

短報

各種 cytochrome P450 に対する アゾール系抗真菌薬の相互作用

丹羽俊朗¹⁾, 今川友里恵¹⁾, 山崎浩史²⁾

1) 就実大学薬学部, 2) 昭和薬科大学

Drug interaction of azole antifungal agents against cytochrome P450s

Toshiro Niwa¹⁾, Yurie Imagawa¹⁾, Hiroshi Yamazaki²⁾

1) School of Pharmacy, Shujitsu University, 2) Showa Pharmaceutical University

(Received 24 December 2013; accepted 19 January 2014)

Abstract

The *in vitro* metabolic inhibitory effects on cytochrome P450s (CYPs) of azole antifungal drugs, including fluconazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole, and voriconazole, were compared with the inhibitory effects against CYP51 (lanosterol 14 α -demethylase) activities. Inhibitory effects as well as desociation constants (K_d) taken from the literature are compared, along with inhibitory constants (K_i) and 50% inhibitory concentrations (IC_{50}). In the interaction studies, the effects of antifungal drugs on specific activities of human hepatic CYPs, including CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4/5, in human liver microsomes were investigated. Fluconazole and voriconazole have lower inhibitory effects on CYP3A4/5 activities than itraconazole and miconazole, and IC_{50} and/or K_i values against CYP2C9 and CYP2C19 activities are the lowest for miconazole, followed by voriconazole and fluconazole, and miconazole is a potent inhibitor of all CYPs investigated. In the inhibitory effects against CYP51 activities, IC_{50} values were similar among fluconazole, itraconazole, and voriconazole, whereas K_d value was lowest for ketoconazole, followed by voriconazole, itraconazole, and fluconazole. Interestingly, the inhibitory effects against CYP3A4 and CYP3A5 seem to be correlated with the affinity to CYP51. These present results suggest the possibility of the similar accessibility of the azoles to heme iron of CYP3A4/5 and CYP51.

Keywords: azole antifungal agents, cytochrome P450, CYP51, lanosterol 14 α -demethylase, drug interaction.

緒言

Fluconazole, itraconazole, miconazole 及び voriconazole を含むアゾール系抗真菌薬は, *Aspergillus* 属及び *Candida* 属などによる真菌感染症に広く用いられている。これらの抗真菌薬は, 真菌中の lanosterol を 14 α -demethyllanosterol に代

謝させる cytochrome P450 51 (CYP51, 14 α -sterol demethylase)を阻害することにより, 細胞膜の主要な脂質成分 ergosterol の生合成を阻害する¹⁾。

薬物代謝酵素としての CYP は, 主に肝臓, 小腸等の小胞体に存在し, 薬物等の多くの異物の酸化, 還元, 加水分解等を行う酵素であり, 多くの

分子種によるスーパーファミリーを形成する²⁾. 薬物相互作用の多くは、薬物の吸収、分布、代謝、排泄の各過程で起こることが知られているが、代謝過程における相互作用、特に CYP が関連した相互作用が最も臨床上問題となる場合が多い³⁾. 我々は、主要な抗真菌薬のヒト薬物代謝酵素に対する阻害活性を報告してきた⁴⁻⁷⁾. また、最近、CYP51 に対する各種アゾール系抗真菌薬の親和性及び阻害活性が報告されたが^{8,9)}、ヒト薬物代謝型 CYP との関連を検討した報告はない. そこで、CYP の基質特異性を解明することを目的とし、まずヒト肝ミクロゾーム (HLM) 中の代表的な CYP に対する抗真菌薬の影響を調査し、CYP51 に対する親和性及び阻害活性の報告^{8,9)}と比較した. 尚、国内では経口剤又は静注剤としては用いられていないが、CYP3A4 の典型的な阻害剤として使用されている ketoconazole¹⁰⁾についても阻害活性を調査し、他の抗真菌薬と比較した.

さらに、HLM を用いた報告では CYP3A4 と CYP3A5 による活性が区別できないため CYP3A4/5 と表記したが、最近 CYP3A4 と基質特異性が若干異なっており、遺伝子多型があることにより重要視されている CYP3A5¹¹⁾について CYP3A4 と区別した研究結果も調査した.

方法

HLM 中の代表的な 6 種の CYP (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 及び CYP3A4/5) に対する抗真菌薬の阻害試験においては、基質濃度が Michaelis 定数 (K_m) 付近の時の 50%阻害濃度 (IC_{50}) は、拮抗阻害では阻害定数 (K_i 値) の 2 倍、非拮抗阻害では K_i 値に相当するため、*in vitro* 阻害試験における基質濃度は、 K_m 値付近となる濃度で実施し⁸⁻¹¹⁾、 IC_{50} 値の文献値は基質濃度が K_m 値付近で検討されている報告値を採用した. さらに、CYP3A4 及び CYP3A5 の K_i 値は recombinant CYP による midazolam 1'-水酸化活性に対する阻害活性も測定した¹²⁾.

CYP51 に対する各抗真菌薬の影響に関しては、*Candida albicans* の CYP51 に対する親和性 (解離定数, K_d) 及び lanosterol 14 α -脱メチル化活性に対する IC_{50} 及び K_i 値を調査した.

複数のパラメータが報告されている場合には、中央値を用いて相関性の解析を行った.

結果

5 種の抗真菌薬について、我々が報告した IC_{50} 値⁴⁻⁷⁾を、既報の K_i 値及び IC_{50} 値と共に Table 1 に纏めた. Fluconazole 及び voriconazole では、CYP1A2, CYP2D6 及び CYP2E1 に対して阻害が認められなかったが、CYP2C9, CYP2C19 及び CYP3A4/5 に対して 8~30 μ M の IC_{50} 値が認められ、fluconazole の CYP3A4/5 に対する IC_{50} 値は既に報告されている K_i 値とほぼ同程度であった. Itraconazole では、CYP3A4/5 に対して 0.0326 μ M の強い阻害が認められたが、その他の CYP に対する阻害は認められないか又は 10 μ M 以上と非常に弱かった. Miconazole は全ての CYP を阻害し、特に CYP3A4/5 及び CYP2C19 に対して強い阻害を示した. 典型的な CYP3A4 阻害薬である ketoconazole¹⁰⁾では、CYP3A4/5 に対して IC_{50} 値 0.2 μ M の強い阻害が認められ、CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 及び CYP2D6 に対しても IC_{50} 値又は K_i 値が 13~28 μ M の阻害を示した. CYP2C9 及び CYP2C19 活性に対する IC_{50} 値は miconazole が最も低く、voriconazole では、8.4-8.7 μ M であり、fluconazole 及び itraconazole では 10 μ M 以上と推察された. CYP3A4 と CYP3A5 に対する fluconazole, itraconazole 及び voriconazole の阻害活性を比較したところ、いずれも CYP3A4 の方が低い K_i 値を示した.

CYP51 に対する阻害活性では、 K_i 値を測定している報告がなかったため IC_{50} 値を示したが、 K_d 値は ketoconazole < voriconazole < itraconazole < fluconazole であるのに対し、 IC_{50} 値では fluconazole, itraconazole, voriconazole 間に大きな

Table 1. K_i , IC_{50} and K_d values of antifungal agents against human CYP activities and *Candida albicans* CYP51

CYP		K_i , IC_{50} , or K_d (μ M)				
		Fluconazole	Itraconazole	Ketoconazole	Miconazole	Voriconazole
CYP1A2	K_i	-	-	-	3.2 (C)	-
(HLM)	IC_{50}	NI	NI	13	2.90	NI
CYP2C9	K_i	8*	-	-	1.2	-
(HLM)		[7-9 (M)]				
	IC_{50}	30.3	>10	13	2.0	8.4
CYP2C19	K_i	-	-	-	0.010 (C)	-
(HLM)	IC_{50}	12.3	>10	28	0.33	8.7
CYP2D6	K_i	-	-	-	0.70 (C)	-
(HLM)	IC_{50}	NI	NI	17	6.46	NI
CYP2E1	K_i	-	-	-	5.7*	-
(HLM)		[4 (N), 7.3 (C)]				
	IC_{50}	NI	NI	>90 [90, >100]	>10	NI
CYP3A4/5	K_i	10.7	-	0.037*	0.028 (C)	-
(HLM)		[0.015 (M), 0.037 (C), 0.34(C)]				
	IC_{50}	13.1	0.0326	0.2* [0.0117, 0.2, 0.2]	0.0742	10.5
Rec.	K_i	1.9 (C)	0.03 (C)	-	-	0.15 (C)
CYP3A4 ¹²⁾						
Rec.	K_i	21 (C)	0.94 (C)	-	-	0.20 (C)
CYP3A5 ¹²⁾						
CYP51 ^{8,9)}	K_i	-	-	-	-	-
	IC_{50}	0.6	0.4	-	-	0.5
	K_d	0.056*	0.023*	0.012	-	0.018*
		[0.056, 0.056]	[0.019, 0.027]			[0.010-0.025]

The references of the values without reference number were described in Ref. 7.

* Median. HLM: human liver microsomes, Rec.: recombinant, (C): Competitive inhibition, (N): non-competitive inhibition, (M): mixed-typed inhibition. NI: no inhibition was observed at 10 and/or 25 μ M concentrations.

差は認められていない。

Miconazole を除いた 4 種の抗真菌薬について、HLM での CYP3A4/5 に対する IC_{50} 値と CYP51 に対する親和性の相関性を検討したところ (Fig. 1), voriconazole では若干 CYP51 に対する親和性が低いものの、相関傾向が認められ、3 種の抗真菌薬ではあるが、CYP3A4、CYP3A5 の K_i 値と良好な相関性が認められた。

考察

各種抗真菌薬の CYP3A4 及び CYP3A5 に対する阻害活性と CYP51 に対する親和性との間に相関性が認められた。今回、調査した抗真菌薬は 5 種類と少ないため、今後測定法を統一して多くの抗真菌薬を用いて詳細に検討する必要があるが、分類上大きく異なる CYP 間で相関傾向が認められたことは興味深いことである。すなわち、ヒトの薬物代謝において多くの薬物を基質とする

CYP3A4/5 と真菌に存在する CYP51 の基質認識部位が類似している可能性が示唆され、今後、CYP の基質特異性を解明する上で貴重な情報となるため、これらの CYP における三次元構造解析¹³⁾などの研究に興味を持たれる。また、近年 CYP3A4 と CYP3A5 の基質特異性などの相違が明らかにされており¹¹⁾、これらの CYP を区別して詳細に解析する必要性がある。

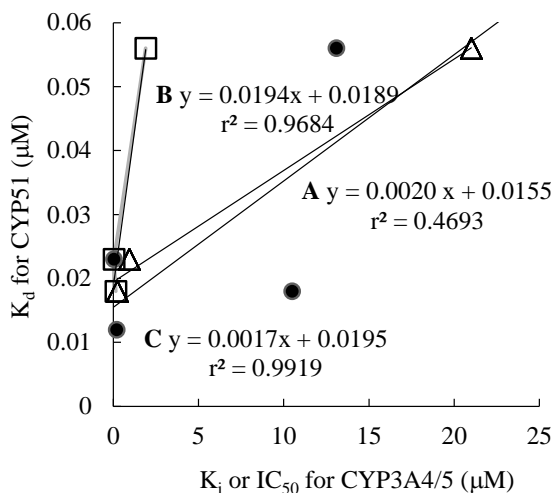


Fig.1. Relationship between IC₅₀ for CYP3A4/5 in HLM (A, ●), K_i for CYP3A4 (B, Δ), or K_i for CYP3A5 (C, □) and K_d for CYP51

引用文献

- 1) Jeu L., Piacenti F. J., Lyakhovetskiy A. G., Fung H. B.: Voriconazole, *Clin. Ther.*, 25 (5), 1321-1381 (2003).
- 2) Rendic S.: Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data, *Drug Metab. Rev.*, 34 (1-2), 83-448 (2002).
- 3) Ito K., Iwakubo T., Kanamitsu S., Ueda K., Suzuki H., Sugiyama Y.: Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver, *Pharmacol. Rev.*, 50 (3), 387-411 (1998).
- 4) Sakaeda T., Iwaki K., Kakumoto M., Nishikawa M., Niwa T., Jin J., Nakamura T., Nishiguchi K., Okamura N., Okumura K.: Effect of micafungin on cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance

protein 1 activities, and its comparison with azole antifungal drugs, *J. Pharm. Pharmacol.*, 57, 759-764 (2005).

- 5) Niwa T., Shiraga T., Takagi A.: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (9), 1805-1808 (2005).
- 6) Niwa T., Inoue-Yamamoto S., Shiraga T., Takagi A.: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (9), 1813-1816 (2005).
- 7) 丹羽俊朗, 白神歳文, 高木明: 抗真菌剤の薬物相互作用—薬物代謝酵素に及ぼす影響—, *薬学雑誌*, 125 (10), 795-805 (2005).
- 8) Warrilow A.G., Mullins J.G., Hull C.M., Parker J.E., Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L.: S279 point mutations in *Candida albicans* Sterol 14 α -demethylase (CYP51) reduce *in vitro* inhibition by fluconazole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56 (4), 2099-10 (2012).
- 9) Warrilow A.G., Parker J.E., Kelly D.E., Kelly S.L.: Azole affinity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57 (3), 1352-1360 (2013).
- 10) Bourrié M., Meunier V., Berger Y., Fabre G.: Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277 (1), 321-32 (1996).
- 11) Niwa T., Murayama N., Yamazaki H.: Comparison of the contributions of cytochromes P450 3A4 and 3A5 in drug oxidation rates and substrate inhibition, *J. Health Sci.*, 56 (3), 239-256 (2010).
- 12) Yamazaki H., Nakamoto M., Shimizu M., Murayama N., Niwa T.: Potential impact of cytochrome P450 3A5 in human liver on drug interactions with triazoles, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 69 (6), 593-597 (2010).
- 13) Niwa T., Yasumura M., Murayama N., Yamazaki H.: Comparison of catalytic properties of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by molecular docking simulation, *Drug Metab. Lett.*, 7 (2), in press (2013).