

博士論文

医薬品の代謝/輸送を考慮した消化管吸収過程にお  
ける定量的予測法の構築

高野順市

## 目次

序論 .....	5
第1章 .....	11
1.1 目的 .....	11
1.2 方法 .....	12
1.3 結果 .....	18
1.4 考察 .....	20
1.5 小括 .....	22
第2章 .....	30
2.1 目的 .....	30
2.2 方法 .....	31
2.3 結果 .....	47
2.4 考察 .....	50
2.5 小括 .....	58
總括 .....	79
将来展望 .....	80
参考文献 .....	83
謝辞 .....	97

## ABBREVIATIONS

ACAT	advanced compartmental absorption and transit
afe	average fold error
AUC	area under the plasma concentration–time curve
AUC <sub>0-12</sub>	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours
AUC <sub>inf</sub>	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinity
BCRP	breast cancer resistance protein
BMI	body mass index
C <sub>max</sub>	peak plasma concentration
C <sub>u,in max</sub>	肝臓入口の最大非結合形薬物濃度
C <sub>u,ent</sub>	小腸上皮細胞コンパートメント内の非結合形薬物濃度
CYP	cytochrome P450
DIN	drug interaction number
ESF	regional distribution factor
F	バイオアベイラビリティ
F <sub>a</sub>	吸収率
FaSSIF	fasted state–simulated intestinal fluid
FeSSIF	fed state–simulated intestinal fluid
F <sub>g</sub>	消化管アベイラビリティ
F <sub>h</sub>	肝アベイラビリティ
f <sub>u</sub>	血漿中非結合形薬物分率
f <sub>ue</sub>	小腸上皮細胞コンパートメント内の非結合形薬物分率
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
k <sub>e</sub>	消失速度定数
K <sub>i</sub>	阻害定数
K <sub>m</sub>	Michaelis 定数
LC–MS/MS	liquid chromatography–tandem mass spectrometry
MRM	multiple-reaction monitoring
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
OATP2B1	organic anion transporting polypeptide 2B1
PBS	phosphate buffered saline
P-gp	P-glycoprotein
Q <sub>h</sub>	肝血流速度
rmse	root mean squared error

SD	標準偏差
SF	scaling factor
SF <sub>CYP3A</sub>	CYP3A の $V_{\max}$ に対する scaling factor
SF <sub>P-gp</sub>	P-gp の $V_{\max}$ に対する scaling factor
SULT	sulfotransferase
$t_{1/2}$	消失半減期
$t_{\max}$	time point at peak plasma concentration
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
$V_{\max}$	最大速度

## 序論

### 1. 消化管吸収における代謝/輸送過程の飽和に起因した非線形薬物動態

経口投与は、点滴静注等 비해 簡便かつ安全な投与方法であり、薬物療法において最も汎用されている。しかし、経口投与された薬物が全身循環に到達するまでにはいつくもの障壁が存在する。これらの障壁は創薬研究の新薬候補化合物を見出すうえで薬物動態学的な課題を生じる。経口投与された薬物は、主に小腸上皮細胞を介して吸収され、肝臓での初回通過代謝を免れて全身循環に到達する。ヒトの消化管にフォーカスすると、図 A に示すように異物排除機構として薬物代謝酵素及び管腔側膜上の排出トランスポーターが発現し、薬物の消化管吸収の抑制に寄与している。そのため、これらの薬物代謝酵素及び排出トランスポーターに良好に認識される薬物は消化管吸収率が低く、低バイオアベイラビリティとなりやすい。また、経口投与後の消化管管腔内では薬物濃度が急激に上昇するため、薬物代謝及びトランスポーターによる排出輸送の飽和が生じうる。血漿中薬物濃度が投与量に比例して増減を示す線形性の薬物動態に対し、消化管の代謝酵素及び排出トランスポーターが飽和した場合には、血漿中薬物濃度が投与量比以上に上昇する非線形性の薬物動態を示す懸念がある。

小腸に発現する薬物代謝酵素として、cytochrome P450 (CYP)<sup>1,2</sup>、UDP-glucuronosyltransferase (UGT)<sup>3-6</sup>及び sulfotransferase (SULT)<sup>7-9</sup>などが知られており、消化管管腔から吸収された薬物を細胞内で代謝することにより不活性化する。一方、P-glycoprotein (P-gp)<sup>10-12</sup>、breast cancer resistance protein (BCRP)<sup>13,14</sup>及び multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)<sup>15,16</sup>は小腸上皮細胞の管腔側

に発現し、吸収されようとする薬物を上皮細胞から管腔側に押し戻すことによって吸収の抑制に働く代表的な排出トランスポーターである。小腸に発現する cytochrome P450 のうち約 80%は CYP3A ファミリーが占める<sup>17</sup>。CYP3A は非常に広範な薬物を基質として認識し、臨床で使用される医薬品全体の約 4 割は CYP3A の基質となることが示されている<sup>18</sup>。また、P-gp は CYP3A と類似した広範な基質認識性を示す<sup>19</sup>ため、小腸に発現する薬物代謝酵素/トランスポーターの中でも CYP3A 及び P-gp の両分子種は消化管吸収過程において異物排除の主要な役割を担っていると言える。CYP3A/P-gp は生体にとっては異物排除の役割を担う一方で、CYP3A/P-gp の基質薬物は、消化管吸収性が低い傾向があることに加え、それに伴う薬物動態の大きな個人差がみられる点や、薬物動態の非線形性が見られやすい点が挙げられる。実際に CYP3A 基質の felodipine<sup>20</sup>、midazolam<sup>21</sup>、sildenafil<sup>22</sup>、P-gp 基質の celiprolol<sup>23</sup>、talinalol<sup>24</sup>、CYP3A/P-gp の dual 基質の indinavir<sup>25</sup>、UK-393,664<sup>26</sup>は臨床投与量の範囲において非線形薬物動態を示すことが報告されている。薬物動態の非線形性は、ヒト血中薬物濃度の予測を困難にし、創薬段階で本来は吸収性が高いにもかかわらず「吸収性が低い薬物」とする誤った判断に陥ったり、投与量によって予期せぬ急激な濃度上昇が引き起こされ重篤な副作用を招く一因になったりする元凶となりうる。したがって、CYP3A/P-gp 活性の消化管吸収率への影響を定量的に予測することは、医薬品開発上において重要な課題である。

## 2. 数理モデルを用いた消化管吸収過程における定量的予測法の構築の必要性と課題

これまで創薬過程における薬物の消化管吸収率の予測には、Caco-2 細胞単層膜を用いた膜透過性<sup>27</sup>やヒトリコンビナント CYP3A を用いた代謝活性を評価し<sup>28</sup>、個々の *in vitro* 評価系で得られたデータに基づき、受動拡散のみから見積もられる吸収率、トランスポーター及び代謝酵素の吸収に対する影響をそれぞれ各要因に絞り込んで予測するアプローチがとられてきた。一方、*in vivo* における医薬品の経口吸収は、製剤の崩壊・薬物の溶解の後に、消化管上皮細胞を介した受動拡散による膜透過に加え、代謝酵素を介した代謝、トランスポーターを介した取り込み/排出輸送を経て門脈血中に到達することから、これらの各素過程を統合的に扱い、消化管吸収率として定量的に予測する方法論が必須である。しかし、これらを包括的に評価可能な *in vitro* 実験系は存在せず、*in vivo* 動物実験では代謝酵素/トランスポーターの種差が問題となる。近年、生理学的な実体を比較的反映した消化管吸収を記述する数理モデルである Advanced compartmental absorption and transit (ACAT) model を適用し、消化管吸収における CYP3A/P-gp の役割を定量的に解析する試みがなされている<sup>29</sup>。ACAT model はヒトの消化管内での薬物の動態を複数のコンパートメントを使って表現し、さらに、溶解、吸収、代謝、能動輸送の各過程を薬物ごとの *in vitro* データに基づき計算し、トータルでのヒト消化管吸収率を算出するモデルである(図 B)。但し、*In vitro* 実験データをモデルに組み込み、*in vivo* 消化管吸収性を予測するためには以下に示すような複数の課題が考えられる。1つ目は、代謝活性や膜透過性など *in vitro* 実験から求められる速度論パラメータに大きな実験間の差が認められることである。この原因のひとつとして実験条

件の違いが考えられる。例えば、CYP3A の代謝活性の評価においては、用いる実験材料の違い(ヒト肝ミクロソーム、ヒトリコンビナントタンパク質発現ミクロソーム等)、反応系でのアクセサリータンパク質やコファクターの存在比<sup>30,31</sup>、バッファー条件<sup>32</sup>が活性に影響を与える。また、P-gp による輸送活性の評価においても同様に、用いる細胞の違い(Caco-2 細胞、ヒト小腸由来細胞又は P-gp 強制発現の細胞)や実験結果からパラメータを評価する際の計算方法の違い( $K_m$  値を算出するときの基準がメディウム中薬物濃度又は細胞内非結合形薬物濃度、flux ratio による算出、もしくは basal-to-apical 方向の輸送のみを使った算出等)が速度論パラメータに影響を及ぼす。2 つ目は、タンパク質のヒト組織における生理的な条件での絶対発現量の評価が困難なため、単純に in vitro 実験系と in vivo での発現量の違いをスケールリングしたような bottom-up approach による予測が難しいことである。CYP3A についてはヒト小腸の各部位における絶対発現量が報告されているが<sup>12</sup>、P-gp のヒト小腸での絶対発現量に関する情報は得られていない。しかし、統一した実験条件で複数の薬物について速度論パラメータを取得し、複数の薬物における in vitro と in vivo の結果の乖離を包括的に説明しうるパラメータとして scaling factor(SF)を設定し、複数薬物のデータに対する同時フィッティングで最適な SF を決定することにより、消化管吸収率×消化管アベイラビリティ( $F_a F_g$ )を定量的に予測可能な方法論の構築が可能であると考えた(図 C)。これにより、投与量に依存した消化管吸収、すなわち非線形性を示す消化管吸収動態を予測可能にすること、さらには、完成したモデルを用いて、創薬の現場で実践可能な P-gp/CYP3A4 が関わる薬物の吸収率の予測法の提案を目指して、以下の研究を進めることとした。



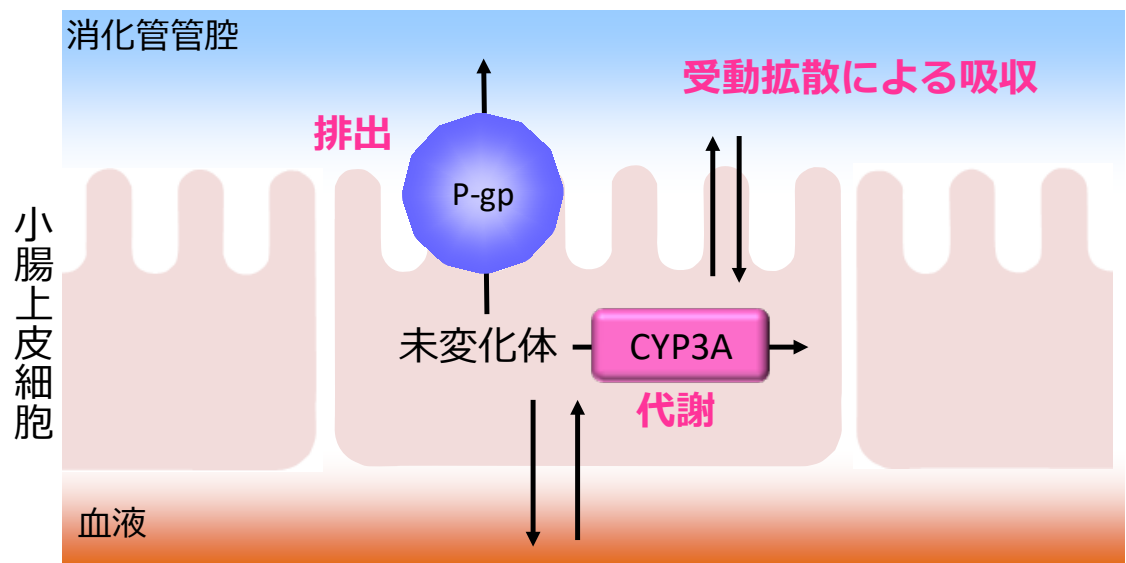


図 A ヒト小腸における異物排除機構の模式図

## Advanced compartmental absorption and transit (ACAT) model

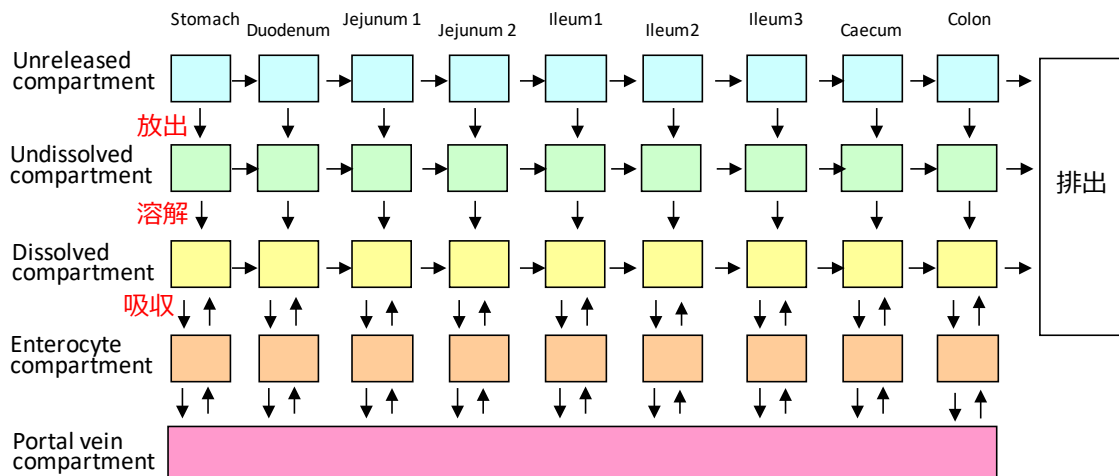


図 B ACAT model の概略

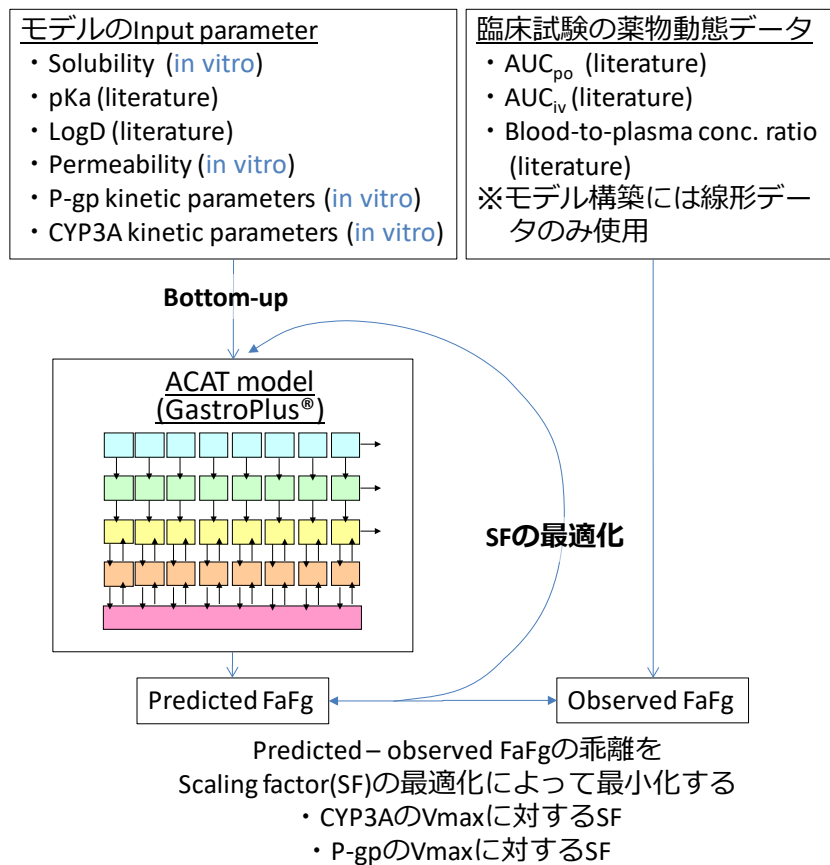


図 C 消化管吸収予測モデル構築のストラテジー

# 第1章

## 消化管吸収における代謝/輸送過程の飽和に起因した 非線形薬物動態を実証するための臨床研究

### 1.1 目的

消化管吸収過程における定量的予測法を構築するために、まず、臨床において消化管の CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送過程の飽和に起因し、薬物動態の非線形性を生じることを臨床試験により実証することとした。モデル薬物の選択は消化管での CYP3A/P-gp を介した薬物相互作用リスクの指標として過去に提案された drug interaction number<sup>33</sup> (DIN)を活用した。DIN は、投与量を in vitro 実験から得られる阻害定数( $K_i$ )で割ることにより算出される。DIN が高値を示すほど消化管での薬物間相互作用リスクが高まると判断され、P-gp 基質では 27.9L、CYP3A 基質では 9.4L を超えると、ハイリスクと判断できることが報告されている。本研究では DIN を算出する過程の  $K_i$  を  $K_m$  に置き換え、消化管吸収過程での非線形性の指標として用いた。P-gp 基質である fexofenadine の例を挙げると、Caco-2 細胞単層膜の経細胞輸送実験から評価した  $K_m$ ; 150 $\mu$ mol/L<sup>34</sup>と、臨床投与量 60 mg から算出した DIN は 0.734L と低値を示した。実際、fexofenadine はヒト臨床試験において、マイクロドーズ(100 $\mu$ g)と臨床投与量(60mg)の間で薬物動態の線形性が認められている<sup>35</sup>。次に、CYP3A 及び P-gp 両方の基質となる quinidine 及び verapamil につい

て同様に DIN を算出した。Quinidine 及び verapamil の P-gp 輸送の  $K_m$  は 1.69 及び 1.01  $\mu\text{mol/L}$  と報告されており<sup>36</sup>、それぞれの臨床投与量を 200 及び 80 mg としたとき、DIN は 303 及び 161 L と閾値と比較して十分に高い値を示した。同様に、quinidine 及び verapamil の CYP3A 代謝による  $K_m$  は in vitro 実験の結果から 7.48 及び 0.726  $\mu\text{mol/L}$  と評価され、DIN は 68.5 及び 224 L と高値を示した。本章の目的は、消化管 CYP3A/P-gp の飽和に起因する非線形な消化管吸収動態を示すと推定した quinidine 及び verapamil の投与量依存的な薬物動態を特徴づけることとした。

## 1.2 方法

### 1.2.1 対象被験者

Quinidine 及び verapamil、2 種の被験薬について臨床試験を実施した。はじめに、各投与群で、8 名の日本人健康成人男性ボランティアが登録された。選択基準に従い登録された被験者の年齢は 20~35 歳、BMI は 18.5~28.5  $\text{kg/m}^2$ であった。身体検査、心電図検査、血液学的検査、尿検査を実施済みの被験者候補から、臨床試験開始前の 1 ヶ月にわたる病歴を収集した。Quinidine の臨床試験に登録された被験者のうち 1 名は、試験前に健常人ボランティアの基準を満たさなくなったため試験から除外された。そのため最終的に、quinidine 投与群では 7 名、verapamil 投与群では 8 名の被験者を対象とした。

### 1.2.2 試験デザイン

試験プロトコールは、東京大学大学院薬学系研究科及び北里大学東病院 臨床試験センター、両機関の倫理委員会により承認されている。すべての参加者は書面による同意を取得後、非盲検、2群、4期、用量漸増の単回経口投与試験に参加した。被験薬の投与後、次期の投与開始前には1週間のウォッシュアウト期間を設けた。被験者は quinidine もしくは verapamil 投与群へ無作為に割り付けられた。被験者は、投与期ごとの投与前日に医療施設に入院した。各投与期とも、一晚絶食の後、被験者に quinidine sulfate(82.9%の quinidine を含む)または verapamil hydrochloride(92.6%の verapamil を含む)を溶解した注射用水を水 200 mL とともに経口投与した。Quinidine sulfate の投与量は 100 µg、1 mg、10 mg、100 mg とし、verapamil hydrochloride の投与量は 100 µg、3 mg、16 mg、80 mg とした。採血時刻は、投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 及び 12 時間とし、1 回につき 5 mL の静脈血を採血した。採血後、4°C で 10 分間、遠心分離し、血漿試料を得た。すべての血漿試料は、分析実施まで-80°C で凍結保存した。入院の 7 日前から投与期が終了するまで、グレープフルーツ、オレンジ、りんごを含むジュース類、セント・ジョーンズ・ワートを含むサプリメント類、医薬品類の摂取を禁止した。また、入院期間中のアルコールまたはカフェインを含む飲料の摂取、並びに喫煙も禁止した。試験期間中、被験者全員の食事は同じメニューとし、あらかじめ設定した時刻に標準食を提供した。被験者の安全性の配慮のため、各投与期の終了時には、身体検査、心電図検査、血液検査、尿検査を実施した。心電図検査は、各投与期の投与後 1、2、4 及び 8 時間後にも実施した。

### 1.2.3 Quinidine 及び verapamil 投与被験者の血漿中薬物濃度測定

血漿中薬物濃度の測定は LC-MS/MS を用いて積水メディカル株式会社にて実施した。

Quinidine 投与群の測定対象は quinidine 及び3種の主要な代謝物(3-hydroxy quinidine, O-desmethyl quinidine 及び quinidine N-oxide)とした。Verapamil 投与群の測定対象は verapamil 及び主要代謝物 (norverapamil)とした。LC-MS/MS のシステムは 4000 Q trap(AB SCIEX) equipped with a ACQUITY UPLC System(Waters)、分析カラムは ACQUITY UPLC HSS T3(2.1× 50 mm, 1.8µm, Waters)を使用した。MS/MS 分析は electrospray ionization ポジティブモードでイオン化し、multiple-reaction monitoring (MRM)にてイオンを検出した。

### 1.2.4 Quinidine 及びその代謝物の血漿中薬物濃度測定

500 µL の血漿試料に 50 µL の内部標準溶液(quinidine-d3)、200 µL の 10%アンモニア、2 mL の酢酸エチルを添加し振とうした。混合物は 1,800×g、4°C で 5 分間遠心分離し、上層を採取した。さらに 2 mL の酢酸エチルを添加し振とうした。同じ条件下で遠心分離し上層を採取した。上層の溶液を 40°C で N<sub>2</sub>気流下、蒸発乾固した。50%メタノールを添加し(0.1 及び 1mg 投与群:100 µL、10 及び 100mg 投与群 : 500 µL)、再溶解した。溶液を攪拌したのち、1,800×g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を採取した。上清を測定試料として LC-MS/MS へ注入した。注入量は、0.1 及び 1mg 投与群で 10 µL、10 及び 100mg 投与群で 2 µL とした。Quinidine 及びその代謝物は 0.1%(v/v)

ギ酸(移動相 A)及び 0.1%(v/v)ギ酸を含むメタノール(移動相 B)によるグラジエント分析により分離した。流速は 0.60 mL/min とし、グラジエント条件は移動相 B の割合を 0~0.5min の間に 5%、0.5~1.2min の間に 25%、1.2~2.0min で 95%まで上昇させ、2.0~2.5min の間に 95%で維持した。その後、移動相 B を 5%に下げて 2 分間、平衡化の後、次の分析に移行した。MRM の検出条件は quinidine、*O*-desmethyl quinidine、3-hydroxy quinidine、quinidine N-oxide 及び quinidine-d3 に対してそれぞれ、m/z 325.20 → 184.23、311.20 → 146.18、341.20 → 198.22、341.22 → 186.23 及び 328.30 → 187.24 とした。検量線の濃度範囲は 0.1 及び 1mg 投与群で 0.005~10 ng/mL、10 及び 100mg 投与群で 1~1000 ng/mL とした。

### 1.2.5 Verapamil 及びその代謝物の血漿中薬物濃度測定

血漿中の verapamil 及び主要な代謝物(norverapamil)の濃度測定は LC-MS/MS を用いて積水メディカル株式会社にて実施した。500 µL の血漿試料に 50 µL の内部標準溶液(verapamil-d6 hydrochloride)、2 mL のアセトニトリルを添加し振とうした。混合物は 1,800×g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。上清を 40°C で N<sub>2</sub>気流下、蒸発乾固した。メタノールを添加し(0.1 及び 3mg 投与群 : 100 µL、16 及び 80mg 投与群 : 500 µL)、再溶解した。溶液を攪拌したのち、20,400×g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。上清を測定試料として LC-MS/MS へ注入した。注入量は、0.1 及び 3mg 投与群で 10 µL、16 及び 80mg 投与群で 2 µL とした。Verapamil 及び norverapamil は 0.1%(v/v)ギ酸(移動相 A)及びアセトニトリル(移動相 B)によるグラジエント

分析により分離した。流速は 0.80 mL/min とし、グラジエント条件は移動相 B の割合を 0~0.5min の間に 5%、0.5~1.2min の間に 33%、1.2~2.0min で 85%まで上昇させ、2.0~2.5min の間に 85% で維持した。その後、移動相 B を 5%に下げて 2 分間、平衡化の後、次の分析に移行した。MRM の検出条件は verapamil、norverapamil 及び verapamil-d6 に対してそれぞれ、m/z455.5 → 165.1、441.1 → 165.2 及び 461.4 → 165.1 とした。検量線の濃度範囲は 0.1 及び 3mg 投与群で 0.001~1 ng/mL、16 及び 80mg 投与群で 0.5~300 ng/mL とした。

#### 1.2.6 薬物動態学的解析

Quinidine 及び verapamil の薬物動態学的パラメータは、WinNonlin 5.0.1 (Certara, Princeton, NJ) を使用して算出した。算出の対象は、 $C_{max}$ 、 $t_{max}$ 、 $AUC_{0-12}$ 、 $AUC_{inf}$ 及び  $t_{1/2}$ とした。対数変換した消失相の採血点から直線部分を自動的に判別し、自然対数に変換した濃度値から直線回帰し消失速度定数( $k_e$ )を算出した。 $t_{1/2}$ は以下の計算式から算出した。

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e} \quad \text{式 1}$$

$AUC_{0-12}$ は線形台形法により、 $AUC_{inf}$ は線形台形法と対数台形法を組み合わせ、定量可能な最終時点の血漿中濃度を  $k_e$ で割ることにより無限時間まで外挿して算出した。



### 1.2.7 CYP3A4 を介した代謝反応を定量化するための in vitro 代謝実験

Quinidine 及び verapamil の CYP3A4 を介した代謝反応の速度論パラメータを過去に報告されている substrate depletion 法<sup>37</sup>を使って評価した。ヒトリコンビナント CYP3A4 発現ミクロソーム (Corning Inc., Corning, NY) と基質の quinidine sulfate dehydrate (Sigma Chemical, St Louis, MO) または verapamil hydrochloride (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を 3.3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> を含む 100 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中でインキュベートした。ヒトリコンビナント CYP3A4 発現ミクロソームは異なる濃度の quinidine (5–500 μmol/L) または verapamil (0.5–100 μmol/L) と 37°C、5 分間プレインキュベーションし、1.3 mmol/L となるように nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を添加することで反応を開始した。反応開始直後、反応開始後 2、5、10、20、40 分後に反応液の一部 (0.05 mL) を採取し、内部標準物質として 300 μmol/L dextromethorphan を含むアセトニトリルと氷冷下で混合し、反応を停止させた。混合液は、20,400×g、4°C で 5 分間、遠心分離し、上清を採取した。上清は 5 mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.1) / アセトニトリル (70/30, v/v)、または、0.1% ギ酸 / アセトニトリル (60/40, v/v) で希釈し、LC-MS/MS にて quinidine 及び verapamil 濃度を定量した。

### 1.2.8 CYP3A4 を介した代謝反応の速度論パラメータの解析

親化合物である quinidine 及び verapamil の実験系からの depletion 速度定数 ( $k_{\text{dep}}$ ) を評価するために、経時的な親化合物の系内残存率のデータを一次速度式にフィッティングさせ算出した。反

応開始直後の経過時間に従った線形な消失が維持される時点までを解析の対象とした。In vitro

実験での代謝固有クリアランス( $CL_{int}$ ; mL/min/pmol CYP3A4)は以下の式に従って算出した。

$$CL_{int} = \frac{k_{dep} \times \text{medium volume}(0.5\text{mL})}{10 \text{ pmol CYP3A4}} \quad \text{式 2}$$

CYP3A4 を介した代謝反応の Michaelis 定数( $K_m$ )は、基質濃度依存的な  $CL_{int}$  のデータに、以下の式を適用したフィッティングによって算出した。1 相性の代謝反応を示した quinidine は式 3、2 相性の代謝反応を示した verapamil は式 4 を適用した。

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{S + K_m} \quad \text{式 3}$$

$$CL_{int} = \frac{V_{max,1}}{S + K_{m,1}} + \frac{V_{max,2}}{S + K_{m,2}} \quad \text{式 4}$$

ここで、 $S$  は反応液中の基質薬物の初濃度、 $V_{max}$  は最大 depletion 速度とした。MULTI プログラム<sup>38</sup>を使って、 $K_m$  及び  $V_{max}$  を最小二乗法により算出した。

## 1.3 結果

### 1.3.1 被験者の背景

最終的に quinidine 投与群には 7 名、verapamil 投与群には 8 名の被験者が登録された。各群そ

れぞれで、被験者の年齢は  $27 \pm 4$  歳及び  $26 \pm 3$  歳(mean  $\pm$  SD)、BMI は  $21.8 \pm 2.5$  kg/m<sup>2</sup>及び  $20.7 \pm 1.4$  kg/m<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SD)であった。

### 1.3.2 投与量依存的な quinidine の薬物動態

各投与量における quinidine 及び3種の代謝物の薬物動態学的パラメータを Table 1 に示す。最小投与量の 100 $\mu$ g を投与時、代謝物である *O*-desmethyl quinidine の血漿中濃度は、定量下限値未満(<0.01 ng/mL)となった(Figure 1)。その他、quinidine 及び3種の主要な代謝物の血漿中薬物濃度は、全ての被験者で、最終採血時点の投与 12 時間後まで検出可能であった。投与量で規格化した  $C_{max}$  は、100  $\mu$ g 投与時に対して 1、10 及び 100 mg 投与時で、それぞれ 1.34、1.97 及び 2.99 倍に上昇した(Table 1)。投与量で規格化した  $AUC_{0-12}$  は、100  $\mu$ g 投与時に対し 1、10 及び 100 mg 投与時で、それぞれ 1.29、1.82 及び 2.56 倍となり、投与量依存的に上昇した(Table 1、Figure 3A)。代謝物については、3-hydroxy quinidine 及び quinidine N-oxide の投与量で規格化した  $AUC_{0-12}$  は、100  $\mu$ g 投与時に対し 100 mg 投与時で、それぞれ 3.80 及び 3.24 倍に上昇した。一方、*O*-desmethyl quinidine の投与量で規格化した  $AUC_{0-12}$  は、投与量依存的に低下した。

### 1.3.3 投与量依存的な verapamil の薬物動態

各投与量における verapamil 及びその代謝物 norverapamil の薬物動態学的パラメータを Table 2 に示す。Verapamil 及び norverapamil の血漿中薬物濃度は、全ての被験者で、最終採血時点の投

与 12 時間後まで検出可能であった(Figure 2)。投与量で規格化した  $C_{max}$  は、100  $\mu\text{g}$  投与時に対して 3、16 及び 80 mg 投与時で、それぞれ 1.02、1.92 及び 2.34 倍に上昇した。投与量で規格化した  $AUC_{0-12}$  は、100  $\mu\text{g}$  投与時に対し 3、16 及び 80 mg 投与時で、それぞれ 1.19、1.83 及び 2.30 倍となり、投与量依存的に上昇した(Table 2、Figure 3B)。代謝物については、norverapamil の投与量で規格化した  $AUC_{0-12}$  は、投与量依存的に上昇し、100  $\mu\text{g}$  投与時に対し 80 mg 投与時で、1.89 倍の上昇であった。

#### 1.3.4 CYP3A4 を介した代謝反応を定量化するための *in vitro* 代謝実験

Quinidine 及び verapamil の代謝固有クリアランスは、メディウム中濃度に依存して飽和性を示した(Figure 4)。Quinidine の代謝は 1 相性の飽和を示し、 $K_m$  及び  $V_{max}$  は、それぞれ  $7.48 \pm 1.03 \mu\text{mol/L}$  及び  $0.0344 \pm 0.0019 \text{ nmol/min/pmol CYP}$  (mean  $\pm$  computer-calculated SD)であった。一方で、verapamil の代謝は 2 相性の飽和が観察され、高親和性サイトの  $K_m$  及び  $V_{max}$  は、 $0.726 \pm 0.274 \mu\text{mol/L}$  及び  $0.0208 \pm 0.0050 \text{ nmol/min/pmol CYP}$ 、低親和性サイトの  $K_m$  及び  $V_{max}$  は、 $16.3 \pm 4.8 \mu\text{mol/L}$  及び  $0.0483 \pm 0.0042 \text{ nmol/min/pmol CYP}$  であった。

### 1.4 考察

本章では、臨床において消化管の CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送過程の飽和に起因し、薬物動態の非線形性が観察されることを実証すべく、臨床試験を実施した。CYP3A 及

び P-gp の両方の基質となる薬物の quinidine 及び verapamil を、健康成人男性を対象に単回経口投与し、用量依存的な薬物動態パラメータの変動を評価した。その結果、quinidine 及び verapamil の投与量で規格化した  $AUC_{0-12}$  は、いずれも投与量依存的に上昇し、薬物動態の非線形性が認められた。

#### 1.4.1 肝臓の CYP3A 代謝飽和が基質薬物の血中濃度上昇に及ぼす影響

CYP3A は小腸に発現し薬物吸収を抑制する役割を果たすと同時に、肝臓中にも非常に多く発現し、肝初回通過時における主要な薬物代謝酵素としても機能する。そのため、本臨床試験で認められた薬物動態の非線形性における肝臓 CYP3A 代謝の飽和の影響を推察した。まず、quinidine および verapamil の  $t_{1/2}$  は投与量の増加にかかわらず、一定の値を示し、肝臓の CYP3A による代謝過程は飽和していないことが考えられた。さらに、両薬物の最大の投与量での理論的に考える肝臓入口の最大非結合形薬物濃度 ( $C_{u,in \max}$ )<sup>39</sup> を以下の式から算出し、in vitro 実験から評価した CYP3A の  $K_m$  値と比較することで、肝臓における CYP3A 代謝反応の飽和性について推定した。

$$C_{u,in \max} = C_{\max,u} + \frac{k_a \times F_a F_g \times f_u / R_b \times \text{dose}}{Q_h} \quad \text{式 5}$$

式中で、 $C_{\max,u}$  は非結合形の最大血漿中薬物濃度、 $k_a$  は吸収速度定数、 $F_a F_g$  は消化管吸収率×消化管アベイラビリティ、 $f_u$  は血漿中蛋白非結合形薬物分率、 $R_b$  は血液－血漿中薬物濃度比、dose

は投与量、 $Q_h$ は肝血流速度を表す。 $C_{\max,u}$ は、本研究で実測した $C_{\max}$ と、報告されている $f_u$ の値 [Quinidine:0.23<sup>40</sup>、Verapamil:0.1<sup>41</sup>]から算出した。 $k_a$ は、相互作用リスクを最大化して評価することを意図して、理論上の最大値である胃内容排出時間を考慮し $6\text{ h}^{-1}$ と仮定した。 $F_aF_g$ は、本研究の経口投与時の薬物動態パラメータと報告されている静脈内投与時の薬物動態パラメータ<sup>42,43</sup>から算出した (Quinidine: 0.404、Verapamil: 0.529)。 $Q_h$ は $20.7\text{ mL/min/kg}$ とし<sup>44</sup>、体重は各投与群の平均体重とした(Quinidine: 62.9 kg、Verapamil: 64.3 kg)。 $R_b$ は1と仮定した。これらのパラメータを使って算出した $C_{u,\text{in max}}$ は、quinidine 及び verapamil について、2.00 及び 0.661  $\mu\text{mol/L}$ であった。これらは、いずれも *in vitro* 実験から求められた CYP3A4 の  $K_m$ である 7.48 及び 0.726  $\mu\text{mol/L}$  より低く、肝臓の CYP3A4 を介した代謝はほぼ飽和していないと推定された。すなわち、本臨床試験で観察された薬物動態の非線形性は、主に消化管吸収過程での CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送の飽和に起因することが示唆された。

## 1.5 小括

本章での検討により、CYP3A/P-gp 基質薬物から、消化管吸収過程の飽和に起因する非線形薬物動態が想定された quinidine 及び verapamil を選定し、ヒト臨床試験にて実際に薬物動態が投与量依存的に非線形性を示すことを実証した。両薬物とも、 $C_{u,\text{in max}}$ は、*in vitro* 実験により得られた CYP3A の  $K_m$ より低値であることから、薬物動態の非線形性は、主に消化管の CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送の飽和に起因すると考えられた。

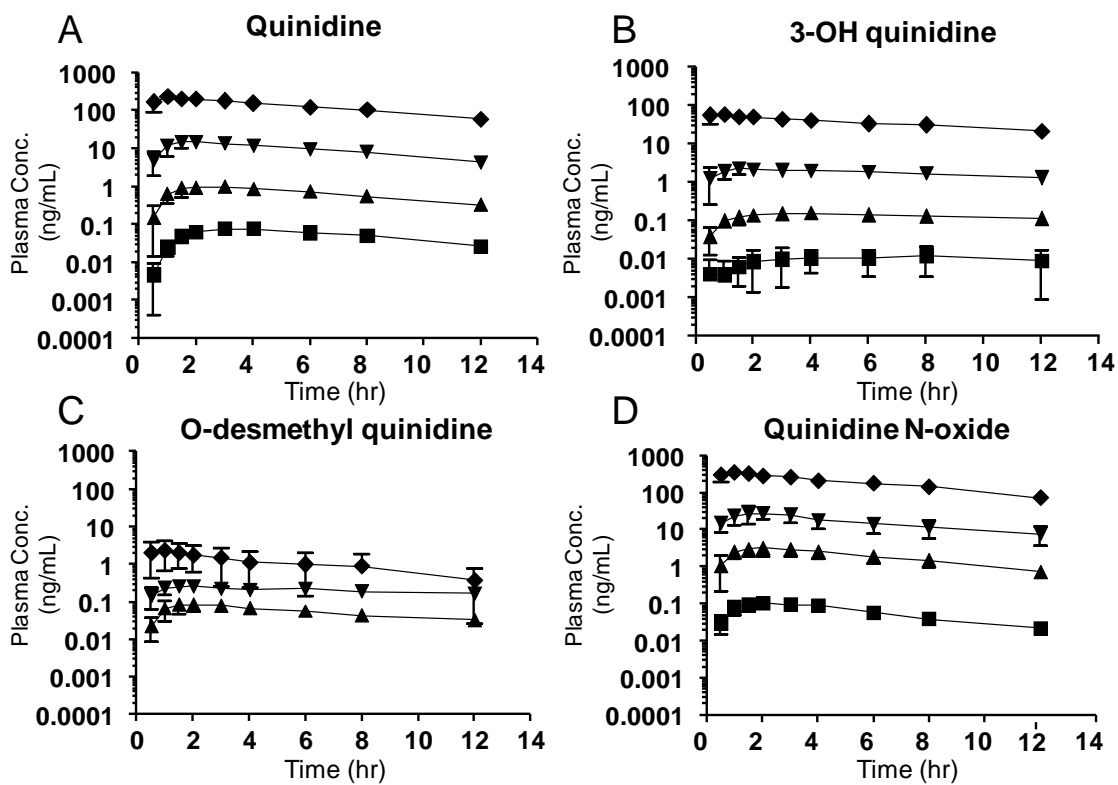


Figure 1 Dose-dependent pharmacokinetics of quinidine and its metabolites.

Plasma concentrations of (A) quinidine and its metabolites (B) 3-OH quinidine, (C) O-desmethyl quinidine, and (D) quinidine N-oxide were measured after the oral administration of several doses of quinidine (100 µg (squares), 1 mg (triangles), 10 mg (inverted triangles), 100 mg (diamonds); n = 7). Each point represents a mean value ± SD.

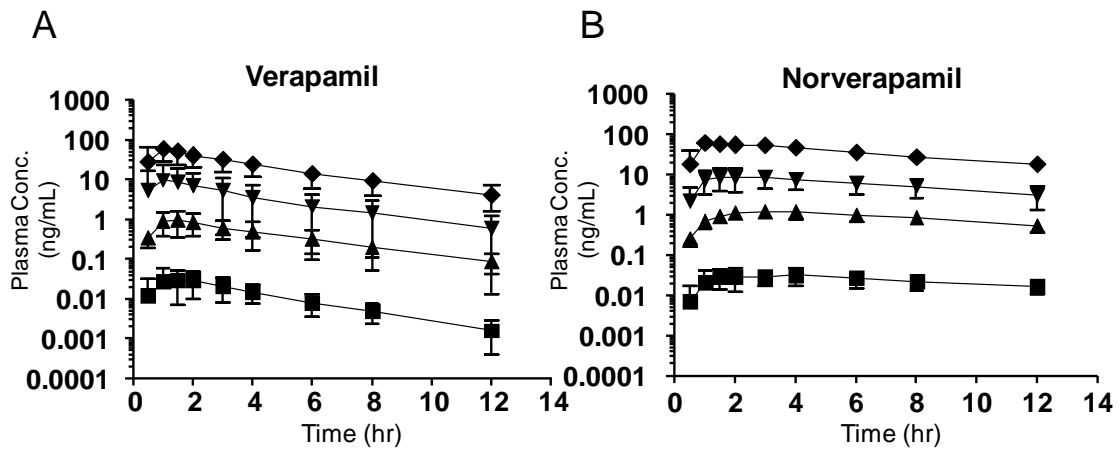


Figure 2 Dose-dependent pharmacokinetics of verapamil and its metabolite.

Plasma concentrations of (A) verapamil and (B) its metabolite (norverapamil) were measured after the oral administration of several doses of verapamil (100 µg (squares), 3 mg (triangles), 16 mg (inverted triangles), 80 mg (diamonds); n = 8). Each point represents a mean value ± SD.



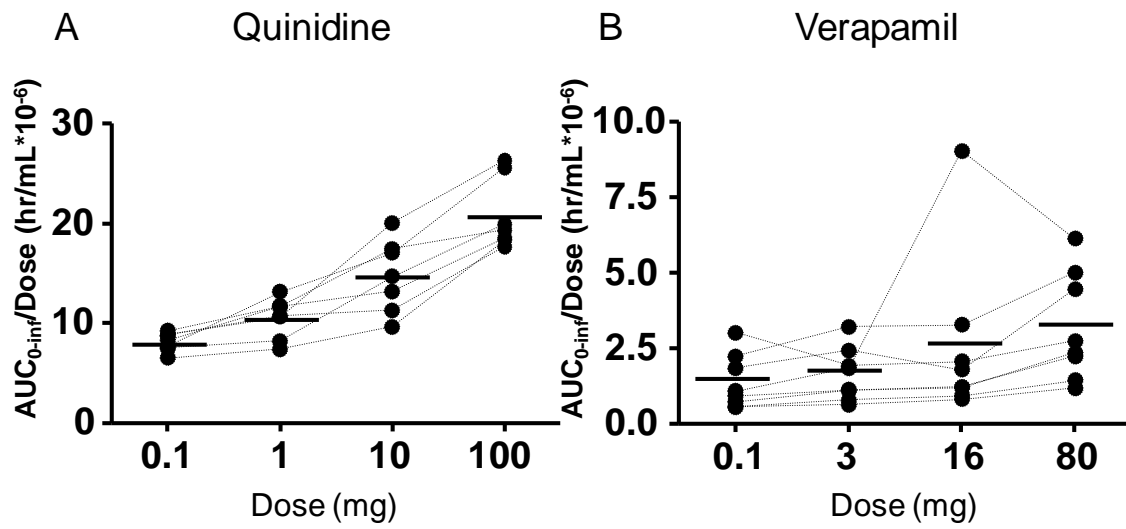


Figure 3 Dose-normalized  $AUC_{0-\infty}$  for quinidine and verapamil.

The  $AUC_{0-\infty}$  for (a) quinidine and (b) verapamil, normalized by dose, were plotted. The filled circles represent the dose-normalized  $AUC$  values for individual subjects, and the plots relating to a given subject are connected with dotted lines. The horizontal lines at each column indicate the mean value of the dose-normalized  $AUC$  for each dose.

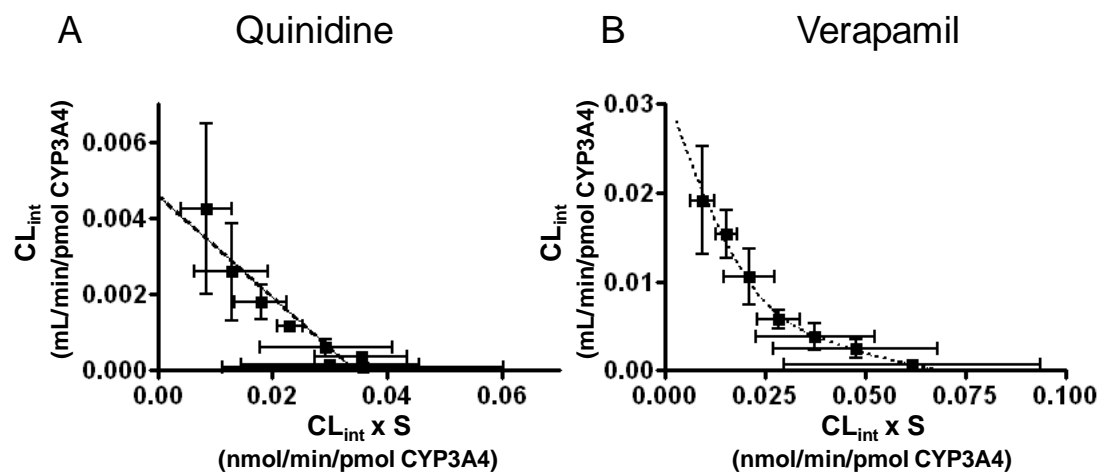


Figure 4 Saturation kinetics of the metabolic clearance of quinidine and verapamil by recombinant human CYP3A4.

The concentration- dependence of the CYP3A4-mediated metabolism of (A) quinidine (5–500  $\mu\text{mol/L}$ ) and (B) verapamil (0.5–100  $\mu\text{mol/L}$ ) were determined using recombinant human CYP3A4 enzyme and are shown as Eadie–Hofstee plots. The solid lines represent the fitted lines based on Eq. 3 (A) or Eq. 4 (B). Each data point and bar represent a mean value  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Table 1 Pharmacokinetic parameters of quinidine and its metabolites

(A) Quinidine

		100 µg		1 mg		10 mg		100 mg	
$C_{max}$	(ng/mL)	0.0816	± 0.0138	1.09	± 0.33	16.1	± 5.0	244	± 46
$t_{max}$	(hr)	3.4	± 0.5	2.5	± 1.0	2.0	± 0.5	1.3	± 0.5
$AUC_{0-12}$	(ng*hr/mL)	0.614	± 0.074	7.73	± 1.81	113	± 26	1590	± 240
$AUC_{inf}$	(ng*hr/mL)	0.813	± 0.096	10.5	± 2.0	148	± 37	2080	± 360
$t_{1/2}$	(hr)	5.07	± 0.87	5.73	± 1.23	5.24	± 0.64	5.59	± 0.57
$C_{max}/Dose$	(mL <sup>-1</sup> *10 <sup>-6</sup> )	0.816	± 0.138	1.09	± 0.33	1.61	± 0.50	2.44	± 0.46
$AUC_{0-12}/Dose$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	6.14	± 0.74	7.73	± 1.81	11.3	± 2.6	15.9	± 2.4
$AUC_{inf}/Dose$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	8.13	± 0.96	10.5	± 2.0	14.8	± 3.7	20.8	± 3.6

(B) 3-OH Quinidine

		100 µg		1 mg		10 mg		100 mg	
$C_{max}$	(ng/mL)	0.0132	± 0.0089	0.172	± 0.036	2.58	± 0.74	63.9	± 19.3
$t_{max}$	(hr)	6.4	± 2.1	3.9	± 1.1	1.9	± 1.1	1.0	± 0.7
$AUC_{0-12}$	(ng*hr/mL)	0.116	± 0.087	1.57	± 0.35	21.2	± 5.6	441	± 82
$C_{max}/Dose$	(mL <sup>-1</sup> *10 <sup>-6</sup> )	0.132	± 0.089	0.172	± 0.036	0.258	± 0.074	0.639	± 0.193
$AUC_{0-12}/Dose$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	1.16	± 0.87	1.57	± 0.35	2.12	± 0.56	4.41	± 0.82

Table 1 (Continued)

## (C) O-desmethyl Quinidine

		100 µg	1 mg			10 mg			100 mg		
$C_{\max}$	(ng/mL)	ND	0.0976	±	0.0276	0.290	±	0.068	2.58	±	1.59
$t_{\max}$	(hr)	ND	1.9	±	0.8	2.2	±	1.7	1.3	±	0.6
$AUC_{0-12}$	(ng*hr/mL)	ND	0.650	±	0.181	2.44	±	0.58	13.0	±	11.0
$C_{\max}/\text{Dose}$	(mL <sup>-1</sup> *10 <sup>-6</sup> )	ND	0.0976	±	0.0276	0.0290	±	0.0068	0.0258	±	0.0159
$AUC_{0-12}/\text{Dose}$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	ND	0.650	±	0.181	0.244	±	0.058	0.130	±	0.110

## (D) Quinidine N-oxide

		100 µg	1mg			10mg			100mg				
$C_{\max}$	(ng/mL)	0.116	±	0.034	3.68	±	1.29	30.3	±	12.5	394	±	97
$t_{\max}$	(hr)	2.3	±	1.1	2.1	±	0.6	1.7	±	0.4	1.2	±	0.5
$AUC_{0-12}$	(ng*hr/mL)	0.701	±	0.149	22.7	±	7.9	188	±	79	2270	±	500
$C_{\max}/\text{Dose}$	(mL <sup>-1</sup> *10 <sup>-6</sup> )	1.16	±	0.34	3.68	±	1.29	3.03	±	1.25	3.94	±	0.97
$AUC_{0-12}/\text{Dose}$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	7.01	±	1.49	22.7	±	7.9	18.8	±	7.9	22.7	±	5.0

Table 2 Pharmacokinetic parameters of verapamil and its metabolite

(A) verapamil

		100 µg		3 mg		16 mg		80 mg	
$C_{\max}$	(ng/mL)	0.0338	± 0.0292	1.03	± 0.64	10.4	± 12.6	63.3	± 34.2
$t_{\max}$	(hr)	1.7	± 0.4	1.4	± 0.4	1.3	± 0.3	1.0	± 0.3
$AUC_{0-12}$	(ng*hr/mL)	0.132	± 0.087	4.54	± 2.48	38.1	± 41.3	236	± 131
$AUC_{\text{inf}}$	(ng*hr/mL)	0.139	± 0.090	4.95	± 2.68	40.8	± 43.9	256	± 143
$t_{1/2}$	(hr)	2.48	± 0.35	3.29	± 0.38	3.04	± 0.22	3.21	± 0.31
$C_{\max}/\text{Dose}$	(mL <sup>-1</sup> *10 <sup>-6</sup> )	0.338	± 0.292	0.344	± 0.213	0.649	± 0.788	0.791	± 0.428
$AUC_{0-12}/\text{Dose}$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	1.32	± 0.87	1.51	± 0.83	2.38	± 2.58	2.95	± 1.64
$AUC_{\text{inf}}/\text{Dose}$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	1.39	± 0.90	1.65	± 0.89	2.55	± 2.74	3.20	± 1.79

(B) norverapamil

		100 µg		3mg		16mg		80mg	
$C_{\max}$	(ng/mL)	0.0342	± 0.0162	1.29	± 0.39	9.96	± 4.70	67.2	± 17.4
$t_{\max}$	(hr)	2.9	± 1.3	3.4	± 0.7	1.9	± 1	1.3	± 0.7
$AUC_{0-12}$	(ng·hr/mL)	0.285	± 0.135	10.5	± 3.1	70.6	± 35.4	430	± 124
$C_{\max}/\text{Dose}$	(mL <sup>-1</sup> *10 <sup>-6</sup> )	0.342	± 0.162	0.430	± 0.130	0.622	± 0.294	0.840	± 0.218
$AUC_{0-12}/\text{Dose}$	(hr/mL*10 <sup>-6</sup> )	2.85	± 1.35	3.51	± 1.03	4.42	± 2.21	5.38	± 1.55

## 第2章

### ACAT モデルを用いた CYP3A/P-gp 基質薬物の 消化管吸収率の非線形性に関する定量的予測法の構築

#### 2.1 目的

In vivo での代謝酵素/トランスポーターの機能は、理論的には、in vitro の活性を in vivo の組織中での発現量と in vitro 実験系での発現量の比を用いてスケールアップすることで推定可能である。しかしながら、実際には、CYP を介した肝代謝クリアランス<sup>45-47</sup>や肝トランスポーターによる取り込み輸送<sup>48</sup>を考慮した in vitro-in vivo extrapolation 法の予測においては、しばしば”empirical scaling factor”を設定することによってはじめて予測精度が改善されるとする報告が見受けられる。この原因には、前述のとおり、1. 実験条件が速度論パラメータの評価に影響を与えること、2. 組織中の絶対的発現量の評価することの困難さが挙げられる。そこで本章では、これらの課題を克服し、数理モデルを用いて、消化管での CYP3A を介した代謝、P-gp を介した輸送過程を考慮し、消化管吸収率を定量的に予測可能な方法論を構築することを目的とした。さらに、非線形性を示す薬物の消化管吸収動態の予測性も検討した。

## 2.2 方法

### 2.2.1 試薬類

Felodipine、midazolam、triazolam、verapamil hydrochloride は FUJIFILM Wako Pure Chemical(Osaka、Japan)より購入した。Digoxin、quinidine sulfate dehydrate salt は Sigma-Aldrich(St. Louis、MO)より購入した。Sildenafil citrate、talinalolol、fexofenadine hydrochloride は Toronto Research Chemicals(North York、Canada)より購入した。Celiprolol hydrochloride は AvaChem Scientific(San Antonio、TX)より購入した。Indinavir、saquinavir mesylate は U.S. Pharmacopeial Convention (Rockville、MD)より購入した。Recombinant human CYP3A4 及び CYP3A5 supersomes は Corning より購入した。Human intestine homogenate は Biopredic International (Rennes、France)より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium with 4500 mg/L glucose、nonessential amino acids、penicillin-streptomycin solution は Thermo Fisher Scientific(Waltham、MA)より購入した。

### 2.2.2 CYP3A を介した代謝反応の速度論パラメータ取得のための *in vitro* 代謝実験

CYP3A4 を介した代謝反応の速度論パラメータは、substrate depletion 法<sup>37</sup>を使って評価した。ヒトリコンビナント CYP3A4 発現マイクロソームと基質薬物を 3.3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>を含む 100 mmol/L リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中で 37°C、5 分間インキュベートした。基質薬物の濃度は、それぞれ、0.03–10 mmol/L; felodipine、0.05–5 mmol/L; midazolam、0.03–30 mmol/L; sildenafil、0.5–100 mmol/L; triazolam、0.03–10 mmol/L; indinavir、2–100 mmol/L; quinidine、0.03–10 mmol/L;

saquinavir 及び 0.5–50 mmol/L; verapamil とした。終濃度が 1.3 mmol/L となるように NADPH を系に添加することで反応を開始した。反応開始直後、反応開始後 0.5、1、2、5、10、20 分後に反応液の一部(0.05 mL)を採取し、内部標準物質を含むアセトニトリルと氷冷下で混合し、反応を停止させた。内部標準物質は、triazolam (felodipine 及び midazolam 測定用)、diazepam (sildenafil 測定用)、saquinavir (indinavir 測定用)、dextromethorphan (verapamil 及び quinidine 測定用)、indinavir (saquinavir 測定用)とした。混合液を、20,400×g、4°C で 5 分間、遠心分離し、上清を採取した。LC-MS/MS にて上清中の基質薬物濃度を定量した。加えて、ミクロソームへの非特異的な結合の影響について超遠心法により検討した。各基質薬物は、ヒトリコンビナント CYP3A4 発現ミクロソームと 3.3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>を含む 100 mmol/L リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中で 37°C、5 分間インキュベートした。反応液を 105,000×g、4°C で 60 分間遠心分離して、上清を採取し、LC-MS/MS にて上清中の基質薬物の濃度を定量した。CYP3A4 を介した代謝反応の Michaelis 定数(K<sub>m</sub>)は、基質濃度依存的な CL<sub>int</sub>のデータを用いて、以下の式に対してフィッティングすることにより算出した。CL<sub>int</sub>は、ミクロソーム中の非結合形薬物分率によって補正した非結合形薬物濃度を基にして算出した。2 相性の飽和が観察された verapamil は式 4、それ以外の 1 相性の飽和が観察された基質薬物については式 3 を適用した。

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{S + K_m} \quad \text{式 3}$$

$$CL_{int} = \frac{V_{max,1}}{S + K_{m,1}} + \frac{V_{max,2}}{S + K_{m,2}} \quad \text{式 4}$$



ここで、 $S$  は反応液中の基質薬物の初濃度、 $V_{\max}$  は最大 depletion 速度とした。MULTI プログラム<sup>38</sup>を使って、 $K_m$  及び  $V_{\max}$  を最小二乗法により算出した。

### 2.2.3 細胞培養

Caco-2 細胞は、東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室から譲り受けた。Caco-2 細胞は、10% fetal bovine serum、1% nonessential amino acids、100 U/mL penicillin 及び 100 mg/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium を用いて 5% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーター中で 37°C にて培養した。細胞は、80% 程度の confluency に達する直前に 0.25% trypsin-EDTA にて剥離し、1:5 の比率で継代を行なった。Caco-2 細胞単層膜を調製する際は、懸濁した Caco-2 を  $4 \times 10^4$  cells/insert で Corning 24-well Transwell plate (表面積 0.33 cm<sup>2</sup>、直径 6.5 mm、Corning) に播種した。播種後、2 日間に 1 回の頻度で培地交換した。Caco-2 細胞は培養を継続することで細胞間にタイトジャンクションを形成し、apical 側/basal 側が区別された極性のある単層膜を形成する。21~25 日間培養後の Caco-2 細胞単層膜を輸送実験に使用した。

### 2.2.4 Caco-2 細胞単層膜による P-gp を介した輸送の速度論パラメータ取得のための in vitro

#### 輸送実験

Transwell 中の培地を 10 mM HEPES を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS, apical 側; pH6.5、

basal 側; pH7.4)に交換し、Caco-2 細胞単層膜を 30 分間、37°C でプレインキュベーションした。

その後、Millicell-ERS system (Millipore Co., Bedford, MA)を使用して、経上皮電気抵抗値を測定した。Caco-2 細胞単層膜の経上皮電気抵抗値が 300  $\Omega\text{cm}^2$ を超えるものを輸送実験に使用した。基質薬物及び濃度範囲は、それぞれ、celiprolol; 10–1000  $\mu\text{mol/L}$ 、digoxin; 0.3–30  $\mu\text{mol/L}$ 、fexofenadine; 1–300  $\mu\text{mol/L}$ 、talinalol; 3–1000  $\mu\text{mol/L}$ 、indinavir; 1–30  $\mu\text{mol/L}$ 、quinidine; 0.3–100  $\mu\text{mol/L}$ 、saquinavir; 1–30  $\mu\text{mol/L}$  及び verapamil; 0.3–100  $\mu\text{mol/L}$  とした。基質薬物を含む HBSS(pH 6.5)を apical 側へ 0.25 mL 添加し、反応を開始した。同時に、P-gp 阻害剤である verapamil を 100  $\mu\text{mol/L}$  の濃度で apical 側に添加した条件も加えて受動拡散による膜透過性とした。37°C で 30、60 および 90 分間インキュベーション後、basal 側から 0.1 mL の培地を採取し、薬物濃度測定用の試料とした。試料採取の直後に HBSS(pH7.4) 0.1 mL を basal 側へ添加して減少した培地を補った。試料中の薬物濃度は LC-MS/MS を使用して測定した。見かけの膜透過係数( $P_{\text{app}}$ , cm/s)は次式により算出した。

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0} \quad \text{式 6}$$

ここで、 $dQ/dt$  は膜透過速度(mol/min)、 $A$  はカルチャーインサートの表面積(0.33  $\text{cm}^2$ )、 $C_0$ は apical 側の初濃度( $\mu\text{mol/L}$ )を表す。P-gp を介した輸送の速度論パラメータは、濃度依存的な  $P_{\text{app}}$  から評価した。非結合形薬物濃度基準の  $K_m$  値は、既報の以下に示すモデル解析の手法<sup>49</sup>を使って算出した。Apical 側から basal 側への膜透過クリアランス( $PS_{\text{AB}}$ )は式 7 及び 8 で表される。従

って、式9へのフィッティングにより、P-gpを介した輸送の $K_m$ 値を算出した。

$$PS_{AB} = \frac{PS_1 \times PS_3}{PS_2 + PS_3 + PS_{P-gp}} \quad \text{式7}$$

$$PS_{AB} = P_{app,AB} \times A \quad \text{式8}$$

$$PS_{AB} = \frac{PS_3 \left[ PS_1 \times C_0 - (PS_2 + PS_3) \times K_m - V_{max} + \sqrt{\{PS_1 \times C_0 - (PS_2 + PS_3) \times K_m - V_{max}\}^2 + 4PS_1 \times (PS_2 + PS_3) \times K_m \times C_0} \right]}{2(PS_2 + PS_3) \times C_0}$$

式9

ここで、 $PS_1$ は apical 側から細胞内への受動拡散による膜透過クリアランス、 $PS_2$ は細胞内から apical 側への受動拡散による膜透過クリアランス、 $PS_3$ は細胞内から basal 側への受動拡散による膜透過クリアランス、 $PS_{P-gp}$ は細胞内から apical 側への P-gp を介した輸送による膜透過クリアランスであり、それぞれの基質において  $PS_1=PS_2=PS_3$ と仮定した。各基質薬物の濃度依存的な  $PS_{AB}$  のデータに基づき、 $K_m$ 、 $V_{max}$  および  $PS_1$  の3種のパラメータをフィッティングにより算出した。Celiprolol、digoxin 及び saquinavir は、濃度依存的な  $PS_{AB}$  の飽和性が観察されなかった。

式7において  $PS_{P-gp}=0$  としたとき、 $PS_{AB}$  は以下の式に簡略化することができる。

$$PS_{AB} = \frac{1}{2} \times PS_1 \quad \text{式10}$$

式に従うと、100  $\mu\text{mol/L}$  verapamil 存在下の P-gp を阻害した条件下の  $PS_{AB}$  は、受動拡散によ

る膜透過クリアランスの半分である。そのため、飽和性が観察されなかった化合物では  $PS_1=2 \times PS_{AB}$  に固定し、 $PS_{P-gp}$  ( $V_{max}/K_m$ ) をフィッティングによって算出した。フィッティング計算は SAAMII version 1.2 (The Epsilon Group, Charlottesville, VA) の numerical mode を使用して実行した。

### 2.2.5 受動拡散による見かけの膜透過係数の評価

Caco-2 細胞単層膜を用いて  $P_{app}$  を評価した。実験方法は「2.2.4 Caco-2 細胞単層膜による P-gp を介した輸送の速度論パラメータ取得のための in vitro 輸送実験」に記載した方法に従った。In vitro 実験で評価した  $P_{app}$  をヒト小腸での effective permeability ( $P_{eff}$ ) へ変換して ACAT model に適用した。GastroPlus にはあらかじめヒトで実測された  $P_{eff}$  がデータベース化された化合物 (reference compounds) が登録されている。Reference compounds の中から、低膜透過性の atenolol、cimetidine 及び ranitidine、中程度の metoprolol 及び propranolol、高膜透過性の ketoprofen 及び verapamil を選択し  $P_{app}$  を評価した。 $P_{app}$  から  $P_{eff}$  へ変換する方法は「2.2.10 ACAT model による解析」に示す。薬物及び添加濃度は felodipine; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、midazolam; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、sildenafil; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、triazolam; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、atenolol; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、cimetidine; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、ketoprofen; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、metoprolol; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、propranolol; 1  $\mu\text{mol/L}$  及び ranitidine; 100  $\mu\text{mol/L}$  とした。P-gp 基質薬物については、celiprolol; 10  $\mu\text{mol/L}$ 、digoxin; 30  $\mu\text{mol/L}$ 、fexofenadine; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、talinolol; 3  $\mu\text{mol/L}$ 、indinavir; 1  $\mu\text{mol/L}$ 、quinidine; 1  $\mu\text{mol/L}$  及び saquinavir; 1  $\mu\text{mol/L}$  とし、P-gp を阻害するために 100  $\mu\text{mol/L}$

verapamil を apical 側に添加した。それぞれの薬物を含む HBSS(pH6.5)を apical 側に添加し反応を開始した。37°C で 30、60 および 90 分間インキュベーション後、basal 側から各時点で 0.1 mL ずつの培地を採取し、薬物濃度測定用の試料とした。試料中の薬物濃度は LC-MS/MS を使用して測定した。

### 2.2.6 小腸上皮細胞におけるタンパク結合率の評価

小腸上皮細胞におけるタンパク結合率は Rapid Equilibrium Dialysis device (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)またはEquilibrium DIALYZER plate (Harvard Apparatus, Holliston, MA)を使用して平衡透析法により測定した。薬物及び最終添加濃度は、それぞれ、felodipine; 3  $\mu\text{mol/L}$ 、midazolam; 50  $\mu\text{mol/L}$ 、sildenafil; 10  $\mu\text{mol/L}$ 、triazolam; 50  $\mu\text{mol/L}$ 、celiprolol; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、digoxin; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、fexofenadine; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、talinalol; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、indinavir; 10  $\mu\text{mol/L}$ 、quinidine; 100  $\mu\text{mol/L}$ 、saquinavir; 10  $\mu\text{mol/L}$  及び verapamil; 100  $\mu\text{mol/L}$  とした。薬物を含む PBS(pH7.4)で希釈し、7、14 及び 21%のヒト小腸ホモジネートを調製した。薬物を含むヒト小腸ホモジネート溶液及び PBS(pH7.4)をそれぞれ平衡透析プレートにセットし、緩やかに混和しながら 37°C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、ヒト小腸ホモジネート溶液及び PBS の両側から 30  $\mu\text{L}$  の試料を採取し、内標準溶液を含むアセトニトリル 50  $\mu\text{L}$  と混合した。混合液は、20,400 $\times$ g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を採取した。LC-MS/MS にて上清中の薬物濃度を定量した。小腸上皮細胞における非結合形薬物分率( $f_{ue}$ )は Langmuir 式から導いた以下の式<sup>11</sup><sup>50</sup>に従

い、各希釈倍率での薬物濃度データを用いて定数  $B_{\max}/K_d$  を Excel 2007 で算出し、希釈倍率を 1 に外挿したときの  $C_b/C_u$  の値から算出した。

$$\frac{C_b}{C_u} = \frac{B_{\max}}{K_d} \times \text{dil} \quad \text{式 11}$$

ここで  $C_b$  は蛋白結合形薬物濃度、 $C_u$  は蛋白非結合形薬物濃度、 $B_{\max}$  は単位体積あたりの蛋白への薬物の結合サイト数、 $K_d$  は解離定数、dil はヒト小腸ホモジネートの希釈倍率を表す。

### 2.2.7 溶解度の評価

Felodipine、midazolam、sildenafil citrate、digoxin、fexofenadine hydrochloride、indinavir、quinidine sulfate、saquinavir 及び verapamil hydrochloride の溶解度における pH 依存性を評価した。0.1 mol/L 酢酸緩衝液(pH4 及び 5)、0.1 mol/L リン酸緩衝液(pH6、7 及び 8)、glycine-NaOH 緩衝液(pH9 及び 10)を調製した。pH の異なる緩衝液に薬物が完全に溶解しなくなるまでの量を添加し、24 時間、25°C でインキュベートした。インキュベーション終了後、懸濁液は 20,400×g、25°C で 5 分間遠心分離し、上清を採取した。さらに、上清を Millipore Millex-HA filter 0.45 μm でろ過した後、LC-MS/MS にてろ液中の薬物濃度を定量した。また、インキュベーション終了後の懸濁液の pH を、pH meter (Shindengen, Tokyo, Japan)を使用して測定した。異なる pH の溶解度データから、GastroPlus (Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA)に組み込まれた“Solubility vs. pH Model version 6.1”を使って pKa 及び solubility factor (解離型の溶解度/非解離型の溶解度の比と定義される)をフィッティングにより算出した。Triazolam、celiprolol 及び talinolol それぞれの pKa 及び solubility factor

は、報告されている溶解度<sup>51-53</sup>から算出した。

## 2.2.8 LC-MS/MS による薬物濃度測定

薬物濃度の測定には、Quattro micro API tandem mass spectrometer equipped with an alliance 2695 separation module (Waters, Milford, MA)、AB SCIEX QTRAP 5500 mass spectrometer (AB SCIEX, Foster City, CA) equipped with a prominence liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan)、AB SCIEX API-4000 mass spectrometer (AB SCIEX) equipped with a Agilent 1100 series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)の3種のLC-MS/MSシステムを使用した。MS/MS分析はelectrospray ionization ポジティブモードでイオン化し、MRMにてイオンを検出した。LC及びMRMの条件はTable 3に示した。採取した試料は、各測定条件の移動相で適宜、希釈した。Atlantis T3 カラム(2.1×50 mm, 5 µm; Waters)を接続したLC-MS/MSに10 µLの試料を注入し、測定した。各薬物の濃度測定範囲は、0.01~10 µmol/L (felodipine)、0.1~10 µmol/L (sildenafil)、1~1000 nmol/L (celiprolol)、0.1~100 nmol/L (digoxin)、0.3~300 nmol/L (fexofenadine)、1~300 nmol/L (talinolol)、0.003~10 µmol/L (indinavir)、1~3000 nmol/L (quinidine, verapamil)及び1~100 nmol/L (midazolam, triazolam, atenolol, cimetidine, ranitidine, metoprolol, propranolol, ketoprofen)とした。検量線の相関係数は、全ての分析で0.990より高い値であった。

### 2.2.9 臨床における消化管アベイラビリティの算出

全身クリアランス( $CL_{tot}$ )、腎クリアランス( $CL_r$ )及び血液-血漿中薬物濃度比( $R_b$ )は論文報告されている情報に基づき計算した。なお、 $CL_{tot}$ 、肝クリアランス( $CL_h$ )および  $CL_r$ は血液中薬物濃度基準のクリアランスに変換し取り扱った。バイオアベイラビリティ、肝アベイラビリティ、消化管吸収率×消化管アベイラビリティ( $F_aF_g$ )は、それぞれ以下の式に従って算出し、計算結果を Table 4 に示した。

$$F = \frac{AUC_{po} \times Dose_{iv}}{AUC_{iv} \times Dose_{po}} \quad \text{式 12}$$

$$CL_{tot} = \frac{Dose_{iv}}{AUC_{iv} \times R_b} \quad \text{式 13}$$

$$CL_h = CL_{tot} - CL_r \quad \text{式 14}$$

$$F_h = 1 - \frac{CL_h}{Q_h} \quad \text{式 15}$$

$$F_aF_g = \frac{F}{F_h} \quad \text{式 16}$$

ここで、 $AUC_{po}$ は経口投与したときの血漿中 AUC、 $AUC_{iv}$ は静脈内投与したときの血漿中 AUC、 $Dose_{po}$ は経口投与したときの投与量、 $Dose_{iv}$ は静脈内投与したときの投与量、 $CL_h$ は肝クリアランス、 $F_h$ は肝アベイラビリティ、 $Q_h$ は肝血流速度を表す。 $Q_h$ は、フェロジピンを除き  $25.5 \text{ mL/min/kg}$ <sup>54</sup>とした。一方、過去の報告によると、フェロジピンは経口投与後に  $Q_h$ を 1.7 倍に上昇させることがわかっており<sup>55</sup>、フェロジピンの  $F_h$ を算出する際には  $Q_h$ は



43.4 (=25.5×1.7) mL/min/kg とした。報告されている臨床試験の結果から算出した  $F_aF_g$  は”observed  $F_aF_g$ ”と定義し、Table 4 にまとめた。一方、in vitro 速度論パラメータを組み込んだ ACAT model から算出した  $F_aF_g$  は”predicted  $F_aF_g$ ”と定義した。臨床試験の報告において、被験者の体重が記載されていない場合、体重は 70 kg と仮定して計算した。Table 12 に示した celiprolol 及び saquinavir の dose-escalation 試験、並びに triazolam の臨床試験は非絶食の条件にて薬剤が経口投与されていた<sup>23,56,57</sup>。また、celiprolol 及び fexofenadine の臨床試験において、食事条件は不明であった<sup>58,59</sup>。Table 4 及び Table 12 に示した他のすべての臨床試験は絶食条件下で薬剤が経口投与されていた。

#### 2.2.10 ACAT model による解析

非線形性の薬物動態を考慮した  $F_aF_g$  値を定量的に評価するために、ACAT モデル解析用ソフトウェアの GastroPlus version 9 を使用した。ACAT model の設定として、human physiologic fasted model 及び Opt logD model を選択した。また、physiologic parameters (intestinal length, radius, pH, transit time 及び regional distribution factors for CYP3A4 及び P-gp) は GastroPlus version 6.1 で採用されている初期設定値とした (Table 5)。Table 4 及び Table 12 に示した臨床試験では、経口製剤として液剤、カプセル剤、錠剤が使用されており、controlled-release 製剤は使用されていなかった。そのため、すべての薬剤は速放錠として投与されたことと仮定し、ACAT model での計算する際には、製剤を immediate-release 製剤と設定した。すべての基質薬剤について、投与後 48 時間ま

での消化管内薬物動態を計算した。GastroPlusにおいて、消化管吸収の各素過程は以下の式で定義されている。

$$k_a = P_{\text{eff}} \times \frac{2\pi RL}{\pi R^2 L} \quad \text{式 17}$$

$$\frac{dM_{(j)\text{absorbed}}}{dt} = k_{a(j)} \times V_{(j)} \times (C_{(j)\text{lumen}} - f_u \times C_{(j)\text{ent}}) \quad \text{式 18}$$

$$\text{Gut metabolism rate} = \sum_j \sum_i \frac{V_{\text{max}}^i \times SF_{V_{\text{max}}} \times ESF_{ij} \times C_{\text{ent}}^j \times f_{\text{ue}}}{K_m^i \times SF_{K_m} \times C_{\text{ent}}^j \times f_{\text{ue}}} \quad \text{式 19}$$

$$\text{Gut influx rate} = \sum_j \sum_i \frac{V_{\text{max}}^i \times SF_{V_{\text{max}}}^{\text{in}} \times ESF_{ij} \times C_{\text{lumen}}^j}{K_m^i \times SF_{K_m}^{\text{in}} + C_{\text{lumen}}^j} \quad \text{式 20}$$

$$\text{Gut efflux rate} = \sum_j \sum_i \frac{V_{\text{max}}^i \times SF_{V_{\text{max}}}^{\text{ef}} \times ESF_{ij} \times C_{\text{ent}}^j \times f_{\text{ue}}}{K_m^i \times SF_{K_m}^{\text{ef}} + C_{\text{ent}}^j \times f_{\text{ue}}} \quad \text{式 21}$$

ここで、 $k_a$ は吸収速度定数、 $P_{\text{eff}}$ はヒト小腸での effective permeability、 $R$ は小腸の形状を円筒と仮定した時のコンパートメントの仮想的な半径、 $L$ は小腸の長さ、 $i$ は  $i$  番目の代謝酵素またはトランスポーターを表す識別記号、 $j$ は  $j$  番目の小腸コンパートメントを表す識別記号、 $dM_{\text{absorbed}}/dt$ は吸収速度、 $V$ は小腸コンパートメントの容積、 $C_{\text{lumen}}$ は消化管管腔コンパートメント中の薬物濃度、 $C_{\text{ent}}$ は小腸上皮細胞コンパートメント中の薬物濃度、 $SF_{V_{\text{max}}}$ は  $V_{\text{max}}$ に対するスケーリングファクター(初期値=1)、 $SF_{K_m}$ は  $K_m$ に対するスケーリングファクター(初期値=1)、 $ESF$ は regional distribution factor (肝臓の代謝酵素またはトランスポーター発現量の各部位間における相対発現比)、 $f_{\text{ue}}$ は小腸上皮細胞コンパートメントにおける非結合形薬物分率を表す。 $SF$ は代謝及び influx または efflux の輸送速度式の中に組み込まれており、observed  $F_a F_g$ と predicted  $F_a F_g$

の解離を補正するためにフィッティングによって最適化するために使用した。ヒトの  $P_{\text{eff}}$  は、腸管灌流法などにより、定常状態における消化管管腔からの薬物の消失速度を測定することにより評価されており、GastroPlus にあらかじめその値がデータベース化されている。本研究では、GastroPlus に組み込まれている以下の式<sup>60</sup>を使って  $P_{\text{app}}$  から  $P_{\text{eff}}$  に変換した。

$$P_{\text{eff}} = 10^{[A+B \times \log(P_{\text{app}})]} \quad \text{式 22}$$

ここで、 $P_{\text{eff}}$  は  $\times 10^{-4}$  cm/s、 $P_{\text{app}}$  は  $\times 10^{-6}$  cm/s の単位で表現される。A 及び B は係数であり、前述した reference compounds の  $P_{\text{app}}$  に対してフィッティングした結果、それぞれ -0.162 及び 0.6447 と算出された。フィッティングした A 及び B の係数を適用した式 21 を使って、基質薬物の  $P_{\text{app}}$  を  $P_{\text{eff}}$  に変換した。

### 2.2.11 CYP3A5 を介した代謝の影響

GastroPlus の初期設定では、小腸上皮細胞の CYP3A5 の発現が考慮されていない。そこで、論文の情報に基づき、CYP3A5 の発現を設定した。Lin らの報告<sup>61</sup>によると、空腸ホモジネート中の CYP3A4 及び 3A5 発現量は、CYP3A5\*1/\*1 被験者で 17.2 及び 14.0 pmol/mg protein、CYP3A5\*1/\*3 被験者で 2.4 及び 3.6 pmol/mg protein、CYP3A5\*3/\*3 被験者で 18.2 及び 0.5 pmol/mg protein であった。CYP3A5 のアレル頻度を Caucasian の腎移植患者<sup>62,63</sup>から算出すると、

CYP3A5\*1/\*1、CYP3A5\*1/\*3 及び CYP3A5\*3/\*3 の頻度は、それぞれ、1、14 及び 85%であった。

各 genotype の CYP3A4 及び 3A5 発現量とアレル頻度から、以下の式を使って CYP3A4 及び 3A5 の平均発現量を算出した。

$$\text{Mean enzyme expression level} = \sum_i (\text{enzyme expression level}^i \times \text{frequency}^i) \quad \text{式 23}$$

ここで、i は i 番目の genotype を表す識別記号を表す。式から計算した CYP3A4 及び 3A5 の平均発現量は 16.0 及び 1.07 pmol/mg protein であった。算出した平均発現量は空腸ホモジネートに基づく値であるが、CYP3A5 については、発現量の部位差に関する情報が存在しないことから、CYP3A4 及び CYP3A5 の発現比率が全ての小腸部位で等しいと仮定、すなわち発現比率がすべての部位で CYP3A4: CYP3A5=16.0:1.07 として、GastroPlus に CYP3A5 の発現量を設定した。また、CYP3A に関わるスケーリングファクターは、CYP3A4 及び 3A5 の両者に共通する値として設定した。

#### 2.2.12 SF<sub>CYP3A</sub> 及び SF<sub>P-gp</sub> の最適化

解析のストラテジーを Figure 5 に示した。GastroPlus に組み込まれた ACAT model を使用して、式 19 及び 21 に基づき CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送に関する素過程のクリアランスを算出した。なお、fexofenadine や celiprolol 及び talinolol を含む一部の β 遮断薬は小腸の取

り込みトランスポーターにより消化管管腔から小腸上皮細胞へ能動輸送されることが示唆されている<sup>64-66</sup>が、臨床試験の用量依存性の検討において取り込みトランスポーターの飽和性を示す等の十分な情報が得られなかったため、本解析では取り込みトランスポーターを介した輸送過程は設定しなかった。また、in vivo における CYP3A 及び P-gp の  $K_m$  は、in vitro 実験にて評価した  $K_m$  と等しいと仮定した。GastroPlus で CYP3A4 の ESF は、小腸での絶対発現量の情報に基づき設定されている。一方、P-gp の ESF は、小腸での絶対発現量の情報がないため、小腸各部位間の相対的な発現量は論文情報を元に設定されている<sup>67</sup>が、絶対発現量は仮の値が設定されている。そこで、予測精度の高いモデルを構築する上で、適切な CYP3A の  $SF_{V_{max}}$  ( $SF_{CYP3A}$ ) 及び P-gp の  $SF_{V_{max}}$  ( $SF_{P-gp}$ ) を設定することが重要であると考えた。SF は in vitro の実験データを組み込んだモデル上の分子の単位あたりの活性と in vivo で機能する分子の単位あたりの活性を補正する係数と考えることができる。そのため、 $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  はそれぞれ CYP3A 及び P-gp 基質薬物ごとに変化するパラメータではなく、すべての CYP3A 及び P-gp 基質に共通するパラメータとして設定されるべきである。そこで、複数の CYP3A 及び P-gp 基質薬物の情報に基づき、単一の  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  を同時フィッティングにより最適化することとした。最適化に用いる基質薬物は、CYP3A の選択的基質として felodipine、midazolam、sildenafil 及び triazolam、P-gp の選択的基質として celiprolol、digoxin、fexofenadine 及び talinolol、CYP3A/P-gp の dual 基質として indinavir、quinidine、saquinavir 及び verapamil の合計 12 基質を選択した。すべての基質薬物のパラメータをモデルに組み込み、各基質の predicted  $F_aF_g$  を算出した。臨床試験から得られた observed  $F_aF_g$

と predicted  $F_aF_g$  の解離が最も小さくなるように、 $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P_{gp}}$  をすべての基質薬物に基づき同時フィッティングにより最適化した。最適化計算は GastroPlus の optimization module を使用した。最適化の目的関数(OF)は以下の式で表される。

$$OF = W \times \sum \left[ (\text{predicted } F_aF_g - \text{observed } F_aF_g)^2 \right] \quad \text{式 24}$$

ここで、 $W$  は重みを表し、 $1/\text{observed } F_aF_g$  を設定した。最適化計算には可能な限り observed  $F_aF_g$  が線形性を示すと考えられる投与量範囲のデータのみを使用した(Table 4)。Predicted  $F_aF_g$  の予測バイアス及び精度は、以下に示した average fold error (afe) 及び root mean squared error (rmse) によって評価した<sup>68,69</sup>。

$$afe = 10^{\frac{1}{n} \times \sum \log \frac{\text{predicted } F_aF_g}{\text{observed } F_aF_g}} \quad \text{式 25}$$

$$rmse = \sqrt{\frac{1}{n} \times \sum \left[ (\text{predicted } F_aF_g - \text{observed } F_aF_g)^2 \right]} \quad \text{式 26}$$

ここで、 $n$  はデータ数を表しており、ここでは最適化計算に用いた全ての observed  $F_aF_g$  の数、すなわち 14 とした。

### 2.2.13 CYP3A 及び P-gp の役割が $F_aF_g$ に与える影響のシミュレーション

CYP3A 及び P-gp の役割が  $F_aF_g$  に与える影響を特徴づけるために、最適化した  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  を適用した GastroPlus のモデルを使ってシミュレーションを実施した。シミュレーションの条件は、quinidine のパラメータを基準に設定した。物理化学的パラメータ及び enterocyte での非結合形薬物分率は quinidine と同値とした。 $P_{app}$  は  $1\sim 30\times 10^{-6}$  cm/s の範囲で設定した。CYP3A4 を介した代謝の  $K_m$  及び  $V_{max}$  は、 $100\ \mu\text{mol/L}$  (固定) 及び  $100\sim 100000\ \mu\text{L/min/pmol P450}$  の範囲とした。P-gp を介した輸送の  $K_m$  及び  $V_{max}$  は、 $100\ \mu\text{mol/L}$  (固定) 及び  $100\sim 10000\ \mu\text{L/min}/10^6$  cells の範囲とした。P-gp は考慮せず  $P_{app}$  及び代謝クリアランス ( $V_{max}/K_m$ ) を変化させたとき、並びに CYP3A は考慮せず  $P_{app}$  及び輸送クリアランス ( $V_{max}/K_m$ ) を変化させたときの predicted  $F_aF_g$  を算出した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 $F_aF_g$ 値の定量的予測に用いるパラメータの収集

pH 依存的な溶解度の測定結果は Figure 6 に、各基質薬物の物理化学的パラメータは Table 6 に示す。Reference compound の  $P_{app}$  は Table 7 に示す。 $P_{app}$  及び小腸上皮細胞中の非結合形分率は Table 8 に示す。各基質薬物の  $P_{eff}$  は Caco-2 細胞で評価した  $P_{app}$  から算出した。CYP3A 基質薬物の Eadie-Hofstee plots は Figure 7 に、P-gp 基質薬物の濃度依存的な  $P_{app}$  を測定した結果は Figure 8 に示す。これらの実験データから算出した CYP3A4 を介した代謝及び P-gp を介した輸送の速度

論パラメータは Table 9 に示す。すべての CYP3A 基質薬物は飽和性の代謝反応を示し、代謝固有クリアランスは最も低い quinidine の  $4.23 \mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol P450}$  と最も高い felodipine の  $211 \mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol P450}$  との間で約 50 倍の差があった。Tachibana らは Caco-2 細胞で評価した濃度依存的な  $P_{\text{app}}$  データに基づき、細胞内非結合形濃度基準の P-gp を介した輸送の速度論パラメータを算出する方法を報告している<sup>49</sup>。この方法を用いて P-gp を介した輸送の  $K_m$  及び  $V_{\text{max}}$  を算出した。Efflux clearance は最も低い verapamil の  $1.18 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$  と最も高い saquinavir の  $63.6 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$  との間で約 50 倍の差があった。従って、本研究で選択した CYP3A 又は P-gp の選択的基質、並びに CYP3A/P-gp の dual 基質の代謝及び排出輸送の固有クリアランスは、広範な特性を示した。CYP3A4 と CYP3A5 との間で代謝固有クリアランスを比較した結果を Table 10 に示す。Midazolam の CYP3A5/CYP3A4 metabolic clearance ratio は最も高く 1.86、一方、quinidine では最も低く 0.299 であった。小腸における平均 CYP3A4 発現量は、平均 CYP3A5 発現量より 10.8 倍高いと考えられたことから、小腸における CYP3A5 を介した代謝の寄与は CYP3A4 に比べ小さいと予想された。

### 2.3.2 Observed 及び predicted $F_a F_g$ の乖離を説明する $SF_{\text{CYP3A}}$ 及び $SF_{\text{P-gp}}$ の最適化

Observed 及び predicted  $F_a F_g$  の関係を Figure 9 に示す。小腸での CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送を考慮しないとき ( $SF_{\text{CYP3A}}=0$ 、 $SF_{\text{P-gp}}=0$ )、ほとんどの基質薬物の predicted  $F_a F_g$  は observed  $F_a F_g$  と一致せず、過大評価となった。 $SF_{\text{CYP3A}}$  及び  $SF_{\text{P-gp}}$  を最適化したとき、12 基質薬



物のうち 8 種の predicted  $F_aF_g$  は、observed  $F_aF_g$  の 1.5 倍の範囲内に納まり、良好に予測可能な SF を設定することができた。このとき、 $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  は、それぞれ 0.0740 及び 0.00651 と算出された。小腸での CYP3A 及び P-gp の役割をシミュレーションにより検討した結果を Table 11 に示す。CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送のそれぞれについて、最適化した  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  を適用する ( $SF_{CYP3A}=0.0740$  及び  $SF_{P-gp}=0.00651$ )、又は SF を考慮しない ( $SF_{CYP3A}=0$  及び  $SF_{P-gp}=0$ ) 条件を組み合わせた simulation I~IV の合計 4 条件とした。Simulation II ( $SF_{CYP3A}=0.0740$ ,  $SF_{P-gp}=0$ ) 及び simulation III ( $SF_{CYP3A}=0$ ,  $SF_{P-gp}=0.00651$ ) では、それぞれ P-gp 基質及び CYP3A 基質の predicted  $F_aF_g$  は過大評価された。Simulation I ( $SF_{CYP3A}=0.0740$ ,  $SF_{P-gp}=0.00651$ ) では afe 及び rmse の値が最も小さく、12 種の基質薬物全般において、predicted  $F_aF_g$  は良好な予測性を示した。

### 2.3.3 CYP3A/P-gp 基質薬物の消化管吸収過程での非線形性の予測

構築したモデルを用いて 12 種の基質薬物の消化管吸収に関する非線形性を検討した。モデルから算出した predicted  $F_aF_g$  の ratio (最低投与量に対する各投与量での比) 及び対応する observed AUC/dose の比を Table 12 に示す。Triazolam、celiprolol、digoxin、fexofenadine 及び indinavir の predicted  $F_aF_g$  は臨床投与量の範囲で一定であり、線形な消化管吸収動態を示した。一方、felodipine、midazolam、sildenafil、talinolol、quinidine 及び verapamil の predicted  $F_aF_g$  は投与量依存的に増加し、非線形な消化管吸収動態を示した。また、saquinavir の predicted  $F_aF_g$  は、投与量の増加に伴

い低下した。

## 2.4 考察

本章では、複数の CYP3A/P-gp 基質薬物について、in vitro 実験から得られた各種速度論パラメータに基づき、in vivo 消化管吸収過程での CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送過程を組み込んだ  $F_a F_g$  値の予測モデルの構築を試み、12 種の CYP3A/P-gp 基質薬物全般について、良好に予測可能な SFs を設定することに成功した。

### 2.4.1 消化管での CYP3A5 を介した代謝の影響

消化管での CYP3A5 を介した代謝の影響を調べるために、CYP3A5 を介した代謝を考慮しないモデルを用いて、同様の方法で  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  の最適化を行った。CYP3A4 及び CYP3A5 両方の代謝過程を考慮して最適化した  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  は 0.0740 及び 0.00651 であったのに対して、CYP3A5 を介した代謝過程を考慮しないとき、 $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  は 0.0811 及び 0.00643 であった。従って、各条件の SF に大きな違いは認められなかったことから、消化管での CYP3A5 を介した代謝の寄与は小さいことが考えられた。ただし、個体間差を考慮すると CYP3A5\*1/\*1 の保有者では平均値に比べ  $F_a F_g$  が低下することが考えられる。CYP3A5\*1/\*1 の保有者の  $F_a F_g$  をシミュレートすると平均値に比べ、最も CYP3A5/CYP3A4 代謝活性比率の高い midazolam で最大の約 18% 低下した。CYP3A5/CYP3A4 代謝活性比率の高い化合物の場合、個体間差が大きく

なることには留意が必要となる。

#### 2.4.2 ACAT model による $F_aF_g$ 予測モデルの構築

受動拡散による膜透過のみを考慮し  $F_aF_g$  を算出したとき、ほとんどの基質薬物の predicted  $F_aF_g$  は、observed  $F_aF_g$  と一致せず 100% に近い値となった (Figure 9A)。この結果は、基質薬物の受動拡散による膜透過は良好であること、また、in vivo の消化管吸収過程において P-gp を介した輸送及び CYP3A を介した代謝が明確に寄与していることを示唆する。SF<sub>CYP3A</sub> 及び SF<sub>P-gp</sub> を同時に最適化したとき、ほとんどの基質薬物の predicted  $F_aF_g$  は observed  $F_aF_g$  に近い値が得られ、12 基質のうち 8 基質は 1.5 倍以内の解離しか示さず、我々のアプローチは消化管吸収を比較的良みに定量的な評価が可能な方法であると考えられた。ただし、indinavir の predicted  $F_aF_g$  (11.3%) は observed  $F_aF_g$  (100%) と比較して過小評価する結果となった (Figure 9B)。Simulation IV、すなわち受動拡散による膜透過性のみを考慮して算出したとき、indinavir の predicted  $F_aF_g$  は 30.7% であり (Table 11)、CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送を考慮せずとも observed  $F_aF_g$  に比べ低い値を示した。その原因を探索すべく、ACAT model において消化管管腔コンパートメント中で溶解した薬物の割合を Table 13 に示す。Indinavir 及び saquinavir を除く全ての基質薬物は、投与後 48 時間内に全て消化管管腔内で溶解していた。このため、indinavir の predicted  $F_aF_g$  が過小評価された原因のひとつとして、消化管管腔内での indinavir の溶解性の評価が影響したことが考えられた。ヒトの消化管環境を模倣した人工腸液における化合物の溶解度を適用した PBPK モデ

ルを使って、 $F_g$ を予測する方法が報告されている<sup>70</sup>。絶食時・非絶食時の胃・腸液を再現した fasted state-simulated intestinal fluid (FaSSIF、pH6.5)及び fed state-simulated intestinal fluid (FeSSIF、pH5.0)中の indinavir の溶解度は、それぞれ 0.048 及び 1.4 mg/mL と報告されている<sup>71</sup>。本研究では、異なる pH の緩衝液中の溶解度を測定しており、各人工腸液の pH 条件に近い緩衝液での indinavir の溶解度は、pH6.1 及び 5.1 で、それぞれ 0.035 及び 0.18 mg/mL であった。FaSSIF 中の溶解度は緩衝液中と同様であった一方、FeSSIF 中の溶解度は緩衝液中に比べ約 8 倍高かった。Indinavir の observed  $F_aF_g$ の算出に使用した臨床試験<sup>72</sup>は絶食条件で投薬されており、本モデル解析で FaSSIF 中の溶解度を適用して predicted  $F_aF_g$ を算出したとしても過小評価は改善されないと考えられた。仮に、溶解度が pH 全域で 8 倍大きいと設定したとき、indinavir の predicted  $F_aF_g$ は 53.0% と算出された。Indinavir と同様に低溶解性の saquinavir について、FeSSIF(pH6.5)中の溶解度は 0.456 mg/mL と報告されており<sup>73</sup>、pH6.9 の緩衝液中の溶解度 0.239 mg/mL に比べ約 2 倍高かった。Indinavir と同様に saquinavir の溶解度が pH 全域で 2 倍大きいと仮定したとき、saquinavir の predicted  $F_aF_g$ は 6.31% と算出された。したがって、人工腸液中の溶解度を仮定したとき、indinavir の predicted  $F_aF_g$ は observed  $F_aF_g$ に近づくように高く算出され、saquinavir の predicted  $F_aF_g$ は observed  $F_aF_g$ に近く、低値のままであった。GastroPlus には消化管管腔での溶解度を与える胆汁酸ミセルの影響をシミュレートする補正式が組み込まれている。本章で構築したモデルではこの補正式は採用していなかったが、胆汁酸ミセルの効果を考慮したときの indinavir の predicted  $F_aF_g$ は 33.1% と算出された。したがって、低溶解性の基質薬物については胆汁酸ミセルの効果を考慮

することにより  $F_a F_g$  予測の改善が期待されるが、消化管内の胆汁酸濃度や胆汁酸による薬物の可溶化能を表現するパラメータをどのように設定することがより適切であるかはさらなる検討が必要と考える。Indinavir を除く 11 の基質薬物で  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  を最適化したとき、 $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  はそれぞれ 0.0781 及び 0.00682 と算出され、全ての基質薬物で最適化した  $SF(SF_{CYP3A}=0.0778$  及び  $SF_{P-gp}=0.00651)$  と大きな差はなかった。したがって、indinavir の predicted  $F_a F_g$  は過小評価されたが、複数の基質薬物を用いた同時フィッティングによる  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  の最適化計算において、indinavir が単独で大きな影響を与えることはなかった。

#### 2.4.3 CYP3A/P-gp 基質薬物の消化管吸収過程における CYP3A 及び P-gp の相対的な寄与

最適化した  $SF_{CYP3A}$  及び  $SF_{P-gp}$  を適用したモデルを使って、シミュレーションにより医薬品の消化管吸収過程における CYP3A 及び P-gp の相対的な役割について検討した (Table 11)。CYP3A のみを考慮して計算した条件下 (Simulation II) において、verapamil の predicted  $F_a F_g$  は、Simulation I と同等の値を示した。一方、P-gp のみを考慮して計算した条件下 (Simulation III) において、verapamil の predicted  $F_a F_g$  は、observed  $F_a F_g$  より高値へシフトした。この結果は、verapamil の消化管吸収の抑制には、P-gp よりも主に CYP3A が寄与していることが示唆された。一方、quinidine の predicted  $F_a F_g$  は、Simulation II 及び III の両条件で observed  $F_a F_g$  より高値へシフトした。この結果から quinidine の消化管吸収の抑制には、CYP3A 及び P-gp の両方が寄与することが示唆された。第 1 章で示した verapamil 及び quinidine の臨床試験では、両薬物の  $AUC_{0-inf}/dose$  は投与量

依存的に増加し、薬物動態の非線形性が認められた。本章で最適化した SF を使って quinidine 及び verapamil の投与量依存的な  $F_a F_g$  の変動をシミュレーションした結果を Figure 10 に示した。その結果、最適化した SF を用いることで、quinidine 及び verapamil の投与量に依存した  $F_a F_g$  を比較的良好に予測することができた。同じく CYP3A/P-gp の dual 基質の saquinavir は、Simulation III のとき predicted  $F_a F_g$  は Simulation I と同等の値を示した一方で、Simulation II のときは observed  $F_a F_g$  よりも予測値はかなり高値へとシフトした。この結果は、saquinavir の消化管吸収抑制において主に P-gp が寄与することを示唆している。Saquinavir の CYP3A に対する  $K_m$  は比較的小さい(0.395  $\mu\text{mol/L}$ )ことから、臨床投与量においては、CYP3A を介した代謝は飽和していると考えられた。一方、indinavir の observed  $F_a F_g$  は 100% であり、消化管吸収の抑制において CYP3A 及び P-gp の寄与はないと推察されたが、シミュレーションでは P-gp の寄与がわずかにみられ、CYP3A を介した代謝はほとんど寄与していないと考えられた。本研究の方法論を用いて構築したモデルにより、消化管吸収過程での CYP3A 及び P-gp の相対的な寄与を定量的に示すことが可能となった。

#### 2.4.4 CYP3A/P-gp 基質薬物の消化管吸収過程での非線形性の予測

最適化した  $SF_{\text{CYP3A}}$  及び  $SF_{\text{P-gp}}$  を適用したモデルを使って、消化管吸収過程での非線形性を検討した(Table 12)。Felodipine, midazolam, sildenafil, celiprolol, talinolol, indinavir, quinidine 及び verapamil は臨床投与量において、投与量依存的に AUC/Dose が増加する非線形性を示すことが

報告されている<sup>20-22,24,74</sup>。そこで、本研究において見積もった最適化された P-gp, CYP3A の SF を入力した ACAT モデルにより、投与量依存的な  $F_aF_g$  の変動をシミュレーションにより求めたところ、felodipine, midazolam, sildenafil, talinolol, quinidine 及び verapamil については、投与量依存的な predicted  $F_aF_g$  の増加が観察され、臨床で観察された AUC/dose ratio に近い値が得られた。一方で、indinavir の predicted  $F_aF_g$  は、投与量依存的な増加を示さなかった。Table 6 に示した Simulation I と III との比較では、predicted  $F_aF_g$  の変化が認められないため、消化管の CYP3A は 400 mg 投与時に飽和していると推察された。このことは、indinavir の  $C_{u,in\ max}$  は、400 mg 投与時に 17.5  $\mu\text{mol/L}$  と算出され、CYP3A4 の  $K_m$  (0.0761  $\mu\text{mol/L}$ ) より高いこととも合致している。従って、これまでの論文報告と同様に<sup>75</sup>、臨床試験で観察された indinavir の体内動態の非線形性は、主に肝代謝の飽和に起因すると考えられた。Celiprolol は臨床投与量において薬物動態が非線形性を示すにもかかわらず、predicted  $F_aF_g$  は投与量によらず一定の値を示した。Celiprolol は、小腸に発現する排出トランスポーター P-gp のみならず、取り込みトランスポーター OATP2B1 の基質ともなる<sup>76</sup>。Caco-2 細胞単層膜を用いた経細胞輸送実験において、celiprolol の apical 側から basal 側へ輸送されるとき  $P_{app}$  は濃度に依らず一定であり、飽和性の輸送挙動を示さなかった。Caco-2 細胞には OATP2B1 が発現していることが報告されており<sup>77</sup>、取り込み及び排出の両方向に働くトランスポーターが共に celiprolol の経細胞輸送に寄与している可能性が考えられる。しかし、モデル解析の結果、消化管吸収の非線形性は見られず、体内動態の非線形性を説明できなかった。その詳細な理由については不明であり、今後更なる非線形性を生み出さうる要因個々の

解析が必要になると考えている。経口投与したときの  $AUC(AUC_{po})$  は、 $F$  及び  $CL_{tot}$  によって決定付けられる。したがって、 $CYP3A/P-gp$  の飽和によって引き起こされる  $F_aF_g$  の変動は  $AUC_{po}$  に反映される。そこで、報告されている臨床試験から得られた  $AUC_{po}/Dose$  の変動比と、シミュレーションから得られた  $F_aF_g$  の変動比を比較することで消化管吸収過程での非線形動態の予測性を考察した。ただし、 $AUC_{po}$  は小腸に発現する  $CYP3A$  のみならず肝臓の  $CYP3A$  の飽和も反映されるため、肝臓の  $CYP3A$  の影響も併せて考察した。Saquinavir は臨床投与量の範囲で、投与量依存的に  $AUC_{po}/Dose$  が減少する方向の非線形薬物動態を示した。シミュレーションの結果、saquinavir の predicted  $F_aF_g$  は用量依存的に低下し、臨床の  $AUC/dose$  ratio に近い値が得られた。Saquinavir の投与量 400~600 mg において  $C_{u,in\ max}$  及び最大  $C_{u,ent}$  は  $K_m^{CYP3A4}$  より高く (Table 6A 及び Table 12)、肝臓及び小腸の  $CYP3A$  を介した代謝は飽和していたと考えられる。加えて、モデルで算出した消化管管腔内の溶解度は 0.44 mg/mL と低いとため、消化管吸収過程において溶解律速となることが示唆される。したがって、saquinavir の非線形薬物動態は代謝過程の飽和、消化管腔内における溶解飽和の両方の要因が関連する複雑なメカニズムによって生じるものと考えられる。Triazolam, digoxin 及び fexofenadine は、臨床投与量において線形の薬物動態を示した (Table 12)。これらの基質の predicted  $F_aF_g$  には線形性が見られ、臨床の  $AUC/dose$  ratio に近い値が得られた。従って、多くの  $CYP3A/P-gp$  基質薬物について、消化管吸収過程の非線形性の有無を良好に予測可能なことが示された。



#### 2.4.5 CYP3A 及び P-gp の役割が $F_aF_g$ に与える影響を明らかにするためのシミュレーション

Quinidine をモデル化合物とし、 $P_{app}$ 、代謝クリアランス( $V_{max}/K_m$ )及び輸送クリアランス( $V_{max}/K_m$ )を設定範囲で変化させたときに predicted  $F_aF_g$  を算出した結果を Figure 11 に示す。

Quinidine は、CYP3A 及び P-gp 両方の基質であること、代謝クリアランス及び輸送クリアランスが本章の検討で用いた 12 基質薬物の中では中間的な位置づけにあることから、当シミュレーションで基準とするモデル化合物に選択した。シミュレーションにおいては、 $P_{app}$ 、代謝クリアランス及び輸送クリアランスは、検討で用いた 12 基質薬物の実測値をカバーする範囲を設定した。 $P_{app}$  及び代謝クリアランスの関係から、代謝クリアランスが大きくなるにつれ  $F_aF_g$  の低下が認められた(Figure 11A)。一方、代謝クリアランスが  $10 \mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol P450}$  未満の低いときには、 $P_{app}$  が大きくなるにつれ  $F_aF_g$  が高値を示す傾向が認められたが、それ以外では  $P_{app}$  が多少変化しても  $F_aF_g$  は変化しなかった。したがって、CYP3A を介した代謝クリアランスの大小が  $F_aF_g$  に与える影響は大きいことが分かった。一方で、膜透過性が  $F_aF_g$  に与える影響は限定的であると考えられた。一方、P-gp の影響を観察すべくシミュレーションを行ったところ、 $P_{app}$  及び輸送クリアランスの関係において、P-gp を介した輸送が無視できるほど小さい条件下では、 $P_{app}$  が  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  以上の膜透過性を示すとき、 $F_aF_g$  は 80%以上となった(Figure 11B)。また、輸送クリアランスが大きくなるにつれ  $F_aF_g$  は低下し、 $P_{app}$  が大きくなるにつれ  $F_aF_g$  は高くなる関係が認められた。したがって、P-gp を介した輸送クリアランスと膜透過性については、その両者のパラメータが  $F_aF_g$  を決定づけると考えられる。

## 2.5 小括

複数の CYP3A/P-gp 基質について、*in vitro* 実験のパラメータに基づき、*in vivo* 消化管吸収過程での CYP3A を介した代謝及び P-gp を介した輸送過程を組み込んだ消化管吸収率の予測モデルの最適化に成功し、CYP3A/P-gp の飽和に起因した薬物動態の非線形性や消化管吸収の非線形性に対する CYP3A/P-gp の相対的な寄与の定量的評価が可能であることを示すことができた。

**Selective CYP3A substrates**

Felodipine, midazolam, sildenafil, triazolam

**Selective P-gp substrates**

Celiprolol, digoxin, fexofenadine, talinolol

**Dual substrates**

Indinavir, quinidine, saquinavir, verapamil

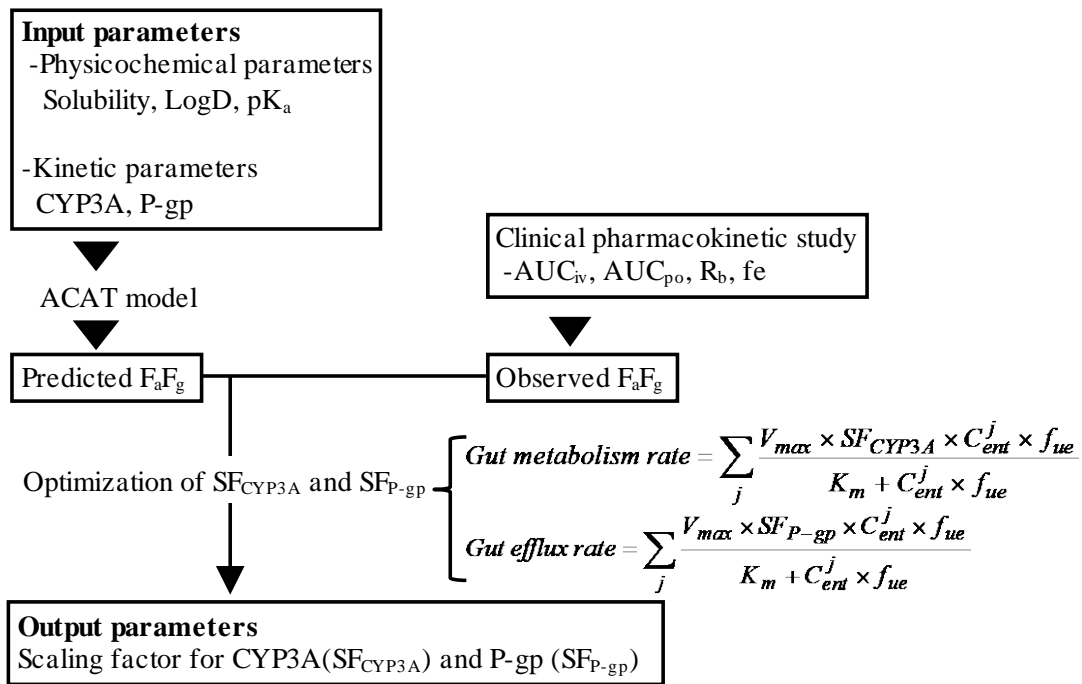


Figure 5 The schematic diagram of our strategy for the prediction of intestinal absorption. The predicted F<sub>a</sub>F<sub>g</sub> was calculated from physicochemical and in vitro kinetic parameters of drugs with the ACAT model. SF<sub>CYP3A</sub> and SF<sub>P-gp</sub> were simultaneously estimated from the relationship between predicted and observed F<sub>a</sub>F<sub>g</sub>.

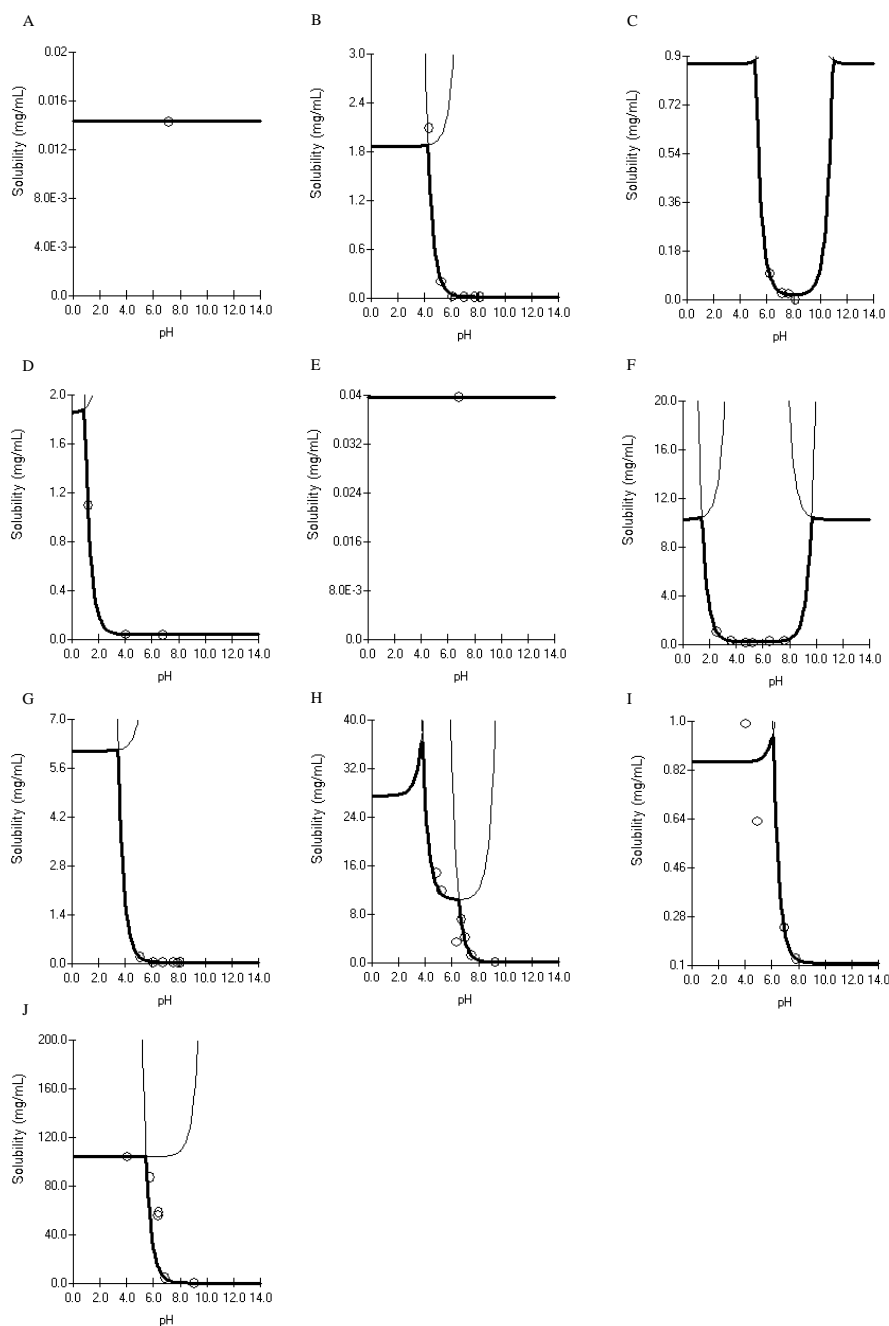


Figure 6 pH-dependent solubility profile of felodipine (A), midazolam (B), sildenafil (C), triazolam (D), digoxin (E), fexofenadine (F), indinavir (G), quinidine (H), saquinavir (I), and verapamil (J). Experimental solubilities at different pH values were fit using the built-in pKa-based solubility model in GastroPlus. The solubility factor, which is a ratio of the solubility of the completely ionized drug to the completely unionized drug, and pKa were adjusted. Open circles represent the experimental solubility and the solid line represents the calculated solubility based on fitted the pKa and solubility factor in GastroPlus.

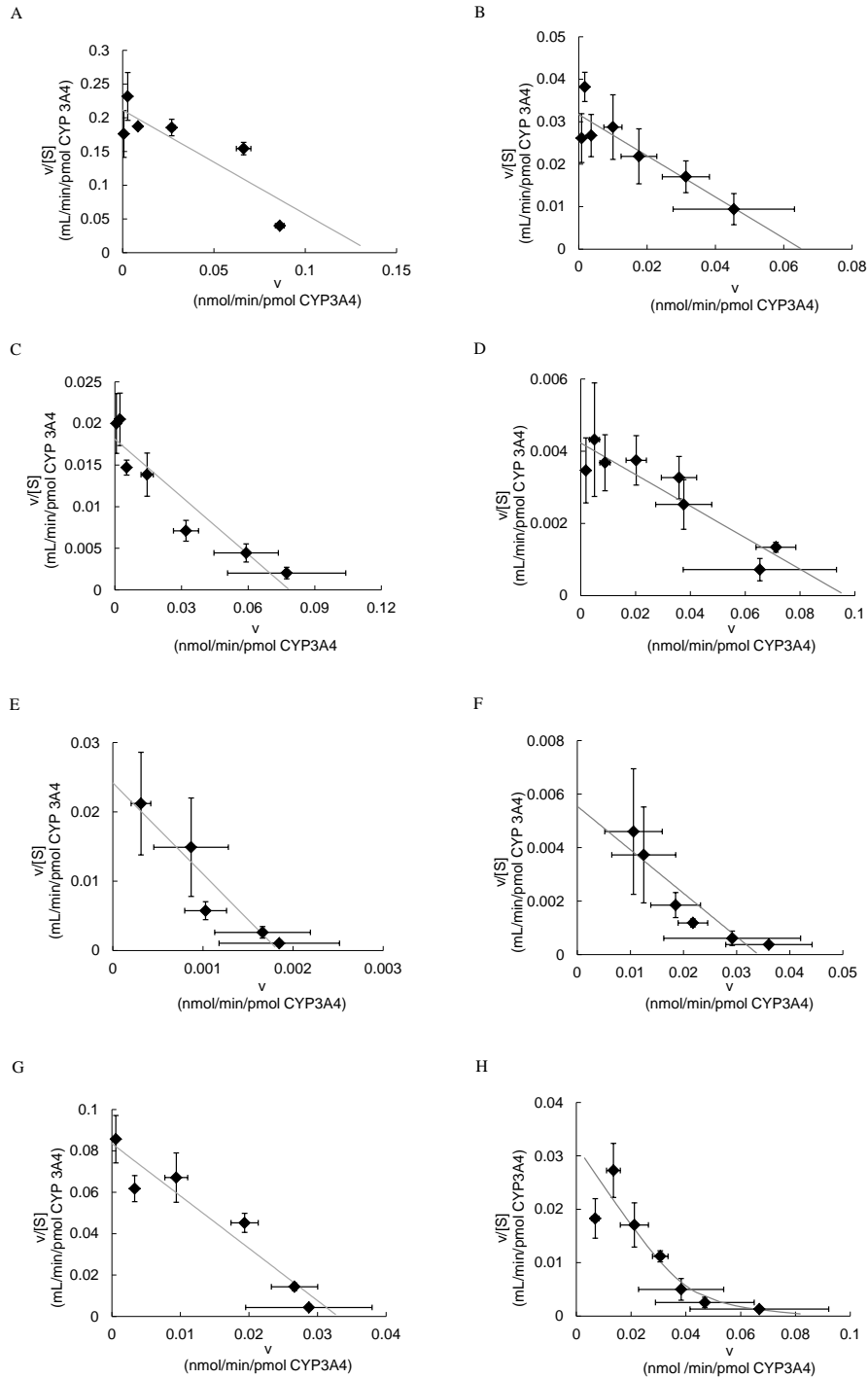


Figure 7 Saturation kinetics of the metabolic clearance of felodipine (A), midazolam (B) sildenafil (C), triazolam (D), indinavir (E), quinidine (F), saquinavir (G), and verapamil (H) in recombinant human CYP3A4. The concentration-dependence of the CYP3A4-mediated metabolism was determined using the recombinant human CYP3A4 enzyme and is shown as Eadie-Hofstee plots. Each plot and bar represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 6).

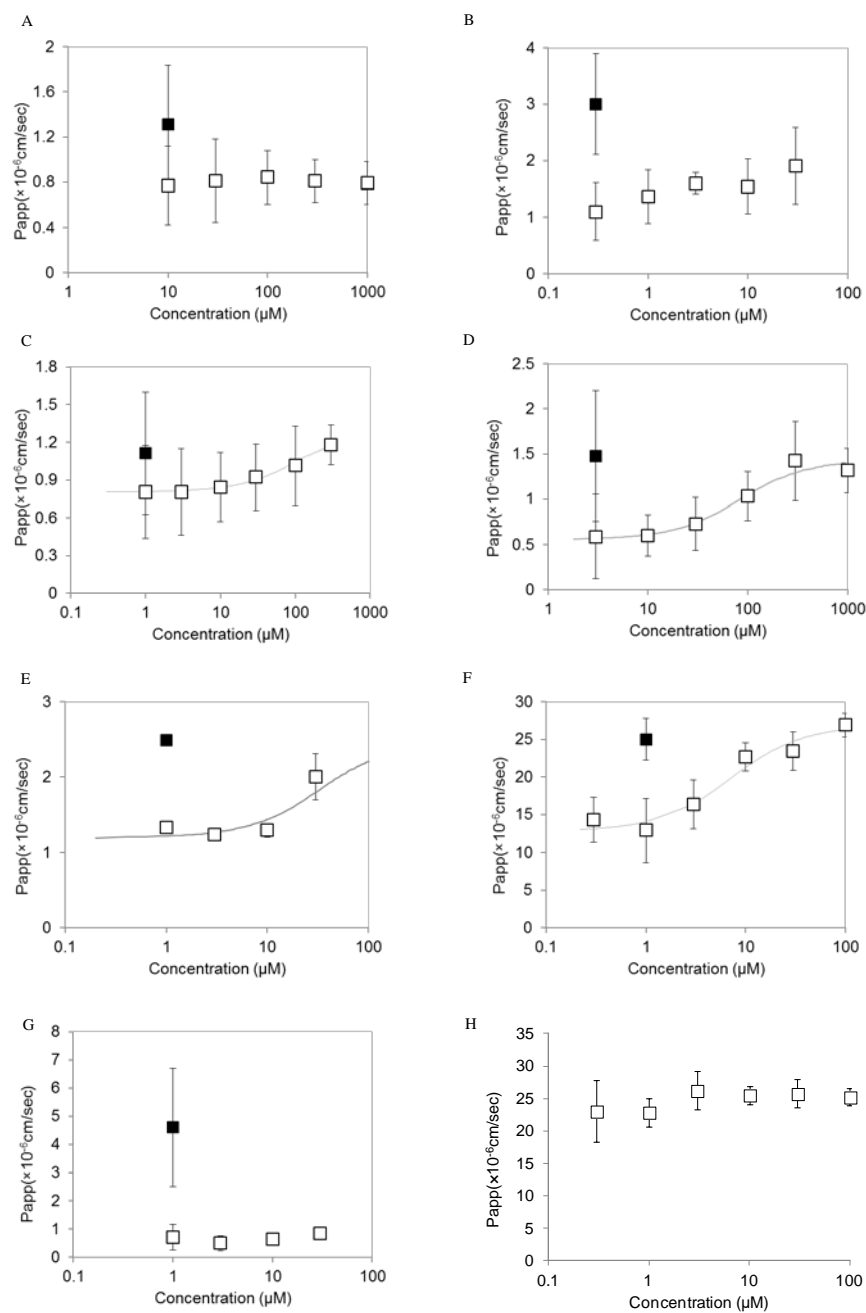


Figure 8 Saturation kinetics of P-gp-mediated transport of celiprolol (A), digoxin (B), fexofenadine (C), talinolol (D), indinavir (E), quinidine (F), saquinavir (G), and verapamil (H).

The concentration-dependence of the P-gp-mediated transport was determined using Caco-2 cell monolayers. Open squares represent the  $P_{app}$  with the substrate alone. Filled squares represent the  $P_{app}$  in the presence of 100  $\mu$ mol/L verapamil as a P-gp inhibitor. The kinetic parameter for P-gp-mediated transport was calculated based on modeling analysis. Each plot and bar represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

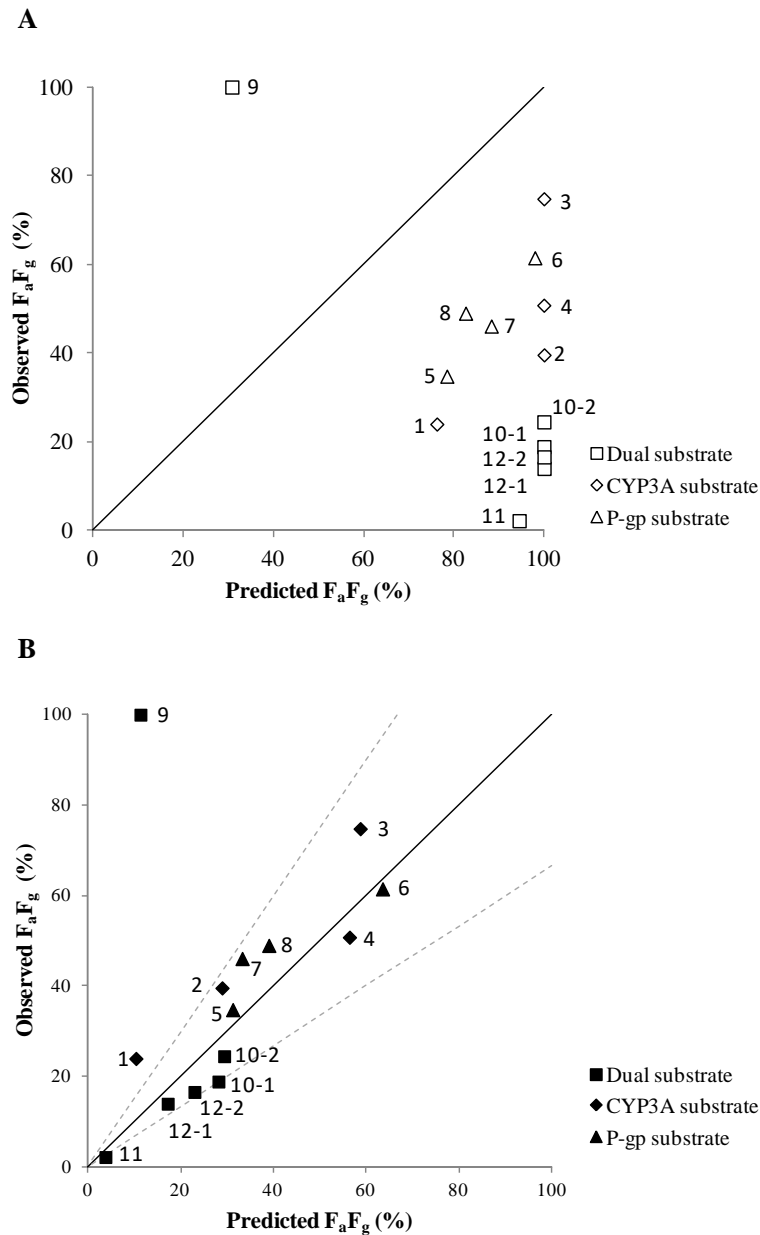


Figure 9 Comparison of the predicted and observed intestinal availabilities of CYP3A and P-gp substrates.

**(A) Before optimization**  $F_a F_g$  was predicted only considering the membrane permeation by passive diffusion. CYP3A-mediated metabolism and P-gp-mediated efflux were not considered.

**(B) After optimization** Predicted  $F_a F_g$  was calculated with optimized  $SF_{CYP3A}$  and  $SF_{P-gp}$ . The broken line represents a 1.5-fold deviation from the unity. CYP3A substrates are felodipine (1), midazolam (2), sildenafil (3), and triazolam (4). P-gp substrates are celiprolol (5), digoxin (6), fexofenadine (7), and talinolol (8). Dual substrates are indinavir (9), quinidine 0.1 mg (10-1), quinidine 1 mg (10-2), saquinavir (11), verapamil 0.1 mg (12-1), and verapamil 3 mg (12-2).

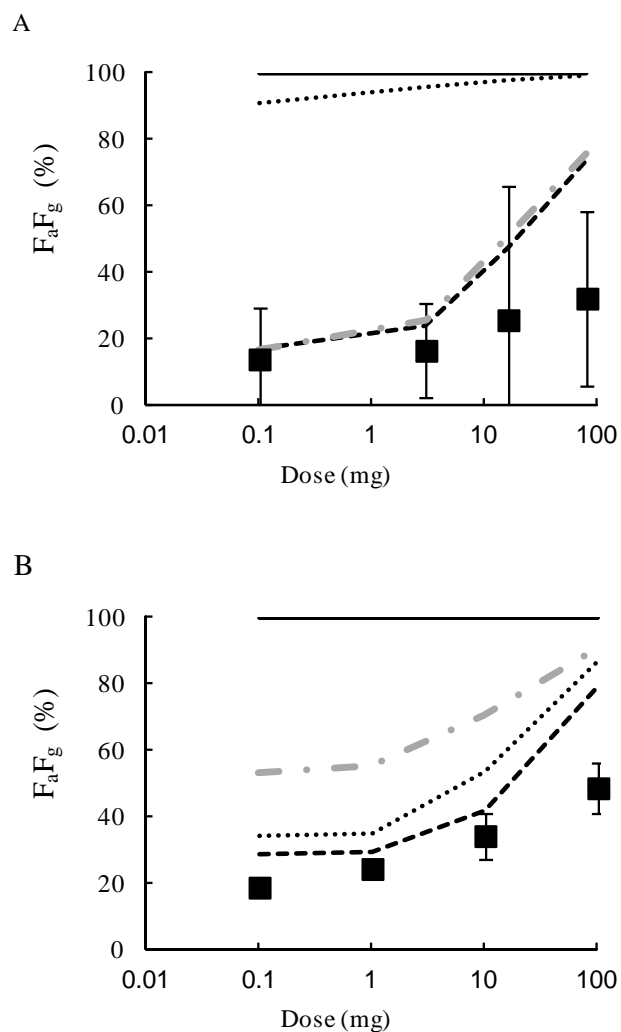
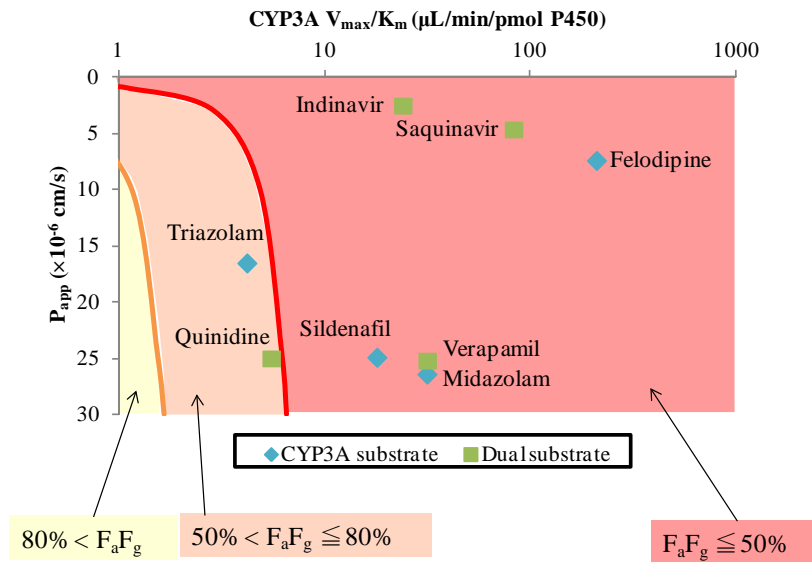


Figure 10 Role of CYP3A and P-gp in the non-linear intestinal absorption of verapamil and quinidine. Intestinal availability after oral administration of verapamil at a dose range of 0.1 to 80 mg (A) and that of quinidine at a dose range of 0.1 to 100 mg (B) were simulated. Simulation was performed using optimized  $SF_{CYP3A}$  and  $SF_{P-gp}$  (---), optimized  $SF_{CYP3A}$  and  $SF_{P-gp} = 0$  (-•-),  $SF_{CYP3A} = 0$  and optimized  $SF_{P-gp}$  (•••), and  $SF_{CYP3A}$  and  $SF_{P-gp} = 0$  (—). Square symbols represent the mean  $F_a F_g$  value observed *in vivo*. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 8[verapamil] and 7[quinidine]).



A



B

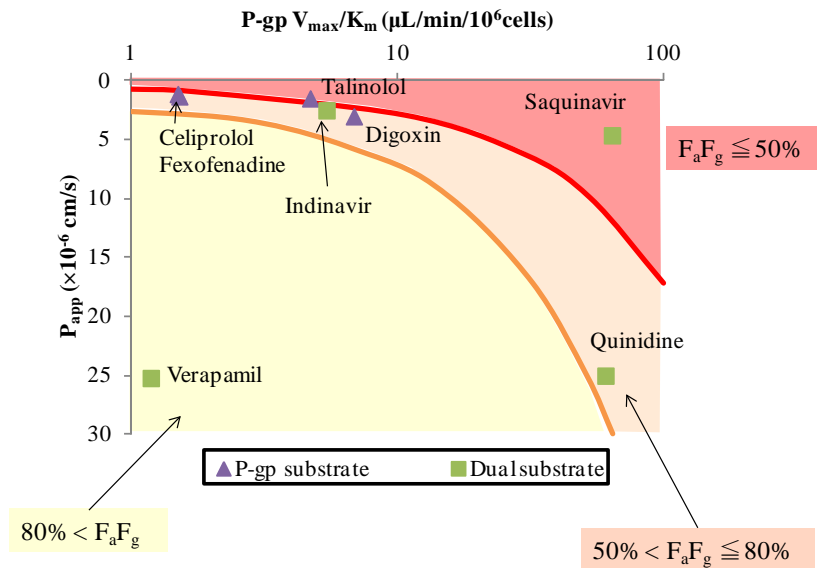


Figure 11 Changes in  $F_a F_g$  of model compound as a function of CYP3A-mediated metabolism and P-gp-mediated efflux in gut.

(A) Simulated  $F_a F_g$  in drugs with different  $P_{app}$ /metabolic clearance without considering P-gp-mediated efflux.

(B) Simulated  $F_a F_g$  in drugs with different  $P_{app}$ /efflux clearance without considering CYP3A-mediated metabolism. CYP3A/P-gp substrates were plotted based on experimental data.

Table 3 Analytical conditions for LC-MS/MS

Compound	m/z	Mobile phase		Gradient condition (B concentration %)
		A	B	
Felodipine	384/338	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 40%→2 min, 80%→5 min, 80%→5.01 min, 40%→8 min, 40%
Midazolam	326/291	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 20%→2 min, 60%→3 min, 60%→3.01 min, 20%→5 min, 20%
Sildenafil	475/283	0.1% Formic acid	Acetonitrile	0.5 min, 25%→1.5 min, 80%→4 min, 80%→4.01 min, 25%→6 min, 25%
Triazolam	343/308	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 20%→2 min, 60%→3 min, 60%→3.01 min, 20%→5 min, 20%
Celiprolol	380/251	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 5%→3 min, 45%→3.5 min, 45%→3.55 min, 5%→6 min, 5%
Digoxin	798/651	10 mM ammonium formate	Acetonitrile	0.5 min, 60%→1 min, 95%→3 min, 95%→3.05 min, 60%→5 min, 60%
Fexofenadine	502/466	0.1% Formic acid	Acetonitrile	0.5 min, 18%→1.5 min, 60%→4 min, 60%→4.05 min, 60%→6 min, 18%
Talinolol	364/308	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 5%→3 min, 45%→3.5 min, 45%→3.55 min, 5%→6.5 min, 5%
Indinavir	614/421	0.1% Formic acid	Acetonitrile	0.5 min, 25%→1.5 min, 80%→4 min, 80%→4.01 min, 25%→6 min, 25%
Quinidine	325/160	16 mM ammonium formate	Acetonitrile	1 min, 15%→2 min, 45%→4 min, 45%→4.1 min, 15%→6 min, 15%
Saquinavir	671/570	0.1% Formic acid	Acetonitrile	0.5 min, 25%→1.5 min, 80%→4 min, 80%→4.01 min, 25%→6 min, 25%
Verapamil	455/165	0.1% Formic acid	Acetonitrile	0 min, 18%→1 min, 38%→3 min, 38%→3.1 min, 18%→6 min, 18%
Atenolol	267/145	0.1% Formic acid	Acetonitrile	0 min, 5%→2 min, 10%→3 min, 40%→3.5 min, 40%→3.55 min, 5%→8 min, 5%
Cimetidine	253/159	0.1% Formic acid	Acetonitrile	2 min, 7%→5.5 min, 80%→5.55 min, 7%→10 min, 7%
Ranitidine	315/176	0.1% Formic acid	Acetonitrile	2 min, 5%→3 min, 40%→3.5 min, 40%→3.55 min, 5%→6 min, 5%
Metoprolol	268/159	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 5%→3 min, 45%→3.5 min, 45%→3.55 min, 5%→6.5 min, 5%
Propranolol	260/183	0.1% Formic acid	Acetonitrile	2 min, 10%→3.5 min, 60%→4 min, 60%→4.05 min, 10%→6.5 min, 10%
Ketoprofen	255/209	0.1% Formic acid	Acetonitrile	1 min, 30%→3 min, 60%→3.5 min, 60%→3.55 min, 30%→6.5 min, 30%

Table 4 Bioavailability and intestinal absorption for CYP3A and P-gp substrates

Compound	Dose <sub>iv</sub> (mg)	Dose <sub>po</sub> (mg)	R <sub>b</sub>	F	F <sub>h</sub> <sup>a</sup>	Observed F <sub>a</sub> F <sub>g</sub>	Reference
Felodipine	2.5	2.5	0.7	0.152	0.377	0.240 <sup>b</sup>	78,79, e
Midazolam	2	6	0.824	0.253	0.638	0.396	80,81
Sildenafil	50	50	0.64	0.41	0.548	0.748	22,82
Triazolam	0.25	0.25	0.760	0.44	0.866	0.508	83,84
Celiprolol	20	100	0.870 <sup>c</sup>	0.296	0.851	0.348	58
Digoxin	0.01 (mg/kg)	0.75	0.96	0.553	0.899	0.615	78,85
Fexofenadine	0.1	0.1	0.74	0.410	0.890	0.461	59
Talinolol	30	100	0.941 <sup>c</sup>	0.453	0.924	0.490	24
Indinavir	16 <sup>d</sup>	400	0.84	0.6	0.521	1.15	25,72,82
Quinidine	233 (as free quinidine)	0.1 1	0.919	0.160 0.207	0.848	0.189 0.245	42,74,86
Saquinavir	12	600	0.74	0.007	0.317	0.0221	82,87, f
Verapamil	10	0.1 3	0.885	0.0677 0.0802	0.482	0.140 0.166	74,88

<sup>a</sup> F<sub>h</sub> was calculated using a hepatic blood flow rate of 25.5 mL/min/kg<sup>54</sup>, except for felodipine

<sup>b</sup> F<sub>h</sub> for felodipine was calculated using a hepatic blood flow rate of 43.4 mL/min/kg<sup>55</sup>

<sup>c</sup> Calculated based on an *in silico* prediction method<sup>78</sup>

<sup>d</sup> Co-administration with 400 mg p.o.

<sup>e</sup> Interview form of Splendil®, AstraZeneca K.K.

<sup>f</sup> Interview form of Invirase®, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

Table 5 Physiological parameters for human fasted state ACAT model

Compartment	Length (cm)	Radius (cm)	pH	Transit time (h)	ESF for CYP3A4 <sup>a</sup> [relative to whole liver]	ESF for P-gp <sup>b</sup> [relative expression level of each compartment]
Stomach	27.39	9.50	1.3	0.25	0	0
Duodenum	13.68	1.50	6.0	0.25	$2.02 \times 10^{-3}$	0.538
Jejunum 1	56.55	1.42	6.2	0.92	$3.16 \times 10^{-3}$	0.645
Jejunum 2	56.55	1.27	6.4	0.73	$3.16 \times 10^{-3}$	0.723
Ileum 1	56.55	1.11	6.6	0.57	$9.98 \times 10^{-4}$	0.770
Ileum 2	56.55	0.96	6.9	0.41	$9.98 \times 10^{-4}$	0.838
Ileum 3	56.55	0.81	7.4	0.29	$9.98 \times 10^{-4}$	0.908
Caecum	12.84	3.33	6.4	4.01	$3.00 \times 10^{-4}$	1.000
Colon	26.87	2.37	6.8	12.04	$3.00 \times 10^{-4}$	1.000

a Regional distribution factor for CYP3A4 in GastroPlus is expressed as intestinal CYP3A4 expression level relative to hepatic expression level. Intestinal CYP3A4 expression are derived from expression level in intestinal homogenate <sup>12</sup>. CYP3A4 expression level in whole liver is calculated with the following assumptions; 111 pmol/mg microsomal protein, 38 mg microsomal protein/g liver, 1800 g of liver weight/human body<sup>89</sup>.

b Regional distribution factor for P-gp in GastroPlus is expressed as relative expression level of each compartment, which is derived from P-gp protein level in human intestine<sup>67</sup>.

Table 6 Physicochemical and kinetic parameters for predicting the intestinal absorption of drugs with GastroPlus

Compound	Molecular weight	LogD or LogP		Reference solubility (mg/mL)	Solubility factor <sup>a</sup>	Fitted pKa <sup>a</sup>	Diffusion coefficient <sup>b</sup> ( $\times 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /s)
		Reported	Reference	<i>In vitro</i> data	Calculated	Calculated	Calculated
Felodipine	384.3	4.64 (pH 7.4)	<sup>78</sup>	0.0143 (pH 7.1)	-	-	0.673
Midazolam	325.8	2.68 (pH 7.5)	<sup>90</sup>	0.0147 (pH 7.7)	133	6.38	0.735
Sildenafil	474.6	2.7 (pH 7.4)	<sup>c</sup>	0.0250 (pH 7.1)	50, 50	6.91, 9.17	0.601
Triazolam	343.2	2.42	<sup>91</sup>	0.037 (pH 6.8)	50	2.66	0.715
Celiprolol	381.5	0.160 (pH 6.8)	<sup>d</sup>	15.2 (pH 7.4)	50	9.60	0.675
Digoxin	780.9	4.11 (pH 7.4)	<sup>78</sup>	0.0397 (pH 6.8)	-	-	0.460
Fexofenadine	501.7	2.0	<sup>e</sup>	0.297 (pH 7.6)	50, 50	3.15, 7.94	0.583
Talinolol	363.5	1.08 (pH 7.4)	<sup>52</sup>	1.24 (pH 7.0)	50	9.20	0.693
Indinavir	613.8	2.66 (pH 7.0)	<sup>f</sup>	0.0300 (pH 7.6)	206	5.79	0.523
Quinidine	324.4	1.10 (pH 6.5)	<sup>92</sup>	1.24 (pH 7.4)	190, 500	4.20, 8.77	0.737
Saquinavir	670.8	2.12	<sup>g</sup>	0.124 (pH 7.8)	7.92	6.99	0.499
Verapamil	454.6	2.7 (pH 7.4)	<sup>93</sup>	4.40 (pH 6.8)	7805	9.35	0.615

<sup>a</sup> The pKa and solubility factors were calculated from various solubilities at different pH.

<sup>b</sup> The diffusion coefficient was calculated based on molecular weight using the Hayduk-Laudie formula installed in GastroPlus.

<sup>c</sup> Interview form of Viagra®, Pfizer Japan Inc.

<sup>d</sup> Interview form of Seloctol®, Nippon Shinyaku Co., Ltd.

<sup>e</sup> Interview form of Allegra®, Sanofi K.K.

<sup>f</sup> Interview form of Crixivan®, MSD K.K.

<sup>g</sup> Interview form of Invirase®, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

Table 7 Apparent permeability of reference compounds

Compound	$P_{app}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)
Atenolol	0.0958
Cimetidine	0.190
Ranitidine	0.364
Metoprolol	9.89
Propranolol	14.3
Ketoprofen	20.6
Verapamil	25.2

Table 8 Passive permeability and unbound fraction in enterocyte for predicting the intestinal absorption of drugs with GastroPlus

Compound	$P_{app}$	$P_{eff}^a$	Unbound fraction in enterocyte
	( $\times 10^{-6}$ cm/s)	( $\times 10^{-4}$ cm/s)	
	<i>In vitro</i> data	Calculated	<i>In vitro</i> data
Felodipine	7.37	2.45	0.00204
Midazolam	26.4	5.67	0.0995
Sildenafil	24.9	5.45	0.113
Triazolam	16.5	4.16	0.255
Celiprolol	1.31	0.786	0.348
Digoxin	3.00	1.36	0.080
Fexofenadine	1.11	0.704	0.465
Talinolol	1.48	0.851	0.724
Indinavir	2.49	1.36	0.789
Quinidine	25.0	5.47	0.215
Saquinavir	4.61	1.80	0.0250
Verapamil	25.2	5.50	0.126

<sup>a</sup>  $P_{eff}$  was calculated from  $P_{app}$  estimated from Caco-2 cells.

Table 9 Kinetic parameters for CYP3A4-mediated metabolism (A) and P-gp-mediated transport (B) of tested drugs

(A)

Compound	$V_{\max}$ (pmol/min/pmol CYP)	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\max}/K_m$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol CYP}$ )
Felodipine	137 $\pm$ 33.0	0.648 $\pm$ 0.196	211
Midazolam	65.3 $\pm$ 11.3	2.06 $\pm$ 0.45	31.7
Sildenafil	78.6 $\pm$ 9.00	4.34 $\pm$ 0.67	18.1
Triazolam	96.8 $\pm$ 11.8	22.9 $\pm$ 3.8	4.23
Indinavir	1.84 $\pm$ 0.180	0.0761 $\pm$ 0.0149	24.2
Quinidine	34.1 $\pm$ 3.30	6.15 $\pm$ 1.31	5.55
Saquinavir	33.0 $\pm$ 3.20	0.395 $\pm$ 0.059	83.5
Verapamil	39.0 $\pm$ 15.9 ( $V_{\max 1}$ ) 53.0 $\pm$ 31.0 ( $V_{\max 2}$ )	1.27 $\pm$ 0.77 ( $K_{m1}$ ) 46.8 $\pm$ 26.5 ( $K_{m2}$ )	31.8

Kinetic parameter for CYP3A4 was estimated from the elimination of the parent compound using recombinant human CYP3A4. Each parameter represents the mean  $\pm$  computer-calculated S.D. (n = 6).

(B)

Compound	$V_{\max}^a$ (pmol/min/ $10^6$ cells)	$K_m^a$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\max}/K_m$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells)
Celiprolol	-	-	1.51
Digoxin	-	-	6.83
Fexofenadine	38.7 $\pm$ 13.1	25.9 $\pm$ 5.9	1.49
Talinolol	57.5 $\pm$ 17.8	11.2 $\pm$ 3.3	4.68
Indinavir	32.0 $\pm$ 28.8	5.94 $\pm$ 4.35	5.39
Quinidine	75.7 $\pm$ 2.3	1.26 $\pm$ 0.23	60.1
Saquinavir	-	-	63.6
Verapamil	-	-	1.18

Each parameter represents the mean  $\pm$  computer-calculated S.D. (n = 3).

<sup>a</sup> The  $V_{\max}$  and  $K_m$  values with regard to unbound concentration in the cells were calculated based on the previous report<sup>49</sup>.  $V_{\max}$  is converted by the use of  $40 \times 10^4$  cells/ $0.33 \text{ cm}^2$ .

-: Saturable kinetics was not observed.



Table 10 Relative metabolic clearance of CYP3A4 and CYP3A5 used in the current ACAT model

Compound	CL <sub>met, CYP3A4</sub> ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol CYP}$ )	CL <sub>met, CYP3A5</sub> ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol CYP}$ )	Ratio CYP3A5/CYP3A4
Felodipine	28.0	18.9	0.675
Midazolam	14.1	26.2	1.86
Sildenafil	16.6	13.9	0.837
Triazolam	3.18	3.72	1.17
Indinavir	14.3	23.6	1.65
Quinidine	5.05	1.51	0.299
Saquinavir	33.3	31.3	0.940
Verapamil	11.8	8.66	0.734

Table 11 Role of CYP3A and P-gp in the intestinal absorption of CYP3A and P-gp substrates

Compound	Observed $F_a F_g$ (%)	Predicted $F_a F_g$ (%)			
		Simulation I	Simulation II	Simulation III	Simulation IV
		SF <sub>CYP3A</sub> =0.0740 SF <sub>P-gp</sub> =0.00651	SF <sub>CYP3A</sub> =0.0740 SF <sub>P-gp</sub> =0	SF <sub>CYP3A</sub> =0 SF <sub>P-gp</sub> =0.00651	SF <sub>CYP3A</sub> =0 SF <sub>P-gp</sub> =0
Felodipine	24.0	10.8	10.8	76.2	76.2
Midazolam	39.6	30.2	30.2	100	100
Sildenafil	74.8	60.0	60.0	99.9	99.9
Triazolam	50.8	57.5	57.5	99.9	99.9
Celiprolol	34.8	31.2	78.4	31.2	78.4
Digoxin	61.5	63.5	97.9	63.5	97.9
Fexofenadine	46.1	33.2	88.3	33.2	88.3
Talinolol	49.0	39.0	82.6	39.0	82.6
Indinavir	100	11.3	29.8	11.6	30.7
Quinidine (0.1mg)	18.9	28.7	53.1	34.0	99.9
Quinidine (1mg)	24.5	29.6	55.7	35.3	99.9
Saquinavir	2.21	3.76	71.0	4.13	94.5
Verapamil (0.1mg)	14.0	16.8	16.6	90.7	100
Verapamil (3mg)	16.6	24.1	25.8	95.9	100
afe	-	0.849	1.536	1.476	2.900
rmse	-	25.2	36.4	46.3	62.9

Table 12 Prediction of the dose-dependent intestinal absorption of CYP3A and P-gp substrates

Compound	Dose (mg)	Observed AUC <sub>po</sub> /dose ratio	Reference	Predicted F <sub>a</sub> F <sub>g</sub>	Predicted F <sub>a</sub> F <sub>g</sub> ratio	Maximum C <sub>u,ent</sub> (μmol/L)	C <sub>u,in max</sub> <sup>b</sup> (μmol/L)	K <sub>m CYP3A4</sub> / K <sub>m P-gp</sub> (μmol/L)
Felodipine	2.5	1.00	20	0.108	1.00	0.173	0.00368	0.648/
	5	0.92		0.122	1.13	0.390	0.00741	N.A.
	10	1.58		0.153	1.42	0.937	0.0148	
Midazolam	7.5	1.00	21	0.334	1.00	14.5	0.0358	2.06/
	15	1.02		0.441	1.32	29.1	0.0715	N.A.
	30	1.37		0.552	1.65	57.3	0.148	
Sildenafil	25	1.00	22	0.503	1.00	34.4	0.191	4.34/
	50	1.02		0.600	1.19	62.7	0.383	N.A.
	100	1.17		0.687	1.37	114	0.768	
	200	1.30		0.743	1.48	211	1.54	
Triazolam	0.125	1.00	56,57	0.574	1.00	0.466	0.00385	22.9/
	0.25	0.96		0.575	1.00	0.962	0.00719	N.A.
Celiprolol	100	1.00	23	0.312	1.00	81.7		N.A./
	200	1.49		0.312	1.00	164		-
	400	2.08		0.313	1.00	332		
	600	2.68		0.314	1.01	503		

Table 12 (Continued)

Compound	Dose (mg)	Observed AUC <sub>po</sub> /dose ratio	Reference	Predicted F <sub>a</sub> F <sub>g</sub>	Predicted F <sub>a</sub> F <sub>g</sub> ratio	Maximum C <sub>u,ent</sub> <sup>a</sup> (μmol/L)	C <sub>u,in max</sub> <sup>b</sup> (μmol/L)	K <sub>m</sub> CYP3A4/ K <sub>m</sub> P-gp (μmol/L)
Digoxin	0.25	1.00	<i>c</i>	0.635	1.00	0.0453		N.A./
	0.5	0.99		0.635	1.00	0.0909		-
Fexofenadine	0.1	1.00	<sup>35</sup>	0.332	1.00	0.0632		N.A./
	60	0.75		0.388	1.17	51.8		1.49
Talinolol	25	1.00	<sup>24</sup>	0.236	1.00	25.2		N.A./
	50	1.24		0.301	1.28	92.5		11.2
	100	1.64		0.390	1.65	264		
	400	1.84		0.552	2.34	821		
Indinavir	400	1.00	<sup>25</sup>	0.113	1.00	553	20.5	0.0761/
	700	1.49		0.106	0.938	997	36.7	5.94
	1000	1.95		0.103	0.912	1440	53.3	
Quinidine <sup>d</sup>	0.1	1.00	<sup>74,94,95</sup>	0.287	1.00	0.0193	0.00392	6.15/
	1	1.28		0.296	1.03	0.216	0.0394	1.26
	10	1.80		0.416	1.45	10.3	0.397	
	100	2.57		0.795	2.77	305	4.03	
	200	4.25		0.866	3.02	639	8.17	
	600	6.40		0.934	3.25	1980	25.3	

Table 11 (Continued)

Compound	Dose (mg)	Observed AUC <sub>po</sub> /dose ratio	Reference	Predicted F <sub>a</sub> F <sub>g</sub>	Predicted F <sub>a</sub> F <sub>g</sub> ratio	Maximum C <sub>u,ent</sub> <sup>a</sup> (μmol/L)	C <sub>u,in max</sub> <sup>b</sup> (μmol/L)	K <sub>m</sub> CYP3A4/ K <sub>m</sub> P-gp (μmol/L)
Saquinavir	200	1.00	96	0.0600	1.00	8.90	0.487	0.395/
	400	0.367		0.0481	0.802	11.6	0.974	-
	600	0.489		0.0376	0.627	12.4	1.46	
Verapamil <sup>e</sup>	0.1	1.00	74	0.168	1.00	0.0358	0.00140	1.27 (K <sub>m1</sub> )/
	3	1.17		0.241	1.43	3.08	0.0418	N.A.
	16	1.77		0.473	2.82	30.9	0.224	
	80	2.44		0.734	4.37	213	1.12	

*a* Maximum unbound concentration in intestinal compartment was calculated by ACAT model.

*b* Maximum unbound concentration at the inlet to the liver (C<sub>u,in max</sub>) was calculated using the following equation:  $C_{u,in max} = f_{ub} \cdot [C_{max,b} + (k_a \cdot Dose \cdot F_a F_g / Q_h)]$  where *f*<sub>ub</sub>, C<sub>max,b</sub>, *k*<sub>a</sub>, F<sub>a</sub>F<sub>g</sub>, and Q<sub>h</sub> are respectively the unbound fraction in blood, maximum drug concentration in blood observed in the clinical study, absorption rate constant, intestinal availability, and hepatic blood flow rate. *k*<sub>a</sub>, F<sub>a</sub>F<sub>g</sub>, and Q<sub>h</sub> were assumed to be 0.1 min<sup>-1</sup>, 1, and 99.5 L/h, respectively.

*c* Interview form of digoxin (Digosin®), Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

*d* Dose of quinidine sulfate, including 82.9% of quinidine

*e* Dose of verapamil hydrochloride, including 92.6 % of verapamil

N.A. Not applicable

-: Saturation was not observed in in vitro experiment

Table 13 Dissolved fraction in intestinal lumen calculated by ACAT model at tested dose-range

Compound	Dose (mg)	Dissolved fraction in intestinal lumen at 48h (%)	Maximum dissolved fraction in intestinal lumen within 0-48h (%)
Felodipine	2.5 / 10	94.8 / 93.8	94.8 / 93.8
Midazolam	6 / 30	100.0 / 100.0	100.0 / 100.0
Sildenafil	25 / 200	100.0 / 98.7	100.0 / 98.7
Triazolam	0.125 / 0.25	100.0 / 100.0	100.0 / 100.0
Celiprolol	100 / 600	100.0 / 100.0	100.0 / 100.0
Digoxin	0.25 / 0.75	100.0 / 99.5	100.0 / 99.5
Fexofenadine	0.1 / 60	100.0 / 83.4	100.0 / 100.0
Talinolol	25 / 400	100.0 / 91.6	100.0 / 100.0
Indinavir	400 / 1000	14.5 / 11.6	91.0 / 89.6
Quinidine	0.1 / 600	100.0 / 100.0	100.0 / 100.0
Saquinavir	200 / 600	51.4 / 22.9	10.0 / 56.7
Verapamil	0.1 / 80	100.0 / 100.0	100.0 / 100.0

## 総括

本研究により得られた知見を、以下にまとめる。

1. CYP3A/P-gp 基質薬物である quinidine 及び verapamil について、消化管 CYP3A/P-gp の飽和に起因する薬物動態の非線形性が認められることをヒト臨床試験により実証した。
2. 非線形薬物動態を示す複数の薬物について、統一された条件下で *in vitro* 実験によりパラメータを取得し、数理モデル中の *in vitro-in vivo* 間の CYP3A, P-gp 活性比を補正する *scaling factor* を最適化した消化管吸収モデルを構築することにより、様々な投与量に対応して複数の CYP3A/P-gp 基質薬物の消化管吸収率( $F_a F_g$ )を包括的に良好に予測できることを示した。

## 将来展望

本研究成果を踏まえ、創薬の現場における開発候補化合物の消化管吸収の定量的な予測のための方法論を提案する(図 D)。創薬において本方法論を適用するためには、まず各ラボで標準化されたプロトコールに従って、CYP3A 代謝/P-gp 輸送実験において reference となる典型基質を複数評価し、ACAT model 解析によりラボの評価系の性能に対応してカスタマイズした SF を本研究の方法論に従って見積もる必要がある。それに続き、最適化した SF を組み込んだ ACAT model を使って、開発候補化合物の in vitro データを基にヒトにおける  $F_aF_g$  の予測を実施することで、従来の方法に比べより予測精度を高めることができると考えている。

本研究では、広範な薬物の代謝/輸送に関わる CYP3A/P-gp に焦点をおき、消化管吸収の定量的予測のためのモデルを構築した。これにより大部分の薬物の消化管吸収挙動を予測可能なモデルを構築できたが、その一方で、十分な予測精度が得られない薬物も存在すると考える。1 つ目は UGTs を介した代謝や BCRP によって輸送される薬物のように本研究でモデル中に組み込まれていない代謝酵素/トランスポーターの基質薬物である。例えば経口投与された raloxifene の  $F_aF_g$  は 3.4% と低く、消化管吸収の抑制には UGTs による代謝の寄与が大きいと考えられている<sup>97,98</sup>。

また、topotecan の消化管吸収は BCRP により抑制されており、BCRP 阻害薬の GF120918 を併用することにより F は 40% から 100% へと増加する<sup>99</sup>。このような特性の薬物についても、UGTs の発現系マイクロソームや BCRP 発現系細胞を用い、SF を最適化する方法論を適用することで、予測可能なモデルを構築することは理論的には可能と考える。本方法論は in vitro 実験で得られ



る速度論パラメータと *in vivo* での  $F_a F_g$  との関係から  $SF$  を見積もることに着眼した手法であり、特定の分子に限らず広く適用できる可能性がある。2 つ目は低溶解性の薬物である。本研究では比較的良好的な溶解性を示す薬剤を対象としてモデルを構築した。結果として低溶解性の薬剤 (indinavir 等) では、消化管吸収率の予測精度が悪くなる傾向が示された。ヒト消化管における胆汁酸による薬物の可溶化作用が考慮されていないことが原因のひとつと考えられる。しかしながら、提案する方法論、すなわちヒトの消化管内の薬物溶解性を模倣できる *in vitro* 実験条件の確立し、*in vitro-in vivo* 間で  $SF$  を設定し最適化するアプローチは、低溶解性薬物の溶解挙動の予測についても有効に機能すると考える。創薬の探索段階では、薬理活性の高い化合物を見出すために構造展開した結果、脂溶性が高く溶解度の低い化合物特性となることが頻繁に見受けられる。そのため、低溶解性化合物の経口吸収性を予測することは重要となる。また、創薬の現場では、製剤や原薬の工夫により溶解度を改善する技術が取り入れられている。低溶解性など広範な特性を示す化合物の経口吸収性を予測するためには、ADME 研究者だけでなく、製剤や物理薬剤領域の研究者との協働が必須となる。本研究で構築された消化管吸収モデルには、薬剤の崩壊・溶解性を組み込むことも可能であり、今後、物性パラメータの最適化も実施すると共に、異なる領域の研究者同士の共通理解を深めるためにも有用な手段であると考えられ、製剤としての経口医薬品開発の効率化にも寄与できるものと期待する。

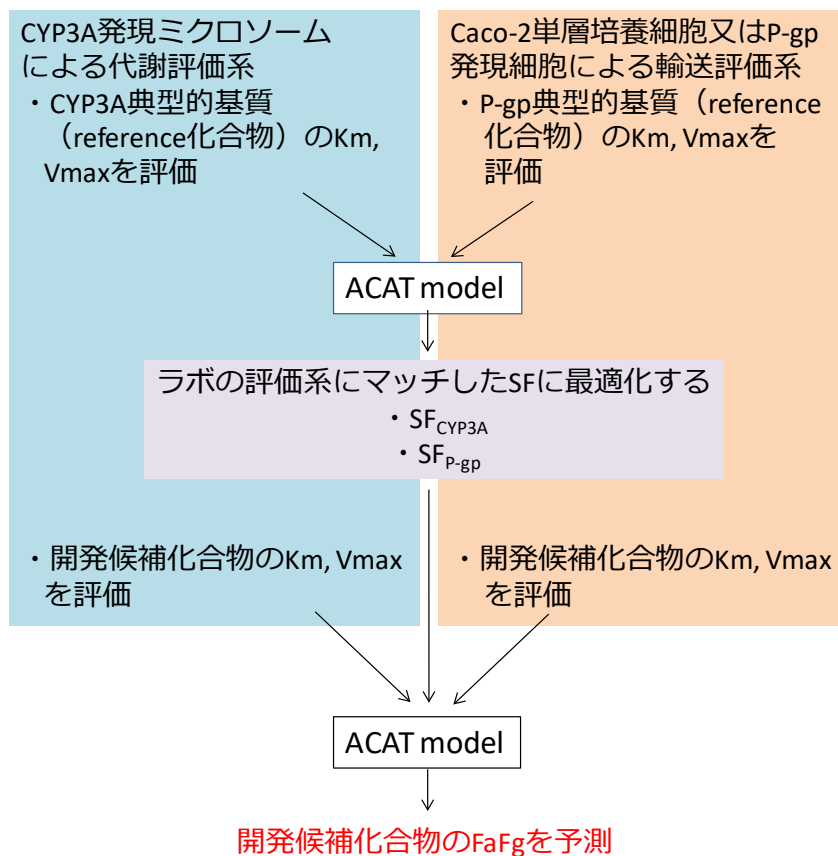


図 D 本研究成果を踏まえた、創薬の現場における開発候補化合物の消化管吸収率予測のための方法論を示したスキーム

## 参考文献

1. Kolars, J. C., Schmiedlin-Ren, P., Schuetz, J. D., Fang, C. & Watkins, P. B. Identification of rifampin-inducible P450III<sub>A4</sub> (CYP3A<sub>4</sub>) in human small bowel enterocytes. *J. Clin. Invest.* **90**, 1871–1878 (1992).
2. Kolars, J. C., Watkins, P. B., Merion, R. M. & Awni, W. M. First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. *Lancet* **338**, 1488–1490 (1991).
3. Strassburg, C. P., Oldhafer, K., Manns, M. P. & Tukey, R. H. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A<sub>7</sub> and UGT1A<sub>10</sub> transcripts in extrahepatic tissue. *Mol. Pharmacol.* **52**, 212–20 (1997).
4. Tukey, R. H. & Strassburg, C. P. Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 581–616 (2000).
5. Fisher, M. B., Paine, M. F., Strelevitz, T. J. & Wrighton, S. A. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* **33**, 273–297 (2001).
6. Cheng, Z., Radomska-Pandya, A. & Tephly, T. R. Cloning and Expression of Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A<sub>8</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 301–305 (1998).
7. Mulder, G. J. & Jakoby, W. B. Sulfation in conjugation reactions. In *Drug Metab.* (Mulder, G. J.

- & Jakoby, W. B.) 107–161 (Taylor and Francis, London, 1990).
8. Falany, C. N. & Roth, J. A. Properties of human cytosolic sulfotransferases involved in drug metabolism. In *Hum. drug Metab. from Mol. Biol. to man.* (Jeffery, E. H.) 101–115 (CRC Press, Boca Raton, 1993).
  9. Weinshilboum, R. & Otterness, D. M. Sulfotransferase enzyme conjugation-deconjugation reactions. In *Conjug. React. drug Metab. Toxic.* (Kaufman, F. C.) 45–78 (Springer-Verlag, Berlin, 1994).
  10. Thiebaut, F. *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7735–7738 (1987).
  11. Saitoh, H. & Aungst, B. J. Possible involvement of multiple P-glycoprotein-mediated efflux systems in the transport of verapamil and other organic cations across rat intestine. *Pharm. Res.* **12**, 1304–1310 (1995).
  12. Paine, M. F. *et al.* Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 1552–1562 (1997).
  13. Maliepaard, M. *et al.* Subcellular localization and distribution of the Breast Resistance Protein Transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61**, 3458–3464 (2001).
  14. Doyle, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15665–15670 (1998).

15. Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1461**, 347–357 (1999).
16. König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I. & Keppler, D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: Localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1461**, 377–394 (1999).
17. Paine, M. F. *et al.* The human intestinal cytochrome P450 'pie'. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 880–886 (2006).
18. Guengerich, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70–83 (2008).
19. Wacher, V. J., Wu, C. Y. & Benet, L. Z. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol. Carcinog.* **13**, 129–34 (1995).
20. Nakashima, M. *et al.* Study on Safety, Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Felodipine Following Single Oral Administration in Healthy Adult Male Volunteers. *Rinshoiyaku* **8**, 1763–1780 (1992).
21. Bornemann, L. D. *et al.* Dose dependent pharmacokinetics of midazolam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **29**, 91–95 (1985).
22. Nichols, D. J., Muirhead, G. J. & Harness, J. A. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral

- doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **53 Suppl 1**, 5S-12S (2002).
23. Nakashima, M., Kanemaru, M., Takiguchi, Y. & Mizuno, A. Phase I Study of NBP-582 (Celiprolol). *Rinsyoiyaku* **4**, 1075–1090 (1988).
24. Wetterich, U. *et al.* Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo. *Pharm. Res.* **13**, 514–522 (1996).
25. Yeh, K. C. *et al.* Single-dose pharmacokinetics of indinavir and the effect of food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 332–338 (1998).
26. Abuasal, B. S., Bolger, M. B., Walker, D. K. & Kaddoumi, A. In silico modeling for the nonlinear absorption kinetics of UK-343,664: a P-gp and CYP3A4 substrate. *Mol. Pharm.* **9**, 492–504 (2012).
27. Artursson, P. & Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 880–885 (1991).
28. Yang, J., Jamei, M., Yeo, K. R., Tucker, G. T. & Rostami-Hodjegan, A. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* **8**, 676–684 (2007).
29. Agoram, B. & Woltosz, W. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on

- oral drug bioavailability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50**, S41–S67 (2001).
30. Venkatakrisnan, K. *et al.* Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1493–1504 (2000).
31. Taguchi, M. *et al.* Kinetics of testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation in the reconstituted system with similar ratios of purified CYP3A4, NADPH-cytochrome p450 oxidoreductase and cytochrome B5 to human liver microsomes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **109**, 53–63 (2001).
32. Kudo, T. *et al.* Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylation and CYP3A4-mediated triazolam  $\alpha$ - and 4-hydroxylation by human liver microsomes. *Xenobiotica.* **46**, 241–246 (2016).
33. Tachibana, T., Kato, M., Watanabe, T., Mitsui, T. & Sugiyama, Y. Method for predicting the risk of drug-drug interactions involving inhibition of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Xenobiotica.* **39**, 430–443 (2009).
34. Petri, N., Tannergren, C., Rungstad, D. & Lennernäs, H. Transport Characteristics of Fexofenadine in the Caco-2 Cell Model. *Transport* **21**, 1398–1404 (2004).
35. Yamazaki, A. *et al.* Microdose study of a P-glycoprotein substrate, fexofenadine, using a non-radioisotope-labelled drug and LC/MS/MS. *J. Clin. Pharm. Ther.* **35**, 169–175 (2010).

36. Shirasaka, Y., Sakane, T. & Yamashita, S. Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane. *J. Pharm. Sci.* **97**, 553–565 (2008).
37. Obach, R. S. & Reed-Hagen, A. E. Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 831–837 (2002).
38. Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. & Uno, T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* **4**, 879–885 (1981).
39. Ito, K. *et al.* Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* **50**, 387–412 (1998).
40. Sawada, Y., Hanano, M., Sugiyama, Y., Harashima, H. & Iga, T. Prediction of the volumes of distribution of basic drugs in humans based on data from animals. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **12**, 587–596 (1984).
41. Manitpisitkul, P. & Chiou, W. L. Intravenous verapamil kinetics in rats: Marked arteriovenous concentration difference and comparison with humans. *Biopharm. Drug Dispos.* **14**, 555–566 (1993).
42. Ueda, C. T., Williamson, B. J. & Dzindzio, B. S. Absolute quinidine bioavailability. *Clin. Pharmacol. Ther.* **20**, 260–265 (1976).



43. Fromm, M. F., Busse, D., Kroemer, H. K. & Eichelbaum, M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology* **24**, 796–801 (1996).
44. Dedrick, R. L. & Forrester, D. D. Blood flow limitations in interpreting Michaelis constants for ethanol oxidation in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 1133–1140 (1973).
45. Hirota, N. *et al.* In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**, 53–71 (2001).
46. 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.* **29**, 1316–1324 (2001).
47. Galetin, A., Brown, C., Hallifax, D., Ito, K. & Houston, J. B. Utility of recombinant enzyme kinetics in prediction of human clearance: impact of variability, CYP3A5, and CYP2C19 on CYP3A4 probe substrates. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1411–1420 (2004).
48. Watanabe, T., Kusuhara, H., Maeda, K. & Shitara, Y. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Predict Transporter-Mediated Clearance and Distribution of Pravastatin in Humans. *Pharmacology* **328**, 652–662 (2009).
49. Tachibana, T. *et al.* Model analysis of the concentration-dependent permeability of P-gp substrates. *Pharm. Res.* **27**, 442–446 (2010).
50. 杉山雄一 & 前田和哉 In vitro-in vivo補外法. In 分子薬物動態学 (杉山雄一 & 楠原洋之)

- 220–247 (南山堂, 東京, 2008).
51. Interview form of Triazolam. 9th ed. (2012). Fukui, Japan: Kobayashi Kako co., Ltd.
  52. Gramatté, T., Oertel, R., Terhaag, B. & Kirch, W. Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**, 541–549 (1996).
  53. Bergström, C. A. S., Luthman, K. & Artursson, P. Accuracy of calculated pH-dependent aqueous drug solubility. *Eur. J. Pharm. Sci.* **22**, 387–398 (2004).
  54. Wynne, H. A. *et al.* The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* **9**, 297–301 (1989).
  55. Bengtsson-Hasselgren, B., Rönn, O., Blychert, L. O., Edgar, B. & Raner, S. Acute effects of felodipine and nifedipine on hepatic and forearm blood flow in healthy men. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **38**, 529–533 (1990).
  56. Greenblatt, D. J. *et al.* Ketoconazole inhibition of triazolam and alprazolam clearance: Differential kinetic and dynamic consequences. *Clin. Pharmacol. Ther.* **64**, 237–247 (1998).
  57. Greenblatt, D. J. *et al.* Inhibition of triazolam clearance by macrolide antimicrobial agents: in vitro correlates and dynamic consequences. *Clin. Pharmacol. Ther.* **64**, 278–285 (1998).
  58. Caruso, F. S. *et al.* Celiprolol: pharmacokinetics and duration of pharmacodynamic activity. *Br. J. Clin. Pract. Suppl.* **40**, 12–16 (1985).

59. Lappin, G. *et al.* Pharmacokinetics of fexofenadine: evaluation of a microdose and assessment of absolute oral bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 125–131 (2010).
60. Sun, D. *et al.* 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 (2002).
61. Lin, Y. S. *et al.* Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol. Pharmacol.* **62**, 162–172 (2002).
62. Haufroid, V. *et al.* The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* **14**, 147–154 (2004).
63. Mai, I. *et al.* MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **58**, 548–553 (2004).
64. Dresser, G. *et al.* Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **71**, 11–20 (2002).
65. Kato, Y. *et al.* Involvement of Influx and Efflux Transport Systems in Gastrointestinal Absorption of Celiprolol. *Animals* **98**, 2529–2539 (2009).
66. Schwarz, U. I. *et al.* Grapefruit juice ingestion significantly reduces talinolol bioavailability. *Clin.*

- Pharmacol. Ther.* **77**, 291–301 (2005).
67. Mouly, S. & Paine, M. F. P-Glycoprotein Increases from Proximal to Distal Regions of Human Small Intestine. *October* **20**, 1595–1599 (2003).
68. Sheiner, L. B. & Beal, S. L. Some suggestions for measuring predictive performance. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **9**, 503–512 (1981).
69. Obach, R. S. *et al.* The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 46–58 (1997).
70. Gertz, M., Houston, J. B. & Galetin, A. Physiologically based pharmacokinetic modeling of intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates with high intestinal extraction. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 1633–1642 (2011).
71. Holmstock, N. *et al.* Exploring food effects on indinavir absorption with human intestinal fluids in the mouse intestine. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 27–32 (2013).
72. Yeh, K. C. *et al.* Simultaneous investigation of indinavir nonlinear pharmacokinetics and bioavailability in healthy volunteers using stable isotope labeling technique: study design and model-independent data analysis. *J. Pharm. Sci.* **88**, 568–573 (1999).
73. Kawai, Y. *et al.* Profiling and trend analysis of food effects on oral drug absorption considering micelle interaction and solubilization by bile micelles. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **26**, 180–191 (2011).

74. Maeda, K. *et al.* Nonlinear pharmacokinetics of oral quinidine and verapamil in healthy subjects: a clinical microdosing study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90**, 263–270 (2011).
75. Ke, A. B., Nallani, S. C., Zhao, P., Rostami-Hodjegan, A. & Unadkat, J. D. A PBPK Model to Predict Disposition of CYP3A-Metabolized Drugs in Pregnant Women: Verification and Discerning the Site of CYP3A Induction. *CPT pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **1**, 1–10 (2012).
76. Kato, Y. *et al.* Involvement of influx and efflux transport systems in gastrointestinal absorption of celiprolol. *J. Pharm. Sci.* **98**, 2529–2539 (2009).
77. Englund, G. *et al.* 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 (2006).
78. Uchimura, T., Kato, M., Saito, T. & Kinoshita, H. Prediction of human blood-to-plasma drug concentration ratio. *Biopharm. Drug Dispos.* **31**, 286–297 (2010).
79. Edgar, B. *et al.* Felodipine kinetics in healthy men. *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 205–211 (1985).
80. Tsunoda, S. M., Velez, R. L., Moltke, L. L. von & Greenblatt, D. J. Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**, 461–471 (1999).
81. Perdaems, N. *et al.* Predictions of metabolic drug-drug interactions using physiologically based modelling: Two cytochrome P450 3A4 substrates coadministered with ketoconazole or verapamil.

- Clin. Pharmacokinet.* **49**, 239–258 (2010).
82. Gertz, M., Harrison, A., Houston, J. B. & Galetin, A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 1147–1158 (2010).
83. Vanderveen, R. P., Jirak, J. L., Peters, G. R., Cox, S. R. & Bombardt, P. A. Effect of ranitidine on the disposition of orally and intravenously administered triazolam. *Clin. Pharm.* **10**, 539–543 (1991).
84. Kroboth, P. D., McAuley, J. W., Kroboth, F. J., Bertz, R. J. & Smith, R. B. Triazolam pharmacokinetics after intravenous, oral, and sublingual administration. *J. Clin. Psychopharmacol.* **15**, 259–262 (1995).
85. Goodman, L. S., Gilman, A., Hardman, J. G., Gilman, A. G. & Limbird, L. E. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York.* (2005).
86. Hughes, I. E., Ilett, K. F. & Jellett, L. B. The distribution of quinidine in human blood. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2**, 521–525 (1975).
87. Kupferschmidt, H. H., Fattinger, K. E., Ha, H. R., Follath, F. & Krähenbühl, S. Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **45**, 355–359 (1998).
88. Fromm, M., Busse, D. & Kroemer, H. Differential induction of prehepatic and hepatic

- metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology* **24**, 796–801 (1996).
89. Rostami-Hodjegan, A. & Tucker, G. T. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 140–148 (2007).
90. Gerecke, M. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **16 Suppl 1**, 11S-16S (1983).
91. Rodgers, T. & Rowland, M. Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes. *Pharm. Res.* **24**, 918–933 (2007).
92. Grube, S. *et al.* Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: quinidine sulfate. *J. Pharm. Sci.* **98**, 2238–2251 (2009).
93. Winiwarter, S. *et al.* Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J. Med. Chem.* **41**, 4939–4949 (1998).
94. Dankier, P., Hansen, L. L. & Brøsen, K. Effect of fluvoxamine on the pharmacokinetics of quinidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 451–456 (1999).
95. Darbar, D., Dell’Orto, S., Mörike, K., Wilkinson, G. R. & Roden, D. M. Dietary salt increases first-pass elimination of oral quinidine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **61**, 292–300 (1997).
96. Hsu, A. *et al.* Pharmacokinetic interactions between two human immunodeficiency virus protease inhibitors, ritonavir and saquinavir. *Clin. Pharmacol. Ther.* **63**, 453–464 (1998).

97. Mizuma, T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *Int. J. Pharm.* **378**, 140–141 (2009).
98. Kemp, D. C., Fan, P. W. & Stevens, J. C. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: Contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 694–700 (2002).
99. Kuppens, I. E. L. M. *et al.* A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3276–3285 (2007).



## 謝辞

本研究の推進にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院 薬学系研究科 分子薬物動態学教室 教授 楠原洋之 先生、並びに国立研究開発法人理化学研究所 科技ハブ産連本部 バトンゾーン研究推進プログラム 杉山特別研究室 杉山雄一 先生に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多大なる御助言と御指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 講師 前田和哉 先生に深謝いたします。

臨床研究の実施、並びに臨床サンプルの提供に際しご尽力いただきました、北里大学病院 臨床試験センター長 熊谷雄治 先生に深謝いたします。

解析ソフトウェアの提供に際しご尽力いただきました、ノーザンサイエンスコンサルティング株式会社 東嶋 知彦 氏に深謝いたします。

本研究の機会を与えてくださり、研究の推進に多大なるご支援を賜りました杏林製薬株式会社 薬物動態研究所長 鳥海千冬 博士に深謝いたします。

最後に私の研究を支えてくださいました、東京大学大学院 薬学系研究科 分子薬物動態学教室  
の皆さま、杏林製薬株式会社 薬物動態研究所の皆さま、そして私の家族に深く感謝いたします。