The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	テオフィリン代謝に関与するチトクロムP-450分子種の特性とヒトの本代謝系に係わる薬物相互作用
Author(s)	小西, 廣己
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3113077
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

テオフィリン代謝に関与するチトクロムＰ-450分子種の特性と

ヒトの本代謝系に係わる薬物相互作用

小　西　廣　己

①

テオフィリン代謝に関与するチトクロムＰ-450分子種の特性と

ヒトの本代謝系に係わる薬物相互作用

小　西　廣　己

目　次

序　論 …… 1
本　論 …… 3
第一章　固相抽出法を利用したHPLCによるマウス肝ミクロソームの
テオフィリン代謝酵素活性測定法の開発 …… 3
第一節　序 …… 3
第二節　テオフィリン代謝物分離分析のためのHPLC条件 …… 3
第三節　固相抽出法の検討とその妥当性 …… 4
第四節　肝ミクロソームのテオフィリン代謝酵素活性測定への応用 …… 6
第五節　酵素反応条件の至適化 …… 8
第六節　考察および小括 …… 9
第二章　マウス肝ミクロソームのテオフィリン代謝に関与する
チトクロムP-450分子種の速度論的多様性 …… 10
第一節　序 …… 10
第二節　テオフィリン各代謝反応の速度論的解析 …… 10
第三節　基質親和性の異なるチトクロムP-450分子種の誘導特性の比較 …… 12
第四節　代謝酵素活性の基質濃度依存的な阻害感受性 …… 15
第五節　考察および小括 …… 16
第三章　マウス肝ミクロソームのテオフィリン８-水酸化反応に関与する
チトクロムP-450分子種の特殊性 ── N-脱メチル化反応との相異 …… 18
第一節　序 …… 18
第二節　高基質濃度におけるテオフィリン代謝酵素活性におよぼす
酵素誘導剤の影響 …… 18
第三節　アセトン投与に対する各種薬物代謝酵素活性の反応性 …… 19
第四節　CYP2E阻害剤に対するテオフィリン代謝酵素活性の感受性 …… 21
第五節　テオフィリン代謝と *p*-ニトロフェノール水酸化反応との関連性 …… 22
第六節　考察および小括 …… 24
第四章　ヒトのテオフィリン代謝に対するフルコナゾールの阻害作用の
有無と本代謝系に関与するチトクロムP-450との関連性 …… 26
第一節　序 …… 26
第二節　コルチゾールの６β-水酸化代謝能におよぼす
フルコナゾールの影響 …… 27
第三節　テオフィリン代謝能におよぼすフルコナゾールの影響 …… 28
第四節　考察および小括 …… 31
結　論 …… 35
謝　辞 …… 36
実験の部 …… 37
引用文献 …… 44

本論文中には以下のチトクロム P-450分子種名を記載した。

CYP1A(CYP1A2)
CYP2B
CYP2C
CYP2D
CYP2E(CYP2E1)
CYP3A

本論文中には以下の略号を使用した。

TP　：テオフィリン
1-MX　：1-メチルキサンチン
1-MU　：1-メチル尿酸
3-MX　：3-メチルキサンチン
1,3-DMU：1,3-ジメチル尿酸
F　：コルチゾール
6β-OHF：6β-ヒドロキシコルチゾール
EDTA　：エチレンジアミン四酢酸
DMSO　：ジメチルスルフォキシド
$NADP^+$：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NADPH：還元型 $NADP^+$
TBA　：硫酸水素テトラ-*n*-ブチルアンモニウム
TCA　：トリクロロ酢酸
HPLC　：高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}　：50 %阻害濃度
Km　：Michaelis定数
Vmax　：単位タンパク質濃度あたりの最大酵素反応速度
V'max：単位チトクロムP-450含量あたりの最大酵素反応速度
ANOVA：分散分析
IS　：内部標準
SD　：標準偏差

序　論

テオフィリンは、茶葉に含有されるキサンチン誘導体のアルカロイドで、慢性閉塞性肺疾患、特に気管支喘息の治療に臨床上で広く用いられている代表的な気管支拡張剤である（1 - 4）。本剤の強力な気管支平滑筋弛緩作用には、ホスホジエステラーゼ活性阻害（5）、アデノシン受容体に対する拮抗（6, 7）、カテコラアミンの放出促進（8）あるいは化学伝達物質遊離抑制（9）などの多岐にわたる機序が介在するものと考えられているが、その多様な薬理作用は中枢神経系・心血管系にも現れ、痙攣や不整脈などの重篤な有害反応も誘発することが知られている（10）。近年、テオフィリンの体内動態に関する研究の進歩に伴い、その血液中濃度と臨床効果、副作用との関連性が追究された。その結果、有効濃度域と中毒発現濃度域とは互いに近接していることが明確となり（11 - 13）、本剤による治療効果を高め副作用を回避するためには、体液中濃度の継続的なモニタリングが必須であるとの認識が現在では定着しており、モニタリングの健康保険への適用もすでに認可されている（14）。

体内に投与されたテオフィリンは、大部分が酸化的に代謝されて消失するため、その体内動態は薬物代謝酵素活性に大きく依存するものと考えられている（15,16）。本剤は、8位の水酸化または3位あるいは1位のN-脱メチル化反応を受け、それぞれ 1,3-ジメチル尿酸(1,3-DMU)、1-メチルキサンチン(1-MX)および3-メチルキサンチン(3-MX)に変換される(Fig. 1)。これら3つの代謝経路は、ヒトをはじめとして多くの哺乳動物に共通しており、代謝酵素の本体はいずれも肝臓ミクロソーム分画のチトクロムP-450（P-450）であることが証明された（16, 17）。一方、免疫学的手法により、これらの代謝反応には、多環芳香族炭化水素誘導型のP-450分子種であるCYP1Aが関与することが見いだされた（17, 18）。このことは、喫煙（19）、高タンパク食の摂取（20）によってテオフィリンクリアランスが増加すること、また、実験動物に環状炭化水素を前投与した場合にテオフィリン代謝酵素活性が顕著に上昇する(17, 21, 22) などの *in vivo* での現象の理論的根拠となるものである。しかしながら、肝ミクロソームを用いた検討により、過剰量の抗CYP1A抗体の存在下でもテオフィリン代謝酵素活性はかなりの割合で残存することが認められ(17, 23)、事実、臨床上で他剤併用時に頻繁に遭遇するテオフィリン体内動態の変動は、その薬剤種の多様さを鑑みるとCYP1A活性の変動のみでは説明し得るものではない（24）。すなわち、テオフィリンの酸化的代謝反応には、CYP1A 以外にいずれの分子種がどの程度寄与しているかの詳細は明確にされておらず、これらを明らかにすることは、特に、テオフィリン代謝をめぐる薬物相互作用を評価あるいは予測する上で重要であると考えられる。

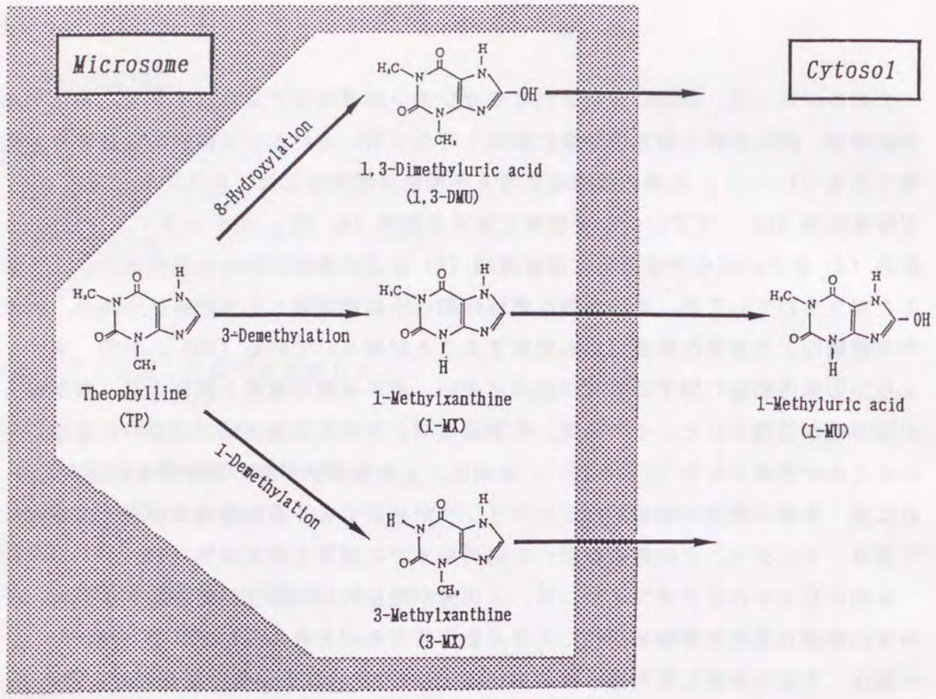

Fig. 1. Metabolic Pathways of Theophylline

これらの観点から著者は、テオフィリン代謝物の生成率がヒトと類似しているマウスを用い、肝ミクロソームにおけるテオフィリン代謝酵素活性の精度の高い測定法を新たに開発し、各代謝反応を種々の条件下で速度論的に解析することにより関与するP-450分子種の特性を明らかにしようとした。さらにヒトにおいて、強力なP-450阻害作用を有する抗真菌剤・フルコナゾールとの併用時にテオフィリンの酸化的代謝能に変動を生ずるか否かを検証し、テオフィリン代謝に係わる薬物相互作用を類推する指針を得ようとした。

本　論

第一章　固相抽出法を利用したHPLCによるマウス肝ミクロソームのテオフィリン代謝酵素活性測定法の開発

第一節　序

肝ミクロソームのテオフィリン代謝酵素活性測定法の研究は、Lohmannら（25）がHPLCによる検討を手掛けて以来、本法に改良を加えたいくつかの報告がなされてきた（16, 26 - 28）。これらの方法は、HPLCの長所を十分に生かし、酵素反応で生成したテオフィリン代謝物の分離分析を可能にしたものであるが、いずれの場合も試料の前処理段階において煩雑な有機溶媒抽出操作を必要としている。また、有機溶媒での抽出効率自体がすぐれているとは言えず、逆に夾雑物を転溶させてしまうなど、定量性に直接影響を与えるような重大な問題点を抱えている。

そこで著者は、有機溶媒抽出に代えて、固相法によるテオフィリン代謝物の抽出を試み、テオフィリン代謝酵素測定のための定量精度の高いHPLC法の確立に着手した。

第二節　テオフィリン代謝物分離分析のための HPLC条件

テオフィリンの３種の代謝物、テオフィリンおよび内部標準物質（IS)のアセトアミノフェンを含有する標準液をHPLCに供したところ、Fig. 2 に示すように、適切な保持時間で互いに良好な分離が得られた。

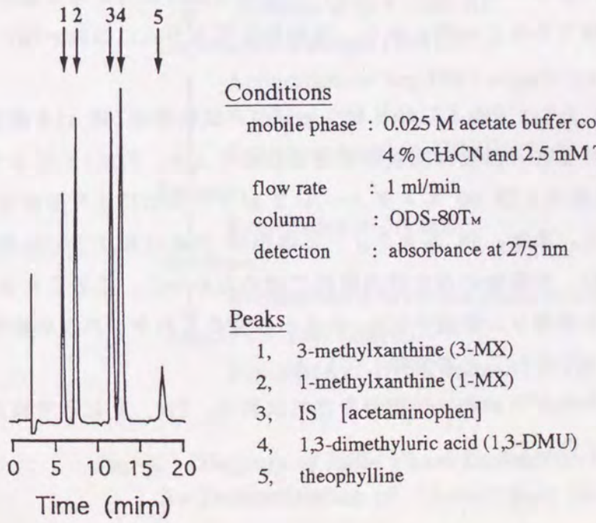

Fig. 2. HPLC Separation of Theophylline, Its Metabolites and Internal Standard

IS の選定にあたっては、いくつかのキサンチン系化合物も含め、その適性をあらかじめ調べた。8-クロロテオフィリンや1,3,7-トリメチル尿酸は保持時間が長すぎ、テオブロミン、パラキサンチンやβ-ヒドロキシエチルテオフィリンは、後述するような酵素反応に応用した場合、未反応のテオフィリンの大きなピークと重なる。また、3,7-ジメチル尿酸は1,3-DMUとの分離が困難など、いずれもISとして条件を満たすものではなかった。一方、アセトアミノフェンはキサンチンとは化学構造的には異なるものの、テオフィリンおよびその代謝物との分離性が高く、テオフィリン代謝物の吸収極大波長である 270 - 290 nmに平坦な吸収スペクトラムを有するなどの理由でISとして採用し、以下の検討に供した。

移動相は、Muirら（29）が提唱したイオンペアークロマトグラフの原理に準拠し、その溶媒組成とpH値に関して変更を加えた。すなわち、イオンペアリング効果により移動相のpH値を変えることで、特にメチル尿酸の保持時間を容易に修正できるため、ISあるいは夾雑ピークとの分離を確実にする上で非常に有用であった。

第三節　固相抽出法の検討とその妥当性

ミクロソーム反応を想定し、既知量の1,3-DMU、1-MXおよび3-MXとISを溶解した 70 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）1 mlに除タンパク剤の15 %トリクロロ酢酸(TCA) 100 μl を添加したものを試料とした。試料溶液が疎水性溶媒とは混和しないこと、また、液性が酸性に傾いているためいずれの分析物も荷電状態にないことから、順相あるいはイオン交換を目的とした方式は適性を欠くと判断し、逆相系のカラムを用いることとした。テオフィリン代謝物の極性が高く（29）、広範な保持能力がある吸着担体が装填されたカラムが必要であるとの観点から、固相抽出用カラムにはSep-Pak C_{18}カートリッジを選択した。

あらかじめ活性化したSep-Pak C_{18}カートリッジに、試料溶液700 μlを添加した後、洗浄と溶出過程における各分析物の回収率を定量したところ、Fig. 3 に示すように、精製水 2.5 mlでの洗浄および 40 %メタノール 2 mlでの溶出によりほぼ完全に抽出できることが判明した。また、40 %メタノール溶出液 2 mlは減圧下で比較的容易に濃縮乾固が可能であり、残留物の存在は肉眼的に認めなかった。このことは、試料中に多量に含まれている無機リン酸塩やTCA、あるいは変性したタンパクの断片などの夾雑物が効率的に除去できたことを意味している。

これらの結果から、テオフィリン代謝物を含む試料は、Fig. 4 に示す操作手順を経てHPLCによる分析に供した。

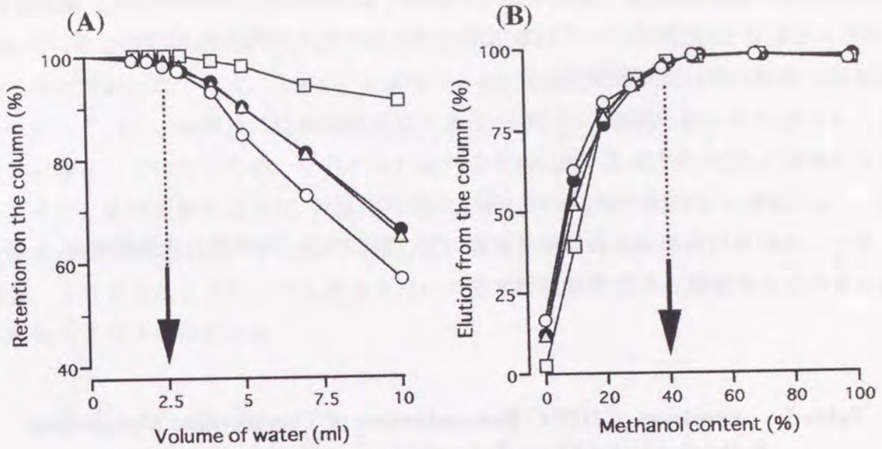

Fig. 3. Behavior of the Analytes during Solid Phase Extraction

(A) Desorption of the analytes from the column by passing of water.
(B) Effect of methanol content on elution of the analytes from the column.
Arrows indicate the conditions for sequential experiments.
Symbols : ○, 3-MX; △, 1-MX; □, 1,3-DMU; ●, IS

Microsome samples (1 ml)
↓ Treatment with 15 % TCA (100 μl)
↓ Addition of IS * (100 μl)
Deproteinized sample (700 μl)
↓ Application on Sep-Pak C_{18} cartridge
↓ Washing with H_2O (2.5 ml)
↓ Extraction by 40 % CH_3OH (2 ml)
Extracts
↓ Evaporation to dryness
Residues
↓ Reconstitution in mobile phase buffer
Sample solution (200 μl)
Injection onto HPLC column (15 μl)
*** Acetaminophen (50 μg/ml)**

Fig. 4. Diagram of Solid Phase Extraction Method for Determination of Theophylline Metabolites

各代謝物の種々濃度(X, μg)に対する代謝物／IS のピーク面積比(Y)は、添加量が 0.025 - 10 μg の範囲で、いずれも下記の式で表される相関係数 0.996 - 0.998 のほぼ原点を通る高い直線性を示した。

3-MX : $Y = 0.928\ X - 0.005$

1-MX : $Y = 0.724\ X - 0.004$

1,3-DMU : $Y = 0.648\ X - 0.009$

また、回収率は添加量に関係なくほぼ 100 %であり、再現性も変動係数が 6 %以内と良好な成績が得られた(Table 1)。

Table 1. Precision of HPLC Determination of Theophylline Metabolites Following Solid Phase Extraction

Metabolites	Added (μg)	Analytical recovery[a] (%)	CV[b] (%)
3-MX	0.15	96.8	4.52
	0.50	98.9	2.67
	1.50	102.2	2.81
1-MX	0.15	98.5	4.72
	0.50	97.1	2.14
	1.50	98.8	2.25
1,3-DMU	0.3	100.4	6.22
	1.0	103.7	3.15
	3.0	100.6	2.29

a) Mean of four experiments. b) Coefficient of variation.

第四節　肝ミクロソームのテオフィリン代謝酵素活性測定への応用

前節において、高い精度でテオフィリン代謝物の定量が可能であることを明らかにしたので、その方法をマウス肝ミクロソームの P-450による酵素反応に適用し、活性測定法の妥当性を検討した。

マウス肝ミクロソームは常法により調製し、70 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)中 1 mM テオフィリンおよび NADPH 再生系とともに 37 ℃にて反応、Fig. 4 にしたがって前処理を施し、HPLCにより代謝生成物を測定した。また、反応に先立って失活させたP-450酵素を用い、同一条件で分析を行なった場合のクロマトグラムと対比させた。

Fig. 5 に示すように、酵素反応後において、標準品と一致した位置に３種の代謝物のピークが検出され、IS および未反応のテオフィリンのピークとの分離性もきわめて良好であった。一方、1-メチル尿酸 (1-MU) が検出されなかったのは、ここで用いたミクロソーム画分には細胞質酵素であるキサンチンオキシダーゼはおそらく微量しか混在していないため、1-MXから1-MUへの反応は進行しなかったためと考えられる。また、各代謝物およびIS の保持時間の近傍に妨害ピークはほとんど認めず、溶出はほぼ20分で完了し、その後の持越しピークも出現しなかった。
なお、失活させたミクロソーム標品を用いて酵素反応を行なった場合では、いずれの代謝物も生成されなかった。

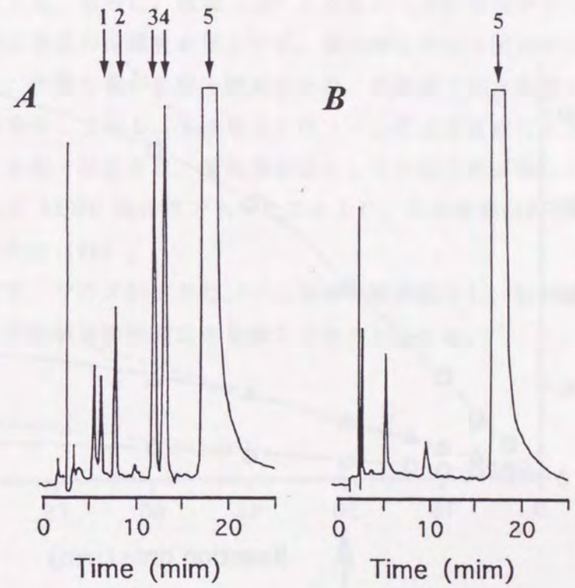

Fig. 5. HPLC Chromatogram of Extract of Incubation Mixture of Theophylline and Mouse Hepatic microsomal P-450 (A) and That of Theophylline with Microsomal P-450 Inactivated Prior to Enzyme Reaction (B)

Metabolic reaction of theophylline with mouse hepatic microsomal P-450 was carried out at 37 ℃ for 30 min in a total volume of 1 ml including 1 mg protein of microsomes, 1 μmole of substrate and NADPH generating system in 70 mM phosphate buffer, pH 7.4. Following solid phase extraction, chromatographic analysis was performed under flow rate of 1 ml per min and detection by absorbance at 275 nm.

Peaks : (1) 3-MX; (2) 1-MX; (3) IS; (4) 1,3-DMU; (5) unmetabolized theophylline

第五節　酵素反応条件の至適化

Fig. 6 で示すように、テオフィリン代謝物の生成量は時間依存的に増加することが確認された。Hemsworthら（26）は、ウサギ肝による研究で酵素反応時間を２時間に設定しているが、今回著者は、直線性が認められた30分を以降の実験での酵素反応時間とした。

また、本条件下での代謝物の生成は、ミクロソームタンパク質濃度が少なくとも1.5 mg/mlまでは比例的に増加した。NADPH再生系を添加しないと酵素反応が進行しないこと、テオフィリン非存在下では代謝物のピークが検出されないこともあわせて確認した。

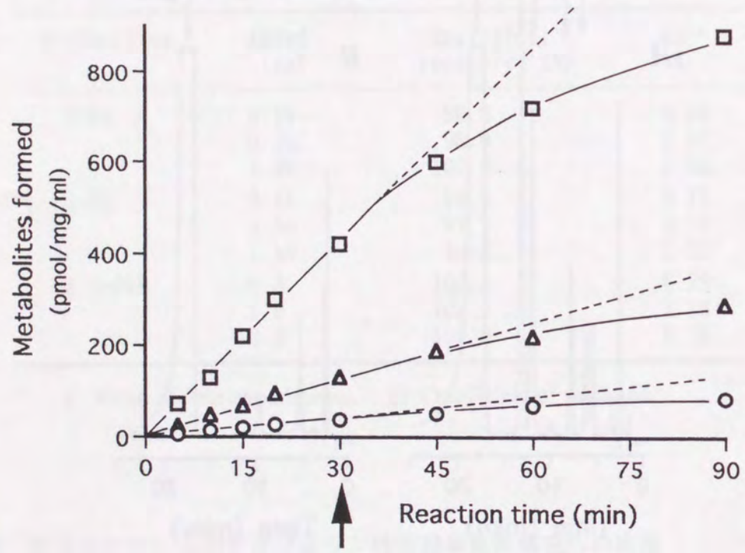

Fig. 6. Effect of Reaction Time on Formation of Theophylline Metabolites

An arrow shows the incubation time adopted for sequential experiments. Dotted lines indicate theoretical production of the metabolites on the assumption of linearity of the enzyme reaction.

Symbols : ○, 3-MX; △, 1-MX; □, 1,3-DMU

第六節　考察および小括

テオフィリン代謝には３つの酸化的経路が存在するため、その酵素活性を測定するためには、それぞれの代謝産物を高い精度で定量することが必須である。しかし、3-MX, 1-MX は 1,3-DMUはいずれも極性が高く、物理化学的性質も互いに大きく異なっているため、有機溶媒では抽出されにくく、また移行性も一様ではない（29）。

生体試料中のホルモンや薬物など、両親媒性をもつ物質のクロマト分離を目的とする場合、近年、液－液抽出法に代わって固相抽出法による夾雑物の除去が試みられており、その優秀性が数多く報告されている（30 - 32）。

そこで今回、アセトアミノフェンを IS として固相抽出法を実施したところ、操作条件を適切に規定することにより、目的物のみをより選択的に高い回収率で抽出できることを見いだした。さらに、既報（28）と比較して分析精度が著しく向上したのみならず、前処理に多量の溶媒を必要とせず、抽出時における試料の乳化の危険性も排除できる。また、作業行程が短縮・簡素化され、実践面での有用度もきわめて高いなど多くの利便性を有している。本法をミクロソームによる反応に応用したところ、各代謝物は明瞭に分離・検出され、活性測定法としての妥当性が明らかとなった。さらに、反応の進行が NADPH 依存性であったことより、代謝変換はP-450によるものであることが確認された（16）。

以上のことより、マウス肝ミクロソーム分画を酵素源とし、固相抽出－HPLC法によるテオフィリン代謝酵素活性測定法を確立できたといえる。

第二章　マウス肝ミクロソームのテオフィリン代謝に関与するチトクロムP-450分子種の速度論的多様性

第一節　序

テオフィリン代謝に関与する肝ミクロソームのP-450には、免疫化学的な研究（17, 18, 23）等により、CYP1A 以外にもそれとは異なる分子種の存在が示唆されている。しかし、これらの分子種が実際にどの程度代謝反応に寄与しているかについは不明な点が多い。したがって、CYP1Aも含め、テオフィリン代謝に係わるP-450の触媒活性能の全容とそれらの諸性質を把握することは、本剤の体内動態は薬物代謝酵素活性に支配されていることからも意義が深い。

前章で、テオフィリン代謝を担うP-450活性測定法を開発した。そこで、本章では、テオフィリン代謝物の生成比率がヒトと類似しているマウス（33）の肝ミクロソームを用い、各代謝酵素活性を速度論的に解析した。さらに、酵素誘導、酵素阻害の観点から、基質親和性の異なるP-450分子種の酵素学的反応性の相違を精査した。

第二節　テオフィリン各代謝反応の速度論的解析

基質濃度 0.1 - 15 mM においてテオフィリンの代謝反応を行い、それぞれの代謝変換について Fig. 7 で示すような Eadie-Hofstee プロットを作成した。

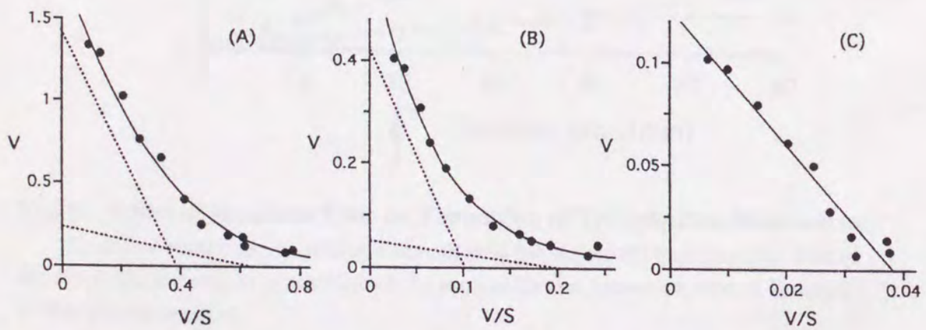

Fig. 7. Eadie-Hofstee Plots for 8-Hydroxylation (A), 3-Demethylation (B) and 1-Demethylation (C) of Theophylline in Hepatic Microsomes

The slope of the dotted lines represent the estimates of the Michaelis-Menten constants for the high and low affinity sites, respectively.

S , substrate concentration (mM). *V* , reaction velocity (nmol/mg/min).

テオフィリン１-脱メチル化反応のプロットは直線上に位置したのに対し、８-水酸化および３-脱メチル化反応のプロットの軌跡は曲線を示した。二相性を呈した原因としては、アロステリック効果など酵素タンパクの構造的変化の可能性もあるが、P-450を構成する分子種の多様性（34）からすると、複数種のP-450が代謝に関与すると考えるのが妥当である（35）。

これらの結果に基づいて、テオフィリン代謝に関与するP-450活性の速度論的パラメータを算出した。１-脱メチル化反応には見かけ上単一のP-450種で触媒されているものと仮定した。一方、二相性を示した８-水酸化および３-脱メチル化反応の場合には、理論的には２種以上のP-450群が関与している可能性がある。しかし、予測モデル式に対する実測値の統計学的適合性を示す尺度である赤池の情報量基準値（36）から判断すると、２種を超えるP-450群の関与を想定するよりもむしろ、基質親和性が相似するP-450はひとつのグループにまとめて取り扱う方が実際をより的確に反映するものと考えられる。したがって、これらの代謝系には、見かけ上２種のP-450が関与するものと仮定し、下記の Michaelis-Menten式にしたがって反応が進行するものとして解析を行なった。

１-脱メチル化：$V = Vmax * S / (Km + S)$

８-水酸化と３-脱メチル化：$V = Vmax_1 * S / (Km_1 + S) + Vmax_2 * S / (Km_2 + S)$

$(Km_1 < Km_2,\ Vmax_1 < Vmax_2)$

V：反応速度　(pmol/mg/min)

S：基質濃度　(mM)

Table 2. Kinetic Parameters for Metabolic Conversion of Theophylline in Mouse Hepatic Microsomes

Reaction	Km (mM)		Vmax (pmol/mg/min)	
	Km_1	Km_2	$Vmax_1$	$Vmax_2$
8-Hydroxylation	0.26 ± 0.03	3.16 ± 0.63	120 ± 29	1450 ± 270
3-Demethylation	0.22 ± 0.07	3.70 ± 0.72	39 ± 12	370 ± 80
1-Demethylation	—— a)	3.43 ± 0.54	—— a)	163 ± 23

The values of Km and Vmax were determined according to Michaelis-Menten equation described in the text. Each value represents the mean ± SD of four animals. a) Not detected.

Table 2 に示すように、8-水酸化および3-脱メチル化反応では、得られた2つのKm値と対応する2つの Vmax値には、いずれの代謝経路においてもそれぞれおよそ10倍の隔差が認められた。このことは、2つの P-450分子種はhigh affinity-low capacity および low affinity-high capacity の性質を有することを明らかに示すものである。一方、1-脱メチル化反応の場合、得られた Km値は上記のKm_2値に対応しているものと考えられ、見かけ上 low affinity-high capacity P-450分子種のみで反応が進行するものと解釈される。

また、酵素活性の強さは、いずれの基質濃度においても、8-水酸化＞3-脱メチル化＞1-脱メチル化代謝活性の序列にあり、Betlachら (33) が報告したマウスにテオフィリンを投与した時の *in vivo* での各代謝物の生成クリアランスの大きさの序列と一致する結果であった。

第三節　基質親和性の異なるチトクロムP-450分子種の誘導特性の比較

前節で明らかにした high affinity-low capacity および low affinity-high capacity P-450分子種が、互いに異なる代表的なモノオキシゲナーゼの誘導剤 (37) であるβ-ナフトフラボンおよびフェノバルビタールによってどのような影響を受けるかについて検討した。これらの薬剤をマウスに投与して酵素誘導をもたらした後に、テオフィリン代謝酵素活性変動の様相を調べたところ、Fig. 8 に示すように、8-水酸化および3-脱メチル化反応において、0.5 mM 以下の低基質濃度領域では、β-ナフトフラボン投与による酵素活性の亢進作用はフェノバルビタールのそれよりもはるかに顕著なものであった。しかし、基質濃度の増加にしたがい両者の活性亢進効率の差は縮小し、0.5 - 1 mM 以上の基質濃度範囲では、それらの酵素活性はβ-ナフトフラボンよりはむしろフェノバルビタールによって優位に上昇することが明らかとなった。一方、1-脱メチル化反応は、β-ナフトフラボンではいずれの基質濃度でも酵素活性に亢進は認められなかったが、フェノバルビタール投与によりその活性が顕著に増加した。

なお、酵素誘導剤の懸濁もしくは溶解のために用いたプロピレングリコールを投与した場合でも、投与しない群と速度論的パラメータに有意な差はないことを確認した。

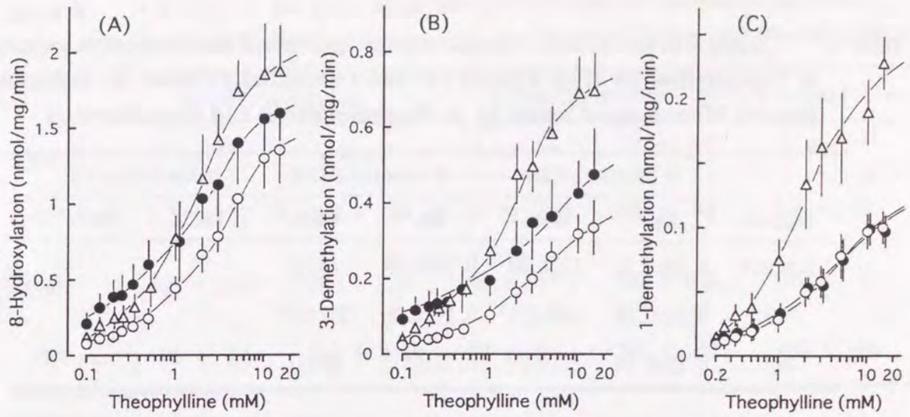

Fig. 8.　Profiles of the Enzyme Activities for 8-Hydroxylation (A), 3-Demethylation (B) and 1-Demethylation (C) of Theophylline after Exposure to Inducers

Each activity represents the mean ± SD of experiments with five animals given vehicle alone (○), β-naphthoflavone (●) or phenobarbital (△).

これらの酵素誘導剤投与後におけるP-450活性の速度論的パラメータの変動を解析した。酵素反応は、前節で述べた high affinity-low capacity および low affinity-high capacity P-450分子種の関与を前提としたMichaelis-Menten式に従うものとした。

Table 3 に示すように、8-水酸化および3-脱メチル化反応に関する$Vmax_1$値は、β-ナフトフラボン投与により有意に増加したが、フェノバルビタールの場合には変動は認められなかった。これとは対照的に、β-ナフトフラボンはいずれの$Vmax_2$値にも影響を与えず、フェノバルビタール投与においてのみ有意な増加がもたらされた。一方、Km_1値は誘導剤投与の有無によらず有意な変動は認められなかったが、フェノバルビタール投与時にはKm_2値に減少する傾向が認められた。このKm_2値の僅かな変動は、low affinity P-450分子種に対する誘導作用の不均一性に起因するものと考えられ、特にN-脱メチル化反応に係わるlow affinity P-450が、親和性の類似した複数の分子種で構成されていることを間接的に示唆している。この現象は、部分的な変動を low affinity群全体の変動として包括して評価することの整合性を示している。

Table 3. Changes in the Kinetic Parameters for Individual Metabolic Conversion of Theophylline for High Affinity (A) and Low Affinity Phases (B) in Mouse Hepatic Microsomes Caused by β-Naphthoflavone and Phenobarbital

A

	8-Hydroxylation		3-Demethylation		1-Demethylation	
Inducer	Km_1 [a]	$Vmax_1$ [b]	Km_1 [a]	$Vmax_1$ [b]	Km_1 [a]	$Vmax_1$ [b]
Control	0.24±0.05	117± 28	0.26±0.09	38±11	– [c]	– [c]
β-NF [e]	0.18±0.07	440±211 [d]	0.17±0.05	197±92 [d]	– [c]	– [c]
PB [f]	0.19±0.04	131± 22	0.25±0.12	33±11	– [c]	– [c]

B

	8-Hydroxylation		3-Demethylation		1-Demethylation	
Inducer	Km_2 [a]	$Vmax_2$ [b]	Km_2 [a]	$Vmax_2$ [b]	Km_2 [a]	$Vmax_2$ [b]
Control	2.92±0.77	1270±190	3.84±0.92	416± 77	3.02±0.70	152±20
β-NF [e]	3.90±1.29	1460±320	4.95±0.89	469±124	2.38±0.55	149±35
PB [f]	1.85±0.47	2020±350 [d]	2.10±0.95 [d]	763±154 [d]	2.58±0.43	405±81 [d]

The values of Km and Vmax were determined according to Michaelis-Menten equation described in the text. Each value represents the mean ± SD of five animals. Control mice received vehicle alone. The vehicle was confirmed to exert no significant effect on the kinetic parameters. a) mM. b) pmol/mg protein/min. c) Not detected. d) Significantly different from control ($p<0.05$, Fisher's test). e) β-naphthoflavone. f) Phenobarbital.

次に、上記 highおよびlow-affinity P-450種の酵素誘導性をP-450含量に対する最大反応速度（V'max）の増加率を求めることで評価した。

Table 4に示すように、β-ナフトフラボンは$V'max_2$値を有意に変動させず、$V'max_1$値のみを顕著に増加させた。これは、単位タンパク濃度を基準に算出した場合と同様の結果であった。一方、フェノバルビタールの場合では、$V'max_1$値に有意な減少が見られたのみならず、$V'max_2$にも低下する傾向が認められた。このことは、P-450含量の増加率に比し、酵素活性上昇の程度は小さいことを示すものである。

Table 4. Changes in the Individual Metabolic Capacity Calculated on P-450 Content Basis Following Exposure to β-Naphthoflavone and Phenobarbital

	8-Hydroxylation		3-Demethylation		1-Demethylation
Inducer	$V'max_1$ [a]	$V'max_2$ [a]	$V'max_1$ [a]	$V'max_2$ [a]	$V'max_2$ [a]
Control	115 ± 22	1270 ± 260	37 ± 7	419 ± 93	156 ± 27
β-NF [c]	403 ± 219 [b]	1380 ± 220	169 ± 54 [b]	397 ± 106	141 ± 50
PB [d]	64 ± 24	918 ± 205 [b]	14 ± 6	340 ± 40	180 ± 16

The values of $V'max_1$ and $V'max_2$ for each metabolic pathway were designated as maximum reaction velocity per nmol P-450 content for high and low affinity phases, respectively. Each value represents the mean ± SD of five animals. a) pmol/nmol P-450/min. b) Significantly different from control ($p<0.05$, Fisher's test). c) β-naphthoflavone. d) Phenobarbital.

第四節　代謝酵素活性の基質濃度依存的な阻害感受性

前節での検討結果より、基質濃度がKm_1とKm_2付近では主として関与する分子種が異なることが示唆されたので、テオフィリン濃度を0.2 mMと5 mM における８-水酸化および３-脱メチル化代謝酵素活性に対する各種P-450阻害剤の阻害効率を比較検討し、その結果をTable 5 に示した。

ここで用いたエリプチシンはCYP1Aに対する特異的阻害剤であり（38）、プロアディフェン（39）、ジフェンヒドラミン（40）、ジエチルジチオカルバメート（41）あるいはケトコナゾール（42, 43）はCYP2B, CYP2C, CYP2E, CYP3Aなどのフェノバルビタールによって誘導されうるP-450分子種に比較的阻害選択性が高いと考えられている。

基質濃度 0.2 mMと5 mMでのIC_{50}値（それぞれ$IC_{50(H)}$および$IC_{50(L)}$と定義する）の比（$IC_{50(L)}/IC_{50(H)}$）を比較すると、エリプチシンとそれ以外の阻害剤の間には、いずれの代謝経路においてもおよそ２オーダーの差が認められ、２つの P-450種の阻害感受性が本質的に異なることが示唆された。さらに、エリプチシンを除く阻害剤の中には、$IC_{50(L)}<IC_{50(H)}$ となる例も認められた。しかし、$IC_{50(L)}$値をこれら２つの代謝反応間で比較すると、同一の阻害剤であっても、その数値は必ずしも近接するものではなかった。この理由については、第三章で詳細に述べる。

Table 5. Effects of P-450 Inhibitors on Theophylline 8-Hydroxylation and 3-Demethylation at Substrate Concentrations of 0.2 mM and 5 mM

	8-Hydroxylation			3-Demethylation		
	IC_{50} (μM)			IC_{50} (μM)		
Inhibitor	$IC_{50(H)}$	$IC_{50(L)}$	$IC_{50(L)}/IC_{50(H)}$	$IC_{50(H)}$	$IC_{50(L)}$	$IC_{50(L)}/IC_{50(H)}$
Ellipticine	0.23	15	65.2	0.43	17	39.5
Proadifen	220	180	0.8	83	67	0.8
DPH[a)]	360	290	0.8	270	170	0.6
DEDTC[b)]	85	87	1.0	75	100	1.3
KCZ[c)]	12	37	3.1	10	14	1.4

The $IC_{50(H)}$ was defined as the IC_{50} at a theophylline concentration of 0.2 mM, and the $IC_{50(L)}$ was defined as that at 5 mM. Each value is the mean of experiments with four separate microsomal preparations. a) Diphenhydramine. b) Diethyldithiocarbamate. c) Ketoconazole.

第五節　考察および小括

代謝酵素活性を速度論的に解析することにより、テオフィリンの酸化的代謝には、affinityとcapacityがそれぞれ大きく異なる少なくとも２つのP-450分子種が関与することを示した。さらに、これら２つの分子種は酵素誘導性および阻害感受性も本質的に異なり、それらの酵素学的挙動の相違から（44）、high affinity P-450分子種は、従来よりその関与が指摘されているCYP1Aに属し、low affinity P-450分子種はフェノバルビタール誘導型の分子種に分類されることが明らかとなった。

CYP1Aの基質特異性は比較的狭く、ベンツピレンや7-エトキシレゾルフィンなどの極めて平面性の高い分子構造を有する化合物に対してのみ高い触媒活性を示すと推定されている（45）。テオフィリンの分子構造にも高い平面性が確認されていることから、必然的にCYP1Aの良好な基質となる（45、46）。しかし、肝ミクロソームにおけるCYP1Aの発現量は、他の分子種のそれと比べると一般的に低いので（47）、テオフィリン代謝に関し、CYP1Aは高い親和性は示すものの代謝許容量としては低いのであろう。その一方で、テオフィリンはフェノバルビタール誘導型P-450種の非特異的な

基質としても働くようである。この範疇に属する分子種は多岐にわたっていることから（48）、その中のいくつかが協同して作用することで、テオフィリンの高い代謝能が得られるものと推定される。

Campbelら（27）は、ヒト肝ミクロソームにおけるテオフィリン酸化反応の Eadie-Hofsteeプロットは二相性とみなしうると報告しており、今回マウスで得られた結果と同様、テオフィリン代謝に関与するP-450種の多様性を示唆するものである。テオフィリンクリアランスは喫煙によって亢進されるが、臨床上、フェノバルビタールとの併用によっても有意に増大することが認められており（49）、酵素誘導特性が類似した他の薬剤との併用時にも同様の現象が見いだされている（50、51）。これらの知見は、フェノバルビタール誘導型 P-450分子種の *in vivo* での寄与を如実に示しているものである。体内におけるテオフィリン代謝に速度論的に区別できる２種のP-450が関与するとすれば、テオフィリン濃度が希薄である場合でも、low affinity分子種の寄与率はそれぞれの肝固有クリアランスの比($Vmax_2 \cdot Km_1/Vmax_1 \cdot Km_2$)に近似できる（52）。テオフィリンの肝臓内濃度は血清中のそれとほぼ同じレベルで推移することがラットで報告されているが（53）、肝ミクロソーム近傍での薬物濃度はその周囲よりも高いことが一般的な概念として受け入れられている。したがって、血清中テオフィリン濃度が治療有効範囲内，50 - 100 μM (10)，にあっても、low affinity分子種の寄与の程度は理論値に比して高くなると予測され、capacity が十分に大きければ、high affinity 分子種のそれに匹敵する役割を担うものと考えられる。

以上、本章では、マウス肝ミクロソームのテオフィリン８-水酸化およびN-脱メチル化代謝には、CYP1A以外に、それよりもcapacityがはるかに高いフェノバルビタール誘導型のP-450分子種が関与することを明らかにした。

第三章　マウス肝ミクロソームのテオフィリン８-水酸化反応に関与するチトクロムＰ-450分子種の特殊性 ── Ｎ-脱メチル化反応との相異

第一節　序

テオフィリン８-水酸化とＮ-脱メチル化酵素活性との間で、抗P-450抗体あるいは各種薬剤に対する阻害効率に顕著な差異が認められることから（17、23、26）、それぞれの代謝経路には、少なくとも部分的には異なるP-450種が関与しているものと推察されている。前章において、テオフィリン代謝は、CYP1Aの他に、それよりもcapacityが大きいP-450群によって営まれていることを論じた。high capacity P-450群の特性は代謝反応の全貌を規定する重要な因子となるため、これらの P-450群を構成する分子種の異同を各代謝経路間で明確にする必要がある。

そこで、８-水酸化およびＮ-脱メチル化代謝に関与する high capacity P-450群の酵素学的性質の相異を明らかにする目的で、各種薬剤に対する酵素誘導および酵素阻害挙動、さらに他の代謝反応との関連性の面から検討し、特に、最も代謝活性の高い８-水酸化反応に関与するP-450分子種を特定しようとした。

第二節　高基質濃度におけるテオフィリン代謝酵素活性におよぼす酵素誘導剤の影響

誘導剤投与後の肝ミクロソームを試料とし、high capacity (low affinity) P-450群に対する各種P-450誘導剤の作用特性を、これらの酵素群の寄与が全活性の大部分を占める基質濃度5 mM の条件下で代謝反応を行なうことにより検証した。

CYP2Bをはじめとして広範なP-450分子種に酵素誘導効果がおよぶフェノバルビタール（48）にて前処置したところ、すべての酵素活性が明瞭に上昇したが、各代謝経路間に有意な差異はなく選択性に乏しいものであった。また、CYP3Aの選択的誘導剤であるプレグネノロン-16α-カルボニトリル（48, 54）を投与した場合では、いずれの酵素活性にも有意な変動は認められなかった。一方、エタノール誘導型分子種として知られるCYP2Eを比較的強力かつ優先的に誘導するとされているアセトン（55 - 57）を投与することにより、１-および３-脱メチル化活性には全く変動は認められなかったものの、８-水酸化酵素活性のみに有意な上昇が認められ、各代謝活性は酵素誘導剤に応じて異なった反応性を示すことが明らかとなった。これらの結果を総括して Fig. 9 に示す。

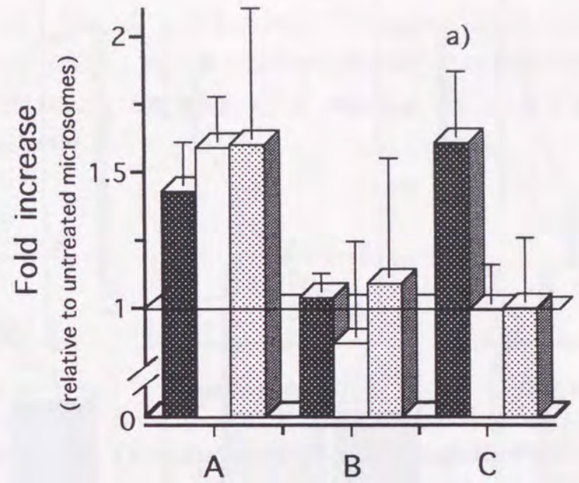

Fig. 9. Differential Induction of Theophylline Oxidations after Exposure to Phenobarbital (A), Pregnenolone-16 α -carbonitrile (B) and Acetone (C)

Each column represents the mean ± SD of 6 - 10 experiments. a) Significantly different from the other enzyme activities in respective experimental group ($p < 0.05$, Tukey's test).

Columns : ▩, 8-hydroxylation; □, 3-demethylation; ▒, 1-demethylation

第三節　アセトン投与に対する各種薬物代謝酵素活性の反応性

アセトンを暴露させたマウスの肝ミクロソームのテオフィリン代謝酵素活性を広い範囲の基質濃度下で測定した。Fig. 10 に示すように、８-水酸化反応に関していずれの基質濃度においてもアセトン投与により活性の上昇が見られたが、有意な増加は高基質濃度領域のみに限定されていた。一方、１-および３-脱メチル化反応に関しては、基質濃度を問わずそれらの活性に全く変動は認められなかった。

さらに、これらの測定値から速度論的パラメータを算出し、その結果をTable 6 として記載した。８-水酸化反応の$Vmax_2$値のみに明らかな増大が認められたが、Ｎ-脱メチル化反応の$Vmax_2$値には有意な上昇は認められなかった。また、いずれの代謝系の$Vmax_1$およびKm（Km_1またはKm_2）値にも有意な変動はなかった。なお、表には示さないが、P-450含量を基準として各パラメータを算出しても同様な結果が得られた。

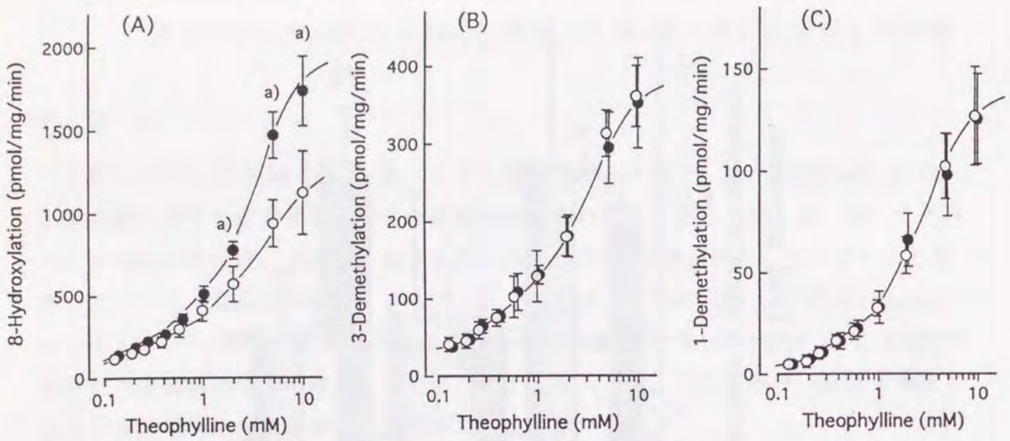

Fig. 10. Inductive Response of 8-Hydroxylation (A), 3-Demethylation (B) and 1-Demethylation (C) of Theophylline upon Exposure to Acetone

Each activity represents the mean ± SD of experiments with five animals given drinking water (○) or 1 % acetone (●).

a) Significantly different from control ($p < 0.05$, Tukey's test).

Table. 6. Changes in the Kinetic Parameters for the Three Metabolic Pathways of Theophylline in Mouse Hepatic Microsomes after Induction by Acetone

Reaction	Km (mM)		Vmax (pmol/mg/min)	
	Km_1	Km_2	$Vmax_1$	$Vmax_2$
8-Hydroxylation	0.31±0.13 (0.28±0.04)	4.68±0.80 (3.97±0.67)	149±64 (174±55)	2500±410 b) (1340±219)
3-Demethylation	0.20±0.09 (0.19±0.06)	4.52±1.54 (3.65±0.45)	64±20 (51±19)	429± 89 (428± 74)
1-Demethylation	— a)	3.71±0.08 (4.07±0.74)	— a)	173± 28 (176± 35)

The values of Km and Vmax were determined according to Michaelis-Menten equation described in the text. Each value represents the mean ± SD of five animals. The parameter values of control groups are described in parentheses. The control mice received drinking water alone instead of 1% acetone. a) Not detected. b) Significantly different from control ($p<0.05$, Tukey's test).

アセトン投与後におけるテオフィリン代謝以外の薬物代謝酵素活性の変動の様相をあわせて検討した。Fig. 11 に示すように、アミノピリンN-脱メチル化酵素活性およびペントキシレゾルフィンO-脱アルキル化酵素活性には変動を認めなかったが、ほとんど専らCYP2Eによって触媒されている *p*-ニトロフェノール水酸化活性（58）はおよそ２倍に上昇した。

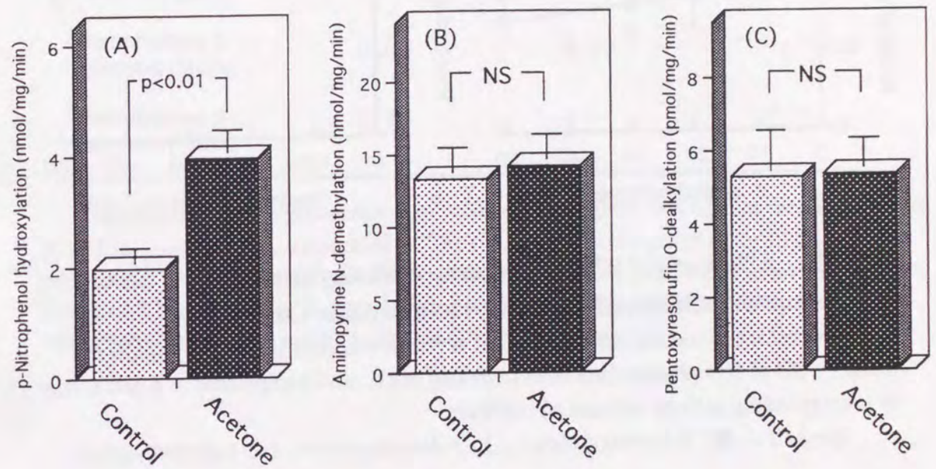

Fig. 11. Inducibility of *p*-Nitrophenol Hydroxylation (A), Aminopyrine N-Demethylation (B) and Pentoxyresorufin O-Dealkylation (C) by Acetone

Each column represents the mean ± SD of the enzyme activities of five experiments. Statistical comparison was made by unpaired *t*-test. NS, not significant

第四節　CYP2E阻害剤に対するテオフィリン代謝酵素活性の感受性

CYP2Eに対する選択的阻害剤である４-メチルピラゾールあるいはアミノアセトニトリル（47）の共存下で基質濃度 5 mM にてテオフィリン代謝反応を行い、各酵素活性の阻害感受性を比較したところ、Fig. 12 に表わすように、８-水酸化反応はこれらの阻害剤によって濃度依存的に抑制された。これとは対照的に、２つのN-脱メチル化反応ではそれらの活性に低下はほとんど認められず、阻害抵抗性を示すことが明らかとなった。

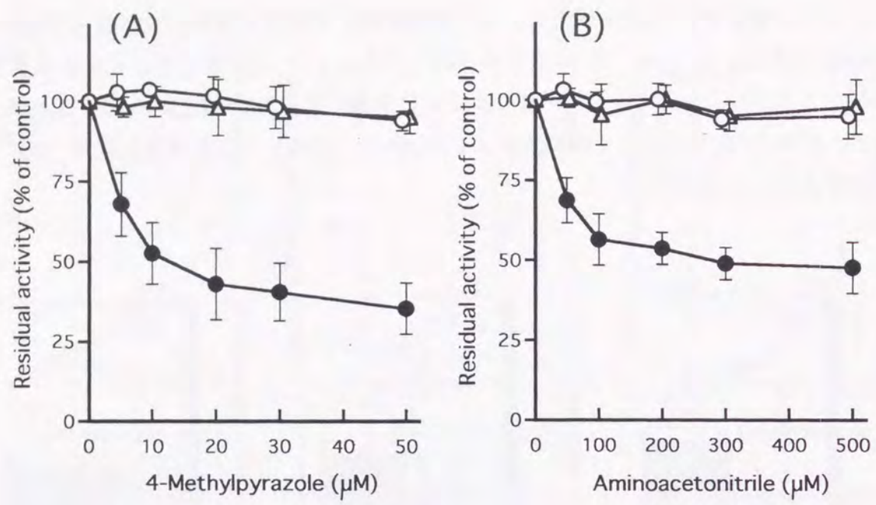

Fig. 12. Effect of CYP2E Inhibitors, 4-Methylpyrazole (A) and Aminoacetonitorile (B), on Theophylline Oxidations

The substrste concentration was fixed at 5 mM theophylline. Each point is the mean ± SD of five preparations from untreated mice, and is expressed as a percentage of corresponding activity without an inhibitor.

Symbols: ●, 8-hydroxylation; ○, 3-demethylation; △, 1-demethylation

第五節　テオフィリン代謝と *p*-ニトロフェノール水酸化反応との関連性

テオフィリンの各代謝酵素および *p*-ニトロフェノール水酸化酵素の相互の関連性を検索する目的で、無処置肝ミクロソームにおける各酵素活性の相関性を比較した。なお、前節と同様にテオフィリン濃度は5 mM に設定した。Table 7 に示すように、実測されたそれぞれの酵素活性は比較的狭い範囲に分散しており、統計学的有意性が論じがたい条件ではあったが、テオフィリン８-水酸化酵素活性と *p*-ニトロフェノール水酸化酵素活性の間には有意な正の相関が認められた。しかし、テオフィリンN-脱メチル化酵素活性の *p*-ニトロフェノール水酸化酵素活性に対する相関は見られなかった。一方、テオフィリンの１-および３-脱メチル化酵素活性間の相関性はきわめて良好であることが判明した。

Table 7. Relationship of Metabolic Activities Among Theophylline Oxidations and *p*-Nitrophenol Hydroxylation in Untreated Hepatic Microsomes

	Correlation coefficient (*r*)		
	8-Hydroxylation	3-Demethylation	1-Demethylation
p-Nitrophenol hydroxylation	0.73 [a)]	0.11	0.09
Theophylline 1-demethylation	0.07	0.83 [a)]	——
Theophylline 3-demethylation	0.10	——	——

The Enzyme reaction proceeded at substrate concentrations of 5 mM for theophylline and 50 μM for *p*-nitrophenol, respectively. The ***r*** values were computed using 18 microsomal preparations. *p*-Nitrophenol hydroxylase activity ranged from 1.41 to 2.43 nmol/mg/min. Activities of 8-hydroxylation, 3-demethylation were in the range of 690 to 1220 pmol/mg/min, 195 to 365 pmol/mg/min and 64 to 112 pmol/mg/min, respectively. a) $p<0.05$.

P-450への親和性や活性抑制強度など阻害特性がさまざまな薬剤の共存下でテオフィリン代謝酵素活性と *p*-ニトロフェノール水酸化酵素活性を測定し、両者の阻害挙動を比較検討した。酵素反応はテオフィリン濃度を 5 mM および *p*-ニトロフェノール濃度を 50 μM として行なった。すなわち、*p*-ニトロフェノール水酸化酵素活性のKm値（27 μM であることをあらかじめ算出した）とこの阻害実験で用いた基質濃度との比が、テオフィリン代謝に関する比（Km_2値/基質濃度）とほぼ同じようになるように設定した。

Fig. 13 に示すように、テオフィリン８-水酸化酵素活性とN-脱メチル化酵素活性との間に顕著な相違が認められた。８-水酸化酵素活性の阻害感受性はその阻害剤の種類によらず *p*-ニトロフェノール水酸化活性のそれと概ね一致するものであった。しかし、N-脱メチル化酵素活性は *p*-ニトロフェノール水酸化活性とは大きくかけ離れた修飾を受けた。一方、図には示していないが、１-および３-脱メチル化反応は互いにきわめて類似した阻害挙動を呈した。

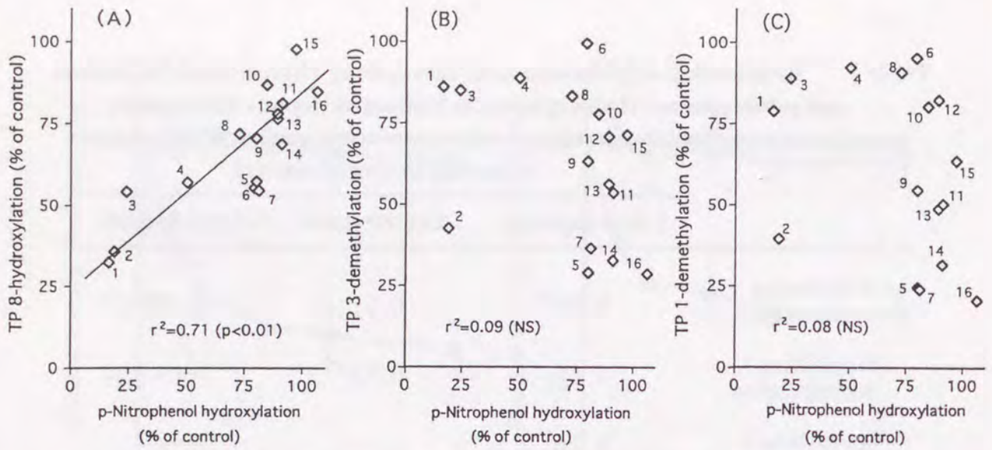

Fig. 13. Relative Change in Enzyme Activities of 8-Hydroxylation (A), 3-Demethylation (B) and 1-Demethylation (C) of Theophylline Compared with That of *p*-Nitrophenol Hydroxylation in the Presence of P-450 Inhibitors

The enzyme reaction proceeded at substrate concentrations of 5 mM for theophylline and 50 μM of *p*-nitrophenol. The concentration of the inhibitors was fixed at 100 μM. Each point is the mean of 4 - 6 experiments, and expressed as the remainder of activities in the absence of inhibitors. NS, not significant.

Inhibitors : 1, 4-methylpyrazole; 2, diethyldithiocarbamate; 3, aniline; 4, coumarin; 5, proadifen; 6, aminoacetonitrile; 7, ticlopidine; 8, mexiletine; 9, diphenhydramine;10, verapamil; 11, metyrapone; 12, propranolol; 13, orphenadrine; 14, propafenone; 15, cimetidine; 16, fluconazole

第六節　考察および小括

マウス肝ミクロソームのテオフィリン代謝に関与する high capacity P-450群に焦点をあてて精査したところ、８-水酸化酵素はCYP2Eと一致した酵素学的挙動を示したが、N-脱メチル化酵素とは明確な相違が認められた。８-水酸化反応のみにCYP2Eの寄与を支持する主たる理由は、本活性のみがアセトンの暴露によって上昇したこと、そして、特異的CYP2E阻害剤によって選択的に抑制されたことである。

アセトンは、CYP2E酵素タンパクあるいは対応するmRNAを安定化させることで相対的に肝CYP2Eレベルを高めるとされている（59, 60）。しかしこの薬物は、摂取量と暴露期間によっては転写段階での活性化作用も発揮し、フェノバルビタールと同じ機構でCYP2Bの生合成を制御することが報告されている（61）。しかし、今回のアセトン投与プロトコールでは、CYP2Bが関与するペントキシレゾルフィンO-脱アルキル化酵素活性（62, 63）などが不変であったことからCYP2Bの誘導が惹起された可能性は否定できた。 High capacity P-450群が担うテオフィリン８-水酸化活性はアセトン

投与によっておよそ２倍に上昇し、これが *p*-ニトロフェノール水酸化活性の上昇と一致することが速度論的に解析することで明白となり、CYP2Eである可能性が強く示唆された。

テオフィリン８-水酸化酵素活性と *p*-ニトロフェノール水酸化活性は非誘導時の肝ミクロソームを用いても有意な相関性が認められたこと、さらに、種々の薬剤による阻害感受性が両代謝酵素間で類似していたことは、上記の推論を立証するものであると考えられる。ここで採用した基質濃度は、それぞれの代謝反応におけるKm値と近似するように設定しているので、阻害剤による阻害様式が拮抗・非拮抗あるいは不拮抗などいずれの機序に基づくとしても、共通した酵素であれば同程度の抑制がもたらされるとの理論が成立するからである。一方、２つのテオフィリンN-脱メチル化活性は数々の点でそれらの酵素学的反応性が極似することから、CYP2Eには属さないが同一もしくは密接に関連するP-450分子種によって触媒されているのであろう。

CYP2Eは、有機溶媒類やニトロソアミンなどの低分子化合物に対し良好な基質として作用することが知られているが（41）、近年、クロルゾキサゾンなどのテオフィリンに類した混成環状構造を有する薬物もCYP2Eによって酸化的に代謝されることが *in vitro*で証明されており（64）、同様な事実が臨床上でも認められている（65）。これらの知見はCYP2Eの基質特異性は必ずしも高くないことを意味しているが、ヒトにおいて、テオフィリン８-水酸化代謝にCYP2Eが実際にどの程度関与しているかについては明確にされていない。Guら（66）は、いくつかのヒトP-450発現細胞系を用いて基質濃度 1 mMで代謝反応を行なったところ、CYP2E1はテオフィリン８-水酸化活性を有するが CYP1A2と比較してその役割は低いと報告している。一方、Sarkarら（23）は、ヒト肝ミクロソームにおける基質濃度 20 mMでのテオフィリン８-水酸化活性は免疫化学的に検出されたCYP2E1含量と有意に相関し、CYP1A2含量との関連性はないとしている。これらの矛盾は、それぞれの実験で用いられた基質濃度の20 倍の差に起因していると考えられ、CYP2Eの真の代謝能を評価するためには、特に、最も代謝クリアランスの高い８-水酸化反応の速度論的解析が必須であることを示している。今回マウスで得られた結果を直接ヒトに外挿することは危険を伴うが、CYP2Eが動物種をこえて相同性の高いP-450分子種であること（47）を考慮すると、ヒトのテオフィリン代謝の酵素化学的解析には十分応用が可能であり、速度論を念頭に置いた今後の研究の発展が期待される。

以上、本章では、マウス肝ミクロソームのテオフィリン８-水酸化反応をつかさどるhigh capacity P-450分子種はCYP2Eに相当し、N-脱メチル化反応に関与するP-450分子種とは本質的に異なることを明らかにした。

第四章　ヒトのテオフィリン代謝に対するフルコナゾールの阻害作用の有無と本代謝系に関与するチトクロムP-450との関連性

第一節　序

近年、深在性真菌症の罹患者数は世界的に増加の一途をたどり、その趨勢を止めるべく有用な薬剤の開発が積極的に模索されてきた。フルコナゾール（Fig. 14）は、いわゆる第二世代と言うべきトリアゾール誘導体の抗真菌剤で、現在、呼吸器真菌症をはじめとする多彩な日和見真菌感染症の治療に広く用いられている（67 - 69）。本剤は、真菌細胞膜に存在するP-450（ステロール-14-脱メチル化酵素）を作用標的とし、ラノステロールからエルゴステロールへの生合成を阻止して細胞膜異常を誘発することで真菌を死滅させ、結果としてその主たる薬理作用を発現する（70）。

フルコナゾールは、シクロスポリン（71）、フェニトイン（72, 73）およびテルフェナジン（74）など、いくつかの併用薬剤の血清中濃度を顕著に上昇させることが臨床上で認められている。これらの知見は、フルコナゾールの酵素阻害作用は真菌のP-450のみならず宿主であるヒト肝ミクロソームのP-450にも及ぶことを示唆しているものと考えられることから、それをさらに明確にする必要がある。

一方、テオフィリンは治療有効血清中濃度域が狭く（10）、他剤との併用によりテオフィリンに代謝阻害が起こればその体内濃度が上昇し、重篤な副作用を招く危険性がある。事実、テオフィリンはさまざまな要因でその代謝クリアランスに変動を生じ易いことが知られており、薬理効果の減弱あるいは毒性の出現に至った臨床例が数多く報告されている（24）。したがって、フルコナゾールのP-450阻害作用およびテオフィリン体内動態におよぼす影響を検証することは、臨床薬理学的に重要のみならず *in vivo* でのテオフィリン代謝に関与するP-450種の推定に有用な指標となる。

本章では、ヒトにおいて、フルコナゾールの酸化的薬物代謝酵素阻害作用をより明確にするとともに、本剤併用時のテオフィリン体内動態変動を薬物動態学的に解析し、テオフィリン代謝酵素の阻害感受性を精査した。

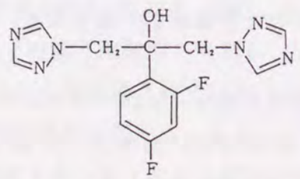

Fig. 14. Chemical Structure of Fluconazole

第二節　コルチゾールの６β-水酸化代謝能におよぼすフルコナゾールの影響

ヒトの酸化的薬物代謝能を包括的に評価する手段として、内因性コルチゾール（F）とその酸化的代謝物である 6β-ヒドロキシコルチゾール（6β-OHF）の尿中排泄量の比（6β-OHF/F）を、生体に対して非侵襲的に測定する方法が知られており（75）、酵素誘導ならびに酵素阻害の研究に広く応用されている（75 - 79）。F分泌量には日内変動が知られており、尿中6β-OHF排泄量もそれに呼応して変化するが、Fとの比として表わす限り日内変動に由来するバラツキは補正され、任意の時間帯の採尿試料であってもほぼ一定の値を示すことが明らかにされている（75）。

健康成人５名に１日200 mgのフルコナゾールを連続経口投与したところ、Fig. 15に示すように、6β-OHF/F比は経日的に減少し、投与開始３日目にはその比は服用前の50 %以下にまで低下した。また、服用を中止しても元の値に回復するまで約１週間を要した。これらの結果は、フルコナゾールはヒトの酸化的薬物代謝能に対して強力かつ持続的な抑制作用を有することを示している。

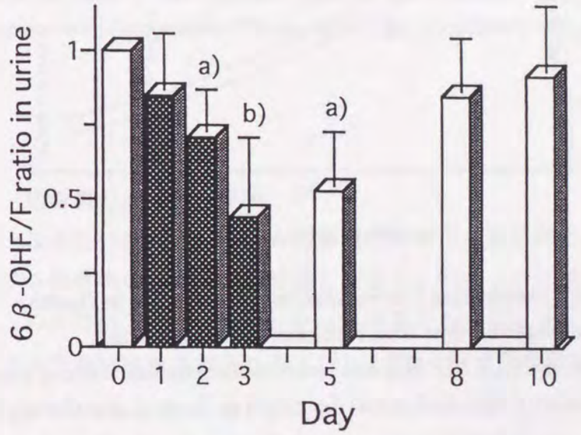

Fig. 15. Change in the Ratio of 6β-Hydroxycortisol to Cortisol in Urine Obtained from 5 Healthy Subjects Following Fluconazole Administration

The ordinate shows the percentage to the ratio on day 0 in each subject. Shaded columns indicate the values during fluconazole administration. Each column represents the mean ± SD. a) Significantly different from day 0 ($p < 0.05$, paired *t*-test). b) Significantly different from day 0 ($p < 0.01$, paired *t*-test).

第三節　テオフィリン代謝能におよぼすフルコナゾールの影響

ヒトにおけるテオフィリンの酸化的薬物代謝能に対するフルコナゾールの阻害力を評価するに際し、テオフィリン代謝を抑制することが臨床上すでに知られているピリドンカルボン酸系合成抗菌剤・エノキサシン（80）を対照薬剤として検討した。

テオフィリンの血清中濃度推移

健康成人５名を被験対象とし、フルコナゾールあるいはエノキサシンの併用時またはこれら薬剤の非併用時における血清中テオフィリンの時間－濃度曲線を Fig. 16として示す。テオフィリンの血清中濃度は、エノキサシンの併用により顕著に上昇したが、フルコナゾールの場合では非併用時での推移と大差は認められなかった。

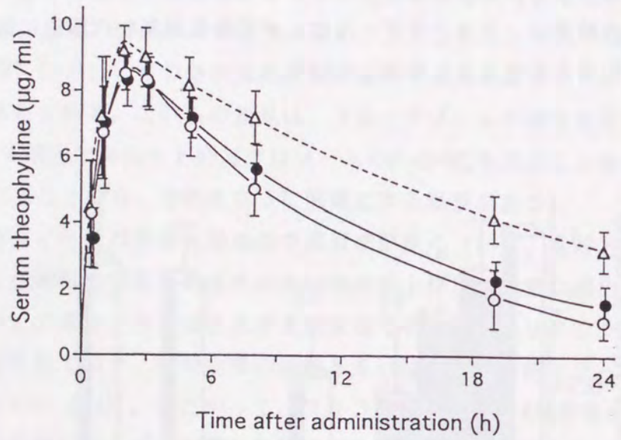

Fig. 16.　Serum Theophylline Concentration-Time Profile in Healthy Subjects in Combination with Fluconazole or Enoxacin

Each point is the mean ± SD. Subjects received theophylline 240 mg alone (○); after 3 days of treatment with fluconazole 200 mg daily (●) or enoxacin 600 mg daily (△).

未変化体テオフィリンの尿中排泄挙動

フルコナゾールあるいはエノキサシンの併用時の24時間までの未変化体テオフィリンの累積尿中排泄量を、非併用時の場合と比較し Fig. 17 に示す。

エノキサシン服用時には、28.3 ± 3.5 mg から 39.5 ± 2.9 mg へ有意に増加した。一方、フルコナゾールの併用時と非併用時では、未変化体テオフィリンの回収率に全く変動は見られなかった。

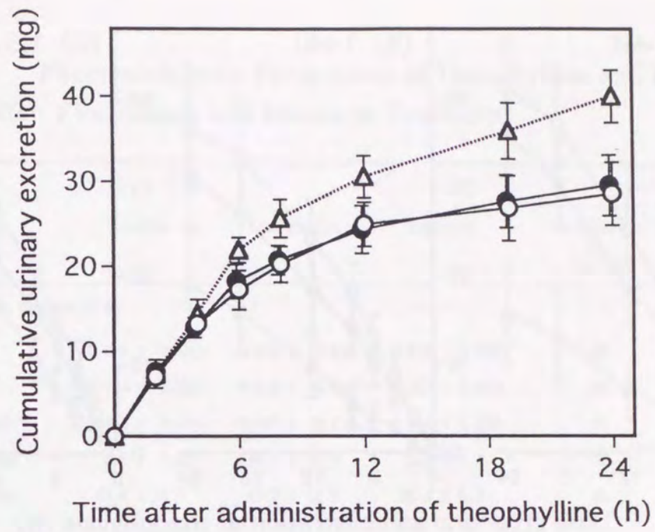

Fig. 17.　Cumulative Urinary Recovery of Unchanged Theophylline

Each point is the mean ± SD. Subjects received theophylline 240 mg alone (○); after 3 days of treatment with fluconazole 200 mg daily (●) or enoxacin 600 mg daily (△).

各テオフィリン代謝物の尿中排泄挙動

フルコナゾールあるいはエノキサシンの併用時および非併用時での24時間までの３種のテオフィリン代謝物の累積尿中排泄量を定量し、Fig. 18 に示す。

エノキサシンの併用時では、1-MX, 1-MU（肝細胞質のキサンチンオキシダーゼによって1-MXからすみやかに産生される）および1,3-DMUの尿中回収量は、それぞれ 29.4 ± 3.8 mg から 10.2 ± 4.1 mg に、36.0 ± 7.1 mg から 19.2 ± 7.4 mg に、そして 97.5 ± 12.6 mg から 74.8 ± 8.4 mg に減少し、その低下率は 35 - 70 %にまでおよんだ。これに対してフルコナゾール併用時には、代謝物尿中排泄抑制率はエノキサシンのそれに比べると明らかに小さく、わずか15 %前後にとどまり、テオフィリン単独服用時との間に有意差は認めなかった。

なお、いずれの場合も24時間尿量に差異は認めなかった。

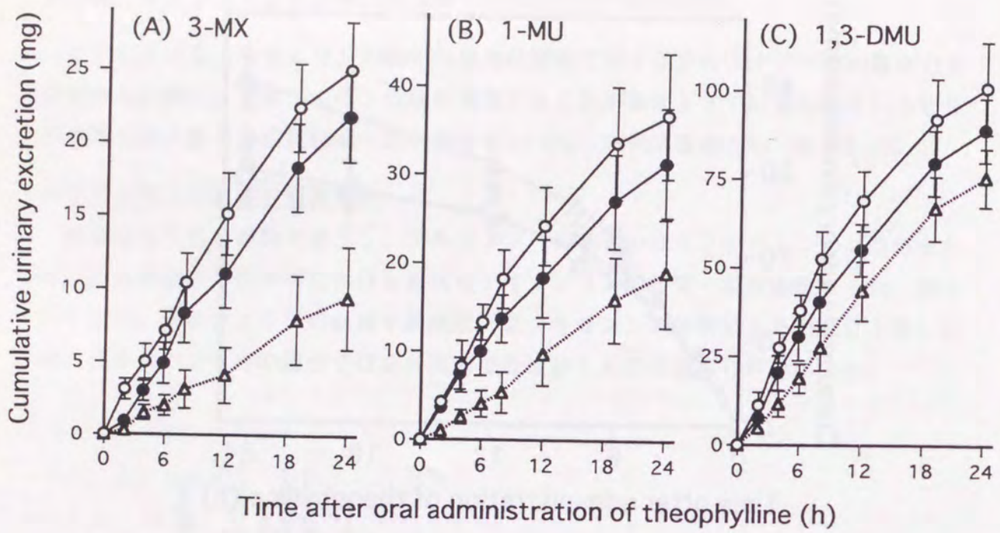

Fig. 18. Cumulative Urinary Excretion of Theophylline Metabolites

Each point is the mean ± SD. Subjects received theophylline 240 mg alone (○); after 3 days of treatment with fluconazole 200 mg daily (●) or enoxacin 600 mg daily (△).

薬物動態学的パラメータの変動

前項の結果をより定量化するため、フルコナゾールあるいはエノキサシンの併用による種々の薬物動態学的パラメータの変動を解析した。その結果をTable 8 として要約する。エノキサシン併用時には、血漿タンパク結合率や組織移行性の指標となる分布容積（V_d）および薬物排泄能を表わす腎クリアランス（CL_R）は有意に変動せず、消失速度定数（K_{el}）、全身クリアランス（CL_T）および肝クリアランス（CL_M）などの代謝能に関連するパラメータに有意な低下が認められた。また、代謝物生成クリアランスのうち、$CL_{1\text{-}MU}$および $CL_{3\text{-}MX}$の低下は特に顕著であった。しかし、フルコナゾールの場合には、V_d やCL_Rを含め、いずれのパラメータにも有意な変動は認められなかった。また、フルコナゾール併用時およびエノキサシン併用時の間で比較すると、$CL_{1,3\text{-}DMU}$を除くすべての代謝関連パラメータに有意差が認められた。

Table 8. Pharmacokinetic Parameters of Theophylline and Its Metabolites after Fluconazole and Enoxacin Treatment

Parameter	Control	Fluconazole	Enoxacin	Significance (P)		
				Fluconazole vs Control	Enoxacin vs Control	Fluconazole vs Enoxacin
Theophylline disposition						
V_d (l/Kg)	0.496 ± 0.051	0.518 ± 0.036	0.516 ± 0.070	NS	NS	NS
K_{el} (1/h)	0.114 ± 0.025	0.092 ± 0.022	0.057 ± 0.013	NS	<0.05	<0.05
CL_T (l/h/kg)	0.056 ± 0.014	0.047 ± 0.016	0.030 ± 0.009	NS	<0.05	<0.05
CL_R (ml/h/kg)	6.8 ± 1.2	6.1 ± 1.3	5.4 ± 1.4	NS	NS	NS
CL_M (ml/h/kg)	49.8 ± 11.7	41.7 ± 12.3	25.4 ± 6.9	NS	<0.05	<0.05
Partial metabolic clearance						
$CL_{3\text{-}MX}$ (ml/h/kg)	8.0 ± 2.5	6.6 ± 2.2	2.5 ± 1.3	NS	<0.05	<0.05
$CL_{1\text{-}MU}$ (ml/h/kg)	11.6 ± 4.5	9.6 ± 3.8	4.7 ± 2.6	NS	<0.05	<0.05
$CL_{1,3\text{-}DMU}$ (ml/h/kg)	30.2 ± 5.1	25.6 ± 6.7	18.6 ± 2.5	NS	<0.05	NS

Each value is the mean ± SD. Statistic comparison was made by ANOVA followed by Dunnett's test. NS, not significant.

第四節　考察および小括

副腎から分泌されたFの一部は未変化体のままで、また一部は肝ミクロソームのP-450によって6β-OHFへと酸化的に変換され、抱合反応を受けることなく尿中に排泄される（81）。したがって、分泌されたコルチゾール(F)の総量のうちヒドロキシコルチゾール(6β-OHF)へ代謝された比率をあらわす尿中 6β-OHF/F比は、肝ミクロソームのP-450活性状態を端的に反映するものであり、ヒトのP-450を構成する主要分子種であるCYP3A活性と高い相関性があると言われている（78）。

哺乳動物の肝P-450へのフルコナゾールの親和性は真菌P-450に対するそれに比較し

て低いとされている（82）。しかし、P-450全般に対するフルコナゾールの阻害作用は、その構造中のトリアゾール基の窒素原子がP-450のヘム鉄に配位する共通の機序によって発現することから（83）、実際には本剤によって酸化的薬物代謝能はかなり抑制されるようであり、これの服用後に認められた6β-OHF/F比の顕著な低下は、主としてCYP3A活性が強力に阻害されたことによるものと考えられる。また、投与を中止しても6β-OHF/F比はすみやかに回復せず低いレベルのままで留まっていたのは、フルコナゾールの血漿タンパク結合率は低く遊離型濃度が総濃度のおよそ90 %に達するとの血中分布特性（84）に加え、その長い体内消失半減期，約 30時間（85），にある程度起因していると考えられる。

一方、テオフィリン代謝に対するフルコナゾールの影響は、予期に反して著しく弱いことがエノキサシンとの比較を通して明らかとなった。テオフィリンは投与量の90 %近くが代謝過程で消失し、未変化体の尿中回収率はわずか 10 %内外である。主要代謝経路は８-水酸化反応であり、投与量の約 50 %が 1,3-DMUとして尿中に排泄される。また、N-脱メチル化反応によって1-MXおよび3-MXが生成されるが、後者はさらに1-MUへと代謝されて 3-MXと共に尿中へ排泄される（12）。これらのテオフィリン代謝挙動の特性を考慮すると、今回いずれの薬剤の併用時にも V_dおよびCL_Rには変動が認められなかったことから、フルコナゾールとエノキサシン間で見られたK_{el}およびCL_Tの変動の相違は、CL_Mの低下率の差異に立脚していると判断される。すなわち、テオフィリンの血中動態から算出されたK_{el}およびCL_Tは、未変化体とその代謝物の尿中排泄推移と連動していたからである。

フルコナゾールの併用時にはテオフィリン代謝能に関連するすべてのパラメータに有意な変動を認めなかったのに対し、エノキサシン併用時ではこれらのすべてに顕著な変動が見いだされた。このことより、フルコナゾールの併用ではテオフィリン体内動態に対して臨床上留意すべき変動をもたらさないと考えることができる。そして同時に、フルコナゾールのP-450阻害作用にはP-450種選択性があり、CYP3Aに対しては高い親和性を有するがテオフィリン代謝に関与するP-450種には弱い阻害作用しか持たないということ、換言すれば、テオフィリン代謝にはCYP3Aはほとんど寄与しないと言えるであろう。

CYP3Aはヒト肝ミクロソームのP-450分子種の中で最も発現量が高く、多種多様な薬物、環境化学物質から内因性ステロイドに到るまで非常に広範な物質の代謝に幅広く機能している(47)。近年、フルコナゾールと同じアゾール系抗真菌剤あるいはエリスロマイシンが併用薬剤の代謝を阻害して血中濃度を高め、中毒あるいは死亡事故につながった事例が相次いで報告された。この現象は、併用薬の代謝に携わるCYP3Aがア

ゾール系抗真菌剤によって強力に阻害されたことによるものと推定されており（86, 87）、薬物相互作用の観点からCYP3Aの薬理学的意義に関して世界的に注目を集めている。その中で、CYP3Aのテオフィリン代謝への関与の有無も議論されており、ヒト肝ミクロソームやP-450発現細胞を用いて基礎的に研究されているが一致した結論が得られていない。一方、臨床面では本代謝系へのCYP3Aの係わりについては肯定的な見解が示されている(88)。これは、CYP3Aの基質となるマクロライド系抗生物質の併用によってテオフィリンクリアランスが低下した臨床所見（24, 89）から論証されたものであり、これらの抗生物質の酸化的代謝過程で生成する中間体がP-450と不活性な複合体を形成するとの分子化学的な証拠を背景としている（90, 91)。しかし、P-450不活化作用がCYP3Aのみに選択的に惹起されるか否かについての明確な結論は出されておらず、テオフィリン体内動態の変動はこれらの抗生物質を高用量かつ長期間にわたって投薬するなどの比較的激しい条件下でのみ観察され、この現象は喫煙習慣で相殺される（93）等、CYP3Aの関与を支持することに対する疑問点も多い。このように、テオフィリン代謝へのCYP3Aの関与の有無については混沌とした状況にもかかわらず、今回、生体においてCYP3Aの積極的な関与を否定するに足る結果を導き出せた意義は大きいと思われる。

テオフィリン代謝速度に大きな個人差を示す要因として、一部に遺伝子多様性の存在が示唆されているが（94），*S*-メフェニトイン水酸化やデブリソキン水酸化代謝に代表されるような正常者と欠損者の二峰性（47）は、テオフィリン代謝には未だ見いだされていないことから、本代謝系にはCYP2CやCYP2Dの関与の可能性も低いと推定される。その一方、第三章において、テオフィリン８-水酸化代謝にCYP2Eが関与する可能性を論述した。事実、これを支持する臨床知見が得られている。すなわち、シメチジンやエノキサシンなどのテオフィリン代謝を阻害する薬物の多くは、８-水酸化よりもむしろN-脱メチル化反応を効率的に阻害することが経験上知られているが（24, 95, 96)、ジスルフィラム服用時には、テオフィリンN-脱メチル化反応に比べ８-水酸化反応がより顕著に抑制されることが認められており(97)、このことがジスルフィラムの還元代謝物がCYP2Eの強力な阻害剤であることと符合するからである（64）。ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤に関しては、CYP2EやCYP3Aに対する阻害作用を示唆する報告がないことから、エノキサシン併用時に確認されたテオフィリン酸化的代謝能の低下はCYP1A活性が阻害されたことに起因すると推論できる。また、フルコナゾールは CYP2Eによって触媒されている *p*-ニトロフェノール水酸化およびテオフィリン８-水酸化に対してほとんど阻害作用を持たないことを肝ミクロソームレベルで明らかにしている（第三章、Fig.13）事実も、*in vivo* におけるテオフィリン代謝への

CYP2Eの関与を裏づける根拠となりえるであろう。

ヒトのテオフィリン代謝に関与するP-450種を特定するにはさらに詳細な検討を必要とするが、今回観察されたフルコナゾールとエノキサシン併用間でのテオフィリン代謝の阻害感受性の差異から判断すると、特に主要代謝経路である８-水酸化反応には、マウスで得られた結果と同様に、CYP1A (CYP1A2) およびCYP2E (CYP2E1) が主として関与すると考えるのが妥当であろう。

以上、本章において、CYP3Aが関与するコルチゾール６β-水酸化代謝に対し、臨床容量のフルコナゾールは強力な阻害作用を有することを明らかにした。しかし、フルコナゾールの酵素阻害作用にはP-450種選択性があり、本剤を併用してもテオフィリンの体内動態はほとんど変動しないことを実証した。また、テオフィリン代謝におけるヒト肝の主要P-450分子種であるCYP3Aの寄与は低く、本代謝系には、CYP1AやCYP2Eといった比較的特殊性のあるP-450分子種が関与していることが推定された。

結　論

気管支拡張剤・テオフィリンの酸化的薬物代謝の様相とそれに関与するP-450の特性について、マウス肝を用いた*in vitro*での検討、および他剤併用時にテオフィリン体内動態がどのような影響を受けるかについてのヒトで実施した*in vivo*での検証を通し、以下に示す知見を得た。

1）固相抽出法を応用したHPLCにより、テオフィリンの３種の代謝物について高精度な定量を可能にし、肝ミクロソームにおけるP-450依存性のテオフィリン代謝酵素活性測定にも利用できることを明らかにした。

2）マウス肝ミクロソームのテオフィリン代謝に関与するP-450について反応速度論的に解析し、high affinity-low capacity および low affinity-high capacity 分子種の存在を明らかにした。そして、前者は従来より知られているCYP1Aに、後者はフェノバルビタール誘導型の分子種にそれぞれ分類されることを示した。

3）Low affinity-high capacity 分子種はさらに複数存在し、８-水酸化反応を触媒するP-450分子種はCYP2Eに属することを示した。

4）抗真菌剤・フルコナゾールはヒトの酸化的薬物代謝能、特に主要P-450分子種であるCYP3Aを強力に阻害するが、テオフィリン代謝に対しては阻害作用をほとんど持たないことを実証した。また、テオフィリン代謝へのCYP3Aの寄与は低く、本代謝系にはCYP1AやCYP2Eなどの別のP-450種の関与が示唆された。

臨床上で見られる薬物相互作用のうち、P-450阻害に基づくものの占める割合がきわめて高いことが明らかにされている。多剤併用療法が主流となった現在、薬物代謝をめぐる相互作用に起因する不測の事態を回避するためには、目的とする薬物の代謝に関与するP-450種の特定や分類の必要性が高まるものと考えられる。

テオフィリンは有効血中濃度域がきわめて狭く、その体内動態はほとんど代謝過程に依存していることから、薬物相互作用に関して最も留意すべき薬剤のひとつである。本研究で得られた結果はテオフィリン代謝に携わる P-450種の特性をより明確にしたものであり、今後のより良い気管支喘息治療のために活用されることを期待したい。

謝　辞

本論文提出の機会を与えていただき、かつ御懇切なる御鞭撻と御教示を賜りました大阪大学薬学部、溝口　正教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただき、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部長　山路　昭教授に謹んで御礼申し上げます。

また、種々の御指導と御鞭撻を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院前薬剤部長島川治巳博士、同前副薬剤部長（現　大津市民病院薬剤科長）小野　彪博士ならびに同試験研究室長　森田邦彦博士に謹んで感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に御理解、御協力を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部　蓑内徳蔵　副部長、星野伸夫　製剤室長、芝田信人博士はじめ滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部の諸氏に深く感謝致します。

実験の部

第一章の実験

1, 試薬および材料

テオフィリン（スタンダードリファレンス用）、1-MX, 3-MX, 1,3-DMUおよびアセトアミノフェンは Sigma社より購入した。その他の試薬、溶媒類はいずれも市販特級品を用いた。Sep-Pak C_{18}カートリッジ（粒子型 55 - 105 μm、充填剤重量 100 mg）は、Waters社より購入した。

2, 肝ミクロソームの調製

ddY系雄性マウス（4 - 6 週齢）をエチルエーテルによる弱い麻酔下で頸椎脱臼により屠殺後開腹し、上大静脈および門脈から等張塩化カリウム溶液を注入して肝臓の脱血を行なった。次いで肝臓を摘出し、氷冷した等張塩化カリウム溶液中でホモジナイズ（容量容積比、1 : 4）した後、10000 × g で 15分間遠心分離した。その上清をさらに105000 × g で 60分間遠心分離し、沈査として得たミクロソーム画分を、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）に懸濁して、タンパク質濃度が 10 mg/ml となるように調製した。これらの一連の操作は、原則として 4 ℃以下で行なった。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準タンパクとして、Lowryらの方法（98）にしたがって定量した。

3, 酵素反応条件

反応溶液は、NADPH再生系（0.5 mM $NADP^+$、5 mM グルコース-6-リン酸、5 mM 塩化マグネシウム、および２国際単位のグルコース-6-リン酸脱水素酵素）、0.2 mM EDTA、1 mM テオフィリン、70 mM リン酸緩衝液（pH 7.4)およびミクロソーム懸濁液（1 mg/ml）をそれぞれ含有し、全量を 1 ml とした。

酵素反応は、NADPH再生系を添加することで開始し、37 ℃で30分間振盪を加えながらインキュベートした。反応は15 % TCA 100 μlを添加することで停止した。

4, 固相抽出の手順

酵素反応終了後の試料にアセトアミノフェン水溶液（50 μg/ml)を100 μl添加し、氷冷下に約10分間放置し除タンパクを促進した。その後、3000 × g で ５分間遠心分離し、得られた上清から 700 μlを分取して、メタノール５ mlと精製水10 mlで処理

することであらかじめ活性化させたSep-Pak C_{18}カートリッジに添加し、精製水 2.5 mlで洗浄後、40 %メタノール 2 mlで必要画分を溶出させた。固相抽出条件を決定するに際しては、3-MX, 1-MXおよび1,3-DMUをそれぞれ1.5 μg/ml、1.5 μg/mlおよび 3 μg/ml の濃度で含有する70 mM リン酸緩衝液を試料とし、Sep-Pak C_{18}カートリッジに添加後に、精製水 1.5 - 10 mlにて洗浄、0 - 100 %の濃度範囲に調製したメタノール溶液で溶出し、各テオフィリン代謝物の回収率を定量した。固相カラムの洗浄および溶出操作はいずれも弱い減圧下で１分以上の時間をかけて実施した。得られた溶出液は37 ℃で減圧乾固し、移動相に再溶解してHPLCシステムへの注入試料とした。

5, HPLC装置とクロマト条件

分析には、Model 7125 シリンジ注入装置（Pheodyne社製）、Model SPD-2ASUV検出器（島津製作所製）および Model C-R2AX クロマトグラムデータ処理装置（島津製作所製）を装着したModel LC-4A HPLC装置を用いた。

分離用カラムは ODS-80T_M（粒子サイズ 5 μm、150 mm × 46 mm *i.d.*、東ソー製）を、移動相は 2.5 mM 硫酸水素テトラ-*n*-ブチルアンモニウム(TBA)と4 %アセトニトリルを含有する25 mM 酢酸緩衝液 (pH5.25)を使用した。移動相の流速は 1 ml/min に設定し、検出波長は275 nm とした。移動相で調製した試料の 15 μlをHPLCシステムに注入し、IS に対する面積比から各テオフィリン代謝物を定量した。

第二章の実験

1, 試薬類

フェノバルビタールナトリウム、β-ナフトフラボン、塩酸ジフェンヒドラミンおよびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムはナカライテスク社より、エリプチシンはSigma社よりそれぞれ購入した。プロアディフェンおよびケトコナゾールは、Smith Kline & French研究所および協和発酵工業より分与された。その他の試薬、溶媒類はいずれも市販特級品を用いた。

2, 各薬物溶液の調製

フェノバルビタールナトリウムおよびβ-ナフトフラボンは、いずれもプロピレングリコールに溶解もしくは懸濁させて調製した。エリプチシンおよびケトコナゾールはいずれも DMSOに溶解させて調製した。

3, マウスへの薬物投与

ddY系雄性マウス（4 - 6 週齢）を少なくとも１週間環境に馴化させて使用した。フェノバルビタールは１日１回 80 mg/kgを３日間連続腹腔内投与した。β-ナフトフラボンは２日目のみに 80 mg/kgを単回投与し、１および３日目には溶剤のみを単回腹腔内投与した。対照群には溶剤のみを同様に投与した。いずれの場合も最終投与の24時間後に屠殺した。

4, 肝ミクロソームの調製と酵素反応

第一章に準拠して行なった。ただし、酵素反応は、テオフィリン濃度 0.1 - 15 mM で行なった。また、IC_{50}値を求める実験においては、各種阻害剤の存在下で実施し、反応溶液に添加するDMSO濃度を一律に 0.1 %とした。

5, 肝ミクロソームの P-450含量の定量

測定には、Model UV-300 ２波長分光光度計（島津製作所製）を用い、Omura and Satoの方法 (99) にしたがって行なった。1 mg/mlに調製したミクロソーム試料にハイドロサルファイトを少量添加し、試料キュベットと対照キュベットにそれぞれ分注し、400 - 500 nm の波長間を走査することによりベースラインを記録した。次に、試料側のみに一酸化炭素を通じ、再び400 - 500 nm の波長間を走査して得られた差スペクトルの 450 nmと490 nmの吸光度の差を測定して、分子吸光係数 91 $mM^{-1}cm^{-1}$からP-450量を算出した。

6, 速度論的パラメータの算出

基質濃度を独立変数、テオフィリン各代謝酵素活性を従属変数として、各種速度論的パラメータ (Km_1,Km_2,$Vmax_1$($V'max_1$)および $Vmax_2$($V'max_2$)) を非線形最小二乗法プログラム MULTI (100) を Model PC-9801VM2 マイクロコンピューター（ＮＥＣ製）にて作動させて求めた。解析時に必要なパラメータの初期値は、実測された酵素活性を Lineweaver-Burkプロットに変換し、見かけ上直線を示す部分を外挿した時の *x* および *y*切片より求めた。測定値の重みづけは数学的に等価とし、残差平方和が変動幅の１％未満に至った時に計算の収束とみなした。

7, 統計処理

一元配置の分散分析 (ANOVA)を行い、続いて Fisher法による検定を実施した。危険率５％未満を有意と判断した。

第三章の実験

1, 試薬類

アセトンおよび *p*-ニトロフェノールはナカライテスク社より、プレグネノロン-16α-カルボニトリルはSigma社よりそれぞれ購入した。プロアディフェンは、Smith Kline & French研究所より、フルコナゾールはファイザー製薬より、塩酸メキシレチンは日本ベーリンガーインゲルハイム社より、塩酸プロプラノロールは住友化学工業より、塩酸チクロピジンは第一製薬よりそれぞれ分与された。その他の試薬、溶媒類はいずれも市販特級品を用いた。

2, 各薬物溶液の調製

フェノバルビタールは生理食塩水に溶解して調製し、プレグネノロン-16α-カルボニトリルはプロピレングリコールに懸濁させて調製した。

3, マウスへの薬物投与

ddY系雄性マウス（4 - 7 週齢）を少なくとも１週間環境に馴化させ、食餌および飲料水は自由に摂取させた。

アセトンは、屠殺するまでの８日間、飲料水に１％の濃度で混ぜて摂取させた。フェノバルビタールおよびプレグネノロン-16α-カルボニトリルは、それぞれ80 mg/kgおよび 50 mg/kgの用量で、１日１回３日間連続腹腔内投与し、最終投与の24時間後に屠殺した。

4, 肝ミクロソームの調製および P-450含量の定量

第一章および第二章に準拠して行なった。

5, 酵素反応条件と測定法

反応溶液は全量 1 ml 中、NADPH再生系、0.2 mM EDTA、70 mM リン酸緩衝液（pH 7.4)ミクロソーム懸濁液（1 mg/ml）および基質（0.13 - 10 mM テオフィリン、15 - 75 μM *p*-ニトロフェノール、5 mM アミノピリン、もしくは 2.5 μM ペントキシレゾルフィン）をそれぞれ含有するものとし、必要に応じて、図の脚注に記す各種阻害剤をいずれも100 μMの濃度で添加した。

酵素反応は、ミクロソーム懸濁液を添加することで開始し、37 ℃で所定時間（テオフィリン各酸化反応は30分間、*p*-ニトロフェノール水酸化反応およびペントキシレゾルフィンO-脱アルキル化反応は 10分間、アミノピリンN-脱メチル化反応は５分間）振盪を加えながらインキュベートした。テオフィリン各酸化反応は15 % TCA 100 μlを、*p*-ニトロフェノール水酸化反応は10 % TCA 300 μlを、アミノピリンN-脱メチル化反応は10 % TCA 1 mlを、また、ペントキシレゾルフィンO-脱アルキル化反応はアセトン 2 mlを、それぞれ添加することにより停止した。

テオフィリンの各代謝酵素活性は第一章に記載した方法により測定した。*p*-ニトロフェノール水酸化酵素活性は、Reinkeらの報告（101）に従い、生成した *p*-ニトロカテコールをアルカリ条件下で比色定量することにより求めた。アミノピリンN-脱メチル化酵素活性は、Nashの方法（102）に従い、遊離したホルムアルデヒド量から算出した。ペントキシレゾルフィンO-脱アルキル化酵素活性は、 Lee and Forkert の手順（57）に従い、生成したレゾルフィンの蛍光強度を測定することにより求めた。各代謝酵素活性と、その反応時間および酵素タンパク濃度との間に直線関係が成立することを確認した。

6, 速度論的パラメータの算出および統計処理

各速度論的パラメータは、第二章に記載した非線形最小二乗法により算出した。群間平均値の比較は、ANOVAに組み合わせたTukey法、または対応のない *t*-検定により実施した。相関性については、Student法による直線回帰分析を行なった。危険率５％未満を有意と判断した。

第四章の実験

1, 投与製剤

いずれも滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部に保管中の市販製剤のうち、試験研究用に分与されたものを用いた。テオフィリン製剤として１錠中 300 mgのアミノフィリン（テオフィリン 240 mgと等価）を含有するネオフィリン™錠を、フルコナゾール製剤として１カプセル中に 100 mgを含有するジフルカン™カプセルを、エノキサシン製剤として１錠中に 200 mgを含有するフルマーク™錠をそれぞれ使用した。

2, 被検者

あらかじめ研究内容について十分な認識をもち、参加に同意した滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部に在籍する薬剤師を被検者とした。全員、試験期間の前後を通して何ら薬物も服用していないこと、また、肝および腎機能に異常のないことを生化学検

査により確認した。

3, 各薬剤の投与法および体液サンプルの採取

コルチゾール6β-水酸化代謝能変動試験

健康成人５名（男性４名と女性１名、年齢 24 - 45 才）に、200 mgのフルコナゾールを１日１回 7:00に、３日間連続投与した。

フルコナゾール投与の前日（０日目)、および投与開始から1, 2, 3, 5, 8, 10日目の 14:00 - 16:00の間に１回採尿した。尿サンプルは6β-OHFおよびＦの分析に供するまで －80 ℃にて凍結保存した。

テオフィリン代謝能変動試験

健康成人５名（男性４名と女性１名、年齢 23 - 35 才）を対象とし、試験期間を通してキサンチンを含有する食物および嗜好品の摂取を禁じた。試験はクロスオーバー法にて実施した。対照群として、13:00（空腹時）にテオフィリン 240 mgを単回経口投与した。併用群として、１日用量 200 mgのフルコナゾールを２回(7:00, 19:00)に分け、または、１日用量 600 mgのエノキサシンを３回(7:00, 15:00, 21:00)に分け、それぞれ３日間連続経口投与した。いずれも、４日目の 7:00に最終投与を行ない、当日の13:00（空腹時）にテオフィリン 240 mgを単回経口投与した。フルコナゾールもしくはエノキサシンの最終投与から次回の試験に至るまで、少なくとも２週間の休薬期間を設けた。

採血時間はテオフィリン投与後 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 19, 24時間とし、肘静脈から１回あたり約 3 mlを抗凝固剤を添加せずに採血した。各血液試料は、採血後30分間室温に放置し、1000 × *g* で５分間遠心分離することにより血清を分取し、テオフィリン濃度測定に供するまで －20 ℃にて凍結保存した。また、採尿時間はテオフィリン投与前および投与後 2, 4, 6, 8, 12, 19, 24時間とし、尿量を測定した後、その一部をテオフィリンおよびその代謝物の濃度測定に供するまで －20 ℃にて凍結保存した。

4, 尿中6β-OHFおよびＦの定量

尿中6β-OHFの定量は、著者らが開発した HPLC法（30）により行なった。尿中Ｆの定量は、尿試料をクロロホルムにて抽出処理を施した後、蛍光偏光免疫測定法（ダイナボット社製、TDX™システムキット）により行なった。

5, 血清中テオフィリン濃度の測定

蛍光偏光免疫測定法（ダイナボット社製、TDX™システムキット）により行なった。

6, 尿中テオフィリンおよびテオフィリン代謝物の定量

Muirらの HPLC法（29）に一部改良を加えて行なった。HPLC装置は、第一章と同様なものを使用した。分離用カラムは Cosmosil $5C_{18}$（150 mm × 46 mm *i.d.*、ナカライテスク社製）を、移動相は 5 mM TBAと10 %メタノールを含有する 10 mM 酢酸緩衝液(pH 4.8)を使用した。移動相の流速は 1 ml/min、検出波長は270 nm に設定し、ISのβ-ヒドロキシエチルテオフィリンに対する面積比からテオフィリン、3-MX、1-MUおよび 1,3-DMUを定量した。検量線の作成には、テオフィリン投与前の各人の尿試料に標準品を段階濃度で添加したものを用い、フルコナゾール、エノキサシンあるいはそれらの代謝物が測定に対し干渉しないことをあらかじめ確認した。

7, テオフィリンの動態学的パラメータの算出

１次吸収過程をもつワンコンパートメントモデルを組み入れた非線形最小二乗法プログラム MULTI (98)を用い、K_{el}および腎排泄速度定数(K_{cr})を算出した。血中薬物濃度（*y*軸）・時間（*x*軸）の曲線下面積（$AUC_{0\to\infty}$）は、24時間目までは台形法により、それ以降は24時間値のK_{el}に対する比を用いて無限大時間まで外挿することにより求めた。CL_TおよびV_dは、テオフィリンの生物学的利用率を100 %とみなし、次式により算出した。

$$CL_T = Dose/AUC_{0\to\infty}$$

$$V_d = CL_T/K_{el}$$

CL_Rおよび CL_Mは以下の算式にしたがって求めた。

$$CL_R = K_{cr} \cdot V_d$$

$$CL_M = CL_T - CL_M$$

$CL_{3\text{-}MX}$、$CL_{1\text{-}MU}$および$CL_{1,3\text{-}DMU}$は、$f_i \cdot CL_M$として算出した。ここで、f_iは代謝物の全回収量に占める当該代謝物回収量の割合と定義し、代謝物尿中排泄量はテオフィリンとの等価性を保つためにモル単位で表わした。

8, 統計処理

ANOVAに組み合わせたDunnett法、または対応のある *t*-検定により実施した。危険率５％未満を有意と判断した。

引用文献

1) Herrmann, G., Aynesworth M.B., Martin, J., *J. Lab. Clin. Med.*, 23, 135 (1937).

2) Maselli, R., Casal, G.L., Ellis, E.F., *J. Pediatr.*, 76, 777 (1970).

3) Hendeles, L., Weinberger, M., *Pharmacotherapy*, 3, 2 (1983).

4) 浅井貞宏、 *Ther. Res.*, 15, 273 (1994).

5) Amer, M.S., Kreighbaum, W.E., *J. Pharm. Sci.*, 64, 1 (1975).

6) Mann, J.S., Holgate, S.T., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 19, 685 (1985).

7) Cushley, M.J., Tattersfield, A.E., Holgate, S.T., *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 129, 380 (1986).

8) Higbee, M.D., Kumar, M., Galant, S.P., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 70, 377 (1982).

9) Lichtenstein, L.M., Margolis, S., *Science*, 161, 902 (1968).

10) 石崎高志、鈴木洋通、*治療*、61, 99 (1979).

11) Mitenko, P.A., Ogilvie, R.I., *N. Engl. J. Med.*, 289, 600 (1973).

12) Ogilvie, R.I., *Clin. Pharmacokinet.*, 3, 267 (1978).

13) Hendeles, L., Weinberger, M., Johnson, G., *Clin. Pharmacokinet.*, 3, 294 (1978).

14) 厚生省保険局発令　第25号　(1994).

15) Grygiel, J.J., Birkett, D.J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 28, 456 (1980).

16) Robson, R.A., Matthews, A.P., Miners, J.O., McManus, M.E., Meyer, U.A., Hall, P. de la M., Birkett, D.J., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 24, 293 (1987).

17) McManus, M.E., Miners, J.O., Gregor, D., Stupans, I., Birkett, D.J., *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 388 (1988).

18) Robson, R.A., Miners, J.O., Matthews, A.P., Stupans, I., Meller, D., McManus, M.E., Birkett, D.J., *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1651 (1988).

19) Grygiel, J.J., Birkett, D.J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 30, 491 (1981).

20) Kappas, A., Anderson, K.E., Conney A.H., Alvares, A.P., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 20, 643 (1976).

21) Williams, J.F., Lowitt, S., Szentivanyi, A., *Biochem. Pharmacol.*, 28, 2935 (1979).

22) Betlach, C.J., Tozer, T.N., *Drug Metab. Dispos.*, 8, 271 (1980).

23) Sarkar, M.A., Hunt, C., Guzelian, P.S., Karnes, H.T., *Drug Metab. Dispos.*, 20, 31 (1992).

24) Upton, R.A., *Clin. Pharmacokinet.*, 20, 66 (1991); *idem.*, *ibid.*, 20, 135 (1991).

25) Lohmann, S.M., Miech, R.P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 196, 213 (1976).

26) Hemsworth, T.C., Renton, K.W., *J. Pharm. Sci.*, 71, 712 (1982).

27) Campbell, M.E., Grant, D.M., Inaba, T., Kalow, W., *Drug Metab. Dispos.*, 15, 237 (1987).

28) Sarkar, M., Polk, R.E., Guzelian, P.S., Hunt, C., Karnes, H.T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 594 (1990).

29) Muir, K.T., Jonkman, J.H.G., Tang, D.-S., Kunitani, M., Riegelman, S., *J. Chromatogr.*, 221, 85 (1980).

30) Ono, T., Tanida, K., Shibata, H., Konishi, H., Shimakawa, H., *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 2522 (1986).

31) Coutant, J.E., Westmark, P.A., Nardella, P.A., Marcwalter, S., Okerholm, R.A., *J. Chromatogr.*, 570, 139 (1991).

32) Ingwersen, S.H., *Biomed. Chromatogr.*, 7, 166 (1993).

33) Betlach, C.J., Tozer, T.N., *Drug Metab. Dispos.*, 8, 268 (1980).

34) Guengerich. F.P., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 25, 97 (1990).

35) Boobis, A.R., Kahn, G.C., Whyte, C., Brodie, M.J., Davies, D.S., *Biochem. Pharmacol.*, 30, 2451 (1981).

36) Akaike, H., *Math. Sci.*, 5, 9 (1976).

37) Guengerich, F.P., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V., Kaminsky, L.S., *Biochemistry*, 21, 6019 (1982).

38) Lesca, P., Rafidinarivo, E., Lecointe, P., Mansuy, D., *Chem.-Biol. Interactions*, 24, 189 (1979).

39) Murray, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 262, 381 (1988).

40) Bast, A., Valk, A.J., Timmerman, H., *Agents Actions*, 30, 161 (1990).

41) Guengerich, F.P., Kim, D.-H., Iwasaki, M., *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 168 (1991).

42) Morita, K., Ono, T., Shimakawa, H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, 11, 106 (1988).

43) Gonzalez, F.J., Idle, J.R., *Clin. Pharmacokinet.*, 26, 59 (1994).

44) 堀尾武一、山下仁平、蛋白質・酵素の基礎実験法、南江堂、p 383 - 408

45) Ioannides, C., Parke, D.V., *Biochem. Pharmacol.*, 36, 4197 (1987).

46) Lewis, D.F.V., Ioannides, C., Parke, D.V., *Biochem. Pharmacol.*, 35, 2179 (1986).

47) 島田　力、*衛生化学*、38, 209 (1992).

48) Gonzalez, F.J., *Pharmacol. Rev.*, 40, 243 (1989); *idem.*, *Pharmacol. Ther.*, 45, 1 (1990).

49) Landay, R.A., Gonzalez, M.A., Taylor, J.C., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 62, 27 (1978).

50) Marquis, J.-F., Carruthers, S.G., Spence, J.D., Brownstone, Y.S., Toogood, J.H., *N. Engl. J. Med.*, 307, 1189 (1982).

51) Powell-Jackson, P.R., Jamieson, A.P., Gray, B.J., Moxham, J., Williams, R., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 131, 939 (1985).

52) 北川晴雄、花野　学　編集、薬物代謝・薬物速度論、p 98 - 107 (1985).

53) 飯田成宇、林　公子、安部恵子、佐藤朋以、井口富夫、*基礎と臨床*、14, 3767 (1980).

54) Elshourbagy, N.A., Guzelian, P.S., *J. Biol. Chem.*, 255, 1279 (1980).

55) Honkakoski, P., Autio. S., Juvonen, R., Raunio, H., Gelboin, H.V., Park, S.S., Pelkonen, O., Lang, M.A,. *Arch. Biochem. Biophys.*, 267, 589 (1988).

56) Hyland, R., Gescher, A., Thummel, K., Schiller, C., Jheeta, P., Mynett, K., Smith, A.W., Mraz, J., *Mol. Pharmacol.*, 41, 259 (1991).

57) Lee, R.P., Forkert, P.-G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270, 371 (1994).

58) Koop, D.R., *Mol. Pharmacol.*, 29, 399 (1986).

59) Song, B.-J., Veech, R.L., Park, S.S., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., *J. Biol. Chem.*, 264, 3568 (1989).

60) Kim, S.G., Shehin, S.E., States, J.C., Novak, R.F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 767 (1990).

61) Johansson, I., Ekström, G., Scholte, B., Puzycki, D., Jörnvall, H., Ingelman-Sundberg, M., *Biochemistry*, 27, 1925 (1988).

62) Burke, M.D., Thompson, S.T., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T., *Biochem. Pharmacol.*, 34, 3337 (1985).

63) Lubet, R.A., Mayer, R.T., Cameron, J.W., Nims, R.W., Burke, M.D., Wolff, T., Guengerich, F.P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 43 (1985).

64) Peter, R., Böcker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Yang, C.S., *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 565 (1990).

65) Kharasch, E.D., Thummel, K.E., Mhyre, J., Lillibridge, J.H., *Clin. Pharmacol.* Ther., 53, 643 (1993).

66) Gu, L., Gonzalez F.J., Kalow, W., Tang, B.K., *Pharmacogenetics*, 2, 73 (1992).

67) Dismukes, W., *Ann. Intern. Med.*, 109, 177 (1988).

68) Grant, S.M., Clissold, S.P., *Drugs*, 39, 877 (1990).

69) Kowalsky, S.F., Dixon, D.M., *Clin. Pharm.*, 10, 179 (1991).

70) 山口英世、内田勝久、川崎賢二、松永敏幸、*Jpn. J. Antibiotics*, 42, 1 (1989).

71) Canafax, D.M., Graves, N.M., Hilligoss, B.C., Gardner, M.J., Matas, A.J., *Transplant. Proc.*, 23, 1041 (1991).

72) Blum, R.A., Wilton, J.H., Hilligoss, D.M., Gardner, M.J., Henry, E.B., Harrison, N.J., Schentag, J.J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 49, 420 (1991).

73) Touchette, M.A., Chandrasekar, P.H., Milad, M.A., Edwards, D.J., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 34, 75 (1992).

74) Honig, P.K., Wortham, D.C., Zamani, K., Mullin, J.C., Conner, D.P., Cantilena, L.R., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 53, 630 (1993).

75) Saenger, P., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 34, 818 (1983).

76) Ohnhaus, E.E., Breckenridge, A.M., Park, B.K., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 36, 39 (1989).

77) Morita, K., Yamakawa, M., Minouchi, T., Hayashi, Y., Konishi, H., Ono, T., Shimakawa, H., *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 3351 (1989).

78) Ged, C., Rouillon, J.M., Pichard, L., Combalbert, J., Bressot, N., Bories, P., Michel, H. Beaune, P., Maurel., P., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 28, 373 (1989).

79) Hunt, C.M., Watkins, P.B., Saenger, P., Stave, G.M., Barlascini, N., Watlington, C.O., Wright, Jr., J.T., Guzelian, P.S., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 51, 18 (1992).

80) Beckmann, J., Elsäßer, W., Gundert-Remy U., Hertrampf, R., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 33, 161 (1987).

81) Ohnhaus, E.E., Park, B.K., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 15, 139 (1979).

82) 森田達也、野沢義則、*真菌誌*、27, 190 (1986).

83) Houston, J.B., Humphrey, M.J., Matthew, D.E., Tarbit, M.H., *Biochem. Pharmacol.*, 37, 401 (1988).

84) Humphrey, M.J., Jevons, S., Tarbit, M.H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28, 648 (1985).

85) 柴　孝也、斎藤　篤、宮原　正、*Jpn. J. Antibiotics*, 42, 17 (1989).

86) Pohjola-Sintonen, S., Viitasalo, M., Toivonen, L. Neuvonen, P.J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 45, 191 (1993).

87) Varhe, A., Olkkola, K.T., Neuvonen, P.J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 56, 601 (1994).

88) 千葉　寛、*治療*、76, 2214 (1994).

89) Renton, K.W., Gray, J.D., Hung, O.R., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 30, 422 (1981).

90) Danan, G., Descatoire, V., Pessayre, D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218, 509 (1981).

91) Larrey, D., Funck-Brentano, C., Breil, P., Vitaux, J., Theodore, C., Babany, G., Pessayre, D., *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1063 (1983).

92) 川勝一雄、河合　満、*Ther. Res.*, 8, 33 (1988).

93) May, D.C., Jarboe, C.H., Ellenburg, D.T., Roe, E.J., Karibo, J., *J. Clin. Pharmacol.*, 22, 125 (1982).

94) Miller, C.A., Slusher, L.B., Vesell, E.S., *J. Clin. Invest.*, 75, 1415 (1985).

95) Grygiel, J.J., Miners, J.O., Drew, R., Birkett, D.J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 335 (1984).

96) Sano, M., Kawakatsu, K., Ohkita, C., Yamamoto, I., Takeyama, M., Yamashina, H., Goto, M., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 35, 161 (1988).

97) Loi, C.-M., Day, J.D., Jue, S.G., Bush, E.D., Costello, P., Dewey, L.V., Vestal, R.E., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 45, 476 (1989).

98) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

99) Omura, T., Sato, R., *J. Biol. Chem.*, 239, 2370 (1964).

100) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T., Uno, T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, 4, 879 (1981).

101) Reinke, L.A., Moyer, M.J., *Drug Metab. Dispos.*, 13, 548 (1985).

102) Nash, T., *Biochem. J.*, 55, 416 (1953).