

創薬の非臨床段階における
ヒト腸管薬物代謝予測法の開発

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生命産業科学専攻
博士（生物工学）学位論文

門野 啓太郎

目次.....	i
略語.....	ii
序論.....	1
第一章 ラットを用いたヒト腸管薬物代謝の予測.....	10
第一節 背景.....	11
第二節 実験項.....	12
第三節 結果.....	23
第四節 考察.....	38
第二章 Simplified intestinal availability モデルを用いた ヒト腸管薬物代謝の予測.....	41
第一節 背景.....	42
第二節 実験項.....	47
第三節 結果.....	60
第四節 考察.....	74
総括.....	80
参考文献.....	84
謝辞.....	98
発表論文目録.....	99

略語

AO	Aldehyde oxidase
AUC	Area under the plasma (blood) concentration time curve
BCRP	Breast cancer resistance protein
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray ionidation
HPLC	High-performance liquid chromatography
IS	Internal standard
LC-MS/MS	High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
MRM	Multiple reaction monitoring
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
P-gp	P-glycoprotein
SULT	Sulfotransferase
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

序論

製薬企業の使命は、優れた医薬品を開発、供給することにより、世界の人々の福祉と医療の向上に貢献し、健康で質の高い生活の現実に寄与することにある（製薬協企業行動勲章より）。創薬の初期段階ではコンビナトリアルケミストリーなどの手法を用いて非常に多くの化合物が合成され、高度に自動化されたスループットの高いスクリーニング法により標的分子に高い親和性を有する化合物が探索される。その後、マウス、ラットなどのげっ歯類、イヌ、サルなどの大動物を用いた非臨床試験により有効性および安全性を評価し医薬品候補化合物の絞り込みが行われ、臨床試験に導入する化合物が決定される。しかしながら、これまでの医薬品開発の統計によれば、臨床試験に進んだ医薬品候補化合物の内、実際に医薬品として認可され上市される確率は10%程度と非常に低いことが明らかとなっており、医薬品開発における臨床予測性の向上が大きな課題となっている（Hay et al., 2014）。

投与された薬物は、投与部位から吸収され全身循環血中に到達し、様々な組織に分布し、代謝酵素により代謝され、または代謝されず未変化体として尿または胆汁中に排泄され体内から消失する。これら一連の体内での薬物の動きを薬物動態と呼ぶ。薬物動態は作用部位近傍における薬物濃度を支配しているため、薬物の有効性および安全性と密接に関係している。従って、非臨床試験（動物）から臨床試験（ヒト）を予見するためには、動物における薬物動態と有効性および安全性との関係を詳細に解析するとともに、ヒトの薬物動態を予測することが不可欠となる。

薬物治療において経口投与はその利便性から臨床で最も用いられている投与経路であり、製薬企業ではバイオ医薬品などの例を除けば、ほとんどのケースで経口剤を第一選択として医薬品開発が行われている。経口投与された薬物が全身循環血中に到達するまでの過程を Figure 1 に示す。経口

投与された薬物は、腸管管腔から腸管上皮細胞へ吸収され、腸管上皮細胞での代謝を回避し門脈血中に到達し、肝臓での代謝および胆汁中への排泄を回避して全身循環血に到達する。投与された薬物量の内、全身循環血中に到達できる薬物の割合のことを絶対的バイオアベイラビリティ (F) と呼び、経口投与時の F は腸管吸収率 (Fa)、腸管上皮細胞での代謝回避率 (Fg)、肝臓での代謝および胆汁排泄回避率 (Fh) の積として表すことができる (式 1)。

$$F = Fa \cdot Fg \cdot Fh \quad (\text{式 1})$$

一方、薬物を静脈内投与した場合は、投与量のすべてが全身循環血中に到達することができる。従って経口投与時の F は、投与量で規格化した静脈内投与時の AUC (AUCiv) と経口投与時の AUC (AUCpo) の比としても表すことができる (式 2)。

$$F = AUC_{po}/AUC_{iv} \quad (\text{式 2})$$

F が低い場合、薬効発現に必要な投与量が多くなり、患者さんの服薬コンプライアンスの低下を招く一因となる。また、血中薬物濃度が個体間でばらつきやすい傾向にあるため (Hellriegel et al., 1996)、有効性および安全性に大きな個体差をもたらす可能性が高まる。さらに、F が低い原因が Fh にある場合、すなわち肝臓で速やかに代謝もしくは排泄される場合は、全身循環血中からの薬物の消失が早く、結果として有効性を持続させるために頻回投与が必要となる可能性も高まる。従って一般的には、ヒトにおいて良好な F が期待できる化合物を創製し医薬品候補化合物として選択する

ことが望ましく、ヒトの薬物動態を予測する上で経口投与時の F を予測することは重要な検討項目の 1 つとなっている。

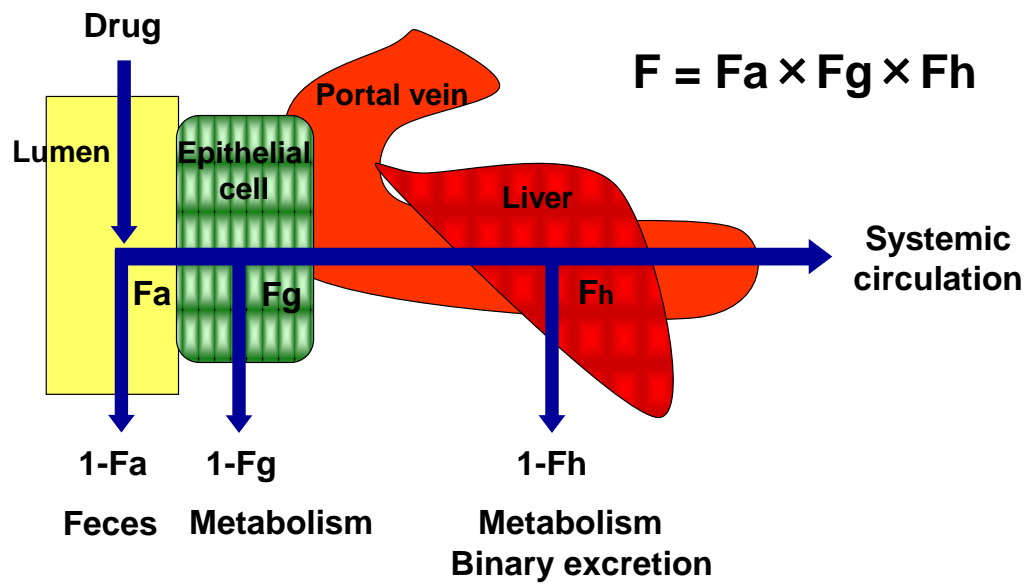


Figure 1. Bioavailability of an orally administered drug.

F; oral bioavailability, F_a ; net fraction of dose absorbed, F_g ; intestinal availability, and F_h ; hepatic availability.

医薬品開発の非臨床段階では、マウス、ラットなどのげっ歯類や、イヌ、サルなどの大動物を用いて化合物の薬物動態評価が行われるが、経口投与時の F には大きな種差があることが報告されており、動物の F からヒトの F を予測することは困難と考えられている (Musther et al., 2014, Grass and Sinko, 2002)。

一方、F の種差の原因が Fa、Fg および Fh のどこにあるのかを明らかにすることはヒトの F を予測する上で重要であり、動物のデータをヒトの F の予測に活用できる場合もある。例えば、腸管吸収に関しては、ラットとヒトの間に良好な相関があることが報告されており、ラットの Fa からヒトの Fa の予測が可能であると考えられている (Chiou and Barve, 1998, Zhao et al., 2003)。一方、イヌにおいては、腸管上皮細胞の細胞間隙経路を介した吸収がヒトに比べて高く、イヌの Fa はヒトの Fa を過大評価する傾向があることが報告されている (He et al., 1998, Chiou et al., 2000)。また、サルにおいてもラットと同様にヒトの Fa と良好に相関するという報告があるが (Chiou and Buehler, 2002)、一方で、サルの腸管上皮細胞膜に発現する P-gp や BCRP 等の排泄トランスポーターの発現量はヒトに比べて著しく高く、これらのトランスポーターの基質となる薬物においては、サルの Fa はヒトに比べて著しく低いという報告もある (Akabane et al., 2010, Takahashi et al., 2009, Takahashi et al., 2008)。

また、肝抽出率 (Eh) に関しても種差の検討が報告されている。Eh とは、薬物が肝臓を 1 回通過する際に代謝または胆汁排泄により消失する割合のことを示し、式 3 で表される。

$$Eh = CLh/Qh \quad (\text{式 3})$$

CLh および Qh はそれぞれ肝クリアランスと生理学的パラメーターである肝血流速度である。Fh は肝臓での代謝および胆汁排泄回避率であるため、Fh と Eh は式 4 の関係にある。

$$Fh = 1 - Eh \quad (\text{式 4})$$

多くの化合物を用いて動物とヒトの Eh の相関について検討がなされているが、明確な相関は認めらず動物の Fh からヒトの Fh を予測することは困難と考えられている (Ward and Smith, 2004)。

一方、肝臓での薬物代謝の予測には生理学的モデルとクリアランスコンセプトに基づいたアプローチ (*in vitro-in vivo* extrapolation) が有用であることが数多く報告されている (Naritomi et al., 2001, Naritomi et al., 2003, Iwatsubo et al., 1996, Iwatsubo et al., 1997a, Iwatsubo et al., 1997b, Iwatsubo et al., 1997c, Shibata et al., 2002, Chiba et al., 2009, Rane et al., 1977, Lin et al., 1982, Roberts and Rowland, 1986, Wilkinson, 1987)。すなわち、肝ミクロソームや肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験で得られる代謝パラメーター、化合物の血漿タンパク結合率および血球移行率、さらには生理学的パラメーターである肝血流速度から、well-stirred model、parallel-tube model、dispersion model などの数理モデルを用いて理論的にヒトの CLh および Fh を予測する方法である。この方法は主に P450 (CYP) によって代謝される化合物の予測に有用であると考えられている。また近年、肝臓の約 80% がヒトの肝細胞に置換されたヒト肝キメラマウス (Tateno et al., 2004) を用いたヒトの薬物動態予測研究も行われており、ヒト肝キメラマウスは CYP の基質化合物に限らず、グルクロン酸抱合転移酵素 (UGT)、硫酸抱合転移酵素 (SULT)、アルデヒドオキシダーゼ (AO) の基質化合物の CLh および Fh の

予測にも有用であることが報告されている (Sanoh et al., 2012a, Sanoh et al., 2012b, Sanoh et al., 2012c)。

このように、薬物の腸管吸収や肝代謝に関しては、ヒトと動物の種差の検討やヒトの生体試料と数理モデルを用いた予測方法の確立、さらにはヒト化動物の活用など、これまでに多くの研究がなされ、これらの研究成果を実際の創薬の現場で化合物の特性に応じて上手く活用することで、経験的または理論的に医薬品候補化合物のヒトの **Fa** および **Fh** の予測が可能となっている。

ヒトの腸管上皮細胞には肝臓と同様に多くの代謝酵素が存在しており、その中でも **CYP3A** は腸管上皮細胞に存在する **CYP** の約 80% を占める主要な代謝酵素である (Paine et al., 2006)。全身循環血中に取り込まれた薬物は主に代謝酵素によって代謝される、もしくは未変化体として胆汁または尿中に排泄され体内から消失するが、200 種類の薬物のヒトの薬物動態を調査した報告によれば、主消失経路が代謝である割合は全体の約 75% を占め、その内、関与する主要な代謝酵素が **CYP3A** である割合は約 35% を占めた (Wienkers and Heath, 2005)。つまり、全体の約 25% の薬物が主に **CYP3A** によって代謝されることにより体内から消失しているものと考えられた。先に述べたように **CYP3A** は腸管上皮細胞に存在する主要な代謝酵素でもある。従って、約 25% の薬物は肝臓だけでなく腸管上皮細胞の **CYP3A** によっても代謝される可能性があり、これは決して少ない割合ではない。また、**CYP3A** 基質薬物の中にはヒトの **Fg** の値が **Fh** の値と同等もしくはそれ以下と推定されるものが多数存在しており、腸管代謝の **F** に与える影響は決して無視できない (Wu et al., 1995, Thummel et al., 1996, Floren et al., 1997, Masica et al., 2004)。しかしながら、腸管代謝に関しては、サルはヒトに比べて代謝活性が高く **CYP3A** 基質薬物のサルの **Fg** はヒトに比べ低い著しく

低い値を示すことが報告されているが (Akabane et al., 2010, Sakuda et al., 2006)、非臨床試験で使用するその他の動物とヒトの種差に関する情報の蓄積は不十分であり、経験的に動物の Fg をヒトの Fg の指標にすることができない。また、腸管での吸収と代謝の各過程を詳細に記述した生理学的モデルが既に構築されているが (Ito et al., 1999)、この精緻なモデルの記述に必要な全てのパラメーターを実験から正確に算出することは困難であるため、実際の創薬の現場で予測のために活用することはできない。

筆者は、創薬の非臨床段階で実用可能なヒト腸管薬物代謝の予測法の開発を目的として、経験的アプローチおよび理論的アプローチの両面から検討を行った。第一章では、創薬の初期段階から汎用される動物であるラットに着目し、経験的アプローチとしてラットを用いたヒトの Fg の予測性について検証した。第二章では、腸管の生理学的モデル (Ito et al., 1999) に着目し、創薬の実情を考慮してこのモデルを創薬の現場で実用可能な形に簡素化した *simplified intestinal availability model* (SIA モデル) を考案し、理論的アプローチとして SIA モデルを用いたヒトの Fg の予測法の構築を検討した。また、肝臓は多くの医薬品にとって主要な代謝消失臓器であることから、創薬の初期段階から多くの化合物についてヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝安定性評価が実施されている。そこで、ヒト肝ミクロソームでの代謝安定性が腸管代謝の受け易さを早期に判断する上で有用な指標になるか否かについても検討を行った。これらの検討結果について以下、順に述べる。

第一章

ラットを用いたヒト腸管薬物代謝の予測

第一節 背景

ラット、マウスなどのげっ歯類は小動物であることから少量の化合物量で動物実験の実施が可能であり、創薬の初期段階から合成された多くの化合物の動物実験に汎用されている。その中でもラットは腸管吸収に関してヒトとの類似性が高く、ヒトの Fa の予測に適した動物であると考えられている (Chiou and Barve, 1998, Zhao et al., 2003)。一方で、CYP3A の基質化合物の腸管代謝に関してはラットとヒトの類似性を検討した報告は少なく、ラットがヒトの Fg の予測に適した動物であるかは不明である。そこで第一章では、ラットを用いたヒトの Fg の予測性について検討した。検討には CYP3A の基質であり Fa が良好と考えられる 9 種の化合物を使用した。ラットの FaFg を門脈血および全身循環血同時採取法 (P-S difference 法) (Tabata et al., 1995, Fujieda et al., 1996, Hoffman et al., 1995) により算出し、ヒトの FaFg については、静脈内投与 (iv) および経口投与 (po) 投与時の薬物動態パラメーターを文献調査し indirect 法により算出した。検討に使用した薬物はいずれも高い Fa を示すことが予想されることから、ラットとヒトの FaFg の値はいずれも Fg と等しいと仮定し、ラットとヒトの Fg の比較を実施した。本章では上記の検討によって得られた知見について論述する。

第二節 実験項

1) モデル化合物の選択

CYP3A の基質でありヒトに iv および po 投与後の薬物動態パラメーターが文献情報より入手可能である 9 種の化合物を使用した (Figure 2)。

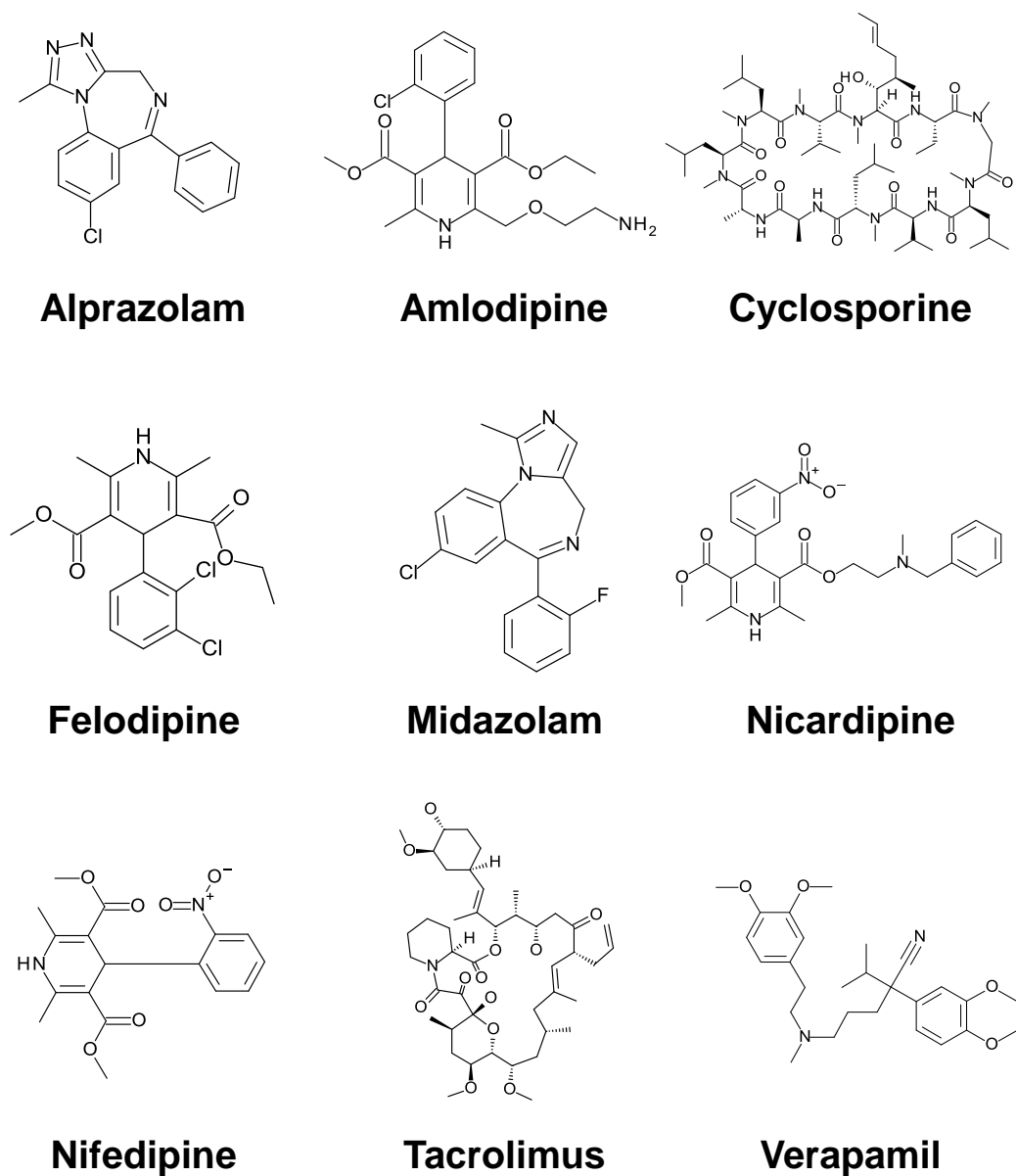


Figure 2. Chemical structures of the 9 model compounds used for correlation study of Fg between rats and humans.

2) 試薬

Acyclovir、alprazolam、amlodipine、amphotericin B、atenolol、caffeine、cyclosporine A、diazepam、hydrochlorothiazide、nicardipine および nifedipine は和光純薬工業より購入したものを使用した。Tacrolimus はアステラス製薬により合成されたものを使用した。Dormicam (5 mg/mL ミダゾラム注射溶液) および Prograf (5 mg/mL タクロリムス注射溶液) はアステラス製薬より提供されたものを使用した。Sandimmun (50 mg/mL サイクロスポリン注射溶液) はノバルティス製薬より購入したものを使用した。Acetaminophen、alprenolol、antipyrine、carbamazepine、diclofenac、felodipine、furosemide、indomethacin、ketoprofen、ketorolac、metoprolol、nadolol、naproxen、piroxicam、prednisone、propranolol、ranitidine、sulpiride、terbutaline、theophylline、verapamil および warfarin は Sigma-Aldrich より購入したものを使用した。その他の試薬は試薬特級または分析用のグレードを購入し使用した。

3) 動物

雄性 SD ラット (8 週令、体重約 250 g) は日本チャールズリバーより購入した。動物実験は、国際医学団体協議会によって策定された「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」に従いアステラス製薬の動物実験倫理委員会の承認を受けて、アテラスリサーチテクノロジーにて実施した。

4) ラットにおける門脈血および全身循環血同時採血

試験に用いるラットは投与前 17 時間絶食し、各化合物の溶液を 1 mg/5 mL/kg で経口投与した。投与後、ヘパリン存在下で門脈および腹部大動脈の血液を群採血により同時採取した (n=3-6)。各化合物の投与液の組成は Table 1 に示す。Cyclosporine および tacrolimus に関しては、血液サンプル

は採取後速やかに氷冷し、LC-MS/MS 分析まで-20 °C で保存した。その他の化合物に関しては、血液サンプルは採取後速やかに氷冷し、16,000 g、4 °C で 2 分遠心分離して血漿サンプルを得た。血漿サンプルは LC-MS/MS 分析まで-20 °C で保存した。

Table 1. Dosing vehicle used for P-S difference method in rats.

Compound	Vehicle
Alprazolam	20% Propylene glycol
Amlodipine	20% Propylene glycol
Cyclosporine	Distilled water ^a
Felodipine	40% Propylene glycol
Midazolam	Distilled water ^b
Nicardipine	20% Propylene glycol
Nifedipine	50% Polyethylene glycol
Tacrolimus	Distilled water ^c
Verapamil	Distilled water

^a Sandimmun (50 mg/mL of cyclosporine solution for i.v. injection) was diluted with distilled water.

^b Dormicam (5 mg/mL of midazolam solution for i.v. injection) was diluted with distilled water.

^c Prograf (5 mg/mL of tacrolimus solution for i.v. injection) was diluted with distilled water.

5) 血漿または血液中濃度測定

Cyclosporine の濃度測定用サンプルは、血液 50 μ L、50%メタノール 50 μ L、IS 溶液 (アステラス製薬の cyclosporine 類縁化合物を 100 ng/mL 含む 50%メタノール) 50 μ L、蒸留水 500 μ L を混合し、*tert*-ブチルメチルエーテル 4 mL を添加して混合した。有機層を分取して窒素気流下 40 $^{\circ}$ C で溶媒を留去した後、残渣を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム: アセトニトリル=1:1 (v/v) の溶液 200 μ L に溶解し LC-MS/MS 分析の測定サンプルとした。

Tacrolimus の濃度測定用サンプルは、血液 100 μ L、50%メタノール 50 μ L、IS 溶液 (100 ng/mL diazepam を含む 50%メタノール) 100 μ L、10 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH7.5) 500 μ L を混合し、*tert*-ブチルメチルエーテル 4 mL を添加して混合した。有機層を分取して窒素気流下 40 $^{\circ}$ C で溶媒を留去した後、残渣を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム: アセトニトリル=1:1 (v/v) の溶液 200 μ L に溶解し LC-MS/MS 分析の測定サンプルとした。その他の化合物の濃度測定用サンプルは、血漿 30 μ L、50%アセトニトリル 30 μ L および IS 溶液 (100 ng/mL diazepam と 0.1 %ギ酸を含むアセトニトリル) 150 μ L を混合した後、16,000 g、4 $^{\circ}$ C で 5 分遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS 分析の測定サンプルとした。

6) ラットにおける血球移行率 (Rb) の測定

Cyclosporine および tacrolimus 以外の化合物に関しては、血漿中濃度を測定した。そのため、これらの化合物の血液中濃度を推定するために Rb 値の測定を実施した。ヘパリン存在下で採取したラットのブランク血液に、5 μ g/mL 化合物を含む 50%アセトニトリル溶液を化合物濃度が 1 μ g/mL となるように添加した後、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。その後、一部の血液サンプルは 37 $^{\circ}$ C、1,800 g で 10 分間遠心して血漿サンプルを得た。

血液または血漿サンプルを 0.25 mL 分取して IS 溶液 (100 ng/mL diazepam と 0.1 %ギ酸を含むアセトニトリル) 800 μ L を混合した後、16,000 g、4 $^{\circ}$ C で 5 分遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS 分析した。各化合物の Rb は式 5 により算出した (n=3)。

$$Rb = \text{血液中濃度} / \text{血漿中濃度} \quad (\text{式 5})$$

7) LC-MS/MS 分析条件

評価化合物の濃度測定は API-4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems 製) と Acquity UPLC (Waters 製) で構成された LC-MS/MS システムを用いた。MS/MS 分析は ESI ポジティブモードでイオン化し、MRM 条件でイオンを検出した。各化合物のモニターイオンは Table 2 に示した。HPLC による分離は、分析カラムに XBridge C18 Intelligent Speed Column (130Å, 2.5 μ m, 2.1 mm \times 20 mm, Waters 製) を用い、カラム温度 50 $^{\circ}$ C、流速 0.4 mL/min とした。Cyclosporine および tacrolimus 以外の化合物に関しては、移動相に A 液 (0.1%ギ酸-10%アセトニトリル水溶液) と B 液 (0.1%ギ酸-90%アセトニトリル水溶液) を用いて以下の線形グラジエントの条件にて測定した。括弧内の数値は%B を示す。0 min (10)、0.5 min (10)、1 min (90)、1.8 min (90)、1.81 min (10)、2.5 min (10)。Cyclosporine および tacrolimus に関しては、移動相に A 液 (20 mmol/L 酢酸アンモニウム-10%アセトニトリル水溶液) と B 液 (20 mmol/L 酢酸アンモニウム-90%アセトニトリル水溶液) を用いて以下の線形グラジエントの条件にて測定した。括弧内の数値は%B を示す。0 min (10)、0.5 min (10)、1 min (90)、2 min (90)、2.01 min (10)、2.7 min (10)。

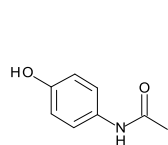
Table 2. Monitoring ion in LC-MS/MS analysis for the 9 model compounds.

Compound	Monitoring ion
	precursor > product
Alprazolam	309.6 > 281.5
Amlodipine	409.7 > 237.4
Cyclosporine	1220.0 > 1202.8
Felodipine	384.1 > 337.8
Midazolam	326.6 > 291.1
Nicardipine	480.3 > 315.0
Nifedipine	347.0 > 315.0
Tacrolimus	821.7 > 768.4
Verapamil	455.4 > 165.1

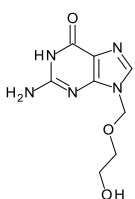
8) 人工膜を用いた膜透過性評価

FaFg の値から Fg を見積もる目的でモデル化合物の膜透過性を人工膜透過性評価 (PAMPA)を用いて行った。PAMPA は、PAMPA Evolution (pION 製)を用いて、pION のプロトコールに従って実施した。すなわち、96 well マイクロタイタープレート (pION 製) と 96well フィルタープレート (polyvinylidene difluoride, ミリポア製) とで構成され、20% (w/v) ドデカン溶液-レシチン混合液をコートした 125 μm 厚マイクロフィルターディスク (0.45 μm pores, pION 製) を挟んだサンドイッチプレートを用いた。評価化合物の 10 mmol/L DMSO 溶液 0.005 mL を pH6.5 の緩衝液 (pION 製) で希釈して 50 μM にして、ドナー側に添加した。アクセプター側には pH7.4 の緩衝液 (pION 製) を添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした後、ドナー側とアクセプター側のサンプルの UV スペクトル (270-400 nm) を測定した。膜透過係数 (P_{app}) は PAMPA Evolution 付属のソフトウェア (pION 製) を用いて算出した。

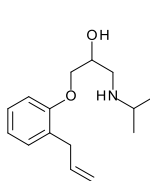
ヒトの Fa が既知の 25 種類の化合物 (Zhu et al., 2002) (Figure 3) を用いて PAMPA により算出した P_{app} と Fa の相関を検討し、得られた相関から本検討で用いたモデル化合物のヒトの Fa を予測した。



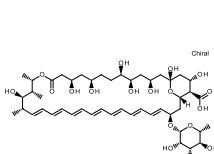
Acetaminophen



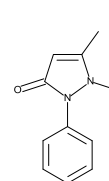
Acyclovir



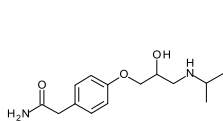
Alprenolol



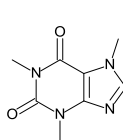
Amphotericin B



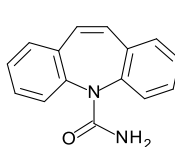
Antipyrine



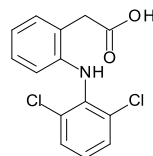
Atenolol



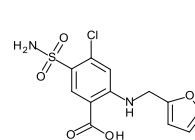
Caffeine



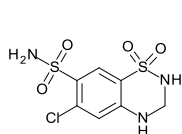
Carbamazepine



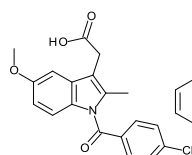
Diclofenac



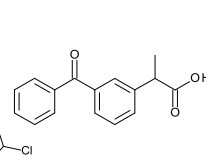
Furosemide



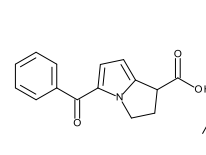
Hydrochlorothiazide



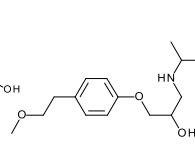
Indomethacin



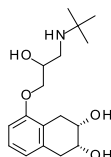
Ketoprofen



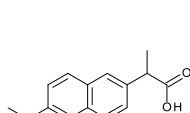
Ketorolac



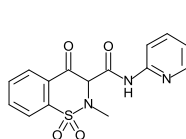
Metoprolol



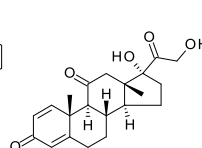
Nadolol



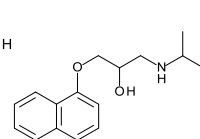
Naproxen



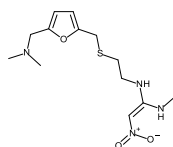
Piroxicam



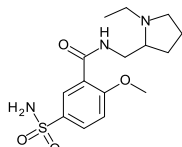
Prednisone



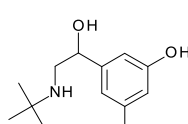
Propranolol



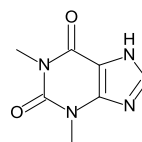
Ranitidine



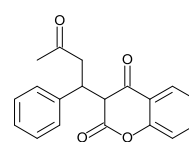
Sulpiride



Terbutaline



Theophylline



Warfarin

Figure 3. Chemical structures of the 25 reference compounds used for correlation study between human Fa and permeability in PAMPA.

9) ラットにおける FaFg の算出

門脈血中の薬物量は、経口投与により腸管から吸収され腸管上皮細胞での代謝を回避し門脈血中に流入する薬物量 (投与量×FaFg) と、全身循環血中から門脈血中に流入する薬物量の総和となる。従って、門脈血中薬物量から全身循環血中薬物量を差し引くことにより FaFg の算出が可能となる。本検討では、門脈血および全身循環血同時採血法 (P-S difference 法) により得られた薬物動態パラメーターを用いてラットの FaFg を算出した。Cyclosporine および tacrolimus に関しては血液中濃度を定量しているため式 6 を用い、それ以外の化合物については血漿中濃度を定量しているため式 7 を用い、それぞれの FaFg の算出を行った。

$$\text{FaFg} = \text{Qpv} \times (\text{AUCpv} - \text{AUCsys}) / \text{Dose} \quad (\text{式 6})$$

$$\text{FaFg} = \text{Qpv} \times \text{Rb} \times (\text{AUCpv} - \text{AUCsys}) / \text{Dose} \quad (\text{式 7})$$

Qpv はラット門脈血流量、AUCpv は門脈血漿または門脈血液中の AUC、AUCsys は全身循環血漿または全身循環血液中の AUC、Dose は投与量を示す。AUCpv および AUCsys は台形法により算出した。Qpv の値は文献報告値の幅を考慮し、39.2 mL/min/kg と 53.2 mL/min/kg の 2 種の値を用いた (Davies and Morris, 1993, Fujieda et al., 1996)。

10) ヒトにおける FaFg の算出

文献により得られた静脈内投与および経口投与後の薬物動態パラメーターを用い、全身クリアランスは肝クリアランスと等しいと仮定して indirect 法 (式 8-11) によりヒトの FaFg を算出した。

$$CL_{tot, blood} = CL_{tot, plasma}/R_b \quad (\text{式 8})$$

$$CL_h = CL_{tot, blood} \quad (\text{式 9})$$

$$F_h = 1 - CL_h/Q_h \quad (\text{式 10})$$

$$FaF_g = F/F_h \quad (\text{式 11})$$

$CL_{tot, blood}$ は血液ベースの全身クリアランス、 $CL_{tot, plasma}$ は血漿ベースの全身クリアランスを示す。ヒトの肝血流量 (Q_h) の値は文献報告値の幅を考慮し、17.1 mL/min/kg、20.7 mL/min/kg および 25.5 mL/min/kg の3種の値を用いた (Davies and Morris, 1993, Kato et al., 2003)。 $FaF_g > 1$ と算出された場合は、 $FaF_g = 1$ として解析した。

第三節 結果

1) PAMPA によるモデル化合物の Fa 予測

まず、ヒトの Fa が既知の 25 種類の化合物 (Zhu et al., 2002) を用いて PAMPA による Papp と Fa の相関を検討した。その結果、Papp の値が 1.0×10^{-6} cm/sec 以上の場合、ヒトの Fa は 0.8 (腸管吸収率 80%) 以上の高い値が期待できると考えられた (Table 3, Figure 4)。次に、本検討に用いたモデル化合物の Papp の値を評価した結果、いずれの化合物も Papp の値は 1.0×10^{-6} cm/sec 以上の高い値を示した。従って、モデル化合物のヒトの Fa は 0.8 以上の高い値が期待できると考えられた (Table 3)。また、ヒトとラットの Fa には良好な相関があることが報告されているため (Chiou and Barve, 1998, Zhao et al., 2003)、ラットにおいてもヒトと同様に高い Fa が期待できると考えられた。以上のことから、これらのモデル化合物のヒトおよびラットの FaFg の値は Fg の値に等しいと仮定でき、ラットとヒトの FaFg の比較から両種間の Fg の比較が可能であると判断した。

Table 3. Permeability in PAMPA and human Fa.

Reference Compounds	Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)	Fa	Model Compounds	Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)
Acetaminophen	2.8	0.8	Alprazolam	7.0
Acyclovir	0.0	0.21	Amlodipine	19.5
Alprenolol	37.2	0.94	Cyclosporine	15.9
Amphotericin B	0.0	0.05	Felodipine	9.9
Antipyrine	2.6	1	Midazolam	30.8
Atenolol	0.1	0.52	Nicardipine	31.5
Caffeine	2.0	1	Nifedipine	13.4
Carbamazepine	27.7	1	Tacrolimus	34.3
Diclofenac	32.9	1	Verapamil	35.8
Furosemide	0.2	0.6		
Hydrochlorothiazide	0.1	0.7		
Indomethacin	22.4	1		
Ketoprofen	12.7	1		
Ketorolac	4.0	1		
Metoprolol	11.3	0.95		
Nadolol	0.0	0.32		
Naproxen	11.1	0.98		
Piroxicam	16.1	1		
Prednisone	14.3	0.99		
Propranolol	37.4	0.93		
Ranitidine	0.1	0.55		
Sulpiride	0.0	0.36		
Terbutaline	0.7	0.68		
Theophylline	1.8	0.97		
Warfarin	12.9	0.97		

Fa values were quoted from Zhu et al., 2002.

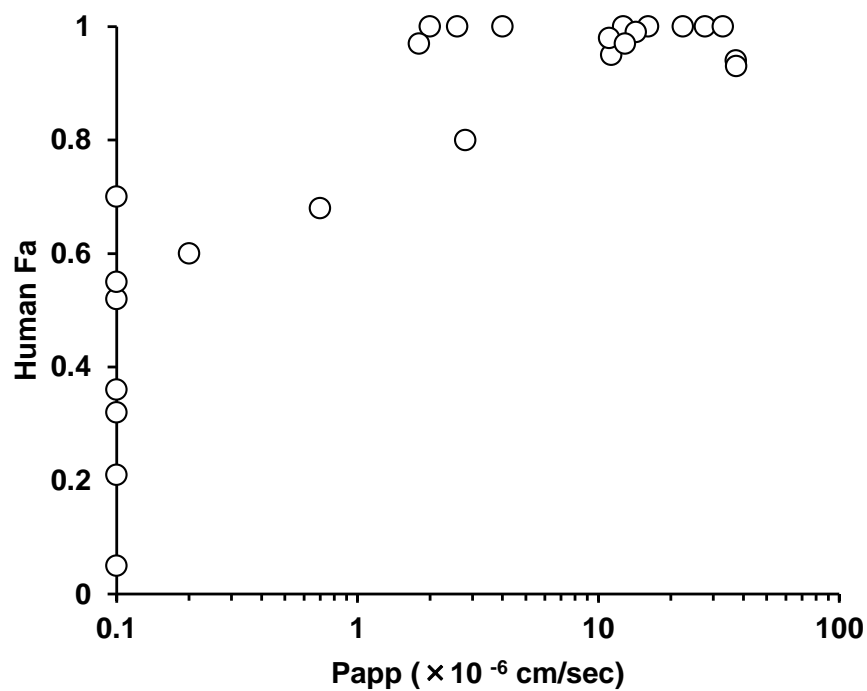


Figure 4. Correlation between Fa in humans and permeability in PAMPA of 25 reference compounds. Papp <0.1×10⁻⁶ cm/sec was plotted as 0.1×10⁻⁶ cm/sec. Fa values were quoted from Zhu et al., 2002.

2) P-S difference 法を用いたラット FaFg の算出

Figure 5-9 および Table 4 に P-S difference 法により得られたラットの血漿（血液）中濃度推移および FaFg の値を示す。血漿（血液）中濃度推移および算出された FaFg の値は化合物によって大きく異なる結果を示した。特に Nicardipine および tacrolimus に関しては、FaFg の値はそれぞれ 0.027 – 0.037 および 0.181 – 0.245 と非常に低い値を示し、両化合物ともラットの腸管で著しく代謝されるものと考えられた。一方で amlodipine に関しては、FaFg は 0.767 – 1.041 と高い値を示し、ラットの腸管では殆ど代謝されないものと考えられた。

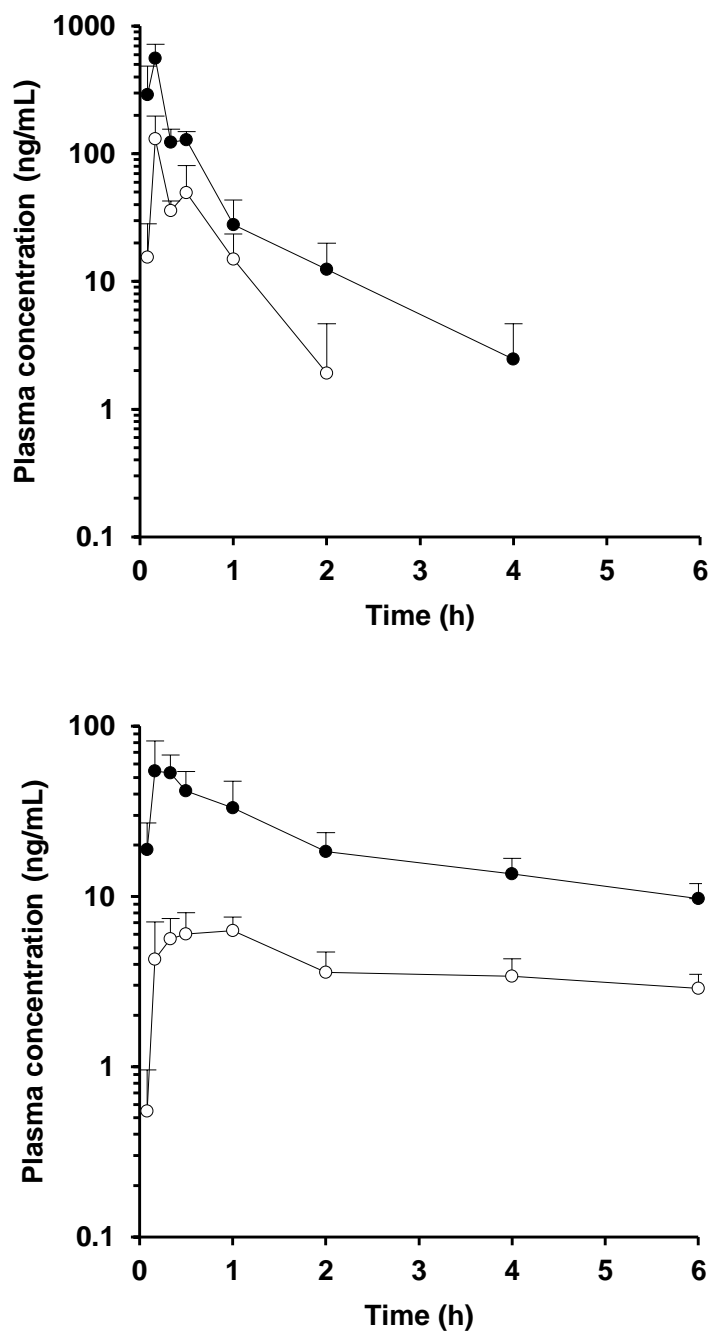


Figure 5. Plasma concentration-time profiles in the portal vein (●) and systemic circulation (○) of alprazolam (upper) and amlodipine (lower) after oral administration in rats at a dose of 1 mg/kg. Each value presents the mean + S.D.

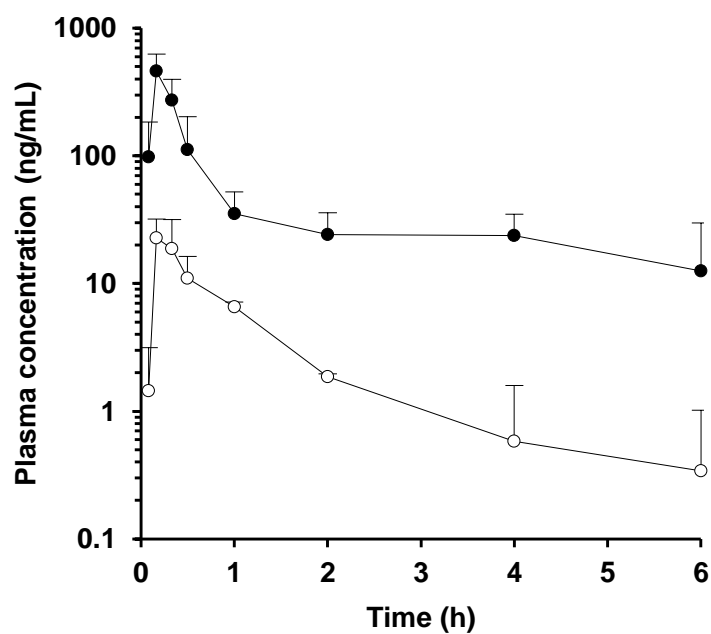
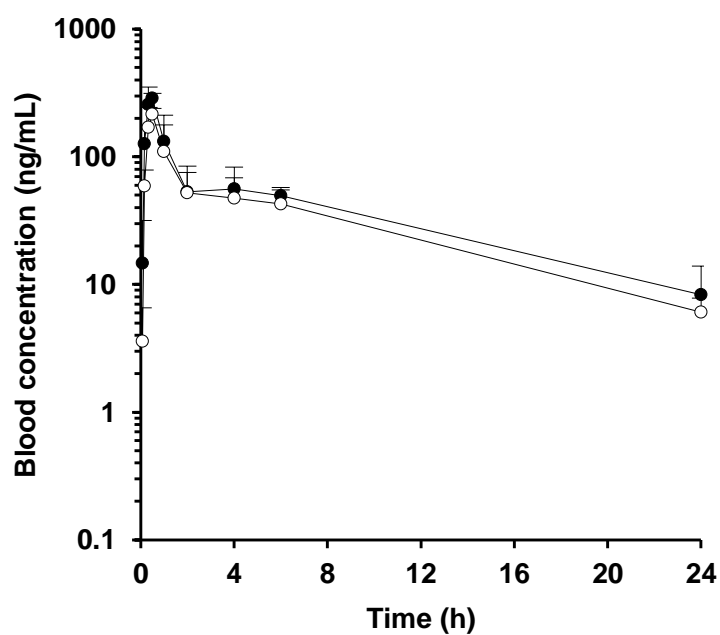


Figure 6. Plasma or blood concentration-time profiles in the portal vein (●) and systemic circulation (○) of cyclosporine (upper) and felodipine (lower) after oral administration in rats at a dose of 1 mg/kg. Each value presents the mean + S.D.

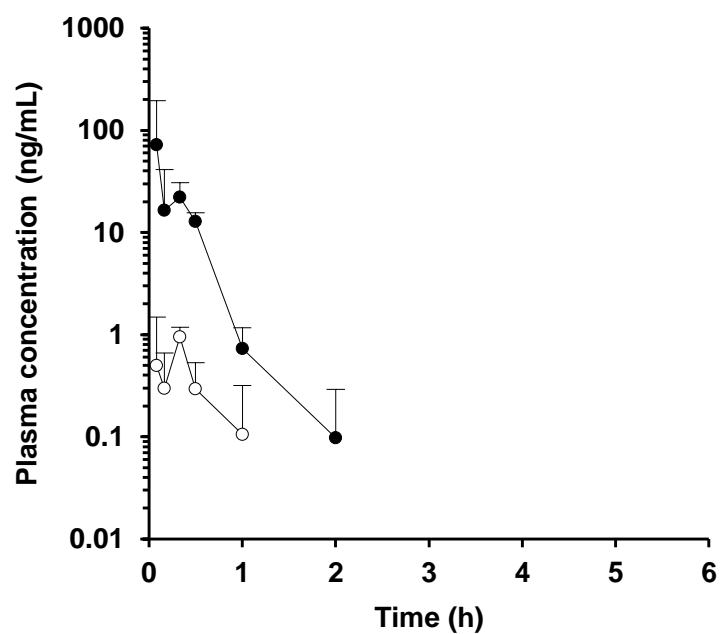
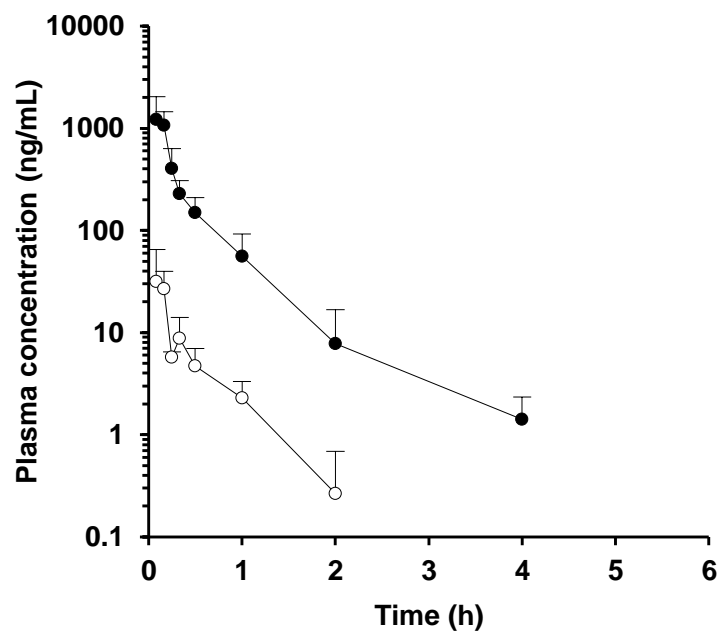


Figure 7. Plasma concentration-time profiles in the portal vein (●) and systemic circulation (○) of midazolam (upper) and nicardipine (lower) after oral administration in rats at a dose of 1 mg/kg. Each value presents the mean + S.D.

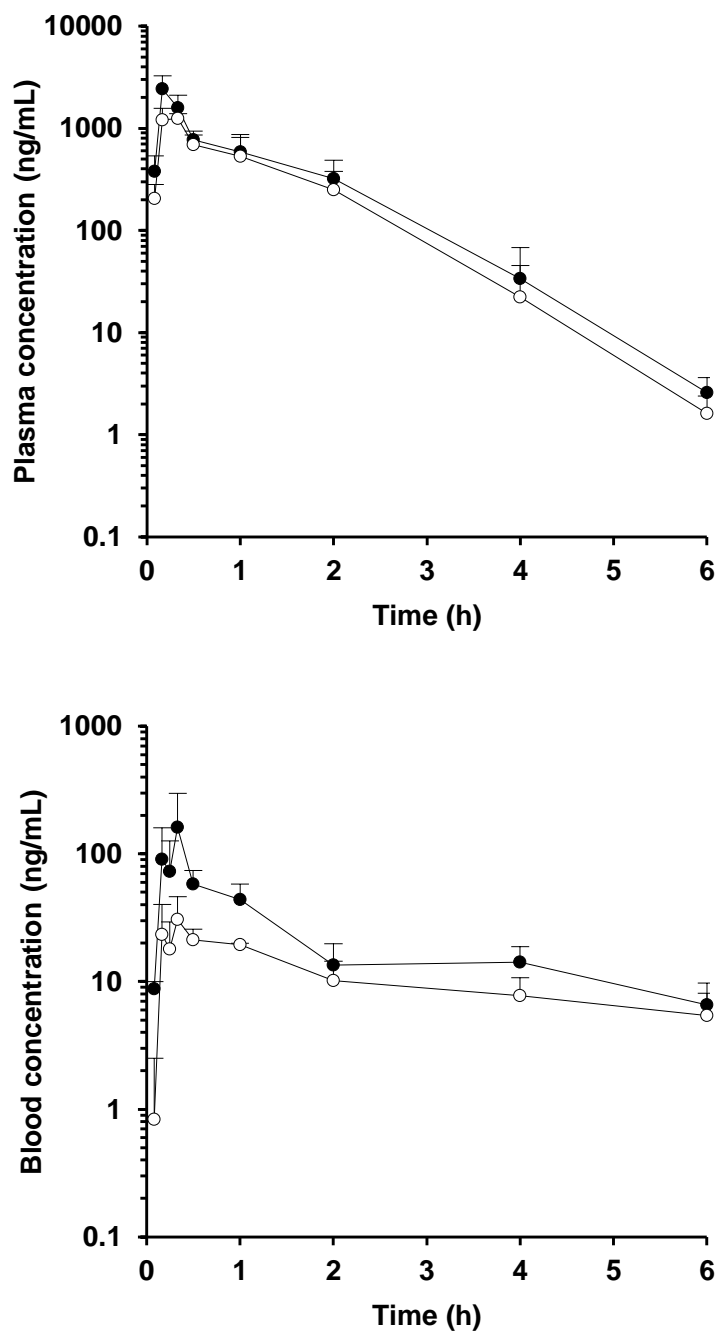


Figure 8. Plasma or blood concentration-time profiles in the portal vein (●) and systemic circulation (○) of nifedipine (upper) and tacrolimus (lower) after oral administration in rats at a dose of 1 mg/kg. Each value presents the mean + S.D.

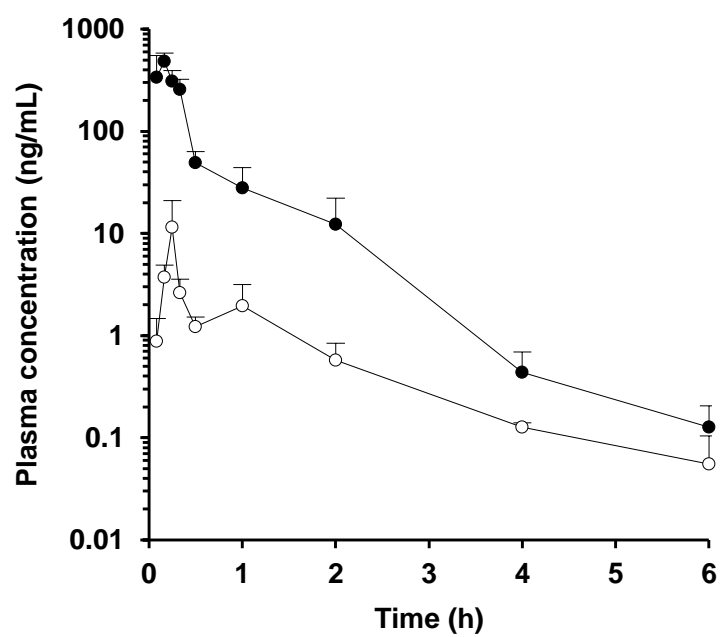


Figure 9. Plasma concentration-time profiles in the portal vein (●) and systemic circulation (○) of verapamil after oral administration in rats at a dose of 1 mg/kg. Each value presents the mean + S.D.

Table 4. *In vivo* pharmacokinetic parameters obtained from P-S difference method in rats.

Compound	AUC _{pv}	AUC _{sys}	R _b	Q _{pv} : 39.2	Q _{pv} : 53.2
	(ng·h/mL)	(ng·h/mL)		mL/min/kg	mL/min/kg
				FaFg	FaFg
Alprazolam	200	52.6	1.07	0.371	0.503
Amlodipine	121	23.4	3.36	0.767	1.041
Cyclosporine	1018 ^a	846 ^a	-	0.405	0.550
Felodipine	272	19.0	0.70	0.416	0.564
Midazolam	359	9.88	0.66	0.542	0.736
Nicardipine	16.7	0.414	0.70	0.027	0.037
Nifedipine	1848	1423	0.59 ^b	0.590	0.801
Tacrolimus	142 ^a	65.2 ^a	-	0.181	0.245
Verapamil	183	4.71	0.82 ^c	0.344	0.466

^a Blood-based value.

^b Grundy et al., 1997.

^c Robinson and Mehvar, 1996.

3) Indirect 法を用いたヒト FaFg の算出

Table 5 および 6 に indirect 法により算出されたヒトの FaFg の値を示す。ラットと同様に、FaFg の値は化合物によって大きく異なる結果が得られた。Nicardipine および tacrolimus に関しては、FaFg がそれぞれ 0.106 - 0.154 および 0.185 - 0.1885 と非常に小さい値を示し、ヒトの腸管で著しく代謝されるものと考えられた。一方、alprazolam および amlodipine に関しては、FaFg がそれぞれ 0.914 - 0.932 および 0.882 - 1.084 と高い値を示し、これらの化合物に関してはヒトの腸管で殆ど代謝されないものと考えられた。また、felodipine、nicardipine および tacrolimus においては、FaFg の値が Fh に比べ著しく小さく、これらの 3 化合物に関しては、腸管代謝が肝代謝よりも F に大きな影響を与えているものと考えられた。

Table 5. *In vivo* pharmacokinetic parameters in humans.

	CL _{tot,plasma} (mL/min/kg)	R _b	CL _h (mL/min/kg)	Reference
Alprazolam	0.74	0.78 ^a	0.95	Smith et al., 1984.
Amlodipine	7.00	1.00 ^b	7.00	Faulkner et al., 1986.
Cyclosporine	-	-	6.60	Gupta et al., 1990.
Felodipine	12.00	1.45 ^c	8.23	Hardman JG, 1996.
Midazolam	5.77	0.53 ^a	10.89	Kupferschmidt et al., 1995, Thummel et al., 1996, Tsunoda et al., 1999.
Nicardipine	7.00	0.71 ^c	9.86	Higuchi and Shiobara, 1980.
Nifedipine	8.22	0.74 ^d	11.11	Holtbecker et al., 1996.
Tacrolimus	-	-	0.70	Floren et al., 1997, Moller et al., 1999.
Verapamil	12.15	0.77 ^a	15.78	McAllister and Kirsten, 1982, Eichelbaum et al., 1984.

^a Quoted from Obach, 1999.

^b Assumed value.

^c Quoted from Hardman JG, 1999.

^d Quoted from Holtbecker et al., 1996.

Table 6. *In vivo* pharmacokinetic parameters in humans (Continued).

	F	Qh: 17.1		Qh: 20.7		Qh: 25.5	
		mL/min/kg		mL/min/kg		mL/min/kg	
		Fh	FaFg	Fh	FaFg	Fh	FaFg
Alprazolam	0.880	0.945	0.932	0.954	0.922	0.963	0.914
Amlodipine	0.640	0.591	1.084	0.662	0.967	0.725	0.882
Cyclosporine	0.420	0.614	0.684	0.681	0.617	0.741	0.567
Felodipine	0.150	0.516	0.291	0.600	0.250	0.675	0.222
Midazolam	0.276	0.363	0.760	0.474	0.582	0.573	0.482
Nicardipine	0.065	0.423	0.154	0.524	0.124	0.613	0.106
Nifedipine	0.412	0.350	1.176	0.463	0.889	0.564	0.730
Tacrolimus	0.180	0.959	0.188	0.966	0.186	0.973	0.185
Verapamil	0.194	0.077	2.512	0.238	0.816	0.381	0.509

4) ラットとヒトの Fg の比較

PAMPA を用いた膜透過性評価の結果から、検討に用いたモデル化合物のラットおよびヒト Fa はいずれも良好であることが期待できることから、 $FaFg=Fg$ と仮定しラットとヒトの Fg 比較のプロットを行った (Figure 10)。その結果、Fg の種差は 9 化合物中 7 化合物が ± 2 倍の範囲に収まり、ラットとヒトの Fg には相関が認められた ($R^2=0.566$)。

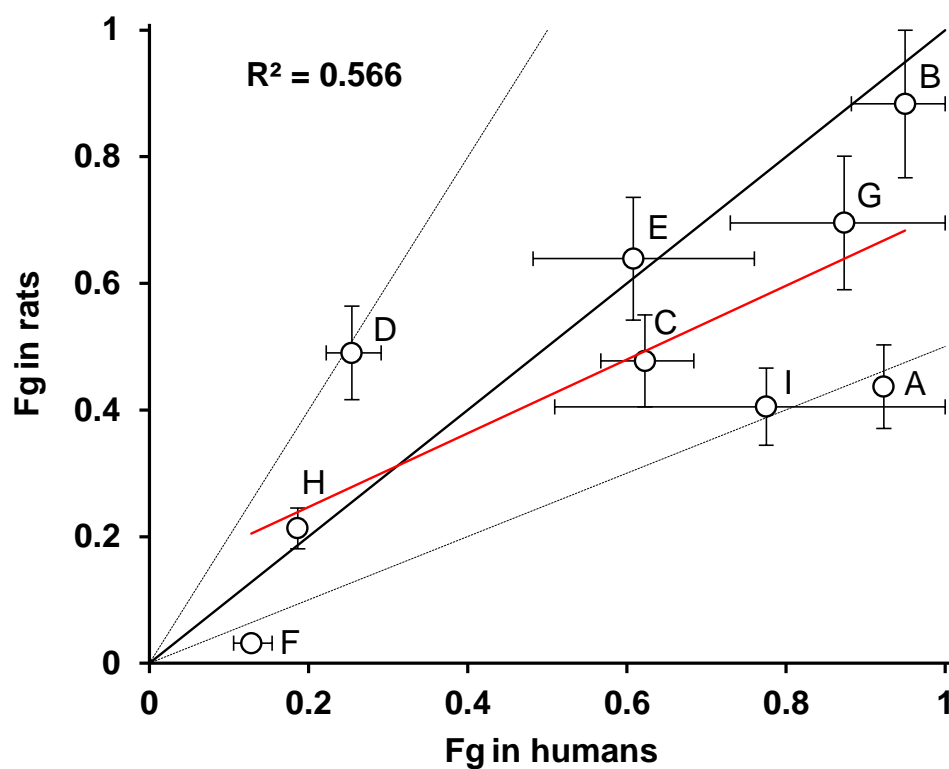


Figure 10. Comparison of Fg in rats and humans. The solid line represents the line of unity, and the dotted lines represent a two-fold difference. Open circles represent the mean of observed FaFg calculated with different blood flow rates. The upper and lower whiskers represent highest and lowest value of rat FaFg, respectively. The left and right whiskers represent lowest and highest value of human FaFg, respectively. When FaFg was calculated at >1 , it was treated as 1. A, alprazolam; B, amlodipine; C, cyclosporine; D, felodipine; E, midazolam; F, nicardipine; G, nifedipine; H, tacrolimus; I, verapamil.

第四節 考察

本検討では9種のCYP3A基質化合物を用いてラットとヒトのFgの相関を検討し、ラットとヒトのFgには相関があることを明らかとした($R^2=0.566$)。このことから、経験的アプローチとしてラットを用いてヒトのFgを定性的に予測することが可能であると考えられた。Faに関してはラットとヒトで良好な相関があり、ラットを用いてヒトのFaを定量的に予測することが可能であると考えられている (Chiou and Barve, 1998, Zhao et al., 2003)。従ってCYP3A基質化合物においては、ラットで高いFaFgを示す化合物を医薬品候補化合物として選択することで、ヒトにおいても高いFaFgを示す医薬品を創出できる確率が高まるものと考えられた。

非臨床段階では化合物を動物にivおよびpo投与することにより、化合物の薬物動態を評価することが一般的に行われているが、Fhが低い化合物のFaFgをindirect法により算出する場合、計算に使用する肝血流速度(Qh)の値に依存してFaFgの算出値が大きく変動する。さらにCLhがQhよりも大きく見積もられた場合は、計算上indirect法ではFaFgを算出することができない。本検討ではヒトのFaFgをindirect法により算出しているが、使用した化合物のヒトのCLhの値は、ほとんどの化合物でヒトのQh(17.1 – 25.5 mL/min/kg) (Kato et al., 2003) の値の半分以下であるため (Table 5)、ヒトのFaFgについては算出値の見積り誤差は小さいものと考えられた。一方、ラットにおいては、検証に用いた多くの化合物でCLt,bloodがラットのQh(55.2 – 80 mL/min/kg) (Davies and Morris, 1993, Lebrech and Blanchet, 1985) と同等またはそれ以上の非常に高い値を示すことが報告されている (Table 7)。これらの化合物の肝臓以外の臓器クリアランスの寄与は小さいと考えられるため、CLhの値もQhと同等またはそれ以上と非常に高い値と考えられる。このため本検討ではラットのFaFgの算出にindirect法を採

用することは不適であると判断し、P-S difference 法を用いて算出を行った。P-S difference 法は門脈血と動脈血の 2 か所から採血を行う必要があるため実験手技に技術を要するが、化合物の CL_h の値の大小によらず FaFg の算出が可能である。また計算に Q_{pv} の値を使用するが、Q_{pv} の報告値の幅は 39.2- 53.2 mL/min/kg (Davies and Morris, 1993, Fujieda et al., 1996) であり、この幅を考慮しても FaFg 算出値の誤差範囲は 1.36 倍と小さいという利点もある。ヒトの薬物動態の予測のためにラットの FaFg を見積もる際には、薬物動態パラメーターを考慮して化合物ごとに適した算出方法を選択することが重要である。

本検討は CYP3A 基質化合物を用いたが、UGT によるグルクロン酸抱合代謝は、CYP に次いで多くの薬物の消失に関与する代謝反応であり (Williams et al., 2004)、腸管でのグルクロン酸抱合代謝が薬物の経口投与時の F に影響を与えることを示す知見も数多く報告されている (Ritter, 2007, Zhang et al., 2007, Wu et al., 2011, Mizuma, 2009, Kosoglou et al., 2005, Kosaka et al., 2011)。古川らは Fa が良好と考えられる UGT 基質化合物を用いてラットとヒトの FaFg の相関を検討し、両種間には相関は認められないことを報告している ($R^2=0.104$) (Furukawa et al., 2014)。従って、関与する代謝酵素によってラットとヒトの Fg の相関は異なるものと考えられ、ラットから経験的にヒトの Fg を予測する場合には腸管代謝に関与する代謝酵素を明らかにしておく必要がある。

Table 7. Total clearance in rats.

Compound	CL _{tot,plasma} (mL/min/kg)	R _b	CL _{tot,blood} (mL/min/kg)	Reference
Alprazolam	133	1.07	124	Wang et al., 1999.
Amlodipine	122	3.36	36	Stopher et al., 1988.
Cyclosporine	-	-	1.7	Hirunpanich et al., 2006.
Felodipine	85	0.70	121	Baarnhielm et al., 1986.
Midazolam	60	0.66	91	Mandema et al., 1991.
Nicardipine	115	0.70	164	Higuchi and Shiobara, 1980.
Nifedipine	10.3	0.59 ^a	17	Grundy et al., 1997.
Tacrolimus	-	-	50	Zhou et al., 2013.
Verapamil	64	0.82 ^b	78	Chen et al., 2008.

^a Grundy et al., 1997.

^b Robinson and Mehvar, 1996.

第二章

Simplified intestinal availability モデルを用いた

ヒト腸管薬物代謝の予測

第一節 背景

種々の *in vitro* スクリーニングおよび動物実験等により医薬品候補化合物がある程度の数に絞られた段階では、ヒトでの有効性および安全性の予測、薬物間相互作用の予測など、臨床を予見するための様々な検討が行われる。これらの臨床予見性を高めるためには、評価化合物のヒトにおける薬物動態を定量的に予測することが重要となる。ヒトの F_g を定量的に予測するためには、腸管での膜透過性および代謝安定性の各過程を記述した生理学的モデルの活用が期待される。ヒトの腸管上皮細胞には CYP3A と P-gp が高発現しており、両者の基質認識性が類似していることから (Wacher et al., 1995)、代謝酵素と排泄トランスポーターが吸収過程の障壁として協働的に作用している仮説が提唱されている (Benet et al., 1999)。すなわち、P-gp 基質化合物の場合、腸管管腔から腸管上皮細胞内への膜透過と腸管上皮細胞内から腸管管腔への排泄が繰り返されることで、投与された薬物が腸管上皮細胞に発現する CYP3A の近傍に曝される機会が増え効率的に腸管で代謝されるという仮説である (Figure 11)。

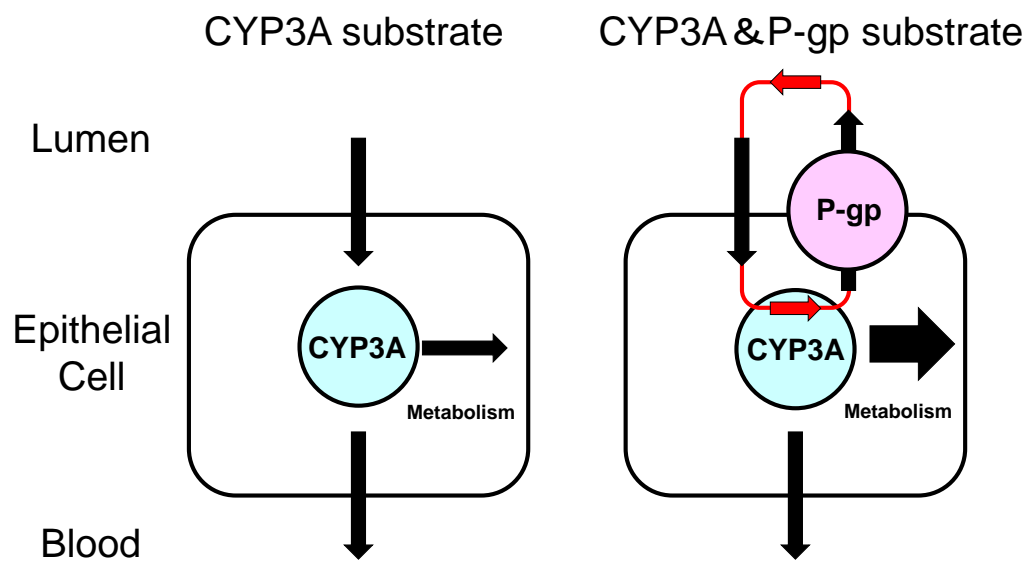


Figure 11. Synergistic effect of CYP3A and P-gp on intestinal metabolism of an orally administered drug.

伊藤らは、薬物の腸管管腔内での移行性、腸管上皮細胞内への透過性、腸管上皮細胞内での代謝安定性、腸管上皮細胞内から門脈血中への透過性、さらに、腸管上皮細胞内から腸管管腔内への汲み出しを考慮し、FaFg を説明するための腸管吸収および腸管代謝の生理学的モデルを構築している (Ito et al., 1999) (Figure 12) (式 12)。

$$\text{FaFg} = \frac{\text{CLab}}{\text{CLab} + \text{CLm}} \times \left\{ 1 - \exp \left(-\frac{\text{PSinf}}{Q} \times \frac{\text{CLab} + \text{CLm}}{\text{PSeff} + \text{CLab} + \text{CLm}} \right) \right\} \quad (\text{式 } 12)$$

CLab は腸管上皮細胞から門脈血中への吸収クリアランス、CLm は腸管上皮細胞での代謝クリアランス、PSinf は腸管管腔から腸管上皮細胞への吸収クリアランス、PSeff は腸管上皮細胞から腸管管腔への排泄クリアランス、Q は腸管管腔内での薬物の移行速度を示す。

伊藤らはこの精緻な生理学的モデルを用いて、FaFg に及ぼす膜透過性、代謝安定性および CYP3A と P-gp の協働作用の影響をシミュレーションしている。しかしながら、モデルが複雑であるため記述に必要な全てのパラメーターを実験から正確に算出することは困難であり、実際の創薬の現場で予測のために活用することはできない。一方、創薬の初期段階では、PAMPA や Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 膜透過性評価がハイスループットで実施されており、経口剤としての開発を指向する場合は、高い膜透過性を有する化合物が医薬品候補として絞り込まれる場合が多い。また、創薬の初期段階では合成された多くの化合物についてヒト肝ミクロソームを用いた代謝安定性の評価が実施されている。これらの現状を踏まえ、創薬の場で実用可能なヒトの Fg の定量的な予測法を構築することを目的として以下の検討を行った。まず、膜透過性は高いという前提に立ち生理学的モデ

ルの簡素化を行い、simplified intestinal availability model (SIA model) を考案した。次に、膜透過性が高く Fa が良好と考えられる CYP3A の基質である 11 種の化合物を使用し、ヒト小腸マイクロソームを用いて代謝安定性を評価した。得られた代謝パラメーターを SIA モデルに組み込み、Fg の値を SIA モデルから説明可能かどうか検証した。さらに、ヒト小腸マイクロソームとヒト肝マイクロソームでの代謝安定性の比較を行い、ヒト肝マイクロソームでの代謝安定性が腸管代謝の受け易さを推察する上で有用な指標になるか否かについても検討を行った。本章ではこれらの検討結果について論述する。

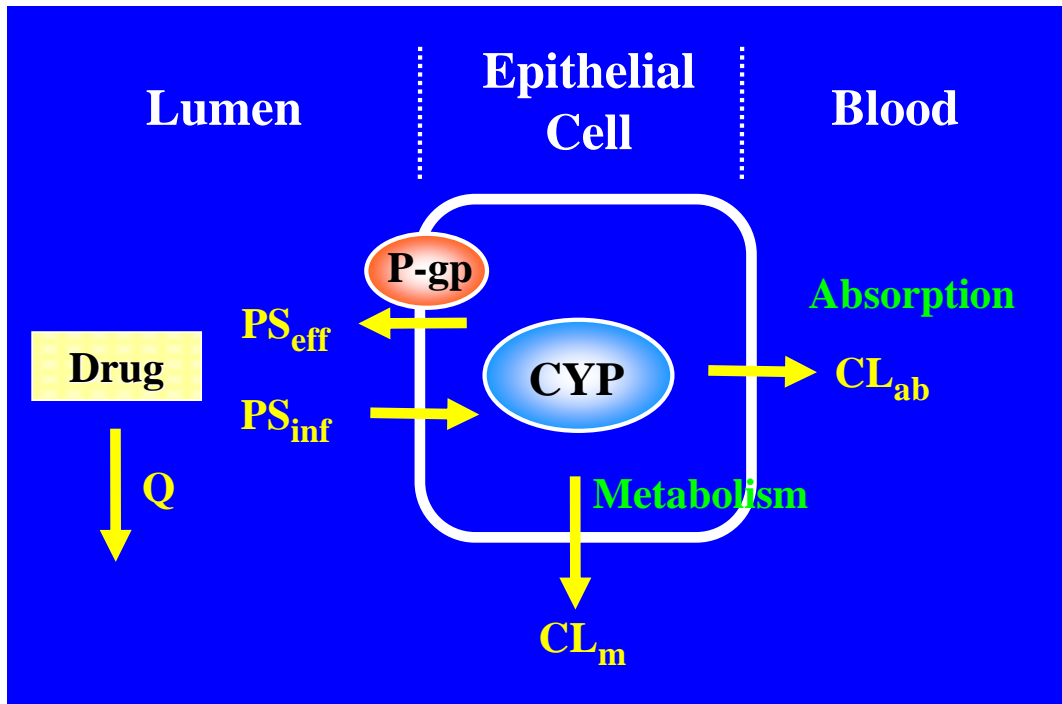


Figure 12. The theoretical model for drug absorption and metabolism in the intestine constructed by Ito et al (1999). PS_{inf} ; influx clearance from the lumen into epithelial cells, PS_{eff} ; efflux clearance from the cells to the lumen, CL_{ab} ; absorption clearance from the cells to blood, CL_m ; metabolic clearance in the cells, and Q is luminal flow rate.

第二節 実験項

1) 腸管の生理学的モデルの簡素化

膜透過性が高い化合物の場合、以下に示す仮定が成立するものとして伊藤らの構築した生理学的モデル (Ito et al., 1999) (式 12) を簡素化した。

仮定 1. 膜透過性が高い場合、腸管吸収率は 100% である。

この場合、 $F_a=1$ が成立する。

仮定 2. 膜透過性が高い場合、腸管上皮細胞に取り込まれる速度は、腸管管腔内を上部から下部へ移行する速度よりも非常に速い。

この場合、 $PS_{inf} \gg Q$ が成立する。

仮定 3. 膜透過性が高い場合、腸管上皮細胞から門脈血中に移行する速度は、P-gp 等排泄トランスポーターの影響で腸管管腔内に汲み出される速度よりも非常に速い。

この場合、 $CL_{ab} \gg PS_{eff}$ が成立する。

仮定 1-3 が成立する場合、式 12 で示した生理学的モデルは、式 13 および式 14 を経由して式 15 に変換される。

$$F_a F_g = \frac{CL_{ab}}{CL_{ab} + CL_m} \times \left\{ 1 - \exp \left(-\frac{PS_{inf}}{Q} \times \frac{CL_{ab} + CL_m}{PS_{eff} + CL_{ab} + CL_m} \right) \right\} \quad (\text{式 12})$$

$$1 \times F_g = \frac{CL_{ab}}{CL_{ab} + CL_m} \times \left\{ 1 - \exp \left(-\infty \times \frac{CL_{ab} + CL_m}{CL_{ab} + CL_m} \right) \right\} \quad (\text{式 13})$$

$$F_g = \frac{CL_{lab}}{CL_{lab} + CL_m} \times \{1 - \exp(-\infty)\} \quad (\text{式 14})$$

$$F_g = \frac{CL_{lab}}{CL_{lab} + CL_m} \quad (\text{式 15})$$

式 15 では、 F_g は CL_{lab} と CL_m のバランスによって決定されるが、筆者は膜透過性が高い化合物の集団で考えた場合、以下に示す仮定 4 が成立するものとし、さらなる簡素化を行った。

仮定 4. 膜透過性が高い化合物の集団の中では、腸管上皮細胞から門脈血中に移行する速度に化合物間で違いはない。

この場合、 CL_{lab} は定数と取扱いが可能となり、式 15 は式 16 を経由して式 17 に簡素化される。

$$F_g = \frac{1}{1 + \frac{1}{CL_{lab}} \times CL_m} \quad (\text{式 16})$$

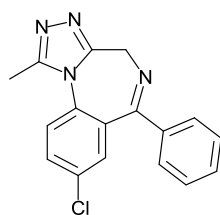
$$F_g = \frac{1}{1 + \alpha \times CL_m} \quad (\text{式 17})$$

筆者は、式 17 を simplified intestinal availability (SIA) モデルと命名し、 F_g と CL_m をつなぐ定数である α を empirical scaling factor と定義した。 CL_m には、ヒト小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験より算出した $CL_{int,intestine,u}$ の値、もしくは、 $CL_{int,intestine,u}$ の値を midazolam の値で規格化した $CL_{m,index}$ (式 18) の値を使用して SIA モデルの妥当性を検証した。

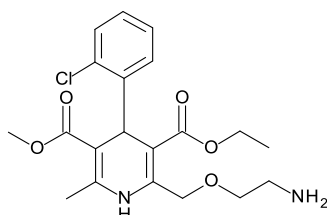
$$CL_{m, index} = \frac{CL_{int, intestine, u \text{ of compound A}}}{CL_{int, intestine, u \text{ of midazolam}}} \quad (\text{式 18})$$

2) モデル化合物の選択

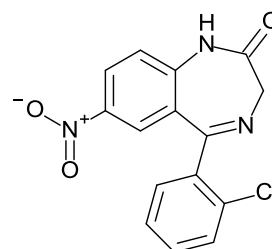
SIA モデルの検証には、膜透過性が良好な CYP3A の基質である 11 種の化合物を用いた (Figure 13)。この内、cyclosporine, nifedipine, quinidine, tacrolimus および verapamil については P-gp の基質でもある。ヒト小腸マイクロソームとヒト肝マイクロソームにおける代謝安定性の比較には、11 種のモデル化合物の他に、4 種の市販化合物 (amitriptyline, propafenone, propranolol および timolol) (Figure 14) および 21 種のアステラス製薬の自社化合物 (構造非開示) を加え、計 36 化合物を用いた。



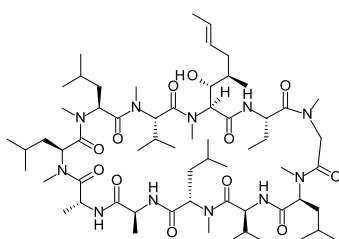
Alprazolam



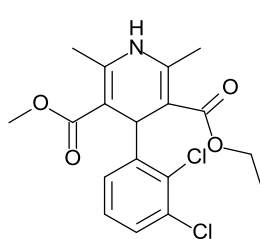
Amlodipine



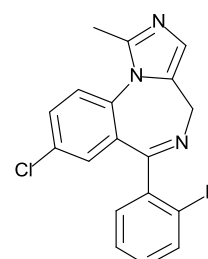
Clonazepam



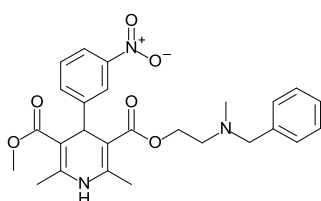
Cyclosporine



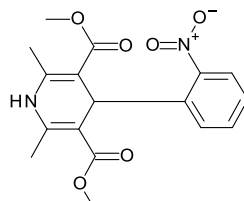
Felodipine



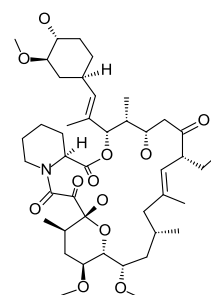
Midazolam



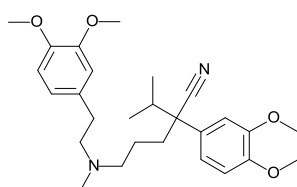
Nicardipine



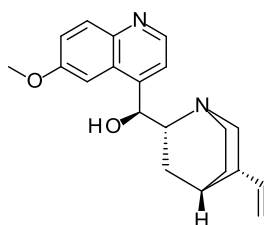
Nifedipine



Tacrolimus

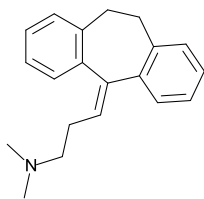


Verapamil

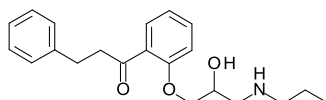


Quinidine

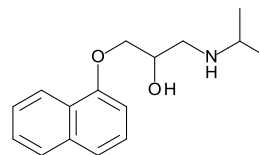
Figure 13. Chemical structures of the 11 model compounds used for the validation of SIA model.



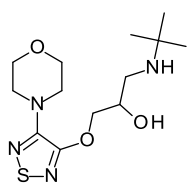
Amitriptyline



Propafenone



Propranolol



Timolol

Figure 14. Chemical structures of amitriptyline, propafenone, propranolol, and timolol.

3) 試薬

ヒトのプール小腸マイクロソーム (n=13 のプール)およびプール肝臓マイクロソーム (n=50 のプール) は Xenotech より購入したものを使用した。ヒトの個別小腸マイクロソームは KAC より購入したものを使用した。Clonazepam は和光純薬工業より購入したものを使用した。Amitriptyline、propafenone、quinidine および timolol は Sigma-Aldrich より購入したものを使用した。その他の試薬については第一章に記載したものを使用した。

4) 人工膜を用いた膜透過性評価

試験方法は第一章に記載した。11 種のモデル化合物の Papp を算出し、Figure 4 で示した相関からモデル化合物のヒトの Fa を予測した。

5) ヒト小腸マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

プール小腸マイクロソームを 3 ロットと個別小腸マイクロソームを 2 ロット用いて *in vitro* 代謝試験を実施した。反応液 (1 mL) の組成は、化合物濃度 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、小腸マイクロソーム濃度 0.02-0.2 mg/mL、100 mmol/L Na,K-リン酸緩衝液 (pH7.4)、0.1 mmol/L EDTA とし、37 °C で 5 分間プレインキュベーションした後、NADPH を 1 mmol/L になるよう添加して反応開始とした。反応液中に含まれる有機溶媒 (アセトニトリル) の濃度は 0.5% (v/v) とした。反応液を経時的にサンプリングし、以下に示す方法で前処理を行い LC-MS/MS にて評価化合物を測定した。アッセイは n=2 で実施した。Cyclosporine および tacrolimus 以外の化合物に関しては、反応液 100 μL を IS 溶液 (100 ng/mL diazepam を含むアセトニトリル) 200 μL に添加し反応を停止させた後、10,000 g、4 °C で 5 分遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS 分析の測定サンプルとした。Cyclosporine に関しては、反応液

100 μ L を IS 溶液 (アステラス製薬の cyclosporine 類縁化合物を 100 ng/mL 含むアセトニトリル) 100 μ L に添加し反応を停止させた後、蒸留水 500 μ L および *tert*-ブチルメチルエーテル 4.5 mL を添加して混合した。有機層 4 mL を分取して窒素気流下 40 $^{\circ}$ C で溶媒を留去した後、残渣を 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール (10:90) の溶液 200 μ L に溶解し LC-MS/MS 分析の測定サンプルとした。Tacrolimus に関しては、反応液 100 μ L を IS 溶液 (アステラス製薬の tacrolimus 類縁化合物を 100 ng/mL 含むアセトニトリル) 100 μ L に添加し反応を停止させた後、10 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH7.5) 500 μ L および *tert*-ブチルメチルエーテル 4.5 mL を添加して混合した。有機層 4 mL を分取して窒素気流下 40 $^{\circ}$ C で溶媒を留去した後、残渣を 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール (10:90) 200 μ L に溶解し LC-MS/MS 分析の測定サンプルとした。

6) ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

プールしたヒト肝ミクロソームを用いて *in vitro* 代謝試験を実施した。反応液 (1 mL) の組成は、化合物濃度 0.2 μ mol/L、肝ミクロソーム濃度 0.02-0.2 mg/mL、100 mmol/L Na,K-リン酸緩衝液 (pH7.4)、0.1 mmol/L EDTA とし、37 $^{\circ}$ C で 5 分間プレインキュベーションした後、NADPH を 1 mmol/L になるよう添加して反応開始とした。反応液中に含まれる有機溶媒 (アセトニトリル) の濃度は 0.5% (v/v) とした。反応液を経時的にサンプリングし、ヒト小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験と同じ方法で前処理を行い LC-MS/MS にて評価化合物を測定した。アッセイは n=2 で実施した。

7) *In vitro* 代謝試験時の反応液中の非結合型分率の測定

ヒト小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験における反応液中の評

価化合物の非結合型分率 ($f_{u,inc}$) は、8 kDa の半透膜の 96 well 平衡透析プレート (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定した。NADPH の代わりに蒸留水を添加した反応液 200 μ L をプレートのドナー側に、PBS 350 μ L をプレートのアクセプター側にそれぞれ添加し、37°C で 16 時間振とうした。振とう後、cyclosporine 以外の化合物については、アクセプター側またはドナー側から 30 μ L を分取し、50% アセトニトリル 30 μ L および IS 溶液 (100 ng/mL IS と 0.1% ギ酸を含むアセトニトリル) 150 μ L を混合した後、16,000 g、4 °C で 5 分遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS 分析し、両側の薬物濃度を測定した。Cyclosporine については、ドナー側から 30 μ L を分取し、50% アセトニトリル 30 μ L、IS 溶液 (100 ng/mL IS を含むアセトニトリル) 30 μ L および蒸留水 500 μ L を混合し、*tert*-ブチルメチルエーテル 4 mL を添加して混合した。有機層を分取して窒素気流下 40 °C で溶媒を留去した後、残渣を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム：アセトニトリル=1:1 (v/v) の溶液 200 μ L に溶解し LC-MS/MS 分析し、ドナー側の化合物濃度を測定した。アクセプター側から 30 μ L を分取し、50% アセトニトリル 30 μ L および IS 溶液 (100 ng/mL IS と 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル) 150 μ L を混合した後、16,000 g、4 °C で 5 分遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS 分析し、アクセプター側の化合物濃度を測定した。アッセイは $n=3$ で実施した。 $f_{u,inc}$ は式 19 により算出した。ここで $C_{acceptor\ side}$ および $C_{donor\ side}$ は、それぞれアクセプター側およびドナー側の化合物濃度を示す。 $f_{u,inc}>1$ と見積もられた場合には $f_{u,inc}=1$ として扱った。

$$f_{u,inc} = C_{acceptor\ side} / C_{donor\ side} \quad (\text{式 19})$$

8) $CL_{int,intestine}$, $CL_{int,liver}$ および $CL_{int,intestine,u}$ の算出

ヒト小腸ミクロソームおよびヒト肝ミクロソームにおけるみかけの *in vitro* 代謝固有クリアランス (CL_{int,intestine} および CL_{int,liver}) の値は、各ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験における未変化体の残存率の経時変化より、1 次の消失速度定数を算出し、式 20 および式 21 を用いて算出した (Naritomi et al., 2001)。

CL_{int,intestine} (μL/min/mg protein)

$$= 1 \text{ 次の消失速度定数} / \text{ミクロソームタンパク濃度} \quad (\text{式 20})$$

CL_{int,liver} (mL/min/kg)

$$\begin{aligned} &= 1 \text{ 次の消失速度定数} / \text{ミクロソームタンパク濃度} \\ &\quad \times \text{単位肝臓重量あたりのミクロソームタンパク含量} \\ &\quad \times \text{単位体重あたりの肝臓重量} \end{aligned} \quad (\text{式 21})$$

ヒトにおける単位肝臓重量あたりのミクロソームタンパクの含量および単位体重あたりの肝臓重量はそれぞれ 32 mg protein/g liver (Barter et al., 2007) および 24.1 g liver/kg (Davies and Morris, 1993) を使用した。

In vitro 代謝試験における評価化合物と反応液中の成分との非特異的な結合による影響を考慮することで、*in vitro* から *in vivo* の予測性が向上するため (Obach, 1996, Obach, 1999)、ヒト小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験では、CL_{int,intestine} の値を式 22 により fu,inc で補正し、*in vitro* 代謝固有クリアランス (CL_{int,intestine,u}) を算出した。

$$\text{CL}_{\text{int, intestine, u}} = \text{CL}_{\text{int, intestine}} / \text{fu, inc} \quad (\text{式 22})$$

小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験において、タンパク濃度 0.2 mg/mL で 60 分間インキュベーションしても未変化体の残存率が 90%以上であった場合には、CL_{int,intestine} の正確な値の算出は困難と判断し、CL_{int,intestine,u} および CL_{m,index} の値は No depletion (N.D.) と表記した。

9) ヒトにおける FaFg の算出

文献により得られた静脈内投与および経口投与後の薬物動態パラメーターを用い indirect 法 (式 6-9) によりヒトの FaFg を算出した。なお、quinidine については一部が尿中に未変化体として排泄され、腎クリアランス (CL_r) の寄与が無視できないと考えられたため (Greenblatt et al., 1977, Rakhit et al., 1984)、CL_{tot,blood} から CL_r を引くことにより CL_h を算出した。ヒトの肝血流量 (Q_h) の値は文献報告値の幅を考慮し、17.1 mL/min/kg、20.7 mL/min/kg および 25.5 mL/min/kg を用いた (Davies and Morris, 1993, Kato et al., 2003)。

10) LC-MS/MS 分析条件

評価化合物の測定は、Quattro Ultima mass spectrometer (Waters 製) と Alliance 2695 separation module (Waters 製) で構成された LC-MS/MS システムを用いた。MS/MS 分析は ESI ポジティブモードでイオン化し、MRM 条件でイオンを検出した。各化合物のモニターイオン (precursor>product) 分析条件は Table 8 に示した。Alprazolam, amlodipine, clonazepam, nicardipine および felodipine の HPLC 分離は、分析カラムに XTerra MC C18Column (3.5 μm, 4.6 mm × 50 mm, Waters 製) を用い、カラム温度 40 °C、流速 0.3 mL/min とし、移動相は、0.1%ギ酸/アセトニトリル (40:60) を用いた。Midazolam, nifedipine, quinidine, verapamil, amitriptyline, propafenone, propranolol および

timolo の HPLC 分離は、分析カラムに Ascentis RP-Amide Column (3 μ m, 3 mm \times 30 mm, Supelco 製) を用い、カラム温度 50 $^{\circ}$ C、流速 0.5 mL/min とし、移動相に、A 液 (20 mmol/L 酢酸アンモニウム-10%アセトニトリル水溶液) と B 液 (20 mmol/L 酢酸アンモニウム-90%アセトニトリル水溶液) を用い、線形グラジエントの条件で測定した。Midazolam, nifedipine, quinideine, verapamil, amitriptyline, propafenone および propranolol のグラジエント条件を以下に示す。括弧内の数値は%B を示す。0 min (0), 0.5 min (0), 1 min (70), 3 min (70), 3.1 min (0), 4 min (0)。Timolol のグラジエント条件を以下に示す。0 min (0), 0.5 min (0), 1 min (70), 3 min (70), 3.1 min (0), 4.5 min (0)。Cyclosporine の HPLC 分離は、分析カラムに XTerra MC C18Column (5 μ m, 2.1 mm \times 50 mm, Waters 製) を用い、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、流速 0.2 mL/min とし、移動相に、10 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール (10:90) を用いた。Tacrolimus の HPLC 分離は、分析カラムに XTerra MC C18Column (3.5 μ m, 4.6 mm \times 50 mm, Waters 製) を用い、カラム温度 55 $^{\circ}$ C、流速 0.4 mL/min とし、移動相に、2 mmol/L 酢酸アンモニウム/0.1%ギ酸および 2 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール (20:80) を用いた。また、Alprazolam, amlodipine, cyclosporine, felodipine, midazolam, nicardipine, nifedipine, tacrolimus および verapamil のヒト小腸マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験の一部のサンプルに関しては、第一章に示した LC-MS/MS 条件を用いて測定を行った。

Table 8. Monitoring ion in LC-MS/MS analysis for the 11 model compounds, amitriptyline, propafenone, propranolol, and timolol.

Compound	Monitoring ion
	precursor > product
Alprazolam	309.0 > 281.0
Amlodipine	409.0 > 238.0
Clonazepam	315.9 > 270.0
Cyclosporine	1219.2 > 1202.7
Felodipine	383.9 > 337.9
Midazolam	326.0 > 291.1
Nicardipine	480.0 > 315.0
Nifedipine	347.1 > 315.1
Quinidine	325.1 > 183.9
Tacrolimus	821.5 > 768.3
Verapamil	455.2 > 165.0
Amitriptyline	278.0 > 91.0
Propafenone	342.1 > 116.0
Propranolol	260.1 > 182.9
Timolol	317.1 > 261.0

11) SIA モデルにおける empirical scaling factor (α) の推定

モデル化合物の FaFg と CLint の関係を SIA モデルに当てはめて、非線形最小二乗法プログラム MULTI (Yamaoka et al., 1981) を用いて α の値を算出した。

第三節 結果

1) PAMPA によるモデル化合物のヒト Fa 予測

本検討に使用したモデル化合物の内、clonazepam および quinidine 以外の 9 化合物については、第一章において、ヒトの Fa が 0.8 以上の高い値が期待できることを示した (Table 3, Figure 4)。Table 9 に、clonazepam および quinidine の PAMPA による P_{app} の値を示す。両化合物ともに P_{app} の値は高く、Figure 4 で示した P_{app} とヒト Fa の相関からヒトの Fa は良好 (0.8 以上) と予測された。従って、本検討に使用したモデル化合物のヒトの FaFg の値は Fg に等しいと仮定することに問題ないと判断した。

Table 9. Permeability in PAMPA.

Model Compounds	P_{app}
	($\times 10^{-6}$ cm/sec)
Clonazepam	18.6
Quinidine	17.9

2) Indirect 法を用いたヒト FaFg の算出

本検討に使用したモデル化合物の内、clonazepam および quinidine 以外の 9 化合物については、第一章において、indirect 法によりヒトの FaFg の値を算出した (Table 5 および 6)。Table 10 および 11 に、clonazepam および quinidine のヒトにおける薬物動態パラメーターおよび FaFg の値を示す。両化合物ともに FaFg の値は高く、これら 2 つの化合物に関しては腸管代謝を受けにくいものと考えられた。

Table 10. *In vivo* pharmacokinetic parameters in humans.

	CL _{tot,plasma} (mL/min/kg)	R _b	CL _h (mL/min/kg)	Reference
Clonazepam	0.87	1.00 ^a	0.87	Crevoisier et al., 2003.
Qunideine	3.86	0.92 ^b	2.83	Greenblatt et al., 1977, Rakhit et al., 1984.

^a Assumed value.^b Quoted from Obach, 1999.Table 11. *In vivo* pharmacokinetic parameters in humans (continued).

		Qh: 17.1 mL/min/kg		Qh: 20.7 mL/min/kg		Qh: 25.5 mL/min/kg	
	F	Fh	FaFg	Fh	FaFg	Fh	FaFg
Clonazepam	0.900	0.949	0.948	0.958	0.939	0.966	0.932
Qunideine	0.764	0.835	0.915	0.863	0.885	0.889	0.859

3) ヒト小腸マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝反応液中の fu,inc の算出

Table 12 に各モデル化合物の fu,inc の値を示す。Amlodipine, felodipine および cyclosporine は反応液中の成分と比較的強い結合が認められ、fu,inc の値はそれぞれ、0.479, 0.284 および 0.146 と見積もられた。その他の化合物の結合率は低く 0.885 以上であった。小腸マイクロソームを用いて算出した CLint,intestine の値を各化合物の fu,inc で除すことにより CLint,intestine,u の算出を行った。

Table 12. fu,inc value in reaction mixtures of human intestinal microsomes.

Compound	Microsomal	fu,inc
	concentration (mg/mL)	
Alprazolam	0.2	1
Amlodipine	0.2	0.479
Clonazepam	0.2	1
Felodipine	0.2	0.284
Midazolam	0.2	0.925
Nifedipine	0.2	1
Cyclosporine	0.2	0.146
Nicardipine	0.02	1
Quinidine	0.2	1
Tacrolimus	0.2	0.885
Verapamil	0.2	1

4) ヒト小腸マイクロソームを用いた CLint,intestine,u および CLm,index の算出

評価系の再現性および頑健性は重要であるため、プール小腸マイクロソームを3ロット、個別小腸マイクロソームを2ロット、計5ロットを用いて、CLint,intestine,u の算出を行った (Table 13)。プール小腸マイクロソームのロット間で比較した場合、cylcoposrine の値 (178 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ および 603 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) を除き、ロット間による CLint,intestine,u の値の違いは小さく、再現性の高い結果が得られた。一方、個別小腸マイクロソームを用いた場合、プール小腸マイクロソームに比べ CLint,intestine,u の値が大きく異なる結果が得られた。そこで、ロット間による代謝活性の補正を行う目的で、CLint,intestine,u の値をモデル化合物の1つである midazolam の値で規格化した CLm,index の値をロット間で比較すると、プールマイクロソーム、個別マイクロソームに関わらず、ロット間差は小さく再現性が高まる結果が得られた (Table 14)。

Table13. CL_{int,intestine,u} in human intestinal microsomes.

	CL _{int,intestine,u} (μL/min/mg)				
	Lot: 1	Lot: 2	Lot: 3	Lot: 4	Lot: 5
Alprazolam	N.D.	N.T.	N.D.	N.T.	N.D.
Amlodipine	27	N.T.	46	N.T.	61
Clonazepam	N.T.	N.T.	N.D.	N.T.	N.D.
Felodipine	1954	N.T.	2616	4870	N.T.
Midazolam	183	181	271	577	448
Nifedipine	89	88	N.T.	340	N.T.
Cyclosporine	178	N.T.	603	884	N.T.
Nicardipine	1665	1287	N.T.	3600	N.T.
Qunideine	N.T.	N.D.	N.T.	N.D.	N.T.
Tacrolimus	624	N.T.	798	2025	N.T.
Verapamil	79	107	N.T.	291	N.T.

Lot:1-3: Pooled intestinal microsomes.

Lo:4 and 5: Individual intestinal microsomes.

N.D.: No depletion.

N.T.: Not tested.

Table 14. CL_m,index in human intestinal microsomes.

	CL _m ,index				
	Lot: 1	Lot: 2	Lot: 3	Lot: 4	Lot: 5
Alprazolam	N.D.	N.T.	N.D.	N.T.	N.D.
Amlodipine	N.T.	N.T.	0.17	N.T.	0.14
Clonazepam	N.D.	N.T.	N.D.	N.T.	N.D.
Felodipine	10.68	N.T.	9.64	8.44	N.T.
Midazolam	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Nifedipine	0.49	0.49	N.T.	0.59	N.T.
Cyclosporine	0.97	N.T.	2.22	1.53	N.T.
Nicardipine	9.10	7.13	N.T.	6.24	N.T.
Quinidine	N.T.	N.D.	N.T.	N.D.	N.T.
Tacrolimus	3.41	N.T.	2.94	3.51	N.T.
Verapamil	0.43	0.59	N.T.	0.50	N.T.

Lot:1-3: Pooled intestinal microsomes.

Lot:4 and 5: Individual intestinal microsomes.

N.D.: No depletion.

N.T.: Not tested.

5) ヒトの F_g と $CL_{int,intestine,u}$ または CL_m の相関と SIA モデルを用いた F_g 予測式の構築

プール小腸マイクロソームより求めた $CL_{int,intestine,u}$ または $CL_{m,index}$ が再現性の高い代謝安定性のパラメーターになると考えられたことから、プール小腸マイクロソーム (lot:1-3) より求めた $CL_{int,intestine,u}$ の平均値またはすべての小腸マイクロソーム (lot:1-5) より求めた $CL_{m,index}$ の平均値を用いて、ヒトの F_g との相関性を検討した (Figure 15 および 16)。その結果、いずれの Q_h 条件 (17.1, 20.7 および 25.5 mL/min/kg) においても、 P_{-gp} の基質性の有無に関わらず $CL_{int,intestine,u}$ または $CL_{m,index}$ が増加するに従って F_g が低下する傾向が確認され、いずれの条件においても F_g を SIA モデルに良好にフィッティングさせることが可能であった。各条件で算出された empirical scaling factor (α) を Table 15 に示す。

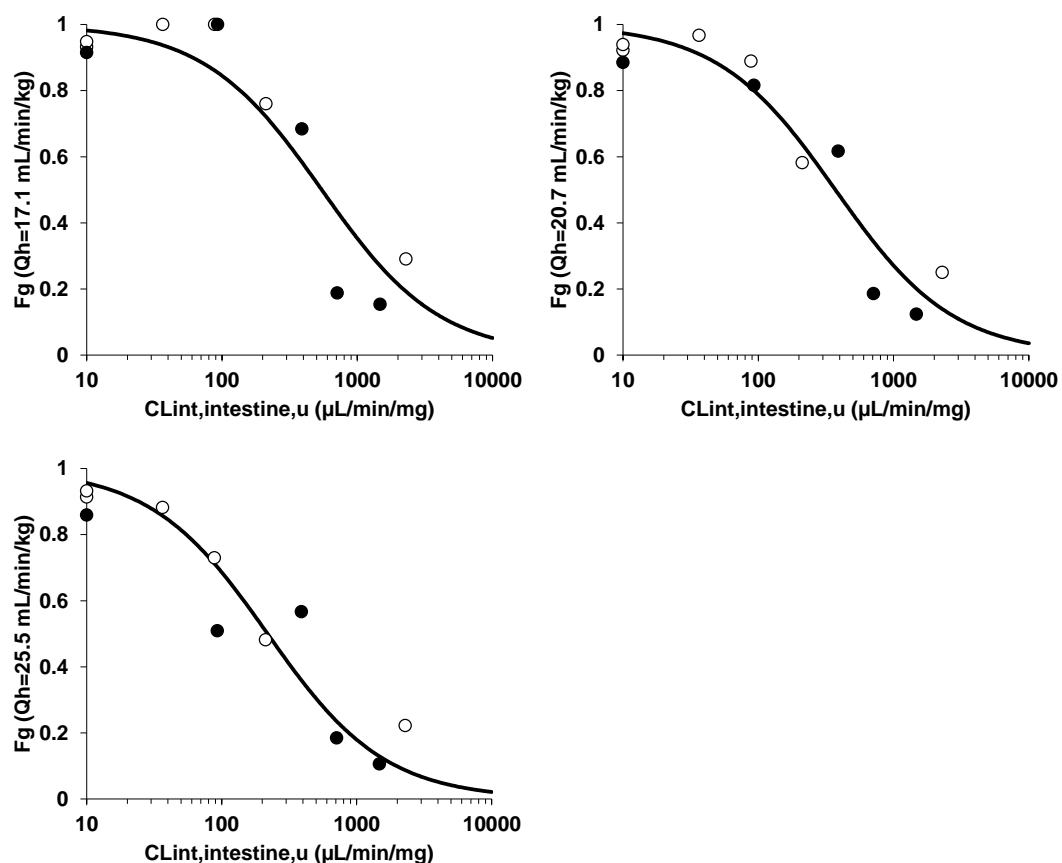


Figure 15. Correlation between human Fg and CL_{int,intestine,u} of high permeable CYP3A substrates. Open circles represent non-P-gp substrates, and closed circles represents P-gp substrates. Solid lines were obtained by a fitting study with SIA model. When observed Fa was calculated at >1, it was treated as 1. When CL_{int,intestine,u} was no depletion, it was treated as 10 μL/min/mg.

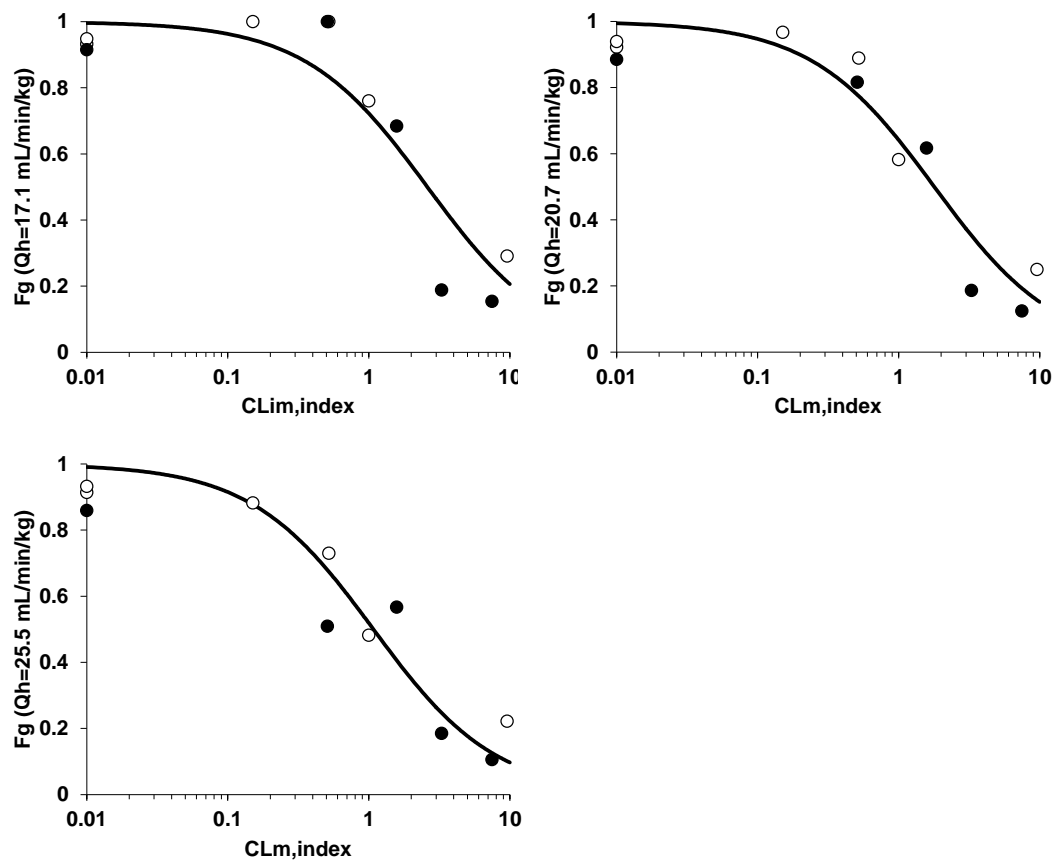


Figure 16. Correlation between human F_g and $CL_{m,index}$ of high permeable CYP3A substrates. Open circles represent non-P-gp substrates, and closed circles represents P-gp substrates. Solid lines were obtained by a fitting study with SIA model. When observed F_a was calculated at >1 , it was treated as 1. When $CL_{m,index}$ was no depletion, it was treated as 0.01.

Table15. Empirical scaling factor in SIA model for CYP3A substrates.

Metabolic parameter	Qh: 17.1	Qh: 20.7	Qh: 25.5
	mL/min/kg	mL/min/kg	mL/min/kg
CL _{int,intestine,u}	0.0018	0.0027	0.0046
CL _{m,index}	0.38	0.56	0.93

6) ヒト小腸マイクロソームとヒト肝マイクロソームを用いた代謝安定性の比較

36 種の化合物を用いて、CLint,intestine,u および CLm,index と CLint,liver との相関を検討した (Figure 17)。その結果、多くの化合物で正の相関が確認された。また、CLint,liver の値が大きいにも関わらず、CLint,intestine,u および CLm,index の値が非常に小さい化合物もいくつか存在した。一方、CLint,liver の値が非常に小さいにも関わらず、CLint,intestine,u および CLm,index の値が大きい化合物は確認されなかった。

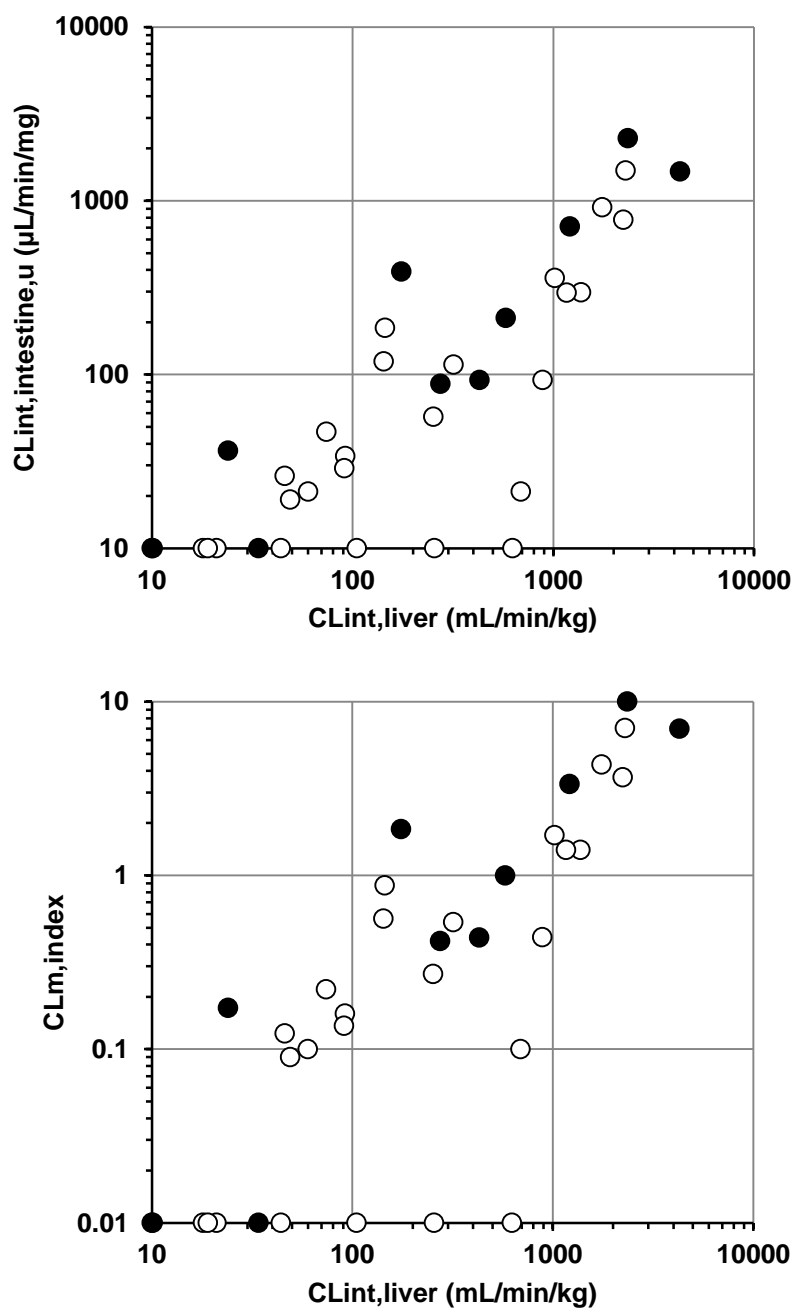


Figure 17. Correlation between $CL_{int,intestine,u}$ ($CL_{M,index}$) and $CL_{int,liver}$. Closed circles represent the 11 model compounds, and open circles represent 4 commercial and 21 in-house compounds.

第四節 考察

本研究では創薬の現場で実用可能なヒトの F_g を定量的に予測する方法の構築を目的として、膜透過性が高い前提のもと腸管の生理学的モデルを簡素化した SIA モデルを考案し、CYP3A 基質を用いてモデルの妥当性の検証を行った。CYP3A と P-gp の基質認識の類似性が効率的な腸管代謝に寄与する可能性が提唱されているが (Benet et al., 1999)、本検討に使用したモデル化合物の F_g の値は P-gp の基質性の有無に関わらず、 $CL_{int, intestine, u}$ および $CL_{m, index}$ の値の増加に伴い低下し、腸管代謝における P-gp の影響は確認されなかった。さらに、両パラメーターの間で得られた相関は SIA モデルに良好にフィッティングさせることが可能であった。以上のことから、少なくとも膜透過性が高い化合物においては、腸管代謝における CYP3A と P-gp の協働作用の影響は無視できるほど小さいものと考えられ、本検討のフィッティングにより得られた empirical scaling factor (Table 15) を用いることにより、SIA モデルから膜透過性が高い化合物のヒトの F_g を定量的に予測することが可能であると考えられた。

本検討は膜透過性が高い前提で実施しているが、膜透過性が低い化合物の場合、腸管代謝に影響する様々な条件が膜透過性の高い化合物とは異なるものと考えられる。例えば、膜透過性が高い化合物に比べ腸管細胞内から門脈血中へ移行する速度が遅いため、代謝酵素近傍に曝される時間が長くなり、結果として膜透過性が高い化合物よりも腸管代謝を受けやすくなる可能性が考えられる。また、膜透過性が高い化合物に比べ P-gp による腸管管腔への排出の影響を受けやすく、結果として腸管代謝における CYP3A と P-gp の協働作用の影響を受けやすくなる可能性も考えられる。さらに、膜透過性の違いによる吸収部位の違いも F_g に影響を与える可能性がある。すなわち、膜透過性が高い化合物は溶解性が律速にならない限り主に小腸

の上部で吸収されるものと考えられるが、膜透過性が低い化合物は小腸上部から中部さらには下部まで移行しながら吸収される可能性がある。CYP3A の発現量は小腸上部で高く下部では低いことが報告されているため (Zhang et al., 1999)、小腸下部で吸収された化合物は CYP3A による代謝を受けにくい可能性がある。一方、P-gp の発現量は CYP3A とは逆に小腸上部よりも下部の方が高いことが報告されている (Mouly and Paine, 2003, Zimmermann et al., 2005)。従って、小腸下部で吸収された化合物は上部で吸収された化合物よりも CYP3A と P-gp の協働作用による影響を受けやすい可能性も考えられる。このように、膜透過性が低い化合物に関しては、腸管上皮細胞内での滞留時間、吸収部位の違い、さらには腸管における CYP3A と P-gp の発現分布の違いなど、腸管代謝に影響を与える様々な条件が膜透過性の高い化合物とは異なるものと考えられる。SIA モデルは膜透過性が高い前提のもと構築されており、これら様々な条件を考慮していない。そのため、膜透過性の低い化合物の F_g を SIA モデルから正確に予測することは困難と考えられる。膜透過性が低い化合物の F_g を予測するためには、膜透過性と代謝安定性だけでなく、腸管内での薬物の移行速度、吸収部位および腸管における CYP3A と P-gp の発現分布も考慮した予測モデルが必要かもしれない。ただし、モデルが複雑になると実際の創薬の現場での実用化が困難になることにも留意して検討する必要がある。

肝臓は多くの医薬品にとって主要な代謝排泄臓器であるため、創薬の初期段階からヒト肝ミクロソームなどの試料を用いて多くの化合物の *in vitro* 代謝安定性評価が高度に自動化された装置を用いてハイスループットで実施されている。本検討では 36 種の化合物を用いてヒト小腸ミクロソームとヒト肝ミクロソームでの CYP に対する代謝安定性を比較した結果、多くの化合物で $CL_{int,liver}$ の値と $CL_{int,intestine,u}$ および $CL_{m,index}$ の値に相

関が確認され、創薬の初期段階に得られる $CL_{int,liver}$ の値が腸管代謝の受け易さを推察する上で有用な指標になるものと考えられた。すなわち、Figure 15 および 16 で示した F_g と SIA モデルのフィッティングから、 $CL_{int,intestine,u}$ の値が $50 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ 以下または $CL_{m,index}$ の値が 0.3 以下の条件を満たせば F_g は 0.75 以上の高い値が期待できるが、Figure 17 の相関から、 $CL_{int,liver}$ の値が $100 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ 以下であれば、これらの条件を満たすことができる。一方、 $CL_{int,liver}$ が $1000 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ 以上であれば $CL_{int,intestine,u}$ は $200 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ 以上、 $CL_{m,index}$ は 1 以上となる可能性が高く、その場合、 F_g は 0.5 以下になると予測される。

一方で、 $CL_{int,liver}$ が大きい値にも関わらず、 $CL_{int,intestine,u}$ および $CL_{m,index}$ が小さい値を示す化合物も存在した。ヒトの小腸に発現する CYP 分子種の存在比は CYP3A が約 80% と大部分を占めており (Paine et al., 2006)、CYP3A 以外の CYP 基質化合物については腸管代謝が経口投与時の F に大きな影響を与えていることを示す報告はない。このことから、CYP3A 以外の CYP 分子種の腸管代謝への寄与は小さいと考えられ、Figure 17 の相関から外れた化合物の肝ミクロソームでの代謝には主として CYP3A 以外が関与しているものと推察される。実際、CYP2D6 の基質である propafenone (Dilger et al., 2000) は $CL_{int,liver}$ の値が $690 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ と大きい、 $CL_{int,intestine,u}$ の値は $18 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ 、 $CL_{m,index}$ の値は 0.1 と小さい。また、CYP1A2 と CYP2D6 の基質である自社化合物は、 $CL_{int,liver}$ の値が $626 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ であるが、 $CL_{int,intestine,u}$ の値は $10 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ 以下、 $CL_{m,index}$ の値は 0.01 以下であった。

本検討では CYP3A の基質化合物を用いて SIA モデルの妥当性を検証したが、近年、腸管に発現する UGT による代謝が薬物の経口投与時の F に大きな影響を与えることを示す結果が数多く報告されている (Ritter, 2007,

Zhang et al., 2007, Wu et al., 2011, Mizuma, 2009, Kosoglou et al., 2005, Kosaka et al., 2011)。そこで中森らは、膜透過性の高い 11 種の UGT 基質化合物を使用し、本検討で構築した SIA モデルが UGT 基質化合物のヒトの Fg の予測にも応用可能かどうか検証した (Nakamori et al., 2012)。その結果、CYP3A 基質化合物と同様に UGT 基質化合物の Fg はプール小腸マイクロソームより算出した $CL_{int, intestine, u}$ の値が大きくなるに従って低下し、両パラメーターの相関関係は SIA モデルを用いて良好にフィッティングさせることが可能であった (Figure 18)。また得られた empirical scaling factor の値は CYP3A 基質で得られた値とほぼ同等であることも確認された (Table 16)。このように、SIA モデルは CYP3A のみならず UGT 基質化合物の Fg の予測にも応用が可能な有用なモデルであることが示されている。

腸管上皮細胞には数多くの UGT アイソザイムが発現しており、UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4 および UGT2B6 が含まれる (Ritter, 2007, Ohno and Nakajin, 2009, Fisher et al., 2001)。この内、UGT1A8 と UGT1A10 の発現は腸管上皮細胞特異的に存在し肝臓には存在しない (Tukey and Strassburg, 2001)。さらに、raloxifen のように、これらの腸管上皮細胞特異的な UGT アイソザイムにより腸管特異的に著しく代謝される化合物も存在している (Dalvie et al., 2009, Kemp et al., 2002)。従って、UGT 基質化合物の場合には、CYP3A 基質とは異なりヒト肝マイクロソームにより算出した $CL_{int, liver}$ の値は腸管代謝の指標にはならないと考えられる。そのため、カルボキシル基やフェノール基など UGT で代謝される可能性がある部分構造を有する化合物については、医薬品候補化合物として絞り込まれる前にヒト小腸マイクロソームを用いた代謝安定性を評価し、SIA モデルを用いてヒトの Fg を予測しておくことが肝要と考える。

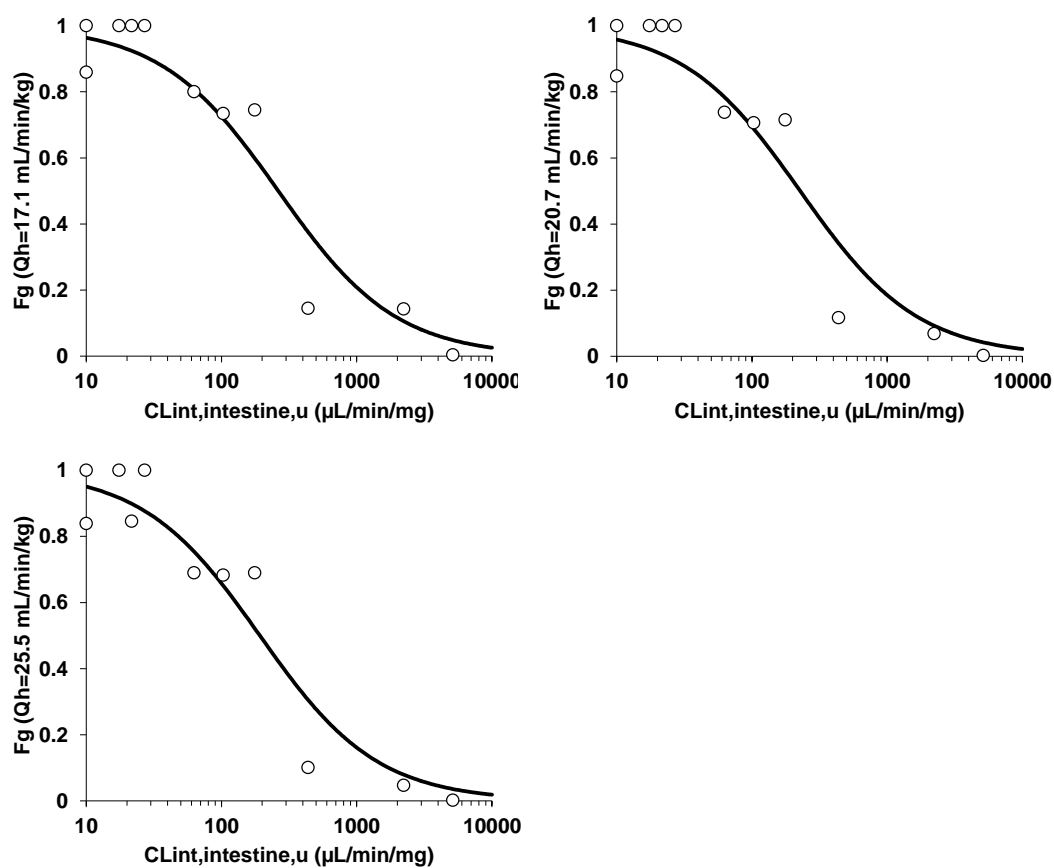


Figure 18. Correlation between human Fg and CL_{int,intestine,u} of high permeable UGT substrates. Solid lines were obtained by a fitting study with SIA model. These data were quoted from Nakamori et al., 2012.

Table16. Empirical scaling factor in SIA model for UGT substrates.

Metabolic parameter	Qh: 17.1	Qh: 20.7	Qh: 25.5
	mL/min/kg	mL/min/kg	mL/min/kg
CL _{int,intestine,u}	0.0038	0.0044	0.0052

These data were quoted from Nakamori et al., 2012.

総括

本研究では、創薬の非臨床段階におけるヒト腸管薬物代謝の予測法の開発を目的として CYP3A 基質化合物を用いて経験的および理論的アプローチの両面から検討を行い、以下の知見を得た。

- 1) CYP3A 基質化合物のラットとヒトの F_g には相関があり、経験的なアプローチとして、ラットからヒトの F_g を定性的に予測することが可能である。
- 2) 膜透過性が高い化合物の場合、腸管代謝における CYP3A と P-gp の協働作用の影響は小さく、理論的なアプローチとして、SIA モデルを用いてヒトの F_g を定量的に予測することが可能である。
- 3) ヒト肝ミクロソームにより算出される $CL_{int,liver}$ の値は、CYP3A による腸管代謝を受け易いか否かについて創薬の早期から推察する上で有用な指標となる。

本研究で得られた知見から、医薬品開発の非臨床段階における CYP3A 基質化合物のヒトの腸管薬物代謝の予測の流れを以下に示す (Figure 19)。PAMPA または Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 膜透過性評価において、膜透過性が高く $F_a=1$ が期待できる化合物については、SIA モデルの活用が可能と判断する。腸管代謝の寄与が大きいか否かについては、ヒト肝ミクロソームで算出された $CL_{int,liver}$ の値により推察が可能であるため、 $CL_{int,liver}$ の値から腸管代謝の寄与が無視できない可能性が高いと考えられる場合については、ヒト小腸ミクロソームを用いて *in vitro* 代謝試験を実施し、SIA モデルを用いて F_g を定量的に予測する。一方、膜透過性が低い化合物

物については SIA モデルを用いた予測は不適と判断し、ラットを用いて定性的な予測を行う。また、Fa が高くない可能性もあるため Fa の予測も行う必要があるが、ラットとヒトの Fa には良好な相関があることが報告されているため (Chiou and Barve, 1998, Zhao et al., 2003)、ラットの FaFg を P-S difference 法または indirect 法を用いて算出し、ヒトの FaFg を定性的に予測する。

これまでのヒトの F 予測の現状では、Fa に関しては、ラットの Fa または Caco-2 細胞や PAMPA により予測が可能であり、Fh に関しては、*in vitro-in vivo extrapolation* やキメラマウスの活用などにより予測が可能であった。一方、Fg に関しては、実際の創薬の現場で実用可能な予測法が確立されておらず、腸管で代謝されやすい化合物の場合、F を正確に予測することは困難であった。例えば、tacrolimus の場合、ヒトの Fh は 0.96-0.97 と非常に高いが、F は 0.18 と低い (Table 6)。Fa は非常に良好と予想されるため (Table 3, Figure 4)、tacrolimus の低い F の原因は腸管代謝にあると考えられ、Fg の予測を行わなければ予測と実測の間には大きな乖離が生じるものと考えられる。本研究の成果は、特に、tacrolimus のように、腸管で代謝されやすい化合物の F の予測性の向上に大きく貢献する。

薬物動態は作用部位における薬物濃度を支配しており、薬物の有効性および安全性と密接に関係している。そのため、臨床試験に導入する化合物を選択する非臨床段階で、医薬品候補化合物のヒトの薬物動態の予測を見誤ることにより、ヒトで期待した有効性や安全性が確認されず、医薬品開発が中止に追い込まれる場合もある。本研究の成果は、創薬の非臨床段階におけるヒト腸管薬物代謝予測法の開発を通じて、医薬品開発の臨床予測性を向上させ、医薬品開発の成功確立の向上に貢献するものとする。

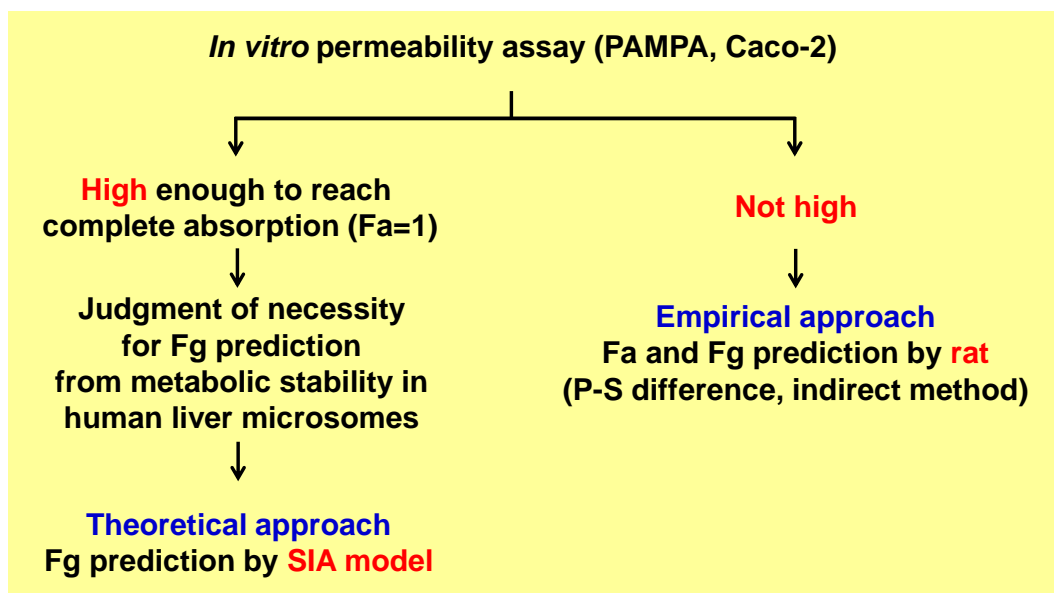


Figure 19. Proposed cascade for human Fg prediction for CYP3A substrates in drug discovery stage.

参考文献

- AKABANE, T., TABATA, K., KADONO, K., SAKUDA, S., TERASHITA, S. & TERAMURA, T. 2010. A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys. *Drug Metab Dispos*, 38, 308-16.
- BAARNHIELM, C., DAHLBACK, H. & SKANBERG, I. 1986. *In vivo* pharmacokinetics of felodipine predicted from *in vitro* studies in rat, dog and man. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 59, 113-22.
- BARTER, Z. E., BAYLISS, M. K., BEAUNE, P. H., BOOBIS, A. R., CARLILE, D. J., EDWARDS, R. J., HOUSTON, J. B., LAKE, B. G., LIPSCOMB, J. C., PELKONEN, O. R., TUCKER, G. T. & ROSTAMI-HODJEGAN, A. 2007. Scaling factors for the extrapolation of *in vivo* metabolic drug clearance from *in vitro* data: reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Curr Drug Metab*, 8, 33-45.
- BENET, L. Z., IZUMI, T., ZHANG, Y., SILVERMAN, J. A. & WACHER, V. J. 1999. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release*, 62, 25-31.
- CHEN, M., XU, D., HU, X. L. & WANG, H. 2008. Effects of liver fibrosis on verapamil pharmacokinetics in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35, 287-94.
- CHIBA, M., ISHII, Y. & SUGIYAMA, Y. 2009. Prediction of hepatic clearance in human from *in vitro* data for successful drug development. *AAPS J*, 11, 262-76.
- CHIOU, W. L. & BARVE, A. 1998. Linear correlation of the fraction of oral dose

- absorbed of 64 drugs between humans and rats. *Pharm Res*, 15, 1792-5.
- CHIOU, W. L. & BUEHLER, P. W. 2002. Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human. *Pharm Res*, 19, 868-74.
- CHIOU, W. L., JEONG, H. Y., CHUNG, S. M. & WU, T. C. 2000. Evaluation of using dog as an animal model to study the fraction of oral dose absorbed of 43 drugs in humans. *Pharm Res*, 17, 135-40.
- CREVOISIER, C., DELISLE, M. C., JOSEPH, I. & FOLETTI, G. 2003. Comparative single-dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. *Eur Neurol*, 49, 173-7.
- DALVIE, D., OBACH, R. S., KANG, P., PRAKASH, C., LOI, C. M., HURST, S., NEDDERMAN, A., GOULET, L., SMITH, E., BU, H. Z. & SMITH, D. A. 2009. Assessment of three human *in vitro* systems in the generation of major human excretory and circulating metabolites. *Chem Res Toxicol*, 22, 357-68.
- DAVIES, B. & MORRIS, T. 1993. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, 10, 1093-5.
- DILGER, K., HOFMANN, U. & KLOTZ, U. 2000. Enzyme induction in the elderly: effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propafenone. *Clin Pharmacol Ther*, 67, 512-20.
- EICHELBAUM, M., MIKUS, G. & VOGELGESANG, B. 1984. Pharmacokinetics of (+)-, (-)- and (+/-)-verapamil after intravenous administration. *Br J Clin Pharmacol*, 17, 453-8.
- FAULKNER, J. K., MCGIBNEY, D., CHASSEAUD, L. F., PERRY, J. L. &

- TAYLOR, I. W. 1986. The pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers after single intravenous and oral doses and after 14 repeated oral doses given once daily. *Br J Clin Pharmacol*, 22, 21-5.
- FISHER, M. B., PAINE, M. F., STRELEVITZ, T. J. & WRIGHTON, S. A. 2001. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev*, 33, 273-97.
- FLOREN, L. C., BEKERSKY, I., BENET, L. Z., MEKKI, Q., DRESSLER, D., LEE, J. W., ROBERTS, J. P. & HEBERT, M. F. 1997. Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther*, 62, 41-9.
- FUJIEDA, Y., YAMAOKA, K., ITO, T. & NAKAGAWA, T. 1996. Local absorption kinetics of levofloxacin from intestinal tract into portal vein in conscious rat using portal-venous concentration difference. *Pharm Res*, 13, 1201-4.
- FURUKAWA, T., NARITOMI, Y., TETSUKA, K., NAKAMORI, F., MORIGUCHI, H., YAMANO, K., TERASHITA, S., TABATA, K. & TERAMURA, T. 2014. Species differences in intestinal glucuronidation activities between humans, rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica*, 44, 205-16.
- GRASS, G. M. & SINKO, P. J. 2002. Physiologically-based pharmacokinetic simulation modelling. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 433-51.
- GREENBLATT, D. J., PFEIFER, H. J., OCHS, H. R., FRANKE, K., MACLAUGHLIN, D. S., SMITH, T. W. & KOCH-WESER, J. 1977. Pharmacokinetics of quinidine in humans after intravenous, intramuscular and oral administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 202, 365-78.

- GRUNDY, J. S., ELIOT, L. A. & FOSTER, R. T. 1997. Extrahepatic first-pass metabolism of nifedipine in the rat. *Biopharm Drug Dispos*, 18, 509-22.
- GUPTA, S. K., MANFRO, R. C., TOMLANOVICH, S. J., GAMBERTOGLIO, J. G., GAROVOY, M. R. & BENET, L. Z. 1990. Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol*, 30, 643-53.
- HARDMAN JG, L. L., MOLINOFF PB, RUDDON RW, AND GILMAN GA (EDS) (ed.) 1996. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed*, pp 1764, McGraw-Hill, New York.
- HAY, M., THOMAS, D. W., CRAIGHEAD, J. L., ECONOMIDES, C. & ROSENTHAL, J. 2014. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol*, 32, 40-51.
- HE, Y. L., MURBY, S., WARHURST, G., GIFFORD, L., WALKER, D., AYRTON, J., EASTMOND, R. & ROWLAND, M. 1998. Species differences in size discrimination in the paracellular pathway reflected by oral bioavailability of poly(ethylene glycol) and D-peptides. *J Pharm Sci*, 87, 626-33.
- HELLRIEGEL, E. T., BJORNSSON, T. D. & HAUCK, W. W. 1996. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies. *Clin Pharmacol Ther*, 60, 601-7.
- HIGUCHI, S. & SHIOBARA, Y. 1980. Comparative pharmacokinetics of nifedipine hydrochloride, a new vasodilator, in various species. *Xenobiotica*, 10, 447-54.
- HIRUNPANICH, V., KATAGI, J., SETHABOUPPHA, B. & SATO, H. 2006.

- Demonstration of docosahexaenoic acid as a bioavailability enhancer for CYP3A substrates: *in vitro* and *in vivo* evidence using cyclosporin in rats. *Drug Metab Dispos*, 34, 305-10.
- HOFFMAN, D. J., SEIFERT, T., BORRE, A. & NELLANS, H. N. 1995. Method to estimate the rate and extent of intestinal absorption in conscious rats using an absorption probe and portal blood sampling. *Pharm Res*, 12, 889-94.
- HOLTBECKER, N., FROMM, M. F., KROEMER, H. K., OHNHAUS, E. E. & HEIDEMANN, H. 1996. The nifedipine-rifampin interaction. Evidence for induction of gut wall metabolism. *Drug Metab Dispos*, 24, 1121-3.
- ITO, K., KUSUHARA, H. & SUGIYAMA, Y. 1999. Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption--theoretical approach. *Pharm Res*, 16, 225-31.
- IWATSUBO, T., HIROTA, N., OOIE, T., SUZUKI, H., SHIMADA, N., CHIBA, K., ISHIZAKI, T., GREEN, C. E., TYSON, C. A. & SUGIYAMA, Y. 1997a. Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. *Pharmacol Ther*, 73, 147-71.
- IWATSUBO, T., HIROTA, N., OOIE, T., SUZUKI, H. & SUGIYAMA, Y. 1996. Prediction of *in vivo* drug disposition from *in vitro* data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos*, 17, 273-310.
- IWATSUBO, T., SUZUKI, H., SHIMADA, N., CHIBA, K., ISHIZAKI, T., GREEN, C. E., TYSON, C. A., YOKOI, T., KAMATAKI, T. & SUGIYAMA, Y. 1997b. Prediction of *in vivo* hepatic metabolic clearance of YM796 from *in vitro* data by use of human liver microsomes and recombinant P-450 isozymes. *J Pharmacol Exp Ther*, 282, 909-19.

- IWATSUBO, T., SUZUKI, H. & SUGIYAMA, Y. 1997c. Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the *in vivo* metabolic clearance of YM796 by the liver from *in vitro* data. *J Pharmacol Exp Ther*, 283, 462-9.
- KATO, M., CHIBA, K., HISAKA, A., ISHIGAMI, M., KAYAMA, M., MIZUNO, N., NAGATA, Y., TAKAKUWA, S., TSUKAMOTO, Y., UEDA, K., KUSUHARA, H., ITO, K. & SUGIYAMA, Y. 2003. The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature. *Drug Metab Pharmacokinet*, 18, 365-72.
- KEMP, D. C., FAN, P. W. & STEVENS, J. C. 2002. Characterization of raloxifene glucuronidation *in vitro*: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metab Dispos*, 30, 694-700.
- KOSAKA, K., SAKAI, N., ENDO, Y., FUKUHARA, Y., TSUDA-TSUKIMOTO, M., OHTSUKA, T., KINO, I., TANIMOTO, T., TAKEBA, N., TAKAHASHI, M. & KUME, T. 2011. Impact of intestinal glucuronidation on the pharmacokinetics of raloxifene. *Drug Metab Dispos*, 39, 1495-502.
- KOSOGLOU, T., STATKEVICH, P., JOHNSON-LEVONAS, A. O., PAOLINI, J. F., BERGMAN, A. J. & ALTON, K. B. 2005. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. *Clin Pharmacokinet*, 44, 467-94.
- KUPFERSCHMIDT, H. H., HA, H. R., ZIEGLER, W. H., MEIER, P. J. & KRAHENBUHL, S. 1995. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 58, 20-8.
- LEBREC, D. & BLANCHET, L. 1985. Effect of two models of portal hypertension on splanchnic organ blood flow in the rat. *Clin Sci (Lond)*,

68, 23-8.

LIN, J. H., SUGIYAMA, Y., AWAZU, S. & HANANO, M. 1982. Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained *in vitro* as well as on physiological data. *J Pharmacokinet Biopharm*, 10, 649-61.

MANDEMA, J. W., TUKKER, E. & DANHOF, M. 1991.

Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the EEG effects of midazolam in individual rats: influence of rate and route of administration. *Br J Pharmacol*, 102, 663-8.

MASICA, A. L., MAYO, G. & WILKINSON, G. R. 2004. *In vivo* comparisons of constitutive cytochrome P450 3A activity assessed by alprazolam, triazolam, and midazolam. *Clin Pharmacol Ther*, 76, 341-9.

MCALLISTER, R. G., JR. & KIRSTEN, E. B. 1982. The pharmacology of verapamil. IV. Kinetic and dynamic effects after single intravenous and oral doses. *Clin Pharmacol Ther*, 31, 418-26.

MIZUMA, T. 2009. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *Int J Pharm*, 378, 140-1.

MOLLER, A., IWASAKI, K., KAWAMURA, A., TERAMURA, Y., SHIRAGA, T., HATA, T., SCHAFER, A. & UNDRE, N. A. 1999. The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos*, 27, 633-6.

MOULY, S. & PAINE, M. F. 2003. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res*, 20, 1595-9.

- MUSTHER, H., OLIVARES-MORALES, A., HATLEY, O. J., LIU, B. & ROSTAMI HODJEGAN, A. 2014. Animal versus human oral drug bioavailability: do they correlate? *Eur J Pharm Sci*, 57, 280-91.
- NAKAMORI, F., NARITOMI, Y., HOSOYA, K., MORIGUCHI, H., TETSUKA, K., FURUKAWA, T., KADONO, K., YAMANO, K., TERASHITA, S. & TERAMURA, T. 2012. Quantitative prediction of human intestinal glucuronidation effects on intestinal availability of UDP-glucuronosyltransferase substrates using *in vitro* data. *Drug Metab Dispos*, 40, 1771-7.
- NARITOMI, Y., TERASHITA, S., KAGAYAMA, A. & SUGIYAMA, Y. 2003. Utility of hepatocytes in predicting drug metabolism: comparison of hepatic intrinsic clearance in rats and humans *in vivo* and *in vitro*. *Drug Metab Dispos*, 31, 580-8.
- NARITOMI, Y., TERASHITA, S., KIMURA, S., SUZUKI, A., KAGAYAMA, A. & SUGIYAMA, Y. 2001. 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*, 29, 1316-24.
- OBACH, R. S. 1996. The importance of nonspecific binding in *in vitro* matrices, its impact on enzyme kinetic studies of drug metabolism reactions, and implications for *in vitro-in vivo* correlations. *Drug Metab Dispos*, 24, 1047-9.
- OBACH, R. S. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos*, 27, 1350-9.

- OHNO, S. & NAKAJIN, S. 2009. Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos*, 37, 32-40.
- PAINE, M. F., HART, H. L., LUDINGTON, S. S., HAINING, R. L., RETTIE, A. E. & ZELDIN, D. C. 2006. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*, 34, 880-6.
- RAKHIT, A., HOLFORD, N. H., GUENTERT, T. W., MALONEY, K. & RIEGELMAN, S. 1984. Pharmacokinetics of quinidine and three of its metabolites in man. *J Pharmacokinet Biopharm*, 12, 1-21.
- RANE, A., WILKINSON, G. R. & SHAND, D. G. 1977. Prediction of hepatic extraction ratio from *in vitro* measurement of intrinsic clearance. *J Pharmacol Exp Ther*, 200, 420-4.
- RITTER, J. K. 2007. Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drugs and xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3, 93-107.
- ROBERTS, M. S. & ROWLAND, M. 1986. Correlation between *in vitro* microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics: analysis with a dispersion model. *J Pharm Pharmacol*, 38, 177-81.
- ROBINSON, M. A. & MEHVAR, R. 1996. Enantioselective distribution of verapamil and norverapamil into human and rat erythrocytes: the role of plasma protein binding. *Biopharm Drug Dispos*, 17, 577-87.
- SAKUDA, S., AKABANE, T. & TERAMURA, T. 2006. Marked species differences in the bioavailability of midazolam in cynomolgus monkeys and humans. *Xenobiotica*, 36, 331-40.

- SANO, S., HORIGUCHI, A., SUGIHARA, K., KOTAKE, Y., TAYAMA, Y., OHSHITA, H., TATENO, C., HORIE, T., KITAMURA, S. & OHTA, S. 2012a. Prediction of *in vivo* hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos*, 40, 322-8.
- SANO, S., HORIGUCHI, A., SUGIHARA, K., KOTAKE, Y., TAYAMA, Y., URAMARU, N., OHSHITA, H., TATENO, C., HORIE, T., KITAMURA, S. & OHTA, S. 2012b. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 40, 2267-72.
- SANO, S., NOZAKI, K., MURAI, H., TERASHITA, S., TERAMURA, T. & OHTA, S. 2012c. Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 40, 76-82.
- SHIBATA, Y., TAKAHASHI, H., CHIBA, M. & ISHII, Y. 2002. Prediction of hepatic clearance and availability by cryopreserved human hepatocytes: an application of serum incubation method. *Drug Metab Dispos*, 30, 892-6.
- SMITH, R. B., KROBOTH, P. D., VANDERLUGT, J. T., PHILLIPS, J. P. & JUHL, R. P. 1984. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam after oral and IV administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 84, 452-6.
- STOPHER, D. A., BERESFORD, A. P., MACRAE, P. V. & HUMPHREY, M. J. 1988. The metabolism and pharmacokinetics of amlodipine in humans and animals. *J Cardiovasc Pharmacol*, 12 Suppl 7, S55-9.
- TABATA, K., YAMAOKA, K., FUKUYAMA, T. & NAKAGAWA, T. 1995.

Evaluation of intestinal absorption into the portal system in enterohepatic circulation by measuring the difference in portal-venous blood concentrations of diclofenac. *Pharm Res*, 12, 880-3.

TAKAHASHI, M., WASHIO, T., SUZUKI, N., IGETA, K., FUJII, Y., HAYASHI, M., SHIRASAKA, Y. & YAMASHITA, S. 2008. Characterization of gastrointestinal drug absorption in cynomolgus monkeys. *Mol Pharm*, 5, 340-8.

TAKAHASHI, M., WASHIO, T., SUZUKI, N., IGETA, K. & YAMASHITA, S. 2009. The species differences of intestinal drug absorption and first-pass metabolism between cynomolgus monkeys and humans. *J Pharm Sci*, 98, 4343-53.

TATENO, C., YOSHIZANE, Y., SAITO, N., KATAOKA, M., UTOH, R., YAMASAKI, C., TACHIBANA, A., SOENO, Y., ASAHINA, K., HINO, H., ASAHARA, T., YOKOI, T., FURUKAWA, T. & YOSHIZATO, K. 2004. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol*, 165, 901-12.

THUMMEL, K. E., O'SHEA, D., PAINE, M. F., SHEN, D. D., KUNZE, K. L., PERKINS, J. D. & WILKINSON, G. R. 1996. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther*, 59, 491-502.

TSUNODA, S. M., VELEZ, R. L., VON MOLTKE, L. L. & GREENBLATT, D. J. 1999. Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an *in vivo* probe: effect of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther*, 66, 461-71.

TUKEY, R. H. & STRASSBURG, C. P. 2001. Genetic multiplicity of the human

- UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol*, 59, 405-14.
- WACHER, V. J., WU, C. Y. & BENET, L. Z. 1995. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog*, 13, 129-34.
- WANG, Y., ROY, A., SUN, L. & LAU, C. E. 1999. A double-peak phenomenon in the pharmacokinetics of alprazolam after oral administration. *Drug Metab Dispos*, 27, 855-9.
- WARD, K. W. & SMITH, B. R. 2004. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans. I. Clearance. *Drug Metab Dispos*, 32, 603-11.
- WIENKERS, L. C. & HEATH, T. G. 2005. Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 825-33.
- WILKINSON, G. R. 1987. Clearance approaches in pharmacology. *Pharmacol Rev*, 39, 1-47.
- WILLIAMS, J. A., HYLAND, R., JONES, B. C., SMITH, D. A., HURST, S., GOOSEN, T. C., PETERKIN, V., KOUP, J. R. & BALL, S. E. 2004. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, 32, 1201-8.
- WU, B., KULKARNI, K., BASU, S., ZHANG, S. & HU, M. 2011. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci*, 100, 3655-81.

- WU, C. Y., BENET, L. Z., HEBERT, M. F., GUPTA, S. K., ROWLAND, M.,
GOMEZ, D. Y. & WACHER, V. J. 1995. Differentiation of absorption and
first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with
cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*, 58, 492-7.
- YAMAOKA, K., TANIGAWARA, Y., NAKAGAWA, T. & UNO, T. 1981. A
pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J*
Pharmacobiodyn, 4, 879-85.
- ZHANG, L., ZUO, Z. & LIN, G. 2007. Intestinal and hepatic glucuronidation of
flavonoids. *Mol Pharm*, 4, 833-45.
- ZHANG, Q. Y., DUNBAR, D., OSTROWSKA, A., ZEISLOFT, S., YANG, J. &
KAMINSKY, L. S. 1999. Characterization of human small intestinal
cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos*, 27, 804-9.
- ZHAO, Y. H., ABRAHAM, M. H., LE, J., HERSEY, A., LUSCOMBE, C. N.,
BECK, G., SHERBORNE, B. & COOPER, I. 2003. Evaluation of rat
intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption.
Eur J Med Chem, 38, 233-43.
- ZHOU, Y. N., ZHANG, B. K., LI, J., ZUO, X. C., YUAN, H., YANG, G. P.,
CHENG, Z. N., LIU, Z., LI, P. J., TAN, H. Y., ZHOU, L. Y., WANG, C. J.
& YANG, M. 2013. Effect of amlodipine on the pharmacokinetics of
tacrolimus in rats. *Xenobiotica*, 43, 699-704.
- ZHU, C., JIANG, L., CHEN, T. M. & HWANG, K. K. 2002. A comparative study
of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of
drug absorption potential. *Eur J Med Chem*, 37, 399-407.
- ZIMMERMANN, C., GUTMANN, H., HRUZ, P., GUTZWILLER, J. P.,
BEGLINGER, C. & DREWE, J. 2005. Mapping of multidrug resistance

gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab Dispos*, 33, 219-24.

謝辞

終わりに臨み、本論文の作成にあたり終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院 生命環境科学研究科 繁森 英幸 教授、王 碧昭 教授、中村 幸治 教授、山田 小須弥 准教授に哀心より感謝の意を表します。

本論文の作成の機会を与えられ、御便宜を賜りましたアステラス製薬株式会社 薬物動態研究所 所長 田端 健司 博士、薬物動態研究推進室 室長 荒井 寛 氏に深甚なる謝意を表します。

本研究に際しまして有益なご助言を賜りましたアステラス製薬株式会社 旧創薬推進研究所（現薬物動態研究所） 前所長 寺村 俊夫 博士、創薬代謝研究室 前室長 寺下 茂之 博士、薬物動態研究所 薬物動態研究推進室 成冨 洋一 博士に深謝致します。

本研究はアステラス製薬株式会社 旧創薬推進研究所および薬物動態研究所の多くの皆様に恵まれて遂行できたものであり、ここに厚くお礼申し上げます。

最後に、常に励ましてくれた妻に心から感謝します。

発表論文目録

KADONO, K., AKABANE, T., TABATA, K., GATO, K., TERASHITA, S. & TERAMURA, T. 2010. Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor. *Drug Metab Dispos*, 38, 1230-7.

KADONO, K., KOAKUTSU, A., NARITOMI, Y., TERASHITA, S., TABATA, K. & TERAMURA, T. 2014. Comparison of intestinal metabolism of CYP3A substrates between rats and humans: application of portal-systemic concentration difference method. *Xenobiotica*, 44, 511-21.