

## 略号

ADME	: Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion
AFE	: average-fold error
AUC	: the area under the concentration-time curve
BA	: bioavailability
BCRP	: breast cancer resistance protein
BCS	: Biopharmaceutics Classification System
BSA	: body surface area
CL	: clearance
C <sub>v</sub>	: concentration of the drug in the vehicle
CYP	: cytochrome P450
D <sub>s</sub>	: diffusivity of the drug within the skin
EMA	: the European Medicines Agency
F	: fraction dose percutaneous absorbed
F <sub>a</sub>	: a fraction dose absorbed from the gastrointestinal tract
FDA	: the U.S. Food and Drug Administration
f <sub>e</sub>	: the urinary excretion ratios
F <sub>g</sub>	: intestinal availability (a fraction not metabolized in the gut wall)
F <sub>h</sub>	: hepatic availability (a fraction not metabolized in the liver)
f <sub>up</sub>	: unbound fraction in plasma
f <sub>ut</sub>	: unbound fraction in tissues
GER	: gastric emptying rate
GI	: gastrointestinal
GITT	: gastrointestinal transit time
J <sub>ss</sub>	: the steadystate flux
K <sub>S/V</sub>	: the partition coefficient of the drug between the skin and the vehicle
L <sub>s</sub>	: the skin thickness
MAT	: mean absorption time
MLP	: maximum lifespan potential
MRP2	: Multi-drug resistance protein 2
MRT	: mean residence time
NSAIDs	: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
OATP	: organic anion transporting polypeptide
OECD	: the Organization for Economic Co-operation and Development
PB-PK	: physiologically-based pharmacokinetic

P-gp	: P-glycoprotein
$Q_h$	: the hepatic blood flow
$R_B$	: blood-to-plasma concentration ratio
ROE	: the rule of exponent
UGT	: UDP-glucuronosyltransferase
$V_d$	: steady-state volume of distribution
WHO	: the World Health Organization

# 目次

総論の部 .....	1
緒言 .....	2
第 1 章 ミニブタにおける薬物の経口吸収に関する評価 .....	4
1.1 量的 BA (extent of bioavailability) に関する評価 .....	5
1.1.1 各種市販薬物を用いた BA ( $F_a \cdot F_g \cdot F_h$ ) の評価 .....	5
1.1.2 肝及び小腸代謝に関する <i>in vitro</i> による評価 .....	17
1.2 速度的 BA (rate of bioavailability) に関する評価 .....	22
1.2.1 消化管通過時間に関する評価 .....	22
1.2.2 各種市販薬物を用いた $T_{max}$ 、 $C_{max}$ 及び $C_{max}/AUC$ 比較 .....	25
1.3 考察 .....	27
第 2 章 ミニブタにおける薬物の体内動態パラメータに関する評価 .....	30
2.1 各種市販薬物を用いた $V_d$ 及び $CL$ に関する評価 .....	31
2.2 ヒト体内薬物動態予測におけるミニブタの有用性に関する評価 .....	36
2.2.1 ヒト $V_d$ 予測 .....	36
2.2.2 ヒト $CL$ 予測 .....	41
2.3 考察 .....	46
第 3 章 ミニブタにおける製剤の経皮吸収に関する評価 .....	50
3.1 <i>In vivo</i> 経皮吸収率に関する評価 .....	51
3.2 <i>In vitro</i> フランツ拡散セルを用いた薬物皮膚透過性評価 .....	56
3.3 Triple pack approach によるヒト経皮吸収率の予測に関する評価 .....	57
3.4 考察 .....	59
結論 .....	62
謝辞 .....	64
実験の部 .....	65
第 1 章 実験の部 .....	66
第 2 章 実験の部 .....	74
第 3 章 実験の部 .....	82
引用文献 .....	90

# 総論の部

## 緒言

新規医薬品の開発では、まず探索研究として薬効、物性、薬物動態、安全性などに関する *in vitro* スクリーニング評価を実施し、開発候補化合物の取得を目指す。*In vitro* 動態スクリーニングでは、投与後の化合物の体内動態を吸収・分布・代謝・排泄（ADME）の各過程でその最も基本的となる固有のパラメータ（素過程パラメータ）に分割し、*in vitro* においてそれぞれの素過程を再現することで化合物の溶解性、膜透過性及び代謝安定性等を評価する。本スクリーニングの導入により、薬物動態の観点で医薬品開発が中止に陥る頻度は軽減されている。しかしながら、良好な *in vitro* 動態プロファイルを有する化合物においても、実験動物等を用いた *in vivo* 試験では十分な血中曝露が得られないといった状況も多く散見され、*in vitro* スクリーニングのみですべての問題を解決することは難しいのが現状である。

そのため、製薬企業における医薬品開発の早期段階では、*in vitro* での一次スクリーニングにおいて良好な物性、動態プロファイルを有する化合物が選別された後、二次スクリーニングとして、ラット等の小型動物、次いでイヌ等の大型動物に投与した際の体内動態が評価される。この時、*in vivo* での体内動態が *in vitro* からの予想に比べ大きく異なった場合には、その要因を明らかにするとともに、ヒトにおける血中濃度推移を正確に予測するための手法の構築が求められる。例えば、薬物によっては実験動物とヒトの薬物代謝能に大きな種差が報告されており[1]、こうした種差を考慮した上でヒトにおける体内動態を予測できなければ、以降の開発を継続することは難しい。また、*in vivo* において体内動態が異なった要因が明らかにされなければ、その回避策を合成展開へとフィードバックすることができないため、プロジェクト自体の遅延あるいは中止にも繋がる。特に、各実験動物における薬物の体内動態に明らかな種差が認められた場合には、臨床への移行を決定するための最終的な試験にどの動物種を選択するかが大きな問題となる。そのため、各動物種における薬物の体内動態に関連した特徴を把握し、ヒトとの類似点や相違点を理解しておくことは重要である。一方、近年、動物愛護の観点から実験動物の使用に関しては更なる考慮が必要となっており、特に大型動物のイヌやサルの使用は欧米では強く制限される傾向にある。そのため、その代替動物としてミニブタの前臨床試験での利用に製薬企業からの注目が高まっている。ミニブタは、ヒトと解剖学的、生理学的、遺伝学的、生化学的に多くの点で類似していることが報告されている[2, 3]。実際に、近年ミニブタは経皮製剤を開発する際の毒性試験で使用されており、ミニブタの結果は the U.S. Food and Drug Administration（FDA）や the European Medicines Agency（EMA）において承認申請資料として受け入れられている。しかしながら、ミニブタを用いた薬物の体内動態試験はほとんど実施されておらず、動態特性に関する背景データは極めて乏しいのが現状である。

そこで本研究では物性及び体内動態特性の異なる様々な市販薬物を用いてミニブタにおける薬物動態評価を行い、ミニブタの医薬品開発における体内動態面での特徴及び有用性に関して評価した。第1章では、市販薬物を経口投与し、経口吸収の程度と速度をミニブタで評価し、ヒト又は他の実験動物としてマウス及びラットと比較することで、ミニブタの薬物経口吸収性評価における有用性について検討した。第2章では、市販薬物を静脈内投与してクリアランス（clearance, CL）及び分布

容積 (steady-state volume of distribution,  $V_d$ ) に関する動態パラメータをミニブタで評価し、ヒト又はマウス及びラットの CL 及び  $V_d$  と比較した。更にこれらの薬物のヒト CL 及び  $V_d$  に関して、ミニブタ又はマウス及びラットのデータを基に経験則的に予測する *allometric scaling* を用いて予測し、ミニブタの動態パラメータや各予測値をヒトと比較することで、前臨床動態試験でのミニブタの使用に関する有用性について検討した。第 3 章では、市販経皮製剤を経皮投与してミニブタにおける経皮吸収を評価し、報告された臨床試験データ又はマウス及びラットと比較した。更に、ミニブタとヒト又はマウスの摘出皮膚を用いた *in vitro* 薬物皮膚透過試験を実施し、得られたミニブタの *in vivo* 及び *in vitro* データを用いて、評価薬物のヒトにおける経皮吸収を予測し、ミニブタの経皮吸収に関する有用性について検討した。以下、得られた結果を 3 章にわたり論述する。

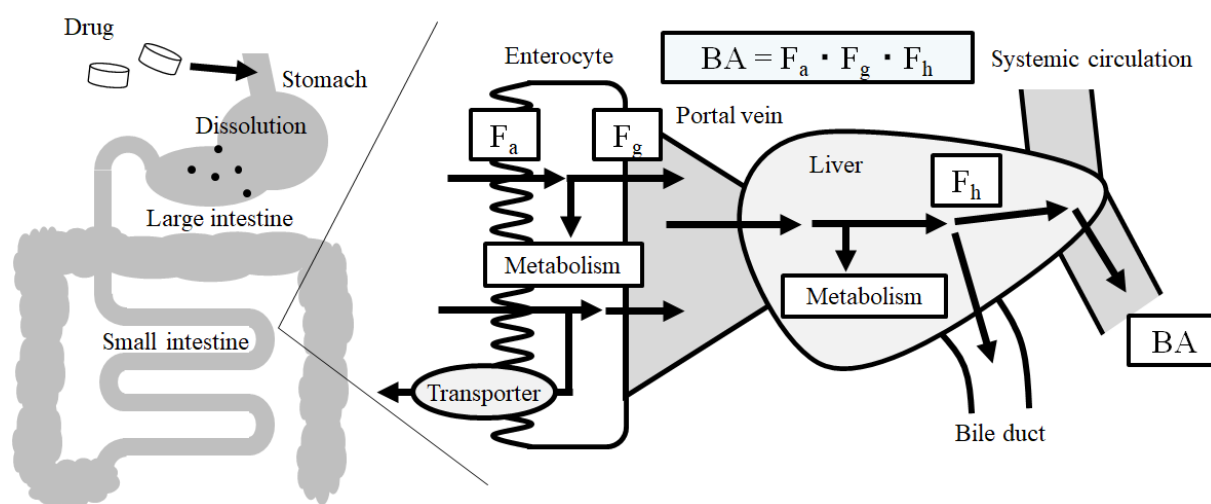
## 第1章 ミニブタにおける薬物の経口吸収に関する評価

医薬品開発において、経口投与は侵襲性が低く、また製剤の投与が容易であるため、その他の投与経路と比較しても患者のコンプライアンスは良好である。そのため医薬品開発の第一選択として経口剤を選択するケースは多い。Figure 1 に示すように、経口投与された薬物は、消化管内で溶解した後、脂質二重膜で構成される消化管上皮細胞膜を透過して細胞内へと取り込まれる。その後、消化管の上皮細胞において、薬物代謝酵素による代謝や消化管排泄型トランスポーターによる管腔側への汲み出しを受け、それらを免れた薬物が門脈を経て肝臓へと流入する。更に肝臓では、多種多様な薬物代謝酵素による代謝や胆汁排泄を受け、肝臓での抽出を免れた薬物のみが最終的に全身循環血へと到達する。通常、これら消化管吸収の各プロセスは、 $F_a$ （消化管内から消化管組織への移行率）、 $F_g$ （消化管組織から門脈への移行率）及び  $F_h$ （門脈から全身循環血への移行率）の3つのパラメータによって定量的に評価される。また、経口投与された薬物の最終的な生物学的利用率（bioavailability, BA）は、それらパラメータの積として表される。経口剤として開発する場合には、経口投与された開発化合物の最終的な BA によって体内曝露量が異なってくるため、BA を早期にかつ正確に把握することが非常に重要となる。しかしながら、実験動物とヒトでは、BA に種差があることが報告されており[4]、実験動物からヒトの BA を予測する際にはその種差を十分に考慮する必要がある。経口剤の開発において、探索段階での経口吸収性評価にはげっ歯類のマウスやラットが、前臨床段階では非げっ歯類のビーグルイヌやカニクイザルがよく利用される。開発候補化合物の選定段階において、マウスやラットでの BA が開発の判断指標の一つとして用いられることもあるが、例えば *in vitro* での評価で経口吸収性が高い化合物に該当していたとしても、実験動物で顕著に低い経口吸収性を示した場合、ヒトにおける BA の評価を見誤る危険性も考えられる。このようなリスクを回避するためには、各実験動物における種差の要因を把握し、ヒトにおける経口吸収性、体内動態を的確に予測する必要がある。Chiou らは様々な薬物に関して、ヒトにおける用量依存性や経口吸収特性を予測する上で、ラットは良好なモデル動物となり得ることを報告している[5]。一方、ヒトより消化管が短いイヌでは、薬物が消化管内を通過する時間はヒトより短いと考えられるにもかかわらず、ヒトよりイヌでは親水性が高い薬物は速やかに経口吸収される傾向にあり、イヌとヒトの経口吸収挙動に違いがあることが報告されている[6]。また、サルでは他の動物種と比較し、多くの薬剤に対して著しく BA が低いことが報告されている[7]。更に、胃内 pH [8, 9, 10]、胃内容排出速度（gastric emptying rate, GER）及び消化管（gastrointestinal, GI）運動[11, 12, 13, 14, 15]に関しても種差があることが報告されており、実験動物とヒトの間で薬物の経口吸収が相関しない結果を引き起こす要因は多岐にわたる。

マウス及びラットは、薬効及び毒性試験で広く用いられているため、医薬品開発の初期段階で最も一般的に使用されている実験動物である。したがって、マウス及びラットでは様々な種類の *in vivo* 動態特性に関する背景データが蓄積されており、これらのデータは経口吸収の推定に有用な情報となる。一方で、マウス及びラットでは体格的にヒトに適用するものと同じ大きさの錠剤又はカプセルを投与することは困難なため、製剤評価には不向きである。一方、ミニブタでは体格的に臨床製

剤をそのまま投与できるため、前臨床における経口製剤評価動物として動物倫理の観点からイヌに代わる代替動物として強く期待されている。しかしながらミニブタを用いた経口投与による動態試験はほとんど実施されておらず、イヌに代わるにはまだ情報の蓄積は不十分な状況にある。

本章では、薬物のヒトにおける経口吸収動態を予測する上で、ミニブタの実験動物としての有用性を評価するため、様々な薬剤を対象にミニブタにおける経口吸収解析を行い、文献から収集した上記評価薬剤に関するヒトにおける経口吸収データと比較した。また、比較対象動物としてマウス及びラットでも同様の経口投与試験を行った。



**Figure 1. Schematic diagram of the first-pass effect in intestine and liver after oral administration with drug.**

## 1.1 量的 BA (extent of bioavailability) に関する評価

### 1.1.1 各種市販薬物を用いた BA ( $F_a \cdot F_g \cdot F_h$ ) の評価

ヒトとミニブタにおける BA を比較評価するため、異なる動態特性を有する 17 種のモデル薬物 (acetaminophen、amitriptyline、antipyrine、atenolol、felodipine、fexofenadine、furosemide、midazolam、nicardipine、nifedipine、pitavastatin、pravastatin、propranolol、raloxifene、sulfasalazine、timolol 及び verapamil) をミニブタに静脈内投与及び経口投与し、BA を算出後、ヒトの BA に関する文献情報と比較評価した。また、比較対象動物としてマウス及びラットでも同様に評価し比較した。

17 種のモデル薬物の特徴及び各動物種への投与量に関して Table 1 に示した。



**Table 1. Physicochemical profiles and elimination pathways of tested drugs in mice, rats, minipigs and humans.**

Drugs	Dose		Elimination pathway	Ionization property	BCS class <sup>a</sup>	Aqueous Solubility <sup>b</sup> (mg/mL)	Dose number of	
	Mice, rats and minipigs	Humans					Human <sup>c</sup>	Animals <sup>d</sup>
Acetaminophen	5 mg/kg	20 mg/kg	UGT, Sulfate conjugation, CYP2E	Base	I	15.3	< 1	< 1
Amitriptyline	3 mg/kg	1.2 mg/kg	CYP2D	Base	I	> 50	< 1	< 1
Antipyrine	1 mg/kg	10 mg/kg	CYP	Neutral	I	51.9	< 1	< 1
Atenolol	1 mg/kg	100 mg	urinary excretion	Base	III	20	< 1	< 1
Felodipine	1 mg/kg	27.5 mg	CYP3A	Neutral	II	0.00058	190	345
Fexofenadine	1 mg/kg	120 mg	P-gp, OATP1B3	Zwitterion	III	1.43	< 1	< 1
Furosemide	0.5 mg/kg	40 mg	urinary excretion by OATs	Acid	IV	0.049	3.3	2.0
Midazolam	0.5 mg/kg	10 mg	CYP3A	Neutral	I	0.0769	< 1	1.3
Nicardipine	0.5 mg/kg	30 mg	CYP3A	Base	III	6	< 1	< 1
Nifedipine	0.5 mg/kg	0.27 mg/kg	CYP3A	Neutral	II	0.01	6.5	10.0
Pitavastatin	1 mg/kg	2 mg	P-gp, MRP2, BCRP	Acid	I	0.1-1	< 1	0.2-2.0
Pravastatin	1 mg/kg	19.2 mg	MRP2	Acid	III	> 100	< 1	< 1
Propranolol	1 mg/kg	80 mg	CYP2D, 1A, UGT	Base	I	33-100	< 1	< 1
Raloxifene	5 mg/kg	60 mg	UGT	Base	III	0.392	< 1	2.6
Sulfasalazine	1 mg/kg	2–3 g	intestinal flora	Zwitterion	IV	0.016	750	12.5
Timolol	3 mg/kg	0.4 mg/kg	CYP2D	Base	I	83.3	< 1	< 1
Verapamil	1 mg/kg	80 mg	CYP3A, P-gp	Base	I	28.6	< 1	< 1

a; the Biopharmaceutics Classification System (BCS)

b; Data of solubility in water are cited from the each drug interview forms.

c; Dose number (Do) = Dose / V / C<sub>s</sub>, C<sub>s</sub> is solubility in water. V is oral dose volume at 250 mL.

d; Dose number (Do) = Dose / V / C<sub>s</sub>, C<sub>s</sub> is solubility in water. V is oral dose volume as 5 mL/kg.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Table 1

Amidon らは、薬物の溶解性と膜透過性を基に、薬物を 4 つのクラスに分類した Biopharmaceutics Classification System (BCS) を提唱し、薬物の *in vivo* における消化管吸収に関する特徴付けを行った[16]。簡易的な分類とはなるが、今回の試験で評価した薬物には、膜透過性及び溶解性が良好な BCS クラス I に該当する薬物が 8 種、膜透過性は良好だが溶解性が低い BCS クラス II に該当する薬物が 2 種、膜透過性は低い溶解性は良好な BCS クラス III に該当する薬物が 5 種、膜透過性及び溶解性が低い BCS クラス IV に該当する薬物が 2 種含まれている。また、評価薬物のヒトにおける主な消失経路はそれぞれ、(1) cytochrome P450 (CYP) を介した代謝 (antipyrine、amitriptyline、felodipine、midazolam、nicardipine、nifedipine、propranolol、timolol 及び verapamil)、(2) non-CYP 代謝 (acetaminophen 及び raloxifene)、(3) トランスポーターを介した消失 (fexofenadine、pitavastatin、pravastatin 及び sulfasalazine)、(4) 腎排泄 (atenolol 及び furosemide) であり、吸収性及び体内動態特性の異なるものを選択した。

BA は被験薬物を静脈内投与及び経口投与し、各血漿中濃度推移から得られたパラメータを用いて eq. (1)によって算出される。

$$BA = \frac{AUC_{po} \cdot Dose_{iv}}{AUC_{iv} \cdot Dose_{po}} \quad \text{eq. (1)}$$

ここで、AUC<sub>po</sub> は経口投与時の血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC<sub>iv</sub> は静脈内投与時の血漿中濃度－時間曲線下面積、Dose<sub>po</sub> は経口投与時の投与量、Dose<sub>iv</sub> は静脈内投与時の投与量を示す。

また、BA は、F<sub>a</sub>、F<sub>g</sub> 及び F<sub>h</sub> の積として、eq. (2)によって表される。

$$BA = F_a \cdot F_g \cdot F_h \quad \text{eq. (2)}$$

更に、F<sub>h</sub> 及び F<sub>a</sub>・F<sub>g</sub> は Rowland の理論[17]に従い eq. (3)～(6)によって算出される。

$$CL_b = \frac{CL_p}{R_B} \quad \text{eq. (3)}$$

$$CL_h = CL_b \cdot (1 - f_e) \quad \text{eq. (4)}$$

$$F_h = 1 - \frac{CL_h}{Q_h} \quad \text{eq. (5)}$$

$$F_a \cdot F_g = \frac{BA}{F_h} \quad \text{eq. (6)}$$

ここで、 $CL_b$ は血液を基準にした全身クリアランス、 $CL_p$ は血漿を基準にした全身クリアランス、 $R_B$ は血液血漿濃度比、 $CL_h$ は肝クリアランス、 $f_e$ は尿中排泄率、 $Q_h$ は肝血流量を示す。なお、 $Q_h$ はそれぞれ文献値を引用し、マウスの  $Q_h$ は 90 mL/min/kg [18]、ラットの  $Q_h$ は 55.2 mL/min/kg [18]、ミニブタの  $Q_h$ は 27.9 mL/min/kg [19]、ヒトの  $Q_h$ は 20.7 mL/min/kg [18]とした。また、 $f_e$ に関してはミニブタ、マウス及びラットともにヒトの  $f_e$ と同程度であると仮定し、ヒトにおける文献情報に基づき以下のように設定した。それぞれの  $f_e$ は acetaminophen を 0% [20]、antipyrene を 5% [21]、atenolol を 94% [20]、fexofenadine を 11% [22]、furosemide を 65% [20]、pravastatin を 8% [23]、propranolol を 0% [20]、sulfasalazine を 5% [24]、timolol を 17.4% [25]及び verapamil を 1% [26]と設定した。また、amitriptyline [27]、felodipine [28]、midazolam [29]、nicardipine [30]、nifedipine [drug information]、pitavastatin [31]及び raloxifene [32]に関しては、ヒトでの  $f_e$ が 0.5%以下との報告であったため、0%として取り扱った。

Acetaminophen [33]、amitriptyline [34]、antipyrene [35]、atenolol [36]、felodipine [37]、fexofenadine [38]、furosemide [39]、midazolam and propranolol [7]、nicardipine [40]、nifedipine and timolol [41]、pitavastatin [42]、pravastatin [43]、raloxifene [44]、sulfasalazine [24]及び verapamil [45]に関するヒトの経口吸収の結果については、それぞれ文献より引用した。

Figure 2、Figure 3、Figure 4 及び Table 2 に、各モデル薬物を静脈内投与及び経口投与した際のヒトとミニブタ、マウス及びラットにおける BA、 $F_h$  及び  $F_a \cdot F_g$ を示した。以下に、各モデル薬物の結果に関してその特徴を論述する。

#### Acetaminophen :

Acetaminophen は膜透過性及び溶解性が良好であり、ヒトにおける BA は 88%との報告[33]があり、ヒトでの経口吸収が良好な薬物である。ミニブタに関しては、Henze らによって acetaminophen のミニブタにおける BA は 86.4%との報告[46]があり、今回得られたミニブタにおける BA (76.4%) は Henze らの報告と乖離はなかった。ラットに関しても、Belanger らによって acetaminophen のラットにおける BA は 56%、肝抽出率は 41%すなわち  $F_h$ は 59%との報告[47]があり、今回得られたラットにおける BA (42.6%) 及び  $F_h$  (50.4%) は Belanger らの報告と乖離はなかった。今回の評価では acetaminophen の各動物種における BA、 $F_h$  及び  $F_a \cdot F_g$ はヒトと比較しミニブタでは概ね同程度であったが、マウス及びラットでは僅かに低値であった。

#### Amitriptyline :

Amitriptyline は高い膜透過性及び溶解性を示し[47]、薬物代謝酵素である CYP2D により主に代謝される塩基性薬物である。ラットに関しては、Bae らによって amitriptyline のラットにおける BA は 6.3%との報告[49]があり、今回得られたラットにおける BA (4.4%) は Bae らの報告と乖離はなかった。なお、Bae らは amitriptyline のラットにおける消化管での初回通過効果が約 9%であることも報告[49]しているが、今回の評価では計算上  $F_h$ が 0%付近であったことから  $F_a \cdot F_g$ を算出することはできなかった。今回の評価では amitriptyline の各動物種における BA はヒト (47.7%) と比較しミニ

ブタ (7.9%)、マウス (1.6%) 及びラット (4.4%) いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (18.1%)、マウス (2.5%)、ラット (NC、約 9%[49]) でヒト (100%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Antipyrine :

Antipyrine は膜透過性及び溶解性が良好であり、ヒトにおける BA は 97%との報告[35]があり、ヒトでの経口吸収が良好な薬物である。マウス及びラットに関しては、Liu ら及び Matsuda らによって antipyrine のマウス及びラットにおける BA は 97%及び 89%との報告[50, 51]があり、今回得られたマウス及びラットにおける BA (72.0%及び 74.6%) は Liu ら及び Matsuda らの報告と比較的乖離はなかった。今回の評価では antipyrine の各動物種における BA、 $F_h$  及び  $F_a \cdot F_g$  はヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットで同程度であった。

#### Atenolol :

Atenolol は溶解性は良好であるが、膜透過性はやや低い BCS クラス III に該当する腎排泄型の薬物である。ラットに関しては、Chiou らによって atenolol のラットにおける  $F_a$  は 48~50%との報告[5]があり、今回得られたラットにおける  $F_a \cdot F_g$  (51.6%) は Chiou らの報告と乖離はなかった。今回の評価では atenolol は腎排泄型で肝代謝は受け難いため、各動物種における  $F_h$  はいずれも高値を示した。また BA 及び  $F_a \cdot F_g$  はヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットで同程度であった。

#### Felodipine :

Felodipine は溶解性は低い、膜透過性は良好な BCS クラス II に分類され、CYP3A 基質に該当する薬物である。ラットに関しては、Bäärnhielm らによって felodipine のラットにおける BA は 20%との報告[52]があり、今回得られたラットにおける BA (5.1%) は Bäärnhielm らの結果と差が生じた。この差が生じた要因としては、経口投与に関して今回の評価では 1 mg/kg で投与したのに対して、Bäärnhielm らは 5  $\mu$ mol/kg (1.9  $\mu$ g/kg) での投与であり、溶解度に起因したものと考えられた。なお、Wang らは、 $[^3\text{H}]$ felodipine を用いた検討により、ラットにおける felodipine の  $F_a \cdot F_g$  は 0.09 から 0.15 であることを報告[53]しているが、今回の評価では計算上  $F_h$  が 0%付近であったことから  $F_a \cdot F_g$  を算出することはできなかった。今回の評価では felodipine の各動物種における BA はヒト (16%) と比較しミニブタ (2.4%)、マウス (5.6%) 及びラット (5.1%) いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (7.1%)、マウス (6.3%)、ラット (NC、9~15%[53]) でヒト (100%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。ただし、今回の評価において、ヒトの文献値[37]から算出した  $F_h$  は極めて低い値となり、 $F_a \cdot F_g$  は結果的に計算上 100%と算出されたため、ヒトにおける  $F_a \cdot F_g$  の実測値を反映しているか否かは不明であった。

#### Fexofenadine :

Fexofenadine は溶解性は良好であるが、膜透過性は低い BCS クラス III に分類され、P-gp 等のトランスporter基質に該当する薬物である。マウス及びラットに関しては、Tahara 及び Qiang らによって fexofenadine のマウス及びラットにおける BA は 2.38%及び 4.6%との報告[54, 55]があり、今回得られたマウス及びラットにおける BA (0.9%及び 1.0%) は Tahara 及び Qiang らの報告と比較的乖離がなく、いずれも低 BA であった。今回の評価では fexofenadine の各動物種における BA はヒト (30%) と比較しミニブタ (5.8%)、マウス (0.9%) 及びラット (1.0%) いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (7.5%)、マウス (1.0%)、ラット (2.3%) でヒト (39.4%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Furosemide :

Furosemide は膜透過性及び溶解性がやや低く BCS クラス IV に分類され、主に腎排泄される薬物である。ラットに関しては、Kim らによって furosemide のラットにおける BA は 28.9%との報告[56]があり、今回得られたラットにおける BA (14.9%) は Kim らの結果とやや差が生じたが Kim らは完全溶解した投与液で経口投与を実施したためと考えられた。今回の評価では furosemide の各動物種における BA はヒト (71%) と比較しミニブタ (56.6%) 及びマウス (58.9%) では比較的同程度であったが、ラット (14.9%) では低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がラット (15.7%) で低かったことに由来すると考えられた。

#### Midazolam :

Midazolam は膜透過性が良好な、CYP3A 基質に該当する薬物である。ミニブタ、マウス及びラットに関しては、Lignet ら、Kuze ら及び Nishimura らによって midazolam のミニブタ、マウス及びラットにおける BA は 12.0%、2.3%及び 1.1%との報告[57, 58, 59]があり、今回得られたミニブタ、マウス及びラットにおける BA (8.7%、1.2%及び 2.7%) は既報の結果と比較的乖離はなかった。今回の評価では midazolam の各動物種における BA はヒト (44%) と比較しミニブタ (8.7%)、マウス (1.2%) 及びラット (2.7%) いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (16.9%)、マウス (2.3%)、ラット (6.0%) でヒト (65.6%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Nicardipine :

Nicardipine は溶解性は比較的良好であるが、膜透過性は低い BCS クラス III に分類され、CYP3A 基質に該当する薬物である。ラットに関しては、Choi らによって nicardipine のラットにおける BA は 11.0%との報告[60]があり、今回得られたラットにおける BA (<0.1%) は Choi らの結果より低値であった。なお、ラットに静脈内投与後の  $CL_p$  は Choi らの結果 (59.4 mL/min/kg) と今回の結果 (45.2 mL/min/kg) に乖離はなく、肝代謝は速かった。そのため、ラットの  $F_h$  は 0%付近と計算され  $F_a \cdot F_g$  を算出することはできなかったが、CYP3A 基質である felodipine や midazolam と同様に  $F_a \cdot F_g$  は低い可能性が考えられた。今回の評価では nicardipine の各動物種における BA はヒト (7%) と比

較しミニブタ (0.8%)、マウス (<0.1%) 及びラット (<0.1%) いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (1.7%)、マウス ( $\approx 0\%$ )、ラット (NC) でヒト (16.1%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Nifedipine :

Nifedipine は溶解性は低い、膜透過性は良好な BCS クラス II に分類され、CYP3A 基質に該当する薬物である。ラットに関しては、Choi らによって nifedipine のラットにおける BA は 15.8%との報告[61]があり、今回得られたラットにおける BA (37.8%) は Choi らの結果と差が生じた。この差が生じた要因としては、経口投与に関して今回の評価では 0.5 mg/kg で投与したのに対して、Choi らは 10 mg/kg での投与であり、溶解度に起因したものと考えられた。今回の評価では nifedipine の各動物種における BA はヒト (41.2%) と比較しラット (37.8%) では同等であったが、ミニブタ (14.0%) 及びマウス (11.7%) は低かった。また、 $F_h$  はヒト (46.4%) と比較しミニブタ (78.8%)、マウス (89.3%) 及びラット (82.8%) では比較的高かったが、 $F_a \cdot F_g$  ではミニブタ (17.8%)、マウス (13.1%)、ラット (45.7%) でヒト (88.8%) より低値を示した。

#### Pitavastatin :

Pitavastatin は膜透過性が良好で、P-gp、MRP2 及び BCRP といったトランスポーターの基質に該当する薬物である。マウスに関しては、Karibe らによって pitavastatin のマウスにおける BA は 9.29%との報告[62]があり、今回得られたマウスにおける BA (3.7%) は Karibe らの結果と比較的乖離はなく低 BA であった。今回の評価では pitavastatin の各動物種における BA はヒト (53%) と比較しミニブタ (3.3%)、マウス (3.7%) 及びラット (22.9%) いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (7.1%)、マウス (4.3%)、ラット (33.9%) でヒト (95.7%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Pravastatin :

溶解性は良好であるが、膜透過性は低い BCS クラス III に分類され、MRP2 のトランスポーターの基質に該当する薬物である。マウス及びラットに関しては、Higgins ら及び Koitabashi らによって pravastatin のマウス及びラットにおける BA は 0.2%及び<0.1%との報告[63, 64]があり、今回得られたマウス及びラットにおける BA (1.6%及び1.2%) は既報の結果と比較的乖離はなく低 BA であった。今回の評価では pravastatin の各動物種における BA はヒト (19.1%) と比較しミニブタ (1.5%)、マウス (1.6%) 及びラット (1.2%) いずれも低値を示した。なお、ヒト及びミニブタにおける  $CL_b$  は  $Q_h$  付近となり  $F_h$  は 0%付近と計算されたため、 $F_a \cdot F_g$  を算出することはできなかった。なお、Singhvi らは、 $[^{14}C]$  pravastatin を用いた検討により、ヒトにおける pravastatin の  $F_a \cdot F_g$  は約 34%であることを報告[43]しており、ヒトよりマウス (2.0%)、ラット (2.0%) は低値であった。

#### Propranolol :

Propranolol は膜透過性及び溶解性が良好であり、肝代謝型の薬物である。ラットに関しては、Vercruysse らによって propranolol のラットにおける BA は約 5%との報告[65]があり、今回得られたラットにおける BA (1.8%) は Vercruysse らの結果と比較的乖離はなく低 BA であった。なお、Letendre らは、ラットにおける propranolol の  $F_a \cdot F_g$  を約 24%と報告[66]しているが、今回の評価では計算上  $F_h$  が 0%付近であったことから  $F_a \cdot F_g$  を算出することはできなかった。今回の評価では propranolol の各動物種における BA はヒト (26%) と比較しミニブタ (12.3%)、マウス (1.1%) 及びラット (1.8%) いずれも低く、その主要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ (20.5%)、マウス (5.6%)、ラット (NC、約 24%[66]) でヒト (74.7%) より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Raloxifene :

Raloxifene は膜透過性がやや低く、グルクロン酸抱合代謝を受ける薬物である。ラットにおいても、小腸マイクロソーム画分を用いた評価によってグルクロン酸抱合代謝を受けることが分かっており、 $F_a \cdot F_g$  は 16%と低値を示すことが Kosaka らによって報告されている[67]。またラットにおける raloxifene の BA は 4.8%との報告[67]があり、今回得られたラットにおける BA (4.4%) は Kosaka らの結果と乖離はなく低 BA であった。今回の評価では raloxifene の各動物種における BA はヒト (2%) と比較しミニブタ (1.3%)、マウス (1.4%) 及びラット (4.4%) で同程度であった。また、 $F_a \cdot F_g$  及び  $F_h$  に関してはマウスを除きヒト、ミニブタ及びラットで大きな乖離はなかった。

#### Sulfasalazine :

Sulfasalazine は溶解性及び膜透過性ともに低い BCS クラス IV に分類され、大腸に内在する腸内細菌叢により代謝を受ける薬物である。ラットに関しては、Zamek-Gliszczyński らによって sulfasalazine のラットにおける BA は 1.4%との報告[68]があり、今回得られたラットにおける BA (4.4%) は Zamek-Gliszczyński らの結果と比較的乖離はなく低 BA であった。今回の評価では sulfasalazine の各動物種における BA はヒト (6%) と比較しミニブタ (6.4%)、マウス (1.6%) 及びラット (4.4%) で同程度であった。また、 $F_a \cdot F_g$  及び  $F_h$  についてもいずれの種でも大きな乖離はなかった。

#### Timolol :

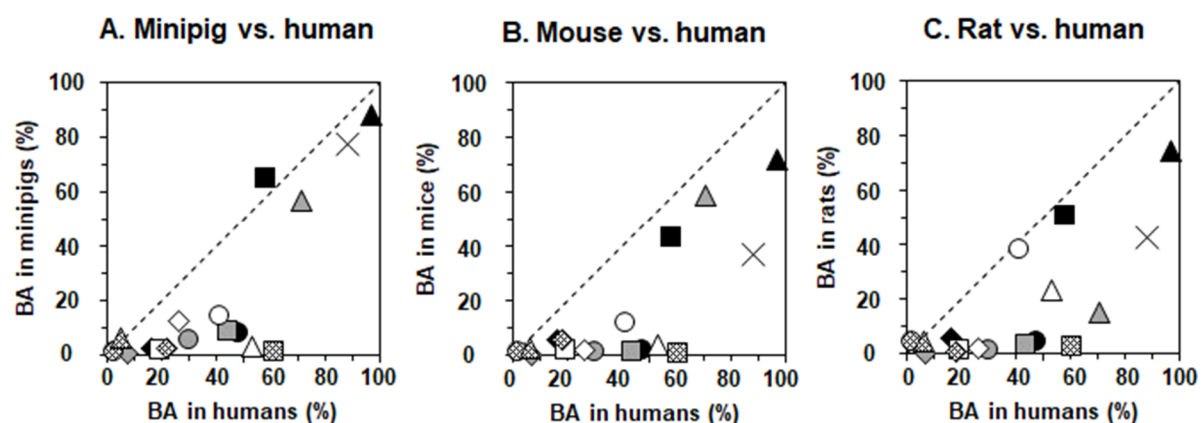
Timolol は膜透過性及び溶解性が良好であり、薬物代謝酵素である CYP2D により主に代謝される塩基性薬物である。ラットに関しては、Komura らによって timolol を静脈内投与後のラットにおける  $CL_p$  は 75.7 mL/min/kg との報告[69]があり、今回得られたラットにおける  $CL_p$  (56.0 mL/min/kg) は Komura らの報告と比較的乖離はなく代謝は速かった。今回の評価では timolol の各動物種における BA はヒト (61%) と比較しミニブタ (1.3%)、マウス (0.4%) 及びラット (2.0%) いずれも低かった。その主要因としてマウスでは肝代謝が速く  $F_h$  が 0%付近であったため  $F_a \cdot F_g$  を算出する

ことができなかったが、 $F_a \cdot F_g$ がミニブタ（2.7%）、ラット（6.2%）でヒト（96.2%）より著しく低かったことに由来すると考えられた。

#### Verapamil :

Verapamil は膜透過性及び溶解性が良好であり、薬物代謝酵素である CYP3A により主に代謝される塩基性薬物である。ラットに関しては、Choi らによって verapamil のラットにおける BA は 3.9% との報告[70]があり、今回得られたラットにおける BA（0.2%）は Choi らの結果と比較的乖離はなく低 BA であった。今回の評価では verapamil の各動物種における BA はヒト（18%）と比較しミニブタ（2.2%）、マウス（5.5%）及びラット（0.2%）いずれも低く、その主な要因として  $F_a \cdot F_g$  がミニブタ（8.5%）、マウス（13.0%）、ラット（0.3%）でヒト（54.7%）より著しく低かったことに由来すると考えられた。

以上、今回用いたすべてのモデル薬物のデータを基に、ヒトとミニブタ、マウス及びラットにおける経口投与後の吸収特性に関して速度論的解析を行った。まず、経口投与後の BA を比較した結果、評価した 17 種のモデル薬物の内、antipyrene、atenolol、raloxifene 及び sulfasalazine に関しては、種間で BA はほぼ同等であった。しかしながら、その他の薬物ではヒトと比較し、ミニブタ、マウス及びラットの動物の方が BA は低値であった（Figure 2）。なお、マウスやラットの BA に関しては、これまで報告されている文献値と大きな乖離はなかった。

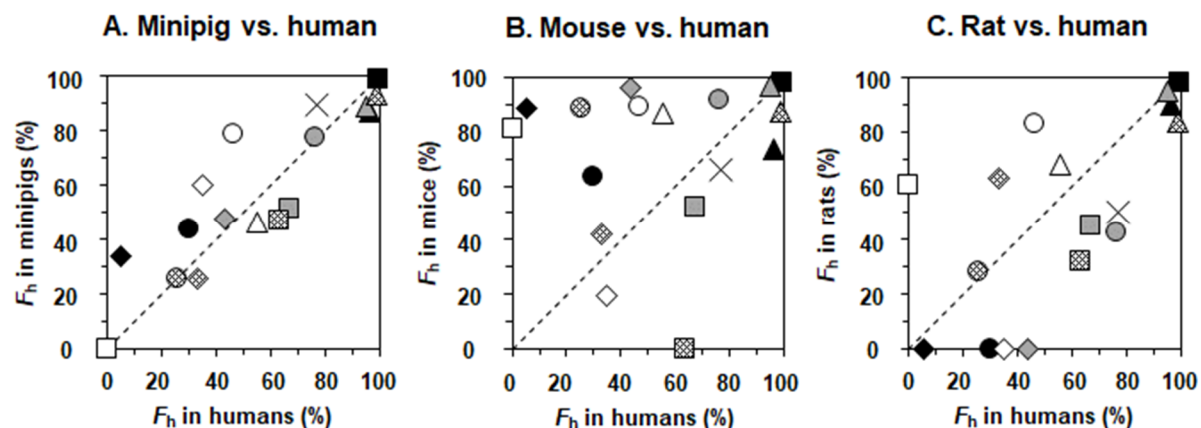


**Figure 2** Plots of the values of the oral bioavailability (BA) in each animal vs. actual values in humans measured after oral administration of 17 drugs.

The following species were used: A, minipigs; B, mice; C, rats. Each point represents the mean value of three animals. Dashed lines represent lines of unity. Each symbol represents ×, acetaminophen; ●, amitriptyline; ▲, antipyrene; ■, atenolol; ◆, felodipine; ○, fexofenadine; △, furosemide; □, midazolam; ◇, nifedipine; △, pitavastatin; □, pravastatin; ◇, propranolol; ⊗, raloxifene; ▲, sulfasalazine; ⊠, timolol; and ◆, verapamil.



次にヒトと各動物における  $F_h$  の相関性を検討した結果、ミニブタの  $F_h$  はヒトの  $F_h$  と良好な相関を示す傾向にあり、ミニブタとヒトにおける肝での初回通過効果は同程度であったと推察された (Figure 3)。一方、ヒトとマウス又はラットとの間における  $F_h$  の相関性は不明瞭であった。

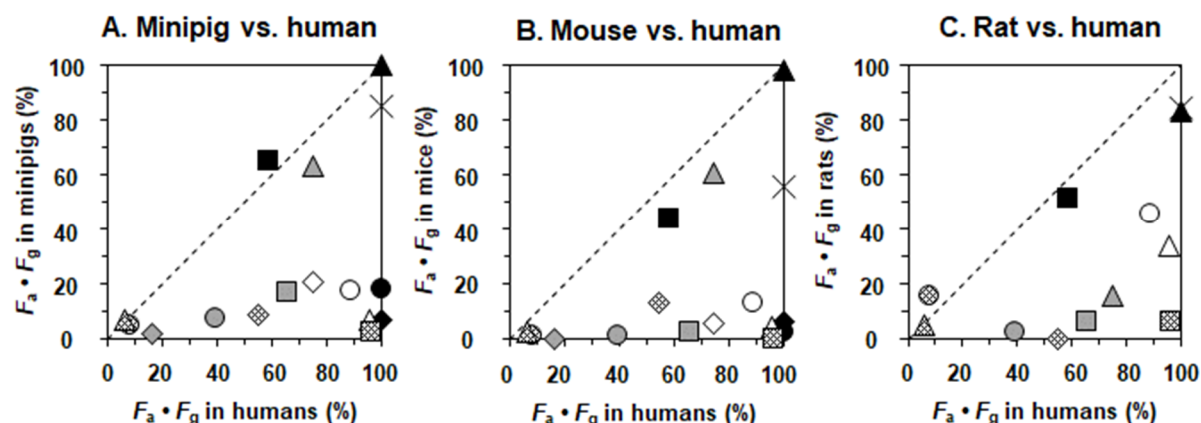


**Figure 3** Plots of the values of the hepatic availability ( $F_h$ ) in each animal vs. actual values in humans measured after oral administration of 17 drugs.

The following species were used: A, minipigs; B, mice; C, rats. Each point represents the mean value of three animals. Dashed lines represent lines of unity. Each symbol represents ×, acetaminophen; ●, amitriptyline; ▲, antipyrine; ■, atenolol; ◆, felodipine; ○, fexofenadine; △, furosemide; □, midazolam; ◇, nifedipine; △, pitavastatin; □, pravastatin; ◇, propranolol; ⊗, raloxifene; ▲, sulfasalazine; ⊠, timolol; and ◇, verapamil.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Fig. 1

最後に経口吸収評価に大きく影響する  $F_a \cdot F_g$  に関してヒトと動物における相関性を検討した結果、BA がほぼ同等であった antipyrine、atenolol、raloxifene 及び sulfasalazine を除いて、ヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットの動物において  $F_a \cdot F_g$  は低い値であった (Figure 4)。とりわけ、CYP3A 基質となる felodipine、midazolam、nicardipine、nifedipine 及び verapamil や CYP2D 基質となる amitriptyline、propranolol 及び timolol ではヒトと比較しミニブタで顕著に低かった。また、OATP1Bs や P-gp (fexofenadine) 及び OATP1B1 (pitavastatin) トランスポーターの基質においても 3 種の実験動物ともヒトより  $F_a \cdot F_g$  は低値であった (Table 2)。



**Figure 4** Plots of the values of the fraction absorbed from gastro-intestinal tract ( $F_a \cdot F_g$ ) in each animal vs. actual values in humans measured after oral administration of 17 drugs.

The following species were used: A, minipigs; B, mice; C, rats. Each point represents the mean value of three animals. Dashed lines represent lines of unity. Each symbol represents  $\times$ , acetaminophen;  $\bullet$ , amitriptyline;  $\blacktriangle$ , antipyrine;  $\blacksquare$ , atenolol;  $\blacklozenge$ , felodipine;  $\bigcirc$ , fexofenadine;  $\triangle$ , furosemide;  $\square$ , midazolam;  $\diamond$ , nifedipine;  $\triangleleft$ , pitavastatin;  $\square$ , pravastatin;  $\diamond$ , propranolol;  $\odot$ , raloxifene;  $\triangleleft$ , sulfasalazine;  $\boxtimes$ , timolol; and  $\diamond$ , verapamil.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Fig. 1

各パラメータがヒトと動物種でどの程度同等であるのかを評価する指標の一つとして Average-fold error (AFE) が挙げられる。AFE は eq. (7) によって算出される。

$$AFE = 10^{\left\{ \frac{1}{N} \times \left[ \sum \left| \log \left( \frac{\text{Predicted}}{\text{Actual}} \right) \right| \right] \right\}} \quad \text{eq. (7)}$$

ここで、 $N$  は評価化合物数、Predicted は比較する動物におけるパラメータの数値又は予測値、Actual はヒトにおけるパラメータの数値を示す。AFE は比較するすべてのパラメータの値が種間で一致した際には 1 となり、種間で値が外れるほど 1 より大きくなる指標となる。そのため、比較したパラメータの AFE が 1 に近づくほど、それらの間の相関は高いことを表す。ヒトとミニブタ、マウス又はラットとの間における  $BA$ 、 $F_h$  及び  $F_a \cdot F_g$  の関係に関して AFE で比較した結果、いずれのパラメータともにミニブタとヒトとの間における AFE が一番小さく、マウスやラットよりもミニブタの方がヒトの  $BA$ 、 $F_h$  及び  $F_a \cdot F_g$  に相関することが示唆された。中でもミニブタとヒトの  $F_h$  を比較した場合の AFE は 1.32 となり、ミニブタの肝臓での薬物代謝プロファイルはヒトと極めて類似していることが明らかとなった。(Table 2)。

**Table 2 BA,  $F_h$  and  $F_a \cdot F_g$  values of each drug calculated from the pharmacokinetic parameters after oral and intravenous administration.**

Drugs	Mice (%)			Rats (%)			Minipigs (%)			Humans (%)		
	BA	$F_h$	$F_a \cdot F_g$	BA	$F_h$	$F_a \cdot F_g$	BA	$F_h$	$F_a \cdot F_g$	BA	$F_h$	$F_a \cdot F_g$
Acetaminophen	36.8	66.2	55.6	42.6	50.4	84.5	76.4	89.8	85.1	88	76.8	100.0
Amitriptyline	1.6	63.7	2.5	4.4	$\approx 0$	NC	7.9	43.7	18.1	47.7	30.0	100.0
Antipyrine	72.0	73.3	98.2	74.6	89.7	83.2	88.5	87.1	100.0	97	96.2	100.0
Atenolol	43.0	97.8	44.0	50.4	97.6	51.6	64.9	99.3	65.4	58	99.3	58.4
Felodipine	5.6	88.7	6.3	5.1	$\approx 0$	NC	2.4	33.7	7.1	16	5.3	100.0
Fexofenadine	0.9	91.7	1.0	1.0	42.8	2.3	5.8	77.8	7.5	30	76.2	39.4
Furosemide	58.9	96.6	61.0	14.9	94.7	15.7	56.6	89.0	63.6	71	95.1	74.7
Midazolam	1.2	52.0	2.3	2.7	45.3	6.0	8.7	51.6	16.9	44	67.1	65.6
Nicardipine	< 0.1	96.0	$\approx 0$	< 0.1	$\approx 0$	NC	0.8	47.7	1.7	7	43.5	16.1
Nifedipine	11.7	89.3	13.1	37.8	82.8	45.7	14.0	78.8	17.8	41.2	46.4	88.8
Pitavastatin	3.7	86.7	4.3	22.9	67.6	33.9	3.3	46.2	7.1	53	55.4	95.7
Pravastatin	1.6	81.1	2.0	1.2	60.5	2.0	1.5	$\approx 0$	NC	19.1	$\approx 0$	NC
Propranolol	1.1	19.8	5.6	1.8	$\approx 0$	NC	12.3	59.9	20.5	26	34.8	74.7
Raloxifene	1.4	88.8	1.6	4.4	28.6	15.4	1.3	25.8	5.0	2	25.6	7.8
Sulfasalazine	2.2	87.0	2.5	4.4	83.6	5.3	6.4	93.1	6.9	6	98.7	6.1
Timolol	0.4	$\approx 0$	NC	2.0	32.4	6.2	1.3	47.3	2.7	61	63.4	96.2
Verapamil	5.5	42.2	13.0	0.2	62.9	0.3	2.2	25.8	8.5	18	32.9	54.7
AFE	7.65	3.58	7.99	6.58	6.52	4.39	3.94	1.32	3.85			
N	17	17	15	17	17	12	17	17	16			

The BA value in mice, rats, and minipigs represents the mean value of three animals.

Data in humans are cited from the literature.

NC, not calculated.

AFE; Average-fold error of humans vs animals. The values of  $< 0.1$ ,  $\approx 0$  were regarded as 0.1 in calculations.

NC was excluded in calculations.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Table 2

### 1.1.2 肝及び小腸代謝に関する *in vitro* による評価

各種市販薬物を用いた BA ( $F_a \cdot F_g \cdot F_h$ ) の評価において、 $F_a \cdot F_g$  及び  $F_h$  でヒトとミニブタ、マウス及びラットに種差が認められた。この種差の原因の一つとして、代謝能の違いが考えられたため、評価した 17 種のモデル薬物を対象に各動物種の肝及び小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験を実施し、各動物種における固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を評価した。

$CL_{int}$  は eq. (8) によって算出される[71]。

$$CL_{int} = \frac{V_{init}}{C_{init}} \quad \text{eq. (8)}$$

ここで、 $V_{init}$  は評価薬物の初期における代謝速度、 $C_{init}$  は初期濃度を示す。

Figure 5 及び Table 3 に、各モデル薬物のヒト、ミニブタ、マウス及びラットにおける肝及び小腸  $CL_{int}$  を示した。以下に、各モデル薬物の結果に関してその特徴を論述する。

#### CYP3A 基質 (felodipine、midazolam、nicardipine、nifedipine 及び verapamil)

Felodipine はヒト及びラットの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.08~0.15 及び 0.50~0.63 mL/min/mg protein [72]との報告があり、今回得られた結果 (0.346 及び 0.524 mL/min/mg protein) と大きな乖離はなかった。今回の評価では肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝に関してはヒトとミニブタは同程度であり、 $CL_{int}$  はともに比較的高かった。

Midazolam はヒトの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.353 mL/min/mg protein [73]との報告があり、今回得られた結果 (0.614 mL/min/mg protein) と同様  $CL_{int}$  は高かった。また、ヒト、マウス及びラット小腸ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.0939~0.157、0.118~0.301 及び 0.0134~0.0311 mL/min/mg protein [74]との報告があり、今回得られた結果 (0.151、0.589 及び 0.018 mL/min/mg protein) と比較的乖離はなかった。今回の評価では肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝に関してはヒトとミニブタは同程度であり、 $CL_{int}$  はともに比較的高かった。

Nicardipine はヒトの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 1.719 mL/min/mg protein [75]との報告があり、今回得られた結果 (1.250 mL/min/mg protein) と同様  $CL_{int}$  は高かった。今回の評価では肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝に関してはヒトとミニブタは同程度であり、 $CL_{int}$  はともに高かった。

Nifedipine はヒト及びラットの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.096 及び 0.243 mL/min/mg protein [75, 76]との報告があり、今回得られた結果 (0.260 及び 0.355 mL/min/mg protein) と同様  $CL_{int}$  は比較的高かった。また、ラット小腸ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.00269 mL/min/mg protein [76]との報告があり、今回得られた結果 (0.003 mL/min/mg protein) と乖離はなかった。今回の評価では肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝に関してはヒトとミニブタは同程度であり、 $CL_{int}$  はともに高かった。

Verapamil はヒトの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.01256 mL/min/mg protein [77]との報告があり、今回得られた結果 (0.035 mL/min/mg protein) と大きな乖離はなかった。今回の評価では小腸ミクロソーム代謝に関しては、いずれの種も  $CL_{int}$  は低く、種間で大きな種差はなかった。また、肝ミクロソーム CYP 代謝に関しても、ヒトとミニブタで同程度であった。

#### CYP2D 基質 (amitriptyline、propranolol 及び timolol)

Amitriptyline はヒトの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.017 mL/min/mg protein [73]との報告があり、今回得られた結果 (0.006 mL/min/mg protein) と大きな乖離はなく、ヒトでは比較的  $CL_{int}$  は低かった。今回の評価では小腸ミクロソーム UGT 代謝を除き、肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝に関してはヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットの  $CL_{int}$  は高い傾向にあった。とりわけ、肝ミクロソーム CYP 代謝ではラットの  $CL_{int}$  が一番高く  $F_h$  とも相関する傾向にあった。また、小腸ミクロソーム CYP 代謝に関しても  $F_a \cdot F_g$  の種差と相関する傾向にあった。

Propranolol は主に CYP2D、1A、2C など代謝され、ヒトの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.013 mL/min/mg protein [75]との報告があり、今回得られた結果 (0.012 mL/min/mg protein) と乖離はなかった。今回の評価では小腸ミクロソーム代謝に関しては、いずれの種も  $CL_{int}$  は低く、種間で大きな種差はなかったが、肝ミクロソーム CYP 代謝に関しては、ヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットで高値であった。とりわけ、肝ミクロソーム CYP 代謝ではラットの  $CL_{int}$  が一番高く  $F_h$  とも相関する傾向にあった。

Timolol はヒト及びラットの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は約 0.004 及び 0.380 mL/min/mg protein [78, 69]との報告があり、今回得られた結果 (0.010 及び 0.675 mL/min/mg protein) と大きな乖離はなかった。今回の評価では肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝に関しては、ヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットで高値であった。

#### non-CYP 代謝 (acetaminophen 及び raloxifene)

Acetaminophen はヒトの肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.0081 mL/min/mg protein [73]との報告があり、今回得られた結果 (0.021 mL/min/mg protein) と大きな乖離はなく、ヒトでは比較的  $CL_{int}$  は低かった。またラットの肝ミクロソームグルクロン酸抱合 (UGT) 代謝における  $CL_{int}$  は 0.00025 mL/min/mg protein [79]との報告があり、今回得られた結果 (0.002 mL/min/mg protein) も今回評価時の定量下限 (0.001 mL/min/mg protein) 付近で、ごく僅かであった。今回の評価では肝ミ

クロソーム CYP 代謝及び小腸ミクロソーム UGT 代謝に関しては評価動物種間で概ね同程度であり、小腸ミクロソーム CYP 代謝においてもヒトとミニブタは同程度であった。

Raloxifene は主に UGT で代謝され、ヒト及びラットの肝ミクロソーム UGT 代謝における  $CL_{int}$  は 3.284 及び 0.992 mL/min/mg protein [67]との報告があり、今回得られた結果 (0.521 及び 0.209 mL/min/mg protein) と数値は異なったが、種間での大小関係に大きな乖離はなかった。数値の差に関しては、UGT 代謝試験の反応条件が異なることに起因すると考えられた。なお、ヒト肝ミクロソーム CYP 代謝における  $CL_{int}$  は 0.119 mL/min/mg protein [67]との報告があり、今回得られた結果 (0.073 mL/min/mg protein) と乖離はなかった。今回の評価では肝及び小腸ミクロソーム CYP 代謝はヒトとミニブタで同程度であり、UGT 代謝に関してもヒトとミニブタで同程度であった。

ヒト、ミニブタ、マウス及びラットの肝及び小腸ミクロソームを用いた CYP 又は UGT 代謝について検討した結果、CYP2D 基質の薬物ではヒトよりミニブタ、マウス及びラットの方が肝  $CL_{int}$  は高い傾向にあった。また、小腸においても amitriptyline 及び timolol ではヒトよりミニブタの方が小腸  $CL_{int}$  は高い傾向にあった。なお、CYP2D 基質以外の薬物では、ヒトとミニブタにおける  $CL_{int}$  の値に顕著な種差は認められなかった (Table 3)。

*In vitro*  $CL_{int}$  に関するヒトとの相関性については、ミニブタ、マウス及びラットいずれの種も、小腸においては相関性が低く、肝においての方が相関性は高い傾向にあった (Figure 5)。中でも、ヒトとミニブタにおける肝  $CL_{int}$  の関係は AFE も最も小さく (Table 3)、*in vivo*  $F_h$  との関係 (Figure 3 A) と同様に、最もよく相関する結果であった。

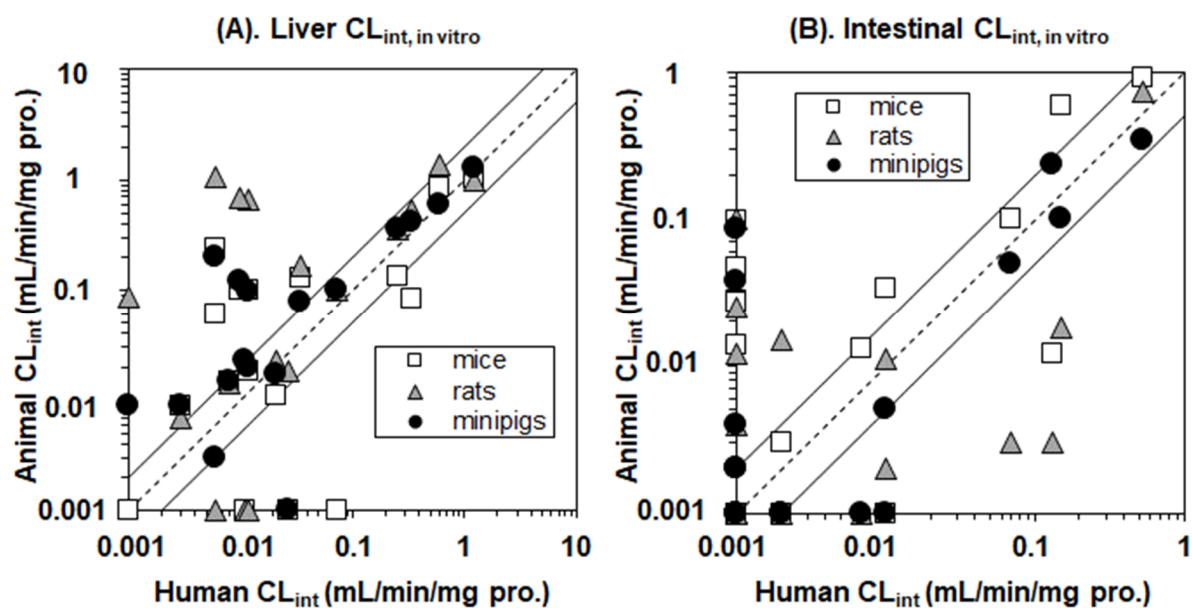


Figure 5 Plots of the values of the in vitro intrinsic clearance  $CL_{int}$ , *in vitro* in hepatic (A) and intestinal (B) microsomes in each animal vs. human evaluated of 17 drugs.

Each point represents the mean value of duplicated experiments. Dashed lines represent lines of unity.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Fig. 2

**Table 3 The intrinsic clearance of drugs calculated from *in vitro* metabolic study using liver and intestine microsomes.**

Drugs	CL <sub>int</sub> in liver microsomes (mL/min/mg protein)				CL <sub>int</sub> in intestine microsomes (mL/min/mg protein)							
	Oxidation metabolism				Oxidation metabolism				Glucuronidation metabolism			
	Species	Mice	Rats	Minipigs	Humans	Mice	Rats	Minipigs	Humans	Mice	Rats	Minipigs
Acetaminophen	0.011	0.023	0.017	0.021	0.028	0.012	< 0.001	< 0.001	0.003	0.002	< 0.001	0.002
Amitriptyline	0.243	1.060	0.198	0.006	0.099	0.025	0.085	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Antipyrine	< 0.001	< 0.001	0.023	0.011	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	0.008	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Atenolol	< 0.001	0.018	< 0.001	0.027	0.013	< 0.001	< 0.001	0.007	0.005	0.011	0.003	< 0.001
Felodipine	0.085	0.524	0.412	0.346	0.012	0.003	0.232	0.133	0.005	< 0.001	0.006	0.002
Fexofenadine	0.009	0.007	0.009	0.003	< 0.001	< 0.001	0.004	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001
Furosemide	0.060	< 0.001	0.003	0.006	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.001
Midazolam	0.866	1.350	0.591	0.614	0.589	0.018	0.101	0.151	0.008	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Nicardipine	1.030	0.971	1.250	1.250	0.898	0.742	0.342	0.528	0.018	< 0.001	0.002	< 0.001
Nifedipine	0.135	0.355	0.355	0.260	0.102	0.003	0.050	0.070	0.011	< 0.001	0.010	0.027
Pitavastatin	0.015	0.014	0.015	0.008	0.003	0.015	< 0.001	0.002	0.007	0.009	< 0.001	0.006
Pravastatin	0.018	< 0.001	0.020	0.012	0.014	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.008	< 0.001	0.008
Propranolol	0.100	0.651	0.098	0.012	< 0.001	0.002	0.005	0.010	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.001
Raloxifene	< 0.001	0.102	0.100	0.073	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002	0.218	0.209	0.539	0.521
Sulfasalazine	< 0.001	0.087	0.009	< 0.001	0.034	0.011	< 0.001	0.010	NC	NC	NC	NC
Timolol	0.101	0.675	0.121	0.010	0.047	0.101	0.038	< 0.001	0.004	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Verapamil	0.131	0.170	0.079	0.035	0.027	0.004	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
AFE	4.93	5.88	3.08	-	5.08	5.03	3.04	-	-	-	-	-



Each value represents the mean of duplicate determinations. NC, not calculated. AFE; Average-fold error of humans vs animals. The values of < 0.001 were regarded as 0.001 in calculations.

*J Drug Deliv Sci Technol., 58, 101743 (2020), Table S1 (supplementary material)*

## 1.2 速度的 BA (rate of bioavailability) に関する評価

### 1.2.1 消化管通過時間に関する評価

経口吸収では、GER や GI 運動性[11, 12, 13, 14, 15]が種差により異なることで、実験動物とヒトの間で薬物吸収が相関しない結果を引き起こす原因の一つとなり得ることが挙げられている。そこで、本項ではヒトとミニブタにおける薬物が消化管を通過する時間に関して検討した。また、比較対象動物としてマウス及びラットでも同様な評価を行った。

消化管通過時間 (GI transit time, GITT) は、sulfasalazine を用いて評価した。Sulfasalazine は小腸から吸収され難いが、大腸に内在する腸内細菌叢 (azoreductase) により代謝を受け sulfapyridine に代謝されることで、sulfapyridine として吸収性が高くなる薬物である。そのため、sulfasalazine を経口投与し、血中に sulfapyridine 濃度が検出され始めるまでの時間 ( $T_{\text{first}}$ ) 帯を GITT として評価する方法が報告されている[80]。また、GER に関しては、acetaminophen における平均吸収時間 (mean absorption time, MAT) によって推定した。MAT は eq. (9)によって算出される。

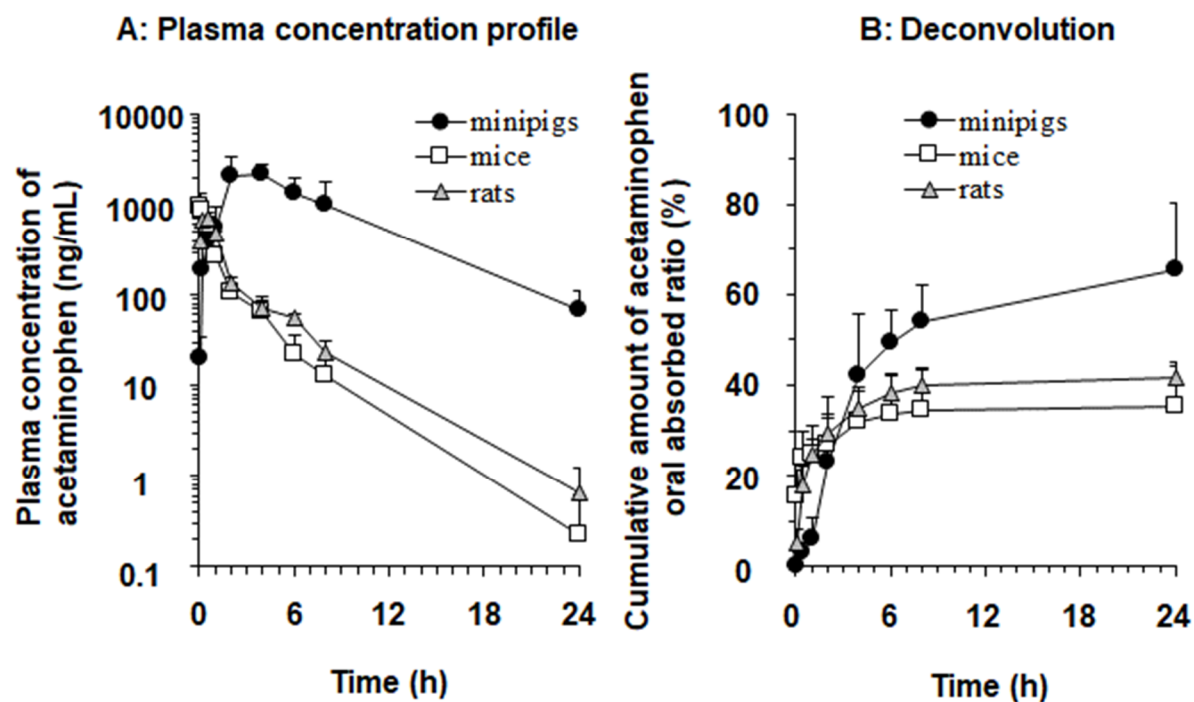
$$\text{MAT} = \text{MRT}_{\text{po}} - \text{MRT}_{\text{iv}} \quad \text{eq. (9)}$$

ここで、 $\text{MRT}_{\text{po}}$  及び  $\text{MRT}_{\text{iv}}$  は、acetaminophen を動物に経口投与及び静脈内投与後の平均滞留時間 (mean residence time) を示す。Acetaminophen は胃からは吸収され難く、小腸では高い膜透過性を示し、小腸上部でも速やかに吸収される。そのため、acetaminophen の MAT は GER に相当すると考えられ、これまで多くの報告で GER の評価に利用されている[14, 15, 81]。Acetaminophen 及び sulfasalazine を経口投与した際の acetaminophen 及び sulfasalazine の累積薬物経口吸収量を評価するために、それぞれの静脈内投与及び経口投与後の血漿中濃度推移から Phoenix WinNonlin 6.4 解析ソフトを用いて deconvolution 法により累積薬物経口吸収量を算出した。

ミニブタ、マウス及びラットに acetaminophen 又は sulfasalazine を経口投与した際の acetaminophen 又は sulfapyridine の血漿中濃度推移及び acetaminophen 又は sulfasalazine の累積薬物経口吸収量の推移を Figure 6、Figure 7 に示した。また、acetaminophen 及び sulfasalazine 又は sulfapyridine のヒト、ミニブタ、ラット及びマウスにおける  $\text{MRT}_{\text{po}}$ 、MAT 及び体循環中に各濃度が検出され始めた時間 ( $T_{\text{first}}$ ) を Table 4 に示した。なお、ヒトの結果は文献より引用した。

ミニブタにおける acetaminophen の MAT は 3.82 h であり、ヒト (0.7~0.8 h [81]) やマウス (1.66 h) 及びラット (1.44 h) よりも顕著に長い結果であった。MAT は吸収速度定数 ( $k_a$ ) の逆数であることから、acetaminophen の  $k_a$  はミニブタで  $0.262 \text{ h}^{-1}$ 、ヒトで  $1.25 \sim 1.43 \text{ h}^{-1}$ 、マウスで  $0.602 \text{ h}^{-1}$  及びラットで  $0.694 \text{ h}^{-1}$  と算出され、ミニブタでは  $k_a$  が小さく、acetaminophen の吸収は主に胃排出によって速度が制限されるため、ミニブタではヒトやマウス、ラットよりも GER が遅いことが示唆された。

加えて、ミニブタにおける acetaminophen の累積経口吸収量は投与後 24 時間まで持続的に増加する一方、マウス及びラットでは約 6 時間で増加がほぼ頭打ちする結果であった。本結果より、ミニブタではヒトやマウス、ラットと比較し、経口投与された薬物の GER は遅く、小腸から徐々にかつ持続的に消化管から吸収されると考えられた。

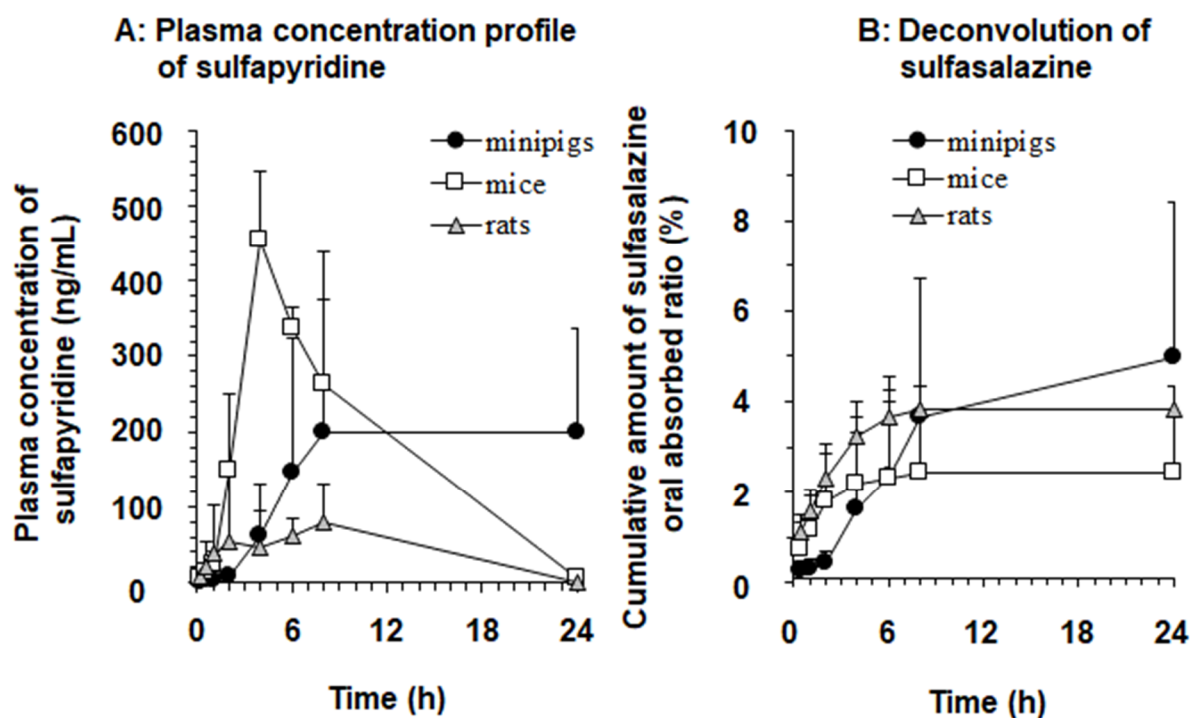


**Figure 6** Plasma concentration-time profiles of acetaminophen and cumulative amounts of acetaminophen after oral acetaminophen administration at a dose of 5 mg/kg in fasted animals.

Each symbol represents □, mice; △, rats; and ●, minipigs. Each point represents the mean + S.D. of three animals.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Fig. 3

Sulfasalazine を経口投与し、血漿中に sulfapyridine を検出した  $T_{\text{first}}$  は、ミニブタでは 2~4 h、マウスでは 0.5~1 h 及びラットでは 0.5~4 h であった。そのため、ミニブタにおける GITT は 2~4 h と推定され、ヒトにおける GITT は 3~4 h との報告[82]があり、ミニブタはヒトと同程度の GITT であると考えられた。しかしながら、sulfasalazine を経口投与した際の sulfasalazine の累積経口吸収量は、ミニブタでは 24 時間まで持続的に増加することが確認され、acetaminophen と同様に持続的に消化管吸収される可能性が示唆された。



**Figure 7** Plasma concentration-time profiles of sulfapyridine (A) and cumulative amounts of sulfasalazine (B) after oral sulfasalazine administration at a dose of 1 mg/kg in fasted animals.

Each symbol represents  $\square$ , mice;  $\triangle$ , rats; and  $\bullet$ , minipigs. Each point represents the mean + S.D. of three animals.

*J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Fig. 3

**Table 4** Pharmacokinetic parameters after oral administration of acetaminophen and sulfasalazine in mice, rats, minipigs and humans.

Species	Acetaminophen			Sulfasalazine			Sulfapyridine
	MRT <sub>po</sub>	MAT	T <sub>first</sub>	MRT <sub>po</sub>	MAT	T <sub>first</sub>	
	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	T <sub>first</sub> (h)
Mice	2.22	1.66	0.0833	2.03	0.707	0.0833	0.5 – 1
Rats	2.64	1.44	0.0833	2.78	2.40	0.0833	0.5 – 4
Minipigs	6.33	3.82	0.0833	7.99	4.36	0.194	2 – 4
Humans	2.52	0.7 – 0.8	-	-	-	-	3 – 4

T<sub>first</sub>, The first time point of sulfasalazine detected in the systemic circulation.

Each value in mice, rats, and minipigs represents the mean value of three animals.

Human PK parameters were cited from the reference literature [81, 82].

### 1.2.2 各種市販薬物を用いた $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 及び $C_{\max}/AUC$ 比較

消化管通過時間に関する評価では、ミニブタではヒトやマウス、ラットと比較し、経口投与された薬物の GER が遅く、小腸から徐々にかつ持続的に消化管から吸収されると考えられた。そこで、本項ではミニブタにおける本遅延の影響を検証するため、評価した 17 種のモデル薬物を対象にミニブタ、マウス及びラットに経口投与した際の、各動物種における  $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$  及び  $C_{\max}/AUC$  を比較評価した (Figure 8、Table 5)。

Pravastatin 及び verapamil を除き、ミニブタは、マウス及びラットよりも  $T_{\max}$  は遅かった。また、いずれの薬剤においても  $C_{\max}/AUC$  はマウス及びラットよりもミニブタで低値を示した。これらの結果から、ミニブタでは経口投与された薬物の胃排出が遅く徐々にかつ持続的に排出されるために、ミニブタでは薬物血漿中濃度推移が他動物と比較し、 $T_{\max}$  が遅く長時間持続する特徴を有することが確認された。

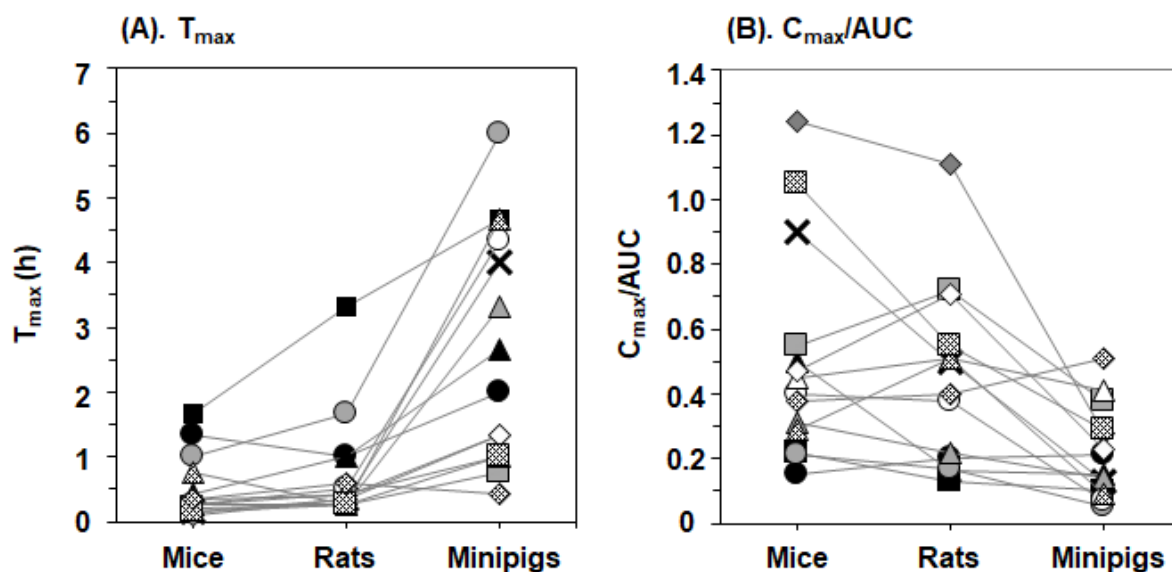


Figure 8  $T_{\max}$  and  $C_{\max}/AUC$  of 14 drugs in mice, rats and minipigs.

Felodipine, pravastatin and raloxifene were excluded because of too long  $T_{\max}$  (> 10 h) in minipigs (felodipine and raloxifene) and in mice (pravastatin). Each symbol represents ×, acetaminophen; ●, amitriptyline; ▲, antipyrine; ■, atenolol; ○, fexofenadine; △, furosemide; □, midazolam; ◇, nifedipine; △, pitavastatin; ◇, propranolol; △, sulfasalazine; ▤, timolol; and ◇, verapamil.

**Table 5** The values of  $T_{max}$ ,  $C_{max}$  and  $C_{max}/AUC$  after oral administration of each drug in mice, rats and minipigs.

Species  Drugs	Mice			Rats			Minipigs		
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	$C_{max}/AUC$	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	$C_{max}/AUC$	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	$C_{max}/AUC$
Acetaminophen	0.139	998	0.90	0.333	730	0.50	4.00	2610	0.13
Amitriptyline	1.33	3.33	0.15	1.00	6.51	0.20	2.00	34.6	0.21
Antipyrine	0.417	348	0.50	1.00	375	0.16	2.67	584	0.15
Atenolol	1.67	50.6	0.22	3.33	48.8	0.13	4.67	309	0.10
Felodipine	0.500	17.5	0.19	1.17	3.88	0.15	24.0	2.06	0.08
Fexofenadine	1.00	4.90	0.21	1.67	1.53	0.17	6.00	10.1	0.05
Furosemide	0.250	224	0.31	0.250	49.8	0.22	3.33	113	0.14
Midazolam	0.194	1.64	0.55	0.250	6.95	0.72	0.750	24.2	0.38
Nicardipine	0.0833	0.159	1.24	0.333	0.401	1.11	1.33	1.76	0.28
Nifedipine	0.250	69.0	0.40	0.500	210	0.38	4.33	17.8	0.07
Pitavastatin	0.250	33.6	0.45	0.417	156	0.51	1.00	14.4	0.41
Pravastatin	10.8	3.74	0.11	0.500	7.77	0.61	0.917	3.68	0.38
Propranolol	0.333	1.54	0.47	0.389	3.31	0.71	1.33	42.9	0.23
Raloxifene	4.67	9.94	0.08	4.67	13.2	0.11	24.0	3.75	0.08
Sulfasalazine	0.750	25.4	0.29	0.250	57.9	0.51	4.67	65.3	0.09
Timolol	0.139	1.54	1.05	0.250	9.66	0.55	1.00	6.92	0.29
Verapamil	0.333	10.2	0.38	0.583	0.950	0.40	0.417	7.36	0.51

Each value represents the mean value of three animals. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 58, 101743 (2020), Table S2 (supplementary material)

### 1.3 考察

ミニブタは、体格的な観点から、ヒトに適用可能な経口製剤を同じ大きさのまま投与可能なことや、動物愛護の観点から経口製剤評価動物として注目されている。しかし、医薬品開発において経口剤としての新規化合物の探索又は最適化を行う初期段階では、まず溶解性、膜透過性、代謝に関する *in vitro* 試験などで評価した後、マウスやラットなどの小動物を用いた *in vivo* 試験を実施し評価していくが、イヌ、サル及びミニブタといった大型動物での評価は、処理能力が低く、コストも高いため、前臨床試験の後期段階まではほとんど実施されない。更に、ミニブタは実験動物として注目を集めつつある段階であるため、経口剤開発過程におけるミニブタの有用性や動態特性に関する背景データは極めて乏しい状況にある。そこで、本章では物性の異なる 17 種の市販薬物を経口投与後の薬物の量的及び速度的な BA を算出し、ヒト又は他の実験動物（マウス及びラット）と比較することで、ミニブタの経口剤評価における有用性について検討した。

量的 BA を算出した結果、代謝酵素及び消化管トランスポーターの基質となる薬物では、ミニブタの量的 BA はヒトよりも低くなる傾向が認められた。これは、比較のために評価したマウスやラットにおいても同様であったため、その要因を速度論的に解析した。ヒトと各動物における  $F_h$  の相関を調べた結果、マウス及びラットでは有意な相関性は認められなかったのに対し、ヒトとミニブタの  $F_h$  は極めて良好な正の相関を示した。一方、 $F_a \cdot F_g$  は、いずれの動物においてもヒトと比較して低くなった。薬物の  $F_a$  に関しては、Amidon らがラット小腸における *in situ* 灌流法によって得られた見かけの薬物透過性とヒトでの  $F_a$  との間に良好な相関関係があることを報告している[83]。更に、Chiou らは、ラット、イヌ及びカンクイザルを対象に様々な薬物の  $F_a$  を検討し、それらはヒトの  $F_a$  とよく相関していることを報告している[5, 6, 40]。ミニブタにおける  $F_a$  に関するデータはほとんど報告されていない状況ではあるが、受動拡散によって消化管膜を透過する薬物では、ヒトと実験動物の間に顕著な  $F_a$  の種差はほとんど認められないといった報告があることから、ミニブタにおいてもヒトの  $F_a$  と相関する可能性を有していると考えられる。その他胃内 pH に関しては、絶食下における胃内 pH はミニブタとヒトで近いとの報告がある[84, 85]。本検討では、動物に投与した薬物量は raloxifene を除き、ヒトでの臨床評価時に投与された量とほぼ同等の dose number (Do) となるよう調整し経口投与した (Table 1)。そのため、本検討では消化管内における薬物量的な観点では評価動物種間で大きな違いはなく、量的な薬物溶解過程が経口吸収の種差に影響を及ぼす可能性は少ない条件で評価した。消化管における受動的な膜透過が動物とヒトの間で顕著な種差が無いと仮定すると、動物における  $F_a \cdot F_g$  に種差がある要因としては、P-gp などのトランスポーターにおける活性の違いや、消化管代謝  $F_g$  における初回通過効果の種差などが挙げられる。トランスポーターの基質特異性や組織分布、相対的存在量については、げっ歯類、イヌ、サル及びヒトで種差があることが報告されている[86]。また、サルでは消化管における薬物代謝能に関して極めて高い活性を有することが多数報告されている[7, 41, 87, 88]。そのため、実験動物からヒトにおける経口 BA を予測するためには、各動物種における消化管トランスポーターや代謝酵素の活性の差異について詳細に検討する必要がある。

肝ミクロソームを用いた nifedipine 及び testosterone を対象とした *in vitro* 試験では、ミニブタにおける肝 CYP3A の活性はヒトと同程度であったのに対して、bufuralol を対象とした CYP2D 活性はミニブタの方がヒトより高いことが報告されている[89]。本検討においても、CYP2D 基質に該当する amitriptyline、propranolol、timolol の肝固有クリアランスはヒトよりミニブタの方が高値を示した (Table 3)。肝血流量や血漿タンパク結合など他の生理的要因の影響も考慮すべきではあるが、このような代謝酵素の活性の違いが、様々な薬物の肝クリアランスにおける種差の主要な要因であると考えられる。本検討ではミニブタとヒトにおけるこれらの薬物の  $F_h$  は良好な相関を示したことから、ヒト肝クリアランスの予測については、ミニブタを使用する利点はあると考えられた。また、ミニブタにおける全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) から肝クリアランス ( $CL_h$ ) を差し引き算出した腎クリアランス ( $CL_{NH}$ ) に関してもヒトと相関すると考えられた。

Table 2 に示すように CYP2D (amitriptyline、propranolol 及び timolol) 及び CYP3A (felodipine、midazolam、nicardipine、nifedipine 及び verapamil) 基質における  $F_a \cdot F_g$  はヒトと比較しミニブタ、マウス及びラットの方が低かった。CYP3A は消化管内の P450 の約 8 割を占める主要な構成要素である。そのため、CYP3A 基質は消化管での代謝も受け易く、ほとんどの動物種で概ね CYP3A 基質の  $F_g$  は低値になり易い傾向にあると考えられる。一方、CYP3A 基質を除く薬剤については、これらの薬剤に対応する代謝酵素の発現又は活性に種差がある場合、CYP3A 基質と比較して  $F_g$  に有意な種差が現れると考えられる。Table 3 に示すように、*in vitro* 小腸ミクロソーム代謝試験では、ミニブタを含むすべての動物種において propranolol を除き、CYP2D 基質に対して高い代謝活性が認められたが、ヒトでは認められなかった。一方、動物及びヒトの小腸における評価した CYP3A 基質に対する代謝活性に有意な差は認められなかった。Xie らはマウス、ラット、イヌやサルなどの動物種とヒトの小腸 P450 における特定のアイソフォームの相対的発現量は、ヒトと動物種間で異なる可能性があり、更に各 CYP サブファミリー内の CYP 遺伝子のナンバーは動物種間でしばしば異なり、とりわけ CYP2~4 ファミリーについては、オルソログまで特定できるとは限らないと報告している[90]。また、消化管初回通過代謝に関しては、*in vitro* 実験から  $F_g$  を予測する動態モデルは未だ確立されていない[91, 92]。そのため、次のステップとしては、*in vivo* と *in vitro* の消化管代謝クリアランスの乖離の原因について今後明らかにし、本検討で確認された  $F_g$  の種差について精査していく必要がある。

経口投与した薬物の血漿中におけるプロファイルについては、吸収量 (量的 BA) だけでなく、吸収速度 (速度的 BA) もプロファイルに影響を与える。Figure 6 に示すように、ミニブタの GER はヒトやマウス及びラットよりも顕著に遅かった。ミニブタにおける GITT はヒトと同程度であったが、経口投与後の acetaminophen と sulfasalazine の累積薬物吸収量の推移 (Figure 6、Figure 7 B) から、ミニブタでは 24 時間まで薬物が持続的に吸収されることが示された。これらミニブタにおける胃排出が遅く、消化管通過が持続的であることが、Figure 8 に示すように、その他のほとんどの薬物においてもミニブタでは他の動物と比較して  $T_{max}$  は遅く、 $C_{max}/AUC$  が小さくなる結果をもたらしたと考えられた。

Hossain らや Oberle らは、Landrace ブタにおける GER を検討した結果、GER は 24 時間付近と遅いことを報告している[93, 94]。一方、Landrace ブタの GER は 6 時間付近との報告もある[95]。近年、Henze らが絶食及び摂食下における Göttingen ミニブタの GER を検討した結果、acetaminophen で評価したミニブタの MAT は 1~3 時間の範囲であり、本検討結果を支持する報告[96]であった。ブタの GER に関しては、様々な系統間、個体間及び実験間における変動が大きいことは報告されているが、いずれにしてもミニブタは GER の遅い動物種であると考えられた。

以上の検討により、薬物の経口吸収に関して量的及び速度的 BA の両方の観点からミニブタとヒトにおける種差について明らかにした。ミニブタではヒトと比較し量的 BA の観点では  $F_g$  が低いこと、速度的 BA の観点では GER が遅く、消化管通過が持続的であることが量的及び速度的 BA の種差の主要因であると考えられた。そのため、経口剤投与後のヒトにおける薬物血漿中濃度推移をミニブタから予測する場合には、消化管での薬物代謝能の違いに十分な注意が必要であることを示した。また、経口剤を投与した際のヒトにおける血漿中濃度推移をミニブタから予測することは、生理学的観点から困難であると考えられた。特に、徐放性製剤のように速度的な BA が重要となる製剤では、胃排出の影響を強く受けてしまうため、ミニブタは評価動物として不向きであると考えられた。ヒト予測を見据えた経口製剤評価をミニブタで実施するためには、胃排出を促進する運動促進薬である metoclopramide 投与による前処置などを用いた消化管運動の生理学的条件をヒトに近づけるなど、更に検討する必要があると考えられた。一方、ヒトとミニブタの  $F_h$  に高い相関性が得られたことから、薬物の肝代謝を含めた体内動態評価に有用な評価系となる可能性を示した。



## 第2章 ミニブタにおける薬物の体内動態パラメータに関する評価

第1章では、ミニブタにおける薬物の経口吸収特性に関して明らかにし、ミニブタの  $F_g$  はヒトより低い傾向にあることを示した。また、ミニブタはヒトより GER が遅く、消化管通過は持続的であることが示唆され、ミニブタからヒトにおける経口剤の血漿中濃度推移を予測する際には更なる検討が必要と考えられた。一方、ミニブタとヒトにおける各薬物の  $F_h$  が良好な相関を示したことから、ミニブタとヒトでの薬物の肝代謝能が同程度である可能性が示唆された。薬物代謝酵素については、肝 CYP450 サブファミリーに関してミニブタとヒトとの間に類似性が報告されており、ヒトにおける代謝経路を予測する実験動物としてミニブタの有用性も支持されている[84]。

新規に開発された候補化合物を臨床に進めていくうえで、first in human 試験における被検者へのリスクを最小限にするためなど、ヒトの体内動態を予測することは重要である。ヒト体内動態の定量的予測のためにいくつかアプローチが開発され、医薬品開発において活用されている[97,98]。一般的に、ヒトの体内動態を予測する手法としては、実験動物の *in vivo* 前臨床データを基にした経験則的 (empirical) アプローチ又は *in vitro* データと組み合わせた mechanistic アプローチが用いられる。中でも CL 又は  $V_d$  を各動物種の体重との関係から経験則的に予測する allometric scaling は、簡便かつ一定の精度を持った予測法として広く利用されている empirical アプローチの1つである。一方、ヒト CL の予測には多数の mechanistic アプローチが開発され、活用されている。このアプローチは一般に、生理学的薬物速度論 (PB-PK) に基づいており、ヒトの組織、細胞又はミクロソームから得られた *in vitro* データをヒトの生理学的モデルに統合し解析するものである。しかし、予測されたヒト CL は *in vivo* の実測 CL と乖離することも報告されている。Kilford らは CYP と UGT 両者を介した代謝の場合、PB-PK アプローチからでは過小評価傾向にあったことを報告している[99]。また Miners らは、一部の薬剤について、ヒト CL が予測値の 10~30 倍異なったことを報告[100]しており、*in vitro* データのみからでは定量的な予測が困難な場合があることを示している。

本章では、多様な物理化学的特性を有する 14 種の薬物の CL 及び  $V_d$  に関する体内動態パラメータをミニブタで評価し、ヒトの文献情報と比較した。また、比較対象動物としてマウス及びラットでも同様に評価を行った。更にこれらの薬物のヒト CL 及び  $V_d$  に関して、ミニブタ又はマウス及びラットのデータを基に allometric scaling を用いて予測した。ミニブタの体内動態パラメータ及び各動物からの予測値をヒトの実測値と比較することで、前臨床体内動態試験でのミニブタの有用性について検討した。

## 2.1 各種市販薬物を用いた $V_d$ 及び $CL$ に関する評価

ヒトとミニブタ、マウス及びラットにおける  $V_d$  及び  $CL$  を比較評価するため、異なる動態特性を有する 14 種のモデル薬物 (acetaminophen、antipyrine、atenolol、buprenorphine (lepetan injection 0.3 mg)、diclofenac sodium、felodipine、fentanyl、fexofenadine、flurbiprofen、furosemide、ketoprofen、lidocaine、propranolol hydrochloride 及び raloxifene hydrochloride) をミニブタ、マウス及びラットに静脈内投与し、血漿中濃度推移から  $V_d$  及び  $CL_p$  を算出後、ヒトの  $V_d$  及び  $CL_p$  に関する文献情報と比較評価した。また、各薬物の各動物種における血漿中タンパク非結合率 ( $f_{up}$ ) 及び  $R_B$  を評価した。

ヒト、ミニブタ、マウス及びラットの血液を用いた *in vitro* 試験にて 14 種のモデル薬物の  $f_{up}$  及び  $R_B$  を評価した結果を Table 6 に示した。また、薬物を静脈内投与したときの血漿中濃度から算出した動物の  $V_d$  及び  $CL_p$  及び文献から引用したヒトにおけるパラメータを Table 7 に示した。以下に、各モデル薬物の結果に関してその特徴を論述する。

### Acetaminophen :

評価結果より acetaminophen の各動物種における  $V_d$ 、 $f_{up}$  及び  $R_B$  では、 $V_d$  に関してはヒトよりミニブタで低い (1/2 倍程度) 傾向にはあったが、ヒトと各動物種で顕著な種差は認められなかった。一方、 $CL_p$  に関してはヒトとミニブタでは概ね同程度であったが、マウス及びラットでは高値を示した。

### Antipyrine :

評価結果より antipyrine の各動物種における  $V_d$ 、 $f_{up}$  及び  $R_B$  では、ヒトと各動物種で顕著な種差は認められなかった。一方、 $CL_p$  に関してはヒト、ミニブタ及びラットと比較しマウスは高い傾向にあった。

### Atenolol :

評価結果より atenolol の各動物種における  $f_{up}$  及び  $R_B$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $V_d$  に関してはマウスで  $CL_p$  に関してはマウス及びラットでヒトより高い傾向にあったが、ヒトとミニブタの  $V_d$  及び  $CL_p$  は同程度であった。

### Buprenorphine :

Buprenorphine は主に肝臓で代謝されグルクロン酸抱合体となる塩基性の薬物である。ラットに関しては、Gopal らによって buprenorphine のラットにおける  $CL_p$  は 45 mL/min/kg との報告[101]があり、今回得られたラットにおける  $CL_p$  (29.3 mL/min/kg) は Gopal らの報告と大きな乖離はなかった。評価結果より buprenorphine の各動物種における  $R_B$ 、 $V_d$  及び  $CL_p$  では、ヒトと各動物種で顕著な種差は認められなかった。一方、 $f_{up}$  に関してはヒトとミニブタは同程度であったが、マウス及びラットはやや高い傾向にあった。

#### Diclofenac :

Diclofenac は主に肝臓で代謝され、CYP2C による代謝やグルクロン酸抱合体を受ける nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) に分類される酸性の薬物である。マウス及びラットに関しては、Deguchi らによって diclofenac のマウス及びラットにおける  $CL_p$  は 5.33 及び 6.67 mL/min/kg との報告[102]があり、今回得られたマウス及びラットにおける  $CL_p$  (9.32 及び 8.36 mL/min/kg) は Deguchi らの報告と大きな乖離はなかった。評価結果より diclofenac の各動物種における  $R_B$  及び  $V_d$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $f_{up}$  及び  $CL_p$  に関してはヒトとミニブタは同程度であったが、マウス及びラットはやや高い傾向にあった。

#### Felodipine :

評価結果より felodipine の各動物種における  $f_{up}$  及び  $R_B$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $V_d$  に関してはヒトとミニブタ、ラットは同程度であったが、マウスはやや低い傾向にあり、 $CL_p$  に関してはヒトとミニブタ、マウスは同程度であったが、ラットはやや高い傾向にあった。

#### Fentanyl :

Fentanyl は主に肝臓で代謝され、CYP3A による代謝を受ける塩基性の薬物である。ラットに関しては、Ohtsuka らによって fentanyl のラットにおける  $CL_p$  は 41 mL/min/kg との報告[103]があり、今回得られたラットにおける  $CL_p$  (42.9 mL/min/kg) は Ohtsuka らの結果と同等であり、肝代謝は速かった。評価結果より fentanyl の各動物種における  $R_B$  及び  $V_d$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $f_{up}$  に関してはヒトとミニブタ、マウスは同程度であったが、ラットはやや高い傾向にあり、 $CL_p$  に関してはヒトとミニブタは同程度であったが、マウス、ラットではやや高い傾向にあった。

#### Fexofenadine :

評価結果より fexofenadine の各動物種における  $f_{up}$  及び  $R_B$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $V_d$  に関してはヒトとミニブタ、ラットは同程度であったが、マウスはやや低い傾向にあり、 $CL_p$  に関してはヒトとミニブタ、マウスは同程度であったが、ラットではやや高い傾向にあった。

#### Flurbiprofen :

Flurbiprofen は主に肝臓で代謝され、CYP2C による代謝やグルクロン酸抱合体を受ける NSAIDs に分類される酸性の薬物である。ラットに関しては、Jamali らによって flurbiprofen のラットにおける  $CL_p$  は約 2.5 mL/min/kg との報告[104]があり、今回得られたラットにおける  $CL_p$  (1.16 mL/min/kg) は Jamali らの結果と乖離はなく、肝代謝は緩やかであった。評価結果より flurbiprofen の各動物種における  $R_B$ 、 $V_d$  及び  $CL_p$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $f_{up}$  に関してはヒトとミニブタは同程度であったが、マウス、ラットはやや高い傾向にあった。

#### Furosemide :

評価結果より furosemide の各動物種における  $R_B$  は、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $f_{up}$  及び  $V_d$  に関してはヒトとミニブタ、ラットは比較的同程度であったが、マウスではやや高く、 $CL_p$  に関してはヒトではミニブタ、マウス及びラットより低い傾向にあった。

#### Ketoprofen :

Ketoprofen は主に UGT2B による抱合代謝を受ける NSAIDs に分類される酸性の薬物である。マウス及びラットに関しては、Deguchi らによって ketoprofen のマウス及びラットにおける  $CL_p$  は 4.28 及び 0.749 mL/min/kg との報告[102]があり、今回得られたマウス及びラットにおける  $CL_p$  (2.29 及び 0.864 mL/min/kg) は Deguchi らの報告と大きな乖離はなかった。評価結果より ketoprofen の各動物種における  $R_B$ 、 $V_d$  及び  $CL_p$  では、ヒトと各動物種でほぼ同等であった。一方、 $f_{up}$  に関してはヒトとミニブタは同程度であったが、マウス、ラットは高い傾向にあった。

#### Lidocaine :

Lidocaine は主に肝臓で代謝され CYP3A 及び CYP1A による代謝を受ける塩基性の薬物である。ラットに関しては、Matsuda らによって lidocaine のラットにおける  $CL_p$  は 69.3 mL/min/kg との報告[51]があり、今回得られたラットにおける  $CL_p$  (85.1 mL/min/kg) は Matsuda らの結果と大きな乖離はなく、代謝は速かった。評価結果より lidocaine の  $f_{up}$ 、 $R_B$ 、 $V_d$  及び  $CL_p$  は、ヒトとミニブタではほぼ同等であったが、マウス、ラットはパラメータによってはヒトと異なる傾向にあった。

#### Propranolol :

評価結果より propranolol の  $f_{up}$ 、 $R_B$ 、 $V_d$  及び  $CL_p$  は、ヒトとミニブタではほぼ同等であったが、マウス、ラットでは  $V_d$ 、 $CL_p$  においてヒトと異なる傾向にあり、とりわけ  $CL_p$  はマウス、ラットともにヒトより高い傾向にあった。

#### Raloxifene :

評価結果より raloxifene の  $f_{up}$ 、 $R_B$ 、 $V_d$  及び  $CL_p$  は、ヒトとミニブタ、ラットでは大きな乖離はなく、マウスにおいても  $V_d$  を除き、大きな乖離はなかった。

以上、評価した 14 種のモデル薬物はそれぞれ  $f_{up}$  が 0.11%~87.04%、 $R_B$  が 0.540~1.12、ミニブタにおける  $V_d$  が 0.112~3.84 L/kg、 $CL_p$  が 0.790~21.5 mL/min/kg の範囲に該当するそれぞれ特徴が異なる薬物を選択し評価した。各薬物における各パラメータを動物種間で直接比較した際、マウスやラットよりもミニブタの方がヒトに近い傾向にあった。

**Table 6 Summary of the unbound fraction of plasma protein binding and blood-to-plasma concentration ratios in the animal species and humans.**

Drug	$f_{up}$ (%)				$R_B$			
	Mice	Rats	Minipigs	Humans	Mice	Rats	Minipigs	Humans
Acetaminophen	78.90	75.76	44.93	64.55	0.921	0.890	1.12	1.04
Antipyrine	72.70	76.21	62.97	56.51	0.712	0.868	1.04	0.767
Atenolol	87.04	86.81	82.03	80.69	0.982	0.994	1.07	1.07
Buprenorphine	3.28	3.51	1.52	1.32	0.585	0.684	0.752	0.596
Diclofenac	4.29	0.97	0.21	0.19	0.550	0.540	0.575	0.567
Felodipine	0.37	0.35	0.38	0.39	0.706	0.600	0.784	0.560
Fentanyl	25.02	53.42	24.51	23.55	0.815	0.822	0.833	0.733
Fexofenadine	57.04	44.79	43.51	42.22	0.550	0.561	0.682	0.560
Flurbiprofen	4.37	1.74	0.12	0.11	0.550	0.540	0.707	0.560
Furosemide	25.15	4.58	5.83	1.86	0.782	0.660	0.655	0.550
Ketoprofen	16.48	7.87	0.69	0.64	0.550	0.591	0.671	0.560
Lidocaine	77.58	85.52	60.45	52.31	1.04	0.775	0.633	0.643
Propranolol	29.44	28.12	18.32	16.73	0.872	0.816	0.989	0.890
Raloxifene	1.33	1.60	0.88	0.89	0.966	0.772	1.04	0.702

Each value represents the mean (n = 2–3).

*Drug Metab Pharmacokinet.*, 31, 73-81 (2016), Table 1

**Table 7 Summary of *in vivo* PK parameters in the animal species and humans.**

Drug	V <sub>d</sub> (L/kg)				CL <sub>p</sub> (mL/min/kg)			
	Mice	Rats	Minipigs	Human <sup>a</sup>	Mice	Rats	Minipigs	Human <sup>a</sup>
Acetaminophen	0.984	1.73	0.479	1	28.0	24.4	3.18	5
Antipyrine	0.889	0.790	0.648	0.77	18.0	5.20	3.94	0.64
Atenolol	4.58	2.33	1.38	0.95	32.7	22.0	3.52	2.5
Buprenorphine	2.14	4.82	3.43	4.95	30.7	29.3	17.1	18.9
Diclofenac	0.248	0.410	0.141	0.22	9.32	8.36	1.20	3.5
Felodipine	0.462	3.08	2.19	4.4	7.21	34.7	14.5	11
Fentanyl	2.22	2.84	2.95	3.78	33.0	42.9	20.5	19
Fexofenadine	0.148	0.750	0.625	0.771	4.64	19.9	4.74	3.1
Flurbiprofen	0.106	0.210	0.112	0.144	0.421	1.16	0.790	0.3
Furosemide	0.588	0.180	0.183	0.12	6.85	5.52	5.75	1.6
Ketoprofen	0.262	0.390	0.184	0.132	2.29	0.864	0.913	1.14
Lidocaine	2.15	3.87	1.94	1.3	38.3	85.1	12.8	13.6
Propranolol	6.86	3.57	1.93	3.1	63.0	63.7	11.1	12
Raloxifene	0.639	5.38	3.84	7.52	9.76	30.4	21.5	10.8

Values for mice, rats and minipigs represent the mean of 3 experiments.

<sup>a</sup> Both V<sub>d</sub> and CL<sub>p</sub> for humans were quoted from the literature: acetaminophen, antipyrine, atenolol, diclofenac, felodipine, furosemide and propranolol (Obach et al., 2008); buprenorphine (Kuhlman et al., 1996); fentanyl (Christrup et al., 2008); fexofenadine (Lappin et al., 2010); flurbiprofenb (Tohno et al., 1992); ketoprofen (Debruyne et al., 1987); lidocaine (Burm., 1989); and raloxifene (Jones CD, 1997).

<sup>b</sup> Flurbiprofen parameters were measured by administration of flurbiprofen axetil.

## 2.2 ヒト体内薬物動態予測におけるミニブタの有用性に関する評価

### 2.2.1 ヒト $V_d$ 予測

本項では、ヒトの  $V_d$  を予測する際のミニブタの有用性について 2.1 項の異なる動態特性を有する 14 種のモデル薬物における各パラメータを用いて下記の方法で解析し評価した。

(1) ミニブタ、マウス、ラットいずれか 1 種の動物データからの予測： $V_d$  (L/kg)

1) 直接比較

各動物種における  $V_d$  (animal) を直接ヒト  $V_d$  予測 ( $V_d$  (human)) として使用。

$$V_d(\text{human}) = V_d(\text{animal}) \quad \text{eq. (9)}$$

2) 血漿タンパク非結合率補正

対象薬物のヒトと各動物種における血漿タンパク非結合率 ( $f_{up}(\text{human})$  及び  $f_{up}(\text{animal})$ ) の種差による影響を補正し予測する方法として下記の式により算出した。

$$V_d(\text{human}) = \frac{V_d(\text{animal})}{f_{up}(\text{animal})} \times f_{up}(\text{human}) \quad \text{eq. (10)}$$

3) 組織タンパク非結合補正 (Oie-Tozer 法)

対象薬物のヒトと各動物種における組織タンパク非結合率 ( $f_{ut}(\text{human})$  及び  $f_{ut}(\text{animal})$ ) の種差による影響を補正し予測する方法として Oie らによって報告[105]された下記の式 (eq. (12)) により算出した。なお、 $f_{ut}$  は各動物種における  $V_d$  及び  $f_{up}$  の実測値と体液量 ( $V_r$ )、血漿量 ( $V_p$ )、細胞外液量 ( $V_e$ ) 及び血漿タンパク結合に対する細胞外液 (血漿を除く) 中の結合タンパクの比 ( $R_{e/i}$ ) に関する文献値を用いて eq. (11) のように計算される。

$$f_{ut} = \frac{V_r \times f_{up}}{(V_d - V_p - f_{up} \times V_e) - \{(1 - f_{up}) \times R_{e/i} \times V_p\}} \quad \text{eq. (11)}$$

ここで、eq. (11) にて使用したパラメータの文献値[18, 105, 106, 107, 108, 109, 110]を Table 8 に示す。また、各対象薬物における  $f_{ut}$  にはヒトと各動物種間で種差はないものと仮定し、 $V_d$  (human) を下記の式により算出した。

$$V_d(\text{human}) = V_p + f_{up}(\text{human}) \times V_e + \{(1 - f_{up}(\text{human})) \times R_{e/i} \times V_p\} + V_r \times \frac{f_{up}(\text{human})}{f_{ut}(\text{animal})} \quad \text{eq. (12)}$$

**Table 8 Values used for physiological parameters in laboratory animals and humans.**

Parameters	Units	Species					
		Mouse	Rat	Monkey	Dog	Minipig	Human
Body weight	kg	0.03	0.25	5	10	15–30	70
MLP	years	2.8	4.5	24.2	20.4	12.8	93.4
Brain weight	g	0.42	1.7	90	80	50	1530
$V_p$	L/kg	0.0500	0.0312	0.0448	0.0515	0.0364	0.0429
$V_e$	L/kg	0.203	0.297	0.208	0.276	0.200	0.260
$V_r$	L/kg	0.378	0.371	0.485	0.328	0.300	0.340
$R_{e/i}^a$		1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
HCT	%	45	46	41	42	44	44
$Q_h$	mL/min/kg	90	55	44	30.9	26.3	20.7

These values were obtained from the literatures by Mahmood et al. (2004), Davies B et al. (1993), Oie S et al. (1979), Chapman ME et al. (2010), Diehl et al. (2001), Radin MJ et al. (1986) and Wyler F et al. (1979). The  $V_e$  and  $V_r$  of minipigs were assumed to be approximately 20% and 30% of total body weight, respectively.

<sup>a</sup>  $R_e / i$  was assumed to be 1.4 for all species and all binding proteins.

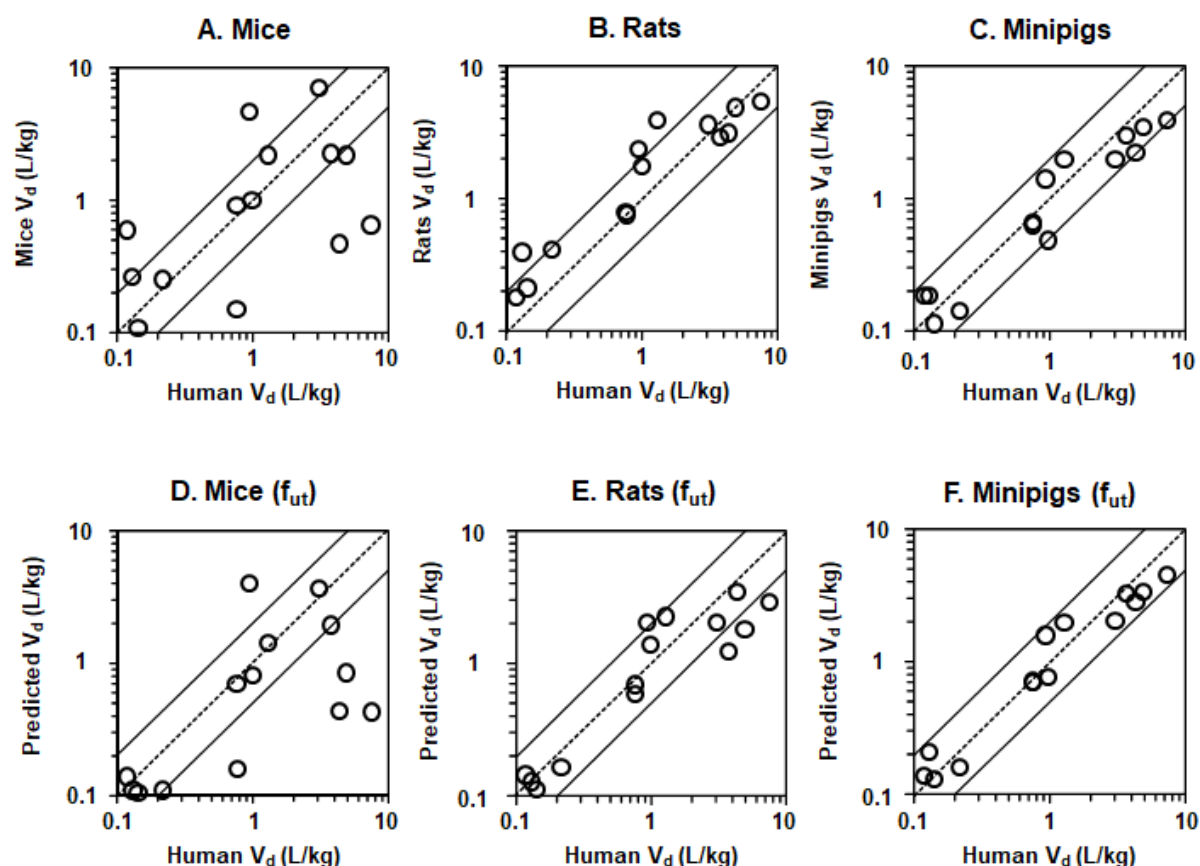
*Drug Metab Pharmacokinet., 31, 73-81 (2016), Supplementary Table 1*

14 種の薬物のミニブタ、マウス及びラットにおける  $V_d$  (animal) の実測値とヒトにおける  $V_d$  (human) の文献値を直接比較した結果を Figure 9 A～C 及び Table 9 (A) に示した。  $V_d$  (human) と比較し  $V_d$  (mice) では誤差が  $\pm 2$  倍以内の範囲にあった薬物数は 50%、AFE は 2.62 であったのに対して、  $V_d$  (minipigs) 及び  $V_d$  (rats) では誤差が  $\pm 2$  倍以内の範囲にあった薬物数は 86% 及び 79% で、AFE は 1.51 及び 1.56 であった (Table 9 (A))。よって、  $V_d$  に関しては、ミニブタはヒトとの相関性が高いことが確認された。なお、ラットもヒトとの相関性は高く、マウスでは低い傾向にあった。

14 種の薬物の  $V_d$  (human) を各動物種における  $V_d$  (animal) から eq. (10) に従い  $f_{up}$  で補正し予測した結果を Table 9 (A) に示した。  $f_{up}$  で補正後の  $V_d$  (human) の予測は、マウス及びラットからの予測では直接比較した際よりも予測精度は低下する結果であった。一方、ミニブタの  $f_{up}$  を用いた補正データからの  $V_d$  (human) の予測では、誤差が  $\pm 2$  倍以内の範囲にあった薬物数は 93%、AFE は 1.54 であり、直接比較時と大差なく予測性はマウス及びラットを用いるよりも予測精度は高かった。



各動物種における  $f_{ut}$  を **eq. (11)** (OieTozer 法) に準じて算出した後、 $V_p$ 、 $V_r$  及び  $V_e$  のような生理学的パラメータの種差を考慮した **eq. (12)** により、各薬剤の  $V_d(\text{human})$  を予測した。この方法ではミニブタのデータを基にした予測では更に予測精度が改善し、誤差が  $\pm 2$  倍以内の範囲にあった薬物数は 100%、AFE は 1.37 であった。一方、マウスやラットのデータを基にした予測では予測精度を改善するには至らなかった (Figure 9 D~F)。これらの結果より、 $V_d(\text{human})$  を予測する上でミニブタの使用は有用であると考えられた。



**Figure 9** Plots of human  $V_d$  values predicted from single animal species directed or corrected for  $f_{ut}$  vs. actual values measured after intravenous administration.

The following species were used: A and D, mice; B and E, rats; C and F, minipigs. Dashed lines represent lines of unity, and the area between the solid lines represents values within 2-fold error.

*Drug Metab Pharmacokinet.*, 31, 73-81 (2016), Fig. 1

## (2) Allometric scaling による予測

### 1) Allometric scaling

2.1 項で得られたミニブタ、マウス及びラットの  $V_d(\text{animal})$  を用いて allometric scaling による  $V_d$  (L/body) に関する予測を実施した。**Eq. (13)** に従い、各  $V_d(\text{animal})$  と各動物の体重 (Table 8) との関連性から評価薬物ごとの allometric パラメータ (**eq. (13)** の A 及び B) を求めた。なお、allometric

パラメータは、ミニブタ、マウス及びラット 3 種のデータ又はミニブタ及びマウス、ミニブタ及びラット又は、マウス及びラットの 2 種データの組み合わせによる関連性から算出した。

$$V_d(L/body) = A \times (body\ weight)^B \quad \text{eq. (13)}$$

ここで、A は allometric scaling における係数、B は allometric scaling における指数 (allometric パラメータ) を示す。算出した allometric パラメータとヒトの体重を eq. (13) に代入し、 $V_d(human)$  を予測した。なお、ヒトの体重は引用した文献に実測値の記載があった場合には記載値を、記載されていなかった場合には Table 8 に示した 70 kg とし計算した。

## 2) 血漿タンパク非結合率で補正した allometric scaling

1) 項 allometric scaling に対して  $f_{up}$  の種差による影響を補正することを目的とした予測を実施した[98]。まず、eq. (14) に従い、対象薬物に関して評価動物種での  $f_{up}$  で各  $V_d(animal)$  を補正した各動物種における  $V_{d\ free}(animal)$  を求めた。

$$V_{d\ free}(animal) = \frac{V_d(animal)}{f_{up}(animal)} \quad \text{eq. (14)}$$

Eq. (14) で算出した  $V_{d\ free}(animal)$  と各動物の体重を eq. (13) に従いプロットし  $V_{d\ free}(animal)$  時における allometric パラメータを求め、予測された  $V_{d\ free}(human)$  からヒトの  $V_d(human)$  に変換し (eq. (15))、計算した。

$$V_d(human) = V_{d\ free}(human) \times f_{up}(human) \quad \text{eq. (15)}$$

Eq. (13) に従い  $V_d(animal)$  から allometric scaling を適用し  $V_d(human)$  を予測した。Allometric scaling による  $V_d(animal)$  のデータから、予測された  $V_d(human)$  とヒト  $V_d$  の文献値との予測の精度を Table 9 (B) に、相関を Figure 10 に示した。本方法では、ミニブタ、マウス及びラット 3 種のデータの組み合わせから予測した場合に、誤差が  $\pm 2$  倍以内の範囲にあった薬物数は 86%、AFE は 1.33 であり、最も予測精度の高い結果が得られた (Figure 10 A)。一方、ミニブタを含めた場合の結果と比較し、ミニブタを除外した場合の allometric scaling による  $V_d(human)$  の予測精度は著しく低下した。

Eq. (14, 15) に従い  $f_{up}$  で補正した  $V_{d\ free}(animal)$  から allometric scaling を適用し  $V_d(human)$  を予測した。Table 9(B) から、 $f_{up}$  の種差を考慮した補正においては、3 種のデータの組み合わせから予測した場合においても補正しなかった予測時と比較し、予測精度の改善には至らなかった (Figure 10 B)。しかしながら、 $V_d(human)$  の値が大きい薬物 ( $> 0.6\ L/kg$ 、14 種中 10 種の薬物) の場合には、 $f_{up}$  の補正によりミニブタを組み合わせた予測では  $V_d(human)$  の予測精度は僅かに改善された (Figure 10 C)。

**Table 9 Accuracy of the prediction of human  $V_d$** **(A) Prediction from single animal species**

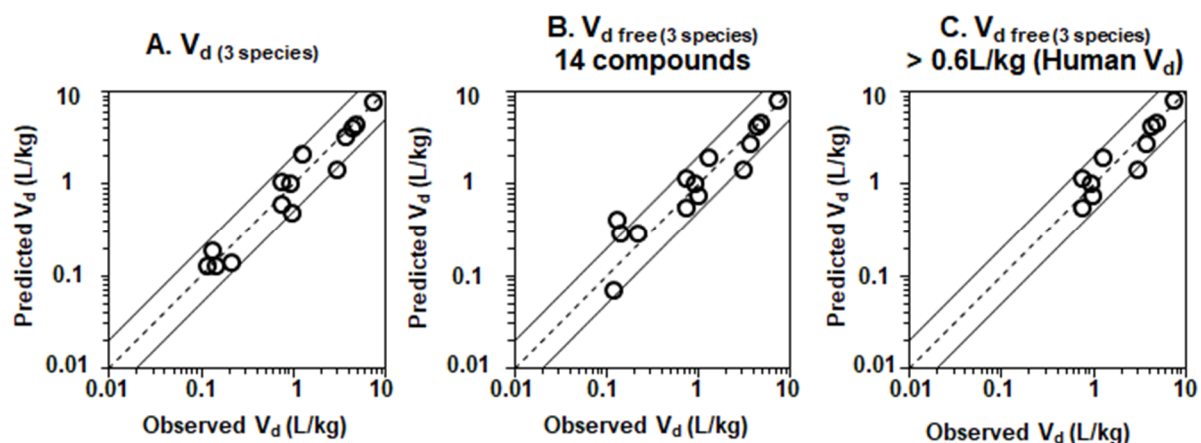
		$V_d$ (L/kg)								
		Direct comparison			Corrected for $f_{up}$			Corrected for $f_{ut}$		
		Mice	Rats	Minipigs	Mice	Rats	Minipigs	Mice	Rats	Minipigs
% of drugs	2-fold	50	79	86	36	50	93	57	71	100
within	4-fold	64	100	100	43	86	100	64	100	100
Average-fold error		2.62	1.56	1.51	4.84	2.21	1.54	2.47	1.60	1.37

**(B) Prediction using allometric scaling**

		$V_d$ (L/kg)										
		Simple allometry				Allometry corrected with $f_{up}$ ( $V_d$ free)						
						14 drugs				> 0.6 L/kg (Human $V_d$ ) 10 drugs <sup>a</sup>		
		m, r, p	m, r	m, p	r, p	m, r, p	m, r	m, p	r, p	m, r, p	m, p	r, p
% of drugs	2-fold	86	14	86	71	86	7	86	79	90	90	90
within	4-fold	100	21	100	100	100	29	100	100	100	100	100
Average-fold error		1.33	8.95	1.40	1.62	1.47	9.58	1.47	1.59	1.32	1.34	1.47

m, mice; r, rats; p, minipigs.

<sup>a</sup> Prediction of human  $V_d$  was achieved for 10 drugs that had larger  $V_d$  values than those of total body water (0.6 L/kg in humans). The following 4 drugs were excluded from the 14 total: diclofenac, flurbiprofen, furosemide and ketoprofen.



**Figure 10** Plots of human  $V_d$  values predicted from allometric scaling using mice, rats and minipigs, including interspecies protein binding differences vs. actual values measured after intravenous administration.

The following parameters were used: A, not corrected; B and C, fup. Dashed lines represent lines of unity, and the area between the solid lines represents values within 2-fold error.

*Drug Metab Pharmacokinet.*, 31, 73-81 (2016), Fig. 2

## 2.2.2 ヒト CL 予測

本項では、ヒトの CL を予測する際のミニブタの有用性について 2.1 項の異なる動態特性を有する 14 種のモデル薬物における各パラメータを用いて下記の方法で解析し評価した。

(1) ミニブタ、マウス、ラットいずれか 1 種の動物データからの予測：CL (mL/min/kg)

1)  $CL_p$  の直接比較

各動物種における  $CL_p$  (animal) を直接ヒト  $CL_p$  予測 ( $CL_p$  (human)) として使用した。

$$CL_p \text{ (human)} = CL_p \text{ (animal)} \quad \text{eq. (16)}$$

2) 血液 CL ( $CL_b$ ) の直接比較

対象薬物の各動物種における  $R_B$  (animal) を用いて  $CL_b$  (animal) を算出し、 $CL_b$  (animal) を直接ヒト  $CL_b$  予測 ( $CL_b$  (human)) として使用した。

$$CL_b \text{ (animal)} = \frac{CL_p \text{ (animal)}}{R_B \text{ (animal)}} = CL_b \text{ (human)} \quad \text{eq. (17)}$$

$$CL_p \text{ (human)} = CL_b \text{ (human)} \times R_B \text{ (human)} \quad \text{eq. (18)}$$

### 3) Single-species allometric scaling

ヒトと各動物種における体重及び生理学的な補正指数（0.75）で補正し各動物種における  $CL_b(\text{animal})$  から  $CL_b(\text{human})$ （いずれも単位は mL/min/body）を予測する方法が報告されており、下記の式により算出した。

$$CL_b(\text{human})(\text{mL/min/body}) = CL_b(\text{animal}) \times \left( \frac{\text{body weight}(\text{human})}{\text{body weight}(\text{animal})} \right)^{0.75} \quad \text{eq. (19)}$$

その後、**eq. (18)**及びヒトの体重を用いて  $CL_p(\text{human})$ （単位：mL/min/kg）に変換し、予測した。

### 4) 血漿タンパク非結合率で補正した single-species allometric scaling

3)項 single-species allometric scaling に対して  $f_{up}$  の種差による影響を補正することを目的とした予測を実施した。まず、**eq. (20)**に従い、対象薬物の評価動物種での  $f_{up}$  で各  $CL_b(\text{animal})$  を補正した各動物種における  $CL_b(\text{animal})_{free}$  を求めた。

$$CL_b(\text{animal})_{free}(\text{mL/min/body}) = \frac{CL_p(\text{animal})(\text{mL/min/body})}{f_{up}(\text{animal}) \times R_B(\text{animal})} \quad \text{eq. (20)}$$

その後、**eq. (19)**に代入し  $CL_b(\text{human})_{free}$ （mL/min/body）を計算し、 $f_{up}(\text{human})$ 、**eq. (18)**及びヒトの体重を用いて  $CL_p(\text{human})$ （単位：mL/min/kg）に変換し予測に用いた。

14 種の薬物のミニブタ、マウス及びラットにおける  $CL_p(\text{animal})$  の実測値とヒトにおける  $CL_p(\text{human})$  の文献値を直接比較した結果を Figure 11 A～C 及び Table 10 (A)に示した。ミニブタ、マウス及びラット 3 種の中で、 $CL_p(\text{minipigs})$  と  $CL_p(\text{human})$  は誤差が  $\pm 2$  倍以内の範囲にあった薬物数は 71%、AFE は 1.75 でミニブタとヒトの  $CL_p$  は最も高い相関を示した。

14 種の薬物の  $CL_p(\text{human})$  を各動物種における  $CL_p(\text{animal})$  から **eq. (17, 18)**に従い  $R_B(\text{animal})$  を用いて  $CL_b(\text{animal})$  から、また **eq. (19, 20)**に従い  $f_{up}$  で補正した single-species allometric scaling から予測した結果を Figure 11 D～F 及び Table 10 (A)に示した。 $R_B$  で補正後の  $CL_p(\text{human})$  の予測は、ラットを除きミニブタ及びマウスで精度の向上は認められなかった。また、 $f_{up}$  で補正後の  $CL_p(\text{human})$  の予測においても、評価した 3 動物種すべてで予測精度の向上は認められず、マウス及びラットからの予測では直接比較した際よりも予測精度は低下した。

Table 10 Accuracy of the prediction of human CL

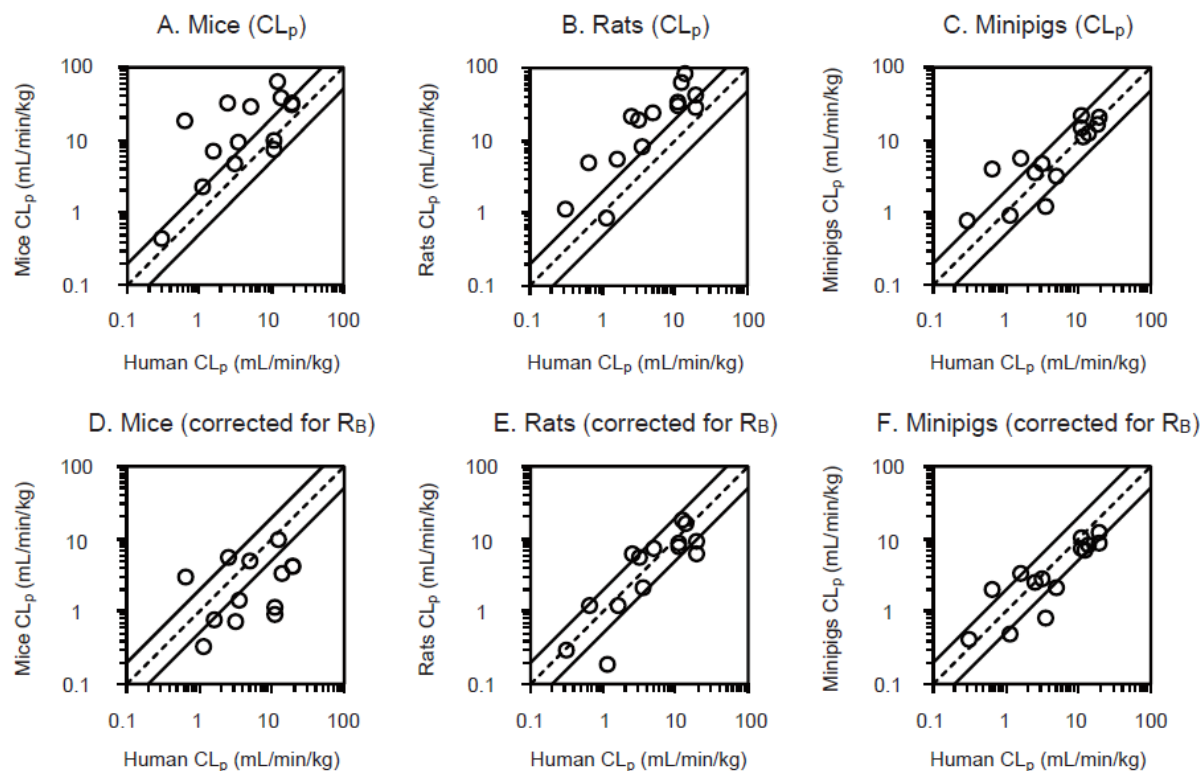
(A) Prediction from single animal species

		CL (mL/min/kg)								
		Direct comparison of CL <sub>p</sub>			Direct comparison of CL <sub>b</sub>			Direct comparison of CL <sub>b free</sub>		
		Mice	Rats	Minipigs	Mice	Rats	Minipigs	Mice	Rats	Minipigs
% of drugs within	2-fold	43	14	71	14	79	57	7	43	71
	4-fold	64	57	93	50	93	93	29	64	93
Average-fold error		3.08	3.72	1.75	3.52	1.79	1.80	10.35	3.45	1.75

(B) Prediction by allometric scaling

		CL (mL/min/kg)								
		Allometry for CL <sub>p</sub>				Allometry for CL <sub>b</sub>				Allometry for CL <sub>b free</sub>
		m, r, p	m, r	m, p	r, p	m, r, p	m, r	m, p	r, p	m, r, p
% of drugs within	2-fold	50	21	57	57	57	14	57	57	79
	4-fold	93	43	86	86	93	36	93	93	93
Average-fold error		2.06	10.47	2.03	2.05	1.91	12.87	1.88	2.09	1.72

m, mice; r, rats; p, minipigs



**Figure 11** Plots of observed animal  $CL_p$  or corrected for  $R_B$  values vs. human  $CL_p$  or corrected for  $R_B$  values measured after intravenous administration.

The following species were used: A and D, mice; B and E, rats; and C and F, minipigs. Dashed lines represent lines of unity, and the area between the solid lines represents values within 2-fold error.

*Drug Metab Pharmacokinet.*, 31, 73-81 (2016), Fig. 3

## (2) Allometric scaling による予測

### 1) Allometric scaling

2.1 項で得られたミニブタ、マウス及びラットの  $CL_{p(animal)}$  又は  $R_{B(animal)}$  により変換し算出した  $CL_{b(animal)}$  を用いて  $CL$  (mL/min/body) に関する allometric scaling による予測を実施した[98]。Eq. (21)に従い、各  $CL_{p(animal)}$  又は  $CL_{b(animal)}$  と各動物の体重 (Table 8) との関連性から評価薬物ごとの allometric パラメータ (eq. (21)の A 及び B) を求めた。なお、allometric パラメータはミニブタ、マウス及びラット 3 種のデータ又はミニブタ及びマウス、ミニブタ及びラット又は、マウス及びラットの 2 種データの組み合わせによる関連性から算出した。

$$CL_p \text{ or } CL_b(\text{mL/min/body}) = A \times (\text{body weight})^B \quad \text{eq. (21)}$$

ここで、A 及び B は、allometric scaling における係数と指数 (allometric パラメータ) を示す。なお、 $CL_b$  で算出した場合には別途、更に得られた B の値が 0.71~1.0 の範囲であった場合には  $CL_b$  に各動物種の最大寿命 (MLP) に掛けた式 eq. (22)で、B の値が 1.0 を超えた場合には  $CL_b$  に

脳重量を掛けた式 **eq. (23)**の関連性から再度 allometric scaling における係数と指数を算出し直し、予測する方法を変更した。

$$CL_b \times MLP = A \times (\text{body weight})^B \quad \text{eq. (22)}$$

$$CL_b \times \text{brain weight} = A \times (\text{body weight})^B \quad \text{eq. (23)}$$

算出した allometric パラメータとヒトの体重を **eq. (21~23)**に代入し、 $CL_{(\text{human})}$ を予測した。なお、ヒトの体重は引用した文献に実測値の記載がある場合には記載値を、記載されていない場合には Table 8 に示した 70 kg とし計算した。

## 2) 血漿タンパク非結合率で補正した allometric scaling

1)項 allometric scaling に対して  $f_{up}$ の種差による影響を補正することを目的とした予測を実施した。まず、**eq. (24)**に従い、対象薬物の評価動物種での  $f_{up}$  及び  $R_B(\text{animal})$ で各  $CL_p(\text{animal})$ を補正した各動物種における  $CL_b(\text{animal})_{free}$ を求めた。

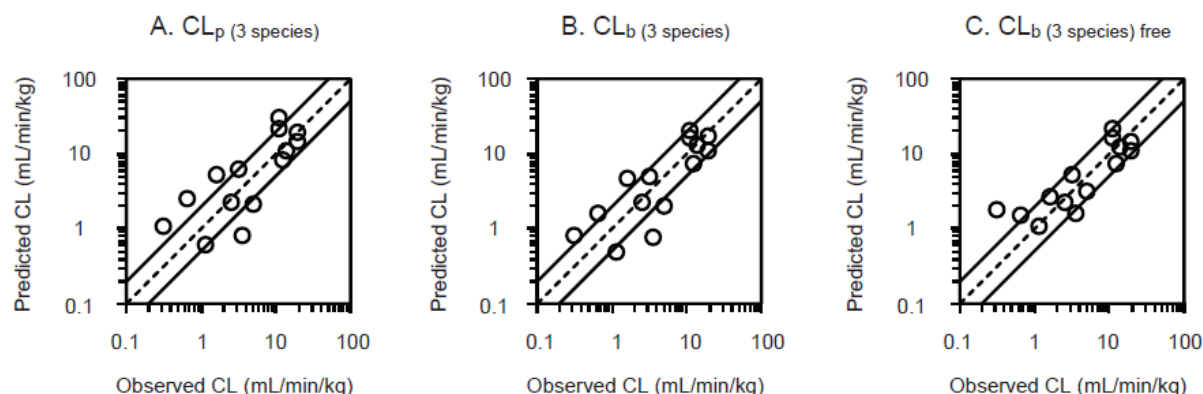
$$CL_b(\text{animal})_{free} = \frac{CL_p(\text{animal})}{R_B(\text{animal}) \times f_{up}(\text{animal})} \quad \text{eq. (24)}$$

**Eq. (24)**で算出した  $CL_b(\text{animal})_{free}$ と各動物の体重を **eq. (21~23)**に従いプロットし  $CL_b(\text{animal})_{free}$ 時における allometric パラメータを求め、予測された  $CL_b(\text{human})_{free}$ からヒトの  $CL_p(\text{human})$ に変換し、予測に用いた。

**Eq. (21~24)**に従い  $CL_{(\text{animal})}$ から allometric scaling を適用し  $CL_{(\text{human})}$ を予測した。Allometric scaling による  $CL_{(\text{animal})}$ のデータから、予測された  $CL_p(\text{human})$ とヒト  $CL_p$ の文献値との予測の精度を Table 10 (B)に、相関を Figure 12 に示した。Allometric scaling により  $CL_{(\text{human})}$ を予測する場合には、ミニブタとマウス及びミニブタとラットの2種とミニブタ、ラット、マウスの3種からの allometric scaling 予測による予測精度に差は認められず、ミニブタの結果を組み込んだ方が組み込まない場合よりも予測精度は向上した。

更に  $CL_b(\text{animal})$ に変換し予測した場合の方が  $CL_p(\text{animal})$ を使用した場合と比較して予測精度は僅かに向上した。また、 $CL_b(\text{animal})_{free}$ にて3種からの allometric scaling 予測した場合は、誤差が $\pm 2$ 倍以内の範囲にあった薬物数は79%、AFEは1.72で最もよい予測精度が得られた。なお、MLPや脳重量による補正 (**eq. (14, 15)**)を行った  $CL_{(\text{human})}$ の予測に関しては、3種からの allometric scaling 予測した場合は、誤差が $\pm 2$ 倍以内の範囲にあった薬物数は29%、AFEは3.12となり、予測精度は明らかに低下した。全体を通して、 $CL_{(\text{human})}$ を予測するに当たり、ミニブタ1種の動物データからの予測と比較して、ミニブタ、マウス、ラットの3種からの予測も含めた allometric scaling からの予測精度に明らかな優位性は認められなかった。





**Figure 12** Plots of human plasma CL values predicted from allometric scaling considering physiological parameters,  $f_{up}$  vs. actual values measured after intravenous administration.

The following parameters were used: A,  $CL_p$ ; B,  $CL_b$ ; and C,  $CL_b$  free. Dashed lines represent lines of unity, and the area between the solid lines represents values within 2-fold error.

*Drug Metab Pharmacokinet.*, 31, 73-81 (2016), Fig. 4

## 2.3 考察

本章では、ヒト体内動態パラメータの予測の観点から新薬開発における前臨床試験でミニブタを使用することの有用性に関して、様々な薬物を対象に評価し検討した。ミニブタ、マウス及びラットにおける 14 種の薬物の  $V_d$  及び CL を評価し、allometric scaling を含む様々な予測方法によりヒトの  $V_d$  及び CL を予測することで、各種予測方法における予測精度を比較した。各薬物のミニブタにおける  $V_d$  及び CL はともに、マウスやラットと比べてヒトとの相関性に優れていることが確認された。また、allometric scaling による予測では、ミニブタの結果を含めることで、ヒトの CL 及び  $V_d$  の予測精度が向上した。

Hosea らは、 $V_d(\text{human})$  を予測する場合に、ラット 1 種の動態パラメータから予測した際に予測精度が良好であったことを報告している[98]。本章では、 $V_d(\text{human})$  を 1 種の  $V_d(\text{minipigs})$  から予測することで  $V_d(\text{rats})$  から予測した場合と同等以上の良好な予測精度を示すことが明らかとなった。また、allometric scaling 予測においてもミニブタを含めることで  $V_d(\text{human})$  の予測精度の向上が確認された。 $f_{up}$  を用いた補正ではミニブタにおける  $V_d(\text{human})$  の予測精度にはほとんど影響しなかったが、マウスやラットにおいては直接比較よりも  $f_{up}$  補正することで予測精度は低下した。 $V_d$  は基本的に生理学的概念に基づき、簡易的に次式で記述される。

$$V_d = V_p + V_t \times \frac{f_{up}}{f_{ut}} \quad \text{eq. (25)}$$

ここで、 $V_p$  は薬物が分布する血漿容積、 $V_t$  は薬物が分布する血漿外の組織容積を示す。本式では、 $V_d$  が比較的小さい薬物については、 $V_d \approx V_p$  と仮定することができ、この場合には、 $f_{up}$  の変化は  $V_d$  の変化に影響を及ぼし難いと想定される。一方、 $V_d$  が大きい薬物の場合、総  $V_d$  に対する  $V_p$  の寄与

は無視でき、 $V_d$  は  $V_d \approx V_t \times (f_{up}/f_{ut})$  と仮定することができる。今回評価した薬物中に含まれる NSAIDs の  $f_{up}$  は非げっ歯類（ヒト及びミニブタ）よりもげっ歯類（マウス及びラット）で 5~20 倍高値を示した（Table 6）。これらの薬物の  $V_d$  は低く（ヒトでは 0.12~0.22 L/kg）（Table 7）、 $V_d \approx V_p$  と見なすことができ、 $f_{up}$  が  $V_d$  に影響を及ぼす可能性は低くなると考えられるため、 $f_{up}$  により補正（eq. (10)）してしまうことで、特にマウスとラットにおいて  $V_d(\text{human})$  の過小評価をもたらしたと考えられた。本現象に関しては、 $f_{up}$  で補正して得られた  $V_{d\text{ free}}$  を用いた allometric scaling の結果により確認することができた（Table 9 (B)）。 $V_{d\text{ free}}$  による allometric scaling 予測において、14 種の全薬物を対象にした 2 種又は 3 種の動物種すべての組合せによる予測では、 $V_d(\text{human})$  の予測精度の改善には至らなかったが、総体液量（ヒトでは 0.6 L/kg）を上回る  $V_d$  値を示した 10 種の薬物を対象にした同様の予測では、予測精度は改善した。

$f_{ut}$  を用いた補正は、 $V_e$ 、 $V_r$  及び  $R_{ef}$  などの生理学的要因における種差を考慮した方法である。この方法は、血漿タンパク結合、組織結合及び様々なコンパートメント容積に関して Oie らによって提唱された方法に由来するものであり、各動物種における  $f_{ut}$  を計算するために、数式を変換したものである[105]。 $f_{ut}$  を用いた補正をすることにより、ミニブタ 1 種からの  $V_d(\text{human})$  予測において予測精度は更に向上した。一方、マウス、ラットでは  $f_{ut}$  補正により予測精度は改善されなかった。ミニブタの  $f_{up}$  はマウスやラットとは異なり、ヒトの  $f_{up}$  と類似した結果であったため、 $f_{up}(\text{minipigs})$  とミニブタにおけるいくつかの生理学的要因を用いて計算した  $f_{ut}(\text{minipigs})$  は  $f_{ut}(\text{human})$  ともよく対応し、結果的に  $V_d(\text{human})$  の予測精度の改善に至ったと考えられた。 $V_d$  は血漿タンパク結合に加え、血流量、トランスポーターの発現、薬物の血球分配など様々な因子の影響を受ける。本  $V_d$  予測の結果から、ミニブタとヒトとの間に多数の生理学的類似性があることが明確に示唆され、ミニブタ単一種における体内動態解析からでも  $V_d(\text{human})$  予測に関して有用な情報に成り得ると考えられた。

様々な薬物に対する動物における CL に関しては  $V_d$  よりもヒトとの相関性が低いと考えられているが、これまで、様々な動物種の体内動態データを基に経験則的なアプローチによりヒトの CL 予測が実施されてきた。例えば、Hosea らはヒトの CL を予測する上でラットが有用であることを報告している[98]。また、主に UGTs により代謝される薬物においては、ヒトの CL を予測する際、現状では *in vitro* 試験から予測するよりも allometric scaling で予測した方が予測精度は高かったことが報告されている[102]。

本章で評価した薬物は主に以下の経路で消失される。(1) CYP 代謝 (antipyrine、buprenorphine、diclofenac、felodipine、fentanyl、flurbiprofen、lidocaine 及び propranolol)、(2) non-CYP 代謝 (acetaminophen、furosemide、ketoprofen 及び raloxifene)、(3) 能動的肝取り込み (fexofenadine)、(4) 受動的腎排泄 (atenolol)。これら選択した薬物の中には、CYP 基質に該当するいくつかの薬物 (buprenorphine、fentanyl、lidocaine 及び propranolol) で  $Q_h$  と同等の比較的高い CL を示す薬物も選択した。第 1 章でも記載したように肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験では、nifedipine、testosterone におけるミニブタの肝 CYP3A の活性はヒトと同等であるが、bufuralol における CYP2D 活性はミニブタの方がヒトより高いことが明らかにされている[89]。酵素活性におけるこれらの種差は、様々な薬物の  $CL_h$  に

おける種差の主要な要因として考えられる。また、 $CL_h$  は代謝酵素活性だけでなく、肝臓の血流量や  $f_{up}$  のようないくつかの生理学的因子によっても影響を受けると考えられる。

本章では、ヒトの  $CL$  予測において、ミニブタを用いた予測では直接比較することが最も高い予測精度を示し、ミニブタはヒトの  $CL$  とよく相関し、予測に有用であることが確認された (Table 10)。一方、 $f_{up}$  による補正では、ミニブタを用いた  $CL_{(human)}$  予測において予測精度の顕著な改善は認められず、マウスとラットを用いた予測においては予測精度の低下が確認された。主に肝代謝により体循環から消失される薬物の場合、 $CL_{tot}$  は well-stirred model を仮定すると、

$$CL_{tot} = \frac{f_{up} \times CL_{int,H} \times Q_h}{f_{up} \times CL_{int,H} + Q_h} \quad \text{eq. (26)}$$

として表される。ここで、 $CL_{int,H}$  は薬物の肝固有クリアランスを示す。 $f_{up} \times CL_{int,H}$  が  $Q_h$  よりも非常に小さい場合、 $CL_{tot}$  は  $CL_{tot} \approx f_{up} \times CL_{int,H}$  として近似される。このような薬物では、 $f_{up}$  を用いた補正により、 $CL_{(human)}$  の予測精度を改善させることができる。一方、 $f_{up} \times CL_{int,H}$  が  $Q_h$  より非常に大きい場合には、 $CL_{tot} \approx Q_h$  と近似されるため  $CL_{tot}$  は  $Q_h$  により制限されることになり、このような薬物で  $f_{up}$  に種差がある薬物では、 $f_{up}$  による補正によって予測精度が損なわれる可能性がある。そのため、 $V_d$  の時と同様に  $CL$  の程度などで分類して考える必要はあると考えられた。

以上 Table 10 (A) より、 $CL_{(human)}$  の予測には、補正方法に関わらずミニブタを用いることで予測精度が向上することが示唆された。ヒトの  $V_d$  予測についても、Table 9 (A) の結果から、ミニブタを用いることで予測精度が高くなることが実証された。よって、ミニブタは他の動物種における動態解析結果に頼ることなく、単一種でヒトの  $CL$  及び  $V_d$  に関して堅牢な予測を可能とする動物種であることが示唆された。以上の結果より、ヒトの体内動態を予測するための前臨床体内動態試験においてミニブタを使用することは有用であると考えられた。ヒトとミニブタの生理学的及び解剖学的特性には、いくつかの類似点が報告されている [84, 111]。これらヒトとミニブタにおける類似性は、多様な物理化学的性質を有する様々な薬物に対してヒトの体内動態を精度よく予測する上で重要であると考えられる。

$CL$  に関する allometric scaling 予測の結果より、ミニブタのデータを含めることの重要性も示唆された。また、評価したすべての allometric アプローチにおいて、 $f_{up}$  で補正した  $CL_b$  からの予測が、ヒトの  $CL$  を予測するのに最も精度が良かった。一方、the rule of exponent (ROE) に従った MLP 又は脳重量で補正した予測では 3 動物種すべてのデータを用いた場合においても、予測精度は低下した。Mahmood らは、少なくとも 3 動物種の前臨床データが入手可能な場合において ROE の適用を提案しているが [106]、ROE の使用については批判的な報告もある [98]。今回の結果のみから ROE を適用した根拠を考察するのは適切ではないかもしれないが、ROE 理論の有用性を証明するためには、より包括的な研究が必要であると考えられた。

Lombardo らは、これまで  $V_d$  に関して評価報告のある化合物を基にイヌでは 242 化合物数、サルでは 127 化合物数を対象にヒトとの相関を解析した結果、ヒトの  $V_d$  の実測値との乖離が 2 倍未満であった化合物数はイヌ単一種では 69%、サル単一種では 73% であり、 $V_d$  に関してイヌ及びサルはヒトと良好な相関を示したと報告している [112]。また  $CL$  に関しては、イヌでは 249 化合物数、サ

ルでは 132 化合物数を対象にヒトとの相関を解析した結果、ヒトの CL の実測値との乖離が 2 倍未満であった化合物数はイヌ単一種では 55%、サル単一種では 61%であり、CL に関してサルはヒトと良好な相関を示したと報告している[113]。本章では、評価した薬物数は異なるが、 $V_d$  及び CL についてミニブタとヒトを比較した際、実測値の乖離が 2 倍未満であった化合物数は、 $V_d$  では 86%、CL では 71%であったことから、ヒトの CL 及び  $V_d$  に関して、ミニブタはイヌやサルと同等以上の相関を示すと考えられ、他の非げっ歯類と比較しても、ミニブタは様々な薬物に対するヒトの体内動態を予測する際に、高い効力を有し得ると考えられた。

以上より、種差を考慮したいいくつかの生理学的因子で補正した *allometric scaling* では、ミニブタのデータを含めることで、ヒトの CL 及び  $V_d$  の予測精度の改善に繋がることが確認された。ただし、ヒト CL を予測する際に、ミニブタ単一種のデータから予測した結果と比較して、*allometric scaling* から予測した結果では、3 動物種を使用した場合においても、明確な予測精度の改善には至らなかった。これらの結果から、様々な薬物に対してヒトの体内動態を予測する際にミニブタを使用することは有用であることが示唆された。本章の結果によりヒト体内動態予測においてミニブタのデータに関して有用性が確認されたため、ミニブタのデータを使用し適切な PB-PK モデリングのような速度論モデル解析を実施することで、ヒトにおける様々な薬物の体内動態予測に関して、精度の良い予測が期待できると考えられた。

### 第3章 ミニブタにおける製剤の経皮吸収に関する評価

第2章において、ミニブタは薬物のヒト体内動態を予測する上で有用であることを示した。一方、その他ブタに関しては、皮膚構造、脂質組成、血管新生などが、ヒトとブタで類似しているという報告が多数ある[114, 115, 116, 117]。また、皮膚透過性に関して、ブタとヒトの皮膚透過性は類似するが、イヌとヒトでは類似しないという報告もある[118]。更に、ミニブタ又は家畜ブタの皮膚を用いた *in vitro* 透過性試験では、ヒトの皮膚と比較して、様々な基質に対して個体内及び個体間変動が少ないことも報告されている[119]。マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ及びサル等の実験動物の皮膚は、形態学的にヒトの皮膚とは異なるとの報告がある一方、ミニブタとヒトの皮膚では、一般的な形態、表皮の厚さ、細胞組成及び免疫学的反応性などに関して類似するとの報告がある[120, 121]。以上のような観点から the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) が発行した OECD 試験法ガイドラインにおいて、経皮製剤の安全性評価に有用な動物のモデル種としてブタ及びミニブタが挙げられている。更に近年、ミニブタは経皮製剤を開発する際の毒性試験にしばしば使用されており、一部は FDA 及び EMA において医薬品の承認申請資料として受け入れられている。

一方、ミニブタとヒトの皮膚における主な形態学的な種差としては、ミニブタの皮膚は表面が鱗状であり、角質層が肥厚していることが挙げられている[115]。また、皮下脂肪層については一般にミニブタの方がヒトよりも厚く、その観点から個体内及び個体間で変動が大きい可能性も考えられている。ミニブタにおけるこれらの種差が、多様な特性を有する様々な製剤に関する経皮吸収に及ぼす影響については、まだ明確には確認されていない。一方、OECD (2004) でも、マウス及びラットは毒性試験及びトキシコキネティクス試験で広く使用されている種であり、得られた結果を直接比較することができることから、動物の *in vivo* 試験で最も一般的に使用されている種であると記載されている。したがって、マウス及びラットからの経皮吸収の推定に有用な様々な種類の *in vivo* 経皮吸収データは蓄積されているが、ミニブタに関しては経皮吸収試験は僅かしか実施されていない。そこで、本章では6種の市販の経皮適用型製剤について、皮膚からの薬物経皮吸収率 (F) をミニブタで評価し、報告された臨床試験結果と比較した。また、比較対象動物としてマウス及びラットでも同様に評価を行った。更に、ヒト、ミニブタ及びマウスの摘出皮膚を用いた *in vitro* 薬物皮膚透過試験を実施し、各動物の *in vivo* 吸収率及び *in vitro* 皮膚透過性の結果から、評価薬物のヒトにおける F を予測し、経皮製剤の開発におけるミニブタの有用性を検証した。

### 3.1 *In vivo* 経皮吸収率に関する評価

本章では、市販製剤である ketoprofen tape、flurbiprofen pap、diclofenac gel、buprenorphine tape、fentanyl patch 及び lidocaine tape を使用した。選択した上記 6 種のモデル薬物の clogP は 1.95～4.58 と比較的高く、ketoprofen、flurbiprofen 及び diclofenac は酸性化合物、buprenorphine、fentanyl 及び lidocaine は塩基性化合物に該当する薬物である (Table 11)。

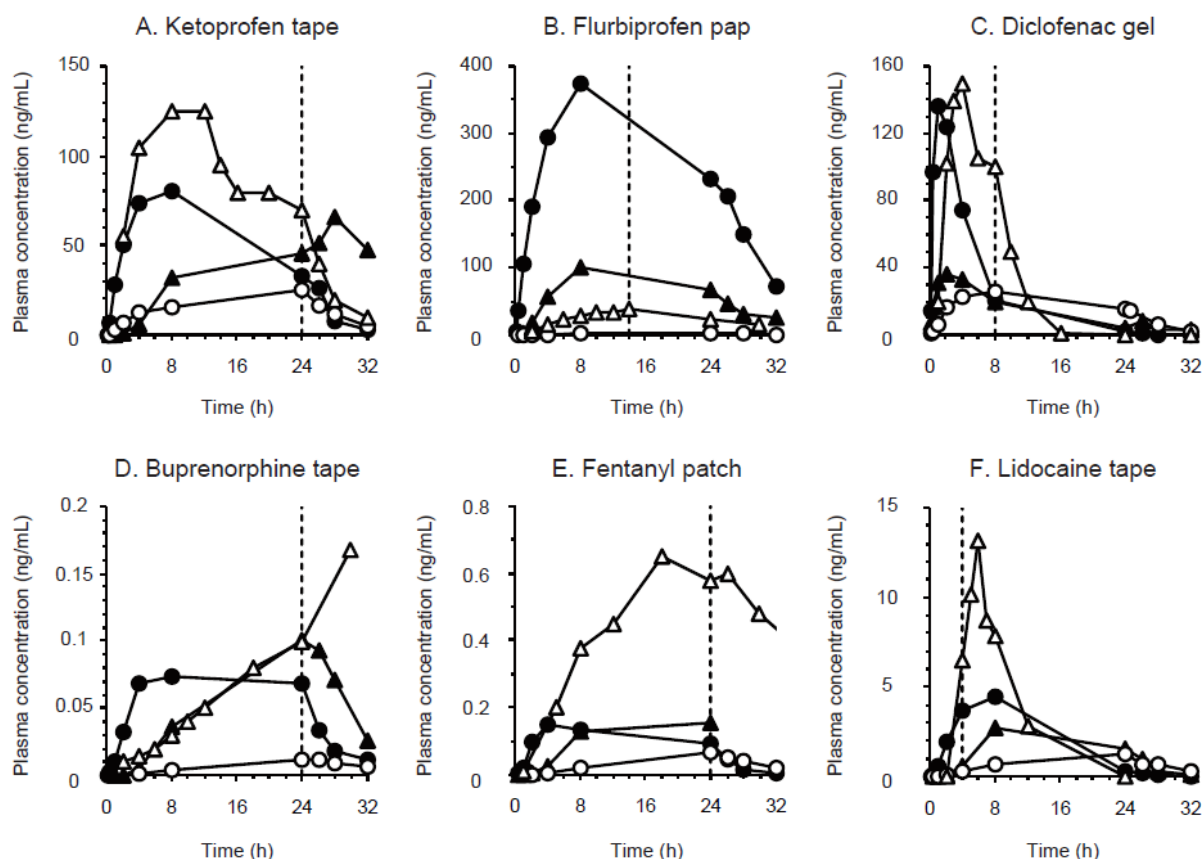
**Table 11 Summary of molecular weight, pKa, clogP.**

Compound	MW	pKa	clogP
Ketoprofen	254.3	4.14	2.76
Flurbiprofen	244.3	4.15	3.75
Diclofenac	296.2	3.84	4.58
Buprenorphine	467.7	8.02	3.99
Fentanyl	336.5	8.99	3.62
Lidocaine	234.3	7.12	1.95

The pKa, and clogP values of drugs were calculated using the ChemDraw Professional version 15.1.0.144 software.

*Int J Pharm*, 534, 348-55 (2017), Table 1

各種市販製剤をミニブタ、マウス及びラットに経皮投与したときの薬物の平均血漿中濃度を Figure 13 に示した。なお、臨床データは文献及び各種インタビューフォームから入手し、すべての薬物の血漿中濃度は、ヒトの臨床試験における用量を基準に各動物種の血漿中濃度をそれぞれ標準化補正した結果で示した。Flurbiprofen pap を除き、各種製剤の経皮適用時間内で比較した場合、ヒトは他の動物種よりも高い血漿中薬物濃度を示した。評価動物の中では、マウスはラットやミニブタと比較してすべての製剤において血漿中濃度が速やかに増加し、マウスにおける薬物の経皮吸収は速やかであった。一方、6 種の製剤すべてにおいて、ミニブタの血漿中濃度はマウス、ラット及びヒトの血漿中濃度よりも非常に低値を示した。



**Figure 13 Plasma concentrations of drugs substances after single percutaneous administration to mice, rats, minipigs, and humans.**

Each symbol represents ●, mice; ▲, rats; ○, minipigs; and △, humans. Plasma concentrations in mice, rats, and minipigs were corrected by the dose in human clinical trials. Dashed lines represent the application time in human clinical trials. In animal experiments, tested drugs were applied for 24 h (occluded application), and then removed from the application site. Each point represents the mean value of three animals.

*Int J Pharm*, 534, 348-55 (2017), Fig. 1

ミニブタ、マウス及びラットに6種の製剤を経皮投与したときのFを次式により算出し、経皮吸収評価時の投与量、適用時間、適用面積及び体表面積(BSA)に対する適用面積の割合とともにTable 12に示した。

$$F = \frac{AUC_{0-t(\text{percutaneous})} \times \text{Dose}_{(\text{iv})}}{AUC_{0-\infty(\text{iv})} \times \text{Dose}_{(\text{percutaneous})}} \quad \text{eq. (27)}$$

以下に、各モデル薬物の結果に関して論述する。

#### Ketoprofen tape (Mohrus tape)

NSAIDsに分類される酸性の薬物で、膏体1g中にketoprofenを20mg含有するテープ剤である。ラットに関しては、Goiらによってketoprofen tapeのラットにおけるFは貼付時間が今回の評価時の半分に相当する12時間で14.8%との報告[122]があり、今回得られたラットにおけるF(25.9%)

と矛盾のない結果であった。評価結果より ketoprofen tape の各動物種における F は、ヒト（61.2%）と比較しマウス（62.0%）はほぼ同程度であったが、ラットは 25.9%と低く、ミニブタは 8.0%で一番低かった。

#### Flurbiprofen pap (Adofeed pap)

NSAIDs に分類される酸性の薬物で、膏体 12 g 中に flurbiprofen を 40 mg 含有する貼付剤である。ラットに関しては、Goi らによって flurbiprofen tape のラットにおける F は今回の評価時と基剤は異なるが、適用面積及び投与量が約 2 倍で 43.0%との報告[122]があり、今回得られたラットにおける F（23.7%）と大きな乖離はなかったと考えられた。評価結果より flurbiprofen pap の各動物種における F は、ヒト（3.0%）と比較しマウス（32.0%）及びラット（23.7%）は高く、ミニブタ（0.4%）が一番低かった。

#### Diclofenac gel (Voltaren gel)

NSAIDs に分類される酸性の薬物で、ゲル 1 g 中に diclofenac を 10 mg 含有するゲル状軟膏である。ミニブタに関しては、Yamamoto らによって diclofenac gel のミニブタにおける F は 6.8%との報告[123]があり、今回得られたミニブタにおける F（3.2%）と大きな乖離はなかった。なお、ヒトの結果に関しては、本製剤を密封包帯法で経皮投与した際と開放系で経皮投与した際に経皮吸収量が異なり、密封包帯法の方が AUC 比で約 60 倍高いことが確認されている（インタビューフォーム）。本ミニブタ検討の実験条件は閉塞塗布であり、密封包帯法に近いことからヒトの結果は密封包帯法の結果で比較した。評価結果より diclofenac gel の各動物種における F は、ヒト（23.3%）と比較しマウス（35.4%）、ラット（19.6%）はほぼ同程度であったが、ミニブタ（3.2%）が一番低かった。

#### Buprenorphine tape (Norspan tape)

塩基性の薬物で、テープ剤である。評価結果より buprenorphine tape の各動物種における F は、ヒト（3.1%）と比較しマウス（1.8%）とラット（1.8%）で大きな乖離はなかったが、ミニブタ（0.1%）が一番低かった。

#### Fentanyl patch (Oneduro patch)

塩基性の薬物で、パッチ剤である。評価結果より fentanyl patch の各動物種における F は、ヒト（49.4%）と比較しマウス（9.7%）、ラット（11.8%）、ミニブタ（2.3%）ともに低値を示したが、ミニブタが一番低かった。

#### Lidocaine tape (Penles tape)

今回評価した製剤の中では clogP が低い塩基性の薬物で、膏体 30 mg 中に lidocaine を 18 mg 含有するテープ剤である。ミニブタに関しては、Yamamoto らによって lidocaine tape のミニブタにおける F は 0.5%との報告[123]があり、今回得られたミニブタにおける F（3.1%）と同様に低い経皮吸収



であった。評価結果より lidocaine tape の各動物種における F は、ヒト（35.8%）と比較しマウス（21.7%）、ラット（42.0%）はほぼ同程度であったが、ミニブタ（3.1%）は一番低かった。

**Table 12 Summary of the dose, application time, application site area, % of BSA, skin permeation rate, and F after percutaneous administrations in mice, rats, minipigs, and humans.**

Compound	Species	Dose (mg/kg)	Application Time (h)	Area (cm <sup>2</sup> )	% of BSA (%)	F (%)
Ketoprofen tape	Mice	4.00	24	0.355	0.4	62.0
	Rats	4.00	24	3.29	1.4	25.9
	Minipigs	1.40	24	59.7	1.6	8.0
	Humans	0.333	24	70.0	0.4	61.2
Flurbiprofen pap	Mice	2.10	24	0.194	0.2	32.0
	Rats	2.10	24	1.82	0.8	23.7
	Minipigs	2.10	24	136	2.6	0.4
	Humans	0.667	14	136	0.7	3.0
Diclofenac gel	Mice	8.00	24	4.00	5.0	35.4
	Rats	4.00	24	10.0	4.3	19.6
	Minipigs	3.80	24	500	9.5	3.2
	Humans <sup>a)</sup>	1.25	8	750	4.1	23.3
Buprenorphine tape	Mice	10.0	24	0.350	0.4	1.8
	Rats	10.0	24	2.84	1.2	1.8
	Minipigs	2.00	24	36.3	0.9	0.1
	Humans	0.167	24	12.5	0.1	3.1
Fentanyl patch	Mice	4.00	24	0.497	0.6	9.7
	Rats	4.00	24	4.17	1.8	11.8
	Minipigs	0.500	24	35.2	0.8	2.3
	Humans	0.0567	24	16.0	0.1	49.4
Lidocaine tape	Mice	10.0	24	0.240	0.3	21.7
	Rats	10.0	24	2.00	0.9	42.0
	Minipigs	10.0	24	103	2.7	3.1
	Humans	0.573	4	30.5	0.2	35.8

Each value in mice, rats, and minipigs represents the mean value of three animals.

% of BSA, the ratio of application site area against total body surface area

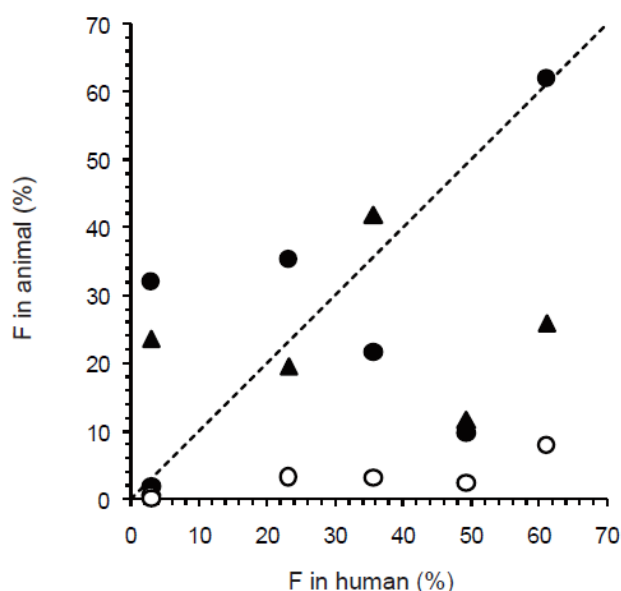
a) Human values were quoted from the data obtained by occlusive dressing technique.

*Int J Pharm, 534, 348-55 (2017), Table 2*

F の値に関しては、評価した製剤で酸性薬物ではマウス>ラット>ミニブタの順であったが、塩基性薬物では、ラット $\geq$ マウス>ミニブタの順であった。ヒトの F の値はすべての製剤でミニブタより高かったが、マウス及びラットの F とは明確な関係性を確認できなかった。

ヒトと動物における F を直接比較した Figure 14 においても、ヒトと動物の F の相関は明確ではなかった。ただし、ミニブタは評価した動物種の中ですべての製剤に対して F の値が最も低かった。

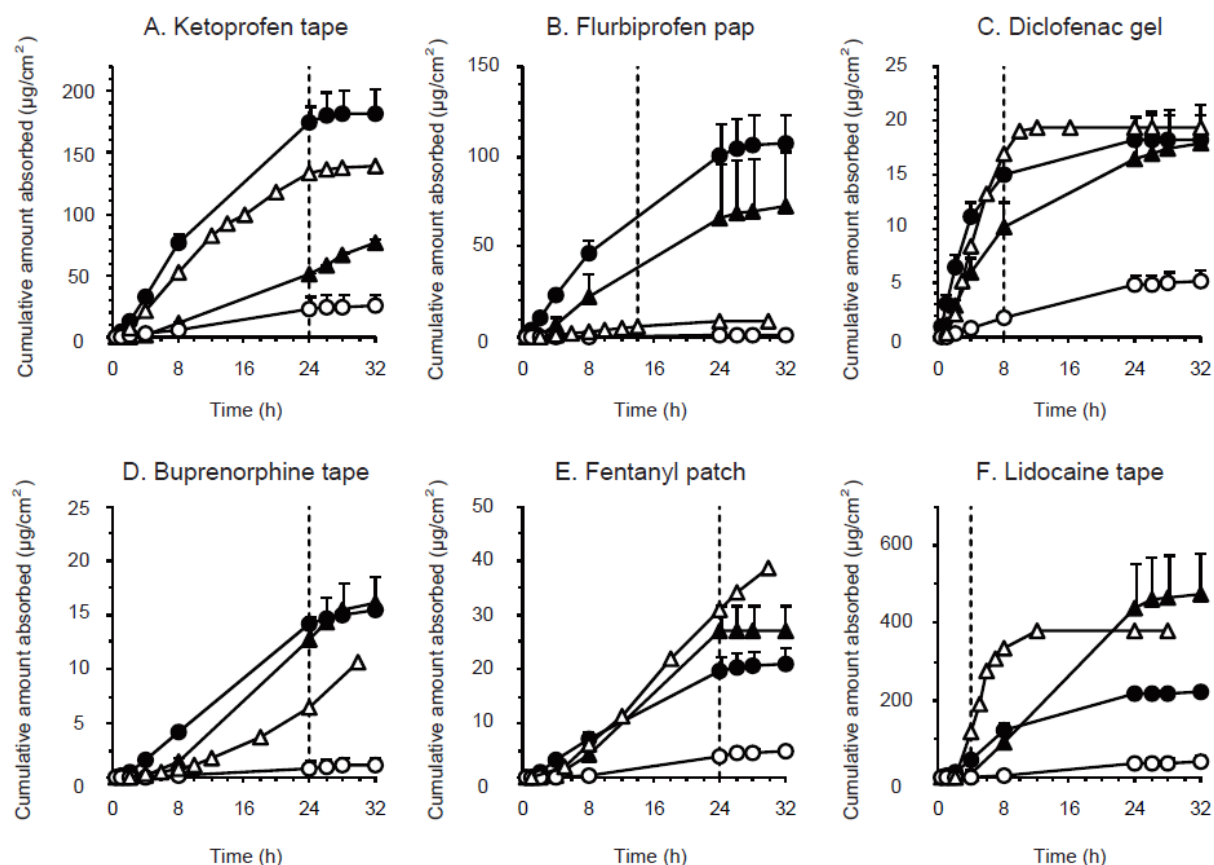
各種製剤を各動物種に経皮投与したときの単位適用面積当たりの皮膚から吸収された累積薬物量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) を静脈内投与及び経皮投与から得られた血漿中濃度から Phoenix WinNonlin 6.4 解析ソフトを用いて deconvolution 法により計算し、Figure 15 に示した。全体として、flurbiprofen pap を除き、マウスとラットの薬物経皮吸収量と速度に関してはヒトと概ね一致した。一方で、ミニブタでは、ヒトや他の動物種と比較して経皮吸収された薬物の量は著しく低かった。



**Figure 14** Plots of the values of the fraction of the dose absorbed (F) in each animal vs. actual values in humans measured after percutaneous administration.

Each symbol represents ●, mice; ▲, rats; and ○, minipigs. Dashed lines represent lines of unity.

*Int J Pharm*, 534, 348-55 (2017), Fig. 2



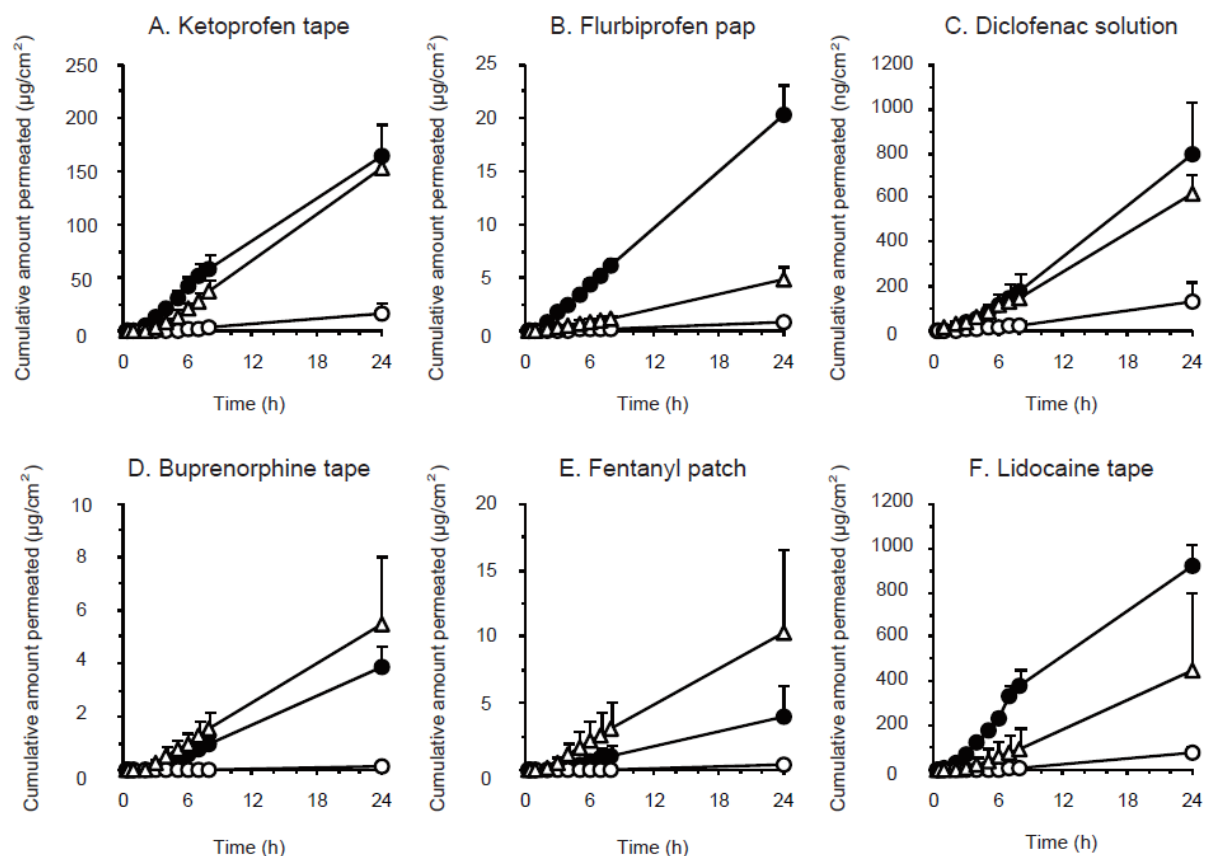
**Figure 15** Cumulative amounts of drugs absorbed from the skin after single percutaneous administration to mice, rats, minipigs, and humans.

Each symbol represents ●, mice; ▲, rats; ○, minipigs; and △, humans. Dashed lines represent the application time in human clinical trials. In animal experiments, tested drugs were applied for 24 h (occluded application), and then removed from the application site. Each point represents the mean + S.D. of three animals.

*Int J Pharm*, 534, 348-55 (2017), Fig. 3

### 3.2 *In vitro* フランツ拡散セルを用いた薬物皮膚透過性評価

3.1 項の *in vivo* 経皮吸収で評価した市販製剤に関して、ミニブタにおける市販製剤からの薬物の吸収率はヒトやマウス、ラットよりも有意に低くなったことが確認された。そこで、本要因が皮膚における薬物の透過性に起因するものか検討するためにヒト、ミニブタ及びマウス皮膚を用いて、評価した 6 製剤の *in vitro* 薬物皮膚透過試験を実施した。6 製剤の *in vitro* 皮膚透過性評価による経時的な累積薬物皮膚透過量を Figure 16 に示した。皮膚厚みを同等に揃えた皮膚表面より薄切したヒトとミニブタの皮膚及び摘出したマウスの皮膚を用いて評価した結果、6 製剤すべてに対してミニブタの皮膚はヒトやマウスの皮膚よりも薬物に対する透過性が低いことが確認された。本結果は、3.1 項のヒトと各動物種へ経皮投与した際の薬物の *in vivo* 経皮吸収を反映する結果であった。



**Figure 16** Time-course of the cumulative amounts of drug substances through the mice full thickness skin without adipose tissue and minipigs and human dermatomed skin using Franz diffusion cells.

Each symbol represents ●, mice; ○, minipigs; and △, humans. Each point represents the mean + S.D. of three skin samples.

*Int J Pharm*, 534, 348-55 (2017), Fig. 4

### 3.3 Triple pack approach によるヒト経皮吸収率の予測に関する評価

3.1 項及び3.2 項で得られたミニブタとマウスの *in vivo* 及び *in vitro* のデータから triple pack approach を用いてヒトにおける薬物の経皮吸収率の予測を試みた。Triple pack とは、1) 評価動物の皮膚における薬物の *in vitro* 透過性、2) ヒトの皮膚における薬物の *in vitro* 透過性、3) 評価動物における薬物の *in vivo* 経皮吸収の3種類のデータの組み合わせに該当する。これらの *in vitro* 及び *in vivo* データを組み合わせ、ヒトにおける経皮吸収を予測する手法を triple pack approach と言い本手法で予測した際、予測精度が向上したことが報告されている[124]。本章では、ヒトにおける薬物の経皮吸収（吸収率、 $F_{\text{human}}$ ）は評価動物（ $F_{\text{animal}}$ ）の *in vivo* 経皮吸収データとヒト及び評価動物における皮膚の *in vitro* 透過性データから次式により予測した。

$$F_{\text{human}} = F_{\text{animal}} \times \left( \frac{\text{in vitro human skin permeated fraction}/24\text{h}}{\text{in vitro animal skin permeated fraction}/24\text{h}} \right) \quad \text{eq. (28)}$$

評価した 6 製剤におけるヒト、ミニブタ及びマウス皮膚を用いた 24 時間までにおける *in vitro* 薬物累積透過率とミニブタ及びマウスにおける *in vivo* 経皮吸収率 ( $F_{\text{animal}}$ ) を **eq. (28)**に代入し予測した  $F_{\text{human}}$  を Table 13 に示した。ミニブタにおける *in vitro* 皮膚透過性と *in vivo* の  $F_{\text{animal}}$  の値はヒトよりも大幅に低下した結果であったが、Figure 17 で示されるようにミニブタのデータから予測した  $F_{\text{human}}$  は実測値とよく相関することが確認された。 $F_{\text{human}}$  の予測値と実測値との相関係数は、ミニブタからの予測の方がマウスからの予測より良好であり、経皮吸収予測に関してミニブタの有用性が示唆された。

**Table 13 Predictions of human percutaneous absorption using the triple pack approach from mice and minipigs data.**

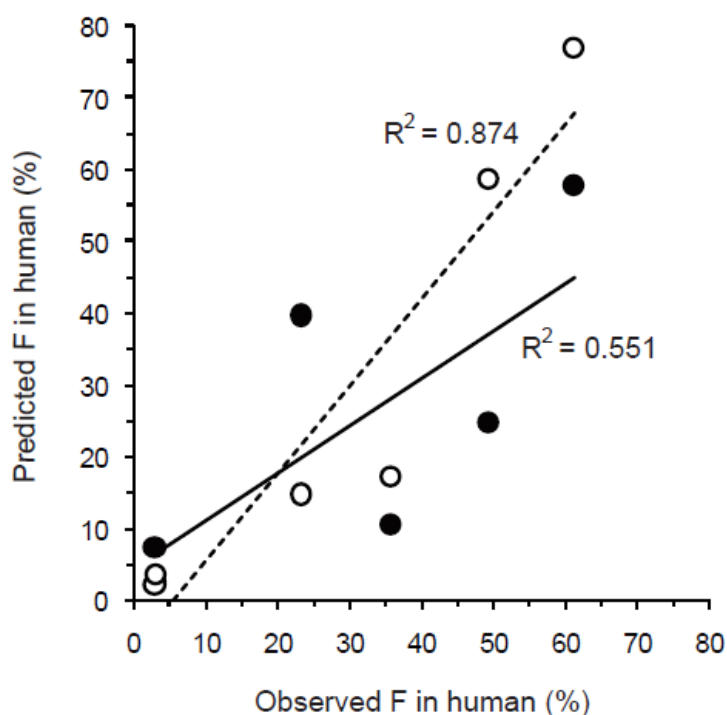
Compound	Species	<i>In vitro</i> permeation *		<i>In vivo</i> absorption (F)		Relative error of predicted human F (%) **
		Fraction of dose permeated/24 h (%)	Ratio Human/animal	Observed F	Predicted human F	
Ketoprofen tape	Mice	57.9	0.93	62.0	57.7	-5.7
	Minipigs	5.6	9.61	8.0	76.9	25.6
	Humans	53.8	-	61.2	-	-
Flurbiprofen pap	Mice	6.9	0.23	32.0	7.4	147
	Minipigs	0.3	5.33	0.4	2.1	-30.0
	Humans	1.6	-	3.0	-	-
Diclofenac gel	Mice	32.8	1.12	35.4	39.6	70.0
	Minipigs	8.0	4.58	3.2	14.7	-36.9
	Humans	36.6	-	23.3	-	-
Buprenorphine tape	Mice	0.49	1.41	1.8	2.5	-19.4
	Minipigs	0.02	34.50	0.1	3.5	12.9
	Humans	0.69	-	3.1	-	-
Fentanyl patch	Mice	2.0	2.55	9.7	24.7	-50.0
	Minipigs	0.2	25.50	2.3	58.7	18.8
	Humans	5.1	-	49.4	-	-
Lidocaine tape	Mice	78.0	0.49	21.7	10.6	-70.4
	Minipigs	6.9	5.54	3.1	17.2	-51.9
	Humans	38.2	-	35.8	-	-

\* Permeation parameters of tested drugs through mice full thickness skin without adipose tissue and minipigs and human dermatomed skin, using Franz diffusion cells.

Each value represents the mean value of three skin samples.

\*\* Calculated as (predicted F- observed F) / observed F × 100 (%)

*Int J Pharm, 534, 348-55 (2017), Table 3*



**Figure 17** Plots of the values of the predicted fraction of the dose absorbed (F) in humans from each animal vs. actual values in humans calculated by the triple pack approach using in vitro and in vivo data from mice and minipigs.

Each symbol represents ●, mice and ○, minipigs. Each line represents the correlation coefficient of mice (solid line) and minipigs (dashed line).

### 3.4 考察

6種の市販製剤をミニブタ、ヒト、マウス及びラットに経皮投与したときの血漿中濃度は、いずれの製剤ともにミニブタで最も低値を示した (Figure 13)。また、ミニブタではFも評価動物種の中で最も低く、ヒトのFと相関しなかった (Figure 14)。これらの結果は、ヒトとブタの皮膚が解剖学的に類似していることや、ヒトにおける薬物経皮吸収予測のモデルとしてミニブタを推奨しているこれまでの報告[3, 120, 121]と相反する結果であった。

ただし、血漿中濃度だけでの比較では、ヒト臨床試験時における製剤を皮膚へ適用する時間と面積は、今回評価した動物への適用時間と面積は異なるため、この実験条件の違いに関してヒト臨床試験時における条件を基準に標準化補正を行い比較する必要があった。そこで、まず各動物種における経皮吸収された薬物の累積量を算出するために、経皮投与後の血漿中濃度を静脈内投与後の血

漿中濃度に deconvolution した。そして、経皮吸収された薬物量を、ヒトの臨床試験時に適用された投与量及び面積で補正し標準化した (Figure 15)。本法により、*in vivo* での製剤の適用時間中における単位皮膚面積あたりの薬物の経皮吸収量を各動物種間で直接比較した。標準化補正した動物とヒトにおける経皮吸収薬物量を比較した結果、ミニブタの経皮薬物吸収量はヒトやマウス、ラットよりも非常に低く、経皮吸収率の結果と同じ結論であった。

経皮吸収量に種差があった場合、皮膚における薬物の初回通過代謝を無視できると仮定すると、評価薬物の皮膚への透過性に種差がある可能性が一つ考えられる。Fick の第 1 拡散法則に基づき、定常状態の flux ( $J_{ss}$ ) は簡易的に次式で表される。

$$J_{ss} = K_{s/v} \times D_s \times \frac{C_v}{L_s} \quad \text{eq. (29)}$$

ここで  $K_{s/v}$  は皮膚と製剤間の薬物の分配係数、 $D_s$  は皮膚内の薬物の拡散係数、 $C_v$  は製剤中の薬物濃度、 $L_s$  は皮膚の厚さを表す。すべての動物種において皮膚で主な拡散障壁となるのは角質層であるため、 $L_s \approx$  角質層の厚さと仮定することができる。角質層の厚さの平均値は、ヒトで 16.8  $\mu\text{m}$ 、ミニブタで 12.3  $\mu\text{m}$ 、マウスで 2.9  $\mu\text{m}$ 、ラットで 5.0  $\mu\text{m}$  と報告されている[125]。Figure 15 では、すべての製剤について、実験動物における経皮投与後 8 時間までの吸収量は、マウス>ラット>ミニブタの順であり、この順序は角質層の厚さの順序と一致した。角質層の構造がマウスやラットではヒトより薄いため、ほとんどの薬物においてマウスやラットの皮膚ではヒト皮膚よりも薬物の透過性が高い傾向にあることが the World Health Organization (WHO) により報告されている。そのため、マウスやラットから得られた *in vivo* データを用いてヒトにおける経皮吸収を予測した場合には、過小評価となる可能性は低いと考えられている[126]。これらの報告と比較した際、本章のマウス及びラットを用いた結果は妥当と考えられた。

Figure 15 から、ミニブタはすべての製剤に対して経皮吸収が評価動物種の中で最も低かった。ミニブタで低吸収を示した要因として、ミニブタの角質層はマウスやラットに比べて厚いということから、ミニブタがヒトに比べて経皮吸収が低かった結果については、角質層の厚さでは説明できなかった。

そこで、*in vivo* 評価した製剤 (diclofenac gel のみ diclofenac 溶液) を対象に、皮膚表面から薄切したミニブタ及びヒトの皮膚とその薄切皮膚の厚みと同等のマウス摘出皮膚を用いて *in vitro* 皮膚薬物透過試験を実施し比較した。Diclofenac 溶液を含むすべての薬物で、マウス皮膚における *in vitro* 透過性はヒト皮膚と同等以上であった。これらのマウスにおける *in vitro* 結果は、WHO の報告及び Figure 15 に示した *in vivo* 経皮吸収試験のデータと一致する結果であった。一方、ミニブタ皮膚における薬物透過性はヒト皮膚よりも非常に低いことが確認された。

ブタとヒトの皮膚は解剖学的に構造が類似していることから、皮膚透過性やその他の経皮 ADME 研究のためのモデル動物としてブタが活用されていることが報告されている[127]。そのため、OECD では、ブタがヒトと同様の薬物経皮吸収を示す場合には、経皮吸収の研究に用いることができるとも記載されている。しかし、1) ブタの皮膚では皮膚表面が鱗状であること、角質層が肥厚している

こと[115]、2) ミニブタでは皮膚腺における血管新生機能が乏しい傾向にあること[84]、3) ミニブタでは皮下組織以降に広範に脂肪が沈着していること[117, 128]、4) ヒトの皮膚の平均 pH 値は 5 に対してミニブタの皮膚の pH 値は 6~7 など軽微な皮膚環境状態に関する種差があること[129]など、ブタとヒトの皮膚で解剖学的、生理学的にいくつか特異的な相違点も見出されている。これらの種差が薬物の経皮吸収に影響し、本章ではヒトよりもミニブタで経皮吸収が非常に低い結果をもたらした可能性も考えられた。

本章の結果では、ミニブタを用いた *in vivo* 試験から直接ヒトの経皮吸収性を予測することは困難であると考えられた。そこで、ミニブタの *in vivo* 吸収率をヒトとミニブタの *in vitro* の皮膚透過性の違いによって補正する triple pack approach により予測したところ、 $F_{\text{human}}$  の予測精度が向上することが確認され、薬物経皮吸収研究におけるモデル動物としてミニブタの有用性を確認することができた。また、Figure 17 よりミニブタのデータから予測した  $F_{\text{human}}$  は、マウスのデータから予測した  $F_{\text{human}}$  よりも実測値と相関する結果が得られた。これらの結果から、ミニブタにおける経皮吸収過程は、定量的な観点ではヒトと一致しない可能性はあるものの、定性的にはヒトと一定の類似性を示しており、*in vivo*、*in vitro* の試験を組み合わせることによって、薬物経皮吸収研究におけるモデル動物として有用であると考えられた。



## 結論

以上3章にわたり、ミニブタにおける経口吸収、体内薬物動態及び経皮吸収に関して検討し、医薬品開発におけるミニブタの実験動物としての有用性について評価することで、以下の結論を得た。

### 第1章 ミニブタにおける薬物の経口吸収に関する評価

本章では物性の異なる17種の市販薬物をミニブタに経口投与後の薬物の量的及び速度的なBAを算出し、ヒト又は他の実験動物（マウス及びラット）と比較することで、ミニブタの薬物吸収性評価における有用性について考察を加えた。

薬物の経口吸収に関して量的及び速度的BAの両方の観点からミニブタとヒトにおける種差について明らかにした。ミニブタではヒトと比較し量的BAの観点では $F_g$ が低いこと、速度的BAの観点ではGERが遅く、消化管通過も持続的であることが量的及び速度的BAの種差の主な要因であると考えられた。以上の結果より、経口剤投与後のヒトにおける薬物血漿中濃度推移をミニブタから予測する場合には、消化管での薬物代謝能の違いに十分な注意が必要であることを示した。また、徐放性製剤のように速度的なBAが重要となる製剤では、胃排出の影響を強く受けてしまうため、ミニブタは評価動物として不向きであると考えられた。一方、ヒトとミニブタの $F_h$ に高い相関性が得られたことから、薬物の肝代謝を含めた体内動態評価に有用な評価系となる可能性を示した。

### 第2章 ミニブタにおける薬物の体内動態パラメータに関する評価

第1章において、ミニブタとヒトにおける各薬物の $F_h$ が良好な相関を示したことから、ミニブタとヒトでの薬物の肝代謝能が同程度である可能性が示唆された。そこで本章では、多様な物理化学的特性を有する14種の薬物を静脈内投与後の血漿中濃度推移からCL及び $V_d$ を算出し、これら動態パラメータの予測におけるミニブタの有用性について検証を試みた。更にこれらの薬物のヒトCL及び $V_d$ に関して、ミニブタ又はマウス及びラットのデータを基にallometric scalingを用いて予測した。ミニブタの体内動態パラメータ及び各動物からの予測値をヒトの実測値と比較することで、前臨床体内動態試験でのミニブタの有用性について検討した。

各薬物のミニブタにおけるCL及び $V_d$ はともに、マウスやラットと比べてヒトとの相関性に優れていることが確認された。また、allometric scalingによる予測では、ミニブタの結果を含めることで、ヒトのCL及び $V_d$ の予測精度が向上した。この時、3種の動物種の結果を組み合わせたallometric scalingによりヒトのCLを予測した場合、ミニブタ単一種の結果から予測した結果と比較して、明確な予測精度の改善は認められなかったことから、ミニブタは他の動物種における動態解析結果に頼ることなく、単一種でヒトのCL及び $V_d$ に関して堅牢な予測を可能とする動物種であることが示唆された。以上の結果より、ヒトの体内動態を予測するための前臨床体内動態試験においてミニブタを使用することは有用であると考えられた。

### 第3章 ミニブタにおける製剤の経皮吸収に関する評価

第2章において、ミニブタは薬物のヒト体内動態を予測する上で有用であることが示された。一方、これまでミニブタは経皮製剤を開発する際の毒性試験にしばしば使用されており、一部は欧米において医薬品の承認申請資料として受け入れられている。また、OECD 試験法ガイドラインにおいても、経皮製剤の安全性評価に有用な動物のモデル種としてブタ及びミニブタが挙げられている。しかしながら、市販の経皮製剤を対象としたミニブタにおける薬物動態に関する情報は少ない。そこで、本章では、6種の市販の経皮適用型製剤について、皮膚からの薬物吸収率をミニブタで評価し、報告された臨床試験結果又は併せて評価したマウス及びラットでの結果と比較した。更に、ヒト、ミニブタ及びマウスの摘出皮膚を用いた *in vitro* 薬物皮膚透過試験を実施し、各動物の *in vivo* 吸収率及び *in vitro* 皮膚透過性の結果から、評価薬物のヒトにおける経皮吸収率を予測し、経皮製剤開発におけるミニブタの有用性を検証した。

製剤を経皮投与した結果、ミニブタの薬物の吸収率はヒトやマウス、ラットよりも有意に低くなった。更に、*in vitro* 薬物皮膚透過試験の結果から、ミニブタの皮膚はヒトやマウスの皮膚よりも薬物に対する透過性が低いことが確認された。すなわち、ミニブタにおいて経皮製剤投与後の吸収率が低かった理由は、薬物の皮膚透過性自体が低いことに起因しており、ミニブタを用いた *in vivo* 試験から直接ヒトの経皮吸収性を予測することは困難であると考えられた。一方で、*in vitro* 及び *in vivo* データを組み合わせた **triple pack approach** により予測したところ、比較として評価したマウスに比べて高い予測精度が得られることが確認された。以上の結果より、ミニブタにおける経皮吸収過程は、定量的な観点ではヒトと一致しない可能性はあるものの、定性的にはヒトと一定の類似性を示しており、*in vivo*、*in vitro* の試験を組み合わせることによって、薬物経皮吸収研究におけるモデル動物として有用であると考えられた。

以上、医薬品の前臨床試験におけるミニブタの有用性に関し、ヒトにおける薬物の体内動態との類似性及び経口投与、経皮投与後の吸収性の違いに関する詳細な検討を行った結果、ミニブタの実験動物としての有効な利用法に関して多くの知見を得た。今後、本研究成果を含めて、ミニブタの生理学的及び動態学的な特徴を十分に理解することで、医薬品開発におけるミニブタの有効な利用法の構築が可能になるものと期待される。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 薬剤学教室 山下伸二 教授に深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益なご助言を頂きました摂南大学薬学部 薬剤研究室 片岡誠 准教授、高木敏英 准教授、南景子 助教に感謝の意を表します。

本研究遂行の機会を与えて戴き、著者の研究活動にあらゆる面でのご支援をいただきました科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部 部長 薩川正広 博士に多大なる感謝の意を表します。

本研究の実施に際し、学術的、技術的なご指導を終始戴きました科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部 石井邦和 氏に深く感謝致します。本研究に関し、ご協力を戴きました科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究の期間中、精神面や健康面などすべての面において、著者を支えてくれた両親、妻と子供に親愛と感謝の意を表します。

2021 年 8 月

吉松 宏倫

## 実験の部

## 第1章 実験の部

### [1] 試験材料

Antipyrine、atenolol、furosemide、midazolam、nicardipine hydrochloride、propranolol hydrochloride、sulfapyridine 及び verapamil hydrochloride は和光純薬工業（株）〔旧名称、現名称は富士フィルム和光純薬（株）〕から、fexofenadine、nifedipine、raloxifene hydrochloride 及び sulfasalazine は Sidma-Aldrich 社から、amitriptyline hydrochloride 及び pravastatin は東京化成工業（株）から、acetaminophen はナカライテスク（株）から、felodipine は AK Scientific 社から、pitavastatin calcium は AvaChem Scientific 社から、timolol は Aronis 社から購入した。ヒト、ミニブタ、マウス及びラットの肝及び小腸ミクロソームは XenoTech, LLC〔旧名称、現名称は Sekisui XenoTech, LLC〕から購入した。その他の試薬は市販の特級品以上のグレードのものを用了。

### [2] 動物

動物の取扱いに関しては、科研製薬（株）動物実験委員会の規程に準拠し、実施した。雄 ICR マウス（6 週齢）は日本エスエルシー（株）から購入した。雄 Sprague-Dawley ラット（6 週齢）は日本チャールス・リバー（株）から購入した。雄 NIBS ミニブタ（3 ヶ月齢）は日生研（株）から購入した。これらの動物は、投与使用前にマウス及びラットでは 6 日間以上、ミニブタでは 1 ヶ月間以上、温度 20～26℃、湿度 30～70%、換気回数は毎時間約 15 回及び 12 時間照明（7～19 時）に設定された飼育室内で馴化した。7～9 週齢のマウス、7～9 週齢のラット及び 4～24 ヶ月齢のミニブタに静脈内投与及び経口投与を行った。

### [3] 血液/血漿濃度比の評価

マウス、ラット、ミニブタ及びヒトそれぞれ各種 3 例以上から採取した新鮮血液を各種プールし、各種血液と各薬物をインキュベートし、*in vitro* 血液/血漿濃度比 ( $R_B$ ) を評価した。プールした各種血液 1 mL を 37℃ でプレインキュベートした後、100 µg/mL の各薬物含有メタノール溶液をそれぞれ 1 µL 添加し転倒混和することで 100 ng/mL の各薬物含有血液試料を調製した。調製した各種血液試料を 37℃ で更に 10 分間インキュベートした。その後、速やかに 4℃、14,000 ×g、10 分間の条件で遠心分離し、血漿を得た。調製直後の血液、分離後の血漿試料に対して 3 倍量の ketoconazole〔和光純薬工業（株）〕含有メタノール〔和光純薬工業（株）〕溶液を内標準物質 (IS) として加えた後、遠心分離（4℃、14,000 ×g、10 分間）し上清を得た。上清を HPLC バイアルに移し、LC-MS/MS 測定試料とした。

### [4] 血漿中タンパク非結合率の評価

マウス、ラット、ミニブタ及びヒトそれぞれ各種 3 例以上から採取し得た血漿を各種プールし、各種血漿と各薬物を平衡透析によりインキュベートし、*in vitro* 血漿中タンパク非結合率 ( $f_{up}$ ) を評価した。プールした各種血漿 990 µL に 1 mg/mL の各薬物含有メタノール溶液をそれぞれ 10 µL 添

加し、各薬物 10 µg/mL を含むマウス、ラット、ミニブタ及びヒト血漿溶液を調製した。予め温湯に通し、0.1 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に浸しておいた透析膜を、平衡透析装置にセットした。透析膜を介し、一方に 0.1 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 750 µL を、他方に調製した血漿溶液 750 µL を添加した。平衡透析装置を設定温度 37°C の恒温振盪器にセットし、振盪回数 60 rpm で 24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、透析膜を介した両相の溶液全量をシリコンコート済低吸着チューブに回収した。回収した試料に対して 3 倍量の ketoconazole 含有メタノール溶液を IS として加えた後、遠心分離 (4°C、14,000 ×g、10 分間) し上清を得た。上清を HPLC バイアルに移し、LC-MS/MS 測定試料とした。

#### [5] 薬物動態試験 (実験動物への投与及び採血)

薬物動態試験では、acetaminophen、amitriptyline hydrochloride、antipyrine、atenolol、felodipine、fexofenadine、furosemide、midazolam、nicardipine hydrochloride、nifedipine、pitavastatin calcium、pravastatin、propranolol hydrochloride、raloxifene hydrochloride、sulfasalazine、timolol 及び verapamil hydrochloride の計 17 種の薬物をそれぞれマウス、ラット及びミニブタに投与した。マウス、ラット及びミニブタともに、薬物の経口投与前日は自由飲水下で一晩 (約 18 時間) 絶食させ、経口投与当日は絶食下で投与した。

##### [5-1] 静脈内投与液の調製

投与液調製濃度より濃度が 100 倍高い各薬物のジメチルスルホキシド (DMSO) [和光純薬 (株)] 溶液を調製した。調製した DMSO 溶液に、エタノール [和光純薬 (株)] / Kolliphor ELP [BASF ジャパン (株)] の 1:1 混液を添加し、最後に生理食塩液を加えて (それぞれ最終濃度は 1%、2.5%、2.5% 及び 94%)、振盪攪拌し、超音波処理することにより、静脈内投与液を調製した。すべての投与液は用時調製し、調製後に目視にて溶解していることを確認し、使用した。

##### [5-2] 経口投与液の調製

各薬物を所定量秤量後、メノウ乳鉢に移し、メノウ乳棒で磨り潰しながら 0.5 w/v% メチルセルロース (MC) 溶液を徐々に加えた。0.5 w/v% MC 溶液で共洗いしながら、所定の濃度に調製した。投与液は、超音波処理し均一に分散させた。すべての投与液は用時調製し、調製後に目視にて均一に分散していることを確認し、使用した。なお、17 種の薬物の内、felodipine、furosemide、nifedipine、sulfasalazine 及び raloxifene の 5 薬物は 0.5 w/v% MC 溶液中で懸濁液状態、その他の薬物は溶解した溶液状態であった。

##### [5-3] 投与及び採血

静脈内投与は無麻酔下で実施した。マウス及びラットには保定器で固定し、シリンジ及び注射針を用いて 0.5 mg/kg 又は 1 mg/kg の用量で、マウスは 5 mL/kg で、ラットは 1 mL/kg で、尾静脈から

投与液を静脈内投与した。ミニブタには保定器で仰向けに固定し、シリンジ及び注射針を用いて 0.1 mg/0.1 mL/kg の用量で前大静脈洞から投与液を静脈内投与した。

経口投与は無麻酔下で実施した。マウス及びラットには片手で保定し、シリンジ及び経口ゾンデを用いて 5 mL/kg で投与液を胃内へ強制投与した。ミニブタでは、心室にできた憩室用の膨隆いわゆる心室憩室は噴門胃の頂部に位置し、その生理的機能は完全には解明されていないが、この突出が経口投与時に影響を及ぼすことが報告されている[130]。経口ゾンデを用いて胃内へ強制投与する際に、ゾンデが誤ってこのポケットに侵入し投与された場合、溶解及び胃内容物排出に遅延が発生する可能性がある。このような誤投与を回避するために、本検討では各投与液をゼラチンカプセルに充填し、ミニブタに経口投与した。

投与後 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、6、8 及び 24 時間無麻酔下で経時的に採血した。マウス及びラットでは、保定器で固定し、尾静脈に片刃カミソリで切れ込みを入れ、ピペットを用いて尾静脈から採血した。ミニブタでは保定器で仰向けに固定し、シリンジ及び注射針を用いて前大静脈洞から採取した。採血量は各時点、マウスは約 30 µL、ラットは約 100 µL、ミニブタは約 400 µL とした。

採取した血液は予めヘパリンナトリウム注射液（1000 単位/mL）を血液量に対して約 2 vol% 分注しておいたチューブに速やかに移し、よく転倒混和した後、氷上に一時保管した。各採血時点で得られた血液を遠心分離（4°C、14,000 ×g、10 分間）し、血漿を得た。採取後の血漿は濃度測定時まで冷凍庫（-30°C 設定）で凍結保存した。血漿中薬物濃度は LC-MS/MS を用いて定量した。

#### [6-1] 肝又は小腸ミクロソーム *in vitro* CYP 代謝試験

シリコンコート済低吸着チューブに 250 mmol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）20 µL、蒸留水 19.5 µL、各薬物含有メタノール溶液 0.5 µL、マウス、ラット、ミニブタ又はヒトの各種肝又は小腸ミクロソーム溶液（反応系での終濃度：0.5 mg 蛋白/mL）5 µL を添加し、設定温度 37°C の恒温槽で 5 分間プレインキュベートした（各薬物終濃度：100 ng/mL）。プレインキュベート後、反応群には NADPH 再生成系（反応系での終濃度：NADP<sup>+</sup> 5 mmol/L、glucose-6-phosphate 5 mmol/L、glucose-6-phosphate dehydrogenase 1 unit/mL、MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/L）5 µL を添加し、反応を開始した。一方、コントロール群には NADPH 再生成系は添加せずインキュベートを続けた。10 分後に ketoconazole 含有メタノール溶液 150 µL を IS として添加し反応を停止した。なお、コントロール群にはこの後 NADPH 再生成系 5 µL を添加した。反応を停止した溶液を遠心分離（4°C、14,000 ×g、10 分間）して上清を HPLC バイアルに移し、LC-MS/MS 測定試料とした。

#### [6-2] 肝又は小腸ミクロソーム *in vitro* UGT 代謝試験

シリコンコート済低吸着チューブに 125 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5）20 µL、蒸留水 19.0 µL、2.5 mg/mL alamethicin（25 vol%メタノール）溶液 0.5 µL、マウス、ラット、ミニブタ又はヒトの各種肝又は小腸ミクロソーム溶液（反応系での終濃度：0.5 mg 蛋白/mL）5 µL を添加し、15 分間氷上に静置した。その後、各薬物含有メタノール溶液 0.5 µL を添加し、設定温度 37°C の恒温槽で 5 分間

プレインキュベートした（各薬物終濃度：100 ng/mL）。プレインキュベート後、反応群には UDP-GA 反応開始剤（反応系での終濃度：UDP-glucuronic acid (UDP-GA) 2 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 8 mmol/L）5 μL を添加し、反応を開始した。一方、コントロール群には UDP-GA 反応開始剤は添加せずインキュベートを続けた。10～20 分後（薬物ごとにインキュベーション時間を設定）に ketoconazole 含有メタノール溶液 150 μL を IS として添加し反応を停止した。なお、コントロール群にはこの後 UDP-GA 反応開始剤 5 μL を添加した。反応を停止した溶液を遠心分離（4℃、14,000 ×g、10 分間）して上清を HPLC バイアルに移し、LC-MS/MS 測定試料とした。

#### [7] LC-MS/MS による測定対象化合物の濃度測定

本分析法では試料の前処理としてメタノール沈殿法による除蛋白を行い、その上清を LC-MS/MS で分析した。各検量線は検量試料のピークエリアと内標準物質のピークエリアの比を直線回帰して作成した。

##### [7-1] 検量線用標準溶液

各種測定対象化合物をそれぞれメタノールで段階希釈し、0.1～500 ng/mL の範囲で各濃度の検量線用標準溶液を調製した。各標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

##### [7-2] QC (Quality control) 試料用標準溶液

各種測定対象化合物をそれぞれメタノールで段階希釈し、1、10 及び 100 ng/mL の QC 試料用標準溶液を調製した。各標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

##### [7-3] 内標準溶液 (IS)

Ketoconazole をメタノールに溶解させ、60 ng/mL の内標準溶液を調製した。内標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。なお、[3]、[4]、[6]で使用した ketoconazole 含有メタノール溶液は ketoconazole 濃度を 20 ng/mL に調製したものを使用した。

##### [7-4] 試料の前処理

###### (1) 検量線用標準試料

ポリプロピレン（以下、PP と表記）チューブにメタノール、IS、各濃度の検量線用標準溶液（濃度 0 はメタノール）及び各種ブランクマトリックス [vivo : 各種ブランク血漿、vitro : PBS 緩衝液 (pH 7.4) ] を 1 : 1 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを遠心分離（4℃、14,000 ×g、10 分間）し、その上清を HPLC バイアルに移し、検量線用標準試料とした。

###### (2) QC 試料

PP チューブにメタノール、IS、各濃度の QC 試料用標準溶液及び各種ブランクマトリックスを 1 : 1 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、QC 試料と



した。QC 試料は連続分析シーケンスの中で検量線用標準試料の後の未知試料の前後に配置した。分析単位ごとの前処理後試料の調製本数は各濃度  $n = 2$  とした。

### (3) ブランク試料

PP チューブにメタノール及び各種ブランクマトリックスを 3:1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、ブランク試料とした。ブランク試料は連続分析におけるバックグラウンドノイズを確認するため連続分析シーケンス中に適宜配置した。

### (4) 未知試料

PP チューブにメタノール、IS 及び採取した[5]の実試料（血漿）を 2:1:1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、未知試料とした。なお、実試料は必要に応じて各種ブランクマトリックスで希釈したものを添加した。また、[3]、[4]、[6]の LC-MS/MS 測定試料はそのまま未知試料として取り扱った。

## [7-5] TSQ QUANTUM Vantage LC-MS/MS システムの条件

- HPLC : NANOSPACE SI-2 [旧名称：(株) 資生堂、現：(株) 大阪ソーダ]
- MS : TSQ QUANTUM Vantage [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]
- データ処理ソフト : Xcalibur [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]
- データ解析ソフト : LCquan [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]

### (1) HPLC 条件

- 1) カラム : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MGIII [2.0 mm I.D. × 50 mm、粒子径 5 μm、(株) 資生堂]  
(Amitriptyline、midazolam、nicardipine、nifedipine、timolol)  
: Inertsil® ODS-3 [2.1 mm × 50 mm、粒子径 4 μm、ジーエルサイエンス (株)]  
(Acetaminophen、antipyrine、felodipine、fexofenadine、furosemide、propranolol、raloxifene)  
: YMC-Triart C18 [2.0 mm × 50 mm、粒子径 5 μm、(株) ワイエムシィ]  
(Atenolol、pitavastatin、pravastatin、sulfapyridine、sulfasalazine、verapamil)
- 2) 移動相 : 移動相 A ; 0.1 vol% ギ酸水溶液、移動相 B ; メタノール  
(Acetaminophen、amitriptyline、antipyrine、felodipine、fexofenadine、furosemide、midazolam、nicardipine、nifedipine、pitavastatin、pravastatin、propranolol、raloxifene、sulfapyridine、sulfasalazine、timolol、verapamil)  
: 移動相 A ; 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 B ; アセトニトリル  
(Atenolol)

3) グラジエント : Acetaminophen、antipyrine、felodipine、fexofenadine、furosemide、propranolol、  
raloxifene

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.4	95.0	5.0
0.7	0.4	95.0	5.0
0.8	0.4	10.0	90.0
3.0	0.4	10.0	90.0
3.1	0.8	0.0	100.0
6.0	0.8	0.0	100.0
6.1	0.6	95.0	5.0
7.8	0.6	95.0	5.0
7.9	0.4	95.0	5.0
8.0	0.4	95.0	5.0

: Amitriptyline、atenolol、midazolam、nicardipine、nifedipine、pitavastatin、pravastatin、  
sulfapyridine、sulfasalazine、timolol、verapamil

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	90.0	10.0
1.5	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	90.0	10.0
5.5	0.5	90.0	10.0
5.6	0.3	90.0	10.0
7.5	0.3	90.0	10.0

4) カラム温度 : 40°C

5) 注入量 : 10 µL

6) オートサンプラー温度 : 5°C

## (2) MS 条件

- 1) Ionization Method : Electro spray ionization (ESI)  
 2) Spray Voltage : 3000 V  
 3) Q2 Gas Pressure : 1.5 mTorr  
 4) Sheath Gas flow rate : 20 Arb  
 5) Ion Sweep Gas Pressure : 0 Arb  
 6) Aux Gas flow rate : 5 Arb  
 7) Capillary Temperature : 330°C  
 8) Vaporizer Temperature : 200°C  
 9) Scan Width :  $\pm 0.500$  amu  
 10) Scan Time : 0.200 s  
 11) Q1 Peak Width : 0.70 FWHM  
 12) Q3 Peak Width : 0.70 FWHM  
 13) Scan Events : selective reaction monitoring (SRM) モード

測定対象化合物	Scan Events	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (V)	S-Lens
Acetaminophen	Positive	151.92	109.95	20	75
Amitriptyline	Positive	278.24	202.12	57	82
Antipyrine	Positive	189.10	77.03	40	64
Atenolol	Positive	267.16	190.11	17	57
Felodipine	Negative	382.08	154.08	16	74
Fexofenadine	Positive	502.34	466.36	24	144
Furosemide	Negative	328.89	204.94	23	81
Midazolam	Positive	326.14	291.17	25	116
Nicardipine	Positive	480.30	315.19	22	115
Nifedipine	Positive	347.18	254.13	18	62
Pitavastatin	Positive	422.23	290.15	27	122
Pravastatin	Negative	423.25	303.25	18	139
Propranolol	Positive	260.10	155.03	25	87
Raloxifene	Positive	474.21	112.17	28	153
Sulfapyridine	Positive	250.05	156.04	16	86
Sulfasalazine	Negative	397.08	197.02	27	100
Timolol	Positive	317.22	244.11	22	80
Verapamil	Positive	455.25	165.14	26	101
IS (ketoconazole)	Positive	531.28	243.90	32	151

CE : Collision Energy

#### [7-6] 定量値の算出

クロマトグラムの波形処理及び濃度計算は LCquan で行った。LCquan で自動的に認識されたピークのピーク面積値を得た。検量線は、内標準物質に対する分析対象物質のピーク面積比と濃度の関係を最小二乗法により適切な重み付けをし、直線回帰 ( $y = ax + b$ ) して作成した。得られた検量線を用い、QC 試料及び未知試料における各測定対象化合物の濃度を定量した。

#### [7-7] 測定結果の採用基準

分析単位の採用・不採用を以下の採用基準で判断した。なお、真度 (%) = (定量値/理論値) × 100 とした。

- (1) 回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限においては理論値の  $\pm 20\%$  以内、定量下限以外においては理論値の  $\pm 15\%$  以内でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限濃度を除く濃度が評価基準を満たさない場合、その濃度を除外して検量線を求め、評価基準を満たした場合はその検量線を採用する。その場合、検量線用標準試料の 75% 以上が上記基準を満たさなければならない。
- (2) 検量線用標準試料の定量下限が基準を満たさなかった場合には、この次の濃度の検量線用標準試料を定量下限としてもよい。その場合、変更された検量線の濃度範囲は、少なくとも 3 濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）の QC 試料を含まなければならない。
- (3) QC 試料の数は、各濃度あたり 2 試料とする。QC 試料は、少なくとも実試料の前後で測定される必要がある。QC 試料の真度は理論値の  $\pm 15\%$  以内であるものとし、全 QC 試料の 3 分の 2 以上かつ各濃度の 2 分の 1 以上の QC 試料が上記基準を満たさなければならない。

本試験では上記の基準をすべて満たした。

#### [8] 薬物動態パラメータ解析

薬物動態パラメータ AUC、MRT 及び  $CL_p$  の算出は Phoenix WinNonlin 6.4（サターラ合同会社）を用いて、ノンコンパートメント解析により実施した。

## 第2章 実験の部

### [1] 試験材料

Antipyrine、atenolol、diclofenac sodium、furosemide、ketoprofen、lidocaine 及び propranolol hydrochloride は和光純薬工業（株）〔旧名称、現名称は富士フイルム和光純薬（株）〕から、fexofenadine 及び raloxifene hydrochloride は Sidma-Aldrich 社から、flurbiprofe は東京化成工業（株）から、acetaminophen はナカライテスク（株）から、felodipine は AK Scientific 社から購入した。Fentanyl injection はヤンセンファーマ（株）から、lepetan injection 0.3 mg は大塚製薬（株）から購入した。その他の試薬は市販の特級品以上のグレードのものをを用いた。

### [2] 動物

動物の取扱いに関しては、科研製薬（株）動物実験委員会の規程に準拠し、実施した。雄 ICR マウス（6 週齢）は日本エスエルシー（株）から購入した。雄 Sprague-Dawley ラット（6 週齢）は日本チャールス・リバー（株）から購入した。雄 NIBS ミニブタ（3 ヶ月齢）は日生研（株）から購入した。これらの動物は、投与使用前にマウス及びラットでは 6 日間以上、ミニブタでは 1 ヶ月間以上、温度 20～26℃、湿度 30～70%、換気回数は毎時間約 15 回及び 12 時間照明（7～19 時）に設定された飼育室内で馴化した。7～9 週齢のマウス、7～9 週齢のラット及び 4～24 ヶ月齢のミニブタに静脈内投与及び経口投与を行った。

### [3] 血液/血漿濃度比の評価

マウス、ラット、ミニブタ及びヒトそれぞれ各種 3 例以上から採取した新鮮血液を各種プールし、各種血液と各薬物をインキュベートし、*in vitro* 血液/血漿濃度比 ( $R_B$ ) を評価した。プールした各種血液 1 mL を 37℃ でプレインキュベートした後、100 µg/mL の各薬物含有メタノール溶液をそれぞれ 1 µL 添加し転倒混和することで 100 ng/mL の各薬物含有血液試料を調製した。調製した各種血液試料を 37℃ で更に 10 分間インキュベートした。その後、速やかに 4℃、14,000 ×g、10 分間の条件で遠心分離し、血漿を得た。調製直後の血液、分離後の血漿試料に対して 3 倍量の ketoconazole [和光純薬工業（株）] 含有メタノール [和光純薬工業（株）] 溶液を内標準物質 (IS) として加えた後、遠心分離（4℃、14,000 ×g、10 分間）し上清を得た。上清を HPLC バイアルに移し、LC-MS/MS 測定試料とした。

### [4] 血漿中タンパク非結合率の評価

マウス、ラット、ミニブタ及びヒトそれぞれ各種 3 例以上から採取し得た血漿を各種プールし、各種血漿と各薬物を平衡透析によりインキュベートし、*in vitro* 血漿中タンパク非結合率 ( $f_{up}$ ) を評価した。プールした各種血漿 990 µL に 1 mg/mL の各薬物含有メタノール溶液をそれぞれ 10 µL 添加し、各薬物 10 µg/mL を含むマウス、ラット、ミニブタ及びヒト血漿溶液を調製した。予め温湯に通し、0.1 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に浸しておいた透析膜を、平衡透析装置にセット

した。透析膜を介し、一方に 0.1 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 750  $\mu$ L を、他方に調製した血漿溶液 750  $\mu$ L を添加した。平衡透析装置を設定温度 37°C の恒温振盪器にセットし、振盪回数 60 rpm で 24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、透析膜を介した両相の溶液全量をシリコンコート済低吸着チューブに回収した。回収した試料に対して 3 倍量の ketoconazole 含有メタノール溶液を IS として加えた後、遠心分離 (4°C、14,000  $\times$ g、10 分間) し上清を得た。上清を HPLC バイアルに移し、LC-MS/MS 測定試料とした。

#### [5] 薬物動態試験 (実験動物への投与及び採血)

薬物動態試験では、acetaminophen、antipyrine、atenolol、lepetan injection 0.3 mg、diclofenac sodium、felodipine、fentanyl injection、fexofenadine、flurbiprofen、furosemide、ketoprofen、lidocaine、propranolol hydrochloride 及び raloxifene hydrochloride の計 14 種の薬物をそれぞれマウス、ラット及びミニブタに静脈内投与した。マウス、ラット及びミニブタともに、投与当日は非絶食下で投与した。

##### [5-1] 静脈内投与液の調製

投与液調製濃度より濃度が 100 倍高い各薬物のジメチルスルホキシド (DMSO) [和光純薬 (株)] 溶液を調製した。調製した DMSO 溶液に、エタノール [和光純薬 (株)] / Kolliphor ELP [BASF ジャパン (株)] の 1:1 混液を添加し、最後に生理食塩液を加えて (それぞれ最終濃度は 1%、2.5%、2.5% 及び 94%)、振盪攪拌し、超音波処理することにより、静脈内投与液を調製した。すべての投与液は用時調製し、調製後に目視にて溶解していることを確認し、使用した。なお、lepetan injection 0.3 mg 及び fentanyl injection に関しては製品に生理食塩液を添加し希釈することにより所定の濃度に調製した。

##### [5-2] 投与及び採血

静脈内投与は無麻酔下で実施した。マウス及びラットには保定器で固定し、シリンジ及び注射針を用いて buprenorphine は 0.2 mg/kg、fentanyl は 25  $\mu$ g/kg、その他は 1 mg/kg の用量で、マウスは 5 mL/kg で、ラットは 1 mL/kg で、尾静脈から投与液を静脈内投与した。ミニブタには保定器で仰向けに固定し、シリンジ及び注射針を用いて buprenorphine は 0.02 mg/0.1 mL/kg、fentanyl は 5  $\mu$ g/0.1 mL/kg、その他は 0.1 mg/0.1 mL/kg の用量で前大静脈洞から投与液を静脈内投与した。

投与後 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、6、8 及び 24 時間に無麻酔下で経時的に採血した。マウス及びラットでは、保定器で固定し、尾静脈に片刃カミソリで切れ込みを入れ、ピペットを用いて尾静脈から採血した。ミニブタでは保定器で仰向けに固定し、シリンジ及び注射針を用いて前大静脈洞から採取した。採血量は各時点、マウスは約 30  $\mu$ L、ラットは約 100  $\mu$ L、ミニブタは約 400  $\mu$ L とした。

採取した血液は予めヘパリンナトリウム注射液 (1000 単位/mL) を血液量に対して約 2 vol% 分注しておいたチューブに速やかに移し、よく転倒混和した後、氷上に一時保管した。各採血時点で得

られた血液を遠心分離（4°C、14,000 ×g、10 分間）し、血漿を得た。採取後の血漿は濃度測定時まで冷凍庫（-30°C 設定）で凍結保存した。血漿中薬物濃度は LC-MS/MS を用いて定量した。

#### [6] LC-MS/MS による測定対象化合物の濃度測定

本分析法では試料の前処理としてメタノール沈殿法による除蛋白を行い、その上清を LC-MS/MS で分析した。各検量線は検量試料のピークエリアと内標準物質のピークエリアの比を直線回帰して作成した。

##### [6-1] 検量線用標準溶液

各種測定対象化合物をそれぞれメタノールで段階希釈し、0.1～500 ng/mL の範囲で各濃度の検量線用標準溶液を調製した。各標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

##### [6-2] QC（Quality control）試料用標準溶液

各種測定対象化合物をそれぞれメタノールで段階希釈し、1、10 及び 100 ng/mL の QC 試料用標準溶液を調製した。各標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

##### [6-3] 内標準溶液（IS）

Ketoconazole をメタノールに溶解させ、60 ng/mL の内標準溶液を調製した。内標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。なお、[3]、[4]、[6]で使用した ketoconazole 含有メタノール溶液は ketoconazole 濃度を 20 ng/mL に調製したものを使用した。

##### [6-4] 試料の前処理

###### (1) 検量線用標準試料

ポリプロピレン（以下、PP と表記）チューブにメタノール、IS、各濃度の検量線用標準溶液（濃度 0 はメタノール）及び各種ブランクマトリックス [vivo : 各種ブランク血漿、vitro : PBS 緩衝液 (pH 7.4) ] を 1 : 1 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを遠心分離（4°C、14,000 ×g、10 分間）し、その上清を HPLC バイアルに移し、検量線用標準試料とした。

###### (2) QC 試料

PP チューブにメタノール、IS、各濃度の QC 試料用標準溶液及び各種ブランクマトリックスを 1 : 1 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、QC 試料とした。QC 試料は連続分析シーケンスの中で検量線用標準試料の後の未知試料の前後に配置した。分析単位ごとの前処理後試料の調製本数は各濃度  $n = 2$  とした。

###### (3) ブランク試料

PP チューブにメタノール及び各種ブランクマトリックスを 3:1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、ブランク試料とした。ブランク試料は連続分析におけるバックグラウンドノイズを確認するため連続分析シーケンス中に適宜配置した。

#### (4) 未知試料

PP チューブにメタノール、IS 及び採取した[5]の実試料（血漿）を 2 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、未知試料とした。なお、実試料は必要に応じて各種ブランクマトリックスで希釈したものを添加した。また、[3]、[4]の LC-MS/MS 測定試料はそのまま未知試料として取り扱った。

#### [6-5] TSQ QUANTUM Vantage LC-MS/MS システムの条件

- HPLC : NANOSPACE SI-2 [旧名称 : (株) 資生堂、現 : (株) 大阪ソーダ]
- MS : TSQ QUANTUM Vantage [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]
- データ処理ソフト : Xcalibur [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]
- データ解析ソフト : LCquan [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]

#### (1) HPLC 条件

- 1) カラム : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MGIII [2.0 mm I.D. × 50 mm、粒子径 5 μm、(株) 資生堂]  
(Buprenorphine、diclofenac、fentanyl、flurbiprofen、ketoprofen、lidocaine)  
: Inertsil® ODS-3 [2.1 mm × 50 mm、粒子径 4 μm、ジーエルサイエンス (株)]  
(Acetaminophen、antipyrine、felodipine、fexofenadine、furosemide、propranolol、raloxifene)  
: YMC-Triart C18 [2.0 mm × 50 mm、粒子径 5 μm、(株) ワイエムシィ]  
(Atenolol)
- 2) 移動相 : 移動相 A ; 0.1 vol%ギ酸水溶液、移動相 B ; メタノール  
(Acetaminophen、antipyrine、buprenorphine、felodipine、fentanyl、fexofenadine、furosemide、propranolol、raloxifene)  
: 移動相 A ; 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 B ; アセトニトリル  
(Atenolol)  
: 移動相 A ; 0.01 vol%酢酸水溶液、移動相 B ; 0.01 vol%酢酸アセトニトリル溶液  
(Diclofenac、flurbiprofen、ketoprofen)  
: 移動相 A ; 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 B ; メタノール  
(Lidocaine)



3) グラジエント : Acetaminophen、antipyrine、felodipine、fexofenadine、furosemide、propranolol、raloxifene

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.4	95.0	5.0
0.7	0.4	95.0	5.0
0.8	0.4	10.0	90.0
3.0	0.4	10.0	90.0
3.1	0.8	0.0	100.0
6.0	0.8	0.0	100.0
6.1	0.6	95.0	5.0
7.8	0.6	95.0	5.0
7.9	0.4	95.0	5.0
8.0	0.4	95.0	5.0

: Atenolol

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	90.0	10.0
1.5	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	90.0	10.0
5.5	0.5	90.0	10.0
5.6	0.3	90.0	10.0
7.5	0.3	90.0	10.0

: Buprenorphine、fentanyl、lidocaine

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	80.0	20.0
1.0	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0

4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	80.0	20.0
5.5	0.5	80.0	20.0
5.6	0.3	80.0	20.0
7.5	0.3	80.0	20.0

: Diclofenac、flurbiprofen

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	75.0	25.0
1.0	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	75.0	25.0
5.5	0.5	75.0	25.0
5.6	0.3	75.0	25.0
7.5	0.3	75.0	25.0

: Ketoprofen

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	75.0	25.0
2.0	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	75.0	25.0
5.5	0.5	75.0	25.0
5.6	0.3	75.0	25.0
7.5	0.3	75.0	25.0

4) カラム温度 : 40°C

5) 注入量 : 10 µL

6) オートサンプラー温度 : 5°C

(2) MS 条件

- 1) Ionization Method : Electro spray ionization (ESI)
- 2) Spray Voltage : 3000 V
- 3) Q2 Gas Pressure : 1.5 mTorr
- 4) Sheath Gas flow rate : 20 Arb
- 5) Ion Sweep Gas Pressure : 0 Arb
- 6) Aux Gas flow rate : 5 Arb
- 7) Capillary Temperature : 330°C
- 8) Vaporizer Temperature : 200°C
- 9) Scan Width :  $\pm 0.500$  amu
- 10) Scan Time : 0.200 s
- 11) Q1 Peak Width : 0.70 FWHM
- 12) Q3 Peak Width : 0.70 FWHM
- 13) Scan Events : selective reaction monitoring (SRM) モード

測定対象化合物	Scan Events	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (V)	S-Lens
Acetaminophen	Positive	151.92	109.95	20	75
Antipyrine	Positive	189.10	77.03	40	64
Atenolol	Positive	267.16	190.11	17	57
Buprenorphine	Positive	468.25	396.30	39	141
Diclofenac	Negative	293.94	250.00	15	62
Felodipine	Negative	382.08	154.08	16	74
Fentanyl	Positive	337.21	188.17	22	110
Fexofenadine	Positive	502.34	466.36	24	144
Flurbiprofen	Negative	243.02	199.10	16	38
Furosemide	Negative	328.89	204.94	23	81
Ketoprofen	Positive	255.04	209.20	13	72
Lidocaine	Positive	235.10	86.06	18	73
Propranolol	Positive	260.10	155.03	25	87
Raloxifene	Positive	474.21	112.17	28	153
IS (ketoconazole)	Positive	531.28	243.90	32	151

CE : Collison Energy

[6-6] 定量値の算出

クロマトグラムの波形処理及び濃度計算は LCquan で行った。LCquan で自動的に認識されたピークのピーク面積値を得た。検量線は、内標準物質に対する分析対象物質のピーク面積比と濃度の関

係を最小二乗法により適切な重み付けをし、直線回帰 ( $y = ax + b$ ) して作成した。得られた検量線を用い、QC 試料及び未知試料における各測定対象物質濃度を定量した。

#### [6-7] 測定結果の採用基準

分析単位の採用・不採用を以下の採用基準で判断した。なお、真度 (%) = (定量値/理論値) × 100 とした。

- (1) 回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限においては理論値の  $\pm 20\%$  以内、定量下限以外においては理論値の  $\pm 15\%$  以内でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限濃度を除く濃度が評価基準を満たさない場合、その濃度を除外して検量線を求め、評価基準を満たした場合はその検量線を採用する。その場合、検量線用標準試料の 75% 以上が上記基準を満たさなければならない。
- (2) 検量線用標準試料の定量下限が基準を満たさなかった場合には、この次の濃度の検量線用標準試料を定量下限としてもよい。その場合、変更された検量線の濃度範囲は、少なくとも 3 濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）の QC 試料を含まなければならない。
- (3) QC 試料の数は、各濃度あたり 2 試料とする。QC 試料は、少なくとも実試料の前後で測定される必要がある。QC 試料の真度は理論値の  $\pm 15\%$  以内であるものとし、全 QC 試料の 3 分の 2 以上かつ各濃度の 2 分の 1 以上の QC 試料が上記基準を満たさなければならない。

本試験では上記の基準をすべて満たした。

#### [7] 臨床データ

臨床体内動態パラメータは文献[38, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137]から引用した。

#### [8] 薬物動態パラメータ解析

薬物動態パラメータ  $CL_p$ 、 $V_d$  の算出は Phoenix WinNonlin 6.3（サターラ合同会社）を用いて、ノンコンパートメント解析により実施した。

### 第3章 実験の部

#### [1] 試験材料

Mohrus tape 20 mg (ketoprofen tape) 及び norspan tape 10 mg (buprenorphine tape) は久光製薬 (株) から、adofeed pap 40 mg (flurbiprofen pap) は科研製薬 (株) から、voltaren gel (diclofenac gel) はノバルティスファーマ (株) から、penles tape (lidocaine tape) はマルホ (株) から、oneduro patch (fentanyl patch) はヤンセンファーマ (株) から購入した。

Diclofenac sodium、ketoprofen 及び lidocaine は和光純薬工業 (株) [旧名称、現名称は富士フィルム和光純薬 (株)] から、flurbiprofen は東京化成工業 (株) から、fentanyl injection (fentanyl) 及び lepetan injection (buprenorphine) はヤンセンファーマ (株) から購入した。その他の試薬は市販の特級品以上のグレードのものをを用いた。

#### [2] 動物

動物の取扱いに関しては、科研製薬 (株) 動物実験委員会の規程に準拠し、実施した。雄 Hos: HR-1 ヘアレスマウス (6 週齢) 及び雄 HWY ヘアレスラットは日本エスエルシー (株) から購入した。雄 NIBS ミニブタ (3 ヶ月齢) は日生研 (株) から購入した。これらの動物は、投与使用前にマウス及びラットでは 6 日間以上、ミニブタでは 1 ヶ月間以上、温度 20~26°C、湿度 30~70%、換気回数は毎時間約 15 回及び 12 時間照明 (7~19 時) に設定された飼育室内で馴化した。7~9 週齢のマウス、7~9 週齢のラット及び 4~24 ヶ月齢のミニブタに静脈内投与及び経皮投与を行った。

#### [3] 皮膚

ヒト及びミニブタの皮膚組織は、それぞれ 3 例ずつ (株) ケー・エー・シーから購入し入手した。ヒトの皮膚は、Biopredic International 社 (フランス) で様々な場所で実施された美容外科的手術中に白人女性の腹部から採取した皮膚である。3 例のヒトドナーの年齢は 52 歳、62 歳、48 歳であり、その BMI スコアはそれぞれ 28、31、29 であった。3 例のミニブタはいずれも雄、6 ヶ月齢、体重約 10 kg であった。ミニブタを屠殺後に背部皮膚から皮膚組織を採取し、これらの皮膚を直ちに厚み約 0.4 mm に dermatomed し、使用するまで -20°C で凍結保存した。購入した皮膚は、製造業者が推奨している使用期限内 (調製後 6 ヶ月以内) に使用した。マウスに関しては、屠殺後 3 匹のマウスの背部皮膚から、脂肪組織を含まないように、全層皮膚を採取し、直ちに皮膚透過試験に使用した。

#### [4] フランツ拡散セル

フランツ拡散セル (内径: 1.5 cm、有効面積: 1.77 cm<sup>2</sup>、レセプター容積 10 mL) は (株) クライミングから購入したものをを用いた。

## [5] 薬物動態試験（実験動物への投与及び採血）

薬物動態試験では、ketoprofen、flurbiprofen、diclofenac、buprenorphine、fentanyl 及び lidocaine の計 6 種の薬物又は該当製剤をそれぞれマウス、ラット及びミニブタに投与した。マウス、ラット及びミニブタともに、非絶食下で投与した。

### [5-1] 静脈内投与液の調製

投与液調製濃度より濃度が 100 倍高い各薬物のジメチルスルホキシド (DMSO) [和光純薬 (株)] 溶液を調製した。調製した DMSO 溶液に、エタノール [和光純薬 (株)] / Kolliphor ELP [BASF ジャパン (株)] の 1:1 混液を添加し、最後に生理食塩液を加えて（それぞれ最終濃度は 1%、2.5%、2.5%及び 94%）、振盪攪拌し、超音波処理することにより、静脈内投与液を調製した。すべての投与液は用時調製し、調製後に目視にて溶解していることを確認し、使用した。なお、lepetan injection 0.3 mg 及び fentanyl injection に関しては製品に生理食塩液を添加し希釈することにより所定の濃度に調製した。

### [5-2] 経皮投与製剤

購入した製品そのものを使用し投与した。

### [5-3] 投与及び採血

静脈内投与は無麻酔下で実施した。マウス及びラットには保定器で固定し、シリンジ及び注射針を用いて buprenorphine は 0.2 mg/kg、fentanyl は 25 µg/kg、その他は 1 mg/kg の用量で、マウスは 5 mL/kg で、ラットは 1 mL/kg で、尾静脈から投与液を静脈内投与した。ミニブタには保定器で仰向けに固定し、シリンジ及び注射針を用いて buprenorphine は 0.02 mg/0.1 mL/kg、fentanyl は 5 µg/0.1 mL/kg、その他は 0.1 mg/0.1 mL/kg の用量で前大静脈洞から投与液を静脈内投与した。

経皮投与はイソフルラン吸入麻酔下で背部皮膚に投与し実施した。なお、ミニブタの腹部の皮膚は、最も一般的に使用される背部の皮膚と比較して、皮膚の厚さと構造の点でヒトの皮膚と類似性が高い傾向にあると考えられているが、*in vivo* で腹部に経皮投与し評価する際は薬物のコンタミネーションのリスクが高まり、*in vivo* 経皮吸収評価が困難となり易いため、本検討では背部皮膚に投与し評価した。ミニブタへの経皮投与では、製剤の投与前日に背部の剪毛を実施した。無麻酔下にて、電気バリカン [THRIVE® PET CLIPPER MODEL 501-P、スライブ (株)、刃のサイズ 0.1 mm] を用い背部全体を剪毛し、中性洗剤を用いて背部皮膚周辺部を清拭した。投与当日に麻酔下にて所定の投与面積に各製剤を貼付又は塗布した。その後、ポリエチレンシートに両面テープを用い固定した投与部位と同じ面積のガーゼ [BEMCOT® M-1、旭化成 (株)] を、ガーゼ面が製剤塗布面に接するように被せた。その上から粘着性伸縮包帯 [エラストポア®、(株) ニチバン] を巻き付け、製剤塗布面を固定した（閉塞塗布・貼付）。最後にネット [伸縮性ネット包帯クリーンネット 7、オオサキメディカル (株)] を被せ保護した。その後、ケージへ戻し個別飼育を続けた。投与後 24 時間に、閉塞塗布・貼付が正常に行われていることを確認後、無麻酔下で被覆物を除去し、微温湯を用

いて投与部位を穏やかに清拭し、再びケージへ戻し個別飼育を続けた。マウス及びラットへの経皮投与では、ミニブタ経皮 PK 試験時の投与量を基準に投与量及び投与面積を設定し、ミニブタと同様に経皮投与を行った（背部の剪毛操作は除く）。

投与後 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、6、8、24、26、28 及び 32 時間に無麻酔下で経時的に採血した。マウス及びラットでは、保定器で固定し、尾静脈に片刃カミソリで切れ込みを入れ、ピペットを用いて尾静脈から採血した。ミニブタでは保定器で仰向けに固定し、シリンジ及び注射針を用いて前大静脈洞から採取した。採血量は各時点、マウスは約 30  $\mu\text{L}$ 、ラットは約 100  $\mu\text{L}$ 、ミニブタは約 400  $\mu\text{L}$  とした。

採取した血液は予めヘパリンナトリウム注射液（1000 単位/mL）を血液量に対して約 2 vol% 分注しておいたチューブに速やかに移し、よく転倒混和した後、氷上に一時保管した。各採血時点で得られた血液を遠心分離（4°C、14,000  $\times g$ 、10 分間）し、血漿を得た。採取後の血漿は濃度測定時まで冷凍庫（-30°C 設定）で凍結保存した。血漿中薬物濃度は LC-MS/MS を用いて定量した。

#### [6] *In vitro* フランツ拡散セルを用いた皮膚透過性評価

フランツ拡散セル（内径：1.5 cm、有効面積：1.77  $\text{cm}^2$ ）のレセプター相にマグネティックスターラーを設置し、3%エタノール含有 PBS 溶液（pH 7.4）でレセプター相を満たした（10 mL）。なお、エタノールはフランツ拡散セル器具への薬物の吸着を防ぐ目的で添加した。採取したマウス皮膚及び室温に戻したミニブタ及びヒト皮膚をフランツ拡散セルの外径に合わせて直径約 2.5 cm の円状に裁断した。フランツ拡散セルのトップとドナーキャップにそれぞれゴムパッキンをセットし、この間に皮膚を挟みフランツ拡散セルに皮膚を装着した。レセプター相に混入した気泡を取り除いた後、32°C で 2 時間以上攪拌した。再度、レセプター相に存在する気泡を取り除いた。その後、ドナー相に直径 1.5 cm の円状に裁断した各種製剤を貼付、又は 10  $\mu\text{g/mL}$  diclofenac 溶液 [10 mmol/L MES/HBSS 緩衝液（pH 6.0）] を 300  $\mu\text{L}$  添加し、上部をパラフィルムで閉塞して透過試験を開始した（各群  $n=3$ ）。開始後 0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 24 時間にレセプター液をサンプリングポートから 150  $\mu\text{L}$  採取し、採取ごとに直ちに同量の 3%エタノール含有 PBS 溶液をサンプリングポートから添加した。採取後の試料は濃度測定時まで冷凍庫（-30°C 設定）で凍結保存した。採取試料中薬物濃度は LC-MS/MS を用いて定量した。

#### [7] LC-MS/MS による測定対象化合物の濃度測定

本分析法では試料の前処理としてメタノール沈殿法による除蛋白を行い、その上清を LC-MS/MS で分析した。各検量線は検量試料のピークエリアと内標準物質のピークエリアの比を直線回帰して作成した。

##### [7-1] 検量線用標準溶液

各種測定対象化合物をそれぞれメタノールで段階希釈し、0.1~500 ng/mL の範囲で各濃度の検量線用標準溶液を調製した。各標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

#### [7-2] QC (Quality control) 試料用標準溶液

各種測定対象化合物をそれぞれメタノールで段階希釈し、1、10 及び 100 ng/mL の QC 試料用標準溶液を調製した。各標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

#### [7-3] 内標準溶液 (IS)

Ketoconazole をメタノールに溶解させ、60 ng/mL の内標準溶液を調製した。内標準溶液はガラス製容器で用時調製とした。

#### [7-4] 試料の前処理

##### (1) 検量線用標準試料

ポリプロピレン (以下、PP と表記) チューブにメタノール、IS、各濃度の検量線用標準溶液 (濃度 0 はメタノール) 及び各種ブランクマトリックス [*vivo* : 各種ブランク血漿、*vitro* : PBS 緩衝液 (pH 7.4) ] を 1 : 1 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを遠心分離 (4°C、14,000 ×g、10 分間) し、その上清を HPLC バイアルに移し、検量線用標準試料とした。

##### (2) QC 試料

PP チューブにメタノール、IS、各濃度の QC 試料用標準溶液及び各種ブランクマトリックスを 1 : 1 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、QC 試料とした。QC 試料は連続分析シーケンスの中で検量線用標準試料の後の未知試料の前後に配置した。分析単位ごとの前処理後試料の調製本数は各濃度  $n = 2$  とした。

##### (3) ブランク試料

PP チューブにメタノール及び各種ブランクマトリックスを 3:1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、ブランク試料とした。ブランク試料は連続分析におけるバックグラウンドノイズを確認するため連続分析シーケンス中に適宜配置した。

##### (4) 未知試料

PP チューブにメタノール、IS 及び採取した[5]の実試料 (血漿) を 2 : 1 : 1 の容量比で添加し、攪拌した。これを検量線用標準試料と同様に処理し、未知試料とした。なお、実試料は必要に応じて各種ブランクマトリックスで希釈したものを添加した。また、[3]、[4]、[6]の LC-MS/MS 測定試料はそのまま未知試料として取り扱った。

#### [7-5] TSQ QUANTUM Vantage LC-MS/MS システムの条件

- HPLC : NANOSPACE SI-2 [旧名称 : (株) 資生堂、現 : (株) 大阪ソーダ]
- MS : TSQ QUANTUM Vantage [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)]
- データ処理ソフト : Xcalibur [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) ]
- データ解析ソフト : LCquan [サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) ]



(1) HPLC 条件

- 1) カラム : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MGIII [2.0 mm I.D. × 50 mm、粒子径 5 μm、(株) 資生堂]  
(Buprenorphine、diclofenac、fentanyl、flurbiprofen、ketoprofen、lidocaine)
- 2) 移動相 : 移動相 A ; 0.1 vol% ギ酸水溶液、移動相 B ; メタノール  
(Buprenorphine、fentanyl)  
: 移動相 A ; 0.01 vol% 酢酸水溶液、移動相 B ; 0.01 vol% 酢酸アセトニトリル溶液  
(Diclofenac、flurbiprofen、ketoprofen)  
: 移動相 A ; 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 B ; メタノール  
(Lidocaine)

3) グラジエント : Buprenorphine、fentanyl、lidocaine

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	80.0	20.0
1.0	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	80.0	20.0
5.5	0.5	80.0	20.0
5.6	0.3	80.0	20.0
7.5	0.3	80.0	20.0

: Diclofenac、flurbiprofen

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
Init	0.3	75.0	25.0
1.0	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	75.0	25.0
5.5	0.5	75.0	25.0
5.6	0.3	75.0	25.0
7.5	0.3	75.0	25.0

: Ketoprofen

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0.3	75.0	25.0
2.0	0.3	0.0	100.0
3.6	0.3	0.0	100.0
3.7	0.5	0.0	100.0
4.5	0.5	0.0	100.0
4.6	0.5	75.0	25.0
5.5	0.5	75.0	25.0
5.6	0.3	75.0	25.0
7.5	0.3	75.0	25.0

4) カラム温度 : 40°C

5) 注入量 : 10 µL

6) オートサンプラー温度 : 5°C

## (2) MS 条件

1) Ionization Method : Electro spray ionization (ESI)

2) Spray Voltage : 3000 V

3) Q2 Gas Pressure : 1.5 mTorr

4) Sheath Gas flow rate : 20 Arb

5) Ion Sweep Gas Pressure : 0 Arb

6) Aux Gas flow rate : 5 Arb

7) Capillary Temperature : 330°C

8) Vaporizer Temperature : 200°C

9) Scan Width : ± 0.500 amu

10) Scan Time : 0.200 s

11) Q1 Peak Width : 0.70 FWHM

12) Q3 Peak Width : 0.70 FWHM

13) Scan Events : selective reaction monitoring (SRM) モード

測定対象化合物	Scan Events	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (V)	S-Lens
Buprenorphine	Positive	468.25	396.30	39	141
Diclofenac	Negative	293.94	250.00	15	62
Fentanyl	Positive	337.21	188.17	22	110
Flurbiprofen	Negative	243.02	199.10	16	38
Ketoprofen	Positive	255.04	209.20	13	72
Lidocaine	Positive	235.10	86.06	18	73
IS (ketoconazole)	Positive	531.28	243.90	32	151

CE : Collision Energy

#### [7-6] 定量値の算出

クロマトグラムの波形処理及び濃度計算は LCquan で行った。LCquan で自動的に認識されたピークのピーク面積値を得た。検量線は、内標準物質に対する分析対象物質のピーク面積比と濃度の関係を最小二乗法により適切な重み付けをし、直線回帰 ( $y = ax + b$ ) して作成した。得られた検量線を用い、QC 試料及び未知試料における各測定対象化合物の濃度を定量した。

#### [7-7] 測定結果の採用基準

分析単位の採用・不採用を以下の採用基準で判断した。なお、真度 (%) = (定量値/理論値) × 100 とした。

- (1) 回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限においては理論値の ±20% 以内、定量下限以外においては理論値の ±15% 以内でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限濃度を除く濃度が評価基準を満たさない場合、その濃度を除外して検量線を求め、評価基準を満たした場合はその検量線を採用する。その場合、検量線用標準試料の 75% 以上が上記基準を満たさなければならない。
- (2) 検量線用標準試料の定量下限が基準を満たさなかった場合には、この次の濃度の検量線用標準試料を定量下限としてもよい。その場合、変更された検量線の濃度範囲は、少なくとも 3 濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）の QC 試料を含まなければならない。
- (3) QC 試料の数は、各濃度あたり 2 試料とする。QC 試料は、少なくとも実試料の前後で測定される必要がある。QC 試料の真度は理論値の ±15% 以内であるものとし、全 QC 試料の 3 分の 2 以上かつ各濃度の 2 分の 1 以上の QC 試料が上記基準を満たさなければならない。

本試験では上記の基準をすべて満たした。

#### [8] 薬物の物性パラメータ解析

薬物の pKa、clogP 値は、ChemDraw Professional version 15.1.0.144 ソフトウェア (PerkinElmer 社) を用いて算出した。

[9] 薬物動態パラメータ解析

薬物動態パラメータ AUC の算出は Phoenix WinNonlin 6.4（サターラ合同会社）を用いて、ノンコンパートメント解析により実施した。

[10] 臨床データ

臨床体内動態パラメータは文献[131, 132, 133, 134, 135, 136]及びインタビューフォームから引用した。

[11] 累積皮膚透過量の算出

累積皮膚透過量（ $Q_n$ ）は下記の計算式を用いて算出した。

$$Q_n = \frac{V_R \times C_n + \sum_{i=1}^{n-1} (V_S \times C_i)}{A} \quad \text{eq. (30)}$$

ここで、 $C_n$  は  $n$  回目の試料中濃度、 $V_R$  はレセプター相の液量（10 mL）、 $V_s$  は採取容量（0.15 mL）、 $A$  は透過断面積（1.77 cm<sup>2</sup>）を示す。

## 引用文献

1. Martignoni, M., et al., *Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006. **2** (6) p. 875–94.
2. Forster, R., et al., *Steering Group of the RETHINK Project, the minipig as a platform for new technologies in toxicology*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010. **62** (3) p. 227–35.
3. Forster, R., et al., *The RETHINK project on minipigs in the toxicity testing of new medicines and chemicals: conclusions and recommendations*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010. **62** (3) p. 236–42.
4. Musther, H., et al., *Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate?* Eur J Pharm Sci, 2014. **57**(100): p. 280–91.
5. Chiou, WL. and Barve, A., *Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats*. Pharm Res, 1998. **15** (11): p. 1792–5.
6. Chiou, WL., et al., *Evaluation of using dog as an animal model to study the fraction of oral dose absorbed of 43 drugs in humans*. Pharm Res. 2000. **17** (2): p. 135–40.
7. Takahashi, M., et al., *The species differences of intestinal drug absorption and first-pass metabolism between cynomolgus monkeys and humans*. J Pharm Sci. 2009. **98** (11): p. 4343–53.
8. Lui, CY., et al., *Comparison of gastrointestinal pH in dogs and humans: implications on the use of the beagle dog as a model for oral absorption in humans*. J Pharm Sci. 1986. **75** (3): p. 271–4.
9. Yamada, I., et al., *Gastric acidity-dependent bioavailability of commercial sustained release preparations of indomethacin, evaluated by gastric acidity-controlled beagle dogs*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1990. **38** (11) p. 3112–5.
10. Kanerva, H., et al., *Different absorption profiles of deramciclone in man and in dog*. J Pharm Pharmacol. 1998. **50** (10) p. 1087–93.
11. Mizuta, H., et al., *Gastrointestinal absorption of chlorothiazide: evaluation of a method using salicylazosulfapyridine and acetaminophen as the marker compounds for determination of the gastrointestinal transit time in the dog*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1990. **38** (10) p. 2810–3.
12. Dressman, JB., *Comparison of canine and human gastrointestinal physiology*. Pharm Res. 1986. **3** (3) p. 123–31.
13. Katori, N., et al., *Effects of codeine on the agitating force and gastrointestinal transit time in dogs, for use in drug absorption studies*. Biol. Pharm. Bull. 1998. **21** (4) p. 418–20.
14. Kondo, H., et al., *Gastrointestinal transit of liquids in unfed cynomolgus monkeys*. Biopharm Drug Dispos. 2003. **24** (3) p. 131–40.
15. Ikegami, K., et al., *Suitability of the cynomolgus monkey as an animal model for drug absorption studies of oral dosage forms from the viewpoint of gastrointestinal physiology*. Biol Pharm Bull. 2003. **26** (10) p. 1442–7.
16. Amidon, G.L., et al., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in*

- vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.* Pharm Res, 1995. **12**(3): p. 413-20.
17. Rowland, M. and Tozer, TN., *Clinical Pharmacokinetics; Concept and Application.* Lea & Febiger, Philadelphia. 1980. **2**.
  18. Davies, B. and Morris, T., *Physiological parameters in laboratory animals and humans.* Pharm Res. 1993. **10** (7) p. 1093–5.
  19. Suenderhauf, C. and Parrott, N., *A physiologically based pharmacokinetic model of the minipig: data compilation and model implementation.* Pharm Res. 2013. **30** (1) p. 1–15.
  20. Goodman, LS., et al., *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics; 10th ed., Japanese ed.,* Hirokawa Publishing Co., Tokyo, 2003.
  21. Stevenson, IH., *Factors influencing antipyrine elimination.* Br J Clin Pharmacol. 1977. **4** (3) p. 261–5.
  22. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Application Number 201373Orig1s000, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics review(s). U.S. Dep. Health Human Serv., U.S. Food Drug Adm 2010. (Ref ID: 2867565) p. 15–16.
  23. Sasahara, K., *Phase I study of CS-514, an inhibitor of HMG-CoA reductase II: Pharmacokinetics of CS-514 in healthy volunteers.* J. Clin. Therap. Med. 1988. **4** (1) p. 45–65.
  24. Peppercorn, MA. and Goldman, P., *Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites.* Gastroenterology. 1973. **64** (2) p. 240–5.
  25. Ishizaki, T. and Tawara, K., *Comparison of disposition and effect of timolol and propranolol on exercise tachycardia.* Eur J Clin Pharmacol. 1978. **14** (1) p. 7–14.
  26. Piotrovskii, VK., et al., *Disposition kinetics and urinary excretion of verapamil and some of its primary metabolites after oral administration in patients with angina pectoris.* Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. 1986. **24** (1) p. 4–11.
  27. Prox, A. and Breyer-Pfaff, U., *Amitriptyline metabolites in human urine. Identification of phenols, dihydrodiols, glycols, and ketones.* Drug Metab Dispos. 1987. **15** (6) p. 890–6.
  28. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Application number ANDA 75-896, Felodipine Extended-release Tablets USP, 2.5 mg, 5 mg, and 10 mg. U.S. Dep. Health Human Serv, U.S. Food Drug Adm (Bioequivalence reviews) 2004.
  29. Heizmann, P. and Ziegler, WH., *Excretion and metabolism of 14C-midazolam in humans following oral dosing.* Arzneimittelforschung. 1981. **31** (12a) p. 2220–3.
  30. Shiina, A., et al., *Repeated infusion of nicardipine hydrochloride to healthy volunteers. –A study of pharmacokinetics–.* Clinical report. 1986. **20** (2) p. 1114 –24.
  31. Nakaya, N., et al., *A phase I clinical study of a novel HMG–CoA reductase inhibitor, NK–104 (Pitavastatin) – Results of single and 7–day repeated oral administration studies in healthy adult male volunteers –.* J. Clin. Therap. Med. 2001. **17** (6) p. 741–66.
  32. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Application number ANDA 78-193, Raloxifene Hydrochloride Tablets USP, 60 mg. U.S. Dep. Health Human Serv, U.S. Food Drug Adm 2014. (Ref

ID: 2928004)

33. Hardman, JG., et al., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th int. edition.* Columbus: McGraw-Hill, 2001.
34. Schulz, P., et al., *Amitriptyline disposition in young and elderly normal men.* Clin Pharmacol Ther. 1983. **33** (3) p. 360–6.
35. Eichelbaum, M., et al., *Pharmacokinetics and metabolism of Antipyrine (phenazone) after intravenous and oral administration.* Arzneimittelforschung. 1982. **32** (5) p. 575–8.
36. Mason, WD., et al., *Kinetics and absolute bioavailability of atenolol.* Clin Pharmacol Ther. 1979. **25** (4) p. 408–15.
37. Edgar, B., et al., *Felodipine kinetics in healthy men.* Clin Pharmacol Ther. 1985. **38** (2) p. 205–11.
38. Lappin, G., et al., *Pharmacokinetics of fexofenadine: evaluation of a microdose and assessment of absolute oral bioavailability.* Eur J Pharm Sci. 2010. **40** (2) p. 125–31.
39. Waller, ES., et al., *Disposition and absolute bioavailability of furosemide in healthy males.* J Pharm Sci. 1982. **71** (10) p. 1105–8.
40. Chiou, WL. and Buehler, PW., *Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human.* Pharm Res. 2002. **19** (6) p. 868–74.
41. Akabane, T., et al., *A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys.* Drug Metab Dispos. 2010. **38** (2) p. 308–16.
42. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Application number 22-363, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s), Part 1. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food Drug Adm. (Clinical pharmacology review) 2009. P. 8–17.
43. Singhvi, SM., et al., *Disposition of pravastatin sodium, a tissue-selective HMG-CoA reductase inhibitor, in healthy subjects.* Br J Clin Pharmacol. 1990. **29** (2) p. 239–43.
44. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Application number 20-815, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s), Part 2. U.S. Dep. Health Human Serv, U.S. Food Drug Adm. 1997. p. 1–22.
45. McAllister, RG. and Kirsten Jr., EB., *The pharmacology of verapamil. IV. Kinetic and dynamic effects after single intravenous and oral doses.* Clin. Pharmacol. Ther. 1982. **31** (4) p. 418–26.
46. Henze, LJ., et al., *Exploring gastric emptying rate in minipigs: Effect of food type and pre-dosing of metoclopramide.* Eur J Pharm Sci. 2018. **15** (118) p. 183–90.
47. Bélanger, PM., et al., *Time-dependent variations in the organ extraction ratios of acetaminophen in rat.* J Pharmacokinet Biopharm. 1987. **15** (2) p. 133–43.
48. Manzo, RH., et al., *Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: amitriptyline hydrochloride.* J Pharm Sci. 2006. **95** (5) p. 966–73.
49. Bae, SK., et al., *Pharmacokinetics of amitriptyline and one of its metabolites, nortriptyline, in rats: little contribution of considerable hepatic first-pass effect to low bioavailability of amitriptyline due to great*

- intestinal first-pass effect. *J Pharm Sci.* 2009. **98** (4) p. 1587–601.
50. Liu, XG., et al., *Induction of hepatic and presystemic metabolism of antipyrine in the mice: rifampicin versus rifabutin.* *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2001. **26** (4) p. 209–13.
  51. Matsuda, Y., et al., *Assessment of intestinal availability of various drugs in the oral absorption process using portal vein-cannulated rats.* *Drug Metab Dispos.* 2012. **40** (12) p. 2231–8.
  52. Bäärnhielm, C., et al., *In vivo pharmacokinetics of felodipine predicted from in vitro studies in rat, dog and man.* *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1986. **59** (2) p. 113–22.
  53. Wang, S.X., et al., *Contribution of the intestine to the first-pass metabolism of felodipine in the rat.* *J Pharmacol Exp Ther,* 1989. **250** (2) p. 632–6.
  54. Tahara, H., et al., *P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role in its biliary excretion.* *Drug Metab Dispos.* 2005. **33** (7) p. 963–8.
  55. Qiang, F., et al., *Pharmacokinetic drug interaction between fexofenadine and fluvastatin mediated by organic anion-transporting polypeptides in rats.* *Eur J Pharm Sci.* 2009. **37** (3-4) p. 413–7.
  56. Kim, EJ., et al., *Gastrointestinal first-pass effect of furosemide in rats.* *J Pharm Pharmacol.* 2000. **52** (11) p. 1337–43.
  57. Lignet, F., et al., *Characterization of Pharmacokinetics in the Göttingen Minipig with Reference Human Drugs: An In Vitro and In Vivo Approach.* *Pharm Res.* 2016. **33** (10) p. 2565–79.
  58. Kuze, J., et al., *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** (11) p. 871–80.
  59. Nishimura, T., et al., *Asymmetric intestinal first-pass metabolism causes minimal oral bioavailability of midazolam in cynomolgus monkey.* *Drug Metab Dispos.* 2007. **35** (8) p. 1275–84.
  60. Choi, JS. and Burm, JP., *Effects of oral epigallocatechin gallate on the pharmacokinetics of nifedipine in rats.* *Arch Pharm Res.* 2009. **32** (12) p. 1721–5.
  61. Choi, JS., et al., *Effects of pioglitazone on the pharmacokinetics of nifedipine and its main metabolite, dehydronifedipine, in rats.* *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2016. **41** (3) p. 231–8.
  62. Karibe, T., et al., *Evaluation of the usefulness of breast cancer resistance protein (BCRP) knockout mice and BCRP inhibitor-treated monkeys to estimate the clinical impact of BCRP modulation on the pharmacokinetics of BCRP substrates.* *Pharm Res.* 2015. **32** (5) p. 1634–47.
  63. Higgins, JW., et al., *Utility of Oatp1a/1b-knockout and OATP1B1/3-humanized mice in the study of OATP-mediated pharmacokinetics and tissue distribution: case studies with pravastatin, atorvastatin, simvastatin, and carboxydichlorofluorescein.* *Drug Metab Dispos.* 2014. **42** (1) p. 182–92.
  64. Koitabashi, Y., et al., *Orange juice increased the bioavailability of pravastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitor, in rats and healthy human subjects.* *Life Sci.* 2006. **78** (24) p. 2852–9.



65. Verduyck, I., et al., *Influences of the calcium antagonists nicardipine and nifedipine, and the calcium agonist BAY-K-8644, on the pharmacokinetics of propranolol in rats*. Cardiovasc Drugs Ther. 1993. **7** (4) p. 721–6.
66. Letendre, L., et al., *Evaluating barriers to bioavailability in vivo: validation of a technique for separately assessing gastrointestinal absorption and hepatic extraction*. Pharm Res. 2004. **21** (8) p. 1457–62.
67. Kosaka, K., et al., *Impact of intestinal glucuronidation on the pharmacokinetics of raloxifene*. Drug Metab Dispos. 2011. **39** (9) p. 1495–502.
68. Zamek-Gliszczyński, MJ., et al., *Characterization of SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats using loperamide, paclitaxel, sulfasalazine, and carboxydichlorofluorescein pharmacokinetics*. Drug Metab Dispos. 2012. **40** (9) p. 1825–33.
69. Komura, H., et al., *Application of substrate depletion assay for early prediction of nonlinear pharmacokinetics in drug discovery: assessment of nonlinearity of metoprolol, timolol, and propranolol*. J Pharm Sci. 2005. **94** (12) p. 2656–66.
70. Choi, DH., et al., *Effect of atorvastatin on the intravenous and oral pharmacokinetics of verapamil in rats*. Biopharm Drug Dispos. 2008. **29** (1) p. 45–50.
71. Naritomi, Y., et al., *Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans*. Drug Metab Dispos. 2001. **29** (10) p. 1316–24.
72. Eriksson, UG., et al., *Stereoselective metabolism of felodipine in liver microsomes from rat, dog, and human*. Drug Metab Dispos. 1991. **19** (5) p. 889–94.
73. Sohlenius-Sternbeck, AK., et al., *Evaluation of the human prediction of clearance from hepatocyte and microsome intrinsic clearance for 52 drug compounds*. Xenobiotica. 2010. **40** (9) p. 637–49.
74. Komura, H. and Iwaki, M., *Species differences in in vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A substrates*. J Pharm Sci. 2008. **97** (5) p. 1775–800.
75. Riley, RJ., et al., *A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes*. Drug Metab Dispos. 2005. **33** (9) p. 1304–11.
76. Kajbaf, M., et al., *Contribution of rat intestinal metabolism to the xenobiotics clearance*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2013. **38** (1) p. 33–41.
77. Wang, S., et al., *Predicted contributions of cytochrome P450s to drug metabolism in human liver microsomes using relative activity factor were dependent on probes*. Xenobiotica. 2019. **49** (2) p. 161–168.
78. Volotinen, M., et al., *Timolol metabolism in human liver microsomes is mediated principally by CYP2D6*. Drug Metab Dispos. 2007. **35** (7) p. 1135–41.
79. Sakakibara, Y., et al., *Effect of adrenalectomy on expression and induction of UDP-glucuronosyltransferase 1A6 and 1A7 in rats*. Biol Pharm Bull. 2014. **37** (4) p. 618–24.

80. Dhôte R, et al., *Orocecal transit time in humans assessed by sulfapyridine appearance in saliva after sulfasalazine intake*. Clin Pharmacol Ther. 1995. **57** (4) p. 461–70.
81. Yamada, K., et al., *Evaluation of gastrointestinal transit controlled-beagle dog as a suitable animal model for bioavailability testing of sustained-release acetaminophen dosage form*. Int J Pharm. 1995. **119** (1) 1–10.
82. Watanabe, E., et al., *A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an in vitro chamber method*. Eur J Pharm Biopharm. 2004. **58** (3) p. 659–65.
83. Amidon, GL., et al., *Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds*. Pharm Res. 1988 **5** (10) p 651–4.
84. Bode, G., et al., *The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010. **62** (3) p. 196–220.
85. Höller, H., *Studies on secretions and secretion production of the glandular region of the cardia in the porcine stomach. I. Secretion volumes and -rhythmics, properties of secretions*. Zentralbl Veterinarmed A. 1970. **17** (8) p. 685–711.
86. Chu, X., et al., *Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013. **9** (3) p. 237–52.
87. Nishimuta, H., et al., *Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates in humans using cynomolgus monkeys*. Drug Metab Dispos. 2010. **38** (11) p. 1967–75.
88. Nishimuta, H., et al., *Species differences in intestinal metabolic activities of cytochrome P450 isoforms between cynomolgus monkeys and humans*. Drug Metab Pharmacokinet. 2011. **26** (3) p. 300–6.
89. Anzenbacher, P., et al., *Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples*. Drug Metab Dispos. 1998. **26** (1) p. 56–9.
90. Xie, F., et al., *An update on the role of intestinal cytochrome P450 enzymes in drug disposition*. Acta Pharm Sin B. 2016. **6** (5) p. 374–83.
91. Fagerholm, U., *Prediction of human pharmacokinetics--gut-wall metabolism*. J Pharm Pharmacol. 2007. **59** (10) p. 1335–43.
92. van de Kerkhof, EG., et al., *In vitro methods to study intestinal drug metabolism*. Curr Drug Metab. 2007. **8** (7) p. 658–75.
93. Hossain, M., et al., *Gastrointestinal transit of nondisintegrating, nonerodible oral dosage forms in pigs*. Pharm Res. 1990. **7** (11) p. 1163–6.
94. Oberle, RL., et al., *Variability in gastric pH and delayed gastric emptying in Yucatan miniature pigs*. Pharm Res. 1994. **11** (4) p. 592–4.
95. Davis, SS., et al., *Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig*. J Pharm Pharmacol. 2001. **53** (1) p. 33–9.

96. Henze, LJ., et al., *Exploring gastric emptying rate in minipigs: Effect of food type and pre-dosing of metoclopramide*. Eur J Pharm Sci. 2018. **15** (118) p. 183-190.
97. Iwatsubo, T., et al., *Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the in vivo metabolic clearance of YM796 by the liver from in vitro data*. J Pharmacol Exp Ther. 1997. **283** (2) p. 462-9.
98. Hosea, NA., *Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches*. J Clin Pharmacol. 2009. **49** (5) p. 513-33.
99. Kilford, PJ., et al., *Prediction of drug clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes*. Drug Metab Dispos. 2009. **37** (1) p. 82-9.
100. Miners, JO., et al., *In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises*. Biochem Pharmacol. 2006. **71** (11) p. 1531-9.
101. Gopal S, et al., *Characterization of the pharmacokinetics of buprenorphine and norbuprenorphine in rats after intravenous bolus administration of buprenorphine*. Eur J Pharm Sci. 2002. **15** p. 287-93.
102. Deguchi, T., et al., *Human pharmacokinetic prediction of UDP-glucuronosyltransferase substrates with an animal scale-up approach*. Drug Metab Dispos. 2011. **39** (5) p. 820-9.
103. Ohtsuka, H., et al., *Pharmacokinetics of fentanyl in male and female rats after intravenous administration*. Arzneimittelforschung. 2007. **57** (5) p. 260-3.
104. Jamali, F., et al., *Dose-dependency of flurbiprofen enantiomer pharmacokinetics in the rat*. J Pharm Sci. 1994. **83** (8) p. 1077-80.
105. Oie, S., et al., *Effect of altered plasma protein binding on apparent volume of distribution*. J Pharm Sci. 1979. **68** (9) p. 1203-5.
106. Mahmood, I., *Principles, Issues, and Applications of Interspecies Scaling*. New Drug Dev. 2004. p. 137-63.
107. Chapman, ME., et al., *Bioimpedance spectroscopy for the estimation of body fluid volumes in mice*. Am J Physiol Renal Physiol. 2010. **299** (1) p. F280-3.
108. Diehl, KH., et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. J Appl Toxicol. 2001. **21** (1) p. 15-23.
109. Radin, MJ., et al., *Hematologic and serum biochemical values for Yucatan miniature swine*. Lab Anim Sci. 1986. **36** (4) p. 425-7.
110. Wyler, F., et al., *Das göttinger miniaturschwein als versuchstier*. Research in Experimental Medicine. 1979. volume **175** p. 31-6.
111. Ellegaard, L., et al., *Welfare of the minipig with special reference to use in regulatory toxicology studies*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010. **62** (3) p. 167-83.
112. Lombardo, F., et al., *Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 1: volume of distribution at steady state*. J Clin Pharmacol. 2013. **53** (2) p. 167-77.

113. Lombardo, F., et al., *Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 2: clearance*. J Clin Pharmacol. 2013. **53** (2) p. 178–91.
114. Monteiro-Riviere, NA. and Stromberg, MW., *Ultrastructure of the integument of the domestic pig (Sus scrofa) from one through fourteen weeks of age*. Anat Histol Embryol. 1985. **14** (2) p. 97–115.
115. Mahl, JA., et al., *The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges*. Exp Toxicol Pathol. 2006. **57** (5-6) p. 341–5.
116. Sharma, R., et al., Quantitative imaging of lymph function. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007. 292 (6) p. H3109–18.
117. Swindle, MM., et al., Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Vet Pathol. 2012. **49** (2) p. 344–56.
118. Reifenrath, WG., et al., *Evaluation of animal models for predicting skin penetration in man*. Fundam Appl Toxicol. 1984. **4** (2 Pt 2) p. S224–30.
119. Qvist, MH., et al., *Evaluation of Gottingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies*. Eur J Pharm Sci. 2000. **11** (1) p. 59–68.
120. Lavker, RM., et al., *Hairless micropig skin. A novel model for studies of cutaneous biology*. Am J Pathol. 1991. **138** (3) p. 687–97.
121. Mortensen, JT., et al., *The minipig in dermal toxicology*. Lit. Rev.. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 1998. **25** (Suppl. 1), 77–83.
122. Goi, N., et al., *Evaluation of percutaneous permeation of flurbiprofen and ketoprofen after application of transdermal patches using a lateral sectioning approach in hairless rats*. Pharm Dev Technol. 2010. **15** (6) p. 658–65.
123. Yamamoto, S., et al., *Utility of Gottingen minipigs for Prediction of Human Pharmacokinetic Profiles After Dermal Drug Application*. Pharm Res. 2017. **34** (11) p. 2415–24.
124. Ross, JH., et al., *Estimation of the percutaneous absorption of permethrin in humans using the parallelogram method*. J Toxicol Environ Health A. 2011. **74** (6) p. 351–63.
125. Mainigi, KD. *Value of minipig as a recommended second (nonrodent/nonprimate) species for regulatory studies to assess the risk, and relative efficacy of topical and systemic antifungals*. FASEB J. 2008. 22 p. 720–724.
126. WHO. Dermal Absorption. Environmental Health Criteria (EHC) 2006. 235. ISBN 978 92 4 1572 35 4.
127. van der Laan, JW., et al., *Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010. **62** (3) p. 184–95.
128. Chandra, SA., et al., *Dermal toxicity studies: factors impacting study interpretation and outcome*. Toxicol Pathol. 2015. **43** (4) p. 474–81.
129. Meyer, W., *Comments on the suitability of swine skin as a biological model for human skin*. Hautarzt. 1996. **47** (3) p. 178–82.
130. Suenderhauf, C. and Parrott, N., *A physiologically based pharmacokinetic model of the minipig: data*

- compilation and model implementation. Pharm Res. 2013. 30 (1) p. 1–15.*
131. Obach, RS., et al., *Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds. Drug Metab Dispos. 2008. 36 (7) p. 1385–405.*
132. Kuhlman, JJ Jr., *Human pharmacokinetics of intravenous, sublingual, and buccal buprenorphine. J Anal Toxicol. 1996. 20 (6) p. 369–78.*
133. Christrup, LL., et al., *Pharmacokinetics, efficacy, and tolerability of fentanyl following intranasal versus intravenous administration in adults undergoing third-molar extraction: a randomized, double-blind, double-dummy, two-way, crossover study. Clin Ther. 2008. 30 (3) p. 469–81.*
134. Tohno, M., et al., *Pharmacokinetics and metabolic studies of LFP83 in man after the single and repeated intravenous administration. The clinical report: foundations and clinics 1992. 26 p. 3907–21.*
135. Debruyne, D., et al., *Clinical pharmacokinetics of ketoprofen after single intravenous administration as a bolus or infusion. Clin Pharmacokinet. 1987. 12 (3) p. 214–21.*
136. Burm, AG. *Clinical pharmacokinetics of epidural and spinal anaesthesia. Clin Pharmacokinet. 1989. 16 (5) p. 283–311.*
137. Jones CD. EVISTA™ clinical pharmacology and biopharmaceutics review. FDA approval package. 1997. p. 1–51. 020815.