

学位論文

ラットを用いた薬物の消化管吸収におけるシトクロム P450 3A、
P-糖蛋白質及び乳癌耐性蛋白質の寄与を評価する方法に関する研究

2020年9月

鈴木 敬

目次	
略号表	3
序論	4
第1章 ラット消化管 CYP3A 選択的阻害薬としてのベルガモチンの有用性	11
1.1 小序	11
1.2 実験材料及び方法	12
1.2.1 被験物質及び試薬	12
1.2.2 動物	12
1.2.3 ラットを用いた <i>in vivo</i> 薬物動態試験	13
1.2.4 ラット CYP3A2 活性に対するベルガモチンの <i>in vitro</i> 阻害作用の評価	14
1.2.5 ベルガモチンのラット血漿中非結合型分率 ($f_{u,p}$) の算出	14
1.2.6 LC-MS/MS による測定	15
1.2.7 データ解析	15
1.3 結果	16
1.3.1 ラットにおいてベルガモチンを同時投与したときの CYP3A 及び P-gp 活性に対する影響	16
1.3.2 ラットにベルガモチンを投与してから2時間後の CYP3A 及び P-gp 活性に対する影響	18
1.3.3 CYP3A に対するベルガモチンの MBI パラメータの算出及びベルガモチンの血漿中濃度推移の評価	20
1.4 考察	22
1.5 小括	24
第2章 ラット消化管 P-gp 選択的阻害薬としてのエラクリダルの有用性、及びエラクリダルを用いた既存薬の評価	26
2.1 小序	26
2.2 実験材料及び方法	28
2.2.1 被験物質及び試薬	28
2.2.2 動物	28
2.2.3 ラットを用いた <i>in vivo</i> 薬物動態試験	28

2.2.4	LC-MS/MS による測定	30
2.2.5	データ解析	30
2.3	結果	31
2.3.1	ラットにおける P-gp 及び CYP3A 活性に対するエラクリダルの影響	31
2.3.2	ラットにおける既存薬の消化管吸収に対するエラクリダルの影響	32
2.3.3	ラットにおける消化管 P-gp 活性に対する既存薬の影響	34
2.4	考察	35
2.5	小括	38
第3章	ラット消化管 Bcrp 選択的阻害薬としてのノボビオシンの有用性	40
3.1	小序	40
3.2	実験材料及び方法	41
3.2.1	被験物質及び試薬	41
3.2.2	動物	42
3.2.3	ラットを用いた <i>in vivo</i> 薬物動態試験	42
3.2.4	ラット CYP3A2 活性に対するノボビオシンの <i>in vitro</i> 阻害作用の評価	43
3.2.5	ノボビオシンのラット血漿中非結合型分率 ($f_{u,p}$) の算出	43
3.2.6	LC-MS/MS による測定	44
3.2.7	データ解析	44
3.3	結果	45
3.3.1	ラットにおけるプローブ基質薬の体内動態に対するノボビオシンの影響	45
3.3.2	ラット CYP3A2 活性に対するノボビオシンの <i>in vitro</i> 阻害作用の評価	49
3.4	考察	49
3.5	小括	51
	総括	53
	参考文献	55
	謝辞	61

略号表

本論文では以下の略号を用いた。

AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-inf}	0 から無限大時間までの AUC
AUC _{0-t}	0 から t 時間後までの AUC
BCRP	ヒト乳癌耐性蛋白質
Bcrp	ラット乳癌耐性蛋白質
CL _{tot}	全身クリアランス
C _{max}	最高血漿中濃度
CYP	シトクロム P450
CV	変動係数
DMSO	ジメチルスルホキシド
F	バイオアベイラビリティ
F _a	消化管吸収率
F _g	消化管アベイラビリティ
F _h	肝アベイラビリティ
f _{u,p}	血漿中非結合型分率
GFJ	グレープフルーツジュース
I	阻害薬濃度
IC ₅₀	50%阻害濃度
IS	内部標準物質
k _{deg}	分解速度定数
k _e	消失速度定数
K _I	最大不活性化速度の 50%の不活性化をもたらす阻害剤の濃度
k _{inact}	最大不活性化速度定数
K _m	ミカエリス・メンテン定数
k _{obs}	見かけの不活性化速度定数
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
MBI	Mechanism-based inhibition (不可逆的阻害)
OATP	ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド
Oatp	ラット有機アニオン輸送ポリペプチド
P-gp	P-糖蛋白質
T _{max}	最高血漿中濃度到達時間
t _{1/2}	消失半減期
Vd _{ss}	定常状態における分布容積

序論

新薬開発において、低分子薬の多くが経口剤として開発される。経口投与された医薬品が全身循環に到達するためには、消化管内で溶解した後に、消化管上皮細胞膜を透過し、消化管及び肝臓での代謝を免れる必要がある (Figure 1)。肝臓は薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターの発現量が高く、解毒臓器として知られているが、消化管上皮細胞にも同様に、薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (cytochrome P450、CYP) 3A、並びに薬物トランスポーターである P-糖蛋白質 (P-glycoprotein、P-gp) 及び乳癌耐性蛋白質 (breast cancer resistant protein、BCRP) 等が発現しており (Figure 2)、これらが生体防御機構として働くことにより薬物の消化管吸収が制限され、生物学的利用率が低下することがある。

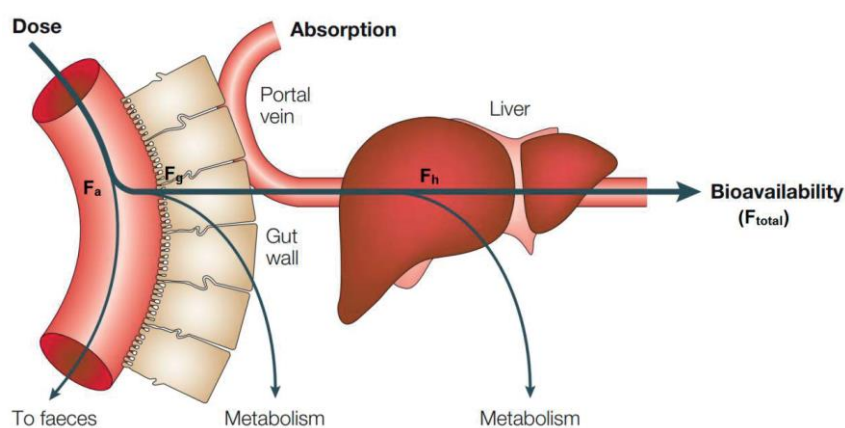


Figure 1. First-pass effects of orally administered drugs. This figure was cited from Nat Rev Drug Discov. 2003; 2(3): 192-204.

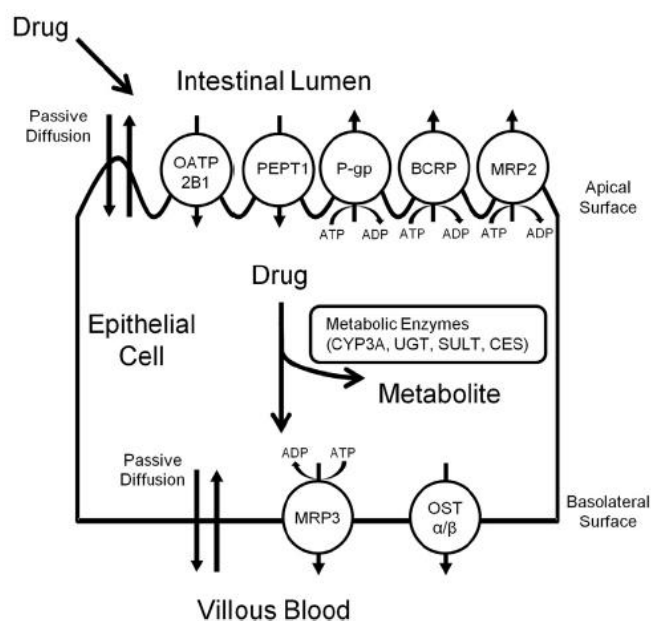


Figure 2. Metabolizing enzymes and transporters expressed in intestinal epithelial cells. The figure was cited from J Pharm Sci. 2016 Feb;105(2):431-442.

近年の創薬研究の一般的な流れとして、ハイスループットスクリーニング (HTS) により創薬標的に対するヒット化合物を見出した後に、合成展開により *in vitro* 薬理活性を向上させてリード化合物を創出し、さらにリード化合物を最適化することにより、複数の候補化合物の中から開発候補化合物を選定し、Phase 1 臨床試験へと進む。リード化合物の段階では、非臨床薬物動態試験において最も汎用される動物種であるラットにおいて、その経口吸収性が低い等、不良な薬物動態プロファイルに直面することがしばしばある。ヒトにおいても経口吸収性が低い場合には、①併用薬による薬物相互作用を受けやすい。②個体間変動が大きくなる。③投与量の増加に伴う製造コストの増加等の課題が生じる可能性が高くなると考えられる。そのため、ヒトにおいて高い経口吸収性が期待されるプロファイルとなるようにリード化合物を合成展開により薬物動態最適化する必要があり、そのためには、様々な原因が考えられる中で、新薬候補化合物の経口吸収性が低い原因を究明する必要があると考えられる。

ヒト及びラットに経口投与したときのバイオアベイラビリティ (F) には種差があることが報告されている (Figure 3) ¹。F は消化管吸収率 (F_a)、消化管アベイラビリティ (F_g) 及び肝アベイラビリティ (F_h) の積、 $F = F_a \times F_g \times F_h$ として表される。 $F_a \times F_g$ に着目した場合、 $F_a \times F_g$ のラット・ヒト間の相関性は高く、種差は小さいことが報告

されている (Figure 4) ²⁴。そのため、ラットにおいて $F_a \times F_g$ が低かった際にはヒトにおいても $F_a \times F_g$ が低く、経口吸収性が低くなる可能性が高いと考えられる。 $F_a \times F_g$ が低下する生物学的原因としては、低膜透過性、CYP3A による初回通過代謝、並びに P-gp 及び Bcrp による汲み出しが主に挙げられ、合成展開により $F_a \times F_g$ を改善するためには、上記のいずれが原因であるかを究明する必要がある。膜透過性については、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 膜透過性試験等の確立した評価方法があることから、膜透過性が原因であるかを判断することは比較的容易である。一方、CYP3A による消化管代謝については、ラット小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験より得られた代謝固有クリアランスからのラット F_g の予測精度は低いことが報告されており ⁴、*in vitro* 代謝試験のデータから CYP3A による初回通過代謝が原因であるかを判断することは困難であると考ええる。さらに、P-gp 及び Bcrp による汲み出しについても、P-gp 及び Bcrp 発現細胞を用いることにより、評価化合物がこれら薬物トランスポーターの基質になるかを評価することは可能であるものの、*in vitro* 試験のデータから *in vivo* でどの程度の寄与があるかを予測する方法論に関する報告はこれまでない。したがって、ラットにおける経口吸収性の低い原因がいずれであるかを *in vivo* で究明できることが望ましい。*In vivo* での評価方法としては、CYP3A、P-gp 及び Bcrp 遺伝子欠損ラットを用いる方法が挙げられるが、他の薬物代謝酵素又は薬物トランスポーターの代償的な発現により、CYP3A、P-gp 及び Bcrp の正味の寄与を評価することは困難であると考えられる。

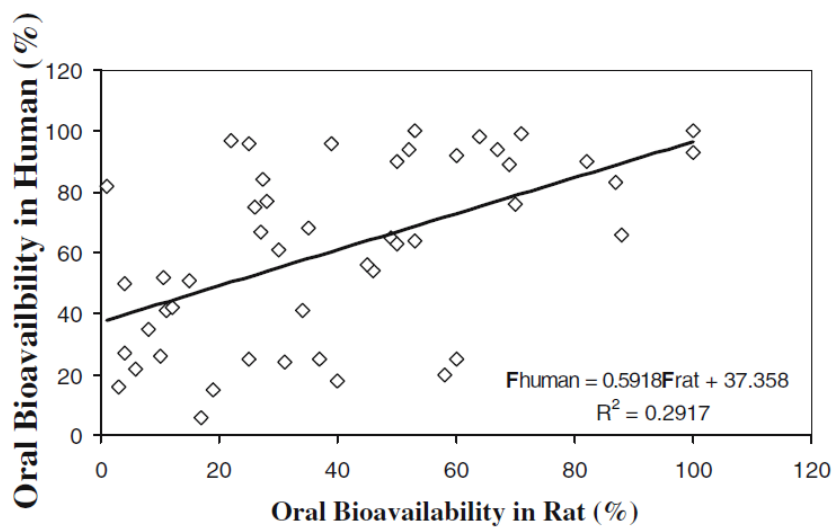


Figure 3. Correlation between oral bioavailability of rat and that of human. The figure was cited from Pharm Res. 2006 Aug;23(8):1675-86.

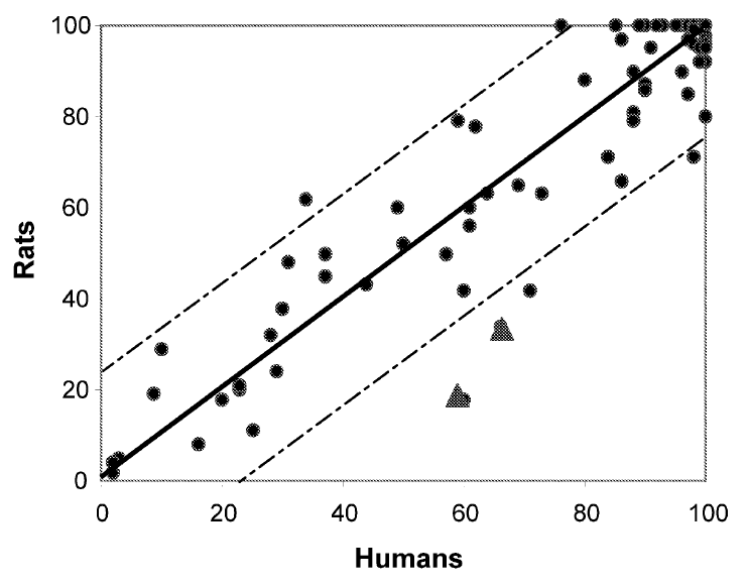


Figure 4. Correlation of $F_a \times F_g$ between rat and human. The figure was cited from Eur J Med Chem. 2003 Mar;38(3):233-43.

例えば、新薬候補化合物のラットにおける消化管吸収が低い場合、CYP3A による初回通過代謝が原因であるかを究明する方法として、新薬候補化合物を CYP3A 阻害薬

と併用したときの AUC 及び C_{\max} の上昇率から、CYP3A による初回通過代謝が原因であるかを評価することが可能である。しかしながら、ケトコナゾールに代表される CYP3A 阻害薬は^{5,6}、消化管 CYP3A 活性だけではなく、肝臓 CYP3A 活性をも阻害することが報告されている⁷。そのため、ケトコナゾール併用下における評価化合物の AUC 及び C_{\max} の上昇は、消化管 CYP3A のみならず肝臓 CYP3A 阻害にも起因することから、経口投与の試験のみから評価化合物の消化管吸収における CYP3A の寄与を評価することは困難である。CYP3A だけではなく、多くの P-gp 及び BCRP 阻害薬も消化管選択性が低いことから、 $F_a \times F_g$ に対する阻害薬の影響を抽出するためには、式①～③より、評価化合物の $F_a \times F_g$ を算出する必要がある。

$$\text{式① } CL_h = CL_{\text{tot}} - CL_R$$

$$\text{式② } F_h = 1 - \frac{CL_h}{Q_h}$$

$$\text{式③ } F_a \times F_g = \frac{F}{F_h}$$

本方法より $F_a \times F_g$ を算出するためには、阻害薬の併用下及び非併用下における評価化合物の全身クリアランス (CL_h) 及び腎クリアランス (CL_R) の数値が必要であり、それぞれ静脈内投与試験及び尿中排泄率試験が必要となる。さらに、ラットの肝血流量 (Q_h) は 60~80 mL/min/kg として報告されているが、特に CL_h の高い化合物では、 $F_a \times F_g$ の数値は用いる Q_h の数値による影響を強く受け、 $F_a \times F_g$ の算出精度の低下を引き起こすことが報告されている⁸。よって、消化管選択性及び標的選択性の高い阻害薬があれば、経口投与時の評価化合物の AUC 及び C_{\max} が阻害薬によりどの程度変化するかを評価することのみで、消化管吸収率の低い原因が CYP3A、P-gp 及び Bcrp のいずれであるかを簡便に評価することが可能になると考えられる。

グレープフルーツジュースの成分であるベルガモチンは、強力な CYP3A 阻害作用を有し、その阻害機序は mechanism-based inhibition (MBI) であることが報告されている^{9,10}。MBI とは、阻害薬が CYP により代謝を受けると、生成した反応性中間体が CYP 活性部位に共有結合し、CYP が新たに生成するまでその代謝活性を持続的に阻害する機序である。よって、ベルガモチンは P-gp 阻害作用を有するものの¹¹、投与して

から数時間経過することでベルガモチンの消化管内からの消失に伴い、ベルガモチンによる P-gp 阻害作用は消失する一方、CYP3A 阻害は残存する可能性が考えられた。さらに、グレープフルーツジュースによる CYP3A 阻害を介した薬物相互作用は消化管選択的であると考えられていることから、ベルガモチンは消化管 CYP3A 選択的阻害薬となり得ると期待される。また、P-gp 阻害薬として報告されているエラクリダルは、強力な P-gp 阻害作用を有する一方、CYP3A4 阻害作用は弱いこと、さらに消化管吸収性が極めて低いことが報告されていることから^{12,13}、消化管 P-gp 選択的阻害薬になる得ると期待される。Bcrp 阻害薬として報告されているノボビオシンは、高用量（50 mg/kg）を経口投与したときには消化管だけではなく肝臓及び腎臓等の Bcrp を阻害することが報告されている¹⁴。経口投与の場合には循環血漿中濃度と比較して消化管内濃度はより高濃度になることが予想されることから、ノボビオシンをより低用量とし、循環血漿中濃度を低濃度に抑えることで、消化管 Bcrp 選択的阻害薬となり得る可能性が期待される。

本研究では、新薬候補化合物の消化管吸収率が低かった際に、その原因が CYP3A、P-gp 及び Bcrp のいずれであるかを既存方法と比較してより効率的に究明する上で、ベルガモチン、エラクリダル及びノボビオシンが消化管 CYP3A、P-gp 及び Bcrp 選択的阻害薬としてそれぞれ有用であるかを検討した。

なお、本研究で用いた CYP3A、P-gp、Bcrp 及び organic anion transporting polypeptide (Oatp) のプローブ基質薬の一覧を Table 1 に示す。各プローブ基質薬の投与量は公表論文を参考とした。詳細は各章に記載した。

Table 1. ラットにおける CYP3A、P-gp、Bcrp 及び Oatp のプローブ基質薬の一覧

標的分子	化合物名	適応	投与量	ラットにおける体内動態
CYP3A	ブスピロン	抗うつ	1mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> • そのほとんどがCYP3Aによる代謝により消失する。 • 消化管において約60%が代謝を受ける。
	ミダゾラム	鎮静		
P-gp	フェキソフェナジン	抗アレルギー	5mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> • ほとんど代謝を受けない。 • P-gp阻害剤との併用でAUCが約3倍に上昇する。 • P-gp以外の薬物トランスポーターの基質にもなる。
Bcrp	スルファサラジン	潰瘍性大腸炎	5mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> • BcrpノックアウトラットでAUCが23.1倍に上昇する。 • 腸内細菌により、メサラジンとスルファピリジンに代謝される。
Oatp	ボセンタン	肺高血圧	1mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> • Oatp阻害剤との併用でAUCが約10倍に上昇する。

第1章 ラット消化管 CYP3A 選択的阻害薬としてのベルガモチンの有用性

1.1 小序

CYP3A はヒトにおいて肝臓だけではなく、消化管においても最も発現比が高い CYP 分子種であり、医薬品の消化管初回通過代謝に重要な役割を果たしている。ラットにおいても、CYP3A は消化管に発現しており、ヒトと同様に複数の CYP3A の基質となる医薬品が消化管代謝を受けることが報告されている^{4,8,15}。

グレープフルーツジュース (GFJ) には CYP3A4 阻害作用があり、併用した CYP3A4 で代謝される汎用医薬品の血漿中濃度を上昇させることが報告されている¹⁶⁻²⁰。一方、GFJ は併用した CYP3A4 基質薬の消失半減期及び全身クリアランスに対してほとんど影響を及ぼさないことが報告されていることから、GFJ による CYP3A4 阻害は肝臓ではなく消化管で起こっていると考えられている^{17,18}。そのため、GFJ は消化管選択性が高いことが期待される CYP3A 阻害薬であると言える。GFJ に含まれる成分としてこれまで数百種類が同定されており、CYP3A4 阻害作用を示す複数の成分が報告されている^{9,10}。その中でもベルガモチンは主要成分であり、強力な CYP3A4 阻害作用を有することから、消化管 CYP3A4 阻害を介したグレープフルーツジュースによる相互作用の主要な原因物質であると考えられている^{9,10}。一方、ベルガモチンは他の CYP3A4 阻害薬と同様に P-gp 阻害作用も有し、ラット *in vivo* において併用した P-gp 基質薬タリノロールの血漿中濃度を上昇させることが報告されている¹¹。しかしながら、ベルガモチンの CYP3A4 阻害機序は MBI と呼ばれる不可逆的阻害であることが報告されており^{9,10}、その阻害作用は CYP3A4 が新しく生成するまで持続すると考えられるのに対して、ベルガモチンの P-gp に対する阻害機序は不可逆的であることは報告されていないことから、一過性阻害であると視察した。よって、ベルガモチンは投与直後では、消化管 CYP3A だけではなく、消化管 P-gp をも阻害するものの、時間経過とともにベルガモチンによる消化管 P-gp 阻害作用は消失し、消化管 CYP3A 阻害のみが持続するものと期待される。実際に、P-gp 阻害作用については不明ではあるものの、シンバスタチンの体内動態に対する GFJ の阻害作用は 3 日間持続することが報告されている²¹。したがって、ベルガモチンはラットにおいて新薬候補化合物の消化管吸収性の低い原因が、CYP3A を介した消化管初回通過代謝であるかを簡便に評価することが可能にすることが期待された。そこで本研究では、評価化合物の消化管吸収におけ

る CYP3A を介した初回通過代謝を簡便に評価する上で、ベルガモチンが有用であるかを評価することを目的とした。

本研究では、CYP3A 及び P-gp のプローブ基質薬としてそれぞれブスピロン及びフェキソフェナジンをを用いた。ブスピロンは CYP3A の基質となるが、P-gp の基質薬とはならない化合物である。ブスピロンは、ラットにおいて CYP3A 阻害薬であるケトコナゾール及びリトナビルと併用することによって、経口投与後のブスピロンの AUC_{0-t} はそれぞれ 7.4 倍及び 12.8 倍に上昇することが報告されている²²。さらに、門脈カニューレラットにおけるブスピロンの F_g は 0.4 と報告されていることから⁸、ブスピロンは肝臓だけではなく消化管においても CYP3A による代謝を著しく受けると考えられる。よって、ブスピロンはラットにおいて肝臓及び消化管における CYP3A 代謝を評価する上で有用なプローブとされている。一方、フェキソフェナジンは P-gp のプローブ基質薬としてよく知られており、ラットに静脈内投与するとそのほとんどが未変化体として尿中及び糞中に回収されることから^{23,24}、P-gp による輸送活性を評価する上で理想的なプローブであるとされている。実際に、ラットにおいて典型的な P-gp 阻害薬であるケトコナゾールと併用することにより、経口投与後のフェキソフェナジンの AUC は約 3 倍に上昇することが報告されていることから²⁴、フェキソフェナジンはラット *in vivo* において P-gp 活性を評価する上で有用であると言える。

1.2 実験材料及び方法

1.2.1 被験物質及び試薬

ブスピロン塩酸塩、フレカイニド酢酸塩及び 1'-ヒドロキシトリアゾラムはシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より購入した。フェキソフェナジン塩酸塩は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) より購入した。ベルガモチンは INDOFINE Chemical Company (Somerville, NJ, USA) より購入した。トリアゾラムは富士フィルム和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。プールド Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット肝ミクロソーム及び NADPH Regenerating System は Corning (Corning, NY, USA) より購入した。その他の試薬は特級試薬以上のものを使用した。

1.2.2 動物

SD系雄性ラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) は8週齢 (体重: 約250 g) で使用した。動物は12時間の明暗サイクルの下で飼育され、標準的な飼料と水道水を自由に摂取した。動物実験プロトコルは、トーアエイヨー株式会社の動物実験委員会により承認された。

1.2.3 ラットを用いた *in vivo* 薬物動態試験

すべての動物は投与前約18時間絶食した。各群は3例で実施した。ブスピロン及びフェキソフェナジンの経口投与製剤は、ブスピロン塩酸塩及びフェキソフェナジン塩酸塩を0.5%メチルセルロース溶液にそれぞれ溶解及び懸濁させて調製した (投与液濃度はそれぞれフリー体として0.2及び1 mg/mL)。ベルガモチンの経口投与製剤は、ベルガモチンをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後に0.5%メチルセルロース溶液に懸濁して調製した (投与液濃度は0.5 mg/mL、DMSO終濃度は5%)。ベルガモチンと各プローブ基質薬を同時に投与する試験では、ブスピロン (1 mg/kg) 及びフェキソフェナジン (5 mg/kg) を溶媒またはベルガモチン (2.5 mg/kg) と同時にそれぞれ経口投与した。ベルガモチンを投与してから2時間後に各プローブ基質薬を投与する試験では、溶媒またはベルガモチン (2.5 mg/kg) を経口投与してから2時間後に上記の基質薬を同一用量にてそれぞれ経口投与した。各群は5~6例で実施した。静脈内投与試験におけるブスピロンの投与製剤は、ブスピロン塩酸塩をPBSに溶解して調製した (投与液濃度はフリー体として0.15 mg/mL)。溶媒またはベルガモチン (2.5 mg/kg) を経口投与してから2時間後に、ブスピロン (0.3 mg/kg) をラットに尾静脈より静脈内投与した。なお、投与容量は経口及び静脈内投与でそれぞれ5及び2 mL/kgとした。

動物は投与後4時間から給餌を開始し、採血は経口投与では投与後0.083、0.25、0.5、1、2、4、6及び8時間に、静脈内投与では投与後0.083、0.25、0.5、1、2、4及び6時間に実施した。

経口投与したときのベルガモチンの血漿中濃度推移を評価するため、ベルガモチン (2.5 mg/kg) を経口投与後、上記と同一の採血時点においてイソフルラン吸入麻酔下で回復し、門脈及び腹部大静脈から同時に採血した。

血漿試料は、血液試料を 4°C、12,000 rpm で 10 分間遠心分離することにより取得し、使用まで -30°C で保存した。血漿試料 50 μ L に蒸留水 50 μ L、100 ng/mL の内部標準 (IS) 溶液 50 μ L 及びアセトニトリル 250 μ L を添加して混合し、4°C、3,000 rpm で 20 分間遠心分離した。その後、上清を適切な溶媒で希釈して LC-MS/MS に注入した。

1.2.4 ラット CYP3A2 活性に対するベルガモチンの *in vitro* 阻害作用の評価

例数は n=3 で実施した。一次反应用混合液は、ラット肝ミクロソーム (終濃度 : 1 mg protein/mL) 及びリン酸バッファー (100 mmol/L、pH 7.4) にベルガモチン溶液を添加することで調製した。ベルガモチンの終濃度は 0、1、2.5、5、10、25 及び 50 μ mol/L、メタノールの終濃度は 1% とした。この一次反応混合液を 37°C の水浴中で 5 分間プレウォーミングした後に、NADPH Regenerating System [glucose 6-phosphate (3.3 mmol/L), NADP (1.3 mmol/L), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.4 units/mL) and MgCl₂ (3.3 mmol/L)] を添加して一次反応を開始した。反応開始後 0、5、10、15 及び 20 分に一次反応液から 10 μ L を取り、トリアゾラム (100 μ mol/L)、NADPH Regenerating System 及びリン酸バッファー (100 mmol/L、pH 7.4) を含んだ二次反応混合液 190 μ L に添加して二次反応を開始した。二次反応開始後 20 分に、あらかじめ氷冷したアセトニトリル 200 μ L を添加して反応を終了させた後に、IS 溶液 (100 ng/mL) を添加した。これらの試料は 4°C、12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を 0.1% ギ酸溶液で希釈して LC-MS/MS に注入した。

1.2.5 ベルガモチンのラット血漿中非結合型分率 ($f_{u,p}$) の算出

例数は n=3 で実施した。ノボビオシンのラットにおける $f_{u,p}$ は、分子量 8-kD をカットオフとする透析膜がインサートされた 96 ウェル Rapid equilibrium dialysis (RED) プレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて評価した。インキュベーション用血漿試料は、ラット血漿にメタノールに溶解したノボビオシン溶液を添加することで調製した。ノボビオシンの終濃度は 1 μ mol/L、メタノールの終濃度は 1% とした。RED プレートのドナー側にインキュベーション用血漿試料 300 μ L、アクセプター側にリン酸バッファー (100 mmol/L、pH 7.4) 500 μ L を添加し、37°C、100 rpm で

16 時間インキュベーションした。インキュベーション後、ドナー側サンプル 50 μL にリン酸バッファー (100 mmol/L、pH 7.4) 50 μL を添加し、アクセプター側サンプル 50 μL にラット血漿 50 μL を添加した。これらのサンプルに IS 溶液 (100 ng/mL) 及びアセトニトリル 250 μL を添加して混合した後、4°C、3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS に注入した。

1.2.6 LC-MS/MS による測定

LC-MS/MS は Triple Quad 5500 (AB Sciex, Tokyo, Japan) 及び Agilent 1290 Infinity (HPLC) を用いた。クロマトグラフィーは、カラムとして ACQUITY UPLC BEH C18 Column (130Å, 1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm, Waters, for LC-MS/MS) を使い、カラムオープンの温度は 40°C、流速は 0.4 mL/min とした。移動相 A は蒸留水、移動相 B は 0.1%ギ酸含有アセトニトリルとした。グラジエント分析条件は、ブスピロンで 0 min : 10% B、4 min : 90% B、4.3 min : 90% B、4.31 min : 10% B、5 min : 10%B、フェキソフェナジン及びベルガモチンで 0 min : 0% B、0.5 min : 0% B、1.0 min : 100% B、1.5 min : 100% B、2.0 min : 100% B、2.01 min : 0% B、2.5 min : 0% B、1'-ヒドロキシトリアゾラムで 0 min : 35% B、1.2 min : 35% B、1.21 min : 100% B、1.5 min : 100% B、1.51 min : 35% B、2 min : 35% B とした。Multiple reaction monitoring (MRM) はポジティブモードとし、モニターイオン (プリカーサーイオン \rightarrow プロダクトイオン) はブスピロンで 386 \rightarrow 122、フェキソフェナジンで 502 \rightarrow 466、ベルガモチンで 339 \rightarrow 203、1'-ヒドロキシトリアゾラムで 359 \rightarrow 331 及びフレカイニドで 415 \rightarrow 301 とした。フレカイニドは IS として使用した。経口投与の試験における検量線濃度範囲は、ブスピロンで 0.01–5 ng/mL、フェキソフェナジンで 0.1–50 ng/mL 及びベルガモチンで 1–200 nmol/L とした。静脈内投与の試験におけるブスピロンの検量線濃度範囲は、0.5–200 ng/mL とした。測定では Quality Control (QC) 試料より分析精度を確認した。すべての測定において、全 QC 試料の 3 分の 2 以上かつ各濃度の 2 分の 1 以上の QC 試料の真度が理論値の \pm 15%以内であった。さらに QC 試料の変動係数 (CV) は 15%を超えなかった。

1.2.7 データ解析

血漿中濃度は個体ごとに解析し、薬物動態パラメータは WinNonlin 2.1 (Pharsight, Mountain View, CA) を用いて、ノンコンパートメントモデル解析により取得した。最高血漿中濃度 (C_{max}) 及び最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は実測値より取得した。0 から t 時間後までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-t}) は台形法により算出した。 t 時間から無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{t-inf}) の算出は、最終定量値 (C_{last}) を消失速度定数 (k_e) で除することにより算出した。0 から無限時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-inf}) は AUC_{0-t} に AUC_{t-inf} を足すことで取得した。静脈内投与の試験では、全身クリアランス (CL_{tot})、定常状態分布容積 (V_{dss}) 及び消失半減期 ($t_{1/2}$) を算出した。 k_e 及び $t_{1/2}$ の算出には定量値が得られた少なくとも三時点の数値を用いた。

ラット CYP3A の残存活性をプレインキュベーション時間に対して片対数プロットし、初期の直線性を示す傾きから見かけの不活性化速度定数 (k_{obs}) を算出した。 k_{obs} を阻害薬濃度に対してプロットし、非線形最小二乗法により下記の式を用いて MBI パラメータ (K_I 及び k_{inact}) を算出した。

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} \times [I]}{K_I + [I]}$$

[I] : 阻害薬濃度

K_I : 最大不活性化速度の 50% の不活性化をもたらす阻害剤の濃度

k_{inact} : 最大不活性化速度定数

個体ごとの各薬物動態パラメータのデータは平均値化し、平均値±標準偏差として報告した。 AUC_{0-inf} 及び C_{max} の統計解析は、これらの数値を対数変換した後に実施した。統計解析は対応のない両側 t 検定により実施し、すべての場合において p 値 < 0.05 を統計学的に有意と見なした。

1.3 結果

1.3.1 ラットにおいてベルガモチンを同時投与したときの CYP3A 及び P-gp 活性に対する影響

ラットにブスピロン及びフェキソフェナジンをベルガモチンまたは溶媒とそれぞれ同時に経口投与したときのブスピロン及びフェキソフェナジンの血漿中濃度推移を Figure 5 に示し、そのときの薬物動態パラメータを Table 2 にそれぞれ示した。ベルガモチンとの併用により、経口投与後のブスピロンの AUC_{0-inf} は対照群と比較して 1.6 倍と有意に上昇した（対照群： $1.3 \pm 0.31 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 、ベルガモチン併用群： $2.1 \pm 0.76 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ ）。ブスピロンの C_{max} の上昇は有意ではなかったが、対照群と比較して 1.6 倍に上昇した（対照群： $0.63 \pm 0.20 \text{ ng/mL}$ 、ベルガモチン併用群： $0.96 \pm 0.57 \text{ ng/mL}$ ）。さらにブスピロンの T_{max} は 0.35 時間から 0.92 時間へと有意に遅延した。同様に、ベルガモチンとの併用により経口投与後のフェキソフェナジンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} は対照群と比較してそれぞれ 1.7 倍（対照群： $16 \pm 5.6 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 、ベルガモチン併用群： $27 \pm 11 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ ）及び 2.2 倍（対照群： $4.9 \pm 1.2 \text{ ng/mL}$ 、ベルガモチン併用群： $11 \pm 5.1 \text{ ng/mL}$ ）と有意に上昇した。ブスピロンと異なり、フェキソフェナジンの T_{max} はベルガモチンによる影響を受けなかった。またブスピロン及びフェキソフェナジンの $t_{1/2}$ は対照群と比較して変化は認められなかった。

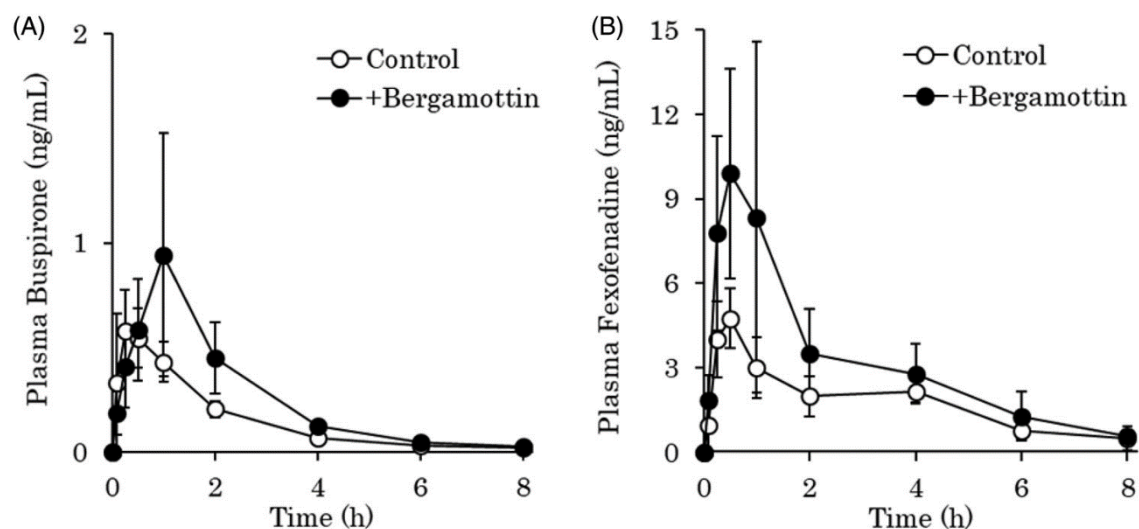


Figure 5. Plasma concentration–time profiles of compounds orally co-administered with bergamottin. (A) Buspirone (1 mg/kg) and (B) fexofenadine (5 mg/kg) were orally co-administered with bergamottin (2.5 mg/kg) or the vehicle in rats. Data are represented as the mean \pm SD for six rats.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of orally administered buspirone (1 mg/kg) and fexofenadine (5 mg/kg) following the oral co-administration of bergamottin (2.5 mg/kg) or the vehicle in rats.

Substrate	Co-administration	ACU _{0-inf}	C _{max}	T _{max}	t _{1/2}
		ng·h/mL	ng/mL	h	h
Buspirone	Control	1.3 ± 0.31	0.63 ± 0.20	0.35 ± 0.18	1.9 ± 0.40
	+ bergamottin	2.1 ± 0.76*	0.96 ± 0.57	0.92 ± 0.20*	1.5 ± 0.15
Fexofenadine	Control	16 ± 5.6	4.9 ± 1.2	0.42 ± 0.13	2.0 ± 1.1
	+ bergamottin	27 ± 11*	11 ± 5.1**	0.54 ± 0.37	1.9 ± 0.57

Values are represented as the mean ± SD for six rats.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the control group.

1.3.2 ラットにベルガモチンを投与してから 2 時間後の CYP3A 及び P-gp 活性に対する影響

ラットにベルガモチンまたは溶媒を経口投与してから 2 時間後のブスピロン及びフェキソフェナジンの血漿中濃度推移を Figure 6 に示し、そのときの薬物動態パラメータを Table 3 に示した。ベルガモチンの前処置により、経口投与したブスピロンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} はそれぞれ 3.7 倍（対照群：1.1 ± 0.45 ng·h/mL、ベルガモチン処置群：4.1 ± 2.2 ng·h/mL）及び 4.6 倍（対照群：0.58 ± 0.24 ng/mL、ベルガモチン処置群：2.6 ± 2.1 ng/mL）と有意に上昇した。ブスピロンの T_{max} は延長傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。またベルガモチンの前処置によりブスピロンの t_{1/2} は影響を受けなかった。一方、経口投与後のフェキソフェナジンの血漿中濃度は、ベルガモチン前処置による影響を受けなかった。

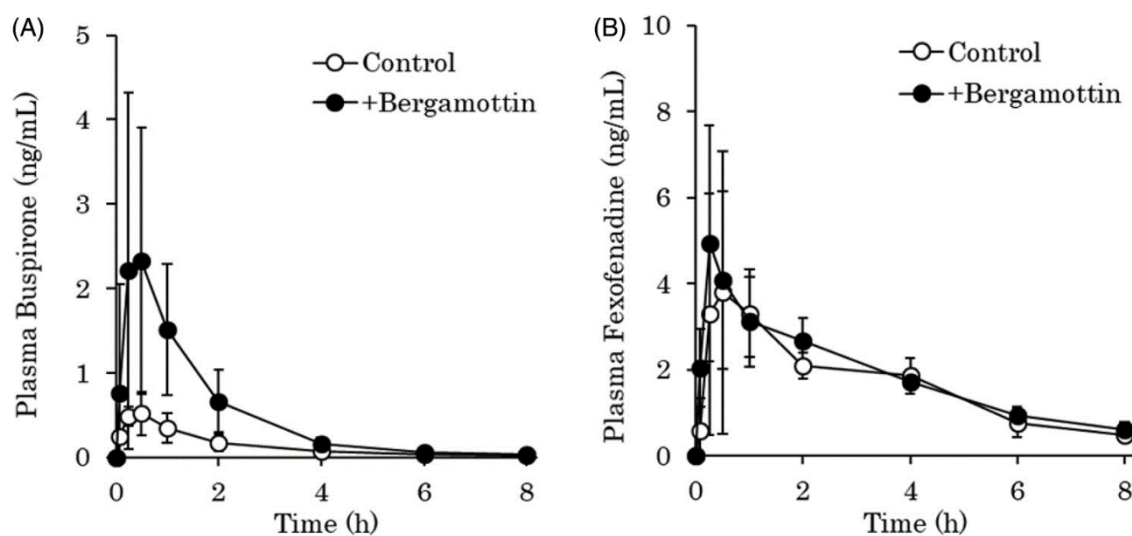


Figure 6. Plasma concentration–time profiles of orally administered compounds following pre-treatment with bergamottin. (A) Profile of orally administered buspirone (1 mg/kg) and (B) fexofenadine (5 mg/kg) 2 h after the oral administration of bergamottin (2.5 mg/kg) or the vehicle in rats. Data are represented as the mean \pm SD for five to six rats.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of orally administered buspirone (1 mg/kg) and fexofenadine (5 mg/kg) 2 h after the oral administration of bergamottin (2.5 mg/kg) or the vehicle in rats.

Substrate	Pre-treatment	ACU _{0-inf}	C _{max}	T _{max}	t _{1/2}
		ng·h/mL	ng/mL	h	h
Buspirone	Control	1.1 \pm 0.45	0.58 \pm 0.24	0.30 \pm 0.11	2.0 \pm 0.36
	+ bergamottin	4.1 \pm 2.2	2.6 \pm 2.1	0.54 \pm 0.25	1.5 \pm 0.36
Fexofenadine	Control	15 \pm 3.7	4.3 \pm 2.8	0.83 \pm 0.29	2.4 \pm 0.86
	+ bergamottin	17 \pm 2.8	5.0 \pm 2.6	0.83 \pm 1.0	2.3 \pm 0.42

Values are represented as the mean \pm SD for five to six rats.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the control group.

さらに、ベルガモチンまたは溶媒を経口投与してから2時間後に静脈内投与したときのブスピロンの血漿中濃度推移を Figure 7 に示し、そのときの薬物動態パラメータを Table 4 に示す。静脈内投与したときのブスピロンの薬物動態パラメータはベルガモチン前処置による影響を受けなかった。

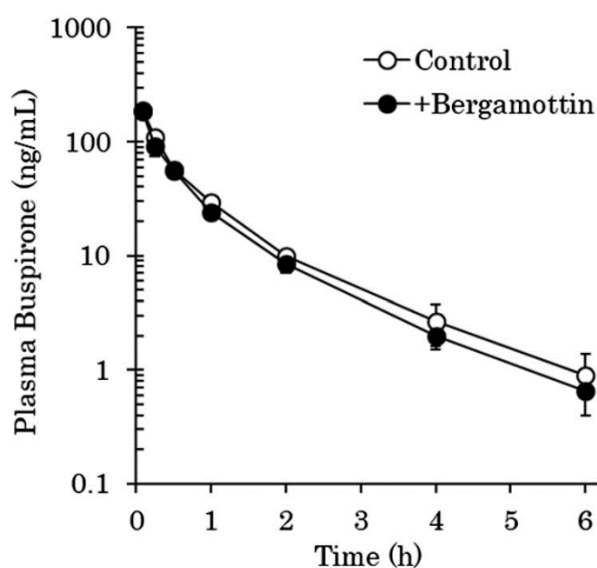


Figure 7. Plasma concentration–time profile of intravenously administered buspirone following pre-treatment with bergamottin. Buspirone (0.3 mg/kg) was administered intravenously 2 h after the oral administration of bergamottin (2.5 mg/kg) or the vehicle in rats. Data are represented as the mean \pm SD for three rats.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of intravenously administered buspirone (0.3 mg/kg) 2 h after the oral administration of bergamottin (2.5 mg/kg) or the vehicle in rats.

Substrate	Pre-treatment	ACU _{0-inf}	CL _{tot}	Vd _{ss}	t _{1/2}
		ng·h/mL	mL/min/kg	L/kg	h
Buspirone	Control	120 \pm 9.8	41 \pm 3.0	2.2 \pm 0.21	1.1 \pm 0.24
	+ bergamottin	110 \pm 14	46 \pm 6.6	2.2 \pm 0.25	1.0 \pm 0.065

Values are represented as the mean \pm SD for three rats.

There were no significant differences between the control and bergamottin pre-treatment.

1.3.3 CYP3A に対するベルガモチンの MBI パラメータの算出及びベルガモチンの血漿中濃度推移の評価

ベルガモチンは時間及び濃度依存的にラット CYP3A 活性を阻害し、CYP3A に対するベルガモチンの K_i 及び k_{inact} はそれぞれ $4.05 \pm 0.450 \mu\text{mol/L}$ 及び $0.0911 \pm 0.00284 \text{ min}^{-1}$ と算出された (Figure 8)。ラットにベルガモチン (2.5 mg/kg) を経口投与したときの門脈及び循環血漿中非結合型濃度を Figure 9 に示す。ベルガモチンは速やかに吸収さ

れ、門脈血では投与後 0.25 時間に、循環血では投与後 0.5 時間に C_{max} に到達した。ベルガモチンの門脈血漿中 C_{max} は $2.06 \pm 0.567 \mu\text{mol/L}$ 、ラット血漿中非結合型分率は 0.0000254 ± 0.00000737 であったことから、ベルガモチンの門脈血漿中非結合型 C_{max} は、 $52.2 \pm 14.4 \text{ pmol/L}$ と算出され、循環血漿中非結合型 C_{max} ($1.35 \pm 0.673 \text{ pmol/L}$) と比較して約 40 倍高い濃度を示した。[I]を門脈血漿中非結合型 C_{max} としたときのラット CYP3A に対するベルガモチンの k_{obs} は $0.00000118 \text{ min}^{-1}$ と算出された。

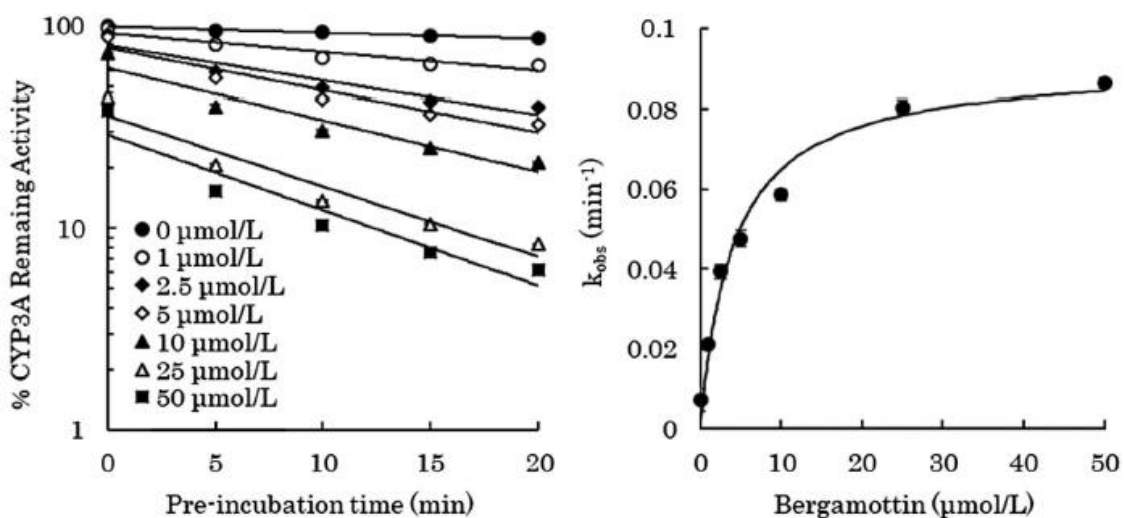


Figure 8. Time- and concentration-dependent inactivation of triazolam 1'-hydroxylation by bergamottin. Data are represented as the mean \pm SD of three experiments.

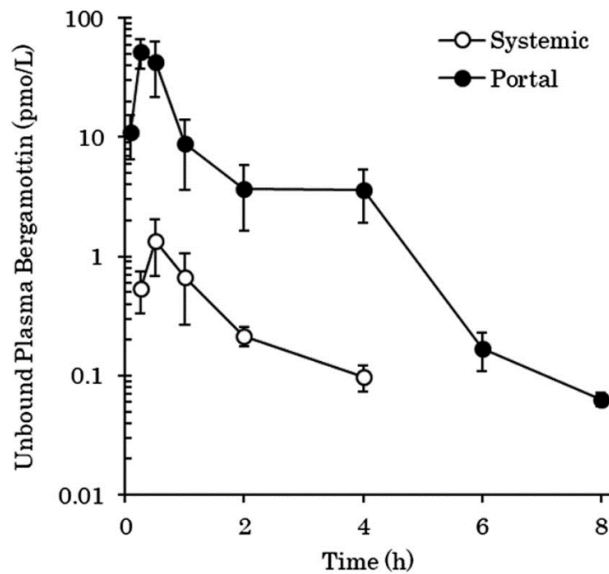


Figure 9. Systemic and portal plasma concentration–time profile of orally administered bergamottin (2.5 mg/kg) in rats. Data are represented as the mean \pm SD for three experiments.

1.4 考察

本章では、ラット *in vivo* において、CYP3A 及び P-gp のプローブ基質薬としてそれぞれブスピロン及びフェキソフェナジンをを用い、化合物の消化管吸収における CYP3A を介した初回通過代謝の寄与を簡便に評価する上で、ベルガモチンが有用であるかどを検討した。

最初に、ラットにおいてベルガモチンを投与した直後の CYP3A 及び P-gp 活性に対する影響を評価した。ラットにベルガモチンと同時に経口投与したときのブスピロン及びフェキソフェナジンの AUC_{0-inf} は対照群と比較してそれぞれ 1.6 倍及び 1.7 倍と有意に上昇した。これらの結果より、ベルガモチンは投与直後では CYP3A 及び P-gp 活性の両方を阻害することが示された。これは、ベルガモチン投与直後では、その消化管内濃度は極めて高いことから、消化管 CYP3A 活性だけではなく P-gp 活性も十分に阻害する濃度であるためと推察された。またベルガモチンの P-gp 活性に対する本試験成績は既報と一致した¹¹。さらに、ヒトにおいて、ブスピロンの T_{max} はグレープフルーツジュースにより遅延することが報告されており²⁵、本研究においても既報と同様にブスピロンの吸収はベルガモチンにより遅延した。次に、ベルガモチンを投与して

から2時間後のCYP3A及びP-gp活性に対する影響を評価した。ベルガモチンをラットに経口投与してから2時間後に経口投与したブスピロンのAUC_{0-inf}及びC_{max}はそれぞれ3.7倍及び4.6倍と有意に上昇した。一方、経口投与したフェキソフェナジンの血漿中濃度はベルガモチン前処置による影響を受けなかった。これらの結果より、ベルガモチンは投与2時間後では、CYP3A活性のみを阻害し、P-gp活性には影響を及ぼさないことが示された。これは、CYP3Aに対するベルガモチンの阻害機序はMBIであり、CYP3Aが新しく生成されるまで阻害が持続するのに対し、投与後の時間経過とともに消化管内ベルガモチン濃度が低下することで、ベルガモチンによるP-gp阻害は消失したためであると考えられた。さらに、ベルガモチンの肝臓CYP3Aに対する影響を評価する目的で、ベルガモチンを経口投与してから2時間後に、ブスピロンを静脈内投与した。その結果、静脈内投与したブスピロンの薬物動態パラメータはベルガモチン前処置による影響を受けなかったことから、ベルガモチンは投与後2時間では肝臓CYP3A活性に影響を与えず、消化管CYP3A活性を選択的に阻害することが示された。門脈カニキュレーションラットを用いた検討においてブスピロンのF_gは0.4であることが報告されている⁸。そのため、もし仮にブスピロンのCYP3Aを介した消化管初回通過代謝が完全に阻害された場合には、ブスピロンのAUCは理論的には2.5倍に上昇すると考えられる。本検討において、ブスピロンのAUC_{0-inf}はベルガモチンにより時間依存的に上昇し、ベルガモチン前処置によるブスピロンのAUC_{0-inf}上昇率は3.7倍であり、理論値と概ね一致したことから、CYP3Aを介した消化管代謝はベルガモチン前処置によりほぼ完全に阻害されたと考えられた。

ベルガモチンが肝臓CYP3A活性に影響しないことをサポートするため、ラット肝ミクロソームを用いてベルガモチンのCYP3Aに対するMBIパラメータ、及びラットにベルガモチン(2.5 mg/kg)を経口投与したときの門脈及び循環血漿中濃度を評価した。[I]を門脈血漿中非結合型C_{max}(52.2 pmol/L)としたときのラットCYP3Aに対するベルガモチンのk_{obs}(0.00000118 min⁻¹)は、肝臓CYP3Aのk_{deg}(0.0005 min⁻¹)²⁶と比較して400倍以上低かった。よって、肝臓CYP3Aの生成速度はベルガモチンによる不活性化速度と比較して顕著に速いことから、ベルガモチン(2.5 mg/kg)を経口投与したときに肝臓CYP3A活性が阻害される可能性は極めて低いと考えられた。本*in vitro*試験成績は、静脈内投与後のブスピロンの薬物動態パラメータがベルガモチンに

よる影響を受けなかった *in vivo* 試験成績と一致した。同様にベルガモチンの門脈血漿中非結合型 C_{max} はヒト P-gp に対するベルガモチンの K_i (約 30 $\mu\text{mol/L}$)²⁷ と比較して顕著に低かったことから、ベルガモチンにより肝臓 P-gp が阻害される可能性も極めて低いと考えられた。

以上より、ベルガモチンは、ラットにおいて同時投与では CYP3A 及び P-gp 活性のいずれも阻害するが、投与後 2 時間では P-gp 活性には影響せずに MBI による持続的な阻害により CYP3A を介した消化管代謝活性を選択的に阻害した。したがって、ベルガモチンは医薬品開発において、ラットにおける低バイオアベイラビリティを示す新薬候補化合物の消化管吸収における CYP3A を介した初回通過代謝の寄与を簡便に評価する上で有用なツールになると考えられた。

1.5 小括

第 1 章の検討結果から、以下のことが明らかとなった。

- ラット *in vivo* において、ベルガモチン (2.5 mg/kg) は経口投与した直後では、経口投与後のブスピロンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} をそれぞれ 1.6 倍及び 1.5 倍に上昇させ、さらに経口投与後のフェキソフェナジンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} をそれぞれ 1.7 倍及び 2.2 倍に上昇させた。よって、ベルガモチンは投与直後では、CYP3A 及び P-gp 活性の両方を阻害することが示された。
- ベルガモチン (2.5 mg/kg) は経口投与してから 2 時間後では、経口投与後のブスピロンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} をそれぞれ 3.7 倍及び 4.6 倍に上昇させたのに対して、経口投与後のフェキソフェナジンの血漿中濃度には影響を及ぼさず、加えて静脈内投与後のブスピロンの薬物動態パラメータにも影響を与えなかった。したがって、ベルガモチンは経口投与してから 2 時間後では、P-gp 及び肝臓 CYP3A 活性に影響を及ぼさず、消化管 CYP3A 活性を選択的に阻害することが示された。
- ベルガモチンは、消化管から吸収されにくく、MBI により CYP3A を持続的に阻害するという薬物動態プロファイルを活かすことにより、ラット *in vivo* において新薬候補化合物の消化管吸収率が低かった際に、CYP3A を介した初回通過代謝が原因であるかを簡便に評価することを可能にすると考えられた (Figure 10)。

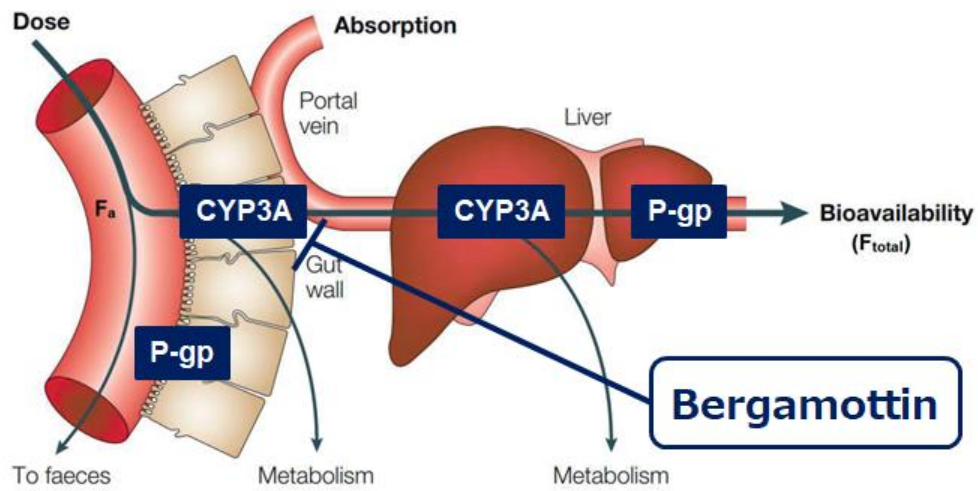


Figure 10. Selective inhibitory effect of bergamottin (2.5 mg/kg) after oral administration on intestinal CYP3A activity in rats. The figure was cited from *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(3): 192-204 with some modifications by the author.

第2章 ラット消化管 P-gp 選択的阻害薬としてのエラクリダルの有用性、及びエラクリダルを用いた既存薬の評価

2.1 小序

P-gp は細胞内に ATP 結合部位を有し、ATP の加水分解エネルギーを利用して異物を細胞外に汲み出す ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの一つであり、血液脳関門、肝臓、腎臓及び消化管等の正常組織内皮細胞の粘膜側に発現する。とりわけ、消化管に発現する P-gp は経口投与された医薬品の消化管吸収を制限する働きがあることから、P-gp 阻害作用を有する医薬品を服用することにより、併用した P-gp の基質となる医薬品の血漿中濃度が上昇する可能性が考えられる。実際に、ヒトにおいて消化管の P-gp が阻害されることに起因する薬物相互作用が複数報告されている^{28,29}。そのため、創薬研究において早期段階から新薬候補化合物の消化管吸収における P-gp の寄与を評価できることが望ましいと考えられる。ラットは最も汎用されている実験動物であり、臨床で認められた消化管 P-gp 阻害を介した薬物相互作用のいくつかはラットで再現が可能であることが報告されていることから^{30,31}、ラットはヒトにおける消化管 P-gp 機能を評価する上で有用であると言える。

ラット消化管組織を用いた単回灌流法は、膜透過性を評価する方法として汎用されている。本方法により算出された膜透過係数は *in vivo* の F_a と関連することが報告されており (Figure 11)³²、消化管吸収率を予測する有用な方法であると考えられている。また、本方法を用いたとき、P-gp のモデル基質であるパクリタキセルの膜透過係数は P-gp 阻害薬ベラパミルの存在下で有意に上昇し、さらにラット *in vivo* で経口投与後のパクリタキセルの血漿中濃度はベラパミルとの併用により有意に上昇することが報告されている³³。よって、*in situ* 単回灌流法はラット *in vivo* での消化管吸収における P-gp の寄与を評価する上でも有用であると考えられる。P-gp の基質となる医薬品の中で、ベラパミル、ジルチアゼム、タクロリムス、コルヒチン及びインジナビルは最も研究されている P-gp 基質薬である。ラットの小腸組織を用いた *in situ* 単回灌流法による試験では、これらの P-gp 基質薬の膜透過係数は、パクリタキセルと同様に P-gp 阻害薬又は誘導薬の存在下において有意に変化することが報告されていることから³⁴、これらの医薬品の消化管吸収に P-gp が関与すると考えられている。しかしなが

ら、パクリタキセルとは異なり、ラット *in vivo* におけるこれらの医薬品の消化管吸収における P-gp の寄与については不明である。

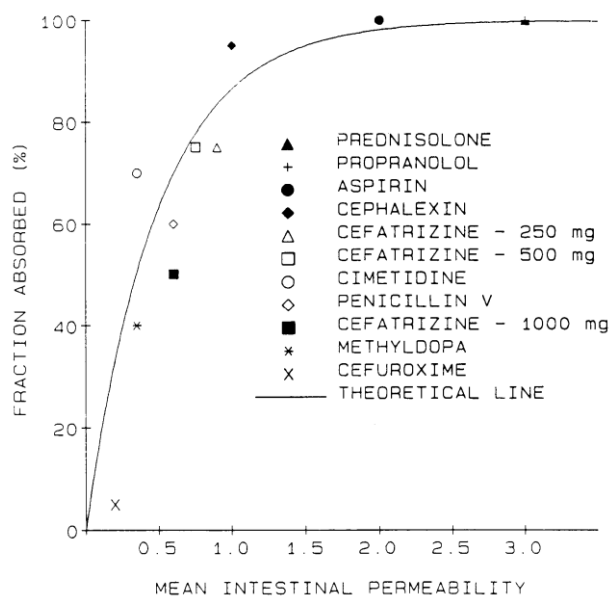


Figure 11. Correlation of fraction dose absorbed (%) and intestinal permeability. The figure was cited from Pharm Res. 1988 Oct;5(10):651-4.

CYP3A は P-gp と同様に消化管上皮細胞に発現し、医薬品の消化管初回通過代謝に寄与すると考えられている。P-gp 及び CYP3A の基質認識性は重複しており、上記の P-gp 基質薬は CYP3A によっても代謝を受けることから、これら医薬品の消化管吸収における P-gp の寄与を評価するためには、CYP3A 活性に影響を及ぼさない選択的 P-gp 阻害薬を用いた試験が必要になると考えられる。

エラクリダルは P-gp 阻害薬として広く使用されており、ラット *in vivo* においても消化管吸収における P-gp による汲み出しを評価する上で有用であることが示されている³⁹⁻⁴¹。ラット P-gp に対するエラクリダルの IC₅₀ 値は 1.6 nmol/L であることが報告されている一方¹²、ヒト CYP3A4 に対するエラクリダルの IC₅₀ 値は約 10 µmol/L であることが報告されていることから¹³、エラクリダルの P-gp 選択性は極めて高いと考えられる。さらに、エラクリダルを 3 mg/kg の用量で経口投与したときのエラクリダルの門脈血漿中 C_{max} は 62.4 ng/mL (111 nmol/L)、かつラット血漿中非結合型分率は 0.0000564 であることが報告されている^{13,42}。よって、エラクリダルの門脈血漿中非結

合型 C_{max} は 6.26 pmol/L と算出され、ラット P-gp に対するエラクリダルの IC_{50} 値 (1.6 nmol/L) よりも顕著に低いことから、エラクリダルは 3 mg/kg の用量においては消化管以外の P-gp を阻害する可能性は低いと考えられた。したがって、エラクリダルは、CYP3A によっても代謝される P-gp 基質薬の消化管吸収における P-gp の寄与を簡便に評価する上で有用なツールであると考えられる。

そこで本研究では、フェキソフェナジン及びブスピロンをそれぞれ P-gp 及び CYP3A のプローブ基質薬として用い、エラクリダルが CYP3A 活性に影響せずに P-gp 活性を選択的に阻害するかを評価することを目的として検討した。次に、エラクリダルを P-gp 阻害薬として用い、P-gp 基質薬であるベラパミル、ジルチアゼム、タクロリムス、コルヒチン及びインジナビルのラットの消化管吸収における P-gp の寄与を *in vivo* で評価することを目的として検討した。

2.2 実験材料及び方法

2.2.1 被験物質及び試薬

フェキソフェナジン塩酸塩及びエラクリダルは Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) より購入した。ベラパミル塩酸塩、ジルチアゼム塩酸塩、タクロリムス一水和物及びコルヒチンは富士フィルム和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。ブスピロン塩酸塩はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より購入した。インジナビルは Cayman Chemical (Ann Arbor, MC, USA) より購入した。プログラフ注射液 (5 mg/mL タクロリムス溶液) はアステラス製薬 (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は特級試薬以上のものを使用した。

2.2.2 動物

SD 系雄性ラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) は 8 週齢 (体重: 約 250 g) で使用した。動物は 12 時間の明暗サイクルの下で飼育され、標準的な飼料と水道水を自由に摂取した。動物実験プロトコルは、トーアエイヨー株式会社の動物実験委員会により承認された。

2.2.3 ラットを用いた *in vivo* 薬物動態試験

すべての動物は投与前約 18 時間絶食した。エラクリダル及びフェキソフェナジンの経口投与製剤は、エラクリダル及びフェキソフェナジン塩酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁させて調製した（投与液濃度はフリー体としてそれぞれ 0.6 及び 1 mg/mL）。プログラムの経口投与製剤はプログラム注射液（5 mg/mL タクロリムス）を蒸留水で希釈して調製した（投与液濃度はフリー体として 0.2 mg/mL）。ブスピロン、ベラパミル、ジルチアゼム、コルヒチン及びインジナビルの経口投与製剤は、ブスピロン塩酸塩、ベラパミル塩酸塩、ジルチアゼム塩酸塩、コルヒチン及びインジナビルを蒸留水に溶解させて調製した（投与液濃度はすべてフリー体として 0.2 mg/mL）。

エラクリダルを阻害剤として用いた試験では、エラクリダル（3 mg/kg）又は溶媒を経口投与してから 15 分後に、フェキソフェナジン（5 mg/kg）、ブスピロン（1 mg/kg）、ベラパミル（1 mg/kg）、ジルチアゼム（1 mg/kg）、タクロリムス（1 mg/kg）、コルヒチン（2 mg/kg）及びインジナビル（2 mg/kg）を経口投与した。ベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスを阻害剤として用いた試験では、ベラパミル（1 mg/kg）、ジルチアゼム（1 mg/kg）及びタクロリムス（1 mg/kg）を経口投与してからすぐにフェキソフェナジン（5 mg/kg）を経口投与した。なお、投与容量はすべて 5 mL/kg とした。またすべての試験は 1 群 3 例で実施した。動物は投与後 4 時間から給餌を再開し、採血は経口投与後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6 及び 8 時間に頸静脈より実施した。血漿試料は 4°C、12,000 rpm で 10 分間の遠心分離により取得し、使用まで -30°C で保存した。

フェキソフェナジン、ブスピロン、ベラパミル、ジルチアゼム、コルヒチン及びインジナビルの測定では、血漿試料 50 µL に 50%メタノール 50 µL、100 ng/mL の IS 溶液 50 µL 及びアセトニトリル 250 µL を添加して混合し、4°C、3,000 rpm で 20 分間遠心分離した上清を適切な溶媒で希釈した後に LC-MS/MS に注入した。タクロリムスの測定では、血液試料 100 µL に 50%メタノール 100 µL、100 ng/mL の内部標準溶液 100 µL 及び 15 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 300 µL を添加して混合した。これらの混合液に 3 mL ジエチルエーテルを添加して 100 rpm で 15 分間振とうして測定対象物質を有機層に抽出した後に、4°C、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、-80°C で凍結させた。その後、上清を窒素気流下（40°C）で乾固させ、移動相を 140 µL 添加して溶解させた後に LC-MS/MS に注入した。

2.2.4 LC-MS/MS による測定

LC-MS/MS は Triple Quad 5500 (AB Sciex, Tokyo, Japan) 及び Agilent 1290 Infinity (HPLC) を用いた。クロマトグラフィーは、カラムとして ACQUITY UPLC BEH C18 Column (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm×50 mm, Waters, for LC-MS/MS) を用い、カラムオープンの温度は 40°C とし、流速は 0.4 mL/min とした。移動相 A は蒸留水、移動相 B は 0.1%ギ酸含有アセトニトリル、移動相 C は 15 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び移動相 D はアセトニトリルとした。グラジエント分析条件は、ブスピロンで 0 min (10% B) →4 min (90% B) →4.3 min (90% B) →4.31 min (10% B) →5 min (10% B) とし、ベラパミルで 0 min (40% B) →0.8 min (40% B) →0.81 min (100% B) →1.5 min (100% B) →1.51 min (40% B) →2.0 min (40% B) とし、タクロリムスで 0 min (0% D) →0.5 min (0% D) →1.0 min (100% D) →2.0 min (100% D) →2.01 min (0% D) →2.5 min (0% D) とし、その他のすべての化合物では 0 min (0% B) →0.5 min (0% B) →1.5 min (100% B) →2.0 min (100% B) →2.01 min (0% B) →2.5 min (0% B) とした。MRM はポジティブモードとし、モニターイオン (プリカーサーイオン→プロダクトイオン) は、フェキソフェナジンで 502→466、ブスピロンで 386→122、ベラパミルで 455→165、ジルチアゼムで 415→178、タクロリムスで 822→768、コルヒチンで 400→358、インジナビルで 415→301 及びフレカイニドで 455→301 とした。フレカイニドは IS 物質として使用した。検量線濃度範囲は、フェキソフェナジンで 0.1–50 ng/mL、ブスピロンで 0.01–2 ng/mL、ベラパミルで 0.02–10 ng/mL、ジルチアゼムで 0.002–1 ng/mL、タクロリムスで 2–5 ng/mL、コルヒチンで 0.1–20 ng/mL 及びインジナビルで 0.1–100 ng/mL とした。血漿中濃度は、Analyst 1.6.3 (AB Sciex, Tokyo, Japan) を用い、IS ピーク面積に対する目的成分ピーク面積の比から作成した検量線より直線回帰式により算出した。

2.2.5 データ解析

血漿中濃度は個体ごとに解析し、薬物動態パラメータは WinNonlin 2.1 (Pharsight, Mountain View, CA) を用いてノンコンパートメントモデル解析により取得した。C_{max} 及び T_{max} は実測値より取得した。AUC_{0-t} は台形法により算出した。個体別の各薬物動

態パラメータのデータは平均値化し、平均値±標準偏差として報告した。AUC_{0-t}及びC_{max}の統計解析では、これらの数値を対数変換した後に実施した。統計解析は対応のない両側t検定により実施し、すべての場合においてp値<0.05を統計学的に有意と見なした。

2.3 結果

2.3.1 ラットにおける P-gp 及び CYP3A 活性に対するエラクリダルの影響

エラクリダルまたは溶媒をラットに経口投与してから15分後に経口投与したフェキソフェナジン及びブスピロンの血漿中濃度推移をFigure 12に示し、そのときの薬物動態パラメータをTable 5に示す。エラクリダルは経口投与後のフェキソフェナジンのAUC_{0-t}及びC_{max}をそれぞれ8.6倍及び5.1倍と著明に上昇させた一方、経口投与後のブスピロンの血漿中濃度はエラクリダルによる影響を受けなかった。

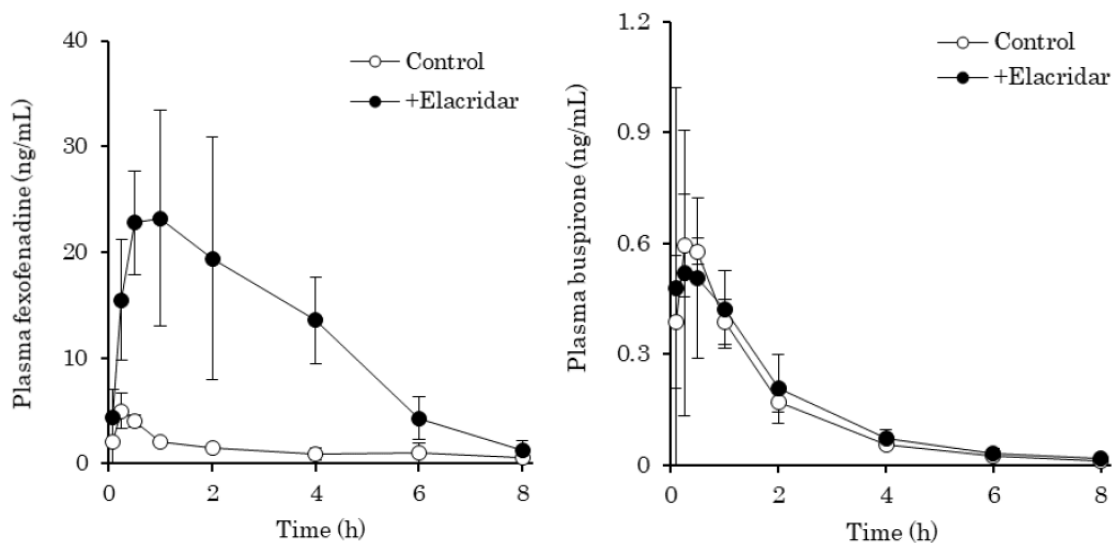


Figure 12. Plasma concentration–time profile of orally administered fexofenadine (5 mg/kg) or bupropion (1 mg/kg) with or without elacridar pre-treatment (3 mg/kg) in rats. Data are presented as mean ± SD for three rats.

Table 5. Pharmacokinetic parameters of orally administered fexofenadine (5 mg/kg) or buspirone (1 mg/kg) with or without elacridar pre-treatment (3 mg/kg) in rats.

Compound	AUC _{0-t}	C _{max}
	ng·h/mL	ng/mL
Fexofenadine	11.1 ± 2.6	5.0 ± 1.7
+ elacridar	95.9 ± 34.2***	25.6 ± 7.9**
Buspirone	1.10 ± 0.10	0.64 ± 0.06
+ elacridar	1.22 ± 0.48	0.63 ± 0.40

Data are presented as mean ± SD for three rats

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the control group

2.3.2 ラットにおける既存薬の消化管吸収に対するエラクリダルの影響

対照群及びエラクリダル併用群における経口投与後の各 P-gp 基質薬の血漿中濃度推移を Figure 13 に示し、そのときの薬物動態パラメータを Table 6 に示す。経口投与後のベラパミル及びジルチアゼムの血漿中濃度及びタクロリムスの血液中濃度に対してエラクリダルはほとんど影響を与えなかった。一方、エラクリダルにより経口投与後のコルヒチンの AUC_{0-t} 及び C_{max} はそれぞれ 5.3 倍及び 4.9 倍と顕著に上昇した。さらに、エラクリダルによりインジナビルの C_{max} に有意な上昇は認められなかったが、インジナビルの AUC_{0-t} は 2.0 倍と有意に上昇した。

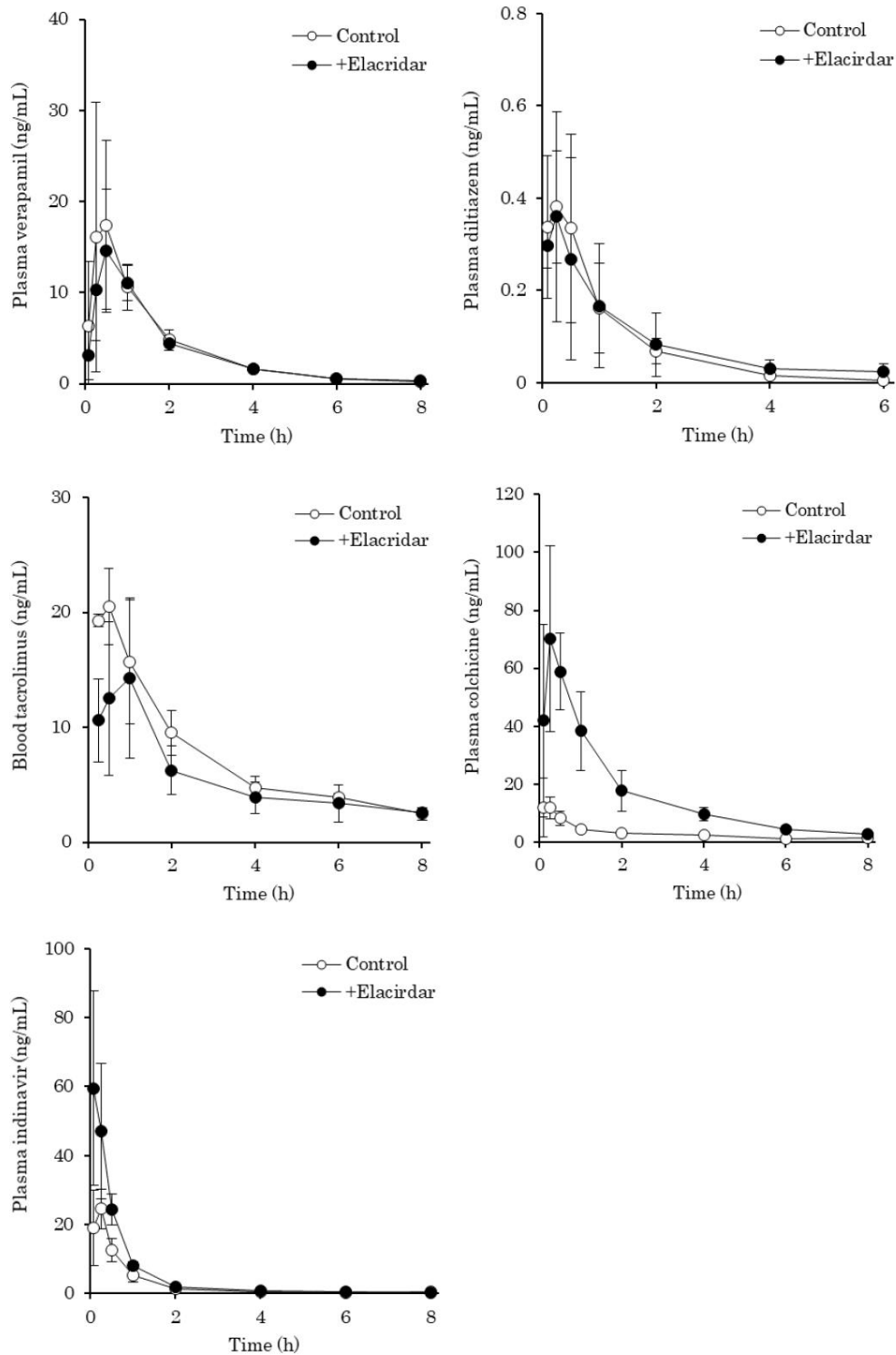


Figure 13. Plasma concentration–time profile of orally administered compounds (1 or 2 mg/kg) with or without elacirdar pre-treatment (3 mg/kg) in rats. Data are presented as mean \pm SD for three rats.

Table 6. Pharmacokinetic parameters of orally administered compounds (1 or 2 mg/kg) with or without elacridar pre-treatment (3 mg/kg) in rats.

Compound	AUC _{0-t}	C _{max}
	ng·h/mL	ng/mL
Verapamil	30.2 ± 11.3	19.4 ± 12.1
+ elacridar	27.6 ± 5.7	16.0 ± 5.7
Diltiazem	0.51 ± 0.23	0.44 ± 0.15
+elacridar	0.55 ± 0.37	0.39 ± 0.19
Tacrolimus	58.0 ± 10.0	21.4 ± 2.1
+elacridar	44.3 ± 16.6	15.4 ± 7.4
Colchicine	24.0 ± 2.6	14.6 ± 8.2
+elacridar	128 ± 14.9***	72.3 ± 30.1*
Indinavir	19.5 ± 4.5	25.8 ± 7.0
+elacridar	38.1 ± 10.3*	59.5 ± 28.2

Data are presented as mean ± SD for three rats

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ according to Student's t-test

2.3.3 ラットにおける消化管 P-gp 活性に対する既存薬の影響

ベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムス又は溶媒を経口投与した直後にフェキソフェナジンを経口投与した際のフェキソフェナジンの血漿中濃度推移を Figure 14 に示す。また取得されたフェキソフェナジンの薬物動態パラメータを Table 7 に示す。フェキソフェナジンをジルチアゼムと併用投与したとき、経口投与後のフェキソフェナジンの血漿中濃度は、ジルチアゼムによる影響をほとんど受けなかった。ベラパミルと併用投与したときの経口投与後のフェキソフェナジンの C_{max} は対照群と比較して有意に上昇した一方 (2.3 倍)、AUC_{0-t} は上昇傾向がみられたものの、有意な変化ではなかった (1.7 倍)。同様に、タクロリムスとの併用により、経口投与後のフェキソフェナジンの AUC_{0-t} 及び C_{max} は、対照群と比較してそれぞれ 3.1 倍及び 2.5 倍といずれも有意に上昇した。

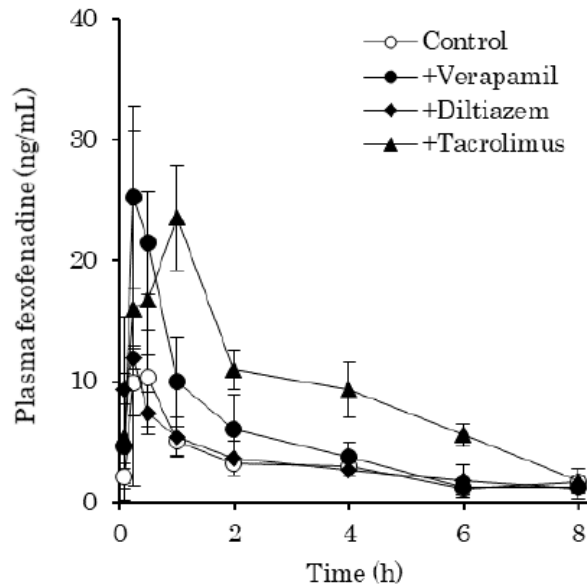


Figure 14. Plasma concentration–time profile of orally administered fexofenadine (5 mg/kg) with or without verapamil, diltiazem or tacrolimus (each dose: 1 mg/kg) in rats. Data are presented as mean \pm SD for three rats.

Table 7. Pharmacokinetic parameters of orally co-administered fexofenadine (5 mg/kg) with or without verapamil, diltiazem, or tacrolimus (each dose: 1 mg/kg) in rats.

Compound	AUC _{0-t}	C _{max}
	ng·h/mL	ng/mL
Fexofenadine	24.8 \pm 2.2	10.8 \pm 3.6
+ verapamil	41.8 \pm 14.8	25.3 \pm 7.5*
+ diltiazem	25.9 \pm 5.6	12.9 \pm 2.3
+ tacrolimus	76.2 \pm 3.6***	26.7 \pm 6.7**

Data are presented as mean \pm SD for three rats

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ according to Dunnett's test

2.4 考察

P-gp は CYP3A と同様に経口投与された医薬品の消化管吸収を制限することが知られている。ラットの消化管組織を用いた *in situ* 単回灌流法を用いた検討では、P-gp 基質薬であるベラパミル、ジルチアゼム、タクロリムス、インジナビル及びコルヒチンの膜透過係数が P-gp の阻害薬又は誘導薬存在下で変化することが報告されている³⁴

38。しかしながら、ラット *in vivo* において、これらの医薬品の消化管吸収における P-gp の寄与についてはこれまで不明である。そこで本研究では、最初に P-gp 及び CYP3A のプローブ基質薬としてそれぞれフェキソフェナジン及びブスピロンを用い、P-gp 阻害薬であるエラクリダルがラット *in vivo* において、医薬品の消化管吸収における P-gp の寄与を評価する上で有用であるかを検討した。続いて、ラット *in vivo* において P-gp 阻害薬としてエラクリダルを用い、ベラパミル、ジルチアゼム、タクロリムス、インジナビル及びコルヒチンの消化管吸収に P-gp がどの程度寄与するかを評価した。

ラットにおいて、エラクリダルの用量を 3 mg/kg としたときの P-gp 活性に対する影響を評価したところ、エラクリダルにより併用したフェキソフェナジンの AUC_{0-t} 及び C_{max} が顕著に上昇することが確認された。本投与量における投与製剤中のエラクリダル濃度 (0.6 mg/mL、1.1 mmol/L) は、ラット P-gp に対するエラクリダルの IC₅₀ 値 (1.6 nmol/L)¹² よりも顕著に高いことから、エラクリダルは消化管 P-gp を十分に阻害すると考えられた。さらに前述の通り、3 mg/kg の用量で経口投与したときのエラクリダルの門脈血漿中非結合型 C_{max} (6.26 pmol/L) はラット P-gp に対するエラクリダルの IC₅₀ 値 (1.6 nmol/L) よりも顕著に低いことから、エラクリダルは消化管以外の P-gp を阻害する可能性は低いと考えられた。一方、門脈カニューレラットを用いた検討において、経口投与後のフェキソフェナジンの F_a は P-gp 阻害薬であるゾスキダル併用下で 3.8 倍に上昇することが報告されている⁴³。本検討におけるフェキソフェナジンの AUC 上昇率が既報と比較して高値を示した理由として、本検討ではフェキソフェナジンの血漿中濃度のばらつきが大きかったためと考えられた。

経口投与後のブスピロンの薬物動態パラメータは、フェキソフェナジンと異なり、エラクリダルによる影響をほとんど受けなかったことから、エラクリダルはラットにおいて消化管及び肝臓 CYP3A 活性にほとんど影響を及ぼさないことが示され、既報の結果と一致した⁴⁴。よって、エラクリダルはラットにおいて化合物の消化管吸収における P-gp の寄与を評価する上で理想的な阻害薬であると考えられた。

ラット *in situ* において、P-gp の阻害薬又は誘導薬の存在下で膜透過性が変化することが報告されている医薬品の消化管吸収における P-gp の寄与を評価した。ベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスについては、経口投与されたこれら医薬品の血漿

中濃度はエラクリダルによる影響をほとんど受けなかった。一方、ベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスの P-gp に対する IC₅₀ 又はミカエリス・メンテン定数 (K_m) はそれぞれ 2.85、77.7 及び 0.74 µmol/L であることが報告されており⁴⁵、これらの医薬品は P-gp に対して中程度から強い阻害薬であると考えられる。そのため、消化管 P-gp 活性はこれらの医薬品により自己阻害され、消化管吸収における P-gp の寄与が過小評価されている可能性が考えられた。これらの P-gp 基質薬により消化管 P-gp 活性が飽和していないかを評価するため、経口投与後のフェキソフェナジンの体内動態に対するこれら P-gp 基質薬の影響を検討した。ジルチアゼムの場合、併用した経口投与後のフェキソフェナジンの血漿中濃度に影響を及ぼさなかったことから、ジルチアゼムは消化管 P-gp 活性に対してほとんど影響を与えないことが示された。一方、タクロリムスの場合、併用した経口投与後のフェキソフェナジンの AUC_{0-t} 及び C_{max} を有意に上昇させた。ベラパミルの場合も同様に、併用した経口投与後のフェキソフェナジンの C_{max} を有意に上昇させた。よって、ベラパミル及びタクロリムスは消化管 P-gp 活性を自己阻害する可能性があると考えられた。しかしながら、併用したベラパミル及びタクロリムスによるフェキソフェナジンの AUC_{0-t} 上昇率は、エラクリダル併用により認められたフェキソフェナジンの AUC_{0-t} 上昇率よりも顕著に低かったことから、ベラパミル及びタクロリムスによる消化管 P-gp の自己阻害は限定的であると考えられた。したがって、消化管 P-gp 活性が充分に残っているにも関わらず、エラクリダルによる影響がほとんど認められなかったことから、これら医薬品のラット *in vivo* における消化管吸収に P-gp はほとんど寄与しないことが示された。本研究における *in vivo* の成績が既報の *in situ* の成績と異なった理由として、ラットの消化管組織を用いた *in situ* 単回灌流法によって求められたベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスの膜透過係数は極めて高く、これら医薬品のラットの F_a はほぼ 1.0 であると予想されることから、消化管吸収における P-gp の寄与はほとんど認めれなかったと考えられた。反対に、経口投与後のコルヒチンの AUC_{0-t} 及び C_{max} はエラクリダルにより有意な上昇が認められ、同様にインジナビルの AUC_{0-t} もエラクリダルにより有意な上昇が認められた。よって、コルヒチン及びインジナビルのラット *in vivo* における消化管吸収に P-gp が寄与することが示された。ラットの消化管組織を用いた *in situ* 単回灌流法によって求められたコルヒチン及びインジナビルの膜透過性は極めて低く、これら医薬品のラ

ットの F_a は 1.0 を大きく下回ると予想されることから、消化管吸収における P-gp の寄与が認められたと考えられた。

ラットにおいて、ベラパミル及びジルチアゼムを経口投与したときの F が P-gp 及び CYP3A 阻害薬であるロバスタチンとの併用により上昇することが報告されており^{46,47}、著者らはその相互作用の機序はロバスタチンによる消化管 CYP3A 及び P-gp 阻害であると考察している。同様に、ラットにおいて経口投与後のタクロリムスの AUC 及び C_{max} は併用したベラパミルにより有意に上昇することが報告されており、著者らはその相互作用の機序はベラパミルによる消化管 P-gp 阻害であると考察している⁴⁸。本研究では、ラット *in vivo* において P-gp はベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスの消化管吸収にほとんど寄与しないことが示されたことから、既報で認められた相互作用のメカニズムは、消化管 P-gp 阻害ではなく、消化管 CYP3A 阻害のみで説明されると考えられた。

以上より、エラクリダルはラット *in vivo* において、化合物の消化管吸収における P-gp の寄与を評価する上で有用であることが示された。P-gp の基質薬であるベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスは高膜透過性を示し、これら医薬品の F_a はほぼ 1.0 であることが予測されるため、これら医薬品のラット *in vivo* における消化管吸収に P-gp は見かけ上寄与しないことが示された。

2.5 小括

第 2 章の検討結果から、以下のことが明らかとなった。

- ラット *in vivo* において、エラクリダル (3 mg/kg) は、経口投与後のブスピロンの血漿中濃度に影響を及ぼさずに、経口投与後のフェキソフェナジンの AUC_{0-1} 及び C_{max} をそれぞれ 8.6 倍及び 5.1 倍に上昇させた。さらにエラクリダルは消化管からほとんど吸収されないことを考慮すると、エラクリダルは、消化管及び肝臓 CYP3A 活性に影響を及ぼさずに、消化管 P-gp 活性を選択的に阻害すると考えられた。
- エラクリダルはラット *in vivo* において、新薬候補化合物の消化管吸収率が低かった際に、P-gp による汲み出しが原因であるかを簡便に評価することを可能にすると考えられた (Figure 15)。

- ラット消化管組織を用いた *in situ* 単回灌流法による検討では、P-gp 基質薬であるベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスの消化管吸収には P-gp が寄与する可能性が報告されていた。しかしながら、これらの医薬品を経口投与したときの血漿中濃度はエラクリダルによる影響を受けなかったことから、これらの医薬品の消化管吸収に P-gp はほとんど寄与しないことが示された。
- ベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスは *in situ* 単回灌流法による検討で高膜透過性を示すことから、その F_a はほぼ 1.0 であると予測されるため、消化管吸収における P-gp の影響を受けにくいと考えられた。

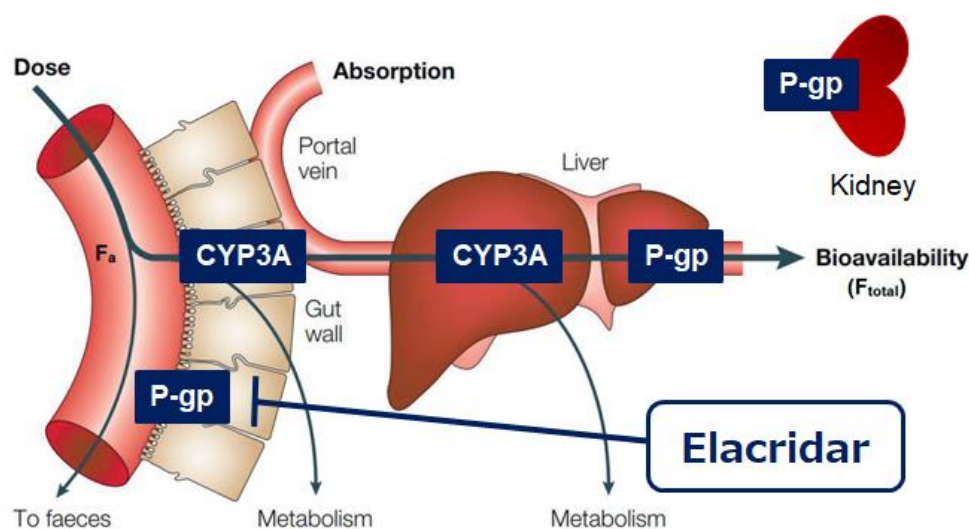


Figure 15. Selective inhibitory effect of elacridar (3 mg/kg) after oral administration on intestinal P-gp activity in rats. The figure was cited from *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(3): 192-204 with some modifications by the author.

第3章 ラット消化管 Bcrp 選択的阻害薬としてのノボピオシンの有用性

3.1 小序

BCRP は P-gp と同様に細胞内に ATP 結合部位を有し、ATP の加水分解エネルギーを利用して異物を細胞外に汲み出す ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの一つであり、血液脳関門、肝臓、腎臓及び消化管等の正常組織内皮細胞の粘膜側に発現する。BCRP はその基質薬であるスルファサラジン及びロスバスタチンの体内動態に大きく関与しており、Bcrp ノックアウトマウスではこれら医薬品の経口投与後の AUC はそれぞれ 150 及び 3.8 倍に上昇することが報告されている⁴⁹。

BCRP をコードする遺伝子である *ABCG2* について複数の遺伝子多型 (SNPs) が報告されており、その中でも *ABCG2* 421C>A はもっとも研究が進められている遺伝子多型である。本遺伝子多型を有するヒトにおいて、経口投与したときの BCRP 基質薬の AUC は、スルファサラジンで 2.4~3.5 倍に^{50,51}、ロスバスタチンで 1.6~2.6 倍に⁵²⁻⁵⁵ 上昇することが報告されている。*ABCG2* 421C>A の発現率は民族によって異なり、East Asians で 48~57%、Caucasians で 17%、Africans で 0~5%であることが報告されていることから^{56,57}、本遺伝子多型は BCRP 基質薬の個体間変動の原因となり得る。興味深いことに、BCRP 基質薬の AUC の上昇は T_{max} 及び $t_{1/2}$ の変化を伴わないことから、本遺伝子変異は薬物の消失過程ではなく吸収過程に対して影響すると考えられる。したがって、医薬品開発の非臨床段階において、消化管吸収における BCRP の寄与を評価することは重要であると考えられる。

複数の化合物がラット *in vivo* において Bcrp を阻害することが報告されているが^{14,58-60}、これら阻害薬の消化管 Bcrp に対する選択性に関する情報はほとんどない。BCRP/Bcrp 阻害薬の中でクルクミンがもっとも研究されており、ラットにおいて併用した経口投与後のロスバスタチンの AUC を有意に上昇させることが報告されている⁶⁰。しかしながら、著者らはクルクミン及びその代謝物であるグルクロン酸抱合体に OATP1B1 及び OATP1B3 阻害作用があることから、その相互作用のメカニズムの一部は、肝臓 Oatp 阻害であると考察している。別の報告では、クルクミンはラットにおいて OATP 基質薬であるドセタキセルの AUC を 2 倍に上昇させることが報告されており⁶¹、この相互作用のメカニズムは肝臓 Oatp 阻害であると考えられている。これらの報告を考慮すると、クルクミンは肝臓 Oatp 阻害作用を有すると言える。さらにクルクミ

ンは CYP3A4 阻害作用 (IC_{50} 値 = 2.7 $\mu\text{mol/L}$) を有しており、ラットにおいて併用した静脈内投与後の CYP3A4 基質薬エトポシドの薬物動態パラメータに影響することなく、経口投与後のエトポシドの AUC 及び C_{max} を有意に上昇させることが報告されている⁶²。著者らはその相互作用メカニズムは、クルクミンによる消化管 CYP3A 阻害であると考察している。これらの報告を考慮すると、クルクミンはラットにおいて肝臓 Oatp 及び消化管 CYP3A 活性を阻害することから、消化管 Bcrp 選択性が低く、その有用性は限定的であると言える。したがって、化合物の消化管吸収における Bcrp の寄与を評価するためには、消化管 Bcrp を選択的に阻害することが可能な阻害薬があることが望ましい。

ノボビオシンは P-gp 阻害がなく、BCRP を強力に阻害することが報告されている¹⁴。ラットにおいて、ノボビオシンは 50 mg/kg の用量で経口投与したとき、併用した BCRP 基質薬トポテカンの AUC 及び C_{max} を有意に上昇させるが、静脈内投与したときのトポテカンの全身クリアランスに対しても有意に影響を及ぼすことが報告されている¹⁴。そのため、ノボビオシンは 50 mg/kg の投与量では、消化管 Bcrp だけではなく、肝臓及び腎臓等の Bcrp も同様に阻害し、消化管 Bcrp 選択性が低いと考えられた。しかしながら、阻害薬を経口投与したとき、循環血漿中濃度と比較して消化管内濃度は高濃度になると想定されることから、投与量をより低くすることで、ノボビオシンは消化管選択性を示す可能性があると考えられた。そこで本研究では、ラット *in vivo* において、ノボビオシンを低用量としたときに P-gp、肝臓 Oatp 及び CYP3A 活性に対して影響せずに、消化管 Bcrp 活性のみを選択的に阻害するかを評価することを目的とした。

3.2 実験材料及び方法

3.2.1 被験物質及び試薬

スルファサラジン及びフレカイニド酢酸塩はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より購入した。フェキシフェナジン塩酸塩は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) より購入した。ミダゾラムは富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。ボセンタン水和物は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。1'-ヒドロキシミダゾラム- d_4 は Cerilliant Corporation (Austin, TX, USA) より購入

した。ドルミカム注射液（5 mg/mL ミダゾラム溶液）はアステラス製薬（Tokyo, Japan）より購入した。ラット CYP3A2 発現系、NADPH Regenerating System 及び 1'-ヒドロキシミダゾラムは Corning（Corning, NY, USA）より購入した。その他の試薬は特級試薬以上のものを使用した。

3.2.2 動物

SD 系雄性ラット（Japan SLC, Hamamatsu, Japan）は 8 週齢（体重：約 250 g）で使用した。動物は 12 時間の明暗サイクルの下で飼育され、標準的な飼料と水道水を自由に摂取した。動物実験プロトコルは、トーアエイヨー株式会社の動物実験委員会により承認された。

3.2.3 ラットを用いた *in vivo* 薬物動態試験

すべての動物は投与前約 18 時間絶食した。各群は n=3~6 例とした。ノボビオシンの経口投与製剤は、ノボビオシンナトリウムを蒸留水に溶解させて調製した（投与液濃度はフリー体として 0.6 mg/mL）。スルファサラジン及びフェキソフェナジンの経口投与製剤は、スルファサラジン及びフェキソフェナジン塩酸塩をそれぞれ 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁させて調製した（投与液濃度はいずれもフリー体として 1 mg/mL）。ミダゾラムの経口投与製剤はドルミカム注射液（5 mg/mL）を蒸留水で希釈して調製した（投与液濃度は 0.2 mg/mL）。スルファサラジン及びボセンタンの静脈内投与製剤は、スルファサラジン及びボセンタン一水和物をそれぞれ DMSO に溶解させた後に PBS で希釈して調製した（投与液濃度はいずれもフリー体として 0.5 mg/mL、DMSO 濃度は 5%）。経口投与の試験では、ノボビオシン（3 mg/kg）又は溶媒を経口投与してから 15 分後に、スルファサラジン（5 mg/kg）、フェキソフェナジン（5 mg/kg）及びミダゾラム（1 mg/kg）をそれぞれ経口投与した（投与容量は全て 5 mL/kg）。静脈内投与の試験では、ノボビオシン（3 mg/kg）又は溶媒を経口投与してから 15 分後に、スルファサラジン（1 mg/kg）及びボセンタン（1 mg/kg）をラットに尾静脈より静脈内投与した（投与容量は全て 2 mL/kg）。動物は投与後 4 時間から給餌を再開し、採血は経口投与では投与後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6 及び 8 時間（ミダゾラムでは経口投与後 4 時間まで）、静脈内投与では投与後 0.083、0.25、0.5、1、2、4 及び 6 時間に実施した。血漿試料は 4°C、12,000 rpm で 10 分間の遠心分離により取得し、使用

まで -30°C で保存した。血漿試料 $50\ \mu\text{L}$ に蒸留水 $50\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \text{ng/mL}$ の IS 溶液 $50\ \mu\text{L}$ 及びアセトニトリル $250\ \mu\text{L}$ を添加して混合し、 4°C 、 $3,000\ \text{rpm}$ で 20 分間遠心分離した。その後、上清を適切な溶媒で希釈して LC-MS/MS に注入した。

3.2.4 ラット CYP3A2 活性に対するノボビオシンの *in vitro* 阻害作用の評価

予備検討において、ラット CYP3A2 発現系 ($1\ \text{pmol/mL}$) における 1'-ヒドロキシミダゾラムの生成量は、5 分間のインキュベーションまで直線性を示した。ノボビオシン (終濃度として 1 、 3 、 10 、 30 及び $100\ \mu\text{mol/L}$) をラット CYP3A2 発現系 (終濃度として $1\ \text{pmol/mL}$)、ミダゾラム (終濃度として $2\ \mu\text{mol/L}$) 及び $100\ \text{mmol/L}$ リン酸バッファー ($\text{pH}\ 7.4$) に添加してインキュベーション試料を調製した。メタノールの終濃度は 0.1% 未満とした。インキュベーション試料を 37°C の水浴中で 5 分間プレウオーミングし、NADPH Regenerating System を添加することで反応を開始した。5 分間のインキュベーション後、IS ($10\ \text{ng/mL}$) を含むあらかじめ氷冷したアセトニトリル $200\ \mu\text{L}$ を添加することで反応を終了させた。これらのサンプルは、 4°C 、 $3,000\ \text{rpm}$ で 20 分間遠心分離し、得られた上清を 0.1% ギ酸溶液で希釈した後に LC-MS/MS に注入した。

3.2.5 ノボビオシンのラット血漿中非結合型分率 ($f_{u,p}$) の算出

ノボビオシンのラットにおける $f_{u,p}$ は、分子量 8-kD をカットオフとする透析膜がインサートされきた 96 ウェル RED プレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて評価した。インキュベーション用血漿試料は、ラット血漿にリン酸バッファー ($\text{pH}\ 7.4$) で調製したノボビオシン溶液を添加することで調製した。ノボビオシンの終濃度は $1\ \mu\text{mol/L}$ とした。RED プレートのドナー側にインキュベーション用血漿試料 $300\ \mu\text{L}$ 、アクセプター側に $100\ \text{mmol/L}$ リン酸バッファー ($\text{pH}\ 7.4$) $500\ \mu\text{L}$ を添加し、 37°C で 16 時間インキュベーションした。例数は $n=3$ とした。インキュベーション後、ドナー側サンプル $50\ \mu\text{L}$ に $100\ \text{mmol/L}$ リン酸バッファー ($\text{pH}\ 7.4$) $50\ \mu\text{L}$ を添加し、アクセプター側サンプル $50\ \mu\text{L}$ にラット血漿 $50\ \mu\text{L}$ を添加した。これらのサンプルに IS 溶液 ($100\ \text{ng/mL}$) 及びアセトニトリル $250\ \mu\text{L}$ を添加して混合した後、 4°C 、 $3,000\ \text{rpm}$ で 20 分間遠心分離した。得られた上清を蒸留水で希釈した後に LC-MS/MS に注入した。

3.2.6 LC-MS/MS による測定

LC-MS/MS は Triple Quad 5500 (AB Sciex, Tokyo, Japan) 及び Agilent 1290 Infinity (HPLC) を用いた。カラムとして ACQUITY UPLC BEH C18 Column (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm×50 mm, Waters, for LC-MS/MS) を使い、カラムオーブンの温度は 40°C、流速は 0.4 mL/min とした。移動相 A は蒸留水、移動相 B は 0.1%ギ酸含有アセトニトリル、移動相 C は 15 mmol/L 酢酸アンモニウム及び移動相 D はアセトニトリルとした。グラジエント分析条件は、スルファサラジンで 0 min : 20% D、2 min : 50% D、2.5 min : 50% D、2.51 min : 20% D、3 min : 20% D とし、それ以外のすべての化合物で 0 min : 0% B、0.5 min : 0% B、1.5 min : 100% B、2 min : 100% B、2.01 min : 0% B、2.5 min : 0% B とした。Multiple reaction monitoring (MRM) は、スルファサラジンではネガティブモードとし、それ以外では全てポジティブモードとした。モニターイオン (プリカーサーイオン→プロダクトイオン) は、スルファサラジン (397→197)、フェキソフェナジン (502→466)、ミダゾラム (326→291)、ボセンタン (552→202)、ノボビオシン (613→189)、1'-ヒドロキシミダゾラム (342→324)、ジクロフェナク (294→214)、フレカイニド (415→301) 及び 1'-ヒドロキシミダゾラム-d₄ (346→328) とした。IS は、スルファサラジンではジクロフェナク、1'-ヒドロキシミダゾラムでは 1'-ヒドロキシミダゾラム-d₄、それ以外の化合物ではフレカイニドを使用した。検量線濃度範囲は、スルファサラジンで 1-500 ng/mL、フェキソフェナジンで 0.1-20 ng/mL、ミダゾラムで 0.02-20 ng/mL、ボセンタンで 2-500 ng/mL 及びノボビオシンで 0.1-10 ng/mL とした。サンプル中濃度は、Analyst 1.6.3 (AB Sciex, Tokyo, Japan) を使い、IS ピーク面積に対する目的成分ピーク面積の比から作成した検量線より直線回帰式により算出した。

3.2.7 データ解析

血漿中濃度は個体ごとに解析し、薬物動態パラメータは WinNonlin 2.1 (Pharsight, Mountain View, CA) を用いて、ノンコンパートメントモデル解析により取得した。C_{max} 及び T_{max} は実験観察値より取得された。AUC_{0-t} は台形法により算出した。AUC_{t-inf} の算出は C_{last} を k_e で除することにより算出した。最終的に AUC_{0-inf} は AUC_{0-t} に AUC_{t-inf}

を足すことで取得した。 CL_{tot} 、 Vd_{ss} 及び $t_{1/2}$ は静脈内投与後試験より算出した。 k_e 及び $t_{1/2}$ の算出には定量値が得られた少なくとも三時点の数値を用いた。個体別の各薬物動態パラメータのデータは平均値化し、平均値±標準偏差として報告した。 AUC_{0-inf} 及び C_{max} の統計解析は、これらの数値を対数変換した後に実施した。統計解析は対応のない両側t検定により実施し、全ての場合において p 値<0.05を統計学的に有意と見なした。

3.3 結果

3.3.1 ラットにおけるプローブ基質薬の体内動態に対するノボビオシンの影響

ノボビオシン (3 mg/kg) 又は溶媒をラットに経口投与してから 15 分後に、経口投与 (5 mg/kg) 及び静脈内投与 (1 mg/kg) したときのスルファサラジンの血漿中濃度推移を Figure 16 に示す。また、Table 8 にはスルファサラジンの薬物動態パラメータを示す。ノボビオシンにより経口投与後のスルファサラジンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} はそれぞれ 3.2 倍及び 5.9 倍と有意に上昇した一方、静脈内投与後のスルファサラジンの薬物動態パラメータはノボビオシンによる有意な影響は受けなかった。なお、経口投与後のスルファサラジンの T_{max} 及び $t_{1/2}$ はノボビオシンによる影響を受けなかった。

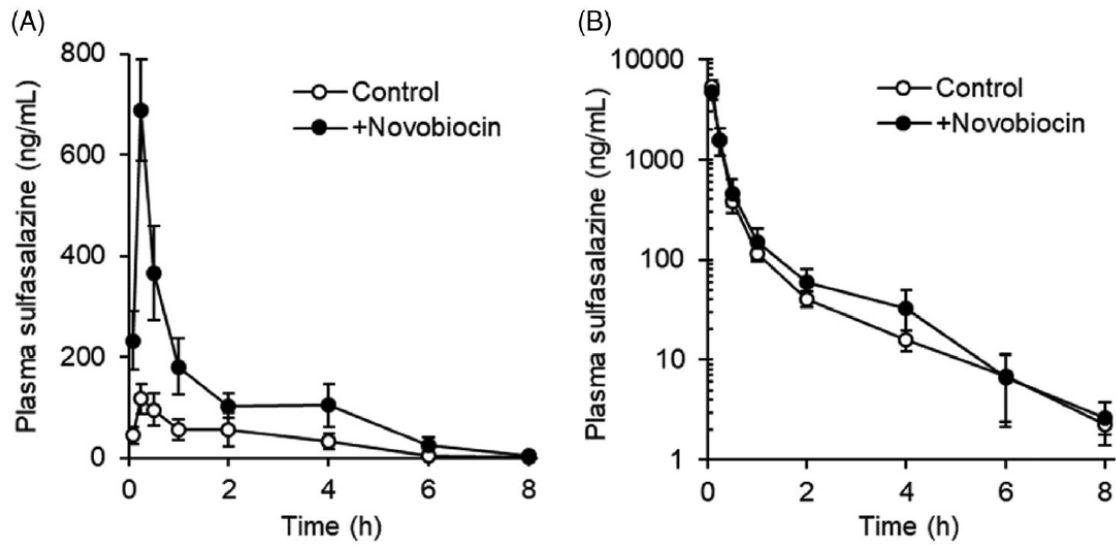


Figure 16. Plasma concentration–time profiles of orally (5 mg/kg, A) and intravenously (1 mg/kg, B) administered sulfasalazine with or without novobiocin pre-treatment (3 mg/kg) in rats. Data are presented as the mean \pm SD for three rats.

Table 8. Pharmacokinetic parameters of orally (5 mg/kg) and intravenously (1 mg/kg) administered sulfasalazine with or without novobiocin pre-treatment (3 mg/kg) in rats.

Substrate	Control	+ Novobiocin
Sulfasalazine (5 mg/kg oral)		
ACU _{0-inf} (ng· h/mL)	269 \pm 123	865 \pm 199*
C _{max} (ng/mL)	117 \pm 30	688 \pm 101***
t _{max} (h)	0.25 \pm 0	0.25 \pm 0
t _{1/2} (h)	0.95 \pm 0.15	0.96 \pm 0.39
Sulfasalazine (1 mg/kg intravenous)		
ACU _{0-inf} (ng· h/mL)	1728 \pm 205	1735 \pm 376
CL _{tot} (mL/min/kg)	9.7 \pm 1.1	9.9 \pm 2.0
Vd _{ss} (L/kg)	0.24 \pm 0.04	0.30 \pm 0.04
t _{1/2} (h)	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1

Data are presented as the mean \pm SD for three rats.

* p < .05, ** p < .001 versus the control group.

ノボビオシンは経口投与後のフェキソフェナジン (5 mg/kg) 及びダゾラム (1 mg/kg) の血漿中濃度に影響を与えなかった (Figure 17 及び Table 9)。また、経口投与後のフェキソフェナジン及びミダゾラムの T_{max} 及び $t_{1/2}$ は、ノボビオシンによる影響を受けなかった。さらに、ノボビオシンは、静脈内投与後のボセンタンの薬物動態パラメータに対しても影響を与えなかった (Figure 17 及び Table 9)。

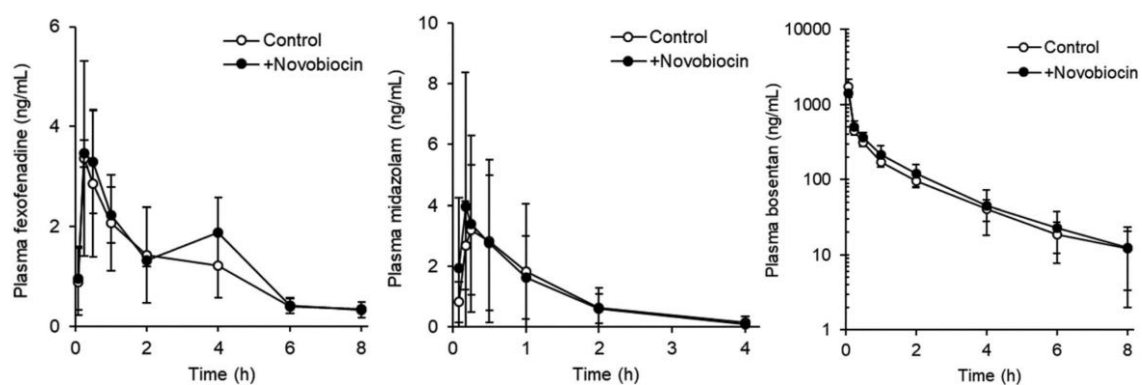


Figure 17. Plasma concentration–time profiles of orally administered fexofenadine (5 mg/kg) or midazolam (1 mg/kg), or intravenously administered bosentan (1 mg/kg) with or without novobiocin pre-treatment (3 mg/kg) in rats. Data are presented as the mean \pm SD for three or six rats.

Table 9. Pharmacokinetic parameters of orally administered fexofenadine (5 mg/kg) and midazolam (1 mg/kg), and intravenously administered bosentan (1 mg/kg) with or without novobiocin pre-treatment (3 mg/kg) in rats.

Substrate	Control	+ Novobiocin
Fexofenadine (5 mg/kg oral)		
ACU _{0-inf} (ng·h/mL)	10.5 ± 4.5	11.7 ± 2.6
C _{max} (ng/mL)	3.4 ± 1.8	3.7 ± 0.7
t _{max} (h)	0.33 ± 0.14	0.33 ± 0.14
t _{1/2} (h)	2.6 ± 0.6	2.1 ± 0.7
Midazolam (1 mg/kg oral)		
ACU _{0-inf} (ng·h/mL)	4.6 ± 4.5	4.4 ± 376
C _{max} (ng/mL)	3.4 ± 2.5	4.2 ± 4.4
t _{max} (h)	0.28 ± 0.11	0.21 ± 0.04
t _{1/2} (h)	0.86 ± 0.23	0.75 ± 0.12
Bosentan (1 mg/kg intravenous)		
ACU _{0-inf} (ng·h/mL)	1008 ± 165	1045 ± 2.95
CL _{tot} (mL/min/kg)	16.9 ± 3.1	16.8 ± 4.8
Vd _{ss} (L/kg)	1.5 ± 0.4	1.5 ± 0.1
t _{1/2} (h)	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3

Data are presented as the mean ± SD for three to six rats.

There were no significant differences between the control and novobiocin pre-treatment groups.

ラットに経口投与したときのノボビオシンの血漿中非結合型濃度を評価するため、経口投与後のスルファサラジンの体内動態に対するノボビオシン前処置の影響を評価したときに取得した血漿試料を用いて、ノボビオシン濃度を測定した。ノボビオシンの C_{max} は 1.3 μmol/L であり (Figure 18)、ラットの血漿中におけるノボビオシンの f_{u,p} は 0.0146 であったことから、経口投与したときのノボビオシンの非結合型 C_{max} は 19.7 nmol/L であると算出された。

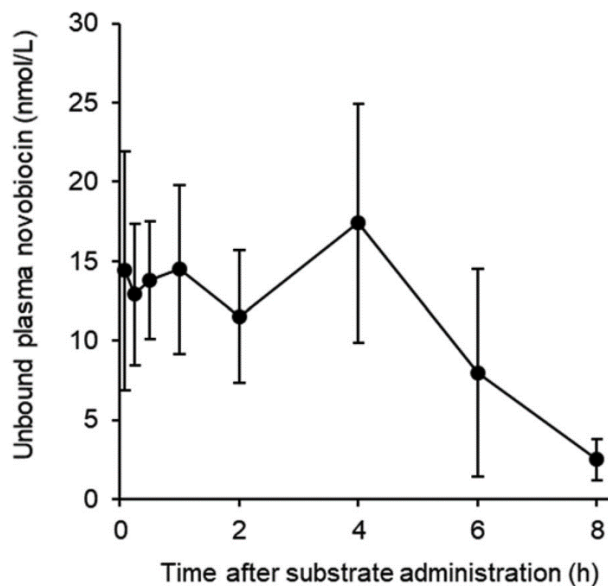


Figure 18. Unbound plasma concentration–time profiles of orally administered novobiocin (3 mg/kg) after administration of a substrate in rats. Data are presented as the mean \pm SD for three rats.

3.3.2 ラット CYP3A2 活性に対するノボビオシンの *in vitro* 阻害作用の評価

ラット CYP3A2 発現系において、ノボビオシンは 100 $\mu\text{mol/L}$ までミダゾラムの 1'-ヒドロキシ活性を阻害しなかった。一方、CYP3A2 阻害の陽性対照薬であるケトコナゾールは 10 $\mu\text{mol/L}$ で CYP3A2 活性を 93%阻害した。

3.4 考察

本研究では、ラット *in vivo* において化合物の消化管吸収における Bcrp の寄与を評価する上で低用量のノボビオシンが有用であるかを検討した。ノボビオシンの消化管及び消化管以外の Bcrp に対する影響を評価する目的で、経口投与及び静脈内投与後のスルファサラジンの体内動態に対するノボビオシンの影響を評価した。さらに、P-gp、CYP3A 及び肝臓 Oatp 活性に対する影響を評価する目的で、経口投与後のフェキシフェナジン及びミダゾラム、並びに静脈内投与後のボセンタンの血漿中濃度に対するノボビオシンの影響を評価した。

ノボビオシンは投与量を 3 mg/kg としたとき、Bcrp のプローブ基質薬であるスルファサラジンの静脈内投与後の薬物動態パラメータに対して影響することなく、経口投与後のスルファサラジンの $\text{ACU}_{0-\text{inf}}$ 及び C_{max} を有意に上昇させたことから、スルファ

サラジンは他の臓器に発現する Bcrp 活性に影響することなく、消化管 Bcrp を選択的に阻害することが示された。経口投与後のノボビオシンは消化管から吸収されるものの、その血漿蛋白結合率が高いことで非結合型 C_{max} は低く、消化管吸収された後に肝臓や腎臓等の全身の Bcrp に対して阻害作用を示さなかったと考えられた。一方、門脈カニューレーションラットを用いた検討において、経口投与後のスルファサラジンの F_a は Bcrp 阻害薬である Ko143 併用下で 4.7 倍に上昇することが報告されており⁵⁹、本検討におけるスルファサラジンの AUC 上昇率と概ね一致した。また ABCG2 421C>A 遺伝子多型は、主に BCRP 基質薬の消化管吸収に影響することを考慮すると、ノボビオシンを Bcrp 阻害薬として用いることで、ラットを用いた薬物動態試験からヒトの消化管吸収における ABCG2 421C>A の影響を予測することができる可能性がある。実際に、本研究では、ノボビオシン併用時における経口投与後のスルファサラジンの AUC 上昇率 (3.2 倍) は、ABCG2 421C>A 遺伝子多型を有するヒトで観察されたスルファサラジンの AUC 上昇率 (2.4~3.5 倍) と同程度であった。

ノボビオシン (3 mg/kg) は、経口投与後の P-gp プローブ基質薬であるフェキシソフェナジンの血漿中濃度に対して影響を示さなかったことから、ノボビオシンの P-gp 活性に対する阻害作用は、ラット *in vivo* においてほとんど認められないことが確認された。

クルクミンは、ラット *in vivo* において消化管 CYP3A 阻害作用を有することが報告されている⁶³。そこで、クルクミンと比較するため、ラット CYP3A2 発現系を用いて、ラット CYP3A2 活性に対するノボビオシンの阻害作用を *in vitro* で評価した。その結果、ノボビオシンはラット CYP3A2 活性に対してほとんど阻害作用を示さないことが確認された。さらに、ノボビオシンの CYP3A 活性に対する影響を *in vivo* で評価する目的で、CYP3A プローブ基質薬であるミダゾラムを経口投与したときの体内動態に対するノボビオシンの影響を評価した。ラットにおけるミダゾラムの $F_a \times F_g$ は、0.3 であることが報告されている⁴⁴。ミダゾラムは膜透過性が高く、 F_a はほぼ 1.0 と見なすことができるため、ミダゾラムは CYP3A による肝代謝だけではなく、消化管代謝を評価する上での理想的なプローブであると言える。ノボビオシンは経口投与後のミダゾラムの血漿中濃度に対してほとんど影響を及ぼさなかったことから、肝臓及び消化管 CYP3A 活性に対する阻害作用をほとんど示さないことが確認された。この *in vivo* にお

ける試験成績は、ラット CYP3A2 発現系を用いた *in vitro* における試験成績と一致した。

ノボビオシンは、クルクミンと同様にヒト OATP1B1 及び OATP1B3 発現系を用いた検討において、20 $\mu\text{mol/L}$ で OATP1B1 及び OATP1B3 活性をそれぞれ 60 及び 85% 阻害することが報告されている⁶⁴。そこで、肝臓 Oatp のプローブ基質薬としてボセンタンを用い、ノボビオシンのラット肝臓 Oatp 活性に対する影響を *in vivo* で評価した。ボセンタンは Oatp の典型的な基質薬であり、ラットにおいて Oatp 阻害剤シクロスポリン A と併用することで、静脈内投与後のボセンタンの AUC が顕著に上昇することが報告されていることから⁶⁵、肝臓 Oatp の理想的なプローブになると考えられる。本研究では、静脈内投与後のボセンタンの薬物動態パラメータはノボビオシンによる影響をほとんど受けななかつたことから、ラット *in vivo* において肝臓 Oatp 活性に対するノボビオシンの影響は無視できると考えられた。

以上より、ノボビオシンはラットにおいて、投与量を 3 mg/kg と低くすることで、P-gp、CYP3A 及び肝臓 Oatp 活性に対して影響することなく、消化管 Bcrp を選択的に阻害することが示された。したがって、ノボビオシンは、ラットにおいて新薬候補化合物の消化管吸収における Bcrp の寄与を簡便に評価することを可能にすると考えられた。

3.5 小括

第 3 章の検討結果から、以下のことが明らかとなった。

- ラット *in vivo* において、ノボビオシン (3 mg/kg) は、静脈内投与後のスルファサラジンの薬物動態パラメータに影響することなく、経口投与後のスルファサラジンの $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ 及び C_{max} をそれぞれ 3.2 倍及び 5.9 倍に上昇させた。よって、スルファサラジンは肝臓及び腎臓等の Bcrp 活性に影響することなく、消化管 Bcrp 活性を選択的に阻害することが示された。ノボビオシンの Bcrp 阻害に消化管選択性が認められた理由としては、経口投与後のノボビオシンの血漿中非結合型濃度が極めて低いことに由来するものと考えられた。
- ノボビオシン (3 mg/kg) は、経口投与後のフェキソフェナジン及びミダゾラム、並びに静脈内投与後のボセンタンの血漿中濃度に影響を及ぼさなかつたことか

ら、スルファサラジンは P-gp、CYP3A 及び肝臓 Oatp 活性に影響を与えないことが示された。

- ノボビオシンは、ラット *in vivo* において新薬候補化合物の消化管吸収率が低かった際に、Bcrp による汲み出しが原因であるかを簡便に評価することを可能にすると考えられた (Figure 19)。

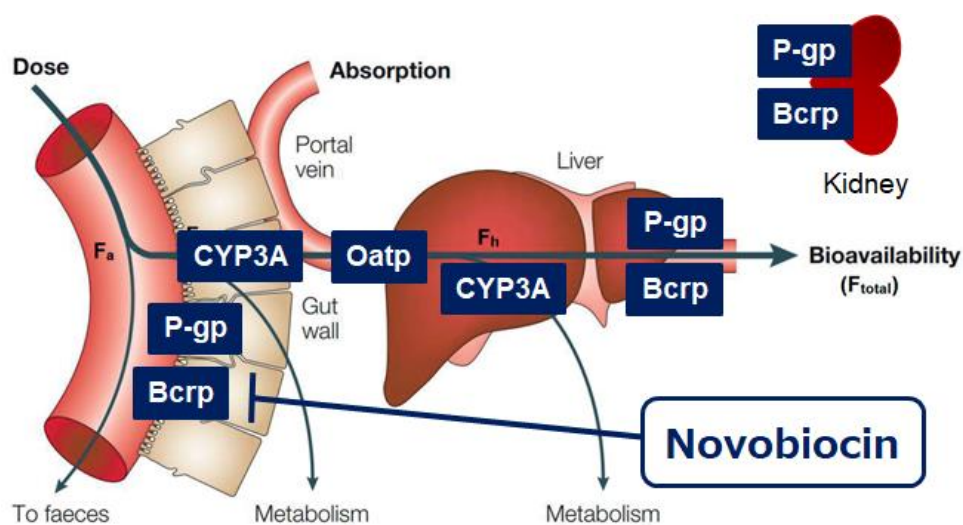


Figure 19. Selective inhibitory effect of novobiocin (3 mg/kg) after oral administration on intestinal Bcrp activity in rats. The figure was cited from Nat Rev Drug Discov 2003; 2(3): 192-204 with some modifications by the author.

総括

新薬開発において、経口吸収率が低い医薬品は様々な課題が生じる可能性があるため、高い経口吸収率が期待される新薬候補化合物を創製する必要がある。なお、 $F_a \times F_g$ のヒト及びラット間の相関性は高く、ラットで $F_a \times F_g$ が低い場合にはヒトでも $F_a \times F_g$ が低く、経口吸収率が低くなる可能性が高い。ここで $F_a \times F_g$ が低下する生物学的要因としては、低膜透過性、CYP3A による初回通過代謝、並びに P-gp 及び Bcrp による消化管管腔への汲み出しが主に挙げられ、合成展開により $F_a \times F_g$ を最適化するためには、上記のいずれが原因であるかを究明する必要があると考えられる。なお、*In vivo* での評価方法の一つとして、CYP3A、P-gp 及び Bcrp 阻害薬を用いた方法が挙げられるが、汎用されている阻害薬は経口吸収されることで消化管以外の CYP3A、P-gp 及び Bcrp も阻害されることから、経口投与の試験から簡便に評価することは困難であると考えられる。そのため、消化管吸収率の低い原因が CYP3A、P-gp 及び Bcrp のいずれであるかを既存方法と比較してより効率的に究明するためには消化管及び標的選択性の高い阻害薬が必要となる。そこで本研究では、ベルガモチン、エラクリダル及びノボビオシンが消化管 CYP3A、P-gp 及び Bcrp 選択的阻害薬としてそれぞれ有用であるかを検討することを目的とした。

第一章では、ベルガモチンの消化管 CYP3A 選択的阻害薬としての可能性を評価した。経口投与 2 時間後のベルガモチンは、経口投与後のフェキソフェナジン及び静脈内投与後のブスピロンの血漿中濃度に影響することなく、経口投与後のブスピロンの AUC_{0-inf} 及び C_{max} を顕著に上昇させたことから、P-gp 及び肝臓 CYP3A 活性に影響することなく、消化管 CYP3A 活性のみを選択的に阻害することが示された。よって、ベルガモチンは消化管 CYP3A 選択的阻害薬となり得ることが示された。

第二章では、エラクリダルの消化管 P-gp 選択的阻害薬としての可能性を評価した。経口投与後のエラクリダルは、経口投与後のブスピロンの血漿中濃度に影響することなく、経口投与後のフェキソフェンジンの AUC_{0-t} 及び C_{max} を顕著に上昇させたことから、CYP3A 活性に影響することなく、P-gp を選択的に阻害することが示された。さらに、報告されている経口投与後のエラクリダルの血漿中濃度を考慮すると、エラクリダルは消化管以外の P-gp を阻害する可能性は極めて低いと考えられた。よって、エラクリダルは消化管 P-gp 選択的阻害薬となり得ることが示された。一方、ラット消化管

組織を用いた *in situ* 単回灌流法による検討で消化管吸収に P-gp の関与が示唆されていたコルヒチン及びインジナビルの AUC_{0-t} 及び C_{max} はエラクリダルにより上昇したのに対して、同様に P-gp の関与が示唆されいたたベラパミル、ジルチアゼム及びタクロリムスを経口投与したときの血漿中濃度はエラクリダルによる影響を受けなかった。

第三章では、ノボビオシンの消化管 Bcrp 選択的阻害薬としての可能性を評価した。経口投与後のノボビオシンは、経口投与後のスルファサラジンの AUC_{0-t} 及び C_{max} を顕著に上昇させた一方、静脈内投与後のスルファサラジンの薬物動態パラメータには影響を及ぼさなかったことから、Bcrp 阻害は消化管のみで起こることが示された。さらに、経口投与後のノボビオシンは、経口投与後のフェキソフェナジン及びミダゾラムの血漿中濃度、並びに静脈内投与後のボセンタンの薬物動態パラメータに影響を及ぼさなかったことから、P-gp、CYP3A 及び肝臓 Oatp を阻害しないことが示された。よって、ノボビオシンは消化管 Bcrp 選択的阻害薬となり得ることが示された。

以上より、創薬研究において、ラットにおける新薬候補化合物の消化管吸収率が低かった際に、その原因が CYP3A、P-gp 及び Bcrp のいずれであるかを既存方法と比較してより効率的に究明する上で、ベルガモチン、エラクリダル及びノボビオシンが消化管 CYP3A、P-gp 及び Bcrp 選択的阻害薬としてそれぞれ有用であると考えられた (Figure 20)。

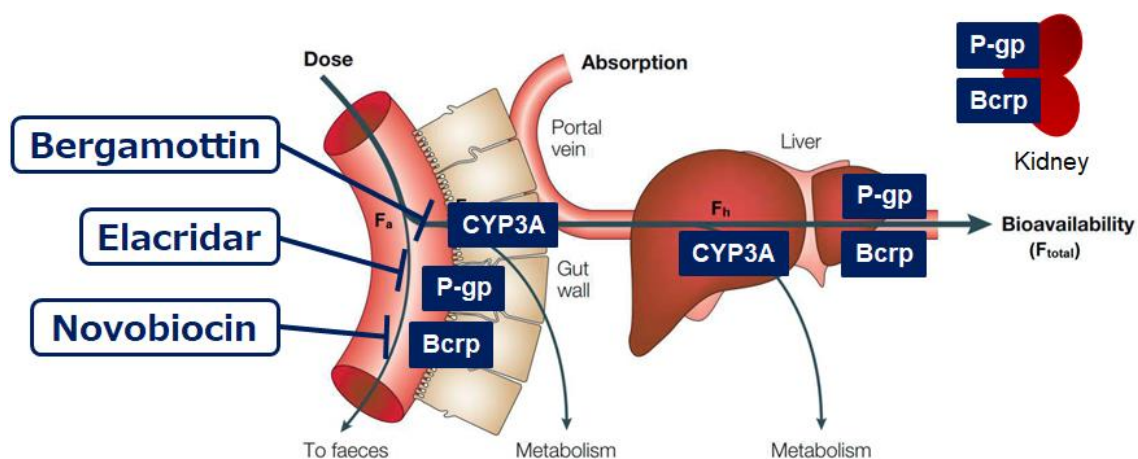


Figure 20. Selective inhibitors of intestinal CYP3A, P-gp and Bcrp in rats. The figure was cited from Nat Rev Drug Discov 2003; 2(3): 192-204 with some modifications by the author.

参考文献

1. Cao X, Gibbs S, Fang L, et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm Res*. 2006;23(8):1675-1686.
2. Chiou W, Barve A. Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats. *Pharm Res*. 1998;15(11):1792 -1795.
3. Zhao Y, Abraham M, Le J, et al. Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption. *Eur J Med Chem*. 2003;38(3):233 -243.
4. Kadono K, Koakutsu A, Naritomi Y, et al Teramura T. Comparison of intestinal metabolism of CYP3A substrates between rats and humans: application of portal-systemic concentration difference method. *Xenobiotica*. 2014;44(6):511-521.
5. Zhang Y, Hsieh Y, Izumi T, et al. Effects of ketoconazole on the intestinal metabolism, transport and oral bioavailability of K02, a novel vinylsulfone peptidomimetic cysteine protease inhibitor and a P450 3A, P-glycoprotein dual substrate, in male Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287(1):246-252.
6. Humphreys W, Obermeier M, Chong S, et al. Oxidative of acylguanidine prodrugs: intestinal presystemic activation in rats limits absorption and can be inhibited by co-administration of ketoconazole. *Xenobiotica*. 2003;33(1):93-106.
7. Kotegawa T, Laurijssens B, Von Moltke L, et al. In vitro, pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of ketoconazole and midazolam in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(3):1228-1237.
8. Matsuda Y, Konno Y, Satsukawa M, et al. Assessment of intestinal availability of various drugs in the oral absorption process using portal vein-cannulated rats. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(12):2231-2238.
9. Fukuda K, Ohta T, Oshima Y, et al. Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction. *Pharmacogenetics*. 1997;7(5):391-396.
10. He K, Iyer K, Hayes R, et al. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol*. 1998;11(4):252-259.
11. de Castro W, Mertens-Talcott S, Derendorf H, et al. Effect of grapefruit juice, naringin, naringenin, and bergamottin on the intestinal carrier-mediated transport of talinolol in rats. *J Agric Food Chem*. 2008;56(12):4840-4845.
12. Sugimoto H, Hirabayashi H, Kimura Y, et al. Quantitative investigation of the impact of P-glycoprotein inhibition on drug transport across blood-brain barrier in rats. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(1):8-14.

13. Ward K, Azzarano L. Preclinical pharmacokinetic properties of the P-glycoprotein inhibitor GF120918A (HCl salt of GF120918, 9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinolinyl)ethyl]phenyl]-4-acridine-carboxamide) in the mouse, rat, dog, and monkey. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310(2):703-709.
14. Su Y, Hu P, Lee S, et al. Using novobiocin as a specific inhibitor of breast cancer resistant protein to assess the role of transporter in the absorption and disposition of toptecan. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10(4):519-536.
15. Mitschke D, Reichel A, Fricker G, et al. Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(6):1039-1045.
16. Bailey D, Spence J, Munoz C, et al. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet*. 1991;337(8736):268-269.
17. Ducharme M, Warbasse L, Edwards D. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;57(5):485-491.
18. Kupferschmidt H, Ha H, Ziegler W, et al. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;58(1):20-28.
19. Kupferschmidt H, Fattinger K, Ha H, et al. Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;45(4):355-359.
20. Lilja J, Kivistö K, Backman J, et al. Grapefruit juice substantially increases plasma concentrations of buspirone. *Clin Pharmacol Ther*. 1998;64(6):655-660.
21. Lilja J, Kivistö K, Neuvonen P. Duration of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate simvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68(4):384-390.
22. Rioux N, Bellavance E, Bourg S, et al. Assessment of CYP3A-mediated drug-drug interaction potential for victim drugs using an in vivo rat model. *Biopharm Drug Dispos*. 2013;34(7):396-401.
23. Cvetkovic M, Leake B, Fromm M, et al. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(8).
24. Kamath A, Yao M, Zhang Y, et al. Effect of fruit juices on the oral bioavailability of fexofenadine in rats. *J Pharm Sci*. 2005;94(2):233-239.
25. Lilja J, Kivistö K, Backman J, et al. Grapefruit juice substantially increases plasma concentrations of buspirone. *Clin Pharmacol Ther*. 1998;64(6):655-660.

26. Kenny JR, Grime K. Pharmacokinetic consequences of time-dependent inhibition using the isolated perfused rat liver model. *Xenobiotica*. 2006;36(5):351-365.
27. Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, et al. Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen. *Pharm Res*. 2001;18(4):432-438.
28. Bedada S, Sudhakar Y, Neerati P. Resveratrol enhances the bioavailability of fexofenadine in healthy human male volunteers: involvement of P-glycoprotein inhibition. *Bioequivalence Bioavailab*. 2014;6(5):158-163.
29. Misaka S, Miyazaki N, Yatabe M, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of nadolol with itraconazole, rifampicin and grapefruit juice in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2013;53(7):738-745.
30. Miyazaki N, Misaka S, Ogata H, et al. Effects of itraconazole, dexamethasone and naringin on the pharmacokinetics of nadolol in rats. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28(4):356-361.
31. Bedada S, Yellu N, Neerati P. Effect of resveratrol on the pharmacokinetics of fexofenadine in rats: Involvement of P-glycoprotein inhibition. *Pharmacol Rep*. 2016;68(2):338-343.
32. Amidon GL, Sinko PJ, Fleisher D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm Res*. 1988;5(10):651-654.
33. Varma MVS, Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: effect on solubility and permeability in vitro, in situ and in vivo. *Eur J Pharm Sci*. 2005;25(4-5):445-453.
34. Tamura S, Ohike A, Ibuki R, et al. Tacrolimus is a class II low-solubility highpermeability drug: the effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats. *Pharm Sci*. 2002;91(3):719-729.
35. Athukuri B, Neerati P. Enhanced oral bioavailability of diltiazem by the influence of gallic acid and ellagic acid in male wistar rats: involvement of CYP3A and P-gp Inhibition. *Phytother Res*. 2017;31(9):1441-1448.
36. Sandström R, Karlsson A, Lennernäs H. The absence of stereoselective P-glycoprotein-mediated transport of R/S-verapamil across the rat jejunum. *Pharm Pharmacol*. 1998;50(7):729-735.
37. Ho Y, Huang D, Hsueh W, et al. Effects of St. John's wort extract on indinavir pharmacokinetics in rats: differentiation of intestinal and hepatic impacts. *Life Sci*. 2009;85(7-8):296-302.

38. Dahan A, Amidon G. Grapefruit juice and its constituents augment colchicine intestinal absorption: potential hazardous interaction and the role of p-glycoprotein. *Pharm Res.* 2009;26(4):883-892.
39. Lévesque J, Bleasby K, Chefson A, et al. Impact of passive permeability and gut efflux transport on the oral bioavailability of novel series of piperidine-based renin inhibitors in rodents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21(18):5547-5551.
40. Liu H, Sun H, Wu Z, et al. P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux limits intestinal absorption of the Hsp90 inhibitor SNX-2112 in rats. *Xenobiotica.* 2014;44(8):763-768.
41. Yang J, Milton M, Yu S, et al. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein affect disposition of tandutinib, a tyrosine kinase inhibitor. *Drug Metab Lett.* 2010;4(4):201-212.
42. Liu X, Cheong J, Ding X, et al. Use of cassette dosing approach to examine the effects of P-glycoprotein on the brain and cerebrospinal fluid concentrations in wild-type and P-glycoprotein knockout rats. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(4):482-491.
43. Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, et al. In vivo assessment of the impact of efflux transporter on oral drug absorption using portal vein-cannulated rats. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(8):1514-1521.
44. Yamamoto S, Kosugi Y, Hirabayashi H, et al. Impact of P-Glycoprotein on intestinal absorption of an Inhibitor of apoptosis protein antagonist in rats: mechanisms of nonlinear pharmacokinetics and food effects. *Pharm Res.* 2018;35(10):190.
45. Tachibana T, Kato M, Sugiyama Y. Prediction of nonlinear intestinal absorption of CYP3A4 and P-glycoprotein substrates from their in vitro K_m values. *Pharm Res.* 2012;29(3):651-668.
46. Hong S, Chang K, Koh Y, et al. Effects of lovastatin on the pharmacokinetics of verapamil and its active metabolite, norverapamil in rats: possible role of P-glycoprotein inhibition by lovastatin. *Arch Pharm Res.* 2009;32(10):1447-1452.
47. Hong S, Yang J, Han J, et al. Effects of lovastatin on the pharmacokinetics of diltiazem and its main metabolite, desacetyldiltiazem, in rats: possible role of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by lovastatin. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(1):129-135.
48. Yigitaslan S, Erol K, Cengelli C. The effect of P-Glycoprotein inhibition and activation on the absorption and serum levels of cyclosporine and tacrolimus in rats. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(2):237-242.
49. Karibe T, Hagihara-Nakagomi R, Abe K, et al. Evaluation of the usefulness of breast cancer resistance protein (BCRP) knockout mice and BCRP inhibitor-treated monkeys

- to estimate the clinical impact of BCRP modulation on the pharmacokinetics of BCRP Substrates. *Pharm Res.* 2015;32(5):1634-1647.
50. Gotanda K, Tokumoto T, Hirota T, et al. Sulfasalazine disposition in a subject with 376C>T (Nonsense Mutation) and 421C>A variants in the ABCG2 gene. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;80(5):1236-1237.
 51. Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, et al. Pharmacogenetic characterization of sulfasalazine disposition based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84(1):95-103.
 52. Wan Z, Wang G, Li T, et al. Marked alteration of rosuvastatin pharmacokinetics in healthy chinese with ABCG2 34G>A and 421C>A homozygote or compound heterozygote. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;354(3):310-315.
 53. Lee H, Hu M, Lui S, et al. Effects of polymorphisms in ABCG2, SLCO1B1, SLC10A1 and CYP2C9/19 on plasma concentrations of rosuvastatin and lipid response in Chinese patients. *Pharmacogenomics.* 2013;14(11):1283-1294.
 54. Zhang W, Yu B, He Y, et al. Role of BCRP 421C>A polymorphism on rosuvastatin pharmacokinetics in healthy chinese males. *Clin Chim Acta.* 2006;373(1-2):99-103.
 55. Keskitalo J, Zolk O, Fromm M, et al. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(2):197-203.
 56. Li R, Barton H. Explaining ethnic variability of transporter substrate pharmacokinetics in healthy asian and caucasian subjects with allele frequencies of OATP1B1 and BCRP: A mechanistic modeling analysis. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57(4):491-503.
 57. Soko N, Chimusa E, Masimirembwa C, et al. An African-specific profile of pharmacogene variants for rosuvastatin plasma variability: Limited role for SLCO1B1 c.521T>C and ABCG2 c.421A>C. *Pharmacogenomics J.* 2019;19(3):240-248.
 58. Kunimatsu S, Mizuno T, Fukudo M, et al. Effect of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein inhibition on the pharmacokinetics of sunitinib in rats. *Drug Metab Dispos* 2013;41(8):1592-1597.
 59. Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, et al. In Vivo assessment of the impact of efflux transporter on oral drug absorption using portal vein-cannulated rats. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(8):1514-1521.
 60. Zhou X, Zhang F, Chen C, et al. Impact of curcumin on the pharmacokinetics of rosuvastatin in rats and dogs based on the conjugated metabolites. *Xenobiotica.* 2017;47(3):267-275.

61. Sun X, Li J, Guo C, et al. Pharmacokinetic effects of curcumin on docetaxel mediated by OATP1B1, OATP1B3 and CYP450s. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2016;31(4):269-275.
62. Lee C, Ki S, Choi J. Effects of oral curcumin on the pharmacokinetics of intravenous and oral etoposide in rats: Possible role of intestinal CYP3A and P-gp inhibition by curcumin. *Biopharm Drug Dispos.* 2011;32(4):245-251.
63. Lee CK, Ki SH, Choi JS. Effects of oral curcumin on the pharmacokinetics of intravenous and oral etoposide in rats: possible role of intestinal CYP3A and P-gp inhibition by curcumin. *Biopharm Drug Dispos.* 2011;32(4):245-251.
64. Karlgren M, Vildhede A, Norinder U, et al. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *J Med Chem.* 2012;55(10):4740-4763.
65. Treiber A, Schneiter R, Delahaye S, et al. Inhibition of organic anion transporting polypeptide-mediated hepatic uptake is the major determinant in the pharmacokinetic interaction between bosentan and cyclosporin A in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(3):1121-1129.

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました東京理科大学薬学部 青山隆夫教授に厚く御礼申し上げます。また、多くの有益な御助言とご指導を賜りました東京理科大学薬学部 花輪剛久教授、山下親正教授、西川元也教授、及び根岸健一准教授に心から御礼申し上げます。また、的確なご指導を賜りました東京理科大学薬学部 河野洋平助教に感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご協力を頂きましたトーアエイヨー株式会社 佐藤隆氏、渡辺宜明氏、及び谷山和弘氏に感謝致します。

2020年9月