

【原著・基礎】

Garenoxacin の *in vitro* 代謝およびヒトチトクロム P450 に対する作用

中村 哲朗・飛世 千栄・加藤 寛・片井 真樹・早川 大善・藤堂 洋三

富山化学工業株式会社総合研究所*

(平成 19 年 4 月 27 日受付・平成 19 年 8 月 9 日受理)

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) の臨床における薬物動態学的薬物間相互作用の発現の可能性を評価するため、GRNX のヒト肝ミクロソームによる代謝、ヒト初代培養肝細胞を用いたチトクロム P450 (CYP)1A2 および CYP3A4 活性に対する誘導作用、およびヒト肝ミクロソームを用いた各 CYP の標準基質代謝活性に対する阻害作用を検討した。GRNX は、ヒト肝ミクロソームにおいて NADPH の有無にかかわらずほとんど代謝されず、GRNX の代謝に対して CYP の関与は少なかった。また、GRNX は血漿中非結合型濃度 (約 $6 \mu\text{mol/L}$ 、400 mg 反復経口投与時のヒト C_{max} より算出) の約 17 倍 ($100 \mu\text{mol/L}$) まで CYP1A2 および CYP3A4 に対して酵素誘導作用を示さなかった。さらに、CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 および CYP3A4 に対する阻害作用は弱く、いずれの分子種に対しても 50% 阻害濃度は $1,000 \mu\text{mol/L}$ 以上であった。以上、GRNX を臨床で他薬剤と併用した場合に、CYP を介した薬物間相互作用が発現する可能性は低いと考えられた。

Key words: garenoxacin, cytochrome P450, drug-drug interaction

Garenoxacin mesilate hydrate (GRNX) は、富山化学工業株式会社が創製された新規な des-F(6)-quinolone 系抗菌薬である。本薬剤は、従来のフルオロキノロン系抗菌薬に必須とされていた 6 位フッ素置換基がなく、既存薬とは異なった新規な化学構造を有している。また、GRNX はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して強い抗菌活性および幅広い抗菌スペクトルを示すことが明らかにされている^{1,2)}。GRNX の代謝物としては、動物において硫酸抱合体 M1、酸化代謝物 M4 および M5、ならびにグルクロン酸抱合体 M6 が報告されている³⁾。今回、臨床における GRNX の薬物間相互作用リスクを評価するために、ヒト肝ミクロソームによる *in vitro* 代謝試験を行った。また、ヒト初代培養肝細胞を用いたチトクロム P450 (CYP) 誘導試験およびヒト肝ミクロソームを用いた CYP 阻害試験により、ヒト CYP に対する GRNX の影響を検討した。

I. 材料および方法

1. 被験物質および試験

GRNX (分子量 540.53, 遊離塩基として 426.41) は富山化学工業 (株) において合成した。¹⁴C-GRNX は第一化学薬品 (株) において合成した (比放射能: 335 MBq/mmol)。HPLC による放射化学的純度は 98% 以上であった。Fig. 1 に化学構造式および標識位置を示す。

GRNX 代謝物の標準物質 M1, M4 および M5 は富山化学工業 (株) において合成した。Fig. 1 に化学構造式を示す。なお、代謝物 M6 (グルクロン酸抱合体) 標準物質

は合成が困難であったため、使用しなかった。

7-エトキシレゾルフィン、レゾルフィン、フェナセチン、アセトアミノフェン、7-エトキシクマリン、テストステロン、 α -ナフトフラボン、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム塩、スルファフェナゾール、トラニルシプロミン塩酸塩、キニジン塩酸塩 1 水和物、クロトリマゾール、オメプラゾール、リファンピシン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよびダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS) は Sigma-Aldrich より購入した。また、ring-U-¹⁴C-トルブタミド (比放射能 2.26 GBq/mmol)、S-4-¹⁴C-メフェニトイン (2.07 GBq/mmol)、guanidine-¹⁴C-デブリスキントリフルオロ酢酸塩 (2.00 GBq/mmol) および 2-¹⁴C-クロルゾキサゾン (2.07 GBq/mmol) は GE Healthcare より、4-¹⁴C-テストステロン (2.07 または 1.85 GBq/mmol) は GE Healthcare または PerkinElmer より購入した。ウンベリフェロンはナカライテスク (株) より購入した。ヒドロキシトルブタミド、4-ヒドロキシメフェニトイン、4-ヒドロキシデブリスキン硫酸塩、6-ヒドロキシクロルゾキサゾンおよび 6β -ヒドロキシテストステロンは SAFC 製を使用した。 β -NADPH、 β -NADP⁺ およびグルコース 6 リン酸二ナトリウム (G6P) はオリエンタル酵母工業 (株) 製を使用し、グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH) は和光純薬工業 (株) より購入した。培地はブレットキット HCM: 培地添加因子セットを三光純薬株式会社より購入した。非働化ウシ胎児血清 (FCS) は

*富山県富山市下奥井 2-4-1

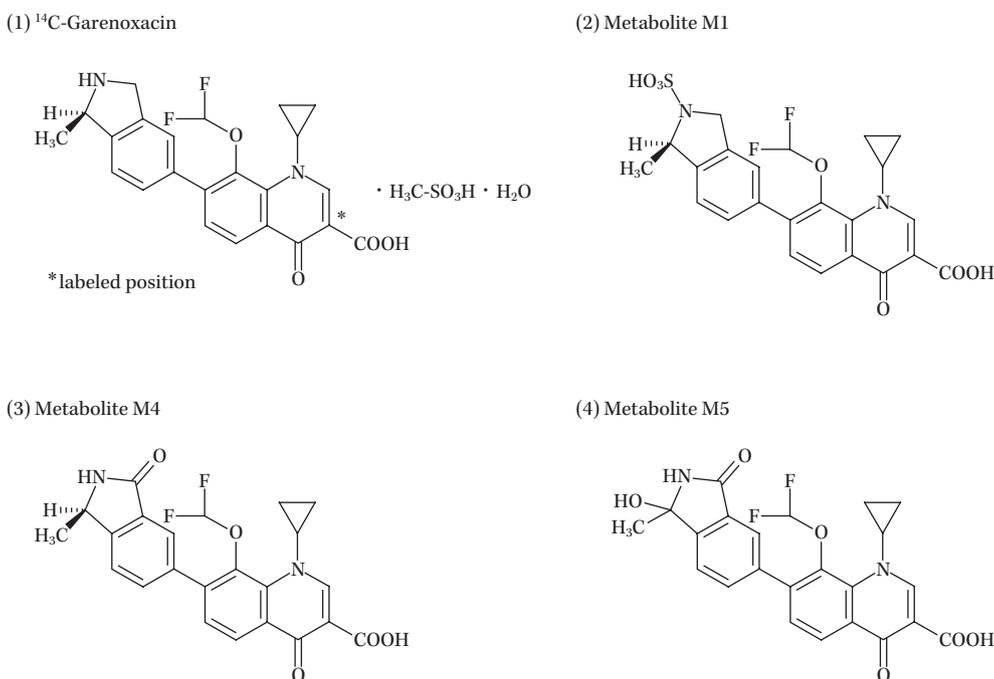


Fig. 1. Chemical structures of ¹⁴C-garenoxacin, and metabolites M1, M4, and M5.

Invitrogen 製を使用した。肝細胞の培養には、BD バイオコート™(マトリゲル™マトリクス薄層コート, 24 ウェルプレート, BD Bioscience)を使用した。その他の試薬は市販の特級品または HPLC 用を使用した。

2. ヒト試料

提供者の同意を得た外国人 10 ドナー (男女各 5 名) および 15 ドナー (男性 8 名, 女性 7 名) 由来のプールドヒト肝マイクロソーム (Lot No. HHM-0254, HHM-0257 および 045243060025), ならびに白人女性由来のヒト凍結肝細胞 (Lot No. 045301940002) は (株) ケーエーシーより購入した。

3. ヒト肝マイクロソームによる代謝

NADPH 生成系 (終濃度: 1.3 mmol/L β-NADP⁺, 3.3 mmol/L G6P, 0.4 unit/mL G6PDH および 3.3 mmol/L 塩化マグネシウム) を含む 100 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) にヒト肝マイクロソーム (終濃度: 1 mg protein/mL) を加え, 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。¹⁴C-GRNX 溶液 (終濃度: 20 および 200 μmol/L) 添加にて反応開始し, 37°C で 2 時間インキュベーションした。最終反応容量は 400 μL とした。氷冷下, アセトニトリル/メタノール (1:1) 800 μL 添加にて反応停止後, 約 11,000 × g で 5 分間遠心して上清を回収した。沈渣をアセトニトリル/メタノール (1:1) で洗浄し, 洗浄液を先の上清と混合して減圧濃縮後, 残渣を移動相 A 液 200 μL に再溶解して Radio-HPLC 分析試料とした。また, NADPH 非添加の系を設定し, NADPH 生成系に代えて蒸留水を添加した。

なお, ヒト肝マイクロソームの酵素活性を確認するため, テストステロン 6β 位水酸化活性 (CYP3A4 活性) を測定した。すなわち, ¹⁴C-テストステロン (50 μmol/L), NADPH 生成系およびヒト肝マイクロソーム (0.2 mg protein/mL) を 37°C で 10 分間インキュベーション後, アセトニトリル/メタノール (1:1) 添加にて反応を停止し, 遠心上清を TLC 分析に用いた。

以上の実験例数は 2 とした。

4. ヒト CYP1A2 および CYP3A4 に対する誘導作用

ヒト凍結肝細胞を融解後, ハイドロコルチゾン, アスכולビン酸, トランスフェリン, インスリン, BSA, hEGF, ゲンタマイシン/アンフォテリシン B および FCS を含む HCM 培地に懸濁して 1 × 10⁶ viable cells/mL とした。トリパンプルー染色法による細胞生存率は約 75% であった。細胞懸濁液は, プレートに播種した後に CO₂ インキュベータ (37°C, 95% air-5% CO₂) 内で 24 時間前培養した。なお播種 4 時間後に培地を交換した。さらに, ハイドロコルチゾン, アスכולビン酸, トランスフェリン, インスリン, BSA およびペニシリン/ストレプトマイシンを含むインキュベーション用培地に交換して 24 時間前培養した。

被験物質暴露は, 前培養の後 GRNX (4, 20 および 100 μmol/L), 溶媒対照 (0.4% ジメチルスルホキシド) または陽性対照物質を含むインキュベーション用培地中で 72 時間行った。陽性対照物質には, オメプラゾール (CYP1A2) またはリファンピシン (CYP3A4) を使用した。培地は 24 時間ごとに交換した。次いで CYP1A2 およ

び CYP3A4 活性測定のため、細胞を D-PBS で洗浄し、それぞれ基質としてフェナセチン (100 $\mu\text{mol/L}$) またはテストステロン (250 $\mu\text{mol/L}$) を含む D-PBS を添加して、37°C にて 6 または 4 時間インキュベーションした。インキュベーション後、培養上清 100 μL にアセトニトリル 100 μL を添加して約 11,000 $\times g$ で 10 分間遠心し、上清を分析試料とした。以上の実験例数は 2 とした。

5. ヒト CYP 標準基質代謝活性に対する阻害作用

GRNX (終濃度: 40, 200 および 1,000 $\mu\text{mol/L}$)、陽性対照物質または溶媒対照 [蒸留水またはアセトニトリル (終濃度: 1%)] を、標準基質 (終濃度: 2 $\mu\text{mol/L}$) およびヒト肝ミクロソーム (終濃度: 1 mg protein/mL) を含む 100 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に加えて 37°C で 1 分間プレインキュベーションした。標準基質および陽性対照物質として、以下のものを使用した: 7-エトキシレゾルフィンおよび α -ナフトフラボン (CYP1A2), 7-エトキシクマリンおよびジエチルジチオカルバミン酸 (CYP2A6), ^{14}C -トルブタミドおよびスルファフェナゾール (CYP2C9), S- ^{14}C -メフェニトインおよびトラニルシプロミン (CYP2C19), ^{14}C -デブリソキンおよびキニジン (CYP2D6), ^{14}C -クロルゾキサゾンおよびジエチルジチオカルバミン酸 (CYP2E1), ならびに ^{14}C -テストステロンおよびクロトリマゾール (CYP3A4)。NADPH (終濃度: 1 mmol/L) 添加にて反応開始し、37°C で所定時間インキュベーションした。反応時間は直線性の得られた範囲、すなわち 10 分 (CYP1A2, CYP2A6 および CYP3A4), 15 分 (CYP2C9, CYP2D6 および CYP2E1) または 30 分 (CYP2C19) とした。最終反応容量は、CYP1A2 は 600 μL , その他の分子種では 200 μL とした。インキュベーション後、メタノール 1.2 mL (CYP1A2), 7.5% トリクロロ酢酸 100 μL (CYP2A6), または TLC マーカーを含むエタノール溶液 400 μL (その他の分子種) を添加、氷冷して反応を停止し、得られた混液を以降の分析に使用した。なお、TLC マーカーとして、ヒドロキシルトルブタミド (CYP2C9), 4'-ヒドロキシメフェニトイン (CYP2C19), 4'-ヒドロキシデブリソキン (CYP2D6), 6'-ヒドロキシクロルゾキサゾン (CYP2E1) および 6 β -ヒドロキシテストステロン (CYP3A4) を使用した。以上の実験例数は 3 とした。

6. 分析条件

1) ヒト肝ミクロソームによる代謝

^{14}C -GRNX の代謝プロファイルの分析には、ポンプ (L-6200, (株) 日立製作所), 検出器 (L-4000, (株) 日立製作所), Radio 検出器 (RadiomaticTM525TR, PerkinElmer) およびオートサンプラー (AS8020, 東ソー (株)) を使用し、データ処理はワークステーションシステム (FLO-ONETM for Windows, PerkinElmer) で行った。分析カラムは Develosil ODS-HG-5 (内径 4.6 mm \times 長さ 150 mm, 野村化学 (株)), カラム温度は 30°C とした。移動

相は A 液 [アセトニトリル/クエン酸緩衝液 (pH 4.0) / 蒸留水 (10: 15: 75)] および B 液 [アセトニトリル/クエン酸緩衝液 (pH 4.0) / 蒸留水 (35: 15: 50)] のグラジエント (B 液 0% で開始後, 15 分までに B 液 60% 次いで 35 分までに B 液 100% となる線形グラジエントとし, その後 45 分まで B 液 100%) とした。流速は移動相 1.0 mL/min, 液体シンチレーター (UltimafloTMM, PerkinElmer) 3.0 mL/min とし, 検出は波長 280 nm および放射能 (フローセル容量: 500 μL) にて行った。

6 β -ヒドロキシテストステロン濃度は, 遠心上清の一部を TLC 展開後⁴⁾, プレート上の放射能分布をバイオイメージングアナライザ (BAS5000, 富士写真フィルム (株)) を用いて測定した。6 β -ヒドロキシテストステロンの位置は, 同時に展開した非標識 TLC マーカーにて確認した。

2) アセトアミノフェンおよび 6 β -ヒドロキシテストステロンの分析

酵素誘導試験における肝細胞培養上清中のアセトアミノフェンおよび 6 β -ヒドロキシテストステロン濃度は HPLC による絶対検量線法により測定した。

アセトアミノフェン定量にはポンプおよびオートサンプラー (W2795, Waters) ならびに検出器 (W2487, Waters) を使用し, データ処理はデータ処理ソフト (EmpowerTM 2, Waters) で行った。分析カラムは YMC pack ODS AM312 (粒子径 5 μm , 内径 6 mm \times 長さ 150 mm, (株) ワイエムシイ), カラム温度は 30°C とした。移動相は A 液 [アセトニトリル/蒸留水/過塩素酸/過塩素酸ナトリウム (100: 900: 1: 5, v/v/v/w)] および B 液 [アセトニトリル/蒸留水/過塩素酸/過塩素酸ナトリウム (800: 200: 1: 5, v/v/v/w)] のグラジエント (B 液 0% で開始後 15 分までに B 液 50% となる線形グラジエントとし, その後 20 分まで B 液 50%) とした。流速は 1.0 mL/min, 検出波長は 254 nm とした。

6 β -ヒドロキシテストステロン定量にはポンプ (L-7100, (株) 日立製作所), 検出器 (L-7400, (株) 日立製作所), データ処理装置 (D-7500, (株) 日立製作所) およびオートサンプラー (717plus, Waters) を使用した。分析カラムは Nucleosil 5C₁₈ (内径 4.6 mm \times 長さ 200 mm, (株) ケムコ), カラム温度は 30°C, 移動相はアセトニトリル/100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) / 蒸留水 (40: 1: 59) とし, 流速 1.0 mL/min, 検出波長 240 nm で測定した。

3) CYP 標準基質代謝活性の測定

CYP1A2 活性測定では, 得られた混液を約 11,000 $\times g$ で 10 分間遠心後, 上清中のレゾルフィン濃度を分光蛍光光度計 (日立 F2000, 励起波長 550 nm, 蛍光波長 585 nm) で測定した。

CYP2A6 活性測定では, 混液の遠心上清 200 μL に 500 mmol/L リン酸緩衝液 (約 pH 9) 800 μL を添加し, ウ

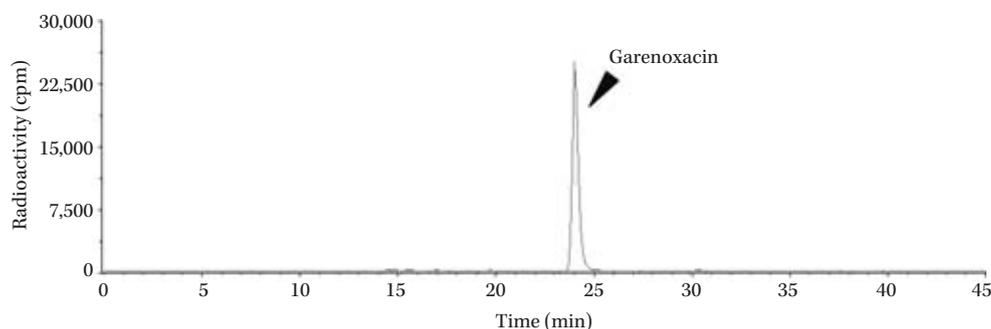


Fig. 2. Representative radiochromatogram of ^{14}C -garenoxacin incubated with human liver microsomes.

^{14}C -Garenoxacin (200 $\mu\text{mol/L}$) was incubated with 1 mg protein/mL of human liver microsomes in the presence of NADPH at 37°C for 2 hr.

ンペリフェロン濃度を分光蛍光光度計(日立 F2000, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm) で測定した⁵⁾。

その他の CYP 活性測定は, 生成した ^{14}C 標識代謝物の放射能測定により行った。すなわち, 反応停止後, 約 11,000 \times g で 2 分間遠心し, 上清を減圧乾固, エタノール 200 μL に再溶解して TLC で分離した。なお, 沈渣はエタノールで 2 回洗浄し, 洗浄上清を先の上清と合わせて乾固した。TLC プレートは活性化処理 (110°C, 1 時間) した Silica gel 60F254 (0.5 mm, Merck), 展開溶媒は酢酸エチル/トルエン/蒸留水/ギ酸 (12:4:4:3) を混和後の上層 (CYP2D6), クロロホルム/酢酸エチル (3:2) (CYP2C19) およびクロロホルム/酢酸エチル/酢酸 (70:30:1) (CYP2E1) を用いた。CYP2C9 および CYP3A4 の展開溶媒は文献^{4,6)} に従った。UV ランプにて目的代謝物の展開位置を確認後, シリカゲル層をシンチレーションバイアルに掻き取り, メタノール 1 mL を加えて 30 分間振盪した (130 strokes/min, Recipro shaker, タイテック)。シンチレーター (PCS, GE Healthcare) を 13 mL 加えて攪拌後, 液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2500TR, PerkinElmer) により放射能を測定した。

II. 結 果

1. ヒト肝ミクロソームによる代謝

^{14}C -GRNX をヒト肝ミクロソームと 2 時間インキュベーションした後の典型的なラジオクロマトグラムを Fig. 2 に示す。NADPH の有無にかかわらず, 20 および 200 $\mu\text{mol/L}$ いずれの GRNX 濃度においても酸化的代謝物である M4 (標準物質の保持時間: 38 分) および M5 (同: 30 分) を含め, 代謝物ピークは認められなかった。また, ^{14}C -GRNX の残存率は, NADPH の有無にかかわらず, 20 および 200 $\mu\text{mol/L}$ でほぼ 100% (99.3~102.3%) であった。

なお, 使用したヒト肝ミクロソーム (Lot No. 045243060025) のテストステロン 6 β 位水酸化活性は

1.13 nmol/min/mg protein であり, 十分な代謝活性を有していたことから, GRNX はヒト肝ミクロソームによる酸化的代謝をほとんど受けないと考えられる。

2. ヒト CYP1A2 および CYP3A4 に対する誘導作用

GRNX の CYP1A2 および CYP3A4 誘導作用について, ヒト初代培養肝細胞を用いて評価した。基質としてフェナセチンおよびテストステロンを用い, それぞれ生成した代謝物 (アセトアミノフェンおよび 6 β -ヒドロキシテストステロン) 濃度からフェナセチン O-脱エチル化 (CYP1A2) およびテストステロン 6 β 位水酸化 (CYP3A4) 活性を算出した (Fig. 3)。

CYP1A2 活性は, 4, 20 および 100 $\mu\text{mol/L}$ の GRNX を 72 時間処理した後も上昇せず, 溶媒対照と同様に定量下限 (0.5 $\mu\text{mol/L}$, 0.69 pmol/min/well の活性に相当) 未満であった。一方, 陽性対照のオメプラゾール (50 $\mu\text{mol/L}$) は CYP1A2 活性を 2.8 pmol/min/well (溶媒対照の 4 倍以上相当) に上昇させた。

CYP3A4 活性も CYP1A2 と同様, 4, 20 および 100 $\mu\text{mol/L}$ の GRNX を 72 時間処理した後も上昇せず, 溶媒対照 (2.6 pmol/min/well) と同程度の約 1.5~3.0 pmol/min/well であった。一方, 陽性対照のリファンピシン (50 $\mu\text{mol/L}$) は CYP3A4 活性を 12 pmol/min/well (溶媒対照の約 5 倍) に上昇させた。

以上, GRNX は CYP1A2 および CYP3A4 に対する誘導作用を示さなかった。

3. ヒト CYP 標準基質代謝活性に対する阻害作用

GRNX の CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 および CYP3A4 に対する阻害作用について, ヒト肝ミクロソームを用いて各 CYP に特異的な代謝活性を指標に評価した (Table 1)。

GRNX は 40 および 200 $\mu\text{mol/L}$ では検討したすべての CYP 活性にほとんど影響を及ぼさなかったが, 1,000 $\mu\text{mol/L}$ で CYP2A6 および CYP2D6 の活性を約 25% 減少させた。また, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19,

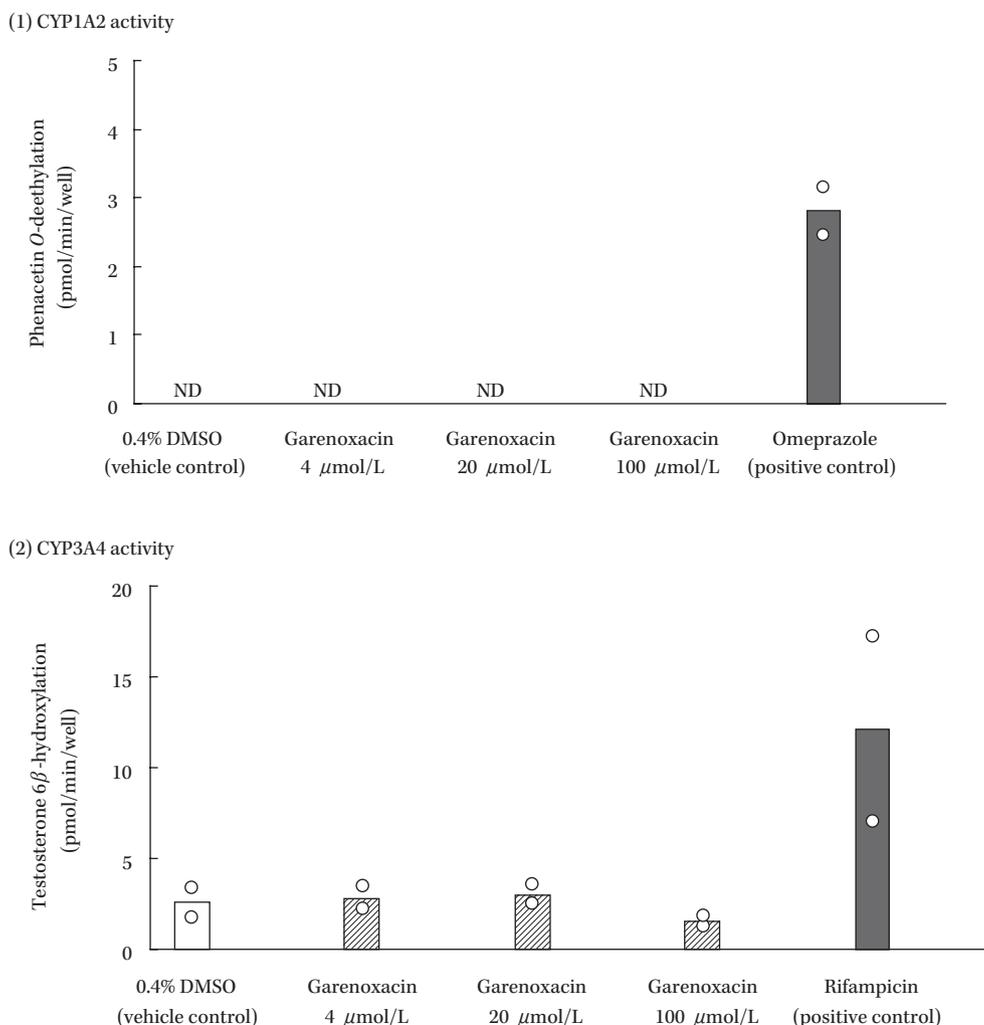


Fig. 3. Effect of garenoxacin on CYP1A2 and CYP3A4 activity in primary cultured human hepatocytes. Human hepatocytes were treated with garenoxacin (4, 20 or 100 μmol/L), positive control compounds (50 μmol/L omeprazole or 50 μmol/L rifampicin), or vehicle control (0.4% dimethylsulfoxide) for 72 hr. The culture medium containing the test compound was replaced daily with fresh medium over the experiment period. Data is expressed as the mean (column) and individual values (circle) of duplicate experiments.

ND: Not detected (lower limit of quantification for acetaminophen: 0.5 μmol/L = 0.69 pmol/min/well).

CYP2E1 および CYP3A4 活性に対しては、1,000 μmol/L においてもその阻害率は20%未満であった。一方、陽性対照物質の各CYP活性に対する阻害率は約30~93%であった。

III. 考 察

新規医薬品に関する種々の情報を提供することは、臨床における医薬品の適正使用に繋がる。特に薬物動態学的な観点からは、薬物間相互作用に関する情報提供が重要である。薬物動態学的相互作用は主に代謝過程が原因であり、中でもCYPが関与するものが大部分を占める⁷⁾。本研究では、臨床におけるGRNXの被相互作用薬としてのリスク(併用薬から受ける影響)を評価するため、ヒト肝ミクロソームを用いてGRNXの代謝に対するCYPの関与を検討した。また、GRNXの相互作用薬とし

てのリスク(併用薬に与える影響)を評価するため、ヒト初代培養肝細胞を用いてCYP1A2およびCYP3A4活性に対するGRNXの誘導作用、およびヒト肝ミクロソームを用いて薬物代謝に関与する主要なCYPに対するGRNXの阻害作用を検討した。

GRNXは、ヒト肝ミクロソームにおいてNADPHの有無にかかわらずほとんど代謝されなかった(Fig. 2)。この結果は、¹⁴C-GRNX 600 mg投与後のヒト生体試料(血漿、尿および糞)を用いた別検討で、主代謝物としてM1、次いで少量のM6が検出され、酸化的代謝物はほとんど認められなかった(未発表データ)ことと一致する。したがって、ヒトにおけるGRNXの主代謝経路は、第2相反応、特に硫酸抱合と考えられ、CYPの関与は少ないと結論づけられる。また、GRNXのバイオアベイラビリティ

Table 1. Effect of garenoxacin on the CYP-catalyzed activity in human liver microsomes

(1) CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, and CYP2C19					
Test compound	($\mu\text{mol/L}$)	Activity (% of control) ^{a)}			
		CYP1A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2C19
Garenoxacin	40	104.0 \pm 1.1	99.5 \pm 6.6	96.4 \pm 1.4	97.4 \pm 4.6
	200	101.9 \pm 0.4	96.0 \pm 3.5	101.9 \pm 4.2	87.2 \pm 6.1
	1,000	89.7 \pm 0.2	75.1 \pm 4.1	96.5 \pm 3.1	83.8 \pm 17.0
Positive control ^{b)}		8.2 \pm 0.2	62.2 \pm 3.8	24.5 \pm 0.2	35.9 \pm 2.4
(2) CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4					
Test compound	($\mu\text{mol/L}$)	Activity (% of control) ^{a)}			
		CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4	
Garenoxacin	40	93.5 \pm 10.4	96.4 \pm 5.0	107.8 \pm 1.4	
	200	99.6 \pm 21.8	90.8 \pm 6.7	106.4 \pm 1.6	
	1,000	77.1 \pm 4.9	82.4 \pm 4.3	95.4 \pm 0.8	
Positive control ^{b)}		29.3 \pm 5.1	70.6 \pm 4.5	6.7 \pm 0.6	

^{a)} 7-Ethoxyresorufin *O*-deethylation (CYP1A2), 7-ethoxycoumarin *O*-deethylation (CYP2A6), tolbutamide hydroxylation (CYP2C9), S-mephenytoin 4'-hydroxylation (CYP2C19), debrisoquine 4-hydroxylation (CYP2D6), chlorzoxazone 6-hydroxylation (CYP2E1) and testosterone 6 β -hydroxylation (CYP3A4).

^{b)} 20 $\mu\text{mol/L}$ α -Naphthoflavone (CYP1A2), 1,000 $\mu\text{mol/L}$ diethyldithiocarbamic acid (CYP2A6), 2 $\mu\text{mol/L}$ sulfaphenazole (CYP2C9), 20 $\mu\text{mol/L}$ tranilcypromine (CYP2C19), 2 $\mu\text{mol/L}$ quinidine (CYP2D6), 200 $\mu\text{mol/L}$ diethyldithiocarbamic acid (CYP2E1) and 2 $\mu\text{mol/L}$ clotrimazole (CYP3A4).

Data is expressed as percentage of the mean value of vehicle control (distilled water for garenoxacin, or 1% acetonitrile for positive control compounds), and mean \pm SD of triplicate incubations. Garenoxacin was incubated at 37°C with human liver microsomes and the probe substrates, as described in Materials and Methods.

(約 92%⁸⁾) および尿中排泄率(約 40%, 600 mg 経口投与時)⁹⁾から、代謝(腎外クリアランス)の寄与は全身クリアランスの約 60% であり、GRNX の代謝・排泄に占める CYP の寄与は小さく、GRNX の被相互作用薬としてのリスクは低いと考えられる。

また、GRNX は臨床 C_{max} (400 mg 反復経口投与 7 日目で 11.06 $\mu\text{g/mL}$ = 26 $\mu\text{mol/L}$, 臨床第一相試験成績) および血漿中非結合型 GRNX 濃度(約 6 $\mu\text{mol/L}$, 上記 C_{max} に *ex vivo* 血漿中非結合型分率 0.25¹⁰⁾ を乗じて算出) のそれぞれ約 4 および 17 倍に相当する 100 $\mu\text{mol/L}$ まで CYP1A2 および CYP3A4 活性を上昇させず、これらの分子種に対する酵素誘導作用はなかった (Fig. 3)。

さらに、GRNX は CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 および CYP3A4 に対する阻害作用が弱く、いずれの分子種に対しても 50% 阻害濃度は 1,000 $\mu\text{mol/L}$ 以上であった (Table 1)。これは、肝臓の酵素近傍の薬物濃度を求める以下のモデル式¹¹⁾より算出したヒトにおける肝臓流入最大非結合型濃度(約 26 $\mu\text{mol/L}$) の約 38 倍以上に相当し、GRNX の CYP 阻害作用を介した薬物間相互作用発現の可能性は低いと考えられる。

$$C_{\text{in, u}} = \left[C_{\text{max}} \cdot R_B + \frac{k_a \cdot D \cdot F_a}{Q_H} \right] \times f_p / R_B$$

$C_{\text{in, u}}$: 肝臓流入最大非結合型濃度, C_{max} : 11.06 $\mu\text{g/mL}$ (26 $\mu\text{mol/L}$, 臨床第一相試験成績), R_B : ヒト血液/

血漿中濃度比 (0.77, *in vitro* 試験より算出), k_a : 吸収速度定数 (0.1 min^{-1})¹²⁾, D : 投与量 (400 mg = 938 μmol), F_a : バイオアベイラビリティ (92%)⁸⁾, Q_H : ヒト肝血流速度 (1.45 L/min)¹³⁾, f_p : ヒト血漿中非結合型分率 (0.25)¹⁰⁾

これらの結果より、GRNX は臨床投与量での血漿中濃度において CYP 阻害および誘導作用を示さず、CYP で代謝される薬剤と併用した場合も、併用薬の体内動態に影響を与える相互作用薬としてのリスクは低いと考えられた。

フルオロキノロン系抗菌薬との併用により薬物間相互作用を引き起こす薬剤としてテオフィリンが挙げられる¹⁴⁾。その機序はフルオロキノロン系抗菌薬による CYP1A2 阻害とされており^{15, 16)}、今回の検討で GRNX の CYP1A2 に対する阻害作用は弱かったことから、GRNX がテオフィリンとの相互作用を発現する可能性は低いと推定された。しかし、臨床薬理試験(経口薬 garenoxacin と経口薬 theophylline の併用試験)において、GRNX はテオフィリンの血漿中濃度をシプロフロキサシンと同程度¹⁷⁾の約 1.2 倍まで上昇させた。二木ら¹⁷⁾の分類によれば、GRNX によるテオフィリン血漿中濃度の上昇は軽度であり、副作用発現の可能性は低いが、その併用は注意すべきであると考えられる。上記臨床薬理試験の結果については、GRNX の CYP 阻害作用からは説明できず、詳細は不明である。なお、テオフィリンは、エリスロマイ

シンとの相互作用について薬物トランスポーターの関与が示唆されており¹⁸⁾、GRNX とテオフィリンの相互作用に CYP 以外のメカニズムが関与する可能性について、今後さらなる検討が必要である。

以上、GRNX は CYP による代謝をほとんど受けず、かつ CYP に対して誘導および阻害作用を示さなかった。したがって、臨床で CYP を介した薬物間相互作用が発現する可能性は低いと考えられた。

謝 辞

本論文の作成に際して、実験にご協力いただきました富山化学工業(株)現 臨床開発部の松本淳一氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Takahata M, Mitsuyama J, Yamashiro Y, Yonezawa M, Araki H, Todo Y, et al: In vitro and in vivo antimicrobial activities of T-3811 ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1077-84
- 2) Fung-Tomc J C, Minassian B, Kolek B, Huczko E, Aleksunes L, Stickle T, et al: Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro (6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3351-6
- 3) Hayakawa H, Fukushima Y, Kato H, Fukumoto H, Kadota T, Yamamoto H, et al: Metabolism and disposition of novel des-fluoro quinolone garenoxacin in experimental animals and an interspecies scaling of pharmacokinetic parameters. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 1409-18
- 4) Waxman D J, Ko A, Walsh C: Regioselectivity and stereoselectivity of androgen hydroxylations catalyzed by cytochrome P-450 isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver. *J Biol Chem* 1983; 258: 11937-47
- 5) Aitio A: A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal Biochem* 1978; 85: 488-91
- 6) Okuyama M, Inoue C, Aijima K, Nakamura Y, Kaburagi T, Shigematsu A: In vitro method for assessing hepatic drug metabolism. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 1-5
- 7) 加藤隆一, 鎌滝哲也 編, 薬物相互作用。薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として (第2版), 東京化学同人, 東京, 2000; 121-30
- 8) Bello A, Stewart C, O'Mara E, Christopher L, Gajjar D A: Absolute oral bioavailability of garenoxacin tablets and the bioequivalence of the intravenous formulation with respect to oral tablets. *American Society of Health-System Pharmacists, Midyear Clinical Meeting in Atlanta, December 2002; #321*
- 9) Bello A, Farmer J, O'Mara E, Christopher L, Gajjar D A: Pharmacokinetics and disposition of [¹⁴C]-garenoxacin in healthy adult male subject. *American Society of Health-System Pharmacists, Midyear Clinical Meeting in Atlanta, December 2002; #331*
- 10) Bello A, Hollenbauch D, Gajjar D, Christopher L, Grasela D: Ex vivo serum protein binding of BMS-284756: Impact on the unbound AUC/MIC ratio for *Streptococcus pneumoniae*. *Abstr 41st Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother in Chicago, September 2001; p.8, A-45*
- 11) 中島由起子, 金光真一, 岩坪隆史: 薬物間相互作用の *in vitro* から *in vivo* の予測。杉山雄一 編, 医薬品開発における薬物動態研究, 薬業時報社, 東京, 1998; 213-55
- 12) 薬物相互作用の検討方法について。医薬審第 813 号 (平成 13 年 6 月 4 日), 2001
- 13) Davies B, Morris T: Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* 1993; 10: 1093-5
- 14) Wijnands W J, van Herwaarden C L, Vree T B: Enoxacin raises plasma theophylline concentrations. *Lancet* 1984; 2: 108-9
- 15) Fuhr U, Anders E M, Mahr G, Sorgel F, Staib A H: Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 942-8
- 16) Stahlmann R, Lode H: Safety overview: Toxicity, adverse effects, and drug interactions. *In Andriole V T (ed.), The quinolones, 3rd ed., Academic Press, California, 2000; p.398-454*
- 17) 二木芳人, 橋口浩二, 木村雅司, 沖本二郎, 副島林造: Quinolone 薬と theophylline 血中濃度—その相互作用の程度に基づく分類法について—。 *Chemotherapy* 1992; 40: 598-601
- 18) Kobayashi Y, Sakai R, Ohshiro N, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T: Possible involvement of organic anion transporter 2 on the interaction of theophylline with erythromycin in the human liver. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 619-22

In vitro metabolism and the effect on human cytochrome P450s of garenoxacin

Tetsuro Nakamura, Chie Tobise, Hiroshi Kato,
Masaki Katai, Hiroyoshi Hayakawa and Yozo Todo

Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama, Japan

To assess the possibility of pharmacokinetic drug-drug interactions of garenoxacin mesilate hydrate (GRNX), we investigated the metabolism of GRNX in human liver microsomes, the induction effect of GRNX on cytochrome P450(CYP) 1A2 and CYP3A4 activity in primary cultured human hepatocytes, and the inhibition effect of GRNX on the metabolic activity of probe substrates for CYP isoforms in human liver microsomes. GRNX was hardly metabolized by human liver microsomes in the presence or absence of NADPH, showing that CYPs are unlikely to be involved in the metabolism of GRNX. GRNX did not exhibit the induction effect on CYP1A2 and CYP3A4 activity at up to 100 $\mu\text{mol/L}$, which was approximately 17-fold higher than the unbound GRNX concentration in plasma (approximately 6 $\mu\text{mol/L}$, calculated from the C_{max} at 400 mg repeated oral dose in humans). GRNX had little inhibition effect on the CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4 activity, and the 50% inhibition concentration for these CYP isoforms exceeded 1,000 $\mu\text{mol/L}$. In conclusion, GRNX is unlikely to cause CYP-mediated drug-drug interactions in humans when it is administered concomitantly with other drugs.