

別紙 1

## 博士論文要旨

論文題目 : 医薬品の体内動態解析におけるミニブタの有用性に関する研究

申請者 吉松 宏倫

研究分野 薬剤学

紹介教授 山下 伸二

医薬品開発における前臨床動態試験では、新規医薬品候補化合物の吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態を評価し、ヒトでの動態を精度よく予測するために、*in vitro* や *in vivo* での様々な試験が実施される。通常、早期探索段階での *in vitro* 一次スクリーニングによって良好な物性、動態プロファイルを有する化合物を選別した後、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おける体内動態が評価される。この時、*in vivo* での体内動態が *in vitro* からの予測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。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的な特徴を把握し、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厳しく制限されている。そのため、その代替え動物としてミニブタの前臨床試験での利用に注目が高まっている。ミニブタはヒトと生理学的、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。しかしながら、ミニブタを用いた薬物の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状況にある。

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経口、静脈内、経皮の各投与経路でミニブタの薬物動態評価を行い、ミニブタの

医薬品開発における薬物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 ミニブタにおける薬物の経口吸収性に関する評価

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ため、経口製剤評価動物として注目されている。そこで、本章では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生物学的利用率 (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。

17種の薬物をミニブタに経口及び静脈内投与し量的 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にあった。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。経口投与後の量的 BA は、消化管膜を透過した薬物の割合 (膜透過率、 $F_a$ )、消化管組織内で代謝を受けなかった割合 (消化管代謝回避率、 $F_g$ ) 及び肝臓で代謝を受けなかった割合 (肝代謝回避率、 $F_h$ ) の3つのパラメータの積として表される。ヒトと各動物の  $F_h$  の相関を調べた結果、マウスや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、消化管から門脈への薬物移行性を表す  $F_a \cdot F_g$  は、いずれの動物もヒトと比較し低くなった。これまで、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  $F_a$  の種差は認められないといった報告があることから、ミニブタの量的 BA がヒトより低かった主な要因として、マウスやラットと同様、消化管組織での薬物代謝能がヒトよりも高く、その結果経口投与後の  $F_g$  が低くなったためと推察された。

次に、各薬物を経口投与後の血漿中濃度の時間推移を比較した結果、ほとんどの薬物で、ミニブタの血漿中濃度推移はヒトやラット、マウスに比べて長時間持続する傾向にあった。そこで、胃内容排出速度 (GER) を acetaminophen の血漿中濃度推移を指標として評価した結果、ミニブタはヒトやマウス、ラットと比較し GER が有意に遅いことが確認された。また、sulfasalazine を経口投与した際の血漿中での代謝物の検出時間より消化管通過時間 (GITT) を求めた結果、GITT はミニブタとヒトで同程度であったことから、ミニブタにおいて薬物血漿中濃度が長時間持続する理由として、胃排出が継続的にゆっくりと起こるためと推察された。

以上の結果より、経口剤投与後のヒトの薬物血漿中濃度推移をミニブタから予測する場合、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が示された。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が示唆された。

## 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、ミニブタとヒトの各薬物の  $F_h$  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、薬物を静脈内投与後の血漿中濃度推移から全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) 及び分布容積 ( $V_d$ ) 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。

第1章で算出した  $F_h$  は、薬物を静脈内投与後の  $CL_{tot}$  から腎クリアランス ( $CL_{NH}$ ) の値を差し引いた肝クリアランス ( $CL_h = CL_{tot} - CL_{NH}$ ) 及び肝血流量 ( $Q_h$ ) より  $F_h = 1 - CL_h / Q_h$  として算出される。ヒトとミニブタの  $Q_h$  は同程度との報告があり、 $CL_{NH}$  に関しても大きな種差がなければ、ヒトとミニブタの  $CL_h$  又は  $CL_{tot}$  は類似すると推察される。ミニブタを用いた検討からヒトの  $CL_{tot}$  と  $V_d$  が予測できれば、体内動態が簡易的な1コンパートメントモデルで書き表される薬物の場合、消失半減期も含めた解析が可能になると期待される。ヒトの動態を予測する手法としては、一般に実験動物の *in vivo* データを基にした経験則的 (empirical) アプローチ及び *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  $CL_{tot}$  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。そこで、本章では14種の薬物をミニブタ及びマウス、ラットの各動物に静脈内投与し、その血漿中濃度推移から算出した  $CL_{tot}$  と  $V_d$  に基づいた allometric scaling により、ヒトの  $CL_{tot}$  と  $V_d$  を予測した。更に、各動物からの予測値をヒトの実測値と比較することで、ミニブタの有用性について検討した。

各薬物のミニブタの  $CL_{tot}$  と  $V_d$  はともに、マウスやラットと比べヒトとの相関性に優れていた。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  $CL_{tot}$  と  $V_d$  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  $CL_{tot}$  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  $CL_{tot}$  と  $V_d$  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。本邦でも、行政機関である経済協力開発機構（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種としてミニブタが挙げられている。しかしながら、経皮製剤を対象としたミニブタの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、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。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**（ヒト吸収率=動物吸収率×*in vitro* ヒト皮膚/動物皮膚の透過性の比）という手法により予測した結果、比較として評価したマウスに比べ高い予測精度が得られた。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。