

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

抗がん剤による肝CYP2Cおよび
CYP3A活性の変動を介した
薬物相互作用機序の解明

2020年7月

福 野 修 平

目 次

目 次	1
略語一覧	4
序 論	6
本 論	8
第一章 5-FU 投与による CYP2C 基質薬物体内動態変動メカニズムの解明 ..	8
第一節 緒 言	8
第二節 実験材料および方法	11
1-2-1. 薬物および試薬	11
1-2-2. 実験動物	11
1-2-3. TB 投与と採血	11
1-2-4. 血清の生化学的検査	12
1-2-5. 肝臓組織観察	12
1-2-6. 血清中 TB 濃度の測定	12
1-2-7. 体内動態パラメータの算出	13
1-2-8. ラット肝ミクロソーム試料の調製	13
1-2-9. TB 水酸化活性の測定	14
1-2-10. CYP2C6 タンパク発現量の比較	14
1-2-11. CYP2C 分子種の遺伝子発現量の測定	15
1-2-12. 統計学的解析	16
第三節 結 果	17
1-3-1. 5-FU 投与ラットの肝機能検査値および肝臓組織像	17
1-3-2. 静脈投与後の TB 体内動態に及ぼす 5-FU の影響	18
1-3-3. TB 4-水酸化活性に及ぼす 5-FU の影響	19
1-3-4. CYP2C6 タンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響	20
1-3-5. 肝臓の CYP2C 遺伝子発現量に及ぼす 5-FU の影響	20

第四節 考 察.....	22
第五節 小 括.....	25
第二章 5-FU 投与が CYP3A 基質薬物の肝代謝能および体内動態に及ぼす 影響.....	26
第一節 緒 言.....	26
第二節 実験材料および方法.....	28
2-2-1. 薬物および試薬	28
2-2-2. 実験動物	28
2-2-3. ラット肝ミクロソーム試料の調製	28
2-2-4. CYP3A 分子種のタンパク発現量の比較.....	28
2-2-5. MDZ 水酸化活性の測定	28
2-2-6. 酵素反応パラメータの算出	29
2-2-7. MDZ 投与および採血	30
2-2-8. 血清中 MDZ 濃度の測定	30
2-2-9. MDZ 体内動態パラメータの解析	30
2-2-10. 統計学的解析	30
第三節 結 果.....	31
2-3-1. 5-FU 投与によるラット体重および肝重量の変化	31
2-3-2. CYP3A タンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響	31
2-3-3. MDZ 4-および 1'-水酸化活性に及ぼす 5-FU の影響	32
2-3-4. 静脈内投与後の MDZ 体内動態に及ぼす 5-FU の影響	34
2-3-5. MDZ 4-および 1'-水酸化反応の酵素反応パラメータ	35
2-3-6. CYP3A 阻害剤に対する MDZ 水酸化活性の阻害感受性	36
第四節 考 察.....	38
第五節 小 括.....	42
第三章 DOX 投与による CYP2C 基質薬物体内動態変動メカニズムの解明	43
第一節 緒 言.....	43

第二節 実験材料および方法	45
3-2-1. 薬物および試薬	45
3-2-2. 実験動物	45
3-2-3. ラット肝ミクロソーム試料の調製	45
3-2-4. CYP2C 分子種のタンパク発現量の比較	45
3-2-5. TB 4-水酸化活性の測定	45
3-2-6. 酵素反応パラメータの算出	46
3-2-7. TB 投与および採血	46
3-2-8. 血清中 TB 濃度の測定	46
3-2-9. TB 体内動態パラメータの解析	47
3-2-10. 血清アルブミン濃度の測定	47
3-2-11. 統計学的解析	47
第三節 結 果	48
3-3-1. DOX 投与ラットの体重および肝重量	48
3-3-2. CYP2C6 および CYP2C11 発現量に及ぼす DOX の影響	49
3-3-3. TB 4-水酸化反応における酵素反応パラメータのモデル式選択 ..	50
3-3-4. TB 4-水酸化反応に及ぼす DOX の影響	51
3-3-5. 静脈投与後の TB 体内動態に及ぼす DOX の影響	52
3-3-6. DOX 投与が TB のタンパク非結合型分率に及ぼす影響	54
第四節 考 察	56
第五節 小 括	60
総 括	61
謝 辞	62
主論文	63
引用文献	64

略語一覧

1'-OH-MDZ	: 1'-hydroxymidazolam
4-OH-MDZ	: 4-hydroxymidazolam
4-OH-TB	: 4-hydroxytolbutamide
5-FU	: 5-fluorouracil
AIC	: Akaike's information criterion
ALT	: alanine aminotransferase
AST	: aspartate aminotransferase
AUC	: area under the serum drug concentration versus time curve
AUMC	: area under the moment curve
BSA	: bovine serum albumin
CBB	: Coomassie brilliant blue
CL _{int}	: intrinsic hepatic clearance
CL _{tot}	: total clearance
CYP	: cytochrome P450
DOX	: doxorubicin
DNA	: deoxyribonucleic acid
ECL	: enhanced chemiluminescence
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
FOXO1	: forkhead box protein O1
f _u	: unbound fraction
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	: hematoxylin-eosin
HPLC	: high performance liquid chromatograph
HRP	: horseradish reagent peroxidase
Ig	: immunoglobulin
IS	: internal standard
JNK	: c-Jun N-terminal kinase

k_e	: elimination rate at the terminal phase
K_m	: Michaelis constant
MBI	: mechanism-based inhibition
MDZ	: midazolam
mRNA	: messenger RNA
miRNA	: microRNA
MRT	: mean residence time
NADP ⁺	: oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PBS-T	: phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween
PCR	: polymerase chain reaction
PT-INR	: prothrombin time-international normalized ratio
PVDF	: polyvinylidene fluoride
PXR	: pregnane X receptor
RNA	: ribonucleic acid
SD	: standard deviation
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SU	: sulfonylurea
$t_{1/2}$: elimination half-life
TB	: tolbutamide
$V_{d_{ss}}$: volume of distribution at steady-state
V_{max}	: maximum reaction velocity

序 論

薬物相互作用による患者の健康被害を防止することは、薬剤師の重要な責務の 1 つである。近年、我が国においては、薬剤師が中心となって患者の薬剤服用歴の一元管理に有用な手帳、いわゆる「お薬手帳」を普及させ、保険薬局のみならず病院での持参薬管理業務に応用することで、医療従事者が患者個々の薬剤服用歴を正確に把握しやすい環境を整備してきた¹⁾。さらに、平成 30 年度の調剤報酬改定²⁾において重複投与・相互作用等防止加算の残薬調整に係るものの以外の点数が引き上げられたことから、薬物相互作用を防止することは、今後より一層の活躍が期待される薬剤師の責務と考えられる。しかし、医療現場に供される医薬品の組み合わせは無数にあり、医薬品の添付文書等や文献検索では解決できない疑問が起り得る。このような臨床的疑問を解明するためには、医薬品情報の収集体制を整備することに加えて、科学的根拠に基づいたエビデンスの構築が必要不可欠である。

我が国では高齢化に伴い、がん、高血圧、糖尿病、動脈硬化性疾患などライフスタイルの変化が原因として発症する生活習慣病の罹患者数が年々増加している³⁾。その中でも、悪性新生物は 1981 年以降我が国における死因順位の第 1 位となり続けている疾患であり⁴⁾、生涯でがんにかかる確率は 2 人に 1 人と予測されている⁵⁾。がん治療戦略の 1 つである化学療法では、治療効果の増強や副作用軽減のためにレジメンと呼ばれる治療計画に基づく多剤併用療法が用いられている。また、がん患者は他の生活習慣病など合併症に対する薬剤を併用している場合も少なくない。そのため、がん化学療法を行うにあたって、治療の成否を左右する薬物相互作用の発現には特段の注意を要する。抗がん剤は一般的に細胞毒性が強く治療域と中毒域が近接しているため、抗がん剤に対する薬物相互作用について過去に様々な研究が報告されている⁶⁻⁸⁾。重大な社会問題となったソリブジン薬害はその一例であり、ソリブジン併用によりフッ化ピリミジン系抗がん剤フルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU) の代謝不活性化が抑制されたことによる血中濃度上昇が原因であることが明らかとされている⁷⁾。その一方で、抗がん剤が併用薬の体内動態を変動させることで治療に悪

影響を及ぼすような薬物相互作用の事例も数多く報告されており，問題視されている⁹⁻¹¹⁾。

シトクロム P450 (cytochrome P450: CYP) は肝臓の主要な薬物代謝酵素群であり，代謝過程における薬物動態学的相互作用に深く関与している^{12, 13)}。抗がん剤との併用で治療に悪影響を及ぼした医薬品の多くは肝臓の CYP によって代謝を受けて体外へ排泄されるため，抗がん剤が CYP 代謝活性を変動させ，それによる併用薬の体内動態変動が薬物相互作用発現の機序と推定^{9-11, 14)}されているものの，詳細が明らかとされていない相互作用の事例は多い。実験動物を用いた過去の研究では，抗がん剤投与が肝臓の CYP 発現量やその活性に影響を与えると報告¹⁵⁻¹⁷⁾されているが，これらの結果は必ずしも臨床報告と一致しているわけではない。さらに，医療現場における薬物動態学的相互作用を考える上で，抗がん剤の影響を CYP 発現量やその代謝活性の増減のみで説明することは困難である。このように，臨床研究や基礎研究で得られた知見の整合性の観点から明らかにすべき疑問は多数残されている。

本研究では，臨床で生じ得る疑問を解明し，抗がん剤による薬物相互作用機序を明らかとすることを目的として，臨床研究等から抽出された 3 つの事例に着目し，ラットモデルを代用することで抗がん剤による CYP2C または CYP3A 基質薬物の体内動態変動の有無を検討するとともに，基質薬物体内動態の変動と肝 CYP2C/3A の発現量および代謝活性の変動との間に関連性が認められるか否かについて検証した。

本 論

第一章 5-FU 投与による CYP2C 基質薬物体内動態変動メカニズムの解明

第一節 緒 言

5-FU は代表的なフッ化ピリミジン系代謝拮抗薬であり、大腸がんをはじめ種々のがん治療に幅広く用いられている¹⁸⁾。5-FU は中間代謝によりフルオロデオキシウリジン三リン酸に変換され、チミジル酸シンターゼを阻害して DNA の生合成を抑制するとともに、代謝物のフルオロウリジン三リン酸およびフルオロデオキシウリジン三リン酸がリボ核酸 (ribonucleic acid: RNA) およびデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid: DNA) にそれぞれ組み込まれることで抗がん作用を示す^{19, 20)}。消化器がんの一般的な治療方法である FOLFIRI レジメンや mFOLFOX6 レジメンにおいて、5-FU は単回大量投与が適応されている^{21, 22)}。

臨床において、5-FU およびそのプロドラッグは抗てんかん薬フェニトインや抗凝固薬ワルファリンの血中濃度上昇に伴う有害事象が発現した症例が複数報告されている²³⁻²⁹⁾。フェニトインおよびワルファリンは主に肝臓の CYP2C で代謝されて体外へ排泄されるため、5-FU は CYP2C 代謝活性を低下させるものと推定されている。しかし、ヒト肝ミクロソームを用いた研究において、5-FU は肝 CYP2C 活性に対する直接的な阻害作用はないと報告³⁰⁾されており、5-FU 投与による CYP2C 代謝活性低下の詳細な機序は未だ不明である。

CYP2C11 は、ラット肝 CYP の中でその発現量が約半数を占める CYP2C サブファミリーの主要な構成酵素であり^{31, 32)}、ヒト CYP2C9 とのアミノ酸配列の相同性が 76% と高く、ラットにおいてヒト CYP2C9 に対応する CYP 分子種と考えられている³³⁾。ヒト CYP2C9 はフェニトインやワルファリンなど治療域が狭い医薬品を含め多数の医薬品の第一相の代謝に関与するため³⁴⁻³⁶⁾、CYP2C11 の関連する薬物相互作用の検討は極めて重要と考えられる。ラット

を用いた過去の研究では、5-FU を単回大量投与することによって、肝臓の CYP2C11 タンパク発現量およびその活性が時間依存的に減少すると報告されている¹⁶⁾。この報告は 5-FU が肝 CYP2C11 タンパク発現量を低下させ、CYP2C11 代謝活性低下を引き起こすことを示唆しているが、タンパク発現量の低下を裏付ける CYP2C11 遺伝子発現量が減少しているか否かに関する報告はない。また、5-FU 単回投与 4 日後のラットにおいてフェニトインの全身クリアランスと CYP2C 代謝活性を示すと考えられるフェニトイン *p*-水酸化活性はいずれも顕著な低下を示すことが報告³⁷⁾されているものの、5-FU 投与後の肝 CYP2C のメッセンジャーRNA (messenger RNA: mRNA) やタンパク発現量は検討されておらず、CYP2C 遺伝子発現量の変動と併用薬の体内動態変動との整合性の有無は検証されていない。さらに近年、ラット CYP2C11 と比較して発現量が少ないものの、基質選択性や特異性の観点からラット CYP2C6 もヒト CYP2C9 に機能的に対応しているもう 1 つの CYP2C 分子種とみなされている^{38, 39)}。肝臓の CYP2C11 および CYP2C6 発現量は、環境変化に呼応して変化すると報告されていることから、同様のメカニズムによって発現調節され则认为られているが⁴⁰⁻⁴²⁾、5-FU 投与が CYP2C6 の mRNA およびタンパク発現量に及ぼす影響についても不明である。

トルブタミド (tolbutamide: TB) は、代表的なスルホニル尿素 (sulfonyl-urea: SU) 薬であり、II 型糖尿病治療薬として現在も世界的に広く用いられている。また、ヒトでは CYP2C9 によって代謝され⁴³⁾、厚生労働省や米国食品医薬品局が提示する薬物相互作用に関するガイドライン^{44, 45)}において、*in vivo* で CYP2C9 活性の変動を評価するための指標薬として取り扱われている。ラットにおいても、TB は CYP2C6 および CYP2C11 によって⁴⁶⁻⁵⁰⁾、4-ヒドロキシトルブタミド (4-hydroxy-tolbutamide: 4-OH-TB) に代謝され则认为されており、CYP2C の典型的な基質薬物として体内動態試験等で頻用されている。これまで、5-FU は CYP2C 代謝活性を低下させると推定されているものの、5-FU が TB と相互作用を引き起こすか否かについての検証は行われていない。そこで本章では、5-FU を単回投与したラットをヒトに代用し、5-FU が CYP2C 基質薬物である TB の体内動態に及ぼす影響の有無を検証した。さらに、5-FU が

ラット肝臓の CYP2C6/11 発現量を遺伝子レベルから影響し得るかを検討し、
TB 体内動態や CYP2C 活性の変動との間に整合性があるか否かを評価した。

第二節 実験材料および方法

1-2-1. 薬物および試薬

5-FU は, Sigma-Aldrich より購入した. TB およびクロルプロパミドは, いずれも富士フィルム和光純薬より購入した. その他の試薬類は特級または HPLC 用のものを使用した.

1-2-2. 実験動物

7 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットは日本エスエルシーより購入し, 少なくとも 2 日間予備飼育した. ラットは標準ラット固形飼料自由採取および自由給水下, 温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 照明時間 8:00 - 20:00 に設定したバリア施設内で飼育した. ラットは 5-FU 群と対照群に分け, それぞれ 5-FU (120 mg/kg) と生理食塩水を 2.5 mL/kg の容量で腹腔内投与した. なお, 5-FU の用法および用量は過去の報告¹⁶⁾に従って設定した. 生化学的, 組織形態学および薬物動態試験は, 5-FU 投与後に CYP2C 活性が最も低下すると報告³⁷⁾されている薬物投与 4 日後に行った. 動物実験計画は, 大阪大谷大学動物実験委員会の審査を受けて承認された.

1-2-3. TB 投与と採血

5-FU または生理食塩水投与 3 日後, 麻酔下にてラットの左右内頸静脈にヘパリン化生理食塩水を満たしたポリエチレンチューブ (SP 10; 夏目製作所) を挿入し, そのポリエチレンチューブは皮下トンネルを通して両肩甲骨間から抜き, 切断面を塞いだ後に一晩飼育した. 翌日, 覚醒下において TB を用量 10 mg/kg, 容量 2.5 mL/kg の条件下で右内頸静脈内から投与した. TB 投与前および投与後 1, 15, 60, 120, 180, 240, 360 および 480 分後に左内頸静脈内から採血を行った. なお, ポリエチレンチューブの開存性を維持するために, 各採血後に少量のヘパリン化生理食塩水でポリエチレンチューブ内を満たし, ヘパリン化生理食塩水は次の採血直前に除去した. 採取した血液は 3,000 g, 4°C で 10 分間遠心分離し, 血清を得た.

1-2-4. 血清の生化学的検査

血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase: AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase: ALT) 活性は, 生化学的自動分析装置 (Spotochem™ EZ sp-4430; ARKRAY) を用いて比色定量法にて測定した. なお, 測定に用いた血清は, TB 投与前に採取した血液から得た.

1-2-5. 肝臓組織観察

TB 投与後 480 分間の採血が終了した後, 麻酔下にて肝臓を採取し, 10% 中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬) に浸漬固定後, パラフィン包埋し, 4 μm の厚さの切片を作製した. その後, ヘマトキシリン-エオシン (hematoxylin-eosin: HE) 染色し, 光学顕微鏡 (LEICA DM750; Leica Microsystems) にて観察することで, 肝臓組織形態を観察した. なお, 観察者は各肝臓を盲検下にて観察し, 各肝臓につき少なくとも 8 つの視野を用いて組織変化の程度を評価した.

1-2-6. 血清中 TB 濃度の測定

血清 100 μL に内部標準物質 (internal standard: IS) として 80 $\mu\text{g/mL}$ クロルプロパミドを 50 μL , 0.1 M 塩酸を 50 μL 添加後, ジエチルエーテルを 4 mL 加え, 60 秒間振とうし, 5,000 g で 10 分間遠心分離を行った. 有機層のみを新しい試験管に採取し, 50°C にて乾固させた後, 残渣を 200 μL の移動相に溶解し, この溶液 50 μL を送液ポンプ (LC-20AD; 島津製作所) および紫外可視分光検出器 (SPD-20A; 島津製作所) から構成される高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatograph: HPLC) システムに注入した. TB とクロルプロパミドの分離用カラムには RP-18 GP II (粒子径 5 μm , 内径 150 mm \times 4.6 mm; 関東化学) を用いた. 移動相にはアセトニトリルおよび 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.0) の混液 (v/v; 39/61) を用い, 流速, カラム温度および測定波長はそれぞれ 1.0 mL/min, 40°C および 230 nm に設定した. 血清中の TB 濃度は IS とのピーク面積比により求めた.

1-2-7. 体内動態パラメータの算出

TB の体内動態パラメータは、ノンコンパートメントモデルに基づいて算出した。消失速度定数 (elimination rate at the terminal phase: k_e) は終末相の血中濃度を一次消失速度式に適応させて求めた。TB の血清中濃度曲線下面積 (area under the serum drug concentration versus time curve: AUC) は 0 時間から最終採血時間 $t_{(last)}$ までを台形法により、 $t_{(last)}$ から t_{∞} までは最終血中濃度 (last measured serum drug concentration: $C_{p(last)}$) を k_e で除することによって算出した。全身クリアランス (total clearance: CL_{tot}) は静脈内投与した薬物量を AUC で除して求めた。一次モーメント曲線下面積 (area under the moment curve: AUMC) は 0 時間から $t_{(last)}$ までを台形法により、 $t_{(last)}$ から t_{∞} までは $t_{(last)} \times C_{p(last)} / k_e + C_{p(last)} / (k_e)^2$ により算出した。平均滞留時間 (mean residence time: MRT) は、AUMC を AUC で除して算出し、定常状態分布容積 (volume of distribution at the steady-state: V_{dss}) は MRT と CL_{tot} を乗じることにより求めた。

1-2-8. ラット肝ミクロソーム試料の調製

ラットを麻酔下にて開腹し、門脈より 1.15% 塩化カリウム溶液を注入することで脱血し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を 1.15% 塩化カリウム溶液で洗浄し、3 倍量の氷冷した 1.15% 塩化カリウム溶液中にてテフロンホモジナイザーを用いてホモジネートし、10,000 g, 4°C で 15 分間遠心分離した。上清を 105,000 g, 4°C で 1 時間超遠心分離し、ミクロソーム分画を沈殿として得た。得られたミクロソーム分画に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて懸濁し、タンパク濃度を 10 mg/mL となるように調製したものを酵素活性測定のためのミクロソーム試料とし、-80°C にて保存した。また、得られたミクロソーム分画の一部はタンパク抽出用緩衝液 (50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク)) に懸濁し、CYP2C6 タンパク発現量の検討に用いた。なお、ミクロソーム試料のタンパク濃度はウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) を標準として Bradford 法⁵¹⁾ にて定量した。

1-2-9. TB 水酸化活性の測定

酵素反応は、80 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5 mM 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADP⁺), 5 mM グルコース-6-リン酸, 5 mM MgCl₂, 2 U/mL グルコース-6-リン酸脱水素酵素および 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine-tetraacetic acid: EDTA) を含む還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide: NADPH) の再生系ならびに 200 μ M TB を含む反応液に、ミクロソーム試料を 1 mg/mL となるように添加し、全量 500 μ L として 37°C にて 10 分間反応させた。酵素反応は、2 M 塩酸を 500 μ L 添加することにより停止させた。酵素反応停止後に、水中にて 5 分間静置し、IS として 20 μ g/mL クロルプロパミド水溶液 50 μ L, ジエチルエーテル 4 mL を添加した後、30 秒間振とうし、4°C, 1,630 *g* で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、有機層のみを採取し、50°C にて揮発させた後の残渣を 200 μ L の移動相に溶解し、この溶液 100 μ L を HPLC システム (島津製作所) に注入した。移動相には 10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.4) とアセトニトリルの混液 (v/v; 72/28) を用いて、流速は 1.0 mL/min に設定した。その他の HPLC 測定条件は血中 TB 濃度測定時と同様に行った。4-OH-TB 濃度は、IS とのピーク面積比より求めた。

1-2-10. CYP2C6 タンパク発現量の比較

タンパク試料 (10 μ g) はラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) にて分離し、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene fluoride: PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。タンパク転写後の膜は、0.1% Tween を含むリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween: PBS-T) で洗浄し、ブロッキングワシ溶液 (ナカライテスク) に浸し室温で 1 時間インキュベートすることでブロッキングした。PBS-T による洗浄後、一次抗体として 1,000 倍希釈したマウス抗 CYP2C6 ポリクローナル抗体 (SantaCruz Biothechnology) を用いて室温で 1 時間インキュベートすることで反応させた。PBS-T による洗

浄後，5,000 倍希釈した二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish reagent peroxidase: HRP) で標識された抗マウス免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig) G ポリクローナル抗体 (GE Healthcare) を用いて室温にて 1 時間インキュベートすることで反応させた．PBS-T による洗浄後，免疫反応性バンドはイムノスター LD (富士フィルム和光純薬) により視覚化させ，冷却 CCD カメラを用いて検出を行った．その後，PVDF 膜はクマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue: CBB) で染色した．なお，結果の数値化は ImageJ (National Institutes of Health) を用いて行い，対照群を 1 とした相対的な発現量を示した．

1-2-11. CYP2C 分子種の遺伝子発現量の測定

ラット肝臓中の total RNA は，ISOGEN 溶液 (富士フィルム和光純薬) を用いて抽出し，GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich) を用いて精製した．得られた RNA は，オリゴ dT をプライマーとして Moloney マウス白血病ウイルス由来逆転写酵素 (GE Healthcare) を用いて cDNA に逆転写した．標的遺伝子の発現量は，蛍光色素である SYBR green 試薬として THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を用いて，ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) によって増幅した標的産物から生じる蛍光を MyiQ2 (Bio-Rad) で検出する定量的リアルタイム PCR 法により求めた．PCR は 95°C で 10 秒，55°C で 10 秒，72°C で 30 秒を 1 サイクルとして行った．初めに，PCR 産物の純度を確認するため融解曲線を解析した．DNA 量のばらつきを補正するため，標的遺伝子の発現量は内在性コントロールであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) の発現量で標準化した．オリゴヌクレオチドプライマー (北海道システムサイエンス) の設計は Beacon Designer 8 (Bio-Rad) を用いて行った．使用したプライマーの塩基配列は Table 1 に示す．mRNA 発現量は，検量線に基づいて定量し，結果は対照群における値を 1 として相対的に示した．

Table 1 Primer sequences list used in this study.

Target	F/R	Primer sequence (5'-3')
CYP2C6	Forward	CTTCAAGATTCAAGAAATATCCA
	Reverse	GTGAATTACCAGGCTACA
CYP2C11	Forward	TCCAGTGAACATCAAACCTCAT
	Reverse	ATGGGAATGTCACAAGATATAGGG
GAPDH	Forward	CCCTTCATTGACCTCAACTACAATGGT
	Reverse	GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG

1-2-12. 統計学的解析

結果は，平均±標準偏差（standard deviation: SD）で示した．なお，2 群間の統計学的比較には対応のない Student's *t*-検定を行い，いずれも $p<0.05$ を有意と判定した．

第三節 結 果

1-3-1. 5-FU 投与ラットの肝機能検査値および肝臓組織像

5-FU 投与ラットにおける肝臓の状態を生化学的および病理組織学的検査によって評価した。5-FU 投与は、ラットの血清 AST および ALT 活性に影響を与えなかった (Table 2)。また、5-FU 投与ラットにおける肝臓組織像は、対照群と同様に細胞質も良好に保たれた正常な細胞形態を示した (Figure 1)。

Table 2 Serum hepatic enzyme levels of control and 5-FU-pretreated rats.

	Control	5-FU
AST (IU/L)	49.0 ± 10.6	56.0 ± 4.7
ALT (IU/L)	15.4 ± 5.8	9.8 ± 4.4

Results are shown as the means ± SD of five rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2018;48:53-59.

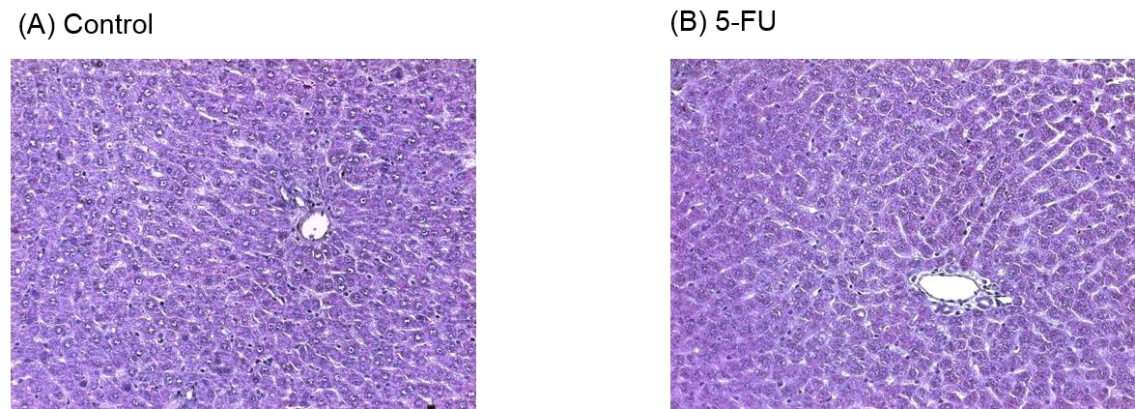


Figure 1 Photomicrograms of liver tissue stained with hematoxylin and eosin.

Hepatic tissues were dissected from rats in the absence (A) or presence (B) of 5-FU treatment, and then were stained with hematoxylin and eosin (×200).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2018;48:53-59.

1-3-2. 静脈投与後の TB 体内動態に及ぼす 5-FU の影響

Figure 2 は, 5-FU 群および対照群における TB の血清濃度時間推移を示す. 静脈投与後の TB 血清濃度は, 投与直後には急速に減少し, その後緩やかに減少する二相性の消失挙動を示した. 5-FU 群の血清 TB 濃度は, いずれの採血時間においても対照群と比較して高値を示した. ノンコンパートメント解析法を用いて算出した体内動態パラメータを Table 3 に示す. 5-FU 群の $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ は対照群と比べて有意な高値を示し, CL_{tot} および k_e は有意な低値を示した. その一方で, Vd_{ss} には両群間で有意な差がみられなかった.

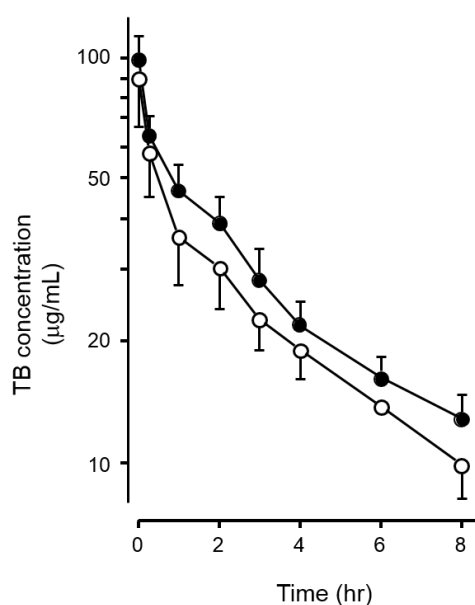


Figure 2 Serum concentration-time courses of TB after intravenous administration to rats.

Serum concentrations of TB were measured after intravenous administration (10 mg/kg). Serum TB concentrations were represented in a logarithmic scale. Results are shown as the means \pm SD of five rats per group. Open: control group; Closed: 5-FU group.

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2018;48:53-59.

Table 3 Pharmacokinetic parameters of TB after intravenous administration.

	Control	5-FU
AUC _{0→∞} (mg·h/L)	324.4 ± 43.4	445.1 ± 24.8*
AUC _{0→8h} (mg·h/L)	194.2 ± 25.4	229.9 ± 22.8*
CL _{tot} (L/h/kg)	0.031 ± 0.004	0.022 ± 0.001*
k _e (1/h)	0.077 ± 0.008	0.061 ± 0.007*
Vd _{ss} (L/kg)	0.313 ± 0.076	0.298 ± 0.047

Results are shown as the means ± SD of five rats per group. * $p < 0.05$ versus control group (Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2018;48:53-59.

1-3-3. TB 4-水酸化活性に及ぼす 5-FU の影響

5-FU 投与ラットから得た肝ミクロソームにおける 4-OH-TB 生成速度は、対照群と比べて有意な低値を示した (Figure 3A). その一方で、500 μ M の 5-FU を酵素反応液に直接添加してもラット肝ミクロソームによる TB 4-水酸化活性には影響を及ぼさなかった (Figure 3B).

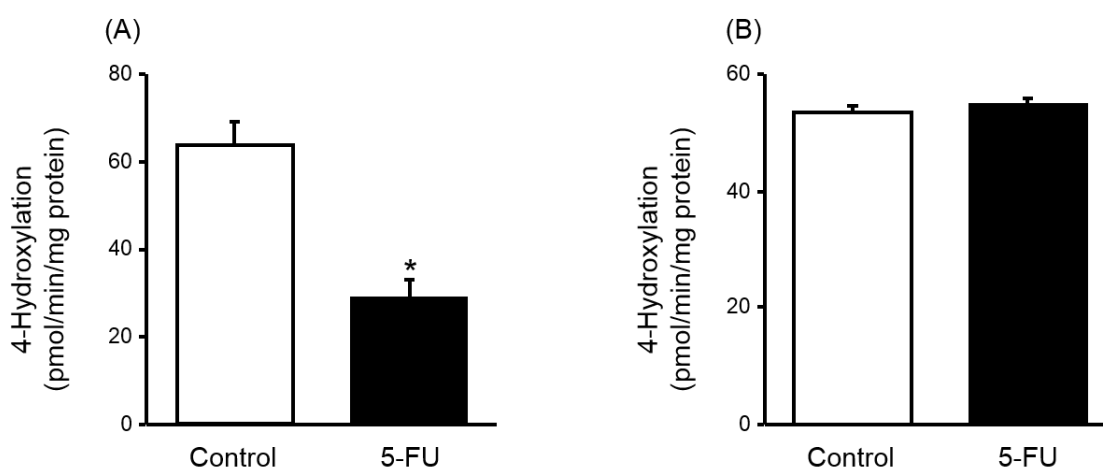


Figure 3 Effects of 5-FU on 4-hydroxylation activity of TB.

(A) TB was reacted with microsomes obtained from rats 4 days after administration of 5-FU. (B) TB was reacted with microsomes in the presence of 500 μ M 5-FU. Results are shown as the means ± SD of four rats per group.

*Significantly different from the mean values of the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2018;48:53-59.

1-3-4. CYP2C6 タンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響

CYP2C6 タンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響についてウェスタンブロット法を用いて検討した (Figure 4). ラット肝臓における CYP2C6 タンパク発現量は, 5-FU 投与によって有意に減少した. なお, 5-FU 群と対照群における PVDF 膜に転写したタンパクは同様の CBB 染色像を示した.

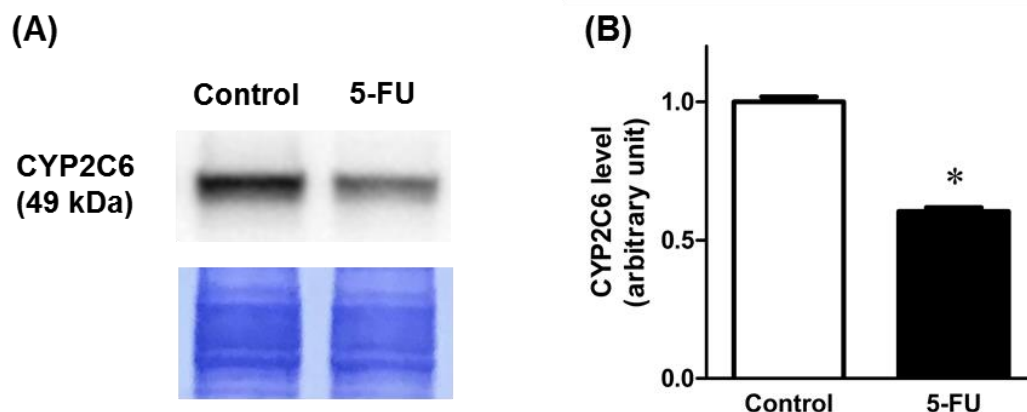


Figure 4 Effect of 5-FU on hepatic expression of protein for CYP2C6.

The upper panel shows immunoreactive bands for CYP2C6 in the control and 5-FU-treated rat, and the lower panel shows the CBB-stained PVDF membrane (A). Calculated values for visualized immunoreactive bands (B) are shown as the mean \pm SD of three rats per group. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$, Student's unpaired t -test).

1-3-5. 肝臓の CYP2C 遺伝子発現量に及ぼす 5-FU の影響

CYP2C6 および CYP2C11 の mRNA 発現量に及ぼす 5-FU の影響についてリアルタイム PCR 法を用いて検討した (Figure 5). ラット肝臓における CYP2C6 および CYP2C11 の mRNA 発現量は, 5-FU 投与によっていずれも有意に減少した.

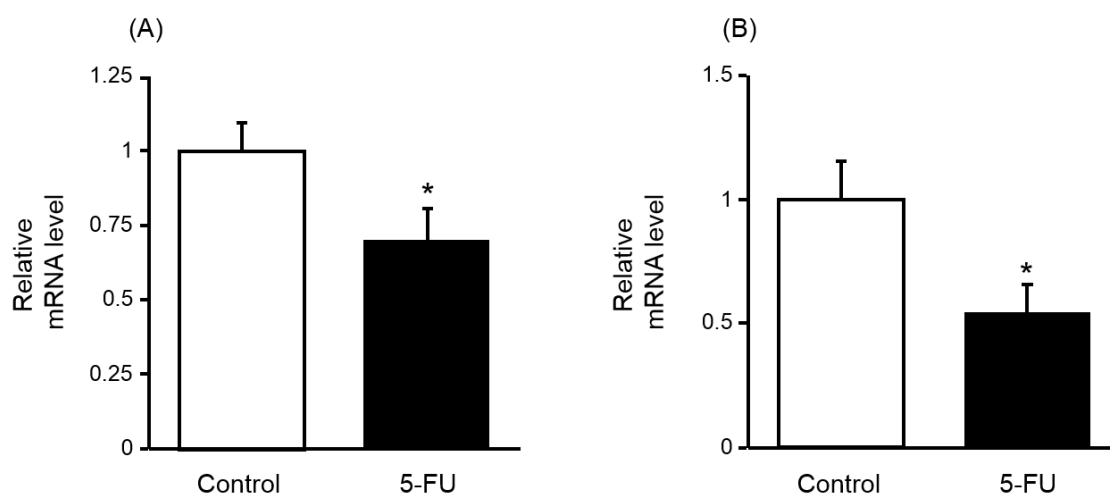


Figure 5 Effects of 5-FU on expression level of mRNAs for CYP2C6 and CYP2C11 in the liver.

Liver tissue was dissected out from rats 4 days after administration of 5-FU, and then the expression level of CYP2C6 (A) and CYP2C11 (B) in the tissue was examined by real-time quantitative PCR. Data were normalized to GAPDH mRNA. Results are shown as the means \pm SD of four rats per group.

*Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2018;48:53-59.

第四節 考 察

過去の研究⁵²⁻⁵⁴⁾と同様に、静脈注射後の TB 血清濃度推移は投与後初期に急速な減少を伴う二相性を示した。5-FU 投与ラットの血清 TB 濃度はいずれの採血時点においても対照群と比較して高値を示し、その結果、算出された AUC は有意な増加を示した。また、 Vd_{ss} は有意な変化を認めず、 CL_{tot} は有意な低値を示した。TB の大半は CYP2C によって 4-水酸化体である 4-OH-TB に代謝変換され⁵⁵⁾、その大部分がグルクロン酸抱合等の第二相の代謝や腸肝循環を受けずに尿中へ排泄される^{56, 57)}。したがって、TB の CL_{tot} は概ね非腎クリアランスとみなすことができるため⁵⁸⁾、TB 体内動態解析の結果は、5-FU 投与によって肝ミクロソームの TB 4-水酸化反応が抑制された *in vitro* の結果と一致するものと考えられた。以上より、5-FU 投与は肝臓の CYP2C 代謝活性を低下させることで TB 代謝クリアランスを変化させ、TB の血中濃度を上昇させることが示唆された。そのため、本実験系は、5-FU 投与による CYP2C 代謝活性低下に関して臨床で推定されている機序の一端を解明していく上で、有用なモデルと考えられた。

5-FU は肝障害を引き起こす可能性があると報告されている⁵⁹⁾。肝障害は薬物の体外への消失を遅延させる可能性が考えられるため⁶⁰⁾、血清 ALT および AST 活性や肝組織染色像を評価した。その結果、本実験条件では 5-FU 投与ラットの肝臓に器質的な異常は認められず、肝組織に対する 5-FU の影響は代謝クリアランスを減少させる原因ではないと考えられた。その一方で、NADPH の存在下で 5-FU をミクロソーム反応液に直接添加しても、ヒト肝ミクロソームを用いた過去の報告³⁰⁾と同様に、TB から 4-OH-TB の生成を阻害しなかったため、5-FU はラット肝 CYP2C に対しても競合的阻害または mechanism-based inhibition (MBI) を引き起こさないことが示唆された。5-FU の代謝に CYP 酵素は関与しておらず⁶¹⁾、5-FU は腹腔内投与 1 日後にはほぼ完全に体内から除去されることから⁶²⁾、5-FU と CYP2C タンパクの間で分子的な相互作用は起こっておらず、5-FU は TB 代謝を間接的に阻害するものと考えられた。

5-FU が CYP2C 代謝活性低下をもたらす機序についての新たな知見を得るため、リアルタイム PCR 法を用いて 5-FU 投与ラットの肝臓における CYP2C6 および CYP2C11 の遺伝子発現量について検討した。その結果、CYP2C6 および CYP2C11 の mRNA 発現量は 5-FU 投与によって顕著に低下し、過去の報告¹⁶⁾で 5-FU 投与ラットの CYP2C11 タンパク発現量が低下した理由が明確に説明された。さらに、過去に報告されていないラット肝臓の CYP2C6 タンパク発現量についても、5-FU 投与によって有意に減少することが確認された。以上より、5-FU 投与による肝 CYP2C 代謝活性の低下は、CYP2C に対応する mRNA の転写抑制または安定性の低下に起因し、CYP2C タンパクへの翻訳を抑制しているものと考えられた。

5-FU の分子薬理学的な作用として c-Jun N-terminal kinase (JNK) シグナル伝達経路を刺激することが認められており⁶³⁾、JNK シグナル伝達経路の活性化によって転写因子の 1 つである forkhead box protein O1 (FOXO1) の細胞質から細胞核への移行が促進される⁶⁴⁾。しかし、CYP2C を含むいくつかの CYP 遺伝子の転写過程は FOXO1 が細胞核から細胞質へ移行することで抑制されると報告^{65, 66)}されていることから、本研究で認められた 5-FU 投与による CYP2C6/11 遺伝子発現量の低下に FOXO1 が関連する可能性は低いと考えられた。一方、5-FU の曝露はいくつかの microRNA (miRNA) の発現量を増加または減少させると報告されている⁶⁷⁻⁷⁰⁾。miRNA は主に mRNA の分解促進や翻訳過程を阻害することで遺伝子発現の転写後制御に深く関与していると考えられており⁷¹⁾、miRNA のうち miR-142-5p や miR-142-3p は CYP2C11 遺伝子発現の抑制因子として機能している可能性が示されている⁷²⁾。そのため、5-FU 投与によってラット肝臓の CYP2C6/11 mRNA 発現量が減少した理由の 1 つとして、miRNA 発現量の変動が関与している可能性が考えられた。5-FU 短期曝露による CYP2C mRNA 発現量減少に関する分子メカニズムの解明には、今後より詳細な検討が必要と考えられる。

本研究で使用した 5-FU の投与量は、体表面積に基づく用量変換式⁷³⁾を用いてヒトへの投与量に換算すると約 700 mg/m²に相当する。消化器がんなどの治療における FOLFIRI²¹⁾ や mFOLFOX6²²⁾ レジメンで、5-FU は 400 mg/m²

の用量で急速静脈内注射された後、さらに 2,400 mg/m² の用量を 46 時間かけて持続点滴投与されており、本実験で用いた抗がん剤の投与量は臨床と大きく乖離していないものと考えられた。主として CYP2C9 で代謝される *S*-ワルファリン³⁵⁾は高い抗凝固活性を有しており、ワルファリン服用患者が 5-FU を併用することで国際標準比プロトロンビン時間 (prothrombin time-international normalized ratio: PT-INR) の上昇に起因する出血症状の発症が認められたと報告されている^{23, 24)}。加えて、CYP2C9 基質薬物であるフェニトインと 5-FU 併用患者においては、血清フェニトイン濃度が中毒域まで顕著に上昇し、頻回転倒を伴う神経症状を発症したと報告されている²⁵⁾。これらの報告は、5-FU 投与による肝臓の CYP2C 活性低下に起因するとされる薬物相互作用の事例であり、本研究で得られた結果は 5-FU が肝臓の CYP2C を介して引き起こす薬物相互作用を基礎的観点から裏付ける重要な知見と考えられた。

現在のところ、CYP2C9 を介した 5-FU と TB の相互作用についての臨床報告はなされていない。しかし、TB を経口投与した場合の体内動態はラットとヒトで同様の挙動を示すことから⁷⁴⁾、医療現場においても TB の体内動態およびその薬理作用が 5-FU 投与によって変化する可能性はあると考えられる。CYP2C9 では 30 種類の対立遺伝子が同定されている。その中でも対立遺伝子発現頻度がそれぞれ白人では 0.03-0.085、アジア人では 0.043-0.077 である CYP2C9*3 は CYP2C9 の主要な変異体であり、野生型と比較してその触媒能は低いとされている^{75, 76)}。TB と同じ SU 剤に分類されるクロルプロパミドは CYP2C9 によって 2-水酸化体に代謝されるが、CYP2C9*1/*3 患者の非腎クリアランスはホモ接合の CYP2C9*1/*1 患者と比較して低下すると報告されている⁷⁷⁾。そのため、TB の固有代謝能に及ぼす 5-FU の影響が CYP2C9*1/*1 を有する患者と CYP2C9*1/*3 を有する患者との間で異なるか否かについては新たな臨床課題と考えられた。

第五節 小 括

本章の結果より，5-FU は肝 CYP2C 遺伝子発現量を低下させることで肝 CYP2C タンパク発現量は減少すると考えられ，その結果として TB 代謝クリアランスの低下をもたらし，TB の体内動態を変動させることが示唆された．

臨床において 5-FU およびそのプロドラッグを併用することでフェニトインやワルファリンの血中濃度上昇に伴う有害事象が発現した症例が複数報告されているが，相互作用の詳細な機序は不明であった．本章で認められた TB 代謝クリアランスの低下は，5-FU 投与による CYP2C 活性低下が原因と考えられる薬物相互作用を基礎的観点から裏付ける重要な知見であり，これらの相互作用は肝臓の CYP2C に関連する mRNA 転写の抑制または安定性の低下に起因することが示唆された．

第二章 5-FU 投与が CYP3A 基質薬物の肝代謝能および体内動態に及ぼす影響

第一節 緒言

第一章の結果より、5-FU は肝臓の CYP 発現量を変動させることで併用薬と薬物相互作用を引き起こす可能性が示された。CYP は多くのサブタイプに分類されるが、その中でも CYP3A サブファミリーは CYP2C サブファミリーと並び医療現場で用いられている多くの医薬品を代謝する重要な酵素群の 1 つと考えられている^{78, 79)}。そのため、実験動物を用いた肝臓の CYP3A に関する基礎研究が、ヒトにおける臨床研究と同様に多数行われている。臨床で催眠鎮静薬として使用されているミダゾラム (midazolam: MDZ) は、ヒトにおいて CYP3A4 および CYP3A5^{80, 81)}、ラットにおいて CYP3A1/3A23 および CYP3A2 によって^{82, 83)}、4-ヒドロキシミダゾラム (4-hydroxy midazolam: 4-OH-MDZ) および 1'-ヒドロキシミダゾラム (1'-hydroxy midazolam: 1'-OH-MDZ) に代謝される。MDZ は CYP3A に対する高い選択性を有しながら薬物トランスポーターによる顕著な影響を受けないことから、ヒトおよびラットの CYP3A 活性を評価するための有用な基質薬物として用いられている⁸⁴⁾。

5-FU はがん患者の全身化学療法において中心的役割を担っているが他の抗がん剤と併用されることも多い。さらに、がん患者は他の合併症に対する治療薬を併用している場合も少なくない。5-FU と CYP2C 基質薬物との薬物相互作用は第一章で述べたように多くの臨床報告がされているものの、CYP3A 基質薬物との薬物相互作用に関する報告はほとんどない。その一方で、ラットを用いた基礎研究では、5-FU を単回投与した 2 日後に肝臓の CYP3A タンパク発現量が顕著に増加すると報告されている¹⁶⁾。しかし、CYP3A 活性を反映するプロゲステロンおよびテストステロンの 6 β -水酸化活性は、いずれも 5-FU 投与 2 日後に顕著な増加を示さず^{16, 85)}、5-FU 投与により増加した肝 CYP3A 発現量とその代謝活性が合致しない理由は未だ明らかとされていない。

本章では、5-FU 投与が CYP3A 基質薬物の肝代謝能および体内動態に及ぼす影響の有無を明らかにするため、5-FU 単回投与 2 日後のラット肝ミクロソームにおける CYP3A 発現量および MDZ 水酸化代謝活性の変動について調べた。さらに、5-FU 投与ラットの *in vitro* における MDZ 代謝能が *in vivo* における MDZ 体内動態に反映されるか否か検証した。

第二節 実験材料および方法

2-2-1. 薬物および試薬

5-FU, MDZ, ジアゼパムおよびフルコナゾールは富士フィルム和光純薬より購入した. フェナセチンは Santa Cruz Biotechnology より購入した. 4-OH-MDZ および 1'-OH-MDZ は Sigma-Aldrich より入手した. その他の試薬類および溶媒類は特級または HPLC 用のものを使用した.

2-2-2. 実験動物

7 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットは日本エスエルシーより購入し, 第一章 第二節 1-2-2. と同様に取り扱った. 5-FU (120 mg/kg) または生理食塩水を 2.5 mL/kg の容量で腹腔内投与し, CYP3A 発現量が増加すると報告¹⁶⁾されている 5-FU 投与 2 日後に肝ミクロソーム試料および血清試料を得た. 動物実験計画は, 大阪大谷大学動物実験委員会の審査を受けて承認された.

2-2-3. ラット肝ミクロソーム試料の調製

第一章 第二節 1-2-8. に準じてミクロソーム試料を調製した.

2-2-4. CYP3A 分子種のタンパク発現量の比較

第一章 第二節 1-2-10. に従い実験を行った. なお, 一次抗体として 1,000 倍希釈したウサギ抗 CYP3A1 ポリクローナル抗体 (Millipore) またはウサギ抗 CYP3A2 ポリクローナル抗体 (コスモバイオ) を用い, 5,000 倍希釈した二次抗体として HRP で標識された抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (GE Healthcare) を用いた.

2-2-5. MDZ 水酸化活性の測定

酵素反応速度試験では, 酵素反応を 0.5 mM NADP⁺, 5 mM グルコース-6-リン酸, 5 mM MgCl₂ および 2 U グルコース-6-リン酸脱水素酵素を含む NADPH 生成系, 1 mM EDTA, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), ミクロソーム試料 (1

mg/mL) ならびに 2.5, 5, 10, 20, 50 もしくは 100 μ M MDZ の混合溶液を全量 500 μ L として行った. ミクロソーム試料を添加することで反応を開始し, 37°C で 5 分間反応させた. 酵素反応阻害試験では, NADPH 生成系, 1 mM EDTA, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), ミクロソーム試料 (1 mg/mL) および CYP3A 拮抗阻害剤としてフルコナゾール (300 μ M) または 5-FU (100 もしくは 500 μ M) の混合溶液 450 μ L を, 37°C で 5 分間プレインキュベーションした後に, MDZ (100 μ M) を添加することで反応を開始し, 37°C で 5 分間反応させた. いずれの試験も MDZ 水酸化反応は, 2 M 水酸化ナトリウム溶液を 1 mL 添加することで停止させた. その後, IS として 2 μ M フェナセチンを 50 μ L 添加し, さらにジエチルエーテルを 4 mL 添加し, 5,000 *g* で 10 分間遠心分離した. 有機層のみを採取し, 50°C で乾固させた後の残渣を 200 μ L の移動相で溶解し, この溶液 100 μ L を第一章 第二節 1-2-6. と同様の HPLC システム (島津製作所) に注入した. なお, 移動相には 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), メタノールおよびアセトニトリルの混液 (v/v/v; 60/5/35) を用いて, 流速は 1.0 mL/min に設定した. 分離用カラムには RP-18 GP II (関東化学) を用いて, カラム温度を 40°C に設定した. 測定波長は 220 nm で分析し, 4-OH-MDZ および 1'-OH-MDZ の濃度は, IS とのピーク面積比により求めた.

2-2-6. 酵素反応パラメータの算出

過去の研究と同様に^{86, 87)}, MDZ 4-および 1'-水酸化反応の酵素反応パラメータは Michaelis-Menten 式に従うものとし, 酵素反応パラメータを推定するために各データを以下の式 (式 1) に当てはめた.

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (\text{式 1})$$

なお, V , V_{\max} , S および K_m は, それぞれ反応速度, 最大反応速度 (maximum reaction velocity: V_{\max}), MDZ 濃度およびミカエリス定数 (Michaelis constant: K_m) を示す. V_{\max} および K_m は非線形最小二乗法により算出した⁸⁸⁾.

2-2-7. MDZ 投与および採血

5-FU 投与 2 日後に、MDZ を用量 5 mg/kg、容量 1 mL/kg の条件下で右内頸静脈から投与した。MDZ 投与 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120 および 180 分後に左内頸静脈から採血を行った。他の操作は、第一章 第二節 1-2-3. と同様に行った。

2-2-8. 血清中 MDZ 濃度の測定

血清 100 μ L に IS として 20 μ g/mL ジアゼパムを 50 μ L, 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を 200 μ L 添加後、ジエチルエーテルを 4 mL 加えて、ボルテックスによる攪拌を行い 5,000 *g* で 10 分間遠心分離を行った。有機層のみを採取し、50°C にて乾固させた後の残渣を 200 μ L の移動相に溶解し、この溶液 50 μ L を HPLC システム（島津製作所）に注入した。移動相には 15 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 4.0）およびアセトニトリルの混液（v/v; 62/38）を用い、流速は 1.0 mL/min に設定した。分離用カラム、カラム温度および測定波長は、いずれも上記 2-2-5. と同じ条件で分析した。血清中の MDZ 濃度は IS とのピーク面積比により求めた。

2-2-9. MDZ 体内動態パラメータの解析

第一章 第二節 1-2-7. に従い、ノンコンパートメントモデルに基づいて MDZ の体内動態パラメータを算出した。

2-2-10. 統計学的解析

結果は、平均 \pm SD で示した。なお、2 群間の統計学的比較には対応のない Student's *t*-検定を行い、いずれも $p<0.05$ を有意と判定した。

第三節 結 果

2-3-1. 5-FU 投与によるラット体重および肝重量の変化

5-FU 投与ラットの体重は対照群と比較して有意に低下した。しかし、肝重量および肝重量/体重比は、5-FU 群と対照群との間で有意な差は認められなかった (Table 4)。

Table 4 Body and liver weights of the control and 5-FU-treated rats.

	Control	5-FU
Body weight (g)	256 ± 8	241 ± 10*
Liver weight (g)	12.9 ± 2.0	13.6 ± 2.0
Liver weight/Body weight (%)	5.0 ± 0.7	5.6 ± 0.8

Results are shown as the mean ± SD of seven rats per group. *Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

2-3-2. CYP3A タンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響

5-FU の CYP3A 分子種のタンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響についてウェスタンブロット法を用いて検討した (Figure 6)。5-FU は肝 CYP3A1/3A23 タンパク発現量に有意な影響を及ぼさなかったものの、5-FU 群の肝 CYP3A2 タンパク発現量は対照群と比較して有意に増加した。なお、5-FU 群および対照群における PVDF 膜に転写されたタンパクは同様の CBB 染色像を示した。

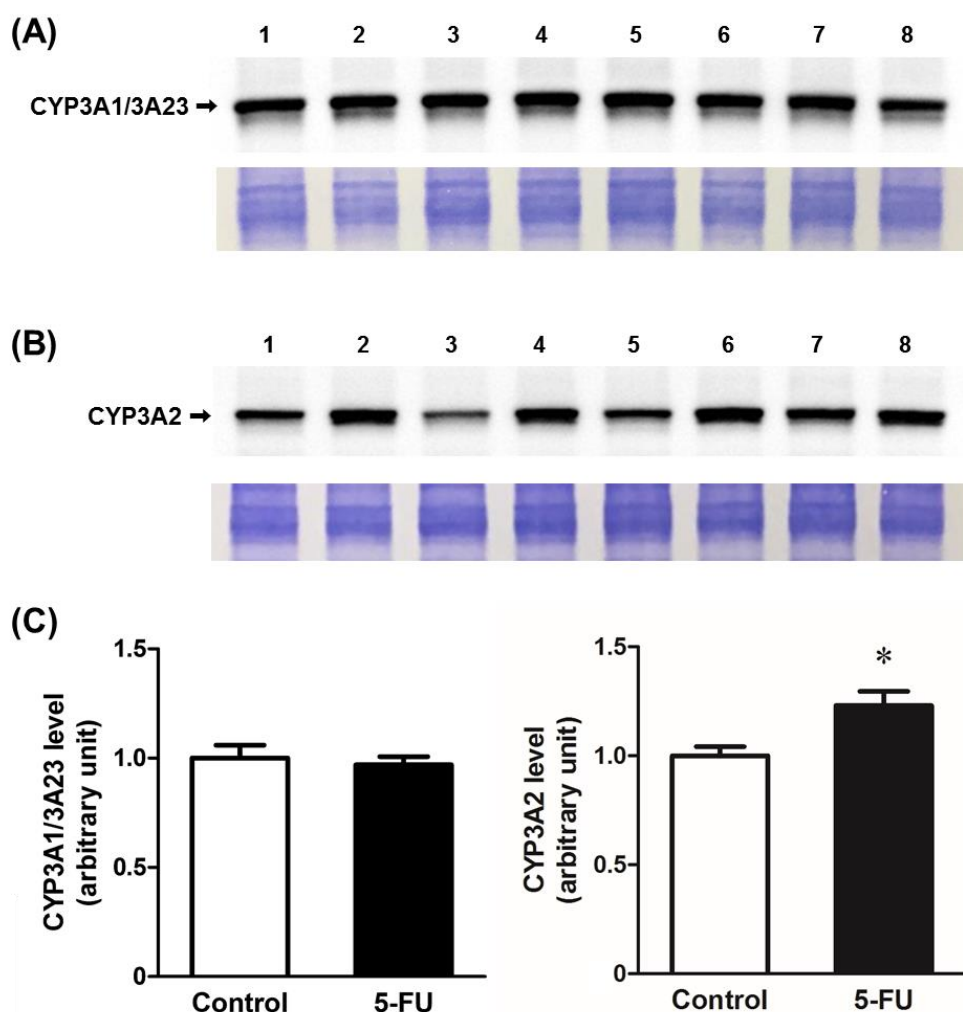


Figure 6 Effect of 5-FU on hepatic protein expression of CYP3A1/3A23 and CYP3A2.

Upper panels show immunoreactive bands for CYP3A1/3A23 (A) and CYP3A2 (B) in the control (1, 3, 5 and 7) and 5-FU-treated (2, 4, 6 and 8) rats, and lower panel shows CBB-stained PVDF membranes. Calculated values for visualized immunoreactive bands (C) are shown as the mean \pm SD of four rats per group. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477. 一部改変

2-3-3. MDZ 4-および 1'-水酸化活性に及ぼす 5-FU の影響

5-FU 投与ラットの肝ミクロソームにおける MDZ 4-および 1'-水酸化活性は、過去の研究⁸⁹⁾で報告されている K_m 値の 10 倍以上の濃度である 100 μ M の基質存在下において、対照群と比較して有意な増加を示した (Figure 7). さらに *in vitro* における 5-FU の MDZ 4-および 1'-水酸化活性に対する影響について

も無処置ラットの肝ミクロソームを用いて検討した。100 μM または 500 μM の 5-FU を酵素反応液に直接添加した結果、いずれの MDZ 水酸化活性にも影響を及ぼさなかった (Figure 8)。

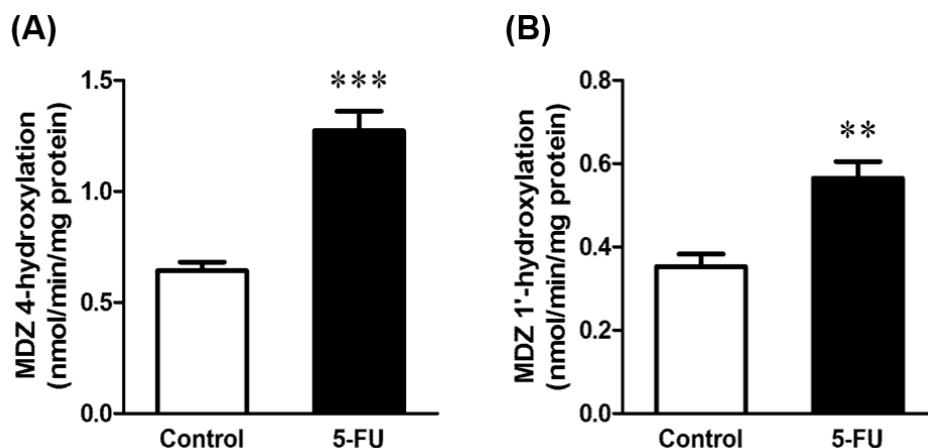


Figure 7 Effects of 5-FU treatment on MDZ 4-hydroxylation (A) and MDZ 1'-hydroxylation (B) in rat liver microsomes.

MDZ (100 μM) was reacted with 1 mg/mL of microsomes for 5 min at 37°C. Results are shown as the mean \pm SD of six rats per group. **Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test). ***Significantly different from the control group ($p < 0.001$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

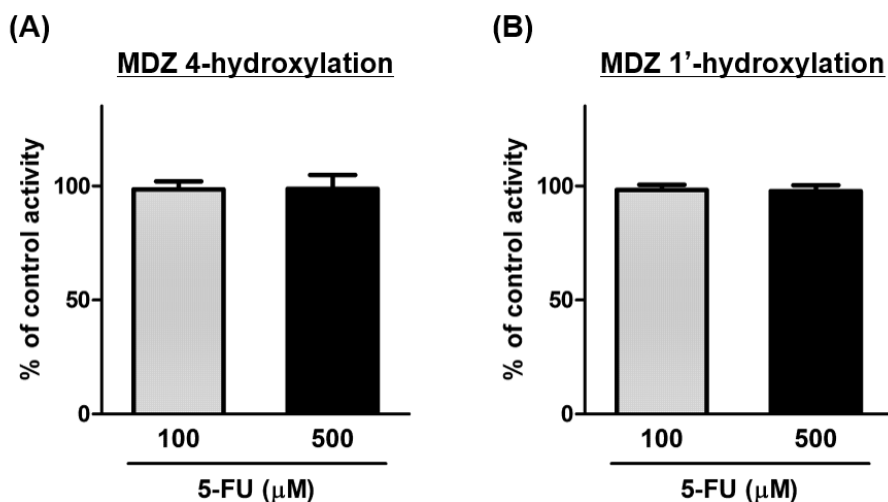


Figure 8 *In-vitro* effects of 5-FU on MDZ 4-hydroxylation (A) and MDZ 1'-hydroxylation (B) in untreated rat liver microsomes.

The incubation mixtures including rat liver microsomes (1 mg/mL) and 5-FU (0, 100, 500 μM) were preincubated for 5 min at 37°C with NADPH-generating system. The reactions were initiated by adding MDZ (100 μM) and proceeded for 5 min at 37°C. Data are expressed as percent of the activity without 5-FU. Results are shown as the mean \pm SD of four rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

2-3-4. 静脈内投与後の MDZ 体内動態に及ぼす 5-FU の影響

Figure 9 は 5-FU 群と対照群における静脈投与後の MDZ 血清濃度時間推移を示す．いずれの採血時間においても 5-FU 群と対照群の血清 MDZ 濃度はほぼ同様の値を示した．ノンコンパートメント解析法を用いて体内動態パラメータを算出した結果を Table 5 に示す． $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 、 CL_{tot} 、 k_e または Vd_{ss} のいずれの値も両群間で有意な差異は認められなかった．

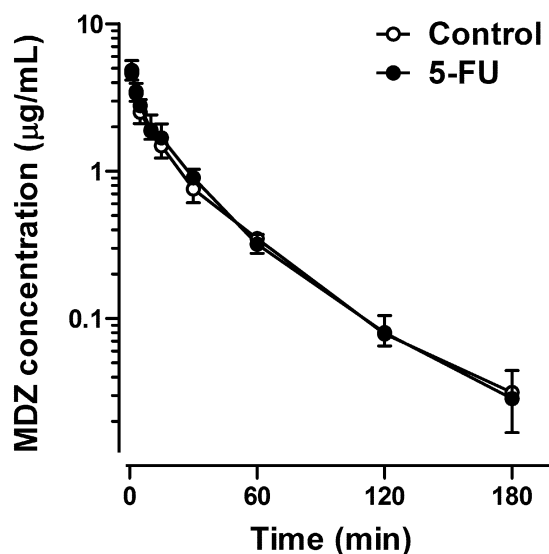


Figure 9 Serum concentration-time courses of MDZ (5 mg/kg) after its intravenous administration to the control and 5-FU-treated rats.

Serum MDZ concentrations are represented in a logarithmic scale. Results are shown as the mean \pm SD of seven rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

Table 5 Pharmacokinetic parameters of MDZ (5 mg/kg) after its intravenous administration to the control and 5-FU-treated rats.

	Control	5-FU
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (mg \cdot hr/L)	1.44 ± 0.18	1.53 ± 0.16
CL_{tot} (L/kg/hr)	3.51 ± 0.46	3.30 ± 0.35
k_e (1/hr)	1.22 ± 0.20	1.34 ± 0.33
Vd_{ss} (L/kg)	2.00 ± 0.23	1.76 ± 0.19

Results are shown as the mean \pm SD of seven rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

2-3-5. MDZ 4-および 1'-水酸化反応の酵素反応パラメータ

Figure 10 は、MDZ 4-および 1'-水酸化反応の基質濃度依存性を検討した結果を示す。酵素反応パラメータを算出した結果、5-FU 群の V_{\max} 値は対照群と比較して有意な高値を示した。その一方で、いずれの水酸化反応においても 5-FU 群の K_m 値は、対照群と比較して有意な高値を示した。 V_{\max} 値と同様に K_m 値の増加が認められた結果、5-FU 群における MDZ 1'-水酸化反応の V_{\max}/K_m 値はわずかに増加が認められたものの、MDZ 4-水酸化反応の V_{\max}/K_m 値に有意な変化は認められなかった (Table 6, 7)。

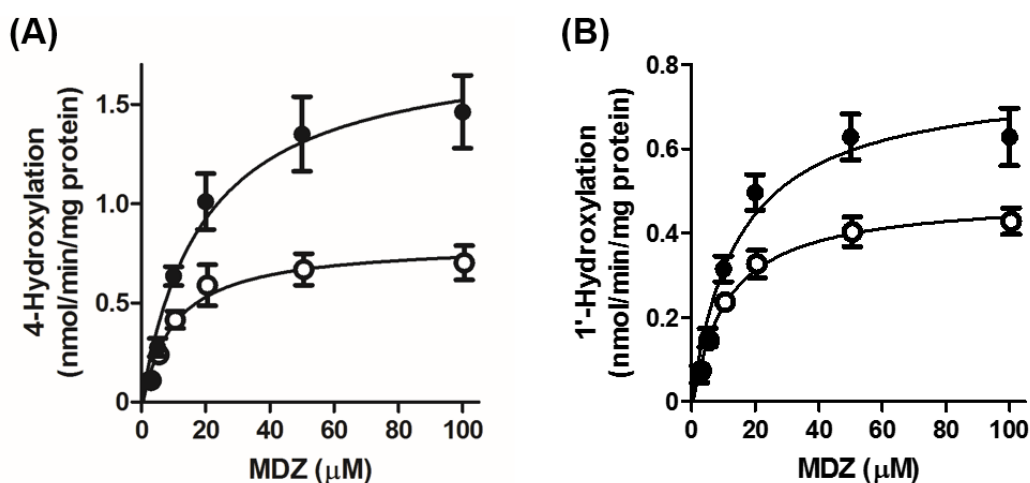


Figure 10 Enzyme kinetics of MDZ 4-hydroxylation (A) and MDZ 1'-hydroxylation (B) in hepatic microsomes of the control and 5-FU-treated rats.

MDZ was reacted with 1 mg/mL of microsomes for 5 min at 37°C. Results are shown as the mean \pm SD of six rats per group. Open: control group; Closed: 5-FU group.

引用) Fukuno S. et al., *Xenobiotica*, 2019;49:1470-1477.

Table 6 Effect of 5-FU treatment on MDZ 4-hydroxylation in rat liver microsomes.

	Control	5-FU
V_{\max} (nmol/min/mg protein)	0.80 ± 0.10	$1.82 \pm 0.26^{***}$
K_m (μ M)	10.2 ± 1.1	$19.5 \pm 3.0^{***}$
V_{\max}/K_m (μ L/min/mg protein)	79.6 ± 11.7	94.2 ± 13.4

Results are shown as the mean \pm SD of six per group. ***Significantly different from the control group ($p < 0.001$, Student's unpaired t-test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

Table 7 Effect of 5-FU treatment on MDZ 1'-hydroxylation in rat liver microsomes.

	Control	5-FU
V_{\max} (nmol/min/mg protein)	0.49 ± 0.05	$0.77 \pm 0.08^{**}$
K_m (μ M)	11.1 ± 2.1	$14.7 \pm 1.6^{***}$
V_{\max}/K_m (μ L/min/mg protein)	44.9 ± 5.9	$52.7 \pm 5.6^*$

Results are shown as the mean \pm SD of six per group. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$, Student's unpaired t-test). **Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t-test). ***Significantly different from the control group ($p < 0.001$, Student's unpaired t-test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

2-3-6. CYP3A 阻害剤に対する MDZ 水酸化活性の阻害感受性

5-FU 群および対照群のラット肝ミクロソームにおける MDZ 4-および 1'-水酸化活性のフルコナゾールに対する阻害感受性について検討した (Figure 11). 両群間において MDZ 4-および 1'-水酸化活性の阻害率の差は、いずれも顕著ではなかったものの統計学的に有意であった。

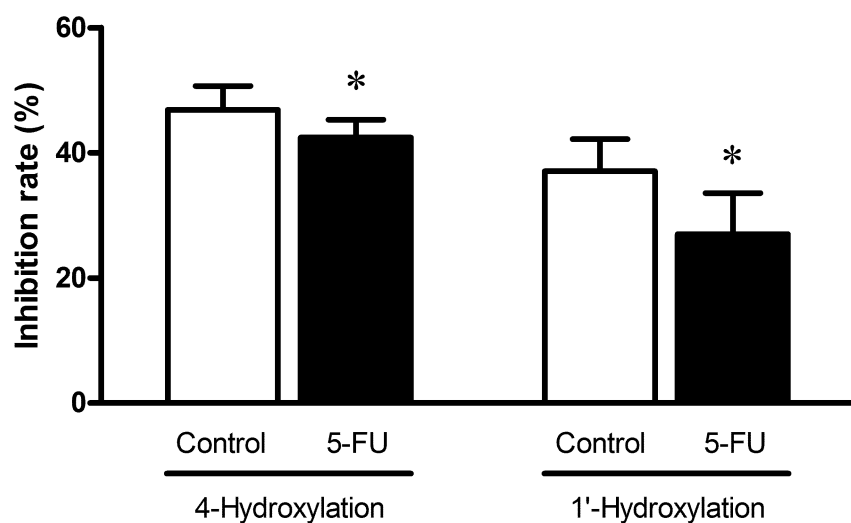


Figure 11 Differences in the inhibitory effects of 300 μ M fluconazole to MDZ 4- and 1'-hydroxylation between the control and 5-FU-treated rat microsomes.

MDZ (100 μ M) was reacted with 1 mg/mL of microsomes for 5 min at 37°C. Results are shown as the mean \pm SD of six rats per group. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$, Student's t -test).

引用) Fukuno S. et al., Xenobiotica, 2019;49:1470-1477.

第四節 考 察

ウェスタンブロット法による検討の結果、5-FU は投与 2 日後において、ラット肝臓の CYP3A1/3A23 タンパク発現量を変化させなかったが、CYP3A2 タンパク発現量を有意に増加させた。この結果は、5-FU 投与によってラット肝臓の CYP3A が誘導されるとの過去の報告¹⁶⁾を支持するとともに、5-FU による CYP 誘導作用は CYP3A2 などの CYP 分子種選択性を示すという点で重要な知見と考えられた。さらに、CYP3A2 発現量の増加と連動して、高濃度の基質存在下での肝ミクロソームの MDZ 水酸化活性は、5-FU 投与によって有意に促進した。過去の研究において、ゾルミトリプタンやメントールなど、いくつかの物質はラット肝 CYP3A2 を選択的に増加させると報告されている^{90, 91)}。生体異物による CYP3A の誘導にはプレグナン X 受容体 (pregnane X receptor: PXR) が重要な役割を担っていることが知られている^{92, 93)}。しかしながら、PXR はラットにおいて CYP3A1/3A23 と CYP3A2 の両方の誘導に関与していること^{94, 95)}から、CYP3A2 の選択的誘導作用は PXR の遺伝子転座のみでは説明ができない。そのため、5-FU による CYP3A2 誘導作用には、PXR の介在以外の分子的メカニズムが関与していることが示唆された。

次に、*in vitro* における肝ミクロソーム MDZ 代謝能の変化が、*in vivo* における MDZ のラット体内動態に連動するか否かについて検討した。過去の報告と同様に^{86, 91)}、対照群における静脈注射後の MDZ 血清濃度時間推移は、投与後初期に急速な減衰を伴う二相性を示した。5-FU 群における血清 MDZ 濃度は、いずれの採血時間においても対照群と同等の値を示した。さらに、体内動態パラメータを算出した結果、 CL_{tot} や k_e を含むいずれのパラメータも CYP3A 発現量の増加とは連動せず、5-FU 群と対照群との間で有意な差異は認められなかった。MDZ はラットおよびヒトのいずれにおいても、その大半が肝臓で水酸化代謝を受けて体内から消失する^{96, 97)}。これらの結果を考慮すると、5-FU 投与ラットにおける MDZ 体内動態は、5-FU による CYP3A2 誘導作用を反映していないものと考えられた。ラットにおいては MDZ の肝抽出率が高く⁹⁸⁾、薬物動態学的に MDZ の肝クリアランスが変化しにくいことも 5-FU 投与後の

MDZ 体内動態に有意な変化が認められなかった理由の 1 つとして考えられる。しかし、ラット肝 CYP3A 代謝活性の変動が MDZ 体内動態に反映されている過去の報告^{86, 89, 91)}を考慮すると、MDZ が高い肝抽出率を有することのみでは、今回の研究で 5-FU 投与後に MDZ の体内動態が変動しなかった理由を説明できないと考えられた。一般に薬物代謝酵素の活性はその薬物の体内濃度に依存することから、*in vitro* と *in vivo* の結果に矛盾が生じた要因を明らかにするため、MDZ 水酸化活性の反応速度論的解析を行った。

5-FU 投与ラットの肝ミクロソームにおける MDZ 水酸化活性について、反応速度論的解析を行った結果、5-FU 群の V_{\max} 値は MDZ 4-水酸化反応では約 2.3 倍、MDZ 1'-水酸化反応では約 1.6 倍と、いずれの MDZ 水酸化反応においても対照群と比較して有意な高値を示した。MDZ 4-水酸化反応は大半が CYP3A1/3A23 および CYP3A2 によって触媒されるが、MDZ 1'-水酸化反応には CYP3A1/3A23 および CYP3A2 だけでなく、他の CYP 分子種も関与していることが報告されている⁸³⁾。本研究において MDZ 4-と 1'-水酸化活性との間に認められた活性増加率の違いは、これらの代謝反応に対する CYP 分子種の寄与割合の差異によるものと考えられた。

CYP3A 誘導作用とは対照的に、5-FU 単回投与によって MDZ 4-および 1'-水酸化反応のいずれにおいても K_m 値の有意な増加が認められた。対照群の K_m 値は過去の報告と概ね同様の値を示した^{86, 87)}。5-FU を連続投与することでラット CYP3A 代謝能が低下することは過去に複数報告されているが^{15, 37, 99)}、5-FU 投与によって基質薬物に対する CYP3A の親和性が変化することを示した報告はない。CYP3A4 を含むヒト肝 CYP に関する研究³⁰⁾や第一章におけるラット肝 CYP2C における結果と同様に、本研究において 5-FU を NADPH 共存下でミクロソーム反応液に直接添加しても、4-OH-MDZ および 1'-OH-MDZ の代謝生成量に変化は認められなかった。そのため、5-FU はラット肝 CYP3A に対して競合的阻害または MBI を引き起こさず、MDZ 水酸化反応の K_m 値が変化した理由として、5-FU 分子と CYP3A タンパクが物理化学的相互作用を引き起こしている可能性は極めて低いと考えられた。雄性ラットにおける CYP3A2 の mRNA 発現量は CYP3A1/3A23 と比較して明らかに多く¹⁰⁰⁾、CYP3A2 のタ

ンパク発現量は CYP3A1/3A23 の 128 倍以上と報告されている¹⁰¹⁾. そのため, 5-FU 投与によって単純に常在型の CYP3A2 タンパク発現量が増加したと仮定すると, MDZ 4-水酸化反応の K_m 値の変化率は非常に小さいはずである. しかしながら, 5-FU 投与後の MDZ 4-水酸化反応における K_m 値の増加率は, V_{max} 値と同程度の顕著な増加を示し, MDZ 1'-水酸化反応においても同様の傾向が認められた. さらに, 5-FU 投与ラットの肝ミクロソームにおいて, CYP3A 阻害剤であるフルコナゾール^{102, 103)} の MDZ 水酸化反応に対する阻害感受性は対照群と比較して有意に低下した. 5-FU 投与の有無により CYP3A 阻害剤に対する阻害感受性に差異が認められたことも考慮すると, 5-FU 投与後では常在型の CYP3A とは活性部位の形状が異なる CYP3A タンパクが生合成されていることが示唆された. 5-FU はタンパク生合成の調節を介してその薬理作用を発現させることから^{104, 105)}, 5-FU は CYP3A 酵素タンパクの触媒機能に障害を引き起こしている可能性が考えられた. 過去の研究で Dolnic と Pink は, メトトレキサート耐性 KB 細胞を 5-FU に曝露すると, 5-FU が RNA に組み込まれることで翻訳過程におけるミスコードを引き起こし, メトトレキサートに対するジヒドロ葉酸還元酵素の親和性を低下させることを報告している¹⁰⁶⁾. 5-FU 暴露が RNA の転写後修飾に及ぼす影響の詳細は未だ明らかではないものの¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾, Dolnic と Pink の報告は, 本研究の結果を支持するものと考えられた. 以上より, 5-FU は CYP3A で触媒される MDZ 水酸化反応を直接的に阻害しないが, CYP3A1/3A23 や CYP3A2 タンパクの構造変化を引き起こし, MDZ に対する親和性を低下させる可能性が示された. 過去の研究では, 5-FU を投与してもプロゲステロンおよびテストステロンの 6 β -水酸化活性は変わらないと報告されている^{16, 85)}. 本研究で得られた知見と同様に, これらの結果から 5-FU 投与により基質薬物に対する CYP3A の親和性が低下している可能性が考えられる. CYP3A タンパク翻訳に影響を及ぼす mRNA のプロセシングに対する 5-FU の関与を明らかとするためには, 分子学的検討が必要と考えられた.

消失相における血清 MDZ 濃度および MDZ のタンパク結合率がおよそ 96% と高いこと⁹⁸⁾ を考慮すると, 肝臓内で代謝される遊離型 MDZ 濃度は MDZ 水酸化反応の K_m 値と比べてはるかに低いため, MDZ 4-水酸化および 1'-水酸化

反応の V_{\max}/K_m 値は、MDZ の肝固有クリアランス (intrinsic hepatic clearance: CL_{int}) に近似できる。実際に、5-FU 群と対照群の肝重量比は同程度であったため、5-FU 群と対照群との間でラットの主要代謝経路である MDZ 4-水酸化反応の V_{\max}/K_m 値に有意な差異が認められなかった結果は、5-FU 投与で MDZ の CL_{tot} が変動しなかった主な理由と考えられた。なお、5-FU 群における MDZ 1'-水酸化反応の V_{\max}/K_m 値は対照群と比較して統計学的に有意な高値を示したが、その変化量はわずか 1.2 倍であり、MDZ 体内動態に与える影響は小さいと考えられた。以上より、5-FU は投与 2 日後においてラット肝ミクロソームの MDZ 最大代謝活性を増加させると同時に、MDZ に対する肝 CYP3A の親和性を低下させるため、結果として *in vivo* における MDZ 代謝クリアランスに変化が認められないことが示唆された。

臨床において、5-FU はワルファリンの抗凝固作用を増強させることが明らかとされており、この薬物相互作用は第一章で得られた知見のように、5-FU による肝臓の CYP2C 活性低下が主な原因と考えられている。その一方で、臨床で用いられているワルファリンは光学異性体である *S*-ワルファリンと *R*-ワルファリンが等量の割合で含有されており、薬理活性の高い *S*-ワルファリンは主に CYP2C9 で代謝されるが、*R*-ワルファリンの代謝には CYP3A4 が一部関与しているため、CYP3A 活性に及ぼす影響についても留意すべきであるとされている¹¹⁰⁾。しかし、5-FU と CYP3A 基質薬物との薬物相互作用に関する臨床報告はほとんどない。また、5-FU のプロドラッグであるカペシタビンの併用がワルファリンの体内動態に及ぼす影響を検討した Camidge らの臨床報告²⁹⁾では、カペシタビン併用時における *R*-ワルファリンの代謝クリアランスは統計学的には有意な低下を示したものの、その程度は小さいものであり、カペシタビンは *R*-ワルファリンの体内動態に大きな影響を与えないとされている。本章で得られた知見は、Camidge らの報告を支持するものであり、5-FU が CYP3A 基質薬物の体内動態を変動させることを示した臨床報告は極めて少ないことを裏付ける貴重なものと考えられた。

第五節 小 括

本章の結果より, 5-FU 投与はラット肝 CYP3A2 タンパク発現量を増加させ, それに伴って肝ミクロソームにおける MDZ 最大代謝活性を増加させることを明らかとした. それと同時に, 5-FU は MDZ に対する CYP3A の親和性を低下させるため, MDZ 代謝活性への作用が相殺され, 結果として MDZ の体内動態に影響を及ぼさないことが示唆された.

実験動物を用いた基礎研究において, 5-FU 投与により増加した肝 CYP3A 発現量とその代謝活性が合致しなかった理由の 1 つとして, 5-FU 投与により基質薬物に対する CYP3A の親和性が低下している可能性が示された. 本章で得られた知見は, 臨床において 5-FU が CYP3A 基質薬物の体内動態を変動させることを示した報告は極めて少ないことを裏付ける貴重なものと考えられた.

第三章 DOX 投与による CYP2C 基質薬物体内動態変動メカニズムの解明

第一節 緒言

ドキソルビシン (DOX) は白血病, リンパ腫, 乳がんや肉腫を含む悪性腫瘍に対して幅広い抗腫瘍スペクトルを有するアントラサイクリン系抗がん剤である¹¹¹⁻¹¹³⁾. DOX の抗腫瘍効果は, DNA の塩基対間に挿入されることによる DNA 複製阻害や, DNA や染色体の立体構造制御に必要な不可欠なトポイソメラーゼ II を阻害することによって惹起される¹¹⁴⁾. また, DOX は心臓や肝臓などにおいて CYP 発現量を mRNA やタンパクレベルで変動させることが知られている医薬品の 1 つである^{17, 115)}.

DOX は 5-FU とは対照的に, 臨床においてフェニトインの血中濃度を低下させるため代謝クリアランスを増加させるとの見解が示されている¹⁴⁾. しかし, ワルファリンとの薬物相互作用は引き起こさないとする報告¹¹⁶⁾や CYP2C の基質であるロサルタンの代謝物排泄率に低下が認められたため CYP2C 活性を低下させるとの見解も示されており¹¹⁷⁾, DOX が CYP2C を介した薬物動態学的相互作用を引き起こすか否かについて相反する情報が交錯している. その一方で, ラットを用いた基礎研究では, DOX 単回投与 24 時間後において肝 CYP2C11 の mRNA およびタンパク発現量が低下すると報告されているが¹⁷⁾, CYP2C6 についての報告はない. また, 第二章で得られた知見のように, CYP タンパク発現量の変動がその代謝活性や併用薬の体内動態変動と必ずしも一致しないことから¹¹⁸⁾, CYP2C11 発現量の変動が CYP2C 基質薬物の体内動態を変動させるか否かについても不明である.

TB は, 代表的な SU 薬であり II 型糖尿病の治療薬である. 過去の酵素反応速度論的研究から, TB はヒトと同様にラットにおいてもほぼ全てが 4-OH-TB に代謝され, CYP2C6/11 の典型的な基質薬物として取り扱われている⁴⁶⁻⁵⁰⁾. 本章では, DOX による CYP2C を介した薬物動態学的相互作用の有無を明らかにすることを目的とし, DOX 投与後のラット肝 CYP2C6/11 発現量の変動が TB

代謝能に反映するか否かを DOX 投与ラットの肝ミクロソームにおける TB 4-水酸化活性を酵素反応速度論的に解析することで検討した。さらに，これら *in vitro* の酵素活性変動が *in vivo* の TB 体内動態変動と連動するか否か検証した。

第二節 実験材料および方法

3-2-1. 薬物および試薬

DOX は Meiji Seika ファルマより購入した。TB およびクロルプロパミドは富士フィルム和光純薬より購入した。4-OH-TB は Tronto Research Chemicals より購入した。その他の試薬類および溶媒類は特級または HPLC 用のものを使用した。

3-2-2. 実験動物

7 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットは日本エスエルシーより購入し、第一章 第二節 1-2-2. と同様に取り扱った。なお、DOX は生理食塩水に溶解し、15 mg/kg の用量でラットに腹腔内投与した。DOX の投与量および投与経路は以前の報告を参考に設定し¹⁷⁾、容量は 1.5 mL/kg に設定した。DOX 投与 1 日後 (Day 1) または 4 日後 (Day 4) に肝ミクロソーム試料および血清試料を得た。動物実験計画は、大阪大谷大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

3-2-3. ラット肝ミクロソーム試料の調製

第一章 第二節 1-2-8. と同様の操作を行い、ミクロソーム試料を調製した。

3-2-4. CYP2C 分子種のタンパク発現量の比較

第一章 第二節 1-2-10. に従い実験を行った。なお、CYP2C11 タンパク発現量は、ウサギ抗 CYP2C11 ポリクローナル抗体 (GeneTex) を用い、5,000 倍希釈した二次抗体として HRP で標識された抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (GE Healthcare) を用いて検討した。

3-2-5. TB 4-水酸化活性の測定

第一章 第二節 1-2-9. に準じて行った。なお、酵素反応速度試験では TB 濃度を 50 - 1500 μM の範囲で、2 種の酵素反応速度モデル式の比較検討では 2.5 - 2000 μM の範囲で検討した。

3-2-6. 酵素反応パラメータの算出

TB 4-水酸化反応の酵素反応速度論的解析は、Michaelis-Menten 式に従うものとして行った。まず初めに、酵素反応パラメータを算出するために各データを以下の単一の Michaelis-Menten 式 (式 1) に当てはめた。

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (\text{式 1})$$

V , V_{\max} , S および K_m は、それぞれ反応速度、最大反応速度、TB 濃度およびミカエリス定数を示す。その一方で、雄性ラットにおいては TB 4-水酸化反応に CYP2C6 および CYP2C11 の二つの酵素が関与すると報告されているため、これら二つの酵素が代謝反応に関与することを仮定し、各データを以下の式 (式 2) に当てはめた。

$$V = \frac{V_{\max 1} \times S}{K_{m1} + S} + \frac{V_{\max 2} \times S}{K_{m2} + S} \quad (\text{式 2})$$

なお、 K_{m1} および K_{m2} はそれぞれ低親和性および高親和性酵素の K_m を示し、 $V_{\max 1}$ および $V_{\max 2}$ はそれぞれ K_{m1} および K_{m2} に対応する酵素の V_{\max} を示す。個々のパラメータは、非線形最小二乗法により算出した⁸⁸⁾。本章では、TB 4-水酸化反応特性を説明するために、上記いずれのモデル式が適切であるか、赤池情報量基準 (Akaike's information criterion; AIC) を指標として決定した。すなわち、AIC 値のより小さいモデル式を選択し、酵素反応パラメータの算出に用いた^{119, 120)}。なお、選択したモデル式の妥当性を評価するため、Eadie-Hofstee プロットを作成し、視覚的に確認した。

3-2-7. TB 投与および採血

第一章 第二節 1-2-3. に従った。なお、TB の血清タンパク結合率を測定するための血清試料は TB 投与 60 分後に採血して得た。

3-2-8. 血清中 TB 濃度の測定

第一章 第二節 1-2-4. に従い、HPLC 法で測定した。なお、血清タンパク非結合型 TB 濃度は、得られた血清の一部を遠心ろ過デバイス (Nanosep®: 分画

分子量 30 kDalton; Pall) に移し, 5,000 *g*, 37°C, 5 分間の条件で遠心分離し, 得られたろ液中の TB 濃度を測定することで得た. TB のタンパク非結合率 (f_u) は, 血清タンパク非結合型 TB 濃度を血清総 TB 濃度で除することによって算出した.

3-2-9. TB 体内動態パラメータの解析

第一章 第二節 1-2-7. に従った. なお, 消失半減期 (elimination half-life: $t_{1/2}$) は, $\ln 2/k_e$ より算出した.

3-2-10. 血清アルブミン濃度の測定

血清アルブミン濃度は生化学自動分析装置 (SPOTCHEM™ EZ sp-4430; ARKRAY) を用いて比色定量法にて測定した. なお, 測定に用いた血清は, TB 投与前に採取した血液から得た.

3-2-11. 統計学的解析

結果は, 平均 \pm SD で示した. なお, 2 群間の統計学的比較には対応のない Student's *t*-検定を行い, いずれも $p<0.05$ を有意と判定した.

第三節 結 果

3-3-1. DOX 投与ラットの体重および肝重量

対照群および DOX 投与群の体重および肝重量を Table 8 および 9 に示す。DOX 投与 4 日後のラット体重および肝重量は、対照群と比較して有意に減少したが、肝重量比は両群間で有意な差異が認められなかった。

Table 8 Body and liver weights of the control and DOX-treated rats on Day 1.

	Control	DOX
Body weight (g)	242 ± 18	242 ± 14
Liver weight (g)	12.4 ± 1.6	11.5 ± 1.2
Liver weight/Body weight (%)	5.12 ± 0.55	4.76 ± 0.58

Body and liver weight were measured before preparation of the microsomal pellet. Results are shown as the mean ± SD of six rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

Table 9 Body and liver weights of the control and DOX-treated rats on Day 4.

	Control	DOX
Body weight (g)	251 ± 17	200 ± 11**
Liver weight (g)	11.9 ± 2.0	9.1 ± 1.6*
Liver weight/Body weight (%)	4.76 ± 0.52	4.52 ± 0.60

Body and liver weight were measured before preparation of the microsomal pellet. Results are shown as the mean ± SD of six rats per group. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$, Student's unpaired t -test). **Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

3-3-2. CYP2C6 および CYP2C11 発現量に及ぼす DOX の影響

CYP2C6 および CYP2C11 のタンパク発現量に及ぼす DOX の影響について、ウェスタンブロット法を用いて調べた (Figure 12). DOX 群の CYP2C11 タンパク発現量は, Day 1 において有意に減少し, Day 4 においては対照群の約 50% まで顕著な減少が認められた. しかし, Day 1 および Day 4 のいずれにおいても, CYP2C6 の発現量に両群間で有意な差異は認められなかった. なお, いずれにおいても DOX 群と対照群における PVDF 膜に転写したタンパクは同様の CBB 染色像を示した.

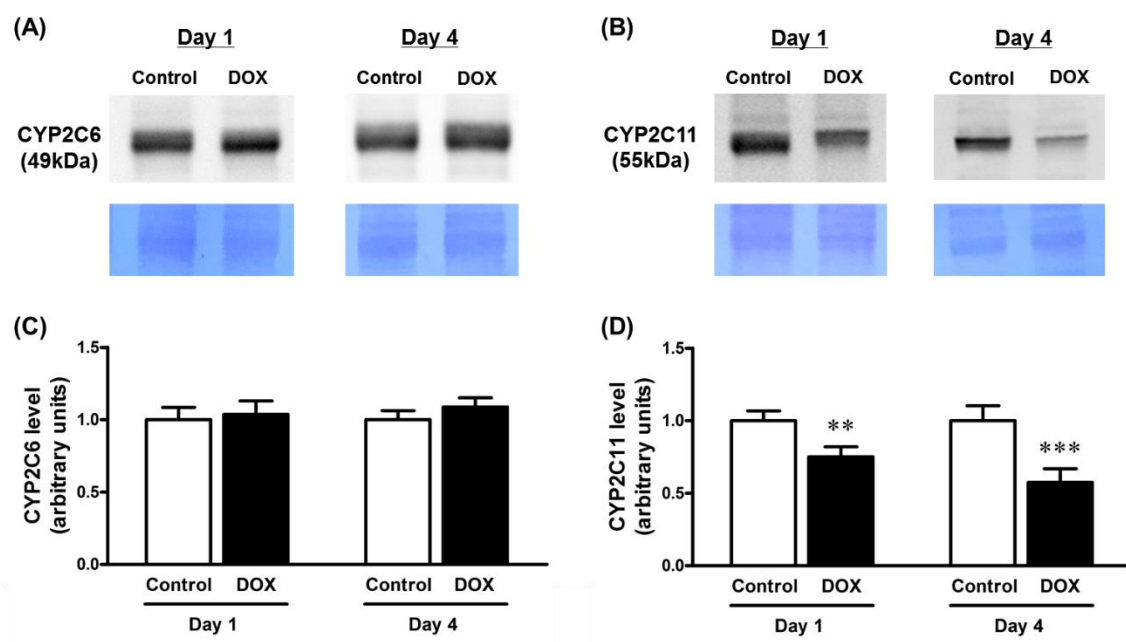


Figure 12 Hepatic protein expression of CYP2C6 and CYP2C11 in the control and DOX-treated rats.

Microsomal protein was obtained from rats 1 (Day 1) or 4 (Day 4) days after the administration of DOX or vehicle alone. Following the detection of immunoreactive bands (upper panels of A and B), the PVDF membranes were stained with CBB (lower panels of A and B). Calculated values for visualized immunoreactive bands of CYP2C6 (A) and CYP2C11 (B) are shown as the mean \pm SD of four rats per group (C and D). **Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test). ***Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233. 一部改変

3-3-3. TB 4-水酸化反応における酵素反応パラメータのモデル式選択

TB 4-水酸化反応に複数の CYP 分子種が関与するか否かを調べるため、2 種の酵素反応速度モデル式の比較検討に用いた Michaelis-Menten プロットおよび Eadie-Hofstee プロットを Figure 13 に示す。TB 4-水酸化反応に関与する酵素が一つと仮定した式 1 の AIC (71.5) は、関与する酵素が二つと仮定した式 2 の AIC (75.5) と比較して小さい値を示した。さらに、Eadie-Hofstee プロットは単相性を示した (Figure 13B)。そのため、以降の TB 4-水酸化反応の酵素反応速度論的解析およびパラメータの算出には式 1 を用いて行った。

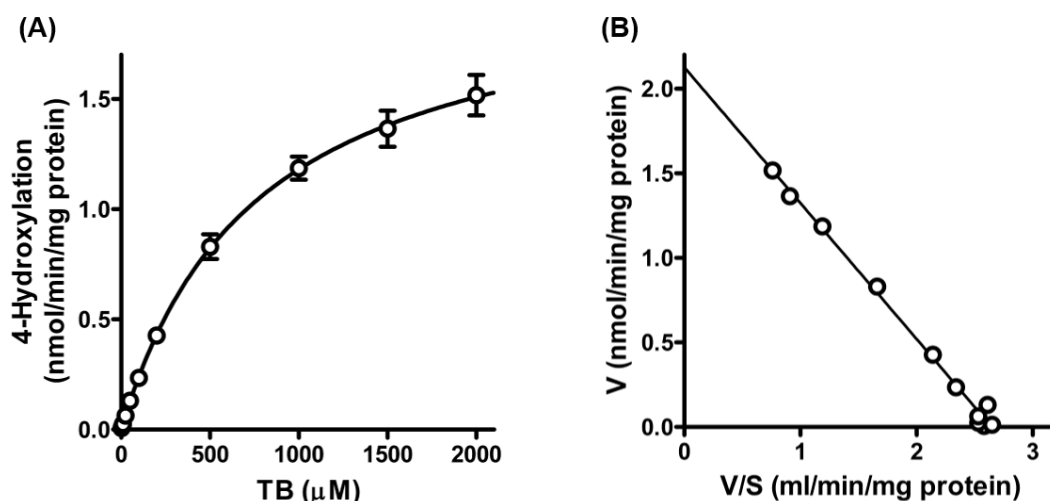


Figure 13 Michaelis-Menten plots (A) and Eadie-Hofstee plots (B) of TB 4-hydroxylation in rat hepatic microsomes.

TB at varying concentrations was reacted with 1 mg/mL of microsomes, the NADPH-generating system, 1 mM EDTA and 67.5 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 10 min at 37°C. V and S are velocity of reaction and TB concentration, respectively. Results are shown as the mean \pm SD of six male rats.

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2018;39:321-327. 一部改変

3-3-4. TB 4-水酸化反応に及ぼす DOX の影響

Day 1 および Day 4 におけるミクロソームの TB 4-水酸化反応は単一の Michaelis-Menten 式に従うものとし，酵素反応速度論的に解析した．TB 4-水酸化活性は，対照群と DOX 群の両方で基質濃度に依存した双曲線を示した (Figure 14)．Day 1 における TB 4-水酸化反応パラメータは，DOX 投与により V_{\max} 値の減少傾向が認められたものの，統計学的に有意な差は認められなかった．Day 4 における DOX 群の V_{\max} 値は，対照群と比較して有意な低値を示したが， K_m 値は両群間で有意な差異が認められなかった．DOX 群の V_{\max}/K_m 値は，対照群と比較して有意な低値を示した (Table 10, 11)．

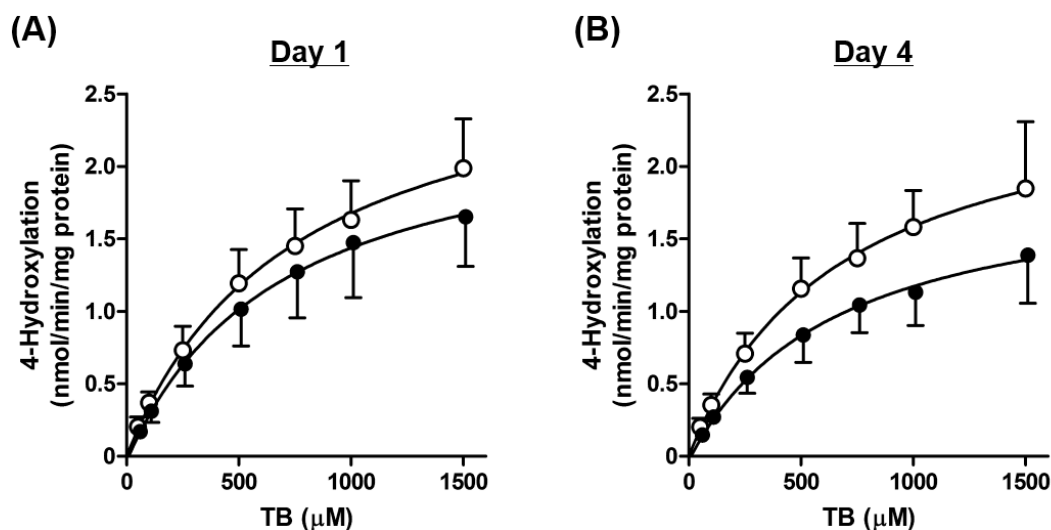


Figure 14 Michaelis-Menten plots of TB 4-hydroxylation in hepatic microsomes of the control and DOX-treated rats.

TB was incubated with 1 mg/mL of microsomes obtained from rats 1 (A) or 4 (B) days after the administration of DOX or vehicle alone for 10 min at 37°C. Results are shown as the mean \pm SD of six rats per group. Open: control group; Closed: DOX-treated group.

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

Table 10 Kinetic parameters of TB 4-hydroxylation in hepatic microsomes of the control and DOX-treated rats on Day 1.

	Control	DOX
V_{\max} (nmol/min/mg protein)	2.95 ± 0.52	2.50 ± 0.48
K_m (μM)	752 ± 177	728 ± 157
V_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	4.10 ± 1.14	3.61 ± 1.10

The kinetic parameters of TB were calculated using the Michaelis-Menten equation. Results are shown as the mean \pm SD of six rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

Table 11 Kinetic parameters of TB 4-hydroxylation in hepatic microsomes of the control and DOX-treated rats on Day 4.

	Control	DOX
V_{\max} (nmol/min/mg protein)	2.95 ± 0.37	$1.93 \pm 0.40^{**}$
K_m (μM)	735 ± 154	669 ± 130
V_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	4.15 ± 0.89	$2.92 \pm 0.41^{**}$

The kinetic parameters of TB were calculated using the Michaelis-Menten equation. Results are shown as the mean \pm SD of six rats per group.

******Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

3-3-5. 静脈投与後の TB 体内動態に及ぼす DOX の影響

Figure 15 は、ラットにおける静脈投与後の TB 血清濃度時間推移を示す。Day 4 における DOX 群の各採血時点の血清 TB 濃度は、対照群と比較して低値で推移した。ノンコンパートメント解析法を用いて算出した体内動態パラメータは、Table 12 および 13 に示す。Day 1 においてはいずれのパラメータも両群間で有意な差異が認められなかったものの、Day 4 においては DOX 群の $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ が対照群と比較して有意な低値を示し、 CL_{tot} および Vd_{ss} は有意な高値を示した。

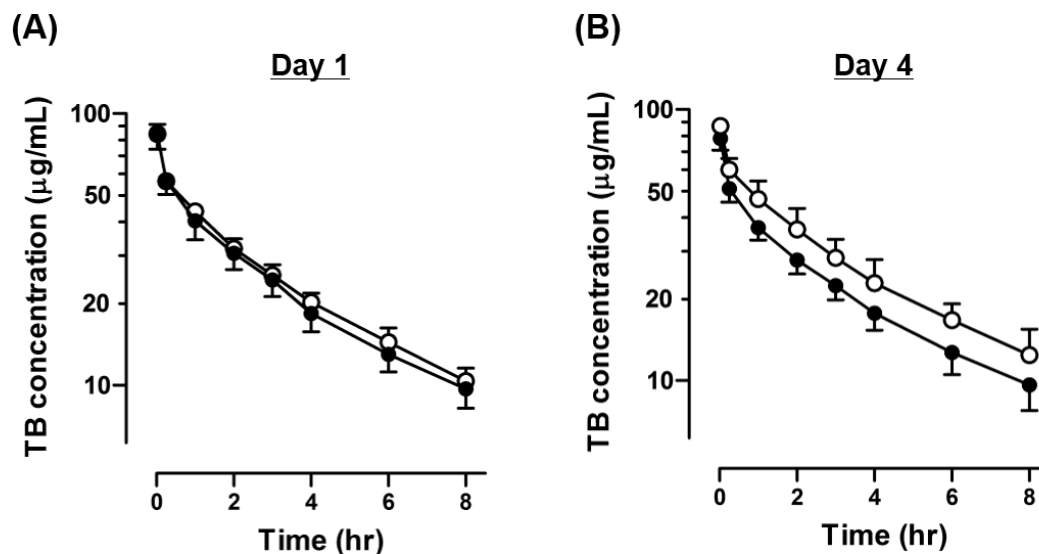


Figure 15 Serum concentration-time courses of TB after its intravenous administration to the control and DOX-treated rats.

The pharmacokinetic examinations were conducted 1 (A) or 4 (B) days after the administration of DOX or vehicle alone. The serum concentrations of intravenously administered TB (10 mg/kg) are presented in a logarithmic scale. Results are shown as the mean \pm SD of rats per group. Open: control group (Day 1: $n=6$; Day 4: $n=5$); Closed: DOX-treated group (Day 1: $n=6$; Day 4: $n=8$).

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

Table 12 Pharmacokinetic parameters of TB after its intravenous administration (10 mg/kg) to the control and DOX-treated rats on Day 1.

	Control ($n=6$)	DOX ($n=6$)
$AUC_{0 \rightarrow 8h}$ (mg \cdot hr/L)	203 ± 12	192 ± 22
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (mg \cdot hr/L)	262 ± 20	246 ± 30
CL_{tot} (mL/kg/hr)	38.4 ± 3.0	41.3 ± 5.7
k_e (1/hr)	0.177 ± 0.013	0.180 ± 0.015
$t_{1/2}$ (hr)	3.93 ± 0.27	3.87 ± 0.34
Vd_{ss} (mL/kg)	152 ± 8	161 ± 22

The pharmacokinetic parameters of TB were calculated on the basis of the non-compartmental method. Results are shown as mean \pm SD of rats per group.

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

Table 13 Pharmacokinetic parameters of TB after its intravenous administration (10 mg/kg) to the control and DOX-treated rats on Day 4.

	Control (n= 5)	DOX (n= 8)
AUC _{0→8h} (mg ·hr/L)	225 ± 32	179 ± 16**
AUC _{0→∞} (mg ·hr/L)	303 ± 52	238 ± 30*
CL _{tot} (mL/kg/hr)	33.9 ± 5.3	42.7 ± 5.5*
k _e (1/hr)	0.164 ± 0.015	0.169 ± 0.026
t _{1/2} (hr)	4.26 ± 0.37	4.20 ± 0.61
Vd _{ss} (mL/kg)	140 ± 17	173 ± 14**

The pharmacokinetic parameters of TB were calculated on the basis of the non-compartmental method. Results are shown as the mean ± SD of rats per group. *Significantly different from the control group ($p<0.05$, Student's unpaired t -test). **Significantly different from the control group ($p<0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

3-3-6. DOX 投与が TB のタンパク非結合型分率に及ぼす影響

ラットに DOX を投与することによって、Day 4 では血清アルブミン濃度が有意に減少した。Day 4 における DOX 群では、血清総 TB 濃度は減少しているにもかかわらず、血清タンパク非結合型 TB 濃度は有意に増加した。その結果、DOX 群の f_u は対照群と比較して有意な高値を示すことが明らかとなった。なお、Day 1 においても同様の傾向が認められたものの、それらの変化はいずれも統計学的な有意水準に達しなかった (Table 14, 15)。

Table 14 Serum albumin concentration and parameters associated with f_u of TB on Day 1.

	Control	DOX
Albumin (g/dL)	3.68 ± 0.28	3.50 ± 0.02
Total TB ($\mu\text{g/mL}$)	45.1 ± 3.7	42.1 ± 2.7
Unbound TB ($\mu\text{g/mL}$)	1.49 ± 0.27	1.97 ± 0.88
f_u (%)	3.29 ± 0.63	4.62 ± 1.82
CL_{tot}/f_u (L/kg/hr)	1.19 ± 0.18	1.00 ± 0.33

Total and unbound TB were measured using blood samples obtained 60 min after the intravenous administration of 10 mg/kg TB. f_u was determined by dividing unbound TB by total TB and the measurements were made using six rats per group. CL_{tot} was calculated from the pharmacokinetic experiment. Results are shown as the mean \pm SD.

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

Table 15 Serum albumin concentration and parameters associated with f_u of TB on Day 4.

	Control	DOX
Albumin (g/dL)	3.42 ± 0.17	$3.08 \pm 0.19^*$
Total TB ($\mu\text{g/mL}$)	46.9 ± 2.7	$33.4 \pm 3.3^{**}$
Unbound TB ($\mu\text{g/mL}$)	1.59 ± 0.23	$2.15 \pm 0.67^*$
f_u (%)	3.37 ± 0.31	$6.52 \pm 2.34^{**}$
CL_{tot}/f_u (L/kg/hr)	1.00 ± 0.18	$0.72 \pm 0.22^{**}$

Total and unbound TB were measured using blood samples obtained 60 min after the intravenous administration of 10 mg/kg TB. f_u was determined by dividing unbound TB by total TB and the measurements were made using six rats per group. CL_{tot} was calculated from the pharmacokinetic experiment. Results are shown as the mean \pm SD. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$, Student's unpaired t -test). **Significantly different from the control group ($p < 0.01$, Student's unpaired t -test).

引用) Fukuno S. et al., Biopharm Drug Dispos., 2019;40:225-233.

第四節 考 察

過去の報告¹⁷⁾と同様に、ラット肝臓における CYP2C11 タンパク発現量は DOX 投与 1 日後に低下した。CYP2C11 発現量に対する DOX の抑制効果は時間依存的であり、Day1 と比較して Day4 ではより顕著な減少が認められた。その一方で、CYP2C6 発現量は Day1 と Day 4 のいずれにおいても DOX 投与の影響を受けなかった。CYP2C11 発現量に呼応して、ラット肝ミクロソームにおける TB 4-水酸化活性も、DOX 投与によって時間依存的に抑制された。Day 4 において算出された K_m 値から DOX 群の TB に対するラット肝 CYP2C の親和性には有意な変化を示さないと考えられた。DOX 投与によって TB の最大代謝活性である V_{max} が低下した結果は、ウェスタンブロット法で CYP2C11 タンパク発現量が低下した結果を支持するものであった。TB 4-水酸化反応は、主に CYP2C11 と CYP2C6 によって触媒され则认为られているが⁴⁶⁻⁵⁰⁾、CYP2C11 が TB から 4-OH-TB への代謝変換にどの程度寄与しているかは不明である。しかしながら、雌性ラットの肝臓において CYP2C6 は雄性ラットと同程度のレベルで発現しているものの CYP2C11 は実質的に発現していないこと¹²¹⁾、雌性ラットと比較して雄性ラットの TB 代謝活性は顕著に高いこと¹²²⁾から、主として CYP2C11 が TB 代謝に深く関与している可能性がある。さらに本研究では、単一の Michaelis-Menten 式である式 1 と、酵素反応に CYP2C6 と CYP2C11 の 2 つの酵素が関与している場合を想定した式 2 のいずれのモデル式がラット肝ミクロソームにおける TB 4-水酸化反応のパラメータ解析に相応しいか検討し、式 1 の AIC は式 2 の AIC より小さいこと、Eadie-Hofstee プロットが直線性を示したことから、式 1 を用いることが適切と考えた。2 つの酵素が同じ代謝反応を共有しており、それらの K_m 値が数倍程度の違いである場合、酵素反応パラメータを正確に区別することは難しいとされている¹²³⁾。本研究で算出された K_m 値は過去の報告^{124, 125)}と概ね一致しており、これらの結果から少なくとも TB 4-水酸化反応において TB に対する CYP2C6 と CYP2C11 の親和性はほぼ同等であることが示唆された。DOX は CYP2C11 に対して MBI を引き起こさないことから¹²⁶⁾、DOX 投与後、CYP2C11 の生合成の強力な抑

制効果を認めるまでに時間を要するとともに、CYP2C6 には影響を及ぼさないものの CYP2C11 タンパク発現量を恒常的に低下させることで TB 代謝能を阻害することが示唆された。

DOX 投与 1 日後におけるラットの TB 体内動態は対照群と比較して同様の挙動を示し、これは *in vitro* における代謝酵素活性に有意な変化が認められなかった結果と一致する。しかし、DOX 投与 4 日後における血清中 TB 濃度は、予測に反して対照群より低値で推移し、DOX 群の CL_{tot} は有意な高値を示した。この CL_{tot} の増加は、肝ミクロソームにおいて TB 4-水酸化活性が低下した結果と見かけ上相反する現象であった。TB は血清アルブミンに対する結合親和性が高いことから¹²⁷⁾、この矛盾を解き明かすために DOX 投与後の血清アルブミン濃度の変化に着目し、非結合型 TB の挙動について評価した。

DOX は肝毒性や腎毒性を示すため、DOX による治療を受けている患者は低アルブミン血症を生じやすいと考えられる。実験動物に DOX を投与することで、これらの毒性に応じて血清アルブミン濃度が低下することは過去に報告されている^{128, 129)}。本研究においても、DOX 投与 4 日後の血清アルブミン濃度は対照群と比較して有意に低く、これは DOX 投与後に静脈投与された TB の f_u 値が顕著に増加した結果を支持するものである。また、DOX 投与 4 日後に TB 血清タンパク非結合型分率の増加とともに血清総 TB 濃度が低下した結果は、 Vd_{ss} が増加した理由にもなり、非結合型 TB の末梢組織への分布が促進されたことを示すと考えられた。以上より、DOX は血清アルブミン濃度の低下を介して TB の血清タンパク非結合型分率を上昇させ、 Vd_{ss} を増大させる結果、血清中総 TB 濃度が低下することが示唆された。その一方で、DOX 投与 4 日後における TB の f_u の増加率は、血清アルブミン濃度の低下率と比較して大きいものであった。DOX は投与後数時間以内に全身循環からほぼ完全に消失するため¹³⁰⁾、DOX によって TB のタンパク結合置換が生じている可能性は低いと考えられる。TB の血清タンパク非結合型分率と血清アルブミン濃度の変化率に大きな違いが生じた理由の一つとして、TB に対するアルブミンの結合親和性が低下している可能性が考えられた。過去の研究において、DOX は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を生成することで、細胞毒性を引き起こすこ

とが報告されている^{131, 132)}。また、血清アルブミンは ROS によって構造変化を示すことが報告されており¹³³⁾、結果的に薬物結合能が変化しやすくなるものと考えられた。このように、血清アルブミンに対する酸化的障害が TB の血清タンパク非結合型分率の増加を顕著にしていることが推察された。DOX 投与が併用薬の血清タンパク結合に及ぼす影響については、今後更なる検討が必要と考えられた。

非結合型 TB の体内動態を正確に評価するために、 f_u を体内動態解析に適用させる必要があると考えられた。CL_{tot}が増加した結果とは反対に、DOX 投与 4 日後において血清タンパク非結合型薬物の全身クリアランスを示す CL_{tot}/ f_u 値は有意に減少した。TB は肝抽出率が低く、非腎クリアランスは肝血流量の制限を受けずに CL_{tot} とほぼ完全に一致するため、TB の CL_{tot}/ f_u 値は TB の肝固有クリアランスに近似することができる^{54, 135)}。そのため、CL_{tot}/ f_u 値の減少は、TB の消失に関わる代謝能の実質的な低下を示している結果と考えられた。その一方で、血清タンパク非結合型 TB 濃度は対照群および DOX 群のいずれにおいても TB の主要代謝経路である 4-水酸化反応の K_m 値と比較して十分小さいため、TB 4-水酸化反応の V_{max}/K_m 値は *in vitro* における TB の肝固有クリアランスを反映している。ラット体重当たりの肝ミクロソームタンパク量がおおよそ 0.2% と仮定すると¹²⁴⁾、 V_{max}/K_m 値から算出される肝固有クリアランス値と体内動態試験から算出した肝固有クリアランスに対応する CL_{tot}/ f_u 値は概ね一致していた。 V_{max}/K_m 値と CL_{tot}/ f_u 値の変化の程度が符合していたことから、DOX 投与は TB の代謝消失を抑制することが強く示唆された。

Elkiran らによる臨床研究¹¹⁷⁾で、乳がん治療のために DOX とシクロホスファミドを併用している患者において CYP2C9 基質薬物であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬ロサルタンとその活性代謝物 E3174 の尿中排泄率を調べた結果、肝臓の CYP2C9 代謝活性が低下していたことが示唆されている。本章の結果は、Elkiran らの臨床報告を基礎的観点から支持するものであり、DOX と CYP2C9 基質薬物は薬物動態学的相互作用が生じる可能性を示している。腹腔内投与後における DOX の生体内利用率を検討した過去の報告に基づく¹³⁰⁾、本研究で用いた DOX 投与量は、臨床と比較して大きく乖離していないと考え

られる^{136, 137)}。その一方で、臨床において DOX はフェニトインの血中濃度を低下させるとの情報¹⁴⁾やワルファリンと相互作用を引き起こさないとする報告¹¹⁶⁾があるものの、DOX 投与患者におけるこれら医薬品の血中遊離型濃度推移に関する情報はない。TB と同様に、フェニトインやワルファリンは血清アルブミンに対して高い親和性を示す CYP2C 基質薬物であり、DOX 投与患者におけるフェニトインやワルファリンの体内動態に対しても、肝臓の CYP2C 活性の低下と併用薬の血清タンパク結合率の低下がいずれも関与している可能性がある。本研究で得られた知見は、血中薬物総濃度の測定のみでは薬理活性を示す血中遊離型薬物の曝露量を過小評価し、誤った用量設定につながるリスクがあることを示したものと考えられた。

第五節 小 括

本章の結果より，DOX 投与はラット肝 CYP2C11 タンパク発現量を減少させることで TB 代謝活性を低下させることが示された．DOX は TB 代謝クリアランスを減少させるが，血清アルブミン濃度の低下を介して TB の血清タンパク結合率も低下させるため，DOX 投与後における肝 CYP2C 代謝活性の低下は血清中 TB の総濃度には反映されず，その遊離型濃度の体内動態に反映されることが示唆された．

臨床において DOX が CYP2C を介した薬物動態学的相互作用を引き起こすか否かについて相反する情報が交錯しているという問題がある．本章で得られた知見は，DOX 投与によって肝 CYP2C 活性は低下するとの臨床報告を支持するものである．DOX 投与は併用薬の代謝遅延をもたらすとともに，併用薬の血清タンパク結合率を大きく変動させる可能性があるため，血中総薬物濃度を測定するのみでは誤った解釈を招くリスクがあることを明確に示すことができた．

総 括

1. 5-FU 投与はラット肝 CYP2C 活性を低下させ、TB の血中濃度を上昇させることが示された。本研究で認められた TB 代謝クリアランスの低下は、肝 CYP2C6 および CYP2C11 発現量の低下に基づくと考えられ、肝臓の CYP2C に関連する mRNA 転写の抑制または安定性の低下に起因することが示唆された。
2. 5-FU 投与はラット肝 CYP3A1/23 発現量に影響を及ぼさないが、CYP3A2 発現量を増加させ、MDZ 水酸化反応の最大代謝活性を上昇させることを明らかとした。しかし、これと同時に 5-FU は CYP3A の基質薬物に対する親和性を低下させるため、MDZ 代謝活性への作用が相殺され、結果として CYP3A 基質薬物の体内動態に影響を及ぼさないことが示唆された。
3. DOX 投与はラット肝 CYP2C6 発現量に影響を及ぼさないが、CYP2C11 発現量を減少させることで肝 CYP2C 活性を低下させることを明らかとした。DOX は併用薬の血清タンパク結合率の低下をもたらしている可能性があり、DOX 投与による肝 CYP2C 活性の低下は CYP2C 基質薬物の血中総濃度ではなく、その血中遊離型濃度に反映されることが示唆された。

本研究では、3つの疑問を解明する上でそれぞれ貴重な知見を得ることができ、これらを通して抗がん剤による CYP を介した薬物相互作用機序の一端を明らかとすることができた。すなわち、抗がん剤による肝 CYP 発現量の変動特性は一様ではなく薬剤や CYP 分子種によって異なること、抗がん剤投与後の CYP 代謝活性は基質薬物に対する親和性の変化にも影響を受ける可能性が示された。また、抗がん剤が原因となる薬物相互作用を薬物動態学的な側面から評価するためには、併用薬の血清タンパク結合率の変動にも留意する必要があることも明らかとした。本研究で得られた知見が、がん化学療法を実施する上で生じる臨床的疑問を解決するために活用されることを期待する。

謝 辞

学位論文提出の機会を与えていただくとともに，本論文の作成にあたり多大なる御指導と御鞭撻を賜りました神戸学院大学 薬学部 臨床薬物動態学研究室 杉岡 信幸 教授に謹んで感謝の意を表します．

本論文を作成するにあたり，種々の有益な御助言と御指導を賜りました神戸学院大学 薬学部 臨床薬剤学研究室 福島 昭二 教授ならびに同 循環器薬理学研究室 屋山 勝俊 教授に衷心より感謝の意を表します．

本研究を進めるにあたり，終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました大阪大谷大学 薬学部 医療薬学講座 小西 廣己 教授に深甚なる感謝の意を表します．また，著者の研究活動にあらゆる面での御指導と御助言を賜りました同 長井 克仁 講師に心より感謝し，厚く御礼申し上げます．

本研究の遂行にあたり，有益な御助言と御協力を賜りました摂南大学薬学部 薬効薬理学研究室 奈邊 健 教授，大阪大谷大学 薬学部 実践医療薬学講座 名徳 倫明 教授，同 初田 泰敏 准教授ならびに同 面谷 幸子 助教に深く感謝いたします．

本研究を実施する上で多大なる御協力を賜りました笠原 恵太，藤池 麻衣，溝端 友希，佐々木 雄哉，谷村 岳洋，堀井 綾乃，山本 弘平の諸氏をはじめ大阪大谷大学 薬学部 医療薬学講座の学生諸氏に心より感謝いたします．

末筆ながら，私の研究活動を支援してくれた両親，妻，子供たちに心より感謝の意を表します．

主論文

1. Fukuno S, Nagai K, Kasahara K, Mizobata Y, Omotani S, Hatsuda Y, Myotoku M, Konishi H. Altered tolbutamide pharmacokinetics by a decrease in hepatic expression of CYP2C6/11 in rats pretreated with 5-fluorouracil. *Xenobiotica*, 2018;48:53-59.
2. Fukuno S, Nagai K, Horii A, Yamamoto K, Konishi H. Pharmacokinetics and metabolic elimination of tolbutamide in female rats: Comparison with male rats. *Biopharm Drug Dispos*, 2018;39:321-327.
3. Fukuno S, Nagai K, Yamamoto K, Tanimura T, Nabe T, Konishi H. Pharmacokinetic interference of doxorubicin with tolbutamide due to reduced metabolic clearance with increased serum unbound fraction in rats. *Biopharm Drug Dispos*, 2019;40:225-233.
4. Fukuno S, Nagai K, Fujiike M, Sasaki Y, Konishi H. Conflicting alterations in hepatic expression of CYP3A and enzyme kinetics in rats exposed to 5-fluorouracil: relevance to pharmacokinetics of midazolam. *Xenobiotica*, 2019;49:1470-1477.

引用文献

1. 舘 友也, 野口 義紘, 寺町 ひとみ. お薬手帳の利用に関する文献レビュー. *医薬品情報学*. 2018;20:1-11.
2. 厚生労働省. 診療報酬の算定方法の一部を改正する件. 厚生労働省告示第43号, 平成30年3月5日.
3. 厚生労働省. 平成29年(2017)患者調査の概況, 平成31年3月1日.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/index.html>
4. 厚生労働省. 平成30年(2018)人口動態統計(確定数)の概況, 令和元年11月28日. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei18/index.html>
5. 国立がん研究センター. がん情報サービス「がん登録・統計」. https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html. 令和2年6月30日閲覧.
6. Rowinsky EK, Gilbert MR, McGuire WP, Noe DA, Grochow LB, Forastiere AA, et al. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J Clin Oncol*. 1991;9:1692-1703.
7. 渡部 烈, 小倉 健一郎, 西山 貴仁. ソリブジン薬害発生の分子毒性学的メカニズムとジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼの遺伝的欠損. *薬学雑誌*. 2002;122:527-535.
8. Thomas-Schoemann A, Blanchet B, Bardin C, Noé G, Boudou-Rouquette P, Vidal M, et al. Drug interactions with solid tumour-targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89:179-196.
9. Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, Bernardi E, Simioni P, Girolami B, et al. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood*. 2002;100:3484-3488.
10. Riechelmann RP, Tannock IF, Wang L, Saad ED, Taback NA, Krzyzanowska MK. Potential drug interactions and duplicate

- prescriptions among cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:592-600.
11. Van Leeuwen RW, Swart EL, Boven E, Boom FA, Schuitmaker MG, Hugtenburg JG. Potential drug interactions in cancer therapy: a prevalence study using an advanced screening method. *Ann Oncol.* 2011;22:2334-2341.
 12. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician.* 2007;76:391-396.
 13. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138:103-141.
 14. Yap KY, Chui WK, Chan A. Drug interactions between chemotherapeutic regimens and antiepileptics. *Clin Ther.* 2008;30:1385-1407.
 15. Stupans I, Richards DA, McClure MT. Effects of 5-fluorouracil treatment on rat liver microsomal enzymes. *Xenobiotica.* 1995;25:1-8.
 16. Afsar A, Lee C, Riddick DS. Modulation of the expression on constitutive rat hepatic cytochrome P450 isozymes by 5-fluorouracil. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74:150-156.
 17. Zordoky BNM, Anwar-Mohamed A, Aboutabl ME, El-Kadi AOS. Acute doxorubicin toxicity differentially alters cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rat kidney and liver. *Drug Metabolism and Disposition.* 2011;39:1440-1450.
 18. Beumer JH, Chu E, Allegra C, Tanigawara Y, Milano G, Diasio R, et al. Therapeutic drug monitoring in oncology: International association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology recommendations for 5-fluorouracil therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105:598-613.

19. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:330-338.
20. Danenberg PV, Lockshin A. Thymidylate synthetase - substrate complex formation. *Mol Cell Biochem*. 1982;43:49-57.
21. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004;22:229-237.
22. Tsuji K, Yasui H, Onozawa Y, Boku N, Doyama H, Fukutomi A, et al. Modified FOLFOX-6 therapy for heavily pretreated advanced gastric cancer refractory to fluorouracil, irinotecan, cisplatin and taxanes: a retrospective study. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:686-690.
23. Brown MC. Multisite mucous membrane bleeding due to a possible interaction between warfarin and 5-fluorouracil. *Pharmacotherapy*. 1997;17:631-633.
24. Kuter DJ. Thrombotic complications of central venous catheters in cancer patients. *Oncologist*. 2004;9:207-216.
25. Gilbar PJ, Brodribb TR. Phenytoin and fluorouracil interaction. *Ann Pharmacother*. 2001;35:1367-1370.
26. Konishi H, Morita K, Minouchi T, Nakajima M, Matsuda M, Yamaji A. Probable metabolic interaction of doxifluridine with phenytoin. *Ann Pharmacother*. 2002;36:831-834.
27. Brickell K, Porter D, Thompson P. Phenytoin toxicity due to fluoropyrimidines (5FU/capecitabine): three case reports. *Br J Cancer*. 2003;89:615-616.
28. Saif MW. An adverse interaction between warfarin and fluoropyrimidines revisited. *Clin Colorectal Cancer*. 2005;5:175-180.
29. Camidge R, Reigner B, Cassidy J, Grange S, Abt M, Weidekamm E, et al. Significant effect of capecitabine on the pharmacokinetics and

- pharmacodynamics of warfarin in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:4719-4725.
30. Park JY, Kim KA. Inhibitory effect of 5-fluorouracil on human cytochrome P₄₅₀ isoforms in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;59:407-409.
 31. Lewis DFV. Substrate specificity and metabolism. Cytochromes P450: Structure, Function and Mechanism. Taylor & Francis; 1996. 115-167.
 32. Ryan DE, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther*. 1990;45:153-239.
 33. Souček P, Gut I. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*. 1992;22:83-103.
 34. Goldstein JA, de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*. 1994;4:285-299.
 35. Ufer M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44:1227-1246.
 36. Isvoran A, Louet M, Vladioiu DL, Craciun D, Lorient MA, Villoutreix BO, et al. Pharmacogenomics of the cytochrome P450 2C family: impacts of amino acid variations on drug metabolism. *Drug Discov Today*. 2017;22:366-376.
 37. Konishi H, Yoshimoto T, Morita K, Minouchi T, Sato T, Yamaji A. Depression of phenytoin metabolic capacity by 5-fluorouracil and doxifluridine in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55:143-149.
 38. Daniel WA, Haduch A, Syrek M, Boksa J. Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006;16:580-587.
 39. Večeřa R, Zacharová A, Siller M, Matuskova Z, Skottová N, Anzenbacherová E, et al. The influence of rosuvastatin on liver

- microsomal CYP2C6 in hereditary hypertriglyceridemic rat. *Neuro Endocrinol Lett.* 2012;33:48-52.
40. Li E, Hu JP, Wang BL, Li Y. Effect of buagafuran on liver microsomal cytochrome P450 in rats. *J Asian Nat Prod Res.* 2010;12:371-381.
41. Večeřa R, Zacharová A, Orolin J, Strojil J, Skottová N, Anzenbacher P. Fenofibrate-induced decrease of expression of CYP2C11 and CYP2C6 in rat. *Biopharm Drug Dispos.* 2011;32:482-487.
42. Zacharová A, Siller M, Spičáková A, Anzenbacherová E, Skottová N, Anzenbacher P, et al. Rosuvastatin suppresses the liver microsomal CYP2C11 and CYP2C6 expression in male Wistar rats. *Xenobiotica.* 2012;42:731-736.
43. Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of CYP2C9 activity in humans. *J Clin Pharmacol.* 2003;43:84-91.
44. 厚生労働省. 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について. 薬生薬審発 0723 第 4 号, 平成 30 年 7 月 23 日.
45. U.S. Food and Drug Administration. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>. 令和 2 年 6 月 30 日閲覧.
46. Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, et al. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 2000;30:1131-1152.
47. Dostalek M, Jurica J, Pistovcakova J, Hanesova M, Tomandl J, Linhart I, et al. Effect of methamphetamine on cytochrome P450 activity. *Xenobiotica.* 2007;37:1355-1366.

48. Pekthong D, Martin H, Abadie C, Bonet A, Heyd B, Mantion G, et al. Differential inhibition of rat and human hepatic cytochrome P450 by *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *J Ethnopharmacol.* 2007;115:432-440.
49. Wang X, Lee WY, Or PM, Yeung JH. Pharmacokinetic interaction studies of tanshinones with tolbutamide, a model CYP2C11 probe substrate, using liver microsomes, primary hepatocytes and in vivo in the rat. *Phytomedicine.* 2010;17:203-211.
50. Chen HW, Huang CS, Liu PF, Li CC, Chen CT, Liu CT, et al. *Andrographis paniculata* extract and andrographolide modulate the hepatic drug metabolism system and plasma tolbutamide concentrations in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:982689.
51. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
52. Yamao T, Nakagami H, Furuhashi K, Onodera T, Kurosaki Y, Nakayama T, et al. Pharmacokinetics of tolbutamide following intravenous and oral administrations in rats with obstructive jaundice. *Biol Pharm Bull.* 1994;17:691-695.
53. Aiba T, Horiuchi M, Makita T, Komori Y, Kawasaki H, Kurosaki Y. Peritoneal dialysis alters tolbutamide pharmacokinetics in rats with experimental acute renal failure. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006; 21:291-296.
54. Choi MR, Kwon MH, Cho YY, Choi HD, Kim YC, Kang HE. Pharmacokinetics of tolbutamide and its metabolite 4-hydroxy tolbutamide in poloxamer 407-induced hyperlipidemic rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2014;35:264-274.

55. Peart GF, Boutagy J, Shenfield GM. Lack of relationship between tolbutamide metabolism and debrisoquine oxidation phenotype. *Eur J Clin Pharmacol.* 1987;33:397-402.
56. Back DJ, Sutcliffe F, Tjia JF. Tolbutamide as a model drug for the study of enzyme induction and enzyme inhibition in the rat. *Br J Pharmacol.* 1984;81:557-562.
57. Carulli N, Ponz de Leon M, Mauro E, Manenti F, Ferrari A. Alteration of drug metabolism in Gilbert's syndrome. *Gut.* 1976;17:581-587.
58. Ando H, Izawa S, Hori W, Nakagawa I. Utility of a single adjusting compartment: a novel methodology for whole body physiologically-based pharmacokinetic modelling. *Theor Biol Med Model.* 2008;5:19.
59. El-Hoseany NMA. Protective effect of captopril against 5-fluorouracil-induced hepato and nephrotoxicity in male albino rats. *J Am Sci.* 2012;8:680-685.
60. Yokogawa K, Ido A, Kurihara T, Mano Y, Nomura M, Ishizaki J, et al. Serum aminotransferase activity as a predictor for estimation of total clearance of hepatically metabolized drugs in rats with acute hepatic failure. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:141-145.
61. Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, Lin K, McBride OW, Podschun B, et al. cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem.* 1994;269:23192-23196.
62. Wei ZG, Li GX, Huang XC, Zhen L, Yu J, Deng HJ, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of intraperitoneal 5-fluorouracil with a novel carrier solution in rats. *World J Gastroenterol.* 2008;14:2179-2186.
63. Gao J, Yan Q, Liu S, Yang X. Knockdown of EpCAM enhances the chemosensitivity of breast cancer cells to 5-fluorouracil by

- downregulating the antiapoptotic factor Bcl-2. *PLoS One*. 2014;9:e102590.
64. Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell*. 2005;121:115-125.
 65. Kim SK, Novak RF. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther*. 2007;113:88-120.
 66. Daskalopoulos EP, Malliou F, Rentesi G, Marselos M, Lang MA, Konstandi M. Stress is a critical player in CYP3A, CYP2C, and CYP2D regulation: role of adrenergic receptor signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303:E40-54.
 67. Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil *in vitro*. *Pharmacol Res*. 2007;56:248-253.
 68. Shah MY, Pan X, Fix LN, Farwell MA, Zhang B. 5-fluorouracil drug alters the microRNA expression profiles in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 2011;226:1868-1878.
 69. Hou N, Han J, Li J, Liu Y, Qin Y, Ni L, et al. MicroRNA profiling in human colon cancer cells during 5-fluorouracil-induced autophagy. *PLoS One*. 2014;9:e114779.
 70. Bash-Imam Z, Thérizols G, Vincent A, Lafôrets F, Polay Espinoza M, Pion N, et al. Translational reprogramming of colorectal cancer cells induced by 5-fluorouracil through a miRNA-dependent mechanism. *Oncotarget*. 2017;8:46219-46233.
 71. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-233.

72. Banerjee S, Das RK, Giffear KA, Shapiro BH. Permanent uncoupling of male-specific CYP2C11 transcription/translation by perinatal glutamate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;284:79-91.
73. Balani SK, Nagaraja NV, Qian MG, Costa AO, Daniels JS, Yang H, et al. Evaluation of microdosing to assess pharmacokinetic linearity in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. 2006;34:384-388.
74. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22:659-661.
75. Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;45:525-538.
76. Bae JW, Kim HK, Kim JH, Yang SI, Kim MJ, Jang CG, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2C9 in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60:418-422.
77. Shon JH, Yoon YR, Kim MJ, Kim KA, Lim YC, Liu KH, et al. Chlorpropamide 2-hydroxylation is catalysed by CYP2C9 and CYP2C19 in vitro: chlorpropamide disposition is influenced by CYP2C9, but not by CYP2C19 genetic polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59:552-563.
78. Tang W, Steams RA. Heterotropic cooperativity of cytochrome P450 3A4 and potential drug-drug interactions. *Curr Drug Metab*. 2001;2:185-198.
79. Guengerich FP. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21:163-168.
80. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol*. 1994;47:1643-1653.

81. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. *In vitro-in vivo* correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271:549-556.
82. Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E, Moore D. Inhibition and kinetics of cytochrome P450 3A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* 1996;24:940-947.
83. Chovan JP, Ring SC, Yu E, Baldino JP. Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. *Xenobiotica.* 2007;37:459-473.
84. Franke RM, Baker SD, Mathijssen RH, Schuetz EG, Sparreboom A. Influence of solute carriers on the pharmacokinetics of CYP3A4 probes. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84:704-709.
85. McLeod HL, Sludden J, Hardy SC, Lock RE, Hawksworth GM, Cassidy J. Autoregulation of 5-fluorouracil metabolism. *Eur J Cancer.* 1998;34:1623-1627.
86. Tian X, Cheng ZY, Jin H, Gao J, Qiao HL. Inhibitory effects of baicalin on the expression and activity of CYP3A induce the pharmacokinetic changes of midazolam in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:179643.
87. He F, Zhang W, Zeng C, Xia C, Xiong Y, Zhang H, et al. Mechanism of action of panaxytriol on midazolam 1'-hydroxylation and 4-hydroxylation mediated by CYP3A in liver microsomes and rat primary hepatocytes. *Biol Pharm Bull.* 2015;38:1470-1477.
88. Yamaoka K, Takakura Y. Analysis methods and recent advances in nonlinear pharmacokinetics from *in vitro* through *in loci* to *in vivo*. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;19:397-406.

89. Kajikawa N, Doi M, Kusaba J, Aiba T. Effect of carrageenan-induced acute peripheral inflammation on the pharmacokinetics and hepatic metabolism of midazolam in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014; 29:400-406.
90. Yu L, Lu S, Zhao N, Ni S, Yao T, Zeng S. Male-specific induction of CYP3A2 in rats by zolmitriptan. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60:1601-1607.
91. Nagai K, Suzuki S, Yamamura A, Konishi H. Change in pharmacokinetic behavior of intravenously administered midazolam due to increased CYP3A2 expression in rats treated with menthol. *Biopharm Drug Dispos.* 2015;36:174-182.
92. Moore JT, Kliewer SA. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology.* 2000;153:1-10.
93. Sinz MW. Evaluation of pregnane X receptor (PXR)-mediated CYP3A4 drug-drug interactions in drug development. *Drug Metab Rev.* 2013; 45:3-14.
94. De Martin S, Gabbia D, Albertin G, Sfriso MM, Mescoli C, Albertoni L, et al. Differential effect of liver cirrhosis on the pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A1 and 3A2 in the rat. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:1617-1626.
95. Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, et al. *In vivo* effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology.* 2005;214:113-122.
96. Heizmann P, Ziegler WH. Excretion and metabolism of ¹⁴C-midazolam in humans following oral dosing. *Arzneimittelforschung.* 1981;31: 2220-2223.
97. Shaw AA, Hall SD, Franklin MR, Galinsky RE. The influence of L-glutamine on the depression of hepatic cytochrome P450 activity in

- male rats caused by total parenteral nutrition. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:177-182.
98. Kotegawa T, Laurijssens BE, Von Moltke LL, Cotreau MM, Perloff MD, Venkatakrishnan K, et al. *In vitro*, pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of ketoconazole and midazolam in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:1228-1237.
 99. Yoshisue K, Nagayama S, Shindo T, Kawaguchi Y. Effects of 5-fluorouracil on the drug-metabolizing enzymes of the small intestine and the consequent drug interaction with nifedipine in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:1166-1175.
 100. Shimada M, Nagata K, Murayama N, Yamazoe Y, Kato R. Role of growth hormone in modulating the constitutive and phenobarbital-induced levels of two P-450₆₈ (testosterone 6 β -hydroxylase) mRNAs in rat livers. *J Biochem.* 1989;106:1030-1034.
 101. Ghosal A, Sadrieh N, Reik L, Levin W, Thomas PE. Induction of the male-specific cytochrome P450 3A2 in female rats by phenytoin. *Arch Biochem Biophys.* 1996;332:153-162.
 102. Ervine CM, Matthew DE, Brennan B, Houston JB. Comparison of ketoconazole and fluconazole as cytochrome P450 inhibitors. Use of steady-state infusion approach to achieve plasma concentration-response relationships. *Drug Metab Dispos.* 1996;24:211-215.
 103. Brown HS, Chadwick A, Houston JB. Use of isolated hepatocyte preparations for cytochrome P450 inhibition studies: comparison with microsomes for K_i determination. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:2119-2126.
 104. Sandborg RR, Siegel IA. Effects of 5-fluorouracil on protein synthesis and secretion of the rat parotid gland. *Arch Oral Biol.* 1990;35:991-1001.

105. Leon JA, Britt JM, Hopp RH, Mills RP, Milam AH. Effects of fluorouracil and fluorouridine on protein synthesis in rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:1709-1716.
106. Dolnick BJ, Pink JJ. Effects of 5-fluorouracil on dihydrofolate reductase and dihydrofolate reductase mRNA from methotrexate-resistant KB cells. *J Biol Chem.* 1985;260:3006-3014.
107. Marin-Vicente C, Lyutvinskiy Y, Romans Fuertes P, Zubarev RA, Visa N. The effects of 5-fluorouracil on the proteome of colon cancer cells. *J Proteome Res.* 2013;12:1969-1979.
108. Mojardín L, Botet J, Quintales L, Moreno S, Salas M. New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS One.* 2013;8:e78172.
109. Jin YY, Chen QJ, Xu K, Ren HT, Bao X, Ma YN, et al. Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and oxaliplatin chemo-resistance in esophageal cancer cells *via* regulation of PTEN. *Mol Cell Biochem.* 2016;422:161-170.
110. Kolesar JM, Johnson CL, Freeberg BL, Berlin JD, Schiller JH. Warfarin-5-FU interaction--a consecutive case series. *Pharmacotherapy.* 1999;19:1445-1449.
111. Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med.* 1996;125:47-58.
112. Formariz TP, Chiavacci LA, Sarmento VH, Santilli CV, Tabosa do Egito ES, Oliveira AG. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007;60:28-35.
113. Rajappa S, Joshi A, Doval DC, Batra U, Rajendranath R, Deo A, et al. Novel formulations of docetaxel, paclitaxel and doxorubicin in the management of metastatic breast cancer. *Oncol Lett.* 2018;16:3757-3769.

114. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845:84-89.
115. Zordoky BN, El-Kadi AO. Induction of several cytochrome P450 genes by doxorubicin in H9c2 cells. *Vascul Pharmacol*. 2008;49:166-172.
116. Okada N, Watanabe H, Kagami S, Ishizawa K. Ifosfamide and etoposide chemotherapy may interact with warfarin, enhancing the warfarin induced anticoagulant response. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2016;54:58-61.
117. Elkiran T, Harputluoglu H, Yasar U, Babaoglu MO, Dincel AK, Altundag K, et al. Differential alteration of drug-metabolizing enzyme activities after cyclophosphamide/adriamycin administration in breast cancer patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29:27-32.
118. Nagai K, Yoshida N, Kiyama M, Kasahara K, Yamamura A, Konishi H. Decreased elimination clearance of midazolam by doxorubicin through reductions in the metabolic activity of hepatic CYP3A in rats. *Xenobiotica*. 2015;45:874-880.
119. Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Proceeding of the Second International Symposium on Information Theory. Akadémiai Kiadó; 1973. p267-281.
120. Seymour MT, Patel N, Johnston A, Joel SP, Slevin ML. Lack of effect of interferon α 2a upon fluorouracil pharmacokinetics. *Br J Cancer*. 1994;70:724-728.
121. Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol*. 2009;76:215-228.
122. Fukuno S, Nagai K, Horii A, Yamamoto K, Konishi H. Pharmacokinetics and metabolic elimination of tolbutamide in female rats: Comparison with male rats. *Biopharm Drug Dispos*. 2018;39:321-327.

123. Ogilvie BW, Usuki E, Yerino P, Parkinson A. In vitro approaches for studying the inhibition of drug-metabolizing enzymes and identifying the drug-metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs (reaction phenotyping) with emphasis on cytochrome P450. *Drug-Drug Interactions*, Second Edition. CRC Press; 2008. p231-358.
124. Ashforth EI, Carlile DJ, Chenery R, Houston JB. Prediction of in vivo disposition from in vitro systems: clearance of phenytoin and tolbutamide using rat hepatic microsomal and hepatocyte data. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274:761-766.
125. Li D, Han Y, Meng X, Sun X, Yu Q, Li Y, et al. Effect of regular organic solvents on cytochrome P450-mediated metabolic activities in rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2010;38:1922-1925.
126. Di Re J, Lee C, Riddick DS. Lack of mechanism-based inactivation of rat hepatic microsomal cytochromes P450 by doxorubicin. *Can J Physiol Pharmacol*. 1999;77:589-597.
127. Judis J. Binding of sulfonylureas to serum proteins. *J Pharm Sci*. 1972;61:89-93.
128. Kabel AM, Alzahrani AA, Bawazir NM, Khawtani RO, Arab HH. Targeting the proinflammatory cytokines, oxidative stress, apoptosis and TGF- β 1/STAT-3 signaling by irbesartan to ameliorate doxorubicin-induced hepatotoxicity. *J Infect Chemother*. 2018;24:623-631.
129. Yu ZK, Yang B, Zhang Y, Li LS, Zhao JN, Hao W. Modified Huangqi Chifeng decoction inhibits excessive autophagy to protect against doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats *via* the PI3K/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2018;16:2490-2498.
130. Nagai K, Nogami S, Egusa H, Konishi H. Pharmacokinetic evaluation of intraperitoneal doxorubicin in rats. *Pharmazie*. 2014;69:125-127.

131. Kassner N, Huse K, Martin HJ, Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Meineke I, et al. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:2113-2120.
132. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000;19:201-213.
133. Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res.* 2001;18:632-639.
134. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1845:84-89.
135. Schary WL, Rowland M. Protein binding and hepatic clearance: studies with tolbutamide, a drug of low intrinsic clearance, in the isolated perfused rat liver preparation. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1983;11:225-243.
136. Millward MJ, Webster LK, Rischin D, Stokes KH, Toner GC, Bishop JF, et al. Phase I trial of cremophor EL with bolus doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 1998;4:2321-2329.
137. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, Martino S, et al. Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:976-983.