

# 1回の採血で ヒトの薬物代謝酵素CYP3A活性を知る

東京薬科大学 薬学部 医療薬学科  
准教授 柴崎 浩美

本発明の基礎となる知見は、「東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会」の承認に基づいて得られたものである。

# CYP3A活性評価に基づく個別化医療



1点の少量採血



分析装置: LC-MS/MS



血中濃度測定  
CYP3A活性評価



CYP3A活性が  
高い: 投与量を多く  
低い: 投与量を少なく

# 本発明: ヒトにおけるCYP3A酵素活性の評価法の開発 (フェノタイプ検査法)

1点採血 100~200  $\mu$ L

血中 6 $\beta$ -ヒドロキシコルチゾール / 血中コルチゾール 濃度比



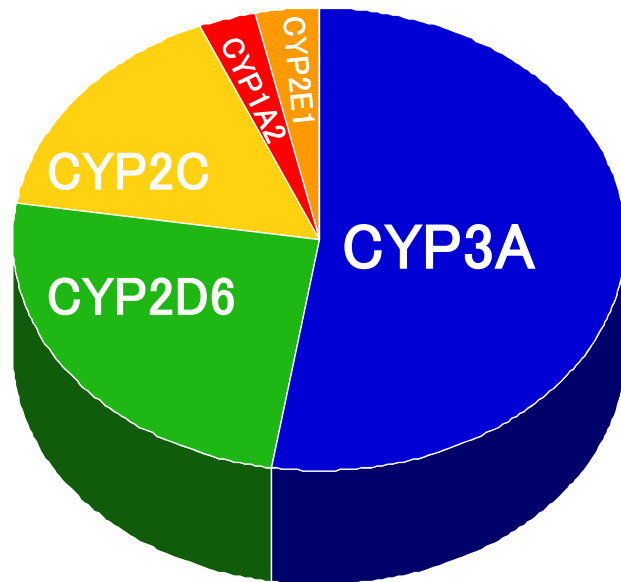
CYP3Aによる薬物代謝能力を知る



個別化薬物治療

「患者一人ひとりに適切な投与方法の指標となる」

# 「個別化薬物治療」実施のための “ヒト *in vivo* CYP3A フェノタイプ検査法の開発”



薬物代謝に関与する  
CYP 酵素分子種

CYP3A (薬物代謝酵素シトクロムP450 3A)

- ・50%以上の医薬品(抗癌剤、免疫抑制剤など)の代謝に関与
- ・数十倍の**個人差**

内因性の要因:

遺伝子多型, 人種, 性別, 加齢, 生体リズム

外因性の要因:

**薬物相互作用(阻害, 誘導)**

遺伝子診断から酵素活性を予測できない

直接的な酵素活性評価(フェノタイプ検査法)が必要

# 従来の代表的なCYP3Aフェノタイプ検査法と問題点

## I) プローブ薬物を投与(治療に不要な薬物の投与)

- (a) ミダゾラムの全身クリアランス(頻回の採血が必要)
- (b) 放射性エリスロマイシンの呼気テスト(放射性物質をヒトに投与)

## II) プローブ薬物を投与しない非侵襲的な方法

- (c) 尿中  $6\beta$ -ヒドロキシコルチゾール/コルチゾール 比  
(コルチゾールの腎クリアランスによって変動)
- (d) 血中  $4\beta$ -ヒドロキシコレステロール(消失半減期が2.5日と非常に長い)
- (e) コルチゾール  $6\beta$ -水酸化代謝クリアランス  
(先行特許: US Patent 6,905,839)

*in vivo* 代謝活性を最も反映する指標は、当該酵素の関与する「代謝クリアランス」である

Watkins PB, *Pharmacogenetics* (1994)

様々な評価法が検討されてきたが、  
患者への負担が少なく、安全で正確、かつ簡便・迅速なフェノタイプ検査法はない

## 具体例 1

従来法:

ミダゾラム投与によるCYP3Aフェノタイピングに基づくドセタキセル投与量の予測  
(ミダゾラムの体内からの消失を CYP3A 活性の指標)

CYP3A活性評価の方法

ミダゾラム (テスト薬物) 投与:

2.5 mg 静脈内投与 (30 sec)

ミダゾラム体内動態のための採血:

静脈内投与開始後, 0, 15, 30, 60, 90,  
120, 210, 300 min

(合計 8 回)

対象: 32名 (男性16名, 女性16名; 41-75歳)

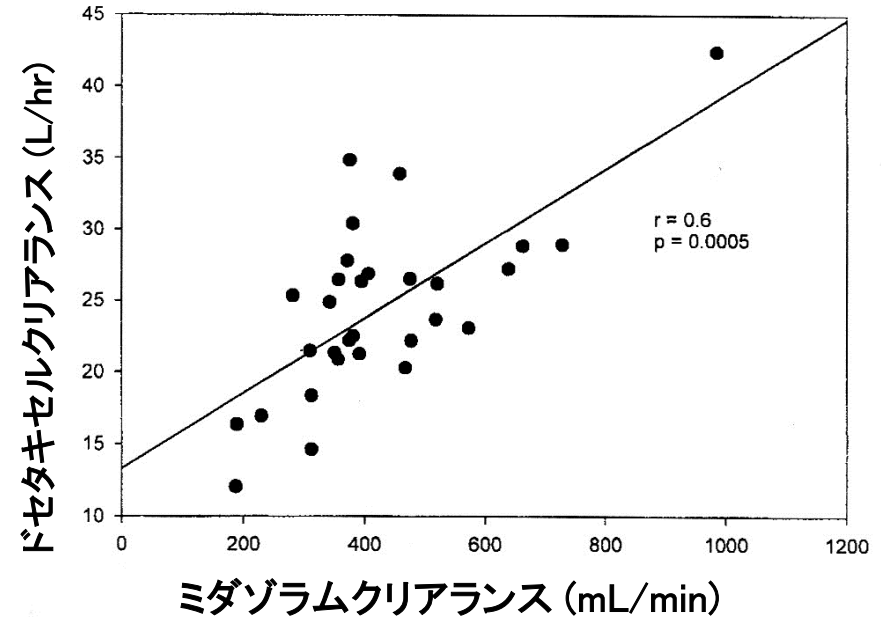


Fig 1. Correlation between midazolam and docetaxel clearances. Solid line is the regression line of best fit. Correlation coefficient ( $r$ ) and significance level ( $P$ ) are given.

Goh *et al.*, *J. Clin. Onol.* **20**, 3683-3690 (2002)

治療に不要な薬物の投与と複数回の採血が必要



患者、医療従事者の負担が大きい

テスト薬物によるCYP3A活性への影響が懸念される

テスト薬物が消失するまで次の活性評価ができない



経時的な活性評価はできない



研究では用いられるが臨床応用は困難

## 具体例 2

従来法:

放射性エリスロマイシン呼気テストによるCYP3Aフェノタイピングに基づくドセタキセル投与量の予測  
(エリスロマイシンの代謝により $^{14}\text{CO}_2$ が呼気中に排出される速度を指標)

### CYP3A活性評価の方法

$^{14}\text{C}$ -エリスロマイシン投与:

[ $^{14}\text{C}$ -N-methyl]erythromycin (3  $\mu\text{Ci}$ )

静脈内投与

投与前、投与後20 min の呼気を採取

対象: 21名 (男性12名, 女性9名; 19-72歳)

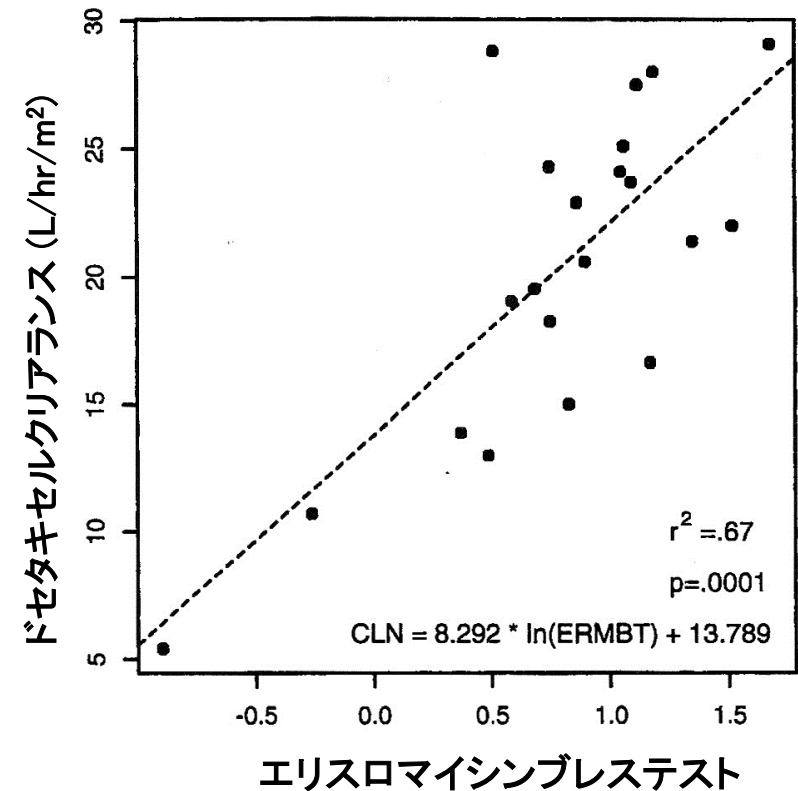


Fig. 2 Relationship between CL and phenotypic measurement of CYP3A4.

Hirth *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **6**, 1255-1258, (2000)

放射性同位体を用いることから日本では行われない

## 具体例 3

従来法:

コルチゾール投与によるCYP3Aフェノタイピングに基づくドセタキセル投与量の予測

コルチゾール代謝により生成する6β-ヒドロキシコルチゾールの尿中排泄量を指標

### CYP3A活性評価の方法

cortisol (300 mg) 静脈内投与

投与終了後24 hr 尿を採取

対象: 59名 (男性44名, 女性15名), 45-73歳

Yamamoto *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **23**, 1061-1069 (2005)

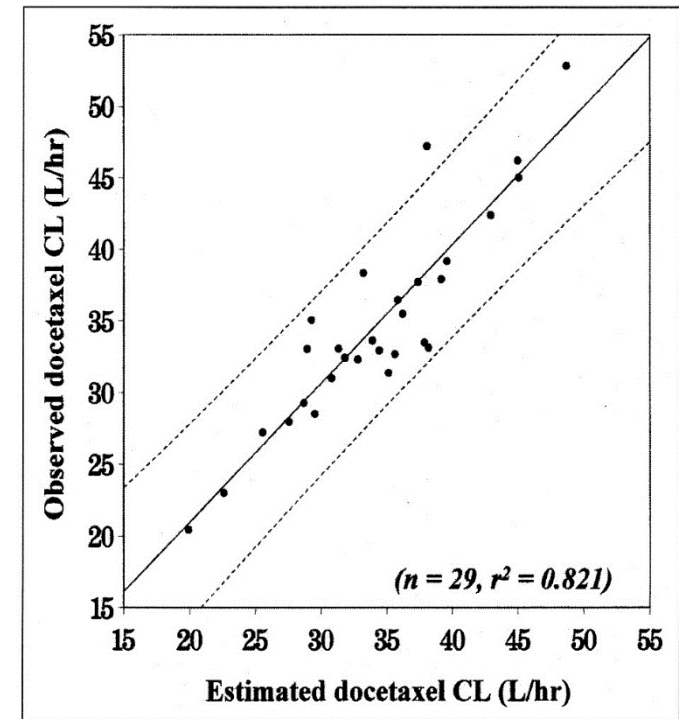


Fig 2. Correlation between the estimated and observed docetaxel clearance (CL) in the individualized arm (n= 29). (—) Linear regression line ( $r^2= 0.821$ ); ( - - - ) 95% CIs for individual estimates.

内因性コルチゾールの分泌量 (20 mg/day) と比較し多量を静脈内投与:

ネガティブフィードバックによる内因性コルチゾールの抑制が懸念される

24時間の採尿が必要

➡ 研究では用いられるが臨床応用は困難



# 海外におけるCYP3Aフェノタイプ検査法

## 1) 海外におけるフェノタイプ検査法の開発(抜粋)

### プローブ

ニフェジピン  
デキサメタゾン  
アルプラゾラム  
オメプラゾール  
DHEAなど  
アルフェンタニル  
アンチピリン

### 国名

ドイツ  
フランス  
スウェーデン  
カナダ  
中国  
米国  
オーストラリア

### 文献

Balogh, *Eur J Clin Pharmacol* (1998)  
Puisset, *Cancer Chemother Pharmacol* (2004)  
Wennerholm, *Eur J Clin Pharmacol* (2005)  
Zhang, *Clin Pharmacol* (2006)  
Li, *J Clin Pharmacol* (2010)  
Zhang, *Clin Pharmacol Thera* (2011)  
Michae, *Cancer Chemther Pharmacol* (2012)

### 内因性物質を利用

4β-hydroxycholesterol

### 国名

ドイツ, スウェーデン  
ドイツ  
米国

### 文献

Lütjohann, *Int J Clin Pharmacol Ther* (2009)  
Tomalik-Scharte *Clin Pharmacol Ther* (2009)  
Kasichayanula, *Brit J Clin Pharmacol* (2014)  
Lutz, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2010)  
Rais, *Exp Ther Med* (2013)  
Get, *Br J Clin Pharmacol* (1989)  
Shin, *Clin Pharmacol Thera* (2013)

6β-hydroxycortisol/cortisol

ドイツ  
ドバイ, インド

6β-hydroxycortisol 排泄量  
DEHA, cortisol等代謝物比

フランス  
韓国

## 2) 海外におけるフェノタイプ検査法応用例(抜粋)

### ミダゾラム血中濃度、ACU、1-水酸化ミダゾラム

急性腎障害患者の評価  
グレープフルーツジュース  
経口避妊薬  
性差

イギリス  
オランダ  
フィンランド  
中国

### 尿中6β-hydroxycortisol/cortisol

経口避妊薬 ドイツ  
グレープフルーツジュースの影響 スウェーデン, 中国  
死後のCYP3A活性 デンマーク  
アルコール中毒患者の活性評価 イタリア  
成長ホルモン補充療法患者の活性 スペイン

### ミダゾラムの全身クリアランス

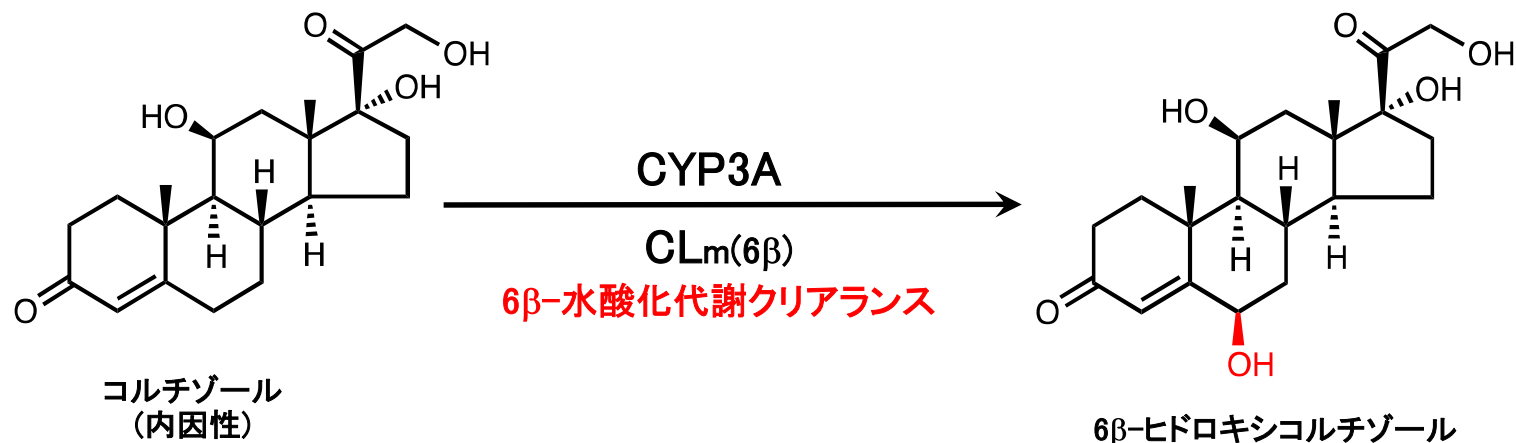
イリノテカン投与設計  
ドセタキセル投与設計

米国  
シンガポール

### エリスロマイシン呼気テスト

ドセタキセル投与設計 フランス, オーストラリア  
シクロスポリン投与設計 オーストラリア

先行特許: 内因性コルチゾールの6β-水酸化代謝クリアランス (CL<sub>m(6β)</sub>) による  
ヒト *in vivo* CYP3A フェノタイピング



$$CL_{m(6\beta)} = \frac{\text{尿中 6}\beta\text{-ヒドロキシコルチゾール排泄量}}{\text{血中コルチゾール濃度-時間曲線下面積}}$$

安全 (プローブ薬物を投与する必要がない)

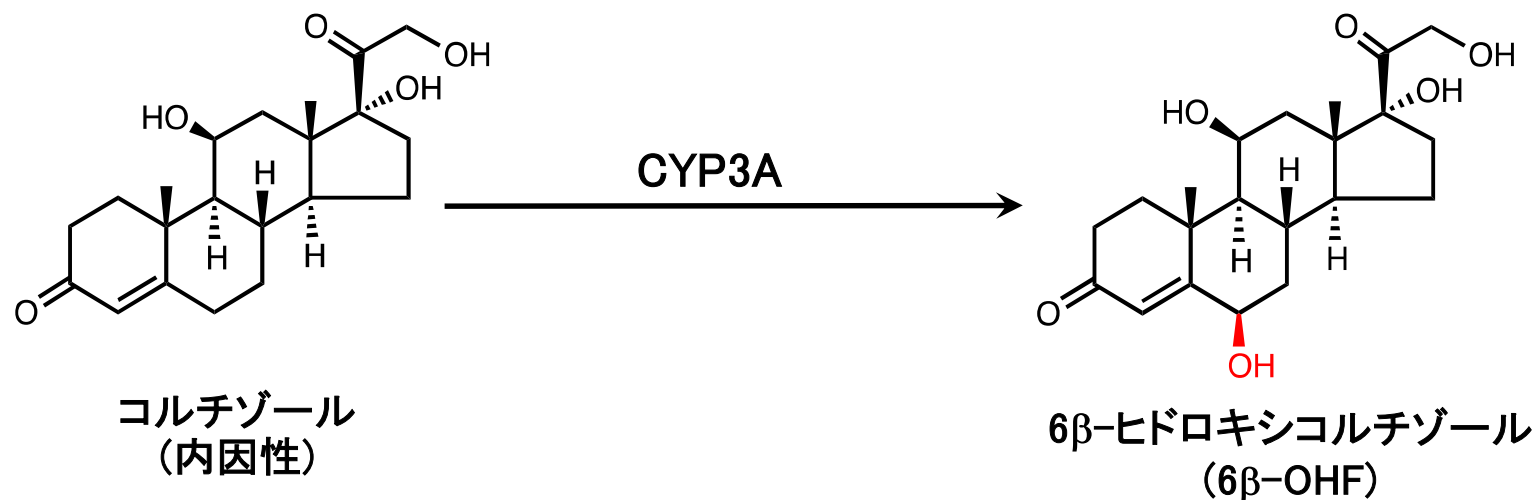
少なくとも1回の採血と採尿 (2時間) で評価

活性の変動をリアルタイムに把握できる (酵素阻害・誘導)

Furuta *et al. Drug Metab. Dispos.* (2003)

CYP3A活性評価のための新技術:

# ヒトにおけるCYP3A酵素活性の評価方法 (フェノタイプ検査法)



1) 血中濃度比による活性評価

$$\text{CYP3A活性} = \frac{\text{血中 } 6\beta\text{-ヒドロキシコルチゾール濃度}}{\text{血中 コルチゾール濃度}} \quad \text{比}$$

2) ピコリン酸誘導体化による血中6β-ヒドロキシコルチゾールとコルチゾールの高感度微量分析法

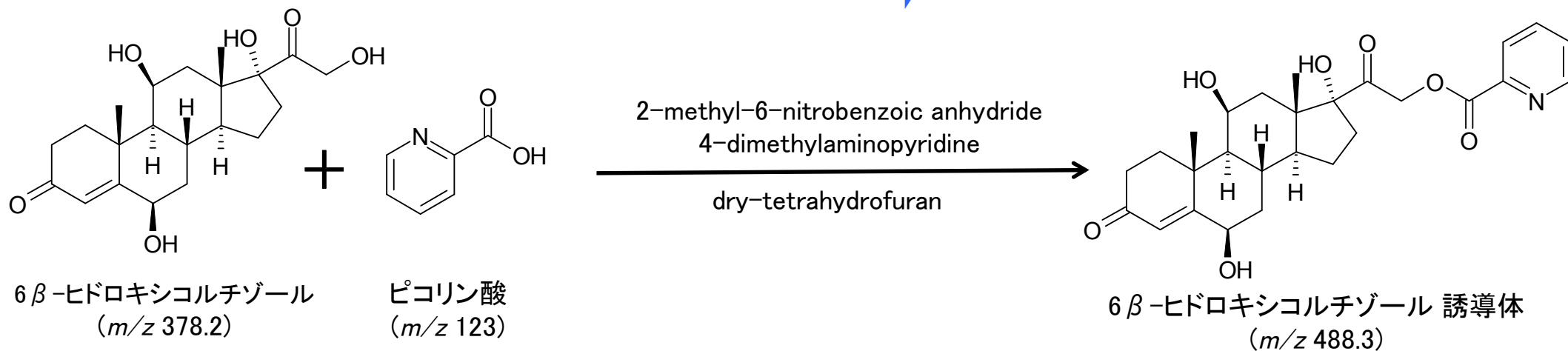
# ピコリン酸誘導体化

血中6β-ヒドロキシコルチゾール濃度は極めて微量:

- ・ 6β-ヒドロキシコルチゾールは血中で約1 ng/mL
- ・ 6β-ヒドロキシコルチゾールのLC-MS/MSの感度はコルチゾール, コルチゾンの1/5~1/10程度



ピコリン酸誘導体化により感度を上昇させる ➡ 微量の血液で評価できる

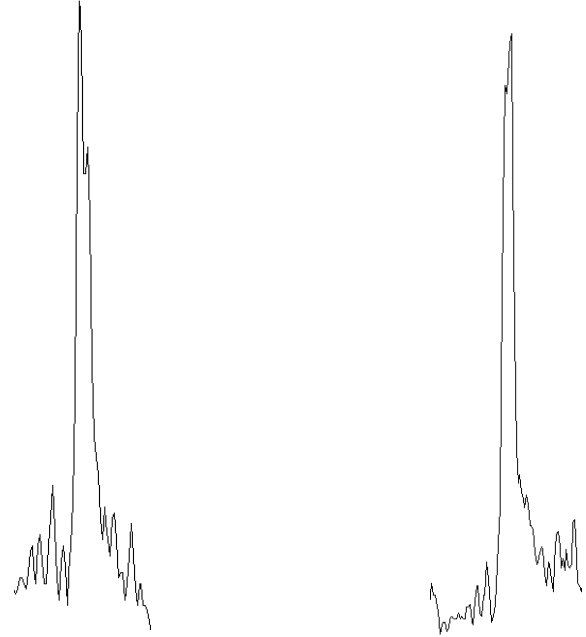


	純物質 (m/z)	誘導体 (m/z)	誘導化前後の質量数の差	Area倍率
コルチゾール	362.2	467.3	105.1	18.1 倍
コルチゾン	360.2	465.2	105.0	10.1 倍
6β-ヒドロキシコルチゾール	378.2	483.3	105.1	9.6 倍

# CYP3A活性評価のための新技術:

## ピコリン酸誘導体の検出限界 (6 $\beta$ -ヒドロキシコルチゾール)

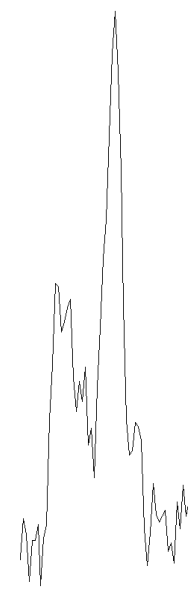
ピコリン酸誘導体  
(positiveモード)



0.5 pg/injection  
(S/N=5.2)

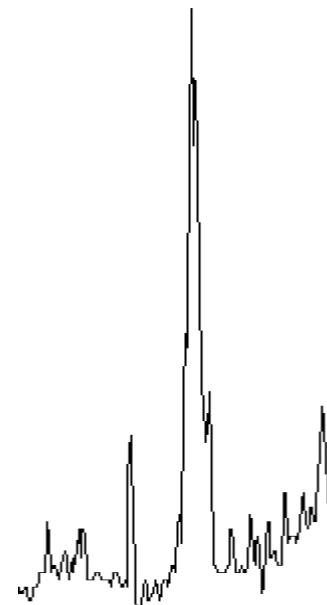
1 pg/injection  
(S/N=9.6)

非誘導体  
(positiveモード)



50 pg/injection  
(S/N=3.7)

非誘導体  
(negativeモード)



10 pg/injection  
(S/N=3.7)

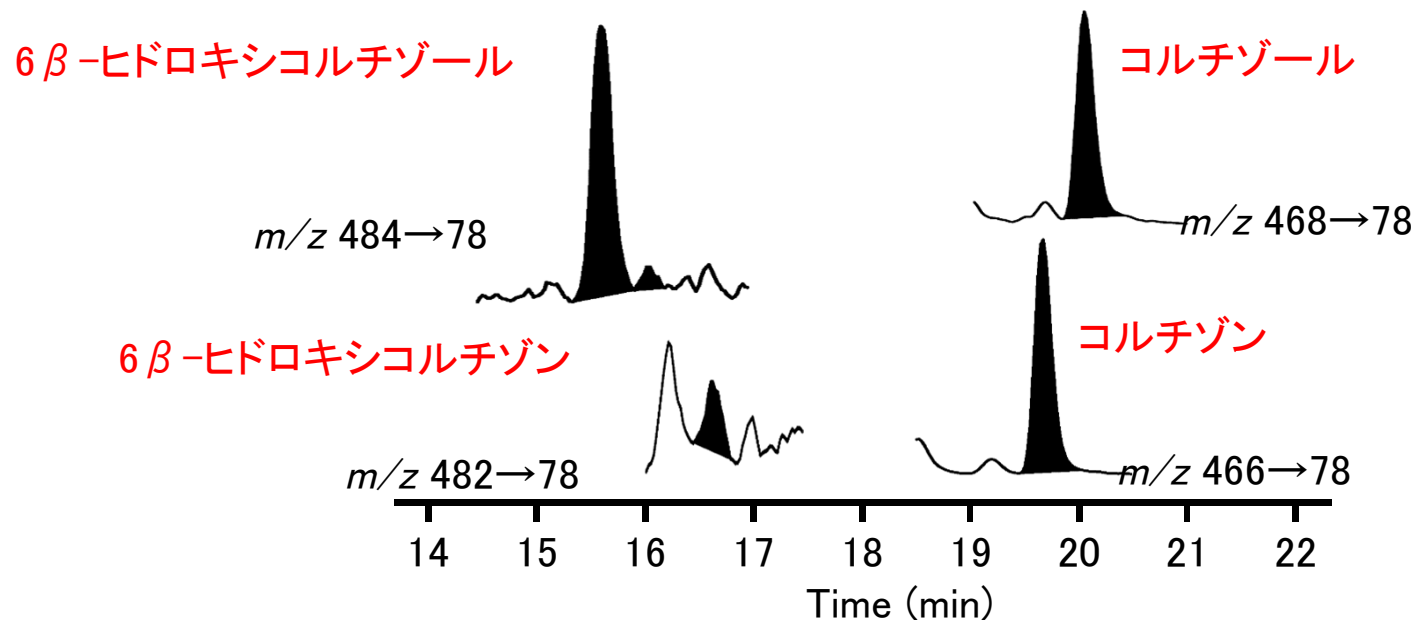
ピコリン酸誘導体化により、6 $\beta$ -ヒドロキシコルチゾールの測定感度が20~100倍上昇した



少量採血 (100~200  $\mu$ L) でCYP3A酵素活性評価が可能となる

# CYP3A活性評価のための技術:

## LC-MS/MSによる血中ステロイドとステロイド代謝物の濃度定量



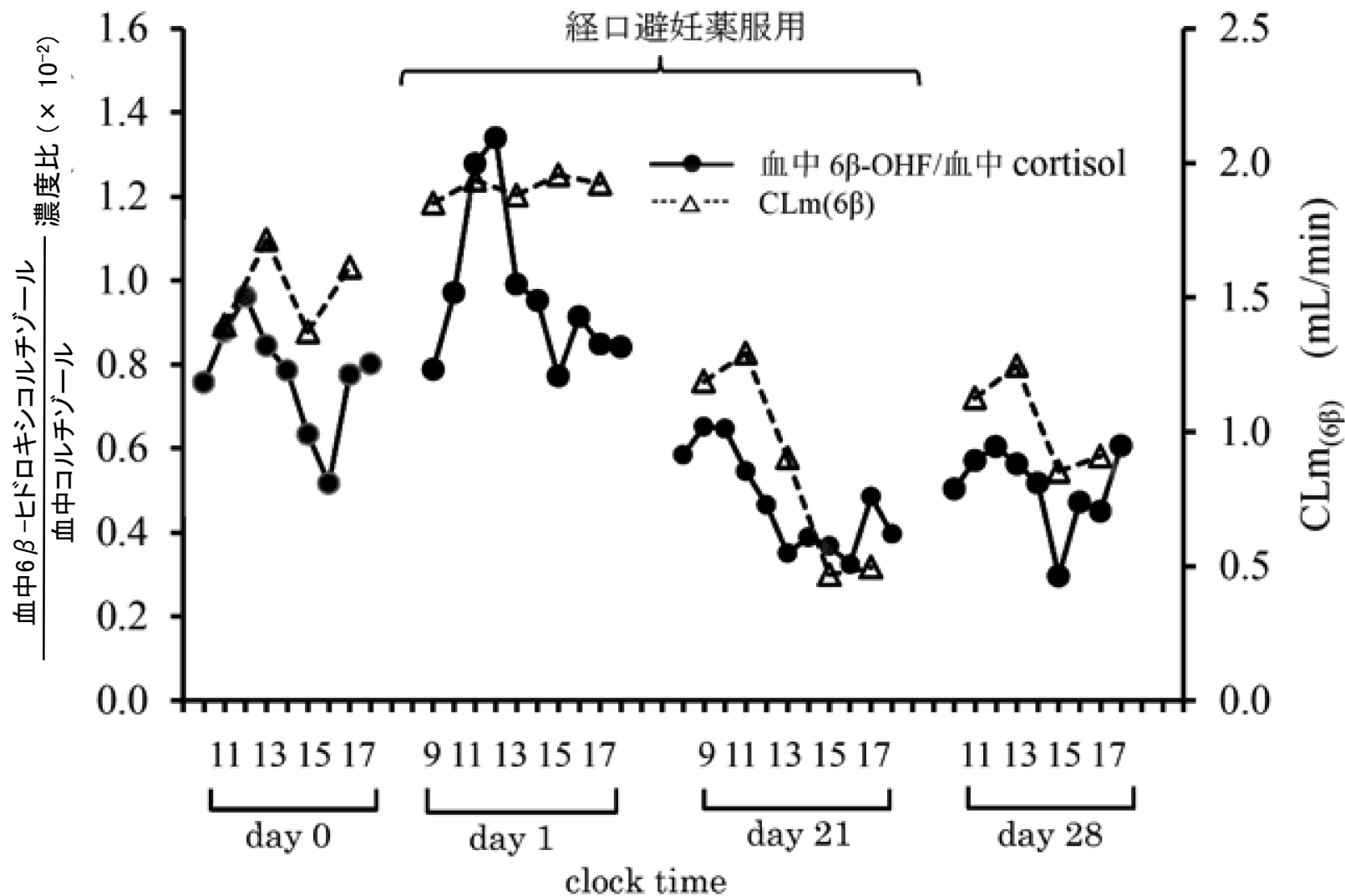
健常成人 (n = 4) におけるコルチゾールと代謝物の血中濃度

subject	6β-ヒドロキシコルチゾール (ng/mL)	6β-ヒドロキシコルチゾン (ng/mL)	コルチゾール (ng/mL)	コルチゾン (ng/mL)
1	0.49	0.21	75.0	18.8
2	0.67	0.19	46.4	17.5
3	2.21	0.31	127.1	34.9
4	1.43	0.20	111.0	32.0

4種を同時定量できる: 血中 6β-ヒドロキシコルチゾール/コルチゾール濃度比  
血中 6β-ヒドロキシコルチゾン/コルチゾン濃度比  
による活性評価が可能

CYP3A活性評価のための新技術:

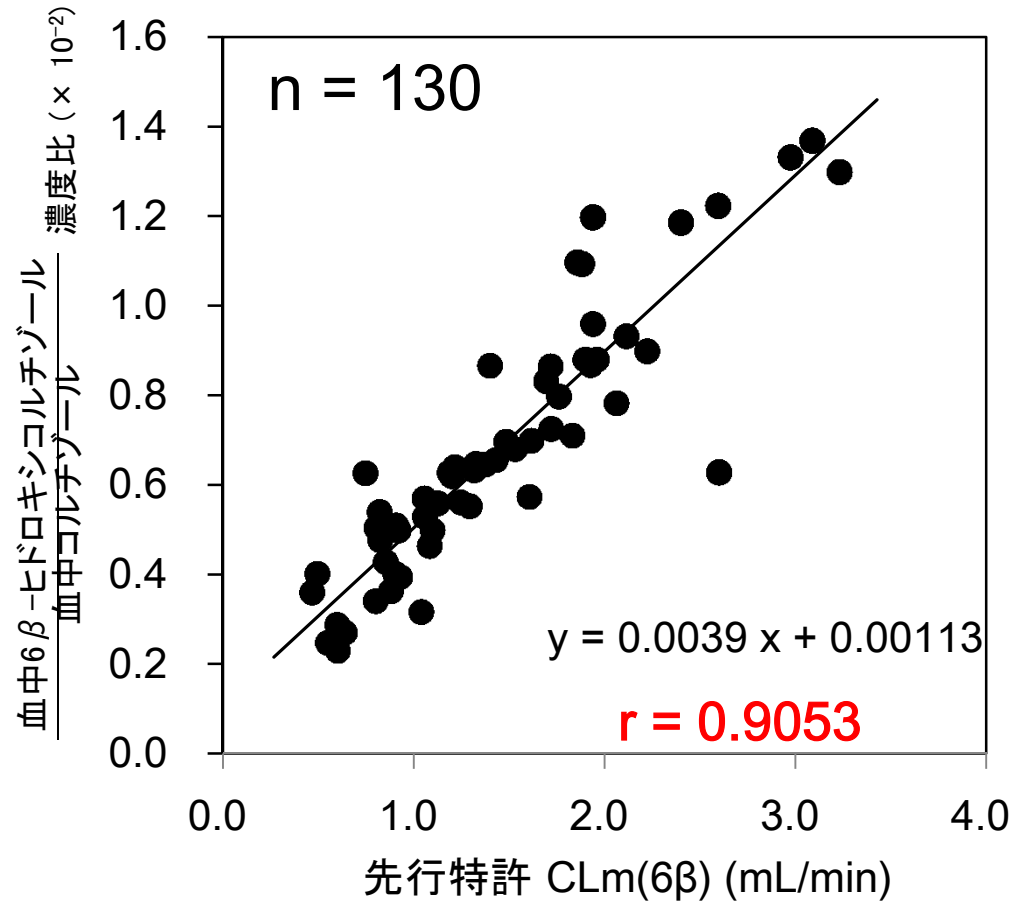
経口避妊薬服用時のCYP3A活性評価(応用例)



血中6β-ヒドロキシコルチゾール／コルチゾール濃度比は、先行特許の「CLm(6β)」と同様の変動を示したことから、有用な活性評価法であることを確認した

# CYP3A活性評価のための新技術:

## 本発明と先行特許によるCYP3A活性の相関



血中ステロイド代謝物比 (血中 6β-ヒドロキシコルチゾール / コルチゾール濃度比)

先行特許の「内因性コルチゾールの6β-水酸化代謝クリアランス」と良好な相関性を示し、正確にCYP3A活性の変動を捉えているといえる



新規ヒト *in vivo* CYP3A酵素活性の指標(フェノタイプ検査法):

血中 6 $\beta$ -ヒドロキシコルチゾール/コルチゾール比

血中 6 $\beta$ -ヒドロキシコルチゾン/コルチゾン比

安全性が高い: プローブ薬物の投与が不要

患者への負担が少ない: 1回の採血、少量の血漿(100-200  $\mu$ L)、蓄尿が不要

正確な方法: 血中濃度比が6 $\beta$ -水酸化代謝クリアランスと高い相関

簡便かつ迅速: 血中6 $\beta$ -ヒドロキシコルチゾールとコルチゾールを同時に測定

低コスト: 低ランニングコスト

安全・簡便にCYP3A酵素活性評価

生化学検査のような臨床検査としてのCYP3Aフェノタイプ検査法



臨床検査、医薬品開発における強力なツールとなる

個別化投与設計に適用可能: 投与量設定の困難な薬物(免疫抑制剤や分子標的抗がん剤など)の初期投与設計ができる

新生児などの評価も可能: 未熟児、新生児期の薬物治療を安全かつ有効に行うことができる

妊婦・授乳婦への応用も可能: 血漿量やタンパク結合率が変動する妊娠時の薬物治療を安全に行える

誘導・阻害をリアルタイムで活性評価が可能: 薬物相互作用による体内動態変動を把握した投与設計が可能

連続的な活性評価にも応用可能: 薬物や食品による酵素誘導・酵素阻害作用を経時的に評価できる

# 血中6β-ヒドロキシコルチゾール／コルチゾール濃度比を用いた CYP3A活性評価に基づく個別化投与設計

CYP3A活性より  
薬物クリアランス予測法の確立

CYP3A 活性評価

$\frac{\text{血中 } 6\beta\text{-ヒドロキシコルチゾール濃度}}{\text{血中 コルチゾール濃度}}$  比

相関性の確立

薬物のクリアランス

経時的な採血による体内動態  
パラメータの算出

CYP3A活性より  
薬物のクリアランスを予測した投与設計

CYP3A 活性評価

$\frac{\text{血中 } 6\beta\text{-ヒドロキシコルチゾール濃度}}{\text{血中 コルチゾール濃度}}$  比

薬物のクリアランスを予測

薬物のクリアランスを考慮した  
投与量の設定

## 1) 臨床(病院)、臨床検査会社における活用

### 臨床におけるCYP3A活性に基づく個別化薬物治療

投与量設定の困難な薬物の初回投与設計

投与量設定の困難な患者の投与設計

(新生児、妊婦、高齢者、多剤併用患者、等)

### 臨床検査における簡便かつ迅速なCYP3Aフェノタイプ検査法

臨床検査項目: 薬物投与設計の指標としてのCYP3A活性評価

プローブ薬物の投与を必要とせず、1回の少量採血により酵素活性を評価できる

遺伝子多型診断に代わる生化学検査項目として、臨床上のニーズが高い

## 2) 製薬会社における活用

### 医薬品開発における薬物相互作用(酵素誘導および阻害)の評価

医薬品開発におけるCYP3A活性への影響の検討

新規薬物による酵素誘導および阻害の検討

(リアルタイムに評価できる)

## 3) 海外における活用

患者一人ひとりに適した薬物療法の確立は、国の内外を問わず各国共通の目標、使命

# 血中6β-ヒドロキシコルチゾール／コルチゾール濃度比によるCYP3A活性評価： まとめ

## 本法の新規性・進歩性

1回の少量採血 (100~200 μL) でCYP3A酵素活性評価 ➡ 安全で簡便

## 臨床における応用性

現在行われている個別化薬物治療

- 1) イリノテカンの投与設計: UGT1A1 の遺伝子多型診断 (保険適用)
- 2) エリグルスタットの投与設計: CYP2D6 遺伝子多型検査 (先進医療 2015年9月~)
- 3) CYP2C19 遺伝子多型検査に基づくテラーメイドのヘリコバクター・ピロリ除菌療法 (先進医療 2007~2016年)

## 遺伝子多型診断

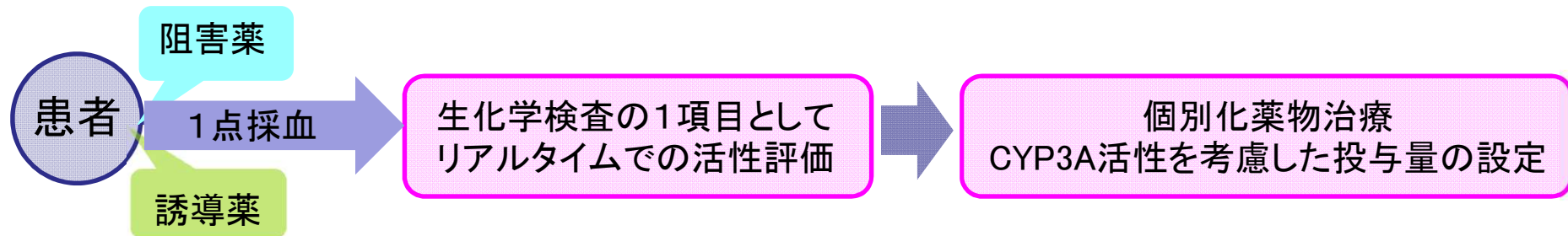
1回の採血で酵素の活性が分かる  
誘導や阻害の影響は評価できない  
50%以上の薬物の代謝に関与するCYP3A活性は遺伝子多型で評価できない

本発明では、

1点の採血でCYP3Aフェノタイプ検査が可能

誘導・阻害を考慮したリアルタイムでの活性評価が可能

CYP3A活性の変化を経時的に把握できる



個別化薬物治療「患者一人ひとりに適切な投与法の指標となる」

# 本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称: ヒトにおけるCYP3A酵素活性の評価方法  
(フェノタイプ検査法)
- ・ 出願番号 : PCT/JP2016/66683
- ・ 出願人 : 東京薬科大学
- ・ 発明者 : 柴崎浩美、古田 隆  
横川彰朋、平野良平

# お問い合わせ先

## ◆ 東京薬科大学

産学官共同研究推進センター

産学連携担当 岩清水 貴嗣

TEL:042-676-5349 FAX:042-676-4714

e-mail [gshinko@toyaku.ac.jp](mailto:gshinko@toyaku.ac.jp)

## ◆ タマティーエルオー株式会社

研究成果移転事業部 松永義則

Tel: 042-631-1325 Fax: 042-649-2269

E-mail : [matsunaga@tama-tlo.com](mailto:matsunaga@tama-tlo.com)