

## 【原著・基礎】

*In vitro* における micafungin の薬物相互作用

金子 勇人・山戸 康弘・橋本 知子・石井 育子

白神 歳文・河村 章生・寺川 雅人・加賀山 彰

藤沢薬品工業株式会社薬物動態研究所\*

Micafungin (MCFG) のヒト血清およびヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* での薬物相互作用について検討し、以下の結果を得た。

1. 限外濾過法により求めた MCFG のヒト血清蛋白結合率は 99.74% であり、ワルファリン、ジアゼパム、サリチル酸およびメトトレキサートの存在下でほとんど変化しなかった。また、ワルファリン、ジアゼパム、サリチル酸およびメトトレキサートのヒト血清蛋白結合率も MCFG の存在下で大きな変化を示さなかった。

2. MCFG を 0.1~1 mmol/L (130~1,300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の濃度範囲で評価した場合、0.5 mmol/L 以上の濃度で明らかにビリルビンとの置換現象が認められ、ビリルビン結合部位における  $K_D$  値は  $2.0 \times 10^3$  L/mol であった。対照薬としたサリチル酸およびスルフィソキサゾールの  $K_D$  値はそれぞれ  $5.0 \times 10^3$  L/mol と  $1.4 \times 10^4$  L/mol であり、MCFG に比べ高値であった。

3. ヒト肝ミクロゾームにおける M5 および M13 生成活性はいずれもクマリン 7-水酸化活性およびテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性と有意な相関があった。さらに M13 生成活性はトルブタミドメチル水酸化活性および S-メフェニトイン 4'-水酸化活性と有意に相関した。

4. トラニルシプロミン (CYP2C19 阻害剤) および ketoconazole (KCZ, CYP3A4 阻害剤) は、ヒト肝ミクロゾーム中 MCFG 代謝活性に対して阻害作用を示した。シクロスポリン A、タクロリムスおよび KCZ の MCFG 代謝活性に対する 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は、それぞれ  $>100$ ,  $>100$  および  $6.2 \mu\text{mol}/\text{L}$  であり、シクロスポリン A およびタクロリムスの作用は KCZ よりも明らかに弱かった。

5. テルフェナジンの代謝活性に対する MCFG および KCZ の  $IC_{50}$  は  $67.7$  および  $0.46 \mu\text{mol}/\text{L}$  であり fluconazole の  $IC_{50}$  は  $100 \mu\text{mol}/\text{L}$  以上であった。同様にアステミゾールの代謝活性に対する  $IC_{50}$  はそれぞれ  $24.9$ ,  $0.12$  および  $44.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、ニフェジピン代謝活性に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は  $17.3$ ,  $0.012$  および  $10.7 \mu\text{mol}/\text{L}$  であった。

6. シクロスポリン A 代謝活性に対する MCFG, caspofungin acetate および KCZ の  $IC_{50}$  は、それぞれ  $31$ ,  $39$  および  $0.14 \mu\text{mol}/\text{L}$  であり、MCFG と caspofungin acetate の阻害作用はほぼ同等であったが、その程度は KCZ よりも明らかに弱かった。

**Key words:** micafungin, *in vitro*, 蛋白結合, 代謝, 薬物相互作用

Micafungin (MCFG) は、藤沢薬品工業株式会社で創製されたキャンディン系抗真菌薬である。本薬は、真菌に特異的な細胞壁の主要な構成成分のひとつである 1,3- $\beta$ -D-glucan の生合成を阻害する新規作用機序を有し、深在性真菌症の主要起因菌であるカンジダ属、アスペルギルス属などに対して優れた抗真菌活性を示した<sup>1)</sup>。

MCFG のヒト血清蛋白結合率は高く<sup>2)</sup>、蛋白結合率の変動により血清中非結合型濃度が増加する可能性が考えられた。また、前臨床試験での代謝物検索からチトクローム P450 (CYP) の関与が推察された<sup>3)</sup>。今回、*in vitro* ヒト血清蛋白結合における薬物相互作用、またヒト肝ミクロゾームおよびヒト CYP 分子種発現系ミクロゾームを用いて MCFG の代謝に関与する酵素の同定、薬物相互作用検討を行った。

## I. 材料および方法

## 1. 使用薬物および試薬

MCFG, 代謝物標品として MCFG のカテコール体 (M1), メトキシ体 (M2), 開環体 (M3) および側鎖の水酸化体 (M5) を藤沢薬品工業 (株) で合成した。 $^{14}\text{C}$  ワルファリン, [mebmt- $\beta$ - $^3\text{H}$ ]-シクロスポリン A ( $^{3}\text{H}$  シクロスポリン A) は Amersham LIFE SCIENCE (Buckinghamshire, UK) より購入した。ワルファリン, メトトレキサート, スルファフェナゾール, ヒト血清アルブミン, Bilirubin mixed isomers, Peroxidase Type I from Horseradish,  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\text{NADP}^+$ ), グルコース 6-リン酸 (G-6-P), グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G-6-

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

P DH), トラニルシプロミン (tranylcypromine, trans-2-phenyl-cyclopropylamine hemisulfate salt) は SIGMA CHEMICAL Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。サリチル酸, スルフィソキサゾールはナカライテスクより購入した。[<sup>3</sup>H] ジアゼパムおよび [<sup>14</sup>C] サリチル酸は NEN Reserch Products より購入した。フラフィリンは Ultrafine Chemicals Ltd. (Manchester, UK) から購入した。ジアゼパム, ketoconazole (KCZ), シクロスボリン A, caspofungin acetate は藤沢薬品工業 (株) にて合成されたものを用いた。

TSKgel ODS-80 TM カラム (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) および TSKguardgel ODS-80 Ts カートリッジガードカラム (3.2 mm $\times$ 15 mm) は, 東ソー株式会社より, Puresil C 18 120 Å カラム (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) は Waters 社より, Inertsil ODS-3 カラム (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) は ジーエルサイエンス株式会社よりそれぞれ購入した。

水は脱イオン水をさらに Milli-Q 超純水製造装置 (Millipore, USA) で処理した後に使用した。

その他の試薬および溶媒はいずれも市販の特級品もしくは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用溶媒を用いた。

## 2. 使用生体試料

ヒト血清は非絶食の健常成人男子 15 名の前腕静脈より採取した新鮮な血液を 4°C で 3,000 rpm, 10 分間遠心分離することにより得た。MCFG は塩基性の血漿中で不安定なため, 約 1.5 mol/L H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 倍希釈リン酸) を 0.3% 添加して, pH を 7.4 付近 (実測値: pH 7.24) に調整したプール血清 200 mL を実験に供した。調製した血清は実験に使用するまで氷冷下で保存した。なお, 健常成人からの採血に際しては文書による同意を得て行った。

30 名の異なる個体より調製されたプールドヒト肝ミクロゾームは XenoTech (USA) より購入した。また, 14 名の異なる個体より調製されたヒト肝ミクロゾーム (コード No. HBI 2, HBI 5, HBI 7, HBI 11, HBI 12, HBI 13, HBI 14, HBI 15, HBI 16, HBI 17, HBI 18, HBI 19, HBI 20 および HBI 21) は HepatoScreen™ test kit (Version 3.0) として Human Biologics, Inc. (USA) より購入した。各個体のミクロゾーム中 CYP 指標酵素活性は Human Biologics, Inc. より入手した。

遺伝子組み替え法によりヒト CYP (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9\*1 (wild-type), 2C18, 2C19, 2D6\*1 (wild-type), 2E1+シトクローム b<sub>5</sub> (b<sub>5</sub>), 3A4+b<sub>5</sub>, 3A5 および 4A11) をヒト NADPH-CYP 還元酵素と共発現させたバキュロウイルス感染昆虫細胞から調製したミクロゾーム (バキュロウイルス発現系) およびバキュロウイルス発現系コントロールミクロゾームは Gentest Corp. (USA) から購入し

た。ヒト肝ミクロゾームおよび CYP 発現系ミクロゾームは使用時まで -80°C で保存した。

## 3. ヒト血清蛋白結合における薬物相互作用

薬物相互作用におけるヒト血清中濃度は, MCFG については定量感度の観点から, 蛋白結合率の測定可能なもっとも低い濃度として 10  $\mu$ g/mL を設定した。他剤については, 臨床用量での血清中濃度を考慮し, ワルファリンは 3  $\mu$ g/mL, ジアゼパムは 0.6  $\mu$ g/mL, サリチル酸は 250  $\mu$ g/mL, メトトレキサートは 1  $\mu$ g/mL に設定した。MCFG はアセトニトリル/0.02 mol/L リン酸二水素カリウム (1: 1, v/v) に溶解した。 [<sup>14</sup>C] ワルファリン, ワルファリン, ジアゼパムおよびサリチル酸はエタノールで溶解または希釈した。メトトレキサートは 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) に溶解した。 [<sup>3</sup>H] ジアゼパムおよび [<sup>14</sup>C] サリチル酸は購入したエタノールまたは 80% エタノール溶液をそのまま用いた。ヒト血清に MCFG 標準溶液を 10  $\mu$ g/mL の濃度になるように添加した。この血清にエタノール (対照), または各評価薬剤の標準溶液を添加後, 最終エタノール濃度がヒト血清に対して 1.125% (v/v) になるようにエタノールで調整した。

結合率はセントリフリー® (MPS-3 P, Amicon) を用いて限外濾過法により評価した。調製した添加血清を 37°C でプレインキュベーションし, その 1 mL をセントリフリー® のリザーバーに入れ, 37°C, 3,000 rpm で 15 分間遠心する操作を 2 回繰り返す, 遠心ごとにリザーバー中の試料およびカップ中の濾液は廃棄した。3 回目は 37°C でプレインキュベーションした添加血清 1 mL をセントリフリー® のリザーバーに, 吸着防止用のアセトニトリル 100  $\mu$ L を濾液カップにそれぞれ入れ, 15 分間遠心した。3 回目の遠心終了後, 添加血清および濾液中の薬物濃度を測定した。

標識化合物を含む血清 0.1 mL を SOLUENE-350 (Packard Instrument Co., Inc.) 1 mL で溶解後, ECONOFLUOR-2 (NEN Reserch Products) 10 mL を加えた。濾液 0.1 mL には HIONIC-FLUOR (Packard Instrument Co., Inc.) 10 mL を加えて測定した。バックグラウンドとして薬物を添加していない血清および濾液を同様に調製して使用した。放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (1600 型, Packard Instrument Co., Inc.) で外部線源標準比法を用いて行った。

限外濾液および血清中 MCFG 濃度は蛍光検出器を用いた HPLC 法により測定した<sup>4)</sup>。限外濾液中メトトレキサート濃度は, 濾液を移動相と混和後, 遠心分離して得た上清を HPLC で分析した。血清中メトトレキサート濃度は, 固相抽出 (Sep-pak tC<sub>18</sub>) 後に限外濾液と同様の HPLC 条件で測定した。カラムは Puresil C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 120 Å, 4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm), ガードカラムは TSK guardgel ODS-80 TM (3.2 mm i.d.  $\times$  15 mm), 移動相

は 0.025 mol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0)/アセトニトリル (80/9, v/v) を用い、検出波長 305 nm で測定した。

各薬物の血清中非結合型分率は、濾液中薬物濃度または放射能濃度と血清中薬物濃度または放射能濃度の比より算出した。

#### 4. ヒト血清アルブミンにおけるビリルビンとの薬物相互作用

ヒト血清アルブミンにおけるビリルビンとの薬物相互作用を検討した。まず、ヒト血清アルブミンを蒸留水に溶解し、pH がおよそ 9 になるように 1 mol/L-NaOH を添加し、250  $\mu$ mol/L の溶液とした。次に、ビリルビンをアルカリ下で溶解し、中和後、1,230  $\mu$ mol/L の溶液とした。これらのヒト血清アルブミン溶液 50 mL とビリルビン溶液 1.25 mL を混合し、pH が 7.4 付近になるように 1 mol/L HCl を適量添加した。Peroxidase Type I を蒸留水に溶解して、2,400 nmol/L 溶液を調製し、蒸留水で順次希釈した。MCFG は 0.01~1.5 mmol/L のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液を調製した。サリチル酸は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4, 2 および 1 mmol/L の溶液を調製した。スルフィソキサゾールは 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 1.5, 1 および 0.5 mmol/L の溶液を調製した。サリチル酸およびスルフィソキサゾールは試験の対照薬として使用した。

薬物添加による遊離型ビリルビン濃度変化の測定は、Brodersen の酵素的酸化法 (peroxidase method)<sup>5)</sup> に準じた。1 cm 幅石英セルに添加薬物の 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液 1 mL とヒト血清アルブミン-ビリルビン混合溶液 1 mL を入れて混合し、温度を 37°C に保ったセルホルダーに挿入した。次いで、35 mmol/L 過酸化水素水溶液を 5  $\mu$ L 添加し、時間を横軸として 455 nm での吸光度変化を 3~5 分間記録した。これが一定となることを確認した後、適当な濃度の peroxidase 水溶液を 100  $\mu$ L 添加して素早く混合し、455 nm における経時的な吸光度変化を記録した。記録したクロマトグラムから、酵素添加後 5 分間における吸光度変化 ( $\Delta$ OD/5 min) を求め、これを peroxidase によるビリルビン酸化反応の初速度とした。初速度を peroxidase 濃度で除し、薬物非添加時に対する薬物添加時の比から、薬物存在下の遊離型ビリルビン濃度 (b) と薬物非存在下の遊離型ビリルビン濃度 (b<sub>0</sub>) の比 (b/b<sub>0</sub>) を求めた。

全薬物濃度 (薬物添加濃度) を D, 薬物のビリルビン結合部位における結合定数を K<sub>D</sub> とすると、 $b/b_0 = K_D \times D + 1$  と表されることから、b/b<sub>0</sub> と D をプロットした時の傾きより K<sub>D</sub> 値を算出した。

臨床用量での血漿中濃度を加味したビリルビン遊離能を示す指標である maximal displacement factor (MDF) 値は、K<sub>D</sub> 値、血清蛋白非結合型分率 (fp) および臨床用量での血漿中濃度 (D) より、以下の式より算出した。

$$MDF = K_D \times fp \times D + 1$$

#### 5. *In vitro* における MCFG の代謝活性

ヒト肝マイクロゾーム及び遺伝子組み替えヒト CYP 発現系マイクロゾームによる<sup>14</sup>C-MCFG の代謝活性は、以下に示す反応条件で生成する代謝物および残存する基質を HPLC で分画後、その放射能を測定することにより定量した。すなわち、[<sup>14</sup>C]MCFG の酸化的代謝の反応条件は基質、ヒト肝マイクロゾーム (2 mg protein/mL), NADPH 生成系 (2 mmol/L NADP<sup>+</sup>, 10 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) および 0.1 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.2 mL の反応液で測定した。MCFG の基質濃度は通常 100  $\mu$ mol/L とした。ヒト CYP 発現マイクロゾームでは、酵素添加量は 50 pmol CYP (250 pmol/mL) とした。上記の反応液は 10 mL のガラス製遠沈管で調製し、反応は NADPH 生成系の添加により開始した。好氣的条件下で 37°C, 1 時間インキュベーションした後、アセトニトリル 195  $\mu$ L および 25% (v/v) 酢酸水溶液 5  $\mu$ L を添加・攪拌後、水冷し反応を停止した。反応停止液は水中に 4~5 分放置後、Eppendorf 5415 C 型遠心機で 12,000 rpm, 4 分間遠心分離し、上清は分取した。この上清 45~50  $\mu$ L を HPLC に注入し、カラム溶出液は試料注入直後から注入後 43.6 分まで 0.4 分間ごとに分取し、Hionic-Flour 4 mL を加えて放射能を測定した。コントロール試料は NADPH 生成系無添加と同様に処理した。HPLC 装置に Beckman System Gold を用い、カラムは TSKgel ODS-80 TM, 流速は 1.0 mL/min とし、以下の移動相条件を使用した。

(条件) A 液: 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 3.5), B 液: アセトニトリル, 0~10 分まで B 液 20%, 10~30 分は B 液 20% から B 液 45% となる直線グラジエント, 30~30.1 分まで B 液 45% から B 液 85% となる直線グラジエント

#### 6. MCFG 代謝活性に対する阻害作用

MCFG 代謝活性に対する CYP の特異的阻害剤あるいは基質の影響は、プールドヒト肝マイクロゾームを用いて基質濃度 100  $\mu$ mol/L で評価した。フラフィリン (CYP 1A2 阻害剤), クマリン (CYP 2A6 基質), スルファフェナゾール (CYP 2C9 阻害剤), トラニルシプロミン (CYP 2C19 阻害剤), KCZ, タクロリムスおよびシクロスポリン A (CYP 3A4 阻害剤) はいずれもメタノールに溶解して反応液に添加した。メタノールの反応液中終濃度は 1% (v/v) とし、MCFG 代謝活性は上記と同様にして測定した。フラフィリンを使用する場合には、フラフィリンとヒト肝マイクロゾームとを NADPH 生成系存在下で 37°C, 10 分間プレインキュベート後に基質を添加して上記の方法で MCFG 代謝活性を測定した。

#### 7. 他剤の代謝活性に対する MCFG の阻害作用

テルフェナジン, アステミゾール, ニフェジピン, タ

クロリムスおよび  $[^3\text{H}]$  シクロスポリン A の代謝活性に対する MCFG の阻害作用について上記の NADPH 生成系により検討した。テルフェナジンの定量は、Waters HPLC システム (蛍光検出: 励起波長; 220 nm, 蛍光波長; 287 nm) を用い、カラムは Spherisorb CN-5 を、流速は 1.5 mL/min とし、移動相はアセトニトリル/メタノール/50 mmol/L 酢酸-酢酸アンモニウム (pH 4) (3/3/4, v/v) を使用した。アステミゾールの定量は、Waters HPLC システム (UV 286 nm) を用い、カラムは Inertsil ODS-2 を、流速は 1.0 mL/min とし、移動相はアセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸 (300/700/1, v/v) を使用した。生成した酸化ニフェジピンの定量は、Waters HPLC システム (UV 254 nm) を用い、カラムは Inertsil ODS-3 を、流速は 1.0 mL/min とし、移動相はメタノール/水 (55/45, v/v) を使用した。タクロリムス代謝活性は既報に準じて実施した<sup>6)</sup>。  $[^3\text{H}]$  シクロスポリン A の測定は装置に Beckman System Gold を用いた。カラムは Inertsil ODS-3 を用い、流速は 1.0 mL/min とし、以下の移動相条件を使用した。

(条件) A 液: メタノール/水 (1/3, v/v), B 液: アセトニトリル, 0~40 分まで B 液 35% から B 液 75% となる直線グラジエント, 40~40.1 分まで B 液 75% から B 液 100% となる直線グラジエント

$[^{14}\text{C}]$ MCFG の測定は、前述の条件により行った。

#### 8. 統計解析

血清蛋白結合の相互作用試験時の対照群と他剤共存時の非結合型分率の有意差検定は Student's t 検定により

行い、両側 5% を有意水準とした。

MCFG のヒトマイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝試験時の各 CYP 分子種と MCFG の代謝活性の相関は、各分子種の指標酵素活性と MCFG の代謝活性または代謝物の生成活性を  $Y = aX + b$  の式に当てはめた時の決定係数 ( $r^2$ ) を算出し、さらに、有意水準 5% の直線性の検定を行った。

なお、有意差検定には、SAS (SAS Institute Inc.) を用いた。

## II. 結 果

### 1. ヒト血清蛋白結合における薬物相互作用

MCFG の単独および他剤共存時の MCFG のヒト血清蛋白結合率を Table 1 に示す。MCFG の結合率は 99.74% であり、ワルファリン、ジアゼパム、サリチル酸またはメトトレキサートの共存下でも結合率はほとんど変化しなかった。

各薬剤の単独および MCFG 共存時の各薬剤のヒト血清蛋白結合率を Table 2 に示す。いずれの薬物においても MCFG の共存下で蛋白結合率は有意に変化したが ( $p < 0.05$ ), その変化はいずれも非結合型分率が減少するもので、その程度はワルファリン、ジアゼパム、サリチル酸およびメトトレキサートでそれぞれ、0.3, 0.3, 1.7 および 3.2% であった。

### 2. ヒト血清アルブミンにおけるビリルビンとの薬物相互作用

MCFG は 0.005~0.03 mmol/L (6.5~39  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ではまったく遊離型ビリルビン濃度の上昇は認められな

Table 1. Effects of drugs on binding of micafungin to human serum protein

Drugs	Concentration of drug added ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Percent bound of micafungin (%)	Percent unbound of micafungin (%)
Control	no addition	99.74 $\pm$ 0.01	0.262 $\pm$ 0.014
Warfarin	3.0	99.72 $\pm$ 0.00	0.284 $\pm$ 0.004
Diazepam	0.6	99.67 $\pm$ 0.02	0.330 $\pm$ 0.020
Salicylic acid	250	99.55 $\pm$ 0.09	0.448 $\pm$ 0.087
Methotrexate	1.0	99.77 $\pm$ 0.03	0.232 $\pm$ 0.033

Mean $\pm$ S.E., n = 3

Table 2. Effects of micafungin on binding of drugs to human serum protein

Drugs	Concentration of drug added ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentration of micafungin added ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Percent bound of micafungin (%)	Percent unbound of micafungin (%)
Warfarin	3.0	no addition	98.46 $\pm$ 0.01	1.54 $\pm$ 0.01
	3.0	10	98.73 $\pm$ 0.01	1.27 $\pm$ 0.01
Diazepam	0.6	no addition	96.92 $\pm$ 0.02	3.08 $\pm$ 0.02
	0.6	10	97.19 $\pm$ 0.02	2.81 $\pm$ 0.02
Salicylic acid	250	no addition	76.80 $\pm$ 0.17	23.20 $\pm$ 0.17
	250	10	78.48 $\pm$ 0.11	21.52 $\pm$ 0.11
Methotrexate	1.0	no addition	56.59 $\pm$ 0.62	43.41 $\pm$ 0.62
	1.0	10	59.80 $\pm$ 0.17	40.20 $\pm$ 0.17

Mean $\pm$ S.E., n = 3

った。一方、0.1~1 mmol/L (130~1,300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の高濃度では遊離型ビリルビン濃度の上昇が認められ、ビリルビン結合部位における  $K_D$  値は  $2.0 \times 10^3$  L/mol であった。対照薬としたサリチル酸及びスルフィソキサゾールの  $K_D$  値はそれぞれ  $5.0 \times 10^3$  L/mol と  $1.4 \times 10^4$  L/mol であり、MCFG に比べ高値であった (Table 3)。

得られた  $K_D$  値をもとに MDF 値を算出したところ、MCFG は 0.023 mmol/L (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) では 1.00 であった。対照薬では、サリチル酸は 0.10 mmol/L (14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 1.03, 2.2 mmol/L (304  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 3.20, スルフィソキサゾールは 0.50 mmol/L (134  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で

2.05 であった (Table 3)。

### 3. *In vitro* における MCFG の代謝活性

MCFG を NADPH 生成系でヒト肝ミクロゾームで代謝させた時に、M 5 および M 13 の生成が認められた。M 13 は未同定代謝物であり、M 5 以外の代謝物標品 M 1, M 2 および M 3 の生成は認められなかった (Fig. 1)。

MCFG の代謝活性と各 CYP 分子種の指標酵素活性の相関を Table 4 に示す。M 5, M 13 生成活性および MCFG 総代謝活性 (M 5 および M 13 生成活性の和) はいずれも CYP 2A6 の指標活性であるクマリン 7-水酸化活性と正の有意な相関 ( $r^2=0.396\sim0.474$ ,  $p<0.01\sim p<0.05$ ) を示した。また M 5, M 13 生成活性および MCFG 総代謝活性は CYP 3A4 の指標活性であるテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性と正の有意な相関 ( $r^2=0.590\sim0.836$ ,  $p<0.001\sim p<0.01$ ) を示した。さらに M 13 生成活性はトルブタミドメチル水酸化活性 (CYP 2C9) および S-メフェニトイン 4'-水酸化活性 (CYP 2C19) とそれぞれ有意な相関をした ( $p<0.05$ )。一方、MCFG 代謝活性とエトキシレゾルフィン O-脱エチル化活性 (CYP 1A2), デキストロ

Table 3. Binding constants ( $K_D$ ) of drugs to the bilirubin-site of human serum albumin and maximal displacement factor (MDF)

Drugs	$K_D$ (L/mol)	Plasma conc. (mol/L)	MDF
Micafungin	$2.0 \times 10^3$	$2.3 \times 10^{-5}$	1.00
Salicylic acid	$5.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^{-4}$	1.03
		$2.2 \times 10^{-3}$	3.20
Sulfisoxazole	$1.4 \times 10^4$	$5.0 \times 10^{-4}$	2.05

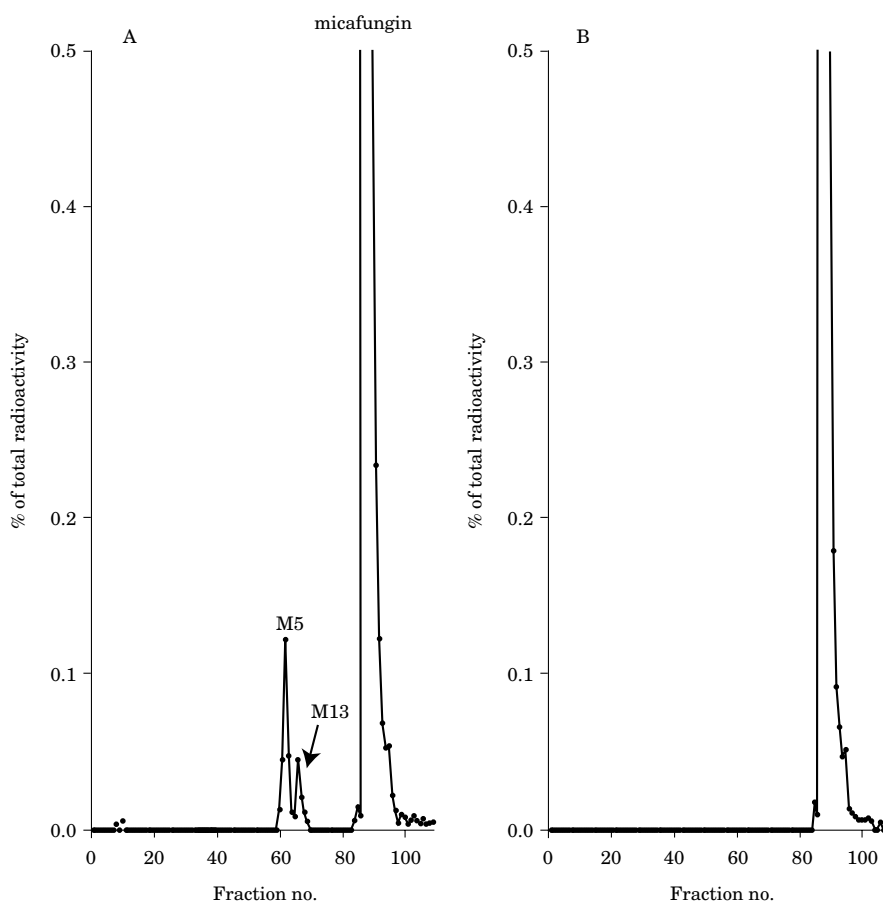


Fig. 1. Typical HPLC-radiochromatograms of micafungin and its metabolites after incubation of [ $^{14}\text{C}$ ] micafungin (100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) in human liver microsomes.

A: +NADPH generating system, B: -NADPH generating system

Table 4. Relationship between metabolic activity of micafungin and enzyme activity of CYP

Isoform/Substrate	Coefficient of determination ( $r^2$ )		
	metabolic activities of micafungin		
	M 5 formation	M 13 formation	total activity <sup>a)</sup>
CYP 1 A 2			
Ethoxyresorufin O-deethylase	0.264	0.086	0.219
CYP 2 A 6			
Coumarin 7-hydroxylase	0.396*	0.474**	0.428*
CYP 2 C 9			
Tolbutamide methyl-hydroxylase	0.089	0.337*	0.139
CYP 2 C 19			
S-Mephenytoin 4'-hydroxylase	0.275	0.357*	0.304*
CYP 2 D 6			
Dextromethorphan O-demethylase	0.035	0.009	0.028
CYP 2 E 1			
Chlorzoxazone 6-hydroxylase	<0.001	0.046	0.002
CYP 3 A 4			
Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase	0.590**	0.836***	0.667***
CYP 4 A			
Lauric acid 12-hydroxylase	0.013	0.054	0.021

The metabolic activity of micafungin was measured at a substrate concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$ . M 13 has been an unknown metabolite.

<sup>a)</sup>Sum of M 5 and M 13 formation activity.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Table 5. Effects of furafylline, coumarin, sulfaphenazole, tranlycypromine and ketoconazole on the metabolic activity of micafungin in human liver microsomes

	Inhibitor	Conc. ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Preincubation time (min)	Metabolic activity	
				( $\text{pmol/h/mg}$ )	(%)
M 5 formation	control		10	85.0	100.0
	furafylline	25	10	67.0	78.8
		2.5	10	88.3	103.8
		control		—	96.3
	coumarin	100	—	61.3	63.6
		10	—	72.3	75.1
	sulfaphenazole	100	—	75.0	77.9
		10	—	74.0	76.9
	tranlycypromine	50	—	53.0	55.1
		5	—	71.8	74.5
	ketoconazole	2.5	—	55.3	57.4
		0.5*	—	101.0	104.9
	M 13 formation	control		10	54.0
furafylline		25	10	44.0	81.5
		2.5	10	60.3	111.6
		control		—	63.3
coumarin		100	—	42.0	66.4
		10	—	45.5	71.9
sulfaphenazole		100	—	55.3	87.4
		10	—	53.3	84.2
tranlycypromine		50	—	35.3	55.7
		5	—	46.0	72.7
ketoconazole		2.5	—	25.8	40.7
		0.5*	—	57.5	90.9

The metabolic activity of micafungin was measured at a substrate concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$ . M 13 has been an unknown metabolite. The inhibitors were dissolved in methanol and added to incubation mixture. The methanol concentration in the reaction mixture was adjusted to 1% (v/v). (n=2, \*n=1)

Table 6. Effects of cyclosporin A, tacrolimus and ketoconazole on the metabolic activity of micafungin in human liver microsomes

Drugs	Concentration of drug added ( $\mu\text{mol/L}$ )	Metabolic activity of micafungin	
		( $\text{pmol/h/mg protein}$ )	(%)
Control	-	217.1	100.0
Cyclosporin A	1	199.2	91.7
	10	164.3	75.7
	100	114.0	52.5
Tacrolimus	1	219.0	100.9
	10	269.5	124.1
	100	135.7	62.5
Ketoconazole	1	151.6	69.8
	10	97.4	44.9
	100	34.4	15.8

The metabolic activity of micafungin was measured at a substrate concentration of  $100 \mu\text{mol/L}$ . The metabolic activity of micafungin was evaluated using the sum of the M 5 and M 13 formation activities. Inhibitors were dissolved in methanol and added to the reaction mixture. The methanol concentration in the reaction mixture was adjusted to 1% (v/v). (n=2)

メトルフアン O-脱メチル化活性 (CYP 2 D 6), クロールゾキサゾン 6-水酸化活性 (CYP 2 E 1) あるいはラウリン酸 12-水酸化活性 (CYP 4 A) との間には, いずれも有意な相関は観察されなかった ( $p > 0.05$ ).

MCFG 代謝活性に対するフラフィリン (CYP 1 A 2 阻害剤), クマリン (CYP 2 A 6 基質), スルファフェナゾール (CYP 2 C 9 阻害剤), トラニルシプロミン (CYP 2 C 19 阻害剤) および KCZ (CYP 3 A 4 阻害剤) の影響について検討した (Table 5). M 5 および M 13 生成活性はフラフィリン ( $25 \mu\text{mol/L}$ ) でそれぞれコントロール値の 78.8 および 81.5% に低下した。クマリン ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) ではそれぞれコントロール値の 63.6 および 66.4% に低下し, スルファフェナゾール ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) ではそれぞれコントロール値の 77.9 および 87.4% に低下した。トラニルシプロミン ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) ではそれぞれコントロール値の 55.1 および 55.7% に低下した。一方, KCZ ( $2.5 \mu\text{mol/L}$ ) ではそれぞれコントロール値の 57.4 および 40.7% に低下した。

MCFG の代謝活性におよぼすシクロスポリン A, タクロリムスおよび KCZ の影響について検討した。

MCFG の代謝活性は, シクロスポリン A を 1, 10 および  $100 \mu\text{mol/L}$  添加した時, それぞれコントロール値の 91.7, 75.7 および 52.5%, タクロリムスではそれぞれ 100.9, 124.1 および 62.5%, KCZ ではそれぞれ 69.8, 44.9 および 15.8% であった (Table 6)。シクロスポリン A および タクロリムスの  $\text{IC}_{50}$  は  $100 \mu\text{mol/L}$  以上であり, KCZ は  $6.2 \mu\text{mol/L}$  であった。

#### 4. 他剤の代謝活性に対する MCFG の阻害作用

テルフェナジンの代謝に対する MCFG および KCZ の  $\text{IC}_{50}$  は  $67.7$  および  $0.46 \mu\text{mol/L}$  であり, fluconazole (FLCZ) の  $\text{IC}_{50}$  は  $100 \mu\text{mol/L}$  以上であった (Table 7)。同様にアステミゾールの代謝に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $24.9, 0.12$  および  $44.2 \mu\text{mol/L}$ , ニフェジピンの代謝に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は  $17.3, 0.012$  および  $10.7 \mu\text{mol/L}$  であった。これらの結果よりテルフェナジン, アステミゾールおよびニフェジピンの代謝に対する本剤の阻害作用は FLCZ とほぼ同程度であり, KCZ よりは弱いことが明らかになった。

タクロリムスの代謝活性は MCFG を  $0.5, 5$  および  $50$

Table 7. Effects of micafungin, ketoconazole and fluconazole on the metabolic activity of terfenadine, astemizole and nifedipine in human liver microsomes

Drugs	Terfenadin $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Astemizole $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nifedipine $K_i$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
Micafungin	67.7	24.9	17.3
Ketoconazole	0.46	0.12	0.012
Fluconazole	>100	44.2	10.7

Table 8. Effects of micafungin and ketoconazole on the metabolic activity of tacrolimus in human liver microsomes

Drugs	Drug concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Inhibition (%)
Micafungin	0.5	12.8
	5	11.5
	50	32.4
Ketoconazole	5	91.4

Table 9. Effects of micafungin, caspofungin acetate and ketoconazole on the metabolic activity of cyclosporin A in human liver microsomes

Drugs	Drug concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Metabolic activity	
		( $\text{pmol/min/mg protein}$ )	(%)
Control	—	109.76	100.0
Micafungin	0.1	100.72	91.8
Micafungin	1	100.15	91.2
Micafungin	10	100.86	91.9
Micafungin	100	6.54	6.0
Caspofungin acetate	0.1	99.54	90.7
Caspofungin acetate	1	98.73	90.0
Caspofungin acetate	10	100.05	91.2
Caspofungin acetate	100	23.76	21.7
Ketoconazole	0.1	63.21	57.6
Ketoconazole	1	5.03	4.6
Ketoconazole	10	0.00*	0.0

The amount of unchanged cyclosporin A was measured after human liver microsomes (0.2 mg protein/mL) and  $^3\text{H}$ -cyclosporin A (2.5  $\mu\text{mol/mL}$ ) were incubated at 37°C for 10 min, with and without test drugs. The metabolic activity of cyclosporin A was evaluated based on the elimination rate of the substrate. The test drugs were dissolved in methanol and added to the reaction mixture. Values are means of duplicate determinations. \*Lower than the detection limit.

$\mu\text{mol/L}$  添加した時、それぞれ 12.8, 11.5 および 32.4 % 阻害され、また KCZ を 5  $\mu\text{mol/L}$  添加した時、91.4 % 阻害された (Table 8)。

シクロスポリン A の代謝活性は MCFG を 0.1, 1, 10 および 100  $\mu\text{mol/L}$  添加した時、それぞれコントロール値の 91.8, 91.2, 91.9 および 6.0%, caspofungin acetate ではそれぞれ 90.7, 90.0, 91.2 および 21.7% であった (Table 9)。一方、KCZ を 0.1, 1 および 10  $\mu\text{mol/L}$  添加すると代謝活性はコントロール値のそれぞれ 57.6, 4.6 および 0.0% (検出限界未満) であった。シクロスポリン A 代謝活性に対する MCFG, caspofungin acetate および KCZ の  $\text{IC}_{50}$  は、それぞれ 31, 39 および 0.14  $\mu\text{mol/L}$  であり、MCFG と caspofungin acetate の阻害作用はほぼ同等であったが、その程度は KCZ よりも明らかに弱かった。

### III. 考 察

MCFG のヒト血清蛋白結合における薬物相互作用を検討した。評価対象薬物として、臨床 MCFG と併用が予想されるサリチル酸、メトトレキサート、ワルファリンおよびジアゼパムを選択した。MCFG のヒト血清蛋白結合率はワルファリン、ジアゼパム、サリチル酸またはメトトレキサートの共存下でほとんど変化がなかった。一方、ワルファリン、ジアゼパム、サリチル酸およびメトトレキサートに対しては、その非結合型分率をわずかに減少させたが、臨床問題となる変動ではないと考えられた。

MDF 値は臨床での核黄疸発生の指標とされている。MDF は 1 以上の値をとるが、この値が 1.20 以上の値

を示した場合に有意なビリルビンとの置換が起こることが知られている<sup>7)</sup>。今回、対照薬として評価した核黄疸の臨床報告例のあるスルフィソキサゾールは 0.50 mmol/L (134  $\mu\text{g/mL}$ ) で MDF 値が 2.05 と 1.20 より大きな値を示した。サリチル酸では、血漿中濃度が低い場合の 0.10 mmol/L (14  $\mu\text{g/mL}$ ) では 1.03 と 1.20 より低い値となったが、血漿中濃度が高い 2.2 mmol/L (300  $\mu\text{g/mL}$ ) では 3.20 と大きな値を示した。このことから、高用量のサリチル酸を投与した場合にはビリルビンとの置換が起こって核黄疸が発症する恐れがあると考えられた。これに対して、MCFG の MDF は 0.023 mmol/L (30  $\mu\text{g/mL}$ ) で 1.00 と小さい値であり、臨床においてビリルビンとの置換を起こす可能性が低いことが示された。以上の結果から、MCFG がビリルビンの蛋白結合を阻害することにより血漿中遊離型ビリルビン濃度を上昇させる可能性は低いものと考えられた。

MCFG の代謝物である M5 生成には CYP 2A6 および 3A4 が、M13 生成には CYP 2A6, 2C9, 2C19 および 3A4 がそれぞれ関与する可能性が示唆された。トラニルシプロミン (CYP 2C19 阻害剤) および KCZ (CYP 3A4 阻害剤) は、ヒト肝ミクロゾームにおける MCFG 代謝活性に対し比較的強い阻害作用を示すことが明らかとなった。また、シクロスポリン A およびタクロリムスは MCFG 代謝活性に対して阻害作用を示したが、その作用は KCZ よりも明らかに弱く、 $\text{IC}_{50}$  は 100  $\mu\text{mol/L}$  以上であった。また、シクロスポリン A、タクロリムスおよび KCZ のヒトにおける血漿中蛋白結合率はいずれも 98% 以上である<sup>8-10)</sup> ことから、臨床におい



てMCFGはこれらの薬剤によるCYP阻害の影響を受け難いと推察された。

テルフェナジン、アステミゾールおよびニフェジピンの代謝に対する本薬の阻害作用はFLCZとほぼ同程度であり、KCZよりは弱いことが明らかになった。MCFGの臨床血中濃度および血清蛋白結合率が99.74%と非常に高いことを考慮すると、*in vivo*では本薬がテルフェナジン、アステミゾールおよびニフェジピンの血漿中濃度を上昇させる可能性は低いものと推察された。

以上、MCFGのヒト血清およびヒト肝ミクロゾームを用いた*in vitro*薬物相互作用試験の結果から、MCFGと今回検討した薬物間の臨床における相互作用の可能性は低いと考えられた。

#### 文 献

- 1) 池田文昭, 大友寿美, 中井 徹, 他: キャンディン系抗真菌薬 micafungin の *in vitro* 抗真菌活性。日化療会誌 50 (S-1): 8~19, 2002
- 2) 山戸康弘, 金子勇人, 橋本知子, 他: マウス, ラットおよびイヌにおける micafungin 単回静脈内投与後の体内動態, *in vitro* 血清蛋白結合および血球移行性。日化療会誌 50 (S-1): 74~79, 2002
- 3) 金子勇人, 山戸康弘, 寺村有理子, 他: ラットおよびイヌにおける micafungin の代謝物。日化療会誌 50 (S-1): 88~93, 2002
- 4) 山戸康弘, 金子勇人, 谷本 薫, 他: ヒト血漿中 micafungin およびその代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる定量法。日化療会誌 50 (S-1): 68~73, 2002
- 5) Brodersen, R: Competitive binding of bilirubin and drugs to human serum albumin studied by enzymatic oxidation, *J. Clin. Invest.* 54: 1353~1364, 1974
- 6) Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, et al.: Metabolism of FK 506, a potent immunosuppressive agent, by cytochrome P 450 3A enzymes in rat, dog and human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 47: 727~735, 1994
- 7) Walker P C: Neonatal bilirubin toxicity: a review of kernicterus and the implication of drug-induced bilirubin displacement, *Clin. Pharmacokin.* 13: 26~50, 1987
- 8) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, et al.: Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver, *Pharmacol Rev* 50: 387~411, 1998
- 9) Campana C, Regazzi M B, Buggia I, et al.: Clinically significant drug interactions with cyclosporin: an update, *Clin Pharmacokinet* 30: 141~179, 1996
- 10) Plosker G L, Foster R H: Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation, *Drugs* 59: 323~389, 2000

## Drug interactions of micafungin *in vitro*

Hayato Kaneko, Yasuhiro Yamato, Tomoko Hashimoto,  
Ikuko Ishii, Toshifumi Shiraga, Akio Kawamura,  
Masato Terakawa and Akira Kagayama

Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

The *in vitro* drug interactions of micafungin (MCFG), a new echinocandin-like lipopeptide antifungal agent, were evaluated using human serum and human liver microsomes and the following results were obtained.

1. The percent of MCFG bound to human serum proteins was as high as 99.74%. Warfarin, diazepam, salicylic acid and methotrexate did not affect the protein binding of MCFG.

2. Based on the results at the concentrations ranging from 0.1 to 1 mmol/L (130~1,300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of MCFG, the binding constant ( $K_D$ ) of MCFG at the bilirubin binding site was calculated to be  $2.0 \times 10^3$  L/mol, indicating that MCFG has a lower affinity to the bilirubin binding site than salicylic acid ( $5.0 \times 10^3$  L/mol) or sulfisoxazole ( $1.4 \times 10^4$  L/mol).

3. M5 and M13 formation activities significantly correlated with the activities of coumarin 7-hydroxylase and testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase. M13 formation activity also significantly correlated with the activities of tolbutamide methyl-hydroxylase and S-mephenytoin 4'-hydroxylase.

4. The metabolism of MCFG was inhibited by tranylcypromine and ketoconazole (KCZ). The 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of cyclosporin A, tacrolimus and KCZ for the metabolic activity of MCFG was  $>100$ ,  $>100$  and  $6.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ , respectively.

5. The  $IC_{50}$  of MCFG, fluconazole (FLCZ) and KCZ for the metabolic activity of terfenadine was 67.7,  $>100$  and  $0.46 \mu\text{mol}/\text{L}$ , respectively, and 24.9, 0.12 and  $44.2 \mu\text{mol}/\text{L}$  for astemizole. The inhibition constant of MCFG, FLCZ and KCZ for the metabolic activity of nifedipine was 17.3, 0.012 and  $10.7 \mu\text{mol}/\text{L}$ , respectively.

6. The  $IC_{50}$  of MCFG, caspofungin acetate and KCZ for the metabolic activity of cyclosporin A was 31, 39 and  $0.14 \mu\text{mol}/\text{L}$ , respectively.