

**CYP2B6 の阻害を介したシクロホスファミドと  
ボリコナゾールの薬物相互作用に関する検討**

2021 年

千葉大学大学院 医学薬学府 先端医学薬学専攻

臨床薬理学研究室

柴田 侑裕

## 目次

略号一覧	1
緒言	3
第1章 In vitro カクテル法を用いた CYP 8 分子種に対する阻害の一斉評価	
序文	5
実験材料および方法	7
1. 材料	
2. HLM を用いた CYP 基質カクテルの代謝反応	
3. IC50 shift assay を組み合わせることによる in vitro カクテル法での Time-dependent inhibition の検出	
4. LC-MS/MS による代謝物濃度の定量	
5. IC50 値の推定結果	
結果	17
1. CYP 阻害薬 8 化合物および農薬 4 化合物の IC50 値の評価	
2. IC50 shift assay を組み合わせた Time-dependent inhibition の検出	
考察	22
第2章 マウスを用いた cyclophosphamide と voriconazole の薬物動態学的相互作用の評価	
序文	27
実験材料および方法	28
1. 材料	
2. 動物	
3. Cyclophosphamide による脱毛の評価	
4. 全血中薬物濃度測定	
5. Cyclophosphamide による白血球減少症の評価	

結果	31
1. Voriconazole の併用が cyclophosphamide の薬物動態に与える影響	
2. Voriconazole による cyclophosphamide 誘発脱毛の抑制効果	
3. Voriconazole による cyclophosphamide 誘発白血球減少の抑制効果	
考察	37
第3章 有害事象自発報告データベースを用いた薬物相互作用の検出	
序文	39
実験材料および方法	43
1. 有害事象自発報告データベースの解析	
結果	45
1. Cyclophosphamide の副作用に関するデータベース解析	
考察	49
補遺 マウス肝ミクロソームを用いたシクロホスファミドとボリコナゾールの in vitro 相互作用試験	
序文	50
実験材料および方法	51
1. 材料	
2. マウス肝ミクロソームを用いた 4-hydroxy cyclophosphamide の生成	
3. LC-MS/MS による代謝物濃度の定量	
4. Voriconazole による 4-hydroxy cyclophosphamide 生成阻害率の算出	
結果	54
1. Voriconazole による 4-hydroxy cyclophosphamide の生成阻害	
考察	55
総括	56

参考文献	58
謝辞	63
論文目録	64
学位論文審査	65

## 略号一覧

AUC: Area under the concentration-time curve

NADP<sup>+</sup>: β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate

BSA: Bovine serum albumin

CXP: Collision cell exit potential

CE: Collision energy

CPM: Cyclophosphamide

CYP: Cytochrome P450

DP: Declustering potential

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DI: Drug interaction

EP: Entrance potential

ECZ: Epoxiconazole

EDTA: Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid

FAERS: FDA Adverse Event Reporting System

FRM: Fenarimol

FCZ: Fluconazole

FVX: Fluvoxamine

G6P: D-glucose 6-phosphate

G6PDH: D-glucose 6-phosphate dehydrogenase

HPLC: High performance liquid chromatography

HLM: Human liver microsomes

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IC<sub>50</sub>: 50% Inhibition Concentration

K<sub>i</sub>: Inhibition constant

ICZ: Itraconazole

JADER: Japanese Adverse Drug Event Report database

LC-MS/MS: Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry

C<sub>max</sub>: Maximum drug concentration

MedDRA: Medical Dictionary for Regulatory Activities

MCZ: Miconazole

MLK: Montelukast

N.I.: not inhibited

PBS: Phosphate-buffered saline

PT: Preferred term

PRR: Proportional Reporting Ratio

PCZ: Prothioconazole

TCZ: Tebuconazole

TDI: Time-dependent inhibition

VCZ: voriconazole

## 緒言

Cytochrome P450 (CYP) による酸化的代謝は薬物代謝の主要な経路であり、最近発売された薬剤や米国で処方されている薬剤の上位 200 品目の約半数が CYP によって代謝されていることが報告されている[1]。薬物、食品成分、汚染物質などが CYP を可逆的または不可逆的に阻害し、阻害剤がない場合には本来 CYP で代謝されるはずの量に相当する程度まで薬物の血中濃度が上昇する薬物相互作用 (DI) が起こる場合がある。重篤な DI を防止するために、最近、欧米や日本の医薬品規制当局は、新薬開発における DI のリスクを適切に評価するためのガイドラインを発表している[2-4]。

これらのガイドラインやガイダンスでは、CYP 阻害を介した相互作用のリスクを評価するために、新薬開発の初期段階で、ヒト肝ミクロソームや発現系ミクロソーム、あるいはヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝阻害実験を実施することが求められている。なお、臨床試験は、これらの *in vitro* 試験の結果に基づいて実施されたものであることに留意すべきである。したがって、*in vitro* 代謝阻害実験を適切な実施は重要な課題で、不適切に行われると本来必要な臨床試験が実施されず、臨床 DI のリスクを見落とす危険性の増大に直結する。また、食品成分や潜在的な汚染物質の安全性を評価することは、これらが CYP を阻害することで薬物誘発性有害事象のリスクを高め、潜在的にホルモンバランスの不均衡を引き起こす可能性があるために重要である[5-8]。 *in vitro* で評価すべき CYP 分子種は、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、および 3A であることは 3 つの規制文書の中で一貫して規定されている。それにもかかわらず、この要件を完全に満たす代表的な CYP 阻害剤は少なく、ほとんどの食品成分や汚染物質については情報がほとんどない。

本研究では、代表的な CYP 阻害剤またはその疑いのある CYP 阻害剤について、*in vitro* カクテル法を用いて複数 CYP 分子種の阻害活性を同時に解析し、CYP 阻害リス

クを系統的に評価することの重要性を実証した（第1章）。この解析の結果では、これまで重篤なDIとの関連性が報告されることがほとんどなかったCYP2B6を大幅に阻害するアゾール系抗真菌薬が存在することに着目した。そこで、CYP2B6に対して強力な阻害作用を示す voriconazole（VCZ）とCYP2B6の基質薬である cyclophosphamide（CPM）との併用による重篤なDIリスクを、動物実験（第2章）と日米の副作用データベースのシグナル検出解析（第3章）により検討した。一連の解析の結果、これまで臨床現場では考慮されてこなかったCPMとVCZを含むCYP阻害薬間のDIのリスクが明らかになった。

## 第1章 In vitro カクテル法を用いた CYP 8 分子種に対する阻害の一斉評価

### 序文

In vitro において試験化合物が CYP に対する阻害活性を持つかどうかを評価する方法はさまざまな方法があり、使用する酵素源によってヒト肝ミクロソームを用いるもの、ヒト肝細胞を用いるもの、評価対象とする酵素の発現系ミクロソームを用いるものに大別することができる[9]。医薬品開発の段階においては、この in vitro 評価で得られる情報をもとに相互作用試験を実施するか否か、またどの医薬品との相互作用試験を実施するかを決定することになる[2-4]ため、適切な DI リスクの評価をするうえで非常に重要な情報となる。しかし、ヒト肝ミクロソームであればより生体内での環境に近い一方で、ロット間が大きく再現性の良い実験結果が得られにくいこと[9]、ヒト肝ミクロソームや発現系ミクロソームを用いた実験では 1 つ 1 つの分子種に対する評価を行った後に、各分子種間での結果の比較を行う際に試験間誤差が存在することなど[9]、それぞれの手法で異なる長所、短所がある。そのため、評価を行う上で最良の手法はまだ確立されておらず、相互作用ガイドライン、ガイダンスにおいてもこれらの酵素源等を利用して試験を行うこと等の概略的な記述に留まっている。

In vitro カクテル法は、ヒト肝ミクロソーム中に各分子種選択的な基質セットを添加して同時に代謝させることで、複数の CYP 分子種への阻害を同時に評価することができる[10]。この方法は、基質を一緒にインキュベートすることで、分子種間の  $K_i$  や  $IC_{50}$  の測定値のばらつきを最小限に抑え、各分子種の阻害活性を比較するのに適している。しかしながら、基質を複数混合することによる意図しない活性の干渉を防いだり、多数の代謝物を一斉に精度良く定量評価する手法が必須になったりと、カクテル法独特の問題点もある。これまでに様々な分子種の組み合わせ、基質薬の組み合わせでの方法が提唱されているが、本検討では Spaggiari ら[11]が報告した方法をもとに、いくつかの修正を加えて実験系を構築したのち、CYP 阻害薬 8 化合物と農薬 4 化合物

の評価を行った。

また、CYP に対して不可逆的な阻害を示す化合物は、通常の *in vitro* の可逆的な阻害を評価する実験で得られた結果以上に強い阻害を示すことがある。これは酵素と反応させた時間に依存してその阻害の強さが増強するため、**Time-dependent inhibition (TDI)** と呼ばれる[12]。そのため、本研究では重大な DI リスクを見落とさないために構築した *in vitro* カクテル法に **IC<sub>50</sub> shift assay** と呼ばれる TDI を検出するための評価法を組み合わせることが可能かどうかについても検証した。

## 実験材料および方法

### 1. 材料

Prothioconazole は BLD Pharmatech (Pudong New Area, Shanghai, China) から購入した。1'-Hydroxymidazolam、6 $\beta$ -hydroxytestosterone、dextroprhan、sulfaphenazole は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。Acetonitrile for LC-MS grade、bupropion、dextromethorph、dichrofenac、dimethyl sulfoxide、ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-2Na)、fenarimol、fluconazole、formic acid、itraconazole、methanol、MgCl<sub>2</sub>、midazolam、phenacetin、tebuconazole、testosterone は Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) から購入した。Epoxiconazole、miconazole は、LKT Laboratories (St. Paul, MI, USA) から購入した。HEPES buffer は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。N-Desethylamodiaquine は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) から購入した。Pooled human liver microsomes (Xtreme 200 Human Liver Microsomes (HLM)、200-donor pool、mixed gender、catalog # H2610、lot no. 1410230) は Sekisui XenoTech (Kansas City, Kansas, USA) から購入した。Acetaminophen、D-glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)、D-glucose 6-phosphate disodium salt hydrate (G6P)、fatty acid free BSA、 $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate (NADP<sup>+</sup>) は Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA) から購入した。7-Hydroxycoumarin、amodiaquine、coumarin、fluvoxamine、montelukast、omeprazole、quinidine、sulfadimethoxine、voriconazole は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。4'-Hydroxydichlofenac、5-hydroxyomeprazole、hydroxybupropion は Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada) から購入した。

### 2. HLM を用いた CYP 基質カクテルの代謝反応

インキュベーション実験用のチューブおよびチップは、吸着を避けるために、あらかじめすべてシリコナイズ処理されたものを深江化成株式会社 (Hyogo, Japan) から購入し、実験に用いた。9種類の基質の混合物 (phenacetin 3  $\mu$ M (最終濃度)、coumarin 2  $\mu$ M、bupropion 0.5  $\mu$ M、amodiaquine 0.5  $\mu$ M、diclofenac 1  $\mu$ M、omeprazole 1  $\mu$ M、dextromethorphan 1  $\mu$ M、midazolam 1  $\mu$ M、testosterone 1  $\mu$ M) および内部標準 (sulfadimethoxine 50 ng/mL) を、溶解度に応じて種々の濃度に調整した阻害剤 (voriconazole、fluconazole、miconazole、montelukast、sulfaphenazole、fenarimol : 0.01 ~ 100  $\mu$ M、quinidine、prothioconazole、epoxiconazole、tebuconazole : 0.01-10  $\mu$ M、itraconazole : 0.01-1  $\mu$ M) の存在下、もしくは非存在下において、NADPH 再生系、pooled HLM 0.2 mg protein/mL、50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4)、0.1% w/v fatty acid-free BSA を混和してインキュベートした。今回使用した化合物の構造を Fig. 5 および 2 に示した。混合液の最終容量は 200  $\mu$ L とした。すべての代謝実験はトリPLICATEで行った。すべての阻害剤および農薬は DMSO 中のストック溶液として調製し、methanol で希釈し、200 倍希釈で混合物に添加した。methanol および DMSO の最終濃度は、それぞれ 0.5% (v/v) および 0.01% (v/v) 以下に抑えた。NADPH 再生系は最終濃度が 1 mM NADP<sup>+</sup>、1 U/mL G6PDH、3 mM G6P、1 mM EDTA-2Na、および 3 mM MgCl<sub>2</sub> となるように調整したものをを用いた。37°C で 3 分間インキュベートした後、NADPH 再生系を添加して CYP 反応を開始した。15 分間インキュベートした後、50  $\mu$ L の混合物を分取し、200  $\mu$ L の氷冷した acetonitrile と混和し、激しく攪拌することで反応を停止させた。沈殿したタンパク質を遠心分離 (15 分、12,000 g、4°C) によって除去した。遠心分離で得られた上清のうち 100  $\mu$ L を LC-MS/MS による代謝物濃度測定に使用した。

### 3. IC<sub>50</sub> shift assay を組み合わせることによる in vitro カクテル法での Time-dependent inhibition の検出

TDI を評価するための実験系では IC<sub>50</sub> shift assay[13]を 2. に組み合わせた。pooled HLM 2.0 mg protein/mL、50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4)、0.1% w/v fatty acid-free BSA と verapamil もしくは imatinib を 0.1 ~ 1000 $\mu$ M で、総液量が 50  $\mu$ L となるよう混和したものを 30 分間インキュベーションし、そこから 20  $\mu$ L 分取したものを 10 倍希釈となるように 2. で示した基質薬カクテルと混和し、さらに 15 分インキュベーションしたものを with-preincubation サンプルとして処理し、代謝物濃度を測定した。

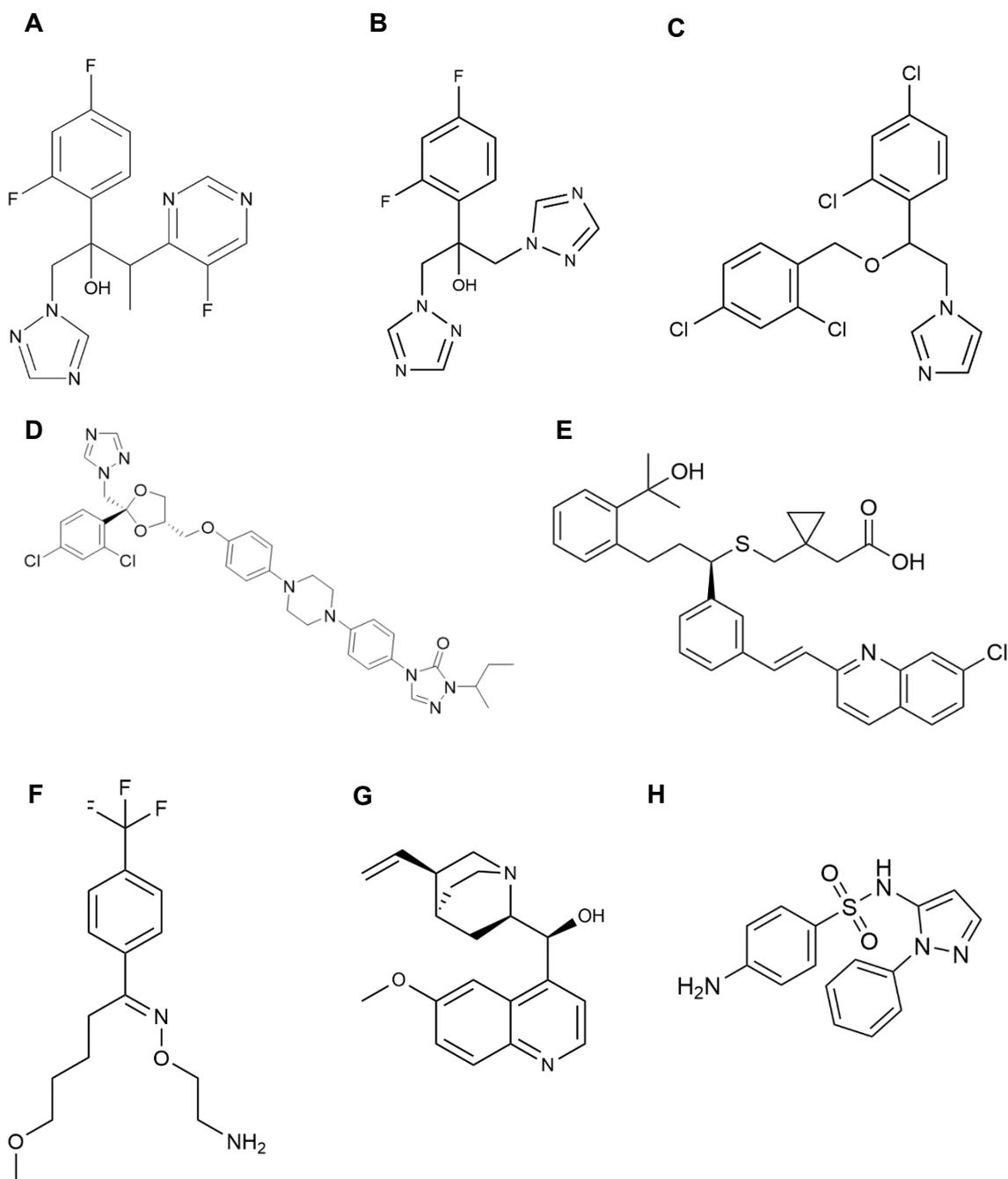
### 4. LC-MS/MS による代謝物濃度の定量

すべての測定は、Prominence HPLC システム (Shimadzu) および QTRAP 4500 システム (AB SCIEX) を使用した。HPLC による分離では Kinetex EVO C18 カラム (Phenomenex、2.6  $\mu$ m、150 mm  $\times$  2.1 mm) および Kinetex EVO C18 ガードカートリッジ (Phenomenex、2.6  $\mu$ m、2.1 mm) を使用して分離した。総流量は 0.3 mL/min とした。バイナリポンプを使用し、A 液 : 0.1% formic acid aq.、B 液 0.1% formic acid in acetonitrile とし、A:B の送液比率を 0 min で 95 : 5、0.3 min で 95 : 5、0.4 min で 82 : 18、1 min で 80 : 20、2 min で 74 : 26、2.5 min で 67 : 33、3 min で 55 : 45、3.5 min で 40 : 60、4 min で 20 : 80、4.2 min で 5 : 95、6 min で 5 : 95、6.1 min で 95 : 5、10 min で 95 : 5 となるようにグラジエントを設定し、分離を行った。各マーカー代謝物の MRM パラメータを Table 1 に示した。内部標準との peak height 比から各代謝物濃度を算出した。

### 5. IC<sub>50</sub> 値の推定

各 CYP 分子種特異的なマーカー反応として CYP1A2 : phenacetin  $\rightarrow$  acetaminophen、

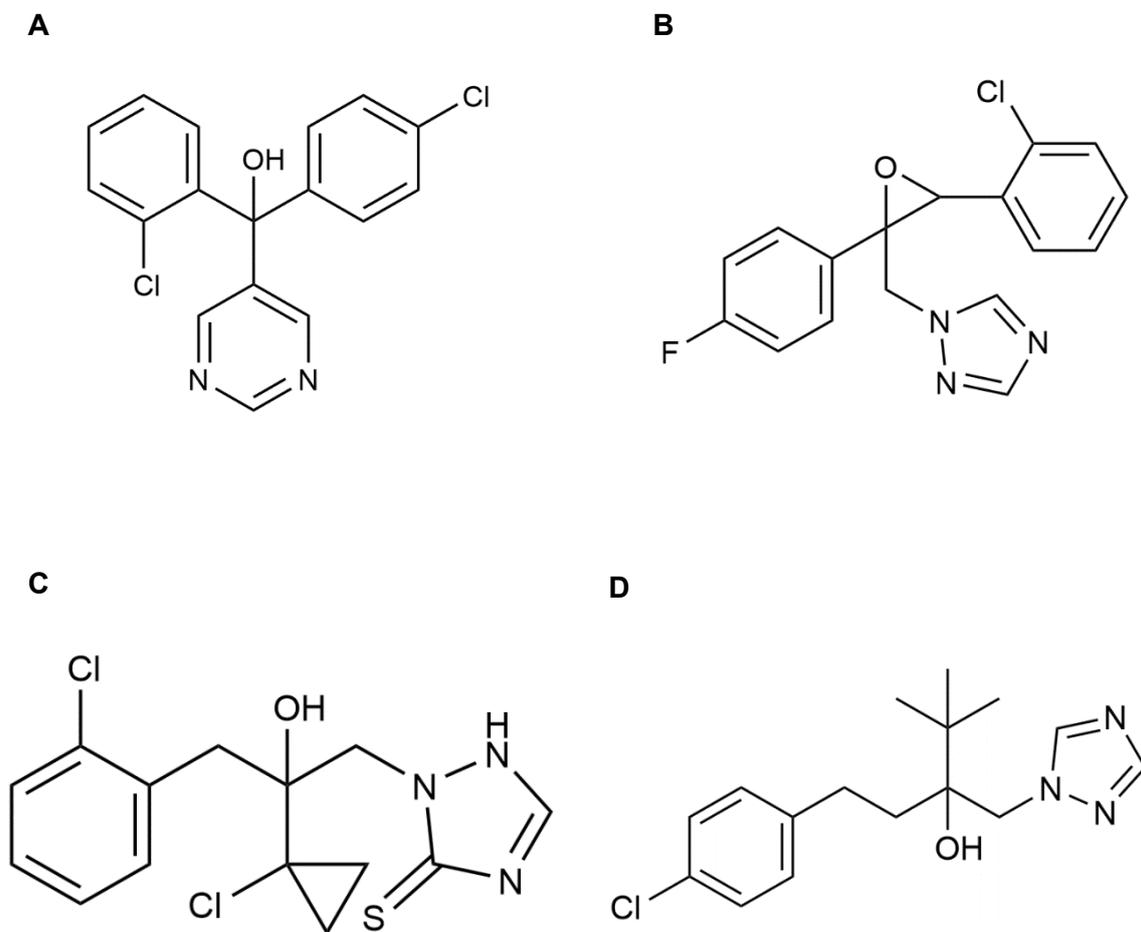
CYP2A6 : coumarin → 7-hydroxycoumarin、CYP2B6 : bupropion → hydroxybupropion、  
CYP2C8 : amodiaquine → N-desethylamodiaquine、CYP2C9 : diclofenac → 4'-  
hydroxydiclofenac、2C19 : omeprazole → 5-hydroxyomeprazole、CYP2D6 :  
dextromethorphan → dextrorphan、CYP3A は midazolam → 1'-hydroxymidazolam、  
testosterone → 6β-hydroxytestosterone の 9 つの反応を用いた。反応と構造式は Fig. 3 に  
示した。阻害率は、代謝物の生成量を y 軸、反応時間を x 軸として原点を通る回帰直  
線を最小二乗法によって求めたのち、阻害薬の有無でのそれぞれの回帰直線の傾きの  
比から算出した。各阻害薬濃度で算出された阻害率の数値と阻害薬濃度からシグモイ  
ド型の阻害曲線を非線形最小二乗法によって算出した。それぞれの計算には R software  
(ver.4.0.0) と GraphPad Prizm 5 software (GraphPad Software, Inc.)を用いた。



**Fig. 1 The structure formula of 8 CYP inhibitors**

Each 2D structure were drawn using ChemDraw software (ver. 20.1.1.125, PerkinElmer).

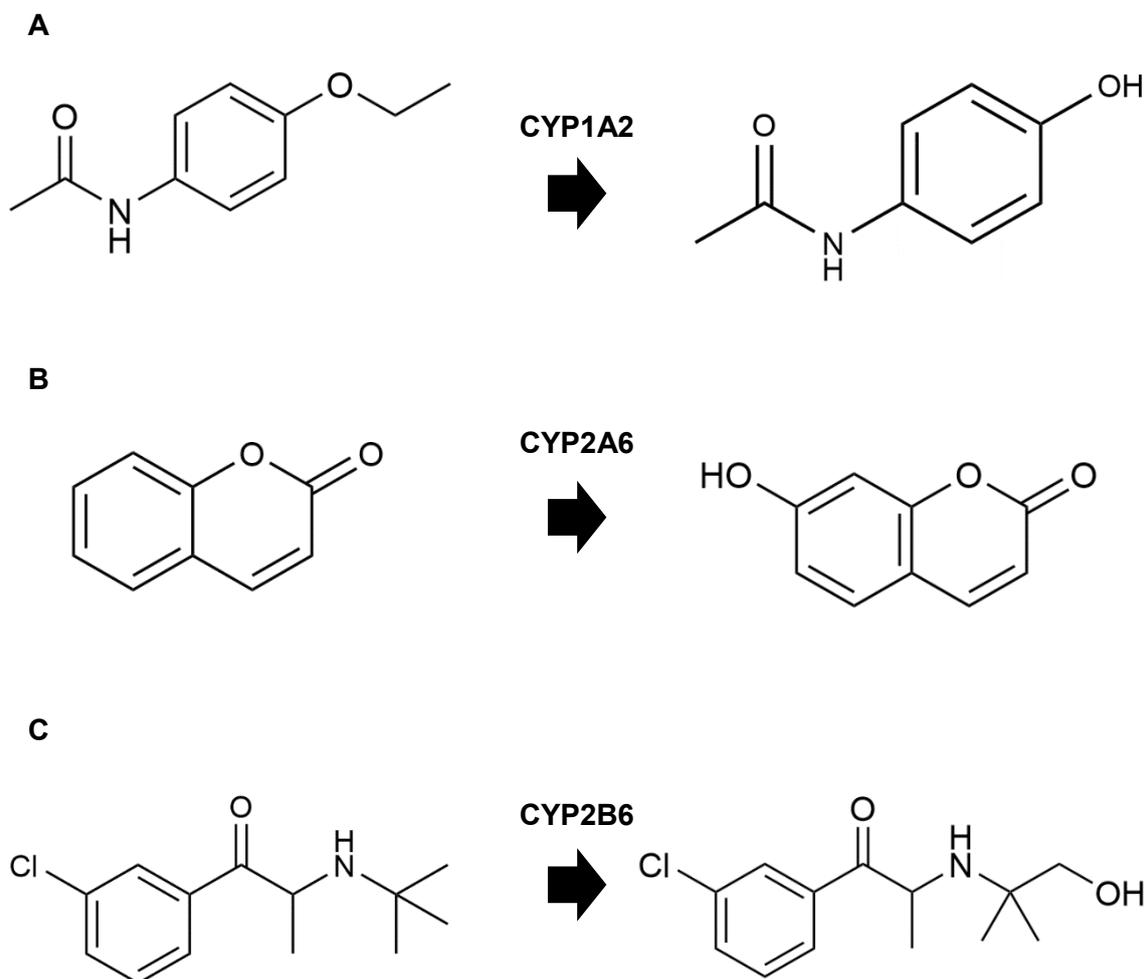
A: VCZ, B: FCZ, C: MCZ, D: ICZ, E: MLK, F: FVX, G:QND, H:SFZ. Compounds for which the stereo configuration was not specified in the structural formula were used as racemic mixtures.



**Fig. 2 The structure formula of 4 pesticides**

Each 2D structure were drawn using ChemDraw software (ver. 20.1.1.125, PerkinElmer).

A: FRM, B: ECZ, C: PCZ, D: TCZ. Compounds for which the stereo configuration was not specified in the structural formula were used as racemic mixtures.

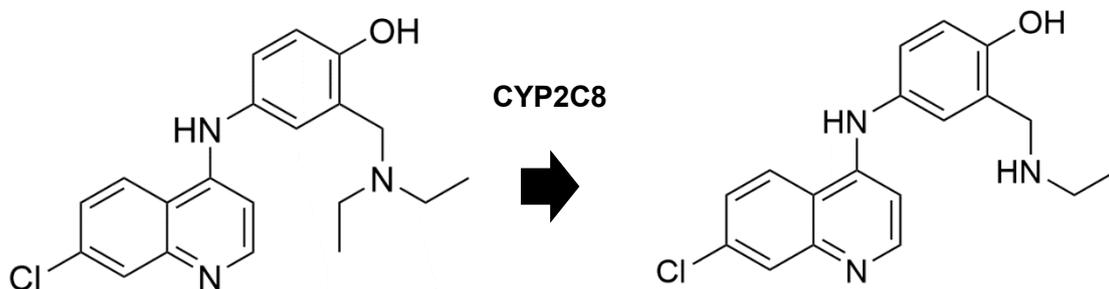


**Fig. 3 The structure formula of 9 marker reactions**

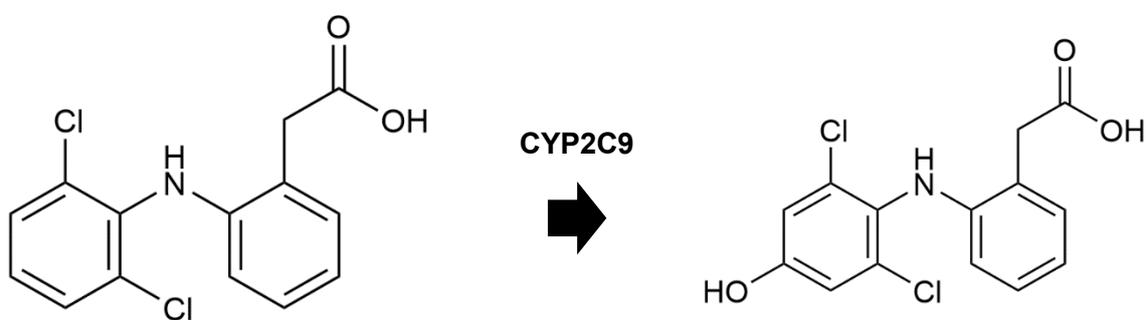
Each 2D structure were drawn using ChemDraw software (ver. 20.1.1.125, PerkinElmer).

A: phenacetin -> acetaminophen, B: coumarin -> 7-hydroxycoumarin, C: bupropion -> hydroxybupropion, D: amodiaquine -> N-desethylamodiaquine, E: diclofenac -> 4'-hydroxydiclofenac, F: omeprazole -> 5-hydroxyomeprazole, G: dextromethorphan -> dextroprhan, H: midazolam -> 1'-hydroxymidazolam, I: testosterone -> 6 $\beta$ -hydroxytestosterone. Compounds for which the stereo configuration was not specified in the structural formula were used as racemic mixtures.

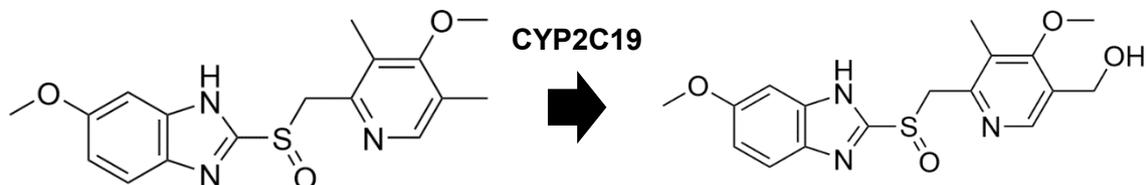
D



E

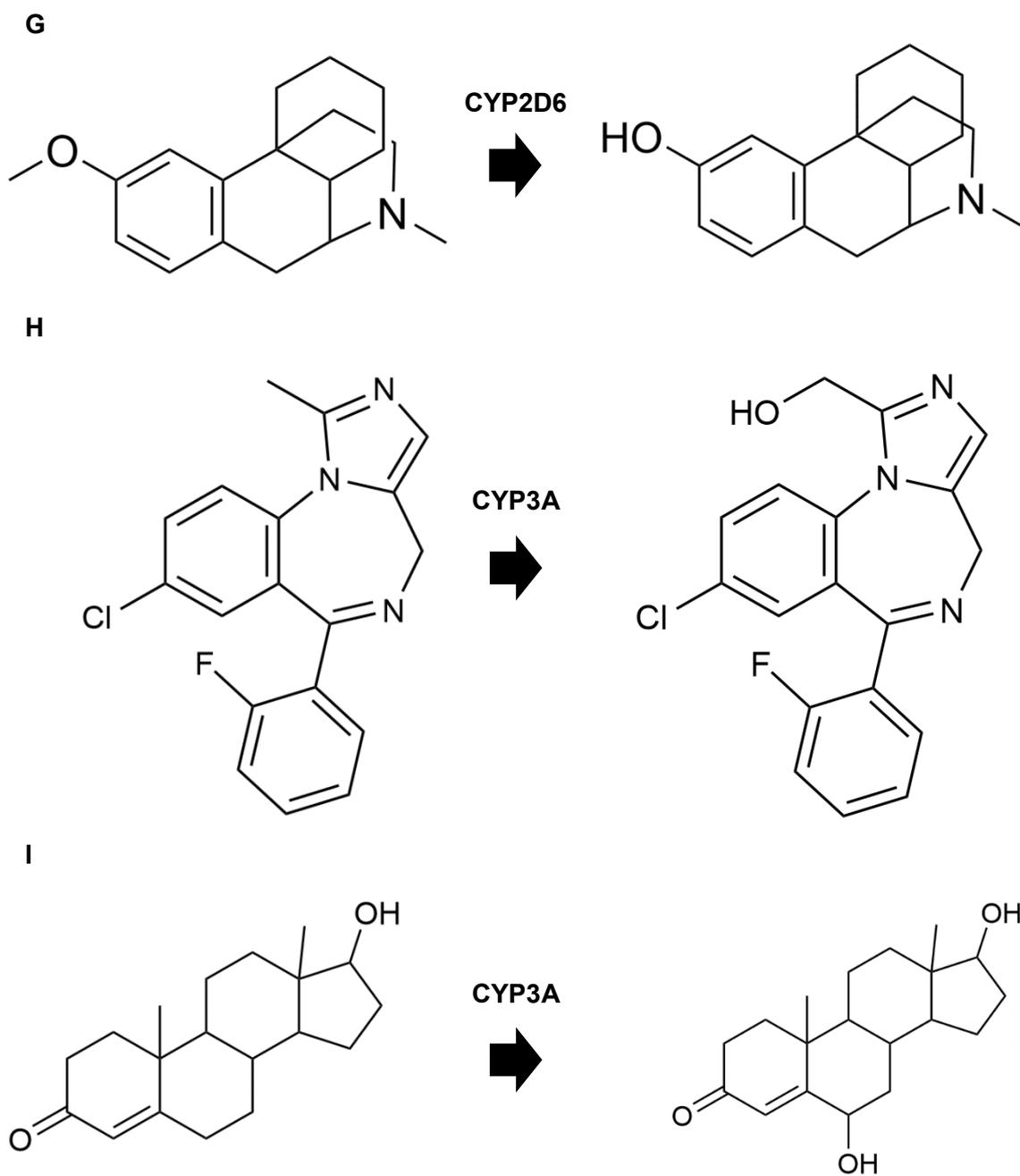


F



**Fig. 3 The structure formula of 9 marker reactions**

Figure legends are as described on the previous page.



**Fig. 3 The structure formula of 9 marker reactions**

Figure legends are as described on the previous page.

**Table 1****MRM transitions of marker metabolites, cyclophosphamide and voriconazole**

compound	Q1	Q3	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
acetaminophen	151.9	109.9	56	10	23	14
7-hydroxycoumarin	163.1	119.3	131	7.03	22.25	5.88
hydroxybupropion	255.9	129.9	66	10	69	12
N-desethylamodiaquine	328	283.1	86	10	30	12
4'-hydroxydiclofenac	312	230	70.88	2.92	36	11.14
5-hydroxyomeprazole	362	214	73.42	10.64	5	7.07
dextrorphan	258	157	101.3	3.47	44	8.81
1'-hydroxymidazolam	341.9	202.9	156	10	33	14
6 $\beta$ -hydroxytestosterone	304.9	269.1	101	10	21	12
sulfadimethoxine	311.2	155.9	95.7	3.61	27.3	10.16
cyclophosphamide	260.9	139.9	70	10	27	13
voriconazole	350.1	127	77.8	7.29	47.73	6.36

DP: declustering potential. EP: entrance potential. CE: collision energy. CXP: collision cell exit potential

## 結果

### 1. CYP 阻害薬 8 化合物および農薬 4 化合物の IC<sub>50</sub> 値の評価

VCZ は CYP2B6 に対して非常に強い阻害作用を示し、IC<sub>50</sub> 値は 0.12 $\mu$ M であった (Table 2)。これは CYP3A (IC<sub>503A</sub> : 1.85 $\mu$ M) の 15.4 倍の阻害力を示した。FCZ は CYP2C19 を阻害し、miconazole は CYP3A と同程度に CYP2B6 および 2C19 を阻害した。一方、別のアゾール系抗真菌薬である ICZ は、CYP3A に対して強い選択的な阻害作用を示した (IC<sub>503A</sub> : 0.04 $\mu$ M) (Table 2)。fluvoxamine、montelukast、sulfaphenazole、quinidine は、予想通り、それぞれ CYP1A2、2C8、2C9 および 2D6 に対して強い阻害作用を示した (Table 2)。ピリミジン系農薬の fenarimol、アゾール系農薬の epoxiconazole、prothioconazole、tebuconazole は複数の CYP 種に対して強い阻害作用を示し、最も強く阻害された種の IC<sub>50</sub> 値は 1  $\mu$ M 以下であった (Table 3)。

### 2. IC<sub>50</sub> shift assay を組み合わせた Time-dependent inhibition の検出

verapamil および imatinib について、プレインキュベーションの有無それぞれにおける CYP8 分子種に対する IC<sub>50</sub> 値と IC<sub>50</sub> shift 値を Table 4 にまとめた。マーカー基質と反応させる前に 30 分間、阻害薬と HLM でのプレインキュベーションを行うことで verapamil の IC<sub>50</sub> 値が 10 倍以上変動することを確認した (IC<sub>503A,midazolam</sub> : 11.8 倍、IC<sub>503A,testosterone</sub> : 18.0 倍、Table 4)。imatinib でも同様に CYP3A の IC<sub>50</sub> shift は見られた (IC<sub>503A,midazolam</sub> : 8.75 倍、IC<sub>503A,testosterone</sub> : 1.61 倍、Table 4) もの、他の分子種に対する

IC<sub>50</sub> shift 値は 1 を大きく下回った (0.17 ~ 0.62)。

**Table 2**

**IC<sub>50</sub> values of various inhibitors for each CYP isoenzyme evaluated from the in vitro HLM cocktail incubation method**

CYP isoenzymes	IC <sub>50</sub> (μM)							
	VCZ	FCZ	MCZ	ICZ	FVX	MLK	SFZ	QND
CYP1A2	>100	N.I.	25.7	N.I.	0.13	N.I.	N.I.	N.I.
CYP2A6	61.6	N.I.	3.92	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
CYP2B6	0.12	46.8	0.02	(3.3)	2.85	24.6	N.I.	N.I.
CYP2C8	98	N.I.	0.86	N.I.	94.3	0.17	(675)	N.I.
CYP2C9	4.7	12.8	0.66	N.I.	34.5	9.8	0.38	N.I.
CYP2C19	3.8	2.13	0.05	N.I.	3.04	18.6	N.I.	N.I.
CYP2D6	>100	N.I.	0.35	N.I.	1.48	16.6	N.I.	0.2
CYP3A (midazolam)	1.85	2.93	0.06	0.04	N.I.	35.5	N.I.	N.I.
CYP3A (testosterone)	2.9	2.18	0.08	0.04	35.5	18.1	<100*	N.I.

CYP species and estimated IC<sub>50</sub> values of azole antifungals and other CYP inhibitors are shown here. If the inhibition ratio was lower than 50% at the highest tested concentration of the inhibitor and IC<sub>50</sub> estimation was not converged, we marked the IC<sub>50</sub> value as N.I. (=not inhibited). If the estimated IC<sub>50</sub> value was higher than the highest tested concentration, the IC<sub>50</sub> value was denoted in parenthesis. \* : The inhibition ratio was higher than 50% at the highest tested concentration but IC<sub>50</sub> estimation was not converged.

**Table 3****IC<sub>50</sub> values of pesticides for each CYP isoenzyme evaluated from the in vitro HLM cocktail incubation method**

CYP isoenzymes	IC <sub>50</sub> (μM)			
	FRM	ECZ	PCZ	TCZ
CYP1A2	N.I.	4	N.I.	(27.9)
CYP2A6	6.74	N.I.	N.I.	N.I.
CYP2B6	1.56	0.66	0.55	1.68
CYP2C8	6.62	(15.9)	2.51	N.I.
CYP2C9	6.29	N.I.	1	0.83
CYP2C19	0.58	0.69	1.73	0.25
CYP2D6	12.3	(10.7)	N.I.	(13.8)
CYP3A (midazolam)	0.1	1.97	N.I.	0.27
CYP3A (testosterone)	0.11	2.15	13.3	0.17

CYP specie and estimated IC<sub>50</sub> values of pesticides are shown here. If the inhibition ratio was lower than 50% at the highest tested concentration of the inhibitor and could not be used to estimate the IC<sub>50</sub>, we marked the IC<sub>50</sub> value as N.I. (=not inhibited). If the estimated IC<sub>50</sub> value was higher than the highest tested concentration, the IC<sub>50</sub> value was denotated in parenthesis. FRM; fenarimol, ECZ; epoxiconazole, PCZ; prothioconazole, TCZ; tebuconazole.

**Table 4****IC<sub>50</sub> values and IC<sub>50</sub> shift values of verapamil and imatinib for each CYP isoenzyme evaluated from the in vitro HLM cocktail incubation method**

CYP isoenzymes	IC <sub>50</sub> (μM)				IC <sub>50</sub> shift	
	with pre-incubation		without-preincubation		VPM	IMT
	VPM	IMT	VPM	IMT		
CYP1A2	72.5	N.I.	36.7	N.I.	0.51	N.I.
CYP2A6	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
CYP2B6	(546)	N.I.	115	N.I.	0.21	N.I.
CYP2C8	45.8	N.I.	13	N.I.	0.28	N.I.
CYP2C9	97.5	N.I.	41.2	N.I.	0.42	N.I.
CYP2C19	(259)	N.I.	(161)	N.I.	0.62	N.I.
CYP2D6	49.8	N.I.	8.4	N.I.	0.17	N.I.
CYP3A (midazolam)	4	31.7	35	(373)	8.75	11.8
CYP3A (testosterone)	8.8	53.4	14.2	(960)	1.61	18.0

CYP specie, estimated IC<sub>50</sub> values and IC<sub>50</sub> shift values of verapamil and imatinib are shown here. If the inhibition ratio was lower than 50% at the highest tested concentration of the inhibitor and could not be used to estimate the IC<sub>50</sub>, we marked the IC<sub>50</sub> value as N.I. (=not inhibited). If the estimated IC<sub>50</sub> value was higher than the highest tested concentration, the IC<sub>50</sub> value was denoted in parenthesis. VPM; verapamil, IMT; imatinib.

## 考察

本研究で構築した *in vitro* カクテル法は、実験間の誤差を気にすることなく、同じ阻害薬の持つ各 CYP 分子種に対する阻害の強さを直接比較することができる。本実験系では incubation mixture に添加する緩衝液として HEPES buffer を使用しているが、代謝実験に用いる buffer によって一部の CYP はその活性が変動することが報告されており [14,15]、CYP 阻害薬の作用も同様に buffer の影響を受ける可能性がある。しかし、本検討で評価された IC<sub>50</sub> 値と先行研究 [19–26] で報告された値に大きな乖離も見られなかったことから、本実験系を用いることで CYP8 分子種に対する阻害の強さを精度よく求めることができ、本実験系においては buffer の影響は大きくないと考えられる。

また、本実験系は Spaggiari らの報告した方法 [11] と異なり、加温に伴って HLM の膜断片から放出される遊離脂肪酸の影響を抑える目的で fatty acid-free BSA を添加している。BSA を添加することで遊離脂肪酸の影響を抑制できることは報告されており、albumin effect と呼ばれている [16–18]。反応系内のタンパク質量が増加するため、基質薬の遊離型濃度が低下するために見かけの代謝速度が低下するが、タンパク結合率で補正すると遊離脂肪酸の影響を抑えることにより反応が通常よりも促進されるというものである。ただし、本実験系で BSA との親和性が非常に高い薬物を評価する場合、遊離薬物濃度が添加した薬物濃度に比べて著しく低くなり、阻害の強さを低く見積もってしまう可能性があることについては留意しなければならない。一般に *in vitro* カク

テル法では複数の基質薬を同時に添加するため、反応の線形性が保たれているかどうか問題となることがあるが、本実験系については当研究室の爲本が基質薬濃度を2倍、もしくは1/2倍にして同様の実験を行い、基質薬の代謝反応が線形領域内にあることを確認している。

VCZがin vivoでCYP3Aを強く阻害することはmidazolamなどのCYP3Aの選択的基質との臨床的相互作用研究から明らかである[27]。そして本検討においてVCZのin vitroでのCYP2B6に対する阻害がCYP3Aに対する阻害よりもはるかに強かったことから、VCZがin vivoでCYP2B6を強く阻害している可能性が高いと考える。また、VCZによるCYP2B6の阻害に加えて、miconazoleのCYP2B6、2C8、2C19、2D6に対する阻害、fluvoxamineのCYP2B6に対する阻害はそれぞれの薬物が臨床において阻害すると注意喚起がされているCYP分子種（miconazole：CYP3A、2C8、fluvoxamine：CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4）に対する阻害と比べても同等以上の阻害を示したにもかかわらず、本邦の添付文書やインタビューフォーム上では注意喚起がなされていなかった。今後、さらに系統的なin vitro実験を行うことで、これまで見過ごされていたDIのリスクが明らかになると考えている。

また、今回評価した4種の農薬はピリミジン骨格やアゾール骨格を持ち、いずれも真菌のもつCYP51（ステロールC-14脱メチル化酵素）を標的としており、臨床で用いられているアゾール系抗真菌薬と同様の作用機序を持つことから、薬物代謝に関与

する CYP を阻害することによる DI のリスクが予想される。しかし、ヒトにおける薬物代謝に関与する CYP に対する阻害の強さはこれまで報告されていなかった。今回評価したいずれの薬剤も複数の CYP 分子種に対して阻害作用を示しており、現在の臨床現場で最も強い DI を引き起こす薬剤に匹敵するものであった。日本では、野菜中の残留農薬の基準は 0.01~10 ppm であり、野菜の日常的な摂取量を考慮すると、これらの農薬がヒトに即時的な薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。しかし、農業従事者や牧草を大量に摂取する家畜の肝臓などでは、代謝作用への配慮が必要かもしれない。

TDI の検出については、CYP3A に対する TDI が知られている verapamil、imatinib を用いて評価をした結果、CYP3A に対する IC<sub>50</sub> 値が、阻害が強くなる方向へ変動することが確認された。このことから、本実験系に IC<sub>50</sub> shift assay を組み合わせることで TDI を検出することが可能であることが示された。しかし、imatinib の結果では CYP3A 以外に対する阻害はむしろプレインキュベーションを行うことで減弱する様子が見られた。これは、プレインキュベーション中に阻害薬が代謝されてしまい、阻害薬濃度が結果に影響を与えるほどに低下してしまっていたためだと考えられる。CYP3A に対する阻害は検出できていることからある程度強い TDI は検出できると考えられるが、TDI の作用がそこまで強くなく、かつ阻害薬自身の代謝が早い薬物については今回設定した 30 分というプレインキュベーション時間が不適切であり、これを短縮すること

で改善する可能性が考えられる。この点に関しては今後、どの程度の TDI までを検出できれば臨床における DI リスクを十分に回避できるのかといった観点も含めてより詳細に検討する必要がある。

**Table 5****Reported  $K_i$  or  $IC_{50}$  values of various inhibitors for each CYP isoenzyme**

CYP isoenzymes	$K_i$ or $IC_{50}$ ( $\mu$ M)							
	VCZ	FCZ	MCZ	ICZ	FVX	MLK	SFZ	QND
CYP1A2	N.I.	N.I.	2.9 3.2*	N.I.	0.02 ~0.2	77.3	N.I.	N.I.
CYP2A6	none	none	0.22*	none	N.I.	none	none	none
CYP2B6	0.34* (1) 0.4* (2)	none	0.5*	none	none	none	none	none
CYP2C8	none	none		none	none	0.10	63	12
CYP2C9	8.4	30.3	2.0	> 10	6~13	0.67	0.30	27
CYP2C19	8.7	12.3	0.33 0.01	> 10	0.5	16	N.I.	6.1
CYP2D6	N.I.	N.I.	6.46 0.7*	N.I.	3.9~16	6.4	N.I.	0.14
CYP3A	2.97 (3) 8.7* (4)	13.1 (4) 10.7* (4) 15~18 (5) >15 (6)	0.07 (4) 0.03* (7)	0.03 (4) 0.02* (3)	8.8	1.2	N.I.	39
Reference	[19][20]	[19][20][21]	[19][20] [21][22]	[19][20] [21]	[23]	[24]	[25]	[26]

Reported  $K_i$  values were showed with \*. (1) : Efavirenz was used as a CYP2B6 substrate. (2) : Bupropion was used as a CYP2B6 substrate. (3) : Midazolam was used as a CYP3A substrate. (4) : Nifedipine was used as a CYP3A substrate. (5) : R-warfarin was used as a CYP3A substrate. (6) : Terfenadine was used as a CYP3A substrate. (7) : Omeprazole was used as a CYP3A substrate.

## 第2章 マウスを用いた cyclophosphamide と voriconazole の薬物動態学的相互作用の評価

### 序文

ナイトロジェンマスタード誘導体の一種であるシクロホスファミド (CPM) は、主に CYP2B6 による代謝活性化を受けて免疫抑制作用と抗悪性腫瘍作用を発揮するプロドラッグである[28,29]。CPM は細胞選択性が低く、細胞分裂の活発な細胞は治療標的でなくてもその影響を受けることはよく知られており、臨床においては骨髄抑制による白血球減少症や脱毛を引き起こす。これらの症状はヒトだけでなくマウスにおいても生じることが報告されている[30,31]。本章では、マウスへ CPM と VCZ を同時に投与することにより、これらの作用が減弱するかどうかを検討した。VCZ にこれらの作用を減弱させるような薬理作用は報告されていないため、これは薬物動態学的相互作用である可能性が高い。そこで、同時に薬物血中濃度の測定も行い、これが薬物動態学的相互作用であることの実証も試みた。

## 実験材料および方法

### 1. 材料

Acetonitrile for LC-MS grade、dimethyl sulfoxide、ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid dipotassium salt dihydrate (EDTA-2K)、formic acid、methanol は Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) から購入した。Corn oil、methyl cellulose は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) は Nissui Pharmaceutical (Tokyo, Japan) から購入した。cyclophosphamide、sulfadimethoxine、voriconazole は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。ワックスシートは Nano Co. Ltd. (Fukuoka, Japan) から購入した。

### 2. 動物

動物を用いた実験は、すべて千葉大学動物実験委員会の承認を受けたプロトコールに従った。全血中薬物濃度測定および脱毛症の評価にはメスの C57BL/6 マウス (10~12 週齢) を、白血球減少症の評価にはオスの ICR マウス (8 週齢) を用いた。マウスは日本 SLC 社から購入し、ケージ内で 25°C、相対湿度 30%~70%、12 時間の明暗サイクル、餌と水を自由に与えた環境下で飼育した。

### 3. Cyclophosphamide による脱毛の評価

マウスの毛を人工的に除去して毛周期を同期させ、脱毛を評価する方法は、Paus R

らによって報告されている[30]。この方法に従い、イソフルラン麻酔下でマウスの背中  
中の毛をバリカンで部分的に刈り取り、残りをワックスシートを用いて物理的に脱毛  
させた。脱毛後9日目に毛根が anagen VI 期に達し、CPM の感受性が高くなったとこ  
ろで、corn oil に懸濁した VCZ を前投薬として 10 mg/kg または 30 mg/kg で腹腔内投与  
した。前投薬の30分後に PBS に溶解した CPM を 150 mg/kg で投与した。投与溶液量  
は、VCZ は 2.5 mL/kg、CPM は 5 mL/kg とした。CPM 投与から30分後にヘマトクリ  
ット毛細管を用いて尾側静脈から約 10~30  $\mu$ L の血液を採取し、第2章実験材料およ  
び方法の4.に示した方法に従って全血中の薬物濃度を評価した。Vehicle 群又は CPM  
単独投与群では、各薬液を同量のコーンオイル又は PBS で代用した。薬物投与から9  
日後（抜毛から数えて18日後）に撮影した写真をもとに、Image J ソフトウェア  
(<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて、抜毛部の平均輝度を測定し、その平均値から脱  
毛の程度を比較した。

#### 4. 全血中薬物濃度測定

第2章実験材料および方法の3.に記載したとおりに採取した血液に、内部標準として  
sulfadimethoxine を含む acetonitrile（内部標準の最終濃度：50 ng/mL）を10倍量加えて  
混合し、よく攪拌してタンパク質を変性させ、薬物を抽出した。その後、15分、  
12,000 g、4 °Cで遠心分離し、上清を回収した。試料を必要に応じて90% acetonitrile  
で希釈し、LC-MS/MSにより CPM および VCZ の濃度を決定した。CPM および VCZ

の MRM 条件は Table 1 に示した。

#### 5. Cyclophosphamide による白血球減少症の評価

白血球減少症の評価は Yoshida M.ら[29]で報告されている方法をもとに行った。マウスに 5% methyl cellulose に懸濁した VCZ を前投薬として 30 mg/kg で腹腔内投与した。その 30 分後に PBS に溶解した CPM (100 mg/kg) を投与した。最終量は、VCZ は 2.5 mL/kg、CPM は 5 mL/kg とした。Vehicle 群または CPM 単独投与群では、各薬液を同量の 5% methyl cellulose または PBS で代用した。薬剤投与 72 時間後に開腹し、下大静脈から全血を採取した。抗凝固剤として EDTA-2Ka を使用した。血球数および白血球分画は、Transgenic INC. (Fukuoka, Japan)に委託して測定を行った。

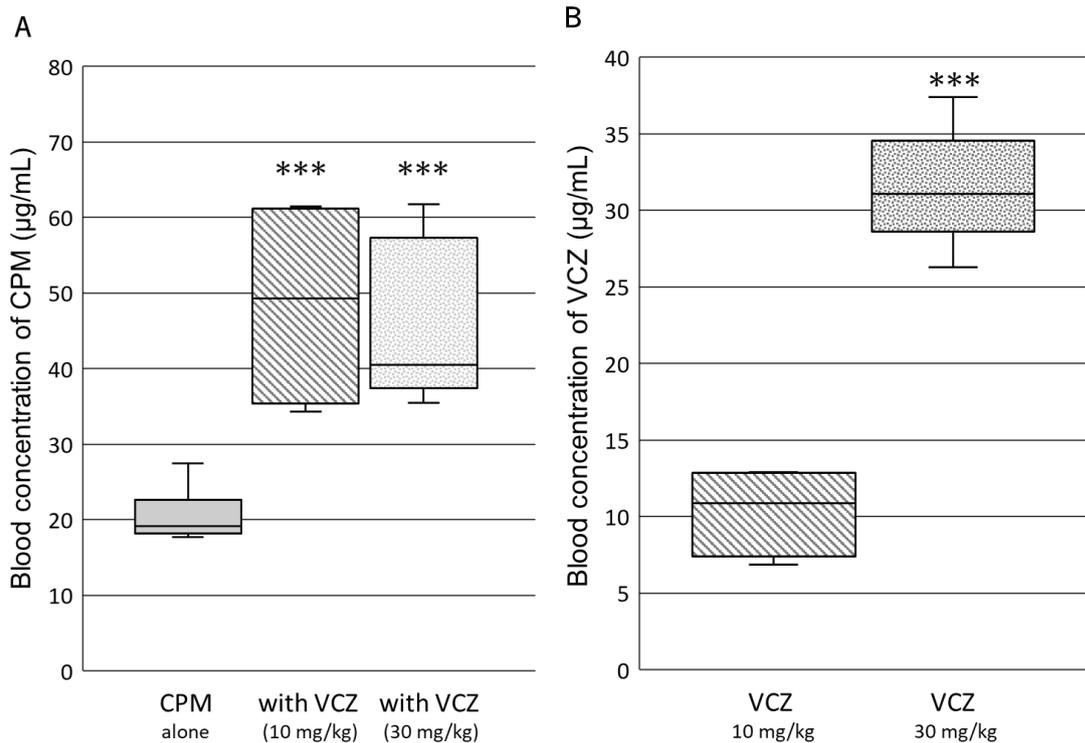
## 結果

### 1. Voriconazole の併用が cyclophosphamide の薬物動態に与える影響

CPM 投与から 30 分後、マウスの全血中に CPM および VCZ の未変化体が検出された (Fig. 3)。VCZ の全血中平均濃度は、10mg/kg 群で 10.4  $\mu\text{g/mL}$ 、30 mg/kg 群で 31.5  $\mu\text{g/mL}$  であった (Fig. 3B)。また、CPM 単独では 20.5  $\mu\text{g/mL}$  であったのに対し、10 mg/kg 及び 30 mg/kg の VCZ 併用群では、CPM 未変化形の平均値が 48.6  $\mu\text{g/mL}$  (237%) 及び 46  $\mu\text{g/mL}$  (225%) に増加した (Fig. 3A)。

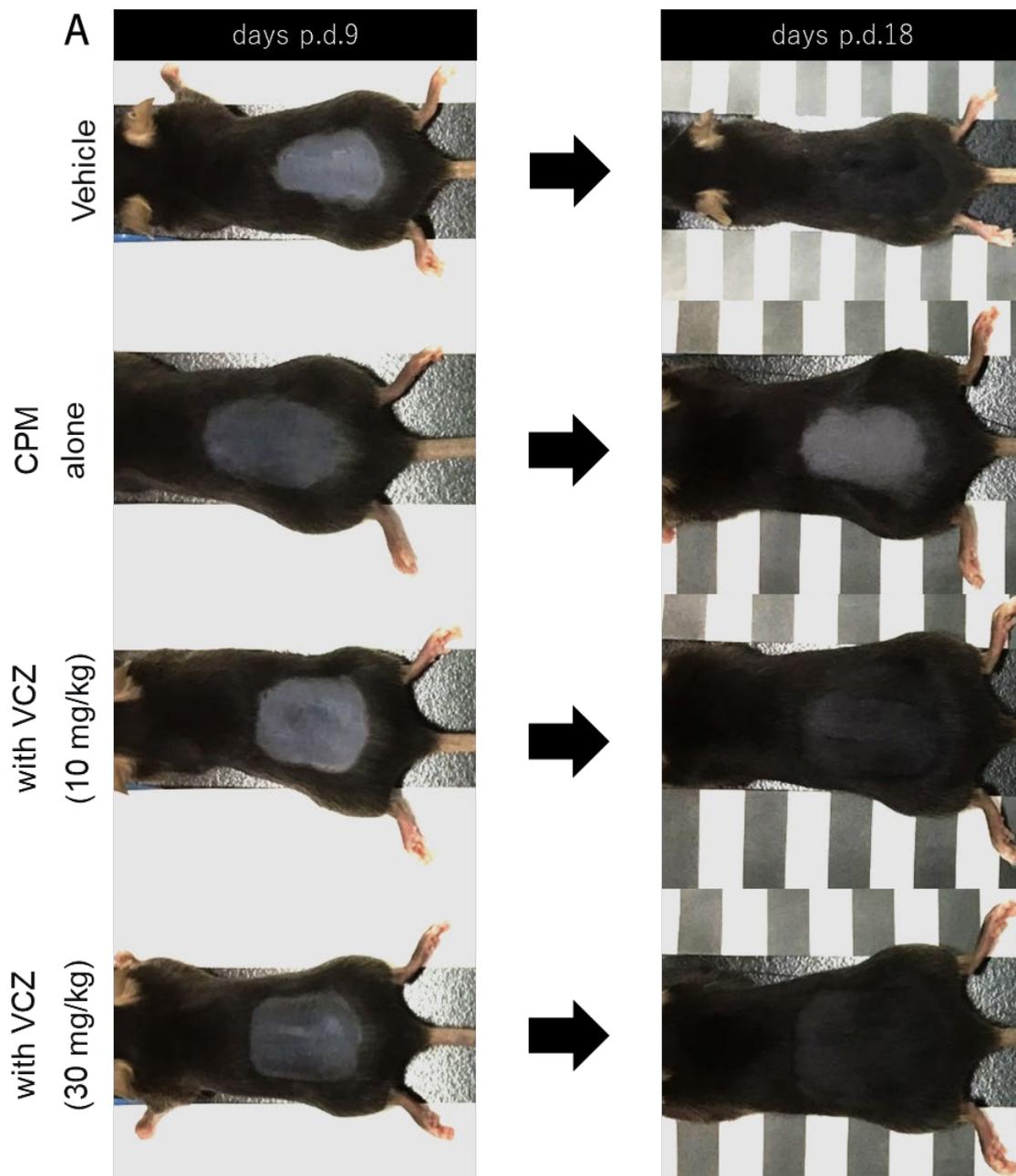
### 2. Voriconazole による cyclophosphamide 誘発脱毛の抑制効果

薬剤投与後 9 日目 (脱毛後 18 日目) の時点で、Vehicle 群のマウスでは抜毛を施した部位に十分な発毛が見られたのに対し、CPM を投与したマウスではほとんどすべて抜け落ちてしまっていた (Fig. 4A)。また、10 mg/kg もしくは 30 mg/kg の VCZ を併用した場合には、これが顕著に抑制された (Fig. 4B)。画像解析ソフトウェアを用いて抜毛部位の輝度を測定した結果、VCZ を併用することで脱毛が 50%程度抑制された。VCZ の投与量が異なる 2 群の間に脱毛の抑制度合いの差は見られなかった (Fig. 5)。



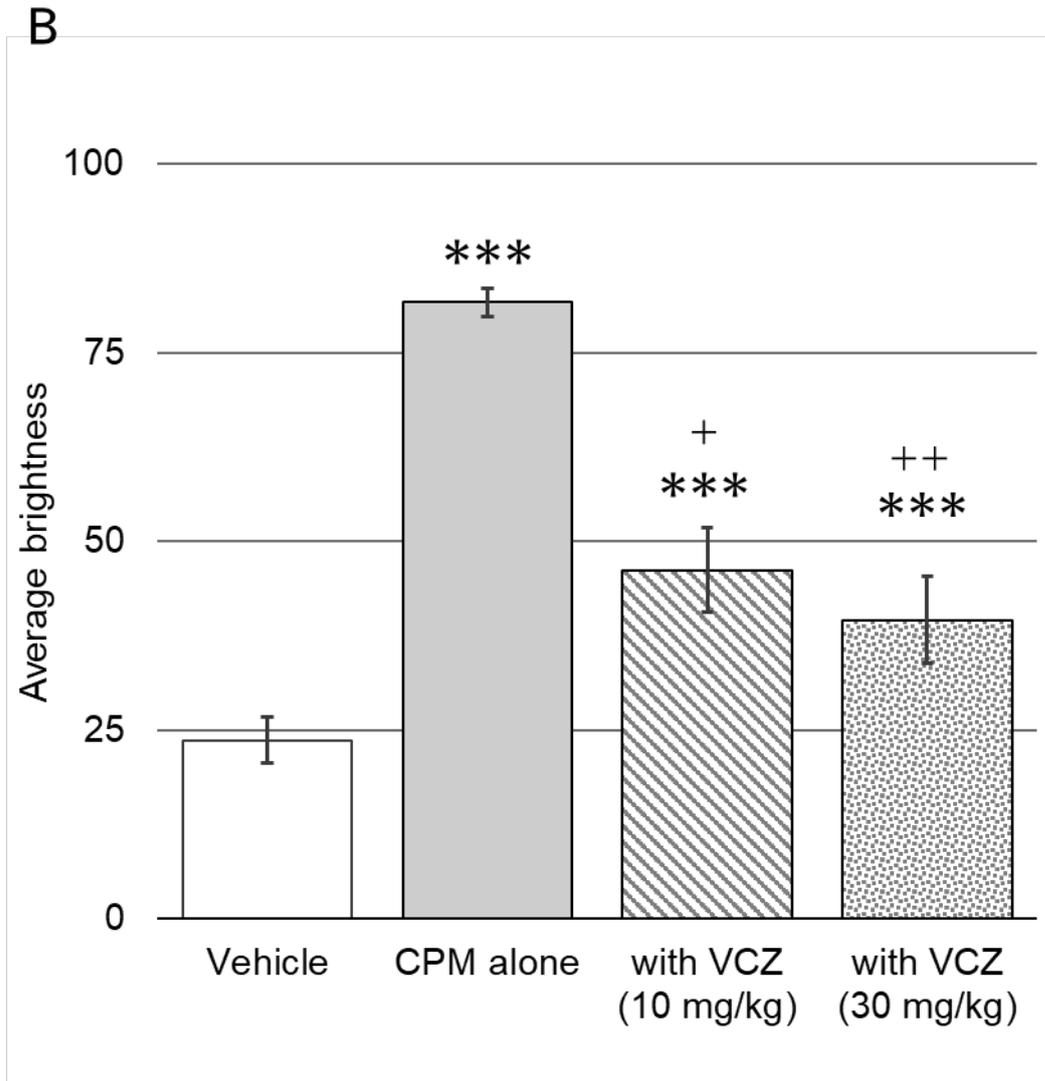
**Fig. 3 Whole-blood concentrations of CPM and VCZ in mice**

Whole-blood concentrations of CPM (Panel A) and VCZ (Panel B) are shown. Gray box represents CPM alone. Striped and dotted boxes represent VCZ at 10 mg/kg and VCZ 30 mg/kg, respectively. Statistical significance: \*\*\*,  $p < 0.005$  by Tukey-Kramer vs CPM alone (Panel A) and by two-sided Student's t-test (Panel B).  $n = 4 \sim 6$ .



**Fig. 4 Effects of VCZ on CPM induced alopecia in mice**

Panel A shows pictures of depilated area at 9 and 18 days post-depilation (p.d.). Panel B (next page) shows average brightness of depilated area at days p.d. 18. Data are shown as mean  $\pm$  standard error. Statistical significance: \*\*\*,  $p < 0.005$  vs vehicle, +,  $p < 0.05$  vs CPM alone, and ++,  $p < 0.01$  vs CPM alone by Tukey-Kramer method.

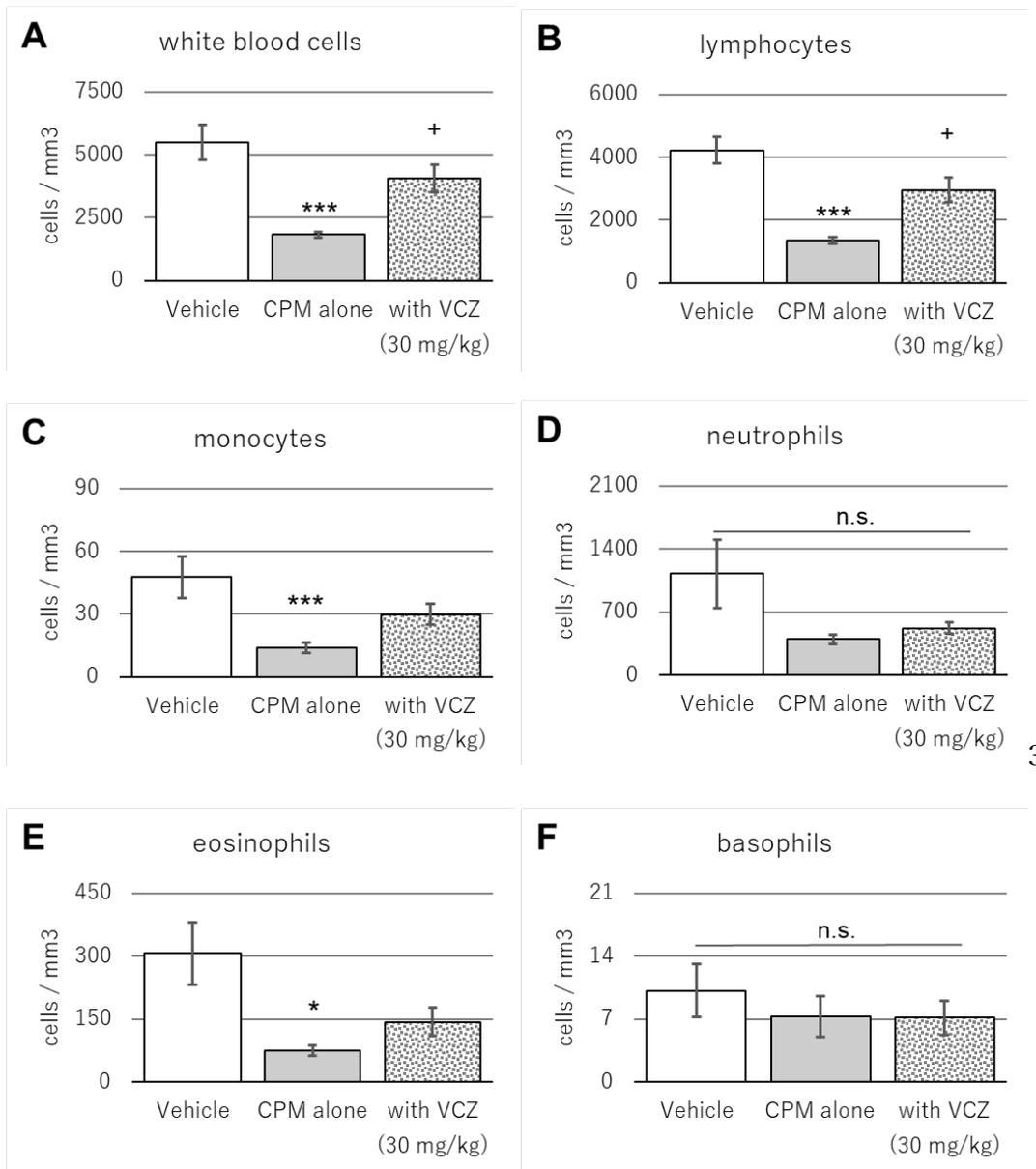


**Fig. 5 Effects of VCZ on CPM induced alopecia in mice**

Figure legends are as described on the previous page.

### 3. Voriconazole による cyclophosphamide 誘発白血球減少の抑制効果

CPM 投与後 72 時間後、マウスの総白血球数は約 3 分の 1 にまで有意に減少した (Fig. 5A)。この減少は VCZ の併用により有意に抑制され、Vehicle 群と VCZ 30 mg/kg 併用群との間に有意な差は認められなかった。各白血球画分については、リンパ球数は総白血球数と同様の有意かつ類似した傾向を示した (Fig. 6B)。単球数、好酸球数、好中球数は VCZ により抑制される傾向にあったが、その差は統計的に有意ではなかった (Fig. 6C-E)。好塩基球数は絶対的に低く、群間での差は認められなかった (Fig. 6F)。



3

**Fig. 6 Effects of VCZ on CPM induced leukopenia in mice**

The number of whole white blood cells (A), lymphocytes (B), monocytes (C), neutrophils (D) eosinophils (E), and basophils (F) are shown. White column shows vehicle group. Gray column shows CPM alone group. Dotted column shows co-administrated CPM and VCZ group. Data are shown as mean  $\pm$  standard error. Statistical significance: \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.005$  vs Vehicle, and +,  $p < 0.05$  vs CPM by Tukey-Kramer method.

## 考察

マウスに CPM と VCZ を併用して投与すると、CPM の血中濃度が 2.3 倍に増加した。VCZ が CPM の血中濃度を上昇させた条件下では、CPM の代謝産物による脱毛作用が抑制されていた。このように、VCZ は薬物動態学的相互作用を介して CPM の安全性や有効性に影響を与える可能性がある。CPM は、毛周期の 3 つの相 (anagen、catagen、telogen) のうち、細胞分裂が繰り返される anagen[31]の毛根にのみ作用する。したがって、毛周期の同調を施していない非脱毛部分では脱毛作用を目視や画像解析で確認することはできなかった。本研究では、2 種類の異なる用量の VCZ を検討したが、VCZ は投与量に比例して血中濃度が増加したのに対し、CPM の血中濃度は用量に比例して上昇しなかった。これは、本検討における採血時間、採血回数が不十分であったか、または 10 mg/kg 用量群での阻害が飽和していたためであると考えられる。脱毛抑制作用にも差が見られなかったことから、後者の可能性が高いと考えている。

マウスでは、VCZ は CPM による白血球数の減少も抑制した。白血球画分のうち、マウスでは特に多いリンパ球について、CPM 単独投与群と VCZ 併用群の間に有意な差が認められた。好中球数は、一般的に寿命が短いことから細胞障害性薬剤の影響を受けやすいと考えられている[31]が、わずかに回復傾向を示したものの、VCZ 併用群で有意な差は認められなかった。これは、予備検討で総白血球数の nadir (最低値) が

確認された時点の評価時点としたため、好中球数の nadir と一致しなかった可能性があることや、本検討で使用した VCZ の用量では好中球減少症の有意な抑制効果が得られなかった可能性がある。

### 第3章 有害事象自発報告データベースを用いた薬物相互作用の検出

#### 序文

第2章において、VCZがCPMと薬物動態学的相互作用を起こす可能性を示した。ヒトでは、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫に対するR-CHOP療法において、CPMの主代謝酵素であるCYP2B6のほか、CYP2C19、CYP3A5の遺伝子多型の影響を評価した臨床試験が報告されている[33]。その結果のうちwild typeと比較してカイ二乗検定で有意な差がみられたものを抜粋し、Table 6とTable 7に示した。CYP2B6のSNPsについては785 A>G (CYP2B6の活性が低下するCYP2B6\*4や\*6などにみられる変異)の変異をもっているとヘテロ、ホモのいずれでも治療応答性、有害事象の発現頻度が低下することが報告されている。また、516 G>T (CYP2B6の活性がするCYP2B6\*6やCYP2B6\*9にみられる変異)を有している場合にはヘテロ、ホモのいずれでも有害事象の発現頻度が有意に低下していた。またそのほかに、CYP2B6以外ではCYP2C19\*2が治療応答性と有害事象の発現頻度を低下させること、CYP3A5\*3が治療応答性を増加させることが報告されている。また、CYP2B6とCYP2B7のfusion geneをもつCYP2B6\*29 (partial deletion allele)とCYP2B6\*30 (duplicated fusion allele)もそれぞれ有害事象の発現頻度を低下させることが報告されている。

第1章で得られたVCZの各CYP分子種に対する阻害プロファイルも併せて考えると、臨床においてCPMとVCZはDIを起こしている可能性が高いと考えられる。こ

の仮説を実証するために、米国 FDA が管理運用する FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) [34]と本邦の PMDA が管理運用する Japanese Adverse Drug Event Report database (JADER) [35]に着目した。これは医療従事者や患者本人などから寄せられた、有害事象とそれに関連する情報を集積したデータベースである。ファーマコビジランスの一環としてこれらの情報から未知の副作用を統計的に検出するための手法が複数開発されており、これらをシグナル検出手法と呼ぶ[36]。今回はシグナル検出手法の 1 つである Proportional Reporting Ratio (PRR) [37]を活用して CPM と VCZ の相互作用の可能性について検証した。

**Table 6****Association of CYP genotype or allele with treatment response**

CYP	Genotype / Allele	Number of non-responders	Number of responders	Odds ratio (95% CI)	p value of chi-square test
CYP2B6 785 A>G	AA	53	242	Reference	< 0.0001
	AG	31	150	0.66 (0.31–0.88)	
	GG	42	49	0.68 (0.29–0.89)	
CYP2C19*2	*1/*1	51	243	Reference	0.001
	*1/*2	48	153	0.47 (0.18–0.62)	
	*2/*2	27	45	0.26 (0.015–0.58)	
CYP3A5*3	*1/*1	33	21	Reference	<0.0001
	*1/*3	39	129	2.84 (1.86–5.54)	
	*3/*3	54	291	0.26 (0.015–0.58)	

This table is based on data extracted from the clinical trial reported by Shu W et al.[33]

**Table 7****Association of CYP genotype or allele with grade 2–4 toxicity**

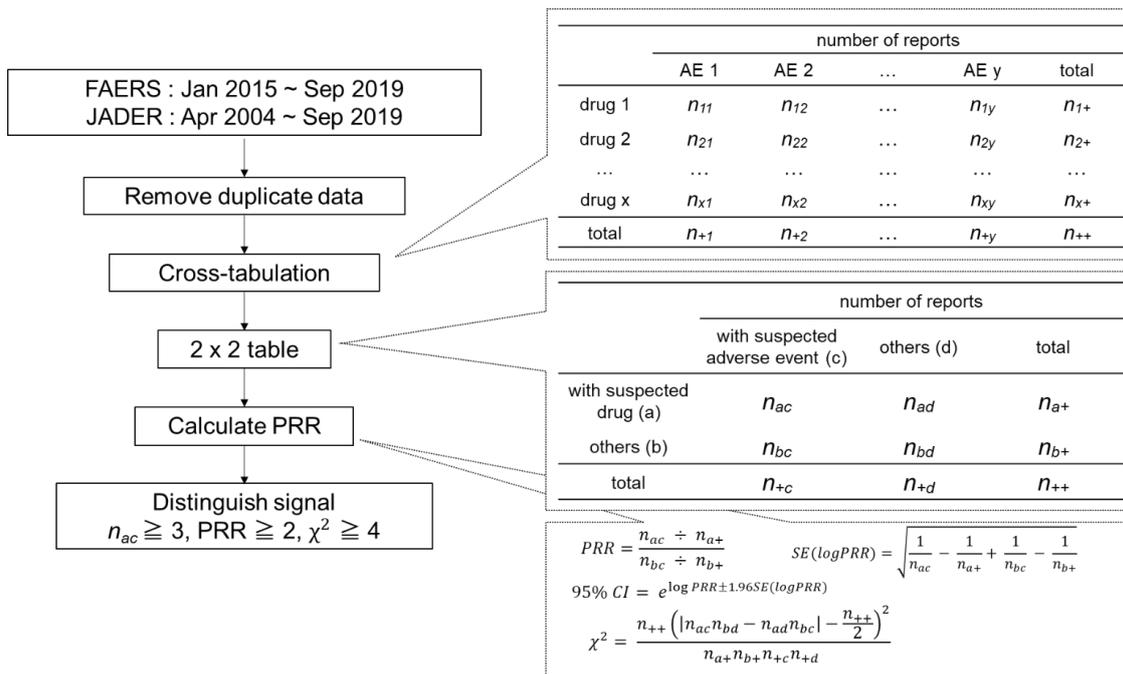
CYP	Genotype / Allele	Number of no grade 2–4 toxicity	Number of grade 2–4 toxicity	Odds ratio (95% CI)	p value of chi-square test
CYP2B6 516 G>T	GG	56	272	Reference	< 0.0001
	GT	92	92	0.67 (0.30–0.81)	
	TT	23	32	0.71 (0.34–0.82)	
CYP2B6 785 A>G	AA	53	242	Reference	< 0.0001
	AG	71	110	0.60 (0.04–0.73)	
	GG	47	44	0.52 (0.02–0.75)	
CYP2C19*2	*1/*1	72	222	Reference	0.001
	*1/*2	66	135	0.65 (0.15–0.84)	
	*2/*2	33	39	0.52 (0.09–0.78)	
CYP2B6 gene copy	*1/*29	9	9	0.78 (0.55–0.82)	0.07
	*1/*1	147	372	Reference	
	*1/*30	15	15	0.75 (0.24–0.87)	

This table is based on data extracted from the clinical trial reported by Shu W et al.[33]

## 実験材料および方法

### 1. 有害事象自発報告データベースの解析

データベースの解析は Fig. 7 に示した手順で行った。FAERS[34]及び JADER[35]から Fig. 7 に示した期間のデータを取得した。各報告に付与された ID をもとに重複情報を削除し、薬効成分名と有害事象ごとにクロス集計表を作成した。有害事象は MedDRA PT に基づいて分類した。Fig. 7 に示すように、比例報告比 (PRR) とその 95%信頼区間、カイ二乗値を算出した。シグナル基準は  $PRR \geq 2$ 、 $カイ二乗 \geq 4$ 、 $nab \geq 3$  とした [37]。CPM とアゾール系抗真菌薬 (VCZ、FCZ、ICZ) を併用した場合は、2 剤を 1 つの被疑薬とみなして集計・計算した。本研究では、群間のシグナルは、95%信頼区間が重ならない場合に有意差があると考えた。これらの集計および統計的解析は、R software (ver.4.0.0) を用いて行った。



**Fig. 7 Method summary of signal detection from JADER and FAERS**

When calculating proportional reporting ratio (PRR) of CPM and azole antifungals combination, we considered each combination of CPM and VCZ, FCZ, or ICZ to be one suspected drug. The signal criteria were according to Evans SJW et al. [37].

## 結果

### 1. Cyclophosphamide の副作用に関するデータベース解析

FAERS と JADER からの報告数を被疑薬と有害事象別にまとめたのが Table 8 である。PRR と 95%信頼区間の値を Fig. 8 に示す。FAERS で報告された 18,745 件の MedDRA PT のうち、1,579 件が CPM との組み合わせでシグナルありと判断された。この中には、CPM の副作用と思われるもののほか、原疾患に起因するものと CPM との併用が一般的な他の薬剤に起因するものが含まれていた。そこで、CPM の有害事象としてよく観察される好中球減少症 (neutropenia)、出血性膀胱炎 (hemorrhagic cystitis)、脱毛症 (alopecia) に着目した。相互作用を比較、評価するためにアゾール系抗真菌薬のうち VCZ、FCZ、ICZ を併用する阻害薬として選択した。Miconazole は第 1 章において VCZ と同様に CYP2B6 を強力に阻害したが、FAERS と JADER では報告数が少ないため、解析しなかった。FAERS では、CPM と VCZ の併用では、好中球減少症 (Fig. 8A) と出血性膀胱炎 (Fig. 8B) の PRR が有意に低下した。また、脱毛症の PRR が CPM 単独の約 1/30 にまで有意に低下し (Fig. 8C)、シグナルが消失した (Table 8)。JADER では、FAERS と同様に VCZ を併用した場合、好中球減少症と出血性膀胱炎の PRR が低下した (Fig. 8D、8E)。しかし、JADER では脱毛症自体の報告数が非常に少なく、シグナルは検出されなかった (Table 8)。HLM 実験で CYP3A および/または CYP2C19 を強く阻害した FCZ および ICZ については、FAERS では脱毛症の

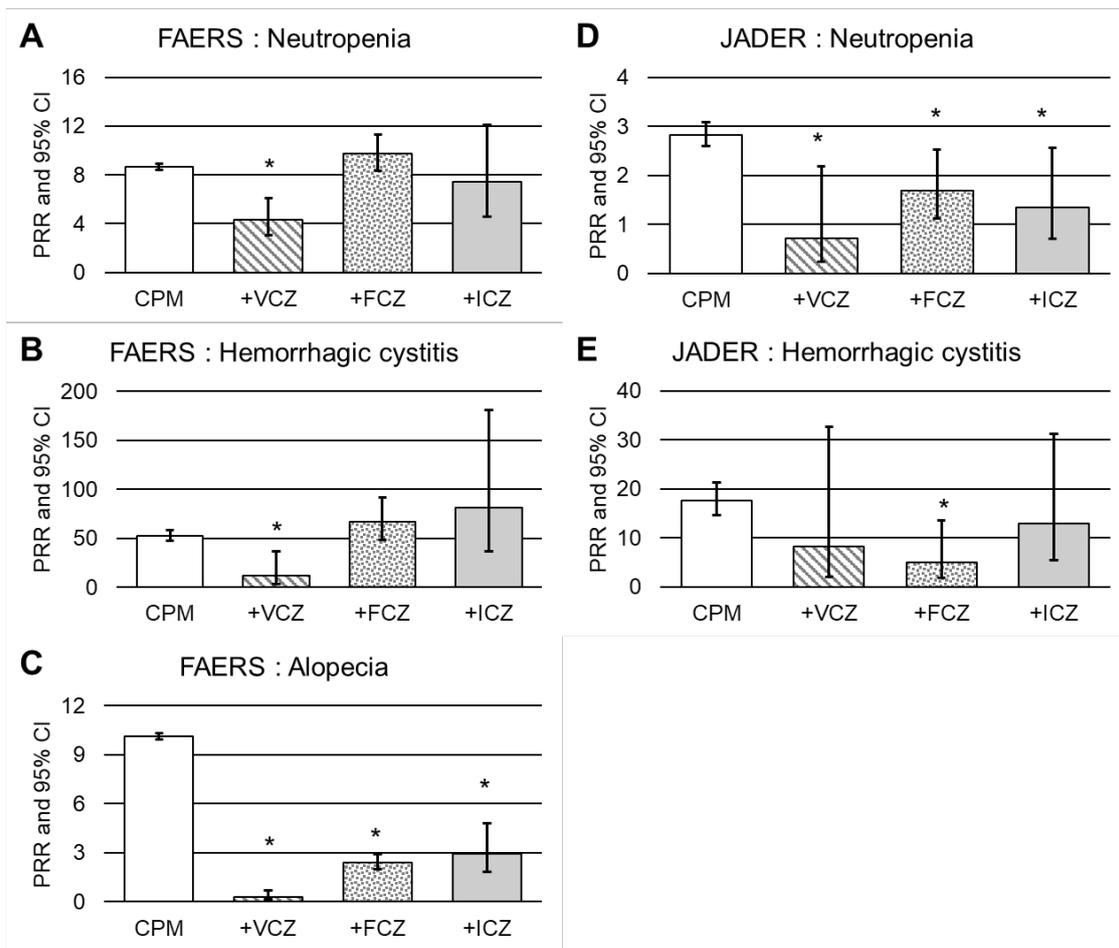
PRR のみが有意に低下したが、脱毛症、好中球減少症および出血性膀胱炎のシグナルは消失しなかった (Fig. 8A、8B、8C)。JADER では、両剤とも好中球減少症と出血性膀胱炎の PRR を低下させ、好中球減少症ではシグナルが消失した (Fig. 8D、8E)。

**Table 8****The number of adverse event reports of CPM from FAERS and JADER**

database	suspected drugs	Number of adverse event reports			
		All	Neutropenia	Hemorrhagic cystitis	Alopecia
FAERS	All	21,013,010	40,050 (0.19%)	1,379 (0.01%)	100,470 (0.48%)
	CPM	260,613	<u>3,931</u> (1.51%)	<u>549</u> (0.21%)	<u>11,352</u> (4.36%)
	CPM with VCZ	3,874	<u>32</u> (0.83%)	<u>3</u> (0.08%)	6 (0.15%)
	CPM with FCZ	8,917	<u>165</u> (1.85%)	<u>38</u> (0.43%)	<u>103</u> (1.16%)
	CPM with ICZ	1,130	<u>16</u> (1.42%)	<u>6</u> (0.53%)	<u>16</u> (1.42%)
JADER	All	915,677	9,302 (1.02%)	539 (0.06%)	421 (0.05%)
	CPM	18,325	<u>508</u> (2.77%)	<u>143</u> (0.78%)	16 (0.09%)
	CPM with VCZ	416	3 (0.72%)	2 (0.48%)	0
	CPM with FCZ	1,349	23 (1.70%)	<u>4</u> (0.30%)	0
	CPM with ICZ	660	9 (1.36%)	<u>5</u> (0.76%)	0

The underline indicates that a signal was detected for a suspected drug compared with the others.

The percentages of the events in all events reported for each drug are shown in parentheses.



**Fig. 8 PRR of neutropenia, hemorrhagic cystitis and alopecia in FAERS and JADER**

Panels A~C shows the results of FAERS. Panels D and E shows the results of JADER. White column shows all reports including CPM. Striped column shows combination with VCZ. Dotted column shows combination with FCZ. Gray column shows combination with ICZ. Data are shown as calculated PRR and 95% confidence interval. Mark \* indicates that there was no overlap in the 95% confidence interval.

## 考察

臨床における CPM と VCZ の相互作用の可能性を検討するために、米国の有害事象報告データベース[34]と日本の有害事象報告データベース[35]の情報を解析した。マウスでは VCZ で脱毛の抑制や免疫抑制効果の低下が観察されたことから、ヒトでは VCZ または類似の CYP 阻害薬と CPM の併用の有無によって有害事象の発現に差が生じるのではないかと考えた。我々は、CPM の一般的な副作用である好中球減少症、出血性膀胱炎、脱毛に着目した[28]。その結果、FAERS では、PRR は CPM 全例では高い傾向にあるが VCZ との併用では低下し、脱毛はシグナルありと判断されていたものがシグナルなしになるという形で顕著に変化した。JADER では FAERS と同様に、好中球減少症や出血性膀胱炎の PRR はアゾール系抗真菌薬の併用で低下する傾向があり、特に VCZ との併用では低下したが、脱毛については併用の有無にかかわらずシグナルは認められなかった。この差の原因は、JADER では FAERS と異なり患者から寄せられた有害事象報告がほとんど存在しないことだと考える。実際に FAERS で医療従事者からの報告データのみを用いて解析を行うと、CPM と脱毛の間に見られていたシグナルは消失した。このことから、米国でも日本でも、患者は脱毛を自覚していたが、医療関係者は関心を示さなかったのではないかとと思われる。だが、FEARS の解析結果から、VCZ だけでなく FCZ や ICZ を併用した場合も含めて、脱毛が強力に抑制されたことは明らかである。

## 補遺 マウス肝ミクロソームを用いたシクロホスファミドとボリコナゾールの in vitro 相互作用試験

### 序文

第2章で示した CPM と VCZ の相互作用試験について、論文目録[1]に示した論文の投稿時にレビューより in vitro においてマウスの肝ミクロソームを用いてシクロホスファミドの代謝活性化が抑制されることを示すべきであるとの指摘を受けた。マウスにおける CPM のクリアランスを測定した論文報告は存在するものの、in vitro においてそのような実験を行った報告は当該論文の投稿時まで存在しなかったため、追加の実験を実施した。本実験では第2章において薬物血中濃度の測定を行ったマウスの系統である C57BL/6 マウスの肝ミクロソームを用いて、CPM の代謝活性化体である 4-hydroxy CPM の生成量が VCZ の添加によって減少するかを確かめた。

## 実験材料および方法

### 1. 材料

Acetonitrile for LC-MS grade、dimethyl sulfoxide、formic acid、methanol、MgCl<sub>2</sub>、は Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) から購入した。HEPES buffer は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。Pooled mouse liver microsomes (C57BL/6, male) は Sekisui XenoTech (Kansas City, Kansas, USA) から購入した。D-glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)、D-glucose 6-phosphate disodium salt hydrate (G6P)、fatty acid free BSA、 $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate (NADP<sup>+</sup>) は Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA) から購入した。Sulfadimethoxine、voriconazole は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。(R,S)-4-Hydroxy cyclophosphamide preparation kit は Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada) から購入した。

### 2. マウス肝ミクロソームを用いた 4-hydroxy cyclophosphamide の生成

インキュベーション実験用のチューブおよびチップは、吸着を避けるために、あらかじめすべてシリコナイズ処理されたものを深江化成株式会社 (Hyogo, Japan) から購入し、実験に用いた。基質として cyclophosphamide (final concentration: 10  $\mu$ M) を、内部標準として sulfadimethoxine (final concentration: 50 ng/mL) を用いた。これを阻害薬である voriconazole (final concentration: 1 or 10 or 100  $\mu$ M) の存在下、もしくは非存在下において、NADPH 再生系、マウス肝ミクロソーム 0.5 mg protein/mL、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)、0.1% w/v fatty acid-free BSA と混和してインキュベートした。Cyclophosphamide および 4-hydroxy cyclophosphamide の構造を Fig. 9 に示した。混合液の最終容量は 500 $\mu$ L とした。すべてのサンプルはトリPLICATEで行った。

Voriconazole は DMSO 中のストック溶液として調製し、methanol で希釈し、200 倍希釈

で混合物に添加した。Methanol および DMSO の最終濃度は、それぞれ 0.5% (v/v) および 0.01% (v/v) 以下に抑えた。NADPH 再生系は最終濃度が 1 mM NADP<sup>+</sup>、1 U/mL G6PDH、3 mM G6P、1 mM EDTA-2Na、および 3 mM MgCl<sub>2</sub> となるように調整したものをを用いた。37°C で 3 分間インキュベートした後、NADPH 再生成系を添加して代謝反応を開始した。反応開始から 0, 10, 20 分間インキュベートした後、反応液を 100 μL 分取し、400 μL の氷冷した acetonitrile と混和し、激しく攪拌することで反応を停止させた。沈殿したタンパク質を遠心分離 (15 分、12,000 g、4°C) によって除去した。遠心分離で得られた上清のうち 200 μL を LC-MS/MS による代謝物濃度測定に使用した。

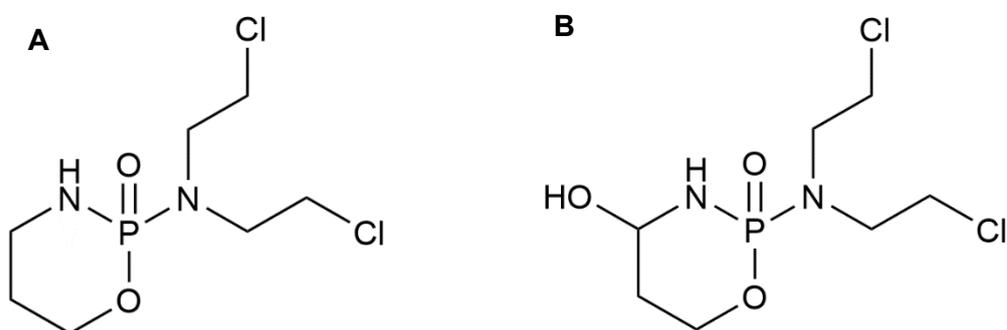
### 3. LC-MS/MS による代謝物濃度の定量

すべての測定は、Prominence HPLC システム (Shimadzu) および QTRAP 4500 システム (AB SCIEX) を使用した。HPLC による分離では Kinetex EVO C18 カラム (Phenomenex、2.6 μm、150 mm × 2.1 mm) および Kinetex EVO C18 ガードカートリッジ (Phenomenex、2.6 μm、2.1 mm) を使用して分離した。総流量は 0.3 mL/min とした。バイナリポンプを使用し、A 液：0.1% formic acid aq.、B 液 0.1% formic acid in acetonitrile とし、A:B の送液比率を 0 min で 95 : 5、5 min で 5 : 95、7 min で 5 : 95、7.1 min で 95 : 5、9 min で 95 : 5 となるようにグラジエントを設定し、分離を行った。4-hydroxy cyclophosphamide の MRM パラメータを Table 9 に示した。内部標準との peak height 比から各代謝物濃度を算出した。

### 4. Voriconazole による 4-hydroxy cyclophosphamide 生成阻害率の算出

解析の前に反応前のコンタミネーションなどが無いことを確かめるために、反応開始から 0 分では代謝物が生成されていないことを確認した。反応開始から 10 分、20 分の各タイムポイントで採取したサンプルから得られたデータを縦軸に代謝物濃度、

横軸に反応時間となるようにプロットし、voriconazole の添加濃度ごとに切片を 0 に固定した時の回帰直線を最小二乗法により求めた。voriconazole 非存在下での回帰直線の傾きを基準として比較することで voriconazole による 4-hydroxy cyclophosphamide 生成の阻害率を算出した。これらの解析はすべて R software (ver. 4.0.0) を用いて行った。



**Fig. 9 The structure formula of CPM and 4-hydroxy cyclophosphamide**

Each 2D structure were drawn using ChemDraw software (ver. 20.1.1.125, PerkinElmer).

A: CPM, B: 4-hydroxy cyclophosphamide. Compounds for which the stereo configuration was not specified in the structural formula were used as racemic mixtures.

**Table 9**

**MRM transitions of 4-hydroxy cyclophosphamide**

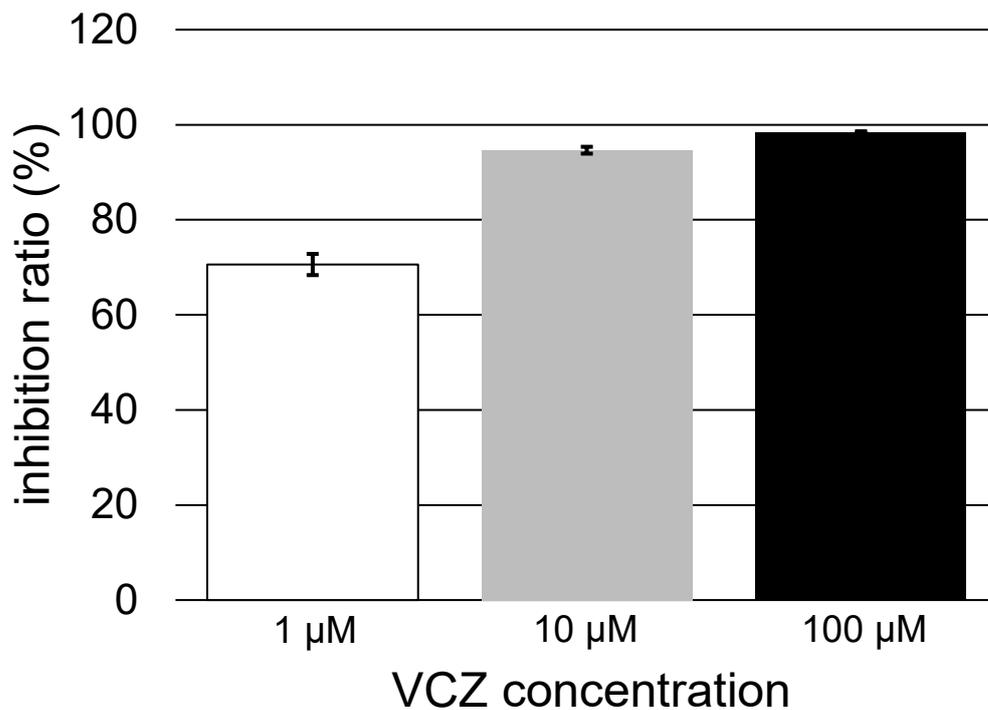
compound	Q1	Q3	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
4-hydroxy cyclophosphamide	277.1	141.8	83.77	6.16	31.37	10.25

DP: declustering potential. EP: entrance potential. CE: collision energy. CXP: collision cell exit potential

## 結果

### 1. Voriconazole による 4-hydroxy cyclophosphamide の生成阻害

実験によって算出された阻害率を Fig. 10 に示した。今回試験した最低濃度である VCZ 濃度 1  $\mu\text{M}$  では約 70%の阻害が、10  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  では 90%を超える阻害が確認された。



**Fig. 10 The inhibition ratio of 4-hydroxycyclophosphamide formation by VCZ**

The inhibition ratio of 4-hydroxycyclophosphamide formation by VCZ. White column represents VCZ 1  $\mu\text{M}$ . Gray column represents VCZ 10  $\mu\text{M}$ . Black column represents VCZ 100  $\mu\text{M}$ . Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3).

## 考察

今回試験した最大濃度である VCZ の 100  $\mu\text{M}$  はおよそ 35  $\mu\text{g/mL}$  であり、第 2 章において併用濃度として設定したうちの高濃度群である VCZ 30 mg/kg 併用群で観察された全血中濃度 (Fig. 2) 付近の濃度である。それよりも VCZ の全血中濃度が低い個体も見られたが、今回の *in vitro* 実験ではその 1/10 の濃度である VCZ 10  $\mu\text{M}$  群でも 90% 以上の 4-hydroxy cyclophosphamide 生成阻害が見られていたことから、第 2 章での実験において、VCZ 30 mg/kg 併用群では VCZ の阻害作用はほぼ飽和に達していたのではないかと考えられる。

しかし、第 2 章での全血中 CPM 濃度は数倍程度の上昇しか見られていない。これは、今回の実験の中では血漿中薬物濃度の測定や血漿タンパク結合率、血球分配率での補正を行っていないために代謝を受けることができる血漿中の遊離型薬物濃度がどれだけ上昇したかの比較ではないこと、また cyclophosphamide は 4-hydroxy cyclophosphamide への代謝活性化のほか、脱クロロメチル化による代謝不活性化を受ける代謝経路もあり、こちらへの影響も評価しなければ *in vitro* の結果から *in vivo* で血中未変化体濃度がどのように変化するかを説明しきることはできない。なお、本実験においてはあくまで VCZ によって代謝活性体である 4-hydroxy cyclophosphamide の生成が抑制されることが確認できれば十分であるため、これ以上の検討は行っていない。

## 総括

VCZ の各 CYP 分子に対する *in vitro* での阻害プロファイル (第 1 章)、マウスを用いた併用試験 (第 2 章)、有害事象報告データベースの調査結果 (第 3 章) から、CPM と VCZ は臨床現場で相互作用する可能性が高いと考えられる。特に、情報源が全く異なる日米のデータベースでは、FCZ や ICZ よりも CYP2B6 に対して強い阻害作用を示す VCZ の方が一貫して強い相互作用を示したことから、この相互作用は主に CYP2B6 を介していることが示唆される。CYP2B6 によって代謝活性化を受け、その代謝物が殺細胞効果を有するという CPM の作用機序を考えると、この相互作用は副作用だけにとどまらず薬効発現にまで及んでおり、致命的な結果をもたらす可能性があることを考慮する必要がある。本研究の結果では、VCZ だけでなく、FCZ、ICZ でも同様の変化が認められたことから、今回の解析では評価することができなかった MCZ を含む強力な CYP 阻害剤についても、CPM との相互作用の可能性を考慮する必要があることが示唆された。一方、本研究は症例調査ではなく自発報告データベースの情報に基づいているため、副作用の頻度は不明である。また、薬効が DI の影響をどの程度強く受けるかについても、さらなる検討が必要である。将来的には、レセプトデータや臨床的相互作用試験をもとに全例調査を実施し、CPM と VCZ やそのほかの CYP 阻害薬との相互作用を評価する必要がある。

また、CPM と VCZ の相互作用は、これまであまり注目されてこなかった CYP2B6 を介した薬物相互作用であることが示唆されていることも重要である。CYP2B6 によって代謝される代表的な薬物の一つに efavirenz がある。Efavirenz と VCZ の併用は efavirenz の AUC、Cmax を上昇させ、また VCZ の AUC と Cmax を低下させるため併用禁忌とされている [38]。上市されている製剤の添付文書、インタビューフォームの情報ではエファビレンツと VCZ の相互作用のメカニズムは不明であるとされている。しかし、今回の結果から、VCZ が CYP3A4 だけでなく CYP2B6 を阻害することが efavirenz と VCZ の薬物相互作用に寄与していることが示唆された。また、CYP2B6 を阻害する薬剤がさらに市販されている可能性もあり、今回の例は CYP2B6 を介した薬物相互作用について、今後、より適切な検討が必要であることを示唆している。本研究で紹介した *in vitro* カクテル試験と有害事象報告データベース調査の組み合わせは、薬物動態学的 DI を包括的に検出するための有用な手段であることが示された。潜在的な DI を体系的に回避することで、より安全な薬物療法の実現に貢献することが期待される。

## 参考文献

- [1] Saravanakumar A, Sadighi A, Ryu R, Akhlaghi F. Physicochemical properties, biotransformation, and transport pathways of established and newly approved medications: a systematic review of the top 200 most prescribed drugs vs. the FDA-approved drugs between 2005 and 2016. *Clinical Pharmacokinetics* 2019;58:1–14. <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00750-8>.
- [2] Food and Drug Administration (FDA), In vitro drug interaction studies - cytochrome p450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions guidance for industry. January 2020, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions> [accessed : 28 December 2020].
- [3] European Medicines Agency (EMA), Guideline on the investigation of drug interactions. 21 June 2012, <https://www.ema.europa.eu/en/investigation-drug-interactions> [accessed : 28 December 2020]
- [4] Ministry of Labor and Welfare. Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information. July 23, 2018. <https://www.pmda.go.jp/files/000228122.pdf> [accessed : 28 December 2020].
- [5] Usmani KA, Hodgson E, Rose RL. In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol. *Chemico-Biological Interactions* 2004;150:221–32. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.015>.
- [6] Consiglio ED, Meneguz A, Testai E. Organophosphorothionate pesticides inhibit the bioactivation of imipramine by human hepatic cytochrome P450s. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;205:237–46. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.009>.
- [7] Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008;392:1093–108. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2291-6>.
- [8] Abass K, Pelkonen O. The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by

18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicology Vitro* 2013;27:1584–8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.003>.

[9] Parkinson A, Kazmi F, Buckley DB, Yerino P, Ogilvie BW, Paris BL. System-dependent outcomes during the evaluation of drug candidates as inhibitors of cytochrome P450 (CYP) and uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymes: Human hepatocytes versus liver microsomes versus recombinant enzymes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2010;25:16–27. <https://doi.org/10.2133/dmpk.25.16>.

[10] Spaggiari D, Geiser L, Daali Y, Rudaz S. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: an overview of current methodologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;101:221–37. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.018>.

[11] Spaggiari D, Daali Y, Rudaz S. An extensive cocktail approach for rapid risk assessment of in vitro CYP450 direct reversible inhibition by xenobiotic exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016;302:41–51. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.013>.

[12] Grimm S, Einolf H, Hall S, He K, Lim H-K, Ling K-HJ, et al. The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: A perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America. *Drug Metabolism and Disposition* 2009;37:1355–70. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.026716>.

[13] Stresser DM, Mao J, Kenny JR, Jones BC, Grime K. Exploring concepts of in vitro time-dependent CYP inhibition assays. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2013;10:157–74. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.856882>.

[14] Kudo T, Ozaki Y, Kusano T, Hotta E, Oya Y, Komatsu S, et al. Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylation and CYP3A4-mediated triazolam  $\alpha$ - and 4-hydroxylation by human liver microsomes. *Xenobiotica* 2015;46:241–6. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1071502>.

[15] Fujino R, Hashizume K, Aoyama S, Maeda K, Ito K, Toshimoto K, et al. Strategies to improve the prediction accuracy of hepatic intrinsic clearance of three antidiabetic drugs: Application of the extended clearance concept and consideration of the effect of albumin on

CYP2C metabolism and OATP1B-mediated hepatic uptake. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018;125:181–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.021>.

[16] Rowland A, Elliot DJ, Knights KM, Mackenzie PI, Miners JO. The “Albumin Effect” and in Vitro-in Vivo extrapolation: Sequestration of long-chain unsaturated fatty acids enhances phenytoin hydroxylation by human liver microsomal and recombinant cytochrome P450 2C9. *Drug Metabolism and Disposition* 2008;36:870–7. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019885>.

[17] Wattanachai N, Polasek TM, Heath TM, Uchaipichat V, Tassaneeyakul W, Tassaneeyakul W, et al. In vitro–in vivo extrapolation of CYP2C8-catalyzed paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylation: effects of albumin on in vitro kinetic parameters and assessment of interindividual variability in predicted clearance. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2011;67:815–24. <https://doi.org/10.1007/s00228-011-1001-z>.

[18] Palacharla R, Uthukam V, Manoharan A, Ponnamaneni R, Padala N, Boggavarapu R, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by saturated and unsaturated fatty acids in human liver microsomes, characterization of enzyme kinetics in the presence of bovine serum albumin (0.1 and 1.0% w/v) and in vitro – in vivo extrapolation of hepatic clearance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017;101:80–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.027>.

[19] Niwa T, Inoue-Yamamoto S, Shiraga T, Takagi A. Effect of antifungal drugs on Cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005;28:1813–6. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1813>.

[20] Niwa T, Shiraga T, Bulletin TA and. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1805>.

[21] Niwa T, Shiraga T, Takagi A. Drug-drug interaction of antifungal drugs. *Yakugaku Zasshi* 2005;125:795–805. <https://doi.org/10.1248/yakushi.125.795>.

[22] Zhang W, Ramamoorthy Y, Kilicarslan T, Nolte H, Tyndale RF, Sellers EM. Inhibition of Cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metabolism and Disposition* 2002;30:314–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.3.314>.

[23] Niwa T, Honda D, Shirakawa K, Imamura Y, Osaki D, Takagi A. Drug interaction of

fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Folia Pharmacologica Japonica* 2006;128:93–103. <https://doi.org/10.1254/fpj.128.93>.

[24] Walsky RL, Obach RS, Gaman EA, Gleeson J-PR, Proctor WR. Selective inhibition of human cytochrome p4502c8 by montelukast. *Drug Metabolism and Disposition* 2005;33:413–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002766>.

[25] Mancy A, Dijols S, Poli S, Guengerich PF, Mansuy D. Interaction of sulfaphenazole derivatives with human liver cytochromes P450 2C: Molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP2C9. *Biochemistry* 1996;35:16205–12. <https://doi.org/10.1021/bi961950t>.

[26] Chen Z, Zhang S, Long N, Lin L, Chen T, Zhang F, et al. An improved substrate cocktail for assessing direct inhibition and time-dependent inhibition of multiple cytochrome P450s. *Acta Pharmacologica Sinica* 2016;37:708–18. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.10>.

[27] Saari TI, Laine K, Leino K, Valtonen M, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79:362–70. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.12.305>.

[28] Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2009;6:638–47. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>.

[29] Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 1999;27:655–66.

[30] Yoshida M. In-vivo enhancement of neutrophil function by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in cyclophosphamide (CPA) treated mice. *The Japanese Journal of Urology* 1992;83:518–27. <https://doi.org/10.5980/jpnjurol1989.83.518>.

[31] Paus R, Handjiski B, Eichmüller S, Czarnetzki B. Chemotherapy-induced alopecia in mice -Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *The American Journal of Pathology* 1994;144:719–34.

- [32] Stackowicz J, Jönsson F, Reber LL. Mouse models and tools for the in vivo study of neutrophils. *Frontiers in Immunology* 2020;10:3130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03130>.
- [33] Shu W, Chen L, Hu X, Zhang M, Chen W, Ma L, et al. Cytochrome p450 genetic variations can predict mRNA expression, cyclophosphamide 4-hydroxylation, and treatment outcomes in Chinese patients with non-Hodgkin's lymphoma. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2017;57:886–98. <https://doi.org/10.1002/jcph.878>.
- [34] Food and Drug Administration (FDA), FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) latest quarterly data files, <https://www.fda.gov/drugs/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers/fda-adverse-event-reporting-system-faers-latest-quarterly-data-files> [accessed : 28 December 2020].
- [35] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Japanese Adverse Drug Event Report database (JADER), <https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/adr-info/suspected-adr/0005.html> [accessed : 28 December 2020].
- [36] Puijtenbroek EP van, Bate A, Leufkens HGM, Lindquist M, Orre R, Egberts ACG. A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2002;11:3–10. <https://doi.org/10.1002/pds.668>.
- [37] Evans SJW, Waller PC, Davis S. Use of proportional reporting ratios (PRRs) for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2001;10:483–6. <https://doi.org/10.1002/pds.677>.
- [38] Liu P, Foster G, LaBadie RR, Gutierrez MJ, Sharma A. Pharmacokinetic interaction between voriconazole and efavirenz at steady state in healthy male subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2008;48:73–84. <https://doi.org/10.1177/0091270007309703>.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜り、また、論文執筆等にも直接指導を賜りました、千葉大学薬学部 臨床薬理学研究室 樋坂章博教授に厚く感謝すると共に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接の実験の指導や有意義な御討論、また研究室での様々な場面で有益な御助言と御指導を賜りました、千葉大学薬学部 臨床薬理学研究室 佐藤洋美講師に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究に関する多くの有意義なご討論とご鞭撻を賜り、非常に有益な御指導、御助言を賜りました、千葉大学薬学部 臨床薬理学研究室 畠山浩人准教授に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有意義な討論をいただき、また実験手技において御協力いただきました千葉大学薬学部 臨床薬理学研究室 博士課程 保月静香さん、爲本雄太君、吉友葵さんに心から感謝いたします。

また、在学中、御指導御討論をいただきお世話になりましたそのほかの臨床薬理学研究室の皆様にも心から感謝いたします。

最後に、10年間に渡る学生生活を支えてくださいました私の家族に深く感謝致します。

## 論文目録

本学位論文の内容は、下記の発表論文による。

- [1] Shibata Y, Tamemoto Y, Pratap S. S, Yoshitomo A, Hozuki S, Sato H, Hisaka A. Drug interaction between cyclophosphamide and voriconazole via inhibition of CYP2B6 evidenced by in vitro cocktail incubation, animal experiment and adverse event report database survey. *Drug Metab Pharmacokinet.* 39, 100396 (2021)  
DOI: 10.1016/j.dmpk.2021.100396.

## 学位論文審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 伊藤 晃成

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 石井 伊都子

副査 千葉大学大学院准教授（薬学研究院） 博士（薬学） 中村 浩之

審査をしていただき、貴重な御助言を賜りました諸先生方に深く感謝申し上げます。