

唾液中カフェイン薬物動態に薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型が及ぼす影響に関する研究

競 和佳・今井 美穂・森次美和子・山森 元博・村田 成範・木下 健司
(武庫川女子大学薬学部)

Studies on Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzyme *CYP1A2* Influencing Pharmacokinetics of Caffeine in Saliva

Madoka Kisoi, Miho Imai, Miwako Moritsugu, Motohiro Yamamori,
Shigenori Murata, Kenji Kinoshita

*School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University
Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya, 663-8179, Japan*

Abstract

Though drugstore pharmacists can also be known as primary health care pharmacists, it cannot yet be said that they completely fill this role. We believe that it is crucial for pharmacists to consult reliably with patients. To develop this ability, it is necessary to select a familiar and relevant theme by considering various factors that are worth discussing in their own right through conducting simple verification experiments.

Caffeine is found in many foods and drinks, as well as in over the counter cold remedies and analgesics. Moreover, it has been widely used around the world to probe the effectiveness of drug-metabolizing enzyme activity of medications for liver disease. We have built a simple and easy experiment system to evaluate the pharmacokinetics of caffeine in saliva, and we examined the relationship between the drug-metabolizing enzyme *CYP1A2* genetic polymorphism and various related constitutional hereditary factors.

緒 言

カフェインは多くの飲食物だけでなく市販感冒薬や鎮痛薬にも含有される身近な成分である。また、肝臓の薬物代謝酵素活性を評価するための安全で有効なプローブとしても世界中で広く用いられている。そこで、唾液中カフェインの薬物動態評価と薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型との関連性について調べた。

さらに近年、薬局薬剤師の役割としてかかりつけ薬剤師が挙げられているが、まだその役割を果たせているとは言えない。患者あるいは一般人か

ら相談されるためには信頼を勝ち得るような考察力が必要であると我々は考えた。考察力を養うには様々な要因を簡単な検証実験を交えながら関連付けて議論できる題材が必要であり且つ自分自身にも関係するような身近なテーマが必要である。

また薬学生においては、TDM や薬物代謝酵素遺伝子についての知識を得た後、知識を応用し実践的に学ぶ教材が少ないと考えられる。

そこで、本研究により簡便な実験系を構築し、データ解析とともに患者ひとりひとりの様々な体質的・遺伝的要因を関連付けて学ぶための教材の開発について考察を行った。

目 的

薬局薬剤師あるいは薬剤師を目指す学生を対象とするため、遺伝子として薬物代謝酵素から *CYP1A2* を選出し、その代謝化合物として一般に摂取するカフェインを選択した。

カフェインは紅茶および緑茶などの嗜好品をはじめ多くの飲食物に含まれるだけでなく、解熱鎮痛作用の増強効果目的で市販感冒薬や鎮痛薬にも含有される成分であり、大多数の日本人が日常的に摂取している。カフェインには中枢神経興奮作用のほか強心・利尿作用、胃酸分泌促進作用および平滑筋弛緩作用など様々な作用がある¹⁾。一方カフェインは、主に肝臓で発現する薬物代謝酵素 *CYP1A2* によって代謝を受けると報告されており、この *CYP1A2* はカフェイン以外にヘテロサイクリックアミンのような発癌物質の代謝に重要な役割を果たしている。また、カフェインは肝臓の薬物代謝酵素活性を評価するための安全で有効なプローブとして世界中で広く用いられている²⁾。一般に、体内に取り込まれたカフェインは小腸で吸収され、門脈を経て肝で代謝を受け、全身に分布される。この時、脂溶性の薬物は主に肝細胞にある薬物代謝酵素 *CYP1A2* により代謝されパラキサンチンを生成する。さらに、その他の酵素の働きによって代謝され、水溶性を増して体外へ排泄される。*CYP1A2* は肝細胞のミクロゾームに存在し、*CYP1A2* には 10 種以上の遺伝子変異が存在するが、日本人に最も多く観察される一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) は *CYP1A2*1C* (Allele 頻度: 0.23) である³⁾。薬物代謝酵素において、代謝機能が欠損または著しく低い人を Poor Metabolizer (PM) と言うが、コーヒーや緑茶を飲んだ後に覚醒、利尿、不眠、動悸などが起きる薬理作用と *CYP1A2*1C* が薬物代謝酵素 *CYP1A2* の活性に及ぼす影響については不明な点が多い⁴⁾。我々は、薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型がカフェインの体内動態に及ぼす影響を調べるために、唾液中のカフェインおよびその代謝物であるパラキサンチンを測定した。ヒトにおいて、血漿中カフェイン濃度に対する唾液中カフェイン濃度の平均は約 8 割程度で統計学的に強い相関を示す^{5,6)}。また最終的に教材として用いることが目的であることから、採血に比べ唾液の採取は対象者にとって容易な採取法であり、試料の保管や

前処理作業においても、より安全で簡便であるため推奨されている。これらの結果から、カフェインの体内動態モニタリングにおける血液の代替生体試料として唾液を使用し、*CYP1A2* 遺伝子多型との関連性を検討した。

対象及び方法

1. 対象

インフォームド・コンセントを受け、同意を得た武庫川女子大学薬学部の女子学生 34 名 (年齢 21 ~ 24 歳、体重 40 ~ 60 kg、喫煙歴なし) を被験者とした。

本実験は武庫川女子大学の遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認 (承認番号 No.15-56) を得た。

2. 方法

1) 薬物代謝酵素遺伝子 *CYP1A2* 遺伝子多型検査概要

被検者 34 名から採取した唾液 (ヒト口腔粘膜細胞を含む) について、薬物代謝酵素遺伝子 *CYP1A2* の遺伝子多型の検出をリアルタイム PCR 装置 ABI7300 (Applied Biosystems 社製) を用いて TaqMan (登録商標) プローブ法により行なった。唾液検体は、水溶紙 (60MDP, 日本製紙パピリア株式会社) に塗布したのち、十分に乾燥させたものを使用した。50 μ L の滅菌水 (DW: distilled water) の入ったサンプルチューブに乾燥後の水溶紙を直径 4 mm にパンチしたもの (貝印生検トレパンを使用) を直接投入し、95 $^{\circ}$ C 5 分加熱した。その内 4 μ L を PCR チューブに投入し、反応液 (各組成は次項) を調製した。通常行なう DNA の抽出・精製工程は省略し、直接増幅反応を行う、ダイレクト TaqMan リアルタイム PCR 法で行った³⁾。

2) TaqMan リアルタイム PCR 法

ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) にて、TaqMan アッセイ法を用いて解析を行った。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (QPS-101, TOYOBO) 5 μ L、50 \times ROX reference dye (TOYOBO) 0.2 μ L、20 \times *CYP1A2*1C* TaqMan Probe & Primer Mix (C_15859191_30, Applied Biosystems) を 0.5 μ L、唾液検体処理液 4 μ L、および DW を添加し合計 10 μ L の反応溶液とした。反応条件は ABI 社の推奨条件を参考にして、50 $^{\circ}$ C 2 分、95 $^{\circ}$ C 10 分、40 サイクルの熱変性 95 $^{\circ}$ C

15 秒、アニーリングおよび伸長反応 60°C 1 分にて実施した。

3) 唾液中カフェイン体内動態試験概要

被験者 34 名の *CYP1A2* 遺伝子検査結果から遺伝子多型タイプ別(*CYP1A2* *1A/*1A、*1A/*1C、*1C/*1C)に 3 名ずつ選抜して、カフェインの体内動態試験を実施した。選抜された喫煙歴のない健康成人女性 9 名(年齢 21 ~ 24 歳、体重 40 ~ 60 kg)を対象とし、朝食後(全員同じ食事内容: サンドウィッチと水 200mL)にカフェイン 200 mg (エスエス製薬 エスタロンモカ 12:1 錠中カフェイン 100 mg 含有)を含有した錠剤を投与し、投与前および投与後 0.5、1、2、4、8 時間に唾液を採取した。投与 12 時間前から試験終了時まで、カフェイン含有飲料の摂取を禁止し、投薬後 3 時間まで絶食とした。唾液の採取は、分泌した唾液 500 µg をスポイドを用いて採取した。

4) 測定機器、測定条件および試薬

カフェインおよびその代謝物パラキサンチンの測定は既法の HPLC 条件の一部を改変して行った⁷⁾。唾液サンプル 200 µL に内標準物質 (Benzotriazole、50µg/mL、ナカライテスク) 15 µL および DW 900 µL を加え混合し、固相抽出カートリッジ Oasis HLB® (Waters)を用いて前処理を行った。酢酸エチル:メタノール(9:1, v/v)で抽出し、窒素ガス(45°C)で蒸発乾固した。乾固した残渣に本定量分析条件の高速液体クロマトグラフィーの移動相溶液(アセトニトリル:酢酸:精製水、100:1:899 (v:v:v)) 150 µL を加えて溶解し混合した後、50 µL を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入した。HPLC 装置は、Agilent 1200 HPLC System (Agilent Technologies 社製)を用いた。分析カラムは、TSKgel ODS-100V (5 mm, 4.6×150 mm, TOSOH)および TSKgel guardgel ODS-100V (5 mm, 3.2 × 15 mm, TOSOH)を使用した。カラムオーブンを 30°C に設定し、移動相を流速 1.5 mL/min で流し、波長 280 nm で検出した。カフェインおよびパラキサンチンの検量線は、カフェインを含まない唾液(カフェイン含有飲料を全く飲まない学生より提供:HPLC 検出限界以下)にそれぞれ 0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.5 µg/mL および 0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 µg/mL の濃度で添加し、本実験で採用したカフェイン抽出方法で回収したサンプルを用いて検量線を作成した。

5) カフェイン体内動態パラメータの解析

モーメント解析プログラム⁸⁾を用いて、最高唾液中濃度(C_{max})、最終測定時間までの唾液中濃度-時間曲線下面積(AUC₀₋₈)、平均滞留時間(MRT)、平均滞留時間の分散(VRT)、唾液クリアランス(CL)、半減期(t_{1/2})を求めた。

結 果

1. 遺伝子多型分布

被検者 34 名の遺伝子多型を解析し、その分布を算出した。*CYP1A2* 遺伝子型の各人数は *1A/*1A は 23 名(60.5%)、*1A/*1C は 11 名(29.0%)、*1C/*1C は 4 名(10.5%)であり、*1A と *1C のアレル頻度は 0.75 と 0.25 であった。遺伝子多型分布は既報と同じ結果となった³⁾。被検者 34 名の *CYP1A2* 遺伝子多型分布より、*1A/*1A、*1A/*1C、*1C/*1C の 3 群からそれぞれ 3 名ずつ選抜し、カフェイン体内動態試験のボランティアとして協力を要請した。

2. 唾液中カフェインの定量分析

カフェインは 0.1 ~ 2.5 µg/mL、パラキサンチンは 0.1 ~ 5.0 µg/mL の範囲で良好な直線性を示した(r = 0.999)。検出限界は、0.1 µg/mL であった。

3. カフェインの生体内動態

被験者 9 名におけるカフェイン 200 mg (1 錠中カフェイン 100 mg 含有)服用前(0 分)の唾液中カフェイン濃度は 0.20 ± 0.16 µg/mL (平均 ± S.E.) であった。被験者 9 名における薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型別各 3 名のカフェイン濃度経時変化を平均値として図 1 に示した。

全被験者の唾液中カフェイン濃度ピークは 0.5 時間から 2 時間に分布していた。モーメント解析により得られた体内動態パラメータの値は、C_{max} = 4.2 µg/mL、AUC₀₋₈ = 26.7 µg/mL · hr、MRT = 3.9 hr、VRT = 5.5 hr²、CL = 3.1 L/hr/kg および t_{1/2} = 9.7 hr であった。薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型(*1A/*1A、*1A/*1C、*1C/*1C)とカフェインおよびその代謝物パラキサンチンの体内動態に関連性は認められなかった(P 値 > 0.05)。

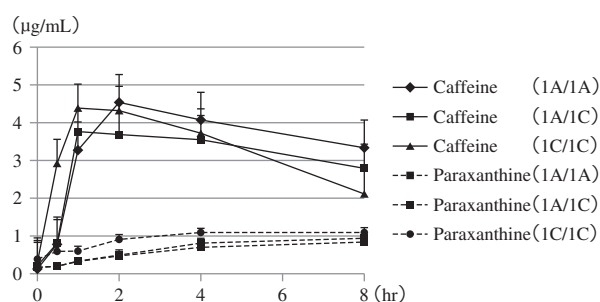


図1 被験者9名における薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型別(◆)*1A/*1A、(■)*1A/*1C、(▲)*1C/*1C)のカフェイン200mg及び、その代謝物パラキサンチンの唾液中濃度経時変化、及びそれぞれのS.E.を求めた。

考 察

我々は、血液、唾液、毛髪などの生体試料からゲノムDNAの抽出精製を行わず迅速・簡便・安価なSNPタイピング法の開発と実用性について報告してきた⁹⁻¹²⁾。従来のSNPタイピング法では、DNAの抽出・精製が必要であるため、時間と費用が多くなる。一方、唾液を付着させた水溶紙を直接PCR反応液に添加して行うダイレクトTaqMan PCR法は、前処理の工程を必要としないため僅か2時間で、さらに一遺伝子あたり約100円の試薬・消耗材料費で検査が可能である。

本タイピング法を応用して、カフェイン体内動態の薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型が及ぼす影響について検討した。

本実験を今後教育ツールとして使用する際に参加者が議論中に考慮すべき項目を考察した。

喫煙などの生活習慣や遺伝子多型による *CYP1A2* の酵素活性には個人差があるが、今回の実験結果においては、薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型とカフェインの薬物動態との間には、アルコール代謝のような密接な関係は認められなかった。これは日本の一般人においてカフェイン含有飲料が日常的に摂取されていることや各遺伝子タイプにおける被験者数が限られていたため有意な差が見られなかったと考えられるが、今後の詳細かつ体系的な研究が待たれる。

さらに、薬学生の高学年がTDMについて学ぶ上でその重要性や、TDMに影響を及ぼす様々な要因について考えるための教材が必要であると考

え、本研究における実験系であれば学生が目的を持って自ら実験を実施し、その結果をもとにこれまで知識として学習してきた事実をつなぎ合わせて検証・考察する題材として非常に重要なツールとなり得る。また、薬局薬剤師に対しては、その場で薬物動態を解析できないため、生活習慣や投与される薬物の情報を遺伝子タイプと照らし合わせて投与設計を実施する必要がある、現場で役立つ考察力を提供する重要な教育ツールとなり得る。

結 言

CYP1A2 遺伝子多型について、水溶紙を用いた乾燥唾液サンプルを直接PCR反応液に添加するダイレクトTaqMan PCR法を応用し、カフェイン体内動態の薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型が及ぼす影響について考察できる実験系を構築した。この実験系は近い将来、個別化医療が実現し、薬剤師が患者個人の遺伝子情報を活用して薬物治療の用法・用量に関して処方提言するために必要な情報の取得および活用方法や、薬学生のTDM実習並びに薬物代謝酵素遺伝子多型の影響について学ぶための有用な教育ツールとなり得る。今後、さらに考察中にもあるカフェイン飲料の嗜好性並びに飲用回数と薬物代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子多型との相関関係について検討する予定である。

利益相反：発表内容に関連し、開示すべき利益相反はない。

謝 辞

本研究については武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学研究講座の大学院生坂口友唯、福本夏江及び研究室の諸嬢に多大な協力を得ましたのでここに深謝を致します。

文 献

- 1) カフェイン「ホエイ」医薬品インタビューフォーム
2013年1月改訂(第5版)
- 2) Streetman D S, et al. Phenotyping of drug- metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000; 10: 187-216.
- 3) Tomoko Ota, et al. Combination Analysis in Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A5* in the Japanese Population, *International Journal of Medical Sciences*.2015; 12: 78-82.
- 4) Nakajima M, et al. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human *CYP1A2* gene: effect on the *CYP1A2* inducibility in humans. *J. Biochem.*1999; 125: 803-808.
- 5) 中澤一治, 田中晴美. 血漿中, 唾液中のカフェインとジメチルキシサンチン類の生体内動態. *薬学雑誌*. 1988;108 (7) : 653-658.
- 6) Zylber-Katz E, Granit L, Levy M. Relationship between caffeine concentrations in plasma and saliva. *Clin Pharmacol Ther.* 1984; 36: 133-137.
- 7) Perera V, Gross AS, McLachlan AJ., Caffeine and paraxanthine HPLC assay for *CYP1A2* phenotype assessment using saliva and plasma., *Biomed Chromatogr.* 2010; 24 (10) :1136-44.
- 8) 田端健司, 山岡清, 貝原徳紀, 鈴木眞吾. Microsoft Excel[®] で利用可能なモーメント解析プログラム MOMENT (EXCEL). *薬物動態*. 1999; 14 (4) : 286-293.
- 9) Mariko H, et al. Genotyping of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenase genes by direct application of PCR-RFLP on dried blood without DNA extraction. *Analytical Sciences*. 2010; 26 (4) : 503-505.
- 10) 大田智子, 林田真梨子, 小泉恭子, 村田成範. 薬物代謝酵素 *CYP2C9* およびビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1 *VKORC1* の高効率な一塩基遺伝子多型解析法の開発. *医療薬学* .2014; 40 (7) : 402-408.
- 11) 林田真梨子, 鎌田由佳, 大田智子, その他. 女子大学生におけるエタノールパッチテストの反応性と *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子多型との関連. *日衛誌*. 2015; 70:134-8.
- 12) 村田成範, 林田真梨子, 石黒裕子. 乾燥唾液を用いたアルコール代謝関連遺伝子 *ADH1B* および *ALDH2* の SNP タイピング解析法の検証実験と妥当性確認. *臨床病理 = The official journal of Japanese Society of Laboratory Medicine: 日本臨床検査医学会誌*. 2015; 63 (11) : 1253-1258.
- 13) 千葉寛. チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア*. 1995; 31 (9) : 992-996.

受稿日 2017年9月21日 受理日 2017年12月22日