

クッシング症候群治療薬メチラポンの
代謝動態に関する研究

June, 2017

村田 秀之

**Research on the oral pharmacokinetics and
metabolism of metyrapone**

Hideyuki Murata

Research on the oral pharmacokinetics and metabolism of metyrapone

Hideyuki Murata

Metyrapone with a ketone group is well known as inhibitor of 11 β -hydroxylase which is the enzyme involved in the biosynthesis of cortisol. This drug is used clinically as a therapeutic drug for the treatment of Cushing's syndrome. Although the clinical route is an oral administration, the plasma pharmacokinetics has not been reported in experimental animals and has not been evaluated in humans in details. In addition, there are few reports related to MP metabolism in both experimental animals and humans. Furthermore, the determination method of MP and its metabolites has not been completely established. In this study, after the method to simultaneously determine MP and its metabolites was developed, the pharmacokinetics was evaluated in *in vitro* and *in vivo* studies.

1) Development of simultaneous determination of MP and its metabolites

High-performance liquid chromatography ultra violet detection (HPLC-UV) method was developed to simultaneously determine MP and its five metabolites. The total run time was 65 min including HPLC column washing. No interfering peaks were obtained for plasma, urine and microsomal (Ms), cytosolic (Cyt) and mitochondrial (Mit) fractions in all the tested tissues. The calibration curves were constructed by plotting the peak-height ratio of MP and its metabolites to the IS in the range of 1.13 - 90.0 ng/mL, which all the correlation coefficient were 0.999. The lower limit of quantification (LLOQ) defined as the lowest concentration on the calibration curve, which the high sensitive analysis was developed by HPLC-UV.

2) Pharmacokinetics after a single oral administration of MP to male Wistar rats

When MP was orally administered at a dose of 50 mg/kg to male Wistar rats, MP was rapidly absorbed followed by rapid decline. By the rapid elimination, metyrapol (MPOL), metyrapone *N*-oxide II (MP NOII) and metyrapol *N*-oxide II (MPOL NOII) were immediately detected in plasma. On the other hand, only a

very small amount of MP was excreted in the urine. Taking into account these results, the rapid elimination of MP from plasma was more likely due to the rapid production of the above MP metabolites. Four metabolites (MPOL NOII>MP NOII>MPOL NOI>MPOL) were excreted in urine, which were different from the kinds and the rates of metabolites reported in male Sprague-Dawley (SD) rats. When the metabolic pathway of MP was predicted based on the amount of the metabolites observed in plasma and urine, it was presumed that MPOL NOII and MPOL NOI were produced from MPOL but not MP NOII and MP NOI.

3) *In vitro* metabolism of MP in the subcellular fractions of tissues in male Wistar rats

MP reductive and oxidative enzyme activities were investigated in the three subcellular fractions to clarify the primary tissue responsible for production of MP metabolites. Regarding the reductive enzyme activity to MPOL, it was suggested that the major metabolic tissue was the liver, judging from tissue weights. In addition, the activity was also highly observed in Ms and Mit of testis. On the other hand, the reductive and/or oxidative activities to other MP metabolites were too low in all the tissues to evaluate the major metabolic tissues. When sex difference in MP reductive activity in the liver Ms of rats was investigated, the difference was significantly observed from puberty. On the other hand, the developmental pattern of the activities from birth to adult age was different from that of the reductive activities of acetohexamide (AH) with a ketone group in previous report. In addition, MP reductive enzyme partially purified from the liver Ms of male Wistar rats did not metabolize AH, indicating that reductive enzyme of MP was different from that of AH. Higher MP reductive activity in males than in females is likely to be dependent on testosterone. Sex difference was also observed in the liver or kidney Ms and Cyt of five animals including rats.

4) Inhibition of MP metabolism in the subcellular fractions of tissues

The major enzyme involved in MP reductive and oxidative metabolism was investigated using the specific inhibitors of enzyme. It was suggested that 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) 1

mainly involved in the reductive metabolism to MPOL in Ms and Mit in the liver of male Wistar rats, and that cytochrome P450 (CYP) mainly involved in the oxidative metabolism to MP NOII. When the inhibition constant (IC_{50}) of the reductive activity for 11 β -HSD1 inhibition was calculated in the Ms and Mit, glycyrrhethinic acid (GA), a selective 11 β -HSD1 inhibitor, inhibited the activity in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of 0.62 and 0.10 μ M, respectively. In addition, in testis with the secondary higher MP reductive activity, the activities in the Ms and Mit were inhibited by GA in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of 0.13 and 0.07 μ M, respectively. The effect of 11 β -HSD1 inhibition by the co-administration of GA on the pharmacokinetics of MP and its metabolites was investigated in an *in vivo* study. By the co-administration of GA, MPOL and MPOL NOII plasma concentrations decreased contrary to the increase in MP and MP NOII plasma concentrations. MP reductive and oxidative enzyme activities were also evaluated in the liver Ms, Cyt and Mit of humans. Similar to the results of male Wistar rats, the reductive metabolic activity to MPOL and the oxidative activity to MP NOII were the highest in the Ms. Taking into account these metabolic activities and the proposed MP metabolic pathway in male Wistar rats, it was guessed that the production pathways of three metabolites (MPOL, MPOL NOII and MP NOII) in humans were similar to the rats. From the viewpoint of inhibitor sensitivities, it was suggested that the major enzyme involved in MP reductive (MPOL) and oxidative (MP NOII) metabolism were 11 β -HSD1 and CYP, respectively, similar to male Wistar rats.

In conclusion, the present study elucidated the plasma pharmacokinetics and metabolites of MP in male Wistar rats after an oral administration. In addition, the study suggested that the major enzymes involved in MP reductive and oxidative metabolism were 11 β -HSD1 and CYP, respectively, in both male Wistar rats and humans. The metabolism of MP in humans would be similar to that in male Wistar rats, judging from the metabolic activities of MP to the three metabolites (MPOL, MPOL NOII and MP NOII) and the proposed MP metabolic pathway in the rats. Therefore, male Wistar rats could be a relevant species for use in predicting drug-drug interactions of MP in humans.

本論文で使用した略号一覧表

AH	アセトヘキサミド	acetohexamide
AUC _∞	0 時間から無限大時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinite time
AUC _{last}	0 時間から最終定量可能時間までの血清 中濃度-時間曲線下面積	area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last quantifiable time
AUC _t	0 時間から t 時間までの血漿中濃度-時 間曲線下面積	area under the plasma concentration-time curve from time zero to time t
C _{max}	最高血漿中濃度	maximum plasma concentration
CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
Cyt	サイトゾール画分	cytosol fraction
GA	グリチルレチン酸	glycyrrhetic acid
GC/MS	ガスクロマトグラフィー-質量分析	gas chromatography-mass spectrometry
G-6-P	グルコース-6-リン酸	glucose-6-phosphate
G-6-PD	グルコース-6-リン酸脱水素酵素	glucose-6-phosphate dehydrogenase
HPLC-UV	高速液体クロマトグラフィー紫外検出	high performance liquid chromatography-ultraviolet detection
11β-HSD	11β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素	11β-hydroxysteroid dehydrogenase
IC ₅₀	50% 阻害濃度	50% inhibitory concentration
LC/MS	液体クロマトグラフィー-質量分析	liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー-タンデム質 量分析	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LLOQ	定量下限	lower limit of quantification
Mit	ミトコンドリア画分	Mitochondria fraction
MP	メチラポン	metyrapone
MPOL	メチラポール	metyrapol
MP NOI	メチラポン N-オキシド I	metyrapone N-oxide I
MP NOII	メチラポン N-オキシド II	metyrapone N-oxide II
MPOL NOI	メチラポール N-オキシド I	metyrapol N-oxide I
MPOL NOII	メチラポール N-オキシド II	metyrapol N-oxide II
Ms	ミクロソーム画分	Microsomal fraction
NADP ⁺	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチ ドリン酸	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチ ドリン酸 (還元型)	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
SD	—	Sprague-Dawley
SDR	—	short chain dehydrogenase/reductase
S9	9,000g 上清	9,000g supernatant
t _{1/2}	消失半減期	elimination half-life
t _{max}	最高血漿中濃度到達時間	time to reach the maximum plasma concentration

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- (1) Postnatal development and sex-related difference of metyrapone reductase activities in liver microsomes and cytosol of the rat
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, **82(1)**, 101-10 (1993)
Imamura Y, Murata H and Otagiri M
- (2) Metyrapone reductase purified partially from liver microsomes of male rats: the enzyme differs from acetohexamide reductase
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, **96(2)**, 219-26 (1997)
Imamura Y, Murata H and Otagiri M
- (3) Oral pharmacokinetics and in-vitro metabolism of metyrapone in male rats
Journal of Pharmacy and Pharmacology, **68(8)**, 970-9 (2016)
Murata H, Higuchi T and Otagiri M
- (4) *In vitro* and *in vivo* inhibition of metyrapone metabolism by glycyrrhetic acid in male Wistar rats
Journal of Pharmaceutics and Pharmacology, **4(1)**, 1-6 (2016)
Murata H, Higuchi T and Otagiri M

目次

第1章 緒言	1
第2章 MP およびその5種類の代謝物のHPLC-UVによる同時定量法の確立	6
第1節 序	6
第2節 MP およびその5種類の代謝物の測定法の確立	6
第3節 考察	10
第4節 小括	11
第3章 Wistar 雄ラットにおけるMP およびその代謝物の薬物動態	12
第1節 序	12
第2節 MP 単回経口投与後のMP およびその代謝物の血漿中薬物動態	13
第3節 MP 単回経口投与後のMP およびその代謝物の尿中排泄	15
第4節 考察	17
第5節 小括	19
第4章 MP の各組織における <i>in vitro</i> 代謝	22
第1節 序	22
第2節 各組織の細胞画分におけるMP の酸化的小よび還元的代謝	23
第3節 ラットにおけるMP 還元酵素活性に及ぼす内的要因の影響	27
3-1. MP 還元酵素活性の週齡差および性差	27
3-2. MP 還元酵素活性に及ぼす去勢の影響	29
3-3. 肝臓におけるMP 還元酵素活性の性差	31
3-4. 腎臓におけるMP 還元酵素活性の性差	33
3-5. ラット肝 Ms から部分的に精製されたMP 還元酵素の基質特異性	35
第4節 考察	36
第5節 小括	41
第5章 MP の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 代謝過程における薬物相互作用	43
第1節 序	43
第2節 ラット肝および副腎におけるMP 還元的および酸化的小よび代謝に対する各種阻害剤の影響	44
第3節 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> におけるMP 代謝に及ぼすGA の影響	46
3-1. ラット肝におけるMP 還元酵素活性に及ぼすGA の影響	46
3-2. ラット精巢におけるMP 還元酵素活性に及ぼすGA の影響	48
3-3. MP およびMPOL の血漿中薬物動態に及ぼすGA 併用投与の影響	50
3-4. MPOL NOII, MP NOII およびMP NOI の血漿中薬物動態に及ぼすGA 併用投与の影響	52
第4節 ヒトにおけるMP 代謝に関するラットとの比較考察	55

4-1. ヒト肝における MP の還元的および酸化的代謝活性	55
4-2. ヒト肝における MP 還元的および酸化的代謝に対する各種阻害剤の影響	56
第 5 節 考察	57
第 6 節 小括	61
第 7 章 総括	64
実験の部	69
謝辞	80
参考文献	81

第1章 緒言

医薬品の開発において、吸収、分布、代謝および排泄に関する薬物動態試験は有効性および安全性と同様に、臨床使用時での医薬品の適正使用に有用な情報を与える^{1,2)}。特に、医薬品の血漿中濃度が薬効発現 (pharmacokinetic/pharmacodynamic) および毒性発現 (toxicokinetics/toxicodynamics) の強さならびに持続時間と密接に関連していることが多く、実験動物を用いた *in vivo* および *in vitro* 試験の結果に基づき臨床試験が進められている^{1,3)}。このため、一般に臨床試験前にげっ歯類および非げっ歯類等を用いた非臨床薬物動態試験が実施されている¹⁾。げっ歯類ではラットが汎用されており、他の実験動物に比べて薬物動態試験の情報が多いため、これに伴い、ラットはヒトと比較可能な情報が多いことから、ヒトにおける新規薬物の体内動態を予測するために有益な情報が得られやすい場合が多い。それゆえ、ラットを用いた薬物動態の基礎研究は、ヒトの薬物動態を予測する上で重要な位置づけとなっている。

投与された薬物は各組織に分布し、各組織に存在する薬物代謝酵素によって一般に体外へ排泄されやすい極性の高い構造に代謝され、その効力を失う^{1,3)}。しかしながら、生成された代謝物が活性または毒性を有する、いわゆる活性代謝物となる場合があり、薬物代謝が薬物の有効性および安全性に影響を及ぼす重要な要因の1つとなっている^{4,5)}。それゆえ、薬物の代謝試験によりその代謝特性を解明することは、薬物の体内動態、有効性および安全性に関する基本的な情報源となる。特に、薬物が多代謝経路によって複数の代謝物に変換される場合、それらの代謝動態の全容を明らかにすることは、有効性および安全性の観点から医薬品の適正使用を図る上できわめて重要である。

薬物の代謝反応には第一相の酸化反応、還元反応および加水分解、ならびに第二相の抱合反応があり、各代謝反応に関与する酵素には多くの種類が認められている⁵⁾。これらの薬物代謝酵素のうち、シトクロム P450 (CYP) は様々な薬物および異物を代謝する重要な酵素であり、すでに多くの分子種が同定されている⁶⁾。一方、薬物には官能基としてケトン基を有するものも多く認められ、その多くは short chain dehydrogenase/reductase (SDR) スーパーファミリーおよびアルドーケト還元酵素ファミリーなどによって還元され、極性の高い第二級アルコールに代謝される^{7,8)}。この酵素ファミリーには、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (還元型)

(NADPH) を補酵素として要求するアルデヒド還元酵素, カルボニル還元酵素, アルドース還元酵素, アルコール脱水素酵素および 11 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (11 β -HSD) などが含まれる^{7,8,9)}。これらの酵素は種々の臓器や組織のミクロソーム画分 (Ms) やサイトゾール画分 (Cyt) に存在するが, いずれも分子多様性を示すため, 同じケトン薬物でも化学構造の相違により代謝酵素も異なることが認められている⁷⁻⁸⁾。それゆえ, CYP 非依存性の薬物代謝の 1 つとして, ケトン基を有する薬物の代謝に関する詳細な試験も必要である。

メチラポン (MP : Fig. 1) はケトン基を有する薬物であり, 古くから下垂体機能診断薬として使用されてきたが, 最近, クッシング症候群の経口治療薬としても使用され, 本薬の薬効の重要性が認識されつつある¹⁰⁾。

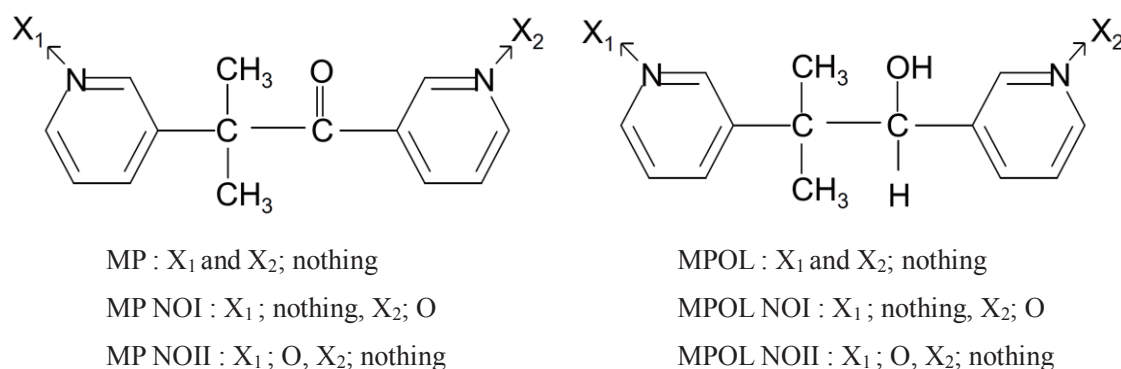


Fig. 1. Chemical structures of MP and its metabolites

これまでに, 実験動物に MP を投与した体内動態に関して, いくつか報告されている。すなわち, Sprague-Dawley (SD) 雄ラットに MP を単回静脈内投与したとき, 血漿中では MP の速やかな消失, および MP のケトン基が還元されたメチラポール (MPOL : Fig. 1) の速やかな生成が認められている^{11,12)}。また, SD ラットに単回腹腔内投与したとき, 血漿中に MPOL が, 尿中に 5 種類の代謝物 (MPOL, 左右のピリジン環が酸化された 2 種の *N*-oxide 体である MP NOI および II, ならびに MPOL *N*-oxide 体である MPOL NOI および II : Fig. 1) が認められ, このうち MPOL NOI および MPOL NOII が尿中に多く排泄され, MPOL は少なかったことが報告されている^{13,14)}。この

ように、腹腔内投与において尿中に5種類の代謝物が認められているにもかかわらず、静脈内および腹腔内投与ともに血漿中代謝物としてMPOLに関する知見しか得られておらず、血漿中での主代謝物はMPOL以外の代謝物(MPOL NOI および MPOL NOII など)の可能性も考えられる。また、MPは経口投与剤として臨床適用されている薬剤であるが、実験動物にMPを経口投与した薬物動態解析データは見当たらない。さらに、MPをヒトに経口投与した報告はあるが、MPOL以外の代謝物の血漿中薬物動態は不明であり、MP代謝の全容解明に至っていない¹⁵⁾。それゆえ、ラットにMPを経口投与したときのMPおよびその複数の代謝物の血漿中薬物動態を明らかにすることは、ヒトにおけるMPの薬物動態を考える上で貴重な基礎データになると考えられる。

MPの代謝に関する知見は、雌雄実験動物の組織の細胞画分を用いたいくつかの*in vitro*代謝研究から得られている。雄のSDラットおよびalbinoマウスの肝Msにおいては、MPの代謝物はMPOL、MP NOI および MP NOII の3種類の生成が確認されている¹⁶⁾。また、雌のSDおよびWistarラットならびにNMRIマウスの肝臓、卵巣、副腎、腎臓のMsおよびCytにおいては、MP還元酵素活性のみ検討している¹⁷⁾。一方、MP還元酵素活性はWistarラットの方がSDラットよりも高いことが認められている¹⁸⁾、WistarラットにおけるMP代謝に関するさらなる詳細な知見は見当たらない。一般に、ラットにおいては、薬物代謝酵素活性に系統差のほか、性差および年齢(週齢)差が認められることがある¹⁹⁻²²⁾。事実、Wistarラットにおける経口糖尿病薬アセトヘキサミド(AH)のケトン基の還元的代謝活性に性差および年齢差による変動が認められている^{23,24)}。このような内的要因による薬物動態の変動に関する知見もまた、ヒトにおける適切な薬物治療を行う上で重要な情報源となる。それゆえ、WistarラットにおけるMPの代謝酵素活性について、SDラットと異なる可能性、ならびに内的要因による変動の有無およびAHと変動の異なる可能性を検討することは興味深い。

MPの還元的代謝、すなわちMPOLの生成にはいくつかの代謝酵素の関与が報告

されている。Maser らは、雌 NMRI マウス肝 Ms ではアルデヒド還元酵素および 11 β -HSD、ヒト肝 Cyt では DT-ジアホラーゼ（ジクマロールによる阻害）およびジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ（インドメタシンによる阻害）などの代謝酵素が MP 還元的代謝を触媒することを示唆している^{18,25,26}。また、Wistar 雌ラット副腎および卵巣 Cyt では、MP 還元的代謝にカルボニル還元酵素（クエルシトリンによる阻害）が関与することを示唆している¹⁷。このように、MP から MPOL への代謝に関与する酵素にはいくつかの報告があるものの、その代謝組織と代謝酵素の分布は各動物およびヒトとの間で検討した組織の細胞画分が異なり、MP 還元酵素について不明な点が多いのが現状である。特に、Wistar ラットにおいてはその詳細は明らかにされていないため、MP の主要な代謝酵素の種類およびその種差についての検討もヒトの薬物動態を予測する上で重要である。また近年、ケトン還元酵素を含め、多くの薬物代謝酵素がミトコンドリア画分 (Mit) にも認められている⁸。しかし、MP が各組織・臓器の Mit において代謝されるか否かは不明である。さらに、MPOL 以外の代謝物に関する知見は非常に少なく、Martini らによって推定された MP の代謝経路は十分に解明されていない²⁷。

ところで、臨床では治療目的を果たすために他剤併用で処方される場合が多く、併用した薬物が阻害剤または誘導剤となる場合、薬物動態学的相互作用が生じる場合がある^{28,29}。ヒトにおける薬物代謝に関する薬物相互作用の予測は、主要な代謝組織の細胞画分での *in vitro* 代謝、またはラットなどの実験動物に投与したときの血漿中薬物動態の試験結果に基づいて行われる³⁰⁻³²。しかし、MP は臨床で使用されているにもかかわらず、ヒトを含めて併用薬による MP の薬物動態学的相互作用に関する情報は見当たらず、実験動物を用いた薬物相互作用試験はヒトにおける MP の薬物動態の予測に有用と考えられる。それゆえ、臨床投与経路である経口投与における MP の代謝動態を解明することが、併用薬との薬物相互作用を考える上でも必須である。

本研究では、MP は経口投与剤であるにもかかわらず、実験動物における経口投与

後の体内動態データがないこと、MP還元酵素活性はWistarラットの方がSDラットよりも高いにもかかわらずWistarラットにおけるデータが少ないこと、WistarラットにおけるMP還元酵素活性に性差および年齢差がある可能性などを踏まえ、まず、MPおよびその5種類のMP代謝物をすべて合成後、MPおよびその代謝物を簡便に同時定量できる測定法の確立、ならびにWistarラットにおけるMPの薬物動態の解明を試みた。また、MPの代謝酵素の種差については不明であるため、Wistarラットおよびヒトとの違いについても検討した。さらに、MPの代謝過程における薬物相互作用を予測するために、WistarラットにMPの主代謝酵素の阻害剤であるグリチルレチン酸(GA)による*in vitro*での阻害強度を確認した後、MP単独投与またはGAを併用投与したときのMPおよびその代謝物の体内動態を比較検討し、ヒトにおけるMPの代謝過程における薬物相互作用の可能性について考察した。

以下、第2章ではMPおよびその5種類の代謝物の同時定量法を確立し、第3章ではWistar雄ラットにMPを単回経口投与したときのMPおよびその代謝物の血漿および尿中薬物動態について検討した。また、第4章ではMPの代謝物の主要な生成組織、ならびにMPの主要な代謝物の生成に影響を及ぼす内的要因(週齢差、性差)、および性ホルモンの影響について検討した。さらに、第5章ではMPの主代謝酵素を明らかにし、その酵素阻害剤におけるMPの薬物相互作用を予測するために*in vitro*および*in vivo*試験を検討した。第6章では、これらの知見を総括した。

第2章 MP およびその5種類の代謝物の HPLC-UV による同時定量法の確立

第1節 序

生体試料中の測定対象物質の濃度測定法には、高速液体クロマトグラフィー紫外吸収検出 (HPLC-UV)、高速液体クロマトグラフィー蛍光検出、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) や液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) などがある^{33,34)}。生体試料中での測定対象物質の濃度測定法として、測定感度および測定時間が満足できるようであれば、上述の中で HPLC-UV が最も簡便な測定法である。MP およびその5種類の代謝物の測定例として、Usansky らによる HPLC-UV 法があるが、この測定法は生体試料ごとに移動相の組成および流速の変更が必要であり、複数の生体試料を連続分析する場合、最適な条件とは言い難い^{13,14)}。また、すべての代謝物を20分以内に検出させたため、各代謝物の分離定量は不十分であった。このため、種々の生体試料中の MP およびその5種類の代謝物を同時測定する場合、これらのピークの高さによりその前後の測定対象物質のピークに影響を及ぼす可能性、および種々の生体試料に由来するピークが測定対象物質のピークと重なる可能性があり、Usansky らの方法では正確な濃度算出は困難と考えられた。本章では、Usansky らの HPLC-UV による測定条件を改良し、新たに MP およびその代謝物を簡便、かつ同時定量する方法を確立した。

第2節 MP およびその5種類の代謝物の測定法の確立

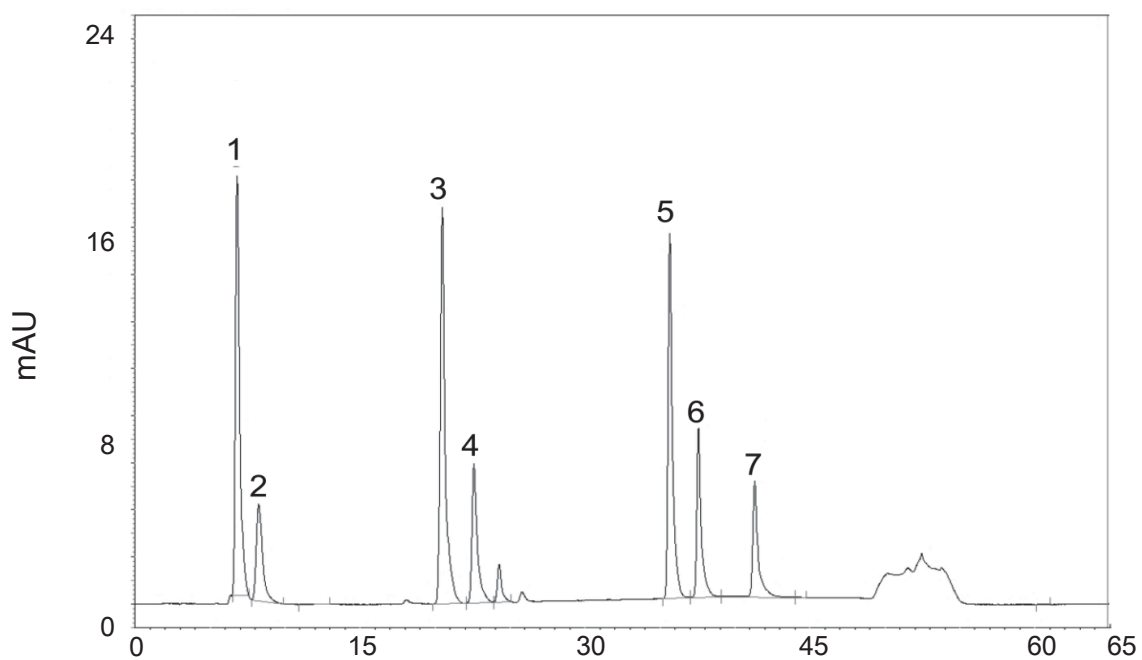
Usansky らの測定条件に従って、MP およびその5種類の代謝物の同時定量を試みた。しかし、血漿、尿および実験対象とした組織の細胞画分など、すべての生体試料

中のMPおよびその5種類の代謝物をUsanskyらの条件およびそれを改良した条件で検討したが、良好な分離条件は得られなかった。そこで、種々の検討を行った結果、分析カラムはInertsil ODS-3 (C₁₈, 5 μm, 4.6 × 250 mm), 移動相を20%メタノールおよび50%メタノールのグラジエントとし、1.0 mL/minの流速で測定することにより、MPOL NOI (6.8分), MP NOI (12.8分), MPOL NOII (24.8分), MP NOII (26.5分), MPOL (36.8分), MP (38.5分), 内部標準物質 (Internal standard; IS) である3-Benzoylpyridine (41.8分) の分離を可能とした (Fig. 2a)。また、測定時間を65分 (カラムに残存する高脂溶性生体成分除去および測定開始時の移動相での安定化時間を含む) にすることにより、MPおよびその代謝物の非存在下におけるラット肝 Ms の酵素溶液をメタノール抽出した HPLC 試料中の生体成分由来ピークは、複数回測定しても各測定対象物質のリテンションタイムと重ならなかった (Fig. 2b)。この結果は、他の生体試料 (Wistar 雄ラットの血漿, 尿および各実験動物の組織の細胞画分ならびにヒト肝の細胞画分) を HPLC 試料として注入した場合においても同様であった。

そこで次に、MPおよび各代謝物の検量線を作成した。横軸にMPおよび各代謝物の濃度 (1.13~90.0 ng/mL ; MPOL : 4.93~94 nmol/L, MP NOIおよびMP NOII : 4.64~372 nmol/L, MPOL NOIおよびMPOL NOII : 4.61~368 nmol/L) を、縦軸にISのピーク高さに対するMPまたは各代謝物のピーク高さの比をプロットしたところ、いずれの検量線も良好な相関関係 (Fig.3 : r²=0.999) が得られた。なお、各測定対象物質の定量下限 (LLOQ) は各検量線の最低濃度であり (CV : 20%以内), 高感度分析を可能とした。

以上のように、本研究においてMPおよびその5種類の代謝物を同時、かつ高感度に定量可能なHPLC-UV法を確立することができた。

A



B

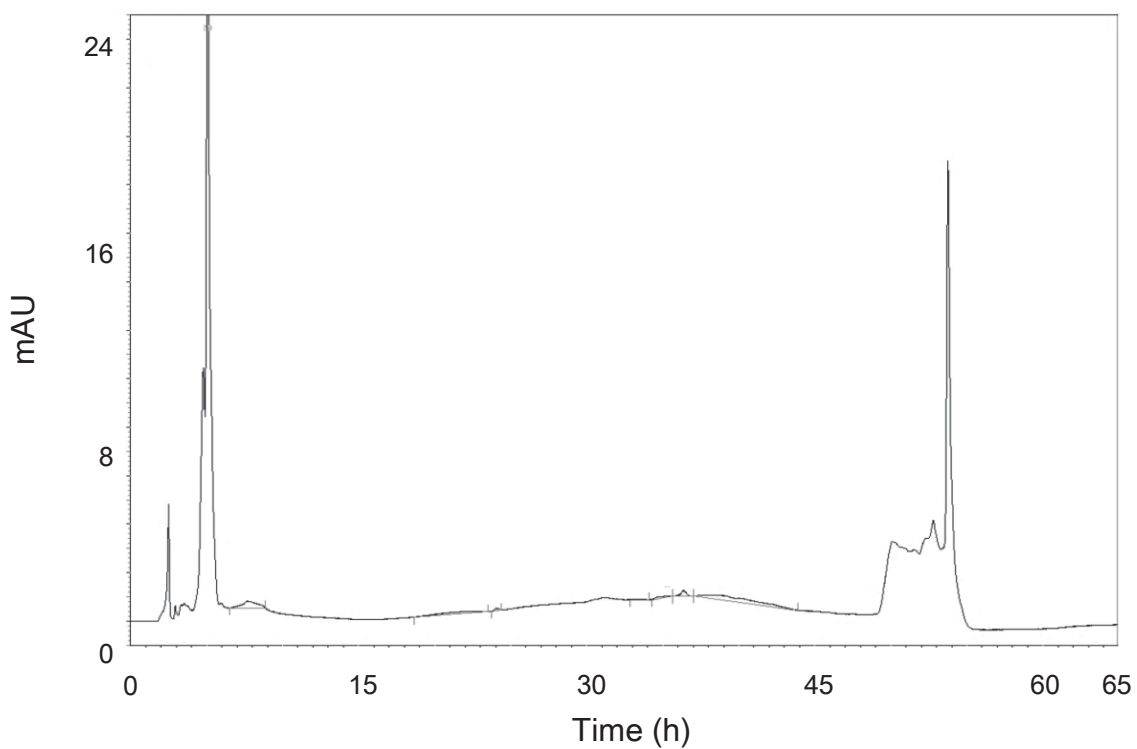


Fig. 2. Representative chromatograms of (A) MP and its five metabolites (MPOL NOI, MP NOI, MPOL NOII, MP NOII, MPOL) and an internal standard (IS), and (B) extract of control male rat liver microsomes.

1: MPOL NOI, 2: MP NOI, 3: MPOL NOII, 4: MP NOII, 5: MPOL, 6: MP, 7: IS

Each standard was prepared using a part of synthetics.

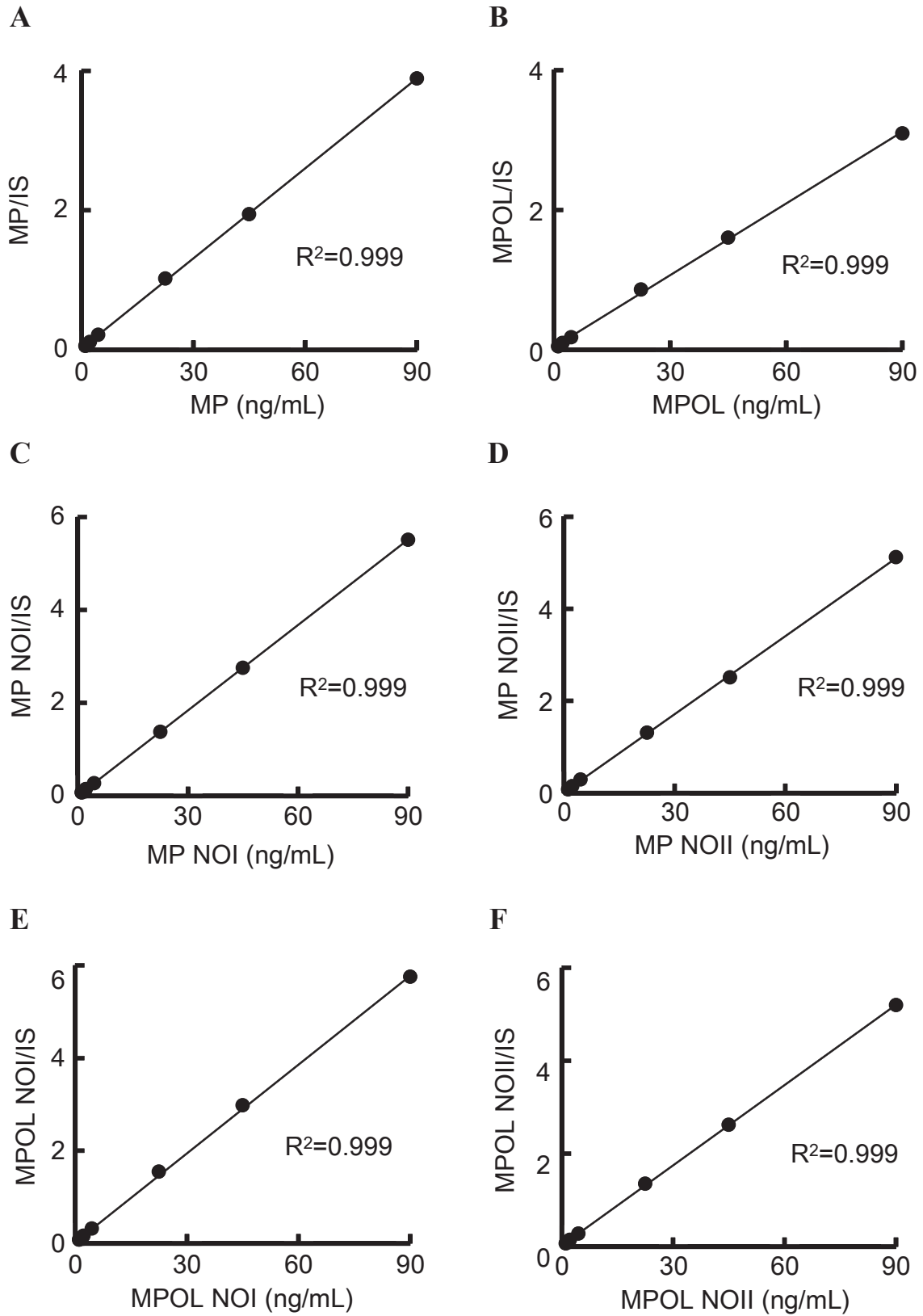


Fig. 3. Calibration curves of MP and its five metabolites.

第3節 考察

本章では、MPの薬物動態を評価するために、MPおよびその5種類の代謝物を同時定量する測定法を確立した。

UsanskyらはMPの5種類の代謝物をHPLC-UVで同時定量しているものの、各代謝物の分離定量は不十分であった^{13,14)}。また、既報は生体試料ごとに異なる移動相で測定する方法であったため、異なる生体試料の連続測定には最適ではなかった。測定対象物質の濃度測定法として、質量分析（GC/MS, LC/MSおよびLC-MS/MS）法は短時間での測定で高感度が望める。しかし、質量分析法を採用する場合、生体成分などの不純物を可能な限り除去しなければならないことから、測定用試料の調製法（測定前処理法）を詳細に検討することが必要となる³⁵⁾。また、測定試料が多くなる場合、できる限り簡便な試料調製（処理）法で行う方が実験ミスも少なく、迅速に試験結果も得られる。そこでUsanskyらの方法に改良を重ね、簡便かつ安価な試料調製法でMPおよびその5種類の代謝物を同時定量するHPLC-UV測定法の確立に着手した。

本研究では、生体試料からの測定対象物質の抽出はメタノールで実施した。この抽出法は他の抽出法と比較して生体成分の除去が不十分であるため、HPLC-UV法において生体成分由来ピークが多く現れる。しかしながら、本研究では1測定に65分を要するものの、分析カラムはC₁₈、移動相は水およびメタノール混合のグラジエントのシンプルな条件を用いることにより、Wistar雄ラット肝Ms（Fig.2 B）だけでなく、検討したすべての生体試料（Wistar雄ラットの血漿、尿および各実験動物の組織の細胞画分ならびにヒト肝の細胞画分）由来のピークと測定対象物質が重ならない条件で、かつ測定対象物質が良好に分離されるHPLC-UV法を確立した。また、各測定対象物質の検量線の相関係数も良好であり（Fig.3 : r^2 : 0.999）、LLOQも低く（いずれの測定対象物質も1.13 ng/mL）、質量分析法での測定と同等の高感度分析を可能とした。本測定法は、各測定対象物質の保持時間に検討したすべての実験動物およびヒトの生体

成分由来ピークは検出されなかったことから、その他の動物種においてもMPの代謝動態研究を行う際に有用と考えられる。

第4節 小括

本章では、MPおよびその5種類の代謝物を同時定量するHPLC-UV法を新たに開発した。以下に得られた結果を要約する。

- 1) 分析カラムは Inertsil ODS-3 (C₁₈, 5 μm, 4.6 × 250 mm) を用い、移動相は 20%メタノールおよび 50%メタノールのグラジエント条件とした。これらの条件で測定することにより、IS を含むすべての測定対象物質は 42 分までに分離定量することが可能となった。
- 2) 測定時間を 65 分 (カラム洗浄および測定開始時の移動相での安定化時間を含む) にすることにより、すべての生体試料 (Wistar 雄ラットの血漿, 尿および各実験動物の組織の細胞画分ならびにヒト肝の細胞画分) 由来ピークは、各測定対象物質のピークと重ならないことが確認された。
- 3) MPおよび各代謝物の検量線に良好な相関関係が得られ ($r^2 : 0.999$), かつ高感度分析を可能とした (LLOQ : 1.13 ng/mL)。

このように、本測定法はヒトやその他の動物種における血漿中および組織中のMPの代謝動態研究に適用可能であり、本測定法の有用性が示唆された。

第3章 Wistar 雄ラットにおける MP およびその代謝物の薬物動態

第1節 序

実験動物に MP を投与した試験には、SD ラットへの静脈内投与および腹腔内投与がある。SD 雄ラットに MP を単回静脈内投与したとき、MP は血漿中から速やかに消失し、MP の還元的代謝物である MPOL が速やかに血漿中に認められている^{11,12)}。また、SD 雄ラットに単回腹腔内投与したとき、血漿中に MPOL が、尿中には5種類の代謝物 (MPOL, MP NOI, MP NOII, MPOL NOI および MPOL NOII) が認められ、このうち MPOL NOI および MPOL NOII が主たる排泄代謝物であったことが報告されている^{13,14)}。このように、これらが主な尿中代謝物であるにもかかわらず、いずれの投与経路においても血漿中代謝物は MPOL に関する検討のみであり、主代謝物が MPOL であるかどうかの疑問が残されている。また、実験動物に MP を経口投与した薬物動態解析報告はなく、詳細は不明である。一方、MP は経口剤として臨床適用されているが、ヒトに MP を経口投与したときもまた、MPOL 以外の血漿中代謝物の薬物動態は不明であり、MP の代謝の全容解明に至っていない¹⁵⁾。また、尿中排泄物として MP および MPOL, ならびにこれらのグルクロン酸抱合体が認められているが³⁶⁾、SD 雄ラットにおいては排泄されず、種差がある¹⁴⁾。ところで、ラットにおける MP 還元酵素活性は概して Wistar 系の方が SD 系よりも高いものの¹⁷⁾、Wistar ラットにおける MP の代謝および体内動態は十分に評価されていない。それゆえ、Wistar ラットに MP を経口投与したときの MPOL 以外の代謝物を含めた血漿中薬物動態を明らかにし、SD ラットおよびヒトで得られている知見と比較考察することは、ヒトにおける MP の代謝動態を考える上で重要な基礎データになると考えられる。そこで本章では、実験動物として Wistar 雄ラットを用い、MP を単回経口投与したときの、MP およびその代謝物の血漿中薬物動態を解析した。さらに、尿中に排泄された代謝物を調べ、

既報の SD ラットおよびヒトにおけるエビデンスと比較考察した。

第 2 節 MP 単回経口投与後の MP およびその代謝物の血漿中薬物動態

Wistar 雄ラットに MP を 50 mg/kg の用量で単回経口投与したときの MP およびその代謝物の血漿中濃度推移を Fig. 4 に、その薬物動態パラメータを Table 1 に示す。なお、MP の投与量は既報の静脈内投与および腹腔内投与における体内動態データを考慮した上で、これらの投与経路と同等の用量である 50 mg/kg とした¹¹⁻¹⁴⁾。血漿中 MP 濃度は投与 0.25 時間後に t_{max} に達したことから (Table 1)、MP は消化管から速やかに吸収された。その後、MP は 0.61 時間の $t_{1/2}$ で速やかに血漿中から消失した (Fig. 4, Table 1)。MP の代謝物のうち、MPOL および MP NOII の血漿中濃度は投与 2.0 時間後に速やかに t_{max} に達し、それぞれ投与後 6 および 8 時間まで t_{max} 付近の濃度で維持された後、それぞれ 0.66 および 6.13 時間の $t_{1/2}$ で消失した (Fig. 4 および Table 1)。MPOL NOII の血漿中濃度は、速やかに上昇後持続的に緩やかに上昇し投与 6.0 時間後に t_{max} となり、その後 1.05 時間の $t_{1/2}$ で速やかに消失した (Fig. 4 および Table 1)。一方、MP NOI の血漿中濃度は投与後 8 時間まで LLOQ 未満で以降緩やかに消失し (Fig. 4)、MPOL NOI の血漿中濃度はすべての採血測定時点で LLOQ 未満であり (data not shown)、3 種の代謝物 (MPOL, MPOL NOII および MP NOII) に比べてマイナー代謝物であることが明らかとなった。

AUC で比較すると、MP および 5 種の代謝物の中で、MPOL の AUC が最も高く、次に高かった MP NOII および MPOL NOII は MPOL の約 1/4 であり、MP と同程度であった (Table 1)。これらの AUC の大小関係から、Wistar 雄ラットに MP を経口投与したときの主代謝物は、MPOL であることが示唆された。

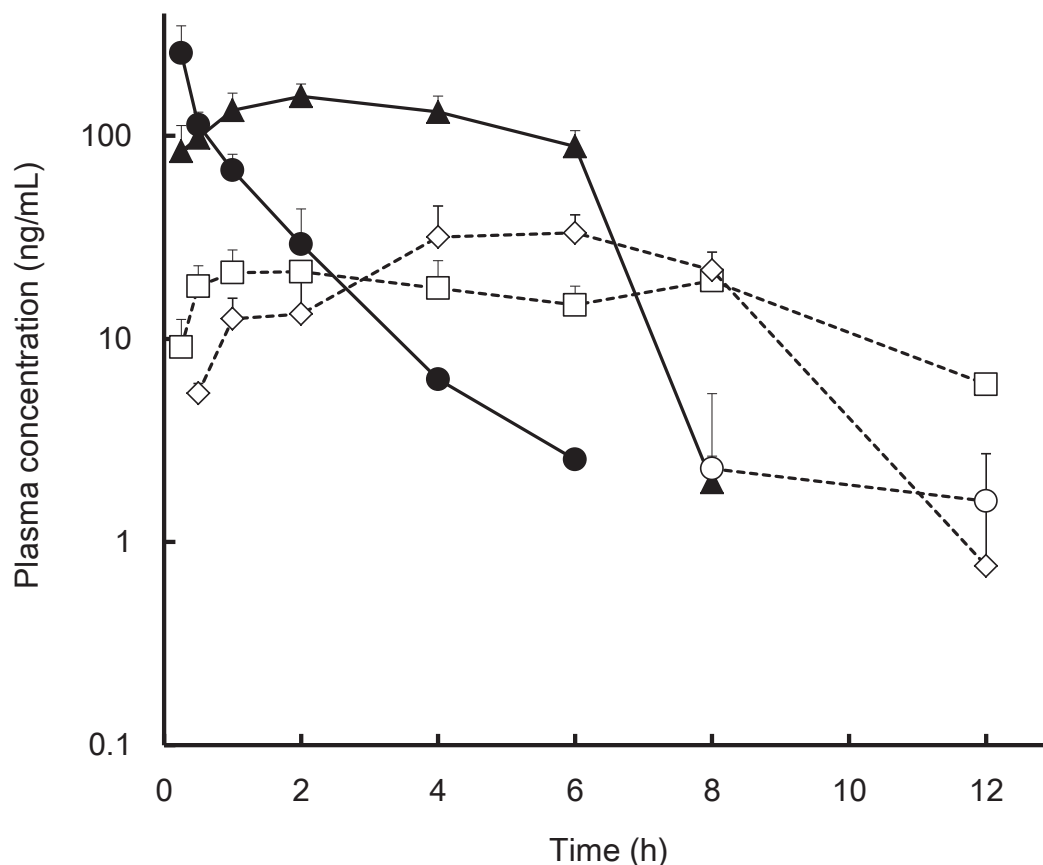


Fig. 4. Plasma concentration profiles of MP and its metabolites after a single oral administration of MP at a dose of 50 mg/kg to male rats.

Each data point represents the mean of three separate determinations and error bars represent standard deviation. ●, MP; ▲, MPOL; ○, MP NOI; □, MP NOII; ◇, MPOL NOII

Table 1. Pharmacokinetic parameters of MP and its metabolites after a single oral administration of MP at a dose of 50 mg/kg to male rats

	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{last} (ng·h/mL)	AUC_{∞} (ng·h/mL)
MP	0.25	255.5	0.99	216.0	219.6
MPOL	2.0	156.5	0.66	833.9	835.8
MPOL NOI	6.0	33.3	1.05	228.9	230.1
MP NOII	2.0	21.4	6.13	192.0	245.1

Each data point represents the mean of three separate determinations. The mean concentrations at each sampling time were used for the calculation of pharmacokinetic parameters.

第3節 MP 単回経口投与後の MP およびその代謝物の尿中排泄

Wistar 雄ラットに MP を 50 mg/kg の用量で単回経口投与後 24, 48 および 72 時間までの MP およびその代謝物の尿中排泄について検討した。なお、投与後 24~48 および 48~72 時間の尿中には MP およびその代謝物はほとんど排泄されなかったため、投与後 24 時間までの MP およびその代謝物を測定し、その割合を算出した。Fig. 5 に示すように、尿中に 4 種類の代謝物が排泄され、これらの排泄量の割合は MPOL NOII (70.4%), MP NOII (17.7%), MPOL NOI (7.0%) および MPOL (4.9%) の順であった。このように、血漿中で AUC が最も大きく主代謝物と判断された MPOL は尿中では非常に少なかった。一方、MP および MP NOI は尿中にはほとんど認められなかった (それぞれ 0.12% および LLOQ 未満)。

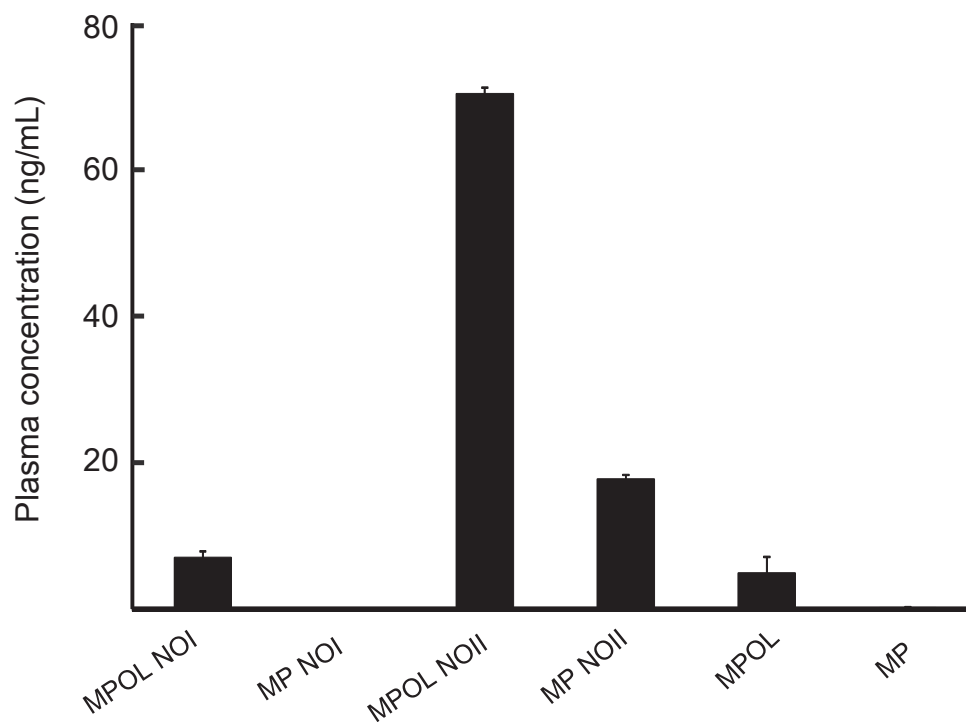


Fig. 5. Ratio of MP and its metabolites in urine at 24 h after a single oral administration of MP at a dose of 50 mg/kg to male rats.

Each data point represents the mean of three separate determinations, and error bars represent standard deviation, n=3. Data represent the percentage of the total peak ratio of MP and its metabolites to IS on HPLC chromatogram.

第4節 考察

MP を実験動物に投与した試験の報告は SD 雄ラットへの静脈内投与および腹腔内投与のみであった¹¹⁻¹⁴⁾。また、臨床投与経路である経口投与の報告は、他の実験動物種も含めて見当たらない。一方、ヒトにおいては MP を経口投与した報告はあるものの、血漿における代謝動態情報はラットと同様に MPOL のみであり、MP の血漿中薬物動態の全容解明に至っていないのが現状である¹⁵⁾。本章では、臨床投与経路である経口投与後の MP の代謝動態を明らかにすることを目的として、Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与 (50 mg/kg) したときの MP およびその代謝物の血漿中動態について検討した。さらに、MP およびその代謝物の尿中排泄挙動についても検討した。

単回経口投与後の MP の t_{max} は投与 0.25 時間後であったことから、MP は消化管から速やかに吸収された (Fig. 4, Table 1)。一方、MP は t_{max} 以降、血漿中から速やかに消失したにもかかわらず (Fig. 4)、尿中にはほとんど排泄されなかった (Fig. 5)。これに対し、MP の代謝物として MPOL、MP NOII および MPOL NOII が血漿中で速やかに生成された (Fig. 4)。これらのことから、血漿中で MP が速やかに消失した要因は、尿中への MP の速やかな排泄によるものではなく、MP の速やかな代謝が示唆された。

Wistar 雄ラットへの MP 経口投与後に生成された主要な代謝物は、AUC が最も高かった MPOL であることが明らかとなった (Table 1)。MPOL は MP と同程度の薬理活性をもつ活性代謝物である¹¹⁾。Wistar 雄ラットにおいて、AUC は MPOL の方が MP よりも約 4 倍高かったことから (Table 1)、MPOL も薬効に寄与することが推察された。SD 雄ラットに静脈内投与したとき、血漿中 MP 濃度は多相性で消失することが認められている^{11, 12)}。本研究では Wistar 雄ラットの血漿中 MP のプロファイルは経口投与後 6 時間までであったが、先の SD ラットへの静脈内投与時のそれと類似していた。このことは、経口投与後の肝初回通過効果を回避して循環血中に移行した MP は、

静脈内投与された MP と同様の消失過程を経ることを想像させるものである。

Wistar 雄ラットに MP を経口投与 (50 mg/kg) したときの、尿中に排泄された代謝物は 4 種類 (MPOL NOII > MP NOII > MPOL NOI > MPOL) であった (Fig. 5)。また、尿中に未変化体 MP がほとんど排泄されなかったことは (Fig. 5)、SD 雄ラットに腹腔内投与した実験報告と類似していた^{13,14)}。一方、SD 雄ラットへの腹腔内投与では、尿中に排泄された MP の代謝物は 5 種類で、その排泄割合は高い順に MPOL NOII > MPOL NOI > MP NOI > MP NOII > MPOL であった。SD 雄ラットは Wistar 雄ラットと投与経路の違いの可能性は否定できないものの、MP 投与によって生成される代謝物の種類およびそれらの排泄量に違いが認められ¹⁴⁾、MP 代謝に関与する代謝酵素およびその活性に系統差があることが推察された。これらの結果を考慮すると、代謝物の血漿中動態プロファイルも両ラット間でいくらか異なることが推察された。

興味深いことに、血漿中ではほとんど検出されなかった MPOL NOI が、尿中にごくわずかではあるが排泄された (Fig. 5)。また、血漿中における主要な代謝物は MPOL であったのに対し、尿中では MPOL NOII および MPOL NOI の方が MPOL よりも排泄割合は高かった (Fig. 5)。これらの代謝物の血漿中濃度および尿中排泄の挙動から MP の代謝経路を推定すると、MPOL NOII および MPOL NOI はそれぞれ MP NOII および MP NOI からの生成によるものではなく、ともに MPOL からの生成によるものと推察された (Fig. 6)。この推定代謝経路は、Martini らによって報告されている MP の代謝経路と同じであった²⁷⁾。

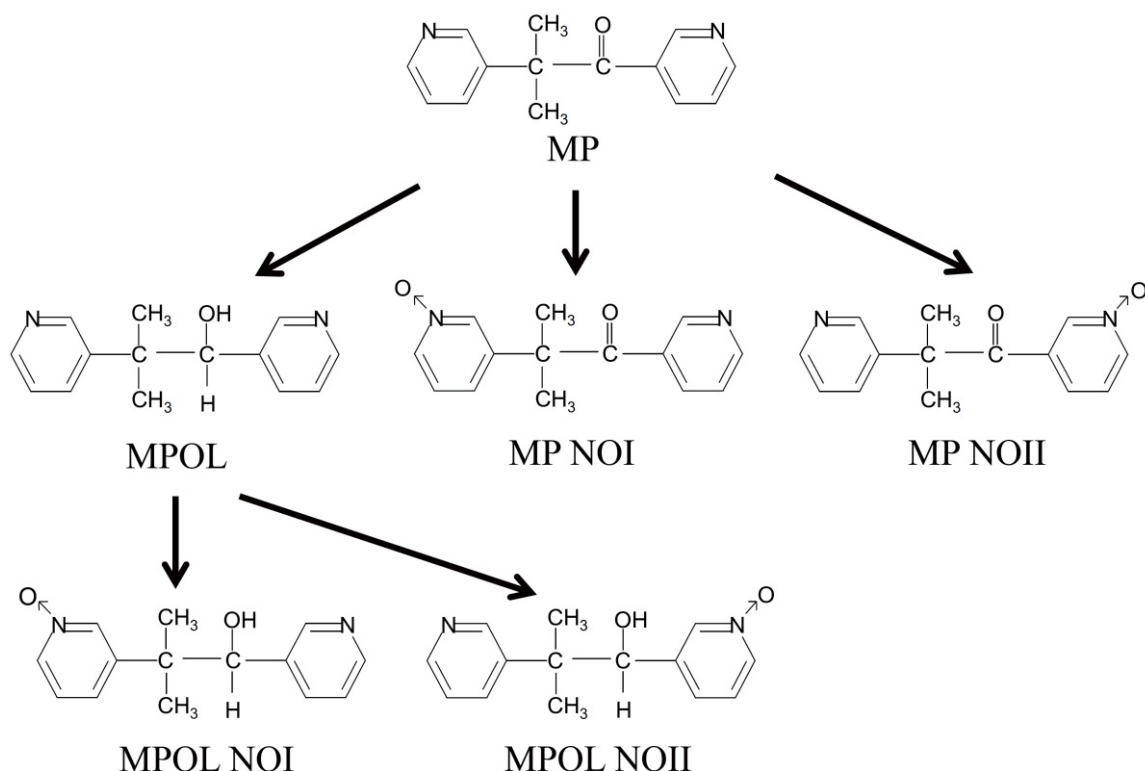


Fig. 6. Proposed metabolic Pathways of MP

ところで、ヒトにMPを経口投与したとき、尿中にはMPおよびMPOL、ならびにこれらのグルクロン酸抱合体の排泄が報告されている³⁶⁾。しかし、Wistar雄ラットの尿中については、これらの代謝物が検出されると思われるHPLC-UVの検出時間に生体試料由来ピークが多く、HPLC-UVではこれらのピークと分離することは難しかったため、詳細に検討することができなかった。また、SD雄ラットにおいては、グルクロン酸抱合体は尿中に排泄されていないものの¹⁴⁾、Wistar雄ラットにおけるMPの第二相反応は不明のままであり、Wistar雄ラットとヒトとの間の種差について詳細を明らかにすることはできなかった。

第5節 小括

本章では、MPを単回経口投与したときのMPおよびその5種類の代謝物の薬物動態を明らかにした。以下に得られた結果を要約する。

1) Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与したとき、MP は消化管から速やかに吸収された後、血漿中から速やかに消失した。

2) Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与したとき、血漿中では主代謝物は活性代謝物である MPOL であった。その AUC は MP の約 4 倍であったことから、MPOL も薬効に寄与することが推察された。

3) Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与したとき、MPOL 以外に MP NOII および MPOL NOII も速やかに生成された。一方、MP は尿中にほとんど排泄されなかったことから、MP の血漿中からの速やかな消失は、尿中への速やかな排泄によるものではなく、組織内での MP の速やかな代謝によるものと示唆された。

4) Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与したとき、尿中に排泄された代謝物は 4 種類で、MPOL NOII, MP NOII, MPOL NOI および MPOL の順であった。既報の SD 雄ラットと投与経路 (MP の腹腔内投与) の違いはあるものの、尿中排泄された代謝物の種類およびそれらの排泄量に違いが認められた。

5) Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与したときの血漿および尿中で認められた MP 代謝物から MP の代謝経路を推定すると、MPOL NOII および MPOL NOI はともに MPOL からの生成によるものと推察された。

以上のように、Wistar雄ラットにMPを経口投与したとき、主代謝物は活性代謝物

MPOLであることが強く示唆された。このことから、MP経口投与後の薬効にMPOLも寄与するものと考えられた。MP NOIIおよびMPOL NOIIもまた、MP投与後、血漿中に速やかに認められたことから、血漿中でのMPの速やかな消失は尿中への速やかな排泄によるものではなく、MPの速やかな代謝によるものと示唆された。

第4章 MPの各組織における *in vitro* 代謝

第1節 序

第3章において、Wistar 雄ラットに MP を単回経口投与したとき、血漿中での MP の速やかな消失は MP の速やかに代謝に基づくものと考えられた。これまでに、ラットにおける MP の *in vitro* 代謝に関する知見にはいくつかの報告がある。すなわち、雄 SD ラットの肝 Ms では3種類の代謝物 (MP NOII, MPOL および MP NOI) が、ならびに Cyt では MPOL のみが HPLC-UV クロマトグラム上で検出されている¹³⁾。また、MP から MPOL への還元酵素活性について検討した組織は、雌の SD および Wistar ラットの肝臓、卵巣、副腎および腎臓のみである¹⁷⁾。このように、*in vitro* 試験では *in vivo* 試験で認められている他の2種類の代謝物 (MPOL NOI および MPOL NOII) の報告はなく、他の MP 代謝物も含めて主要な生成組織は明示されていない。

ところで一般に、薬物代謝酵素活性は種々の内的または外的の要因によりしばしば変動することが認められている。内的要因のうち、幼若期および成熟期との間で、雄および雌との間で、ならびに動物種との間で、薬物代謝酵素活性に差が認められる場合、これらの薬物動態にも差が生じることが示唆されている³⁷⁻³⁹⁾。それゆえ、薬物代謝に影響する内的要因に関する知見は、ヒトにおける医薬品の有効性および安全性を考慮する上で重要な情報源となる。これらの内的要因に関する研究について、CYP に関する報告はあるが^{6, 40)}、MP のようにケトン薬物の代謝酵素においても内的要因がその代謝活性に影響を及ぼすことが予想される。事実、ケトン薬物であるアセトヘキサミド (AH) の還元反応を触媒する酵素活性に Wistar ラットでは週齢差および性差、ならびに各実験動物で性差が認められている^{23, 24)}。しかし、CYP と同様に、ケトン薬物の還元酵素もまた多くの分子種が存在する⁴¹⁻⁴³⁾。このため、MP および AH の還元酵素が同一であるのか否か、また、内的要因の影響による薬物代謝酵素活性の

挙動が MP および AH で同様であるかについては不明である。本章では、第 3 章において Wistar 雄ラットに MP 経口投与後の速やかな代謝に初回通過効果の影響が示唆されたことを踏まえ、MP の主代謝組織を明らかにするために肝臓および小腸、ならびにケトン薬物を還元する代謝酵素の存在が主に認められている 7 種類の組織に着目し^{13, 44)}、これら 9 組織の 3 細胞画分 (Ms, Mit および Cyt) における MP の還元的および酸化的代謝活性について検討した。また、内的要因に関して、Wistar ラットの主代謝組織における MP の主代謝物である MPOL への還元的代謝活性に関する週齢差および性差、ならびに 5 種類の実験動物における本還元酵素活性の性差について検討した。さらに、Wistar 雄ラット肝 Ms における MP 還元酵素を部分精製し、基質特異性についても検討した。

第 2 節 各組織の細胞画分における MP の酸化的および還元的代謝

Wistar 雄ラットにおける MP 代謝物の主要な生成組織を明らかにするために、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸 (NADPH) 生成系存在下で各組織の細胞画分 (Mit, Ms, Cyt) における MP の酸化的還元的代謝活性を測定した (Fig. 7)。

MP の酸化的還元的代謝活性のうち、MP から MPOL への還元的代謝活性が最も高く、肝 Ms (4.08 nmol/min/mg protein) および精巣 Ms (2.96 nmol/min/mg protein) で高かった (Fig. 7A)。Mit ではいずれの組織においても Ms と比べてその活性は低いものの、精巣 (0.83 nmol/min/mg protein) および肝臓 (0.76 nmol/min/mg protein) において比較的高い活性が認められた (Fig. 7A)。興味深いことに、Cyt では副腎が最も高く (1.63 nmol/min/mg protein)、これは肝 Ms および精巣 Ms の次に高かった (Fig. 7A)。一方、一般にケトン還元的酵素活性が高いとされる肝 Cyt では、MP の還元的代謝活性は極めて低かった (0.16 nmol/min/mg protein : Fig. 7A)。各細胞画分における MP 還元酵素活性を有意差検定したところ (non-parametric Kruskal-Wallis および Dunn's test),

Ms では肝臓は脳よりも、Mit では精巣は脳よりも、Cyt では副腎は腎臓よりも有意に高かった (Fig. 7A)。これら Fig. 7A の結果および組織重量から判断すると、MPOL への還元的代謝の主要組織は肝臓であることが示唆された。それゆえ、この MP の還元的代謝が、MP 経口投与後の血漿中での MPOL の速やかな生成および最大の AUC に寄与していると考えられた。また、肝臓の次に高い MP 還元酵素活性が認められた精巣においても、血漿中 MPOL 濃度の上昇に一部寄与しているものと推察された。

MP の酸化的還元的代謝についても、MP 還元的代謝活性と同時に測定した。MP NOII への酸化的代謝活性が MPOL への還元的代謝活性の次に高く (Fig. 7B)、MP NOI への酸化的代謝活性および MPOL NOII への酸化的還元的代謝活性も認められたが (Fig. 7C および 7D)、これらの活性はすべての細胞画分で MP 還元的代謝活性よりも低かった (0.01~0.26 nmol/min/mg protein : Fig. 7A, 7B, 7C および 7D)。MP NOI への代謝活性は内臓脂肪の Ms (0.11 nmol/min/mg protein) および Cyt (0.26 nmol/min/mg protein) で他の組織よりも高く、その活性は Cyt でのみ内臓脂肪は肝臓よりも有意に高かった (Fig. 7C)。MPOL NOII への代謝活性はすべて低かったが (0.01~0.05 nmol/min/mg protein)、Cyt では脳は副腎よりも有意に高かった (Fig. 7D)。MP NOII への酸化的代謝活性は肝 Ms (0.23 nmol/min/mg protein) および内臓脂肪 Mit (0.1 nmol/min/mg protein) で他の組織に比べて高い活性が認められたものの、有意な差は認められなかった (Fig. 7B)。このように、MP の還元的代謝 (MPOL 生成) 以外に酸化的代謝 (MP NOII および MP NOI 生成) ならびに酸化的還元的代謝 (MPOL NOII 生成) も認められたものの、上述したとおり、これらの活性は非常に低く (0.01~0.26 nmol/min/mg protein : Fig. 7A, 7B, 7C および 7D)、MPOL 以外の代謝物の主要な代謝組織は明らかにできなかった。一方、一般に初回通過効果の一翼を担う小腸においては、MP の酸化的還元的代謝活性は極めて低く、小腸は MP の主たる代謝組織ではないことが示唆された (Fig. 7)。なお、MPOL NOI への酸化的還元的代謝活性は、すべての組織の細胞画分でほとんど認められなかった (data not shown)。

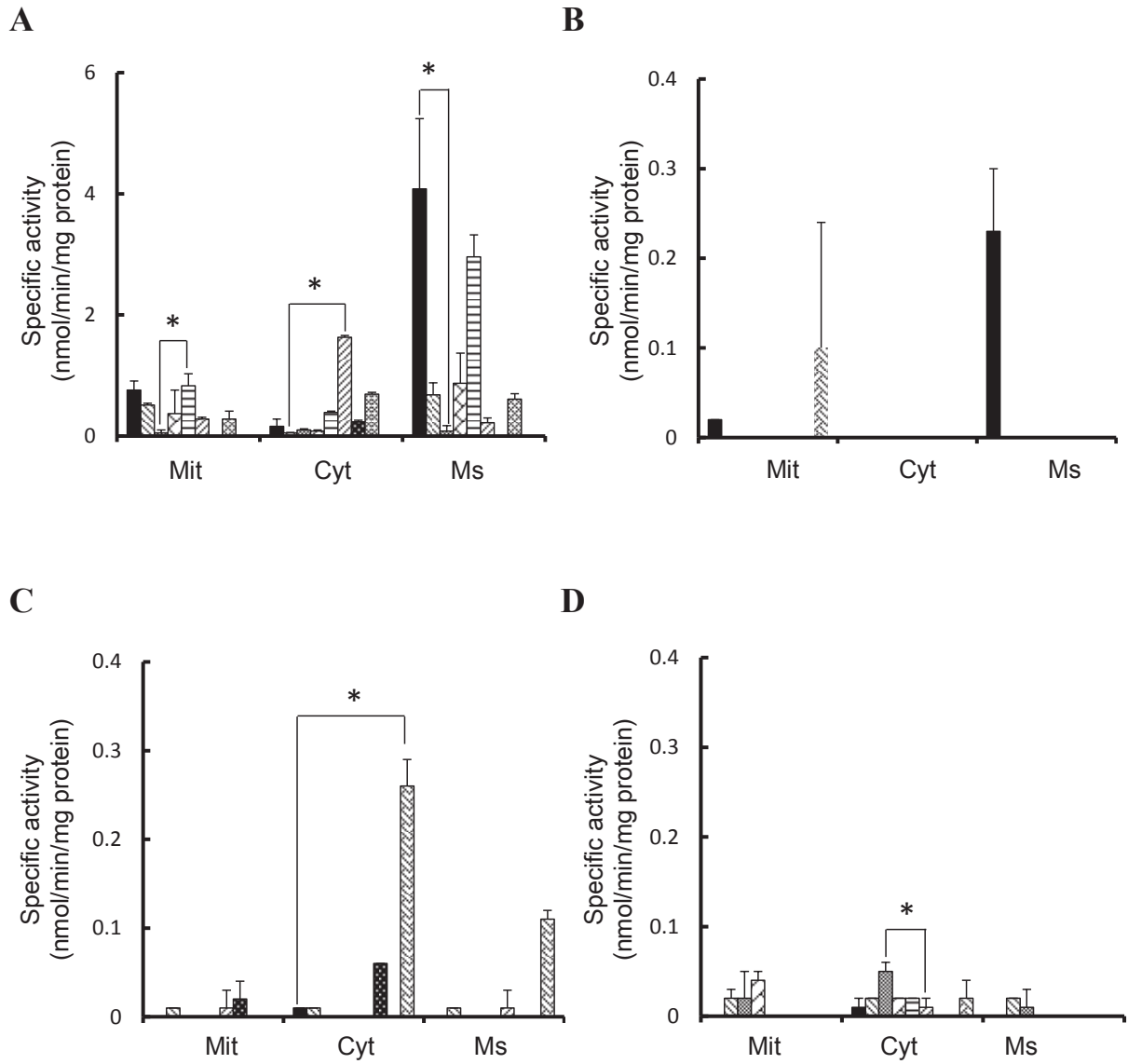


Fig. 7. Activity for the reduction and oxidation of MP in mitochondrial (Mit), cytosolic (Cyt) and microsomal fractions (Ms) in male rat tissues.

Each data point represents the mean of three separate determinations, and error bars represent standard deviation except for small intestine, subcutaneous fat and visceral fat, $n = 3$. Each data point represents the average of triple determinations, and error bars represent standard deviation regarding small intestine, subcutaneous fat and visceral fat, $n = 3$. *: $P < 0.05$; statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis and Dunn’s test. (A) MPO, (B) MP NOII, (C) MP NOI, (D) MPO NOI.

■, liver; ▨, kidney; ▩, brain; ▪, lung; ▫, testis; ▬, adrenal; ▭, small intestine; □, subcutaneous fat; ▮, visceral fat.

第3節 ラットにおけるMP還元酵素活性に及ぼす内的要因の影響

3-1. MP還元酵素活性の週齢差および性差

一般に、ラットにおいて、種々の薬物の代謝酵素活性に週齢差および性差が認められている^{6, 19-22, 40, 45-48})。ケトン薬物の還元的代謝活性においても、週齢差および性差を認めた報告がある^{23, 24})。すなわち、Wistar ラットにおけるAHの還元的代謝活性に性差および年齢差が認められており、その特徴(生後発達パターン)は雌雄ともに思春期まで活性は低く、以降、生後発達とともに雄のみで活性が増加している^{23, 24})。しかしながら、ケトン基を還元する酵素は分子多様性を示すため、同じケトン薬物でも化学構造の相違により代謝酵素が異なる⁸⁻⁹)。それゆえ、MP還元酵素活性がどのような生後発達パターンを示すか興味をもたれる。第2節において、Wistar 雄ラットにおける*in vitro* 代謝試験では、MPの主代謝物はMPOLであり、その主代謝組織の細胞画分は肝Msであった。そこで本項では、生後2週齢から成熟10週齢までの雌雄Wistar ラット肝MsにおけるMP還元酵素活性の週齢差および性差について検討した。

Fig. 8に示すように、肝MsにおけるMP還元酵素活性は雌雄ともに2週齢で最も高く、それ以降低下した。その低下は雌の方が雄よりも顕著であり、雌において顕著な週齢差が認められた。これらの週齢差を反映して6週齢から有意な性差が認められた(student's t test)。このように、MP還元酵素活性の生後発達パターンは、既知のAHの還元酵素活性の生後発達パターンとは明らかに異なることが認められた。なお、肝CytにおけるMP還元酵素活性は雌雄ともに肝Msに比べて極めて低く、週齢差および性差は認められなかった(data not shown)。

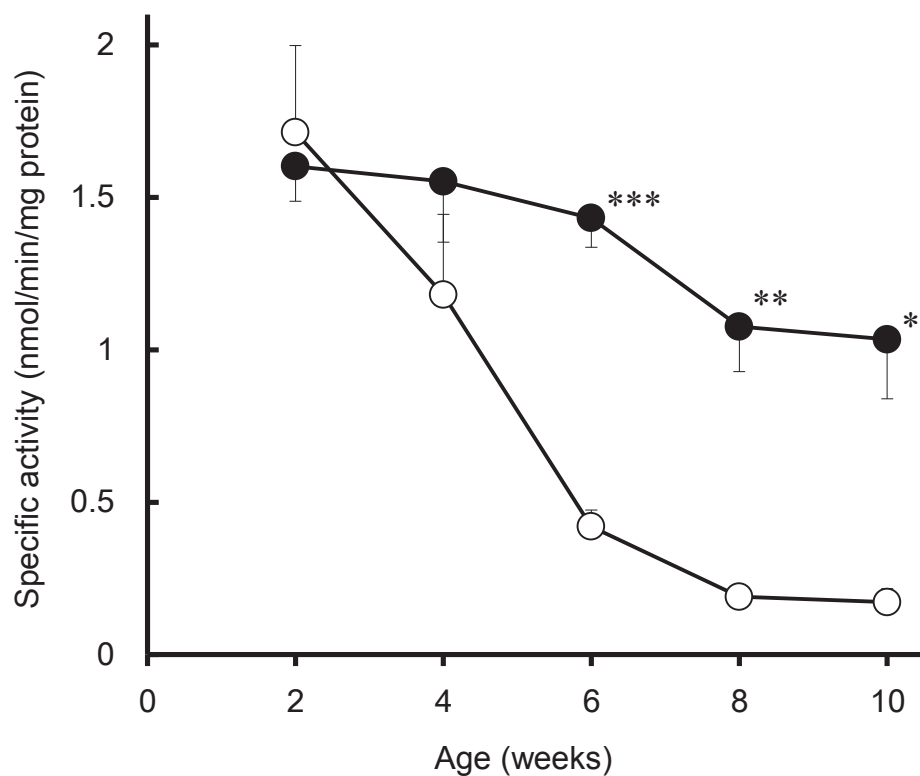


Fig. 8. Developmental profiles of MP reductase activities in liver microsomal fractions of male and female rats.

Each data point represents the mean of six to eight separate determinations and error bars represent standard deviation. ●; male, ○; female, Significantly different from male rats at the same age (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, student's t test).

3-2. MP 還元酵素活性に及ぼす去勢の影響

Wistar ラット肝 Ms における MP 還元酵素活性は，成熟期では雄の方が雌よりも高く維持され，明らかな性差が認められた (Fig. 8)。このような薬物代謝酵素活性に性差が認められる原因として，性ホルモンが関与することが示唆されている⁴⁹⁻⁵⁶⁾。例えば，雄の高い活性には男性ホルモンが関与する場合がある⁵⁷⁻⁶⁰⁾。本項では，雄ラットにおける MP 還元酵素活性の高い維持に男性ホルモン (テストステロン) が影響しているかもしれないとの仮説を立て，4 週齢 (ヒトでは思春期にあたる) に精巣を摘出した去勢ラットならびに未摘出ラットおよび雌ラットの成熟期 (8 週齢) における肝 Ms の MP 還元酵素活性を比較した。

Fig. 9 に示すように，精巣を摘出した雄ラットの肝 Ms における本酵素活性は雌よりもやや高いものの，未摘出ラットと比べて有意に低下した (student's t test)。このように，去勢処置によって男性ホルモン (テストステロン) 作用を軽減させた雄ラットにおける肝 Ms の MP 還元酵素活性が雌レベルに近づいた (活性の観点から雌化する傾向が見えた) ことから，本酵素活性は精巣から分泌されるテストステロンに依存している可能性が推察された。なお，肝 Cyt における MP 還元酵素活性は精巣を摘出しても未処置ラットと同様に非常に低く，変動は認められなかった (data not shown)。



Fig. 9. Effect of castration of MP reductase activities in the liver microsomal fractions of male rats.

Each data point represents the mean of three to six separate determinations and error bars represent standard deviation. Significantly different from control male rats (**; $p < 0.01$, student's t test)

Control; sham-operated male rats

3-3. 肝臓における MP 還元酵素活性の性差

3-1 項では、Wistar ラットの肝 Ms における MP 還元酵素活性に性差が認められた。しかしながら、他の実験動物種において MP 還元酵素活性に性差があるか否かは不明である。本項では、肝 Ms および Cyt における MP 還元酵素活性に関する 5 種の実験動物の性差について比較検討した。前述したように、Wistar ラット肝 Cyt における MP 還元酵素活性は雌雄ともにほとんど認められなかったが (data not shown)、ケトン基を還元する酵素は一般に Cyt に多く分布していることを考慮し⁸⁾、Cyt についても Ms と同様に検討した (Fig. 10)。なお、いずれの実験動物も成熟期の週齢で検討した。

肝 Ms における MP 還元酵素活性は、雄ラットで最も活性が高く、次いで雌雄ハムスター、雌マウス、雄モルモット、雄マウス、雌雄ウサギおよび雌モルモットの順であり、雌ラットが最も低かった (Fig. 10A)。本還元酵素活性に性差が認められた動物種は、ラット、マウスおよびモルモットであり、ラットで最も顕著であった (Fig. 10A)。興味深いことに、マウスにおいてはラットおよびモルモットと異なり、雌の方が雄よりも高かった (Fig. 10A)。

肝 Cyt における MP 還元酵素活性は、雄ウサギで最も活性が高く、次いで雌雄ハムスター、雌雄モルモットおよび雌雄マウスの順であり、雌雄ラットが最も低かった (Fig. 10B)。性差はウサギおよびハムスターで認められ、いずれも雄の方が雌よりも有意に高かった (Fig. 10B)。

このように、MP 還元酵素活性の性差は、肝 Ms ではラット、モルモットおよびマウスで、肝 Cyt ではウサギおよびハムスターで認められた。また、ラットと同様な性差が認められた実験動物の MP 還元酵素活性は、男性ホルモンに依存している可能性が推察された。

一般に、ケトン薬物の還元的代謝は Cyt で活性が高いことが知られている⁶¹⁻⁶⁵⁾。しかし、Wistar 雄ラットにおける MP 還元酵素活性は Cyt ではほとんど認められなかった (Fig. 10)。それゆえ、肝 Ms における MP 還元酵素が、Wistar 雄ラットおよびヒトで類似しているかどうかの検討はヒトの薬物動態を予測する上で興味深い。

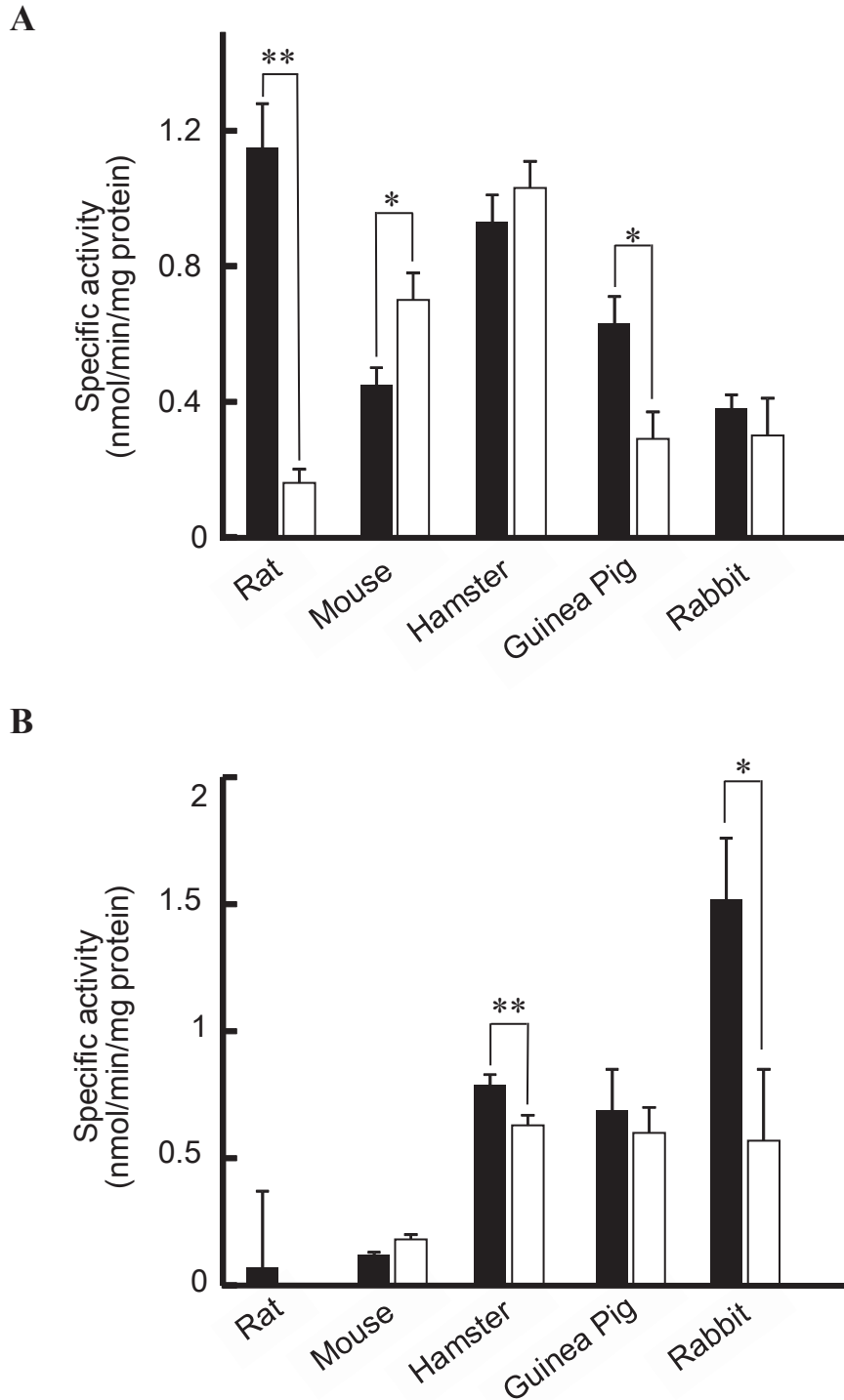


Fig. 10. Sex-related differences of metyrapone reductase activities in (A) microsomal and (B) cytosolic fractions from the liver of the rat, mouse, hamster guinea pig, and rabbit.

Each data point represents the mean of three separate determinations, and error bars represent standard deviation, $n = 3$. ■; male, □; female, Significantly different from male animals (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, student's t test).

3-4. 腎臓における MP 還元酵素活性の性差

薬物代謝組織の1つとして、腎臓も挙げられる。事実、本研究においても Wistar 雄ラット腎 Ms における MP 還元酵素活性は、肝 Ms よりも程度は低いものの、認められた (0.68 nmol/min/mg protein : Fig. 7A)。本項では、5種の実験動物の腎 Ms および Cyt における MP 還元酵素活性の性差について、肝臓と同様に検討した (Fig. 11)。

腎 Ms における MP 還元酵素活性は、雌雄モルモットで最も活性が高く、次いで雄ラット、雌雄ハムスター、雌ラット、雌雄マウスおよび雌雄ウサギの順であった (Fig. 11A)。性差はモルモットおよびラットで認められ、雄の方が雌よりも有意に高かった (Fig. 11A)。

腎 Cyt における MP 還元酵素活性は、雄ウサギで最も活性が高く、次いで雌雄モルモット、雌ウサギ、雌雄ハムスターおよび雌雄マウスの順であり、雌雄ラットに活性はほとんど認められなかった (Fig. 11B)。性差はラット以外のすべての実験動物で認められ、肝 Ms と同様にマウスでは他の動物種と逆の性差が観察された (Fig. 11B)。

このように、腎臓においても MP 還元酵素活性は各実験動物で性差が認められた。また、肝臓および腎臓における本酵素活性が比較的高く認められた実験動物は、Ms ではラットとモルモットで、Cyt ではウサギ、ハムスターおよびモルモットであった。

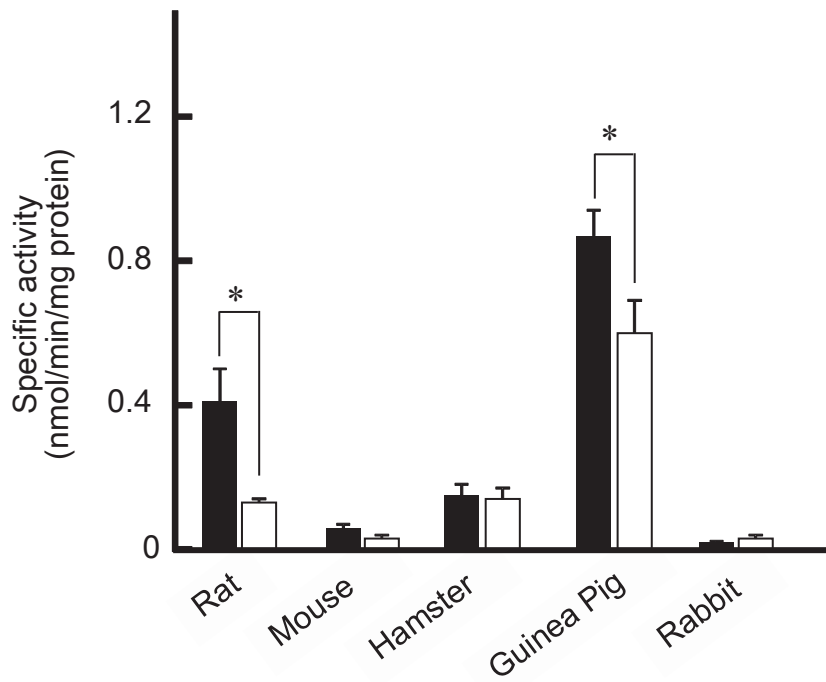
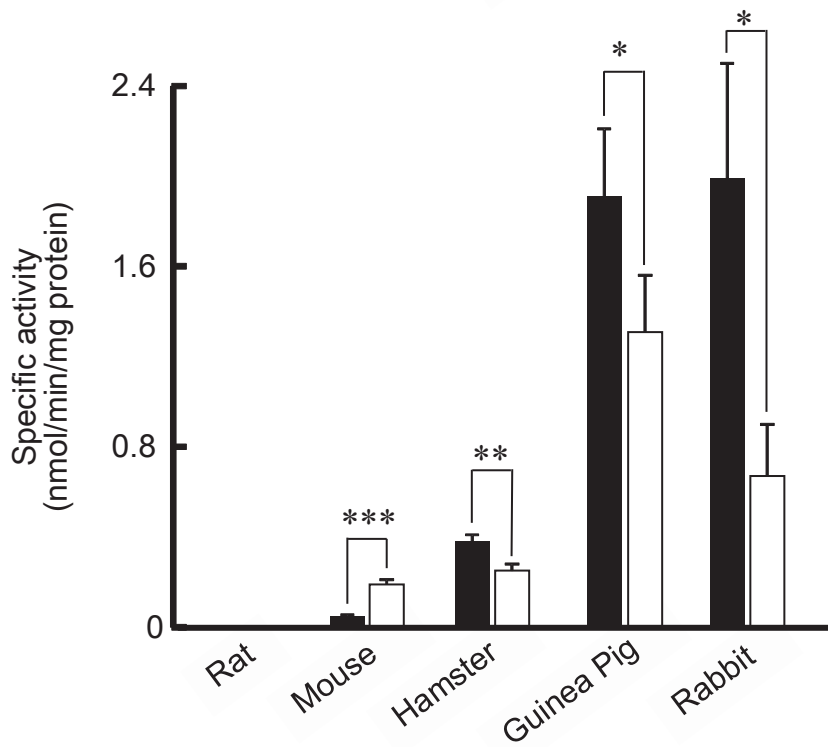
A**B**

Fig. 11. Sex-related differences of metyrapone reductase activities in (A) microsomal and (B) cytosolic fractions from the kidney of the rat, mouse, hamster guinea pig and rabbit. Each data point represents the mean of three separate determinations, and error bars represent standard deviation, $n = 3$. ■; male, □; female, Significantly different from male animals (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, student's t test).

3-5. ラット肝 Ms から部分的に精製された MP 還元酵素の基質特異性

Wistar 雄ラットにおける MP 還元的代謝に関与する酵素は、一般に Cyt に主に存在するケトン基を還元する酵素とは異なる可能性が示唆された。また、3-1 項に記載したとおり、雌雄ラット肝における MP 還元酵素活性の生後発達パターンは、AH 還元酵素活性と異なる挙動を示した³⁷⁾。このことから、両薬物を還元する酵素は異なることが示唆された。そこで、Wistar 雄ラット肝 Ms から MP 還元酵素を精製し、MP および AH を還元する酵素が異なることの検討も含めて、その特性を調べることを試みた。しかしながら、本研究では MP 還元酵素を純化精製することができなかつたため、部分精製酵素で基質特異性について調べた。

その結果、本部分精製酵素は MP と同様にピリジン環を有するカルボニル化合物(4-ベンゾイルピリジン、ピリジン-4-アルデヒド、ピリジン-3-アルデヒド、4-アセチルピリジン)を良い基質とし、AH など MP 以外のケトン薬物およびピリジン環を持たないカルボニル化合物に対して全く反応性を示さなかつた (Table 2)。この結果から、MP および先に報告されている AH を代謝する酵素は明らかに異なることが示された。

Table 2. Substrate specificity of partially purified MP reductase for aldehyde and ketone compounds

Substrate	Relative activity (%)
1 mM 4-benzoylpyridine	440
1 mM Pyridine-4-aldehyde	229
1 mM Pyridine-3-aldehyde	157
1 mM 4-acetylpyridine	34
1 mM <i>p</i> -nitroacetophenone	101
1 mM Acetophenone	0
1 mM Benzophenone	0
10 mM DL-glyceraldehyde	0
10 mM D-xylose	0
10 mM D-Glucuronic acid	0
1 mM Menadione	250
1 mM MP	100
1 mM Daunorubicin	0
1 mM Ketoprofen	0
1 mM Bufunolol	0
1 mM Haloperidol	0
1 mM Levobunolol	0
1 mM AH	0
1 mM fenbufen	0

MP : Metyrapone, AH : Acetohexamide

第4節 考察

Wistar 雄ラットに MP を経口投与したとき、血漿中には 4 種類の代謝物 (MPOL, MPOL NOII, MPNOII および MP NOI) が、尿中には 4 種類の代謝物 (MPOL NOII, MPNOII, MPOL NOI および MPOL) が認められた。しかしながら、MP の代謝に関しては SD 雄ラット肝 Ms では 3 種類 (MP NOII, MPOL および MP NOI) の代謝物が同定されているのみである^{13, 14)}。また検討されている代謝組織は SD および Wistar 雌ラットの肝臓、卵巣、副腎および腎臓の 4 組織のみである¹⁸⁾。近年、薬物の酸化お

よび還元的代謝に関与する酵素は、各組織の Ms および Cyt のみならず、Mit にも多くの酵素が存在することが知られている²⁶⁾。第3章において、MP は経口投与後速やかに代謝されることが示唆されたため、本章では、MP の各代謝物の主要な生成組織を明らかにするために、初回通過効果を担う組織として肝臓および小腸を、ならびにケトン還元酵素の存在が認められている7組織に着目し^{13,44)}、これらの組織の上記3細胞画分 (Ms, Cyt および Mit) における MP の酸化的および還元的代謝について検討した。さらに、MP の主代謝反応である MP 還元的代謝に関与する酵素の活性に影響を及ぼす内的要因 (ラットにおける週齢差および性差, ならびに各実験動物の性差) に加え、Wistar 雄ラット肝 Ms から部分精製した MP 還元酵素の基質特異性について、AH も含めて検討した。

一般に、ケトン還元酵素活性は肝 Cyt において高いことが知られている⁶¹⁻⁶⁵⁾。しかしながら、Wistar 雄ラットの各細胞画分における MP 還元酵素活性は、肝 Ms において最も高く、肝 Cyt における本酵素活性は極めて低かった。興味深いことに、肝 Ms に次いで精巣 Ms で高い本酵素活性が認められた (Fig. 7A)。また、Ms と比べてその活性は低いものの、精巣および肝臓の Mit で比較的高い本酵素活性が認められた (Fig. 7A)。一方、Cyt では、副腎において比較的高い MP 還元酵素活性が観察された (Fig. 7A)。各細胞画分における本酵素活性 (nmol/min/mg protein) を有意差検定すると、Ms では肝臓は脳よりも、Mit では精巣は脳よりも、Cyt では副腎は腎臓よりも有意に高いことが認められた (Fig. 7A)。これら各細胞画分における MP 還元酵素活性および組織重量から判断すると、MP から MPOL への還元的代謝の主要組織は肝臓であることが示唆された。それゆえ、肝臓での MP の還元的代謝により MP 経口投与後の血漿中で MPOL が速やかに生成されたこと、および検出された未変化体 MP および5種類の代謝物のうち MPOL の AUC が最も大きかったことに寄与していると考えられた。また、MP 還元酵素活性は肝臓に次いで精巣も高かったことから、精巣もまた経口投与後の血漿中 MPOL 濃度の上昇に一部寄与しているものと推察された。上述した

とおり，MP 還元酵素活性の組織分布（肝臓，卵巣，副腎および腎臓）は，Wistar 雌ラットで検討されている¹⁷⁾。Wistar 雄ラットの肝 Ms および副腎 Cyt に本酵素活性が認められたことは（Fig. 7A），先の Wistar 雌ラットの結果とよく一致していた¹⁷⁾。また，Wistar 雌ラット肝 Ms における本還元酵素活性が低いことは¹⁷⁾，本酵素活性が成熟期では雌が雄に比べて有意に低いことによって支持された（Fig. 8）。さらに，本酵素活性は雌の腎 Ms および Cyt とともに低い¹⁷⁾，成熟期の雌では雄よりも低い結果と一致していた（Fig. 10）。

MPOL への還元的代謝の次に高かった MP NOII への酸化的代謝活性は，肝 Ms および内臓脂肪 Mit で高かった（Fig. 7B）。また，MP NOI への酸化的代謝活性は内臓脂肪の Ms および Cyt で高く，Cyt でのみ内臓脂肪は肝臓よりも有意に高かった（Fig. 7C）。MPOL NOII への代謝活性は他の代謝物への代謝活性と比べて顕著に低く，Cyt でのみ脳は副腎よりも有意に高かった（Fig. 7D）。しかし，MP の還元的代謝活性（MPOL 生成活性）以外の酸化的代謝活性（MP NOI および MP NOII 生成活性）ならびに酸化的還元的代謝（MPOL NOII 生成活性）はいずれも非常に低く，主要な生成組織を明らかにすることはできなかった。しかし，MP 経口投与後に血漿中で認められた MP の酸化的還元的代謝物は，上述した各組織において生成されることが示唆された。一方，肝臓と同様に初回通過効果を担う組織として知られる小腸の各細胞画分における MP 酸化的還元的代謝活性は著しく低かった（Fig. 7）。それゆえ，MP 経口投与後の速やかな代謝（初回通過効果）に小腸はほとんど関与しないものと考えられた。

これまでに，SD 雄ラットの肝 Ms における MP の代謝物として，MP NOII，MPOL および MP NOI が，ならびに肝 Cyt においては MPOL が報告されている¹³⁾。一方，Wistar 雄ラットの肝 Ms における MP NOI への酸化的代謝活性はほとんどなく，肝 Cyt における MPOL への還元的代謝活性は低かったことから（Fig. 7），MP の酸化的還元的代謝活性にラット系統間で差異が認められた。それゆえ，本研究で得られた Wistar 雄ラット（Fig. 5）および既報の SD 雄ラットへの MP 投与後の尿中に排泄された代謝

物の種類およびその排泄量の違いの要因の1つとして、ラットにおけるMPの酸化的還元的代謝の系統差が考えられた。

薬物代謝酵素活性の内的要因による変動は、CYPに関する種々の報告がある^{6,39)}。週齢の観点から見ると、CYP活性は生後発達に伴って大きく変動し、そのパターンは新生児型（新生児に活性が高く、以降、生後発達とともに減少）および思春期型（思春期まで活性は低く、以降、生後発達とともに活性が増加）の2つに大別される⁶⁶⁾。この分類に従うと、Wistarラット肝MsにおけるMP還元酵素活性は新生児型に属すると推察された（Fig. 8）。なお、この生後発達パターンはCYP3A2のそれとよく類似している^{40,67-68)}。一方、他のケトン薬物であるAHのWistarラット肝における還元酵素活性は雌雄ともに4週齢までほとんど認められず、思春期の5~6週齢から雄のみ顕著に増加し、成熟期に有意な性差が観察されたことから、思春期型に属するものと考えられる²²⁾。これらの異なった生後発達パターンに基づくと、Wistarラット肝Msに存在するMPおよびAHを還元する酵素は異なることが推察された。そこで、両酵素が異なることを検証するために、Wistar雄ラット肝Msから部分精製したMP還元酵素の基質特異性について検討したところ、本部分精製酵素はAHに対して全く反応性を示さないことが判明した（Table 2）。これらのことから、Wistar雄ラット肝Msに存在するMPおよびAHを還元する酵素は明らかに異なることが裏付けられた。

Wistarラット肝MsにおけるMP還元酵素活性の生後発達パターンでは、本酵素活性は成熟期では雄の方が雌よりも高く維持された（Fig. 8）。薬物代謝酵素活性が雌よりも雄の方が高く維持される場合、男性ホルモン（テストステロン）が関与することが知られている⁵⁷⁻⁶⁰⁾。本研究において、男性ホルモンの影響について検討するために、4週齢に精巣を摘出したところ、本酵素活性は精巣未摘出ラット（コントロール）に比べて有意に低下した（Fig. 9）。この低下は同時期に精巣を摘出したときのAH還元酵素活性においても同様に認められ、さらに精巣摘出ラットにテストステロンを1日1回7日間反復皮下投与したとき、AH還元酵素活性はコントロールラットと同レベ

ルにまで回復している²²⁾。MP還元酵素活性に関して、精巣摘出ラットにテストステロンを投与した試験は実施しなかったが、AH還元酵素活性で認められている結果を考慮すると、雄の方が雌よりも高かった本還元酵素活性はテストステロンに依存しているものと推察された。

各実験動物におけるMP還元酵素活性の性差は、肝Msではラット、モルモットおよびマウスで、肝Cytではウサギおよびハムスターで認められ、マウス以外は雄の方が雌よりも高い活性を示した (Fig. 10)。さらに、モルモットおよびラットの腎Ms、ウサギ、モルモット、ハムスターおよびマウスの腎Cytにおける本酵素活性もまた、マウス以外は雄の方が雌よりも高かった (Fig. 11)。このように、マウス以外の実験動物の肝および腎のMsあるいはCytに存在する本酵素活性は雄の方が雌よりも高かったことから、ラット肝Msに存在する酵素と同様にテストステロンに依存している可能性が推察された。一方、マウスの肝Msおよび腎Cytにおける本酵素活性は、他の実験動物と異なり雌の方が雄よりも高かった (Fig. 10 および 11)。ところで、薬物代謝酵素のうち、雌の方が雄よりも高い活性を示す酵素がある。例えば、CYP2A1、CYP2C7 および CYP2C12 などであり、これら CYP 分子種の代謝活性は卵巣摘出で低下し、女性ホルモン (エストラジオール) 投与により増加している^{20-22, 54)}。このことから、他の実験動物と逆の性差を示したマウス肝Msおよび腎CytにおけるMP還元酵素活性は女性ホルモン依存酵素かもしれない。ケトン薬物還元酵素のうち、AH還元酵素活性はラットおよびウサギ肝Cytでは雌の方が雄よりも高い性差が認められている²⁴⁾。しかしながら、MP還元酵素活性はラット肝Cytではほとんど認められなかったため、MPはラット肝Cytに存在するAHなどのケトン薬物還元酵素の基質とならないことが明らかとなった。さらに、Wistar雄ラットにおけるMP還元酵素活性が肝臓および腎臓ともにMsの方がCytよりも高かったことから、MP還元酵素はCytで高い活性を示すAHや多くのケトン化合物を還元する酵素とは明らかに異なることが推察された。

以上のように、週齢差および性差に関する検討より、MP還元酵素活性は種々の内的要因によって変動することが認められた。このため、MP還元酵素活性で認められた内的要因の情報は、ヒトにMPを投与したときの有効性や安全性を考慮する上での投与量の調節に有用な基礎データになると思われる。さらに、MP還元酵素は、同じケトン薬物であるAHを還元する酵素とは明らかに異なることが認められた。これらの結果は、ケトン薬物の還元的代謝に様々な酵素が関与することを裏付けるものであるとともに、ヒトにおけるケトン薬物の代謝動態を予測・考慮するには、主たる代謝酵素が何であるかを実験動物において十分に検討しておくことの重要性を改めて提唱するものである。

第5節 小括

本章では、Wistar雄ラットにおけるMPの酸化的還元的代謝の主要な組織、およびMP還元酵素活性の内的要因について検討した。以下に得られた結果を要約する。

1) MPの酸化的還元的代謝活性のうち、肝MsにおけるMPOLへの還元的代謝活性が最も高く、各細胞画分におけるMP還元酵素活性 (nmol/min/mg protein) を有意差検定したところ、Msでは肝臓は脳よりも、Mitでは精巣は脳よりも、Cytでは副腎は腎臓よりも有意に高かった。

2) MP経口投与後の速やかな代謝に小腸の寄与はほとんどなく、MP還元酵素活性および組織重量を考慮すると、MPOLの主要な生成組織は肝臓であり、肝臓の次に活性が高かった精巣もMPOLの生成に一部関与していることが示唆された。

3) Wistar 雄ラット肝 Ms における MP 還元酵素活性の生後発達パターンは新生児型に属し、AH 還元酵素活性で報告されているパターン（思春期型）と異なっていた。また、Wistar 雄ラット肝 Ms から部分精製した MP 還元酵素は AH に対して全く反応性を示さなかったことから、Wistar 雄ラット肝 Ms において MP および AH を還元する酵素は異なることが判明した。

4) Wistar ラット肝 Ms における MP 還元酵素活性は、思春期から雄の方が雌よりも高くなり、思春期での精巣摘出により有意に低下したことから、テストステロンに依存している可能性が考えられた。

5) Wistar ラットにおける MP 還元酵素活性は肝臓および腎臓ともに Ms の方が Cyt よりも高く、一般に Cyt で高い活性が認められているケトン還元酵素と異なることが推察された。

6) 肝および腎の Ms あるいは Cyt における MP 還元酵素活性の性差は、ラット以外の実験動物においても認められたが、マウスの肝 Ms および腎 Cyt のみ本酵素活性は雌の方が雄よりも高かった。

以上の結果から、Wistar ラットにおける MP 還元酵素活性は週齢や性などの内的要因によって変動することが明らかとなった。さらに、MP 還元酵素は、同じケトン薬物である AH を還元する酵素とは明らかに異なることが示された。それゆえ、ヒトにおけるケトン薬物の代謝動態を予測するには、主たる代謝酵素が何であるかを十分に検討することが必要である。

第5章 MP の *in vitro* および *in vivo* 代謝過程における薬物相互作用

第1節 序

一般に、薬物は他の薬物と併用投与する 경우가多く、併用した薬物が薬物代謝酵素に影響を及ぼす場合、その薬物の体内動態が大きく変動する場合がある。例えば、ある薬物との併用により、非併用時と比べて血漿中未変化体濃度が高く維持されたとき、その薬物代謝酵素が阻害された可能性が考えられる^{28,29)}。一方、ある薬物との併用により、未変化体が非併用時と比べて低濃度になったとき、その薬物代謝酵素が誘導された可能性が考えられる^{28,29)}。このように、血漿中濃度の変動が薬物代謝酵素による場合、その薬物相互作用を予測するために代謝酵素を明らかにすることが必要である。MP の還元的代謝に関与する酵素として、雌 NMRI マウス肝 Ms から精製した酵素はアルデヒド還元酵素および 11 β -HSD であることが示唆されている^{18, 25)}。また、ヒト肝 Cyt における MP 還元酵素は酵素阻害剤感受性の観点から DT-ジアホラーゼ（ジクマロールによる阻害）およびジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ（インドメタシンによる阻害）の関与が、Wistar 雌ラット副腎および卵巣 Cyt における MP 還元酵素はカルボニル還元酵素（クエルシトリンによる阻害）の関与が示唆されている^{17,26)}。さらに、MP の酸化的代謝に関与する酵素として、SD 雄ラット肝 Ms における MP 酸化酵素は CYP（SKF-525A または一酸化炭素処理による代謝活性の低下）の関与が示唆されている⁶⁹⁾。しかしながら、Wistar 雄ラットにおける MP の還元および酸化酵素に関する報告はなく、主代謝酵素も不明である。

上述したように、薬物代謝酵素活性はその代謝酵素に影響を及ぼす阻害剤または誘導剤との併用によりしばしば変動する。このため、ヒトでの薬物代謝に関する薬物相互作用の予測は、主要な代謝組織の細胞画分での *in vitro* 代謝または動物に投与したときの血漿中薬物動態の試験結果に基づいて行われている³⁰⁻³²⁾。これまでに MP は CYP による薬物代謝の阻害剤としてラットの *in vitro* および *in vivo* 試験で古くから使

用されている^{70,71)}。しかしながら、MPは臨床で使用されているにもかかわらず、他の薬物と併用したときのMPの薬物動態への影響については報告されていない。

本章では、第4章で明らかにしたWistar雄ラットにおける主要な代謝組織の細胞画分におけるMPの還元的代謝活性(MPOL生成活性)および酸化的代謝活性(MP NOII生成活性)について、各種阻害剤の影響を検討し、これらの代謝に関与する主要な酵素を検討した。また、MPの主要な代謝酵素の阻害剤の中から医薬品として使用されているグリチルレチン酸(GA)を選び、MPとの薬物動態学的相互作用を*in vitro*および*in vivo*試験で評価した。さらに、ヒト肝Ms, MitおよびCytにおけるMPの還元的および酸化的代謝活性を検討後、ラットと同様に各種阻害剤の影響について検討し、Wistar雄ラットとのMP代謝の種差の有無およびMPの主要な代謝酵素阻害剤を併用投与したときのヒトでの薬物動態的相互作用の可能性について考察した。

第2節 ラット肝および副腎におけるMP還元的および酸化的代謝に対する各種阻害剤の影響

第4章第2節では、Wistar雄ラットにおいて、MPOLへの還元的代謝活性およびMP NOIIへの酸化的代謝活性が高いことが判明した(Fig. 7)。そこで、これらのMP還元的および酸化的代謝に関与する酵素を明らかにするために、MP還元的代謝(MPOL生成)については肝MsおよびMit、ならびに副腎Cyt、またMP酸化的代謝(MP NOII生成)については肝Msにおける各種酵素阻害剤の影響について検討した(Table 3)。

肝MsおよびMitにおけるMPOLへの還元的代謝活性は、いずれも1 μM T0504(11β-HSD1阻害剤)によって強く阻害された(約91%)。また、本還元酵素活性はいずれも1 μM GA(強力に11β-HSD1を阻害する医薬品)^{72,73)}によって強く阻害された(それぞれ77および約92%)。さらに、1 mM phenobarbital(アルデヒド還元酵素阻害

剤) によってそれぞれ約 62 および 68%, ならびに 100 μ M ketoconazole (CYP 阻害剤) によってそれぞれ約 45 および 53%阻害された。興味深いことに, 副腎 Cyt における MP 還元酵素活性は上記の阻害剤によってほとんど阻害されず, 100 μ M quercetin (カルボニル還元酵素阻害剤) によってのみ約 65%阻害された。MP NOII への酸化的代謝活性は, 100 μ M ketoconazole および 100 μ M quercetin (いずれも CYP 阻害剤) によってそれぞれ約 55 および 50%阻害されたが, 他の阻害剤によって顕著に阻害されなかった。これらのことから, MPOL への還元的代謝および MP NOII への酸化的代謝に関与する主要な代謝酵素は, それぞれ 11 β -HSD1 および CYP であることが示唆された。

Table 3. Effects of various inhibitors on the production activity of MPOL and MP NOII in rat liver microsomal, mitochondrial and adrenal cytosolic fractions

Measured substance Subcellular fraction	MPOL			MP NOII
	LMs	LMit	Acyt	LMs
1 μ M T0504	91.2 \pm 0.7	91.5 \pm 3.3	—	—
1 μ M GA	77.0 \pm 10.8	92.3 \pm 0.5	NT	—
100 μ M Phenobarbital	19.4 \pm 6.1	20.5 \pm 7.2	—	4.5 \pm 1.2
1 mM Phenobarbital	61.5 \pm 4.2	68.4 \pm 6.7	—	12.2 \pm 0.9
10 μ M Ketoconazole	4.1 \pm 3.0	10.2 \pm 4.8	—	18 \pm 6.6
100 μ M Ketoconazole	45.3 \pm 6.8	53.3 \pm 7.8	11.3 \pm 0.0	55.3 \pm 23.8
10 mM Pyrazol	—	33.1 \pm 0.0	—	19.9 \pm 8.0
100 μ M Quercetin	18.0 \pm 0.1	2.6 \pm 2.0	64.9 \pm 0.6	49.3 \pm 16.8

Each data point represents the average and standard deviation of triple determinations, The data are expressed as percent inhibition relative to the production activity of MPOL and MP NOII in the tissue subcellular fractions as control in the absence of inhibitor. —:no inhibition, NT; not tested. LMs, liver microsomal fraction; LMit, liver mitochondrial fraction; ACyt, adrenal cytosolic fraction.

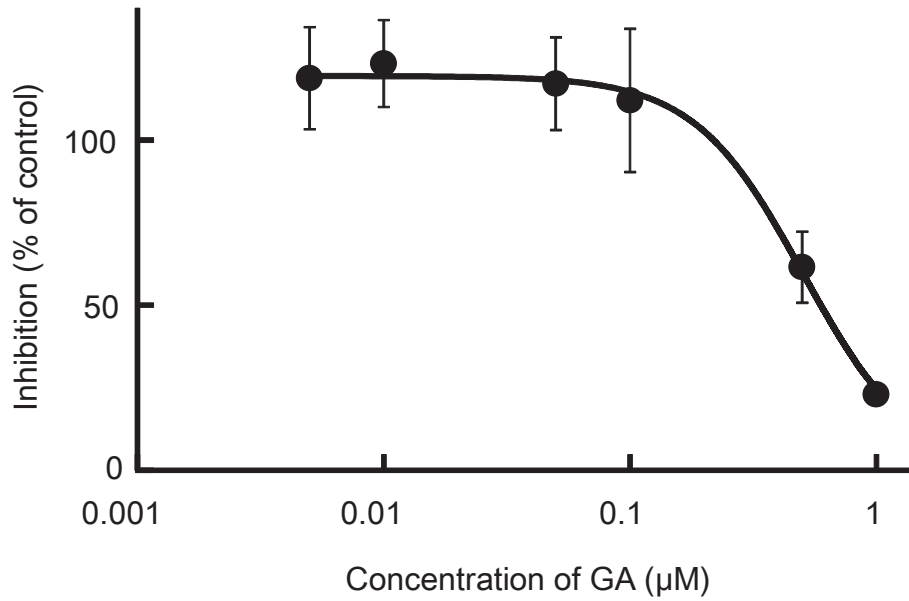
第3節 *In vitro* および *in vivo* における MP 代謝に及ぼす GA の影響

3-1. ラット肝における MP 還元酵素活性に及ぼす GA の影響

上述したように、Wistar 雄ラット肝 Ms および Mit における NADPH 生成系存在下において、MP は主に MPOL に還元された。また、11 β -HSD1 の選択的阻害剤である T0504 を 1 μ M で Ms または Mit を含む酵素反応系に添加したとき、MP 還元酵素活性 (MPOL 生成活性) はいずれも約 91% 阻害された (Table 3)。それゆえ、MPOL への還元的代謝に関与する主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 と考えられたため、11 β -HSD1 阻害剤と MP との併用投与は MP の代謝動態に何らかの影響を及ぼす可能性が推測された。そこで、この仮説を実証すべく、医薬品として使用され、MP 還元酵素活性を強く阻害した GA に着目し、その *in vitro* 阻害効果について、さらに検討を加えた。なお、GA 濃度は 11 β -HSD1 の基質であるコルチゾンからコルチゾールへの還元的代謝に関する阻害定数 (IC_{50}) に基づいて設定した⁷²⁾。

GA を種々の濃度で反応系に添加したとき、GA はラット肝 Ms および Mit のいずれにおいても本酵素活性を濃度依存的に阻害した。これら結果から、 IC_{50} を算出すると、ラット肝 Ms および Mit における本酵素活性に対する IC_{50} はそれぞれ 0.62 および 0.10 μ M であった (Fig. 12A および 12B)。これらのことから、11 β -HSD1 阻害剤である GA は、両画分における本酵素活性を約 0.1 μ M (10^{-7} M) オーダーの低濃度で阻害することが明らかとなった。

A



B

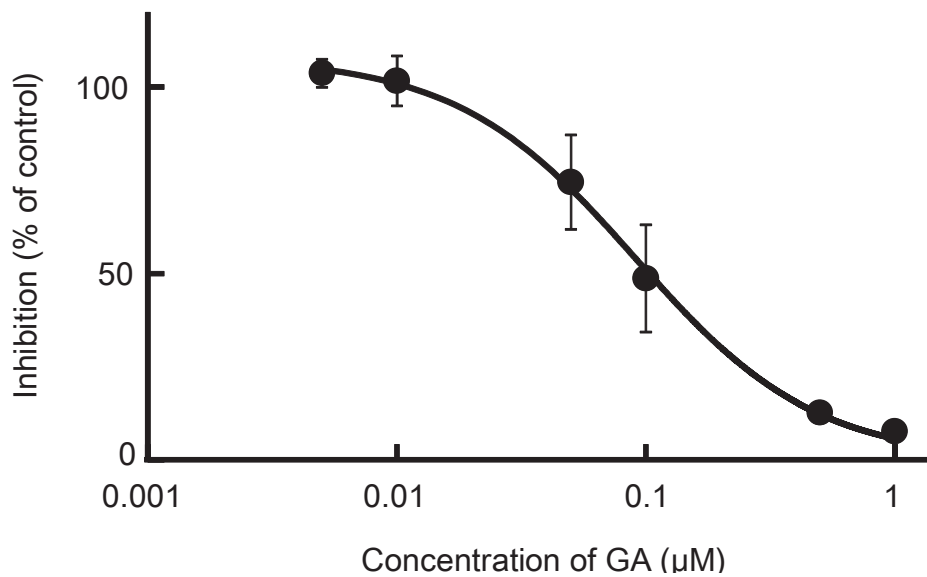


Fig. 12. Inhibitory effect of GA on MP reduction activity in liver microsomal (A) microsomal and (B) mitochondrial fractions.

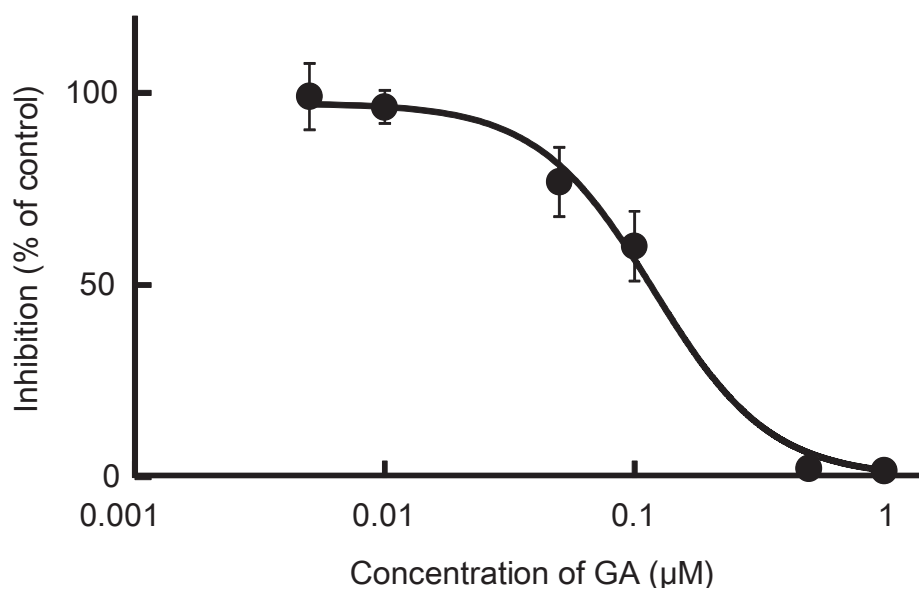
Each data point represents the average of triple determinations and error bars represent the standard deviation. The solid line represents the fitted line obtained by a nonlinear regression analysis.

3-2. ラット精巣における MP 還元酵素活性に及ぼす GA の影響

第 4 章第 2 節に示したように、Wistar 雄ラットの Ms および Mit における MP 還元酵素活性が肝臓の次に高かった組織は精巣であったため(それぞれ 2.96 および 0.83 nmol/min/mg protein), 精巣 Ms および Mit における本酵素活性に及ぼす GA の阻害効果について肝臓と同様に検討した (Fig. 13A および 13B)。

その結果, 両細胞画分における本酵素活性は GA 濃度に依存して阻害され, IC_{50} はそれぞれ 0.13 および 0.07 μM であった (Fig. 13A および 13B)。このことから, 精巣においても GA は両画分における本酵素活性を約 0.1 μM (10^{-7} M) オーダーの低濃度で阻害することが明らかとなった。さらに, 1 μM T0504 を Ms または Mit を含む酵素反応系に添加したとき, 本酵素活性はいずれも約 90%阻害されたことから (data not shown), 肝臓と同様に精巣 Ms および Mit においても MPOL への還元的代謝に $11\beta\text{-HSD1}$ が関与することが示唆された。

A



B

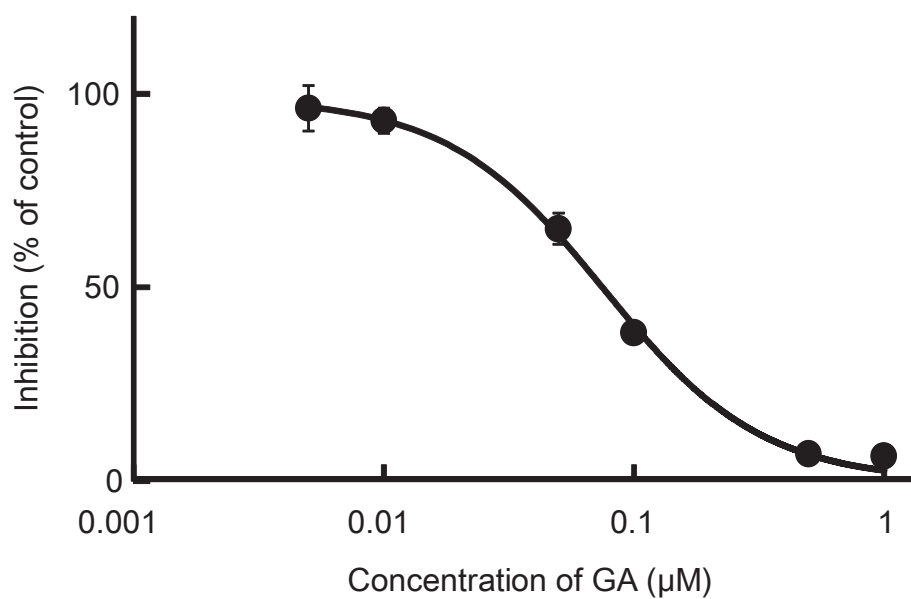


Fig. 13. Inhibitory effect of GA on MP reduction activity in testis (A) microsomal and (B) mitochondrial fractions.

Each data point represents the average of triple determinations and error bars represent the standard deviation. The solid line represents the fitted line obtained by a nonlinear regression analysis.

3-3. MP および MPOL の血漿中薬物動態に及ぼす GA 併用投与の影響

In vitro 代謝阻害実験において、ラット肝および精巢の Ms および Mit における MP 還元酵素活性はともに GA 濃度依存的に強く阻害された (IC_{50} : 約 10^{-7} M オーダー)。そこで次に、MP および GA を併用投与したときの MP およびその代謝物の血漿中動態に及ぼす GA の影響について検討した。Wistar 雄ラットに MP 単独または GA 併用で投与したときの MP および MPOL の血漿中濃度推移、ならびにこれらの薬物動態パラメータをそれぞれ Fig. 14 および Table 4 に示す。なお、GA による 11β -HSD1 の阻害は投与後速やかであったことから⁷³⁾、その阻害の影響は MP 投与後 6 時間まで評価した。また、GA の投与方法 (投与量および投与回数) は、Lin らの報告に基づいて設定した⁷³⁾。

GA を併用投与したとき、未変化体 MP の C_{max} は MP 単独投与と同様に、MP 投与 0.25 時間後であり、GA は MP の吸収に影響を及ぼさないことが認められた (Fig. 14A および Table 4)。その後、血漿中 MP 濃度の $t_{1/2}$ は GA 併用により MP 単独投与に比べて約 2 倍に延長し、投与後 2 時間以降に有意な増加が認められた (Fig. 14A および Table 4)。また、MP の AUC_{6h} (295.19 ng·h/mL) は MP 単独投与 (130.81 ng·h/mL) に比べて約 2.2 倍に増加した (Table 4)。一方、血漿中 MPOL 濃度は GA 併用により投与後初期に MP 単独投与に比べて有意に低下した (Fig. 14B)。その後、血漿中 MPOL 濃度は緩やかに増加し、 t_{max} は MP 単独投与の 2 時間から 4 時間に延長され、それ以降の血漿中濃度は MP 単独投与群と同じ推移を示した (Fig. 14B)。これらを反映して、GA 併用群の MPOL の C_{max} および AUC_{6h} (それぞれ 54.4 ng/mL および 211.65 ng·h/mL) は、MP 単独投与群 (それぞれ 114.30 ng/mL および 431.15 ng·h/mL) の約 1/2 となった (Table 4)。

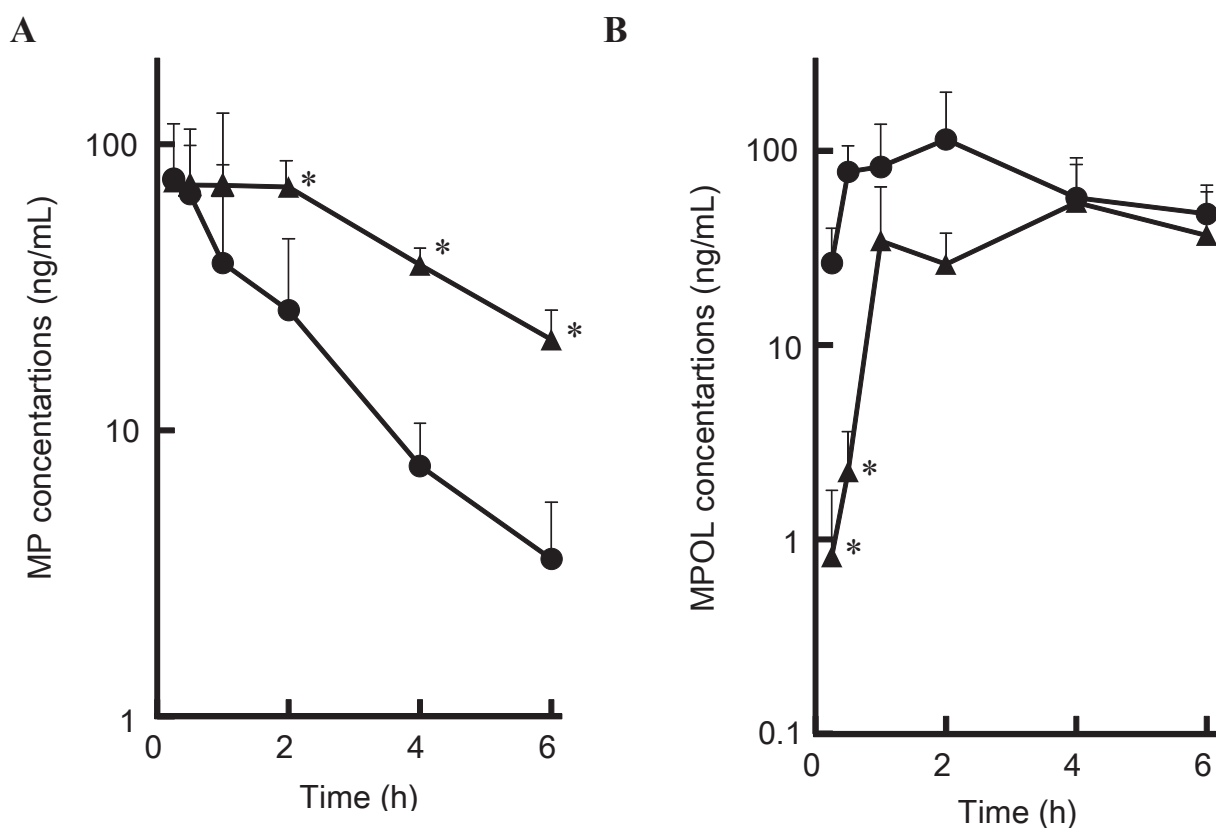


Fig. 14. Plasma concentration profiles of (A) MP and (B) MPOL after the co-administration of MP and GA or vehicle to male rats.

MP was orally administered at a single dose of 50 mg/kg. GA was intraperitoneally administered three times at a dose of 10 mg/kg before the MP dose. Each data point represents the mean of three separate determinations and error bars represent the standard deviation. Asterisk (*) indicates significant differences compared to MP dose group at $p < 0.05$. ●, MP alone; ▲, MP plus GA.

Table 4 Pharmacokinetic parameters of MP and MPOL after the co-administration of MP and GA or vehicle to male rats

Measured substance	MP		MPOL	
	MP alone	GA combination	MP alone	GA combination
Dose				
t_{max} (h)	0.25	0.25	2.00	4.00
C_{max} (ng/mL)	75.50	73.80	114.30	54.4
$t_{1/2}$ (h)	1.29	2.26	3.15	—
AUC _{6h} (ng·h/mL)	130.81	295.19	431.15	211.65
AUC _∞ (ng·h/mL)	137.53	363.03	646.55	—

MP was orally administered at a single dose of 50 mg/kg. GA was intraperitoneally administered three times at a dose of 10 mg/kg before the MP dose. The pharmacokinetic parameters were calculated from mean plasma concentrations, $n=3$. —, not calculated.

3-4. MPOL NOII, MP NOII および MP NOI の血漿中薬物動態に及ぼす GA 併用投与の影響

ラットに経口投与後の未変化体 MP およびその還元体 MPOL の血漿中薬物動態は、GA 併用投与により明らかに変動した。そこで、MPOL 以外の代謝物の血漿中動態についても同様に検討した。MP 単独または GA 併用群の MP NOI, MPOL NOII および MP NOII の血漿中濃度推移、ならびにこれらの薬物動態パラメータをそれぞれ Fig. 15 および Table 5 に示す。なお、MPOL NOI の血漿中濃度は、両投与群ともに採血期間中定量下限未満であったため (data not shown), PK 解析から除外した。

血漿中 MPOL NOII 濃度は、GA 併用により MPOL と同様に投与後初期に有意に低下し、投与 0.25 時間後は定量下限未満となった (Fig. 15A)。その後、MPOL NOII 濃度は緩やかに増加したものの、MP 単独投与群と比較すると投与 4 時間後も有意に低かった (Fig. 15A)。その結果、MPOL NOII の C_{max} および AUC_{6h} (それぞれ 18.90 ng/mL および 69.83 ng·h/mL) は MP 単独投与群 (それぞれ 31.30 ng/mL および 119.94 ng·h/mL) の約 1/2 となった (Table 5)。一方、GA 併用群の血漿中 MP NOII 濃度は MP 単独投与群よりも高く推移し、MP 投与 2 および 4 時間後に MP 単独投与群よりも有意に高かった (Fig. 15B)。その結果、MP NOII の C_{max} および AUC_{6h} (それぞれ 38.80 ng/mL および 163.01 ng·h/mL) は、MP 単独投与群 (それぞれ 19.40 ng/mL および 100.74 ng·h/mL) のそれぞれ約 2 および 1.6 倍に増加した (Table 5)。一方、血漿中 MP NOI 濃度は顕著に低く、その濃度に大きな個体差も認められたため、GA 併用投与による影響を明らかにすることはできなかった (Fig. 15C)。

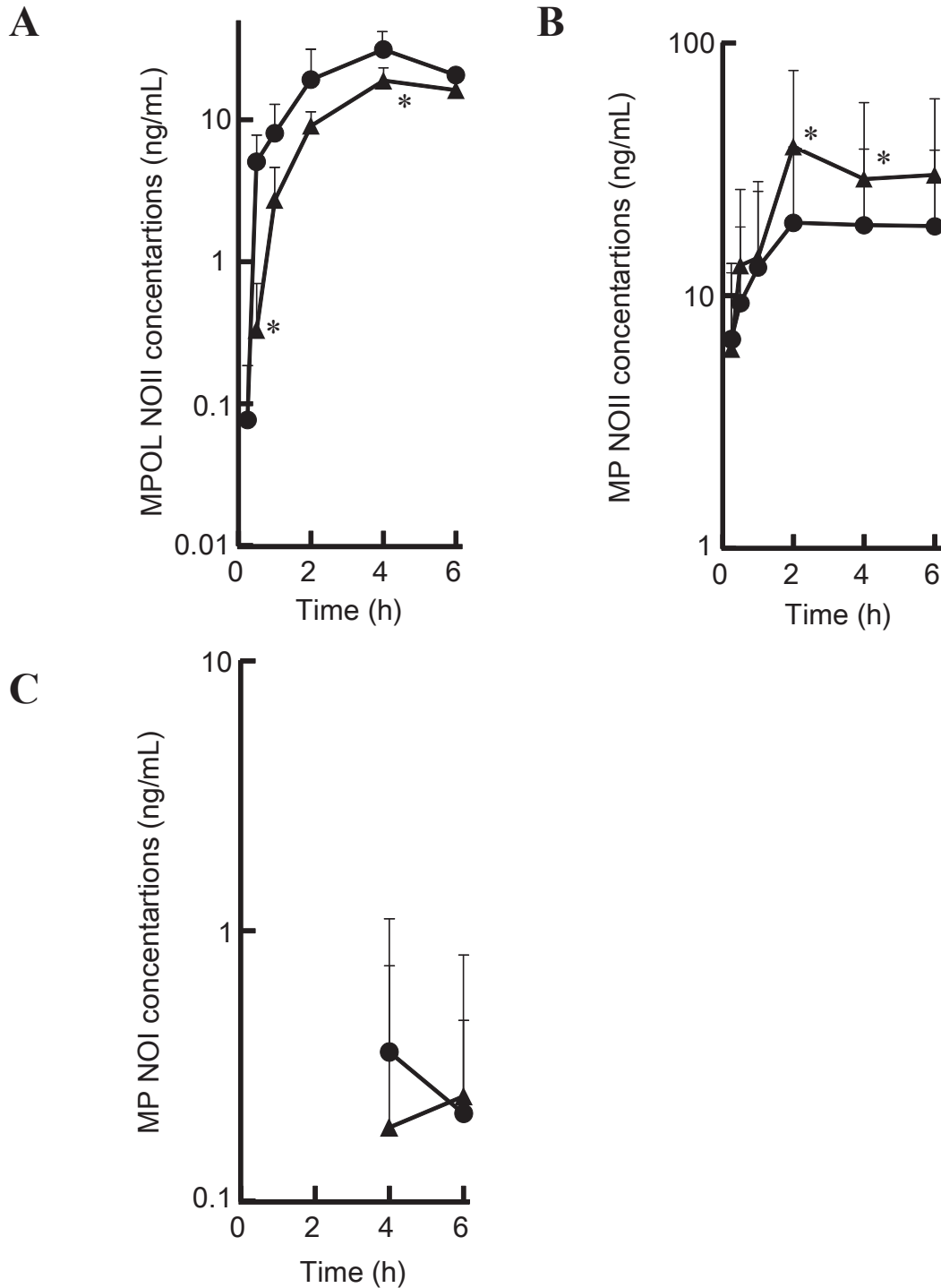


Fig. 15. Plasma concentration profiles of (A) MPOL NOII, (B) MP NOII and (C) MP NOI after the co-administration of MP and GA or vehicle to male rats.

MP was orally administered at a single dose of 50 mg/kg. GA was intraperitoneally administered three times at a dose of 10 mg/kg before the MP dose. Each data point represents the mean of three separate determinations and error bars represent the standard deviation. Asterisk (*) indicates significant differences compared to the MP dose group at $p < 0.05$. ●, MP alone; ▲, MP plus GA.

Table 5. Pharmacokinetic parameters of MPOL NOII and MP NOII after the co-administration of MP and GA or vehicle to male rats

Measured substance	MPOL NOII		MP NOII		
	Dose	MP alone	GA combination	MP alone	GA combination
t _{max} (h)		4.00	4.00	2.00	2.00
C _{max} (ng/mL)		31.30	18.90	19.40	38.80
t _{1/2} (h)		—	—	88.25	10.78
AUC _{6h} (ng·h/mL)		119.94	69.83	100.74	163.01
AUC _∞ (ng·h/mL)		—	—	2494.41	629.53

MP was orally administered at a single dose of 50 mg/kg. GA was intraperitoneally administered three times at a dose of 10 mg/kg before the MP dose. The pharmacokinetic parameters were calculated from mean plasma concentrations, n=3. —, not calculated.

第4節 ヒトにおけるMP代謝に関するラットとの比較

4-1. ヒト肝におけるMPの還元的小よび酸化的代謝活性

ヒトにおける *in vitro* 代謝試験では、Maser らは肝 Ms および Cyt における MP 還元酵素活性は Cyt の方が高いため、肝 Cyt における MPOL への還元に関する代謝酵素 (DT-ジアホラーゼおよびジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ) について報告している²⁶⁾。しかし、Mit における MP 代謝および MP 還元酵素活性以外の代謝活性については未検討のままである。第4章第2節において、Wistar 雄ラット肝では MP の還元的小よび酸化的代謝活性が認められたことから、ラットと同じ条件でヒト肝 Ms, Mit および Cyt におけるこれらの代謝活性を調べた (Table 6)。

ヒト肝 Ms, Mit および Cyt における MP 還元酵素活性はそれぞれ 2.92, 1.10 および 1.05 nmol/min/mg protein であり、第4章第2節に示した Wistar 雄ラットの結果と同様にその活性は Ms で最も高かった。MP 還元酵素活性の高い細胞画分が Maser らの報告と異なっていた原因として、MP 還元酵素は Ms および Cyt で異なることが予想されるが、Maser らは酵素反応時間を 30 分で実施しており²⁶⁾、Ms では 60 分を要することから、比較的早く代謝が完了した Cyt に比べて反応が不十分であった可能性が推察された。MPOL への還元酵素活性以外では MP NOII への酸化的代謝活性のみ認められ、その活性は肝 Ms および Mit でそれぞれ 0.55 および 0.02 nmol/min/mg protein であった。このように、MPOL および MP NOII が *in vitro* でそれぞれ主要な MP の還元的小よび酸化的代謝物であったことは、Wistar 雄ラット肝における MP 代謝の特徴と非常に類似していた。

Table 6. Activity for the reduction and oxidation of MP in liver microsomal, mitochondrial and cytosolic fractions in humans

Measured substance	Specific activity (nmol/min/mg protein)	
	MPOL	MP NOII
LMS	2.92±0.04	0.55±0.02
LMit	1.10±0.00	0.02±0.00
LCyt	1.05±0.07	LLOQ

Each data point represents the average and standard deviation of triple determinations, LMS, liver microsomal fraction; LMit, liver mitochondrial fraction; LCyt, liver cytosolic fraction.

4-2. ヒト肝における MP 還元的小および酸化的小代謝に対する各種阻害剤の影響

ヒトの肝 Ms, Mit および Cyt における MPOL への還元的小代謝活性, ならびに肝 Ms における MP NOII への酸化的小代謝活性に対する各種阻害剤の影響について検討した (Table 7)。

ヒト肝 Ms および Mit における MPOL への還元的小代謝活性はいずれも 1 μ M T0504 (11 β -HSD1 阻害剤) によって最も強く阻害されたが (阻害率: それぞれ約 92 および 55%), 他の阻害剤によって顕著な阻害は認められなかった。ヒト肝 Cyt における本還元酵素活性はラット副腎 Cyt の場合と同様に, 100 μ M quercetin (カルボニル還元酵素阻害剤) によってのみ阻害された (阻害率: 約 70%)。

MP NOII への酸化的小代謝活性はラット肝 Ms と同様に, 100 μ M ketoconazole および 100 μ M quercetin (いずれも CYP 阻害剤) によってのみ阻害された (阻害率: それぞれ約 75 および 82%)。

このように, MP 還元酵素活性がヒトでは肝 Cyt で認められたこと, ならびに MPOL への還元的小代謝にアルデヒド還元酵素および CYP の関与が少ないことは, Wistar 雄ラット肝における代謝と異なっていた。一方, MPOL への還元的小代謝および MP NOII への酸化的小代謝に関与する主要な代謝酵素がそれぞれ 11 β -HSD1 および CYP であったことは, Wistar 雄ラット肝 Ms および Mit における MP 代謝の特徴と非常に類似して

いた。

Table 7. Effects of various inhibitors on the production activities of MPOL and MP NOII in human liver microsomal, mitochondrial, and cytosolic fractions

Measured substance	MPOL			MP NOII
Subcellular fraction	LMs	LMit	LCyt	LMs
1 μ M T0504	92.3 \pm 1.4	54.5 \pm 1.5	6.3 \pm 1.4	—
100 μ M Phenobarbital	1.2 \pm 0.0	—	9.7 \pm 4.1	6.2 \pm 0.6
1 mM Phenobarbital	11.4 \pm 0.4	11.3 \pm 6.4	6.2 \pm 1.5	12.3 \pm 0.9
10 μ M Ketoconazole	—	9.8 \pm 0.0	5.5 \pm 4.4	34.7 \pm 0.3
100 μ M Ketoconazole	—	16.1 \pm 5.2	9.6 \pm 0.0	75.2 \pm 1.6
10 mM Pyrazol	—	—	3.8 \pm 4.6	7.7 \pm 2.9
100 μ M Quercetin	—	25.6 \pm 7.9	68.6 \pm 6.1	82.2 \pm 0.9

Each data point represents the average and standard deviation of triple determinations. The data are expressed as percent inhibition relative to the production activity of MPOL and MP NOII in the tissue subcellular fractions as control in the absence of inhibitor. —:no inhibition. LMs, liver microsomal fraction; LMit, liver mitochondrial fraction; LCyt, liver cytosolic fraction.

第5節 考察

MPの還元的代謝に関与する酵素として、アルデヒド還元酵素および11 β -HSD（雌NMRIマウス肝Ms）、DT-ジアホラーゼおよびジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ（ヒト肝Cyt）、ならびにカルボニル還元酵素（Wistar雌ラット副腎および卵巣Cyt）が報告されている^{17, 18, 25, 26}。一方、MPの酸化的代謝に関与する酵素として、CYP（SD雄ラット肝Ms）の関与が示唆されている⁶⁹。しかしながら、Wistar雄ラットにおけるMP代謝に関与する酵素は知られていない。本章では、Wistar雄ラットにおいて、MPの主要な代謝組織の細胞画分におけるMPの還元的および酸化的代謝活性に関与する主要な代謝酵素を明らかにするために、各種阻害剤の影響について検討した。また、MPおよびその主要な代謝酵素の阻害剤との薬物動態学的相互作用を検討するた

めに、医薬品として使用されている GA を選択した。さらに、ヒト肝の 3 細胞画分における MP の還元的および酸化的代謝活性，ならびにこれらの活性に対する各種阻害剤の影響について検討した。

ラット肝 Ms における MPOL への還元酵素活性は，T0504 (11 β -HSD1 選択的阻害剤) によって最も強く阻害された (Table 3)。この阻害は Mit においても同様に認められた (Table 3)。一般に，11 β -HSD1 は主に Ms に存在することが知られている^{75,77,78)}。しかし，本研究結果から Mit においても MP 還元酵素の存在が明らかとなり，本酵素活性は両画分ともに主に 11 β -HSD1 の関与が示唆された。また，本酵素活性は phenobarbital (アルデヒド還元酵素阻害剤) および ketoconazole (CYP 阻害剤) によっても阻害された。本酵素活性に関与する酵素が 11 β -HSD およびアルデヒド還元酵素であったことは，雌マウス肝 Ms における報告と同様であった^{18,25)}。一方，副腎 Cyt において MPOL への還元的代謝に関与する酵素は 11 β -HSD1 ではなく，カルボニル還元酵素であることが示唆された (Table 3)。カルボニル還元酵素の関与は Wistar 雌ラットの副腎 Cyt においても報告されていることから¹⁷⁾，副腎における MP 還元酵素が性によって異なる可能性は低いと推察された。このように，MPOL への還元的代謝には数種類の代謝酵素の寄与が考えられたが，主代謝組織が肝臓であることを考慮すると，MPOL への還元的代謝に関与する主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 であることが示唆された。一方，肝 Ms における MP NOII への酸化的代謝活性は ketoconazole および quercetin (いずれも CYP 阻害剤) によって阻害されたことから，この代謝には CYP が主に関与することが示唆された (Table 3)。MP の酸化的代謝に CYP が関与することは，SD 雄ラット肝 Ms の報告と同様であった⁶⁹⁾。

MPOL への還元的代謝に関与する主要な酵素は 11 β -HSD1 と示唆されたが (Table 3)，11 β -HSD1 を阻害する薬剤はいくつか報告されている^{9,72,74)}。これらの阻害剤のうち，本研究では併用投与薬による MP の薬物動態学的相互作用を検討するために，11 β -HSD1 を低濃度で強力に阻害する医薬品として知られている GA^{72,73)} を選択した。

GA は 11 β -HSD1 および 11 β -HSD2 を阻害するが、これらの酵素はそれぞれ主に肝臓および腎臓に存在し、補酵素はそれぞれ NADPH および NAD⁺を必要とする⁷⁵⁻⁷⁸)。上述したとおり、Wistar 雄ラットにおける MPOL への還元的代謝に関与する主代謝組織は肝臓であった。また、補酵素は NAD⁺ではなく NADPH を必要としたため (data not shown) , GA が MP の代謝に関与する酵素を阻害した分子種は 11 β -HSD1 であることが示唆された。また、MP 還元酵素活性の高い組織は肝臓および精巣であったが、GA は雄ラットのこれらの組織の 11 β -HSD1 を強く阻害することが知られている⁷⁹)。このことから、GA は 11 β -HSD1 阻害に関する MP の薬物相互作用を評価する上で適切な化合物と考えられた。GA を肝 Ms または Mit を含む酵素反応系に添加したとき、本酵素活性はいずれも低濃度で阻害された (IC₅₀: それぞれ 0.62 および 0.10 μ M; Fig. 12)。また、GA は精巣 Ms および Mit における本酵素活性もまた低濃度で阻害した (IC₅₀ : それぞれ 0.13 および 0.07 μ M ; Fig. 13) 。これらのことから、MPOL への還元的代謝に 11 β -HSD1 が関与することは肝臓だけでなく精巣においても強く示唆された。肝臓および精巣で得られた IC₅₀ は、11 β -HSD1 活性に対する GA の阻害定数 (K_i: 0.44 μ M) と類似していた⁷²)。このように、GA は MPOL への還元酵素活性を低濃度で阻害したため、GA の併用投与は MP の代謝動態に何らかの影響を及ぼす可能性が推測された。予期したとおり、GA 併用により血漿中 MPOL 濃度は MP 単独投与群と比べて MP 投与後速やかに有意に低下し、C_{max} および AUC_{6h} は MP 単独投与群の約 1/2 となった (Fig. 14B および Table 6) 。GA による阻害は 11 β -HSD1 によって生成されるコルチゾンからコルチゾールへの阻害でも認められているため⁷³)、MPOL の薬物動態パラメータ (C_{max} および AUC_{6h}) の低下もまた 11 β -HSD1 阻害によるものと示唆された。しかし、投与 4 時間以降の MPOL の血漿中濃度が MP 単独投与群とほぼ同レベルになった (Fig. 14B) 。この GA による MP の代謝阻害効果が比較的短時間であったことは、GA による 11 β -HSD1 阻害が速やかに消失することと一致した^{73,79})。一方、MP の血漿中濃度は GA 併用により MP 単独投与群と比べて MP 投与後 2 時間以降に有意に増加し、C_{max}

および AUC_{6h} は MP 単独投与群の約 2.2 倍に増加し、 $t_{1/2}$ は約 2 倍に延長した (Fig. 14A および Table 6)。このように、GA 併用投与により MP および MPOL の血漿中薬物動態に変動が認められたため、MPOL 以外の代謝物への影響についても同様に検討した。興味深いことに、MPOL NOII の血漿中濃度は GA 併用により MPOL と同様に速やかに低下し、 C_{max} および AUC_{6h} は MP 単独投与群の約 1/2 となった (Fig. 15A および Table 7)。一方、MP NOII の血漿中濃度は GA 併用により投与後 2~4 時間に有意な増加、ならびに C_{max} および AUC_{6h} の増加 (それぞれ約 2 および 1.6 倍) が認められた (Fig. 15B および Table 7)。酵素阻害剤感受性の観点から、MP NOII への酸化的代謝には CYP の関与が示唆されたため、GA 添加による肝臓または精巣の Mit および Ms における *in vitro* 代謝試験において、MP NOII への酸化的代謝活性の亢進が認められるか検討したが、両組織ともにその活性は増加しなかった (data not shown)。それゆえ、 11β -HSD1 阻害による MP NOII への酸化的代謝活性の亢進は、肝臓および精巣以外の組織での可能性が考えられた。GA 併用により、MP 代謝物の血漿中濃度は変動したが、このうち MPOL および MPOL NOII は有意に低下したのに対し、MP NOII は有意に増加した (Fig. 14 および 15)。これらの代謝物の血漿中濃度推移の結果は、MPOL NOII の生成が MP NOII からではなく、MPOL からによるものと推定した MP の代謝経路を支持した (Fig. 6)。

他剤併用により薬物相互作用が認められる場合、薬理効果の変動もまた重要な論点となる。本併用投与実験では、GA 併用により血漿中濃度は MPOL で有意に低下したのに対し、MP は有意に増加した。しかし、これらの AUC_{6h} の合計は MP 単独投与时および GA 併用投与时との間で顕著な差は認められなかった (Table 4)。MPOL は MP と同程度の薬理活性をもつことが知られていることから¹¹⁾、GA 併用により MP および MPOL の薬物動態が変動したとしても、薬理活性に顕著な変動が認められる可能性は低いことが推察された。さらに、MPOL NOII および MP NOII に薬理活性があるという報告はないため、 11β -HSD1 阻害により CYP の寄与が高くなり、その結果

MP NOII の血漿中濃度が高くなったとしても、薬理活性が顕著に変動する可能性は低いことが推察された。

ヒトおよび Wistar 雄ラットの薬物動態を比較するために、ヒト肝の細胞画分における MP の還元的小よび酸化的代謝活性を検討した。MPOL への還元的小よび MP NOII への酸化的代謝活性が肝 Ms で高く認められたことは、Wistar 雄ラットと同様であった (Table 6 および Fig. 7)。この結果をもとに、ヒトの *in vivo* で生成される代謝物を MP の代謝経路から推定すると、ラットと同様に 3 種類の代謝物 (MPOL, MPOL NOII および MP NOII) が考えられた。また、ヒト肝 Ms および Mit における MP の還元的小よび代謝に関する主要な代謝酵素は 11 β -HSD1、ならびに肝 Ms における MP の酸化的代謝に関する主要な代謝酵素は CYP と考えられた。これらのことから、ヒトに MP および 11 β -HSD1 を阻害する薬物を併用投与したとき、MP およびその 3 種類の代謝物の薬物動態は Wistar 雄ラットと同様に変動することが推察された。

以上のことから、Wistar 雄ラットおよびヒトともに肝 Ms および Mit における MP の還元的小よび代謝に関する主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 であり、肝 Ms における MP の酸化的代謝に関する主要な代謝酵素は CYP であると考えられた。さらに、ヒトにおいて生成される主な代謝物は Wistar 雄ラットと同様に 3 種類 (MPOL, MPOL NOII および MP NOII) と考えられた。それゆえ、Wistar 雄ラットで得られた MP の代謝動態データは、ヒトにおける MP の薬物動態の予測に有用と考えられた。

第 6 節 小括

本章では、Wistar 雄ラットにおける MP の還元的小よび酸化的代謝活性に対する各種阻害剤の影響、11 β -HSD1 の強力な阻害剤である GA および MP との薬物動態学的相互作用、さらにヒト肝の細胞画分における MP の還元的小よび酸化的代謝活性、ならびにこれらの代謝活性に対する各種阻害剤の影響について検討した。以下に得られ

た結果を要約する。

1) Wistar 雄ラット肝 Ms における MOL への還元的代謝は、1 μ M T0504 (11 β -HSD1 選択的阻害剤) によって最も強く阻害されたため、主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 と示唆された。また、本酵素は肝臓の Mit においても主代謝酵素として機能しているものと考えられた。さらに、ヒト肝 Ms および Mit においても同様の結果が得られたため、Wistar 雄ラット肝における MP 還元的代謝に関与する主要な代謝酵素に明白な種差はないことが示唆された。

2) Wistar 雄ラット肝における MP NOII への酸化的代謝に関与する主要な代謝酵素は Ms に存在する CYP であると考えられた。さらに、ヒト肝 Ms においても同様の結果が得られたため、Wistar 雄ラット肝における MP NOII への酸化的代謝に関与する主要な代謝酵素に種差はないことが示唆された。

3) GA は Wistar 雄ラット肝臓または精巢の Ms および Mit における MP 還元酵素活性を低濃度 (10^{-7} M オーダー) で阻害した。また、精巢の Ms および Mit における MP 還元酵素活性は 1 μ M T0504 によって阻害されたことから、精巢においても MP の還元的代謝に関与する主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 であることが示唆された。

4) Wistar 雄ラットへの MP および GA の併用投与により、血漿中 MPOL および MPOL NOII 濃度は MP 単独投与と比べて有意に低下したのに対し、血漿中 MP および MP NOII 濃度は有意に増加した。したがって、GA などの MP の主要代謝酵素である 11 β -HSD1 の活性に影響を及ぼす薬剤を併用投与するとき、MP およびその代謝物の血漿中動態が変動することが明らかとなった。

5) ヒト肝の細胞画分で認められた MP の代謝活性および MP の推定代謝経路に基づき、ヒトで生成される代謝物は Wistar 雄ラットと同様に 3 種類 (MPOL, MPOL NOII および MP NOII) と考えられた。

以上のことから、Wistar 雄ラットおよびヒトともに肝 Ms および Mit における MP の還元的代謝に関与する主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 であり、肝 Ms における MP の酸化的代謝に関与する主要な代謝酵素は CYP であると考えられた。さらに、ヒトの *in vivo* で生成される代謝物は Wistar 雄ラットと同様に 3 種類 (MPOL, MPOL NOII および MP NOII) と考えられた。それゆえ、Wistar 雄ラットで得られた MP の代謝動態データは、ヒトにおける MP の薬物動態の予測に有用と考えられた。

第7章 総括

ケトン基を有する薬物であるMPは、クッシング症候群の治療薬として使用されているが、その臨床投与経路（経口投与）での血漿中薬物動態の報告は実験動物ではなく、ヒトではMPおよびMPOLのみである。また、*in vivo*試験ではSDラットで5種類の代謝物の報告に対し、*in vitro*代謝試験では実験動物およびヒトともに各代謝物を詳細に検討した報告はなく、代謝に関する種差についても不明のままである。さらに、MPおよびその代謝物の濃度の同時定量法は十分に確立されていない。ラットにおけるMP還元酵素活性はWistar系の方がSD系よりも高いことから¹⁸⁾、本研究ではMPの薬物動態はWistar雄ラットで主に検討した。

まず、第2章ではMPおよびその5種類の代謝物の同時定量法をHPLC-UVで開発した。次いで第3章ではWistar雄ラットにMP単回経口投与後のMPおよびその代謝物の血漿中および尿中での薬物動態を検討した。また、第4章ではMPの還元的酸化的代謝に関与する主要な代謝組織、ならびにMP還元酵素活性に影響を及ぼす内的要因（週齢差、性差）、および性ホルモンの影響について検討した。さらに、第5章ではMPの還元的酸化的代謝に関与する主代謝酵素を明らかにし、MPの主代謝酵素阻害による薬物動態的相互作用を*in vitro*および*in vivo*試験で評価した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

1) MPおよびその5種類の代謝物のHPLC-UVによる同時定量法の確立

MPの薬物動態を評価するために、MPおよびその5種類の代謝物の同時定量法をHPLC-UVで確立した。本測定法では分析カラムはC₁₈、移動相は水およびメタノール混合のグラジエントのシンプルな条件を用い、ISを含むすべての測定対象物質は42分までに分離・定量を可能とした。さらに、検討したすべての生体試料（Wistar雄ラッ

トの血漿，尿および各実験動物の組織の細胞画分ならびにヒト肝の細胞画分)由来のピークは，HPLCカラム洗浄を含む65分で各測定対象物質のピークと重ならなかった。また，各測定対象物質の検量線の相関係数はすべて良好であり ($r^2 : 0.999$)，LLOQはいずれも1.13 ng/mLで低く，高感度分析を可能とした。本測定法は，未検討の他の動物の生体試料中MPおよびその代謝物の濃度測定にも適用可能と考えられた。

2) MP およびその代謝物の薬物動態 (*in vivo*)

Wistar 雄ラットに MP を 50 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，MP は速やかに吸収された ($t_{max} : 0.25$ 時間)。その後の血漿中からの速やかな消失 ($t_{1/2} : 0.99$ 時間) は，MP 代謝物 (MPOL, MP NOII および MPOL NOII) の速やかな生成が考えられた。MP の主代謝物である MPOL は MP の AUC よりも約 4 倍高く，活性代謝物であることから¹¹⁾，薬効への寄与が示唆された。尿中には 4 種類の代謝物 (MPOL NOII, MP NOII, MPOL NOI および MPOL の順) が排泄され，既報の SD 雄ラットと代謝物の種類およびその量に差異が認められた。血漿および尿中の代謝物を基に MP の代謝経路を推定すると，MPOL NOII および MPOL NOI は MPOL からの生成と考えられた。

3) MP の各組織における *in vitro* 代謝

Wistar 雄ラットにおいて，肝 Ms における MPOL への還元的代謝活性が最も高く，組織重量も考慮すると，主代謝組織は肝臓と考えられた。一方，MPOL 以外の代謝物への代謝活性は非常に低く，主代謝組織は明らかにできなかった。また，小腸はすべての代謝物への代謝活性が低く，MP の主たる代謝組織ではないことが示唆された。これらのことから，肝臓での MP の還元的代謝により MP 経口投与後の血漿中で MPOL が速やかに生成されたこと，および検出された未変化体 MP およびその 5 種類

の代謝物のうち MPOL の AUC が最も大きかったことに寄与していると考えられた。また、精巣 Ms および Mit における本酵素活性も高かったことから、MPOL の速やかな生成に精巣の酵素も一部寄与することが推察された。なお、Wistar および SD の雄ラットへの尿中代謝物の種類およびその量の差異の要因として、SD 雄ラット肝 Ms および Cyt で報告されている MP の酸化的還元的代謝の差異が推察された。

Wistar ラット肝 Ms における MP 還元酵素活性の生後発達パターンは新生児型に属し、思春期から雄の方が雌よりも有意に高い性差の原因として、精巣から分泌されるテストステロンの可能性が推察された。さらに、本酵素活性はラットを含む実験動物の肝臓または腎臓の Ms および Cyt で性差が認められ、マウス肝 Ms および腎 Cyt のみ雌の方が雄よりも高かったことは興味深い。これらの内的要因の挙動はケトン基を有する AH の還元酵素活性の報告と異なったこと、および部分精製した MP 還元酵素は AH を代謝しなかったことから、両薬物を代謝する酵素は異なることが認められた。これらの結果は、ケトン薬物の還元的代謝に様々な酵素の関与を裏付けるとともに、ヒトにおけるケトン薬物の代謝動態の予測・考慮のために、主たる代謝酵素を実験動物で検討する重要性を改めて提唱するものである。また、MP 還元酵素活性で認められた内的要因の情報は、ヒトに MP を投与したときの有効性や安全性を考慮する上での投与量の調節に有用な基礎データになるとと思われる。

4) MP の *in vitro* および *in vivo* 代謝阻害

Wistar 雄ラットにおいて、MPOL への還元的代謝には肝 Ms だけでなく Mit もまた主に 11 β -HSD1 (T0504 による阻害) の関与が、副腎 Cyt では主にカルボニル還元酵素 (quercetin による阻害) の関与が示唆されたが、MP の主代謝組織 (肝臓) を考慮すると、主要な代謝酵素は 11 β -HSD1 と示唆された。また、肝 Ms における MP NOII への酸化的代謝に、主に CYP (ketoconazole および quercetin による阻害) の関与が示

唆された。

強力な 11 β -HSD1 阻害剤の医薬品である GA は、Wistar 雄ラット肝臓または精巢の Ms および Mit における MP 還元酵素活性を濃度依存的に阻害した。また、これらの細胞画分では、本酵素活性は T0504 によっても強く阻害され、精巢の Ms および Mit においても MPOL への還元的代謝に 11 β -HSD1 の関与が示唆された。Wistar 雄ラットに GA を併用投与したとき、C_{max} および AUC_{6h} は MPOL および MP NOII で減少し、MP および MP NOII で増加が認められ、MP およびその代謝物の血漿中動態は GA によって変動することが示唆された。また、1)項で推定した MP の代謝経路は、これらの代謝物の血漿中濃度の結果からも同様に支持された。

ヒト肝 Ms, Mit および Cyt における MP の主要な還元的および酸化的代謝活性、ならびに MP の推定代謝経路から Wistar 雄ラットと同様に 3 種類の代謝物 (MPOL, MPOL NOII および MP NOII) の生成が考えられた。また、肝 Ms および Mit における MPOL への還元的代謝に主に 11 β -HSD1 (T0504 による阻害) の関与が、ならびに肝 Ms における MP NOII への酸化的代謝に主に CYP (ketoconazole および quercetin による阻害) の関与が示唆されたことは、Wistar 雄ラット肝における MP 代謝の特徴と非常に類似していた。これらのことから、ヒトに 11 β -HSD1 を阻害する薬物を併用したとき、MP およびその 3 種の代謝物の薬物動態は変動することが考えられた。

以上のことから、Wistar 雄ラットにおいて得られた MP の代謝動態データは、ヒトにおける MP の薬物動態の予測に有用であると考えられる。

実験の部

実験材料

Metyrapone (MP) は Sigma-Aldrich から購入した。代謝物の合成に使用した NaBH_4 および *m*-chloroperoxybenzoic acid は東京化成, ならびに magnesium sulfate はナカライテスクから購入した。酵素阻害剤として使用した T0504 はナミキ商事, glycyrrhetic acid (GA) は Sigma-Aldrich, phenobarbital および quercetin は東京化成, ketoconazole および pyrazol, ならびに HPLC の内部標準物質として使用した 3-benzoylpridine は和光純薬から購入した。補酵素として用いた NADP^+ , glucose-6-phosphate および glucose-6-phosphate dehydrogenase はオリエンタル酵母工業, magnesium chloride $6\text{H}_2\text{O}$ はナカライテスクから購入した。HPLC の移動相は, HPLC 用のメタノールおよびミリ Q 水を用いた。すべての薬品および溶媒は, 市販の高純度または HPLC 用のものを使用した。

MP の代謝物の合成法

MP の 5 種類の代謝物である, MPOL, MP NOI および II, ならびに MPOL NOI および II は, Kraulis ら⁸⁰⁾ および Crooks ら⁸¹⁾ の方法に従って合成したが, 目的物以外に不純物も多く含まれていたため, 新たに精製を加えた。

1. MPOL の合成

Kraulis ら⁸⁰⁾ の方法に基づき, 冷メタノール (15 mL) に MP (50 mg) を溶解後, 氷浴中で NaBH_4 (還元剤: 50 mg) を少しずつ加えて約 60 分間攪拌後, 溶媒留去した。残留物に水を数 mL および酢酸を数滴加え, クロロホルム (15 mL) で 3 回抽出後,

magnesium sulfate を適量加え、ひだ付ろ紙でろ過した。濾液の一部を TLC に塗布し、クロロホルム/メタノール (8 : 2) の溶媒で展開させたが、MPOL 以外に不純物も多く、クロロホルム/メタノール (8 : 2 V/V) で置換させた silica gel 60 を充填したカラムクロマトグラフィー (2×40 cm) により MPOL 画分のみを分取し、溶媒留去して得られた目的物は冷蔵保管した。

2. MP NOI および II の合成

Crooks ら⁸¹⁾の方法に基づき、冷クロロホルム (50 mL) に MP (600 mg) を溶解後、*m*-chloroperoxybenzoic acid (酸化剤 : 1.0 g) を少しずつ加え、室温下で 10 分間攪拌した。溶媒留去後、少量のクロロホルム/メタノール (8 : 2 V/V) の溶媒に溶解させて TLC に塗布し、同溶媒で展開後 MP NOI および II の部分を削り、クロロホルムで 3 回抽出したが、得られた目的物の回収率は低く、不純物も多かった。このため、MPOL の精製と同じカラムクロマトグラフィー (2×40 cm) により MP NOI および II 画分のみを分取し、溶媒留去して得られた目的物は冷蔵保管した。

3. MPOL NOI および II の合成

Kraulis ら⁸⁰⁾の方法に基づき、冷メタノール (15 mL) に、2 項で合成した MP NOI または II (それぞれ 50 mg) を溶解後、氷浴中で NaBH₄ (50 mg) を少しずつ加えて約 60 分間攪拌後、溶媒留去後、MPOL と同じ抽出および精製法により、MPOL NOI および II 画分のみを分取し、溶媒留去して得られた目的物は冷蔵保管した。

これら 5 種類の代謝物は ¹H-NMR およびマススペクトロメトリーで構造解析し、Damani らおよび Crooks らの結果と同一であることを確認した^{16,81)}。

第 2 章に関する実験

1. 試料の調製

MP, 合成した 5 種類の MP 代謝物および IS (3-benzoylpridine) をそれぞれメタノールに溶解後, 20%メタノールになるようにミリ Q 水を加えた。

コントロールの血漿および各組織の細胞画分を含む酵素反応溶液にメタノール 2 倍量を, ならびに尿は Sep-Pak Plus C18 固相抽出カートリッジ (Waters, USA) を用い, 80%メタノール/10 mM Na-K リン酸緩衝液 (pH8) の溶出液にメタノール 2 倍量を加えて攪拌し, 生体試料由来の妨害ピークの有無を確認するための試料を調製した (抽出の詳細は第 3 および 4 章を参照)。

2. HPLC-UV 測定

HPLC-UV の条件を以下に示す。なお, 試料の測定は各試料 40 μ L を HPLC に注入し, HPLC クロマトグラムの解析は GL サイエンスのソフトウェアで行った。

HPLC-UV 装置 : GL-7480 シリーズ (ポンプ : GL-7410, UV 検出器 : GL-7450, カラムオーブン : GL-7432 ; GL サイエンス)

分析カラム : Inertsil ODS-3 (C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm)

ガードカラム : Inertsil Sustain (3 μ m, 4.0 \times 10 mm)

カラム温度 : 40°C

UV 検出波長 : 254 nm

移動相：20%メタノール（A）および50%メタノール（B）のグラジエント

時間 (min)	A (%)	B (%)	C (%)
Initial	100	0	0
10	100	0	0
35	0	100	0
45	0	100	0
45.1	0	0	100
50	0	0	100
50.1	100	0	0

C：カラム洗浄（0.1%リン酸を含む80%メタノール）

第3章に関する実験

1. 実験動物

Wistar 雄ラットは8週齢で購入後、9週齢で使用した（日本SLC）。

2. MP 単回経口投与

雄ラットに5%糖液に溶解させたMP（50 mg/mL）を50 mg/kgの用量で経口ゾンデを用いて単回経口投与した。なお、ラットは投与前日の夕方から絶食させたが、飲水は自由摂取させた。

3. 試料の採取

(1) 血漿

投与0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 および24時間後に、エーテル麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、ヘパリン溶液（0.1 mL）を入れた試験管に採取した。血液は遠心分離（3,000×g, 10 min, 4°C）後、血漿を分取し、分析まで-80°Cで保存した。

(2) 尿

代謝ケージに入れたラットに、MP を単回経口投与 24, 48 および 72 時間後に尿を採取した。また、ケージ内を洗浄した少量の水も採取した尿と合わせた。

4. 試料の抽出

(1) 血漿

血漿 (200 μ L) に内標準物質 (IS : 3-benzoylpridine) を含むメタノール (400 μ L) を加えて攪拌した。室温下で 30 分放置後、冷却遠心機で遠心分離 (20,630 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) し、コスモナイスフィルターS (pore size; 0.45 μ m, filter diameter; 4 mm; ナカライテスク) を用いてフィルターろ過し、得られた上清を HPLC 測定用試料とした。

(2) 尿

尿 (1 mL) に 10 mM Na-K リン酸緩衝液 (pH8 : 1 mL) を加えて攪拌後、Sep-Pak Plus C18 固相抽出カートリッジ (Waters, USA) に apply した。10 mM Na-K リン酸緩衝液 (pH8 : 4 mL) および 10%メタノール/10 mM Na-K リン酸緩衝液 (pH8) の混合溶液 (1.5 mL) で洗浄後、80%メタノール/10 mM Na-K リン酸緩衝液 (pH8) の混合溶液 (2 mL) で溶出させた。溶出液 (250 μ L) に IS を含むメタノール (500 μ L) を加えて攪拌し、HPLC 測定用試料とした。

5. 血漿中濃度

HPLC-UV 測定により、IS のピーク高さに対する MP および各代謝物のピーク高さの比を縦軸に、MP および各代謝物の濃度を横軸にプロットした検量線から血漿中 MP および各代謝物の濃度を求めた。

6. 薬物動態パラメータ

MP および各代謝物の薬物動態パラメータは、バリデーションされた解析用ソフト

ウェア Phoenix WinNonlin (version 6.3, Pharsight) を用いて非線形薬物動態解析し、以下のパラメータを算出した。

最高血漿中濃度 (C_{\max})、最高血漿中濃度到達時間 (t_{\max})、消失半減期 ($t_{1/2}$)、0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC_{last})、および 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC_{∞})

7. MP およびその代謝物の尿中排泄

HPLC-UV 測定により、IS のピーク高さに対する MP および各代謝物のピーク高さの比を合算後、MP および各代謝物のピーク高さの比の割合を求めた。

第 4 章に関する実験

1. 実験動物

(1) MP の主代謝組織

Wistar 雄ラットは 8 週齢で購入後、9 週齢で使用した (日本 SLC)。

(2) MP 還元酵素活性の週齢差、性差および種差

雌雄の Wistar ラット (2, 4, 6, 8, 10 週齢, 九動), ddY マウス (8~9 週齢, 九動), Sylian ハムスター (6~7 週齢, 日本 SLC), Hartly モルモット (6~7 週齢, 日本 SLC) および日本白色種ウサギ (15~17 週齢, 日本 SLC) を使用した。

(3) 去勢

4 週齢に精巣を摘出した Wistar 雄ラットを 7 週齢で購入し (日本 SLC), 8 週齢で使用した。

2. 組織採取

薬物無投与のラットをエーテル麻酔下で腹大動脈から採血または断頭により放血後、肝臓は氷冷した 1.15% KCl 溶液で灌流した。肝臓、脳、肺、腎臓、精巣、内臓脂肪および皮下脂肪を摘出後、全組織重量を測定したが、内臓脂肪および皮下脂肪はそれぞれラット 3 匹をプールした。なお、5 動物種の性差の試験では肝臓および腎臓を、週齢差およびテストステロン投与の試験では肝臓のみを摘出した。

3. 細胞画分の調製

各組織を細片後、組織重量の 3 倍容の 1.15% KCl を含む 10 mmol/L Na/K リン酸 buffer (pH7.4) のホモジナイズ用緩衝液を用いて、氷冷下、ガラス-テフロンホモジナイザー (岩城ガラス) でホモジナイズした。なお、Wistar 雄ラットの副腎および小腸のホモジネート溶液は、それぞれ 20 匹をプールして同緩衝液で調製したものを KAC から購入した。各組織のホモジネート液を遠心分離 (700 × g, 10 min, 4°C) し、その上清を更に遠心分離 (9,000 × g, 20 min, 4°C) して得られた上清を S9 とした。S9 を含む沈殿物をガラス-テフロンホモジナイザーを用いて再懸濁させ、遠心分離 (9,000 × g, 20 min, 4°C) して得られた沈殿物を Mit とした。S9 画分は超遠心分離 (105,000 × g, 60 min, 4°C) し、得られた上清を Cyt とした。Cyt を含む沈殿物をガラス-テフロンホモジナイザーを用いて再懸濁させ、超遠心分離 (105,000 × g, 60 min, 4°C) して得られた沈殿物を Ms とした。

4. 酵素反応

MP の代謝反応では、酵素溶液 (Mit, Ms または Cyt 画分) に MP (最終濃度: 1 mM), NADPH 生成系 (最終濃度: 1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM G-6-P, 3.3 mM MgCl₂, 0.4 units/mL G-6- PDH), および 100 mM Na/K リン酸 buffer (pH7.4) を加えた溶液を酵素反応溶液

とした。なお、添加した酵素溶液は酵素反応溶液の 1/10 とした。代謝阻害実験では上記の反応溶液に T0504 (最終濃度: 1 μ M), phenobarbital (最終濃度: 100 および 1000 μ M), ketoconazole (最終濃度: 10 および 100 μ M), pyrazol (最終濃度: 10 mM), quercetin (最終濃度: 100 μ M) をプレインキュベーション前に添加した。なお、酵素反応溶液中に含まれるメタノールまたはエタノールは、終濃度 2.5%未満になるように調製した。37°C で 5 分間プレインキュベーション後、MP を加えて 60 分間インキュベーションした。反応は、IS を含むメタノールを酵素反応溶液の 2 倍量加えて氷冷下で停止させた。30 分放置後、冷却遠心機で遠心分離 (20,630 \times g, 5 min, 4°C) し、コスモナイスフィルターS を用いてフィルターろ過した上清を HPLC 測定用試料とした。

5. タンパク濃度の測定

各組織の細胞画分のタンパク濃度は Bicinchoninic acid (BCA) 法で測定した⁸²⁾。プレートリーダーに検量線用標準タンパク質としてウシ血清アルブミンまたは各組織の酵素溶液 (Mit, Ms および Cyt) を 20 μ L ならびに Bicinchoninic acid/CuSO₄ · 5H₂O (50:1) を 200 μ L 入れ、37°C で 30 分静置後、分光光度計 (570nm) で測定した。

6. MP の酸化および還元活性

HPLC-UV測定により得られたMPの各代謝物およびISのピーク高さを基に、縦軸にISに対する各代謝物のピーク高さの比を、横軸に各代謝物のモル濃度から各代謝物濃度を求めた。各代謝物の生成活性は、タンパク 1 mg 当たり 1 分間に生成される代謝物濃度 (nmol/min/mg protein) で表した。

7. 統計解析

In vitro 試験で得られた結果は、3 例の平均値および標準偏差で表した。雄ラットの

各細胞画分における MP の還元的および酸化的代謝活性の主要な組織は、non-parametric Kruskal-Wallis および Dunn's test 法で有意差検定した。また、Wistar ラットにおける週齢差，去勢の影響および5動物種の性差は，unpaired Student's t test 法により有意差検定した。

8. ラット肝 Ms における MP 還元酵素の部分精製

Wistar 雄ラット肝（湿重量約 270 g）の Ms は，第4章2 および3に準じて調製した。Ms は0.6%トリトン X-100 で可溶化後（タンパク質濃度：約 20 mg/mL），氷冷下で1時間ゆっくり攪拌した。可溶化した Ms は 105,000×g で 60 分間超遠心分離後，得られた上清を半透膜に入れ，0.05%トリトン X-100，0.5 mM EDTA および 10 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.01 M リン酸緩衝液（pH7.4）（緩衝液 A）で一夜透析した。透析後，半透膜内の溶液を 10,000×g で 20 分間遠心分離し，その上清をあらかじめ緩衝液 A で 30 mL/h の流速で平衡化させた DEAE-Sephacel カラム（2.5×18 cm）に添加した。緩衝液 A で洗浄後，0～0.3 M NaCl を含む緩衝液 A の直線塩濃度勾配（900 mL）により，MP 還元酵素活性が認められた約 0.1 M NaCl の溶出画分を限外濾過した。濃縮後，半透膜に入れて 0.05%トリトン X-100 および 10 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.4）（緩衝液 B）で一夜透析後，あらかじめ緩衝液 B で 10 mL/h の流速で平衡化させた Hydroxylapatite カラム（2.5×15 cm）に添加した。緩衝液 B で洗浄後，150 mM リン酸緩衝液で溶出させ，MP 還元酵素活性が認められた画分を限外濾過により濃縮した。

9. MP 還元酵素の基質特異性

部分精製した酵素溶液に MP（最終濃度：1 mM），NADPH（最終濃度：0.25 mM），0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.0）を加えた溶液を酵素反応溶液とした（全量：700 μ L）。なお，基質特異性試験は MP の代わりに，各基質を加えた。反応は 30°C で NADPH

を添加して開始し、島津 UV-240 自記分光光度計を用いて MP の還元反応で使用された NADPH を 340 nm における吸光度の減少で測定した。酵素活性 (unit) は、1 分間に 1 μmol の NADPH ($\epsilon=6.22\times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot \text{cm}^{-1}$) を酸化する酵素量として表した。なお、コントロールは酵素反応溶液から酵素溶液を除いた溶液で実施した。

第 5 章に関する実験

1. 実験動物

Wistar 系雄ラットは 8 週齢で購入後、9 週齢で使用した (日本 SLC)。

2. 酵素反応

肝臓および精巢の摘出、これらの細胞画分の調製、ならびに酵素反応は第 4 章 2. ~4. と同じ方法で実施し、HPLC 測定用試料を調製した。なお、GA (最終濃度: 0.0005 ~1 μM) はプレインキュベーション前に酵素反応溶液に添加した。プールしたヒト肝の Mit, Ms および Cyt は、Xenotech LLC (USA) から購入し、代謝阻害試験は第 4 章 4. と同じ方法で実施した。なお、酵素反応溶液中に含まれるエタノールは、終濃度 2.5%未満になるように調製した。

3. タンパク濃度の測定

タンパク濃度は第 4 章 5. と同じ方法で測定した。

2. GA 併用投与

GA の投与は Lin ら⁷³⁾の方法に準じた。雄ラットは MP 単独投与群および GA 併用投与群の 2 群に分け、それぞれ溶媒または GA (10 mg/kg) を 1 日 3 回腹腔内投与し

た。GA 投与後の両投与群への MP 投与は第 3 章 2.と同じ方法で行った。なお、ラットは MP 投与前日の夕方から絶食させたが、飲水は自由摂取させた。

3. 血漿の採取

投与 0.25, 0.5, 1, 2, 4 および 6 時間後に、エーテル麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、第 3 章 3. (1)と同じ方法で血漿を調製し、分析まで-80°C で保存した。

4. 血漿の抽出

血漿は第 3 章 4. (1)と同じ方法で抽出し、HPLC 測定用試料を調製した。

5. 血漿中濃度

血漿中 MP および各代謝物の濃度は第 3 章 5.と同じ方法で算出した。

6. 薬物動態パラメータ

MP および各代謝物の薬物動態パラメータは、第 3 章 7.と同じ方法で、以下のパラメータを算出した。

C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, 0 時間から 6 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{6h}) および AUC_{∞} 。

7. 統計解析

In vivo および *in vitro* 試験で得られた結果は、3 例の平均値および標準偏差で表した。*In vitro* における MPOL への還元的代謝活性に対する GA の阻害試験では、非線形回帰分析により IC_{50} を算出した。また、GA 併用投与の試験では、unpaired Student's t test 法により MP 単独投与群と有意差検定した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 薬物動態研究室教授 小田切 優樹先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，終始ご指導を賜りました日本薬科大学 健康生命科学分野教授 樋口敏幸先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の開始初期において，ご指導を賜りました元 熊本大学薬学部 准教授，元 日本薬科大学 教授 今村順茂先生に感謝申し上げます。

本研究の代謝物の構造解析に際し，ご協力を頂きました日本薬科大学 薬品創製科学分野教授 原口一広先生，同准教授 齋藤俊昭先生に感謝いたします。

本論文の審査にあたり，有益なご助言および御校閲を賜りました崇城大学薬学部 薬学科 原武 衛 教授，同 山崎 啓之 教授，同 大栗 誉敏 准教授に心から感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，多大なる協力を頂きました日本薬科大学 薬学教育推進センター助教 広田あずさ先生，健康生命科学分野の皆様心から感謝申し上げます。

平成 29 年 6 月

村田 秀之

参考文献

1. 非臨床薬物動態試験. 医薬品 非臨床試験ガイドライン 解説 2013. 第1版. 東京: 薬事日報社; 2013. p. 187-202.
2. 生物薬剤学序論. 生物薬剤学. 改訂第2版. 東京: 南江堂; 2007. p. 1-8.
3. トキシコキネティクス (毒性試験における全身的曝露の評価). 医薬品 非臨床試験ガイドライン 解説 2013. 第1版. 東京: 薬事日報社; 2013. p. 99-106.
4. 薬物代謝概論. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として. 第2版. 東京: 東京化学同人; 2005. p. 1-8.
5. 薬物代謝の反応様式と薬効・毒性の変化. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として. 第2版. 東京: 東京化学同人; 2005. p. 63-102.
6. Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter RD, Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(6): 875-894.
7. 薬物代謝に関与する酵素とその反応機構. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として. 第2版. 東京: 東京化学同人; 2005. p. 9-61.
8. Rosemond MJC, Walsh JS, Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metab Rev.* 2004; 36(2): 335-361.
9. Hoffmann F and Maser E, Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-chain Dehydrogenase/reductase Superfamily. *Drug Metab Rev.* 2007; 39(1): 87-144.
10. メトピロン®カプセル 250 mg インタビューフォーム
11. Nagamine S, Horisaka E, Fukuyama Y, Maetani K, Matsuzawa R, Iwakawa S, Asada S, Stereoselective reductive metabolism of metyrapone and inhibitory activity of metyrapone metabolites, metyrapol enantiomers, on steroid 11 beta-hydroxylase in the rat.

- Biol. Pharm. Bull.* 1997; 20(2): 188-192.
12. Usansky JI, Damani LA, Houston JB, The pharmacokinetics of metyrapone and metyrapol in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 1984; 36: 28P.
 13. Usansky JI, Damani LA, Assay of metyrapone, metyrapol and the isomeric mono-N-oxides of metyrapone in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1991; 563: 283-298.
 14. Usansky JI, Damani LA, The urinary metabolic profile of metyrapone in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 1991; 20(1): 64-69.
 15. Chiarotto JA, Wainer IW, Determination of metyrapone and the enantiomers of its chiral metabolite metyrapol in human plasma and urine using coupled achiral-chiral liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1995; 665: 147-154.
 16. Damani LA, Crooks PA, Metabolism of metyrapone. 2-Chromatographic and mass spectral properties of the N-oxides of metyrapone and metyrapol. *Biomed Mas Spectrom.* 1981; 8(6): 270-277.
 17. Maser E, Hoffmann JG, Friebertshäuser J, Netter KJ, High carbonyl reductase activity in adrenal gland and ovary emphasizes its role in carbonyl compound detoxication. *Toxicology.* 1992; 74: 45-56.
 18. Maser E, Bannenberg G, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 47(10): 1805-1812.
 19. Fujita S, Chiba M, Ohta M, Kitani K, Suzuki T, Alternation of plasma sex hormone levels associated with old age and its effect on hepatic drug metabolism in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 253: 369-374.
 20. Waxman DJ, Morrissey JJ, LeBlanc GA, Female-predominant rat hepatic P-450 forms j (IIE1) and 3 (IIA1) are under hormonal regulatory controls distinct from those of the

- sex-specific P-450 forms. *Endocrinology*. 1989; 124: 2954-2966.
21. Waxman DJ, Morrissey JJ, MacLeod JN, Shapiro BH, Depletion of serum growth hormone in adult female rats by neonatal monosodium glutamate treatment without loss of female-specific hepatic enzymes P450 2d (IIC12) and steroid 5 alpha-reductase. *Endocrinology*. 1990; 126: 712-720.
 22. Kupfer D, Jansson I, Favreau LV, Theoharides AD, Schenkman JB, Regioselective hydroxylation of prostaglandins by constitutive forms of cytochrome P-450 from rat liver: formation of a novel metabolite by a female-specific P-450. *Arch Biochem Biophys*. 1988; 261: 186-195.
 23. Imamura Y, Iwamoto K, Yanachi Y, Higuchi T, Otagiri M, Postnatal development, sex-related difference and hormonal regulation of acetohexamide reductase activities in rat liver and kidney. *J.Pharmacol.Exp.Ther*. 1993; 264: 166-171.
 24. Imamura Y, Honda Y, Ryu A, Murata H, Kojima Y, Otagiri M, Sex-related differences of acetohexamide reductase activities in the liver and kidney of various mammalian species. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol*. 1993; 80: 371-374.
 25. Maser E, Netter KJ, Purification and properties of a metyrapone reducing enzyme from mouse liver microsomes-this ketone is reduced by an aldehyde reductase. *Biochem. Pharmacol*. 1989; 38(18): 3049-3054.
 26. Maser E, Gebel T, Netter KJ, Carbonyl reduction of metyrapone in human liver. *Biochem. Pharmacol*. 1991; 42: S93-S98.
 27. Martini R, Murray M, Characterization of the in vivo inhibition of rat hepatic microsomal aldehyde dehydrogenase activity by metyrapone. *Biochem. Pharmacol*. 1996; 51: 1187-1193.
 28. 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: 東京化学同人; 2005. p. 121-130.

29. 薬物相互作用. 生物薬剤学. 改訂第2版. 東京: 南江堂; 2007. p. 131-148.
30. Obach RS, Baxter JG, Liston TE, Silber BM, Jones BC, Macintyre F, Rance DJ, Wastall P, The Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters from Preclinical and *In Vitro* Metabolism Data. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997; 283: 46-58.
31. Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA, Sugiyama Y, Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmmol. Ther.* 1997; 73: 147-171.
32. Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y, Prediction of Human Hepatic Clearance from in Vivo Animal Experiments and in Vitro Metabolic Studies with Liver Microsomes from Animals and Humans. *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29: 1316-1324.
33. Lutter P, Savoy PMC, Campos GE, Meyer L, Goldmann T, Bertholet MC, Mottier P, Desmarchelier A, Monard F, Perrin C, Robert F, Delatour T, Screening and confirmatory methods for the determination of melamine in cow's milk and milk-based powdered infant formula: Validation and proficiency-tests of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS. *Food Control.* 2011; 22: 903-913.
34. Shen HY, Jiang HL, Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Anal. Chim. Acta.* 2005; 535: 33-41.
35. Vogeser M, Seger C, Pitfalls Associated with the Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2010; 56(8): 1234-1244.
36. Hannah DM, Sprunt JG, The quantitation of metyrapone and its reduced derivative in urine. *J Pharm Pharmacol.* 1969; 21(12): 877-878.
37. 薬物代謝の年齢差, 性差, 人種差および種差. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として. 第2版. 東京: 東京化学同人; 2005. p. 157-168.

38. 年齢と薬物動態. 臨床薬物動態学 臨床薬理学・薬物療法の基礎として. 第4版. 東京: 南江堂; 2011. p. 255-273.
39. 医薬品開発における薬物代謝研究の役割. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として. 第2版. 東京: 東京化学同人; 2005. p. 245-259.
40. Kato R, Yamazoe Y, Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity. *Toxicology Letters*. 1992; 64-65: 661-667.
41. Felsted RL, Bachur NR, Mammalian carbonyl reductases. *Drug Metab.Rev.* 1980; 11: 1-60.
42. Yamano S, Kareura E, Ishida T, Toki S, Purification and characterization of guinea pig liver morphine 6-dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 5259-5264.
43. Wermuth B, Münch JDB, Wartburg JP, Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *J.Biol.Chem.* 1977; 252: 3821-3828.
44. Gomez-Sanchez EP, Romero DG, de Rodriguez AF, Warden MP, Krozowski Z, Gomez-Sanchez CE, Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase and 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Tissue Distribution in the Rat. *Endocrinology*. 2008; 149: 525-533.
45. Bandiera S, Rtan DE, Levin W, Thomas PE, Age-and sex-related expression of cytochromes P450f and P450g in rat liver. *Arch.Biochem.Biophys.* 1986; 248: 658-676.
46. Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T, Kato R, Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: Purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Arch.Biochem.Biophys.* 1983; 225: 758-770.
47. Kamataki T, Maeda K, Shimada M, Kitani K, Nagai T, Kato R, Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1985; 233: 222-228.

48. Kato R, Sex-related differences in drug metabolism. *Drug Metab.Rev.* 1974; 3: 1-32.
49. Einarsson K, Gustafsson JA, Stenberg A, Neonatal imprinting of liver microsomal hydroxylation and reduction of steroids. *J.Biol.Chem.* 1973; 248: 4987-4997.
50. Gustafsson JA, Stenberg A, Irreversible androgenic programming at birth of microsomal and soluble rat liver enzymes active on 4-androstene-3, 17-dione and 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol. *J.Biol.Chem.* 1974; 249: 711-718.
51. Reyes EF, Virgo BB, Neonatal programming of ethylmorphine demethylase and corticosteroid 5 α -reductase by testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol. Effects of an anti-estrogen, an anti-androgen, and an inhibitor of estrogen synthetase. *Drug Metab. Dispo.* 1987; 16: 93-97.
52. Pak RCK, Tsim KWK, Cheng CHK, Pubertal gonadal hormones in modulating the testosterone dependency of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase in female rats. *Pharmacology.* 1984; 29: 121-127.
53. Dannan GA, Guengerich FP, Waxman DJ, Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes. Role of gonadal steroids in programming, maintenance, and suppression of Δ^4 -steroid 5 α -reductase, flavin-containing monooxygenase, and sex-specific cytochromes P-450. *J.Biol.Chem.* 1986; 261: 10728-10735.
54. Bandiera S, Dworschak C, Effects of testosterone and estrogen on hepatic levels of cytochromes P450 2C7 and P450 2C11 in the rat. *Arch.Biochem.Biophys.* 1992; 296: 286-295.
55. Morgan ET, MacGeoch C, Gustafsson JA, Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 α -hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 11895-11898.
56. Gustafsson JA, Mode A, Norstedt G, Skett P, Sex steroid induced changes in hepatic enzymes. *Annu.Rev.Physiol.* 1983; 45: 51-60.

57. Gustafsson JA, Stenberg A, Neonatal programming of androgen responsiveness of liver of adult rats. *J.Biol.Chem.* 1974; 249: 719-723.
58. Imaoka S, Yamazoe Y, Kato R, Funae Y, Hormonal regulation of rat renal cytochrome P450s by androgen and the pituitary. *Arch. Biochem.Biophys.* 1992; 299: 179-184.
59. Kamataki T, Maeda K, Shimada M, Nagai T, Kato R, Neonatal testosterone imprinting of hepatic microsomal drug metabolism and a male-specific form of cytochrome P-450 in the rat. *J.Biochem.* 1984; 96: 1939-1942.
60. McClellan-Green PD, Linko P, Yeowell HN, Goldstein JA, Hormonal regulation of male-specific rat hepatic cytochrome P-450g (P-450IIC13) by androgens and the pituitary. *J.Biol.Chem.* 1989; 264:18960-18965.
61. Hara A, Nakayama T, Deyashjki Y, Kariya K, Sawada H, Carbonyl reductase of dog liver: Purification, properties, and kinetic mechanism. *Arch.Biochem.Biophys.* 1986; 244: 238-247.
62. Sawada H, Hara A, The presence of two NADPH-linked aromatic aldehyde-ketone reductases different from aldehyde reductase in rabbit liver. *Biochem.Pharmacol.* 1979; 28: 1089-1094.
63. Hara A, Inoue Y, Nakagawa M, Nagane F, Sawada H, Purification and characterization of NADP⁺-dependent 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver cytosol. *J.Biochem.* 1988; 103: 1027-1034.
64. Oritani H, Deyashjki Y, Nakayama T, Hara A, Sawada H, Matsuura K, Bunai Y, Ohya I, Purification and characterization of pig lung carbonyl reductase. *Arch.Biochem.Biophys.* 1992; 292: 539-547.
65. Imamura Y, Higuchi T, Nozaki Y, Sugino E, Hibino S, Otagiri M, Purification and properties of carbonyl reductase from rabbit kidney. *Arch.Biochem.Biophys.* 1993; 300: 570-576.

66. Kato R, Yamazoe Y, Hormonal Regulation of Cytochrome P450 in Rat Liver. *Cytochrome P450*. 1993; 105: 447-459.
67. Yun KU, Oh SJ, Oh JM, Kang, KW, Myung, CS, Song G, Kim BH, Kim SK, Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch Toxicol*. 2010; 84:939–946.
68. Kawai M, Bandiera SM, Chang TKH, Bellward GD, Growth Hormone Regulation and Developmental Expression of Rat Hepatic CYP3A18, CYP3A9, and CYP3A2. *Biochem.Pharmacol*. 2000; 59: 1277-1287.
69. Graeve JD, Gielen JE, Kahl GF, Tüttenberg KH, Kahl R, Maume B, Formation of two metyrapone N-oxides by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos*. 1978; 7(3): 166-170.
70. Testa B, Jenner P, Inhibitors of Cytochrome P-450s and their mechanism of action. *Drug Metab Rev*. 1981; 12(1): 1-117.
71. Shaw PN, Tseti J, Warburton S, Adedoyin A, Houston JB, Inhibition of antipyrine metabolite formation. Steady state studies with cimetidine and metyrapone in rats. *Drug Metab. Dispos*. 1986; 14(2): 271-276.
72. Arampatzis S, Kadereit B, Schuster D, Balazs Z, Schweizer RAS, Frey FJ, Langer T, Odermatt A, Comparative enzymology of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from six species. *J Mol. Endocrinol*. 2005; 35: 89-101.
73. Lin D, Sun W, Wang Z, Chen LG, Chen XL, Wang SH, Li WS, Ge RS, Hu GX, The effect of Glycyrrhetic Acid on Pharmacokinetics of Cortisone and Its Metabolite cortisol in Rats. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 1-5.
74. Diederrich S, Grossmann C, Hanke B, Quinkler M, Herrmann M, Bähr V, Oelkers W, In the search for specific inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenases (11 β -HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11 β -HSD-I. *Eur J Endocrinol*. 2000; 142: 200-207.

75. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: A tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine review*. 2004; 25(5): 831-866.
76. Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I, Howie AJ, Rainey WE, Stewart PM, Immunohistochemical Localization of Type 1 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Human Tissues. *J Clin Endocr Metab*. 1998; 83(4): 1325-1335.
77. Maser E, Völker B, Friebertshäuser J, 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 from Human Liver: Dimerization and Enzyme Cooperativity Support Its Postulated Role as Glucocorticoid Reductase. *Biochemistry*. 2002; 41: 2459-2465.
78. Odermatt A, Atanasov AG, Balazs Z, Schweizer RAS, Nashev LG, Schuster D, Langer T, Why is 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 facing the endoplasmic reticulum lumen? Physiological relevance of the membrane topology of 11 β -HSD1. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 248: 15-23.
79. Marandici A, Monder C, Inhibition by glycyrrhetic acid of rat tissue 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in vivo. *Steroids*. 1993; 58: 153-156.
80. Kraulis I, Li TMP, Lantos CP, Birmingham MK, The reduction of SU-4885 by adrenal glands and other tissues and its inhibition by ACTH. *Can J Biochem*. 1968; 46(5): 463-469.
81. Crooks PA, Damani LA, Cowan DA, Synthesis of *N*-oxide derivatives of metyrapone and their detection as in vitro metabolites. *J Pharm Pharmacol*. 1981; 33(1): 309-312.
82. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 1985; 150: 76-85.