

HIV プロテア - ゼ阻害剤の体内動態における薬物相互作用

京都薬科大学薬物動態学教室

吉川 由佳子, 高田 寛治

要旨

後天性免疫不全症候群 AIDS 治療における化学療法はいわゆるカクテル療法といわれる多剤併用療法であるが、臨床において使用されている数種の抗 AIDS 薬のうち最も有効な組み合わせというのはいまだ確定されていない。また多剤併用をおこなう際には、相互作用についての詳細な情報を得ることが合理的投与設計を行なう上で必要不可欠となる。本研究では 4 種の HIV-プロテアーゼ阻害剤、サキナビル、インディナビル、リトナビル、ネルフィナビルを用いて 2 剤併用時および単剤投与時の両条件下での、ラット肝ミクロゾーム中における *in vitro* 代謝により算出した代謝クリアランスから、*in vivo* での血中薬物動態を予測でき得るかどうかを調べるために生理学的薬物動態速度論を用いてシミュレーションをおこなった。シミュレーション結果から、インディナビルに対してサキナビル、リトナビル、ネルフィナビルの各々を併用した際のインディナビルの血中薬物動態を予測し得る結果が得られたことから、本モデルを用いたシミュレーションの可能性と、併用療法においてはインディナビルとネルフィナビルと組み合わせの妥当性が強く示唆された。

研究目的

化学療法の進歩により、後天性免疫不全症候群 AIDS 治療も目覚ましい進歩を遂げている。逆転写酵素阻害剤の単剤療法では耐性ウイルスの出現により当初期待されたほどの治療効果が得られなかった。しかし、逆転写酵素阻害剤と HIV プロテア - ゼ阻害剤との 2 剤もしくは 3 剤による多剤併用療法により AIDS ウィルスに感染していても、その発症を抑制できる段階にまで治療法は進歩してきている¹⁾。逆転写酵素阻害剤としては、AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC などが臨床に用いられている。プロテア - ゼ阻害剤としては図 1 に示すように、サキナビル、インディナビル、リトナビル、ネルフィナビルが用いられている。しかし多剤併用療法時の最適の薬物の組み合わせに関しては完全に解明されていない。特に HIV プロテア - ゼ阻害剤は、肝ミクロゾーム薬物代謝酵素 CYP3A4 の基質となることが知られている^{2), 3)}。CYP3A4 は肝ミクロゾーム薬物代謝酵素群の中において基質特異性が比較的低いことからの広範な薬物、内因性物質さらに環境攪乱物質の代謝などに関与している。そこで我々は HIV プロテア - ゼ阻害剤による多剤併用療法時における合理的な投与設計の確立を目的として本研究を行った。すなわち、ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝実験により、プロテア - ゼ阻害剤であるサキナビル、インディナビル、ネルフィナビルおよびリトナビルの代謝様式を解明するとともに 2 種のプロテア - ゼ阻害剤を種々の濃度で添加した場合における両阻害剤間の代謝における相互作用について検討を行った。さらに、*in vitro* 代謝実験の結果に基づき、*in vivo* における阻害剤の血中薬物動態における相互作用についても薬物速度論の見地から検討を行なった

実験方法

1. ラット肝ミクロゾーム分画を用いる代謝クリアランス実験法

ラット肝ミクロゾーム分画を常法により調製した。NADP, G6P および G6PDH を最終濃度が各々 0.5 mM, 5 mM, 2 IU/ml となるように 5 mM 塩化マグネシウム溶液に溶解し、NADPH 再生系溶液を調製した。ガラス製試験管内に NADPH 再生系溶液 308 μ l, 0.1M リン酸バッファ - (pH7.4) 582 μ l を加え、さらにメタノールに溶解したインディナビルおよびネルフィナビル溶液を加え、全量を 900 μ l とした。37 の恒温槽中で 5 分間プレインキュベ - トした後、Lawry 法により 8 mg protein/ml に調製したミクロゾームサスペンションを 100 μ l 添加することにより代謝反応を開始した。10 ~ 20 分間インキュベ - トを行い酵素反応を行った後、2.0 M K₃PO₄ を添加することにより酵素反応を停止した。酵素反応液中からのインディナビルおよびネルフィナビルの抽出はジエチルエーテル 3 ml を加えることにより行った。エーテル抽出後、窒素ガス気流下にて蒸発・乾固を行い HPLC 用移動相の 200 μ l に溶解した後、

逆相系 HPLC 法によりインディナビルおよびネルフィナビルの定量を行った。カラムは Chemcosorb ODS C₁₈(内径 4.6 mm ,長さ 25 cm)を用いた。移動相は水およびアセトニトリルを 30 対 70 の割合にて混和し、リン酸にて pH 4.0 に合わせるにより調製した。カラムから溶出してくるインディナビルおよびネルフィナビルの検出はそれぞれ UV_{210 nm} ,UV_{260 nm} において島津 UV 検出器(SPD-10A)により行った。マイクロゾーム反応混合液中に添加したインディナビルおよびネルフィナビルの分析において、スパイク試料から調製した検量線は 0.1 ~ 20.0 µg/ml の濃度範囲で良好な直線性を示した。相関係数は 0.999 以上であった。

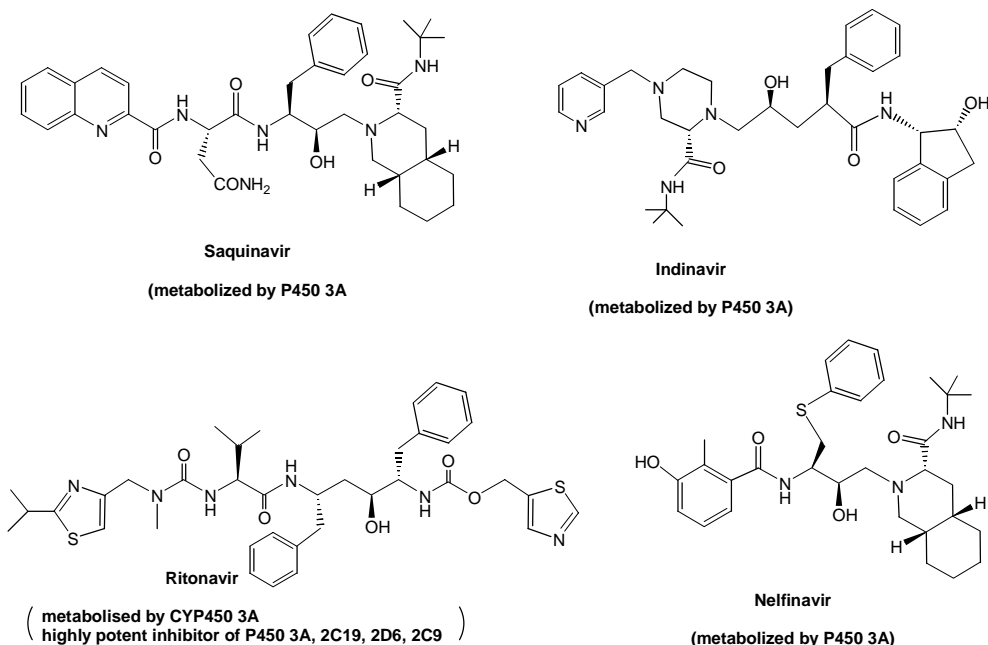


図 1 Chemical structures of HIV protease inhibitors

2. ラットにおける *in vivo* での代謝における相互作用に関する実験法

Wistar 系雄性ラット(体重 300 ~ 350g)を用い、併用剤として用いる任意の HIV プロテアーゼ阻害剤を懸濁液として 20 mg/kg の投与量で前投与を行い、その直後にインディナビルまたはネルフィナビルの懸濁液を 20 mg/kg の投与量で経口投与を行った。経口投与にはステンレス製のゾンデを用いた。投与前および投与後 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 時間後に軽エーテル麻醉下、右頸静脈よりヘパリン処理を施したシリンジにより約 200 µl 採血を行った。13,000 rpm 5 分間遠心分離を行うことにより血漿試料を得た。血漿試料は分析まで - 80 °C にて保存した。血漿中インディナビルおよびネルフィナビル濃度の測定は先に述べた HPLC 法により行った。

今回リトナビルに関しては、CYP3A4 に対する酵素阻害作用が強いため、リトナビルの薬物動態に関する詳細な研究は後日に行うことにし、今回は阻害剤としてのみ用いた

結果および考察

図 2 はラット肝マイクロゾーム再構成系におけるネルフィナビルおよびリトナビルの併用添加時における Lineweaver - Burk plot (左図) と Dixon plot (右図) を示したものである。本実験において用いたネルフィナビルの基質濃度は 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 16.0 µg/ml であった。ネルフィナビルを基質として用い、リトナビルを阻害剤として用いて代謝実験を行ったところ、リトナビルの添加濃度を 25, 50, 100 µM と増加させていくに従ってネルフィナビルの代謝は有意に阻害された。Michaelis-Menten の酵素反応速度論によりこのデータを解析したところネルフィナビルの最大反応速度 V_{max} は 0.491 µg/min/mg protein であり、Michaelis 定数 K_m は 3.89 µg/ml という結果が得られた。一方、阻害剤として用いたリトナビルの添加濃度を变化させた場合において、ネルフィナビルの最大反応速度に有意な差は認められなかつ

た。Dixon plot より算出したリトナビルによる阻害定数 K_i は $1.01 \mu\text{M}$ ($0.728 \mu\text{g/ml}$) であった。次にネルフィナビルの代謝に及ぼすインディナビルの影響について検討を行った。図3はその結果を示したものである。基質であるネルフィナビルの濃度を $0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 16.0 \mu\text{g/ml}$ とし、阻害剤として用いたインディナビルの添加濃度を $7.5, 15, 30 \mu\text{M}$ と3段階の濃度で添加を行い阻害実験を行った。図3の左図は Lineweaver-Burk plot を、右図は Dixon plot を示している。インディナビルの添加濃度を $7.5, 15, 30 \mu\text{M}$ と増加させるに従ってネルフィナビルの代謝速度は有意に阻害された。また、阻害剤として用いたインディナビルの添加濃度を3段階で変化させた場合において、ネルフィナビルの最大反応速度に有意な差は認められなかった。Dixon plot より算出したインディナビルによるネルフィナビル代謝への阻害定数 K_i は $2.76 \mu\text{M}$ ($2.09 \mu\text{g/ml}$) となった。表1は先程の *in vitro* ラット肝ミクロゾーム混合反応液を用いた代謝実験から得られたネルフィナビル、インディナビルおよび先に代謝実験を行ったサキナビルの酵素反応速度論パラメータである Michaelis 定数 K_m および最大反応速度 V_{\max} をまとめて示したものである。ネルフィナビルの K_m 値はインディナビルに比べて約1.3倍高い値になり、更に V_{\max} 値は約2.2倍高い値となった。そこでラット肝ミクロゾーム混合反応液中の薬物代謝酵素によるプロテアーゼ阻害剤の代謝クリアランスすなわち V_{\max}/K_m 値を求めた。ネルフィナビルの代謝クリアランスは $126.06 \pm 4.41 \mu\text{g/min/mg protein}$ という値になり、一方、インディナビルの代謝クリアランス値は $73.01 \pm 1.95 \mu\text{g/min/mg protein}$ という値になった。従って、ネルフィナビルの方がインディナビルに比べて約1.7倍高い代謝クリアランス値を示すことが明らかとなった。次に、ラットを用いて *in vivo* におけるインディナビルおよびネルフィナビルの体内動態に及ぼす他剤の相互作用の有無について検討を行った。体重約350gのWistar系雄性ラットを用い、インディナビル 20 mg/kg に対し、他のHIVプロテアーゼ阻害剤を同用量(20 mg/kg)にて併用投与した。軽度の麻酔下、薬物をラットに経口投与し、6時間にわたって経時的に右頸静脈より採血を行った。得られた血漿試料中のインディナビル濃度をHPLC法にて測定した。

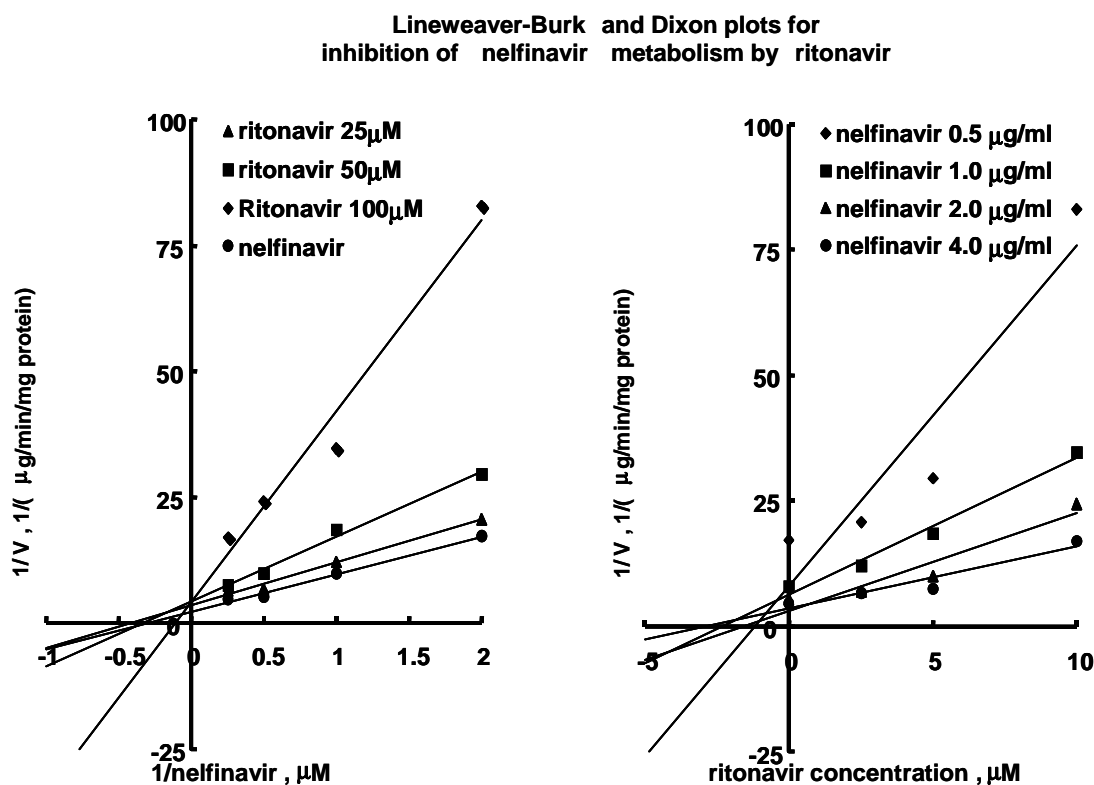


図2. Lineweaver-Burk(a) and Dixon(b) plots for inhibition of nelfinavir metabolism by ritonavir.

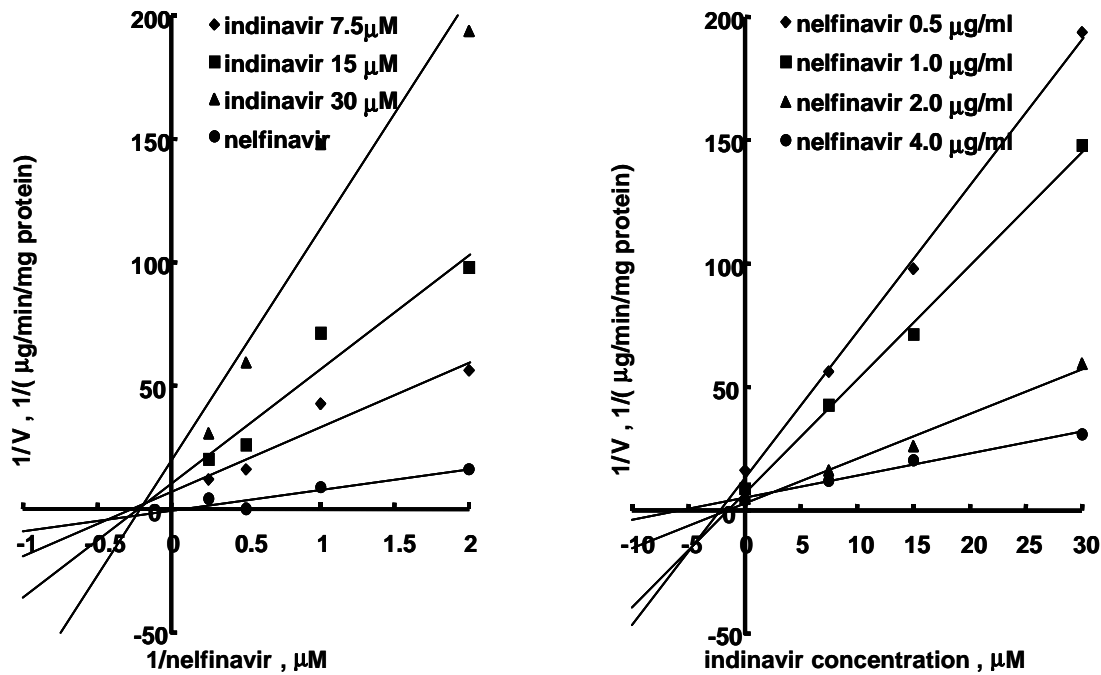


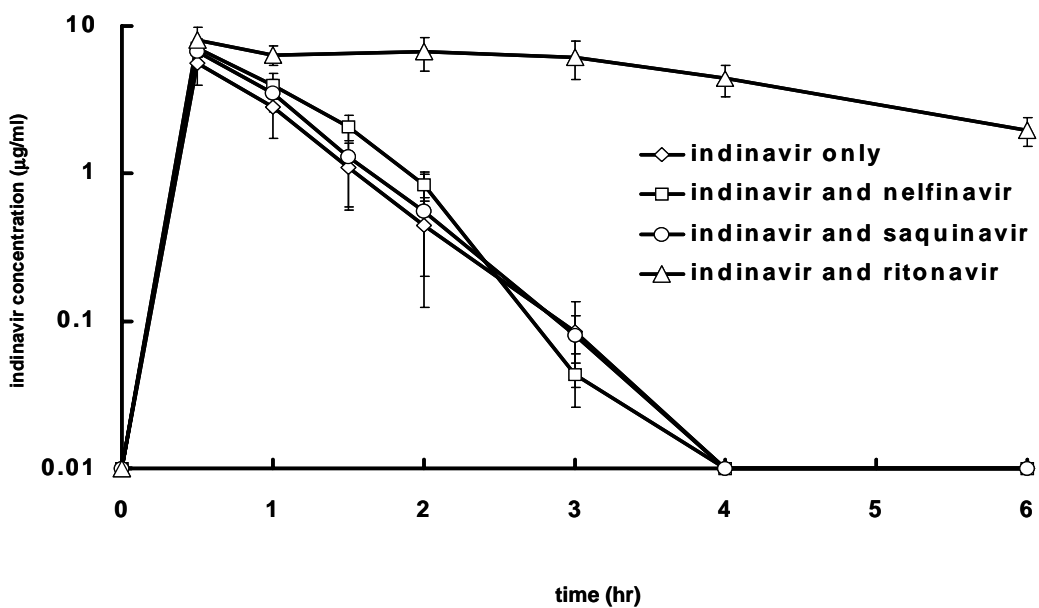
図3. Lineweaver-Burk(a) and Dixon(b) plots for inhibition of nelfinavir metabolism by indinavir.

表 1 Kinetics of liver microsomal metabolism of saquinavir, indinavir and nelfinavir in rat

Drug	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m ($\mu l/min/mg$ protein)
saquinavir	8.31 ± 0.18	1.42 ± 0.07	170.88 ± 10.85
indinavir	4.52 ± 0.08	0.33 ± 0.03	73.01 ± 1.95
nelfinavir	5.87 ± 0.51	0.74 ± 0.05	126.06 ± 4.41

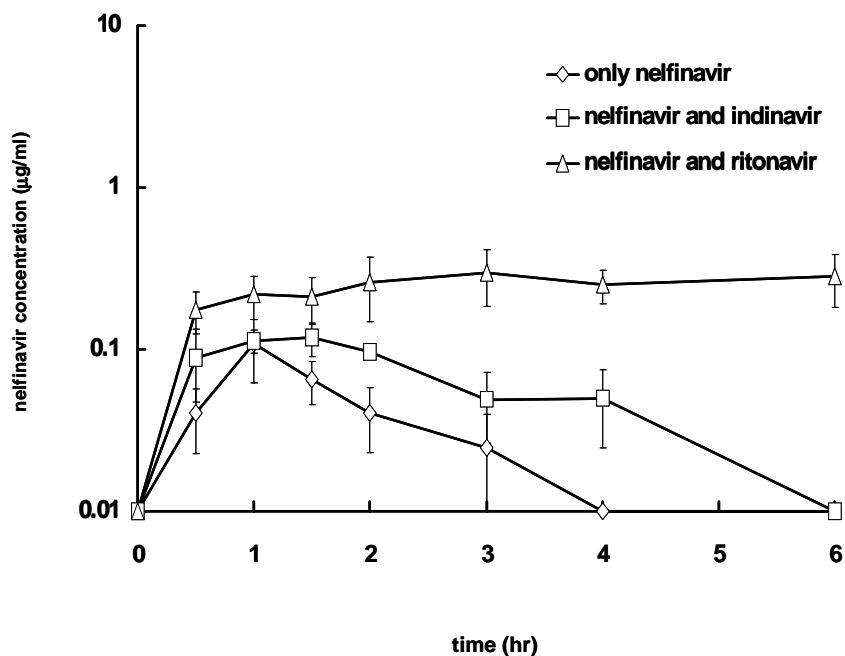
Each value represents the mean \pm S.E. of three or four experiments.

図 4 は、血漿中インディナビル濃度の時間的推移を片対数目盛で示したものである。図中の、 \square で示したのがインディビル 20mg/kg 単独投与群、 \square はサキナビル 20 mg/kg 併用投与群、 \square はネルフィナビル 20 mg/kg 併用投与群、 \square はリトナビル 20 mg/kg 併用投与群における、各インディナビルの血漿中からの消失動態を表している。インディナビル単独投与群の血漿中からの消失動態と、インディナビル・サキナビルおよびインディナビル・ネルフィナビル併用投与群におけるインディナビルの血漿中からの消失動態の間には、統計学的に有意な差は認められなかった。しかし、インディナビル・リトナビル併用投与群におけるインディナビルの消失動態はインディナビル単独投与時と比較して、統計学的に有意な差が認められた。次に、ネルフィナビルの血中薬物動態に及ぼすインディナビルおよびリトナビルの影響について上記と同様の手法により検討を行った。ネルフィナビル 20 mg/kg 単独投与、インディナビル 20 mg/kg 併用投与およびリトナビル 20 mg/kg 併用投与した場合の *in vivo* における血漿中ネルフィナビル濃度の時間的な推移を示したのが図 5 である。図中の、 \square はネルフィナビル 20 mg/kg 単独投与群、 \square はインディナビル 20 mg/kg 併用投与群、 \square はリトナビル 20 mg/kg 併用投与群における各ネルフィナビルの血漿中からの消失動態を表している。本図からも明らかのように、インディナビルの場合と同様にリトナビルの併用投与によりネルフィナビルの著しい血漿中の滞留遅延が認められた



Each point represents the mean \pm S.E. of three or four rats.

Figure 4. Plasma indinavir concentration-time curves after oral administration in combination with saquinavir, indinavir and ritonavir.



Each point represents the mean \pm S.E. of three or four rats.

Figure 5. Plasma nelfinavir concentration-time curves after oral administration in combination with indinavir and ritonavir.

表2は、このデータに対してノンコンパ - トメント解析法により求めた薬物動態速度論的パラメータ値を示したものである。インディナビル単独投与群において最高血漿中濃度 C_{max} は $5.59 \pm 1.69 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、リトナビルの併用投与により $9.61 \pm 1.10 \mu\text{g/ml}$ に約 1.7 倍の上昇を示した。更に全身クリアランス CL_{tot} 値は $1.43 \pm 0.38 \text{ L/hr}$ から $0.17 \pm 0.05 \text{ L/hr}$ にまで激減した。半減期 $t_{1/2}$ も $0.56 \pm 0.03 \text{ h}$ から $2.54 \pm 0.50 \text{ h}$ まで約 5 倍近い延長が認められた。更に、血漿中インディナビル濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) は $5.18 \pm 1.85 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ から $41.28 \pm 9.85 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ まで 8 倍以上の上昇が認められた。また、ネルフィナビルの場合、単独投与群において最高血漿中濃度 C_{max} は $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、リトナビルの併用投与により $0.33 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ に約 3.6 倍の上昇を示した。更に全身クリアランス CL_{tot} 値は $32.08 \pm 2.49 \text{ L/hr}$ から $1.31 \pm 0.6443 \text{ L/hr}$ にまで激減した。半減期 $t_{1/2}$ も $1.36 \pm 0.11 \text{ hr}$ から $8.67 \pm 1.96 \text{ hr}$ まで約 6.5 倍近い延長が認められた。更に、血漿中ネルフィナビル濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) は $0.17 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ から $1.44 \pm 0.41 \mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ まで 8 倍以上の上昇が認められた。しかし、ネルフィナビルとインディナビル併用時における、各パラメーター変化の程度はリトナビル併用時と比べて有意に小さいものであった。

Case	Pharmacokinetics parameter values				
	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$)	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	CL (L/hr)
IND	5.597 ± 1.694	5.178 ± 1.854	0.563 ± 0.027	0.888 ± 0.029	1.428 ± 0.377
IND&NEL	7.163 ± 1.193	7.274 ± 1.916	0.508 ± 0.017	0.913 ± 0.057	0.931 ± 0.203
IND&SAQ	6.763 ± 1.083	6.269 ± 1.268	0.534 ± 0.023	0.809 ± 0.038	1.044 ± 0.220
IND&RIT	9.615 ± 1.102	41.277 ± 9.847	2.547 ± 0.502	3.642 ± 0.541	0.172 ± 0.048
NEL	0.091 ± 0.013	0.170 ± 0.017	1.364 ± 0.107	2.950 ± 0.264	32.075 ± 2.486
NEL&IND	0.152 ± 0.026	0.368 ± 0.060	1.196 ± 0.086	2.422 ± 0.248	16.591 ± 2.190
NEL&RIT	0.327 ± 0.098	1.443 ± 0.414	8.670 ± 1.963	13.181 ± 3.167	1.307 ± 0.643

in vitro の肝ミクロゾーム代謝実験系における阻害実験の結果を用いて、*in vivo* における薬物相互作用の有無とその程度についてどこまで予測可能かということを知るために図 6 a に示すような pharmacokinetic model を考えた。代謝実験において求めた V_{max} 、 K_m および K_i などの各生化学的パラメータ値、各臓器における血液量、臓器容量などの生理学的パラメータ値を組み込んで、インディナビル単独投与時および他剤との併用投与時におけるラット採血血中インディナビル濃度の時間的推移を示したのが図 6 b である。いずれの場合においてもシミュレーション曲線と実測値との間にまずまずの一致が認められ、*in vitro* のデータから *in vivo* における薬物相互作用の動態をシミュレートすることの可能性が示唆された。

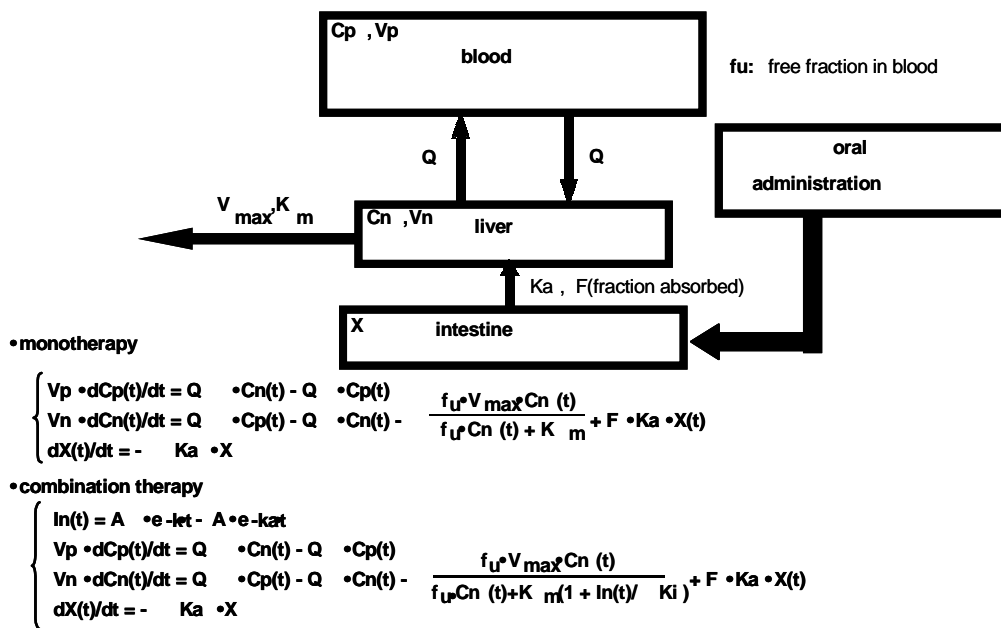


Fig.6a. Pharmacokinetic model for HIV protease inhibitors

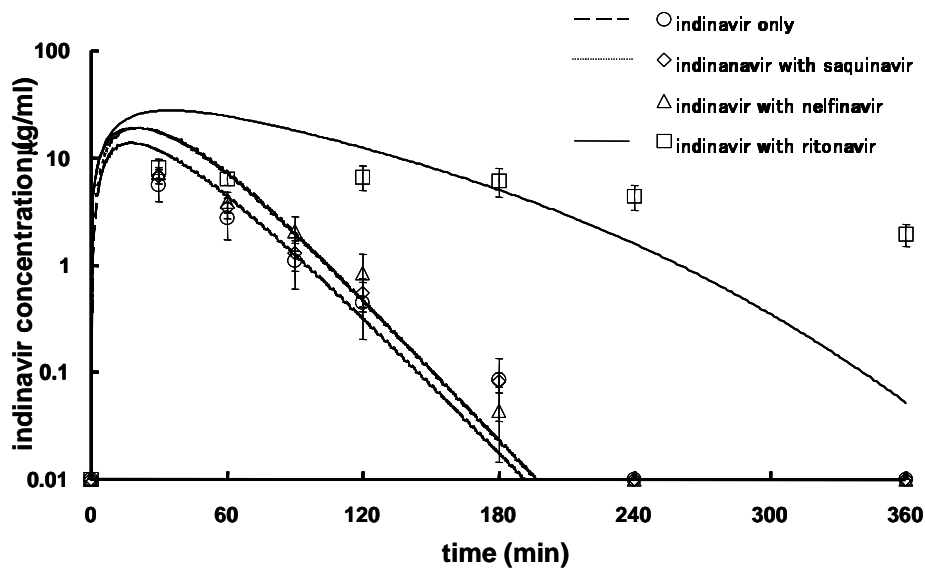


Fig.6b. Simulated plasma indinavir concentration VS. time curves.

結論

HIV プロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤との併用により AIDS 化学療法は著しい進歩を遂げている。さらに HIV プロテアーゼ阻害剤間の併用により耐性発現の問題を克服しようと試みられている。今回の相互作用に関する研究によりインディナビルとネルフィナビルとの併用による抗 AIDS 療法の妥当性が強く示唆された。

文献

- 1) D. J. Kempf , K. Marsh, G. Kumar et.al. : Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 654-660, 1997.
- 2) M. Chiba , M. Hensleigh and J. H. Lin : Hepatic and intestinal metabolism of indinavir , an HIV protease inhibitor , in rat and human microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 53, 1187-1195, 1997.
- 3) M. E. Fitzsimmons and J. M. Collins : Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4. *Drug Metab. Dispos.*, 25, 256-266, 1997.
- 4) 花野 学, 梅村 甲子朗, 伊賀 立二編: 医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法 p.477, 1985.
- 5) L. L. von Moltke , D. J. Greenblatt , J. M. Grass et al. : Protease inhibitors as inhibitors of human cytochromes P450 : High risk associated with ritonavir. *J. Clin. Pharmacol.*, 38, 106-111, 1998.

研究発表

1 . 論文発表

- 1) Hirokazu Yamaji, Yasuhiro Matumura, Yukako Yosikawa, and Kanji Takada: Pharmacokinetic interactions between HIV-protease inhibitors in rats, *Biopharm.drug Dispos.*20,241-247(1999).
- 2) 山地宏和、松村康弘、澤木七桜子、登 佳寿子、吉川由佳子、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の体内動態における薬物相互作用 . *ミノファージェンメディカルレビュー*、44,93-98(1999).

2 . 学会発表

- 1) 岡本弘行、松村康弘、川口裕子、吉川由佳子、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の体内動態における薬物相互作用 . 第 13 回近畿エイズ学会 (大阪) 1999,5.
- 2) 松村康弘、岡本弘行、川口裕子、吉川由佳子、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の体内動態における薬物相互作用に関する研究 . 第 14 回日本薬物動態学会 (浜松) 1999,10.
- 3) 松村康弘、岡本弘行、芝田信人、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の体内動態における薬物相互作用 . *日本エイズ学会 (東京)* 1999,12.
- 4) 山地宏和、松村康弘、澤木七桜子、登 佳寿子、吉川由佳子、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の体内動態における相互作用 . 第 12 回近畿エイズ研究会学術集会 (大阪) 1998,5.
- 5) 山地宏和、松村康弘、小林竜也、澤木七桜子、吉川由佳子、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の代謝における相互作用 (1) *in vitro* ラット肝ミクロゾーム再構成系における代謝クリアランス . 第 13 回日本薬物動態学会年会 (仙台) 1998,11.
- 6) 松村康弘、松村康弘、寿山はるか、梶原恵子、吉川由佳子、高田寛治 : HIV プロテアーゼ阻害剤の代謝における相互作用 (2) *in vitro* 併用経口投与時における血中薬物動態 . 第 13 回日本薬物動態学会年会 (仙台) 1998,11.