

目次

総論の部	1
緒言	2
第1章 CYP 酵素の阻害による薬物代謝物の血中曝露の変動	5
第1節 ミダゾラム (MDZ) の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響	7
1-1) MDZ 静脈内投与後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 阻害の影響	8
1-2) MDZ 中間代謝物の全身クリアランスに及ぼす CYP 阻害の影響	10
1-3) MDZ 静脈内投与後の両中間代謝物の血中移行量の算出	11
1-4) CYP 阻害による MDZ 静脈内投与後の中間代謝物の体内動態に及ぼす胆汁中排泄の影響：胆管カニューレラットを用いた検討	12
第2節 ジアゼパム (DAP) 及びタモキシフェン (TAM) の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響	15
2-1) 親薬物静脈内投与後の親薬物及びその中間代謝物の体内動態に及ぼす CYP 阻害の影響	16
2-2) 中間代謝物の全身クリアランスに対する CYP 阻害の影響	19
2-3) 親薬物静脈内投与後の中間代謝物の血中移行量に対する CYP 阻害の影響	20
第3節 CYP 阻害による薬物中間代謝物の血中曝露増加のメカニズムの解析	21
3-1) 親薬物静脈内投与後の中間代謝物の体内動態に関する PB-PK モデルの構築	21
3-2) 親薬物及びその中間代謝物の AUC の式の誘導	22
第4節 親薬物及び中間代謝物の代謝に及ぼす CYP 阻害の影響：ラット肝ミクロソームを用いた <i>in vitro</i> 代謝試験	24
4-1) ラット肝ミクロソームを用いた <i>in vitro</i> 代謝試験による MDZ とその中間代謝物の代謝速度定数の算出	24
4-2) ラット肝ミクロソームを用いた <i>in vitro</i> 代謝試験による DAP 及び TAM とその中間代謝物の代謝速度定数の算出	27
第5節 考察	29

第2章 親薬物経口投与後の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響	35
第1節 MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 阻害の影響	36
1-1) MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移	36
1-2) MDZ 経口投与後のバイオアベイラビリティの算出	38
第2節 親薬物経口投与後の CYP 阻害による中間代謝物の血中曝露増加のメカニズムの解析	40
2-1) MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の体内動態モデルの構築	40
2-2) $M_{1,H}$ の算出	42
2-3) $M_{1,GI}$ の算出	43
2-4) 門脈カニューレラットを用いた MDZ 経口投与試験後の門脈中 AUC の算出	44
2-5) 全身循環血中に移行した MDZ 中間代謝物の生成量に及ぼす CYP 阻害の影響	49
第3節 考察	50
第3章 臨床における中間代謝物の血中曝露増加の可能性	53
第1節 ケトコナゾール (KTZ) との薬物間相互作用による MDZ 中間代謝物の体内動態の変化	53
1-1) MDZ 及びその中間代謝物の血中 AUC に及ぼす KTZ 前処理の影響	54
第2節 急性肝障害モデルラットにおける MDZ 中間代謝物の体内動態の変動	56
2-1) 急性肝障害モデルラットの作成	57
2-2) 急性肝障害モデルラットにおける MDZ 及び中間代謝物の血中曝露の変動	58
第3節 サルを用いた MDZ 中間代謝物の血中曝露の変動に関する検討	60
3-1) カニクイザルにおける CYP 代謝阻害時の MDZ 中間代謝物の血中曝露の変化	60
3-2) ヒト及びカニクイザルの肝ミクロソームを用いた <i>in vitro</i> 代謝試験	62
第4節 考察	65
結論	69
謝辞	73
実験の部	74

第 1 章 CYP 酵素阻害による薬物代謝物の血中曝露の変動	75
第 2 章 親薬物経口投与後の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 酵素阻害の影響	84
第 3 章 ヒト消化管内における難溶解性薬物の溶解・析出プロファイル評価法の構築	86
引用文献	89

総論の部

緒言

生体内に投与された薬物は、血流によって各臓器に運ばれた後、主として肝臓において代謝を受け、体外に排出される。薬物の代謝過程は、生体防御における解毒過程の一環と考えられるが、薬物代謝物の中には薬理的または毒性学的に強い活性を有するものが存在し、親薬物の臨床効果に影響を与える場合も少なくない¹⁾。代謝物の毒性によって致命的な副作用がもたらされた例として、トログリタゾンの反応性代謝物 (reactive metabolite) によって引き起こされた肝障害が挙げられる^{2,5)}。トログリタゾンは糖尿病治療に非常に効果的な新薬として期待されていたが、その代謝物による重篤な肝毒性が原因で市場からの撤退を余儀なくされた。

反応性代謝物は代謝過程で生じる極めて反応性の高い分子で、生体内の脂質、タンパク質、核酸のような高分子と速やかに反応し、その機能を妨げる。通常、反応性代謝物は速やかに消失し、全身循環血中には検出されない。一方、親薬物投与後、全身循環血中で検出される安定な代謝物 "circulating metabolites" の中でも、親薬物には認められない毒性を有し、様々な有害事象を引き起こすものが存在する⁶⁾。その例として、バルプロ酸、ナファゾドン等が挙げられる。これらの代謝物は親薬物とは異なる毒性を有することが報告されている。例えば、バルプロ酸は小児においてミトコンドリアを傷害し、それによって肝障害を引き起こすことが知られているが、その代謝物であるバルプロ酸 2-プロピル-4-ペンテン酸 (Δ^4 バルプロ酸) はラットにおいて強力な肝毒性に加え、催奇形性を示すことが知られており、さらに (*E*) Δ^4 バルプロ酸に代謝されることでげっ歯類において胎児毒性を示すことが報告されている^{7,8)}。また、ナファゾドンはネクロシスによって肝細胞障害を起こし、肝移植、最悪の場合は死亡させる危険性を有するが、その代謝物である *p*-ヒドロキシナファゾドンはヒト肝ミクロソームにおいて、*p*-ヒドロキシアニリンアナログ及び安定性毒素複合体を形成し、ヒト肝ミクロソームにおいて CYP3A4 を介して求電子性キノイド中間体に変換され、毒性を発現することが報告されている⁹⁾。

この様に、近年増加する薬物の代謝物に起因する有害事象毒性に関する報告を受け、アメリカ食品医薬品局 (US Food and Drug Administration (FDA)) はその発生防止を目的として、2008 年に代謝物の安全性担保のためのガイダンス (MIST: Metabolites In Safety Testing) を公示した¹⁰⁾。このガイダンスは、「定常状態における親薬物の AUC の 10% を超える AUC を示す代謝物に関して、ヒトに特異的である、もしくはヒトに相

当する曝露量が動物実験で得られない場合、その代謝物を用いた非臨床安全性試験を別途要求する」としている。MIST が公示されて以来、世界中の製薬企業は、新規医薬品候補化合物のヒト代謝物の同定に注力しており、実際、第 1 相臨床試験で高濃度に検出されたヒト代謝物が毒性試験の対象となったケースも報告されている。

薬物治療において重篤な有害作用を引き起こす要因として、代謝物毒性の他、多剤併用による薬物間相互作用がある。薬物間相互作用のうち最も頻度の多いものが、薬物代謝酵素の阻害によって併用薬の血中濃度が高くなった結果、有害事象が生じるケースである¹¹⁾。その様なケースの一つとして、セリバスタチンとゲムフィブロジルの併用により横紋筋融解症の発症リスクが上昇し、少なくとも 10 名の患者が死亡したことが報告されている¹²⁾。Shitara らはこの薬物間相互作用のメカニズムについて解析を行い、ゲムフィブロジルの代謝物であるグルクロン酸抱合体(ゲムフィブロジル 1-O-β-グルクロニド) が、肝臓におけるセリバスタチンの CYP2C8 による代謝を阻害した結果、セリバスタチンの全身曝露量が増加し、副作用としての横紋筋融解症が誘発されたことを明らかにした¹³⁾。また、カルバマゼピンは CYP2C9 または CYP2C19 誘導作用を有し、フェニトインのクリアランスを上昇させることが報告されているが^{14,15)}、その一方で、カルバマゼピンの主代謝物であるオキシカルバゼピンがフェニトインのクリアランスを低下させ、その AUC を上昇させることが報告されている^{16,17)}。本症例で明らかのように、薬物間相互作用は、薬物自体のみでなく、その代謝物が代謝酵素やトランスポーターを阻害することによって引き起こされる場合がある。そのような状況から、2012 年に公示された薬物間相互作用に関する FDA のガイダンス (Guidance for Industry: Drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendation)、及びヨーロッパ医薬品庁 (European Medicines Agency (EMA)) のガイドライン (Guideline on the investigation drug-drug interaction) では、親薬物の 25%以上の血中 AUC を示す代謝物については、代謝物に起因する薬物間相互作用の可能性に関して十分な検証を実施する必要があることが記載されている^{18,19)}。

代謝物の動態解析は、代謝物に起因する副作用や薬物間相互作用による有害事象が起こる可能性を予測する上で極めて重要である²⁰⁻²⁴⁾。通常、新規医薬品の開発過程において、その主代謝物の体内動態は、実験動物を用いた非臨床試験、および第 1 相臨床試験において健常人を対象として検証されている。しかしながら、例えば代謝阻害活性を有する薬物を併用した場合には、薬物間相互作用によって対象となる薬物のみでなく、その代謝物の動態も影響を受けることが予想される。また、肝臓に重篤な疾患を持った患

者においては、肝臓での代謝活性の低下によって薬物の代謝速度が低下しているため、代謝物の生成速度やその血中濃度レベルが健常人と異なっている可能性がある。しかしながら現在の薬物間相互作用研究や疾患時の薬物体内動態の研究において、親薬物とともに代謝物の体内動態の変動について詳細な検討を行った事例はほとんど報告されていない。

本研究では、代謝阻害に起因した薬物間相互作用や肝疾患によって、肝臓での薬物代謝活性が低下した場合、薬物の代謝物の体内動態はどのように変動するのかを明らかにすることを目的として、ラット、サルを用いた *in vivo* 試験、肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験を実施するとともに、*in silico* での速度論的な解析を行った。対象薬物としては、ミダゾラム、ジアゼパム、タモキシフェンを用いた。これら薬物の特徴として、いずれも主として肝臓のシトクロム P450 代謝酵素 (CYP) により複数のステップで逐次的に代謝され、その薬理活性を有する中間代謝物が *circulating metabolite* として血中に検出される。その中でも特にミダゾラムはヒトにおいて最も発現量の多い CYP3A 酵素の代表的な基質薬物であることが知られている。本研究ではこれら 3 種の薬物を用い、親薬物投与後の中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす代謝阻害および肝障害の影響について検討を行った。

以下、得られた結果を三章にわたり論述する。

第1章 CYP 酵素の阻害による薬物代謝物の血中曝露の変動

CYP は薬物を始めとした外来異物の解毒を担う最も重要な代謝酵素であり、肝臓、小腸に高発現し、主に酸化・還元による第1相代謝をつかさどっている。CYP には多くのサブファミリーが存在し、ヒトにおける主な分子種としては CYP1A1 から CYP3A5 にいたる 11 の分子種が知られている。中でも、CYP3A4 はヒト肝臓において最も発現量の多い代謝酵素であり²⁵⁾、様々な薬物の代謝に関与していることから、CYP3A4 の基質となる薬物の併用投与によって薬物間相互作用が生じる確率も高い²⁶⁻⁴⁴⁾。

薬物間相互作用における代謝の阻害様式として、同じ代謝酵素で代謝される薬物を併用投与した場合、代謝酵素の活性部位への結合を競合することによって生じる競合阻害と、ある薬物が代謝酵素の活性部位以外の部位に結合することによって酵素の活性を低下させる非競合阻害がある。CYP 酵素に対して非競合阻害を起こす代表的な薬物として、H₂ 受容体拮抗薬シメチジンならびにアゾール系抗真菌薬（ケトコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾールなど）があり、これら薬物は CYP 分子の活性中心に存在するヘムの第6配位子に結合することで、非特異的に複数の CYP 分子種を阻害することが知られている⁴⁵⁻⁵⁰⁾。競合、非競合いずれの阻害においても、阻害作用は阻害薬が存在している場合にのみ生じる可逆的阻害であり、阻害薬濃度が低下すれば作用は消失する。

一方、阻害薬が消失しても阻害作用が持続する不可逆的な阻害として、薬物代謝過程で生じる活性中間代謝物が酵素タンパク質と共有結合を形成して不活化させる mechanism-based inhibition (MBI) がある⁵¹⁾。MBI では、酵素活性回復には新規タンパク質の生合成や細胞膜へのソーティングが必要となるため、阻害薬が消失してもすぐに活性が回復せず、また低濃度の阻害剤でも長時間曝露されれば強い阻害作用を示す。MBI は臨床的にも重篤な相互作用を引き起こす場合が多く、15名も死者を出したソリブジン事件も、ソリブジンの代謝物（プロモビニルウラシル）がフルオロウラシルの代謝酵素であるジヒドロウラシルデヒドロゲナーゼと結合し、その活性を不可逆的に阻害したためであることが報告されている⁵²⁻⁶³⁾。CYP 酵素に対して MBI を引き起こす薬剤としては、エリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質があり、使用に際しては注意が必要とされている^{50,51)}。

いずれの阻害においても、CYP による代謝活性の低下に伴って、その基質となる薬物の

代謝速度が低下し血中曝露量は増加する。代謝阻害による薬物間相互作用に起因した薬物血中曝露量の増加に伴う副作用発現の危険性に関する注意点、およびその評価・検証方法に関しては、FDA のガイダンス (Guidance for Industry: Drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendation)¹⁸⁾、及びヨーロッパ医薬品庁 (European Medicines Agency, EMA)¹⁹⁾のガイドライン (Guideline on the investigation drug-drug interaction)、および PMDA のガイドライン (医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン)⁶⁴⁾にまとめられ、現在、新薬開発における安全性担保の一環として実施されている。

CYP 阻害によって親薬物の血中からの消失が遅延した場合には、代謝物の生成速度は低下するものの、親薬物が長時間血中に存在するため、代謝物の血中濃度推移も正常時と比べて有意に変化すると考えられる。しかしながら、上記のガイドラインは、基本的には投与された薬物自身の体内動態の変化から相互作用の危険性を評価するためのものであり、薬物の代謝物の動態変化に関する記述は極めて少ない。

本章では、CYP 酵素を阻害した場合の、CYP 基質薬物およびその代謝物の体内動態の変動を明らかにすることを目的として、ラットを用いた *in vivo* 試験を実施した。CYP 酵素阻害剤としては、CYP 酵素に対して MBI を起こすことによって、各 CYP 分子種を非特異的に阻害する 1-アミノベンゾトリアゾール (ABT) を用いた⁶⁵⁻⁶⁸⁾。ABT は CYP に対しては非特異的な阻害作用を示すものの、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、スルホトランスフェラーゼ (SULT) などの抱合代謝酵素、および有機アニオントランスポーター (Oatp)、P-糖タンパク質 (P-gp) などの薬物トランスポーターにはほとんど影響しないことが知られている^{69,70)}。また、モデル薬物としては、CYP 基質薬物であるミダゾラム (MDZ)、ジアゼパム (DAP)、タモキシフェン (TAM) を用いた。これらの薬物は体内で CYP による代謝を受け、それぞれ中間代謝物である 1'-OH ミダゾラム (1'-OH MDZ) または 4-OH ミダゾラム (4-OH MDZ)、デスマチルジアゼパム (Desmethyl DAP)、4-OH タモキシフェン (4-OH TAM) に代謝された後、さらに CYP によって最終代謝物に代謝されることが知られている⁷¹⁻⁷³⁾。これら中間代謝物は、それぞれ薬理活性を有した代謝物であり⁷⁴⁻⁸²⁾、また、親薬物投与後、主代謝物として全身血中に検出されることから、CYP 酵素阻害時のこれら中間代謝物の全身循環血中の曝露量の変動に関して詳細な検討を行った。

第1節 ミダゾラム (MDZ) の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響

まず、CYP3A の典型的な基質薬物である MDZ を用いた検討を行った。MDZ は、ラット体内でその中間代謝物である 1'-OH MDZ、または 4-OH MDZ に代謝された後、さらに CYP による代謝を受け、最終代謝物である 1',4-OH MDZ に代謝される (Fig. 1)⁷¹⁾。MDZ の代謝には CYP3A 以外の代謝酵素の関与が少なく、代謝経路もシンプルであることから、FDA の薬物間相互作用に関するガイダンスにおいて CYP3A 基質のモデル薬物として推奨されている¹⁸⁾。MDZ の代謝物による有害作用に関する報告はされていないが、中間代謝物である 1'-OH MDZ、4-OH MDZ は鎮静及び催眠活性作用を有しており⁷⁴⁻⁷⁶⁾、全身循環血中に検出されることが知られている。

CYP 酵素の阻害薬として用いた ABT は、Meschter らの報告によると、ラットに 100 mg/kg を投与しても、副作用は認められていない⁶⁷⁾。そこで本研究では、Strelevitz らの方法にしたがい⁶⁹⁾、MDZ 投与の 18 時間前にラットに 100 mg/kg の ABT を経口投与 (前処理) することで CYP 阻害ラットを作成した。

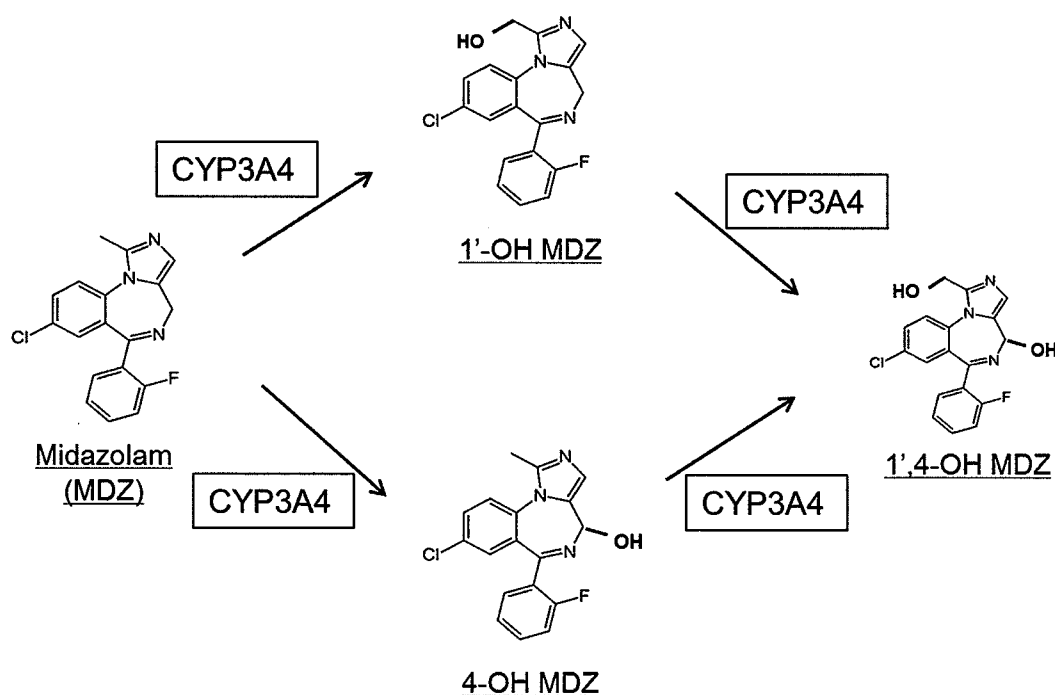


Fig. 1. Metabolic pathway of MDZ⁷¹⁾

1-1) MDZ 静脈内投与後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 阻害の影響

Fig. 2 に、コントロール群および ABT 前処理群ラットに MDZ を急速静注した後の MDZ およびその中間代謝物である 1'-OH MDZ、4-OH MDZ の血中濃度推移を示す。コントロール群において、親薬物である MDZ は静脈内投与後、速やかに全身血中から消失した。一方、ABT 前処理群においては、MDZ の血中からの消失はコントロール群と比較して緩やかであったことから、ABT によって肝臓の CYP 代謝が阻害されていることが確認された。

コントロール群において、両中間代謝物は MDZ の消失に伴って速やかに血中に出現し、実験開始およそ 30 分で最高血中濃度に到達した後、MDZ と同様に速やかに消失した。一方、ABT 前処理群においては、中間代謝物の全身血中への出現はコントロール群と比較して遅延し、1'-OH MDZ は実験開始からおよそ 2 時間後、4-OH MDZ は 4 時間後にそれぞれ最高血中濃度に到達した。また、その後の全身血中からの消失も緩やかであった。

Table 1 には、コントロール群、ABT 前処理群における MDZ 及び両中間代謝物の全身血中曝露の指標として、血漿中の Area Under the Plasma Concentration-Time Curve (AUC) を算出した結果を示す。ABT 前処理群において、親薬物である MDZ はコントロール群と比較し、AUC がおよそ 3.5 倍上昇した。一方、中間代謝物である 1'-OH MDZ、4-OH MDZ は CYP 代謝が阻害されているにもかかわらず、コントロール群と比較し、AUC がそれぞれ 5.1 倍、4.3 倍上昇した。これは、CYP 阻害によって親薬物からの代謝速度が低下すると、中間代謝物の AUC はコントロール群と比較して小さくなるという我々の予想と反する、極めて興味深い結果であった。さらに興味深いことに、中間代謝物の AUC の上昇率 (ABT 前処理群 / コントロール群) は親薬物である MDZ のそれを上回るものであった。

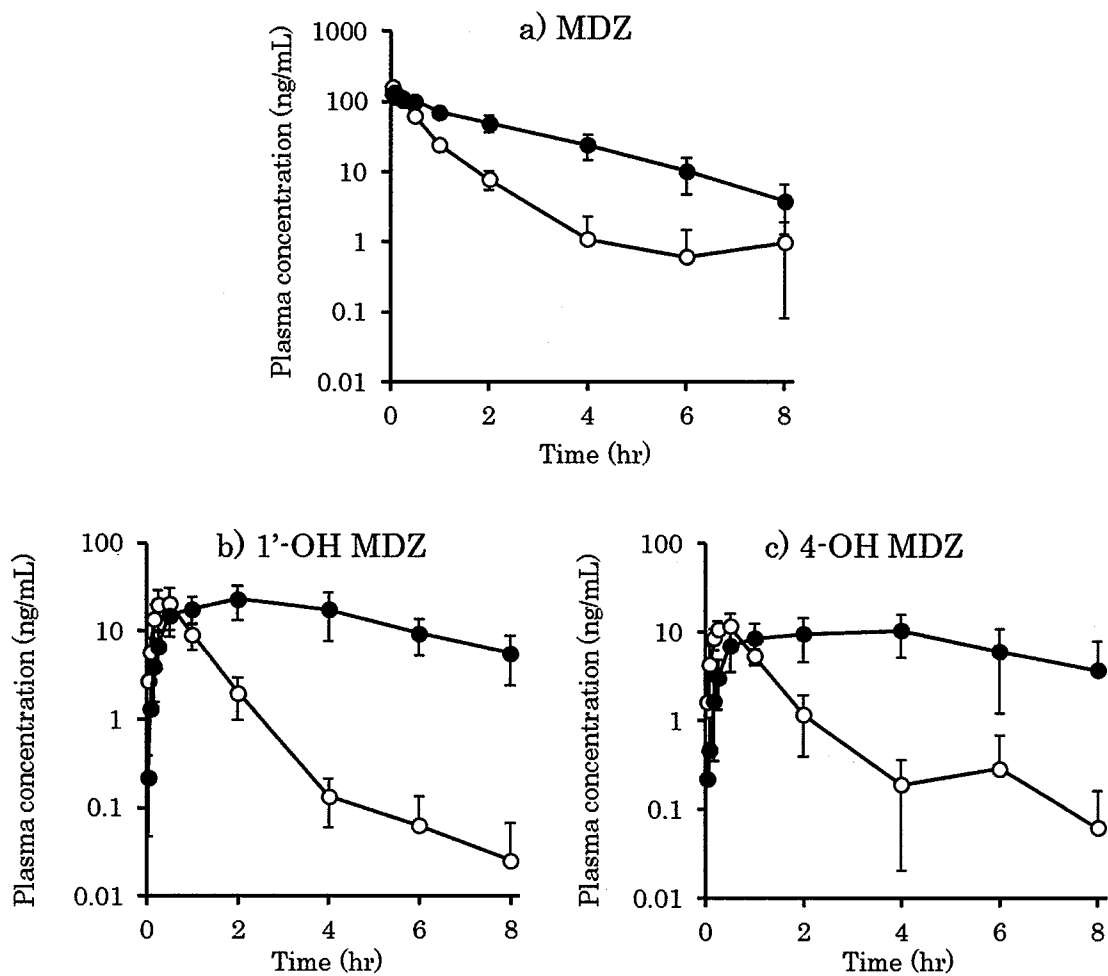


Fig. 2. Plasma concentration-time profile of a) MDZ, b) 1'-OH MDZ and c) 4-OH MDZ after intravenous administration of MDZ to control (○) and ABT-pretreated (●) rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 6).

Table 1. Effect of ABT-pretreatment on the AUC of MDZ and its primary metabolites after intravenous administration of MDZ to rats

	AUC (0-∞) (ng /mL · hr)		ratio
	control	ABT-pretreated	
MDZ	103.1 ± 11.8	357.0 ± 161.2*	3.5
1'-OH MDZ	27.0 ± 8.1	137.4 ± 54.6**	5.1
4-OH MDZ	17.7 ± 9.6	76.1 ± 41.1*	4.3

In the ABT-pretreated rats, MDZ was intravenously administrated at after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to the corresponding values in control rats.

1-2) MDZ 中間代謝物の全身クリアランスに及ぼす CYP 阻害の影響

CYP 阻害による中間代謝物の大幅な AUC 上昇の理由として、ABT による CYP 阻害の影響が親薬物から中間代謝物への代謝だけでなく、中間代謝物から最終代謝物 (1',4-OH MDZ) への代謝を阻害している可能性が考えられた。そこで、各中間代謝物をラット静脈内に投与し、CYP 阻害による中間代謝物の全身クリアランスへの影響を調べた。

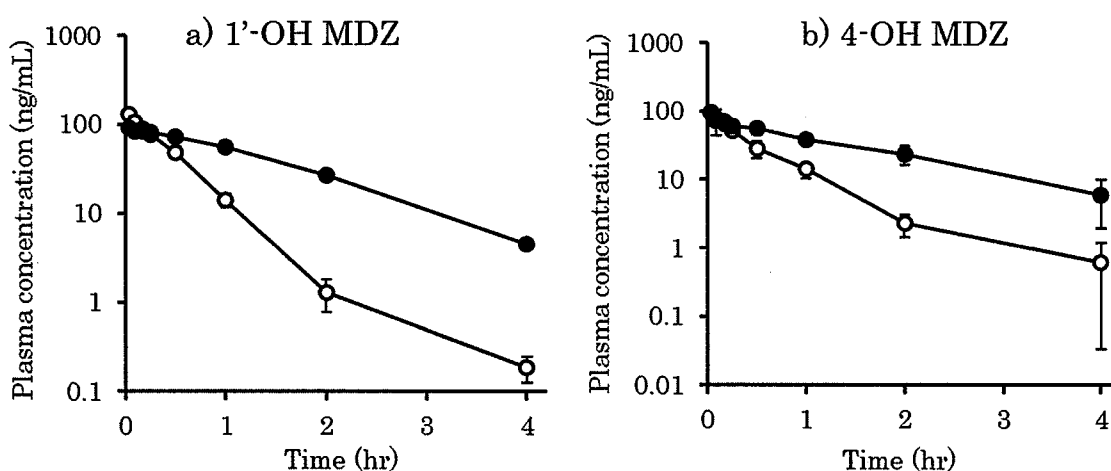


Fig. 3. Plasma concentration-time profile of a) 1'-OH MDZ and b) 4-OH MDZ after intravenous administration of each primary metabolite to control (○) and ABT-pretreated (●) in rats.

Each point in the figure represents the mean ± SD (n = 4).

Fig. 3 に 1'-OH MDZ、4-OH MDZ の静脈内投与試験後の血中濃度推移を示す。両中間代謝物の全身循環からの消失は、CYP 阻害によって有意に遅延した。全身クリアランス (CL_{sys}) を算出した結果 (Table 2)、CYP 阻害によって両中間代謝物とも全身クリアランスは半分程度まで低下していた。したがって、中間代謝物から最終代謝物への代謝が阻害され血中からの消失が遅延したことが、AUC 上昇の一つの理由と考えられた。

Table 2. Effect of ABT-pretreatment on the systemic clearance (CL_{sys}) of primary metabolites after intravenous administration of each primary metabolite to rats

	CL_{sys} (mL/min/kg)		ratio
	control	ABT-pretreated	
1'-OH MDZ	51.4 ± 6.1	22.1 ± 1.0***	0.43
4-OH MDZ	66.8 ± 7.1	27.4 ± 7.3***	0.41

In the ABT-pretreated rats, MDZ was intravenously administrated at after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 4). *** $p < 0.001$ compared to the corresponding values in control rats.

1-3) MDZ 静脈内投与後の両中間代謝物の血中移行量の算出

次に、MDZ 静脈内投与後の両中間代謝物の肝臓から全身循環への移行量 (血中移行量) を、式 (1-1) にしたがって算出した。すなわち MDZ の各中間代謝物の血中移行量は、MDZ 静脈内投与試験より得られた各条件下での中間代謝物の AUC と、中間代謝物の静注試験より得られたそれぞれの全身クリアランス (CL_{sys}) の積として得られる。

$$\text{中間代謝物の血中移行量} = \text{AUC} \times CL_{sys} \quad \text{式 (1-1)}$$

Table 3 に MDZ 静脈内投与後の 1'-OH MDZ 及び 4-OH MDZ の血中移行量を示す。コントロール群において、1'-OH MDZ、4-OH MDZ の血中移行量はそれぞれ MDZ 投与量の 34.5、23.6% であり、その合計として投与量の半分程度が血中に移行することが示された。一方、ABT 前処理群において、両中間代謝物の和はおよそ 100% であり、投与された MDZ はほぼすべて中間代謝物として肝臓から血中に移行することを示す結果となった。なお、ABT 前処理群における両中間代謝物の血中移行量の和は 100% を上回るものであったが、one-sample t 検定によって 100% と有意な差はないことが証明さ

れている ($p = 0.43$)。

以上の結果より、CYP 阻害による MDZ 中間代謝物の大幅な血中曝露量の増加の理由として、(1) 両中間代謝物の消失クリアランスの低下、および/あるいは (2) 中間代謝物の肝臓から全身循環への移行量自体の増加、の二つの要因が関与しているものと推察された。

Table 3. Amount of primary metabolites of MDZ exposed to the systemic circulation after intravenous administration of MDZ

	control		ABT-pretreated	
	1'-OH	4-OH	1'-OH	4-OH
Exposed amount (μg)	19.1 \pm 5.7	11.9 \pm 6.5	39.8 \pm 15.8*	22.0 \pm 11.9
% of administrated MDZ	34.5 \pm 8.3	23.6 \pm 14.3	74.8 \pm 28.8*	42.9 \pm 26.0

Exposed amounts of primary metabolites were calculated by multiplying their AUC after intravenously administration of MDZ (Table 1) and their CL_{sys} (Table 2) in both control and ABT-pretreated rats. Obtained values of metabolite amounts were converted to the corresponding amounts of MDZ by using the ratio of the molecular weight. The values are mean \pm SD ($n = 6$). * $p < 0.05$, compared to the corresponding values in control rats.

1-4) CYP 阻害による MDZ 静脈内投与後の中間代謝物の体内動態の変動に及ぼす胆汁中排泄の影響：胆管カニューレラットを用いた検討

前項の MDZ 静脈内投与試験において、CYP 阻害によってその中間代謝物の血中移行量が増加するという極めて興味深い知見が得られた。その原因として、ABT によって中間代謝物の代謝が阻害された結果、中間代謝物の肝臓から胆汁中への排出量が増加し、腸肝循環によって再び血中に吸収された可能性が考えられる。本検討では、中間代謝物の腸肝循環に対する CYP 阻害の影響を観察するため、胆管カニューレション処理を施したラット（胆管カニューレラット）⁸³⁾を用いて MDZ 静脈内投与試験を行った。この時、血液とともに胆汁を経時的にサンプリングし、胆汁中への中間代謝物量を算出することで、CYP 阻害による中間代謝物の胆汁中排泄量の変動を観察した。

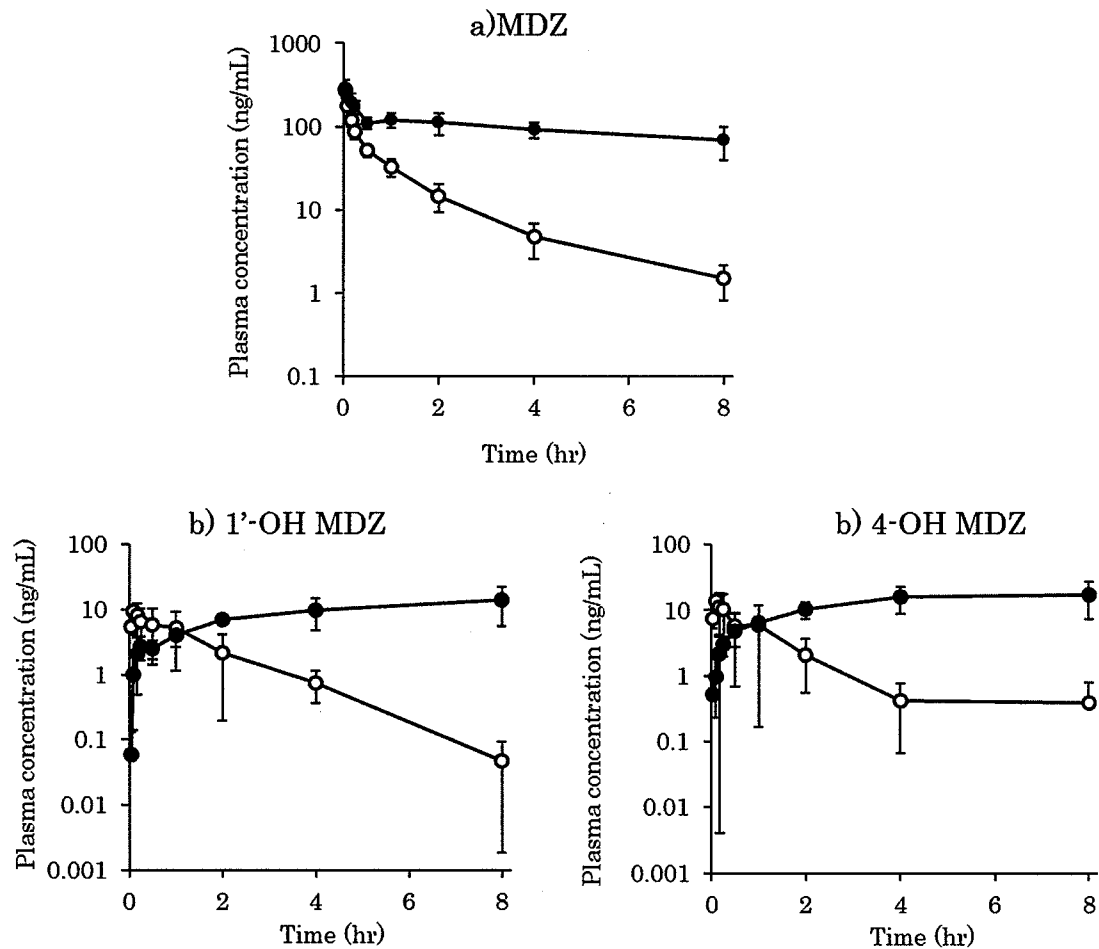


Fig. 4. Plasma concentration-time profile of a) MDZ b) 1'-OH MDZ and c) 4-OH MDZ in bile cannulated rats after intravenous administration of MDZ to control (○) and ABT-pretreated (●) in rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 3 or 4).

Fig. 4 に胆管カニューレラットに MDZ を静脈内投与した結果を示した。無処理ラットを用いた検討と同様に ABT 前処理によって、MDZ のみでなくその中間代謝物の血中からの消失が遅延することが示された。この時、血中 AUC を算出した結果、MDZ 自体は 5.7 倍、また 1'-OH MDZ、4-OH MDZ はコントロール群と比較してそれぞれ 5.1 倍、6.7 倍上昇していた (Table 4)。CYP 阻害による AUC の上昇率は、無処理ラットの場合と比べて若干大きくなったものの、その傾向はほぼ同様と考えられた。

Table 4. Effect of ABT-pretreatment on the systemic exposure (AUC) of MDZ and its primary metabolites after intravenous administration of MDZ to bile-cannulated rats

	AUC (0-∞) (ng /mL · hr)		ratio
	control	ABT-pretreated	
MDZ	141.8 ± 29.1	790.8 ± 182.6*	5.7
1'-OH MDZ	14.3 ± 9.7	72.9 ± 32.4*	5.1
4-OH MDZ	15.6 ± 9.1	104.9 ± 40.0**	6.7

In the ABT-pretreated rats, MDZ was intravenously administrated at after 18 hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 3 or 4). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to the corresponding values in control rats.

Table 5 には、各時間にサンプリングした胆汁中に含まれる中間代謝物量の和を示す。コントロール群において、胆汁中に排泄された中間代謝物量は極めて低く、1'-OH MDZ、4-OH MDZ は、それぞれ MDZ 投与量の 0.64、0.0053%であった。また、ABT 前処理群においてもそれぞれ 0.62、0.0066%であり、胆汁中に含まれる中間代謝物に CYP 阻害による有意な差は見られなかった。この結果から、中間代謝物の胆汁中排泄量は CYP 阻害の影響を受けないことが明らかとなった。また、腸肝循環の影響をなくすために胆汁を体外に排泄しているにもかかわらず、無処理ラットと同様、CYP 阻害による中間代謝物の AUC が大幅に上昇したことから、CYP 阻害による中間代謝物の大幅な血中曝露増加の原因として、腸肝循環の関与は低いと考えられた。

Table 5. Amount of primary metabolites of MDZ excreted into the bile after intravenous administration of MDZ to bile cannulated rats

	control		ABT-pretreated	
	1'-OH	4-OH	1'-OH	4-OH
Excreted amount (ng)	344 ± 173	2.8 ± 0.6	334 ± 170	3.5 ± 0.9
% of dose of MDZ	0.64 ± 0.32	0.0053 ± 0.0011	0.62 ± 0.31	0.0066 ± 0.0016

Obtained values of metabolite amount were converted to the corresponding amount of MDZ by using the ratio of the molecular weight. The values are mean ± SD (n = 3 or 4).

第2節 ジアゼパム (DAP) 及びタモキシフェン (TAM) の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響

前節において、MDZ 静脈内投与後の中間代謝物の血中曝露が、CYP 阻害時に増加することを見出し、その理由として、(1) 中間代謝物から最終代謝物への代謝が阻害されることによって中間代謝物の全身クリアランスが低下すること、(2) CYP 阻害時に肝臓で生成した中間代謝物の全身血中への移行量が増加すること、の二つの要因が関与していることを明らかにした。そこで本節では、MDZ 以外の薬物においても同様な現象が認められるか否かについて検討を行った。

本節ではモデル薬物として DAP および TAM を用いた (Fig. 5)。DAP は、ヒトにおいて主として CYP2C19 によって N-脱メチル化され、活性代謝物であるデスメチルジアゼパム (Desmethyl DAP) に代謝される⁷²⁾。さらに、Desmethyl DAP は CYP3A4 によって 3 位-が水酸化され、やはり活性を有する Oxazepam へと代謝される。Desmethyl DAP は親薬物である DAP より活性は少し落ちるものの、部分作動薬として作用することが知られている⁷⁷⁾。一方、TAM はプロドラッグであり、主に CYP2D6 により代謝された 4-OH-タモキシフェン (4-OH TAM) と、4-OH TAM が CYP3A4 によってさらに代謝されたエンドキシフェンが薬効に関与する。4-OH TAM およびエンドキシフェンはエストロゲン受容体への親和性およびエストロゲン依存性の細胞増殖抑制能が、親化合物である TAM の 30~100 倍程度と極めて強い薬理効果を有している^{79,80)}。本研究では、薬理活性を有する中間代謝物である、Desmethyl DAP および 4-OH

TAM の体内動態に及ぼす CYP 阻害の影響に関して、MDZ の場合と同様な検討を行った。

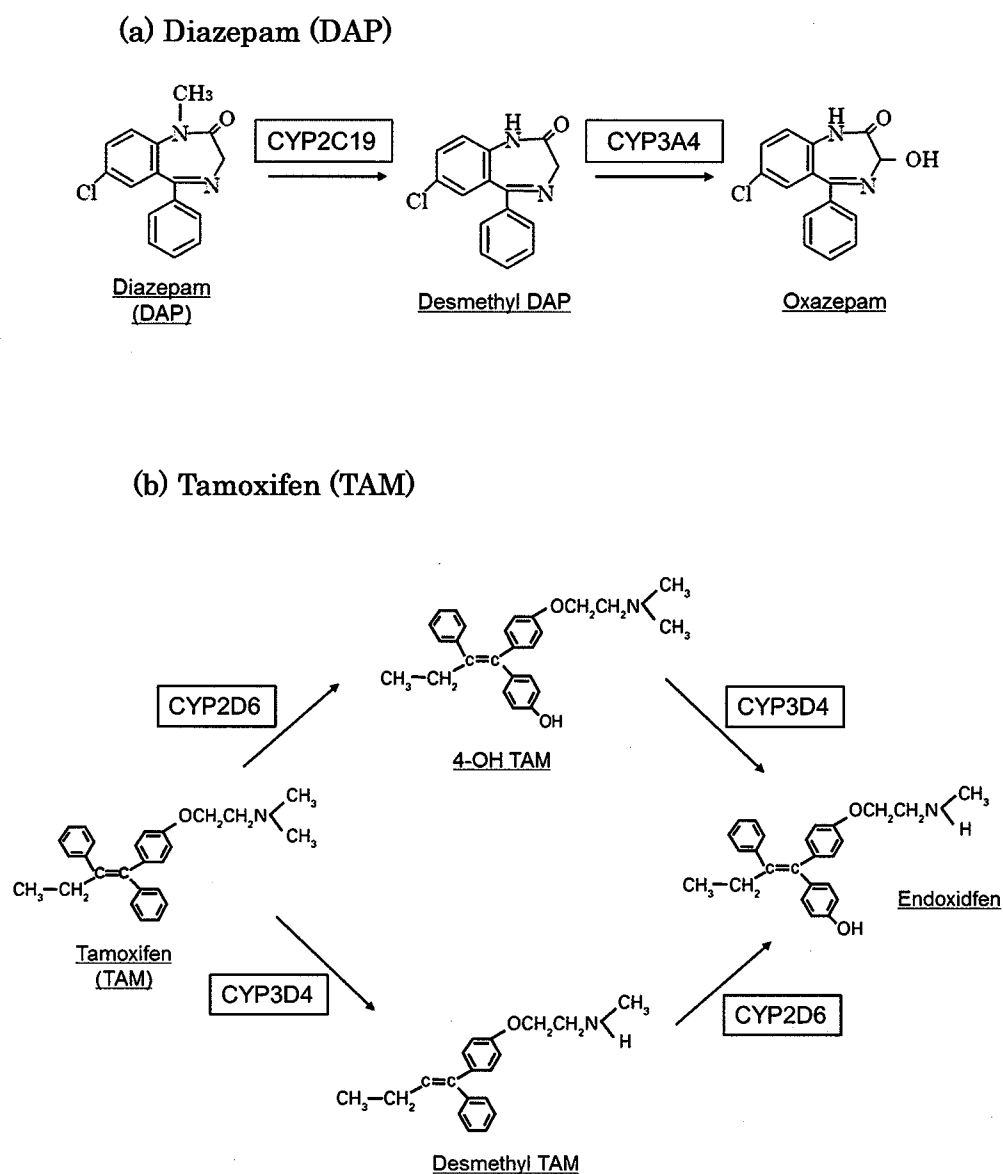


Fig. 5. Metabolic pathways of (a) DAP and (b) TAM^{72,73)}

2-1) 親薬物静脈内投与後の親薬物及びその中間代謝物の体内動態に及ぼす CYP 阻害の影響

DAP あるいは TAM をコントロール群および ABT 前処理群ラットに静注した後の、親薬物およびその中間代謝物である Desmethyl DAP、4-OH TAM の血中濃度推移を

Figs. 6, 7に示す。また、それぞれの血中 AUC を算出した結果を Table 6 に記す。

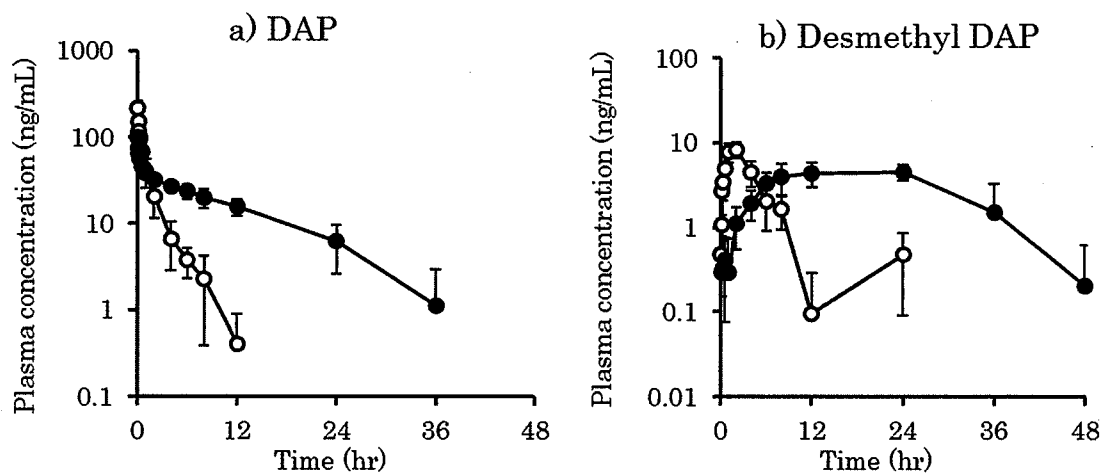


Fig. 6. Plasma concentration-time profile of a) DAP and b) Desmethyl DAP after intravenous administration of DAP to control (○) and ABT-pretreated (●) rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD ($n = 4$).

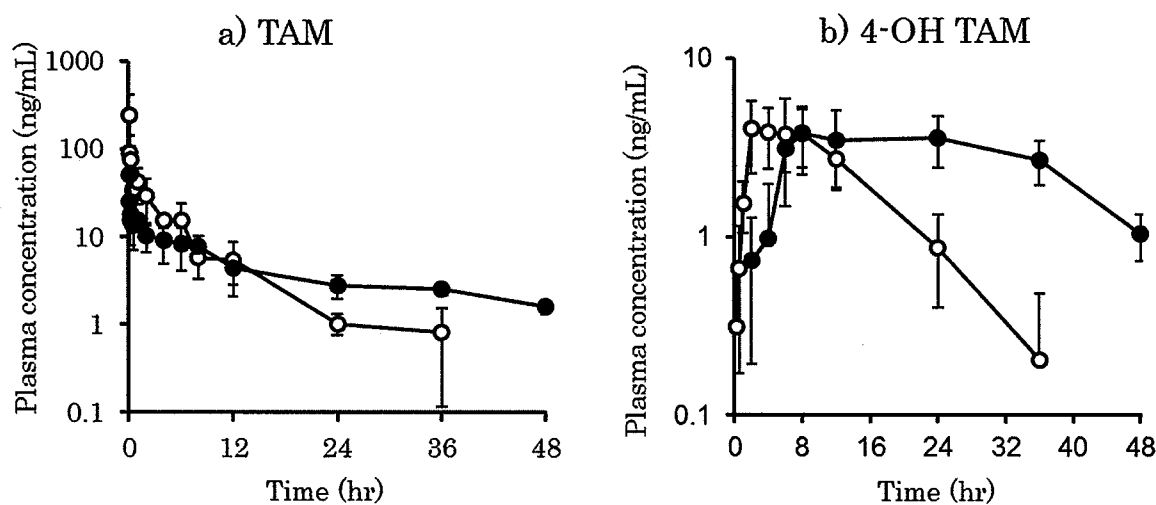


Fig. 7. Plasma concentration-time profile of a) TAM and b) 4-OH TAM after intravenous administration of TAM to control (○) and ABT-pretreated (●) rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD ($n = 4$).

Table 6. Effect of ABT-pretreatment on the systemic exposure (AUC) of parent drugs (DAP, TAM) and their primary metabolites (Desmethyl DAP, 4-OH TAM) after intravenous administration of each parent drug to rats

	AUC (0-∞) (ng/mL · hr)		ratio
	control	ABT-pretreated	
DAP	166.5 ± 56.5	511.4 ± 122.0**	3.1
Desmethyl DAP	53.8 ± 17.4	137.4 ± 27.7**	2.6
TAM	271.1 ± 35.4	278.4 ± 35.8	1.0
4-OH TAM	69.1 ± 15.2	157.8 ± 40.9**	2.3

In the ABT-pretreated rats, each parent drug was intravenously administrated at after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 4). ***p* < 0.01, compared to the corresponding values in control rats.

Fig. 6 に示したように、ABT 前処理によって DAP の血中からの消失は明らかに遅延し、同時に Desmethyl DAP の血中への出現および消失も遅延した。したがって、DAP、Desmethyl DAP とも血中 AUC は ABT 前処理によって上昇し、その程度は親薬物、代謝物でほぼ同程度 (3.1 倍、2.6 倍) であった (Table 6)。一方、Fig. 7 の TAM の場合、TAM 自体の血中濃度に対する ABT 前処理の影響は小さく、AUC には差が認められなかった。しかしながら、中間代謝物の 4-OH TAM の血中濃度推移には明らかな遅延が認められ、AUC も ABT 前処理群で 2.3 倍と有意に上昇するという、極めて興味深い結果が得られた。この理由の一つとして、TAM から 4-OH TAM への代謝と 4-OH TAM からエンドキシフェンへの代謝に関わる CYP 分子種が異なっていることから (CYP2D, CYP3A)^{73,84-86}、それぞれの代謝過程の ABT に対する感受性に違いがあった可能性が考えられる。この点に関して、次章において *in vitro* 等での詳細な検討を行っている。

本節での結果より、DAP、TAM とも ABT 前処理によって CYP 代謝酵素を阻害した場合、中間代謝物の AUC が上昇することが明らかとなった。これは前節での MDZ の結果と同様であったことから、次に各代謝物の全身クリアランスに及ぼす CYP 阻害の影響を観察し、それぞれの血中移行量の変化を算出した。

2-2) 中間代謝物の全身クリアランスに対する CYP 阻害の影響

Desmethyl DAP および 4-OH TAM をコントロールおよび ABT 前処理ラットに静脈内投与した後の血中濃度推移を Fig. 8 に、それぞれの血中濃度推移から求めた全身クリアランスを Table 7 に示す。

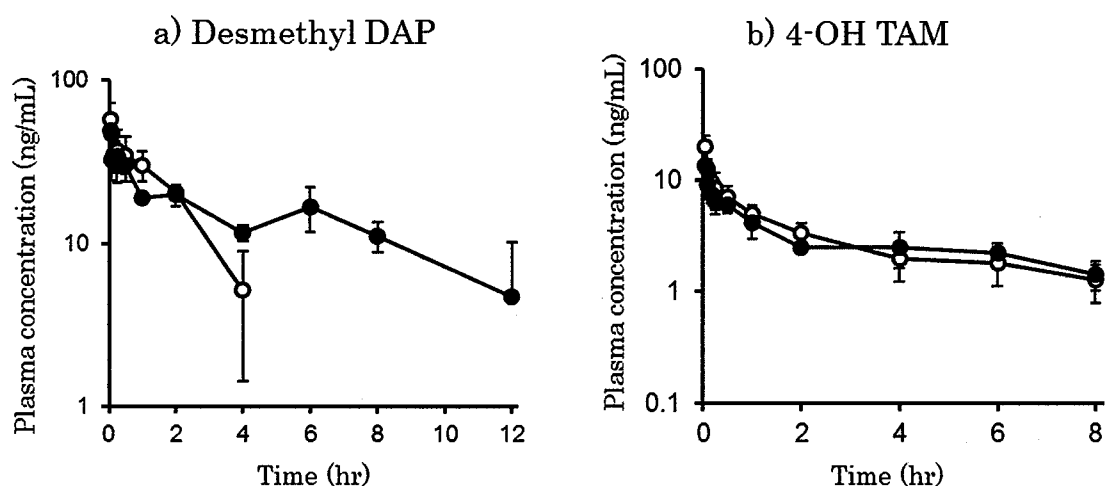


Fig. 8. Plasma concentration-time profile of primary metabolites, a) Desmethyl DAP and b) 4-OH TAM after intravenous administration to control (○) and ABT-pretreated (●) to rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 4).

Table 7. Effect of ABT-pretreatment on the systemic clearance (CL_{sys}) of primary metabolites after intravenous administration of each primary metabolite to rats

	CL_{sys} (mL/min/kg)		ratio
	control	ABT-pretreated	
Desmethyl DAP	14.0 \pm 1.8	6.9 \pm 1.4**	0.49
4-OH TAM	49.5 \pm 12.0	49.0 \pm 9.1	1.0

In the ABT-pretreated rats, each primary metabolite was intravenously administered after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean \pm SD (n = 4). ** $p < 0.01$, compared to the corresponding values in control rats.

コントロール群において、Desmethyl DAP は全身血中から速やかに消失し、4 時間以降では血中に検出されなかったのに対し、ABT 前処理群では消失が明らかに遅延し実験開始 12 時間後も全身血中に存在した。その結果、Desmethyl DAP の全身クリアランス (CL_{sys}) は約半分にまで低下し、Desmethyl DAP の代謝が ABT によって有意に阻害されたことが示唆された。一方、4-OH TAM ではコントロール群と ABT 前処理群の血中濃度推移はほぼ一致し、 CL_{sys} にも変化は認められなかった。これは、親薬物である TAM と同様の結果と考えられた。

2-3) 親薬物静脈内投与後の中間代謝物の血中移行量に対する CYP 阻害の影響

式 (1-1) にしたがって、親薬物投与後の各中間代謝物の血中 AUC と、それぞれの CL_{sys} から、中間代謝物の肝臓から全身血中への移行量 (血中移行量) を算出した。結果を親薬物の投与量に対する割合 (% of Dose) として Table 8 に示す。

Table 8. Amount of primary metabolites of DAP and TAM exposed to the systemic circulation after intravenous administration of DAP or TAM

	% of Dose		ratio
	control	ABT-pretreated	
Desmethyl DAP	9.0 ± 3.2	9.8 ± 1.9	1.1
4-OH TAM	38.4 ± 8.9	90.9 ± 25.3**	2.4

Exposed amounts of primary metabolites were calculated by multiplying their AUC after intravenously administration of parent drugs (Table 6) and their CL_{sys} (Table 7) in both control and ABT-pretreated rats. Obtained values of metabolite amounts were converted to the corresponding amounts of parent drugs by using the ratio of the molecular weight. The values are mean ± SD (n = 4). ** $p < 0.01$, compared to the corresponding values in control rats.

DAP の中間代謝物である Desmethyl DAP では、血中への移行量にはコントロール群と ABT 前処理群で有意な差は認められず、CYP 代謝阻害によって、中間代謝物の移行量は変化しないことが示唆された。したがって、Table 6 に示された Desmethyl DAP の AUC の上昇は、Desmethyl DAP の代謝が阻害され、その全身クリアランスが低下

したためと考えられた。一方、4-OH TAM のコントロール群での全身血中への移行量は投与量のおよそ 40%程度であったのに対し、ABT 前処理群では 2.4 倍と有意に増加し MDZ と同様、投与量とほぼ同量が全身血中に移行する結果となった。Figs. 7、8 で明らかなように、TAM および 4-OH TAM 静脈内投与後の血中濃度推移は ABT 前処理の影響を受けず、全身クリアランスも変化しないことから、TAM 静注後の 4-OH TAM の AUC が上昇した理由は、4-OH TAM の血中移行量の増加に起因した現象であると考えられた。

第 3 節 CYP 阻害による薬物中間代謝物の血中曝露増加のメカニズムの解析

これまでの検討において、著者は CYP 酵素を阻害したラットにモデル薬物として MDZ、DAP、TAM を静脈内投与した結果、いずれの薬物においても中間代謝物の血中 AUC が有意に上昇するという、極めて興味深い知見を得た。さらに、中間代謝物の全身クリアランスおよび血中移行量を算出したところ、CYP 阻害による中間代謝物の AUC 増加の理由として、(1) 中間代謝物から最終代謝物への代謝が阻害された結果、その全身クリアランスが低下した、(2) 肝臓中で生成した中間代謝物の血中への移行量が増加した、という二つの要因が関与していること、及びそれぞれの要因の関与の仕方は薬物によって異なっている可能性が考えられた。

投与した薬物の中間代謝物の血中曝露の増加がどのようなケースで起こるのか、また実際の臨床の場でも認められるのかを考えるためには、その要因及びメカニズムを明らかにすることが重要である。そこで本節では、CYP 阻害による中間代謝物の血中曝露の上昇の原因について、生理学的速度論 (PB-PK: Physiology-based Pharmacokinetics) を用いたモデル解析を試みた。

3-1) 親薬物静脈内投与後の中間代謝物の体内動態に関する PB-PK モデルの構築

PB-PK モデルでは様々な臓器を組み込んだ複雑なモデル解析も可能であるが、本章では、薬物の肝臓での代謝とその全身循環血中での動態を明らかにすることを目的として、親薬物、中間代謝物、最終代謝物、それぞれに対して全身循環と肝臓の 2 つのコンパートメントから成る簡単な PB-PK モデルを構築した。Fig. 9 に示したモデルでは、親薬物と中間代謝物の全身血中からの消失経路は主に肝臓での代謝・胆汁中排泄および腎臓での尿中排泄とした。本モデルでは、静脈内に投与された親薬物は全身循環

(systemic circulation) から肝臓 (liver) に取り込まれた後、まず中間代謝物に代謝される。さらに、肝臓内で生成した中間代謝物のうち、一部は全身循環に移行し、残りは肝臓内でさらに代謝を受けて最終代謝物となる。なお、図または式中に用いた略号の意味は以下のとおりである。

Q_H : 肝血流速度、 CL_R : 腎クリアランス、 CL_{bile} : 胆汁排泄クリアランス
 $f_{ub,parent \text{ or } M1}$: 親薬物または中間代謝物 (M1) の血中タンパク非結合率、
 $CL_{int,met,parent \text{ or } M1}$: 親薬物または M1 の肝代謝固有クリアランス

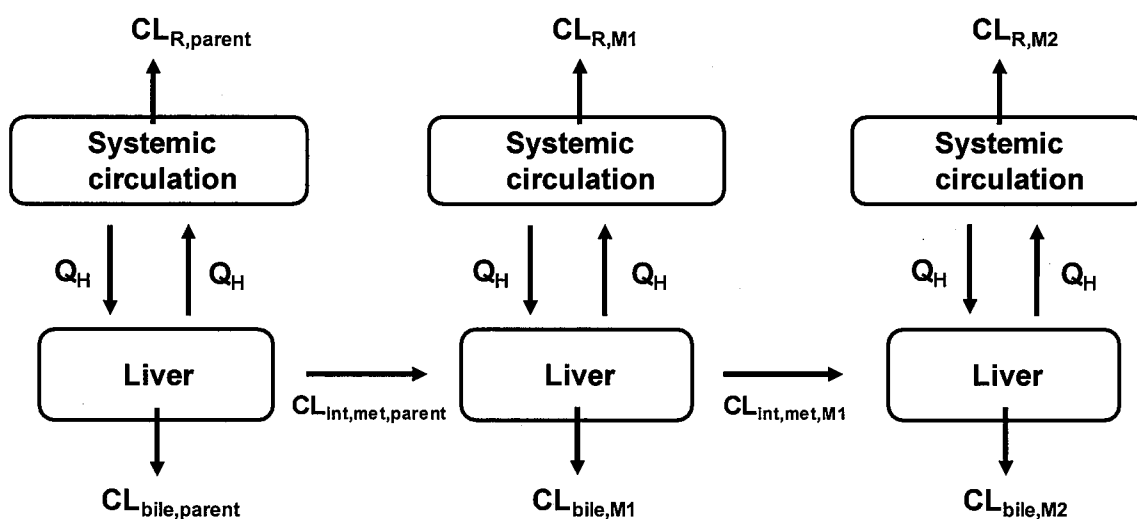


Fig. 9. PB-PK model analysis used in this study

3-2) 親薬物およびその中間代謝物の AUC の式の誘導

一般に、薬物の体内からの消失経路としては、Fig. 9 で示したように肝臓での代謝の他に胆汁中および尿中排泄が考えられるが、今回は式の展開を簡略化するため、本研究で用いた薬物は肝臓での代謝によってのみ体内から消失するとして、他の消失経路は無視できるものと仮定した。Fig. 9 のモデルに従い、well-stirred model を用いて親薬物 (Parent) 及び中間代謝物 (M1) の全身クリアランス (CL_{sys}) および全身循環血中の AUC (AUC_{sys}) を書き表すと、それぞれ式 (1-2) – (1-7) となる。

親薬物 (parent)

親薬物の全身クリアランスは

$$CL_{\text{sys,parent}} = \frac{Q_H \cdot fu_{b,\text{parent}} \cdot CL_{\text{int,met,parent}}}{Q_H + fu_{b,\text{parent}} \cdot CL_{\text{int,met,parent}}} \quad \text{式 (1-2)}$$

薬物を静脈内に投与した場合には、 $AUC = D / CL_{\text{sys}}$ の関係が成立することから

$$AUC_{\text{sys,parent}} = \frac{D}{CL_{\text{sys,parent}}} \quad \text{式 (1-3)}$$

式 (1-2) において、親薬物の血漿中非結合型分率×肝代謝固有クリアランス ($fu_{b,\text{parent}} \cdot CL_{\text{int,met,parent}}$) が肝血流 (Q_H) よりも十分に大きければ、その全身クリアランスは血流律速となり、仮に ABT によって肝代謝固有クリアランスが低下しても全身クリアランス及び AUC にそれほど大きな変化は見られないと考えられる。

中間代謝物 (M1)

一方、中間代謝物 M1 の全身クリアランスは

$$CL_{\text{sys,M1}} = \frac{Q_H \cdot fu_{b,M1} \cdot CL_{\text{int,met,M1}}}{Q_H + fu_{b,M1} \cdot CL_{\text{int,met,M1}}} \quad \text{式 (1-4)}$$

この時、肝臓中で生成した M1 が全身循環血中に移行する割合 ($F_{\text{sys,M1}}$) は

$$F_{\text{sys,M1}} = \frac{Q_H}{Q_H + fu_{b,M1} \cdot CL_{\text{int,met,M1}}} \quad \text{式 (1-5)}$$

また、親薬物は肝臓においてすべて M1 に代謝されることによって全身循環血中から消失すると、全身循環血中に移行する M1 の量は

$$F_{\text{sys,M1}} = \frac{Q_H}{Q_H + fu_{b,M1} \cdot CL_{\text{int,met,M1}}} \cdot D \quad \text{式 (1-6)}$$

したがって、M1 の AUC は式 (1-4) と式 (1-6) より、

$$AUC_{\text{sys,M1}} = \frac{D}{fu_{b,M1} \cdot CL_{\text{int,met,M1}}} \quad \text{式 (1-7)}$$

式 (1-7) より、中間代謝物の AUC はその肝代謝固有クリアランス ($CL_{\text{int,met,M1}}$) と反比例の関係にあり、血流の影響は受けないことがわかる。また、ABT 前処理によって AUC が上昇する理由としては、中間代謝物の肝代謝固有クリアランスの低下に伴っ

て、式 (1-4) で示した全身クリアランスが低下すること、及び式 (1-6) で示した循環血中への移行量が増加すること、の二つの要因が関与していることが数理的にも証明された。そこで、次節において、速度論的解析で得られた結果を検証することを目的として、肝細胞より調整したマイクロソームを用いた *in vitro* での代謝試験を行った。

第 4 節 親薬物及び中間代謝物の代謝に及ぼす CYP 阻害の影響：ラット肝マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

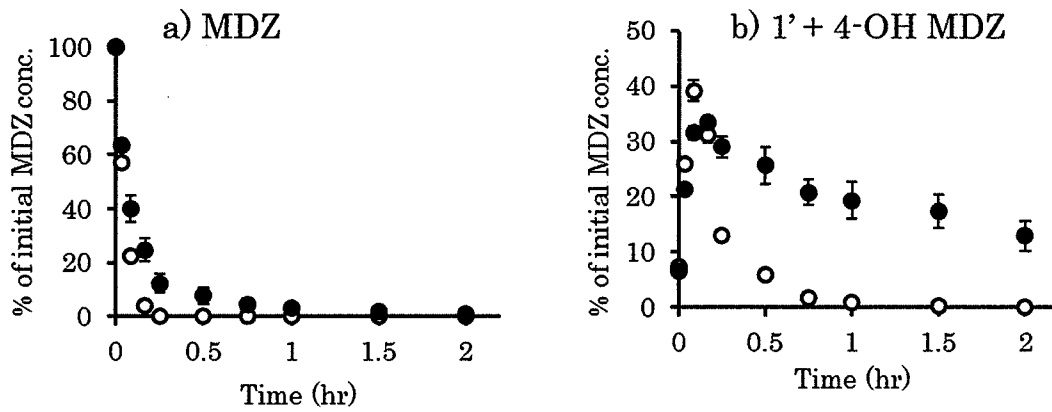
In vitro 代謝試験には、摘出臓器 (*in situ*)、組織スライス、分離細胞、組織ホモジネートおよびマイクロソーム等を用いた種々の実験系があり、目的に合わせて最も適切な *in vitro* 実験系を選択することが重要である^{87,88)}。薬物代謝の主要臓器である肝臓及び小腸において、CYP 酵素はマイクロソーム画分に局在している。従って、それらの組織から調製したマイクロソーム画分を用いて基質薬物の *in vitro* 代謝試験を行い、基質薬物の減少及び代謝物の生成を測定することで、CYP による代謝活性を評価することが可能である。

前節において、親薬物および中間代謝物の血中曝露の変化を数理的に理解するため、全身循環および肝臓の 2 つのコンパートメントからなる PB-PK モデルを用いた解析を行ったところ、中間代謝物の AUC はその肝代謝固有クリアランスに反比例することが明らかとなった。本節では、ABT が親薬物および中間代謝物の代謝をどの程度阻害するのかに関して、肝マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験を行い、*in vitro-in vivo* 相関について考察を試みた。

4-1) ラット肝マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験による MDZ とその中間代謝物の代謝速度定数の算出

まず、MDZ を用いた検討を行った。Fig. 10 にラット肝マイクロソーム中での MDZ 及び中間代謝物の濃度推移に及ぼす ABT の影響を示した。ここでは、中間代謝物の各時間における濃度は 1'-OH MDZ と 4-OH MDZ の濃度の和を用いて表した。

·ABT (1 μ M)



·ABT (5 μ M)

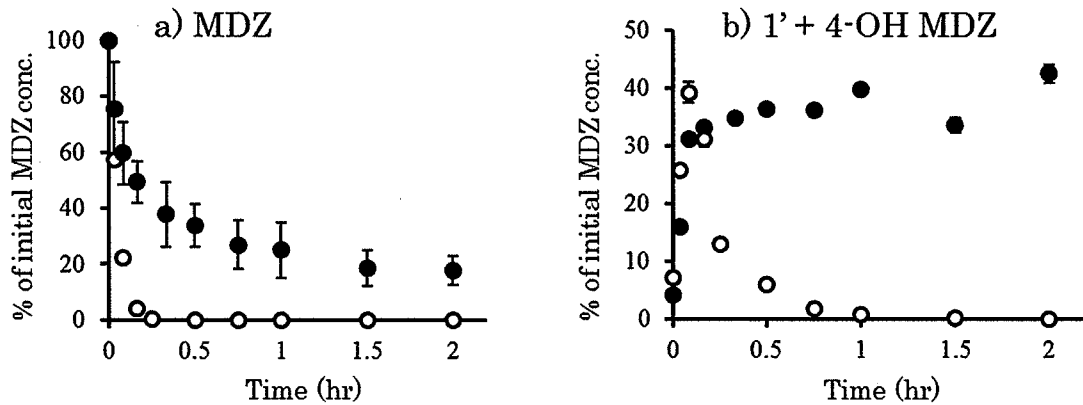


Fig. 10. Concentration-time profile of a) MDZ and b) sum of both primary metabolites in the suspension of rat liver microsomes.

MDZ was added to the suspension of rat liver microsomal without (○) or with (●) ABT-preincubation. The concentration of the primary metabolites (% of initial MDZ concentration) was expressed as a sum of two metabolites, 1'-OH MDZ and 4-OH MDZ. Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 3).

コントロール群において、MDZ の消失は極めて速く、実験開始およそ 15 分でほぼ消失した。一方、ABT 前処理群では、MDZ の消失は ABT の濃度依存的に遅延し、ABT 濃度を 5 μ M とした場合には実験開始 2 時間後にも有意な濃度の MDZ が残存していた。また、この時コントロール群における中間代謝物の生成は速やかであり、実験開始

およそ 10 分程度でピークを迎え、その後、速やかに消失した。一方、ABT 前処理群における中間代謝物の消失は遅延しており、5 μM 処理群では 1 時間以降ほぼ一定の濃度を示した。ABT の添加によって中間代謝物の消失に遅延が観察されたことから、ABT が MDZ の代謝速度だけでなく、中間代謝物の代謝速度にも影響を及ぼしていることが示唆された。そこで、MDZ 及び中間代謝物の代謝速度定数を算出し、各代謝過程における ABT の影響について検討を行った。

代謝酵素による基質の代謝速度は、通常、ミカエリス-メンテン式によって表されるが、基質濃度がミカエリス定数に比べて十分に低い場合には、基質の代謝は見かけ上 1 次速度式に従うとみなすことが出来る。そこで、今回ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験における親薬物 (parent) から中間代謝物 (M1)、さらに最終代謝物 (M2) への代謝過程を下記の様に表した。すなわち、parent から M1 への代謝速度定数を k_1 、M1 から M2 への代謝速度定数を k_2 とし、非線形最小二乗法プログラム “MULTI” を用いて、Fig. 10 に示した MDZ および中間代謝物の濃度推移を式 (1-8)、(1-9) に同時 fitting し、それぞれの値を求めた⁸⁹⁾。



$$-d [\text{parent}] / dt = k_1 \cdot [\text{parent}] \quad \text{式 (1-8)}$$

$$d [\text{M1}] / dt = k_1 \cdot [\text{parent}] - k_2 \cdot [\text{M1}] \quad \text{式 (1-9)}$$

各代謝過程の代謝速度定数を算出した結果、ABT 処理によって k_1 および k_2 ともに有意な低下が確認され、さらに、M1 から M2 への 2 次代謝過程 (k_2) がより顕著に阻害されていることが明らかとなった (Table 9)。本結果および PB-PK モデル解析の結果より、ABT 前処理ラットにおける MDZ 中間代謝物の AUC 上昇の理由として、中間代謝物から最終代謝物への肝代謝固有クリアランスが CYP 阻害によって顕著に低下したためと考えられた。また、MDZ 静脈内投与試験の結果から、well-stirred model に基づく式 (1-2) を用いて MDZ の *in vivo* での肝固有クリアランスを算出した結果、コントロールラットでは 1560 mL/min/kg、ABT 前処理ラットでは 280 mL/min/kg であった。この結果は、第 1 節で行った *in vivo* での検討において、ABT 前処理によって MDZ の肝固有クリアランスがおよそ 18% に低下したことを示している。Table 9

において、*in vitro*でのABT濃度として5 μM を用いた場合、MDZの代謝速度定数(k_1)はコントロール群と比較しておよそ17%まで低下していたことから、*in vivo*試験との相関を考えた場合、5 μM 濃度のABTを用いることが妥当と判断された。

Table 9. Effect of ABT-pretreated on the *in vitro* metabolism rate of MDZ and its primary metabolites in rat liver microsomes.

		control	ABT-pretreated	ratio
ABT (1 μM)	k_1 (min^{-1})	0.29	0.17	0.57
	k_2 (min^{-1})	0.10	0.015	0.15
ABT (5 μM)	k_1 (min^{-1})	—	0.051	0.17
	k_2 (min^{-1})	—	0.012	0.12

Rate constants, k_1 and k_2 , represent the first-order constant for MDZ to the primary metabolites (k_1) and the primary metabolites to the final one (k_2) obtained from the concentration-time profiles of MDZ and the metabolites in Fig. 10. For calculating the rate constants, sum of the concentrations of two primary metabolites (1'-OH MDZ and 4-OH MDZ) were used.

4-2) ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験による DAP 及び TAM とその中間代謝物の代謝速度定数の算出

MDZを用いた *in vitro* 代謝試験において、ABTによって親薬物の代謝のみでなく、中間代謝物から最終代謝物への代謝も阻害されることが明らかとなった。ここでは、さらに DAP 及び TAM を用いて同様な *in vitro* 代謝試験を行い、各代謝過程における代謝速度定数を算出した。ABTの濃度としては、MDZの *in vitro* 代謝試験において、*in vivo* 試験の結果と同程度の阻害効果を示した 5 μM を採用した。

Fig. 11 に DAP、Fig. 12 に TAM の *in vitro* 代謝試験の結果を示した。MDZ 同様、DAP、TAM 共に、ABT 前処理によって親薬物の消失が遅延した。この時、DAP の中間代謝物である desmethyl DAP は、コントロール群において実験開始直後にピークを示し、その後速やかに消失したのに対し、ABT 前処理群での生成速度は遅く、その後の消失も緩やかであった。また、TAM の中間代謝物の 4-OH TAM も desmethyl DAP の場合と同様なパターンを示し、両薬物も親薬物とともに中間代謝物の代謝も阻害されていることが考えられた。

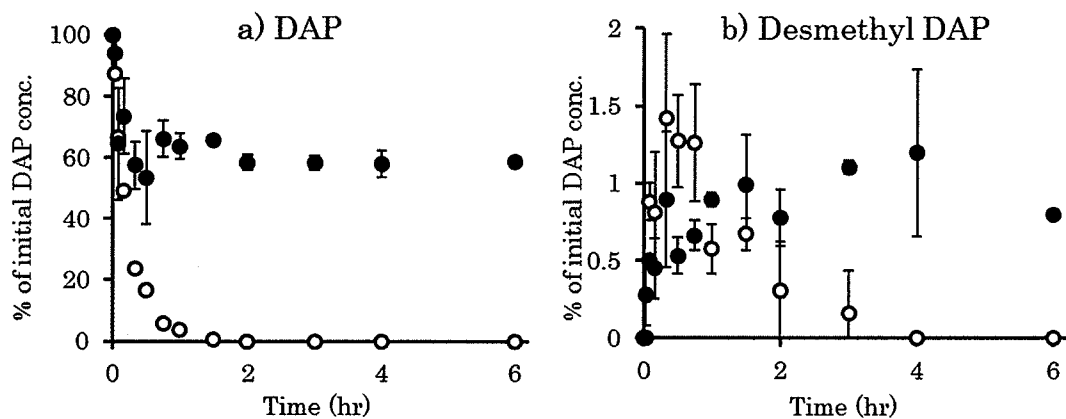


Fig. 11. Concentration-time profile of a) DAP and b) Desmethyl DAP in the suspension of rat liver microsomes.

DAP was added to the suspension of rat liver microsomal without (○) or with (●) ABT-preincubation. Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 3).

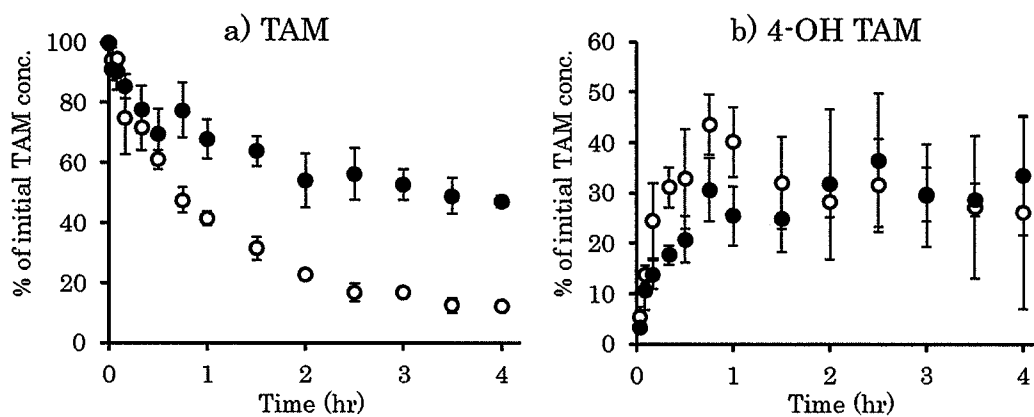


Fig. 12. Concentration-time profile of a) TAM and b) 4-OH TAM in the suspension of rat liver microsomes.

TAM was added to the suspension of rat liver microsomal without (○) or with (●) ABT-preincubation. Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 3).

DAP、TAM およびそれらの中間代謝物について、その代謝速度定数 (k_1 、 k_2) を算出した結果を Table 10 にまとめた。DAP では、 k_1 は ABT によってコントロール群のおよそ 5% まで低下したのに対し、 k_2 の低下は 70% 程度であった。一方、TAM の

k_1 および k_2 は ABT によってそれぞれ 31%、35% 低下したにも関わらず、*in vivo* 試験では TAM の AUC に対する ABT の影響はほとんど観察されなかった。この理由として、TAM には 4-OH TAM 以外にも N-desmethyl TAM に移行する経路が存在しており、*in vivo* 試験において、4-OH TAM に移行する経路が阻害された結果、N-desmethyl TAM への移行量がしたことが考えられた。以上の結果より、薬物によって ABT の阻害のパターンが異なることが示された。

Table 10. Effect of ABT-pretreated on the *in vitro* metabolism rate of DAP and TAM and their primary metabolites in rat liver microsomes.

		control	ABT-pretreated	ratio
DAP	k_1 (min^{-1})	0.071	0.0034	0.047
	k_2 (min^{-1})	0.020	0.013	0.68
TAM	k_1 (min^{-1})	0.014	0.0043	0.31
	k_2 (min^{-1})	0.043	0.015	0.35

Rate constants, k_1 and k_2 , represent the first-order constant for each parent drug to the primary metabolites (k_1) and the primary metabolites to the final one (k_2) obtained from the concentration-time profiles of each parent drug and the metabolite in Figs. 11 and 12.

第5節 考察

本章では MDZ、DAP および TAM をラットに静脈内投与した後、代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 代謝酵素の阻害の影響に関して、*in vivo* での試験を実施した。これらモデル薬物はいずれも、(1) CYP 酵素の基質であり、主として代謝によって体内から消失する、(2) CYP 酵素によって逐次的な代謝を受け、その中間代謝物が循環血中に検出される、(3) それら中間代謝物は薬理活性を有する代謝物である、ことが知られており、それぞれの薬物の中間代謝物の血中曝露の変化に着目して検討を実施した。その結果、いずれの薬物においても、ラット静脈内投与後の中間代謝物の AUC を指標とした血中曝露が、ABT 前処理による CYP 阻害によって有意に上昇すると言う極めて興味深い結果が得られた。一般に、薬物間相互作用

などによって薬物代謝酵素の活性が阻害された場合、親薬物の代謝速度の低下に伴って代謝物の生成速度が低下し、その血中曝露も低くなると考えられる。したがって、CYP 阻害時に逆に代謝物の血中曝露が上昇するという結果は、薬理活性、もしくは何らかの毒性を持った代謝物を生成する薬物の臨床使用において、極めて重要な知見と考えられる。

ラット静脈内投与試験において、親薬物の AUC と中間代謝物の AUC の比 (AUC_{met} / AUC_{parent} ratio) を算出したところ、ABT 前処理によって MDZ と 1'-OH MDZ の比は 26.2% から 38.5%、4-OH MDZ では 17.2% から 21.3% に上昇した。また、DAP と Desmethyl DAP 及び TAM と 4-OH TAM の AUC 比は 7.4% から 26.9%、25.5% から 56.7% にそれぞれ上昇した (Table 1, 6)。薬物の代謝物による有害事象発現の防止を目的として 2008 年に米国 FDA から公示されたガイダンス (MIST)¹⁰⁾ では、定常状態において親薬物の血中 AUC の 10% 以上の AUC を示す代謝物で、ヒト特異的あるいは動物試験においてヒトと同等な曝露が担保されていないものについて、別途、代謝物を用いた安全性試験の実施を要求している。また、米国、欧州の薬物間相互作用ガイドラインにおいても、親薬物の AUC の 25% 以上の AUC を示す代謝物について、代謝物による相互作用の可能性に関して検証を実施するよう求めている^{18,19)}。したがって、現在の新規医薬品開発過程において、主代謝物の同定とその血中曝露の評価は極めて重要な項目であり、出来るだけ早い段階でヒトにおける代謝物を同定し、安全性試験を追加実施する必要性に関して判断する必要がある。本章で認められた現象がもしヒトでも同様に生じるのであれば、臨床試験プロトコルの設定等、製薬企業における開発 strategy に混乱を招く可能性がある。さらに、薬物間相互作用によって代謝物の血中曝露が増大するのであれば、上記の様なガイダンスの基準が、実際の臨床における安全性を担保する上で適切であるかどうかについて、再度検証する必要があると考えられる。

Meyer らは、健常人において DAP とフェロジピンを併用した場合、DAP の血中 AUC は変化しないにもかかわらず、Desmethyl DAP の AUC が上昇することを報告している⁹⁰⁾。この現象に関する詳細なメカニズムについては検討されていないものの、彼らはフェロジピンが Desmethyl DAP から最終代謝物である Oxazepam への代謝を遅延させたと推察している。この報告から、ラットと同様、ヒトにおいても CYP 阻害による薬物代謝物の血中曝露の増加が起こることが考えられる。また、Hoen らは MDZ がラット肝臓で主に CYP3A2 によって中間代謝物に代謝されることを報告し

ている⁹¹⁾。ラットの CYP3A2 のアミノ酸配列のおよそ 70% がヒトの CYP3A と一致している⁹²⁾。また、DAP 及び TAM についても CYP3A の関与が知られていることから^{72,73)}、ヒトにおいても本検討で得られた結果と同様の結果が得られる可能性がある。

CYP 阻害時には、肝臓での代謝活性が低下することによって、相対的に胆汁中排泄の割合が増加し、腸肝循環によって親薬物あるいは代謝物が小腸より再吸収された結果、それらの AUC が上昇した可能性が考えられる。しかしながら、胆管カニユーレを施して胆汁をすべて採取したラットにおいても同様な結果が得られたこと、および胆汁中に排泄された中間代謝物量は親薬物の投与量に比べて極めて少なかったことから、今回の現象に胆汁排泄過程は関与していないと判断された。したがって、CYP 阻害時に中間代謝物の血中 AUC が上昇した理由として、(1) 中間代謝物から最終代謝物への代謝も阻害された結果、中間代謝物の CL_{sys} が低下した、(2) 中間代謝物の血中への移行量が増加した、の二つの要因の関与が考えられた。そこで、ラットに直接中間代謝物を静脈内投与して、その CL_{sys} に及ぼす CYP 阻害の影響を観察したところ、MDZ および DAP の中間代謝物では CL_{sys} がコントロールの 1/2 以下にまで低下することが明らかとなった (Tables 2, 7)。さらに、中間代謝物の血中移行量を算出したところ、MDZ と TAM では移行量が有意に上昇することが示された (Tables 3, 8)。以上の結果をまとめると、CYP 阻害による各代謝物の体内動態の変化は下表の様に表される。

Table 11. Effect of ABT-pretreatment on the pharmacokinetics of primary metabolites of model drugs in rats

	CL _{sys}	Exposed amount	AUC
1'-OH, 4-OH MDZ	↓	↑	↑
Desmethyl DAP	↓	→	↑
4-OH TAM	→	↑	↑

Table 11 において、薬物間で中間代謝物の挙動が異なる理由、また 1'-OH, 4-OH MDZ および 4-OH TAM の血中移行量が CYP 阻害によって増加する理由を明らかにするため、薬物速度論的な解析を行うとともに、肝ミクロソームを用いた *in vitro* の検討を実施した。今回用いた PB-PK モデルとは、投与された化合物 (薬物) が血流によって組織に供給され、組織中に分布し、一部が代謝・排泄されて組織から消失

し、残った化合物が血流に乗って流れていく、といった一連の過程を各臓器における血流や臓器容量等の生理・解剖学的な情報ならびに代謝クリアランス等の薬物固有の情報に従い、実態に即した形で記述するモデルであり、体内のどの臓器に注目するかによって様々なバリエーションが存在する。PB-PK モデルの特徴として、代謝活性や組織結合などの *in vitro* で測定したデータを直接モデルに組み込んだ解析が可能、また、あるパラメータを変化させて計算を行うことにより体内動態におけるそのパラメータの重要性を定量的に評価可能、などの点が挙げられる^{93,94)}。2015年に作成されたファリーダック®カプセル（パノビノスタット乳酸塩カプセル）の添付文書には、薬物間相互作用に関する注意事項として PB-PK モデルを用いた解析結果が記載されている⁹⁵⁾。このように、現在の医薬品開発において、PB-PK モデルは非臨床やヒトにおける体内動態を予測する手段として繁用されており、医薬品候補化合物の選択、最適化を予測する手段として有用である^{96,97)}。

本章では、全身循環血および肝臓からなる簡単なモデルを用いて、親薬物静脈内投与後の親薬物、および中間代謝物の血中 AUC を書き表した結果、中間代謝物の AUC はその肝代謝固有クリアランスに反比例することが明らかとなった。そこで、各薬物について、肝ミクロソーム中での親薬物から中間代謝物、中間代謝物から最終代謝物への代謝過程を観察し、それぞれの代謝過程における速度定数を算出した。血流やタンパク結合の影響を受けない条件で求めた *in vitro* 代謝速度定数は、肝臓の真の代謝能力を表す肝代謝固有クリアランスに相当するパラメータであり、実験に用いた溶液の容積を乗じることによって代謝固有クリアランスとして扱うことが出来る。そこで、式 (1-2) あるいは (1-4) および式 (1-6) に、*in vitro* で求めた肝代謝固有クリアランスを代入することによって、CYP 阻害による親薬物と中間代謝物の全身クリアランス (CL_{sys})、中間代謝物の肝臓から循環血中への移行率 ($F_{sys,M1}$) を推定し、*in vivo* での実測値と比較した (Table 12)。

Table 12 において、MDZ および DAP の親薬物、中間代謝物の全身クリアランスの比 (ABT 前処理群/コントロール) は、*in vitro* と *in vivo* で良好な相関を示し、いずれも ABT 前処理による CYP 阻害によって有意に低下することが示された。また、MDZ の中間代謝物の循環血中への移行率については、*in vitro* からの予測が *in vivo* 実測値より大きくなっているものの、これは、*in vivo* における ABT 前処理群での中間代謝物の血中移行率がすでに 100%であったためと考えられる。また DAP については、中間代謝物の肝固有クリアランスの低下の程度が小さく、*in vivo* では血中移行率

の有意な変化が検出できなかつたと推察された。したがって、MDZ の中間代謝物の AUC の上昇には中間代謝物の全身クリアランスの低下およびその血中移行率の上昇が関与すること、また DAP の場合には主として中間代謝物の全身クリアランスの低下が原因であることが、*in vitro* においても確認された。

一方、TAM においては、親薬物、中間代謝物とも *in vivo* での全身クリアランスに変化が認められなかつたのに対し、*in vitro* では親薬物、中間代謝物とも有意な減少が予測された。この理由に関しては現時点では明らかではないものの、TAM は今回の検討で対象とした 4-OH TAM 以外に、N-desmethyl TAM を介してエンドキシフェンに代謝される経路が存在しており⁷³⁾、その全身クリアランスに対する寄与が *in vitro* では十分に評価されていない可能性が考えられる。今後、それら他の代謝物についても同様な検討を行い、*in vitro*・*in vivo* 間での整合性を検証する必要がある。しかしながら、Table 12 の結果は、Table 11 に示した *in vivo* での現象が速度論的解析と *in vitro* での簡単な実験によってほぼ説明可能であることを示すものであり、多くの薬物の中間代謝物の血中曝露を評価する上で、本手法は有用な手段と考えられる。

Table 12. *In vitro* -*in vivo* correlation in the ratio (ABT-pretreated / control) of exposed amount and systemic clearance of primary metabolite of MDZ, DAP and TAM

	Ratio (ABT-pretreated / control)					
	k ₁ or k ₂	Exposed amount of M1			CL _{sys}	
		<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
MDZ	0.17	-	-	0.28	0.33	
1' + 4-OH MDZ	0.12	8.3	2.0	0.44	0.42	
DAP	0.047	-	-	0.36	0.31	
Desmethyl DAP	0.68	1.5	1.1	0.73	0.50	
TAM	0.31	-	-	0.48	1.0	
4-OH TAM	0.35	2.9	2.4	0.75	1.0	

以上本章では、CYP 阻害時に薬物の中間代謝物の血中曝露が有意に上昇するという新たな知見を得た。CYP 酵素に特異的な阻害剤である ABT を用いた検討は、実際の臨床現場で起こる薬物間相互作用とは状況が異なっていると考えられるものの、ABT と同じように非可逆的な MBI による阻害を引き起こす薬物も存在することから^{50,51)}、

同様な現象が起こる可能性は十分に考えられる。さらに、もしヒトにおいても同様な現象が認められるのであれば、本結果は、薬物代謝物の安全性および活性代謝物による薬理効果の臨床的な寄与を評価する上で、極めて重要な知見と判断される。

第 2 章 親薬物経口投与後の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響

第 1 章において著者は、CYP 酵素を阻害したラットにモデル薬物として MDZ、DAP、TAM を静脈内投与した結果、いずれの薬物においても中間代謝物の血中 AUC が有意に上昇するという、極めて興味深い知見を得た。このような現象が今回モデルとして用いた薬物以外にも同様に起こるのであれば、薬物間相互作用等によって CYP 酵素の活性が阻害された場合、代謝物の血中曝露が上昇し、それに起因した有害事象が引き起こされる可能性が考えられる。

今回用いた 3 種のモデル薬物をはじめ、現在、臨床的に用いられている医薬品の多くが経口投与製剤である。CYP 酵素は肝臓の実質細胞のみでなく、小腸の上皮細胞においても高レベルで発現しており⁹⁸⁾、ヒトにおいては小腸に発現する CYP 酵素全量の 70%以上が CYP3A4 である⁹⁹⁾。したがって、その基質となる薬物を経口投与した場合には、門脈に移行する前に小腸で初回通過代謝を受け、十分な吸収率 (BA: bioavailability) が得られないケースが多く報告されている^{100,101)}。第 1 節でモデル薬物として用いた MDZ についても、吸収された薬物の 50%近くがヒト小腸で初回通過代謝を受けることが知られている¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾。ラットの消化管においても、CYP3A62、3A9 及び 3A18 が多く発現していることが明らかにされており¹⁰⁵⁾、消化管における代謝は経口投与された薬物の BA に大きく寄与すると考えられる。

一般に、経口投与後の薬物の BA (F) は、消化管膜透過率 (Fa)、消化管での初回通過代謝の回避率 (Fg)、及び肝臓での初回通過代謝の回避率 (Fh) の積として表される (Fig. 13)。

$$F = Fa \times Fg \times Fh \quad \text{式 (2-1)}$$

したがって、消化管代謝の寄与が大きい薬物は、経口投与後の BA が低くなるだけでなく、薬物間相互作用によって小腸での代謝が阻害された場合には、急激な血漿中濃度の上昇を引き起こし、重篤な副作用を生じる可能性が考えられる。実際、Tsunoda らは CYP 阻害剤としてケトコナゾールを用いて MDZ の静脈内投与及び経口投与試験を行ったところ、静脈内投与試験と比較し、経口投与試験における MDZ の AUC の上昇が大きくなることを報告している¹⁰⁶⁾。MDZ を含め、本研究でモデル薬物として用いた DAP および TAM は、いずれも臨床では経口剤として用いられることが多い。したがって、薬物間相互作用によって CYP 代謝が阻害された場合のこれら薬物の中間代謝物の血中濃度推移の変化に関しても、経口投与試験による検証が必要と考えられる。

そこで、本章ではモデル薬物として MDZ を用い、コントロールおよび ABT 前処理ラットに経口投与した後の中間代謝物 (1'-OH MDZ、4-OH MDZ) の血中濃度推移を観察した。さらに、速度論的な解析手法および門脈にカニューレを施したラットを用いて、経口投与後の親薬物および中間代謝物の吸収挙動に関する詳細な検討を行った。

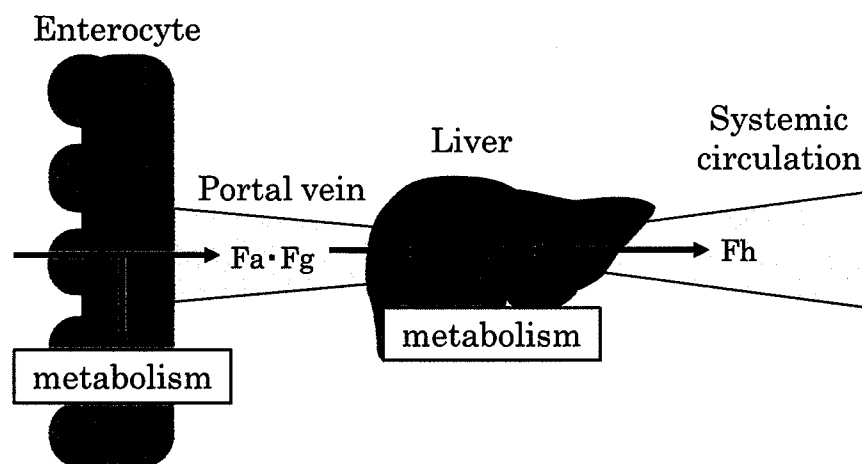


Fig. 13. Drug bioavailability after oral administration

第1節 MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 阻害の影響

一般に、CYP3A 基質薬物は排出系輸送担体である P-糖タンパク質 (P-gp) の基質となる場合が多く¹⁰⁷⁾、薬物間相互作用の解析も複雑となる。しかし、MDZ は P-gp には認識されないため、小腸での代謝の影響のみを観察することが可能である¹⁰⁸⁾。本節では、第1章と同様な方法を用いて ABT 前処理を行ったラットに MDZ を経口投与し、中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 阻害の影響を検討した。

1-1) MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移

Fig. 14 に MDZ をコントロールおよび ABT 前処理ラットに経口投与後の、MDZ および両中間代謝物 (1'-OH MDZ、4-OH MDZ) の血漿中濃度推移を、Table 13 にはそれぞれの血漿中濃度より算出した AUC を示す。経口投与された MDZ の血漿中濃度は ABT 前処理によって顕著に上昇し、AUC はコントロール群と比較して 35 倍以上の値を示した。この時、1'-OH MDZ、4-OH MDZ についても、血中 AUC は ABT 前処理によってそれぞれ 18.6 倍、12.3 倍に上昇し、静脈内投与試験と同様、CYP 代謝を阻害し

ているにもかかわらず代謝物の血中曝露が高くなることが明らかとなった。また、経口投与試験より得られた MDZ 及び両中間代謝物の AUC の上昇率は、Table 1 に示した静脈内投与試験における上昇率を大きく上回るものであった。

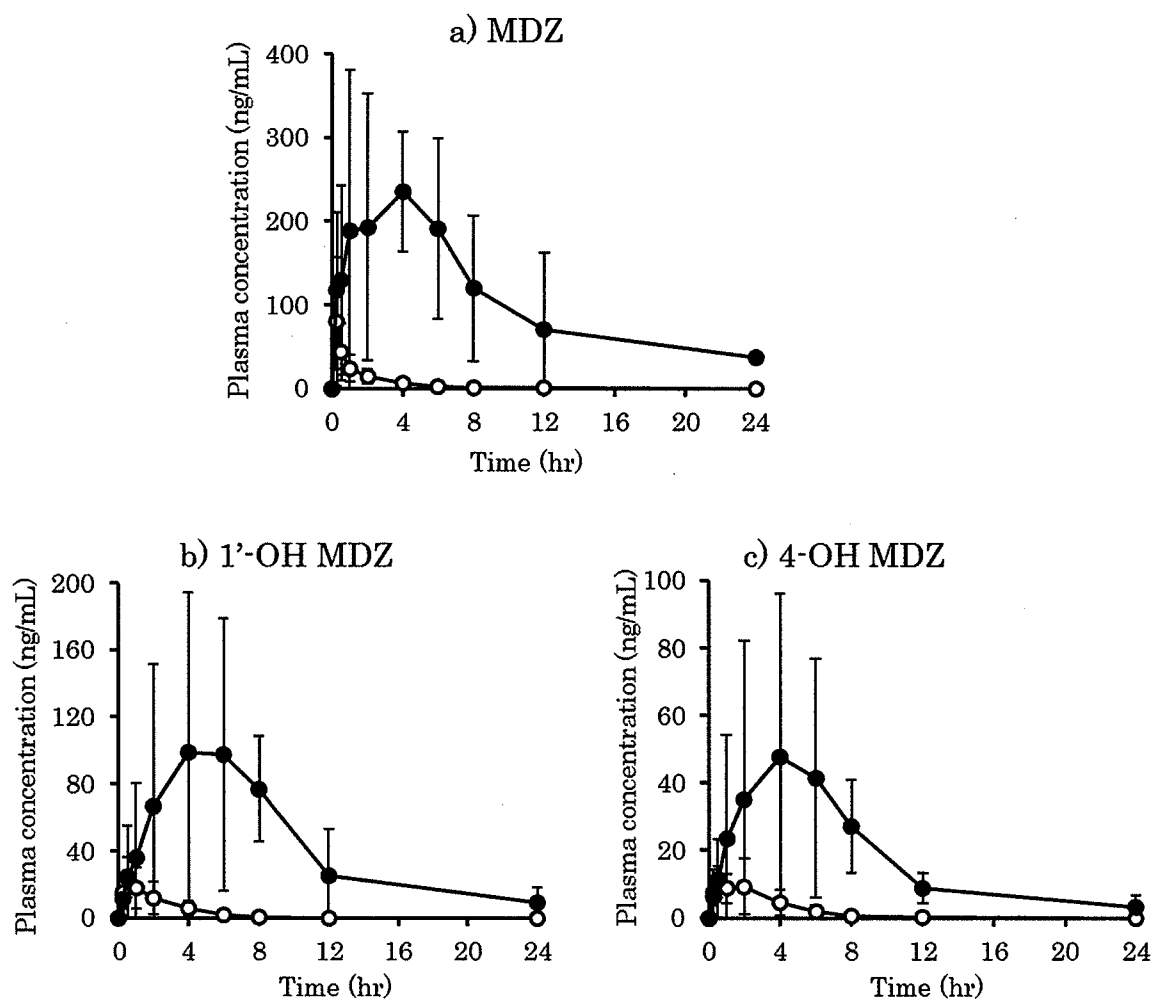


Fig.14. Plasma concentration-time profile of a) MDZ, b) 1'-OH MDZ and c) 4-OH MDZ after oral administration of MDZ to control (○) and ABT-pretreated (●) rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 4).

Table 13. Effect of ABT-pretreatment on the AUC of MDZ and its primary metabolites after oral administration of MDZ to rats

	AUC (0-∞) (ng/mL · hr)		ratio
	control	ABT-pretreated	
MDZ	93.8 ± 35.5	3289.8 ± 2802.4*	35.1
1'-OH MDZ	63.5 ± 12.2	1179.1 ± 548.7*	18.6
4-OH MDZ	39.3 ± 9.7	485.2 ± 242.5*	12.3

In the ABT-pretreated rats, MDZ was orally administrated at after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 4). **p* < 0.05, compared to the corresponding values in control rats.

1-2) MDZ 経口投与後のバイオアベイラビリティの算出

経口投与及び静脈内投与後の AUC を比較することによって経口投与後の BA (F) を求めることが可能である。ここでは、MDZ の F を式 (2-2) に示すように、MDZ 経口投与試験で得られた血中 AUC と MDZ の全身クリアランスの積を投与量で除することで算出した。

$$F = AUC_{po} \cdot CL_{sys,iv} / Dose_{po} \quad \text{式 (2-2)}$$

また、F_h は MDZ の全身クリアランス (CL_{sys}) を肝血流速度 (Q_H) で除して得られた MDZ の肝抽出率 (E_h) を 1 から引くことで算出した。さらに、F_a · F_g は F を F_h で除することによって算出した。

$$F_h = 1 - CL_{sys,iv} / Q_H \quad \text{式 (2-3)}$$

$$F_a \cdot F_g = F / F_h \quad \text{式 (2-4)}$$

Table 14 に今回の検討で得られた値を用いて MDZ の F, F_h および F_a · F_g を算出した結果を示す。ただし、MDZ の体内からの消失は主として肝臓での代謝によるものであることから、CL_{sys} は肝クリアランス (CL_h) と等しいと過程して計算した。また、ラットの肝血流速度 (Q_H) は 70 mL/min/kg¹⁰⁹とした。

Table 14. Effect of ABT-pretreatment on the BA of MDZ after oral administration to rats

	control	ABT-pretreated
F	0.10	1.1
Fa · Fg	0.18	1.3
Fh	0.53	0.84

コントロール群ラットにおける MDZ の F は約 10% と低く、Fa · Fg が 0.18 と低いことがその主たる理由と考えられた。MDZ は脂溶性の薬物で、その小腸膜透過性は高いことから、小腸膜透過率 (Fa) はほぼ 1 とみなすことが出来る。したがって、MDZ はラットにおける Fg が極めて低い、すなわち小腸における初回通過代謝を受けやすいと考えられた。一方、ABT 前処理群では MDZ の BA はほぼ 1 となり、ABT の前投与によってラットにおける消化管及び肝臓の CYP 代謝がほぼ完全に阻害されたことが示された。以上の結果より、MDZ 経口投与後の中間代謝物の AUC の上昇率が静脈内投与を大きく上回った原因として、ABT 前処理群では消化管代謝がほぼ完全に阻害された結果、投与された MDZ のほぼ全量がそのまま全身循環血中に移行した後、肝臓において代謝物が生成したためと推察された。

そこで、静脈内投与試験と同様、式 (1-1) を用いて MDZ 経口投与後のコントロール群及び ABT 前処理群における中間代謝物の血中移行量を算出し、結果を Table 15 に示す。コントロール群において、1'-OH MDZ、4-OH MDZ の血中移行量はそれぞれ 41.9、46.0 µg であり、その合計は MDZ 投与量のおよそ 15% 程度であった。一方、ABT 前処理群では、1'-OH MDZ で 331 µg、4-OH MDZ で 189 µg であり、静脈内投与試験と同様、MDZ の投与量とほぼ同量が全身血中に移行したことを示す結果となった。また、MDZ 静脈内投与試験における血中移行量は CYP 阻害によって約 2 倍に上昇したのに対し、経口投与試験においては 6 倍以上もの上昇が確認された。

Table 15. Amount of primary metabolites of MDZ exposed to the systemic circulation after oral administration of MDZ

	control		ABT-pretreated	
	1'-OH	4-OH	1'-OH	4-OH
Exposed amount (μg)	41.9 \pm 8.6	46.0 \pm 11.3	331 \pm 167**	189 \pm 94.3*
% of administrated MDZ	7.9 \pm 1.6	8.6 \pm 2.1	62.0 \pm 31.2**	35.4 \pm 17.7*

Exposed amount of 1'-OH MDZ and 4-OH MDZ were calculated by multiplying their AUC after oral administration of MDZ (Table 13) and their CL_{sys} (Table 2) in both control and ABT-pretreated rats. Obtained values of metabolite amount were converted to the corresponding amount of MDZ by using the ratio of the molecular weight. The values are mean \pm SD ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to the corresponding values in control rats.

第 2 節 親薬物経口投与後の CYP 阻害による中間代謝物の血中曝露増加のメカニズムの解析

第 1 節で MDZ の経口投与試験を行ったところ、CYP 阻害によって親薬物だけでなくその中間代謝物の AUC が上昇し、その上昇率は静脈内投与試験を上回る結果が得られた。またその理由として、ABT 前処理によって消化管代謝がほぼ完全に阻害された結果、MDZ の全身循環血中への移行量が増加したためと考えられた。そこで本節では、MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の体内動態に及ぼす ABT 前処理の影響を定量的に評価することを目的として、速度論的なモデル解析を行った。

2-1) MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の体内動態モデルの構築

Fig. 15 に、MDZ 経口投与後の MDZ 及びその中間代謝物の体内動態に関する速度論的モデルを示した。MDZ は経口投与後、消化管から吸収されて門脈、肝臓を経て全身血中に移行する。その過程で MDZ は消化管上皮細胞及び肝実質細胞内で初回通過代謝を受け、中間代謝物 (M1)、さらに最終代謝物 (M2) に代謝される。

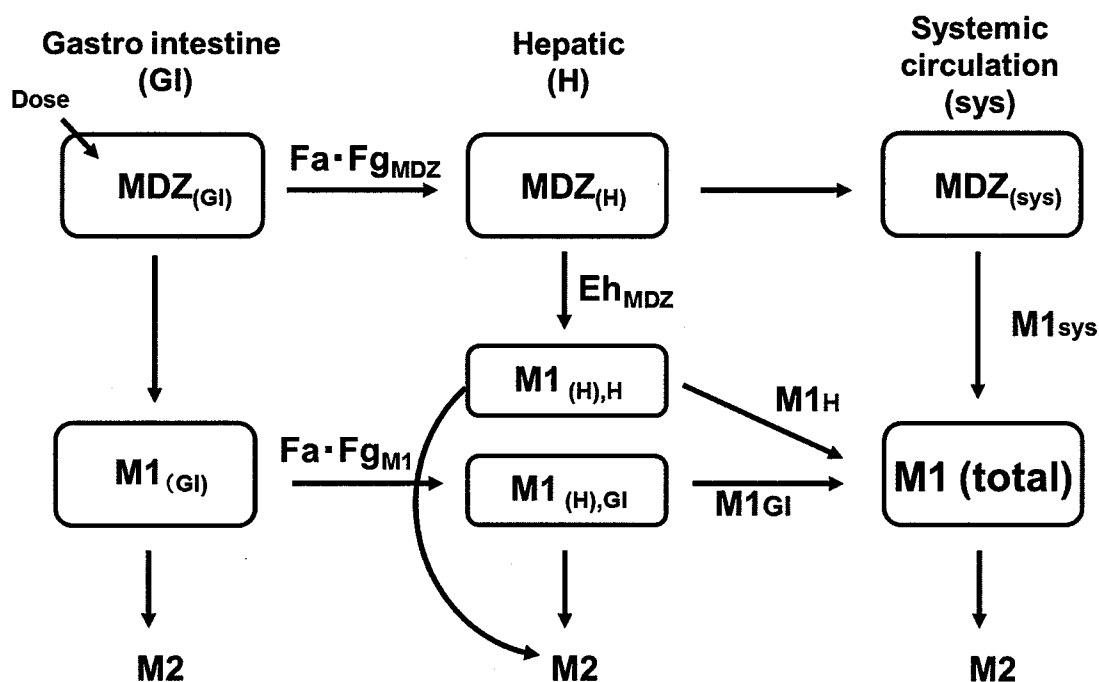


Fig. 15. Pharmacokinetic model of MDZ and its primary metabolites after oral administration of MDZ to rats.

M1: primary metabolite M2: Secondly (final) metabolite

Fig. 15 において M1 が全身循環血中に移行する経路としては、①吸収された MDZ が消化管初回通過代謝を受け、生成した M1 が全身血中に移行する、②吸収された MDZ が肝初回通過代謝を受け、生成した M1 が全身血中に移行する、③初回通過代謝を受けずに全身循環血中に到達した MDZ が肝臓で代謝を受け M1 が生成する、の 3 通りと考えられる。Fig. 15 では、①の経路で全身血中に移行した M1 量を $M1_{GI}$ 、②の経路の M1 量を $M1_H$ 、③の経路の M1 を $M1_{sys}$ と表記した。この 3 つの経路で全身血中に移行した中間代謝物を M1 (total) は式 (2-5) で表される。

$$M1 (total) = M1_H + M1_{GI} + M1_{sys} \quad \text{式 (2-5)}$$

一方、M1 (total) は MDZ 経口投与試験における中間代謝物の AUC ($AUC_{po,M1}$) (Table 13) と、第 1 章で求めた中間代謝物の全身クリアランス ($CL_{sys,M1}$) (Table 2) を用いて以下の式によって算出することができる。

$$M1 (total) = AUC_{po,M1} \times CL_{sys,M1} \quad \text{式 (2-6)}$$

以下、式 (2-6) で示された各経路の M1 量を算出し、それぞれに及ぼす ABT 前処理の影響の定量的評価を試みた。

2-2) M1_Hの算出

M1_Hは Fig. 16、式 (2-7) に示すように、MDZ 投与量 (D_{MDZ}) に消化管初回通過代謝を受けずに肝臓に移行した MDZ の割合 (Fa · Fg_{MDZ})、MDZ の肝抽出率 (Eh_{MDZ})、及び肝臓で生成した中間代謝物が最終代謝物にまで代謝されずに血中に移行する割合 (M1 血中移行率) を乗じることによって算出される。

$$M_{1,H} = D_{MDZ} \times Fa \cdot Fg_{MDZ} \times Eh_{MDZ} \times M1 \text{ 血中移行率} \quad \text{式 (2-7)}$$

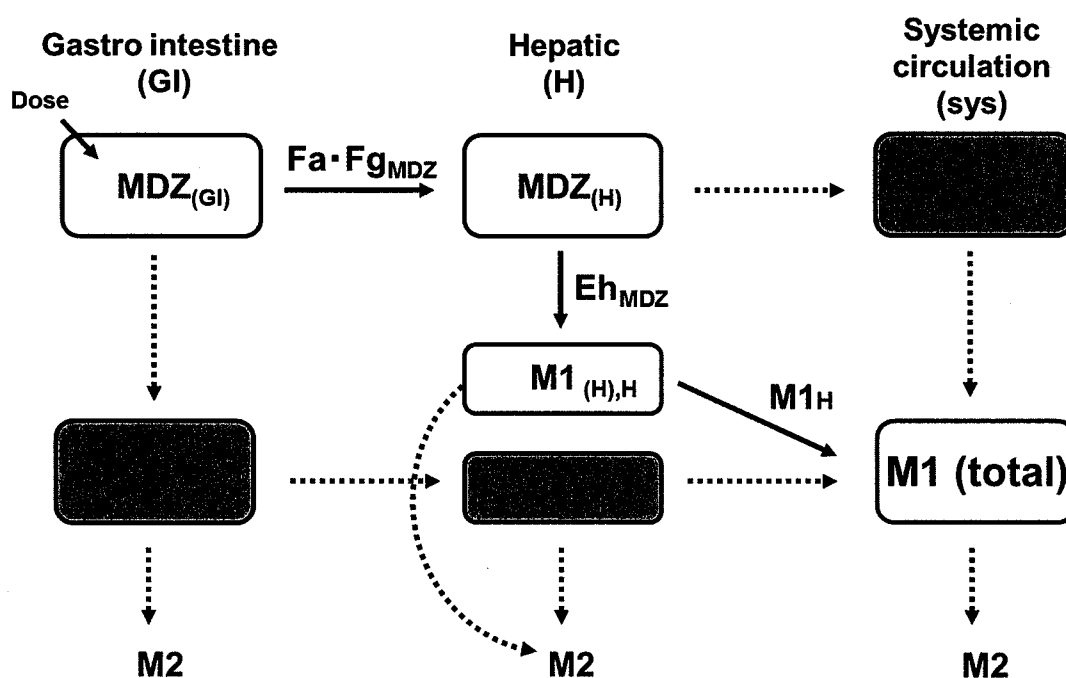


Fig. 16. Productive pathway of M1_H after oral administration of MDZ in rats

以下、式 (2-7) に用いる各パラメータを求める方法を示す。Eh_{MDZ}は式 (2-8) に示すように、MDZ 静脈投与試験で算出した MDZ の全身クリアランス (CL_{sys,MDZ}) が肝クリアランスと見なせることから、それをラット肝血流量 (Q_H) で除することによって求めた。その結果、Eh_{MDZ}はコントロール群で 0.47、ABT 前処理群で 0.16 であった。

$$Eh_{MDZ} = CL_{sys,MDZ} / Q_H \quad \text{式 (2-8)}$$

MDZは膜透過性が高いことからFaはほぼ1と考えることができる。また、消化管での初回通過代謝の回避率(Fg_{MDZ})は、Table 14の値からコントロール群で0.18、ABT前処理群で1.0とした。M1血中移行率としては、Table 3に示したMDZ静脈内投与時のMDZ投与量に対する中間代謝物の血中移行率を用いた。それら値は、コントロール群で1'-OH MDZは0.35、4-OH MDZは0.24、またABT前処理群で1'-OH MDZは0.75、4-OH MDZは0.43であった。

2-3) M1_{GI}の算出

M1_{GI}は、Fig. 17、式(2-9)に示すように、消化管での初回通過代謝によって生成して肝臓に移行した中間代謝物量(M1_{(H),GI})と、中間代謝物の肝初回通過効果の回避率(Fh_{M1})の積として算出した。

$$M1_{GI} = M1_{(H),GI} \times Fh_{M1} \quad \text{式(2-9)}$$

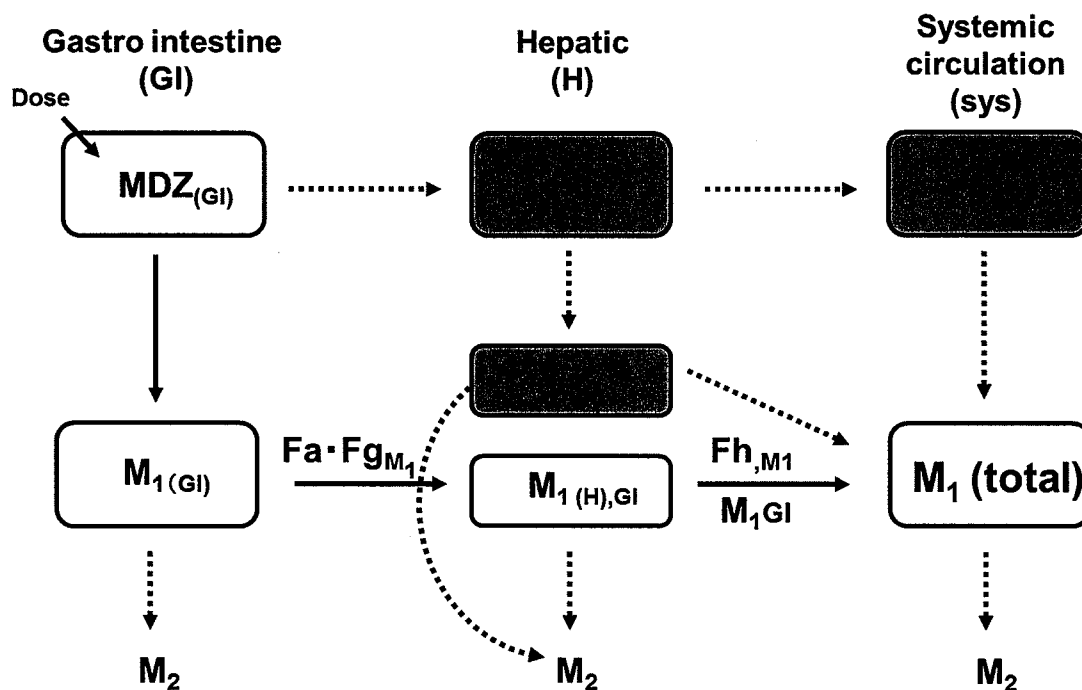


Fig. 17. Productive pathway of M1_{GI} after oral administration of MDZ in rats

ここでFh_{M1}は、式(2-10)および(2-11)に示すように、中間代謝物の全身クリアランスを肝血流量(Q_H)で除することで得られた中間代謝物の肝抽出率(Eh_{M1})から算出した。

$$E_{hM1} = CL_{totM1} / Q_H \quad \text{式 (2-10)}$$

$$F_{hM1} = 1 \cdot E_{hM1} \quad \text{式 (2-11)}$$

一方、Fig. 17 に示すように、 $M1_{(H),GI}$ を算出するためには、中間代謝物の $(Fa \cdot Fg)$ を求める必要があるが、理論上、この値はこれまでの静注試験および経口投与試験の結果のみから算出することは出来ない。そこで、以下の検討では、門脈カニューレラットを用いた MDZ 経口投与試験を行い、門脈中および全身循環血中の中間代謝物の AUC を求めることで、消化管代謝によって生成した後に肝臓に移行した中間代謝物量 ($M1_{(H),GI}$) を算出した。

2-4) 門脈カニューレラットを用いた MDZ 経口投与試験後の門脈中 AUC の算出

本検討では、門脈にカニューレーション処置を施したラット（門脈カニューレラット）を用いて消化管代謝によって生成した中間代謝物量の算出を試みた。Bachir-Cherif らは、ラットに対してカニューレーション手術を施すことで、肝臓における CYP 代謝の活性が低下することを報告している¹¹⁰⁾。Murakami らも、門脈へカニューレーションを施した場合、術部への凝固因子の遊走により術後 3 日目の血小板数が有意に減少したことを報告していることから¹¹¹⁾、手術の影響を避けるためにも十分な回復期間が必要であると考えられた。一方、Matsuda らは門脈カニューレ手術後、9 日間の回復期間を設けたラットの血液学的検査値及び CYP 代謝活性は無処置ラットと比較して有意な差は認められないことを報告しており¹⁰⁹⁾、手術後十分な回復期間を設ければ、MDZ 及び中間代謝物の体内動態が門脈カニューレーションの影響を受ける可能性は極めて低いものと考えられた。そこで本節での実験方法として、門脈カニューレーションを施したラットを手術後 9 日間以上飼育した後に MDZ の経口投与試験を実施し、門脈血および全身血中の中間代謝物濃度を測定した。

Fig. 18 および Table 16 に門脈カニューレラットを用いた MDZ 経口投与試験の結果を示す。無処置ラットを用いた検討と同様、門脈カニューレラットを用いた検討においても CYP 阻害による中間代謝物の大幅な AUC の上昇が確認された。この結果より、今回用いた門脈カニューレラットが、無処置ラットと同様な消化管および肝臓での代謝能を有していることが確認された。

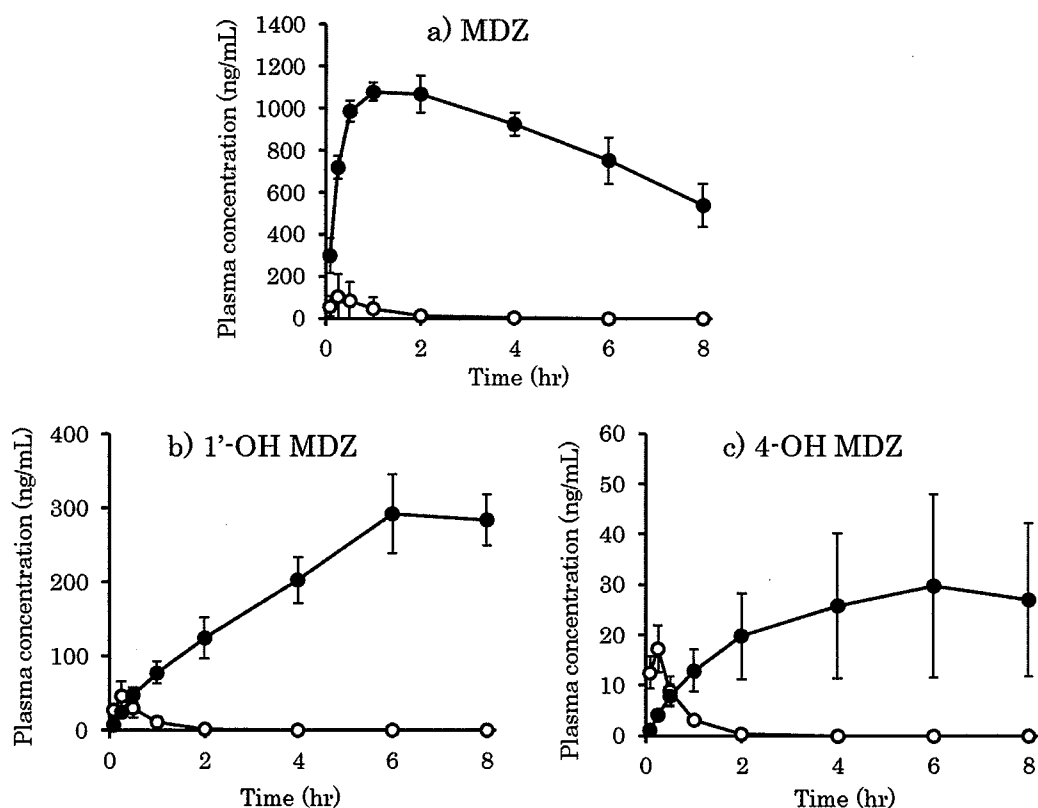


Fig. 18. Systemic plasma concentration-time profile of a) MDZ, b) 1'-OH MDZ and c) 4-OH MDZ after oral administration of MDZ to control (○) and ABT-pretreated (●) in portal vein cannulated rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD ($n = 4$).

Table 16. Effect of ABT-pretreatment on the AUC of MDZ and its primary metabolites after oral administration of MDZ to portal vein cannulated rats

	AUC (0- ∞) (ng /mL \cdot hr)		ratio
	control	ABT-pretreated	
MDZ	116.9 \pm 135.7	6849.9 \pm 423.9***	58.6
1'-OH MDZ	34.1 \pm 18.1	1540.4 \pm 230.7***	45.1
4-OH MDZ	11.1 \pm 2.8	181.5 \pm 95.8**	16.3

In the ABT-pretreated rats, MDZ was intravenously administrated at after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean \pm SD ($n = 4$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to the corresponding values in control rats.

Fig. 19 に門脈血及び全身血中の中間代謝物（1'-OH MDZ、4-OH MDZ）の濃度推移を示す。コントロール群においては、両中間代謝物ともに投与直後より全身血に比べて門脈血中の代謝物濃度が高くなったのに対して、ABT 前処理ラットでは、門脈血と全身血中の中間代謝物濃度はほぼ一致した。また、ABT 前処理群では、両中間代謝物の門脈血 AUC (AUC_{pv}) と全身血 AUC (AUC_{sys}) に差はみられなかった (Table 17)。

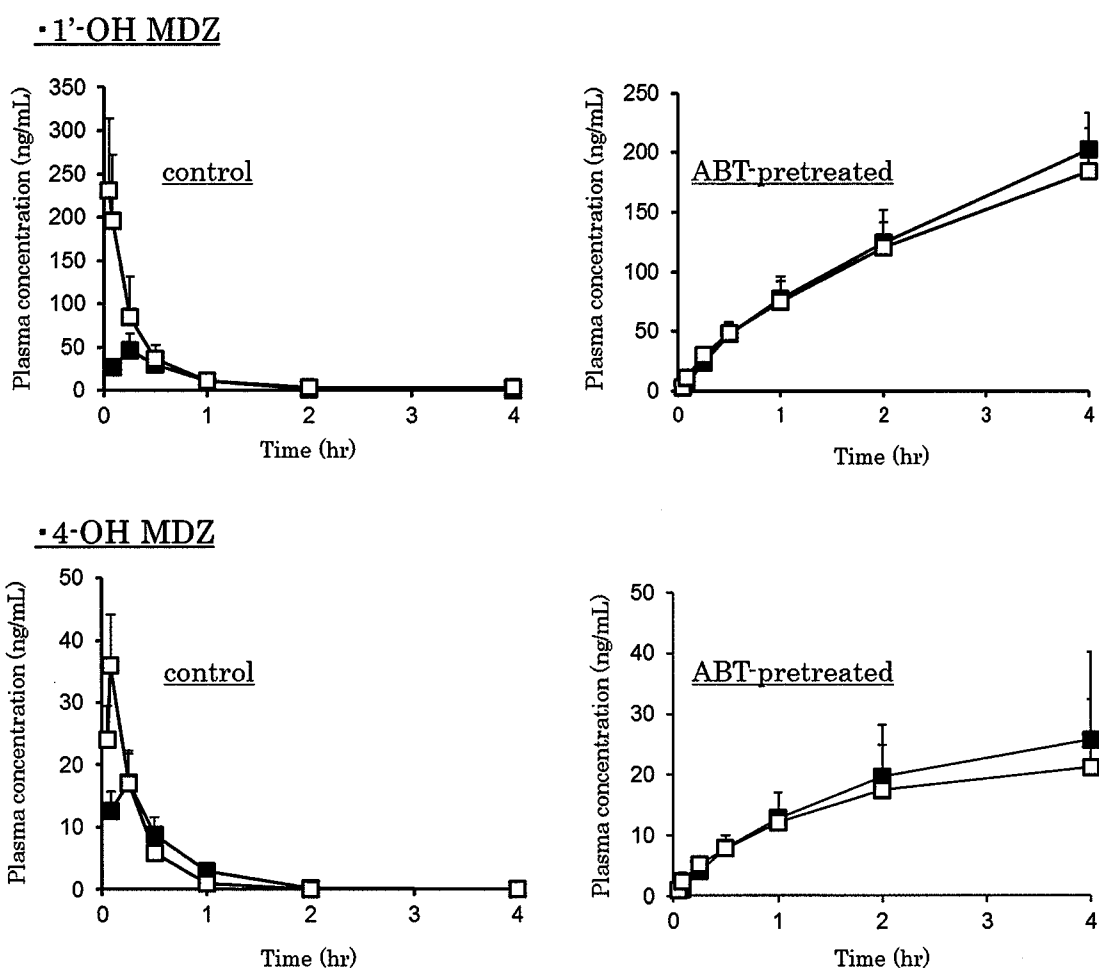


Fig. 19. Effect of ABT-pretreatment on the portal (\square) and systemic (\blacksquare) plasma concentration-time profile of 1'-OH MDZ and 4-OH MDZ after oral administration of MDZ to portal vein cannulated rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD ($n = 4$).

Table 17. Effect of ABT-pretreatment on the portal and systemic AUC of primary metabolites after oral administration of MDZ to portal vein cannulated rats

	AUC (0-∞) (ng/mL · hr)			
	control		ABT-pretreated	
	Portal vein	Systemic	Portal vein	Systemic
1'-OH MDZ	89.1 ± 44.4	34.1 ± 18.1	1396 ± 264***	1540 ± 231***
4-OH MDZ	11.0 ± 2.9	11.1 ± 2.8	156 ± 79.7*	182 ± 95.8*

In the ABT-pretreatment rats, MDZ was oral administrated at after 18hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to the corresponding values in control rats.

以上の結果に基づき、消化管での初回通過代謝によって生成した MDZ の中間代謝物量を算出した。Fig. 20 に示すように、門脈中に存在する中間代謝物量 ($M_{1,pv}$) は消化管代謝によって生成し、門脈中に移行した中間代謝物量 ($M_{1,(H),GI}$) と全身循環血より流入した中間代謝物量 ($M_{1,sys}$) の和であり、この時、式 (2-12) が成り立つ。

$$M_{1,pv} = M_{1,(H),GI} + M_{1,sys} \quad \text{式 (2-12)}$$

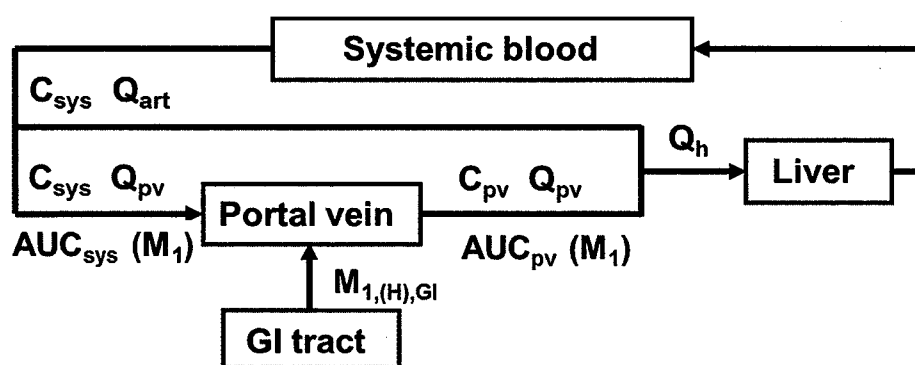


Fig. 20. Schematic diagram of pharmacokinetic model in the cannulated rats¹¹²⁾.

$M_{1,(H),GI}$, mass of drug absorbed from GI tract. Q_{art} , Q_{pv} and $Q_h (= Q_a + Q_{pv})$ were blood flow rates at the hepatic artery, portal vein and hepatic vein. C_{pv} and C_{sys} were plasma concentrations at portal and systemic circulation.

Fig. 20 において、 $M1_{pv}$ 及び $M1_{sys}$ は、それぞれ式 (2-13) 及び式 (2-14) によって表される。

$$M1_{pv} = Q_{pv} \times Rb \times AUC_{pv} \quad \text{式 (2-13)}$$

$$M1_{sys} = Q_{pv} \times Rb \times AUC_{sys} \quad \text{式 (2-14)}$$

ここで、 Q_{pv} 、 Rb 、 AUC_{pv} 、 AUC_{sys} はそれぞれ門脈血流量、血液血漿濃度比、門脈血漿中濃度 AUC 及び全身血漿中濃度 AUC を示す。従って、 $M1_{(H),GI}$ は式 (2-15) として書き表すことができる。

$$M1_{(H),GI} = M1_{pv} - M1_{sys} = Q_{pv} \times Rb \times (AUC_{pv} - AUC_{sys}) \quad \text{式 (2-15)}$$

式 (2-15) を用いて消化管での初回通過代謝によって生成した 1'-OH MDZ および 4-OH MDZ 量を算出した。今回、ラットの Q_{pv} は 32.9 mL/min/kg、両代謝物の Rb 値は 1.22 を用いた¹¹²⁾。その結果、コントロール群ラットにおいて、消化管代謝によって生成した 1'-OH MDZ は 87.7 μ g/kg、4-OH MDZ は 0.12 μ g/kg であった。一方、ABT 前処理によって CYP を阻害した群では、それぞれ 3.9 μ g/kg、0.01 μ g/kg と極めて低い値となることが明らかとなった。また、1'-OH MDZ と比較し、4-OH MDZ の消化管初回通過代謝による生成量は極めて小さいものであった (Table 18)。

Table 18. Amount of primary metabolites of MDZ exposed to the portal vein after oral administration of MDZ

	M1 _{(H),GI} (μ g/kg)	
	control	ABT-pretreated
1'-OH MDZ	87.7 \pm 42.6	3.9 \pm 2.2*
4-OH MDZ	0.12 \pm 0.05	0.01 \pm 0.01*

Exposed amount 1'-OH MDZ and 4-OH MDZ were calculated by multiplying their Rb values, between AUC to the portal vein and AUC to the systemic circulation and hepatic blood flow (Eq. 2-15). Obtained values of metabolite amount were converted to the corresponding amount of MDZ by using the ratio of the ratio of the molecular weight. The values are mean \pm SD (n = 4).

* $p < 0.05$, compared to the corresponding values in control rats.

2-5) 全身循環血中に移行した MDZ 中間代謝物の生成量に及ぼす CYP 阻害の影響

以上、MDZ 経口投与後、3つの過程によって全身血中に移行した MDZ の中間代謝物量を算出した結果を Tables 19、20 に示す。なお、 $M1_{sys}$ の値は、式 (2-5) より、

$$M1_{sys} = M1 \text{ (total)} - M1_{H} - M1_{GI} \quad \text{式 (2-16)}$$

として算出した。

Table 19. Effect of ABT-pretreatment on the amount of 1'-OH MDZ provided from each process after oral administration of MDZ to rats

	Amount of M1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	control	ABT-pretreated
M1 (total)	139.8	1103.2
$M1_{GI}$	23.7	2.7
$M1_{H}$	62.2	299.2
$M1_{sys}$	53.9	801.3

Obtained values of metabolite amount were converted to the corresponding amount of MDZ by using the ratio of the molecular weight.

Table 20. Effect of ABT pretreatment on the amount of 4-OH MDZ provided from each process after oral administration of MDZ to rats

	Amount of M1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	control	ABT-pretreated
M1 (total)	153.4	629.0
$M1_{GI}$	0	0
$M1_{H}$	42.5	171.6
$M1_{sys}$	111.0	457.4

Obtained values of metabolite amount were converted to the corresponding amount of MDZ by using the ratio of the molecular weight.

Tables 19, 20 より、1'-OH MDZ、4-OH MDZ とともに、肝臓の初回通過代謝によって生成した後に全身循環に移行した量、および全身血中に到達後、生成した量は、ABT 前処理によって大幅に増加することが示された。一方、消化管での初回通過代謝によって生成した量 ($M_{1,GI}$) は、1'-OH MDZ の場合は CYP 阻害によって 1/10 程度まで低下し、さらに門脈カニューレラットを用いた検討より、 $M_{1,(H),GI}$ は MDZ 投与量のおよそ 4.5% 程度であったことから、投与された MDZ のほとんどが消化管代謝によって最終代謝物に代謝されることが明らかとなった。また、4-OH MDZ ではコントロール群、ABT 処理群とも有意な値は検出されないことが明らかとなった。

第 3 節 考察

本章では、第 1 章で認められた CYP 阻害による中間代謝物の AUC の上昇が、親薬物を経口投与した場合にも認められるか否かに関し、MDZ をモデル薬物として検証を行った結果、経口投与時には静脈内投与を上回る中間代謝物の血中曝露の増加が確認された。

この時、MDZ の BA (F) および小腸からの吸収率 ($F_a \cdot F_g$)、肝アベイラビリティ (F_h) を算出したところ、コントロール群における MDZ の BA は 10% と低く、その主たる理由として $F_a \cdot F_g$ が 18% 程度と低いことが示された。MDZ をラットに経口投与した場合の BA に関しては多くの報告があり、その多くは 10-20% 程度と低い値であることから今回の検討結果の妥当性が確認された^{113,114})。また、MDZ の小腸膜透過性は十分に高いことから、MDZ を経口投与した場合、吸収量の 80% 以上が小腸で初回通過代謝を受けると考えられた。一方、ABT 前処理群における MDZ の BA はほぼ 100% となったことから、小腸および肝臓における初回通過代謝はほぼ完全に阻害されたことが明らかとなった。したがって、経口投与試験において、CYP 阻害時の中間代謝物の AUC の上昇率が顕著に大きくなった理由として、小腸および肝臓での初回通過代謝が阻害された結果、MDZ 自体の血中移行量が 10 倍程度まで上昇し、それに伴って代謝物の血中曝露も増大したと推察された。

次に、MDZ 経口投与後の中間代謝物の吸収挙動に関して、速度論的解析および門脈カニューレラットを用いた検討を実施した。門脈カニューレラットにおいて、中間代謝物の門脈血中および全身血中での AUC の差より、消化管での初回通過代謝によって生成した後、肝臓に移行した MDZ の中間代謝物量 ($M_{1,H,GI}$) は、コントロールラッ

ト条件下で 87.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった (Table 18)。本検討において、経口投与試験に用いた MDZ の投与量はおよそ 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である。コントロール群ラットにおいて MDZ の $F_a \cdot F_g$ が 0.18 であったことから、 $F_a=1$ と仮定すれば、投与された MDZ のうち 1640 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が消化管で初回通過代謝を受け、さらにそのうちの 1512.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最終代謝物に代謝されたことになる。したがって、コントロール条件下では、MDZ の投与量の約 3/4 が、全身循環血中に移行する前に最終代謝物にまで代謝されており、中間代謝物として血中に検出される量は、最大でも投与量の 1/4 以下と考えられる。

一方、ABT 前処理群では MDZ の初回通過代謝はほぼ完全に阻害されるため、経口投与された MDZ は消化管で代謝されることなく、ほぼ全量が門脈から肝臓に移行する。Table 19、20 において、肝臓で代謝を受けた後に全身循環に移行した中間代謝物量 ($M_{1,H}$) が、ABT 前処理によって増加した理由としては、肝臓に到達した MDZ の量が顕著に増加したことが挙げられる。また、全身血中に移行した後の MDZ は静脈内投与試験と同じ体内動態を示すことから、肝臓で代謝されて生成した MDZ の中間代謝物は、ほぼ 100% が全身循環血中に移行したと考えることができる。したがって、MDZ 経口投与試験において、静脈内投与試験を上回る血中曝露の増加が観察された理由として、コントロール群では消化管初回通過代謝で投与量のおよそ 3/4 が最終代謝物まで代謝されるのに対し、ABT 前処理群では投与量とほぼ同量の MDZ が全身血中に移行したことが大きく寄与していると推察された。

経口投与の場合には、CYP 阻害による MDZ の中間代謝物の AUC の上昇は静脈内投与よりも顕著であったものの、この時、親薬物である MDZ の AUC は 35.1 倍とより大きな上昇を示した。これは ABT 前処理によって MDZ の初回通過代謝がほぼ完全に阻害されたためであり、臨床での薬物間相互作用によって CYP が阻害された場合にも、まず親薬物の血中濃度推移に及ぼす影響を確認することが重要と考えられた。ただし、この場合にも、本章で明らかにしたように中間代謝物の AUC も 10 倍以上に上昇している可能性があることに、十分な注意を払う必要がある。

以上本章では、MDZ 経口投与後の中間代謝物の血中曝露増加のメカニズムを明らかにすることができた。本検討では MDZ をモデル薬物として用いたが、ここで得られた結果は、MDZ だけでなく DAP や TAM のように MDZ と似た代謝過程を有する薬物にも当てはまる可能性が考えられる。今後、より多くの薬物を用いて同様な解析を

行い、薬物間相互作用による代謝物の血中曝露の変化に関する情報を取得しておくことが重要と考えられる。

第 3 章 臨床における中間代謝物の血中曝露増加の可能性

第 1 章において著者は、MDZ、DAP および TAM の中間代謝物の血中 AUC が ABT 前処理による CYP 阻害時に顕著に上昇することを見出し、その要因及びメカニズムに関する *in silico*、*in vitro* での詳細な解析を行った。さらに第 2 章では、MDZ を経口投与した場合にも同様な現象が認められることを明らかにした。本研究で見出した現象が臨床現場において生じた場合、活性代謝物の血中曝露の増加に伴う薬効の増強、あるいは毒性を持った代謝物による有害事象など、予想外の事態が引き起こされる可能性がある。

しかしながら、これまでの検討はすべてラットを用いた動物試験であるため、本研究で見出した現象が、ヒトにおいても同様に認められるか否かに関しては確証が得られていない。また、CYP 酵素の阻害剤として用いた ABT は、CYP 特異的な強い阻害活性を有する試薬であり、実際の臨床現場で生じる薬物間相互作用とは異なった結果を与える可能性も否定できない。

そこで本章では、中間代謝物の AUC の上昇が臨床現場で起こる可能性について検討を行うことを目的として、① 臨床で使用されている薬剤のうち、強い CYP 阻害作用を示すケトコナゾール (KTZ) の併用による検討、② 急性肝障害モデルラットを用いた検討、③ カニクイザルを用いた *in vivo* 試験、及びカニクイザル、ヒト肝由来のマイクロソームを用いた *in vitro* 試験による検討、を行った。

第 1 節 ケトコナゾール (KTZ) との薬物間相互作用による MDZ 中間代謝物の体内動態の変化

医薬品の有害作用に起因した副作用が生じる頻度は、併用する薬剤の数が多くなるほど高くなることが報告されており、ほとんどのケースで薬物間での何らかの相互作用が発現の原因となっている。そのうち CYP3A の阻害に起因する動態学的な薬物間相互作用は、CYP3A 酵素の基質となる薬物が極めて多いことから発現頻度が高く、それら薬物の添付文書には併用注意、もしくは禁忌の記述が記載されている¹¹⁵⁾。中でも抗真菌薬である KTZ は CYP3A を競合的及び非競合的に阻害することが知られており、アステミゾール、シサプリド、ジゴキシシン、タクロリムスをはじめ、多くの医薬品は KTZ との併用が禁忌とされている¹¹⁶⁻¹²¹⁾。

本研究では、これまで代謝酵素阻害剤として CYP の非特異的阻害剤である ABT を

用いてきた。しかし、ABTはCYPを阻害する目的で動物実験等に使用される試薬であり、MBIを起こすことによって強力な阻害効果を示すことから、臨床的に高い頻度で発現する薬物間相互作用とは質的にも異なる可能性がある。そこで本節では、CYP阻害剤として実際に臨床使用されているKTZを用い、MDZの中間代謝物の血中曝露に及ぼす影響について検討を行った。

1-1) MDZ及びその中間代謝物の血中AUCに及ぼすKTZ前処理の影響

臨床現場で薬物間相互作用が引き起こされる場合、CYP阻害の原因薬物の血中濃度は十分に高いことが考えられる。そこで本検討では、KTZ(20または50 mg/kg)を経口投与し、そのKTZが最高血中濃度に達する1時間後にMDZを静脈内投与した。その結果、親薬物であるMDZはKTZの併用によって血中からの消失がコントロール群と比較して遅延し、その遅延は20 mg/kgと比較し、50 mg/kgでより顕著であった(Fig. 21)。したがって、KTZが投与量依存的に肝臓のCYP代謝を阻害することが確認された。またこのとき、中間代謝物である1'-OH MDZ、4-OH MDZもMDZと同様、KTZの併用によって血中からの消失が大きく遅延した。さらに、ABTを阻害剤として用いた検討においては、両中間代謝物の最高血中濃度はコントロール群と比較して差はなかったのに対し、KTZを阻害剤として用いた検討では、両中間代謝物の最高血中濃度はコントロール群よりも高い値を示した。

Table 21にMDZ、1'-OH MDZ、4-OH MDZの血中AUCを算出した結果を示す。親薬物であるMDZはコントロール群と比較して、KTZ投与量20 mg/kgで1.1倍、50 mg/kgでは1.6倍にAUCが上昇したのに対し、中間代謝物である1'-OH MDZでは2.7倍及び4.1倍、4-OH MDZでは3.6倍及び5.8倍の上昇が認められ、ABTによって前処理した場合と同様、中間代謝物のAUCの上昇率(KTZ前処理群 / コントロール群)がMDZのそれを大きく上回る結果が得られた。ラットの肝臓では主にCYP3A2が発現していることから^{91,92)}、MDZおよび両中間代謝物のCYP3A2による代謝がKTZによって強く阻害されたと考えられた。

以上の結果は、実際に臨床的に用いられる薬物同士の相互作用によっても、CYP酵素が阻害された場合に代謝物の血中曝露が上昇する可能性を示すものと考えられる。

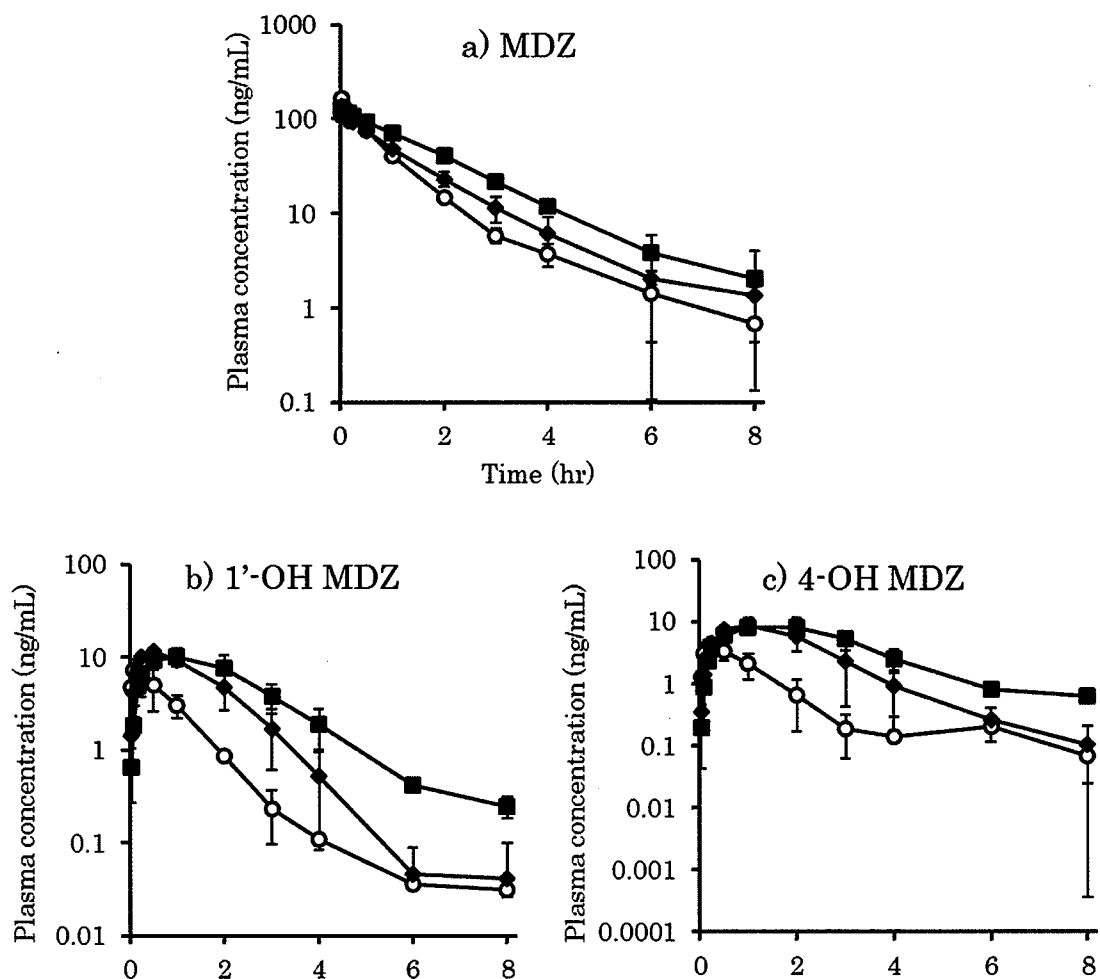


Fig. 21. Plasma concentration-time profile of a) MDZ, b) 1'-OH MDZ, and c) 4-OH MDZ after intravenous administration of MDZ to control (○) and KTZ-pretreated (20 mg/kg (◆), 50 mg/kg (■)) rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 3).

Table 21. Effect of KTZ-pretreatment on the systemic exposure (AUC) of MDZ and its primary metabolites after intravenous administration of MDZ to rats

	AUC (0-∞) (ng/mL · hr)				
	control	KTZ			
		20 mg/kg	ratio	50 mg/kg	ratio
MDZ	137.4 ± 4.3	156.4 ± 23.2	1.1	226.2 ± 5.0*	1.6
1'-OH MDZ	7.8 ± 2.6	21.3 ± 3.3*	2.7	28.3 ± 6.7*	4.1
4-OH MDZ	5.2 ± 2.6	21.1 ± 7.5	3.6	30.3 ± 7.7*	5.8

In the ketoconazole-pretreated rats, MDZ was intravenously administered at after 1hr of oral pretreatment with KTZ. The values are mean ± SD (n = 3). **p* < 0.05, compared to the corresponding values in control rats.

第2節 急性肝障害モデルラットにおけるMDZ中間代謝物の体内動態の変動

肝臓の代謝機能は、遺伝子多形や疾患などによって大きく変動する。特に、肝疾患時には、急性、慢性を問わずCYPを始めとした代謝酵素の活性が低下する¹²²⁻¹²⁵⁾。また、肝硬変、肝癌などの重篤な肝疾患では、代謝酵素活性の他にも、正常肝細胞数や有効肝血流量が低下することが報告されている¹²⁶⁾。したがって、肝機能が低下した患者では、健康人に比べて投与された薬物の代謝速度が低下し、その血中からの消失が遅延する可能性が高いと考えられることから、肝代謝型の薬物を用いて治療を行う場合には、投与量の調節等、患者の病状に応じた投与設計が必要となる。さらに、活性を有した代謝物を生じる薬物では、安全性や有効性の面からも代謝物の血中曝露に関して十分に検討を行うことが求められる。しかしながら、肝疾患時の薬物代謝物の体内動態の変動に関する情報はほとんど報告されていない。

そこで本節では、薬物間相互作用による肝臓の代謝酵素阻害以外のケースでも、肝機能が低下した場合に薬物代謝物の血中曝露が上昇するか否かを明らかにすることを目的として、急性肝障害モデルラットにMDZを静脈内投与した後の中間代謝物の体内動態の変動に関する検討を行った。

2-1) 急性肝障害モデルラットの作成

急性肝疾患のモデルとして、肝毒性を有する化合物を用いた動物モデルが作成され、薬理効果や薬物動態の検証に使用されている¹²⁷⁻¹²⁹⁾。本検討では、投与後速やかに肝障害を誘導することが知られている四塩化炭素 (CCl₄) を用いて、急性肝障害モデルラットを作成した^{130,131)}。CCl₄は主に肝臓のシトクロム P450 系によって代謝され、その過程でトリクロロメチルラジカル、過酸化トリクロロメチルラジカル、ホスゲンなど、極めて不安定で反応性の高い中間代謝物を生じる。その中間代謝物が、脂質の過酸化、タンパク質などの生体高分子への結合、CYP をはじめとする各種酵素タンパク質の不活性化及び分解、グルタチオンなどの細胞内チオール化合物との結合等を引き起こすことによって肝毒性を発現する^{132,133)}。CCl₄処理ラットはヒト肝障害モデルとして頻用されている¹³¹⁾ことから、肝機能低下時の親薬物および中間代謝物の体内動態の評価に有用なモデルであると考えられる。

Table 22. Plasma AST and ALT levels in rats at 24hr after intraperitoneal administration of CCl₄

	Karmen unit		ratio
	Reference	CCl ₄ -pretreated	
AST	56.7 ± 17.8	2277.1 ± 171.0***	40.2
ALT	14.3 ± 2.9	1905.3 ± 343.6***	133.2

In the CCl₄-pretreated rats, plasma samples were collected at after 24hr of intraperitoneal pretreatment with 25% CCl₄. In the reference rats, only the vehicle (olive oil) was used for the pretreatment. The values are mean ± SD (n = 6). ****p* < 0.001, compared to the corresponding values in reference rats.

Mukai らの方法を用いて急性肝障害ラットを作成した^{134,135)}。ラットの腹腔内にオリブオイルで希釈した 25% 四塩化炭素 (CCl₄) をミダゾラム投与のおよそ 24 時間前に腹腔内投与した。本検討では、肝機能低下の指標として血清中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) を測定した。AST、ALT は肝細胞中に含まれる酵素であり、肝細胞がウィルス感染や薬物、あるいはがんなどのために破壊されると、血液中に漏れ出る。AST 及び ALT は肝機能の状態を知る上で測定される。今回、CCl₄の前投与を行ったラットの血中 AST、ALT 値を

測定したところ、 CCl_4 非投与群と比較してそれぞれ 40、133 倍増加したことから、 CCl_4 投与によって急性肝障害が誘発されたことが確認された (Table 22)。

2-2) 急性肝障害モデルラットにおける MDZ 及び中間代謝物の血中曝露の変動

CCl_4 投与群及びコントロール群ラットに MDZ を静脈内投与し、急性肝障害による MDZ 及び中間代謝物の体内動態の変化を観察した結果を Fig. 22 に示した。

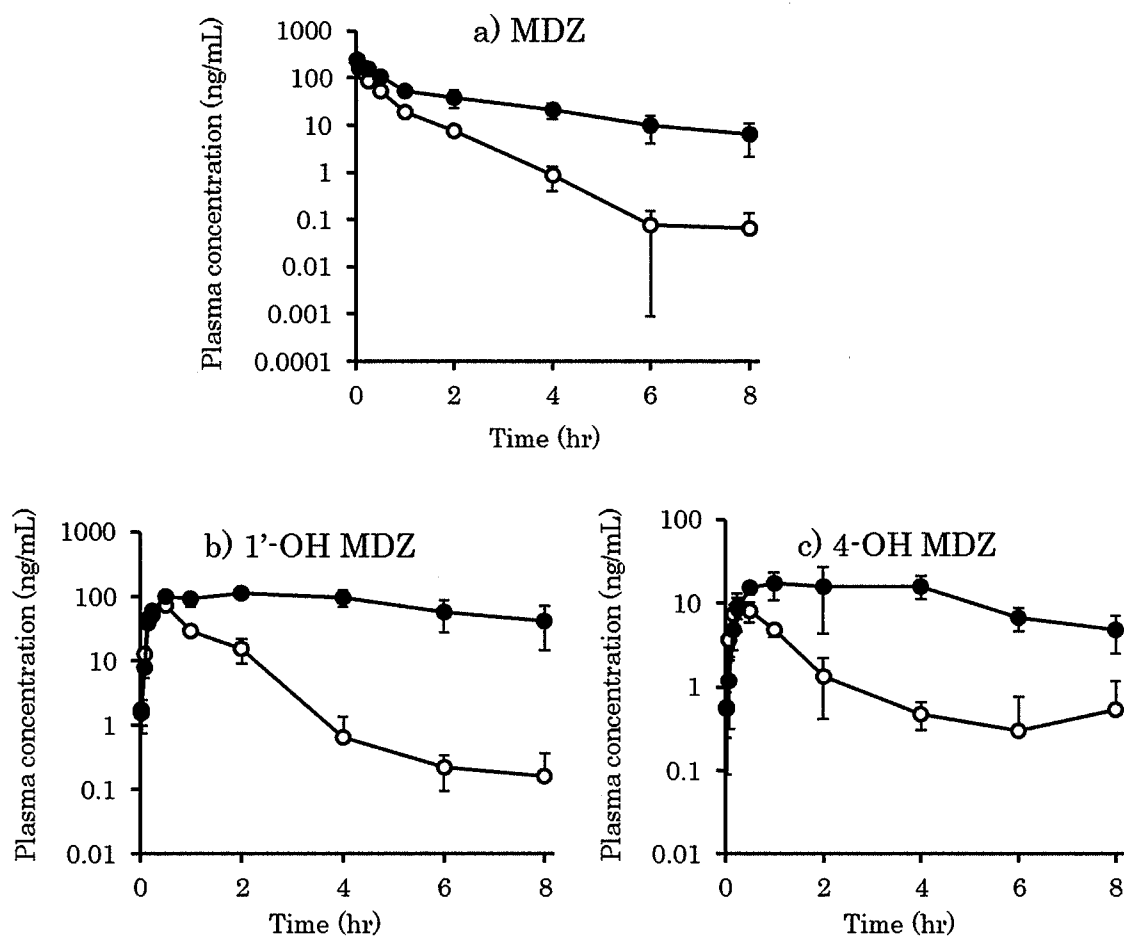


Fig. 22. Plasma concentration-time profile of a) MDZ, b) 1'-OH MDZ and c) 4-OH MDZ after intravenous administration of MDZ to reference (○) and CCl_4 -pretreated (●) rats.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 4).

CCl_4 前処理ラットにおいて、MDZ の全身血中からの消失は非投与群と比較して有意に遅延していたことから、急性肝障害ラットでは MDZ の全身クリアランスが低下していることが示された。一方、1'-OH MDZ、4-OH MDZ の両中間代謝物とも、

CCl₄前処理ラットにおいて血中濃度推移は遅延し、最高血中濃度は CCl₄非投与群よりも有意に上昇した。この時、血中 AUC を比較したところ、親薬物である MDZ の AUC は CCl₄前処理によっておよそ 3 倍上昇したのに対し、1'-OH MDZ、4-OH MDZ の AUC の上昇率はそれぞれ 9.9 倍、6.6 倍となり、第 1 章で示した ABT 前処理時の上昇率を上回る結果が得られた (Table 23)。

Table 23. Effect of CCl₄-pretreatment on the systemic exposure (AUC) of MDZ and its primary metabolites after intravenous administration of MDZ to rats

	AUC (0-∞) (ng/mL · hr)		ratio
	reference	CCl ₄ -pretreated	
MDZ	99.6 ± 10.2	297.9 ± 87.3*	3.0
1'-OH	95.3 ± 21.9	946.0 ± 440.0*	9.9
4-OH	17.0 ± 9.6	111.5 ± 41.7*	6.6

In the CCl₄-pretreated rats, MDZ was intravenously administrated at after 24 hr of intraperitoneal pretreatment with 25% CCl₄. In the reference rats, only the vehicle (olive oil) was used for the pretreatment. The values are mean ± SD (n = 4). **p* < 0.05, compared to the corresponding values in reference rats.

ABT 前処理は CYP 代謝のみに影響を与えると考えられるが、CCl₄投与した急性肝障害モデルラットでは、CYP 代謝の活性の低下以外にも、肝血流速度や血漿中タンパク結合など、さまざまな要因が変化している可能性が考えられる。今回得られた結果に対する、それら要因の影響に関しては明らかではない。今後は、血中タンパク結合率や肝クリアランス、あるいは体内からの消失経路等が異なる様々な薬物を用いて同様な検討を行うことによって、肝疾患時の薬物およびその代謝物の体内動態を明らかにしていく必要があると考えられる。

第3節 サルを用いた MDZ 中間代謝物の血中曝露の変動に関する検討

本研究では、これまでラットを用いて CYP 阻害時あるいは肝障害時の薬物中間代謝物の体内動態の変化について検討を行ってきた。得られた結果は、CYP 代謝の活性が低下した場合には、親薬物だけでなくその中間代謝物の血中曝露が有意に増加するという極めて興味深いものであり、もし、ヒトでも同様な現象が起こるのであれば、代謝物の安全性を担保する上で重要な知見と考えられる。

新規医薬品を開発する場合、様々な動物が候補化合物の薬効、毒性、または体内動態を検証するために用いられる¹³⁹⁾。開発初期では多くの化合物を処理するために、throughput の高いマウスやラットなどの小動物が利用される。一方、開発後期ではヒトにおける薬効や体内動態を精度よく予測することを目的に、イヌ、サルなどの大動物が用いられる。特に、ヒトと同じ霊長類に属するサルは、医薬品開発研究において幅広く用いられている実験動物であり、薬物動態研究および毒性研究において、非げっ歯類の動物種として頻繁に選択されている¹⁴⁰⁾。サルはラットやイヌなどと比較して遺伝的にヒトに近く、特にカニクイザルは CYP 酵素のアミノ酸配列の 90%以上がヒトと一致する¹⁴¹⁾。Sakuda らは、MDZ を含む 13 の薬物について、カニクイザルの肝初回通過率 (Fh) がヒトに極めて近いこと¹⁴²⁾、また Akabane らは、MDZ、デキサメタゾン、イブプロフェンの肝固有クリアランス (CL_{int}) がヒトに近いことを報告している¹⁴³⁾。さらに、Ogasawara らはカニクイザルの薬物間相互作用試験の結果がヒトと類似していること報告しており¹⁴⁴⁾、カニクイザルはヒトにおける薬物間相互作用を予測するための実験動物として推奨されている。

本節では、ABT を前処理したカニクイザルに MDZ を静脈内投与し、中間代謝物の体内動態の変動を観察することで、ヒトにおける CYP 阻害時の中間代謝物の血中曝露増加の可能性について考察を試みた。さらに、カニクイザル及びヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験を実施した。

3-1) カニクイザルにおける CYP 代謝阻害時の MDZ 中間代謝物の血中曝露の変化

Fig. 23 に、カニクイザルに MDZ を静脈内投与した後の MDZ および中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 阻害の影響を示す。ABT 前処理群において親薬物である MDZ の血中からの消失の遅延が確認され、カニクイザルにおいてもラットと同様、肝臓の CYP 代謝が阻害されていることが確認された。この時、MDZ の AUC は ABT 前処理によって 2.2 倍上昇した (Table 24)。一方、中間代謝物である 1'-OH MDZ、4-OH

MDZの最高血中濃度はABT前処理群においてコントロール群を大きく上回っており、全身循環からの消失も明らかに遅延していた。両代謝物のAUCを算出したところ、コントロール群と比較し、それぞれ3.1倍、5.4倍と、MDZよりも高い上昇率を示すことが明らかとなった。

MDZは、カニクイザルにおいて、ヒトと同様にCYP3A4によって代謝されることが報告されている¹⁴⁵⁾。また、肝臓での薬物代謝活性の発現量もヒトに近いことから、カニクイザルを用いた試験においてCYP阻害による中間代謝物のAUC上昇が確認されたことは、ヒトにおいても同様な現象が起こることを強く示唆するものと考えられる。

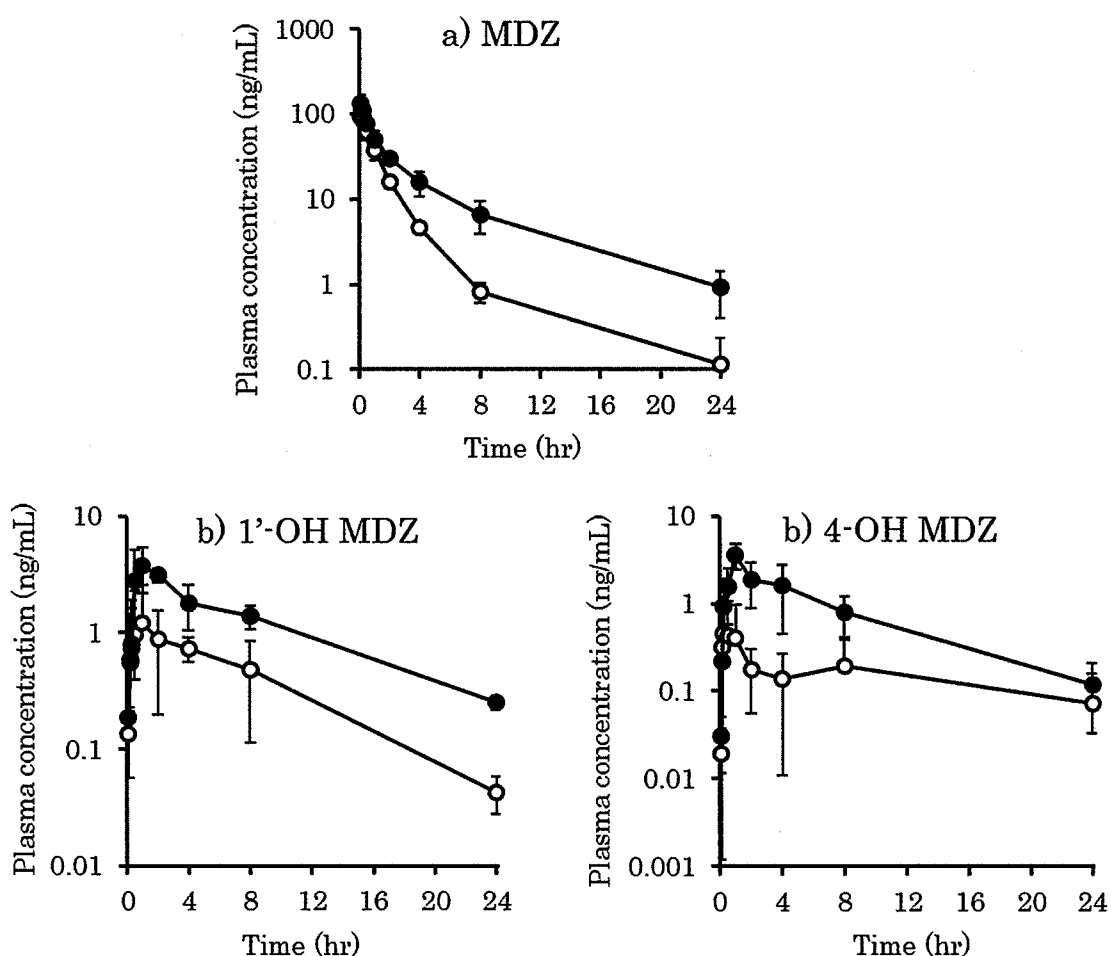


Fig. 23. Plasma concentration-time profile of a) MDZ, b) 1'-OH MDZ and c) 4-OH MDZ after intravenous administration of MDZ to control (○) and ABT-pretreated (●) cynomolgus monkeys.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 4).

Table 24. Effect of ABT-pretreatment on the systemic exposure (AUC) of MDZ and its primary metabolites after intravenous administration of MDZ to cynomolgus monkeys

	AUC (0-∞) (ng/mL · hr)		ratio
	control	ABT-pretreated	
MDZ	131.2 ± 11.5	282.3 ± 74.3*	2.2
1'-OH MDZ	10.5 ± 6.8	32.5 ± 6.5**	3.1
4-OH MDZ	5.0 ± 4.9	26.9 ± 4.1**	5.4

In the ABT-pretreated monkeys, MDZ was intravenously administered at after 2 hr of oral pretreatment with ABT. The values are mean ± SD (n = 4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the corresponding values in control cynomolgus monkeys.

3-2) ヒト及びカニクイザルの肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

第1章で、ラットにおける中間代謝物の血中曝露の増加のメカニズムを明らかにすることを目的として、PB-PK モデルを用いた速度論的解析、およびラットの肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験を行った。その結果、ABTはMDZのみでなく、中間代謝物から最終代謝物の代謝も阻害すること、およびその代謝速度定数 (k_2) の低下に伴って中間代謝物の肝臓から全身血中への移行量が増加することを明らかとした。

そこで本節では、カニクイザルの肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験を行い、MDZの各代謝過程に及ぼすABTの影響について検討を行った。さらに、ヒト肝ミクロソームを用いて同様の試験を行うことによって、ヒト *in vivo* における中間代謝物の血中曝露の変動に関して定量的な考察を試みた。

Fig. 24 及び Table 25 に、カニクイザルを用いた *in vitro* 代謝試験の結果を示す。ラット肝ミクロソームを用いた検討と同様、カニクイザルの肝ミクロソームにおいてもCYP阻害によって試験液中での中間代謝物の濃度推移が遅延したことより、MDZのみでなく、中間代謝物の代謝が阻害されたことが確認された。MDZおよび中間代謝物の濃度推移より、MDZから中間代謝物への代謝速度定数 (k_1) 及び中間代謝物から最終代謝物への速度定数 (k_2) を算出した結果、ABTによる k_1 の低下はおよそ80%程度であったのに対し、 k_2 は17%まで低下していた。カニクイザルを用いた検討では、中間代謝物の血中移行量は算出していないものの、前章に示したPB-PKモデル解析によれ

ば、中間代謝物の肝臓から全身血中への移行量は肝臓中での中間代謝物の固有クリアランスに反比例すること、および k_2 の低下の程度はラット肝ミクロソームでの結果 (12%) とほぼ同程度であったことから、カニクイザルにおいても CYP 阻害時には中間代謝物の血中移行量が上昇していたと推察される。

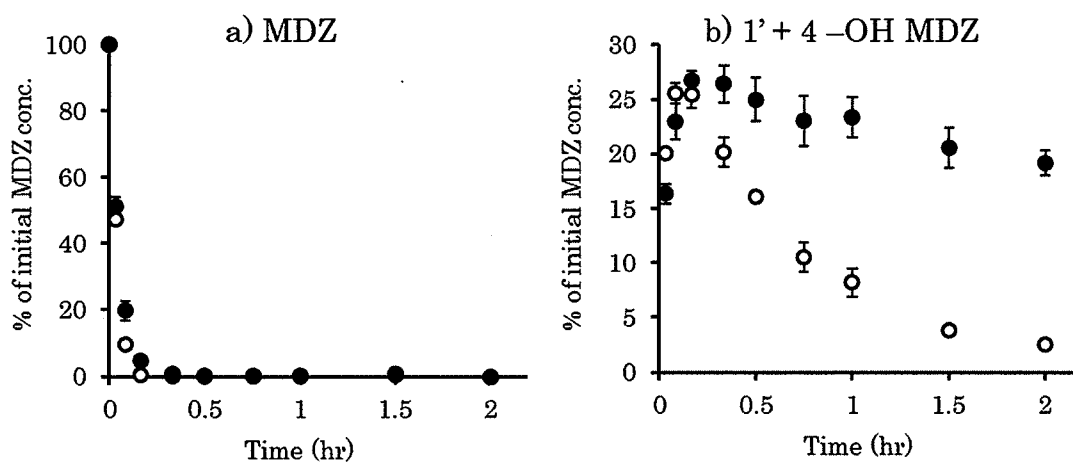


Fig. 24. Concentration-time profile of a) MDZ and b) 1' + 4 -OH MDZ in the control (○) and ABT-preincubation (●) suspension of microsomes prepared from the liver of cynomolgus monkey.

Each point in the figure represents the mean \pm SD ($n = 3$).

Table 25. Effect of ABT-pretreatment on the *in vitro* rate content for the metabolism of MDZ and its primary metabolites in the suspension of microsomes prepared from the liver of cynomolgus monkey

	Cynomolgus monkey		ratio
	control	ABT-pretreated	
k_1 (min^{-1})	0.42	0.33	0.81
k_2 (min^{-1})	0.029	0.0048	0.17

Rate constants, k_1 and k_2 , represent the first-order rate constant for the metabolism of MDZ to the primary metabolites (k_1) and the primary metabolites to the final one (k_2). To calculate rate constants, sum of the concentrations of two primary metabolites (1'-OH MDZ and 4-OH MDZ) were used.

ヒト肝マイクロソームを用いて実施した MDZ の代謝実験の結果を Fig. 25 および Table 26 に示す。ヒト肝マイクロソームにおいても、ラット、カニクイザルの場合と同様、ABT による k_2 の顕著な低下 (18%) が確認された。 *In vivo* 試験において、ABT と同様、KTZ を用いた検討においても中間代謝物の血中曝露の増加が観察されたことから、KTZ を用いたヒト肝マイクロソーム試験においても中間代謝物の消失の遅延が観察されることが考えられる。したがって、ヒトにおいても、CYP 酵素の活性が低下した場合には、MDZ の中間代謝物の血中移行量の上昇に伴ってその血中曝露が増加するものと推察された。

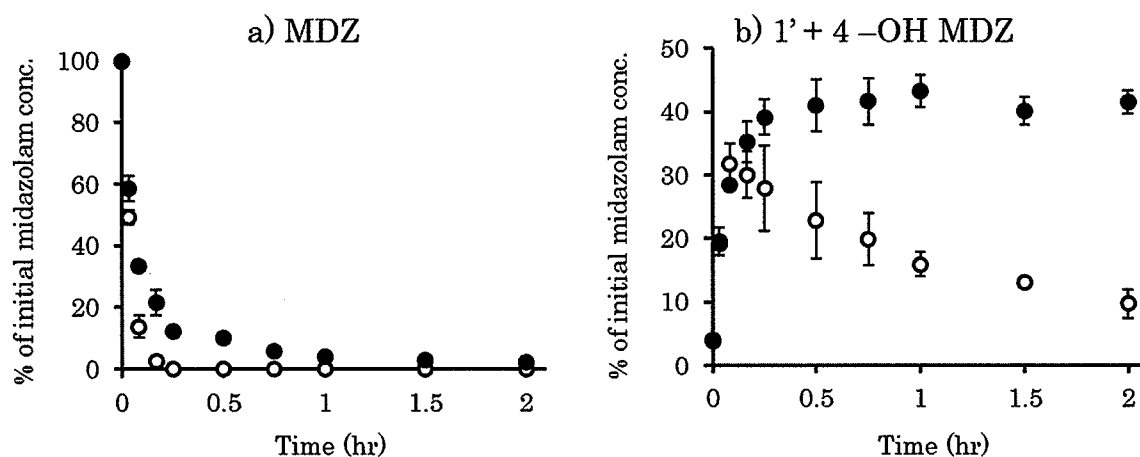


Fig. 25. Concentration-time profile of a) MDZ and b) 1' + 4 -OH MDZ in the control (○) and ABT-preincubation (●) suspension of microsomes prepared from the liver of human.

Each point in the figure represents the mean \pm SD (n = 3).

Table 26. Effect of ABT-pretreatment on the *in vitro* rate content for the metabolism of MDZ and its primary metabolites in the suspension of microsomes prepared from the liver of human

	Human		ratio
	control	ABT-pretreated	
k_1 (min^{-1})	0.37	0.20	0.55
k_2 (min^{-1})	0.013	0.00020	0.18

Rate constants, k_1 and k_2 , represent the first-order rate constant for the metabolism of MDZ to the primary metabolites (k_1) and the primary metabolites to the final one (k_2). To calculate rate constants, sum of the concentrations of two primary metabolites (1'-OH MDZ and 4-OH MDZ) were used.

第4節 考察

本章では、本研究で著者が新たに見出した「肝臓での CYP 酵素が阻害された場合、薬物の中間代謝物の血中曝露が増加する」という現象が、実際の臨床現場で起こる可能性について詳細な検討を行った。その内容としては、(1) 実際の臨床現場で生じる薬物間相互作用を想定し、MDZ と同じく CYP3A の基質薬物である KTZ を CYP 阻害剤として用いた検討、(2) 肝臓の CYP 酵素活性が低下している肝疾患患者を想定し、ラット急性肝疾患モデルを用いた検討、および (3) ヒトの肝代謝と質的および量的に近い代謝活性を有することが報告されているカニクイザルを用いた検討、の3項目の試験を実施した。その結果、いずれの検討においても、本現象が臨床的に起こる可能性を強く示す結果が得られた。

まず、臨床的に用いられている薬物の中で、強い CYP 酵素阻害活性を有することが知られている KTZ を用いて、薬物間相互作用に関する *in vivo* 試験を行い、ABT を用いた第1章と同様な結果を得た。KTZ 以外にも、臨床現場には CYP 酵素に対して阻害作用を有する医薬品が数多く存在する¹⁴⁶⁻¹⁴⁹⁾。例えば、キニジンは CYP3A4 で代謝されるが、CYP2D6 の阻害薬として作用する。また、抗不整脈薬アミオダロンは CYP3A4 で代謝され、自身も CYP3A4 阻害作用を示す一方、その脱エチル化代謝物は CYP2C9 や CYP2D6 を阻害することが報告されている¹¹⁵⁾。また、シメチジンは CYP のヘム鉄に配位することで非特異的に CYP 酵素を阻害し、エリスロマイシン、クラリスロマイシン等のマクロライド系抗生物質は、CYP 酵素に対して MBI による阻害を示す。一般

に、これら阻害剤を併用した場合、基質となる親薬物の代謝速度が低下し、それに伴って代謝物の血中濃度は通常よりも低くなると考えられることから、薬物間相互作用の検討において代謝物の体内動態が考慮されることは少ない。しかし、臨床的に用いられている薬物同士の併用によって、中間代謝物の血中曝露が有意に上昇するのであれば、薬効や毒性を有する代謝物については、血中濃度モニタリングを実施するなど、慎重な対応が必要と考えられる。

次に、肝疾患時に認められる肝機能の低下によっても、CYP 酵素の阻害時と同様な現象が生じるのかに関して、急性肝障害モデルラットを用いた検討を行った。急性肝障害モデルラットは CCl₄ の腹腔内投与によって作成し、これに MDZ を静脈内投与した結果、MDZ の中間代謝物 (1'-OH MDZ、4-OH MDZ) の血中 AUC は、ABT 前処理ラットの場合と同様に有意に上昇した。CCl₄ の前投与による肝障害の誘導によって、ラットの肝臓での CYP 発現量が低下することが報告されている¹³⁰⁾。Kose らはラット肝ミクロソーム内の CYP3A2 の発現量を測定した結果、0.21 nmol/mg of microsomal protein から 0.17 nmol/mg of microsomal protein に低下していることを明らかにしている¹³¹⁾。本検討で用いた CCl₄ 濃度 (0.375 mL/kg) は Kose らが用いた濃度 (0.5 mL/kg) よりも低いものの、本検討においても Kose らの検討と同様に CYP3A2 レベルが低下していると考えられる。したがって、肝障害モデルラットでは、MDZ およびその中間代謝物の肝固有クリアランス自体が低下していることが考えられる。本検討では MDZ 両中間代謝物の血中移行量は算出していないものの、肝障害モデルラットにおいて MDZ の中間代謝物の血中 AUC が上昇した理由として、中間代謝物の肝臓から全身循環への移行量の増加が関与しているものと推察される。

一方、肝疾患は薬物の体内動態に複雑な影響を与えることが知られており^{122,125,150-153)}、CCl₄ の前投与によっても、肝代謝酵素活性のみでなく、肝血流量、胆汁排泄機能および血漿タンパク結合率などが変化している可能性が考えられる。それら個々の要因が薬物代謝物の体内動態にどのような影響を及ぼすのかに関しては、現段階では明らかではない。今後、肝障害モデルラットにおける各パラメータと代謝物の血中曝露の関係について検証を行うとともに、MDZ とは異なる薬物動態的特徴を持つ薬物を用いた検討も行っていきたいと考えている。

肝疾患を発症する要因の一つに、薬害性肝障害があり、公衆衛生上大きな問題となっている¹⁵⁴⁻¹⁶¹⁾。現在、900 種類以上の医薬品について、肝障害誘発の可能性があると添付文書に記載されており¹⁶²⁾、ジクロフェナク、エリスロマイシン、フルクロキサシリ

ン、ハロタンなどによる死亡例または肝移植例が報告されている¹⁶³⁾。これら肝疾患患者における薬物の体内動態を正確に予測することは困難で、肝機能低下の原因、重症度、あるいは肝機能検査結果との相関性は確立されていない。今後、肝機能低下時の薬物投与量や投与間隔の指標となるパラメータ等に関する研究が進むものと期待されるが、その際、本研究で明らかにしたように、薬物自体のみでなく、その代謝物の血中曝露の変化を考慮した投与計画の構築が必要と考えられる。

新規医薬品開発において、臨床試験段階で重篤な副作用が認められた場合、開発の遅れや中止につながり、それまでの前臨床試験に要した費用が無駄になることから、製薬企業にとって大きな損失となる。したがって、前臨床段階で新規候補化合物のヒトでの体内動態をできるだけ精度よく予測し、ヒトにおける治療効果と安全性を確保することがその後の医薬品開発の成功のカギとなる。ヒトにおける薬物の体内動態を予測するためにどの動物種が最も適しているかに関しては、未だ統一した見解は得られておらず、対象となる薬物の物理化学的あるいは動態学的な特性を見ながら、*case by case* に対応しているのが現状である。カニクイザルは医薬品開発に最も多く利用されている動物の一種であり、代謝酵素の遺伝的ホモロジーや肝臓での発現量がヒトに近く、肝代謝の評価に適することが知られている。カニクイザルの肝臓においても、CYP3A4 は CYP 分子種の中で最も発現量の高い酵素であり、ヒトの CYP3A4 と同様な基質認識性を示す^{141,143)}。今回の検討で用いた MDZ も、カニクイザルにおいてヒトと同様に CYP3A4 によって逐次的に代謝されることが報告されている^{142,145)}。本章での検討において、カニクイザルおよびヒトの肝ミクロソームいずれにおいても、ABT が MDZ の中間代謝物の代謝を顕著に阻害し、代謝速度定数の低下の程度はほぼ同程度であった（カニクイザル: 17%、ヒト: 18%）。したがって、CYP 阻害時には、ヒトにおいても MDZ の中間代謝物の血中 AUC がカニクイザルと同程度に上昇するものと考えられた。

以上、本章で得られた結果は、臨床的にも中間代謝物の血中曝露が増加する可能性を示すものであり、代謝阻害に起因した薬物間相互作用が疑われる患者、あるいは肝疾患等によって肝代謝機能が低下している患者に対して薬剤を投与する場合には、薬物自体の動態のみでなく、その代謝物の動態変化にも十分な注意を払う必要があると考えられる。今後は、実際に臨床試験を実施することによって、本章で推定した結果を検証する必要がある。その場合、ABT の臨床使用は認められていないため、ABT を用いた代謝阻害実験をヒトで実施することは不可能である。ヒトに投与可能な代謝阻害剤として、

本章で ABT と同じ効果を示すことを明らかにした KTZ を用いることで、安全性を担保した上で臨床試験の実施が可能になるものと期待される。

結論

以上、著者は3章にわたり、薬物間相互作用や肝疾患によって肝代謝機能が低下した場合の薬物代謝物の血中曝露の変動について、ラット、サルを用いた *in vivo* での動態試験、肝ミクロソームを用いた *in vitro* での代謝試験、及び薬物速度論的手法を用いた要因解析を実施した結果、以下のような結論を得た。

第1章 CYP 酵素の阻害による薬物代謝物の血中曝露の変動

一般に、肝臓での代謝が阻害された場合、薬物の血中からの消失が遅延し、それに伴ってその代謝物の血中曝露は小さくなると考えられる。そこで、モデル薬物として CYP3A によって速やかに代謝される MDZ を用い、CYP 酵素の強力な阻害剤である ABT で前処理したラットに静脈内投与した後の MDZ 及びその中間代謝物の血中濃度推移を観察した。その結果、ABT 前処理ラットにおいて、親薬物である MDZ の全身血中からの消失が遅延し、CYP 酵素が阻害されたことが確認された。一方この時、MDZ の中間代謝物である 1'-OH MDZ および 4-OH MDZ の血中 AUC は、ABT 前処理によって 4.3~5.1 倍にまで上昇し、親薬物の代謝が阻害されたにもかかわらず代謝物の血中曝露が増加すると言う極めて興味深い現象が観察された。

そこで、MDZ の中間代謝物の静注試験を実施したところ、ABT 前処理ラットでは両代謝物とも全身クリアランス (CL_{sys}) が 1/2 程度に低下しており、ABT によって中間代謝物から最終代謝物への代謝も阻害されることが示唆された。また、MDZ 静脈内投与後に全身循環血中に移行した中間代謝物の量 (血中移行量) を算出したところ、CYP 阻害によって約 2 倍上昇していることが明らかとなった。血中移行量増加の理由として腸肝循環の関与が考えられたが、胆管カニューレラットを用いた検討において、腸肝循環の関与は認められなかった。

次に、モデル薬物として CYP の基質である DAP、TAM を用いて同様な検討を行った結果、両薬物とも、ABT 前処理によってその中間代謝物の血中 AUC が有意に上昇した。そこで、3 種のモデル薬物 (MDZ、DAP、TAM) 静脈内投与後の、それぞれの中間代謝物の CL_{sys} 及び血中移行量に及ぼす ABT 前処理の影響を比較した結果、CYP 阻害によって中間代謝物の AUC が上昇した理由として、(1) 中間代謝物から最終代謝物への代謝が阻害されその CL_{sys} が低下した、(2) 肝臓中で生成した中間代謝物の血中への移行量が増加した、という二つの要因が関与していること、及びそれぞれの要因の関与

の仕方は薬物によって異なることが示唆された。

親薬物と中間代謝物の、肝臓及び全身循環血中での動態を表す PB-PK モデルを用いて速度論的な解析を行った結果、親薬物静脈内投与後の中間代謝物の血中 AUC は、その肝代謝固有クリアランスと反比例の関係にあることが明らかとなった。そこで、ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験を行い、各薬物の親薬物から中間代謝物、および中間代謝物から最終代謝物への代謝速度に及ぼす ABT の影響を調べた。その結果、いずれの薬物も、両代謝過程が阻害され、それぞれの代謝速度定数 (k_1 、 k_2) が有意に低下することが示された。*In vitro* で求めた代謝速度定数より、各々の薬物の中間代謝物の CL_{sys} および血中移行率を算出した結果、① MDZ の中間代謝物の AUC の上昇には中間代謝物の CL_{sys} の低下及びその血中移行率の上昇の二つの要因が関与する、② DAP では主として中間代謝物の CL_{sys} の低下が原因である、③ TAM では主として中間代謝物の血中移行率の上昇が原因である、と推察された。

本章で用いた 3 種のモデル薬物の中間代謝物は、いずれも薬理活性を有した活性代謝物である。したがって、ここに示した結果は、薬物間相互作用等によって肝臓での代謝が阻害された場合、薬物の中間代謝物の血中曝露増加による予期せぬ薬効の増強、さらには副作用の発現の可能性を示すものと考えられた。

第 2 章 親薬物経口投与後の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 酵素阻害の影響

臨床的に用いられている多くの薬物は経口的に投与されることから、実際の臨床における代謝物の血中曝露の変動を明らかにするためには、親薬物を経口投与した後の血中濃度を調べる必要がある。そこで、MDZ をラットに経口投与した後の中間代謝物の血中濃度推移に及ぼす CYP 阻害の影響を観察したところ、MDZ 及び両中間代謝物の血中 AUC はそれぞれ 35.1、18.6、12.3 倍と顕著に上昇することが明らかとなった。MDZ 経口投与後の中間代謝物の血中曝露が、静脈内投与の場合よりも顕著に上昇した理由を明らかにするため、静脈内投与試験との比較による経口吸収率 (F) の算出、及び門脈カニューレラットを用いた門脈中での中間代謝物の濃度推移の測定を実施した。その結果、コントロールラットにおいては、投与された MDZ のおよそ 3/4 が全身循環に移行する前に最終代謝物に代謝され、中間代謝物として血中に移行する量は投与量の 1/4 以下であったのに対し、ABT 前処理ラットでは初回通過代謝がほぼ完全に阻害され、投与量とほぼ同量の MDZ が、代謝されることなく全身循環血中に移行することが示された。すなわち、CYP 阻害によって MDZ の全身循環血中への吸収率がほぼ 100% となっ

た結果、肝臓においてより多くの中間代謝物が生成し、その血中曝露が増加したものと推察された。

臨床的に用いられている医薬品の多くが経口剤であることから、本結果は、薬物間相互作用によって肝代謝が阻害された場合には、親薬物のみでなくその代謝物の血中曝露の上昇にも十分な注意を払う必要があることを示すものと考えられた。

第3章 臨床における中間代謝物の血中曝露増加の可能性

臨床的に繁用されている KTZ を CYP 阻害剤として用い、第1章と同様なラット静脈内投与試験を行った結果、ABT で前処理した場合と同様、MDZ の中間代謝物の血中 AUC の上昇が確認された。したがって、臨床現場で実際に生じる薬物間相互作用によっても、薬物の中間代謝物の血中曝露の増加が引き起こされる可能性が示された。

薬物を投与される患者には、肝疾患などが原因で肝臓での薬物代謝機能が低下した患者も多く存在する。そこで、CCl₄ を腹腔内投与することによって急性肝障害モデルラットを作成し、MDZ の中間代謝物の血中曝露の変動について検討を行った。急性肝障害モデルラットに MDZ を静脈内投与した結果、両中間代謝物の血中 AUC の上昇が確認され、その上昇率は ABT 前処理ラットを上回る値であった。CCl₄ 処理によって肝臓の CYP 酵素の発現量が低下することが報告されていることから、急性肝障害によって MDZ の中間代謝物の肝代謝固有クリアランスが低下し、その血中移行量が増加したものと推察された。本結果より、薬物間相互作用のみでなく、肝疾患等によって肝代謝能が低下した場合には、親薬物とともにその代謝物の血中曝露の変動にも注意する必要があると考えられた。

最後に、これまでラットを用いて明らかにしてきた現象が、ヒトにおいても同様に認められる可能性について検証を行うことを目的として、肝臓での代謝活性及び代謝酵素の遺伝的ホモロジーがヒトに近いカニクイザルを用いた検討を行った。その結果、ラットの場合と同様、ABT 前処理による CYP 阻害によって、MDZ の中間代謝物の血中 AUC の有意な上昇が確認された。さらに、カニクイザルの肝ミクロソームを用いて *in vitro* 代謝試験を行ったところ、ABT 処理によって中間代謝物の代謝速度定数の低下が観察されたことから、カニクイザルにおいて MDZ の中間代謝物の血中 AUC が上昇した理由として、中間代謝物の CL_{sys} の低下及び血中移行量の増加が考えられた。また、ヒト肝ミクロソームを用いて検討を行った結果、カニクイザルのミクロソームと同様の結果が得られたことから、CYP 酵素が阻害された場合には、ヒトにおいても中間代謝

物の血中曝露が増加する可能性が示された。

以上、本研究では、薬物間相互作用等によって肝臓での薬物代謝能が低下した場合、薬物の中間代謝物の血中曝露が増加するという新たな現象を見出し、*in vitro* から *in vivo* に至る詳細な検討によってそのメカニズムを明らかにするとともに、実際の臨床においても同様な現象が生じる可能性を示した。薬物の代謝物の中には、親薬物を凌ぐ強い薬効、あるいは親薬物には認められない毒性を有するものも多く存在することから、本研究で得られた結果は、医薬品の安全使用を担保する上で極めて重要な知見と考えられる。今後、本研究の成果が、新規医薬品の開発における代謝物の薬物動態学的評価、さらに臨床現場における代謝物による有害事象の発現の防止に役立てられることを期待する。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 薬剤学研究室 山下伸二 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益な御指導と御助言を戴きました摂南大学薬学部 薬剤学研究室 片岡誠 講師、東野晴輝 助教、南景子 助教に感謝の意を表します。さらに、PB-PK モデル解析に御協力戴きましたサノフィ株式会社 設楽悦久 博士に深く感謝いたします。また、門脈カニューレラットの実験に御協力戴きました科研製薬株式会社 今野芳浩 博士、松田良樹 博士に深く感謝いたします。また、実験の一部に御協力戴きました上田晃大 学士、中西佐都美 学士、畑山翔 学士、小野泰明 学士、本田昌平 学士、江岡芽衣 氏、藤原奈津紀 氏をはじめ、当研究室の卒業生ならびに在校生に深く感謝いたします。

最後に、いつも良き理解者として励まし支えてくれた父、母、妹、祖母をはじめ、親族、友人知人一同に心から感謝いたします。

2017年3月

長谷川 翼

実験の部

第 1 章 CYP 酵素の阻害による薬物代謝物の血中曝露の変動

[1] 実験材料

ABTは東京化学工業より購入した。MDZとDAPは和光純薬株式会社より購入した。1'-OH MDZと4-OH MDZはBD Biosciencesより購入した。desmethyl DAP、TAM、4-OH TAM、β-グルクロニダーゼはSigma-Aldrich社より購入した。胆管カニュレーションに使用したポリエチレンチューブ(PE10、内径0.28mm、外径0.61mm)は夏目製作所より購入した。K₂HPO₄とMgCl₂はナカライテスクより購入した。NADPHはSigma-Aldrich社より購入した。KH₂PO₄は和光純薬株式会社より購入した。Wistar雄性ラットは清水実験材料より購入した。Wistarラット肝ミクロソームは積水メディカル株式会社より購入した。

[2] ラットを用いた *in vivo* 静脈内投与試験

(1) 各試薬の調整

・ ABT

ABTは25 mg/mLになるように生理食塩水に加え、超音波処理により溶解させた。

・ MDZ、1'-OH MDZ、4-OH MDZ

MDZ及び1'-OH MDZ、4-OH MDZは0.2 mg/mLとなるように生理食塩水に添加した後、1 NのHClを数滴滴下し、完全溶解させた。

・ DAP、desmethyl DAP

DAP及びdesmethyl DAPはそれぞれ50及び10 mg/mLとなるようにDMSOに完全溶解させた。その後、ラット血漿でそれぞれ100倍希釈し、DAPは0.5 mg/mL、desmethyl DAPは0.1 mg/mLとなるように調整した。

・ TAM、4-OH TAM

TAM及び4-OH TAMはそれぞれ50及び10 mg/mLとなるようにDMSOに完全溶解させた。その後、ラット血漿でそれぞれ100倍希釈し、TAMは0.5 mg/mL、4-OH TAMは0.1 mg/mLとなるように調整した。

(2) 実験手順

実験開始のおよそ 18 時間前にラットに ABT (4 mL/kg、したがって 100 mg/kg) を経口投与した。その後、MDZ、1'-OH MDZ 及び 4-OH MDZ (1 mL/kg、したがって 0.2 mg/kg)、DAP 及び TAM (1 mL/kg、したがって 0.5 mg/kg)、desmethyl DAP 及び 4-OH TAM (1 mL/kg、したがって 0.1 mg/kg) を頸静脈より急速投与した。そして、もう一方の頸静脈から 1'-OH MDZ 及び 4-OH MDZ は 2、5、10、15、30、60、120、240 分、MDZ、4-OH TAM は 2、5、10、15、30、60、120、240、360、480 分、desmethyl DAP は 2、5、10、15、30、60、120、240、360、480 分及び 12 時間、DAP、TAM は 2、5、10、15、30、60、120、240、360、480 分及び 12、24、36、48 時間まで経時的に 0.5 mL 採血を行い、得られたサンプルは直ちに 4 °C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を血漿サンプルとして -80 °C で保存した。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプル 100 µL をアセトニトリル 900 µL に加え、タンパクを除去した。十分に攪拌した後、20 °C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離を行い、上清 800 µL を減圧下で蒸発乾固させた。蒸発乾固したサンプルを 0.1 % ギ酸 / アセトニトリル (50/50, v/v %) 混合溶液 100 µL で再溶解させた。攪拌させた後、20 °C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離したものを LC-MS/MS サンプルとした。

[3] 胆管カニューレラットを用いた *in vivo* 静脈内投与試験

(1) 各試薬の調整

ABT、MDZ の調整方法については通常のラットを用いた静脈内投与試験と同様の方法を用いた。

(2) 胆管カニューレラット作成方法

イソフルラン吸入麻酔下開腹し、ピンセットを用いて十二指腸の胆管付近の脂肪を剥がし、胆管を露出させた。そして、注射針 (27G) で胆管に穴をあけ、その穴から上流に向けてポリエチレンチューブを挿入し、糸で胆管及びポリエチレンチューブをきつく縛る (このとき、胆汁がチューブ内に出てきていることを確認する)。また、胆管の下流側も糸できつく縛る。

(3) 実験手順

実験開始のおよそ 18 時間前に ABT を前投与したラットにイソフルラン麻酔下で胆管カニューレ処理を施し、頸静脈より MDZ (1 mL/kg、従って 0.2 mg/kg) を投与した。そして、2、5、10、15、30、60、120、240、360、480 分まで経時的に採血を行った。得られたサンプルの保存方法は通常のラットを用いた静脈内投与試験と同様の方法を用いた。また、胆汁は実験開始から終了まで採取し続けた。

(4) 血漿サンプル処理

血漿サンプルの処理方法については通常のラットを用いた静脈内投与試験と同様の方法を用いた。

(5) 胆汁サンプル処理方法

β -グルクロニダーゼは 0.2% NaCl 水溶液で 1 : 3 の割合で希釈して使用した。ラット胆汁 0.025 mL、 β -グルクロニダーゼ 0.02 mL、100 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.125 mL、水 0.08 mL を混合した。37°C で 2 時間加温した後、その反応液 0.05 mL を 0.1% ギ酸-アセトニトリル 0.1 mL と混合して LC-MS/MS サンプルとした。

[4] ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

(1) 各種試薬の調整

・ 3.3 mM MgCl₂ を含むリン酸緩衝液

3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM KH₂PO₄ 溶液と 3.3 mM MgCl₂ を含む 100mM K₂HPO₄ 溶液を混合して 3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM リン酸緩衝液を作成し、pH を 7.4 に調整した。

・ MDZ、DAP、TAM

MDZ、DAP、TAM は 1 mM となるように、ABT は 1 または 5 mM となるようにメタノールに溶解した。

・ NADPH

NADPH は 20 mM となるように 3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解し、調整した。

(2) 代謝反応液の調整

コントロール群及び ABT 添加群の代謝反応液の組成を次に示す。

・コントロール群

3.3 mM MgCl ₂ を含む 100 mM potassium phosphate buffer	457 μL
MDZ (最終濃度 1 μM)	0.5 μL
肝ミクロソーム (20 mg/mL、最終濃度 0.4 mg/mL)	10 μL
20 mM NADPH (最終濃度 1.3 mM)	32.5 μL
<hr/>	
Total	500 μL

・ABT 添加群

3.3 mM MgCl ₂ を含む 100 mM potassium phosphate buffer	456.5 μL
MDZ (最終濃度 1 μM)	0.5 μL
ABT (最終濃度 1 または 5 μM)	0.5 μL
肝ミクロソーム (20 mg/mL、最終濃度 0.4 mg/mL)	10 μL
20 mM NADPH (最終濃度 1.3 mM)	32.5 μL
<hr/>	
Total	500 μL

(3) 実験手順

3.3 mM MgCl₂を含む 100 mM リン酸緩衝液に親薬物、肝ミクロソーム、ABT 添加群においては ABT をそれぞれ添加し、5 分間プレインキュベーションを行った。そして、20 mM の NADPH を添加し、反応を開始させた。MDZ は 0、2、5、10、20、30、45、60、90、120 分、DAP は 0、2、5、10、20、30、45、60、90、120、180、240、360 分、TAM は 0、2、5、10、20、30、45、60、90、120、180、240 分まで経時的に 30 μL サンプリングを行い、氷上でアセトニトリル 270 μL と混合させ、反応を停止させた。そして、直ちに 4 °C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清 200 μL を LC-MS/MS サンプルとした。

[5] 親薬物及び中間代謝物の定量

溶液サンプル中の親薬物及び中間代謝物量は、LC/MS/MS (ACQUITY® UPLC, TQD,

Waters) により定量した。親薬物及び中間代謝物の MS/MS condition は、以下のとおりである。

MDZ

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1×150 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Acetonitrile containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 µL

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 327.08

Daughter m/z: 292.12

1'-OH MDZ

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1×150 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Acetonitrile containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 μ L

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 342.32

Daughter m/z: 203.22

4-OH MDZ

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 150 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Acetonitrile containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 μ L

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 342.31

Daughter m/z: 325.43

DAP

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1×50 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Methanol containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 µL

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 286.17

Daughter m/z: 154.0

Desmethyl DAP

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1×50 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Methanol containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 μ L

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 272.1

Daughter m/z: 140.0

TAM

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 50 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Acetonitrile containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 μ L

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 372.3

Daughter m/z: 71.9

4-OH TAM

LC condition

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1×50 mm column

Mobile Phase (A): Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): Acetonitrile containing 0.1 % formic acid

Gradient program: 0.0 min A = 98 %, B = 2 %, 2.0 min A = 5 %, B = 95 %, 2.5 min A = 98 %, B = 2 %, 3.5 min End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject volume: 5 μ L

Column temperature: 40 °C

MS/MS condition

Ionization: Electrospray +

Source temperature, 150 °C

Desolvation temperature, 400 °C

Cone voltage: 30 kV

Collision energy, 24 eV

Parent m/z: 388.3

Daughter m/z: 71.9

[6] 薬物動態解析

MDZ 及び中間代謝物の静脈内または経口投与後の血漿中濃度推移からの AUC (0- ∞) (ng/mL · hr) 及び全身クリアランス (CL_{sys}: mL/min/kg) の算出は moment.xls を用いた。代謝速度定数 (k_{1 or 2}) の算出には MULTI を用いた。moment.xls 及び MULTI は、京都大学大学院薬学研究科 病態情報薬学研究室からダウンロードしたものである。詳細はホームページ参照。 <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//byoyaku/>

第 2 章 親薬物経口投与後の中間代謝物の血中曝露に及ぼす CYP 酵

素阻害の影響

[1] 試験材料

門脈カニューレラットは日本チャールズリバー（株）より購入した。ABT、MDZ に関しては 1 章を参照。ラットに関しては 1 章を参照。

[2] ラットを用いた *in vivo* 経口投与試験

(1) 薬液調整

・ ABT

ABT については静脈内投与試験と同様の方法を用いた。

・ MDZ

MDZ は 0.5 mg/mL となるように生理食塩水に添加した後、1 N の HCl を数滴滴下し、完全溶解させた。

(2) 実験手順

実験開始のおよそ 18 時間前にラットに ABT を経口投与した。その後、MDZ (4 mL/kg、従って 2 mg/kg) を経口投与した。そして、頸静脈から 5、15、30、60、120、240、360、480 分、12、24 時間まで経時的に 0.5 mL 採血を行った。サンプルの保存方法は静脈内投与試験と同様の方法を用いた。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプルの処理方法については 1 章と同様の方法を用いた。

[3] 門脈カニューレラットを用いた *in vivo* 経口投与試験

(1) 各試薬の調整

ABT および MDZ の調整は通常のラットを用いた MDZ 経口投与試験と同様の方法

を用いた。

(2) 実験手順

実験開始のおよそ 18 時間前にラットに ABT を経口投与した。その後、MDZ を経口投与した。そして、頸静脈から 5、15、30、60、120、240、360、480 分まで尾静脈及び門脈より経時的に 100 μ L 採血を行った。サンプルの保存方法は 1 章と同様の方法を用いた。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプルの処理方法は 1 章と同様の方法を用いた。

なお、本実験は科研製薬株式会社新薬創生センター（京都）にて、今野芳浩博士、松田良樹博士のご協力のもと実施させていただいた。

[4] 薬物動態解析

薬物動態解析に関しては第 1 章を参照。

[5] 親薬物及び中間代謝物の定量

定量に関しては第 1 章を参照。

第 3 章 臨床における中間代謝物の血中曝露増加の可能性

[1] 試験材料

KTZ は東京化成工業株式会社より購入した。四塩化炭素は和光純薬より購入した。カニクイザル及びヒト肝ミクロソームは積水メディカル株式会社より購入した。ドルミカムはアステラス製薬より購入した。ABT、MDZ に関しては第 1 章を参照。KH₂PO₄、K₂HPO₄、MgCl₂ に関しては第 2 章を参照。

[2] CYP 阻害剤として KTZ を用いた *in vivo* 静脈内投与試験

(1) 各試薬の調整

・ KTZ

KTZ を 500 mg/mL または 1250 mg/mL となるように DMSO に溶解し、その後、生理食塩水で 100 倍 (5 mg/mL または 12.5 mg/mL) に希釈した。

・ MDZ

MDZ の調整方法に関しては第 1 章を参照。

(2) 実験手順

実験開始のおよそ 1 時間前にラットに KTZ (4 mL/kg、したがって 20 mg/kg または 50 mg/kg) を経口投与した。MDZ (1 mL/kg、従って 0.2 mg/kg) を静脈内投与した。そして、頸静脈から 2、5、10、15、30、60、120、240、360、480 分まで経時的に 0.5 mL 採血を行った。サンプルの保存方法については第 1 章と同様の方法を用いた。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプルの処理方法については 1 章と同様の方法を用いた。

[3] 急性肝障害ラットを用いた *in vivo* 静脈内投与試験

(1) 各試薬の調整

・ 四塩化炭素

四塩化炭素をオリーブオイルで希釈し、25%四塩化炭素とした。そして、実験開始のおよそ24時間前にラットに腹腔内投与した。

・ MDZ

MDZの調整方法に関しては第1章を参照。

(2) 実験手順

実験開始のおよそ24時間前にラットに25%四塩化炭素(600 mg/kg、四塩化炭素量として0.375 mL)を腹腔内投与し、その後、MDZを静脈内投与した。そして、頸静脈から2、5、10、15、30、60、120、240、480分まで経時的に0.5 mL採血を行った。サンプルの保存方法は第1章と同様の方法を用いた。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプルの処理方法については1章と同様の方法を用いた。

[4] カニクイザルを用いた *in vivo* 静脈内投与試験

(1) 各試薬の調整

・ ABT

ABTについては第1章と同様の方法を用いた。

・ MDZ

既製品であるドルミカムを用いた。0.1 mg/mLとなるように生理食塩水に添加した。

(2) 実験手順

実験開始のおよそ2時間前にラットにABT(4 mL/kg、したがって100 mg/kg)を経口投与した。その後、MDZ(1 mL/kg、したがって0.1 mg/kg)を静脈内投与した。そして、頸静脈から5、10、15、30、60、120、240、480分及び24時間まで経時的に0.5 mL採血を行った。サンプルの保存方法については第1章と同様の方法を用いた。

なお、本実験は(株)イブバイオサイエンスのご協力のもと実施させていただいた。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプルの処理方法については 1 章と同様の方法を用いた。

[5] カニクイザル及びヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

(1) 各種試薬の調整

第 2 章と同様の方法を用いた。

(2) 代謝反応液の調整

第 2 章と同様の方法を用いた。

(3) 実験手順

第 2 章と同様の方法を用いた。

[6] 薬物動態解析

薬物動態解析に関しては第 1 章を参照。

[7] 親薬物及び中間代謝物の定量

定量に関しては第 1 章を参照。

引用文献

- 1) Riss PJ and Rosch F. A convenient chemo-enzymatic and ¹⁸F-labelling of both enantiomers of trans-1-toluenesulfonyloxymethyl-2-fluoromethyl-cyclopropane. *Org Biomol Chem.* 2008;6:4567-4574.
- 2) Gale EA. Lessons from the glitazones: a story of drug development. *Lancet.* 2001;357:1870-1875.
- 3) Graham DJ, Green L, Senior JR, Nourijah P. Troglitazone-induced liver failure: a case study. *Am J Med.* 2003;114:299-306.
- 4) Masubuchi Y. Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21:347-356.
- 5) Watkins PB and Whitcomb RW. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl Med.* 1998;338:916-917.
- 6) Macherey AC and Dansette PM. Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspect. *The practice of Medicinal Chemistry.* 2008:674-679.
- 7) Kassahum K, Baillie T. A. Cytochrome P-450-mediated dehydrogenation of 2-n-propyl-2(E)-pentenoic acid, a pharmacologically active metabolite of valproic acid in rat liver microsomal preparations. *Drug Metab Dispos.* 1993;21:242-248.
- 8) Ho PC, Abbott FS, Zanger UM, Chang TK. Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes, *Pharmacogenomics J.* 2003;3:355-42.
- 9) Bauman JN, Frederick KS, Sawant A, Walsky RL, Cox LM, Obach RS, Kalqutkar AS. Comparison of the bioactivation potential of the antidepressant and hepatotoxin nefazodone with aripiprazole, a structural analog and marketed drug. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:1016-29.
- 10) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Safety testing of drug metabolites. U.S. Food and Drug Administration. Silver Spring, MD. 2008.
- 11) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev.* 1998;50:387-412.
- 12) Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis.

N Engl J Med. 2002;346:539-40.

- 13) Shitara Y, Hirano M, Sato H, Sugiyama Y. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311:228-36.
- 14) Bertilsson L, Tybring G, Widen J, Chang M, Tomson T. Carbamazepine treatment induces the CYP3A4 catalyzed sulphoxidation of omeprazole, but has no or less effect on hydroxylation via CYP2C19. *Br J Clin Pharmacol.* 1997;44:186-189.
- 15) Hansen JM, Siersboek-Nielsen K, Skovsted L. Carbamazepine-induced acceleration of diphenylhydantoin and warfarin metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1971;12:539-543.
- 16) Hossain M, Salla W, Gasparini M, D'Souza J, Drug-drug interaction profile of oxcarbazepine in children and adults. *Neurology.* 1999;52:A525.
- 17) Lakehal F, Wurden CJ, Kalhorn TF, Levy RH. Carbamazepine and oxcarbazepine decrease phenytoin metabolism through inhibition of CYP2C19. *Epilepsy Res.* 2002;52:79-83.
- 18) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendation. U.S. Food and Drug Administration. Silver Spring, MD. 2012.
- 19) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the investigation drug-drug interactions. European Medicines Agency, London, 2012.
- 20) Lutz JD, Fujioka Y, Isoherranen N. Rationalization and prediction of in vivo metabolite exposures: the role of metabolite kinetics, clearance predictions and in vitro parameters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6:1095-109.
- 21) Lutz JD and Isoherranen N. Prediction of relative in vivo metabolite exposure from in vitro data using two model drugs: dextromethorphan and omeprazole. *Drug Metab Dispos.* 2012;40:159-68.

- 22) Sager JE, Yu J, Raqueneau-Majlessi I, Isoherranen N. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: A Systematic Review of Published Models, Applications, and Model Verification. *Drug Metab Dispos.* 2015;43:1823-37.
- 23) Isoherranen N, Hachad H, Yeung CK, Levy RH. Qualitative analysis of the role of metabolites in inhibitory drug-drug interactions: literature evaluation based on the metabolism and transport drug interaction database. *Chem Res Toxicol.* 2009;22:294-8.
- 24) Yeung CK, Fujioka Y, Hachad H, Levy RH, Isoherranen N. Are circulating metabolites important in drug-drug interactions?: Quantitative analysis of risk prediction and inhibitory potency. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:105-13.
- 25) Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4. regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:1-17.
- 26) Ahonen J, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Effect of itraconazole and terbinafine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1995;40:270-272.
- 27) Ahonen J, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Effect of route of administration of fluconazole on the interaction between fluconazole and midazolam. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997;51:415-419.
- 28) Ahonen J, Olkkola KT, Takala A, Neuvonen PJ. Interaction between fluconazole and midazolam in intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43:509-514.
- 29) Albengres E, Le Louet H, Tillement JP. Systemic antifungal agents. Drug interactions of clinical significance. *Drug Saf.* 1998;18:83-97.
- 30) Backman JT, Kivistö KT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. The area under the plasma concentration-time curve for oral midazolam is 400-fold larger during treatment with itraconazole than with rifampicin. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54:53-58.
- 31) Debruyne D, Ryckelynck JP. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. *Clin Pharmacokinet.* 1993;24:10-27.

- 32) Grant SM, Clissold SP. Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs*. 1989;37:310-44.
- 33) Jeu L, Piacenti FJ, Lyakahovetskiy AG, Fung HB. Voriconazole. *Clin Ther*. 2003;25:1321-1381.
- 34) Kaukonen KM, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Itraconazole increases plasma concentrations of quinidine. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62:510-517.
- 35) Kivistö KT, Kantola T, Neuvonen PJ. Different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fluvastatin and lovastatin. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46:49-53.
- 36) Koks CH, Crommentuyn KM, Hoetelmans RM, Burger DM, Koopmans PP, Mathôt RA, Mulder JW, Meenhorst PL, Beijnen JH. The effect of fluconazole on ritonavir and saquinavir pharmacokinetics in HIV-1-infected individuals. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;51:631-635.
- 37) Lukkari E, Juhakoski A, Aranko K, Neuvonen PJ. Itraconazole moderately increases serum concentrations of oxybutynin but does not affect those of the active metabolite. *Eur J Clin Pharmacol*. 1997;52:403-406.
- 38) Neuvonen PJ, Jalava KM. Itraconazole drastically increases plasma concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60:54-61.
- 39) Olkkola KT, Ahonen J, Neuvonen PJ. The effects of the systemic antimycotics, itraconazole and fluconazole, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam. *Anesth Analg*. 1996;82:511-516.
- 40) Olkkola KT, Backman JT, Neuvonen PJ. Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther*. 1994;55:481-485.
- 41) Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Love ER, Eve MD, Fielding A. Coadministration of voriconazole and phenytoin: pharmacokinetic interaction, safety, and toleration. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;56:37-44.

- 42) Romero AJ, Le Pogamp P, Nilsson LG, Wood N. Effect of voriconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71:226-234.
- 43) Sud K, Singh B, Krishna VS, Thennarasu K, Kohli HS, Jha V, Gupta KL, Sakhuja V. Unpredictable cyclosporin-fluconazole interaction in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:1698-1703.
- 44) Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Oral triazolam is potentially hazardous to patients receiving systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;56:601-607.
- 45) Daigle JC, Hosgood G, Foil CS, Hunter RP. Effect of CCl₄ on pharmacokinetics of orally administered cyclosporine in healthy dogs. *Am J Vet Res.* 2001;62:1046-1050.
- 46) Johnson LM, Lankford SM, Bai SA. The influence of cimetidine on the pharmacokinetics of the enantiomers of verapamil in the dog during multiple oral dosing. *J Vet Pharmacol Therap.* 1995;18:117-123.
- 47) Martinez C, Albet C, Agundez JA, Herrero E, Carrillo JA, Marquez M, Benitez J, Ortiz JA. Comparative *in vitro* and *in vivo* inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A by H₂-receptor antagonists. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65:448-455.
- 48) Newton DJ, Wang RW, Lu AY. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1995;23:154-158.
- 49) Wang JS, Wen X, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Midazolam alpha-hydroxylation by human liver microsomes *in vitro*: Inhibition by calcium channel blockers, itraconazole and ketoconazole. *Pharmacol Toxicol.* 1999;85:157-161.
- 50) Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Cytochrome P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cellular Mol Med.* 2002;6:189-198.
- 51) Kouichi Yoshinari. Drug-drug interactions resulting from inhibition of cytochrome P450s. *Folia Pharmacol. Jpn.* 2009;134:285-288.

- 52) Desgranges C, Razaka G, De Clerc G, Herdewijin P, Balzarini J, Drouillet F, Bricaud H. Effect of (E)-5-(2-bromovinyl) uracil on the catabolism and antitumor activity of 5-fluorouracil in rats and leukemic mice. *Cancer Res.* 1986;3:1094-1101.
- 53) Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16:215-237.
- 54) Katahira K, Fundamental policy and its actualization for the prevention of drug-induced suffering from a historical review of these policies in Japan (Report 1). *Bulletin of Social Medicine.* 2009;26:125-132.
- 55) Nagasaka Y, Yoshifune S, Kasai H, Nakamura H, Tatsumi H. Toxicological study of YN-72 (Brovavir) (1)-acute toxicity in rats. *Kiso to Rinsho.* 1990;24:873-876.
- 56) Nakamura H, Omori S, Kitada K, Mochida A. Prevention of drug interactions and its countermeasure. *J Toxicol Sci.* 1994;19:89-93.
- 57) Nishimoto T, Yokoyama N, Sakamoto H, Ohata K, Kohno S, Murai K, Tatsumi H. Studies on the metabolic fate of brovavir (YN-72) II :Metabolism in rats. *Jpn Pharmacol Ther.* 1990;18:507-523.
- 58) Nishiyama T, Ogura K, Okuda H, Suda K, Kato A, Watabe T. Mechanism-based inactivation of human dihydropyrimidine dehydrogenase by (E)-5-(2-bromovinyl) uracil in the presence of NADPH. *Mol Pharmacol.* 2000;57:899-905.
- 59) Ogiwara T, Miue H, Nakamura M, Ohtsuka T, Kumahara Y. Phase I clinical study of YN-72 (BV-araU, Brovavir). *Jpn Pharmacol Ther.* 1990;18:507-523.
- 60) Ogura K, Nishiyama T, Takubo H, Kato A, Okuda H, Arakawa K, Fukushima M, Nagayama S, Kawaguchi Y, Watabe T. Suicidal inactivation of human dihydropyrimidine dehydrogenase by (E)-5-(2-bromovinyl) uracil from the antiviral, sorivudine. *Cancer Lett.* 1998;122:107-133.
- (61) Okuda H, Nishiyama T, Ogura K, Nagayama S, Ikeda K, Yamaguchi S, Nakamura Y, Kawaguchi Y, Watabe T. Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrug. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;287:791-799.

- 62) Watabe T, Nishiyama T, Ogura K. A possible mechanism of lethal interactions of the new antiviral drug, sorivudine, with 5-fluorouracil prodrugs and clinical problems on anti-cancer chemotherapy. *Xenobio Metabol and Dispos.* 2000;15:265-274.
- 63) Watabe T, Ogura K, Nishiyama T. Molecular toxicological mechanism of the lethal interactions of the new antiviral drug, sorivudine, with 5-fluorouracil prodrugs and genetic deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. *TAKUGAKU ZASSHI.* 2002;122:527-535.
- 64) 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物間相互作用ガイドライン (最終案). 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ, アクセス日, 2016,12,31. <https://www.pmda.go.jp/files/000206158.pdf>
- 65) Balani SK, Zhu T, Yang TJ, Liu Z, He B, Lee FW. Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:1059-1062.
- 66) Emoto C, Murase S, Sawada Y, Jones BC, Iwasaki K. *In vitro* inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2003;15:287-295.
- 67) Meschter CL, Mico BA, Mortillo M, Feldman D, Garland WA, Riley JA, Kaufman LS. A 13-week toxicologic and pathologic evaluation of prolonged cytochromes P450 inhibition by 1-aminobenzotriazole in male rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1994;22:369-381.
- 68) El-Kattan AF, Poe J, Buchholz L, Thomas HV, Brodfuehrer J, Clark A. The use of 1-aminobenzotriazole in differentiating the role of CYP-mediated first pass metabolism and absorption in limiting drug oral bioavailability: a case study. *Drug Metab Lett.* 2008;2:120-124.
- 69) Strelevitz TJ, Foti RS, Fisher MB. *In vivo* use of the P450 inactivator 1-aminobanzotriazole in rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance. *J Pharm Sci.* 2006;95:1334-1341.

- 70) Sun Q, Harper TW, Dierks EA, Zhang L, Chang S, Rodrigues AD, Marathe P. 1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase. *Drug Metabo Dispos.* 2011;**39**:1674-1679.
- 71) Woo GK, Williams TH, Kolis SJ, Warinsky D, Sasso GJ, Schwartz MA. Biotransformation of [14C]midazolam in the rat in vitro and in vivo. *Xenobiotica.* 1981;**11**:373-384.
- 72) Mandelli M, Tognoni G, Garattini S. Clinical pharmacokinetics of diazepam. *Clin Pharmacokinet.* 1978;**3**:72-91.
- 73) Sideras K, Ingle JN, Ames MM, Loprinzi CL, Mrazek DP, Black JL, Weinshilboum RM, Hawse JR, Spelsberg TC, Goetz MP. Coprescription of tamoxifen and medications that inhibit CYP2D6. *J Clin Oncol.* 2010;**28**:2768-2776.
- 74) Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Goddard JM, Tanner MS, Tucker GT. Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *Br J Anaesth.* 2002;**89**:428-37.
- 75) Mandema JW, Tuk B, van Steveninck AL, Breimer DD, Cohen AF, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite alpha-hydroxymidazolam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;**51**:715-28.
- 76) Tuk B, van Oostenbruggen MF, Herben VM, Mandema JW, Danhof M. Characterization of the pharmacodynamic interaction between parent drug and active metabolite in vivo: midazolam and alpha-OH-midazolam. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;**289**:1067-74.
- 77) Elsass P, Hendel J, Hvidberg EF, Hansen T, Gymoese E, Rathje J. Kinetics and neuropsychologic effects of IV diazepam in the presence and absence of its active N-desmethyl metabolite in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 1980;**70**:307-312.
- 78) Daniel, C. P., Gaskell, S. J., and Nicholson, R. I. The measurement of tamoxifen and metabolites in the rat and relationship to the response of DMBA-induced mammary tumours. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984;**20**: 137-143.
- 79) Fuee BJ, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther.* 1984;**25**:127-205.

- 80) Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol.* 1977;75: 305-16.
- 81) Lien, E. A., Solheim, E., Lea, O. A., Lundgren, S., Kvinnsland, S., and Ueland, P. M. Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res.* 1989;49:2175-2183.
- 82) Robinson, S. P., Langan-Fahey, S. M., Johnson, D. A., and Jordan, V. C. Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab Dispos.* 1991;19: 36-43.
- 83) 日本薬学会出版委員会編集. 薬剤学実験法必携マニュアル (生物薬剤学) .p.206-208.
- 84) Ruddy KJ, Desantis SD, Gelman RS, Wu AH, Punglia RS, Mayer EL, Tolaney SM, Winer EP, Partridge AH, Burstein HJ. Personalized medicine in breast cancer: tamoxifen, endoxifen, and CYP2D6 in clinical practice. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141:421-427.
- 85) Martinez de Dueñas E, Ochoa Aranda E, Blancas Lopez-Barajas I, Ferrer Magdalena T, Bandrés Moya F, Chicharro García LM, Gómez Capilla JA, Zafra Ceres M7, de Haro T, Romero Llorens R, Ferrer Albiach C, Ferriols Lisart R, Chover Lara D, López Rodríguez A, Munárriz Ferrandis J, Olmos Antón S. Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Breast.* 2014;23:400-406.
- 86) Yazdi MF, Rafieian S, Gholi-Nataj M, Sheikha MH, Nazari T, Neamatzadeh H. CYP2D6 Genotype and Risk of Recurrence in Tamoxifen Treated Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:6783-6787.
- 87) 花野 学 (編) , 薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法, ソフトサイエンス社 (1985)
- 88) GG ギブソン, P スケット, 入門 薬物代謝, 相本刀夫ほか (訳) , 講談社サイエンティフィック (1987)
- 89) Yamaoka K, Nakagawa T. A nonlinear least squares program based on differential equations, MULTI (RUNGE), for microcomputers. *J Pharmacobiodyn.* 1983;6:595-606.
- 90) Meyer BH, Müller FO, Hundt HK, Luus HG, de la Rey N, Röthig HJ. The effects of felodipine on the pharmacokinetics of diazepam. *Int J Clin Pharmacol Ther*

- Toxicol.* 1992;30:117-121.
- 91) Hoen PA, Bijsterbosch MK, van Berkel TJ, Vermeulen NP, Commandeur JN. Midazolam is a phenobarbital-like cytochrome p450 inducer in rats. *J pharmacol Ther.* 2001;299:921-927.
- 92) Soucek P and Gut I. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica.* 1992;22:83-103.
- 93) You L, Gazi E, Archilbeque-Engle S, Casanova M, Conolly RB, Heck HA. Transplacental and lactational transfer of p,p' -DDE in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;157:134-144.
- 94) Gargas ML, Andersen ME, Teo ME, Batra R, Fennell TR, Kedderis GL. A physiologically based dosimetry description of acrylonitrile and cyanoethylene oxide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;134:185-194.
- 95) ファリーダック®カプセル 10mg、15mg 添付文書（ノバルティス）
- 96) Nasu R, Kumagai Y, Kogetsu H, Tsujimoto M, Ohtani H, Sawada Y. Physiologically based pharmacokinetic model for pralmorelin hydrochloride in rats. *Drug Metab Dispos.* 2005;33:1488-1494.
- 97) Watanabe T, Kusahara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328:652-662.
- 98) Shen DD, Kunze KL, Thummel KE. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;27:99-127.
- 99) Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos.* 2006;34:800-886.
- 100) Gertz M, Davis JD, Harrison A, Houston JB, Galetin A. Grapefruit juice-drug interaction studies as a method to assess the extent of intestinal availability: utility and limitations. *Curr Drug Metab.* 2008;9:785-795.
- 101) Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Gillies BS, Thummel KE. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;60:14-24.
- 102) Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Wilkinson GR. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and

- hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59:491-502.
- 103) Kharasch ED, Walker A, Hoffer C, Sheffels P. Intravenous and oral alfentanil as in vivo probes for hepatic and first-pass cytochrome P450 3A activity: noninvasive assessment by use of pupillary miosis. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76:452-466.
- 104) Sakuda S, Akabane T, Teramura T. Marked species differences in the bioavailability of midazolam in cynomolgus monkeys and humans. *Xenobiotica.* 2006;36:331-340.
- 105) Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:1282-1290.
- 106) Crevoisier C, Ziegler WH, Eckert M, Heizmann P. Relationship between plasma concentration and effect of midazolam after oral and intravenous administration. *Br J Clin Pharmacol.* 1983;16:51S-61S.
- 107) Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1391-1400.
- 108) Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, Serabjit-Singh CS. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299:620-628.
- 109) Matsuda Y, Konno Y, Satsukawa M, Kobayashi T, Takimoto Y, Morisaki K, Yamashita S. Assessment of intestinal availability of various drugs in the oral absorption process using portal vein-cannulated rats. *Drug Metab Dispos.* 2012;40:2231-2238.
- 110) Bachir-Cherif D, Blum D, Braendli-Baiocco A, Chaput E, Pacheco GC, Flint N, Haiker M, Hoflack JC, Justies N, Neff R, Starke V, Steiner G, Tournillac CA, Singer T, Ubeaud-Séquier G, Schuler F. Characterization of post-surgical alterations in the bile duct-cannulated rat. *Xenobiotica.* 2011;41:701-711.
- 111) Murakami T, Nakanishi M, Yoshimori T, Okamura N, Norikura R, Mizojiri K. Separate assessment of intestinal and hepatic first-pass effects using a rat model with double cannulation of the portal and jugular veins. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2003;18:252-260.

- 112) Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, Nagai M, Taguchi T, Satsukawa M, Yamashita S. Quantitative assessment of intestinal first-pass metabolism of oral drugs using portal-vein cannulated rats. *Pharm Res.* 2015;32:604-616.
- 113) Kuze J, Mutoh T, Takenaka T, Morisaki K, Nakura H, Hanioka N, Narimatsu S. Separate evaluation of intestinal and hepatic metabolism of three benzodiazepines in rats with cannulated portal and jugular veins: comparison with the profile in non-cannulated mice. *Xenobiotica.* 2009;39:871-880.
- 114) Kotegawa T, Laurijssens BE, Von Moltke LL, Cotreau MM, Perloff MD, Venkatakrisnan K, Warrington JS, Granda BW, Harmatz JS, Greenblatt DJ. In vitro, pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of ketoconazole and midazolam in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:1228-1237.
- 115) Kouichi Yoshinari. Drug-drug interactions resulting from inhibition of cytochrome P450s. *Folia Pharmacol. Jpn.* 2009;134:285-288.
- 116) Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD, Kunze KL. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of K_i values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Dispos.* 1999;27:180-187.
- 117) Lu C, Hatsis P, Berg C, Lee FW, Balani SK. Prediction of pharmacokinetic drug-drug interactions using human hepatocyte suspension in plasma and cytochrome P450 phenotypic data. II. In vitro-in vivo correlation with ketoconazole. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:1255-1260.
- 118) Lu C, Miwa GT, Prakash SR, Gan LS, Balani SK. A novel model for the prediction of drug-drug interactions in humans based on in vitro cytochrome p450 phenotypic data. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:79-85.
- 119) Ogasawara A, Utoh M, Nii K, Ueda A, Yoshikawa T, Kume T, Fukuzaki K. Effect of oral ketoconazole on oral and intravenous pharmacokinetics of simvastatin and its acid in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:122-128.
- 120) Sheets JJ, Mason JI. Ketokonazole: a potent inhibitor of cytochrome P-450-dependent drug metabolism in rat liver. *Drug Metab Dispos.* 1984;12:603-606.
- 121) Shirasaka Y, Chang SY, Grubb MF, Peng CC, Thummel KE, Isoherranen N, Rodrigues AD. Effect of CYP3A5 expression on the inhibition of CYP-3A-catalyzed drug metabolism: impact on modeling CYP-3A mediated drug-drug

- interactions. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:1566-1574.
- 122) Luwig J, Elveback LR. Parenchyma weight changes in hepatic cirrhosis. *Lab Invest.* 1972;26:338-343.
- 123) Mclean AJ and Morgan DJ. Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. *Clin Pharmacokinet.* 1991;21:42-69.
- 124) Ohnishi A. Liver disease-related reduction in in vivo CYP enzyme activity in Japanese patients with HCV seropositive chronic hepatitis and cirrhosis. *Tokyo Jikeikai Medical Journal.* 2011;126:71-78.
- 125) Pan Z, Wu XJ, Li JS, Liu FN Li WS, Han JM. Functional hepatic flow in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2004;10:915-918.
- 126) Imani F, Motavaf M, Safari S, Alavian SM. The therapeutic use of analgesics in patients with liver cirrhosis: a literature review and evidence-based recommendations. *Hepat Mon.* 2014;14:e23539.
- 127) Diaz-Garcia JM, Oliver-Botana J, Fos-Galve D. Pharmacokinetics of diazepam in the rat: influence of a carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *J Pharm Sci.* 1992;81:768-772.
- 128) Kimura T, Nakayama S, Yamano T, Kurosaki Y, Nakayama T. Pharmacokinetics of indocyanine green in rats with experimentally induced hepatic diseases. *Biol Pharm Bull.* 1993;16:1140-1145.
- 129) Shibata N, Shimakawa H, Minouchi T, Yamaji A. Pharmacokinetics of cyclosporine A after intravenous administration to rats in various disease states. *Biol Pharm Bull.* 1993;16:1130-1135.
- 130) Lupp A, Tralls M, Fuchs U, Klinger W. Transplantation of fetal liver tissue suspension into the spleens of adult syngenic rats: effects of different cytotoxins on cytochrome P450 mediated monooxygenase functions and on oxidative state. *Exp Toxicol Pathol.* 2001;52:529-538.
- 131) Kose N, Yamamoto K, Sai Y, Isawa M, Suwa T, Nakashima E. Prediction of theophylline clearance in CCl₄-treated rats using in vivo CYP1A2 and CYP3A2 contents assessed with the PKCYP test. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20:168-176.
- 132) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), Inc.

- Carbon tetrachloride. Documentation of the TLVs and BELs. 7th ed. 2001.
- 133) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Carbon tetrachloride, Environmental Health Criteria, 208, WHO, Geneva, 1999.
- 134) Mukai T, Mera K, Nishida K, Nakashima M, Sasaki H, Sakaeda T, Nakamura J. A novel method for preparation of animal models of liver damage: liver targeting of carbon tetrachloride in rats. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1494-1497.
- 135) Mukai T, Mera K, Nishida K, Nakashima M, Sasaki H, Sakaeda T, Nakamura J. Pharmacokinetics of phenol red in rat models of liver damage prepared by liver targeting of carbon tetrachloride. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:595-597.
- 136) Goorden SM, Buffart TE, Bakker A, Buijs MM. Liver disorders in adults: ALT and AST. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2013;157:A6443.
- 137) Gurung RB, Purbe B, Gyawali P, Risal P. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase (AST/ALT): the correlation of value with underlying severity of alcoholic liver disease. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ).* 2013;11:233-236.
- 138) Wedemeyer H, Hofmann WP, Lueth S, Malinski P, Thimme R, Tacke F, Wiegand J. ALT screening for chronic liver diseases: scrutinizing the evidence. *Z Gastroenterol.* 2010;48:46-55.
- 139) Safety: 安全性（非臨床試験に関するガイドライン）. PMDA ホームページ. <http://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0069.html> アクセス日: 2017,01,01.
- 140) Ward KW, Smith BR. A comprehensive quantitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans. I. Clearance. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:603-611.
- 141) Uno Y, Hosaka S, Matsuno K, Nakamura C, Kito G, Kamataki T, Nagata R. Characterization of cynomolgus monkey cytochrome P450 (CYP) cDNAs: is CYP2C76 the only monkey-specific CYP gene responsible for species differences in drug metabolism? *Arch Biochem Biophys.* 2007;466:98-105.
- 142) Sakuda S, Akabane T, Teramura T. Marked species differences in the bioavailability of midazolam in cynomolgus monkeys and humans. *Xenobiotica.* 2006;36:331-340.

- 143) Akabane T, Tabata K, Kadono K, Sakuda S, Terashita S, Teramura T. A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:308-316.
- 144) 小笠原 明人. カニクイザルを用いた薬物相互作用試験のヒトへの外挿性に関する研究. 岐阜薬科大学紀要. 2011;60:23-32.
- 145) Carr B, Norcross R, Fang Y, Lu P, Rodrigues AD, Shou M, Rushmore T, and Booth-Genthe C. Characterization of the rhesus monkey CYP3A64 enzymes: species comparisons of CYP3A substrate specificity and kinetics using baculovirus-expressed. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:1703-1712.
- 146) Yasui N, Kondo T, Otani K, Furukori H, Mihara K, Suzuki A, Kaneko S, Inoue Y. Effects of itraconazole on the steady-state plasma concentrations of haloperidol and its reduced metabolite in schizophrenic patients: in vivo evidence of the involvement of CYP3A4 for haloperidol metabolism. *J Clin Psychopharmacol.* 1999;19:149-154.
- 147) Bates DE, Herman RJ. Carbamazepine toxicity induced by lopinavir/ritonavir and nelfinavir. *Ann Pharmacother.* 2006;40:1190-1195.
- 148) Pollack TM, McCoy C, Stead W. Clinically significant adverse events from a drug interaction between quetiapine and atazanavir-ritonavir in two patients. *Pharmacotherapy.* 2009;29:1386-1391.
- 149) Aung GL, O'Brien JG, Tien PG, Kawamoto LS. Increased aripiprazole concentrations in an HIV-positive male concurrently taking duloxetine, darunavir, and ritonavir. *Ann Pharmacother.* 2010;44:1850-1854.
- 150) Chalasani N, Gorski JC, Patel NH, Hall SD, Galinsky RE. Hepatic and intestinal cytochromeP450 3A activity in cirrhosis: effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology.* 2001;34:1103-1108.
- 151) Eichelbaum M, Mikus G, Mast V, Fischer C, Kuhlmann U, Machleidt C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nitrendipine in healthy subjects and patients with kidney and liver disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12:6-10.
- 152) Kleinbloesem CH, van Harten J, Wilson JP, Danhof M, van Brummelen P, Breimer DD. Nifedipine: kinetics and hemodynamic effects in patients with liver cirrhosis after intravenous and oral administration. *Clin Pharmacol Ther.*

- 1986;40:21-28.
- 153) Somogyi A, Albrecht M, Kliems G, Schafer K, Eichelbaum M. Pharmacokinetics, bioavailability and ECG response of verapamil in patients with liver cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;12:51-60.
- 154) Arrowsmith J. Trial watch: Phase II and phase III attrition rates 2011-2012. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:569.
- 155) Arrowsmith J. Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:328-329.
- 156) Arrowsmith J. Trial watch: Phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:87.
- 157) Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:566-580.
- 158) Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl Med.* 2003;349:474-485.
- 159) Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:177-202.
- 160) Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:489-499.
- 161) Kaplowitz N. Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf.* 2001;24:483-490.
- 162) Giri S, Nieber K, Bader A. Hepatotoxicity and hepatic metabolism of available drugs: current problems and possible solutions in preclinical stages. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6:895-917.
- 163) Björnsson E, Olsson R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology.* 2005;42:481-489.