

博士論文

新しい消化管吸収生理学的モデルの構築と
P糖タンパク質を介した薬物相互作用予測法の開発

安藤 裕崇

目次

	頁
第一章 序論	1
第二章 新しい消化管吸収生理学的モデルの構築 -トランスロケーションモデル-	
要旨	8
緒言	10
方法	13
結果	36
考察	42
図表	46
第三章 P糖タンパク質を介した薬物相互作用の予測フレームワークの開発	
要旨	62
緒言	64
方法	68
結果	74
考察	77
図表	81
第四章 総括	86
引用文献	89
謝辞	103
論文目録	105

本論文で用いた略記

A, amount

ACAT, advanced compartmental absorption and transit

AFE, average fold error

CL_h, hepatic clearance

CL_{int}, intrinsic clearance

CL_r, renal clearance

CYP3A, cytochrome P450 3A

DDI, drug-drug interaction

DTPA, diethylenetriamine pentaacetic acid

f, unbound fraction

F, bioavailability

F_A, fraction absorbed

F_AF_G, product of F_A and F_G

FaSSIF, fasted state simulated intestinal fluid

F_G, intestinal availability

F_H, hepatic availability

GI, gastrointestinal

Ht, hematocrit

HLw, half-life for disappearance of water

H_{villi}, height of villi

k_{GE}, gastric emptying rate constant

K_m, Michaelis-Menten constant

L, length

ME, microvilli expansion

MRT, mean residence time

P-gp, P-glycoprotein

P, permeability

P_{app} , apparent permeability

PBPK, physiologically-based pharmacokinetic

PE, plicate expansion

P_{eff} , effective permeability

Q, blood flow rate

RMSE, root mean square prediction error

T_{ent} , thickness of enterocyte

TLM, translocation model

V, volume

VE, villi expansion

V_{max} , maximal metabolic rate for CYP3A or maximum flux for P-gp

z, location

第一章 序 論

非侵襲的かつ簡便であることから、経口投与は最も多くの医薬品における標準的な投与方法である。一般的に経口投与薬の吸収部位は小腸であり、経口投与された薬物は、胃から小腸へ移動する中で崩壊および溶解過程を経て、頂端膜側より小腸上皮細胞へ移行する。小腸上皮細胞には薬物代謝酵素である CYP3A など異物の排除を行う種々の機能が存在しており、これらのバリア機能を逃れた薬物は細胞の基底膜側から粘膜固有層に移行し、その後、毛細血管から血液中に移行する。この一連の吸収過程を正しく理解するためには、薬物の移行は吸収方向に対して一方向ではなく、逆方向である小腸上皮細胞から消化管管腔への受動拡散による移行、P 糖タンパク質(P-gp)などのトランスポーターによる消化管管腔への能動的排出、さらには基底膜側でも毛細血管が存在する粘膜固有層から小腸上皮細胞への受動拡散による薬物の移行も考慮する必要がある(図 A-1)。また、薬物が消化管管腔内を、小腸を経て大腸へ移動する過程では、管腔内表面積や pH などの解剖学的・生理学的環境が変化する。医薬品開発においては、こういった消化管吸収の高度に複雑化されたプロセスを定量的に理解し、投与した薬物に対してどの程度の薬物が全身血中に移行するか、すなわちどの程度の生物学的利用率(バイオアベイラビリティ)となるか予測する必要がある。それは、医薬品開発においてその候補化合物のバイオアベイラビリティが低い場合には、その原因が何らかの外的および内的要因により解消または阻害されることによりバイオアベイラビリティが増加する可能性があり、個体差や食事の影響、薬物相互作用(DDI)や非線形吸収動態の影響を強く受ける、さらには必要原末量の見積もりが難しいなど、開発上または使用上、大きな困難を伴い、最悪の場合、開発の中止や重篤な

副作用の原因となるためである。こうしたリスクの回避のために、特に小腸上皮細胞周辺で起こる多岐に渡る現象の素過程に対する理解を深め、個々を組み合わせた上で適切なモデル化を行うことが重要である。

複雑な現象を説明するために、現在では生理学的薬物速度論(PBPK)モデルが用いられている。PBPKモデルは、定常状態における薬物動態的特徴を表すことの可能な静的モデルと異なり、生体の各部位における薬物濃度推移などを動的に表現することが可能な数理モデルである。このモデルでは、解析対象となる臓器を生理学的および解剖学的情報として複数組み込むことが出来ることに加え、対象の臓器内で起こる可能性のある複数の現象を同時に考慮したモデル構築が可能であり、薬物動態における複雑な現象の経時変化を考慮することが必要な解析には特に有用なモデルである。

既存の消化管 PBPK モデルの代表的な構造として、小腸における部位依存的な環境変化を表現可能にするために消化管を上部から下部に向け多数に分割した構造を有するモデル(多分割型モデル、図 A-2)がある(Agoram et al., 2001; Jamei et al., 2009)。このモデルでは、特に消化管管腔内での種々のイベントの良好な予測が可能であり、医薬品候補化合物の製剤化検討などにおいて有用なツールである。一方、小腸において代謝を受ける一部の薬物の経口吸収性を過小評価するなど、解決すべき問題を残している(Hekkinen et al., 2014)。この問題に対して既存の研究では、代謝酵素である CYP3A や排出トランスポーターである P-gp の *in vitro* と *in vivo* における発現量の乖離を補正因子(スケールングファクター、sf)により補正する試みが行なわれており、いくつかの薬物の消化管における代謝ならびに排出の影響の予測精度改善に成功している(Takano et al., 2016.)。一方で、

この予測精度に関する問題は薬物の消失そのものに直接関わるタンパク質の *in vitro* と *in vivo* 間の乖離のみでなく、多分割型モデルの構造自体に起因した本質的な問題であるとも考えられる。

具体的には以下の二つの構造的問題が挙げられる。一つ目は、全ての多分割型モデルでは消化管管腔に設定されたコンパートメント間の上部から下部への薬物の移動が一次速度に従うと仮定しており (Agoram et al., 2001)、表現できる消化管における薬物の移動パターンに制限があることから、実際の薬物の挙動を反映することができない点である。理論的にはコンパートメント間の薬物の移動を一次速度で表現する場合、コンパートメント数の増加に伴い小腸下部での薬物の分布は拡散方向へのみ変化する。しかし、実際には一度、小腸上部において拡散した薬物が、摂取した水分の吸収に伴って小腸下部に至る過程において分布の幅が収束することも考慮する必要がある。したがってこのような現象を表現可能なモデル構造を構築することが、薬物の小腸内挙動を表すためには必要であると考えた。実際、独自に多分割型モデルを構築し、既報の薬物の管腔内移動速度に基づいて薬物の移動のシミュレーションを行い、シンチレーション試薬である ^{99m}Tc -DTPA を経口投与したときの消化管各部位における、放射活性の経時変化の報告値 (Kimura and Higaki, 2002) と比較したところ、一次速度での移動を用いる限り消化管内における薬物の挙動を正確に表すことは不可能であることが明らかとなった (未発表)。

次いで多分割型モデルの二つ目の問題として、その細胞基底膜側のモデル記述の不正確さが挙げられる。多分割型モデルでは、小腸上皮細胞を通過した薬物は直接門脈または毛細血管に移動する構造となっており (Agoram et al., 2001; Jamei et al., 2009)、小腸絨毛

の大部分を満たす結合組織である粘膜固有層の存在を無視していることから、生理学的に正確な記述が行われていない。この場合、細胞内濃度を矛盾なく表現するためには、血管から細胞への薬物の戻りを無視する、または一方向性の膜透過を仮定した上で、その膜透過に意図的な制限を設けるといった措置や、実際の消化管吸収動態の予測結果が実測と一致するように手動でのパラメーターの値そのものへの調整が必要となる。しかしこのような構造では細胞基底膜側における薬物動態が実際の現象を反映し、上皮細胞が細胞実体を有しているとは言えず、特に基底膜が関与する種々の現象の解析自体実施することができない。また、一定の数値を用いた意図的な膜透過性の制限は、特に非定常状態下において計算された結果が実測と大きく異なる可能性がある。以上のことから、上記二つの問題を解決したモデル構築が必要と考えられた。

消化管吸収動態予測モデルなどを用いた定量的な解析や、それをサポートする *in vivo* 試験の結果から、医薬品候補化合物のバイオアベイラビリティが低いことが予想された場合、P-gp や CYP3A の阻害による血中曝露の増加を伴う強い DDI が起きる可能性があることから、その DDI の程度を予測することは安全な医薬品開発のために重要である。DDI の程度を予測する方法として特に代謝酵素である P450 に対しては種々の研究がなされている (Hisaka et al., 2010; Mano et al., 2015)。一方、P-gp を介した DDI の予測法の例は少なく、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」(DDI ガイドライン)では、P-gp の基質と認められたもののほぼ全ての薬物に対して、臨床 DDI 試験を実施することを推奨している (MHRW., 2018)。本ガイドラインでは、P-gp の基質は、ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞などの P-gp 発現細胞を用いて経細胞輸送試

験を行い、基底膜から頂端膜側への透過性とその逆方向の透過性の比である **efflux ratio (ER)**が 2 を超える薬物で、かつ **P-gp** の選択的阻害剤によって阻害された薬物が該当するとされており、それらの薬物では臨床において、**P-gp** の阻害薬を併用することで血中曝露が 1.25 倍以上増加する可能性があるとしている。これらの基準により **DDI** リスク有と判定された場合、臨床 **DDI** 試験実施を検討することとなる。しかし **ER** は、研究施設間、試験間で大きく値が異なることが知られており (**Kamiyama et al., 2009; Troutman and Thakker, 2003; Zhang et al., 2003**)、**DDI** リスクを正確に判定することは出来ない。**DDI** ガイドラインでは **in vitro** 評価系間において **DDI** の程度の相対評価を可能とするための指標となるリファレンス薬の使用を認めているが、その使用法は明確でない。また、最終的に適切でない基準を用いて臨床 **DDI** 試験実施の要否を判定することは、倫理的、開発効率的に意義の乏しい臨床試験の増加を招く可能性もあり、これを防ぐために、**ER** を使用することの妥当性を再評価し、必要に応じて **ER** に代わる新しい基準を考案する必要があると考えられた。

そこで本研究は、1) 既存の多分割型モデルにおける問題点を解決した構造を有し、消化管吸収動態を正確に予測可能な新規の消化管モデルを作成すること、ならびに 2) 新しいモデルを用いて **ER** に代わる **P-gp** 基質の **DDI** リスク判定基準を見出すこと、を目的として実施した。

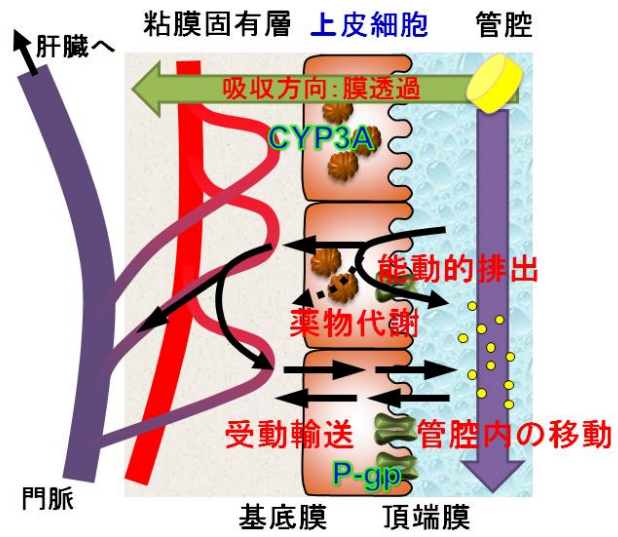


図 A-1. 薬物の小腸における吸収過程の影響因子。黒の矢印は上皮細胞周辺における代表的な薬物の移動経路を表す。

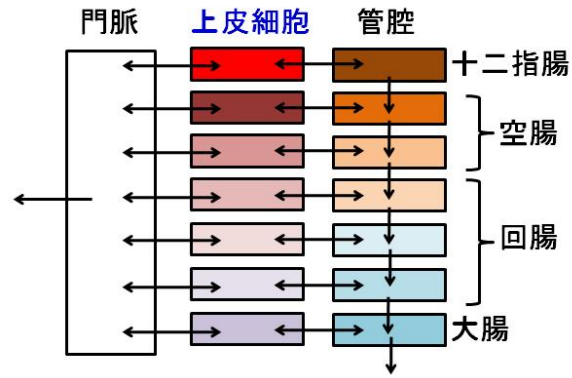


図 A-2. 多分割型モデルの代表的な構造。管腔や上皮細胞内では、色の違いで表したように生理学および解剖学的環境が各コンパートメントで異なる。

第二章 新しい消化管吸収生理学的モデルの構築

ートランスロケーションモデルー

<要 旨>

本研究では、解剖学および生理学的に矛盾のないモデル構造、ならびに薬物の吸収部位における移動の表現に制限の少ない単純かつ分割の少ない構造を有しながら、薬物の吸収動態の予測に必要な主要な要因が記述されており、結果としてヒトにおける薬物の吸収動態を正確に予測できる PBPK モデルの構築を行った。本研究で提案するトランスロケーションモデル(TLM)は、消化管管腔、小腸上皮細胞、粘膜固有層の各組織に対して、それぞれ一つ設定したコンパートメントが、薬物の小腸内における位置および分布の程度によって大きさを変えながら小腸上部から下部へと移動する概念から成る局所の PBPK モデルである。移動するコンパートメント内(吸収部位)では、位置の関数として定義された P-gp の発現量、pH、ならびに管腔内表面積などの生理学的・解剖学的パラメーターが小腸における位置に依存して変化する。したがって吸収部位は1つであるが、多分割型モデルと同様に、小腸内局所による性質の違いが吸収性の評価に反映される。TLM における薬物の吸収部位の位置および大きさの経時変化を定義する任意の型で設定した2種類の関数(移動関数)を作成することで、多分割型モデルでは表現不可能であった薬物の移動パターンを表現することが可能となった。TLM では、小腸における輪状ひだ、絨毛、ならびに微絨毛による吸収部位の表面積の拡張を考慮し、CYP3A や P-gp の発現量などの生理学的パラメーターとともに、位置の関数としてこれらに関数化した。CYP3A の活性は in

vitro で観察された代謝速度を、スケーリングファクターを乗ずることなくそのまま使用した。膜透過ならびに P-gp の活性については、Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送試験の結果より頂端膜から基底膜方向への膜透過性(P_{app})を算出し、これを用いて細胞モデルから導いた一枚膜透過性(P_s)、P-gp への親和性 K_m および最大輸送速度 V_{max} を含む式へのフィッティング計算により、各パラメーターを決定した。

TLM による吸収動態関連パラメーターの予測性を確認することで、TLM の記述の妥当性と医薬品開発への適用性を評価した。その結果、小腸代謝アベイラビリティー(F_G)、およびバイオアベイラビリティー(F)の予測に加え、小腸上皮細胞の予測精度の目安となる、 F_A と F_G の積である $F_A F_G$ の用量増加比以上の増加を表す非線形吸収動態、さらに血漿中濃度推移を良好に予測した。以上より、薬物の様々な環境や条件における消化管吸収を良好に予測可能なモデルであることが明らかとなった。

< 緒 言 >

経口薬の創薬では、体内の薬効標的へ十分、曝露されるか否かが重要な情報であることから、早期の段階で経口薬の吸収性を予測することが求められる。またその予測の結果、バイオアベイラビリティが低いと判断された場合、その原因が吸収過程の主に何に起因するものであったか解析し、その原因改善のために、例えば溶解性、膜透過性、さらには代謝安定性の改善を目指した化学構造変換をすることとなる。したがって、薬物の吸収動態をメカニズムに基づいて理解することが可能であり、化合物の物性改善の効果を簡便かつ定量的に予測可能な、消化管の数理モデルである PBPK モデルは創薬において非常に有用なツールである。吸収動態を予測するモデルとしては、 Q_{Gut} モデル(Yang et al., 2007)、Advanced Compartmental Absorption and Transit(ACAT)モデル(Yu and Amidon, 1999; Agram et al., 2001)、Segregated-flow モデル(SFM: Cong et al., 2000)、Advanced Dissolution, Absorption, and Metabolism(ADAM)モデル(Jamei et al., 2009)、ならびに GI transit time モデル(Bergstrand et al., 2009, 2012; Hénin et al., 2012)などが報告されている。この中で、定常状態における薬物の小腸代謝を予測可能な静的なモデルである Q_{Gut} モデルは、生理学的要因である血流量を考慮したモデルの中で、最も単純なモデルであり、膜透過性と小腸絨毛血流量のハイブリッドパラメーターである Q_{Gut} を用いることで F_G を予測するモデルである。 Q_{Gut} モデルは SFM と同様の基本構造を単純化することによって得られたモデルであるが、代謝や能動輸送の飽和などが実際に起こる小腸上皮細胞を有しておらず、その非線形性の解析などには適していない。ACAT モデルや ADAM モデルなどの多分割型モデルは、第一章で述べたように、小腸を上部から下部へ多数に分

割した構造を有しており、そのコンパートメント間を同様に上部から下部へと一次速度に従って移動する。これらのモデルでは、消化管における大きな特徴である部位依存的な解剖学および生理学的環境の違いを表現することが可能であり、特に管腔内における薬物の挙動を良好に予測可能である。しかし ACAT モデルを単独で用いてヒトにおける小腸代謝を予測した場合には第一章において述べた過小評価の課題があり (Heikkinen et al., 2014)、さらに全身 PBPK モデルに組み合わせてバイオアベイラビリティを予測した場合においても十分な予測精度が得られないなど課題を残している (Poulin et al., 2011; Margolskee et al., 2017)。

この問題は、消化管管腔内における薬物の上部から下部への移動が、一次速度に従って記述されていることから表現できる薬物の移動パターンに制限があることや、管腔から粘膜および漿膜方向への薬物の移行の記述が不正確であることに起因している可能性がある。小腸では、上部(十二指腸)から下部(回腸)へ至って生理学的および解剖学的環境が変化し、その変化が薬物の吸収特性に影響を与えたと考えられている。例えば CYP3A は小腸上部において単位長あたりではより多く発現していることが明らかとなっており (Paine et al., 1997)、モデル解析において薬物が実際より長時間小腸上部に滞留する設定となっている場合、小腸において代謝を受ける割合が大きくなる。このように薬物の移動パターンに制限があり、薬物の移動を正確に表すことができない場合、吸収性の予測結果は実測と乖離すると考えられる。また基底膜側の記述の不正確さに関しては、本来、小腸上皮細胞のモデル化は、頂端膜と基底膜を分割して記述し、基底膜における薬物の輸送は双方向とすべきである。しかし過去に報告のあるほとんどの生理学的モデルでは、基底膜

における薬物の輸送は実質的に一方向であった。これは多分割型モデルの構造では回避不可能な、小腸上部において門脈に移行した薬物が実際より高濃度を保ったまま速やかに小腸下部へ移行し、静脈である門脈から小腸下部の上皮細胞基底膜を介して管腔内へ移行し、実際より早く大腸へ到達するといった現象を制限するための措置と考えられる。しかしこのような制限を加えることで、上皮細胞基底膜から細胞内への薬物の受動輸送を正しく考慮することは不可能となり、上皮細胞実体を有していないと捉えることもできる。さらに基底膜における不正確なモデル記述は、薬物の吸収に重要な血流(Winne, 1978; Schulz and Winne, 1987; Chen and Pang, 1997; Pang and Chow, 2012)のモデルへの記述に対しても影響を与える。

したがって本研究は、既存のモデルにおける問題点であった、薬物の移動の記述と基底膜動態のより生理学的及び解剖学的に正確な記述に関する問題を解決し、薬物の消化管吸収を正確に予測する基盤を構築することを目的として行った。

<方 法>

1. トランスロケーションモデル(TLM)

TLM は、絨毛構造(図 1-1A)を有するヒト小腸の、消化管管腔(固体・液体)、小腸上皮細胞、粘膜固有層の各組織(図 1-1B)に対して、それぞれ一つ設定したコンパートメントが、薬物の小腸内における位置および分布の程度によって大きさを変えながら小腸上部(図 1-1C)から下部(図 1-1D)へと移動するモデル構造を有する生理学的モデルである。吸収部位の移動には移動関数を設定する。移動するコンパートメント内(吸収部位: 図 1-2)では、膜透過性やクリアランスなど生理学的・解剖学的パラメーターが小腸における位置に依存して変化する。厳密には、これらのパラメーターは吸収部位内において一定のバラつきを有している可能性がある。しかしモデルの単純化のため、吸収部位の平均位置における値を各パラメーターの代表値として吸収部位内では一定の値となると仮定した。TLM では、胃と大腸のコンパートメントを **well-stirred** コンパートメントとして別途記述している。胃および大腸内の薬剤(固体・液体)には移動を設定しない。胃からの排出速度は一次速度定数 k_{GE} に従って胃から十二指腸に移動するとした。ここで溶液の胃排出速度は後述のフィッティング計算より 5.46 h^{-1} 、固体では文献値より 0.542 h^{-1} とした。一方、大腸への移動速度 k_{excr} は、小腸における薬物の移動速度より求めた。本研究では解析対象とした薬物の特性を考慮し、胃ならびに大腸からの吸収は起きないと仮定して行った。

以下に、TLM に記述した関数の概要、吸収部位の移動に関する記述、解剖学的特徴のモデル化、生理学的特徴のモデル化の順で TLM のモデル構造について説明する。

TLMにおける各組織中濃度の経時変化を表すために、Scheme 1 に示した式を記述した。

Scheme 1. トランスロケーションモデルに記述した式。

$$\frac{dX_{solid, stomach}}{dt} = -(k_{GE, solid} + k_{dis, stomach})X_{solid, stomach}$$

$$\frac{dX_{stomach}}{dt} = k_{dis, stomach}X_{solid, stomach} - k_{GE}X_{stomach}$$

$$\frac{dX_{solid, lumen}}{dt} = k_{GE, solid}X_{solid, stomach} - (k_{dis, lumen} + k_{excr})X_{solid, lumen}$$

$$\frac{dX_{lumen}}{dt} = k_{GE}X_{stomach} + k_{dis, lumen}X_{solid, lumen} - FL_{lumen}$$

$$\frac{dX_{ent}}{dt} = \frac{f_{lumen} P_1 S_{abs, api}}{V_{lumen, abs}} X_{lumen} - \frac{CL_{out} + CL_{met} + f_{ent} P_3 S_{abs, bas}}{V_{ent, abs}} X_{ent} + \frac{f_{propria} P_4 S_{abs, bas}}{V_{propria, abs}} X_{propria}$$

$$\frac{dX_{propria}}{dt} = \frac{f_{ent} P_3 S_{abs, bas}}{V_{ent, abs}} X_{ent} - \frac{f_{propria} P_4 S_{abs, bas} + Q_{plasma, abs} / f_B}{V_{propria, abs}} X_{propria}$$

$$\frac{dM_{time, 1}}{dt} = X_{lumen} + X_{solid, lumen} - \frac{FL_{lumen} + k_{excr} X_{solid, lumen}}{X_{lumen} + X_{solid, lumen}} M_{time, 1}$$

$$FL_{lumen} = \left(\frac{f_{lumen} P_1 S_{abs,api}}{V_{lumen,abs}} + k_{excr} \right) X_{lumen} - \frac{CL_{out}}{V_{ent,abs}} X_{ent}$$

$$CL_{out} = f_{ent} P_2 S_{abs,api} + \frac{psf_{pgp} V_{max,pgp} A_{rel,pgp,abs}}{K_{m,pgp} / f_{ent} + X_{ent} / V_{ent,abs}}$$

$$CL_{met} = \frac{V_{max,CYP3A} A_{CYP3A,abs}}{K_{m,CYP3A} / f_{ent} + X_{ent} / V_{ent,abs}}$$

$$k_{excr} = \frac{d\lambda(\tau)}{d\tau} / L_{abs} \quad (\text{吸収部位が小腸の出口に到達した時})$$

$$\tau = M_{time,1} / (X_{lumen} + X_{solid,lumen})$$

$$L_{abs} = 2\sqrt{3} \times \sigma(\tau)$$

$X_{solid,stomach}$ 、 $X_{stomach}$ 、 $X_{solid,lumen}$ 、 X_{lumen} 、 X_{ent} 、 $X_{propria}$ はそれぞれ、胃内薬物量(固体)、胃内薬物量(液体)、管腔内薬物量(固体)、管腔内薬物量(液体)、上皮細胞内薬物量、および粘膜固有層内薬物量を表す。また、 $M_{time,1}$ は管腔内の総薬物量の時間に対する一次モーメント、 FL_{lumen} は、管腔内からの薬物の消失流速、 CL_{out} および CL_{met} はそれぞれ小腸上皮細胞における消失クリアランスおよび小腸上皮細胞における代謝クリアランスを表す。

k_{excr} 、 $k_{GE,Solid}$ 、 τ 、 z_{abs} 、および L_{abs} はそれぞれ管腔からの薬物排泄速度定数、固体の胃

排出時間(Jamei et al., 2009)、管腔内における MRT、吸収部位の位置、および長さを表す。吸収部位の移動に関する設定は以下に記述する。

2. 位置関数及び分布関数

TLM における薬物の移動に関する定義を行った。TLM では、薬物の消化管管腔内における位置の平均ならびに分布、すなわち吸収部位の長さを、時間 t における位置関数 $\lambda(t)$ および分散を表す式 $\sigma^2(t)$ を用いて記述した(これらを移動関数とする)。これらの式は、非吸収性の経口指標薬である ^{99m}Tc -diethylenetriamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) の分布の実測にフィッティング計算することで取得した。ここでは小腸内における薬物は全て溶解しており、溶液投与を仮定した。胃の出口から距離 z における単位長当たりの管腔内の薬物総濃度を $C_{\text{lumen,total}}(z)$ 、小腸内薬物の分布の n 次モーメントを式 1-1 に示した。ここで L_{si} は十二指腸から回腸までの小腸の長さを表す。

$$M_{\text{location},n} = \int_0^{L_{\text{si}}} z^n \cdot C_{\text{lumen,total}}(z) dz \quad (1-1)$$

この時、小腸における指標薬の位置の平均及び分散は以下の λ と σ^2 でそれぞれ表される。

$$\lambda = M_{\text{location},1} / M_{\text{location},0} \quad (1-2)$$

$$\sigma^2 = M_{\text{location},2} / M_{\text{location},0} - \lambda^2 \quad (1-3)$$

式 1-2 および 1-3 は、血中濃度推移の時間モーメントと平均滞留時間(MRT)、及び平均滞留時間の分散(VRT)の関係に相当する。 $C_{lumen,total}(z)$ には任意の統計分布関数を設定することが理論的には可能であるが、TLM では単純な構造とするために吸収部位内では一様分布に従い、それ以外の部位では 0 であると仮定した。この仮定において、吸収部位の長さである L_{abs} 、は以下の式で与えられる。

$$L_{abs} = 2\sqrt{3}\sigma \quad (1-4)$$

理論上、 λ および σ は、消化管内における薬物の移動特性に合わせ、任意の式の形で設定することが可能である。そこで本研究では、以下の式 1-5 および式 1-6 を、 m_1 、 m_2 、 s_1 、 s_2 、 s_3 、および s_4 をフィッティングパラメーターとし報告値(Kimura and Higaki, 2002)へのフィッティング計算を行うことでこれらの値を決定した。そのフィッティング時の結果を、 ^{99m}Tc -DTPA をヒトに経口投与した時の胃、空腸、回腸、および大腸における放射活性の経時変化として図 1-3A に示した。

$$\lambda_{bolus}(t) = \frac{m_1 t}{m_2 + t} \quad (1-5)$$

$$\sigma_{bolus}(t) = s_1 \left(e^{-s_2 t} - e^{-s_3 t} \right) + s_4 \quad (1-6)$$

下付きの bolus は、この式が薬物の小腸入り口への瞬時投与を表していることを示しており、 t は投与後の経過時間である。式 1-5 および式 1-6 は、薬物吸収部位(コンパートメント)の時間依存的な変化を表すために使用した。

一方、反復投与などの影響により瞬時投与でなく $I(t)$ での入力となる場合、腸管内局所における薬物濃度は正確には $I(t)$ と式 1-5 とのコンボリューションにより与えられる。

$$\lambda(t) = (\lambda_{bolus} * I)(t) = \int \lambda_{bolus}(v) I(t-v) dv \quad (1-7)$$

この計算は任意の入力関数に対しては複雑な数値計算を必要とする。したがってこのコンボリューションの単純化のため、小腸における薬物の平均滞留時間 τ を計算することとし以下のモーメント解析を行った。

$$M_{time,n} = \int_0^t s^n \cdot X_{lumen,total}(s) ds \quad (1-8)$$

$$\tau = M_{time,1} / M_{time,0} \quad (1-9)$$

ここで、 $X_{lumen,total}(t)$ は時間 t における管腔内の薬物量を表す。部分積分により式 1-8 は、以下のように変換できる。

$$\begin{aligned}
M_{time,n}(t) &= \int_0^t s^n X_{lumen,total}(s) ds \\
&= \frac{t^{n+1}}{n+1} X_{lumen,total}(t) - \frac{1}{n+1} \int_0^t s^{n+1} X_{lumen,total}(s) ds \\
&= \frac{t^{n+1}}{n+1} X_{lumen,total}(t) - \frac{1}{n+1} M_{time,n+1}(t)
\end{aligned} \tag{1-10}$$

式 1-10 を整理すると以下になる。

$$M_{time,n+1}(t) = t^{n+1} X_{lumen,total}(t) - (n+1)M_{time,n}(t) \tag{1-11}$$

式 1-11 の微分は、以下のように表される。

$$\frac{dM_{time,n+1}(t)}{dt} = (n+1)t^n X_{lumen,total}(t) + t^{n+1} \frac{dX_{lumen,total}(t)}{dt} - (n+1) \frac{dM_{time,n}(t)}{dt} \tag{1-12}$$

n = 0 の時、式 1-12 は Scheme 1 の $M_{time,1}$ の式を与える。ここで、 $X_{lumen,total}$ は、 X_{lumen} と $X_{lumen,solid}$ の和を表す。吸収部位における薬物の速度が一定の時、持続的な薬物の入力および出力の有無に関わらず、薬物の分布位置の平均は、 τ にしたがって移動する。そのため、式 1-7 のコンボリューションは、以下の式に近似される。

$$\lambda(t) = (\lambda_{bolus} * I)(t) \cong \lambda_{bolus}(\tau) \tag{1-13}$$

式 1-13 は、薬物の管腔における入力および出力の経時変化から適切に τ を計算する事で、

薬物の移動は見かけ上 $\lambda_{bolus}(\tau)$ で表されることを意味する。式 1-13 では、薬物の移動が吸収部位内ではばらつきがあるとき、誤差を生じる。理論上、これらの誤差はより高次のモーメントを算出することで補うことが可能であるが、この最も単純な設定においても、後述の通り満足できる結果を得られた。

$$\delta(t) \cong \delta_{bolus}(\tau) \quad (1-14)$$

3. 解剖学的パラメーターの設定

TLM における小腸各部位の大きさなど、解剖学的特徴のモデル化を行った。

十二指腸、空腸、および回腸を含む小腸内腔の半径(r)は、報告を参考に線形の関数として設定した(図 1-4A; Willmann et al., 2003, 2004)。

$$r = r_{ini} - r_{grad} \cdot z_c \quad (\text{cm}) \quad (1-15)$$

ここで z_c (cm) は吸収部位の中心を表す。 r_{ini} (1.56) および r_{grad} (0.00265) は、GastroPlus™ を用いた文献報告に記載のある半径(表 1-1)への回帰分析により決定した。

基底膜と頂端膜の表面積(それぞれ $S_{abs,bas}$: 図 1-4B および $S_{abs,api}$) は以下の式より算出した。

$$S_{abs,bas} = \pi(r_{in} + r_{out}) \sqrt{(r_{in} - r_{out})^2 + L_{abs}^2} \times PE \times VE_{abs} \quad (\text{cm}^2) \quad (1-16)$$

$$S_{abs,api} = S_{abs,bas} \times ME \quad (\text{cm}^2) \quad (1-17)$$

ここで r_{in} と r_{out} は、吸収部位の入り口と出口の半径を、 PE は輪状ひだによる表面積拡張係数、 VE_{abs} は絨毛による表面積拡張係数、 ME は微絨毛による表面積拡張係数を表す。式 1-16 は円柱錐の公式より導出した。絨毛の大きさは小腸上部から下部にかけ小さくなっていくため、式 1-18 により VE_{abs} を算出した。

$$VE_{abs} = VE_{ini} - (VE_{ini} - 1) \frac{z_c}{L_{si}} \quad (1-18)$$

ここで VE_{ini} は十二指腸入り口における絨毛による表面積拡張係数を表す。本研究では PE および ME は小腸では一定の値であると仮定した。 PE 、 VE_{ini} および ME は、3、10、20 であると設定した(DeSesso and Jacobson, 2001.)。

小腸全長における表面積は、小腸管腔の位置 0 から L_{si} における円周の積分における解として、式 1-19 より算出した。

$$S_{si} = 2\pi \cdot PE \cdot ME \left[\frac{(1+VE_{ini})r_{ini} \cdot L_{si}}{2} - \left(\frac{1}{3} + \frac{V_{ini}}{6} \right) r_{grad} \cdot L_{si}^2 \right] \quad (\text{cm}^2) \quad (1-19)$$

S_{si} は血流量の算出に後に使用される。吸収部位における管腔内は、小腸内容物によって

完全に満たされてはいないため、式 1-15 などを用いた算出は行わず、薬物投与時に摂取される水の量と、生理学的条件において存在する管腔内の水分量を管腔内容積(図 1-4C)とし、以下の式 1-20 より算出した。

$$V_{lumen,abs} = \frac{L_{abs}}{L_{all}} V_{cont} + V_{water,ini} e^{-\ln(2)t/HLw} \quad (\text{mL}) \quad (1-20)$$

ここで $V_{water,ini}$ は経口投与時に摂取する水の量(200 mL)、 V_{cont} は通常の絶食条件下における小腸管腔内水分量(105 mL; Schiller et al., 2005)を表す。HLw は水の管腔内からの消失半減期を表す。本研究では、HLw は 1 時間と仮定した。時間を設定するに当たり、HLw の感度分析を行ったところ、数倍の変化では薬物の吸収動態への影響は無かった。

吸収部位における小腸上皮細胞の体積 $V_{ent,abs}$ は、上皮細胞の厚さ($T_{ent} = 0.0018 \text{ cm}$; Sugano et al., 2009)と $S_{abs,bas}$ より算出した(図 1-4D)。

$$V_{ent,abs} = S_{abs,bas} \cdot T_{ent} \quad (\text{mL}) \quad (1-21)$$

次いで粘膜固有層の体積 $V_{propria,abs}$ は、絨毛が小腸管腔内を完全に覆っていると仮定し、絨毛の高さ($H_{villi} = 0.07 \text{ cm}$; Sugano, 2009)と管腔表面積の積から、 $V_{ent,abs}$ を除くことで算出した(図 1-4E)。

$$V_{propria,abs} = \frac{S_{abs,bas} \cdot H_{villi}}{VE_{abs}} - V_{ent,abs} \quad (\text{mL}) \quad (1-22)$$

4. 生理学的パラメーターの設定

TLM に記述する小腸の部位依存的な血流量の変化など、生理学的パラメーターのモデル化を行った。

吸収部位における血漿流量 $Q_{plasma,abs}$ は、式 1-23 のように、総血流量に吸収部位と小腸全長の表面積の比を乗じ、ヘマトクリット値 ($Ht = 0.45$) を考慮することで設定した(図 1-4F)。

$$Q_{plasma,abs} = (1 - Ht) Q_{blood,enterocyte} \frac{S_{abs,api}}{S_{si}} \quad (\text{mL/h}) \quad (1-23)$$

$Q_{blood,enterocyte}$ は心拍出量の 10% が上腸管膜動脈血流量 (37,200 mL/h) となり、この内 80% が粘膜に、さらにその内 60% が上皮細胞近傍に流れ込むとし、18,000 mL/h とした (Jamei et al., 2009)。

代謝酵素である CYP3A の小腸単位長あたりの発現量は、十二指腸で最も高く、回腸下部で最も少ないことが明らかになっている (Paine et al., 1997)。したがって、位置に依存して線形で CYP3A の発現量が小腸上部から下部へむけ減少すると仮定した。吸収部位における CYP3A の発現量を $A_{CYP3A,abs}$ とした時、 L_{abs} と CYP3A の小腸における発現密度によ

って式 24 の様に表される(図 1-4G)。ここで L_{si} は小腸全長の長さを表す($z < L_{si}$, $L_{si} = 306$ cm)。

$$A_{CYP3A,abs} = 2A_{CYP3A,total} \left(1 - \frac{z_c}{L_{si}} \right) \frac{L_{abs}}{L_{si}} \quad (\text{pmol}) \quad (1-24)$$

$A_{CYP3A,total}$ は、小腸全体における CYP3A の総発現量(70,500 pmol)を表す。また大腸では CYP3A が発現していないとし、回腸の下端では同様に CYP3A の発現量が 0 であるとした(Bruyere et al., 2010)。CYP3A 基質の代謝クリアランスは、Scheme 1 に示したように、 $A_{CYP3A,abs}$ と各基質のミカエリス定数を用いて算出される。

P 糖タンパク質の小腸における発現量は、小腸上部から下部へかけて増加する傾向が報告されているが(Stephens et al., 2001; Englund et al., 2006; Bruyere et al., 2010)、絶対的発現量の報告は非常に少なく、十分信頼できる値が不明である。したがって P-gp の発現量は、相対比として以下の式 1-25 を用いて算出した(図 1-4H)。

$$A_{rel,Pgp,abs} = \left(A_{init,Pgp} + A_{grad,Pgp} \frac{z_c}{L_{si}} \right) \frac{L_{abs}}{L_{si}} \quad (\text{pmol}) \quad (1-25)$$

ここで $A_{init,Pgp}$ および $A_{grad,Pgp}$ は、十二指腸上部における P-gp の発現量と小腸下部にかけての発現量増加の傾きを表し、本研究ではそれぞれ、0 および 1 とした。実際の発現量を TLM に入力するためには、後述するように、すでに臨床における吸収率の実測値が報告

されている P-gp 基質基準薬における in vitro および in vivo の発現量の乖離をスケーリングファクター(psf_{P-gp})とし、これが各薬物で共通の値をとると仮定した上で、 $A_{rel,Pgp,abs}$ に psf_{P-gp} を乗じて TLM に使用する。

5. 薬物固有のパラメーターの設定

ここまでに TLM の基本構造の構築を行った。次いで、投与する薬物側の情報を TLM において適切に設定するための記述を行った。

投与された薬物が固体の場合、固体の溶解度を定義する必要がある。そのため、絶食状態における溶解を、fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF)への溶解度として式 1-26 より算出した(Poulin et al., 2011)。

$$Sol_{FaSSIF} = Sol_{Water} + Sol_{Water} \frac{MW_{Water}}{MW_{Drug}} \left(10^{0.75 \log P + 2.27}\right) MW_{Drug} \cdot C_{BS} \text{ (}\mu\text{g/mL)} \quad (1-26)$$

ここで Sol_{Water} 、 MW_{Water} 、 MW_{Drug} 、 $\log P$ 、 C_{BS} はそれぞれ、溶解度、水および薬物の分子量、n-オクタノール:緩衝液分配係数、胆汁酸(タウロコール酸)の濃度 (4 nM)を表す。

また、溶解速度は以下の式 1-27 および式 1-28 により定めた。

$$k_{dis} = 3\gamma \frac{Sol - C}{\rho r_j T} \quad (\text{h}^{-1}) \quad (1-27)$$

$$\gamma = 9.9 \times 10^{-5} \cdot MW^{-0.453} \quad (\text{cm}^2/\text{s}) \quad (1-28)$$

ここで、 S_0 、 γ 、 ρ 、 r_j 、 T ならびに C_i は、溶解度、拡散係数、密度 (1.2 mg/mL)、粒子径 (0.0025 cm)、拡散層の厚さ (0.003 cm)、ならびに胃または管腔内薬物濃度を表す (Agoram et al., 2001)。

薬物の細胞膜透過性に関する各パラメーター(受動拡散による頂端膜における細胞内および細胞外への透過、受動拡散による基底膜における細胞内および細胞外への透過、ならびに頂端膜における P-gp による能動的な細胞外への排出)は、それぞれ P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_{P-gp} と表した。細胞膜の構造的な対称性および類似性に基づき、 $P_1 \sim P_4$ の 1 枚膜の受動拡散による透過性は全て等しいと仮定し、 P_s とした。Caco-2 細胞における P_s は、Caco-2 における頂端膜から基底膜側への見かけの膜透過係数(P_{app} ; Gertz et al., 2010)を用いて、以下の式より算出した。

$$P_{s,Caco-2} = \frac{1 + ME_{Caco-2}}{ME_{Caco-2}} P_{app,Caco-2} \quad (1-29)$$

ここで ME_{Caco-2} は、Caco-2 細胞の頂端膜と基底膜の表面積の比を表す。式 1-29 は文献報告にある式を変換して取得した (Tachibana et al., 2009)。その際、 $PS_1 =$

$P_{1,Caco-2} \cdot S \cdot ME_{Caco-2}$ 、 $PS_2 = P_{2,Caco-2} \cdot S \cdot ME_{Caco-2}$ 、 $PS_3 = P_{3,Caco-2} \cdot S$ 、 $PS_4 = P_{4,Caco-2} \cdot S$ と仮定

し算出した。また、式 1-29 は受動拡散による透過係数を算出する目的のため、 K_m および V_{max} は除いて算出した。

本研究では、 ME_{Caco-2} には、Caco-2 における透過試験において、P-gp の基質でない propranolol および naproxen を用いた試験により得られた値の平均値 4 を用いた (Ohura et al. 2011)。P-gp の基質における $P_{app,Caco-2}$ の値は、多濃度で行われた試験において、排出機能の飽和が観察されている最大試験濃度以下 3 点 (およそ 10 - 100 μM) より平均値として算出した。

in vivo における P_s は式 1-30 の通りとした。

$$P_{S,in vivo} = P_2 = P_3 = P_4 = P_{S,Caco-2} \times psf_{passive} \quad (1-30)$$

ここで $psf_{passive}$ は、既存の F_A の情報のある薬物の in vivo および in vitro における膜透過係数の乖離の程度を表す。これは大腸癌由来細胞である Caco-2 により得られた $P_{S,Caco-2}$ が、正常な小腸上皮細胞における $P_{S,in vivo}$ と異なる可能性を考慮し設定した。TLM に設定する全薬物共通の $psf_{passive}$ 算出のために用いた薬物は、以下の条件を満たした主に受動輸送で小腸から吸収される 9 薬物 (acyclovir、atenolol、cimetidine、ciprofloxacin、enalaprilat、gabapentin、methotrexate、ranitidine、sulpiride) とした。条件は以下の通りである：1) $F_A < 0.9$ 、2) Caco-2 透過性の同一文献での文献報告がある (Thomas et al., 2008)、3) $F_H > 0.7$ 、4) $CL_H/CL_{tot} < 0.3$ 。これらの薬物それぞれに対して TLM を構築し、 $psf_{passive}$ を薬物ごとに fitting 計算により決定した。本来、 $psf_{passive}$ の値は薬物によらず一

定の値となる。使用した 9 薬物の個別の $psf_{passive}$ は全ての薬物で一定とはならなかったものの(0.311~5.74 : 表 1-2)、評価系内におけるバラツキよるものと仮定し、本モデルではこれらの値の算術平均値 2.23 を使用し、以下、値を固定して TLM による解析を実施した。

P_1 の算出は後述する。

P-gp の基質薬の P-gp による能動輸送透過係数は以下の式により表される。

$$P_{Pgp,Caco-2} ME_{Caco-2} S = \frac{V_{max,Pgp,Caco-2}}{K_{m,Pgp} + C_{cell}} \quad (1-31)$$

$$P_{Pgp,abs} S_{abs,api} = \frac{psf_{Pgp} \cdot V_{max,Pgp} \cdot A_{rel,Pgp}}{K_{m,Pgp} + C_{Enterocyte,u}} \quad (1-32)$$

ここで、 psf_{Pgp} 、 C_{cell} 、 $C_{Enterocyte,u}$ はそれぞれ P-gp のスケーリングファクター、Caco-2 細胞内濃度、小腸上皮細胞内濃度を表す。P-gp による輸送のミカエリス定数($K_{m,P-gp}$ および $V_{max,Pgp,Caco-2}$)は、多濃度で行われた Caco-2 における経細胞輸送試験において得られた頂端膜側の添加濃度(C_a)に対する $P_{app,Caco-2}$ の関係の文献値に対する、文献報告の式 (Tachibana et al., 2010) に若干の改善を加えた以下の式のフィッティング計算により決定した。

$$P_{app,Caco-2} = \frac{1}{2(1+ME_{Caco-2})S \cdot C_a} \left[\frac{P_{s,Caco-2} S \{ME_{Caco-2}(C_a - K_{m,Pgp}) - K_{m,Pgp}\} - V_{max,Pgp,Caco-2}}{\sqrt{[P_{s,Caco-2} S \{ME_{Caco-2}(C_a - K_{m,Pgp}) - K_{m,Pgp}\} - V_{max,Pgp,Caco-2}]^2 + 4ME_{Caco-2}(1+ME_{Caco-2})(P_{s,Caco-2} S)^2 K_{m,Pgp} C_a}} \right] \quad (1-33)$$

また、フィッティング計算により取得した $P_{s,Caco-2}$ が、式 1-29 により得られた結果と乖離が無いことを確認した。

Caco-2 による経細胞輸送試験では、通常 pH7.4 で実施されるが、小腸管腔における pH は実際にはより酸性である。そこで頂端膜における受動拡散による細胞内への輸送係数 P_1 は、Caco-2 を用いた試験における頂端膜側の pH と、小腸管腔内における pH の違いを考慮して、以下の式 1-34 より算出した。

$$P_1 = P_{s,invivo} \times \frac{1+10^{pH_{Caco-2}-pKa_{acid}} + 10^{pKa_{base}-pH_{Caco-2}}}{1+10^{pH_{lumen}-pKa_{acid}} + 10^{pKa_{base}-pH_{lumen}}} \quad (1-34)$$

なお式 1-34 は薬物の in vivo 管腔内における非解離型薬物の割合を、Caco-2 試験の緩衝液における非解離型薬物の割合で除したものを表す。ここで pH_{Caco-2} 、 pKa_{acid} 、 pKa_{base} は、それぞれ Caco-2 試験における緩衝液の pH、および被験薬物の酸性及び塩基性側の pKa を表す。 pH_{lumen} は、小腸管腔内の pH を表し、以下の式により算出した。

$$pH_{lumen} = pH_{ini} + pH_{grad} \cdot L_{si} \frac{z_c}{L_{si}} \quad (1-35)$$

ここで pH_{ini} および pH_{grad} はそれぞれ 5.85 および 0.00455 とした。

6. データ収集

本モデルに入力した、薬物固有のパラメーターを表 1-3 に示した。CYP3A に対する K_m は、文献報告にある値を使用した(Lavrijsen et al., 1988; Ekins et al., 1999, Heikkinen et al., 2012; Gertz et al., 2011; Kajosaari et al., 2005; Ku et al., 2008; Rotzinger et al., 1998; Polasek et al., 2010)。CYP3A の値がない場合は、CYP3A4 の K_m を代わりに使用した。代謝固有クリアランス、膜透過係数、タンパク結合率などは、Gertz らの報告値を用いた(Gertz et al, 2010)。 F_G の実測値は、Gertz らの値に加え(Gertz et al., 2010)、樋坂らによって報告された DDI 法を用いて得られた F_G (Hisaka et al., 2014)およびその他の報告のある値を用いた(Varma et al., 2010)。これらの実測値の平均値を表 1-4 に示した。解析に必要なその他のパラメーターは、適切な報告より得た。管腔内薬物非結合型分率 (f_{lumen})、小腸上皮細胞中非結合型分率(f_{ent})および粘膜固有層非結合型分率($f_{propria}$)は 1 と仮定した。

7. 薬物速度論的パラメーター(F_G および F)の算出

TLM による $F_A F_G$ の予測値は、TLM における計算において門脈へ移行した薬物の累積

量($A_{portalvein,cumulative}$)を投与量(Dose)で除することにより算出した(式 1-36)。F_Gの予測値は、未吸収のまま大腸に到達した薬物量を投与量で除した値を1から減じた値でF_AF_Gを除することにより算出した(式 1-37)。

$$F_A F_{G,predicted} = \frac{A_{portalvein,cumulative}}{Dose} \quad (1-36)$$

$$F_{G,predicted} = \frac{F_A F_{G,predicted}}{1 - \frac{A_{rectum,cumulative}}{Dose}} \quad (1-37)$$

ヒト肝マイクロソームを用いて見積もった *in vitro* における肝固有クリアランス ($CL_{int,H,HLM}$; Gertz et al., 2010)、血中非結合型分率(f_B)、および肝血流量(Q_H)を用いて、*in vitro* より予測した値、 $F_{H,invitro}$ を算出した。

$$F_{H,invitro} = \frac{Q_H}{Q_H + f_B CL_{int,H,invitro}} \quad (1-38)$$

F_AF_Gの予測値に $F_{H,invitro}$ を乗ずることで、Fの予測値を算出した。Fの実測値は2つの報告より引用し(Varma et al., 2010; Appendix of Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th edition)、その平均値を予測値との比較に用いた。

8. 感度分析

小腸上皮細胞の頂端膜と基底膜の表面積の違い(ME)の、吸収動態予測への影響を確認するために、verapamil をモデル薬物として感度分析を行った。ME の値は 1、5、および 20 を設定し、verapamil を 40 mg 投与したときの小腸管腔内、上皮細胞、粘膜固有層中濃度推移、および $F_A F_G$ への影響を確認した。

9. 予測精度の確認

F_G および F の予測を行い、文献報告値と比較することにより TLM による F_G および F の予測性の確認を行った。 F_G および F の予測の精度および真度の確認には、within 2-fold error、within ± 0.3 error、Average-fold error (AFE; 式 1-39)、および Root mean square prediction error (RMSE; 式 1-40) を用いた。

$$AFE = 10^{\frac{\sum \log\left(\frac{\text{observed}}{\text{predicted}}\right)}{N}} \quad (1-39)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\text{predicted} - \text{observed})^2}{N}} \quad (1-40)$$

ここで N は、解析に使用した薬物数を表す。

10. in vitro 膜透過性と in vivo 空腸透過性の関係の確認

in vivo における薬物の受動拡散による透過性が in vitro から適切に算出できるか確認するために、Caco-2 における見かけの膜透過係数(P_{app})と Loc-I-Gut (Petri et al., 2003) を用いて測定された空腸透過性の関係を散布図にプロットした。 P_{app} は TLM に入力する値を、 P_{eff} は、TLM の吸収部位のコンパートメントを $L_{abs} = 10 \text{ cm}$ として空腸最上部に固定し、そのときの P_{eff} を以下の式により算出する、Loc-I-Gut による実験を TLM により再現する形で行った。

$$P_{eff} = -\frac{Q}{A} \left(\frac{C_{in} - C_{out}}{C_{out}} \right) \quad (1-41)$$

ここで Q はコンパートメント内に流入させる薬液の流速、 C_{in} および C_{out} はそれぞれ薬液の流入時および流出時の濃度、 A は表面積を表す。ここで用いた表面積は、通常の P_{eff} 算出条件で比較するために、表面積の拡張を考慮しなかった。

11. 非線形吸収動態の予測

F_{AFG} と投与量との関係を予測することにより、吸収動態の非線形性を解析した。解析には、CYP3A の基質 2 薬物(alprazolam、midazolam)、P-gp の基質 2 薬物(digoxin、talinalol)、および CYP3A と P-gp 両方の基質(quinidine、verapamil)を用い、0.01 から 1,000 mg の投与量に対する F_{AFG} を散布図として表し、文献報告値より算出した値(Smith et al.,

1984; Lin et al., 1988; Yasui et al., 1996; Barbanoj et al., 2007; Bornemann et al., 1985; Maeda et al., 2011; Misaka et al., 2010; Tachibana et al., 2009; Ieiri et al., 2013)と比較した。文献報告値の算出は、非線形動態を引き起こす部位として、肝臓の影響は小さく、より高曝露する小腸であると仮定をし、体重、血液-血漿濃度比(R_B)、および肝血流量(Q_H)がそれぞれ 70 kg、1、および 25.5 mL/min/kg の条件で行った。全身クリアランス(CL_{tot})および尿中排泄率(f_e)は以下より引用した(Appendix of Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th edition)。

12. 全身血漿中濃度推移の予測

全身血漿中濃度推移は、TLM に全身コンパートメントを追加して予測した。全身コンパートメントには 1-compartment モデルを用い、クリアランスおよび分布容積は、静脈内投与時の血漿中濃度推移の実測値へのフィッティング計算により決定した。予測は、報告間におけるデータのバラつきを考慮し、5 種の生理学的パラメーターを文献報告のあるバラつき(CV として胃排出時間 : 38%、管腔内 pH : 10%、CYP3A 発現量 : 47%、P-gp 発現量 : 75%、血流量 : 14%)を用いて 100 例分ランダムに発生させ、100 人分の仮想被験者の血漿中濃度推移を予測した。解析対象の薬物は、静脈内投与時の血漿中濃度推移の報告のある CYP3A の基質(alprazolam、midazolam、buspirone)、P-gp の基質(digoxin)、P-gp と CYP3A 両方の基質(verapamil)、および難溶解性の薬物(aprepitant、gribenclamide)とした。なお、本章では血漿中濃度推移の解析のみ、固体投与を想定して予測を行った。

13. 使用したソフトウェアとシステム

本研究における微分方程式の数値計算は、薬物動態解析プログラム Napp (<http://square.umin.ac.jp/todaiyak/download.htm>)を用い、Runge-Kutta-Fehlberg 法により行った(Hisaka and Sugiyama, 1998)。

< 結 果 >

TLM の構築

薬物が小腸管腔から上皮細胞および粘膜固有層を経て血流に移動する過程が吸収部位において記述されており(図 1-1C,D および図 1-2)、その吸収部位は時間に依存して小腸を上部(図 1-1C)から下部(図 1-1D)へ、その位置ならびに分布の幅を変化させながら移動する概念に基づいた TLM を構築した。TLM における吸収部位内における、小腸管腔から上皮細胞への薬物の取り込み、排出、上皮細胞から粘膜固有層への薬物の排出および取り込みなど、薬物の移行の詳細を図 1-2 に示した。また、各コンパートメント内の薬物量を算出した結果、投与した薬物と各部位に存在する薬物の物質収支が一致し、TLM が正常に構築されたことが明らかとなった。

位置関数および分布関数の設定

TLM における、吸収部位の移動を表す位置関数および分布関数は、Kimura らによって報告された(Kimura and Higaki, 2002)ガンマシンチグラフィの結果へのフィッティングにより得た。Ps を 0 とすることで投与された薬物が吸収されることなく大腸へ移行する設定とし、各関数の m_1 、 m_2 、 s_1 、 s_2 、 s_3 、および s_4 をフィッティングパラメーターとして、フィッティング計算を行った結果、 m_1 、 m_2 、 s_1 、 s_2 、 s_3 、および s_4 はそれぞれ 415(1.35%)、1.50(4.71%)、92.4(4.68%)、0.605(4.35%)、45.9(36.8%)、3.72(5.03%)であった(括弧内の数字はフィッティング計算時の CV を表す)。以上より、位置関数および分布関数を用いて消化管内における薬物の移動を表現可能である事が確認できた(図 1-3A)。

さらに、これらの関数を用いることで、一様分布を仮定した吸収部位の平均位置および分布の幅、消化管管腔内における薬物量、および消化管管腔内における薬物の平均滞留時間 (MRT) が計算可能となった(図 1-3B~D)。この消化管内における薬物の MRT を用いる事で、位置関数および分布関数を、胃排出速度の低下や、反復投与などの様々な消化管管腔内における薬物の状況に適用する事が可能である。

位置依存的な解剖学および生理学的パラメーターの設定

TLM の吸収部位に対して定義した位置依存的な解剖学および生理学的パラメーターは、全て消化管内に置ける位置 z の関数として記述した。TLM において各パラメーターを定義した式を表 1-5 に示した。また、 z と各パラメーターの関係を図 1-4 に示した。縦軸に各パラメーターを、横軸に z をプロットした。ここで総表面積、管腔内総容積、上皮細胞総容積ならびに粘膜固有層総容積はそれぞれ、751,000 cm²、311 mL、67.6 mL、および 378 mL であった。

in vitro 膜透過係数と空腸透過性の関係の確認

受動拡散により吸収される薬物の in vitro から in vivo への透過性の変換に関する処理が適切に行われているか確認するために、Caco-2 における P_{app} と、in vivo における P_{eff} の関係を確認した(図 1-5)。Loc-I-Gut の試験条件を、TLM を用いて再現することにより算出した $P_{eff}(\text{in vivo})$ のシミュレーション結果を縦軸に、その算出に用いた $P_{app}(\text{in vitro})$ を横軸にプロットした時、両パラメーターの関係は同様にプロットした文献報告値と一致

しており、 P_{app} から P_{eff} への変換式などの経験的な式を用いることなく、解剖学および生理学的パラメーターの積み上げでこれらの関係を表現できることが明らかとなった。

微絨毛による頂端膜表面積拡張の影響の感度分析による確認

小腸上皮細胞では微絨毛のため細胞の頂端膜側と基底膜側でその表面積が異なる。したがって TLM では、吸収上皮細胞の頂端膜と基底膜を区別して記述した。その時の頂端膜と基底膜の表面積の比を ME と定義し、本研究では文献情報に従って *in vivo* における値を 20 とした。しかし表面積の違いがどの程度、吸収性に影響しているか、実際には明らかになっていない。そこで ME が吸収動態に及ぼす影響を確認するために、ME を 1、5、および 20 とし、管腔内、細胞内および粘膜固有層内濃度に加え、FAFG のシミュレーションを行った。ME を増加させた時、薬物が速やかに吸収されることにより、管腔内の濃度は低下し、FAFG は増加することが明らかとなった(図 1-6A および D)。一方、上皮細胞中濃度および粘膜固有層濃度は、ME が 1 から 5 へ増加するとそれぞれ大きく増加したが、それ以上の ME の増加は濃度推移のパターンには影響を与えたものの、総曝露量として著しい影響は与えなかった(図 1-6B および C)。以上の結果、ME の値は、各シミュレーションの結果に一定の影響をあたえることが明らかとなり、*in vitro* および *in vivo* でそれぞれ適切な値を設定する必要があることが示唆された。

F_G および F の予測

TLM による消化管薬物吸収の予測性を確認することを目的として、CYP3A および P-gp

の基質である薬物の F_G および F の予測を行った。 F_G の予測結果を図 1-7A に、 F の予測結果を図 1-7B に示した。18 薬物の F_G を予測した結果、実測値の ± 0.3 および 2 倍の範囲内でそれぞれ 15 および 13 薬物を予測した。また AFE および RMSE はそれぞれ 0.96 および 0.24 であった。一方 F の予測では、17 薬物中、実測値の ± 0.3 および 2 倍の範囲内でそれぞれ 15 および 11 薬物を予測した。また AFE および RMSE はそれぞれ 1.2 および 0.15 であった。以上のことから TLM では、 F_G および F を予測値の真度および精度共に良好であることが明らかとなった。

非線形吸収動態の予測

高用量での投与などにより、小腸上皮細胞における薬物の濃度が CYP3A や P-gp の処理能力を超えると、投与量増加比以上の吸収量の増加、すなわち吸収の非線形動態が起こる。また、この非線形吸収動態が正確に予測できる場合、上皮細胞内薬物濃度が適切に予測されていることが間接的に示される。そこで CYP3A の基質である alprazolam、midazolam、P-gp の基質である digoxin、talinolol、CYP3A および P-gp 両方の基質である quinidine、verapamil の非線形吸収動態の予測性を確認するために、TLM によって予測した $F_A F_G$ と投与量との関係を図 1-8 に示した。その結果、CYP3A の基質では、in vitro と in vivo の CYP3A の発現量の補正をすることなく実測値と予測値が一致することが明らかとなった。また、P-gp の基質では、適切な psf を設定することで非線形性を説明することが可能であることが明らかとなった。さらに CYP3A4 と P-gp の両方の基質では、quinidine で高用量における $F_A F_G$ の過大評価が見られたものの、 $F_A F_G$ の増加する投与量

を含め良好な予測が可能であった。これらの結果より、TLM では非線形吸収動態を適切に予測可能であり、上皮細胞中濃度が適切に予測されていることが間接的に示された。

全身血漿中濃度推移の予測

吸収速度を含む、吸収過程全体を通して TLM が消化管吸収を適切に予測可能か確認するために、TLM を用いて、7 種の薬物の全身血漿中濃度推移を予測した(図 1-9)。ランダムに生成したパラメーターを用いて計算した 100 例の仮想被験者の血漿中濃度推移は、実測値と同様の範囲に分布しており、TLM を用いて吸収過程全体が良好に予測可能であることが明らかとなった。また、apprepitant および digoxin の実測値の分布が、本研究における各生理学的パラメーターのばらつきを考慮した解析結果と一致したことより、各パラメーターが TLM に適切に設定されていることが示唆された。

TLM の反復投与への適用

TLM は管腔内における薬物の MRT を考慮して薬物の移動を定義していることから、反復投与や薬物の移動速度の個人差などを表現することが可能である。この設定が適切に行われているか確認することを目的として、反復経口投与した時における消化管内における薬物の位置のシミュレーションを行った。位置関数および分布関数を、低膜透過性薬物の反復経口投与に適用した時の、消化管管腔内における薬物の位置(図 1-10A)、吸収部位における消化管管腔内濃度、吸収上皮細胞中濃度、および粘膜固有層中濃度(図 1-10B)の経時変化を算出した。その結果、投与を繰り返すことで各部位の濃度が増加し、さらに吸収

部位が小腸の入り口まで戻ることが確認された。以上の結果、管腔内における薬物の MRT を移動関数に導入することで、反復投与時の経時変化を表現可能であることが明らかとなった。

<考 察>

TLM は良好な消化管吸収動態予測を可能とするために、既存の多分割型モデルにおける問題点を改善することを目的として開発した。既存のモデルにおける問題点を解決するために、移動の記述に対する制限の少ない単純なモデル構造を有しながら、吸収に関連する主要な要因を適切に記述することで移動の正確な表現を達成し、解剖学的および生理学的に矛盾のない構造を有するモデルを構築することで基底膜側のモデル化を適切に行った。さらに医薬品開発の幅広いステージで適用可能な汎用性を有し、ヒトにおける消化管吸収動態を適切に予測できるモデルを構築することで多分割型モデルに代わるモデルとすることを目指した。

モデルの構築時には、毛細血管とその周囲を覆う粘膜固有層の間に瞬時平衡が成立すること、さらに全身の血液からの小腸を介したクリアランスがないことを仮定した。小腸における毛細血管が有孔血管であることから、少なくとも低分子～中分子薬物の毛細血管と粘膜固有層の間の出入りは容易であると考えられる。また、静脈内投与後の digoxin は、小腸への排泄量が大きくないことも報告されていることから、これらの仮定は妥当なものと考えた(Drescher et al., 2003)。

モデル構造の単純化のために、コンパートメント数を減少し、位置関数および分布関数を導入した。多分割型モデルでは、消化管を多数のコンパートメントに細分化することで、生理学的パラメーターや薬物動態関連タンパク質の位置依存性などを表現しているが(Yu and Amidon, 1999; Agoram, 2001; Jamei et al., 2009)、TLM では、3つのコンパートメントそれぞれに対して、各パラメーターを位置の関数として記述する事で、モデルを大幅

に単純化する事が可能となり、さらに、様々な投与条件に柔軟に対応することも同時に可能となった。図 1-10 の反復投与条件に加え、食事の影響によって胃排出時間(DeSesso and Williams, 2008)の低下した条件における吸収部位の位置および幅の計算を行った。その結果、吸収部位では絶食条件に比べ位置は小さく、幅は大きくなり投与後 2 時間においても、小腸のおよそ 3 分の 2 を吸収部位が覆うという結果が得られた。この結果は、Kimura らによって報告されている、食事下における消化管内におけるシンチグラフィー試薬投与試験の結果と比較して妥当な結果であった(Kumura and Higaki, 2002)。

上皮細胞の受動拡散による透過性のパラメーターは、多くの既存のモデルで P_{app} から経験的な式を用いて P_{eff} へ変換して用いられる(Yang et al., 2007; Badhan et al., 2009; Gertz et al., 2011)。これは、ヒトの空腸における薬物透過性から得た値であり、Caco-2 における P_{app} との相関関係を用いることで、近似曲線を用いた P_{app} から P_{eff} の見積もりが可能である(Sun et al., 2002)。しかしこの方法では、 P_{app} が pH の影響を受けることが明らかとなっているため(Neuhoff et al., 2003, 2005; Mitra et al., 2011)、pH の値の変化に対応できる経験的な近似式が必要である。TLM では、Caco-2 の透過性を直接使い、さらにこれに PE、VE および ME といった表面積拡張を考慮することで、in vitro の値より pH の違いを考慮した上で in vivo の P_{eff} の値へと積み上げ計算している。これにより、 P_{eff} を P_{app} から経験的手法を用いて直接外挿する場合に比べ、消化管の解剖学および生理学的要因の変化などの影響も考慮することも可能であり、複数の近似式を準備する必要が無い。また、TLM ではこの積み上げの結果が実際の in vitro と in vivo の関係に矛盾しないことが明らかとなった。

TLM を用いて、 F_G および F を予測したところ、いずれも良好な予測精度で予測可能であることが明らかとなった。この結果は、解析対象の薬物が異なるなど、解析上の制限はあるものの、OrBiTo により報告されている (Margolskee et al., 2017) 結果、17 薬物中、実測値の ± 0.3 および 2 倍の範囲内でそれぞれ 11 および 11 薬物を予測した結果と比較しても同等以上の予測精度であることが明らかとなった。また、真度のパラメーターとして用いた AFE は、多分割型モデルにおける結果と同等であった。

投与量と F_{AFG} の関係の予測結果は、CYP3A の基質に対しては、*in vitro* と *in vivo* 間の補正を用いていないことから、上皮細胞中濃度の予測を大きな矛盾なく行えている事を間接的に示した。現在、上皮細胞中濃度の動的な変化を直接測定する方法は無い。本研究による予測結果が正確であることを確認するためには、測定機器が利用可能になることが待たれる。また、P-gp 基質の非線形性予測に関しても、適切な psf の設定により良好な予測ができることが明らかとなったことから、P-gp の機能への影響と同様の現象で起こる、薬物相互作用の予測も TLM を用いて可能であることが示唆された。

本モデルの構築時には前述の 2 つの仮定の他に、非攪拌水相の厚さに *in vitro* と *in vivo* で差がない、また細胞間隙輸送を考慮しないなどとしている。TLM の $psf_{passive}$ において、薬物間でその値に最大 10 倍程度の差が観察されたことも、現時点では考慮していないこれらの機序が一部関与している可能性もあることから、今後、これらの機構は適切にモデルに組み込んでいくことが望ましい。また、digoxin の全身血漿中濃度推移の予測では、消失相が実測よりわずかに小さく、将来的にはこの原因と考えられる全身の血液からの小腸への薬物のクリアランスも考慮していく必要がある。

以上、本研究では、既存の生理学的消化管動態予測モデル、特に多分割型モデルにおける問題点の解決を目指し TLM を構築した。その結果、多分割型モデルにおける移動および基底膜側の記述の問題を解決し、さらに消化管における種々の吸収動態を適切に予測可能なモデルが構築できた。

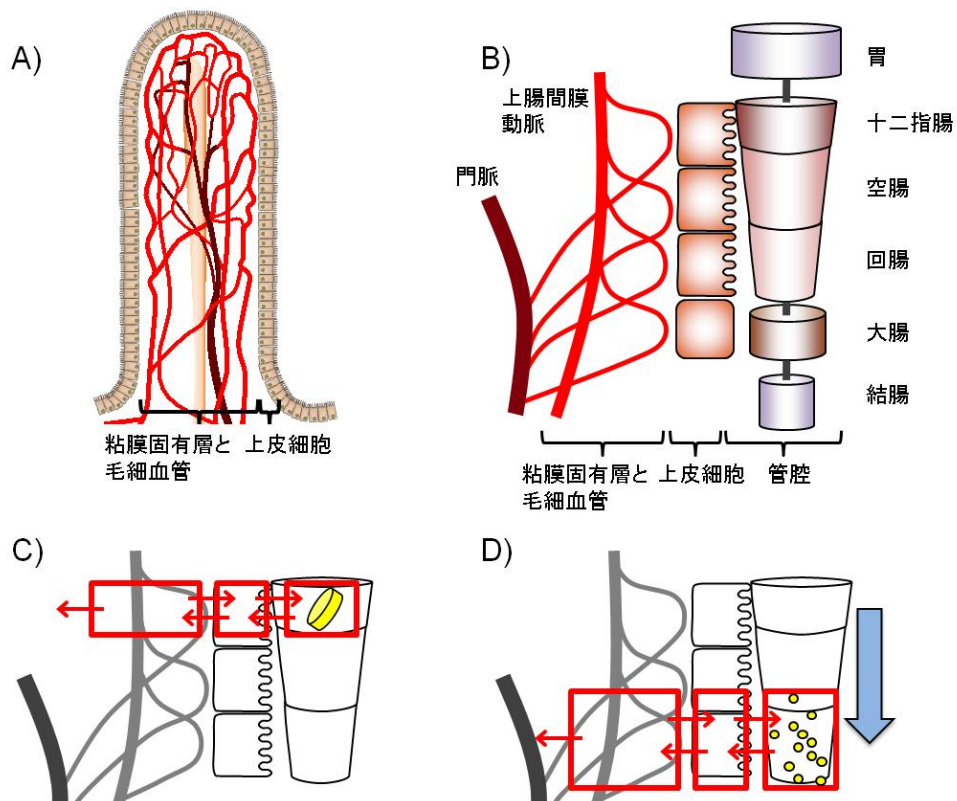


図 1-1. TLM の構造。(A) 絨毛の生理学的構造 (Lin et al., 1999)。(B) TLM で記述した消化管の構造。(C) 薬物が十二指腸到達直後の TLM における吸収部位の配置。図中で薬物は錠剤として存在。(D) 薬物が大腸に到達直後の TLM の吸収部位の配置。図中で薬物は崩壊過程を経て、粒子または溶液の状態が存在。TLM では吸収部位のコンパートメントが、経時的に C から D の位置へ移動する。

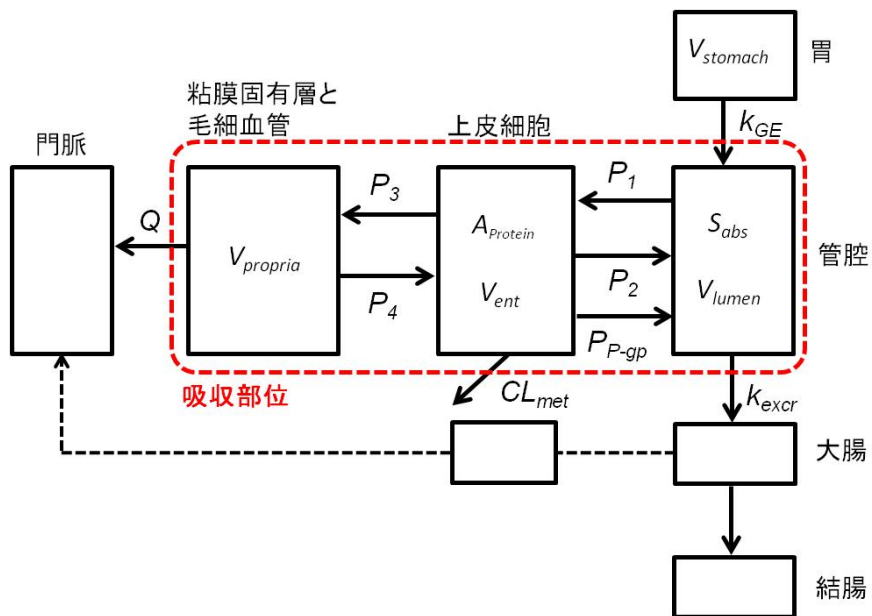


図 1-2. TLM のモデル構造。TLM において小腸管腔、上皮細胞、粘膜固有層のコンパートメントは経時的に小腸上部から下部へと移動する。ここで V は容積、 S は表面積、 A はタンパク量、 Q は血流量、 P は膜透過係数、 CL はクリアランス、 k は速度定数を表す。

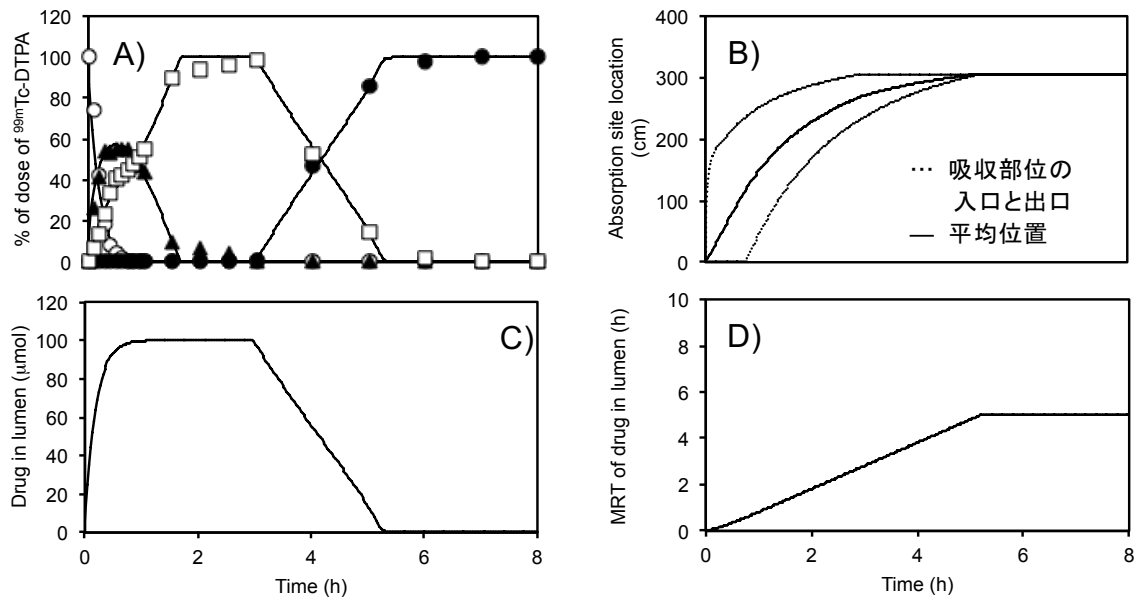


図 1-3. TLM に定義した時間依存的なパラメーター。A) $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ を経口投与した時の消化管各部位(○胃、▲空腸、□回腸、●大腸、-計算値)における放射活性の経時変化。実測値は Kimura らの報告値(Kimura and Higaki, 2002)。B) 位置(実線：平均、点線：吸収部位の入口と出口)。C) 小腸管腔内における薬物量。D) 非吸収性指標薬を単回経口投与した時の平均滞留時間(MRT)。

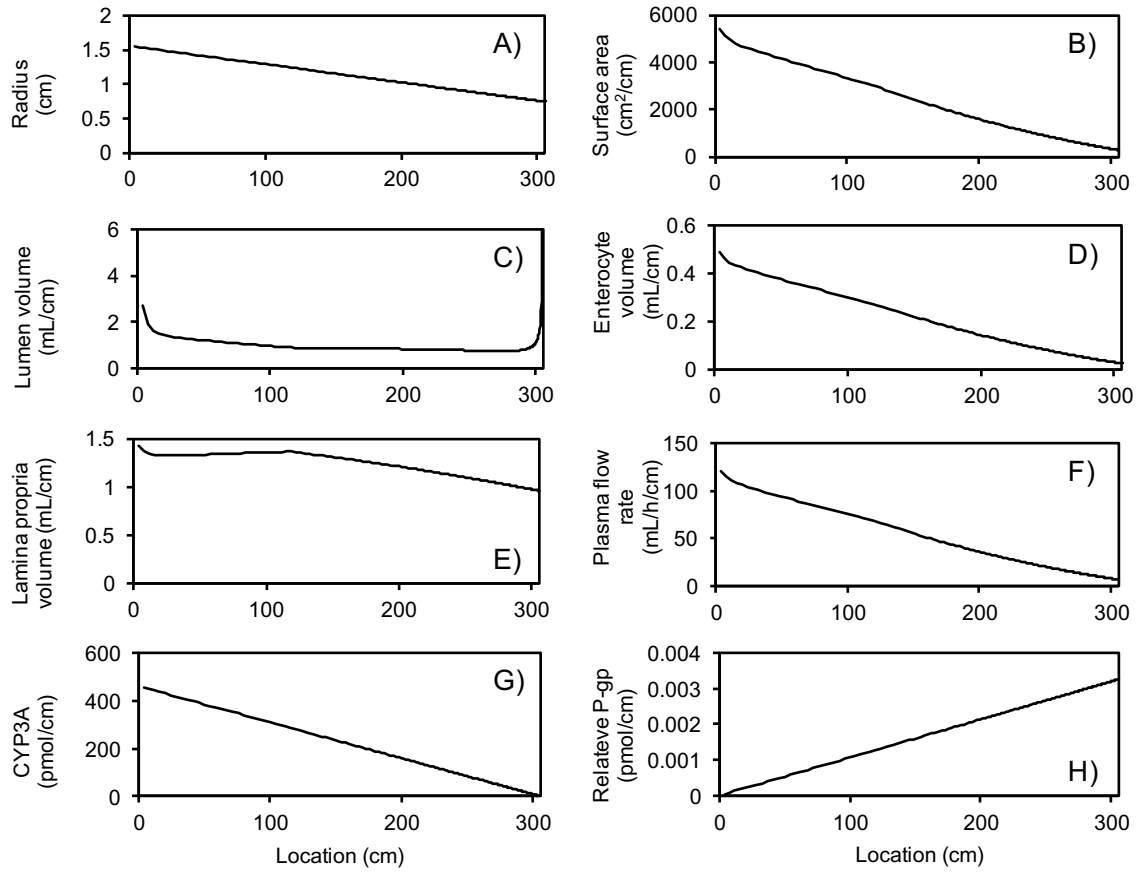


図 1-4. TLM に定義した位置依存的パラメーター。縦軸はそれぞれ A) 小腸管腔の半径；
 B) 管腔内頂端膜表面積；C) 小腸管腔内容積；D) 小腸上皮細胞容積；E) 粘膜固有層容積；
 F) 血漿流量；G) CYP3A 発現量；H) P-gp 相対発現量を表す。

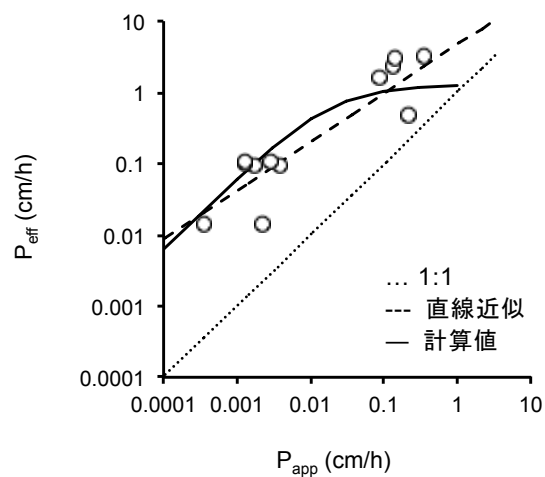


図 1-5. Caco-2 における見かけの膜透過係数(P_{app})と、*in vivo* 空腸透過係数(P_{eff})の関係。

○は受動拡散により輸送される薬物の文献値(Sun et al., 2002, 図より読み取った値)、実線はTLMにおいてLoc-I-Gutの実験条件を再現し計算した計算値。破線ならびに点線は、直線近似ならびに 1:1 の値を表す。

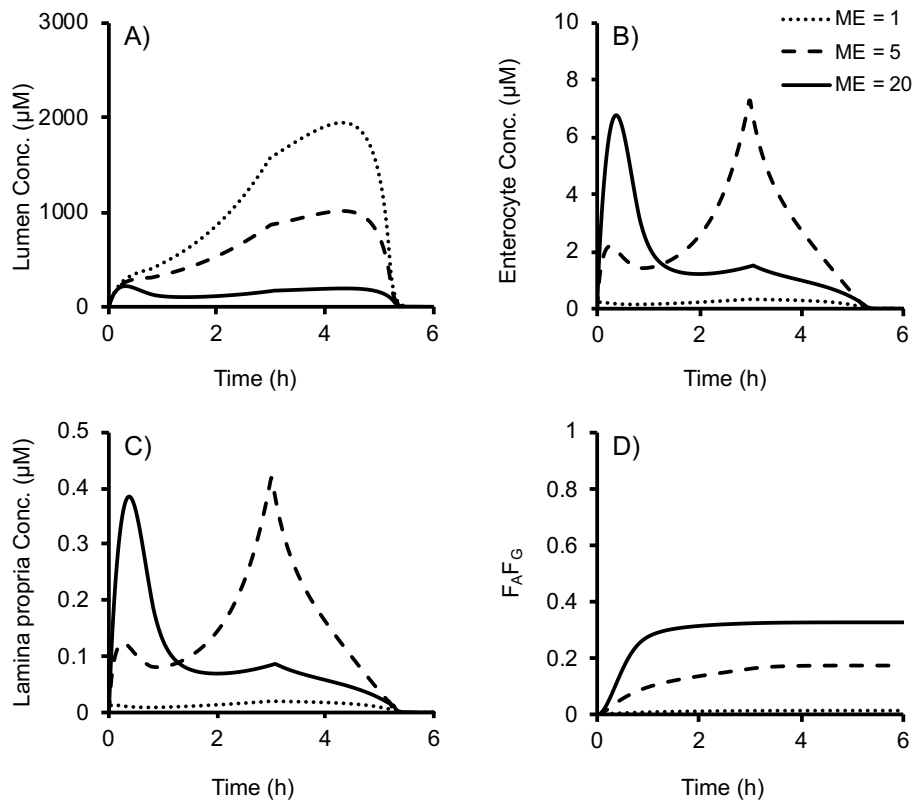


図 1-6. 微絨毛による表面積拡張(ME)の、小腸における薬物動態への影響。A) 管腔内濃度、B) 上皮細胞内濃度、C) 粘膜固有層内濃度、D) F_A/F_G への影響を表す。計算は verapamil を 40 mg 単回経口投与した時の計算結果。点線、破線、および実線はそれぞれ、ME とし て 1、5、および 20 を用いて計算した時の結果を表す。

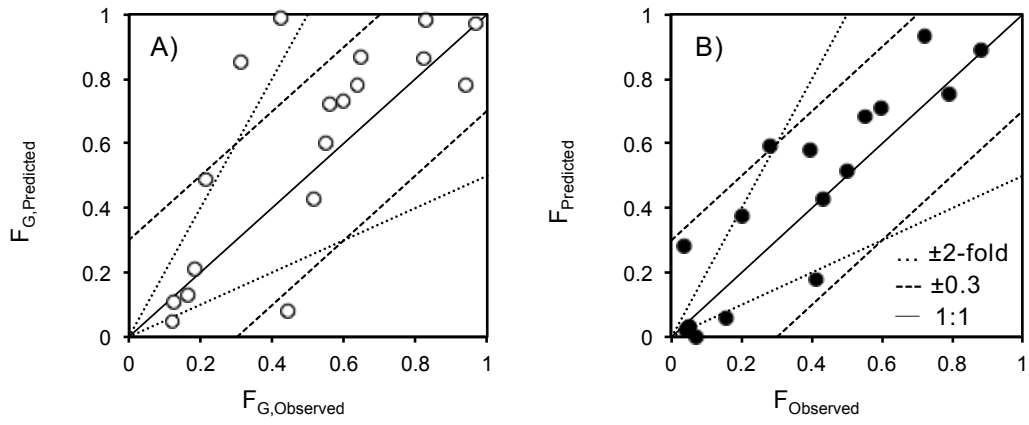


図 1-7. F_G および F の予測結果。A) F_G 、B) F 。実線は 1:1、破線は ± 0.3 、点線は ± 2 倍

を表す。また、○および●はそれぞれ実測値を表す。

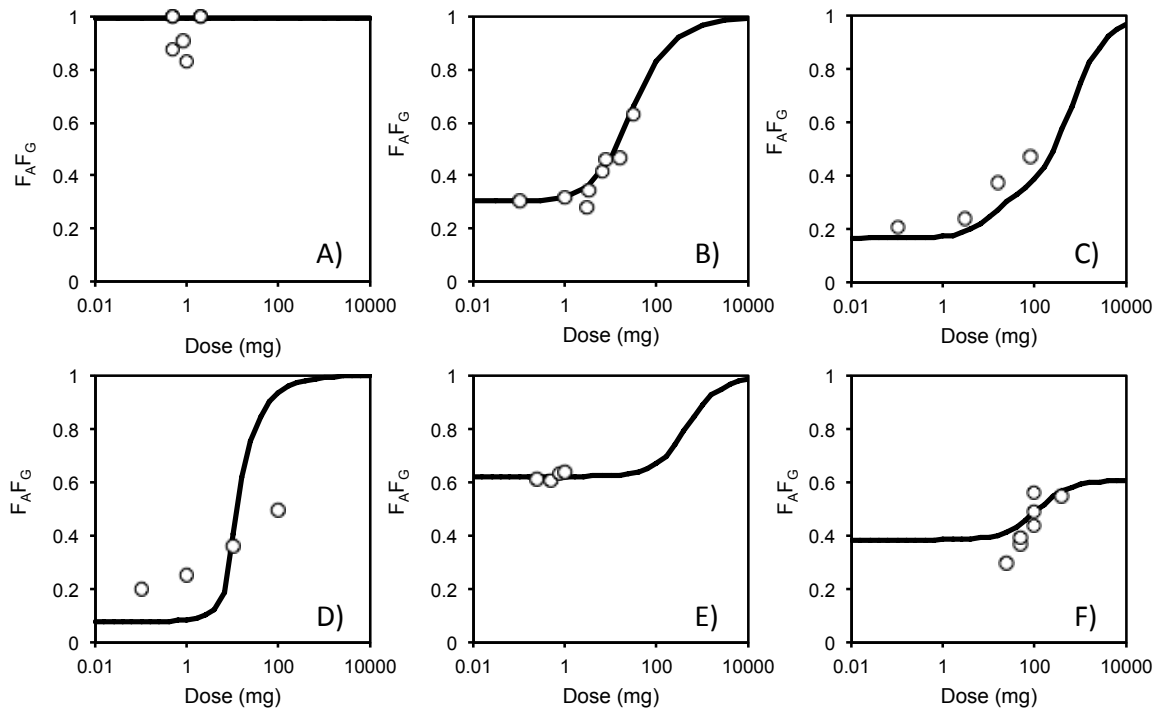


図 1-8. $F_A F_G$ と投与量の関係。実線は TLM による計算値、○は文献値を表す。

A) alprazolam、B) midazolam、C) verapamil、D) quinidine、E) digoxin、F) talinalolol。

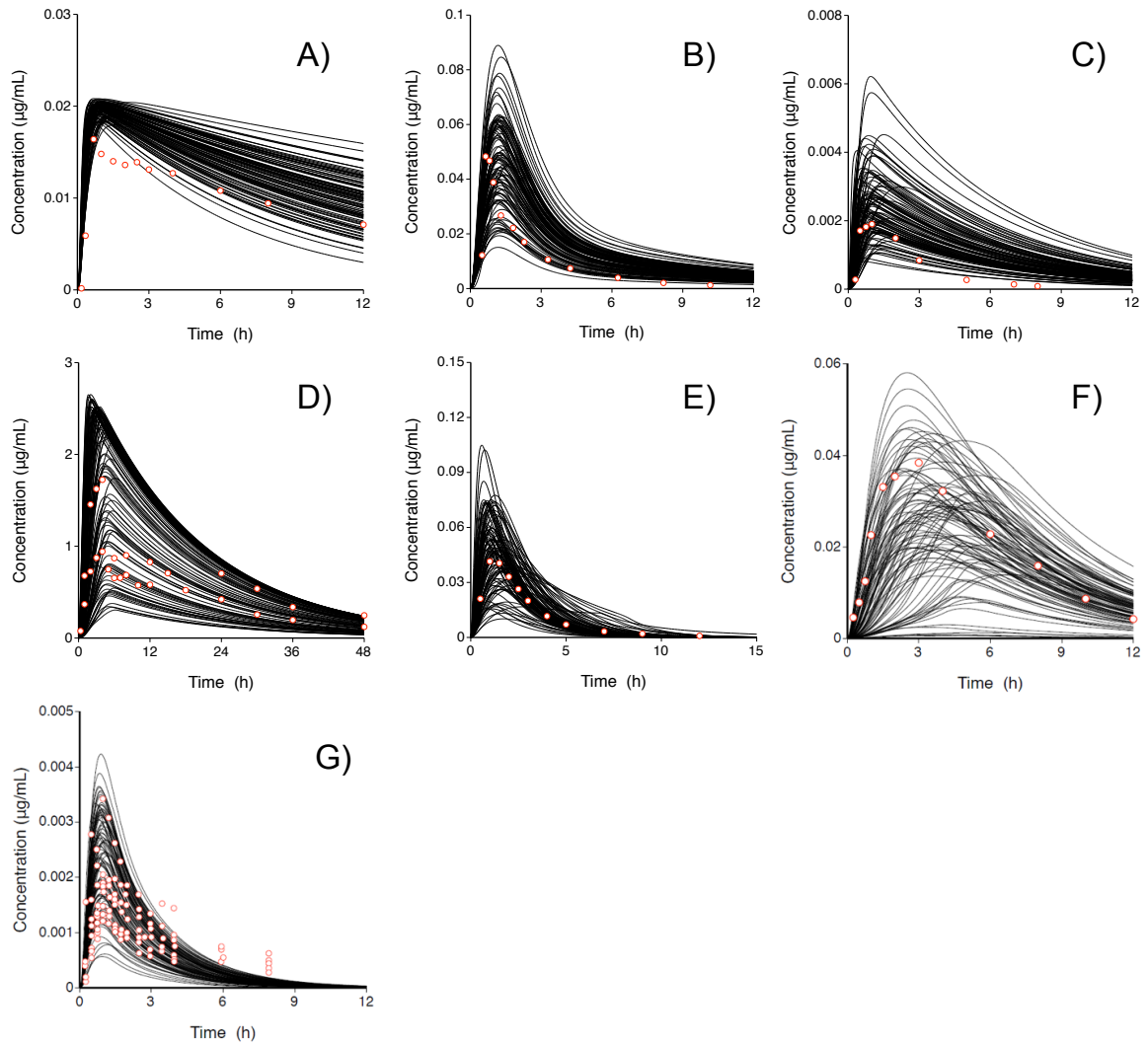


図 1-9. TLM を用いた全身血漿中濃度推移予測結果。実線が計算値、○が文献値を表す。

A) alprazolam、B) midazolam、C) buspirone、D) aprepitant、E) glyburide、F) verapamil、

G) digoxin をそれぞれ表す。CYP3A4 および P-gp の発現量、pH、血流量、胃排出時間を

報告のあるバラツキにしたがってランダムに 100 例分発生させ、仮想被験者の血漿中濃度

推移を予測した。全身コンパートメントを TLM に追加し解析を実施した。その際、全身

クリアランスと分布容積は、文献値へのフィッティングにより決定した。

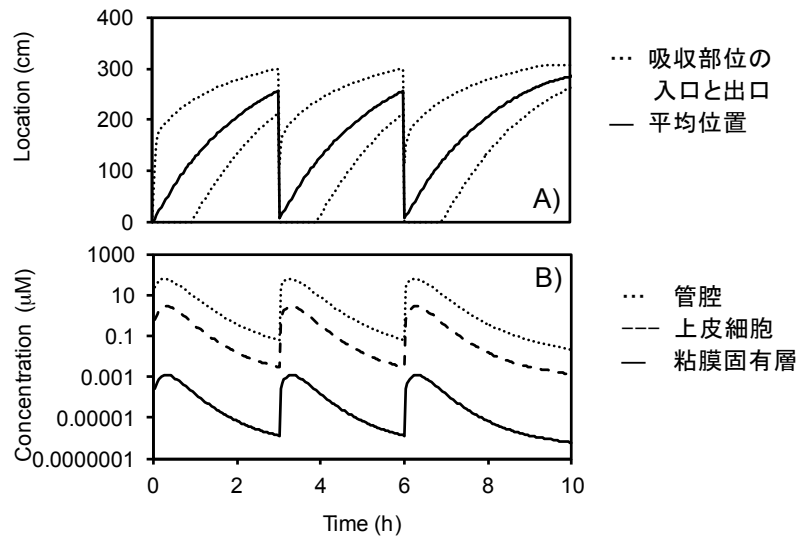


図 1-10. 反復投与時における吸収部位の移動および管腔内濃度の計算結果。A) 低吸収性薬物($P_{app} = 0.0007 \text{ cm/h}$)の吸収部位の位置(実線：平均、点線：吸収部位の入口と出口)の経時変化、B) 管腔内濃度(点線)、上皮細胞内濃度(破線)、粘膜固有層内濃度(実線)。

表 1-1. トランスロケーションモデルにおける解剖学的パラメーターの関数化に使用した
消化管各部位のサイズ

	Radius ^a	Length ^a	Volume ^a	Cumulative length	Note
	cm	cm	mL	cm	
Stomach	9.67	28.3 ^b	47	-	Stomach end
Duodenum	1.53	14.1	42	14.1	Duodenum end
Jejunum1	1.45	58.4	154	72.5	
Jejunum2	1.29	58.4	122	130.9	Jejunum end
Ileum1	1.13	58.4	94	189.3	
Ileum2	0.980	58.4	71	247.7	
Ileum3	0.820	58.4	49	306.1	Ileum end

^a GastroPlus™における値 (Bolger et al., 2009, Heikkinen et al., 2012)。

^b 胃の長さは TLM には使用していない。

表 1-2. $psf_{passive}$ の決定に使用した薬物のパラメーターとフィッティング計算の結果

Drugs	Caco-2 permeability ^a cm/h	F_A		$psf_{passive}$	
		Reported ^b	Estimated	Fitted	CV ($\times 10^{-7}\%$)
Acyclovir	0.000684	0.23	0.445	0.938	128
Atenolol	0.00178	0.50	0.276	4.91	413
Cimetidine	0.00745	0.68	0.929	0.919	87.7
Ciprofloxacin	0.0225	0.75	1.00	0.311	20.7
Enalaprilat	0.000184	0.25	0.390	1.27	545
Gabapentin	0.00167	0.60	0.487	3.09	213
Methotrexate	0.00114	0.70	0.956	0.884	409
Ranitidine	0.00587	0.65	0.680	2.05	8.96
Sulpiride	0.00118	0.44	0.205	5.74	41.5

Estimated は、各薬物の $psf_{passive}$ の算術平均値 2.23 を全薬物共通の $psf_{passive}$ として、各薬物の F_A を算出した結果を表す。

表 1-3. 薬物の吸収動態予測に用いた薬物固有のパラメーター

Drugs	Dose	K _{m,u}		V _{max}		P _{app,caco-2}	f _B	MW
		μM		mmol/h/pmol				
		μg	CYP3A	P-gp	CYP3A			
Alfentanil	3,010	23	NA	1.3	0	0.105	0.137	417
Alprazolam	400	270	NA	0.24	0	0.0918	0.341	309
Aprepitant	125,000	8.9	NA	0.11	NA	0.0283	0.083	534
Buspirone	1,600	8.0	NA	1.0	0	0.0914	0.062	386
Cisapride	7,500	3.2	NA	0.53	0	0.108	0.02	466
Cyclosporin	570,000	1.4	0.0567	0.033	1.38×10 ⁶	0.0286	0.014	1203
Digoxin	500	NA	73.6	NA	3.97×10 ⁸	0.0347	0.75	781
Felodipine	10,000	5.3	NA	7.5	0	0.0151	0.068	384
Glyburide	875	5.2	NA	0.48	NA	0.0904	0.018	494
Lovastatin	20,000	7.8	NA	23	0	0.0522	0.03	405
Midazolam	3,000	3.31	NA	1.35	0	0.117	0.056	326
Nifedipine	10,000	11	NA	1.45	0	0.0846	0.066	346
Nisoldipine	5,000	2.1	NA	9.66	0	0.0720	0.003	388
Quinidine	200,000	4.0	0.348	0.00766	5.11×10 ⁶	0.0491	0.299	325
Repaglinide	250	16	NA	0.442	0	0.0868	0.025	453
Rifabutin	150,000	11	NA	0.338	0	0.0342	0.483	847
Saquinavir	1,000,000	0.30	0.863	1.09	2.47×10 ⁶	0.0497	0.038	671
Sildenafil	25,000	15	NA	1.01	0	0.0922	0.063	475
Simvastatin	40,000	3.4	NA	14.2	0	0.0245	0.025	419
Talinolol	100,000	NA	17.2	NA	1.37×10 ⁶	0.00525	0.39	363
Trazodone	75,000	312	NA	4.41	0	0.0871	0.07	372
Triazolam	250	85.1	NA	0.261	0	0.101	0.161	343

Verapamil	40,000	49	0.622	6.92	3.65×10^6	0.0516	0.104	455
Zolpidem	5,000	140	NA	0.185	0	0.115	0.105	307

NA: Not available.

表 1-4. F_G および F の実測値および予測結果

Drugs	F_G		$CL_{int,HLM}$ μL/min/pmol	$F_{H,in vitro}$	F	
	Predicted	Reported			Predicted	Observed
Alfentanil	0.72	0.56	0.945	0.598	0.429	0.43
Alprazolam	0.98	0.97	0.0520	0.915	0.888	0.88
Buspirone	0.49	0.22	2.35	0.570	0.279	0.04
Cisapride	0.60	0.55	2.32	0.806	0.482	NA
Cyclosporin	0.99	0.42	0.582	0.959	0.589	0.28
Felodipine	0.08	0.44	8.61	0.768	0.0611	0.16
Lovastatin	0.11	0.13	18.8	0.255	0.0286	0.05
Midazolam	0.43	0.51	4.97	0.407	0.177	0.41
Nifedipine	0.73	0.60	1.25	0.701	0.513	0.50
Nisoldipine	0.13	0.12	53.1	0.469	0.0218	0.04
Repaglinide	0.78	0.94	0.737	0.913	0.708	0.60
Rifabutin	0.85	0.31	0.514	0.436	0.371	0.20
Saquinavir	0.21	0.19	35.3	0.126	0.00129	0.07
Sildenafil	0.78	0.64	1.07	0.742	0.580	0.40
Simvastatin	0.13	0.17	27.2	0.223	0.0290	0.05
Trazodone	0.86	0.83	0.370	0.881	0.756	0.79
Triazolam	0.87	0.65	0.330	0.783	0.684	0.55
Zolpidem	0.98	0.83	0.0850	0.956	0.932	0.72

NA: Not available.

表 1-5. TLM の生理学および解剖学的パラメーターを定義する関数

Category	Parameters	Equations
Physical	pH_{lumen}	$pH_{lumen} = pH_{ini} + pH_{grad} \cdot L_{si} \frac{z_c}{L_{si}}$
	r	$r = r_{ini} - r_{grad} \cdot z_c$
	$S_{abs,api}$	$S_{abs,bas} = \pi (r_{in} + r_{out}) \sqrt{(r_{in} - r_{out})^2 + L_{abs}^2} \times PE \times VE_{abs} \times ME$
	V_{lumen}	$V_{lumen,abs} = \frac{L_{abs}}{L_{all}} V_{cont} + V_{water,ini} e^{-\ln(2)t/HLw}$
	V_{ent}	$V_{ent,abs} = S_{abs,bas} \cdot T_{ent}$
	$V_{propria}$	$V_{propria,abs} = \frac{S_{abs,bas} \cdot H_{villi}}{VE_{abs}} - V_{ent,abs}$
Protein expression	Q	$Q_{plasma,abs} = (1 - Ht) Q_{blood,enterocyte} \frac{S_{abs,api}}{S_{si}}$
	A_{CYP3A}	$A_{CYP3A,abs} = 2 A_{CYP3A,total} \left(1 - \frac{z_c}{L_{si}} \right) \frac{L_{abs}}{L_{si}}$
	A_{pgp}	$A_{rel,Pgp,abs} = \left(A_{init,Pgp} + A_{grad,Pgp} \frac{z_c}{L_{si}} \right) \frac{L_{abs}}{L_{si}}$
Permeability	P_1	$P_1 = P_{S,in vivo} \times \frac{1 + 10^{pH_{Caco-2} - pKa_{acid}} + 10^{pKa_{base} - pH_{Caco-2}}}{1 + 10^{pH_{lumen} - pKa_{acid}} + 10^{pKa_{base} - pH_{lumen}}}$
	$P_2 \sim P_4$	$P_{S,in vivo} = P_2 = P_3 = P_4 = P_{S,Caco-2} \times psf_{passive}$

第三章 P 糖タンパク質を介した薬物相互作用の

予測フレームワークの開発

<要 約>

上皮細胞内における P-gp の異物排出機能が併用薬などにより阻害された場合、血液に流入する薬物量が増加する DDI が起こる。現在、DDI ガイドラインにおいて(MHLW, 2018)、P-gp 基質の臨床 DDI 試験実施の要否に対する基準パラメーターとして用いられている ER は、試験条件間で変動が大きいことが明らかとなっていることから(Kamiyama et al., 2009; Troutman and Thakker, 2003; Zhang et al., 2003)、この基準による臨床 DDI 試験要否の判断では、false positive を防ぐことに注目するあまりに本来、臨床 DDI 試験を実施する必要の無い薬物に対してもその実施を求めることによる、倫理的、開発効率的に意義の乏しい試験が増えるリスクがある。そこで本研究では、ER に代わる P-gp を介した DDI の基準の策定法を検討した。

ER の問題は、ER が膜透過性、P-gp の活性、ならびに試験条件の違いを含むハイブリッドなパラメーターであることと考えた。したがって新しい基準には消化管吸収の素過程を表すパラメーターを用いることが望ましいと考えられた。新しい基準に用いるパラメーターの探索を行うに際し、探索のために必要な P-gp 基質薬の情報が少ないといった問題があることが明らかになったことから、解析に必要な薬物数を補うため、仮想薬物をランダムに発生させることとした。

仮想薬物をランダムに発生させるためのパラメーターが、妥当あることを確認するため

に、一般に知られている、肝固有クリアランスと $F_A F_G$ のシグモイド型の相関、ならびに P_{app} と F_A の相関を TLM で再現可能か確認した。その結果、肝固有クリアランスと $F_A F_G$ の関係、ならびに P_{app} と F_A の関係において、仮想薬物の分布は実在薬物の分布をよく反映していることが確認でき、パラメーターセットが妥当あることが確認された。

次に P-gp を完全阻害した時における F_A の増加率(F_A 増加率)と ER の関係について考察した。基準薬にはジゴキシシンを用いて解析を行った。その結果、ジゴキシシンの ER の最大値と最小値、64 および 3.0 となる時の psf を仮想薬物に用いて ER を算出したとき、いずれの場合においても false negative が存在することが明らかとなり、DDI リスクの基準パラメーターとしては不十分であることが示唆された。

そこで ER に変わる新しいパラメーターの探索を行った。その結果 P-gp による排出クリアランス(CL_{eff})と、in vitro と in vivo における頂端膜側の pH を補正した膜透過性(P_u)の比である CL_{eff}/P_u が F_A 増加率と良く相関することが明らかとなった。このパラメーターでは、ER に比べ DDI リスクの false negative をなくした上で、false positive を増やさないと明らかとなった。

以上により、DDI リスクの見逃しを無くした上で、倫理的および開発効率的に意義の乏しい臨床試験を防ぐことが可能な、ER に代わる DDI リスク判定パラメーターを提唱した。

< 緒 言 >

P-gp は、消化管では小腸から大腸にかけて発現し、薬物の消化管吸収において上皮細胞から消化管管腔への排出に関与するトランスポーターとして、消化管におけるその発現の分布を含め良く研究されている(Englund et al., 2006; Bruyere et al., 2010)。P-gp の阻害薬との併用は、P-gp 基質薬の消化管吸収を増加させる DDI を起こすという報告がなされている(Fenner et al., 2009; Shimizu et al., 2006; Umeyama et al., 2014)。したがって創薬の早期の段階でヒトにおける P-gp の影響や DDI リスクを小さくすることは重要である。

最近、DDI に関連する規制文書が European Medicines Agency (EMA)より発出され、続いて草案として US Food and Drug Administration (FDA)および Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)より同様の文書が発出されている。これらの文書では、P-gp を介した DDI の重要性を記しており、必要に応じて *in vitro* や *in vivo* 試験により DDI リスク評価をすることを推奨している。

種々の報告や規制当局の注意喚起により P-gp による薬物の輸送評価の重要性が認識されているにも関わらず、*in vitro* の情報から臨床における DDI リスクを判断するための明快な基準は十分に研究されているとは言い難い。より倫理的および開発効率的に意義のある臨床試験を実施するためには、DDI リスク判定は、まず簡易的な基準による一次スクリーニングと、次に PBPK モデルなどを用いた医薬品候補化合物のより定量的かつ精密な DDI 予測による二次スクリーニングが行われるべきである。現在の DDI ガイドラインでは ER が 2 を上回り、さらに選択的阻害剤を用いた試験により、P-gp の基質であること

が確定した全ての薬物に対して臨床 DDI 試験を検討することとしている。ところが ER は試験条件によって報告されている値に大きな差があり、この絶対値を用いた臨床 DDI 試験実施の要否の判断を行う場合、DDI の有無について誤った判断がなされる可能性がある。一方、DDI ガイドラインでは、適切なリファレンス薬を用いることを許している。しかしその試験条件、比較法などは示されておらず、その有用性は明らかでない。医薬品候補化合物の ER が 2 を上回り、P-gp の基質であると認められた場合、臨床 DDI 試験実施の要否を判断するために、PBPK モデルを用いたより高度な解析を行うことが考えられるが、現在、PBPK モデルを用いた P-gp 基質薬の DDI 予測は、SimCYP®を用いた digoxin の DDI の報告があるが(Neuhoff et al., 2013)、モデルの記述を含めた詳細な解析法の報告はこれに限られており、その汎用性は不明である。したがって現状では、ER が 2 を超えた P-gp の基質薬物のほぼ全てに対して臨床 DDI 試験を実際に実施する必要がある、意義の乏しい臨床試験が増加するリスクがある。したがって、一次スクリーニングにおいてより正確な DDI リスク評価を可能とするために、ER に代わる DDI リスク判定のための基準パラメーターが必要であると考えた。

ここで ER の問題点を考えたとき、ER が膜透過性、P-gp の活性、ならびに試験条件等を含むハイブリッドなパラメーターであることが問題であると考えられた。ER がハイブリッドなパラメーターである限り、算出された数値を吸収メカニズムに基づいて比較をすることができないことに加え、算出された数値そのものに意味はないことから、絶対値の大小から DDI リスクを判定することは困難である。さらに創薬の探索段階における化合物の DDI リスク判定を行うことでその原因を明らかにし、問題を解決するための新たな

候補化合物の合成展開を考案するなどを行うこともできない。したがって DDI リスク判定パラメーターに吸収の素過程を表し、個々のパラメーターの値の影響を考察できるパラメーターを用いることが望ましい。そこで上記の条件を満たすパラメーターを探索することとした。

新しい基準に用いるパラメーターの探索を行うに際し、探索のために必要な P-gp 基質薬の情報が少ないといった問題がある。P-gp を介した DDI の情報は、特に DDI 試験の基質として推奨されている digoxin や fexofenadine など豊富であるが(Fenner et al., 2009; Umeyama et al., 2014; Shimizu et al., 2006)、新しい基準を探索するためには、多種に渡る物性を有する薬物の多数の情報が必須であり、現存する薬物のみでは DDI リスク判定の一般則を見いだすのは困難であると考えた。そこでまず、解析に必要な薬物数を補うため、モンテカルロ法により P-gp の基質である仮想薬物を発生させることを考えた。発生させた仮想薬物は、その基本的な吸収動態関連パラメーターを算出後、対応する実在薬物のパラメーターを比較することにより、仮想薬物が実在薬物の特徴を反映しているか確認した後、仮想薬物の ER を算出する。その ER を、同様に P-gp 完全阻害条件下において PBPK モデルによって算出された仮想薬物の DDI の程度と比較することにより、DDI リスク判定能力の評価を行う。その後、新しいパラメーターの探索を行い、見出された新しいパラメーターと ER との比較をした後に、新しいパラメーターの使用法と期待される効果の確認を行うといった手順で解析を実施することとした。仮想薬物における種々のパラメーターと DDI の関係の計算には、DDI と同様のメカニズムで起こる吸収過程の非線形性を正確に予測可能であることが前章において明らかとなった TLM を用いた。

本研究では、ERにおける問題点を解決したDDIリスク判定のためのパラメーターを探
索し、より安全で効率的な医薬品開発を行うための基盤を構築することを目的として行っ
た。

<方 法>

1. データ収集および仮想薬物の発生

本研究に用いた仮想薬物発生のためのパラメーターを表 2-1 に示した。パラメーターは、文献より収集した値の平均値と CV を用いた(Ando et al., 2015; Sun et al., 2002)。これらを用いて、仮想薬物のパラメーターとして、Caco-2 における見かけの膜透過係数(P_{app})、 pK_a 、血中非結合型分率(f_B)、CYP3A および P-gp への親和性($K_{m,CYP}$ および $K_{m,P-gp}$)、および CYP3A の最大反応速度($V_{max,CYP}$)を 100 薬物分発生させた。なお乱数は対数正規分布にしたがって発生させた。

2. 解析に使用したモデルと解析条件

TLM を用いた。本研究における解析では、すべて溶液状態での投与を仮定して行った。また DDI リスク判定における過小評価を避けるために、低投与量(100 μg)で解析を実施した。 $F_A F_G$ の投与量に対する関係を確認したところ、本試験において発生させた仮想薬物においては 100 μg において非線形性を示す濃度域に達しておらず、溶解度の低い薬物を固体投与しても DDI リスクの過小評価が起きないと判断した。

3. 薬物速度論的パラメーター($F_A F_G$ および F_A)の算出

TLM による $F_A F_G$ の予測値は、TLM における計算において門脈へ移行した薬物の累積量($A_{portalvein,cumulative}$)を投与量(Dose)で除することにより算出した(式 2-1)。 F_A の予測値は、大腸からの吸収は起こらないと仮定し、未吸収のまま大腸に到達した薬物量

($A_{\text{rectum,cumulative}}$)を投与量で除した値を 1 から減じた値として算出した(式 2-2)。

$$F_A F_{G,\text{predicted}} = \frac{A_{\text{portalvein,cumulative}}}{\text{Dose}} \quad (2-1)$$

$$F_A = 1 - \frac{A_{\text{rectum,cumulative}}}{\text{Dose}} \quad (2-2)$$

4. $F_A F_G$ と肝固有クリアランス(CL_{int})、 F_A と P_{app} の比較

ランダムに発生させたパラメーターより得られた仮想薬物の吸収動態が、実在薬物と異なることを確認することを目的として、一般的に知られている $F_A F_G$ と in vitro 肝固有クリアランス(CL_{int})の関係(図 2-1A)、および F_A と P_{app} の関係(図 2-1B)を、仮想薬物と実在薬物で比較した。 CL_{int} は、TLMに入力した $V_{\text{max,CYP}}$ を K_{mCYP} で除した上で、適切に単位変換(69.7 pmol CYP3A/mg protein; Paine et al., 1997: 822.4 mg protein/kg body weight; Ring et al., 2011)を行うことにより算出した。 $F_A F_G$ と CL_{int} の関係では、CYP3Aの基質であり P-gpの基質でない仮想薬物 100 例を用いた。一方、 F_A と P_{app} の関係では CYP3Aの基質 100 例および基質でないもの 100 例に対し、それぞれ $V_{\text{max,P-gp}} \times \text{psf}$ として $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7 \mu\text{g/h/pmol}$ の範囲で公比 10 の 5 点を設定し、仮想薬物における値とした(計 1000 例)。

5. F_A 増加率の算出

本研究では、P-gpの機能が相互作用薬などの併用により完全に阻害された状況におけ

る F_A の増加を F_A 増加率とし、実在薬物と仮想薬物のそれぞれに対して以下の方法で算出した。

実在薬物

実在薬物の F_A 増加率は、腎排泄における $P\cdot gp$ の寄与およびその DDI を考慮して、全身血中濃度-時間曲線下面積(AUC)の DDI による増加率の情報のある薬物のものを算出した。算出に用いた計算式は以下の通りである。本解析に使用した薬物では F_G の寄与はいずれも小さいことから、本解析では、 $F_A F_G$ の増加率を F_A の増加率として扱った。

$$\frac{AUC_i}{AUC} = \frac{CL_h + CL_r}{CL_{h,i} + CL_{r,i}} \times \frac{F_A F_{G,i}}{F_A F_G} \quad (2-3)$$

ここで各パラメーターの下付きの i は阻害剤併用時であることを表す。 CL_h および CL_r はそれぞれ肝クリアランスおよび腎クリアランスを表す。

仮想薬物

仮想薬物の F_A 増加率は TLM を用いて計算した F_A より算出した。 $P\cdot gp$ の V_{max} ($V_{max,P\cdot gp} \times psf$) として各仮想薬物固有の値、もしくは $0 \mu g/h/pmol$ を用いてそれぞれ F_A または $F_{A,i}$ を算出し、その比($F_{A,i} / F_A$)を F_A 増加比とした。解析には、 $V_{max,CYP3A}$ が仮想薬物固有の値、もしくは 0 であるものの計 1000 例を解析に使用した。

6. 仮想薬物の Efflux Ratio (ER)の算出

仮想薬物の ER は、Tachibana らによって報告されている(Tachibana et al., 2011)頂端膜から基底膜方向の見かけの膜透過係数($P_{app,AB}$)とその逆方向の膜透過係数($P_{app,BA}$)の式が、非線形性パラメーターである $V_{max,P-gp}$ および $K_{m,P-gp}$ を、細胞内濃度を考慮して設定可能であるため、これを Caco-2 細胞の頂端膜と基底膜の表面積の違い(ME)を考慮することとで改変し、 $P_{app,BA}$ (式 2-4)と $P_{app,AB}$ (式 2-5)の比($P_{app,BA} / P_{app,AB}$)として算出した。

$$P_{app,BA} = P_s - \frac{1}{2(1+ME)S \cdot C_b} \left[P_s S \{C_b - (1+ME)K_{m,P-gp}\} - V_{max,P-gp} + \sqrt{P_s S \{C_b - (1+ME)K_{m,P-gp}\} - V_{max,P-gp}}^2 + 4(1+ME)(P_s S)^2 K_{m,P-gp} C_b \right] \quad (2-4)$$

$$P_{app,AB} = \frac{1}{2(1+ME)S \cdot C_a} \left[P_s S \{ME(C_a - K_{m,P-gp}) - K_{m,P-gp}\} - V_{max,P-gp} + \sqrt{P_s S \{ME(C_a - K_{m,P-gp}) - K_{m,P-gp}\} - V_{max,P-gp}}^2 + 4ME(1+ME)(P_s S)^2 K_{m,P-gp} C_a \right] \quad (2-5)$$

ここで C_a は Caco-2 を用いた経細胞輸送試験における頂端膜側のチャンバー内薬物濃度、 C_b は基底膜側のチャンバー内薬物濃度を、 S は表面積、 P_s は受動拡散による一枚膜膜透過係数を表す。本計算時には、digoxin の ER が文献報告のある最大値 64(図 2-2A)および最小値 3(図 2-2B)となる psf を使用し、式 2-4 および式 2-5 の $V_{max,P-gp}$ に psf を乗じ、2種の散布図を作成した。

7. 排出クリアランス(CL_{eff})の算出

実在薬物

P_s および $K_{m,P-gp}$ は Caco-2 による経細胞輸送試験の結果の文献値より式 1-33 を用いて決定した。 $V_{\text{max},P-gp}$ は、解析対象の薬物の *in vivo* における $V_{\text{max},P-gp} \times \text{psf}$ を、 F_A の実測値がシミュレーションの結果に合うように設定した。この $V_{\text{max},P-gp} \times \text{psf}$ を $K_{m,P-gp}$ で除することにより CL_{eff} を算出した。

仮想薬物

1000 例分の仮想薬物の $V_{\text{max},P-gp} \times \text{psf}$ を $K_{m,P-gp}$ でそれぞれ除することにより CL_{eff} を算出した。

8. *in vitro* と *in vivo* における pH の補正係数(R_{HH})および R_{HH} を考慮した膜透過係数(P_u)の算出

Caco-2 を用いた経細胞輸送試験は、通常、頂端膜側ならびに基底膜側の緩衝液には pH7.4 の緩衝液を用いて試験を行う。一方、実際の小腸における pH は、より低いことが明らかとなっている(Desesso and Williams., 2008)。解離型の薬物が膜を透過しないと仮定したとき、薬物の pK_a によっては、異なる pH となる *in vitro* と *in vivo* の環境において、解離型と非解離型薬物の存在する割合が異なることにより、上皮細胞頂端膜における細胞内への受動輸送による透過性が、*in vitro* と *in vivo* において異なるといった結果が

起こると考えられる。したがって、これらの乖離の補正を管腔から細胞内への膜透過係数に対して行った。式 2-6 では、Henderson-Hasselbalch の式より導いた小腸における非解離型薬物の割合を、Caco-2 における非解離型薬物の割合で除することにより R_{HH} を定義した。本研究では、新しい DDI リスク判定パラメーター算出時の消化管側の pH(pH_{lumen}) を 6.8、Caco-2 試験における pH は 7.4 とした。この pH は、Caco-2 の実際の試験条件に合わせる必要がある。

$$R_{HH} = \frac{1 + 10^{pH_{Caco-2} - pK_{a_{acid}}} + 10^{pK_{a_{base}} - pH_{Caco-2}}}{1 + 10^{pH_{lumen} - pK_{a_{acid}}} + 10^{pK_{a_{base}} - pH_{lumen}}} \quad (2-6)$$

続いて膜透過係数に対する R_{HH} による補正を行った。 P_{app} より微絨毛による頂端膜の表面積拡張(ME)を考慮し算出される一枚膜透過係数に R_{HH} を乗ずることで in vitro と in vivo における pH の違いを考慮した膜透過係数 P_u とした(式 2-7)。

$$P_u = \frac{1 + ME}{ME} \times R_{HH} \times P_{app} \quad (2-7)$$

9. 数値計算の方法とプログラム

本研究の数値計算は、薬物動態解析プログラム Napp の Runge-Kutta-Fehlberg 法を用いて行った(Hisaka and Sugiyama, 1998)。乱数発生にも本プログラムを使用した。

< 結 果 >

仮想薬物と実在薬物の比較

ランダムに発生させた仮想薬物が、実在薬物の有する薬物動態的特徴を再現し、消化管吸収における DDI の解析を行う上で適切なものとなっているか確認した。まず、Kato や Kadono らによって報告(Kato et al., 2003; Kadono et al., 2010)されている $F_A F_G$ と肝固有クリアランス(CL_{int})との関係を確認した(図 2-1A)。この比較では、CYP3A の基質であり、P-gp の基質でない 100 の仮想薬物について比較を行った。さらに一般的に知られている F_A と P_{app} との関係と同様に散布図にプロットすることで確認した(図 2-1B)。この比較には、CYP3A および P-gp 両方の基質として発生させた 1000 の仮想薬物の値を示した。その結果、いずれの仮想薬物と実在薬物の関係もよく一致しており、本研究において発生させた仮想薬物を表すパラメーターがこの後の解析に使用可能であると考えた。

仮想薬物の ER の算出と、その値による F_A 増加リスク判定

仮想薬物の ER を算出し、 F_A 増加率との関係を確認した(図 2-2)。ここで前述の通り、ER は細胞の継代数や pH など、試験条件で大きく値が変動する。そのため解析に使用する仮想薬物の ER は、これらの変動を考慮した値とすべきである。したがって文献報告にある digoxin の ER の最大値 64(図 2-2A)および最小値 3(図 2-2B)となる時の psf をそれぞれ設定し、各条件における ER を算出し、それらと F_A 増加率との関係を確認した。また、作成した散布図には digoxin の実測値も同時にプロットした。その結果、いずれの ER を用いた場合においても、ER と F_A 増加率の間には相関は観察されなかった。DDI ガイド

ラインにおける DDI リスク判定の基準である $ER = 2$ を同様にプロットし、 ER によるリスク判定の有用性を確認した。その結果、digoxin の ER が 3 および 64 のいずれの値になる時も、 ER による DDI リスク判定では false negative の判定が起こることが明らかとなった。

ER に代わる新しい DDI リスク判定パラメーターの探索

ER が DDI リスク判定において false negative を起こすことが明らかとなったため、 ER に代わるパラメーターの探索を行った。 ER に代わるパラメーターは、TLM に入力する種々の仮想薬物固有のパラメーターと、 F_A 増加率を比較することで行った。その結果、 CL_{eff} および P_u についてのみ、 F_A 増加率とわずかに相関傾向を示すことが明らかとなった。 CL_{eff} と P_u の相関がそれぞれ正負逆方向への相関であったため、 CL_{eff} を P_u で除することにより、より良好な相関が得られるものと考え、 CL_{eff}/P_u を新しい DDI リスク判定パラメーターとして考案した。 CL_{eff}/P_u と F_A 増加率の関係を確認したところ(図 2-3)、正の相関が観察され、またその程度は個別のパラメーターにおけるものよりも良好であった。この関係が、実在薬物の DDI の報告値と比べ矛盾が無いことを確認するために、P-gp 阻害を介した DDI の報告があり、TLM によって、in vivo の CL_{eff}/P_u を算出可能な digoxin、fexofenadine、talinalol の結果を同図にプロットしたところ、いずれの薬物も仮想薬物における CL_{eff}/P_u と F_A 増加率の関係と同様の関係が観察された。このことから、仮想薬物の CL_{eff}/P_u の値を用いた DDI 評価は、実在薬物と大きな矛盾無く実施可能であると考えられた。

ER と CL_{eff}/P_u を用いた DDI リスク判定の比較

ER と CL_{eff}/P_u により、 F_A 増加率 1.25 倍をどの程度正確に判定可能か比較した(表 2-2)。

ER では digoxin の ER が 3 となる時の psf の数値を設定することで、digoxin の ER が 3 となる Caco-2 経細胞輸送評価系を模し、その系において、ER が 2 より大きい仮想薬物の F_A 増加率を確認したところ、1000 の仮想薬物のうち、false negative と判定されたものが 50 存在し、その時の false positive となった薬物は 82 であった。一方、digoxin の ER が 64 となる時、false negative と判定された仮想薬物が 4 と減少したが、false positive が 334 と増加した。次に CL_{eff}/P_u を用いた DDI リスク判定基準を設定した。false negative の判定を示さない基準を設定するために、 F_A が 1.25 倍以上増加する仮想薬物で CL_{eff}/P_u が最小となる時の値である 0.15 を、基準薬(ここでは digoxin)における CL_{eff}/P_u である 1.2 で除した値、 CL_{eff}/P_u 比 0.125 を DDI リスク有の基準とした。その結果、false negative と判定された仮想薬物は 0 でありながら、false positive が 246 と ER を用いた場合に比べ相対的に低値となることが明らかとなった。

< 考 察 >

臨床における P-gp を介した DDI のリスク判定として、現在の DDI ガイドラインでは ER を使用しているが、現在のフローでは多くの医薬品候補化合物が臨床 DDI 試験実施の対象になるものと考えられる。より意義の大きい試験とするためにも臨床 DDI 試験実施の要否の判断基準は、現在より精度の高いものであることが望ましい。ER の精度を改善するためには、試験条件間での結果のバラつきを解決すべきである。本研究において、digoxin の ER が 64 となる時の結果では、より false negative を高い割合で回避可能であったことから、P-gp の活性の強い評価系を用いる必要があると考えられる。しかし高活性かつ評価系における結果のばらつきの問題を解決するためには、細胞の継代数、試験時の細胞密度、緩衝液の種類、pH に加え、攪拌条件やプレートの材質に至るまで、非常に多くの条件を標準化する必要があり、現実的ではない。当然、実験者間での手技の差が影響する可能性もある。また、DDI を引き起こす薬物の見逃しを減らす目的とする場合、ER の精度では ER の値を低く設定せざるを得ない。これらを考えると、新しい DDI リスク判定パラメーターを設定することが望ましいと考えた。

そこで ER における問題点を考えた時、ER が膜透過性や P-gp の活性、Caco-2 の生育および試験条件などが混在するパラメーターであることが問題であると考えられた。したがって、各実験から得られる数値を、より科学的に意味のある数値、すなわち薬物の消化管吸収の素過程を表すパラメーターを使用することが望ましいと考えた。そこで、 F_A を予測するために実験などにより取得し、TLM に入力する仮想薬物生成のための全てのパラメーターと、TLM によるシミュレーションの結果算出される F_A 増加率との関係を精査

した。その結果、 $V_{\max, P-gp}$ と $K_{m, P-gp}$ の比である CL_{eff} 、 P_s を *in vitro* と *in vivo* における頂端膜側 pH の違いで補正した値である P_u に、 F_A 増加率との弱い相関がそれぞれ観察された。さらにこれらの比である CL_{eff}/P_u では、 F_A 増加率との相関が改善し、この関係を DDI リスク判定に使用可能であると考えた。 CL_{eff}/P_u は、ER と構造的には類似したパラメーターであり、ER を構成する $P_{\text{app}, AB}$ と $P_{\text{app}, BA}$ を算出する Tachibana らの式 (Tachibana et al., 2010) を、 $P_1 \sim P_3$ が等しいとした上で整理すると、膜透過係数と $P-gp$ によるクリアランスにより表される。しかし本研究の結果、 R_{HH} を用いて *in vitro* と *in vivo* の pH の違いを考慮せず、同様の解析を行った場合、図 2-3 のような良好な相関は得られず、false positive が観察された。また、ER を用いた DDI リスク判定において false negative となった薬物は全て、*in vitro* と *in vivo* の pH の影響を受けやすく、*in vitro* で見積もるより *in vivo* で解離型の割合が多くなり、 P_u として *in vivo* では膜透過性が低くなる薬物であった。*in vitro* と *in vivo* における頂端膜側 pH の違いを考えた時、*in vivo* の細胞表面において明らかにされている酸性の微小環境における pH が同様に Caco-2 においても存在し、*in vitro* と *in vivo* において同等の pH を有する可能性もあるが、Caco-2 を用いた経細胞輸送試験では頂端膜側の緩衝液の pH を変化させることで P_{app} の値が大きく変化することが知られており (Neuhoff et al., 2003, 2005)、多くの条件で *in vitro* における細胞表面の pH は緩衝液の pH に支配され酸性の微小環境 pH は維持されておらず、緩衝液による pH の調整なくしては *in vivo* の環境を模した試験を実施することは困難と考えられる。したがって、得られた試験結果を適切に補正することが可能な基準を決めることが望ましいと考えられ、試験系の pH の影響をパラメーター算出の際、考慮していない ER では、*in vitro*

と *in vivo* における膜を透過することが可能な非解離型の薬物の割合を補正することができず、 CL_{eff}/P_u と同等の精度での DDI リスク判定は困難であると考えられた。

CL_{eff}/P_u を用いた DDI リスク判定の結果、ER と比較して DDI リスクの見逃しを減らした上で、false positive も減らすことにより、意義の小さい臨床試験を減らすことが出来る可能性が示唆された。 CL_{eff}/P_u を用いた実際の DDI リスク判定は、以下の手順が想定される：1) Caco-2 など、P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送試験を行い、 CL_{eff} および P_{app} を得る。 P_{app} は pK_a を用いることで式 2-7 により P_u の算出をし、 CL_{eff}/P_u を取得する。この試験は、必ず本研究で行った図 2-3 の解析と同様の解析を行った、 F_A 増加率の臨床における値が明らかなリファレンス薬を加えて、目的の被験薬物と同時かつ同じ条件で実施する。2) リファレンス薬の CL_{eff}/P_u に対する被験薬物の CL_{eff}/P_u を算出し、 CL_{eff}/P_u 比とする。3) 本研究において、 F_A を 1.25 倍増加させる時の CL_{eff}/P_u と、リファレンス薬(ここでは digoxin とする)の CL_{eff}/P_u がそれぞれ 0.15 と 1.2 と明らかとなっているため、この CL_{eff}/P_u 比を算出し、これを DDI リスク有無の基準値とする。本研究では、0.125 となった。4) CL_{eff}/P_u 比 0.125 と、被験薬物における CL_{eff}/P_u 比を比較することで DDI リスクの判定を行う。0.125 より高い CL_{eff}/P_u 比を有する P-gp 基質薬物では、1.25 倍の AUC 増加を伴う DDI リスク有、と判定される。これらの手順により、試験条件の影響を受けない P-gp を介した DDI リスクの判定が可能になるものと考えられた。

上記の方法では、pH の影響を考慮したことが DDI リスク判定の改善に大きく影響したものと考えられる。また、同じアッセイ内にリファレンス薬を用い、その使用法を明確に示した点も重要である。しかし、アッセイ内におけるばらつきや試験実施者の手技的な問

題を解決可能な方法は本研究においては提案していない。in vitro 試験により得られる数値の信頼性をより向上させるためには、例えば試験前後で実施する膜抵抗の測定値や不透性マーカーの測定結果、さらには細胞タンパク量や細胞内 P-gp 発現絶対量の測定結果を適切に DDI リスク判定に考慮可能な方法が必要であると考えられ、将来的な課題であると考えられる。

以上より本研究では、ER における問題点を考察することで P-gp を介した DDI リスク判定のための新しいパラメーターを提唱し、これを用いることで、ER における DDI リスクの見逃しを減らした上で、効率的な医薬品開発を行うことが出来ることを示唆した。

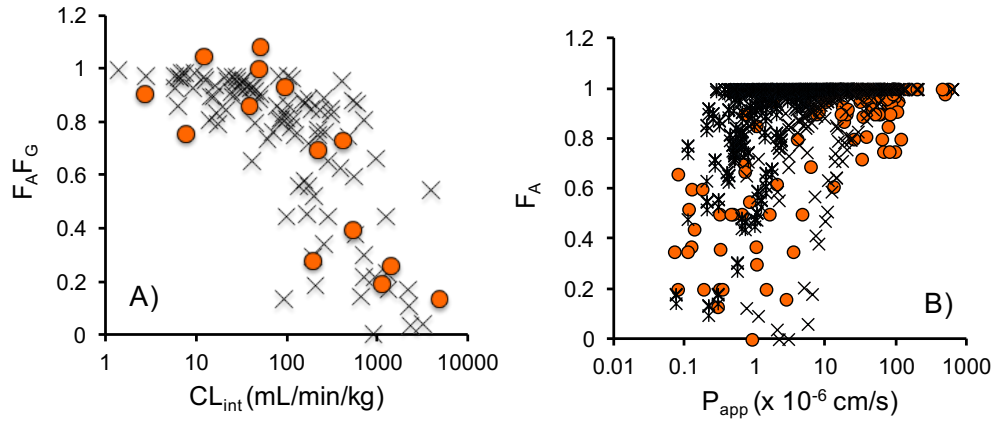


図 2-1. 仮想薬物と実在薬物における吸収動態関連パラメーターの分布の比較。A) $F_A F_G$ と *in vitro* 肝固有クリアランスの関係、B) F_A と Caco-2 における見かけの膜透過係数(P_{app}) の関係。×は仮想薬物を、●は実在薬物の結果を表す。A では CYP3A の基質であり、P-gp の基質でない仮想薬物 100 例を、B では CYP3A の基質 100 例および基質でないもの 100 例を、5 種の $V_{max,P-gp}$ それぞれに対して使用し、計 1000 例の結果を示した。

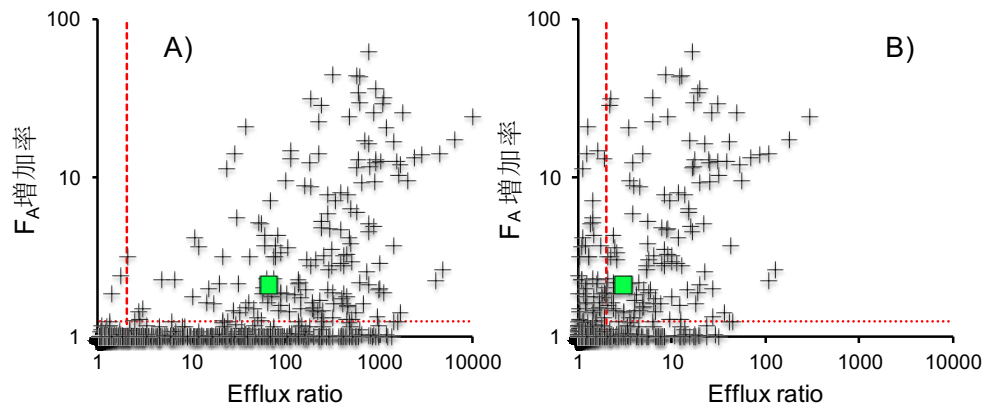


図 2-2. P-gp の完全阻害時における F_A 増加率と Efflux ratio (ER) の関係。+ は仮想薬物の関係を、■ は digoxin の文献値を表す。A) digoxin の ER が 64、B) digoxin の ER が 3 となる P-gp の活性を有する経細胞輸送試験系を用いた時の psf を設定し仮想薬物の ER を算出した時の結果をそれぞれ表す。赤の破線は ER が 2、点線は DDI の基準である F_A 増加率 1.25 の時の値を表す。

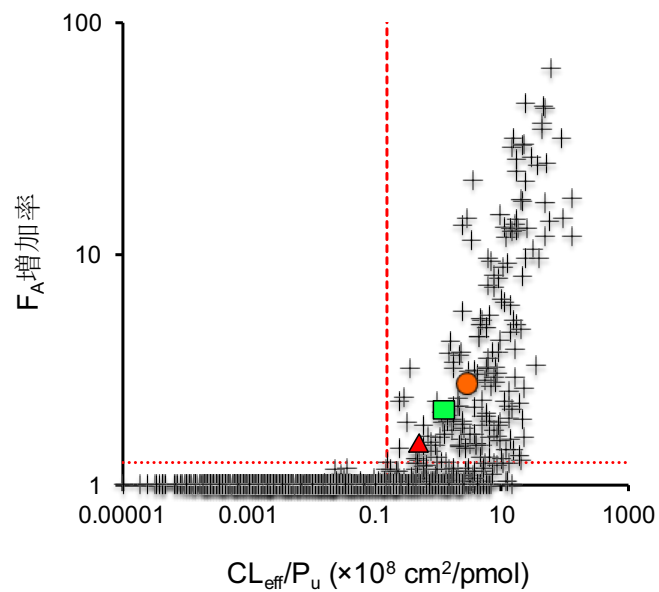


図 2-3. F_A 増加率と新しい DDI リスク判定パラメーター(CL_{eff}/P_u)の関係。+は仮想薬物の関係、●は fexofenadine、■は digoxin、▲は talinalol の解析結果を表す。赤の破線は F_A の増加率が 1.25 倍を超える仮想薬物の CL_{eff}/P_u の値の最小値(0.15)を、赤の点線は F_A 増加率が 1.25 倍の値を表す。

表 2-1. 仮想薬物発生のための物理化学的および薬物動態学的パラメーター

	P_{app}	pK_a		f_B	$K_{m,CYP}$	$K_{m,P-gp}$	$V_{max,CYP}$
	cm/h	Acid	Base		$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/h/pmol}$
Mean	0.112	8.88	5.62	0.109	17.3	0.261	1.53
CV	1.4	0.48	0.76	1.2	1.8	0.89	1.6

表 2-2. DDI リスク判定パラメーターによる F_A 増加率予測の結果

Parameters	Values for digoxin	False negative	False positive	True negative	True positive
CL_{eff}/P_u	1.2	0	246	574	180
ER	64	4	334	486	176
	3.0	50	82	738	130

表の数値は 1000 の仮想薬物のうち、False negative、False positive、True negative、True positive と判定されたものの数を表す。

第四章 総括

本研究は、薬物の消化管からの吸収動態を予測するモデルとして最も広く使用されている既存の多分割型モデルにおける問題点として、薬物の消化管管腔内での移動を正確に表現することが不可能な点、および上皮細胞基底膜側のモデル記述が不正確な点を挙げ、これらを解決した上で消化管吸収動態を正確に予測可能な PBPK モデルを構築すること、ならびに P-gp 基質薬物の P-gp 阻害を介した DDI を簡易的に予測するためのパラメーターとして、試験条件間で大きく値が異なることからその有用性が不十分と考えられる ER に代わる、DDI リスク判定パラメーターを考案することを目的として実施した。

第二章では、多分割型モデルにおける 2 つの欠点を克服する方法を見出し、両欠点に対する改善を行いながらも、多分割型モデルと同等以上の消化管吸収動態予測性を有する PBPK モデルである TLM を構築した。既存のモデルでは、予測値として出力される情報が実測値とできるかぎり一致するように、例えば代謝酵素の発現量を調整する等の方法が行われているが、本研究ではその方法を第一選択とせず、モデル構造そのものに起因する問題点を解決することで、最終的に予測精度を改善する方法を選択した。この解決手段は、現時点で明らかとなっている予測と実測の乖離を、直ちに解決するための最も簡単かつ速やかな方法ではない。しかし、消化管 PBPK モデルが将来的に実際の生体における全ての薬物の現象を完全に矛盾なく説明するためには必須のステップであると考えた。TLM の将来的な応用性の観点からは、粘膜固有層をモデルに追加し、基底膜を有する構造としたことで、基底膜に発現したトランスポーターに関する研究や、免疫学上重要な粘膜固有

層における生体防御機構を考慮した Pharmacokinetics/Pharmacodynamics 解析、さらには粘膜固有層内のリンパ管を追加することによる脂質吸収、ならびに脂質修飾低吸収性分子の消化管吸収動態の解析に応用可能と考えられる。現在の TLM では、すでにモデルへの記述方法の具体的な方法論が公表されている現象である、非攪拌水層透過性や細胞間隙輸送などを考慮していない。また、P-gp の絶対的発現量、BCRP などのその他のトランスポーターの考慮もしていない。上記のモデルへの記述を適切に行うことで、本研究において psf を用いることが必要であった P-gp の影響も、種々の補正を行うことなく解析ならびに予測できるようになるものと考えられる。またこれらの課題も、TLM に必要な記述を行うことによって問題なく対応可能であると考えられる。

次いで第三章では、P-gp を介した DDI 簡易予測法では現在においても標準的手法である ER の、DDI リスク判定基準パラメーターとしての問題点そのものを明らかにし、さらにこれまでその使用法が曖昧で運用困難であったリファレンス薬を用いた評価法を含め、新しいパラメーター CL_{eff}/P_u および CL_{eff}/P_u 比を用いることでその問題点を解決した。さらにこの方法は False negative を無くすことで DDI リスクの見逃しを減らし、さらには False positive と判定される薬物数を増加させないことで、倫理的ならびに開発効率的に意義の乏しい臨床試験の増加を防ぐために有用であると考えられた。

以上のことから本研究では、消化管吸収動態予測生理学的モデルの構築を行うことで、これまでのモデル構造では解決困難または考慮されていなかった薬物の移動ならびに細胞基底膜側の記述に対する問題を解決し、さらにこのモデルを用いて P-gp を介した DDI の予測法を開発することで、安全かつ効率的な医薬品開発に貢献するための基盤を構築で

きたものと考えられる。

引用文献

Agoram B, Woltoz WS, and Bolger MB (2001) Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* 50 Suppl 1: S41-67.

Ando H, Hisaka A, and Suzuki H (2015) A new physiologically based pharmacokinetic model for the prediction of gastrointestinal drug absorption: translocation model. *Drug Metab Dispos* 43: 590-602.

Badhan R, Penny J, Galetin A, and Houston JB (2009) Methodology for development of a physiological model incorporating CYP3A and P-glycoprotein for the prediction of intestinal drug absorption. *J Pharm Sci* 98:2180-2197.

Barbanoj MJ, Urbano G, Antonijuan R, Ballester MR, and Valle M (2007) Different acute tolerance development to EEG, psychomotor performance and subjective assessment effects after two intermittent oral doses of alprazolam in healthy volunteers. *Neuropsychobiology* 55: 203-212.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL editors (2005) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, eleventh edition ed., New York: McGraw-Hill Companies, Inc.

Bergstrand M, Soderlind E, Eriksson UG, Weitschies W, and Karlsson MO (2012) A semi-mechanistic modeling strategy to link in vitro and in vivo drug release for modified release formulations. *Pharm Res* 29:695-706.

Bergstrand M, Soderlind E, Weitschies W, and Karlsson MO (2009) Mechanistic modeling of a magnetic marker monitoring study linking gastrointestinal tablet transit, in vivo drug release, and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 86:77-83.

Bolger MB, Lukacova V, and Woltoz WS (2009) Simulations of the nonlinear dose dependence for substrates of influx and efflux transporters in the human intestine. *AAPS J* 11:353-363.

Bornemann LD, Min BH, Crews T, Rees MM, Blumenthal HP, Colburn WA, and Patel IH (1985) Dose dependent pharmacokinetics of midazolam. *Eur J Clin Pharmacol* 29:91-95.

Bruyere A, Decleves X, Bouzom F, Ball K, Marques C, Treton X, Pocard M, Valleur P, Bouhnik Y, Panis Y, Scherrmann JM, and Mouly S (2010) Effect of Variations in the Amounts of P-Glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2) and CYP3A4 along the Human Small Intestine on PBPK Models for Predicting Intestinal First Pass. *Mol Pharm* 7:1596-1607.

Chen J, and Pang KS (1997) Effect of flow on first-pass metabolism of drugs: single pass studies on 4-methylumbelliferone conjugation in the serially perfused rat intestine and liver preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 24-31.

Cong D, Doherty M, and Pang KS (2000) A new physiologically based, segregated-flow model to explain route-dependent intestinal metabolism. *Drug Metab Dispos* 28:224-235.

DeSesso JM, and Jacobson CF (2001) Anatomical and physiological parameters

affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* 39: 209-228.

DeSesso JM, and Williams AL (2008) Contrasting the Gastrointestinal Tracts of Mammals: Factors that Influence Absorption. *Annu Rep Med Chem* 43: 353-371.

Drescher S, Glaeser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, and Fromm MF (2003) P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 73: 223-231.

Ekins S, Bravi G, Wikel JH, and Wrighton SA (1999) Three-dimensional-quantitative structure activity relationship analysis of cytochrome P-450 3A4 substrates. *J Pharmacol Exp Ther* 291:424-433.

Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, Kindmark A, and Artursson P (2006) Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 29: 269-277.

Fenner KS, Troutman MD, Kempshall S, Cook JA, Ware JA, Smith DA, Lee CA (2009) Drug-drug interactions mediated through P-glycoprotein: clinical relevance and in vitro-in vivo correlation using digoxin as a probe drug. *Clin Pharmacol Ther* 85: 173-181.

Gertz M, Harrison A, Houston JB, and Galetin A (2010) Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos* 38:1147-1158.

Gertz M, Houston JB, and Galetin A (2011) Physiologically based pharmacokinetic modeling of intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates with high intestinal extraction. *Drug Metab Dispos* 39:1633-1642.

European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP), Guideline on the Investigation of Drug Interactions. October 2010. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/05/WC500090112.pdf. Accessed January 27, 2017.

Heikkinen AT, Baneyx G, Caruso A, and Parrott N (2012) Application of PBPK modeling to predict human intestinal metabolism of CYP3A substrates - an evaluation and case study using GastroPlus. *Eur J Pharm Sci* 47:375-386.

Henin E, Bergstrand M, Standing JF, and Karlsson MO (2012) A mechanism-based approach for absorption modeling: the Gastro-Intestinal Transit Time (GITT) model. *AAPS J* 14:155-163.

Hisaka A and Sugiyama Y (1998) Analysis of nonlinear and nonsteady state hepatic extraction with the dispersion model using the finite difference method. *J Pharmacokinet Biopharm* 26:495-519.

Hisaka A, Ohno Y, Yamamoto T, and Suzuki H (2010) Theoretical considerations on quantitative prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet* 25:48-61.

Hisaka A, Nakamura M, Tsukihashi A, Koh S, and Suzuki H (2014) Assessment of

intestinal availability (FG) of substrate drugs of cytochrome p450s by analyzing changes in pharmacokinetic properties caused by drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 42: 1640-1645.

Ieiri I, Tsunemitsu S, Maeda K, Ando Y, Izumi N, Kimura M, Yamane N, Okuzono T, Morishita M, Kotani N, Kanda E, Deguchi M, Matsuguma K, Matsuki S, Hirota T, Irie S, Kusuhara H, and Sugiyama Y (2013) Mechanisms of pharmacokinetic enhancement between ritonavir and saquinavir; micro/small dosing tests using midazolam (CYP3A4), fexofenadine (p-glycoprotein), and pravastatin (OATP1B1) as probe drugs. *J Clin Pharmacol* 53: 654-661.

Jamei M, Turner D, Yang J, Neuhoff S, Polak S, Rostami-Hodjegan A, and Tucker G (2009) Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *AAPS J* 11:225-237.

Kadono K, Akabane T, Tabata K, Gato K, Terashita S, and Teramura T (2010) Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor. *Drug Metab Dispos* 38: 1230-1237.

Kajosaari LI, Laitila J, Neuvonen PJ, and Backman JT (2005) Metabolism of repaglinide by CYP2C8 and CYP3A4 in vitro: effect of fibrates and rifampicin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97: 249-256.

Kamiyama E, Sugiyama D, Nakai D, Miura S, and Okazaki O (2009) Culture period-dependent change of function and expression of ATP-binding cassette transporters in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 37: 1956-1962.

Kato M, Chiba K, Hisaka A, Ishigami M, Kayama M, Mizuno N, Nagata Y, Takakuwa S, Tsukamoto Y, Ueda K, Kusahara H, Ito K, and Sugiyama Y (2003) The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature. *Drug Metab Pharmacokinet* 18: 365-372.

Kimura T and Higaki K (2002) Gastrointestinal transit and drug absorption. *Biol Pharm Bull* 25:149-164.

Ku HY, Ahn HJ, Seo KA, Kim H, Oh M, Bae SK, Shin JG, Shon JH, and Liu KH (2008) The contributions of cytochromes P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, udenafil, and vardenafil. *Drug Metab Dispos* 36: 986-990.

Lavrijsen KL, Van Houdt JM, Van Dyck DM, Hendrickx JJ, Woestenborghs RJ, Lauwers W, Meuldermans WE, and Heykants JJ (1988) Is the metabolism of alfentanil subject to debrisoquine polymorphism? A study using human liver microsomes. *Anesthesiology* 69: 535-540.

Lin JH, Chiba M, and Baillie TA (1999) Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev* 51:135-158.

Lin KM, Lau JK, Smith R, Phillips P, Antal E, and Poland RE (1988) Comparison of alprazolam plasma levels in normal Asian and Caucasian male volunteers. *Psychopharmacology* 96: 365-369.

Maeda K, Takano J, Ikeda Y, Fujita T, Oyama Y, Nozawa K, Kumagai Y, and Sugiyama Y (2011) Nonlinear pharmacokinetics of oral quinidine and verapamil in healthy subjects: a clinical microdosing study. *Clin Pharmacol Ther* 90:263-270.

Mano Y, Sugiyama Y, and Ito K (2015) Use of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Quantitative Prediction of Drug-Drug Interactions via CYP3A4 and Estimation of the Intestinal Availability of CYP3A4 Substrates. *J Pharm Sci* 104:3183-3193

Margolskee A, Darwich AS, Pepin X, Pathak SM, Bolger MB, Aarons L, Rostami-Hodjegan A, Angstenberger J, Graf F, Laplanche L, Müller T, Carlert S, Daga P, Murphy D, Tannergren C, Yasin M, Greschat-Schade S, Mück W, Muenster U, van der Mey D, Frank KJ, Lloyd R, Adriaenssen L, Bevernage J, De Zwart L, Swerts D, Tistaert C, Van Den Bergh A, Van Peer A, Beato S, Nguyen-Trung AT, Bennett J, McAllister M, Wong M, Zane P, Ollier C, Vicat P, Kolhmann M, Marker A, Brun P, Mazuir F, Beilles S, Venczel M, Boulenc X, Loos P, Lennernäs H, and Abrahamsson B (2007) IMI - oral biopharmaceutics tools project - evaluation of bottom-up PBPK prediction success part 1: Characterisation of the OrBiTo database of compounds. *Eur J Pharm Sci* 96: 598-609.

Margolskee A, Darwich AS, Pepin X, Aarons L, Galetin A, Rostami-Hodjegan A, Carlert S, Hammarberg M, Hilgendorf C, Johansson P, Karlsson E, Murphy D, Tannergren C, Thörn H, Yasin M, Mazuir F, Nicolas O, Ramusovic S, Xu C, Pathak SM, Korjamo T, Laru J, Malkki J, Pappinen S, Tuunainen J, Dressman J, Hansmann S, Kostewicz E, He H, Heimbach T, Wu F, Hoft C, Laplanche L, Pang Y, Bolger MB, Huehn E, Lukacova V, Mullin JM, Szeto KX, Costales C, Lin J, McAllister M, Modi S, Rotter C, Varma M, Wong M, Mitra A, Bevernage J, Biewenga J, Van Peer A, Lloyd R,

Shardlow C, Langguth P, Mishenzon I, Nguyen MA, Brown J, Lennernäs H, and Abrahamsson B (2017) IMI - Oral biopharmaceutics tools project - Evaluation of bottom-up PBPK prediction success part 2: An introduction to the simulation exercise and overview of results. *Eur J Pharm Sci* 96: 610-625.

Misaka S, Uchida S, Imai H, Inui N, Nishio S, Ohashi K, Watanabe H, and Yamada S (2010) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low doses of midazolam administered intravenously and orally to healthy volunteers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:290-295.

Mitra P, Audus K, Williams G, Yazdanian M, Galinis D. (2011) A comprehensive study demonstrating that p-glycoprotein function is directly affected by changes in pH: implications for intestinal pH and effects on drug absorption. *J Pharm Sci*. 100:4258-4268.

MHLW. 2018. Available at:

<https://www.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T180724I0150.pdf>. Accessed September 12, 2018.

Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, and Artursson P (2003) pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm Res*. 20:1141-1148.

Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, and Artursson P (2005) pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 25: 211-220.

Neuhoff S, Yeo KR, Barter Z, Jamei M, Turner DB, and Rostami-Hodjegan A (2013) Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: part II - prediction of P-glycoprotein mediated drug-drug interactions with digoxin. *J Pharm Sci* 102: 3161-3173.

Ohura K, Nozawa T, Murakami K, and Imai T (2011) Evaluation of transport mechanism of prodrugs and parent drugs formed by intracellular metabolism in Caco-2 cells with modified carboxylesterase activity: temocapril as a model case. *J Pharm Sci* 100:3985-3994.

Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, and Thummel KE (1997) Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1552-1562.

Pang KS and Chow EC (2012) Commentary: theoretical predictions of flow effects on intestinal and systemic availability in physiologically based pharmacokinetic intestine models: the traditional model, segregated flow model, and QGut model. *Drug Metab Dispos* 40:1869-1877.

Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, Bacon J, O'Leary KA, Kroon PA, Knutson L, Forsell P, Eriksson T, Lennernas H, and Williamson G (2003) Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos* 31:805-813.

Polasek TM, Sadagopal JS, Elliot DJ, and Miners JO (2010) In vitro-in vivo extrapolation of zolpidem as a perpetrator of metabolic interactions involving CYP3A. *Eur J Clin Pharmacol* 66: 275-283.

Poulin P, Jones RD, Jones HM, Gibson CR, Rowland M, Chien JY, Ring BJ, Adkison KK, Ku MS, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Björnsson T, Lave T, and Yates JW (2011) PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 5: Prediction of plasma concentration-time profiles in human by using the physiologically-based pharmacokinetic modeling approach. *J Pharm Sci* 100:4127-4157.

Ring BJ, Chien JY, Adkison KK, Jones HM, Rowland M, Jones RD, Yates JW, Ku MS, Gibson CR, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Björnsson T, Lavé T, Poulin P (2011) PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 3: comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci* 100:4090-4110.

Rotzinger S, Fang J, and Baker GB (1998) Trazodone is metabolized to m-chlorophenylpiperazine by CYP3A4 from human sources. *Drug Metab Dispos* 26: 572-575.

Schiller C, Frohlich CP, Giessmann T, Siegmund W, Monnikes H, Hosten N, and Weitschies W (2005) Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* 22:971-979.

Shimizu M, Uno T, Sugawara K, and Tateishi T (2006) Effects of itraconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 61: 538-544.

Smith RB, Kroboth PD, Vanderlugt JT, Phillips JP, and Juhl RP (1984)

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam after oral and IV administration. *Psychopharmacology* 84: 452-456.

Stephens RH, O'Neill CA, Warhurst A, Carlson GL, Rowland M, and Warhurst G (2001) Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 584-591.

Sugano K (2009) Introduction to computational oral absorption simulation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:259-293.

Sun D, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, Fleisher D, Lee KD, and Amidon GL (2002) Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm Res* 19:1400-1416.

Tachibana T, Kitamura S, Kato M, Mitsui T, Shirasaka Y, Yamashita S, and Sugiyama Y (2010) Model analysis of the concentration-dependent permeability of P-gp substrates. *Pharm Res* 27:442-446.

Tachibana T, Kato M, Watanabe T, Mitsui T, and Sugiyama Y (2009) Method for predicting the risk of drug-drug interactions involving inhibition of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Xenobiotica* 39: 430-443.

Takano J, Maeda K, Bolger MB, and Sugiyama Y (2016) The Prediction of the Relative Importance of CYP3A/P-glycoprotein to the Nonlinear Intestinal Absorption of Drugs by Advanced Compartmental Absorption and Transit Model. *Drug Metab Dispos* 44: 1808-1818.

Thomas S, Brightman F, Gill H, Lee S, and Pufong B (2008) Simulation modelling of human intestinal absorption using Caco-2 permeability and kinetic solubility data for early drug discovery. *J Pharm Sci* 97: 4557-4574.

Troutman MD, and Thakker DR (2003) Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res.* 20: 1200-1209.

Umeyama Y, Fujioka Y, and Okuda T (2014) Clarification of P-glycoprotein inhibition-related drug-drug interaction risks based on a literature search of the clinical information. *Xenobiotica* 44: 1135-1144.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry, drug interaction studies-study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. February 2012. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>. Accessed January 27, 2017.

Varma MV, and Panchagnula R (2005) pH-dependent functional activity of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of protic drugs: kinetic analysis of quinidine efflux in situ. *J Pharm Sci* 94: 2632-2643.

Varma MV, Obach RS, Rotter C, Miller HR, Chang G, Steyn SJ, El-Kattan A, and Troutman MD (2010) Physicochemical space for optimum oral bioavailability:

contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem* 53:1098-1108.

Willmann S, Schmitt W, Keldenich J, and Dressman JB (2003) A physiologic model for simulating gastrointestinal flow and drug absorption in rats. *Pharm Res* 20: 1766-1771.

Willmann S, Schmitt W, Keldenich J, Lippert J, and Dressman JB (2004) A physiological model for the estimation of the fraction dose absorbed in humans. *J Med Chem* 47: 4022-4031.

Winne D (1978) Blood flow in intestinal absorption models. *J Pharmacokinet Biopharm* 6: 55-78.

Yang J, Jamei M, Yeo KR, Tucker GT, and Rostami-Hodjegan A (2007) Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr Drug Metab* 8:676-684.

Yasui N, Otani K, Kaneko S, Ohkubo T, Osanai T, Sugawara K, Chiba K, and Ishizaki T. (1996) A kinetic and dynamic study of oral alprazolam with and without erythromycin in humans: in vivo evidence for the involvement of CYP3A4 in alprazolam metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 59: 514-519.

Yu LX and Amidon GL (1999) A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *Int J Pharm* 186:119-125.

Zhang S, and Morris ME (2003) Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal

Caco-2 cells. Pharm Res. 20: 1184-1191.

謝辞

東京大学医学部附属病院薬剤部部長・教授の鈴木洋史博士には、研究室における研究および勉強の機会を与えて戴き、さらに本論文作成について懇切丁寧にご指導戴きました。また、研究室在籍時から本論文の完成に至るまで、研究者としてあるべき姿勢やものの考え方についてご指導ご鞭撻賜りました。ここに謹んで深く感謝の意を表します。

本研究は、千葉大学大学院薬学研究院教授(前東京大学医学部附属病院 22 世紀医療センター薬理動態学寄付講座特任准教授)の樋坂章博博士による、指導教員としての熱心で暖かな直接のご指導無くして完遂はありませんでした。また、種々の研究の進め方や解析法のみならず、研究者としての相談に親身に乗って戴きました。ここに深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成にあたり、また研究室在籍中に非常に高度で幅広い視点からご指導ご鞭撻賜りました東京大学医学部附属病院薬剤部講師の本間雅博士、研究室在籍中から本論文作成に至るまで実験手技を含む研究活動全般についてご指導戴き、さらに公私ともに様々な相談に乗って戴いた同病院薬剤部助教の苅谷嘉顕博士に、深い感謝の意を表します。

同研究室への出向について快く送り出していただき、出向期間前後を含め、本研究に没頭できる環境を作って戴いた、杏林製薬株式会社創薬本部わたらせ創薬センター管理部課長の伊澤成博士、出向にあたって多くのご助言、環境のご用意をして戴いた同センター薬物動態研究所課長の北村嘉章博士、様々な困難について快く相談に乗って戴いた同研究所所長の鳥海千冬博士、出向についてご許可戴いた杏林製薬ホールディングス相談役の平井

敬二博士、他、本研究に関連する活動を暖かくお見守り戴いた、杏林製薬創薬本部わたらせ創薬センター薬物動態研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。

研究室在籍が可能となるようにはじめにご尽力いただいた東京大学附属病院薬剤部第一副部長・講師の高田龍平博士、外部からの研究者を温かく迎えて戴き、さらに実験についてご指導戴いた東京大学附属病院薬剤部試験研究室助教の池淵祐樹博士をはじめ薬剤部試験研究室・臨床薬物動態学教室の諸先生方および学生の皆様に、感謝の意を表します。

最後に、出向期間以前から非常に長い間、家庭においても研究に没頭する環境を作り上げ力強く支えてくれた家族に深く感謝致します。

論文目録

本論文は以下の原著論文に基づき作成した。

1. Ando, H., Hisaka, A., Suzuki, H. A new physiologically based pharmacokinetic model for the prediction of gastrointestinal drug absorption: translocation model.

Drug. Metab. Dispos. **43**(4), 590-602, 2015.

2. Ando, H., Hatakeyama, H., Sato, H., Hisaka, A., Suzuki, H. Determinants of intestinal availability for P-glycoprotein substrate drugs estimated by extensive simulation with mathematical absorption models. *J. Pharm. Sci.* **106**(9), 2771-2779,

2017.