

博士論文

医薬品開発における内因性基質を用いた
肝 organic anion transporting polypeptide(OATP) 1B
介在性薬物相互作用の定量的リスク評価法に関する研究

竹原 一成

医薬品開発における内因性基質を用いた
肝 organic anion transporting polypeptide(OATP) 1B
介在性薬物相互作用の定量的リスク評価法に関する研究

竹原 一成

目次

| | |
|---|-----------|
| 略語およびパラメータ | 3 - 4 |
| 序論 | 5 - 9 |
| 第一章 OATP1B 内因性基質の同定と臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性評価 | |
| 1. 臨床 DDI バイオマーカーとなりうる OATP1B 内因性基質の新規同定 | |
| 要約 | 11 |
| 序論 | 12 - 15 |
| 結果 | 16 - 17 |
| 考察 | 18 - 20 |
| 図表 | 21 - 27 |
| 2. 各種 OATP1B 内因性基質候補の臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性検証 | |
| 要約 | 29 |
| 序論 | 30 - 33 |
| 結果 | 34 - 38 |
| 考察 | 39 - 45 |
| 図表 | 46 - 47 |
| 第二章 OATP1B 内因性基質の臨床 DDI バイオマーカーとしての実用に向けた検討 | |
| 要約 | 69 |
| 序論 | 70 - 71 |
| 結果 | 72 - 74 |
| 考察 | 75 - 77 |
| 図表 | 78 - 84 |
| 結論および今後の展望 | 85 - 89 |
| 謝辞 | 90 |
| 実験方法 | 91 - 106 |
| 参考文献 | 107 - 116 |

略語およびパラメータ

| | |
|-------------------------|--|
| ABC | ATP-binding cassette |
| AUC | area under the concentration-time curve |
| AUCR | AUC ratio |
| BDC | bile duct cannulation |
| BSEP | bile salt export pump |
| C4 | 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one |
| CA | cholic acid |
| CDCA | chenodeoxycholic acid |
| CDCA-24G | chenodeoxycholic acid-24-glucuronide |
| CL/F | apparent total body clearance |
| C _{max} | maximum plasma concentration |
| CP | coproporphyrin |
| CYP | cytochrome P450 |
| DCA | deoxycholic acid |
| DDI | drug-drug interactions |
| DHEAS | dehydroepiandrosterone sulfate |
| F _a | fraction absorbed |
| FDA | Food and Drug Administration |
| F _g | intestinal availability |
| f _u | unbound fraction |
| FXR | farnesoid X receptor |
| GBC | gallbladder cannulation |
| GCA | glycocholic acid |
| GCDCA | glycochenodeoxycholic acid |
| GCDCA-S | glycochenodeoxycholic acid-3-sulfate |
| GDCA | glycodeoxycholic acid |
| GLCA | glycolithocholic acid |
| GLCA-S | glycolithocholic acid- <i>O</i> -sulfate |
| HDA | hexadecanedioate |
| IC ₅₀ | half-maximal inhibitory concentration |
| I _{u, in, max} | maximum unbound plasma concentration at the inlet to the liver |
| k _a | absorption rate constant |
| K _i | inhibition constant |

| | |
|-------------|--|
| K_m | Michaelis-Menten constant |
| LCA-S | lithocholic acid- <i>O</i> -sulfate |
| LC-MS/MS | liquid chromatograph-mass spectrometry |
| LLOQ | lower limit of quantification |
| MBDD | model-based drug development |
| MRP | multidrug resistance-associated protein |
| NTCP | sodium-taurocholate cotransporting polypeptide |
| OAT | organic anion transporter |
| OATP1B | organic anion transporter polypeptide 1B |
| PBPK | physiologically based pharmacokinetics |
| PET | positron emission tomography |
| Q_h | hepatic blood flow rate |
| r^2 | decision coefficient |
| SD | standard deviation |
| SHP | small heterodimer partner |
| $t_{1/2}$ | elimination half-life |
| TCA | taurocholic acid |
| TCDC | taurochenodeoxycholic acid |
| TDA | tetradecanedioate |
| TDCA | taurodeoxycholic acid |
| TLCA-S | tauroolithocholic acid- <i>O</i> -sulfate |
| TUDCA | tauroursodeoxycholic acid |
| UGT | UDP-glucuronosyltransferase |
| X_{bile} | cumulative amount excreted into bile |
| X_{urine} | cumulative amount excreted into urine |

序論

医薬品開発において理想的な薬物動態プロファイルを得ることは、薬効の最大化および副作用の軽減を可能とする用法用量の設定に繋がり、その是非が上市の成功確率に大きく寄与する。ここでの理想的な薬物動態プロファイルとは、良好なバイオアベイラビリティ、適度な半減期、線型性、個人間および個人内変動が小さい、代謝酵素およびトランスポーターの寄与が小さい等が挙げられる。加えて、臨床現場においては複数の薬物を併用する機会も多いが、併用することで単剤での使用時とは異なる効果を示す薬物相互作用 (drug-drug interactions, DDI) の回避もその一つである。DDI は薬力学的な要因と、薬物動態の変動を伴う薬物動態学的要因に大別されるが、本研究では、特に薬物動態学的要因により生じる DDI について言及する。過去には併用により薬物動態が変動し、重篤な有害事象の発生に繋がった事例も複数報告されている。

薬物動態学的要因として、薬物の体内動態に関わる代謝酵素およびトランスポーターの阻害が知られている。阻害を生じる薬物は相互作用薬、影響を受ける基質となる薬物は被相互作用薬と呼ばれる。薬物動態学的薬物相互作用では、被相互作用薬の体内動態の変動を通じて、有害事象の発現リスクを高める可能性がある。このような薬物相互作用に関与する薬物 (相互作用薬および被相互作用薬) は患者の不利益とならないよう併用注意あるいは併用禁忌として使用を制限される場合があり、医薬品開発において、DDI リスクの有無やその程度に関して、慎重に評価する必要がある。そのため過去に引き起こされた薬物相互作用および関連する臨床副作用について遡及的研究を行ない、同様の機序により生じる DDI を回避するためのドラッグデザインやスクリーニングシステムが化合物探索に組み込まれる。その兆候を早期の段階で検出する方法論として前臨床動物実験や *in vitro* から *in vivo* への予測研究も大きく進展している。近年、日米 EU の規制当局 [Food and Drug Administration (FDA)、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA)、および European Medicines Agency (EMA)] から医薬品開発における薬物相互作用

に関するガイドライン・ガイダンスが発出され、前臨床開発段階および臨床開発段階において、体系的に DDI リスクを評価する環境が整えられた¹⁻⁴。

ヒト肝特異的に発現する organic anion transporter polypeptide 1B1 (OATP1B1) および OATP1B3 (以後、OATP1B) は、血液側からの種々アニオン性化合物の肝細胞内取り込みに寄与するトランスポーターとして知られている^{5,6}。その基質認識性は非常に広範であり、内因性物質のほか、スタチンやフィブラートといった高脂血症治療薬や抗 HCV 薬をはじめとした多くの医薬品の体内動態の一端を担う重要なトランスポーターである^{7,8}。同時に、cyclosporine A や rifampicin などこれらを阻害する薬物も多く報告されており⁹、これら阻害薬との併用による DDI により OATP1B 基質となる薬物の血漿中濃度の増加が生じる。スタチンによる横紋筋融解症の発現リスクが高まる可能性の他^{10,11}、repaglinide の血糖値低下作用の増強¹²、irinotecan の好中球減少の頻度上昇¹³など OATP1B 阻害に伴う血漿中濃度増大に起因する予期せぬ効果や副作用の増強と SNPs の関連について報告されている。OATP1B は多くの薬物の主たる消失臓器である肝臓の取り込み過程において機能するため、他の薬物トランスポーターによる DDI と比較して OATP1B を介する DDI は血漿中濃度の上昇率が大きい傾向にある。必然的に有害事象の発現に繋がる可能性が高く、医薬品開発においては特に注意が必要であるため、開発候補品が OATP1B 阻害剤および基質となる際には、前臨床試験および臨床試験において、前述の各規制当局にて定められた評価フローに従って DDI リスク評価を実施することが求められている。

OATP1B 阻害に関わる DDI リスク評価にはまず、阻害定数 (K_i あるいは IC_{50}) など *in vitro* 試験によって得られたパラメータおよび第一相試験 (Phase1 試験) など臨床早期段階で得られたヒトにおける被相互作用薬の薬物動態パラメータ (F_a 、 F_g 、 f_u 、 C_{max} 、 k_a および Dose) を含む以下の式より R 値を算出する。

$$R = 1 + I_{u, in, max} / K_i \text{ or } IC_{50}$$

$$I_{u, in, max} = f_u \times (C_{max} + k_a \times Dose \times F_a \times F_g / Q_h)$$

算出した R 値があらかじめ設定されたカットオフ値を超え、リスク有りと判断された化合物は、プローブ薬として指定された典型的基質を用いた臨床 DDI 試験による in vivo での DDI リスク評価が推奨される¹⁴。しかしながら、このリスク判定には偽陽性のみならず偽陰性も一定数含まれることが報告されており、その予測精度には依然として課題が存在する¹⁴。この R 値によるリスク判定の不確実性は in vitro パラメータを導く評価系が標準化されていないことによる研究機関および試験間のばらつき、阻害剤の代謝物による上乗せ効果やタンパク結合率の算出確度が主な要因として挙げられる。

その他にも、臨床 DDI 試験の実施に関連した医薬品開発上の課題は存在する。その 1 つは臨床試験におけるタイムラインの問題である。予測には薬理学的作用量における薬物動態パラメータを用いる必要があるが、これは一般的に、Phase1 試験で実施される用量漸増試験を実施後に明らかとなる。そのため必然的に臨床 DDI 試験を実施するタイミングはこれ以降となるが、臨床開発を進める上で臨床試験を別途追加することになるため遅延が起り得る。その他、プローブ薬および治験薬をこの目的のために投薬することとなるため被験者側にとって負担となることや、臨床 DDI 試験は健常人で評価する 경우가多く、必ずしも患者での DDI リスクを反映できないなど、実臨床上のリスクの洗い出しに限界があることも課題として挙げられる。また、当然のことながら臨床試験の実施には費用がかかるため、その実施判断のためにより確度の高い評価が求められる。近年、これらの課題を解決しうる手段の 1 つとして OATP1B 等、トランスポーターの内因性基質を代替プローブとして用いる手法が検討されている^{15,16}。内因性基質を用いることで患者を含むヒトにおける DDI リスク判定がプローブ薬の併用なく可能となる。このことは、臨床 DDI 試験の実施を待たず用量漸増試験を含む Phase1 試験から DDI が観測可能であることを意味しており、早期かつ定量的にそのリスクを把握できると考えられる。

そこで本研究では OATP1B の DDI バイオマーカーとなりうる内因性基質を見出し、in vitro および in vivo での各種評価によりその特性を明らかにするとともに、臨床試験を実施し検討す

ることで医薬品開発における DDI リスク評価としての OATP1B 内因性基質の利用法の確立を目指した。

第一章第一節では、DDI バイオマーカーとして有用性の高い新規の OATP1B 内因性基質の取得を目的に、メタボローム解析結果を利用し網羅的な視点で探索を行った。それにより肝臓におけるクリアランスの寄与が大きいと考えられた胆汁酸抱合体 glycochenodeoxycholic acid-3-sulfate (GCDCA-S) に着目し、同じく胆汁酸抱合体である chenodeoxycholic acid-24-glucuronide (CDCA-24G) とともに *in vitro* 評価により hOATP1B1、hOATP1B3 の基質となり得るか検討した。これら化合物は胆汁酸に由来するものであり、sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) は胆汁酸の腸肝循環過程において肝取り込みに寄与している。そこで胆汁酸抱合体においても同様に NTCP に基質認識され肝取り込みにいて主に働く可能性を考え、hOATP1B1、hOATP1B3 に加え hNTCP についても強制発現 HEK293 細胞を用いて GCDCA-S および CDCA-24G に対する輸送活性について検討した。また、発現細胞で得られた知見を踏まえ、ヒト肝細胞における GCDCA-S および CDCA-24G に取り込みに対するそれぞれの阻害剤の効果から OATP1B と NTCP の活性を区別することで、それぞれのトランスポーターのヒトにおける肝取り込みの寄与を推定した。

第一章第二節では、OATP1B 基質であることが明らかとなった GCDCA-S および CDCA-24G の代替プローブとしての妥当性検証のため、臨床検体および非臨床動物を用いた *in vivo* 評価を実施した。ヒトにおける検証では、rifampicin 非投与時と投与時の血漿サンプルを比較検討に用いた。非臨床研究では、医薬品開発においてヒトの動態を予測する目的で利用されるカニクイザルおよびヒト肝移植キメラマウスを用いた検討を実施した。その際、それぞれに胆汁分流モデルを作成し、内因性基質の腸肝循環に対する考察も併せて行った。

第二章では、医薬品開発における内因性バイオマーカーを用いた定量的 DDI リスク評価法の確立に向け、rifampicin 300 mg および 600 mg の 2 用量を用いた用量反応性試験を実施し、内因性基質の血中濃度に対する rifampicin の用量反応性を確認した。また、OATP1B 基質である

スタチン類をプローブ薬として用いることで、得られた内因性基質の area under the concentration-time curve (AUC) との相関について検討を行った。

本研究で得られた OATP1B の DDI バイオマーカーとなる内因性基質を用いた DDI リスク判定の方法論を臨床開発の初期段階から適用し、非臨床試験で得られた結果や過去のデータを含めて解析することで適切かつ早期の判断が可能となり、開発品の価値最大化だけでなく、開発計画の選択肢の拡大や上市に向けて加速化が期待される。

第一章

OATP1B 内因性基質の同定と臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性評価

第一節

臨床 DDI バイオマーカーとなりうる OATP1B 内因性基質の新規同定

要約

臨床における早期かつ定量的な DDI リスク評価を可能とする OATP1B の DDI バイオマーカーの候補選出として、OATP1B 内因性基質の新規同定を行った。過去のメタボローム解析およびそれに付随する知見では、胆汁酸抱合体 GCDCA-S の腎排泄トランスポーター阻害下において循環血漿中濃度への影響が殆ど認められなかったことから、全身における主たる消失は腎臓ではなく肝臓が担っていると推測された。また、別の報告において、OATP1B の阻害薬である cyclosporine A 投与した際に GCDCA-S と推定される化合物の血漿中濃度は増大していたため、GCDCA-S が OATP1B の内因性基質あることを支持する結果が示されている。このことから、GCDCA-S および同様に胆汁酸抱合体である CDCA-24G に関して検討を進めることとした。肝取り込みに寄与する可能性のある、hOATP1B1、hOATP1B3 および hNTCP の強制発現細胞を用いて、GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みを検討したところコントロールと比較し有意な取り込みが確認された。また、OATP1B の典型的阻害剤である rifampicin は hOATP1B1 および hOATP1B3 による取り込みを阻害し、その IC₅₀ 値は他の OATP1B 基質と同等であることが示された。NTCP の阻害剤である pioglitazone は hOATP1B1、hOATP1B3 および hNTCP による全ての取り込み活性を低下させた。次に、これら阻害剤の特性を利用し OATP1B と NTCP を区別することで、ヒト肝細胞内への GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みにおいて OATP1B が優位に機能していると考えられた。以上より GCDCA-S および CDCA-24G は OATP1B1、OATP1B3 および NTCP の内因性基質であり、OATP1B の DDI バイオマーカーとして利用可能であることが示唆された。

序論

OATP1B を介する薬物相互作用は、阻害薬が基質である被相互作用薬の肝臓への取り込みを抑制することで、循環血中の被相互作用薬の濃度が増大し、薬効の変化あるいは毒性をもたらすこととなる。従って、それぞれの医薬品に関して、薬物相互作用の有無といった定性評価のみならず、相互作用薬の OATP1B の阻害に伴う被相互作用薬の血漿中濃度の増大がどの程度、投与後いつまで起こるかという定量的な DDI リスクに関する情報を得ることが、医薬品の適正使用にとって必要なことと言える。これらは前臨床段階における検討のみから確度の高い予測性を得ることは困難であり、臨床段階における阻害薬のヒト薬物動態プロファイルを加味した定量的予測や臨床 DDI 試験による検証が必要とされる。しかし、臨床 DDI 試験は投与量や投与頻度、被験者といった条件に限りのある中での検証であり、実臨床における真に適正な用法用量の選択手法としては未だ議論の余地が存在する。投与量に関しては、薬理学的作用量を基準として臨床 DDI 試験を実施することとなり十分な情報が得られない恐れがある上、多くは短期間の併用効果の観察となるため、薬剤の蓄積や長期間の曝露による影響を感知できない可能性も否定できない。被験者においては投薬による不利益がない限り、Phase1 試験や臨床 DDI 試験の実施にあたり健常人を対象とするケースが多く、その場合、実際に治療の対象となる患者の全身状態を加味することができない。例えば、肝機能低下等による OATP1B 発現量の変化など薬物相互作用上考慮すべき事項を見落とす可能性や、腎臓疾患においては、腎排泄能低下に伴う薬物の全身クリアランスに対する腎外クリアランスの寄与率の増大により健常人と異なる薬物動態プロファイルを示す可能性も考えられる。このような疾患特異的な背景により、事後的に阻害薬の投与量および投与間隔の変更を余儀なくされ、再検討が必要となるケースも存在する。前述のような限られた情報の中で臨床におけるリスク判定やその定量的予測を導く手法として生理学的薬物速度論 (PBPK) モデルのような数理モデルが有用であるが、前提として用いられるパラメータにも疾患背景が影響を与えかねない上、膨大なデータと検証が求められる。

こういった懸念から臨床 DDI 試験のみならず開発候補品に関わる臨床試験全体を通じて、DDI リスクのモニタリングおよび評価が望まれている一方、医薬品の DDI ポテンシャルを推し測るにはプローブ薬として被相互作用薬の併用が前提というジレンマが存在する。そこで近年注目されているのが、内因性基質を被相互作用薬の代替として DDI リスクを見積もる手法である。プローブ薬の代わりに内因性基質を用いれば、投薬時と比較可能な陰性対照データとして、開発候補品の投与前あるいは偽薬の投与を受けた患者から得られる血液検体が利用可能である限り、開発候補品に関わるすべての臨床試験において適用することが出来る。従って、その開発候補品の薬物相互作用に関するより詳細な情報を得ることが期待される。また、評価にあたり多くの場合追加の採血を必要としないことや、プローブ薬に起因する影響を考慮する必要が無いことも利点である。通常、臨床 DDI 試験は薬理学的作用量を基準として実施するため Phase1 試験など開発初期段階では実施できないが、内因性基質を用いることで用量漸増試験など早期にヒトにおける薬物相互作用の検証が可能となり、その後続く臨床 DDI 試験デザインにも活用できる。また、確度に課題のある *in vitro* パラメータを用いない DDI リスク評価法は R 値の妥当性検証という観点においても有用である。

OATP1B に関しても DDI リスク評価を志向した内因性基質の探索やその有用性の検討が進められている。各種胆汁酸やビリルビン^{17,18}、tetradecanedioate (TDA) および hexadecanedioate (HDA)¹⁹、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)²⁰、ヘム合成過程における副次代謝産物である coproporphyrin (CP) I および III²¹⁻²⁴ といった内因性基質が OATP1B の DDI バイオマーカー候補として報告されており、その検証には *in vitro* 評価だけでなく、げっ歯類やサルを用いた非臨床 *in vivo* 評価、臨床研究など多岐に渡る²⁵。しかしながら、これらをプローブ薬の代替として、医薬品開発や臨床現場において適用していく上でそれぞれの基質ごとに妥当性や検出力、交絡因子など課題も残されているのも事実である。また、OATP1B は有機アニオン性の化合物を中心に非常に広範な基質認識性を有していることから内因性基質が数多くあることは想像に難くなく、前述の他にも DDI バイオマーカーとしてより有用性の高い未知の内因性基質の存

在が期待できる。実際にビリルビンや CP は、OATP1B が原因遺伝子として知られる遺伝疾患のローター症候群の特徴的な症状に関連するものとして OATP1B との関連性が知られていたほか²⁶、胆汁酸に関しても腸肝循環過程における肝取り込みの OATP1B の関与など、既知の事実に基づいていることからその余地があると考えられる²⁷。そこで、網羅的なアプローチでより DDI バイオマーカーとして有用性の高い新規の OATP1B 内因性基質の探索を行うこととし、検討すべき化合物の候補を得るために、既報のメタボローム解析の結果を利用した。

2016 年に Tsuruya らより報告された、メタボローム解析による probenecid 投与前後における健常人被験者の血漿中および尿中の内因性代謝物の変動の結果に着目した。probenecid は腎の基底膜側に発現する有機アニオントランスポーターである organic anion transporter 1 (OAT1) および OAT3 の典型的な阻害剤と知られている。この薬剤の投与により、胆汁酸硫酸抱合体である GCDCA-S の腎クリアランスの低下が確認され、腎排泄過程における OAT の関与を示した。しかしながら、腎排泄の強い抑制が見られた一方で血漿中濃度の変動は殆ど見られなかったことから GCDCA-S の主な消失経路は腎臓ではなく肝臓にあることが想定された²⁸。加えて、GCDCA-S は前述の通り硫酸抱合体、つまりアニオン性化合物であることから、肝取り込みに OATP1B が関与していると考えられた。併せて、2016 年に Yee らが報告した OATP1B の強力な阻害剤である cyclosporine A 投与前後における健常人被験者の血漿を対象としたメタボローム解析においても、GCDCA-S と推定される代謝物 (X-12850) の血漿中濃度の上昇が示唆された¹⁹。これらのことから、GCDCA-S が OATP1B の内因性基質および臨床 DDI バイオマーカーとしての資質を有していると考えられた。

GCDCA-S は cholesterol を初発として肝臓で生合成される一次胆汁酸 chenodeoxycholic acid (CDCA) のグリシン抱合体である glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) が硫酸抱合を受けた胆汁酸硫酸抱合体である。また CDCA は UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A3 により 24 位のカルボン酸がグルクロン酸抱合を受けることが知られており、CDCA-24G についても同時に検討を行うこととした (図 1)。

OATP1B1 および OATP1B3 強制発現細胞を用いた取り込み試験を実施し、これらの化合物が内因性基質であるかの検討を行った。また、肝臓に発現する OATP1B の DDI バイオマーカーとして用いる場合、併用薬の OATP1B 阻害による血漿中濃度の上昇が観察可能でなければならない。GCDCA-S の主たる消失経路と考えられる肝取り込みにおける OATP1B の寄与率が代替マーカーとして機能する重要な要素であるため、凍結ヒト肝細胞を用いた検討によりヒトにおける胆汁酸抱合体の肝取り込みの OATP1B の寄与率を推定した。

結果

OATP1B 強制発現系を用いた GCDCA-S および CDCA-24G の輸送実験

GCDCA-S および CDCA-24G に関して、それぞれ hOATP1B1、hOATP1B3 発現 HEK293 細胞を用いて取り込み活性を評価した (図 2)。hOATP1B1、hOATP1B3 発現細胞への取り込みは、GCDCA-S および CDCA-24G とともに、陰性対照である mock 細胞 (empty vector 導入細胞) に比べて有意に高い値を示した。その取り込みは経時的に増加していたが、5 分以降は直線性が得られず、以降の検討には取り込み時間を 2 分に設定した。それぞれの取り込みに関して GCDCA-S および CDCA-24G の濃度依存性を評価し、速度論的パラメータを算出した (図 2)。GCDCA-S の hOATP1B1、hOATP1B3 に対する K_m 値は、それぞれ $9.95 \pm 0.57 \mu\text{M}$ 、 $5.23 \pm 0.37 \mu\text{M}$ であり、CDCA-24G に関しては $11.5 \pm 1.0 \mu\text{M}$ 、 $16.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ と算出された (表 1)。さらに、hOATP1B1、hOATP1B3 発現細胞における GCDCA-S ($1 \mu\text{M}$) および CDCA-24G ($0.3 \mu\text{M}$) の取り込みに対する rifampicin と pioglitazone の阻害効果を確認した (図 3)。OATP1B1 における CDCA-24G の取り込み量は十分でなく検討できなかったものの、それ以外についてはいずれの薬物においても濃度依存的に阻害された。GCDCA-S の hOATP1B1、hOATP1B3、および CDCA-24G の hOATP1B3 の取り込みに対する rifampicin の IC_{50} 値はそれぞれ $0.39 \pm 0.09 \mu\text{M}$ 、 $1.08 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、 $0.80 \pm 0.14 \mu\text{M}$ であり、pioglitazone に対してはそれぞれ $15.3 \pm 7.4 \mu\text{M}$ 、 $3.41 \pm 0.61 \mu\text{M}$ 、 $6.55 \pm 3.44 \mu\text{M}$ を得た (表 2)。また、 $30 \mu\text{M}$ の rifampicin を用い OATP1B1 における CDCA-24G の取り込みに対する阻害を確認したところ、 $9.4 \pm 1.9 \mu\text{L/mg protein}$ から $3.4 \pm 0.3 \mu\text{L/mg protein}$ と取り込み活性の低下が見られた。

NTCP 強制発現系を用いた GCDCA-S および CDCA-24G の輸送実験

肝臓に発現するトランスポーターとして、胆汁酸を輸送することが知られている hNTCP に関して、強制発現 HEK293 細胞を用いて GCDCA-S および CDCA-24G の取り込み活性を確認した。

コントロールである vector 導入細胞に比較し GCDCA-S および CDCA-24G とともに hNTCP 発現細胞への有意な取り込みが見られた。加えて、pioglitazone (30 μ M, 100 μ M) によりその取り込みは有意に阻害された (図 4)。

凍結ヒト肝細胞を用いた GCDCA-S および CDCA-24G の輸送実験

GCDCA-S および CDCA-24G のヒト肝細胞における OATP1B による取り込み寄与率を見積もるため、凍結ヒト肝細胞を用いて、 $[^3\text{H}]$ atorvastatin、taurocholic acid (TCA)、GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みに対する rifampicin (15 μ M) と pioglitazone (30 μ M) の阻害効果を確認した (図 5)。rifampicin (15 μ M) と pioglitazone (30 μ M) はともに $[^3\text{H}]$ atorvastatin の肝細胞内取り込みを有意に抑制した一方、TCA は pioglitazone 存在下でのみ取り込みが抑制された。その条件下において、GCDCA-S および CDCA-24G 肝細胞内取り込みは rifampicin (15 μ M) と pioglitazone (30 μ M) によって有意な低下が観察された。

考察

過去に報告のあったメタボローム解析の結果から、一次胆汁酸の抱合体である GCDCA-S および CDCA-24G が DDI バイオマーカーの資質を有する OATP1B の内因性基質であるという仮説に基づいて、強制発現細胞や凍結ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 評価を実施し、その検証を試みた。

hOATP1B1 および hOATP1B3 発現細胞において、GCDCA-S および CDCA-24G はコントロールである mock 細胞と比較し有意に高く、その取り込みは担体輸送の特性である飽和性を示した (図 3)。また、肝臓において cholesterol より生成された TCA などの胆汁酸は胆汁中に分泌され、十二指腸内へと移行し、その後小腸で再吸収され肝臓へ取り込まれる。この腸肝循環の過程でトランスポーターは重要な役割を担っており、肝取り込みにおいては主に NTCP が関与していることが知られている^{27,29}。しかしながら、NTCP が胆汁酸硫酸抱合体を輸送することに関して過去の報告はなく、肝取り込みにおける NTCP の関与を明らかとするため、併せて hNTCP 強制発現細胞を用いた GCDCA-S および CDCA-24G の輸送実験を実施した (図 4)。その結果、mock 細胞比較して、有意な取り込みが確認され、GCDCA-S および CDCA-24G が hOATP1B1、hOATP1B3 および hNTCP の基質でもあることが明らかとなった。加えて、hOATP1B1 および hOATP1B3 発現細胞における取り込みは阻害剤として添加した rifampicin と pioglitazone により濃度依存的に阻害を受け、hNTCP による取り込みは既報と同様 pioglitazone により有意に低下した³⁰ (図 3、図 4)。

rifampicin は臨床で用いられる代表的な肝 OATP の阻害剤である。その IC₅₀ 値は基質に依存するが、典型的基質として臨床 DDI 試験で用いられるスタチン類を含めた既存の OATP1B 基質となる薬物の報告値 (Metabolism and Transport Drug Interaction Database³¹) と比較して、本検討で得られた GCDCA-S および CDCA-24G に対する rifampicin の IC₅₀ は同等であった。

また、pioglitazone は NTCP に加え、OATP1B に対しても阻害能を有することが本研究において明らかとなった。

次に rifampicin および pioglitazone を阻害剤として用い OATP1B による取り込みと NTCP による取り込みを区別することで GCDCA-S および CDCA-24G の凍結ヒト肝細胞取り込みにおける各トランスポーターの寄与率の見積もりを試みた。rifampicin は OATP1B を選択的に阻害し、pioglitazone は OATP1B および NTCP の両方を阻害する条件として、検討に用いる濃度をそれぞれ 15 μM 、30 μM と設定した。NTCP に対する rifampicin の IC_{50} の報告値は 277 μM であり、この条件における阻害は限定的であると考えられる³²。また、ヒト肝細胞への取り込みが確認されている atorvastatin と TCA も併せて検討を行った。atorvastatin と TCA は肝取り込みにおいて、それぞれ OATP1B と NTCP が主に担っていることから、これらを寄与率が既知の陽性対照基質として参照することで、本検証の妥当性を示すことが可能である³³。

[³H]atorvastatin の凍結ヒト肝細胞内への取り込みは rifampicin、pioglitazone とともに添加することで有意に低下し、その取り込みの抑制は同程度であった。一方、TCA に関しては有意な取り込みの低下は pioglitazone でのみ観察された。GCDCA-S、CDCA-24G に関して atorvastatin と同様、両阻害剤で肝細胞取り込みは有意に低下し、かつ、これら阻害剤存在下における取り込み活性は同等であったため、肝細胞においては主に OATP1B により血液中より肝臓内へ取り込まれることが示唆された (図 5)。なお、肝臓の類洞側には OATP1B1 や OATP1B3 の他に、OATP ファミリーの 1 つである OATP2B1 も発現しており、これが GCDCA-S、CDCA-24G の肝取り込みに寄与する可能性も否定できない。しかしながら、OATP2B1 の肝臓における機能は十分に解明されていないことや、rifampicin による阻害定数 K_i は 65 μM であることから今回の結果から肝臓中の取り込みに対する寄与は小さいと判断した³⁴。

本節では、メタボローム解析の結果より OATP1B の DDI バイオマーカー候補として考えられた胆汁酸抱合体 GCDCA-S および CDCA-24G が、強制発現 HEK293 細胞を用いて OATP1B1、OATP1B3 および NTCP の基質であることを新たに明らかとした。また、凍結ヒト肝細胞を用

いた検討によりヒトにおける肝取り込みは主に OATP1B が寄与していると結論付けた。このことにより、生体内においても阻害薬により OATP1B が阻害され肝取り込み効率が低下した結果生じる GCDCA-S、CDCA-24G が血漿中濃度の増大を観察することでプローブ薬の代替として利用できる可能性を示した。

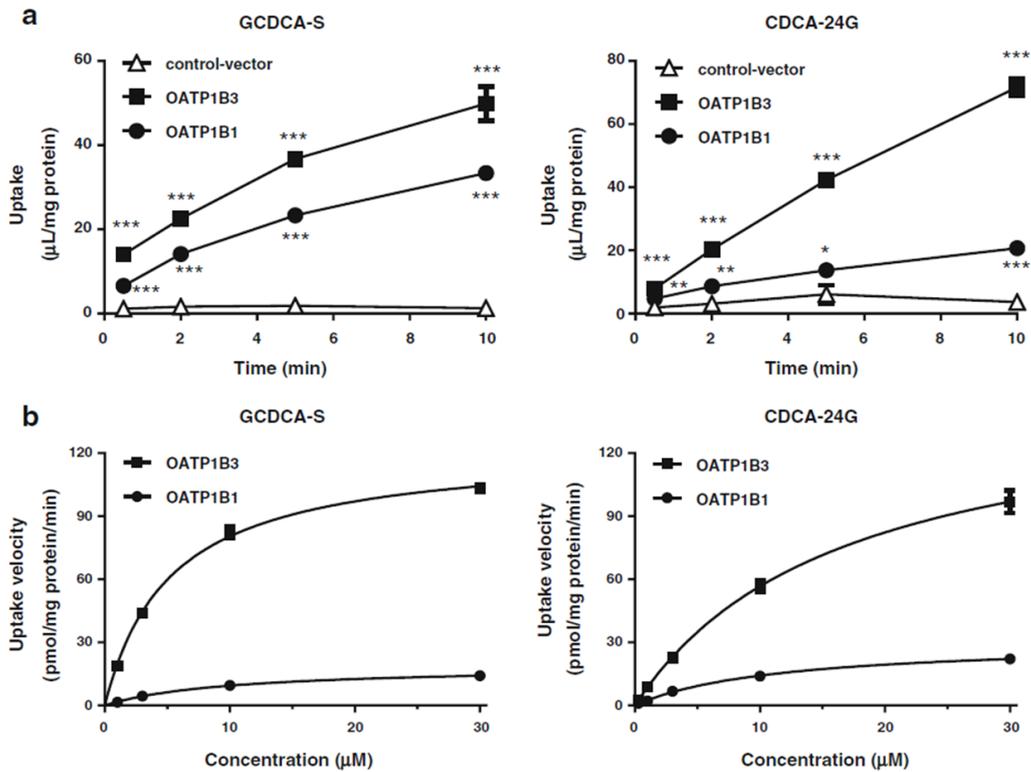


図 2. OATP1B 強制発現 HEK293 細胞における GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みに対する時間および濃度依存性

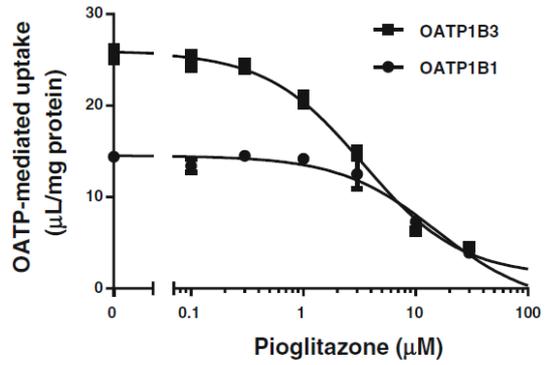
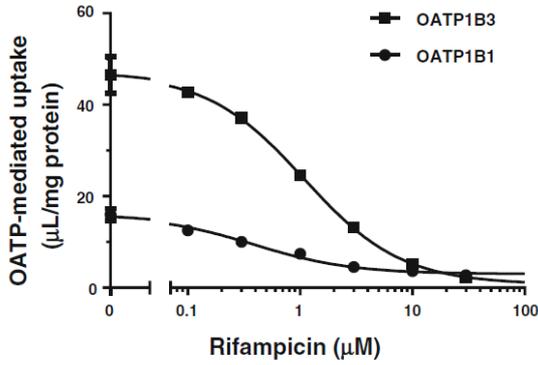
(a) GCDCA-S (1 μM) および CDCA-24G (0.3 μM) の各細胞 (OATP1B1; ●, OATP1B3; ■, control; Δ) に対する細胞内取り込みの時間依存性を示す。(b) OATP1B に対する GCDCA-S および CDCA-24G の 2 分間における取り込みの濃度依存性を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$

表 1. OATP1B 強制発現 HEK293 細胞における GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みの速度論的パラメータ

OATP1B による GCDCA-S および CDCA-24G の細胞内取り込み活性より、Michaelis-Menten 式に基づいて算出した速度論的パラメータを示す [(mean \pm standard deviation (SD))].

| | | Kinetic parameters | | |
|----------|----------|----------------------------|--|--|
| | | K_m (μM) | V_{max} ($\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) | V_{max} / K_m ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein) |
| GCDCA-S | hOATP1B1 | 9.95 ± 0.57 | 18.8 ± 0.4 | 1.9 |
| | hOATP1B3 | 5.53 ± 0.37 | 122 ± 3 | 23 |
| CDCA-24G | hOATP1B1 | 11.5 ± 1.0 | 30.6 ± 1.1 | 2.7 |
| | hOATP1B3 | 16.5 ± 0.3 | 150 ± 1 | 9.1 |

a GCDCA-S



b CDCA-24G

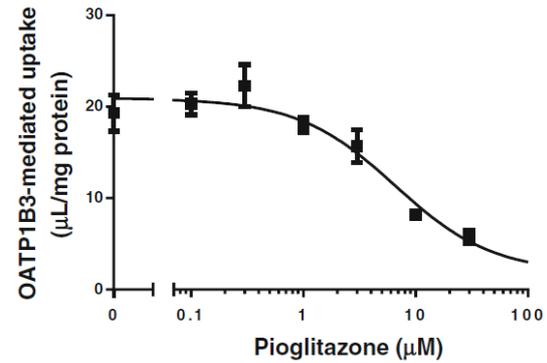
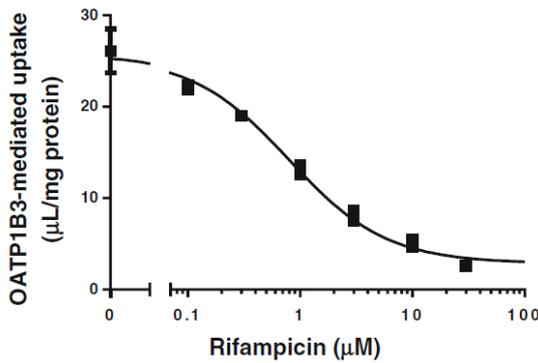


図 3. rifampicin および pioglitazone の OATP1B 強制発現 HEK293 細胞における GCDCA-S および CDCA-24G の取り込み及ぼす効果

rifampicin および pioglitazone 存在下における GCDCA-S (a; 1 μM) および CDCA-24G (b; 0.3 μM) の OATP1B 依存的な取り込みを示す (OATP1B1; ●, OATP1B3; ■)。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。

表 2. OATP1B 強制発現 HEK293 細胞における GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みに対する rifampicin および pioglitazone の阻害パラメータ

rifampicin および pioglitazone 存在下における OATP1B の取り込み活性から算出された IC₅₀ 値を示す (mean ± SD)。OATP1B1 による CDCA-24G 取り込みは十分でなく算出できなかった。

| Substrate | GCDCA-S (1 μM) | | CDCA-24G (0.3 μM) | |
|--------------|----------------|-------------|-------------------|-------------|
| | hOATP1B1 | hOATP1B3 | hOATP1B1 | hOATP1B3 |
| rifampicin | 0.39 ± 0.09 | 1.08 ± 0.02 | ND | 0.80 ± 0.14 |
| pioglitazone | 15.3 ± 7.4 | 3.41 ± 0.61 | ND | 6.55 ± 3.44 |

ND; not determined

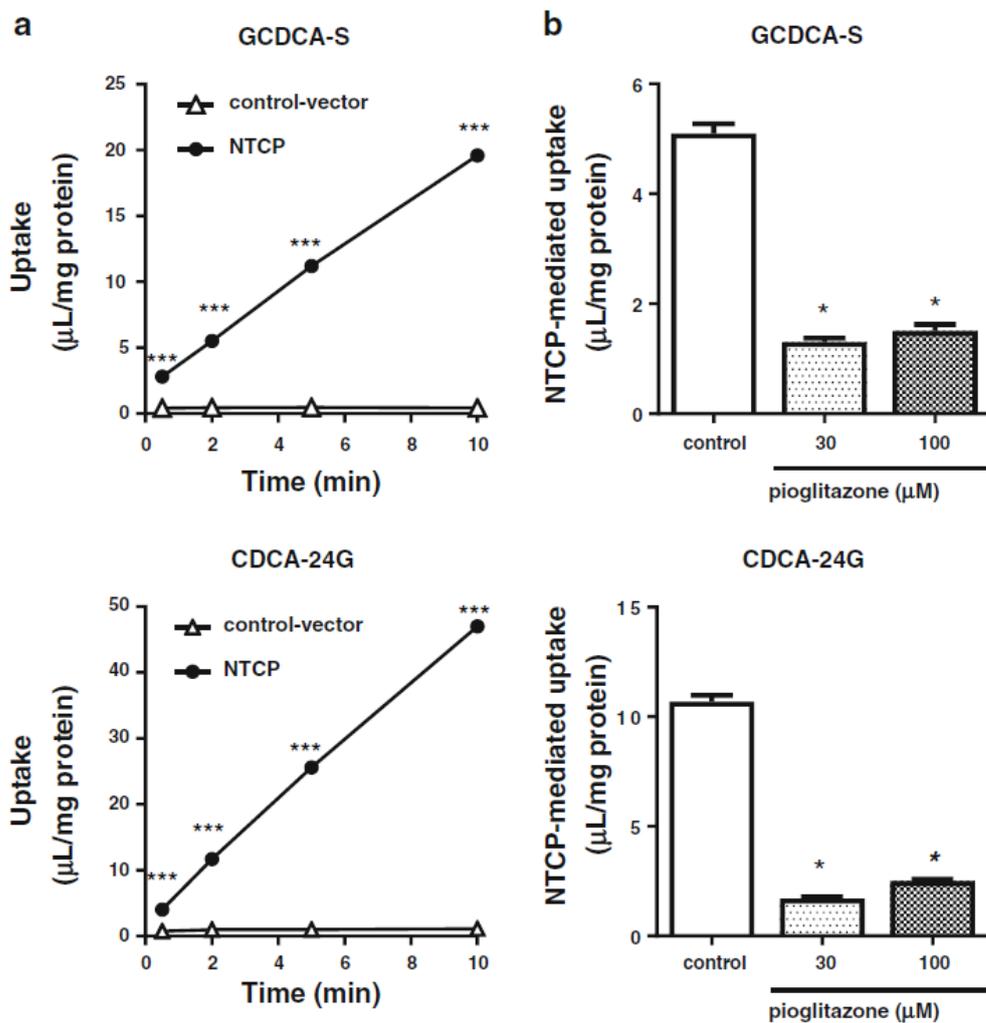


図 4. NTCP 強制発現 HEK293 細胞における GCDCA-S および CDCA-24G の取り込みに対する時間依存性および pioglitazone による阻害効果

(a) GCDCA-S (1 μM) および CDCA-24G (0.3 μM) の各細胞 (NTCP; ●, control; △) に対する細胞内取り込みの時間依存性を示す。(b) pioglitazone 30 μM および 100 μM 存在下における GCDCA-S および CDCA-24G の 2 分間における NTCP 依存的取り込みを示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。*; $P < 0.05$, ***; $P < 0.001$

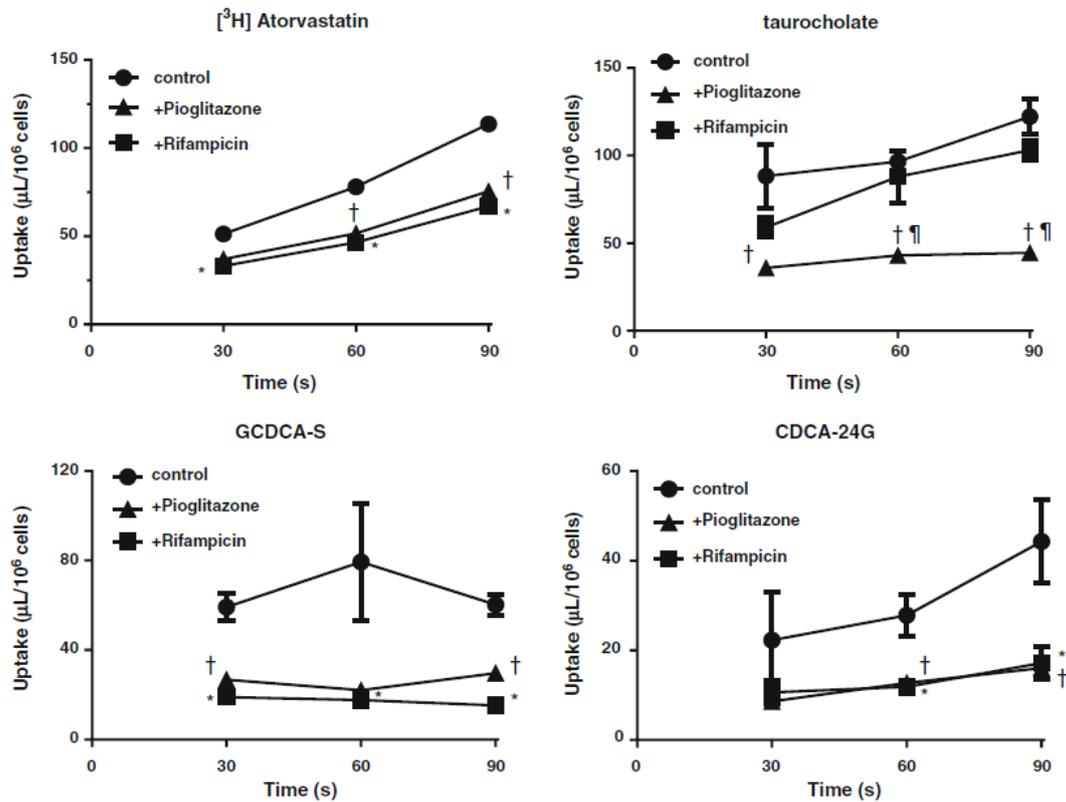


図 5. 凍結ヒト肝細胞における [³H]atorvastatin、TCA、GCDCA-S、CDCA-24G の取り込みおよび rifampicin および pioglitazone の阻害効果

阻害剤非存在下および rifampicin (15 μM)、pioglitazone (30 μM) 存在下における [³H]atorvastatin (50 nM)、TCA (1 μM)、GCDCA-S (1 μM)、CDCA-24G (0.3 μM) の凍結ヒト肝細胞への取り込みの時間依存性を示す(control; ●, pioglitazone; ▲, rifampicin; ■)。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。*; $P < 0.05$ control versus rifampicin, †; $P < 0.05$ control versus pioglitazone, ‡; $P < 0.05$ rifampicin versus pioglitazone

第一章

OATP1B 内因性基質の同定と臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性評価

第二節

各種 OATP1B 内因性基質候補の臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性検証

要約

第一章第一節で OATP1B 基質であることが明らかとなった GCDCA-S および CDCA-24G の DDI リスク評価可能な代替プローブとしての妥当性検証を目的に、臨床検体および非臨床動物を用いた *in vivo* 評価を実施した。検討にあたり、典型的 OATP1B 阻害剤である rifampicin を用いて GCDCA-S、CDCA-24G に加え、胆汁酸を含むその他の OATP1B DDI バイオマーカーの体内動態に与える影響を確認した。ヒトにおける検証として単一群クロスオーバー試験で得られたサンプルを用い、rifampicin 非投与時と投与時を比較検討したところ、GCDCA-S の AUC 比 (AUC ratio, AUCR) は 20.3 ± 2.9 であり、同時に投与された OATP1B 基質薬と比較し顕著な増大であった。GCDCA-S の代替プローブとしての有用性が示された一方で、CDCA-24G は血漿中濃度の上昇は見られたものの、rifampicin 非投与時において分析感度上の問題から検出が出来ず AUCR が算出不可であったため、臨床における内因性バイオマーカーとしての利用が困難であると結論付けた。各種胆汁酸においても血漿中濃度の増大が確認されたことにより、GCDCA-S の血漿中濃度増大の背景には OATP1B の肝取り込み阻害とは異なるメカニズムが存在する可能性が示唆された。非臨床における検討では、医薬品開発においてヒトの動態を予測する目的で利用されることの多いカニクイザルおよびヒト肝移植キメラマウスを用いた。カニクイザルおよびヒト肝移植キメラマウスともに、rifampicin 投与による GCDCA-S を含む胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度の増大が確認された。また、サルにおいては OATP1B の内因性バイオマーカーとして知られる CP も同様に血漿中濃度の上昇が見られた。これらの内因性基質は腸肝循環が疑われることから胆汁分流モデル動物をそれぞれ作成し検討したところ、胆汁酸硫酸抱合体は腸肝循環を受けることが明らかとなり、AUCR を観測する際にその影響を考慮することにより確度の高い DDI リスク評価に繋がると考えられた。

序論

第一章第一節では、強制発現細胞および凍結ヒト肝細胞を用いた各種 *in vitro* 評価により、網羅的メタボローム解析の結果から内因性バイオマーカー候補として得られた GCDCA-S および CDCA-24G が OATP1B の内因性基質であり、ヒトにおける肝取り込みには OATP1B が優位に働くことを新たに示した。

臨床 DDI 試験を含む実際のヒトにおける薬物相互作用に関する検討において、その指標として、阻害薬投与時の被相互作用薬の AUC から単独投与時の AUC を除した AUCR が用いられる。この AUCR を決定する因子は被相互作用薬側および阻害薬側の双方にある。被相互作用薬においては消失経路が主な決定因子であり、それぞれの化合物の持つ、全身クリアランスに対する阻害を受ける経路の寄与率により AUCR は変動する。AUC はクリアランスに反比例することから、理論上、阻害剤による効果が一定である場合、阻害剤併用時の全身クリアランスから単独投与時の全身クリアランスを除した逆数が AUCR となる。GCDCA-S に関しても、ヒトにおいて Tsuruya らの報告より肝臓が主たる消失経路であることが推察され²⁸、また *in vitro* による検討から肝取り込みにおいては OATP1B が優位に機能することや全身クリアランスに対する OATP1B の寄与が比較的高いことが予想された。これは、臨床における OATP1B を介する DDI のリスク判定への適用可能性が期待できる結果であるが、その実証には実際に体内動態を確認する必要がある。また AUCR を決定する阻害薬側の因子として、阻害強度に関する最大血漿中薬物濃度 (C_{max})、阻害定数 (K_i)、および血漿あるいは組織タンパク結合率等の他にも、阻害効果発現期間の観点から吸収速度定数 (k_a) や消失半減期 ($t_{1/2}$) など種々の薬物動態パラメータが挙げられる。以上のことを踏まえ、胆汁酸抱合体が GCDCA-S および CDCA-24G が医薬品開発において DDI リスク評価可能なバイオマーカーであることの妥当性を示すことを目的に、臨床 DDI 試験で汎用される OATP1B 阻害剤 rifampicin を用いた *in vivo* による検討を実施した。

臨床試験「OATPs、CYP3A4 両方の基質薬物のクリアランスに占める OATPs、CYP3A4 の定量的な寄与を決定するための準薬効用量カクテル投与による相互作用試験」は日本人男性健康人を対象とした、準薬効用量の複数の薬物カクテルの投与下で併用薬非投与、臨床用量の rifampicin および itraconazole 併用の 3 相にわたる単一群クロスオーバー試験として計画された。本試験の主要目的はカクテル投与された bosentan、repaglinide、clarithromycin、darunavir、simeprevir および midazolam のそれぞれの肝消失における OATP1B と cytochrome P450 (CYP) 3A4 の寄与に関する定量的な考察であり、これらは Yoshikado らにより報告されている³⁵。同時に、内因性物質の一斉分析による OATP1B のバイオマーカーの探索および妥当性評価を本試験の副次目的として設定しており、rifampicin 非投与時と投与時に採取された血漿サンプルの GCDCA-S、CDCA-24G を定量し、rifampicin 投与時における AUCR の算出を試みることにした。

胆汁酸抱合体を DDI バイオマーカーとして利用することに対する懸念点として、その体内動態の複雑さが挙げられる。肝臓において ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) が胆汁酸硫酸抱合体の胆道側への排泄を担うことが示されており、また MRP2 はグルクロン酸抱合を受けた化合物を基質とする報告もあることから、GCDCA-S および CDCA-24G は MRP2 を介し胆汁排泄あるいは腸肝循環を受ける可能性がある³⁶⁻⁴⁰。加えて、これら胆汁酸抱合体の血漿中濃度の時間推移は抱合前の胆汁酸の体内動態の変動の影響を受けると考えられる。

GCDCA-S のみならず TCA などの胆汁酸もその血漿中濃度と OATP1B1 genotype の間に関連性が示されている他⁴¹、Chu らはカニクイザルにおいて rifampicin を投与により各胆汁酸の血漿中濃度の増大を確認している¹⁸。これら OATP1B に関連した体内動態の変動に限らず、内因性基質特有に存在する生合成過程や、胆汁酸の特徴である食事による顕著な一過性の血漿中濃度の増大および腸肝循環に起因する変動によっても胆汁酸抱合体の血漿中濃度推移は影響を受ける可能性がある。そのため、本検討では各種胆汁酸や胆汁酸生合成マーカーを同時に定量分析

し、rifampicin 投与によるこれらの変動が、GCDCA-S および CDCA-24G における血漿中濃度推移に基づく OATP1B に関する定量的 DDI リスク評価にどの程度影響するか考察した。

前臨床段階において動物モデルを用いた DDI リスク評価法は、化合物動態プロファイルを加味したリスク判定や、阻害薬の代謝プロファイルがヒトと一致する場合に限るものの、代謝物による上乗せ効果など *in vitro* 評価では再現できないリスク抽出が期待できる。このような確度の高い *in vivo* 予測が可能となれば、ヒトにおける薬物相互作用やそれに伴う副作用や薬効発現の予測の他、臨床 DDI 試験における試験デザインの策定など医薬品開発上有効な手段として活用される。そこで、OATP1B 内因性基質の DDI バイオマーカーとしての妥当性評価とともに、臨床試験前段階における DDI リスクに関する *in vivo* 評価法の提案を目的に、前臨床モデル動物を用いた検討も併せて行った。ヒトにおける薬物相互作用リスクを判断することが目的であり、外挿性の観点からヒトの動態を良く反映する動物でなければ十分な意味を成さない。また、げっ歯類における胆汁酸抱合は、グリシン抱合よりもタウリン抱合が優位に進むことが知られており⁴²、GCDCA-S の血漿中濃度は極めて低いことが報告されている⁴³。このような背景のもと、本研究においては遺伝的に近縁かつ、形態学および生理学的に類似であることで汎用されてきたカニクイザル、および近年医薬品開発において盛んに利用されているヒト肝細胞を有するヒト肝移植マウス (PXB マウス) を用いた。カニクイザルは非近交系であること、ヒト肝細胞移植マウスでは、移植する肝細胞ロットや置換率にばらつきが生じることからそれぞれ個体差が大きい。DDI バイオマーカーを用いることでプローブ薬投与が不要なため、開発候補品の薬物動態を検討する際の同時測定により試験間差を排除した DDI リスク評価が可能であると考えられる。加えて、これらは実験を実施する上で個体価格や設備維持などコスト面の懸念も存在するが、コントロール群としてプローブ薬単独投与群の設定が不要なため、ウォッシュアウト期間の省略による試験期間の短縮や DDI に関する *in vivo* 検討自体の省略にも期待できる。

さらに、これら前臨床モデル動物の胆汁分流量による非腸肝循環モデルを作成し、DDI リスク評価の付加情報として胆汁酸抱合体および CP の体内動態に対する腸肝循環の関与および rifampicin による阻害に対して胆汁分流量が及ぼす影響に関する検討を行った。

また、ヒト血漿サンプルおよび前臨床動物モデルから血漿サンプルを用いたこれらの検討において、胆汁酸および胆汁酸抱合体に加え、既知の OATP1B の DDI バイオマーカー候補化合物も同時に定量を行い、それぞれの体内動態および分析に関して比較を行うことでそれぞれの内因性基質の有用性についても考察した。

結果

ヒトにおける GCDCA-S および CDCA-24G の体内動態に対する rifampicin の併用効果

コントロール（非投与）群および rifampicin 併用群における GCDCA-S および CDCA-24G の血漿中濃度を測定した（n = 8）。rifampicin 併用群における GCDCA-S の血漿中濃度推移は、コントロール群と比較し、有意な増大を示した。CDCA-24G に関しては、コントロール群における 1 例において CDCA-24G が検出され、併用群においても投与前、投与直後（1 時間、2 時間）および、24 時間経過後の血漿中濃度はそれぞれ、1 例、5 例、6 例および 4 例のみ検出可能であった。このようにコントロール群において多くの時点で定量下限（lower limit of quantification, LLOQ）を下回る結果となったものの、rifampicin 併用群においては LLOQ を上回る血漿中濃度が観察された（図 6）。GCDCA-S における AUCR は 20.3 ± 2.9 であり、プローブ薬として同時に投与された OATP1B 基質薬と比較して顕著な血漿中濃度の増大が見られた（simeprevir; 7.2、bosentan; 3.2、repaglinide; 1.9)³⁵（図 7、表 3）。

ヒトにおける胆汁酸の体内動態に対する rifampicin の併用効果

コントロール（非投与）群および rifampicin 併用群における胆汁酸の血漿中濃度を測定した。胆汁酸として、cholic acid (CA)、CDCA、glycocholic acid (GCA)、glycochenodeoxycholic acid/glycodeoxycholic acid (GCDCA/GDCA)、glycolithocholic acid (GLCA)、TCA、taurochenodeoxycholic acid/taurodeoxycholic acid (TCDCA/TDCA) および tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) の測定を行った。GLCA は両群において LLOQ を下回ったものの、その他の胆汁酸は rifampicin 併用群においてコントロール群と比較し血漿中濃度の上昇、および AUC の有意な増大が確認された。なお、TUDCA は 2 例においてコントロール群の血漿中濃度が検出出来なかったため、6 例で解析した（図 8、表 3）。

ヒトにおける胆汁酸合成に対する rifampicin の影響

ヒト肝臓における胆汁酸合成に対する rifampicin 併用による効果を検討するため、7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) をコントロール群および rifampicin 併用群で測定した。rifampicin 処置後において血漿中 C4 は一過性に有意な減少を示した (図 9)。

ヒトにおけるステロイド類の体内動態に対する rifampicin の併用効果

コントロール (非投与) 群および rifampicin 併用群における DHEAS を含むステロイド骨格を有する化合物群について血漿中濃度を測定した。すべての化合物において rifampicin 併用による血漿中濃度の増大は確認されなかった (図 10)。

カニクイザルにおける胆汁酸硫酸抱合体の体内動態に対する rifampicin および胆汁分流の影響

胆管カニューレーション (bile duct cannulation, BDC) 非処置および処置カニクイザルにおける各種胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度、胆汁排泄量 (X_{bile}) および尿中排泄量 (X_{urine}) を測定した。GCDCA-S、glycolithocholic acid-*O*-sulfate (GLCA-S)、lithocholic acid-*O*-sulfate (LCA-S)、tauroolithocholic acid-*O*-sulfate (TLCA-S) について、BDC 非処置下においては投与後 24 時間まで各胆汁酸硫酸抱合体は検出可能であった。BDC 処置サルのうち 1 例 (C-594) において投与後 8 時間までの胆汁が回収できた時点において、すべての胆汁酸硫酸抱合体に関して検出可能であったが、もう 1 例 (C-535) においては、コントロール (rifampicin 非投与) 群において GCDCA-S に関して 6 時間および 8 時間時点、LCA-S に関して 8 時間時点において LLOQ 以下であった。コントロール群において、GCDCA-S、GLCA-S および TLCA-S の消失半減期は BDC による胆汁分流により、非処置と比較し短縮される傾向にあった (図 11)。rifampicin 投与により各胆汁酸の C_{max} および 8 時間までの AUC は増大し、その血漿中濃度推移は胆汁分流の影響はなく同等であった (図 11、表 4)。胆汁中の胆汁酸硫酸抱合体の量は GCDCA-S および TLCA-S

が多く、続いて GLCA-S であった。rifampicin 投与群において、GCDCA-S および TLCA-S の X_{bile} に変化は無かったが、LCA-S および GLCA-S に関してはわずかな減少が観察された (表 4)。LCA-S を除く胆汁酸硫酸抱合体が尿中で検出されたものの、コントロール群におけるその排泄量は胆汁への排泄と比較し僅かであった。rifampicin 投与によりこれら X_{urine} は増大傾向にあった (表 4)。

カニクイザルにおける胆汁酸の体内動態に対する rifampicin および胆汁分流の影響

BDC 非処置および処置カニクイザルにおける各種胆汁酸の血漿中濃度を測定した。BDC 非処置下において、rifampicin 投与により TUDCA および GLCA を除き、血漿中濃度は増大傾向にあった。一方、胆汁分流により、rifampicin による血漿中濃度の増大効果は減弱または消失した (図 12)。

BDC 処置下カニクイザルにおける pitavastatin の体内動態に対する rifampicin の併用効果

OATP1B のプローブ薬として準薬効用量 (0.1 mg/kg) で投与した pitavastatin は、コントロール群について C-535 の 4 時間および 8 時間時点を除き、8 時間まで検出可能であった。rifampicin 投与により血漿中濃度推移および AUC の顕著な増大が確認された (図 13)。 X_{bile} および胆汁排泄クリアランス (CL_b) は rifampicin 投与により大きく減少した (表 5)。BDC 処置下カニクイザルにおける rifampicin 血漿中濃度は投与後 24 時間時点においても、カニクイザルにおけるタンパク非結合率で補正した in vivo K_i 値を超える濃度が維持されていた²⁰ (図 14)。

BDC 処置下カニクイザルにおける CP-I および CP-III の体内動態に対する rifampicin の併用効果

CP-I および CP-III の血漿中濃度は rifampicin 投与によって増大し、8 時間までの AUC はそれぞれコントロールと比較しそれぞれ 4.5 倍、5.0 倍であった (図 15、表 6)。CP-I および CP-III

は胆汁中および尿中においても検出され、CP-I は CP-III と比較し X_{bile} が多く、反対に X_{urine} に関しては CP-III が優位であった (表 6)。rifampicin 投与により、CP-I の X_{bile} への影響は無かったものの、 X_{urine} に関しては 1 例 (C-594) において上昇が確認された一方、CP-III に関しては rifampicin により 1 例 (C-535) において X_{bile} が低下し、 X_{urine} においては 2 例とも低下する結果となった (表 6)。

BDC 処置下カニクイザルにおける TCA-d5 の体内動態に対する rifampicin の併用効果

胆汁酸の全身クリアランスに対する rifampicin の影響を明らかにするため、TCA の安定同位体である TCA-d5 の静脈内投与を行い経時的な血漿中および胆汁中濃度測定を行った。コントロール群および rifampicin 投与群共に、TCA-d5 投与後 2 時間 (観測開始から 4 時間) 時点まで検出可能であった。rifampicin 投与による全身クリアランスおよび胆汁排泄クリアランスの低下は確認されなかった (図 16、表 7)。

PXB マウスにおける pitavastatin および胆汁酸硫酸抱合体の体内動態に対する rifampicin の併用効果

OATP1B のプローブ薬として準薬効用量 (0.1 mg/kg) で投与した血漿中 pitavastatin は、投与後 8 時間まで検出可能であった。rifampicin 60 mg/kg の投与により、8 時間までの AUC は顕著に増大した (図 17、表 8)。各種胆汁酸硫酸抱合体に関して、24 時間まで pitavastatin 単独投与による血漿中胆汁酸硫酸抱合体の体内動態に対する影響は観察されなかった。胆汁酸硫酸抱合体の 24 時間までの AUC は、個体差が確認されたものの rifampicin 併用により pitavastatin 単独群と比較し顕著な増大が見られた (13-25 倍) (図 18、表 9)。

PXB マウスにおける胆汁酸の体内動態に対する rifampicin の併用効果

PXB マウスにおける各種胆汁酸の血漿中濃度を測定した。pitavastatin 単独投与群と比較し、rifampicin 投与により血漿中濃度の有意な増大が見られた胆汁酸は存在しなかった (図 19)。

PXB マウス胆汁分流モデルを用いた胆汁酸硫酸抱合体の体内動態に対する rifampicin の影響

胆汁分流モデルとして胆嚢カニューレーション (gallbladder cannulation, GBC) を施した PXB マウスを用いて、胆汁分流開始後 6 時間までの胆汁酸硫酸抱合体血漿中濃度測定を実施した。なお、rifampicin 投与群のうち 1 例 (P-204) は、投与後 4 時間の採血後に死亡したため、4 時間時点までの観測となった。コントロール (rifampicin 非投与) 群において胆汁分流を開始した直後 1 時間までの速やかな消失が確認された。一方、rifampicin 投与群においては一時的な胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度の上昇が確認され、その後の消失に関してもコントロール群と比較し、遅延が見られた (図 20)。

考察

本節では、第一章第一節で OATP1B バイオマーカーの候補として得られた胆汁酸抱合体に関してその妥当性を示すため、*in vivo* において典型的 OATP1B 阻害剤である rifampicin の投与によりこれらの体内動態にどのような影響を与えるかを検討した。

検討に用いたヒト検体は準薬効用量の複数のプローブ薬の投与下で rifampicin 処置された健康人由来のものであり、臨床試験は変動因子である個体間差の影響が最小限となるようクロスオーバー試験として設計された。rifampicin 投与群において血漿中 GCDCA-S はコントロールと比較して有意な増大が見られた (図 6)。rifampicin による GCDCA-S の AUCR は 20.3 ± 2.9 であり、他の OATP1B 内因性基質である CP-I および CP-III の報告値 (CP-I: 4.0, CP-III: 3.3)²² や同時に投薬されたプローブ薬 (simeprevir: 7.2, bosentan: 3.2, repaglinide: 1.9) よりも大きな値を得た³⁵ (表 3)。このことから、GCDCA-S は OATP1B1 あるいは OATP1B3 を介する DDI リスク評価に適用可能である良好な内因性プローブとなりうることが示唆された。一方、CDCA-24G において全例 (8 例) で検出可能であったのは rifampicin 投与群であり、コントロール群の多くの時点で LLOQ を下回る結果となったため AUCR を得ることができなかった。仮に検出できなかった時点を LLOQ の濃度としてコントロール群の AUC を算出すると、4.3 以上の AUCR が観察されたこととなる (図 6、表 3)。過去の報告同様⁴⁴、血漿中胆汁酸濃度も rifampicin 投与により有意な上昇が確認された (図 8)。これは抱合を受ける前段階の胆汁酸の蓄積が GCDCA-S や CDCA-24G の血漿中濃度の増大における交絡因子となり得ることを示唆する結果である。GCDCA/GDCA の AUCR は 2.19 ± 0.31 であり、rifampicin による血漿中濃度に対する影響は GCDCA-S と比較し幾分小さいと考えられた。

GCDCA-S、CDCA-24G およびプローブ薬それぞれの AUC への相互作用の影響の差は全身クリアランスに対する OATP1B1 および OATP1B3 による肝取り込みの寄与率に依存するものと想定される。しかしそれに限らず、化合物ごとに固有のクリアランスメカニズムが存在するため、

rifampicin の OATP1B 以外への作用がそれぞれの体内動態へ影響している可能性も否定できない。本検討で用いられたプローブ薬の主要な消失経路は代謝であり、それらに対する rifampicin の影響は限定的と考えられるが³⁵、一方で GCDCA-S や CDCA-24G が胆汁移行される場合、rifampicin 併用によりこれらの経路として考えられる MRP2 が阻害されることを考慮する必要がある。本試験における rifampicin の非結合形の最大血漿中濃度は 3.8 μM であり、MRP2 に対する *in vitro* IC₅₀ (27 μM) と比較して十分に低い濃度である⁴⁵。しかしながら、ヒトにおける MRP2 基質として(15R)-[11C]-TIC-Me を用いた positron emission tomography (PET) イメージングによる過去の検討では、*in vivo* において rifampicin 投与による MRP2 阻害が示唆されている⁴⁶。この結果から rifampicin が肝実質細胞内で、血漿中に対して濃縮されることが推測され、既報の通り³⁶⁻⁴⁰、硫酸抱合およびグルクロン酸抱合を受けた胆汁酸に関して MRP2 が胆汁分泌を担っているのであれば、これらの胆汁排泄阻害が血漿中濃度へ影響を及ぼす要因となる。

rifampicin による胆汁酸の血漿中濃度の上昇に関して、OATP1B1 の遺伝多型がいくつかの胆汁酸の血漿中濃度との関連性を示すことから⁴¹、胆汁酸によってはその肝取り込みにおいて、NTCP の他に OATP1B が関与していると考えられる。また、TCA のような NTCP が肝細胞への流入を担うものは本来 rifampicin に対して感受性を示さないものと思われるが、血漿中濃度上昇が見られているのも事実である。これらについて考えられるメカニズムの一つとして、胆汁酸の胆汁分泌に関与する ABC トランスポーターである bile salt export pump (BSEP) を、rifampicin が阻害する可能性も考えられる。BSEP に対する rifampicin の *in vitro* IC₅₀ (25 μM) は血漿中遊離形濃度から考えると十分に高い値であり⁴⁵、BSEP の阻害能は低いと推定される。しかし、前述の MRP2 の事例を考慮すると同様に、この推定をもって BSEP 阻害の可能性を否定することも難しい。BSEP 阻害により肝細胞内の胆汁酸濃度が上昇すると、farnesoid X receptor (FXR) -small heterodimer partner (SHP) を介したフィードバック機構が働き胆汁酸の新規合成や NTCP による肝取り込みの抑制が起こると考えられる⁴⁷。その影響を検討するた

めに CYP7A1 により生成される胆汁酸合成過程の中間代謝物である C4 を生合成マーカーとして測定を実施した^{48,49}。rifampicin 投与後 4 時間から 12 時間の時点において、血漿中 C4 濃度の有意な低下が確認され、rifampicin 投与による胆汁酸合成の低下を示唆する結果となった (図 9)。しかし、実際には C4 合成の直接的な阻害の可能性も存在するため、FXR-SHP システムの活性化に起因するものであると断定は出来ず、rifampicin の NTCP や BSEP あるいは胆汁酸合成に対する影響については今後の検討が望まれる。

DHEAS はステロイドの硫酸抱合体であり、Watanabe らは、肝細胞やカニクイザルを用いた検討を通じて DHEAS が OATP1B の DDI バイオマーカーとして利用できる可能性を示した²⁰。そこで、DHEAS を含むステロイド骨格を有する化合物の血漿中濃度を測定したところ、rifampicin 投与による AUC の増大は確認されなかった (図 10)。このことから DHEAS はヒトにおいては OATP1B の代替プローブとしての機能を十分に果たさないと結論付けた。

次に、DDI バイオマーカーとしての更なる妥当性評価および、臨床試験前段階における in vivo リスク評価法の確立を目的に、前臨床モデル動物を用いた検討を実施した。またこれらの胆汁分流モデルを作成することで、これまでの検討により示唆された胆汁酸抱合体の胆汁排泄や腸肝循環による DDI リスクの予測性に対する影響についても検証を行った。検討にあたり、ヒトのコントロール群の各時点において LLOQ を下回った CDCA-24G は定量的な予測には不利であると考え、検討には用いないこととした。一方で、胆汁酸硫酸抱合体の体内動態に関する考察および内因性バイオマーカーとしての利用可能性の検討のため、GCDCA-S に加え、既に報告があり、かつ入手可能であった GLCA-S、LCA-S および TLCA-S を同時に観測することとした⁵⁰。

カニクイザルは OATP1B 阻害に関する in vivo 検討⁵¹⁻⁵³や内因性バイオマーカーの探索の非臨床モデルとして利用されている^{18,20,23,50}。本検討における rifampicin の投与量は Watanabe らの報告をもとに 18 mg/kg とした²⁰。サルにおける rifampicin 非投与時の GCDCA-S の血漿中濃度に関して、GCDCA/GDCA と同様、観察開始直後に見られた血漿中濃度の上昇、および食事による影響と見られる 6 時間時点後の一過性の濃度上昇が観察された (図 11)。しかしながら、

その変動は GCDCA/GDCA と比較して小さく、OATP1B 非依存的な変動要因の 1 つである日内変動について、より軽微であることが示された。BDC 処置サル胆汁分注により腸肝循環を遮断すると、rifampicin 非投与群における各胆汁酸硫酸抱合体はおよそ 2 時間以降に速やかな消失が観察されたことから、これらの血漿中濃度の維持において腸肝循環が重要な役割を果たすことが示された。rifampicin 併用下においては血漿中胆汁酸硫酸抱合体の顕著な増大が観察され、rifampicin 非投与群とは異なり、GLCA-S の血漿中濃度時間推移にはわずかに影響を与えたものの、その他の硫酸抱合体の血漿中濃度時間推移には胆汁分注により腸肝循環を遮断しても、ほとんど影響を与えなかった (図 11)。この結果は胆汁酸硫酸抱合体やその前駆体である胆汁酸の腸肝循環が AUCR に影響を及ぼすことを示唆するが、実際には 8 時間までの AUCR が影響を受けたものは TLCA-S のみであった (表 4)。個体差や日内変動により胆汁分注による影響がマスクされた可能性もあるが、比較的短期間の観察においては腸肝循環による AUCR への影響は大きくないと考えられる。胆汁酸硫酸抱合体の胆汁排泄に関して、rifampicin 投与は X_{bile} に影響を与えなかった (表 4)。サルにおいてもヒトの検討と同様、いくつかの胆汁酸の血漿中濃度は rifampicin により増大した (図 12)。GCDCA/GDCA についても血漿中濃度は著しく増加し、BDC 非処置サル全例で rifampicin 投与 1 時間後にピークに達したことから GCDCA の増加が GCDCA-S の AUCR に影響した可能性は否定できない。関連する考察の一つとして GCDCA-S のマスバランスの算出を試みた。肝臓における GCDCA-S 量が明らかとならない限りはマスバランスの正確な評価が不可能であるものの、8 時間後の血漿中濃度と血漿量の積より推定された血漿中 GCDCA-S 量と X_{bile} の合計を体内の総 GCDCA-S 量として算出したところ、コントロール群と比して、rifampicin 投与下ではそれぞれ 1.5 倍および 1.8 倍であった。この現象は TLCA-S でも観察されたが、LCA-S と GLCA-S では観察されなかった。また、サルにおける胆汁酸の代謝および膜輸送機構に関して rifampicin との相互作用を起こす経路が OATP1B とは別に存在する可能性があり、rifampicin 投与後の胆汁酸の血漿中濃度が増加することに対する機序は実際のところ不明確であるため、今後の更なる検討が必要である (図 12)。しかしながら、TCA-d5

を用いた検討の結果、rifampicin 投与は、TCA-d5 の全身クリアランスおよび胆汁排泄クリアランスの低下を示さず、rifampicin による TCA の全身循環からの肝消失の抑制の可能性については排除することが出来た (図 16、表 7)。血漿中濃度に関する TCA-d5 のクリアランスに関して肝血流量 (43.6 mL/min/kg) を踏まえると⁵⁴、肝臓における TCA-d5 の固有クリアランスは、血液循環からの消失における律速過程に影響を及ぼすほどには低下することはないと考えられる。

同時に測定した pitavastatin や OATP1B 内因性基質である CP-I、CP-III も胆汁酸抱合体同様 rifampicin 投与により血漿中濃度の増大が見られた (図 13、図 14)。ヒトにおける CP の¹⁴C ラベル体を用いた過去の報告より、CP が腸肝循環を受けることが示唆されている⁵⁵。このような背景から CP-I および CP-III についても胆汁分流による影響を検討したところ、血漿中濃度の経時的な低下が見られた胆汁酸硫酸抱合体とは異なり、胆汁分流下においても濃度推移がほぼ一定であった。加えて、カニクイザルの非投与群における CP-I および CP-III の血漿中濃度推移は Shen らによる報告と同等であったことから腸肝循環による AUCR へのインパクトは大きくないと考えられ²³、CP-I および CP-III の DDI バイオマーカーとしての有用性を示す結果であった。BDC サルにおいて CP-III は CP-I と比較し 6.8 倍の尿中排泄量を示し、無処置下のカニクイザルを利用した過去の報告と同等の結果であった一方、胆汁排泄量に関しては CP-I が 5.2 倍多い結果となった (表 6)。X_{bile} と AUC から胆汁排泄クリアランスに換算すると CP-I、CP-III は同等の値であり、これは OATP1B1 に対するそれぞれの輸送活性が同等であったことを支持する²¹。内因性基質とは異なり、プローブ薬である pitavastatin は rifampicin により X_{bile} の低下を示した一方、マスバランスの観点で尿中排泄のみではその変化量を説明できないことから、その他の代謝経路や肝および腎以外の臓器での排泄が関与していることが推察された。

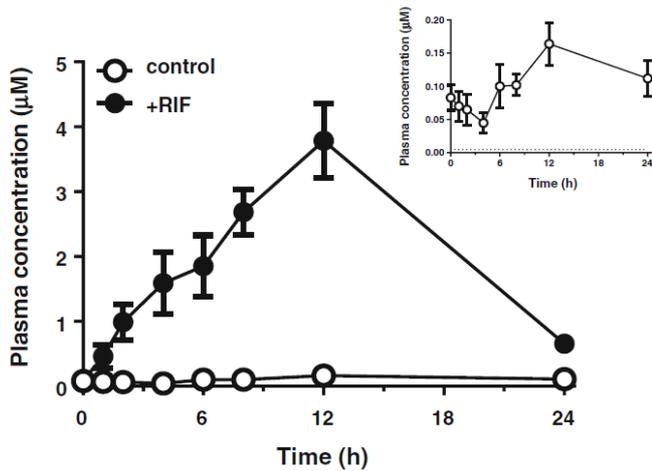
肝臓は吸収、分布、代謝、排泄のすべての過程において重要な臓器であることから、医薬品開発におけるヒト薬物動態を予測するツールとしてヒト肝移植キメラマウスの有用性は高まっている⁵⁶⁻⁵⁸。そこで、キメラマウスにおいても胆汁酸硫酸抱合体が OATP1B を介する DDI リスク評価における代替プローブとなり得るか検討をした。本試験で用いた PXB マウスは、重度免疫

不全肝障害マウスである uPA/SCID マウスに正常ヒト肝細胞を脾臓経由で移植したものであり、正常な肝臓組織形成を示すモデルマウスである⁵⁹。70%以上の置換率が保障されており、本試験で実際に使用したキメラマウスの置換率は血液中のヒトアルブミン比率により 82.2-91.0%と推測された。置換率や肝重量などの個体間差の可能性を考慮し、本動物実験はクロスオーバー法で行った。マウス採血の許容量は限られており、CP-I および CP-III の LC-MS/MS 定量解析に測定感度の観点から必要な血漿量が得られなかったため、CP-I および CP-III に関しては検討できなかった。げっ歯類においてタウリン抱合が胆汁酸の代謝経路において優位に働いており、通常のマウスにおいては GCDCA の検出は認められていないことから^{42,43}、検討にあたり、このマウスモデルの血漿中に GCDCA-S が存在することを確認した。PXB マウスにおいて、GCDCA-S の血漿中濃度はサルおよびヒトと比較して十分に高く、置換されたヒト肝細胞ではヒト型の胆汁酸合成が維持されていることが示唆された。次に、併用試験を進めるにあたり、rifampicin 投与量を検討し、60 mg/kg が PXB マウスにおける rifampicin の血漿中濃度プロファイルが臨床における濃度推移 (600 mg) と同等であることを示し⁶⁰、以後の検討には 60 mg/kg を用いることとした (図 17)。同時にプローブ薬として投与した pitavastatin の AUCR は 4.8 であり、ヒトで認められたものと同等の値であった (表 8)。同様に、rifampicin は PXB マウスにおける胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度も増加させ、GCDCA-S の AUC_{0-8h} および AUC_{0-24h} は、コントロールと比較してそれぞれ 25 倍および 10 倍高かった (図 18、表 9)。これは臨床試験における GCDCA-S の AUCR と同等であり、pitavastatin の結果とともに本試験で使用した rifampicin の投与量は、PXB マウスを用いた際に OATP1B 基質の臨床の AUCR と同等の値が得られる可能性を示している。また、GCDCA/GDCA を含む胆汁酸についても同時に測定をしたが、サルやヒトの結果とは異なり、rifampicin は PXB マウスにおける GCDCA/GDCA の AUC に影響を与えず、GCDCA-S の AUC の増大における GCDCA の関与の可能性は排除することが出来た (図 19)。

正常な肝臓組織が形成されている PXB マウスは胆汁排泄が観察できることから、胆嚢にカテーテルを施した胆汁分流通モデルを作成し、胆汁酸硫酸抱合体における腸肝循環について検討をした。GBC による胆汁分流通により、血漿中濃度の経時的な低下が見られたことから PXB マウスにおいても胆汁酸硫酸抱合体が腸肝循環を受けていることが示唆された (図 20)。GBC 処置下においても rifampicin 投与は PXB マウスの血漿中濃度を上昇させたが、AUCR は胆汁分流通により 20-44%減少した。従って、PXB マウスを用いて、胆汁酸硫酸抱合体を DDI バイオマーカーとして臨床 DDI 予測に用いる際には、腸肝循環による影響を考慮しておく必要がある。

本節では、OATP1B の典型的阻害剤である rifampicin を用いて、ヒトおよび前臨床モデル動物での GCDCA-S が OATP1B 介在性 DDI リスク評価に利用可能な内因性基質である可能性を示した。その血漿中濃度の上昇は顕著であり、検出が容易という利点を有しているが、そのメカニズムは胆汁酸の血漿中濃度の上昇など複数の交絡因子が存在する可能性が示唆された。前臨床モデル動物を用いた検討では、その他胆汁酸硫酸抱合体として GLCA-S、LCA-S および TLCA-S についても同時に観察を行ったところ、GCDCA-S と同様に rifampicin 併用による血漿中濃度の増大が確認され、DDI バイオマーカー候補としての今後の検討が期待された。また胆汁分流通モデルの結果より、これら胆汁酸硫酸抱合体が腸肝循環を受け、AUCR による DDI リスク判定の際には考慮しておく必要があることも明らかとした。腸肝循環を含む DDI による血中濃度推移の複雑な変化を表現する PBPK モデルの構築に関する研究が進められている⁶¹。胆汁酸硫酸抱合体を用いる場合はこのようなモデルやパラメータを適用することで、精緻な予測が期待できる。同時に内因性基質である CP-I および CP-III についても検討し、分析感度面からヒト肝移植マウスではサンプル要求量による制限があったものの、サルを用いた検討では、胆汁酸硫酸抱合体と比較し腸肝循環の影響は軽微であることを示した。

GCDCA-S



CDCA-24G

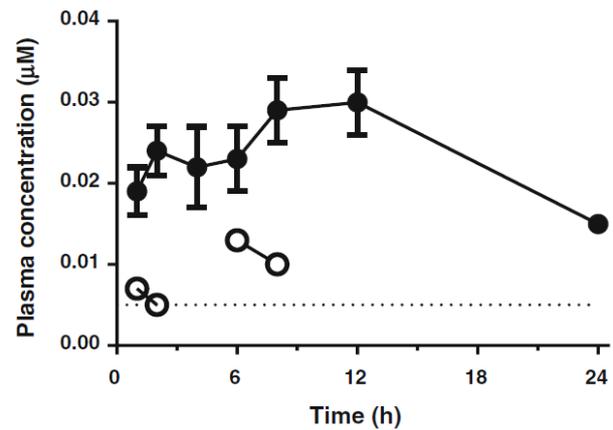


図 6. GCDCA-S、CDCA-24G の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

コントロール群 (○) および rifampicin 投与群 (●) における GCDCA-S および CDCA-24G の血漿中濃度推移を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=8)。GCDCA-S に関してコントロール群のみ抽出したものを上段に示している。コントロール群において被験者#1 の 4 時間、#7 の 2、4、6 時間の濃度は LLOQ 以下であったため除外した。CDCA-24G においては、コントロール群のうち 1 例のみ 1、2、6、8 時間が検出可能であったため平均値およびエラーバーは含まれない。破線で示したものは、LLOQ を示す。

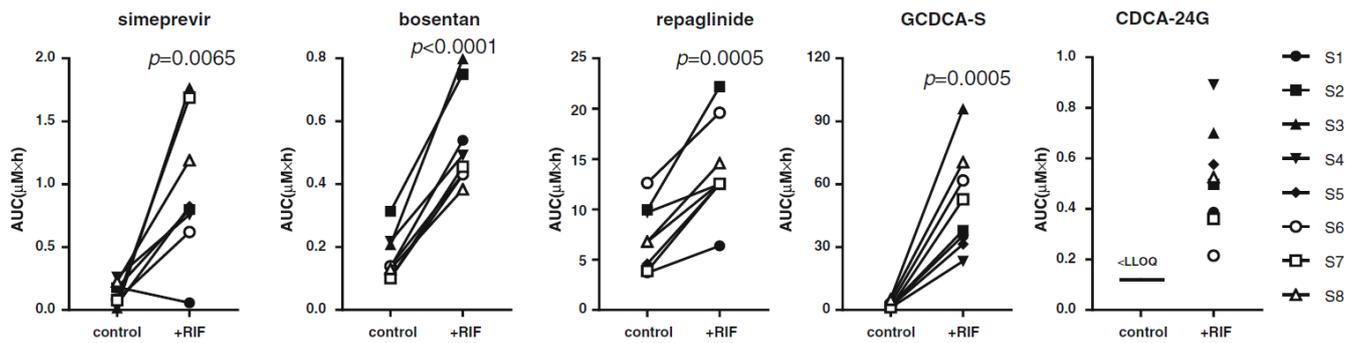


図 7. 各被験者における OATP 基質薬物および胆汁酸抱合体の AUC に対する rifampicin の影響

OATP 基質として知られる simeprevir、bosentan、repaglinide と GCDCA-S および CDCA-24G に関して各被験者の投与後 24 時間までの AUC について示す。CDCA-24G はコントロール群において LLOQ に満たなかった。

表 3. GCDCA-S、CDCA-24G および各種胆汁酸の AUC に対する rifampicin の影響

台形法により算出したカクテルプローブ薬投与後 24 時間までの AUC および、rifampicin 投与群の AUC からコントロール群を除した AUCR について示している (mean ± SD)。TUDCA の血漿中濃度は関して、2 例について LLOQ を下回っていたため 6 例のデータを用いて算出した。

| Compound | control ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | +rifampicin ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | AUCR | <i>P</i> -value |
|------------|--|--|-------------|-----------------|
| GCDCA-S | 2.78 ± 0.59 | 51.2 ± 8.5 | 20.3 ± 2.9 | *** |
| TUDCA | 0.0925 ± 0.014 | 0.410 ± 0.096 | 5.93 ± 1.70 | * |
| GCA | 2.73 ± 0.25 | 5.54 ± 0.81 | 2.73 ± 0.48 | ** |
| CA | 0.295 ± 0.054 | 0.644 ± 0.093 | 2.46 ± 0.32 | ** |
| TCA | 0.289 ± 0.035 | 0.661 ± 0.095 | 2.29 ± 0.25 | ** |
| GCDCA/GDCA | 25.4 ± 2.8 | 51.0 ± 4.1 | 2.19 ± 0.31 | ** |
| TCDCA/TDCA | 4.08 ± 0.60 | 7.36 ± 0.90 | 1.88 ± 0.20 | ** |
| CDCA | 3.70 ± 0.65 | 6.74 ± 1.34 | 1.83 ± 0.19 | ** |
| CDCA-24G | NC | 0.519 ± 0.074 | >4.3 | |

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$, NC; not calculated

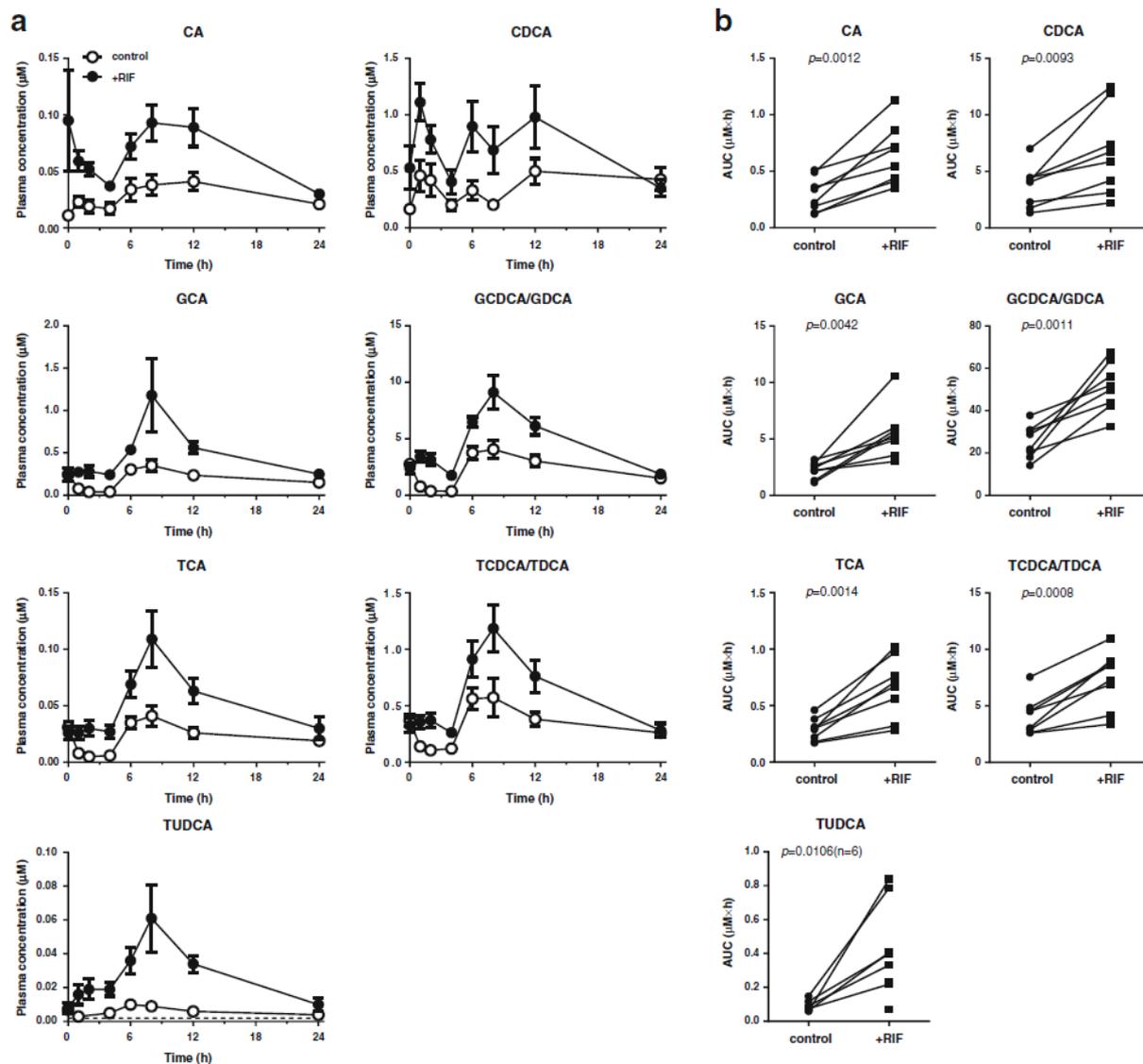


図 8. 各種胆汁酸の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

(a) コントロール群 (○) および rifampicin 投与群 (●) における各種胆汁酸の血漿中濃度推移を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=6-8)。GCDCA-S に関してコントロール群のみ抽出したものを上段に示している。破線で示したものは、LLOQ を示す。GCDCA/GDCA および TCDCA/TDCA は LC-MS/MS 分析においてクロマトグラフ上で分離が出来なかったため、それぞれ GDCA、TDCA の検量線を用いて算出している。(b) コントロール群 (●) および rifampicin 投与群 (■) における各種胆汁酸に関して各被験者の投与後 24 時間までの AUC について示す。Pvalue はグラフ内に示す。

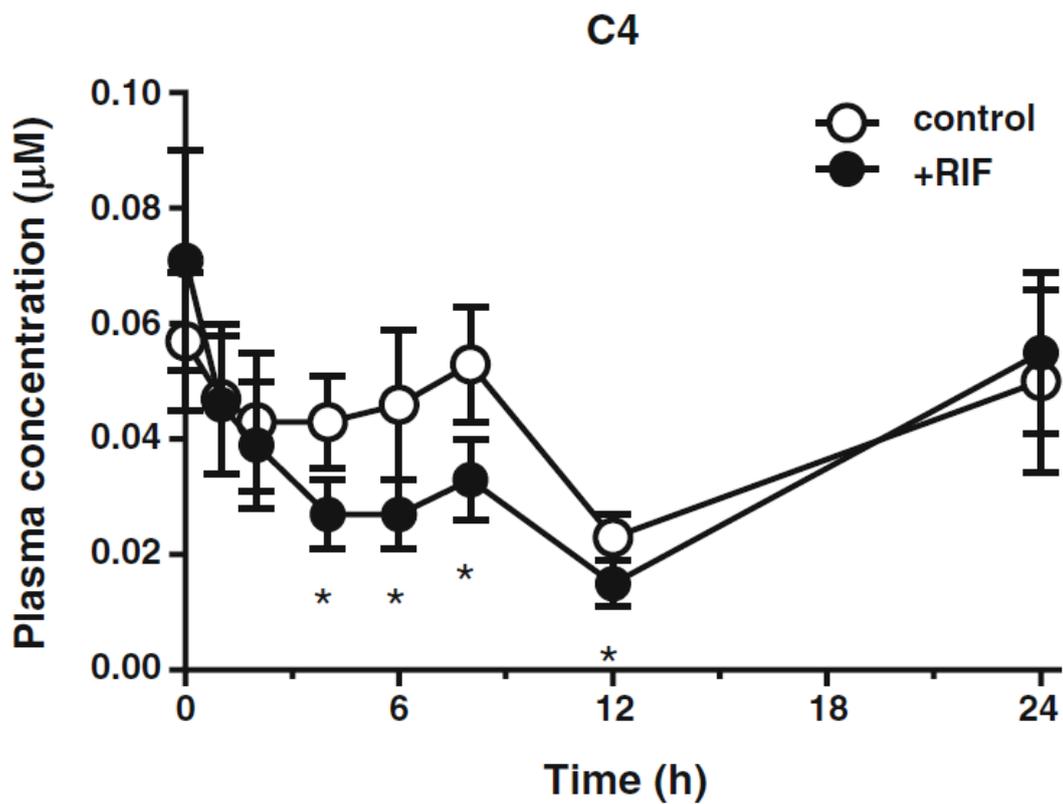


図 9. C4 の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

コントロール群 (○) および rifampicin 投与群 (●) における C4 の血漿中濃度推移を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=8)。*; $P < 0.05$

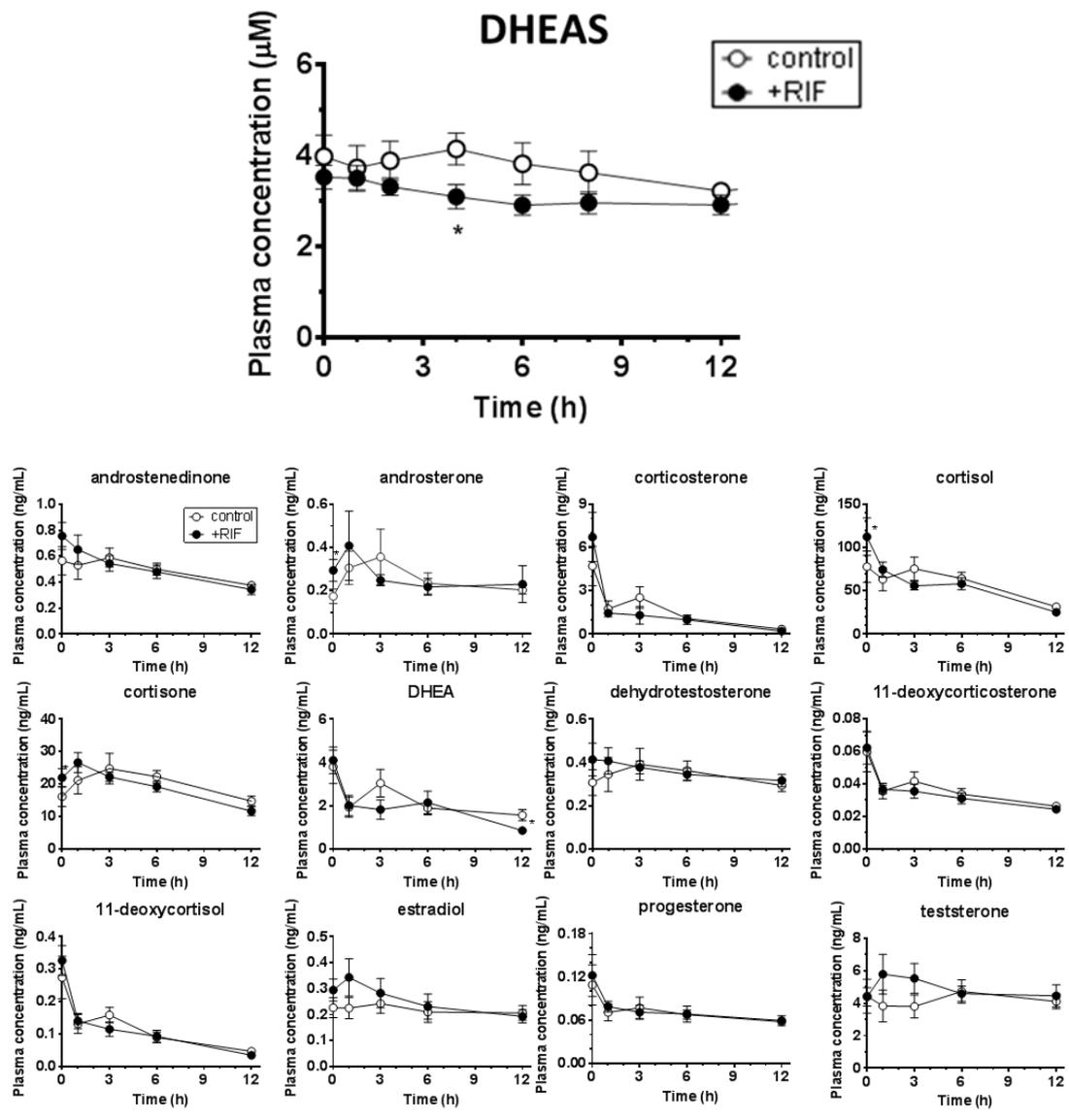


図 10. ステロイド類の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

コントロール群 (○) および rifampicin 投与群 (●) におけるステロイド類の血漿中濃度推移を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=6-8)。*; $P < 0.05$

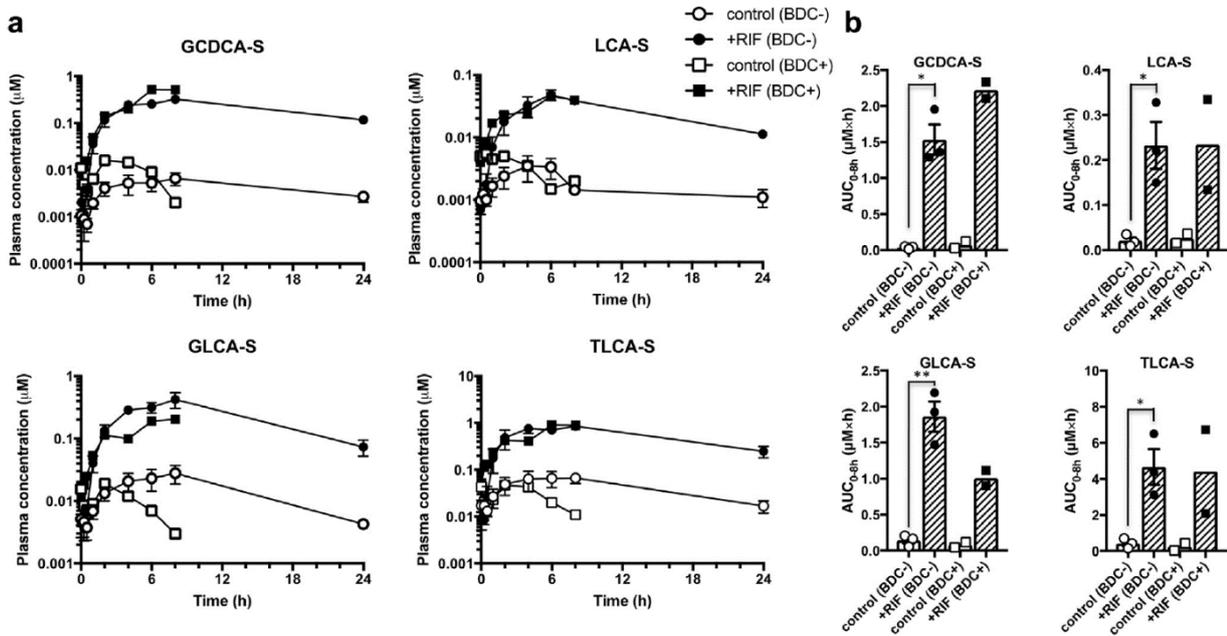


図 11. カニクイザルにおける胆汁酸硫酸抱合体の体内動態に対する rifampicin および胆汁分泌の影響

(a) 非処置 (BDC-) 群 (n=3) および BDC 処置 (BDC+) 群 (n=2) における胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度推移を示す [control (BDC-); ○, +rifampicin (BDC-); ●, control (BDC+); □, +rifampicin (BDC+); ■]。 (b) 台形法により算出した各群における胆汁酸硫酸抱合体の AUC を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す。*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$

表 4. カニクイザルにおける各種胆汁酸硫酸抱合体の体内動態パラメータ

| | | without BDC (mean \pm SD; n=3) | | with BDC [mean (individual data); n=2] | |
|---------|---|----------------------------------|-------------------|--|----------------------------|
| | | control | +rifampicin | control (C-594, C-535) | +rifampicin (C-594, C-535) |
| GCDCA-S | C_{\max} (μM) | 0.0079 \pm 0.0034 | 0.32 \pm 0.08 | 0.020 (0.028, 0.012) | 0.62 (0.58, 0.65) |
| | AUC _{0-8h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.036 \pm 0.020 | 1.5 \pm 0.4 * | 0.072 (0.12, 0.026) | 2.2 (2.3, 2.1) |
| | AUCR | | 68.5 | | 50.1 (19.7, 80.5) |
| | AUC _{0-24h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.11 \pm 0.04 | 5.1 \pm 1.1 | | |
| | X _{urine, 0-8h} (μmol) | | | 0.0018 (0.0027, 0.0010) | 0.026 (0.038, 0.014) |
| | X _{bile, 0-8h} (μmol) | | | 0.21 (0.19, 0.23) | 0.24 (0.21, 0.28) |
| LCA-S | C_{\max} (μM) | 0.0039 \pm 0.0024 | 0.048 \pm 0.016 | 0.0060 (0.0080, 0.0030) | 0.052 (0.067, 0.037) |
| | AUC _{0-8h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.021 \pm 0.013 | 0.23 \pm 0.09 * | 0.026 (0.036, 0.016) | 0.23 (0.34, 0.13) |
| | AUCR | | 13.7 | | 8.93 (9.3, 8.6) |
| | AUC _{0-24h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.041 \pm 0.015 | 0.63 \pm 0.16 | | |
| | X _{urine, 0-8h} (μmol) | | | 0.00054 (0.00054, ND) | 0.0046 (0.0046, ND) |
| | X _{bile, 0-8h} (μmol) | | | 0.012 (0.014, 0.011) | 0.039 (0.007, 0.00045) |
| GLCA-S | C_{\max} (μM) | 0.028 \pm 0.016 | 0.43 \pm 0.20 | 0.019 (0.021, 0.017) | 0.22 (0.23, 0.22) |
| | AUC _{0-8h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.14 \pm 0.08 | 1.9 \pm 0.4 ** | 0.082 (0.12, 0.047) | 1.0 (1.1, 0.9) |
| | AUCR | | 16.0 | | 14.4 (9.50, 19.2) |
| | AUC _{0-24h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.40 \pm 0.21 | 5.8 \pm 2.1 | | |
| | X _{urine, 0-8h} (μmol) | | | 0.00042 (0.00042, ND) | 0.0017 (0.0028, 0.00058) |
| | X _{bile, 0-8h} (μmol) | | | 0.11 (0.11, 0.11) | 0.071 (0.072, 0.069) |
| TLCA-S | C_{\max} (μM) | 0.078 \pm 0.042 | 0.91 \pm 0.26 | 0.047 (0.084, 0.010) | 1.0 (1.4, 0.61) |
| | AUC _{0-8h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 0.43 \pm 0.28 | 4.7 \pm 1.7 * | 0.24 (0.44, 0.041) | 4.4 (6.7, 2.1) |
| | AUCR | | 13.2 | | 32.9 (15.2, 50.6) |
| | AUC _{0-24h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) | 1.1 \pm 0.6 | 13 \pm 4 | | |
| | X _{urine, 0-8h} (μmol) | | | 0.0024 (0.0035, 0.0014) | 0.021 (0.036, 0.0049) |
| | X _{bile, 0-8h} (μmol) | | | 0.35 (0.51, 0.18) | 0.44 (0.66, 0.23) |

BDC; bile duct cannulation, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ND; not detected

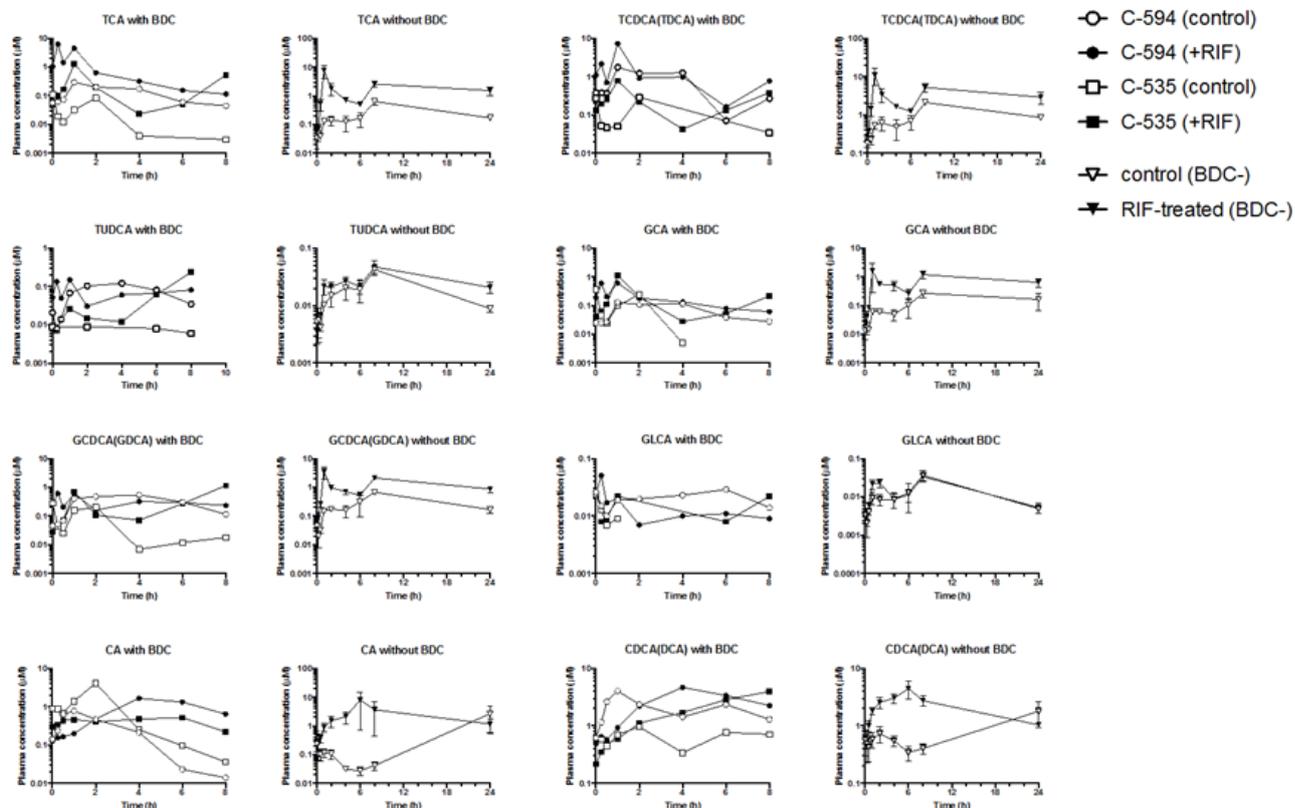


図 12. カニクイザルにおける胆汁酸の体内動態に対する rifampicin および胆汁分流の影響
 非処置 (BDC-) 群 (n=3) および BDC 処置 (BDC+) 群 (n=2) における胆汁酸硫酸抱合体の血
 漿中濃度推移を示す [control (BDC+, C-594); ○, +rifampicin (BDC+, C-594); ●, control
 (BDC+, C-535); □, +rifampicin (BDC+, C-535); ■, control (BDC-); ▽, +rifampicin (BDC-);
 ▼]. エラーバーはデータの標準誤差を示す。

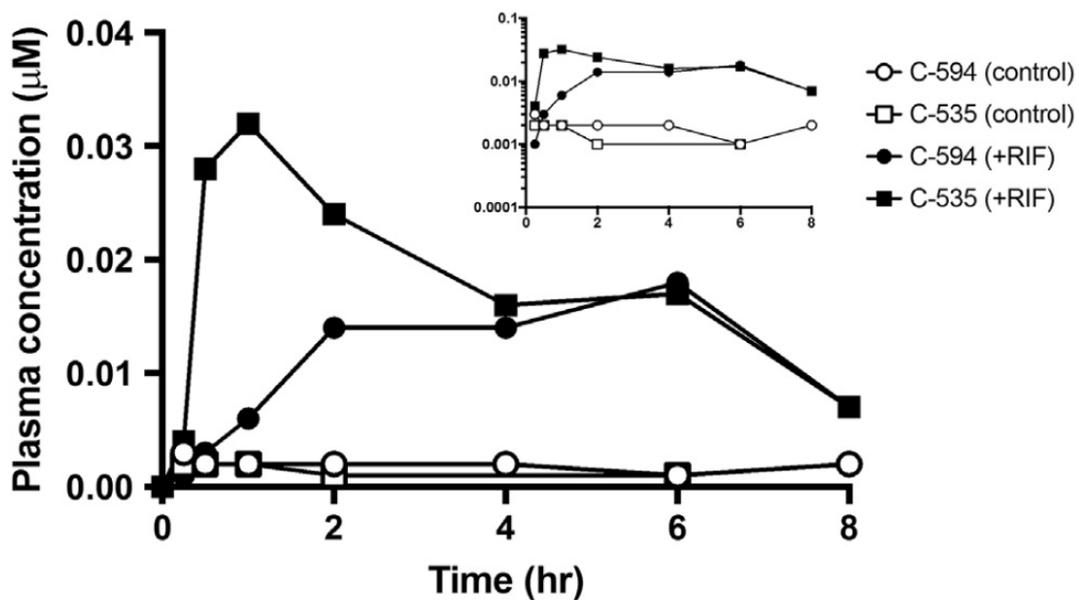


図 13. BDC サルにおける pitavastatin の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

BDC 処置サルのコントロール群 (○, □) および rifampicin 投与群 (●, ■) の各個体における pitavastatin の血漿中濃度推移を示す。片対数でプロットしたものを上段に示している。C-535 の 4 時間および 8 時間時点における血漿中濃度は LLOQ に満たなかった。

表 5. BDC サルにおける pitavastatin および rifampicin の薬物動態パラメータ

| | | with BDC [mean (individual data); n=2] | |
|--------------|---|--|-------------------------|
| | | control (C-594, C-535) | +RIF (C-594, C-535) |
| pitavastatin | C_{\max} (μM) | 0.0029 (0.0035, 0.0024) | 0.025 (0.018, 0.032) |
| | $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | 0.010 (0.014, 0.006) | 0.12 (0.10, 0.15) |
| | AUCR | | 16.3 (6.81, 25.7) |
| | $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | 0.016 (0.026, 0.006) | 0.19 (0.16, 0.21) |
| | $X_{\text{urine}, 0-8\text{h}}$ (μmol) | 0.00013 (0.00013, ND) | 0.0037 (0.0071, 0.0004) |
| | $X_{\text{bile}, 0-8\text{h}}$ (μmol) | 0.22 (0.20, 0.24) | 0.040 (0.041, 0.039) |
| rifampicin | C_{\max} (μM) | | 17.6 (21.4, 13.7) |
| | $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | | 90.9 (100.8, 80.9) |
| | $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | | 222 (283, 160) |
| | $X_{\text{urine}, 0-8\text{h}}$ (μmol) | | 0.30 (0.29, 0.31) |
| | $X_{\text{bile}, 0-8\text{h}}$ (μmol) | | 1.1 (0.8, 1.4) |

BDC; bile duct cannulation, ND; not detected

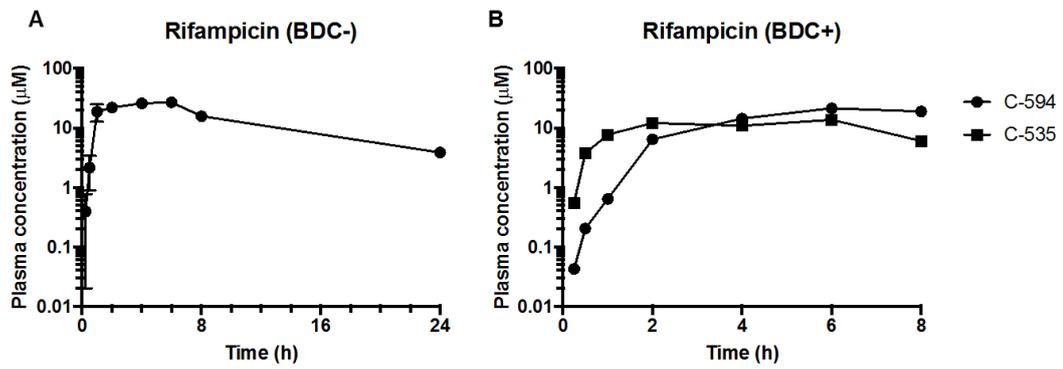


図 14. カニクイザルにおける rifampicin (18 mg/kg) の血漿中濃度推移

(a) 非処置 (BDC-) 群における rifampicin の血漿中濃度推移を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。(b) BDC 処置 (BDC+) 群における各個体の rifampicin の血漿中濃度推移を示す (C-594; ●, C-535; ■)。

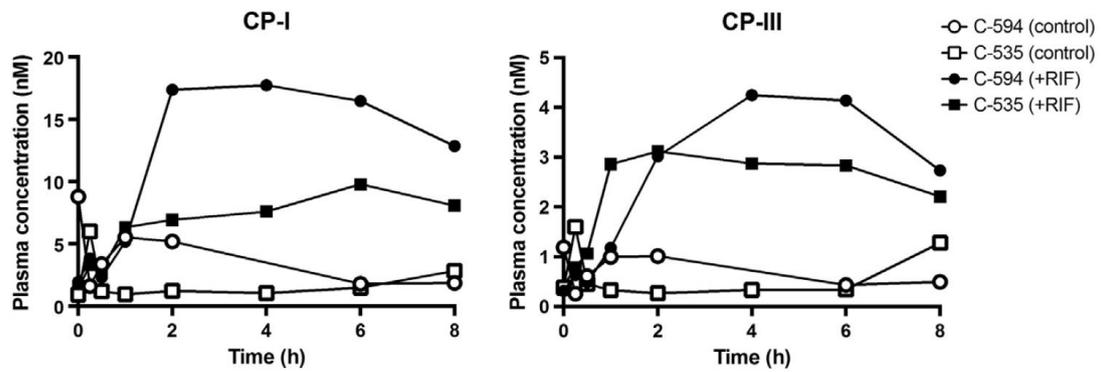


図 15. BDC サルにおける CP-I および CP-III の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響
 BDC 処置サルのコントロール群および rifampicin 投与群の各個体における CP-I および CP-III の血漿中濃度推移を示す [control (C-594); ○, control (C-535); □, +rifampicin (C-594); ●, +rifampicin (C-535); ■]。

表 6. BDC サルにおける CP-I および CP-III の体内動態パラメータ

| | | with BDC [mean (individual data); n=2] | |
|--------|--------------------------|--|----------------------------|
| | | control (C-594, C-535) | +rifampicin (C-594, C-535) |
| CP-I | C_{\max} (nM) | 7.4 (8.8, 6.0) | 13.8 (18, 9.8) |
| | AUC_{0-8h} (nM*h) | 19.8 (27.1, 12.4) | 86.7 (113, 60.1) |
| | AUCR | | 4.5 (4.2, 4.8) |
| | $X_{urine, 0-8h}$ (nmol) | 1.4 (1.5, 1.3) | 2.2 (3.3, 1.1) |
| | $X_{bile, 0-8h}$ (nmol) | 29.2 (24.8, 33.7) | 24.0 (22.6, 25.3) |
| CP-III | C_{\max} (nM) | 1.4 (1.2, 1.6) | 3.7 (4.2, 3.1) |
| | AUC_{0-8h} (nM*h) | 4.7 (5.5, 3.9) | 23.2 (25.3, 21.1) |
| | AUCR | | 5.0 (4.6, 5.4) |
| | $X_{urine, 0-8h}$ (nmol) | 9.5 (9.1, 9.8) | 3.5 (5.0, 2.1) |
| | $X_{bile, 0-8h}$ (nmol) | 5.6 (2.9, 8.3) | 3.2 (2.7, 3.6) |

BDC; bile duct cannulation

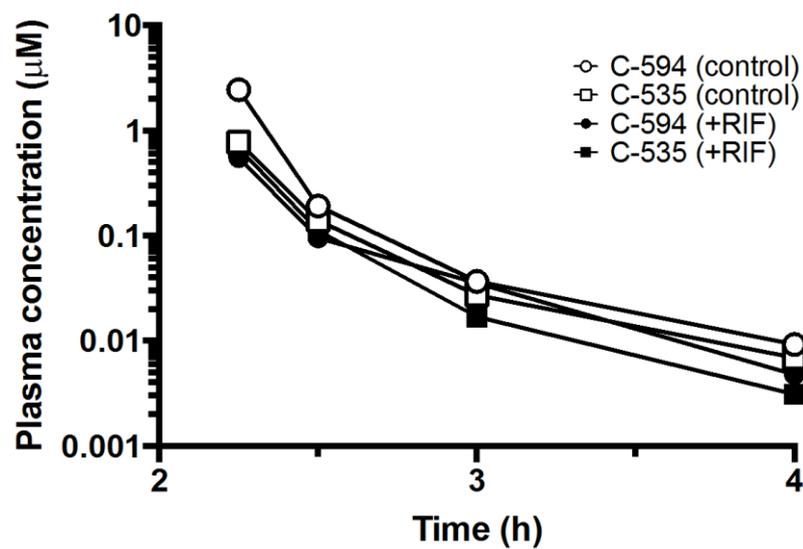


図 16. BDC サルにおける TCA-d5 の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

BDC 処置サルのコントロール群および rifampicin 投与群の各個体における TCA-d5 の静脈内投与後の血漿中濃度推移を示す [control (C-594); ○, control (C-535); □, +rifampicin (C-594); ●, +rifampicin (C-535); ■]。

表 7. BDC サルにおける TCA-d5 の体内動態パラメータ

ノンコンパートメント解析により各パラメータ (Vd、CL および AUC_{inf}) を算出した。

| | | with BDC [mean (individual data); n=2] | |
|--------|--------------------------------|--|----------------------------|
| | | control (C-594, C-535) | +rifampicin (C-594, C-535) |
| TCA-d5 | Vd (L/kg) | 0.7 (0.4, 1.1) | 1.2 (1.4, 1.1) |
| | CL (L/h/kg) | 1.4 (0.7, 2.1) | 2.6 (2.8, 2.5) |
| | AUC _{inf} (μM × h) | 0.51 (0.76, 0.27) | 0.21 (0.20, 0.22) |
| | X _{bile, 0-6h} (μmol) | 1.00 (1.08, 0.92) | 0.68 (0.70, 0.65) |
| | CL _b (L/h) | 2.5 (1.4, 3.5) | 3.2 (3.5, 2.9) |

BDC; bile duct cannulation

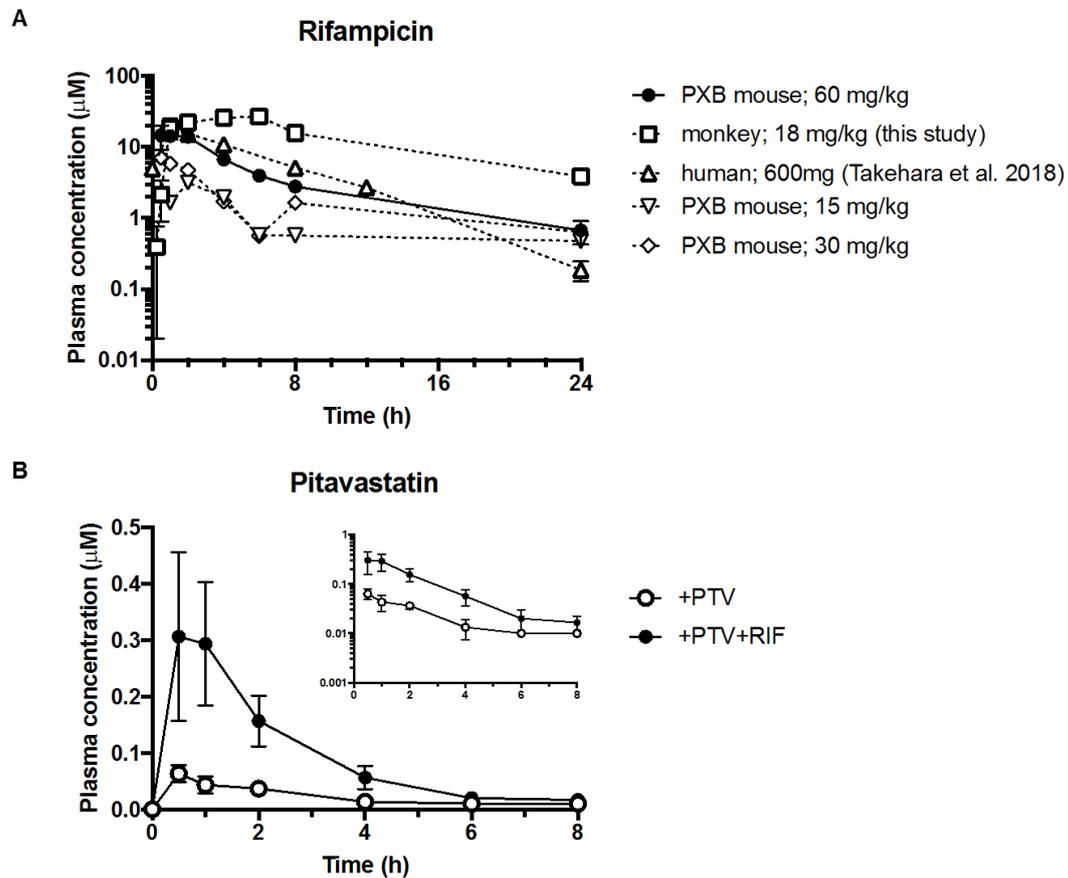


図 17. PXB マウスにおける rifampicin および pitavastatin の血漿中濃度推移

(a) PXB マウスにおける rifampicin (15, 30, 60 mg/kg) の血漿中濃度推移を示す。また、参考としてヒト (600 mg) およびカニクイザル (18 mg/kg) の濃度推移も示している。[PXB mouse (60 mg/kg); ●, monkey (18 mg/kg); □⁶², human (600 mg tablet); △⁶⁰, PXB mouse (15 mg/kg); ▽, PXB mouse (30 mg/kg); ◇]

(b) プローブ単独投与群 (○) および rifampicin 併用群 (●) の PXB マウスにおける pitavastatin の血漿中濃度推移を示す。片対数でプロットしたものを上段に示している。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。

表 8. PXB マウスにおける pitavastatin および rifampicin の薬物動態パラメータ

| | | without GBC (mean \pm SD; n=3) | |
|--------------|---|----------------------------------|---------------------------|
| | | pitavastatin only | pitavastatin + rifampicin |
| pitavastatin | C_{\max} (μM) | 0.06 \pm 0.01 | 0.31 \pm 0.13 |
| | $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | 0.17 \pm 0.02 | 0.79 \pm 0.28 |
| | AUCR | | 4.8 \pm 2.1 |
| rifampicin | C_{\max} (μM) | | 18 \pm 6 |
| | $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | | 63.4 \pm 16.8 |
| | $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ($\mu\text{M} \times \text{h}$) | | 91.1 \pm 18.2 |

GBC; gallbladder cannulation

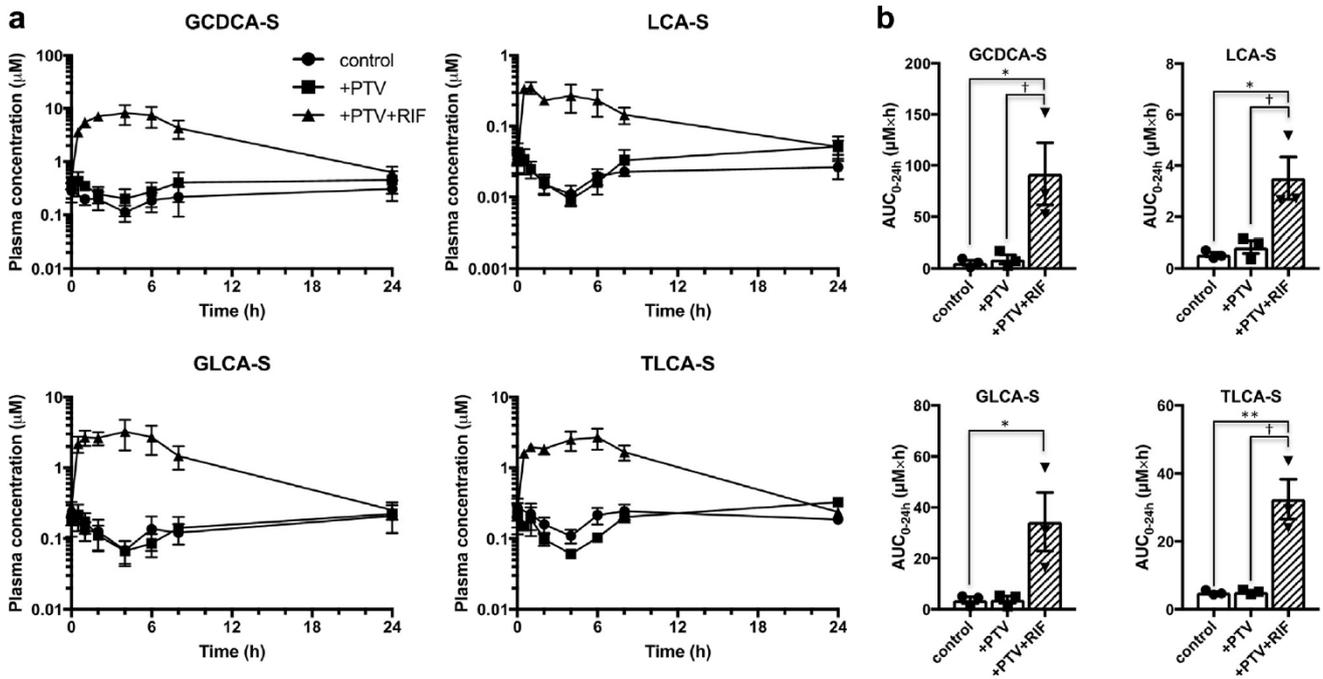


図 18. PXB マウスにおける胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度推移に対する pitavastatin および rifampicin の影響

(a) PXB マウスの各群における胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度推移を示す [非投与群 (control); ●, プローブ薬投与群 (pitavastatin only); ■, rifampicin 併用群 (pitavastatin + rifampicin); ▲]。 (b) 台形法により算出した各群における胆汁酸硫酸抱合体の AUC を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す(n=3)。*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ control versus pitavastatin +rifampicin, †; $P < 0.05$ pitavastatin only versus pitavastatin + rifampicin

表 9. PxB マウスにおける胆汁酸硫酸抱合体の体内動態パラメータ

| | | without GBC (mean ± SD; n=3) | | |
|---------|-----------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------|
| | | control | pitavastatin only | pitavastatin + rifampicin |
| GCDCA-S | C _{max} (μM) | 0.34 ± 0.21 | 0.54 ± 0.28 | 9.2 ± 4.4 |
| | AUC _{0-8h} (μM*h) | 1.44 ± 0.88 | 2.29 ± 1.68 | 52.6 ± 29.8 |
| | AUCR (PTV vs PTV+RIF) | | | 25 ± 4 |
| | AUC _{0-24h} (μM*h) | 5.64 ± 4.18 | 9.12 ± 7.52 | 91.9 ± 52.6 *† |
| LCA-S | C _{max} (μM) | 0.039 ± 0.016 | 0.065 ± 0.017 | 0.41 ± 0.08 |
| | AUC _{0-8h} (μM*h) | 0.15 ± 0.05 | 0.15 ± 0.06 | 1.9 ± 1.0 |
| | AUCR (PTV vs PTV+RIF) | | | 13 ± 4.2 |
| | AUC _{0-24h} (μM*h) | 0.54 ± 0.16 | 0.83 ± 0.42 | 3.5 ± 1.4 *† |
| GLCA-S | C _{max} (μM) | 0.26 ± 0.18 | 0.28 ± 0.14 | 3.6 ± 2.1 |
| | AUC _{0-8h} (μM*h) | 0.96 ± 0.66 | 0.89 ± 0.49 | 21 ± 12 |
| | AUCR (PTV vs PTV+RIF) | | | 23 ± 6 |
| | AUC _{0-24h} (μM*h) | 3.6 ± 2.2 | 3.8 ± 2.4 | 34 ± 20 * |
| TLCA-S | C _{max} (μM) | 0.36 ± 0.10 | 0.39 ± 0.03 | 3.2 ± 1.1 |
| | AUC _{0-8h} (μM*h) | 1.5 ± 0.5 | 0.95 ± 0.15 | 17 ± 5 |
| | AUCR (PTV vs PTV+RIF) | | | 19 ± 8 |
| | AUC _{0-24h} (μM*h) | 4.9 ± 0.7 | 5.2 ± 0.6 | 32 ± 10 **† |

GBC; gallbladder cannulation

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ control versus pitavastatin +rifampicin, †; $P < 0.05$ pitavastatin only versus pitavastatin + rifampicin

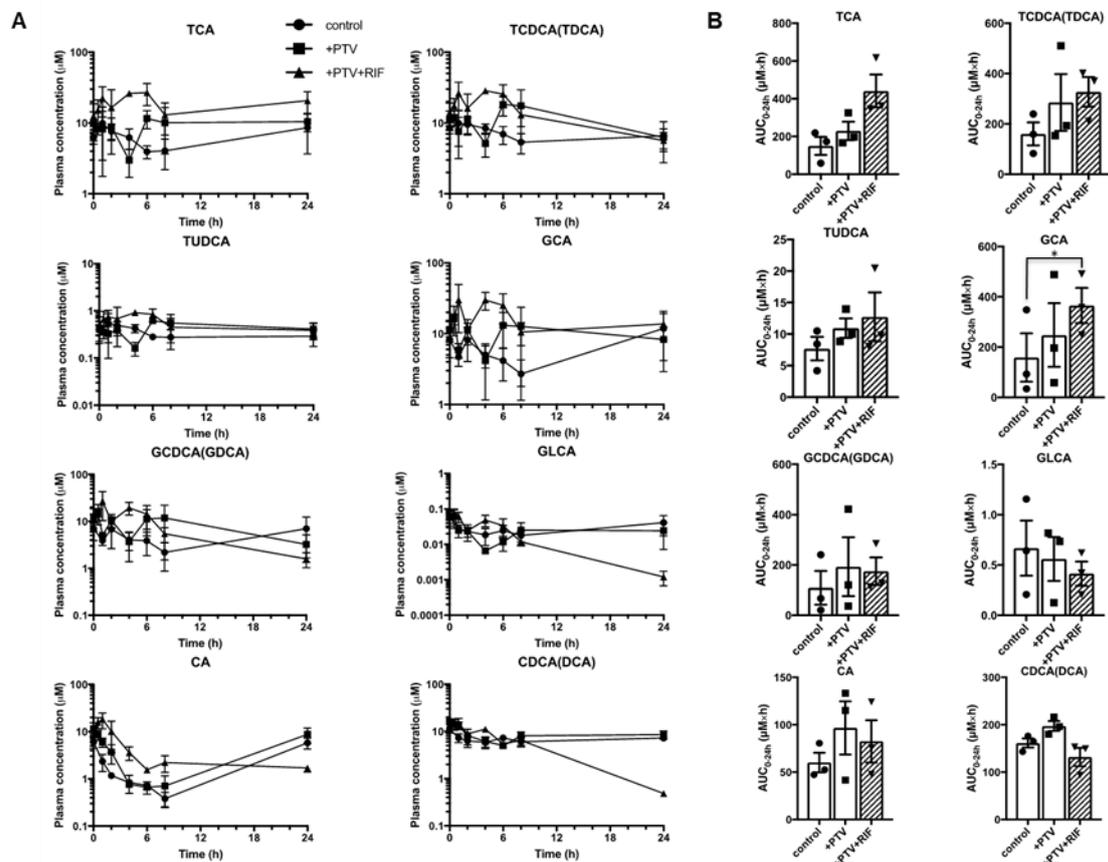


図 19. PXB マウスにおける胆汁酸の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

(a) PXB マウスの各群における胆汁酸の血漿中濃度推移を示す [非投与群 (control); ●, プローブ薬投与群 (pitavastatin only); ■, rifampicin 併用群 (pitavastatin + rifampicin); ▲]。 (b) 台形法により算出した各群における胆汁酸の AUC を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=3)。*; $P < 0.05$ control versus pitavastatin +rifampicin

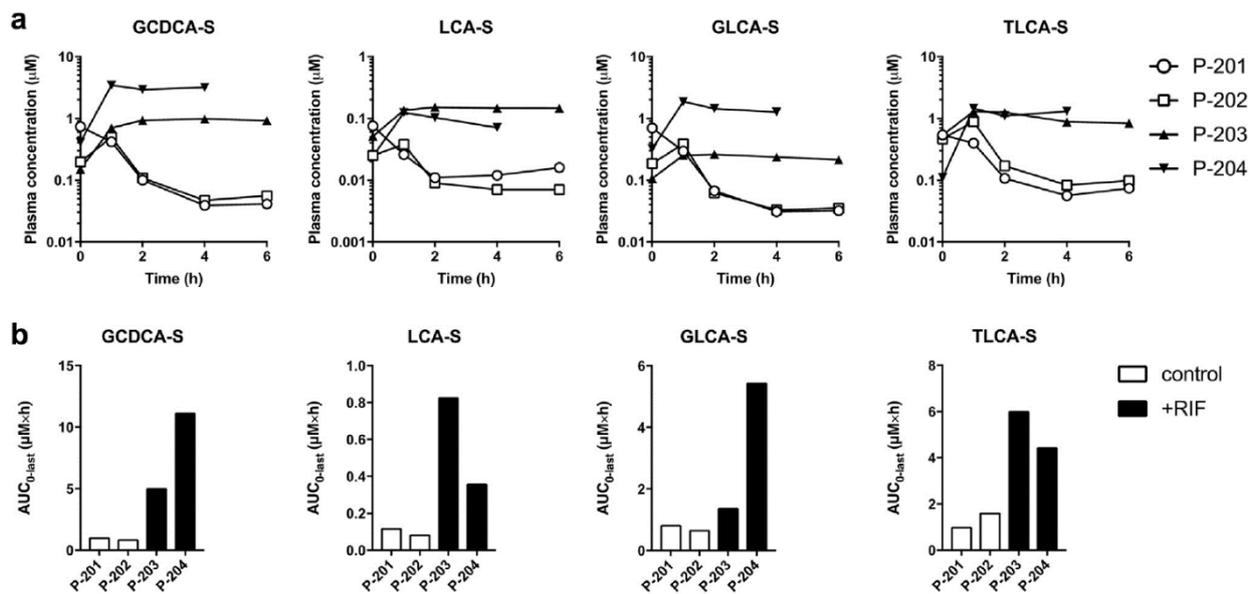


図 20. GBC マウスにおける胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

(a) GBC 処置 PXB マウスのコントロール群および rifampicin 投与群の各個体における胆汁酸硫酸抱合体の血漿中濃度推移を示す [P-201 (control); ○, P-202 (control); □, P-203 (+rifampicin); ▲, P-204 (+rifampicin); ▼]。 (b) 台形法により算出した各個体における胆汁酸硫酸抱合体の AUC を示す。

第二章

OATP1B 内因性基質の臨床 DDI バイオマーカーとしての実用に向けた検討

要約

医薬品開発における OATP1B 内因性基質を利用した定量的 DDI リスク評価の有用性については認識されているものの、これまでに OATP1B 阻害時における汎用されるプローブ薬と内因性基質間の AUC の相関関係について検討されておらず、実際の活用例は限られている。本章は、医薬品開発における定量的 DDI リスク評価の実用に向け、rifampicin 300 mg および 600 mg の 2 用量を用いた用量反応性試験を実施した。OATP1B 基質であるスタチンをプローブ薬として用い、第一章において新規の OATP1B の DDI バイオマーカーとして同定した GCDCA-S に加え CP-I、total bilirubin、direct bilirubin を測定し rifampicin の用量反応性およびそれぞれの AUC における相関関係について検討を行った。各種スタチンは rifampicin 投与による血中濃度の増大が見られたが、用量反応性を示したものは atorvastatin および pitavastatin であった。また、内因性基質の血漿中濃度および AUC は rifampicin 投与により増大し、total bilirubin を除き、用量反応性を示した。GCDCA-S の AUC に対応する total bilirubin、direct bilirubin および CP-I の AUC をプロットしたところ、direct bilirubin および CP-I において GCDCA-S と良好な相関 ($r^2 = 0.74, 0.78$)、total bilirubin においては弱い相関 ($r^2 = 0.30$) が見られた。また atorvastatin の AUC に対する、各内因性基質の AUC の相関について、GCDCA-S、direct bilirubin および CP-I では比較的良好な相関 ($r^2 = 0.65, 0.70, 0.48$) が示された。本検討により、内因性基質 GCDCA-S、direct bilirubin および CP-I は OATP1B 阻害の程度が AUCR に反映されること、および典型的プローブ薬である atorvastatin と相関を示すことを明らかとし、これら内因性基質が臨床における定量的 DDI リスク評価に適応可能であることを示した。

序論

第一章では、胆汁酸硫酸抱合体 GCDCA-S が OATP1B の内因性基質であること、続いてヒトおよび前臨床モデル動物において阻害剤である rifampicin の投与により体内動態パラメータを変化させることを示し、GCDCA-S の DDI バイオマーカーとしての利用可能性を提起した。

医薬品開発における臨床 DDI 試験では単なるリスクの有無のみならず、副作用・薬効発現の予測や実臨床での用法用量調節の検討には定量的な DDI リスク予測が求められる。当然のことながら、内因性基質をプローブ薬の代替として用いる場合においても同様である。内因性基質の DDI リスクの定量的な推定方法として数理学的モデルを用いたボトムアップ型と汎用されるプローブ薬との関係性から予測するトップダウン型が考えられる (図 21)。前者は、in vitro データや物理化学的パラメータを加味した内因性基質や阻害剤の体内動態に基づき構築された生理学的モデルから AUCR やそれに基づく副作用・薬効発現を予測する手法を指し、汎用性が高く、様々なシチュエーションに応じた予測が可能であるが、頑健で複雑な数理モデル構築には多くのデータの蓄積が必要となる。一方、後者はあらかじめ取得したプローブ薬との AUC 変化の相関に基づき、内因性プローブの AUCR からプローブ薬の AUCR をその相関関係より推測することで簡便に定量的判定が可能となる。従って、トップダウン型定量的 DDI リスク判定においては、OATP1B 阻害の程度に対する内因性 OATP1B 基質とプローブ薬の AUC の良好な相関が必須条件であるが、過去にこのような相関に関する検討は実施されていなかった。そこで、医薬品開発において GCDCA-S など各種内因性基質が OATP1B の DDI バイオマーカーとして実用に供することを示すため、内因性 OATP1B 基質およびプローブ薬の体内動態に対する rifampicin 用量反応性を確認する健常人を対象としたクロスオーバー試験を実施した。

検討するプローブ薬には、基質として OATP1B による輸送が肝クリアランスに寄与し、かつそれぞれ固有の消失機構を有するスタチン類 4 種、atorvastatin (CYP3A4)、pitavastatin [breast cancer resistance protein (BCRP)]、rosuvastatin (MRP2 および BCRP)、および fluvastatin

(CYP2C9) を選抜した (括弧内は主たる消失経路)⁶³⁻⁶⁵。臨床における rifampicin 投与により、atorvastatin は 7.3-12 倍、pitavastatin は 4.0-5.4 倍、rosuvastatin は 2.5-4.7 倍、それぞれの AUC を上昇させる報告がされている (Metabolism and Transport Drug Interaction Database³¹)。これらは FDA ガイドラインにおいて、臨床における OATP1B1 および OATP1B3 介在性の DDI 評価に用いられる基質の例としても挙げられている²。fluvastatin に関しては、OATP1B 典型的阻害剤として知られる cyclosporine A の併用により AUC を 3.5 倍増加させることが報告されており、肝クリアランスにおける OATP1B の関与が示唆される一方^{66,67}、rifampicin による併用効果については過去に報告が無い。

OATP1B 遺伝子変異に起因するローター症候群は、抱合型高ビリルビン血症やビリルビンおよび CP-I の尿中排泄の亢進が観察されており、これらの血中からの消失における OATP1B の寄与を支持するものである²⁶。既にこれらは前臨床および臨床 DDI 研究から OATP1B の代替プローブ候補として報告されており^{18,22,24}、医薬品開発における OATP1B 内因性基質を用いた臨床 DDI リスク評価の方法論の確立を目的に、これらとプローブ薬および胆汁酸硫酸抱合体 GCDCA-S との相関について併せて考察した。

結果

各種スタチンの血漿中濃度に対する rifampicin の影響

atorvastatin、pitavastatin、rosuvastatin の血漿中濃度は投与後 24 時間まで検出できたが、fluvastatin の血漿中濃度は速やかな消失が見られ、投与後 4 時間までであった (図 22)。rifampicin の投与は、投与したすべてのスタチンの最高血漿中濃度および AUC を有意に増加させ、atorvastatin で 6.1 倍と最も強い作用を示した (表 10)。rifampicin による atorvastatin と pitavastatin の AUC の増大には中等度の用量依存性が認められたものの、rosuvastatin と fluvastatin では認められなかった (図 22)。

rifampicin の血漿中濃度推移

rifampicin は用量依存性を示し、rifampicin 300 mg および 600 mg の投与で C_{max} はそれぞれ $7.96 \pm 0.81 \mu\text{M}$ および $17.0 \pm 2.2 \mu\text{M}$ であった。また、24 時間までの AUC はそれぞれ $45.8 \pm 3.5 \mu\text{M} \times \text{h}$ 、 $124 \pm 5 \mu\text{M} \times \text{h}$ であった。なお、rifampicin の K_i 値 ($0.23 \mu\text{M}$) を非タンパク結合率で補正した in vivo K_i 値 ($3.3 \mu\text{M}$) を破線で示しており⁶⁷、300 mg においては投与後約 6 時間、600 mg では約 12 時間まで in vivo K_i 値を超える濃度が維持されていた (図 22)。

total bilirubin および direct bilirubin の血漿中濃度に対する rifampicin の影響

プローブ薬非投与群と投与群の比較から、プローブ薬投与による total bilirubin および direct bilirubin の血漿中濃度への影響は無かった。rifampicin 投与後、total bilirubin および direct bilirubin の血漿中濃度は、それぞれ投与後 4 時間と 1 時間に最高値に達するまで増大した (図 23)。total bilirubin に関して、rifampicin 300 mg 群および 600 mg 群それぞれにおいてプローブ薬投与群との AUCR は 1.6 および 1.7 で、おおよそ同一の血漿中濃度推移が見られた。一方、

direct bilirubin において、rifampicin は用量依存的に血漿中濃度を増大させ、AUCR はそれぞれ 2.3 および 3.5 であった。

GCDCA-S の血漿中濃度に対する rifampicin の影響

プローブ薬投与による GCDCA-S の血漿中濃度に対する影響は見られなかった。rifampicin は用量依存的に GCDCA-S の血漿中濃度を上昇させ、その AUCR は 4.3 および 10 であった。血漿中濃度推移に関して、投与後初期 4 時間までは rifampicin の用量に差は無くそれ以後に用量反応性が観察された (図 23)。

CP-I の血漿中濃度に対する rifampicin の影響

rifampicin は用量依存的に CP-I の血漿中濃度を増大させ、投与後 4 時間において最大血漿中濃度を示した。AUC はプローブ投与群と比較して、それぞれ 2.3 倍および 3.5 倍であった (図 23)。

内因性 OATP1B 基質および atorvastatin 間における AUC に関する相関

GCDCA-S の AUC に対する、total bilirubin、direct bilirubin および CP-I の AUC に関して、薬剤非投与群および投与群すべてに関してプロットし、相関係数を算出した (図 24)。direct bilirubin および CP-I に関して GCDCA-S と良好な相関 ($r^2 = 0.74, 0.78$) が示され、total bilirubin においては弱い相関 ($r^2 = 0.30$) が見られた。atorvastatin に対する、GCDCA-S、total bilirubin、direct bilirubin および CP-I についても各群に関して AUC をそれぞれプロットし、相関関係を検討した (図 24)。GCDCA-S、direct bilirubin および CP-I では比較的良好な相関 ($r^2 = 0.65, 0.70, 0.48$) が見られ、total bilirubin においては弱い相関 ($r^2 = 0.36$) であった。

各種胆汁酸の血漿中濃度に対する rifampicin の影響

各群における血漿検体中の胆汁酸濃度に関しても測定したところ、食事に起因すると思われる日内変動の傾向が認められた (図 25)。プローブ薬投与による胆汁酸の血漿中濃度に対する影響は限定的であった。スタチン投与による GCDCA-S の血漿中濃度に対する影響は無かった。rifampicin による AUC の有意な増大が見られたのは CA、CDCA/deoxycholic acid (DCA) でのみであったものの、TUDCA を除き緩やかな用量反応性の傾向が確認された。

考察

本章では、第一章で OATP1B の DDI バイオマーカー候補として同定された GCDCA-S および既報の OATP1B 内因性基質が、臨床 DDI 試験で用いられる OATP1B 基質薬の代替となり得るか検討をした。また、臨床における定量的 DDI リスク評価を志向し、OATP1B 阻害剤である rifampicin の 2 用量投与による用量反応性についても考察した。

rifampicin の併用投与は、本検討に用いたすべてのスタチンの血漿中濃度を有意に上昇させたが、AUC に対する阻害効果に用量反応性が観察されたのは atorvastatin、pitavastatin のみであった (図 22)。AUCR は atorvastatin が最も高く、次いで pitavastatin、rosuvastatin、fluvastatin であった (表 10)。atorvastatin、pitavastatin および fluvastatin は肝排泄型スタチンであり、AUCR の差は主に初回通過効果における肝アペイラビリティの影響および肝取り込み過程に対する OATP1B の寄与によって説明される。その他、atorvastatin、pitavastatin および fluvastatin は OATP1B に加えて、OATP2B1 および NTCP の基質でもあるがこれらのトランスポーターに対する rifampicin の IC_{50} は、rifampicin の非結合形 C_{max} ($1.2 \mu M$) よりも十分に大きく、その阻害はほとんど生じないものと推定される。atorvastatin に関しては吸収過程において CYP3A による腸代謝と P 糖蛋白質による分泌が関与しており、rifampicin はこれらに対する阻害能も有していることから AUC の増加は OATP1B による肝取り込みの阻害と腸管吸収過程への影響の複合効果を表している可能性がある。また、rosuvastatin は尿中排泄が消失に寄与していることを考慮すると、AUC に対する rifampicin の効果は限定的であると考えられる。atorvastatin と pitavastatin の見かけの全身クリアランス (CL/F) に関して、プローブ単独群と rifampicin (600 mg) 投与群ともに既報値と同等であった⁶⁸。一方で、スタチンの CL/F についてこれまで複数報告がされているが、その値は試験ごとにばらつきが存在することも事実であり、rifampicin によるスタチンの AUC 変動における差は、種差など臨床試験の背景および設計に起因する可能性もある⁶⁹。

本研究では、臨床での関連が示されている OATP1B 内因性基質、total bilirubin、direct bilirubin、CP-I および GCDCA-S に焦点を当てた。direct bilirubin、CP-I、および GCDCA-S は rifampicin 用量依存的な有意な血漿中濃度の増加を示したが、total bilirubin の血漿中濃度の増大については用量反応性を示さなかった (図 23)。

血漿中の total bilirubin に対する rifampicin (600mg) の効果は、以前の報告と一致していた。一方、direct bilirubin に対する rifampicin の効果が無かった過去の報告とは異なっていた²²。このような不一致は、direct bilirubin の測定法の違いに起因すると考えられる。total bilirubin および direct bilirubin は、肝機能を評価するために臨床現場で日常的に測定されるものであるが、ジアゾ法やバナジン酸酸化法のような化学反応に基づく検出方法では、 δ bilirubin のような血漿中の他の反応性物質による干渉のために、direct bilirubin 濃度を過大評価することが知られている⁷⁰。そのため、DDI リスク評価を目的に direct bilirubin を測定する場合、本検討で用いた酵素法あるいは、LS-MS/MS による質量分析が望ましい。実際、Lai らによって観察された total bilirubin 濃度は類似していたが、direct bilirubin の濃度 (0.5 mg/dL) は本試験で観察された濃度 (0.07 mg/dL) よりも高かった²²。

24時間までの AUC について、GCDCA-S と用量反応性が見られた direct bilirubin および CP-I との間には良好な相関が認められ、atorvastatin の AUC との間にも相関が示された (図 24)。このことは、少なくとも健常人によるクロスオーバー試験および阻害剤の単回投与の場合においては、これらの内因性基質が代替 OATP1B プローブとして、ヒトにおける OATP1B 阻害の検出に使用可能である事を支持する。

direct bilirubin および CP-I と GCDCA-S との間に体内動態プロファイルに対する rifampicin の効果に差があることに着目した。direct bilirubin および CP-I において投与後 2 時間までに rifampicin による用量反応性が観察された一方、GCDCA-S に関しては投与後 4 時間までの血漿中濃度について 2 用量間に差異は無かった (図 23)。投与後 8 時間以降の rifampicin 600 mg 群における血漿中 rifampicin 濃度は、OATP1B の in vivo K_i 値よりも高く十分な OATP1B 阻害

が予想されるが、300 mg では in vivo K_i よりも低かった (図 22)。これは GCDCA-S の用量反応性が投与後 8 時間以降に見られたことを合理的に説明するものの、内因性バイオマーカー間で異なるプロファイルを示す機序については不明である。胆汁酸における食事による血漿中濃度上昇と対応しており、この現象は食事による胆汁分泌および胆汁酸合成の変動に起因する可能性も否定できない。

前章と同様に各種胆汁酸の血漿中濃度についても検討し、rifampicin は GCDCA を含む胆汁酸の血漿中濃度を弱いながらも増大させ、その効果は用量依存的であった (図 25)。このような rifampicin の胆汁酸に対する効果は、OATP1B 阻害によるものである可能性は低いと考えられる。多くの胆汁酸が OATP1B 基質であるが⁷¹、凍結ヒト肝細胞における TCA の取り込みに対する OATP1B の寄与が限定的であったこともこれを支持するものである。また、日内変動に関する考察として、GCDCA とその抱合体である GCDCA-S について薬剤非投与群の血漿中濃度推移に関して、それぞれ観測開始時の血漿中濃度基準で補正しプロットをした。これにより GCDCA-S は GCDCA と比較し日内変動は小さいことが示唆され、DDI リスク評価における GCDCA-S の有用性を示す結果であった (図 26)。

本章は、いくつかの OATP1B 内因性基質の AUC がプローブ薬と同様に OATP1B 阻害の程度と相関することを初めて実証し、DDI リスク評価における OATP1B の内因性基質の利用可能性を示した。OATP1B プローブ薬を用いた不必要な DDI 試験を避けるために Phase1 試験の血液試料を用いて予備的評価を可能にするなど、このような内因性基質は医薬品開発段階の様々な場面における DDI リスクに関する考察と評価の選択肢を提供することが期待できる。加えて、プローブ薬を必要としないことから、その他の内因性バイオマーカーと同時にデータが得られることも利点の一つであると考えられる。

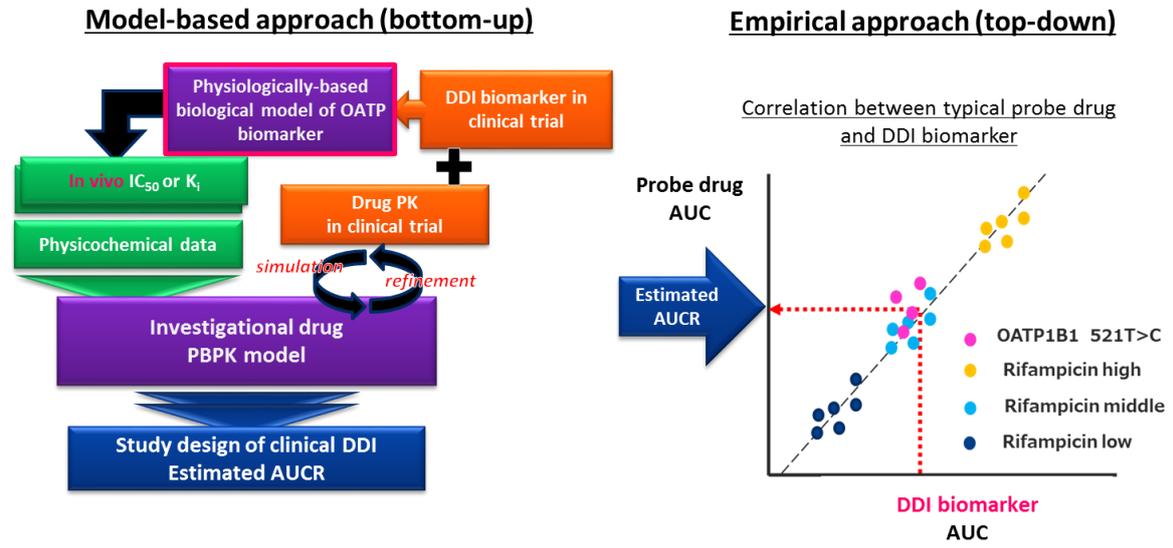


図 21. 内因性基質を利用した臨床における AUCR 推定方法

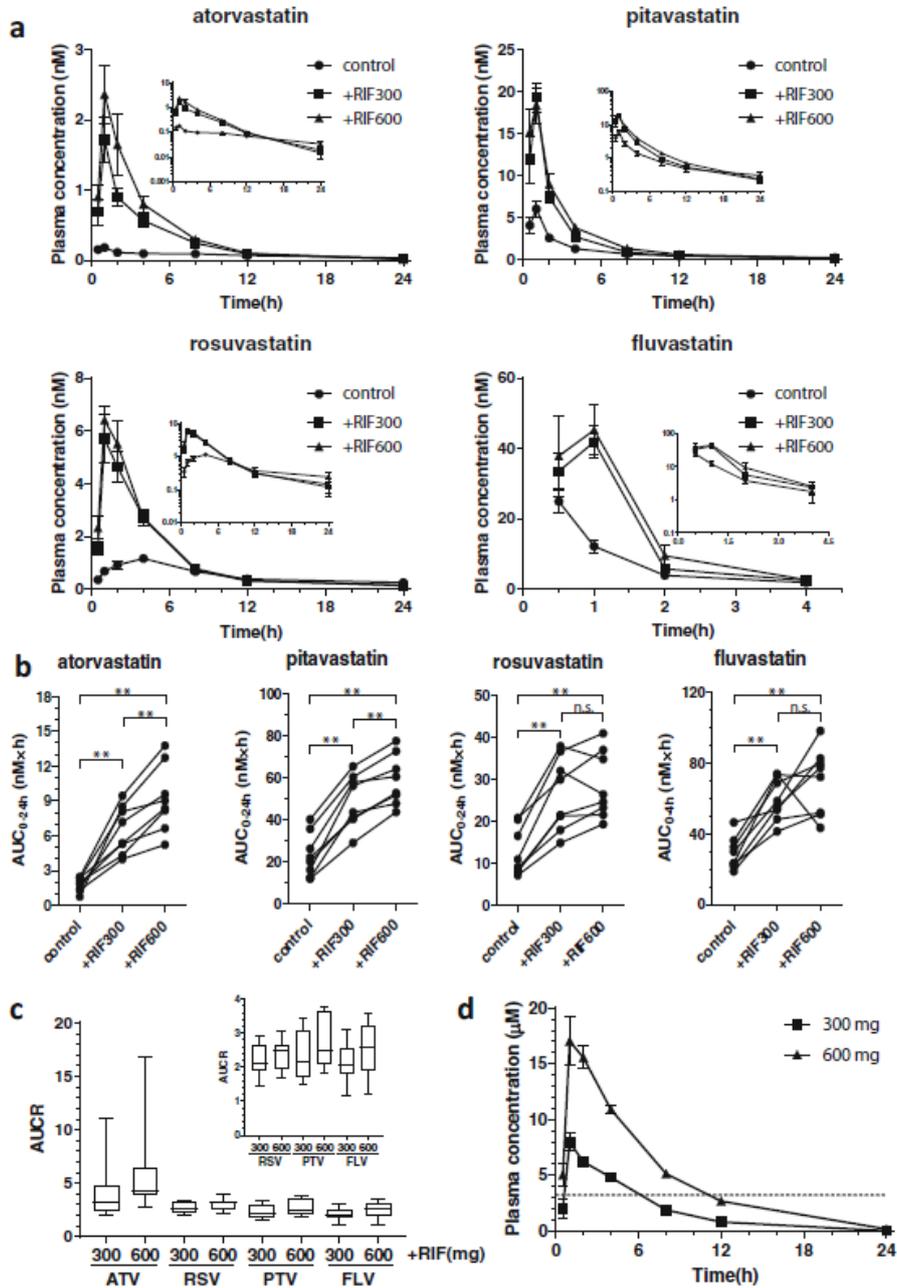


図 22.スタチンの血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

(a) コントロール群および rifampicin 投与群のスタチン類の血漿中濃度推移を示す (プローブ薬投与群; ●, rifampicin 300mg; ■, rifampicin 600mg; ▲)。 (b) 台形法により算出した各個体のスタチン類の AUC、(c) スタチン類の AUCR、(d) rifampicin の血漿中濃度推移をそれぞれ示す。破線は OATP1B の in vivo K_i 値 (0.23 μM) を示す。**: P < 0.01, n.s.; not significant

表 10. OATP1B 基質薬物の薬物動態パラメータ

コントロール群および rifampicin 投与群のスタチン類の薬物動態学的パラメータを示す (mean ± SD)。

| | | probe only | rifampicin 300 mg | | rifampicin 600 mg | |
|--------------|-----------------------------|---------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | | | Fold change | | Fold change |
| atorvastatin | C _{max} (nM) | 0.206 ± 0.022 | 1.72 ± 0.32** | 8.7 ± 1.5 | 2.74 ± 0.45**, † | 14 ± 2 |
| | AUC _{0-24h} (nM×h) | 1.81 ± 0.21 | 6.51 ± 0.73** | 4.2 ± 1.0 | 9.18 ± 1.01**, †† | 6.1 ± 1.6 |
| | CL _{tot} /F (L/h) | 1138 ± 192 | 301 ± 35 | 0.30 ± 0.05 | 213 ± 24 | 0.21 ± 0.03 |
| pitavastatin | C _{max} (nM) | 6.39 ± 1.00 | 20.4 ± 2.1** | 3.5 ± 0.3 | 19.3 ± 1.9** | 3.4 ± 0.5 |
| | AUC _{0-24h} (nM×h) | 23.2 ± 3.7 | 49.3 ± 4.4** | 2.3 ± 0.3 | 58.9 ± 4.2**, †† | 2.8 ± 0.3 |
| | CL _{tot} /F (L/h) | 24.3 ± 3.7 | 10.3 ± 1.1 | 0.46 ± 0.04 | 8.35 ± 0.58 | 0.38 ± 0.04 |
| rosuvastatin | C _{max} (nM) | 1.16 ± 0.14 | 5.87 ± 0.91** | 5.0 ± 0.4 | 7.38 ± 0.65** | 6.7 ± 0.5 |
| | AUC _{0-24h} (nM×h) | 12.6 ± 2.0 | 26.5 ± 3.1** | 2.2 ± 0.2 | 28.5 ± 2.8** | 2.4 ± 0.2 |
| | CL _{tot} /F (L/h) | 97.0 ± 13.5 | 43.5 ± 5.43 | 0.47 ± 0.04 | 38.9 ± 3.6 | 0.43 ± 0.03 |
| fluvastatin | C _{max} (nM) | 25.0 ± 3.3 | 45.2 ± 4.7** | 2.0 ± 0.3 | 58.0 ± 9.9 | 2.9 ± 0.7 |
| | AUC _{0-24h} (nM×h) | 29.0 ± 3.3 | 59.1 ± 4.2** | 2.2 ± 0.2 | 69.6 ± 6.7** | 2.5 ± 0.3 |
| | CL _{tot} /F (L/h) | NC | NC | NC | NC | NC |

**; *P* < 0.01 versus probe only, †; *P* < 0.05, ††; *P* < 0.01 versus rifampicin 300mg, NC; not calculated

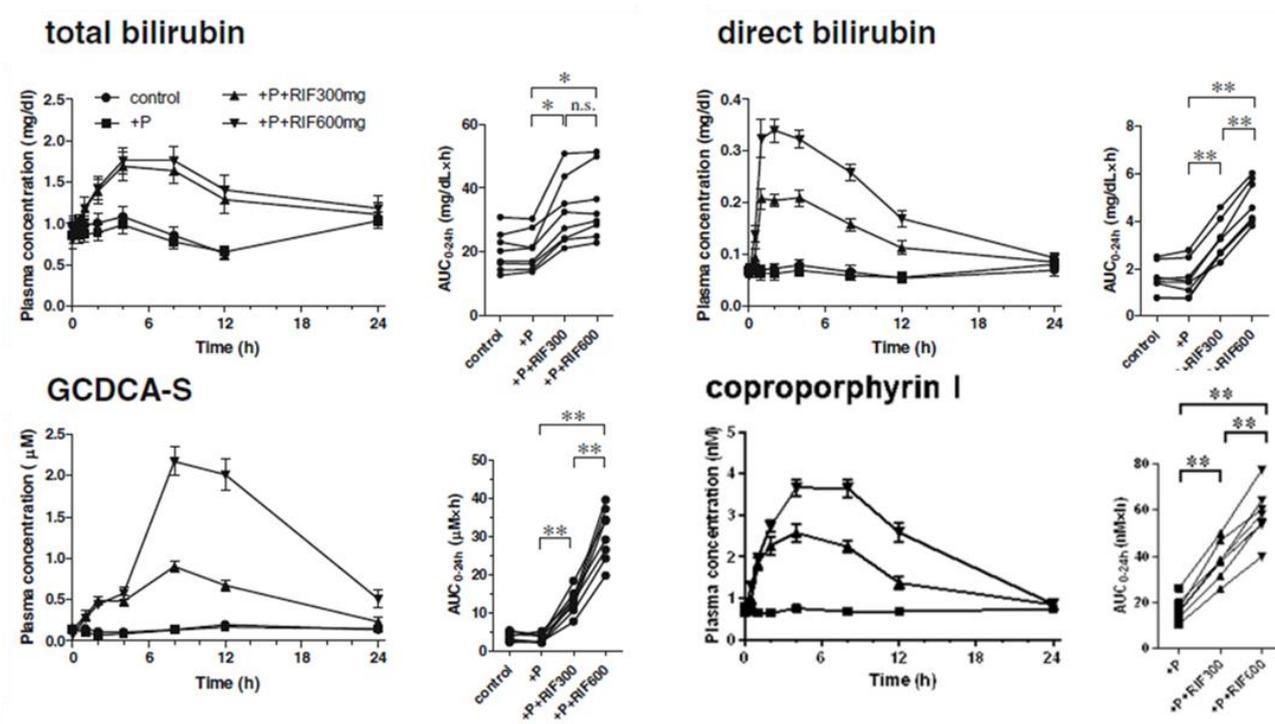


図 23. OATP1B 内因性マーカーの血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

各群の OATP1B 内因性基質の血漿中濃度推移（非投与群；●，プローブ薬投与群；■，rifampicin 300 mg；▲，rifampicin 600 mg；▼）および台形法により算出した各個体の AUC を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す(n=8)。*； $P < 0.05$ ，**； $P < 0.01$ ，n.s.；not significant

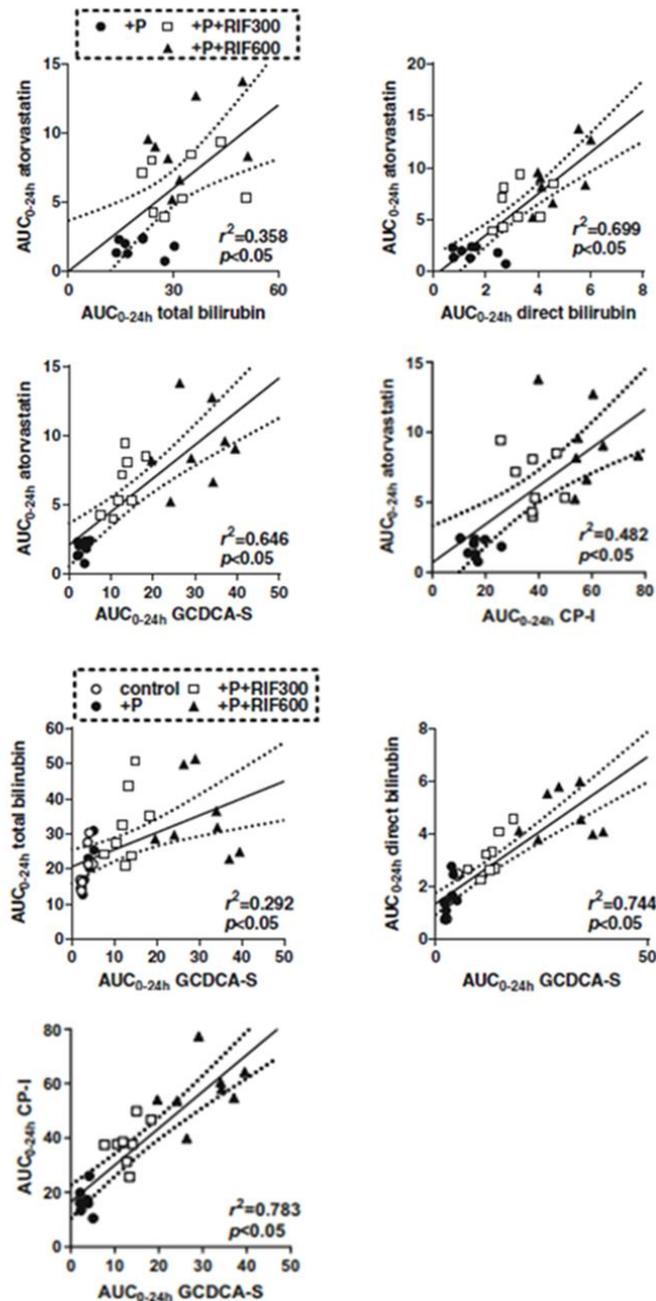


図 24. atrovastatin および OATP1B 内因性マーカーの AUC に関する相関

(上段) プローブ投与群以降の各群の各個体における atrovastatin の AUC に対する内因性基質の AUC をプロットしたものを示す。(下段) 各群の各個体における GCDCA-S の AUC に対するその内因性基質の AUC をプロットしたものを示す。(非投与群; ○, プローブ薬投与群; ●, rifampicin 300 mg; □, rifampicin 600 mg; ▲) 実線は回帰直線を示し、破線は 95%信頼区間を示す。 r^2 は決定係数を示す。

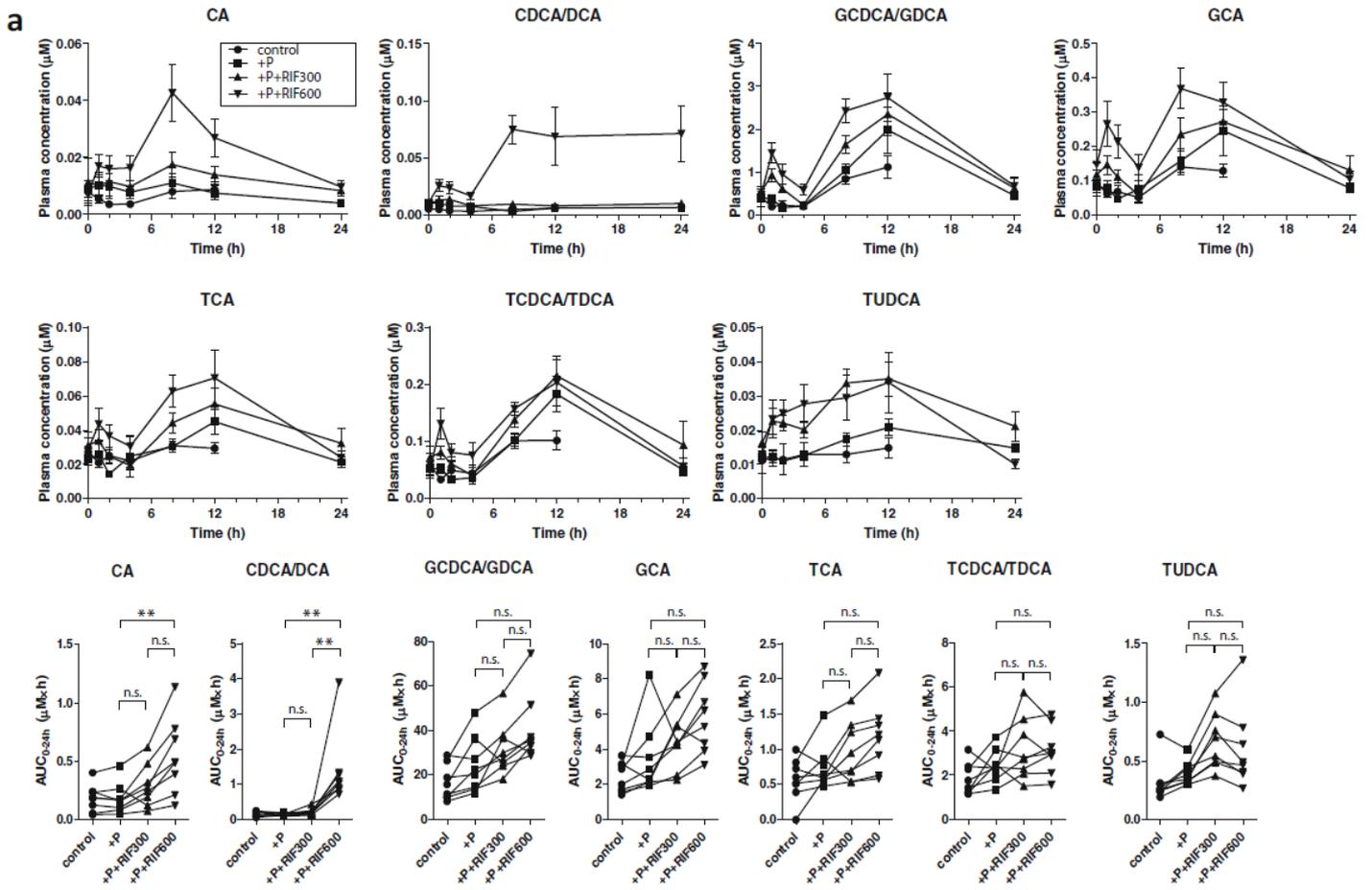


図 25. 胆汁酸の血漿中濃度推移に対する rifampicin の影響

各群の胆汁酸の血漿中濃度推移（非投与群；●，プローブ薬投与群；■，rifampicin 300 mg；▲，rifampicin 600 mg；▼）および台形法により算出した各個体の AUC を示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す(n=8)。**； $P < 0.01$ ，n.s.；not significant

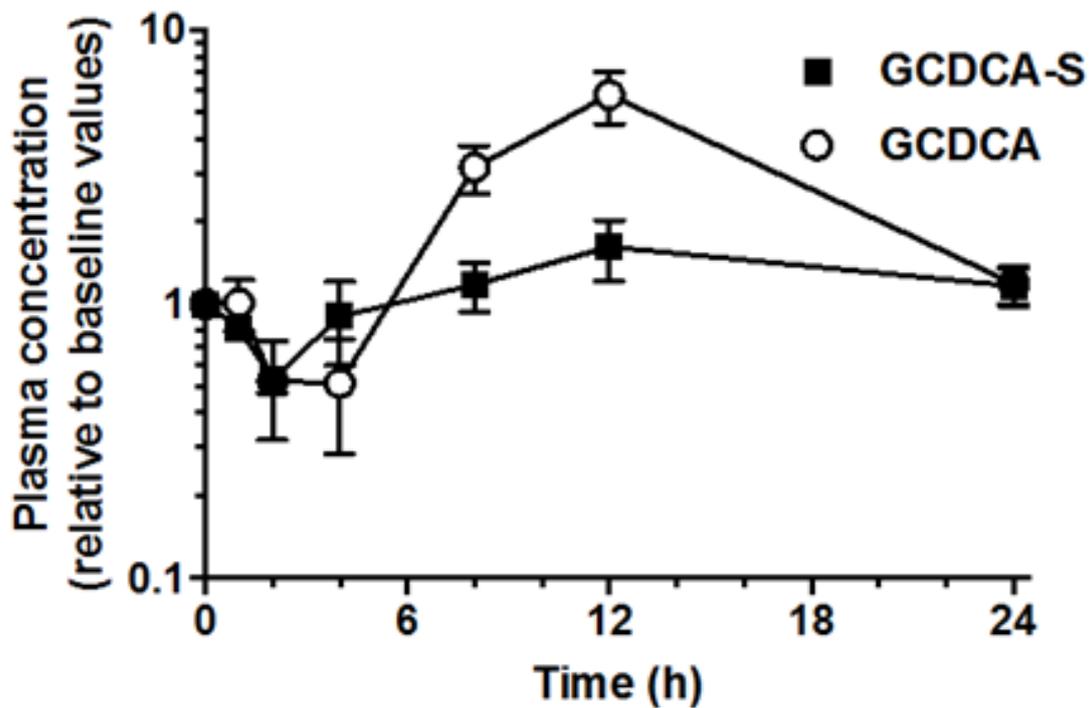


図 26. 健常人における GCDCA および GCDCA-S の血漿中濃度の日内変動

非投与群の GCDCA および GCDCA-S の血中濃度に関して、それぞれの 0 時間時点の血漿中濃度を除して補正しプロットしたものを示す。エラーバーはデータの標準誤差を示す (n=8)。

結論および今後の展望

第一章では、強制発現細胞および凍結ヒト肝細胞を用い胆汁酸抱合体である GCDCA-S および CDCA-24G が OATP1B の新規内因性基質である事を示した。次に OATP1B の典型的阻害剤 rifampicin を投与した臨床サンプルによる検討により、GCDCA-S が定量的に臨床 DDI リスク評価可能な OATP1B の代替プローブである可能性を示した。また医薬品開発においてヒト動態予測に利用されるカニクイザルおよびヒト肝移植マウスを用いて、GCDCA-S および CP について DDI バイオマーカーとしての妥当性を示すとともに、非臨床における *in vivo* DDI リスク評価としても利用可能である事を示した。胆汁分流通モデルを作成し腸肝循環への影響について検討をしたところ、GCDCA-S は胆汁酸とともに腸肝循環を受け、長期の観察においては AUCR の値に影響を与える可能性がある一方、CP に関しては少なくとも阻害剤の単回投与の観察においては腸肝循環による AUCR への影響はほとんどないと考えられた。

また第二章では、定量的 DDI リスク評価の確立に向け、OATP1B 阻害の程度に対する内因性基質とプローブ薬の AUC の相関を得ることを目的に、2 用量の rifampicin を用いた前向き臨床試験を実施した。その結果、direct bilirubin、CP-I、および GCDCA-S は rifampicin 用量依存的な有意な血漿中濃度の増加を示し、GCDCA-S と direct bilirubin および CP-I との間には良好な相関が認められた。また rifampicin の用量反応性が見られたプローブ薬 atorvastatin との間にも相関が示され、これらが OATP1B 介在性 DDI リスク評価における内因性基質の DDI バイオマーカーとして利用可能であることを示す結果となった。

本研究を通じ、内因性基質を用いたヒト動態を想定した前臨床モデルにおける DDI リスク評価、および臨床試験早期から可能な DDI リスク評価を新たに確立するに至った。前臨床段階において化合物動態プロファイルを加味した *in vivo* リスク判定により、臨床 DDI 試験デザイン の策定などヒトにおける薬物相互作用に関する検討の前段階としての活用が期待される。臨床試験においては、用量漸増試験など新薬の臨床開発早期から DDI リスク評価を行うことで、より

定量的かつ信頼度の高い考察に基づいて、臨床 DDI 試験の可否判断や適切な試験設計に活かすことが出来る。また、プローブ薬を不要とするため試験全般にわたり観察が可能であり、このことは反復投与時の長期的な評価や患者における DDI のインパクトに関する情報など、実臨床におけるリスクの把握にも活かされる (図 27)。

OATP1B の DDI バイオマーカーとして望まれる特徴として、阻害剤および SNPs に対する影響に関してプローブ薬との良好な相関性を示すことは当然のこと、分析に際して感度や機器スペックの要求が低いことや全身クリアランスに対して他のトランスポーターおよび代謝酵素の関与が無く OATP1B の寄与が大きいこと、個体間差や個体内差が軽微であることなどが挙げられる。加えて、臨床試験で観察することを考慮した場合には毒性マーカーや疾患マーカーなど生理活性物質や生理学的変化を示唆するものでないことも要件となる。本研究により、GCDCA-S がプローブ薬と良好な相関を示すことその他、全身クリアランスおよび肝取り込みに対する OATP1B の寄与が大きいこと、LC-MS/MS の測定において十分な感度であることが明らかとなり、有望なマーカーである事を裏付けた。GCDCA-S をはじめとする胆汁酸抱合体に限らず、OATP1B の DDI バイオマーカー候補とされる内因性基質が報告されており、本研究や既報の情報よりそれぞれに特徴を持つことが伺える (表 11)。SNPs との関連性や内因性基質間の検討など、更なる DDI バイオマーカーに関する検討は継続して進められているが⁷²⁻⁷⁴、DDI リスク評価の対象となる開発候補品は多種多様であり、OATP1B 阻害に限らずその他の代謝酵素やトランスポーターへ影響を及ぼす可能性は常に存在する。これら内因性基質の多くは LC-MS/MS のような汎用される分析法で試料のロスが無く薬物濃度と同時に測定できるため、内因性基質の特徴や臨床試験におけるアウトプットを考慮した上で、可能な限り複数の DDI バイオマーカーを測定することが OATP1B の DDI リスク評価を正しく捉える上で望ましいと考える。

近年、医薬品開発の取り巻く環境として、がんや希少疾患を対象とする薬剤のように副作用などの観点から健常人での臨床試験が制限される場合や低分子に限らない医薬品の多様化によりガイドランスの対象外となるケースが見られる。また、先駆け審査など臨床試験期間の短縮や早期

承認による開発意思決定の加速化も顕著である。またこのような背景から、数理モデル等を活用した開発を志向する model-based drug development (MBDD) についても注目を浴びている。本研究を通じ提案するに至った、内因性基質によるトップダウン型 DDI リスク評価は製薬企業内において、R 値に依存しない意思決定や臨床戦略の早期策定に寄与できると考えられる。さらには、DDI バイオマーカーに関するナレッジの蓄積や医薬品開発における MBDD の推進に伴い、内因性基質動態を組み込んだ PBPK モデルによるボトムアップ型 DDI リスク評価も進展すると思われる^{75,76}。このようなトップダウン型およびボトムアップ型の DDI リスク評価の普及とともに、DDI バイオマーカーに関するデータが当局における判断材料として活用され、将来的にガイドラインへ組み込まれることにも期待したい。

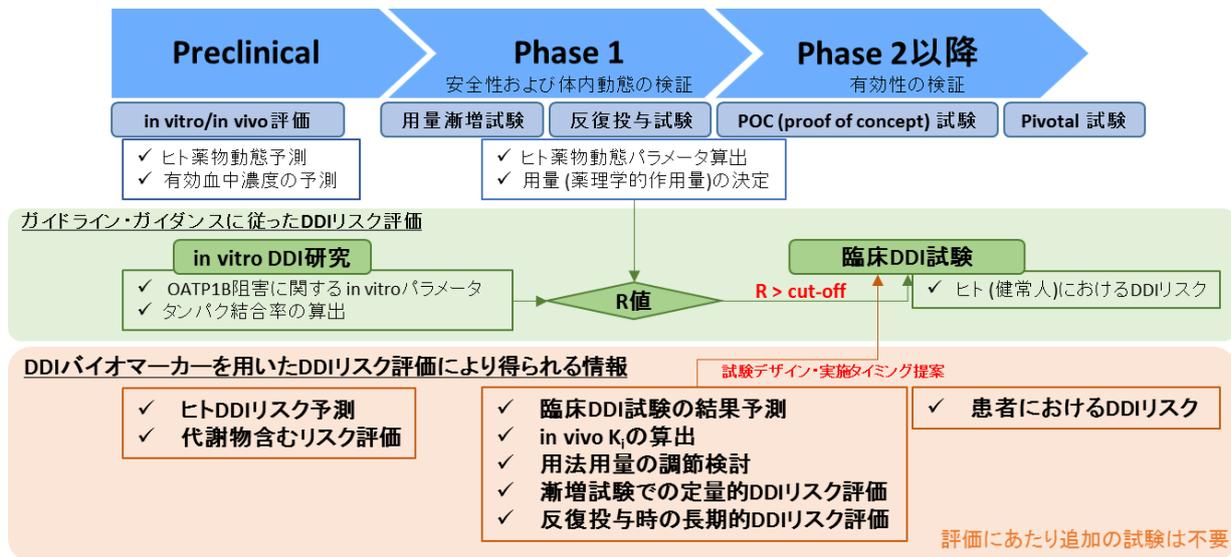


図 27. 医薬品開発フローにおける OATP1B 内因性基質を用いた薬物相互作用リスク評価

表 11. OATP1B DDI バイオマーカー候補

| バイオマーカー | エビデンスレベル | 特徴 | 参考 |
|-----------------------|--|---|---------------------------------|
| GCDCA-S (胆汁酸硫酸抱合体) | 臨床研究 非臨床動物 (サル、ヒト肝キメラマウス) in vitro | atorvastatin AUC と相関を示す 分析が容易 観察される AUCR が大きい 比較的個体間および個体内変動が小さい OATP1B 以外にも、OAT3 および NTCP 基質 腸肝循環を受ける | 50,60, 62,72,74, 77 |
| CP-I、CP-III | 臨床研究 非臨床動物 (サル、ノックアウトマウス) in vitro | atorvastatin AUC と相関を示す 高感度分析が求められる (試料必要量が多い) 個体間および個体内変動が小さい OATP1B 以外にも、MRP2 (CP-I のみ) および MRP3 (CP-I/CP-III) の基質 | 21-25,60, 72-74 |
| bilirubin | 臨床研究 非臨床動物 (サル、ノックアウトマウス) | direct bilirubin のみ atorvastatin AUC と相関を示す 個体間および個体内変動が小さい 肝機能マーカーとしての利用 | 17,18,22, 60,72,74 |
| TDA、HDA | 臨床研究 in vitro | 分析が容易 OATP1B 以外にも、OAT1 および OAT3 基質 | 19,25,72- 74 |
| 胆汁酸 | 臨床研究 非臨床動物 (サル) | 分析が容易 食事による大きな日内変動 個体間および個体内変動が大きい OATP1B 阻害非依存的な変動要因が多いと考えられる 肝機能マーカーとしての利用 | 17,18,25, 60,62,72, 74,77 |
| DHEAS | 非臨床動物 (サル) in vitro | 臨床、キメラマウスにおいては変動が見られない分子種も存在する ヒトにおいて変動が確認されなかった | 20,25,77 |

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、ならびに理化学研究所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分子薬物動態学教室 准教授 前田 和哉 先生、ならびに横浜薬科大学薬学部臨床薬学科臨床薬理学研究室 講師 吉門 崇 先生に深謝いたします。

臨床サンプルの提供に際し御尽力いただきました、医療法人社団慶幸会ピーワンクリニック 院長 降旗 謙一 先生、ならびにスタッフの皆様に深謝いたします。

そして、本研究に御協力いただきました被験者の皆様に謹んで感謝の意を表します。

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第一三共株式会社薬物動態研究所 前所長 安東 治 博士、ならびに現所長 渡邊 伸明 博士に深謝いたします。また、動物モデルの作成および研究に共に携わっていただきました、第一三共株式会社 鈴木 則男 様、村田 信次 様、ならびに山中 亮 様に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究の遂行にあたり、ご尽力いただきました分子薬物動態学教室の皆様、理化学研究所杉山特別研究室の皆様、第一三共株式会社薬物動態研究所ならびにバイオマーカー推進部の皆様に厚く御礼を申し上げます。

令和 2 年 9 月

竹原 一成

実験方法

第一章 OATP1B 内因性基質の同定と臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性評価

第一節 臨床 DDI バイオマーカーとなりうる OATP1B 内因性基質の新規同定

試薬

GCDCA-S disodium salt、CDCA-24G、sodium TCA-d5 は Toronto Research Chemicals (North York, Canada) より購入した。sodium TCA および rifampicin は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。pioglitazone hydrochloride は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。[3H]atorvastatin (10 Ci/mmol) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO) より購入した。その他、用いた試薬は全て市販の特級品、もしくは分析用のものを購入し使用した。

細胞培養および *in vitro* 強制発現系による輸送・阻害試験

ジェノメンブレン (Kanagawa, Japan) より購入した hOATP1B1、hOATP1B3、hNTCP 又はコントロールベクターをそれぞれ一過性に発現させた HEK293 細胞 (TRANS/PORT Cells®) を用いた。試験に先立ち Poly-L-lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で前処理した 24 well 組織培養プレートに細胞を播種し、低グルコース (1 g/L) D-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて 5% CO₂ 下 37°C で培養を行った。播種から約 4 時間後に 5 mM sodium butyrate (富士フィルム和光純薬) を含む培地に交換後、およそ 24 時間試験開始まで維持した。37°C での 3 分間のプレインキュベーション後、試験化合物 GCDCA-S (1 μM) および CDCA-24G (0.3 μM) を含む Krebs-Henseleit 緩衝液 (118 mM NaCl、23.1 mM NaHCO₃、4.83 mM KCl、0.96 mM KH₂PO₄、1.20 mM MgSO₄、12.5 mM HEPES、5.0 mM glucose、および 1.53 mM CaCl₂; pH 7.4) を添加した。

処理後 LC-MS/MS を用いた分析の際には、細胞より内部標準を含む水:アセトニトリル溶液 (1:2) を用いてプレートより抽出しフィルターでろ過後、上清を 96 ウェルプレートに移して LC-MS/MS 分析を行った。液体シンチレーションカウンターを用いた分析の場合、0.2 N NaOH を用いてプレート上の細胞を溶解し、2 N HCl を用いて中和後試料をシンチレーションカクテルに移し、放射活性をシンチレーションカウンター (2300TR, PerkinElmer) で測定した。

ヒト凍結保存肝細胞を用いた輸送試験

本試験に用いた凍結ヒト肝細胞 (Lot Hu8075) は Cellz Direct (Durham, NC) から購入した。37°C、3 分間のプレインキュベーション後、試験化合物: [3H]atorvastatin (50 nM、OATP1B probe)、TCA (1 μM、NTCP probe)、GCDCA-S (1 μM)、および CDCA-24G (0.3 μM) を添加し取り込みを開始した。それぞれ 0.5、1.0、1.5 分間のインキュベーション後、シリコンオイルとミネラルオイル (Sigma-Aldrich) を混合し密度 1.015 に調整した油層を用いて、遠心操作により肝実質細胞を分離することで反応を終了した。細胞溶解のため [3H]atorvastatin の測定にあたり、50 μL の 2 N NaOH を油層の下に加え溶解した細胞を含む画分を回収し、50 μL の 2 N HCl で中和処理後、そこに含まれる放射活性を測定した。TCA、GCDCA-S、CDCA-24G の定量には、油層下に 2.5 M CH₃COONH₄ を添加し、その細胞画分を採取し LC-MS/MS 解析を行った。

内因性化合物の LC-MS/MS 分析

サンプル中の GCDCA-S、CDCA-24G および TCA の分析には TCA-d₅ を内部標準として用いた。細胞内部標準を含む水:アセトニトリル溶液 (1:2) を用いてプレートより抽出し Captiva® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) でろ過後、96 ウェルプレートに移して分析を行った。LC-MS/MS 分析には以下の機器を用いて行った。

LC システム: Prominence LC system (島津製作所, Kyoto, Japan)

Mass Spectrometry: SCIEX QTRAP5500 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada)

カラム: CAPCELL PAK C18 MGII column (2 mm i.d. × 50 mm, Shiseido CO., Ltd. Tokyo, Japan)、40°C

移動相: (A) 5 mM ammonium acetate (water)

(B) methanol

流速: 0.4 mL/min

グラジエント: (B) 10% (0-0.5 min)、10-90% (0.5-2.0 min)、90% (2.0-4.5 min)

検出モード: negative multiple reaction monitoring (MRM)

| Compound | Q1 [Da] | Q3 [Da] | DP [V] | CE [V] | CXP [V] |
|----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| CDCA-24G | 567.3 | 112.9 | -90 | -42 | -5 |
| GCDCA-S | 263.6 | 74.1 | -95 | -24 | -9 |
| TCA | 514.2 | 79.8 | -10 | -124 | -35 |
| TCA-d5 | 519.2 | 79.8 | -10 | -124 | -35 |

ピーク積分およびデータ処理は全て SCIEX Analyst 1.6.1 (Applied Biosystems/MDS SCIEX) を用いて行った。

第二節 各種 OATP1B 内因性基質候補の臨床 DDI バイオマーカーとしての妥当性検証

・臨床試験サンプルを用いた妥当性検証

試薬

GCDCA-S disodium salt、CDCA-24G、sodium TCA-d5、C4-d7 は Toronto Research Chemicals より購入した。CA、DCA、LCA、sodium TCA および rifampicin は富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。sodium GLCA、sodium TCDCA および sodium TUDCA は EMD Biosciences (San Diego, CA) より購入した。GCA および sodium GDCA は Steraloids (Newport, RI) より購入した。CDCA および DHEAS は Sigma-Aldrich より購入した。UDCA は東京化成工業株式会社より購入した。TDCA は MP Biomedicals (Solon, OH)、C4 は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) よりそれぞれ購入した。その他、用いた試薬は全て市販の特級品、もしくは分析用のものを購入し使用した。

臨床試験デザイン

本試験で用いた検体を得た臨床試験について概要を以下に示す。

試験名: OATPs、CYP3A4 両方の基質薬物のクリアランスに占める OATPs、CYP3A4 の定量的な寄与を決定するための準薬効用量カクテル投与による相互作用試験

対象薬物: カクテルプローブ薬として、bosentan (0.6 mg)、repaglinide (0.05 mg)、clarithromycin (1 mg)、darunavir (1 mg)、simeprevir (1 mg)、midazolam (0.07 mg)、阻害剤として、rifampicin (600 mg p.o.) と itraconazole (200 mg i.v.) を用いた。

試験概略: 以下の3相にわたる同一被験者によるクロスオーバー試験を実施。各相の間に休薬期間を1週間設けた。

1相 カクテルプローブ薬のみ

2相 カクテルプローブ薬および rifampicin 600 mg

3相 カクテルプロローブ薬および itraconazole 200 mg

研究プロトコールは理化学研究所、東京大学大学院薬学系研究科、ピーワンクリニックの倫理審査委員会の承認を受けた。参加者全員より書面によるインフォームドコンセントを得た。本試験は大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) に登録され公開されている (UMIN000024790)。竹原は、東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室の受託研究生として、本臨床研究に参加した

内因性化合物の LC-MS/MS 分析

サンプル中の内因性基質の分析には negative ion mode では TCA-d5 を、positive ion mode では C4-d7 を内部標準として用いた。内部標準を含む水:アセトニトリル溶液 (1:2) を用いて抽出し Captiva® (Agilent Technologies) でろ過後、96 ウェルプレートに移して分析を行った。LC-MS/MS 分析には以下の機器を用いて行った。

LC システム: Prominence LC system (島津製作所, Kyoto, Japan)

Mass Spectrometry: SCIEX QTRAP5500 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada)

カラム: CAPCELL PAK C18 MGII column (2 mm i.d. × 50 mm, Shiseido CO., Ltd. Tokyo, Japan)、40°C

移動相: (A) 5 mM ammonium acetate (water)

(B) methanol

流速: 0.4 mL/min

グラジエント: (B) 10% (0-0.5 min)、10-90% (0.5-2.0 min)、90% (2.0-4.5 min)

検出モード: MRM (positive/negative)

| Compound | Ion mode | Q1 [Da] | Q3 [Da] | DP [V] | CE [V] | CXP [V] |
|-------------|----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| CA | Negative | 407.2 | 343.2 | -185 | -48 | -27 |
| CDCA | Negative | 391.2 | 391.2 | -185 | -46 | -55 |
| CDCA-24G | Negative | 567.3 | 112.9 | -90 | -42 | -5 |
| GCA | Negative | 464.2 | 73.8 | -65 | -92 | -29 |
| GCDCA/ GDCA | Negative | 448.2 | 73.9 | -170 | -90 | -9 |
| GCDCA-S | Negative | 263.6 | 74.1 | -95 | -24 | -9 |
| GLCA | Negative | 432.3 | 73.8 | -135 | -84 | -9 |
| TCA | Negative | 514.2 | 79.8 | -10 | -124 | -35 |
| TCDC/ TDCA | Negative | 498.2 | 80.0 | -20 | -124 | -35 |
| TUDCA | Negative | 498.2 | 79.8 | -100 | -126 | -9 |
| DHEAS | Negative | 367.0 | 97.0 | -60 | -30 | -11 |
| C4 | Positive | 401.3 | 383.2 | 101 | 23 | 11 |
| TCA-d5 | Negative | 519.2 | 79.8 | -10 | -124 | -35 |
| C4-d7 | Positive | 408.3 | 390.3 | 106 | 25 | 11 |

ピーク積分およびデータ処理は全て SCIEX Analyst 1.6.1 (Applied Biosystems/MDS SCIEX) を用いて行った。

なお、ステロイド類の分析については、AbsoluteIDQ Stero17 Kit (Biocrates, Innsbruck, Austria) を用い、プロトコールに従い定量分析を行った。

・非臨床動物モデルを用いた妥当性検証

試薬

GCDCA-S disodium salt、LCA-S trimethylamine salt、GLCA-S disodium salt、sodium TCA-d5、sodium TCDC、sodium GCDCA、GCA、sodium GDCA および CP-I-¹⁵N₄ sodium bisulfate salt は Toronto Research Chemicals より購入した。CA、sodium GLCA、pitavastatin calcium および rifampicin は富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。CDCA、sodium TCA、

sodium TDCA、TLCA-S disodium salt および CP-I は Sigma-Aldrich より購入した。UDCA および TUDCA dihydrate は東京化成工業株式会社より購入した。CP-III は Santa Cruz Biotechnology より購入した。その他、用いた試薬は全て市販の特級品、もしくは分析用のものを購入し使用した。

実験動物

動物実験はすべて、第一三共株式会社内の動物実験委員会の承認を受け、ガイドラインに準拠して実施した。本試験で使用したサルは株式会社新日本科学 (Tokyo, Japan) より雄性カニクイザル (体重:4.2~7.3 kg、年齢: 4~6 歳) を得た。ヒト化マウスを用いた試験では、ヒト肝臓を有するキメラマウス (PXB マウス) を株式会社フェニックスバイオ (Hiroshima, Japan) から購入した。試験には、すべて同じドナー由来の肝実質細胞を移植した 16-19 週齢、体重 18.9-22.1g のマウスを用いた。キメラマウス肝臓のヒト肝細胞の置換率は、血液中のヒト-トマスアルブミン比により計算して、82.2-91.0%であった。

胆汁分流通モデルサル (BDC サル) 作成方法

術前処置として、ドミトール (日本全薬工業; 0.08 mg/kg)、アトロピン (田辺三菱製薬; 0.03 mg/kg) を投与し、ケタラール (第一三共株式会社; 10 mg/kg) で麻酔導入した。気管挿管 (気管チューブ: 3-5Fr サイズ) を行いイソフルラン (ファイザー; <3.5% 吸入) で維持麻酔を行った。その後、メタカム (ベーリンガーインゲルハイム; 0.2 mg/kg)、バイトリル (バイエル薬品; 5 mg/kg)、レペタン (大塚製薬; 0.01 mg/kg)、プリンペラン (アステラス製薬; 0.35 mg/kg) を投与した。術中は、呼吸管理、輸液管理および体温管理を行い、局所麻酔として切開部にマーカイン注 (<2 mg/kg) の浸潤投与を行った。上腹部の正中線に沿って切開し、大網の全摘出を行った後、肝側と十二指腸側の総胆管の端を切開してカテーテルの挿入口を作製した。T 字型サンプリングカテーテル (プライムテック株式会社) の各端部を切開部から挿入し固定した。胆嚢管と胆

囊動脈を剥離し、肝管側と胆嚢側の 2 箇所を結紮してその中央を切断した。次にポートを埋め込む背部を切開した。背中の中切開部から T 字型カテーテルを腹腔内側から外へ取り出し、カテーテルの先端にポート（プライムテック）を接続した。ポートは切開部から皮下に埋め込み固定後、背中と腹部の切開部を縫合し、ジャケット（バイオリサーチセンター株式会社）を装着し、アンチセダン（日本全薬工業; 0.48 mg/kg）を投与した。術後当日、翌日および翌々日にメタカム、バイトリル、レペタンによる疼痛管理、感染防止対応を行った。

胆汁分流通モデル PXB マウス (GBC マウス) 作成方法

処置中、PXB マウスはイソフルラン吸入により麻酔導入および維持をした。体温管理を行った。開腹し、総胆管結紮後、切開した胆嚢壁側部にポリエチレンカテーテルを挿入し、さらに結紮して胆嚢に固定した。カテーテルのもう一方の端を背部から引き出し、サンプリングチューブに接続した。胆汁が回収できることを確認後、腹部を縫合し、麻酔を中断した。試験中は温度制御フード (37°C) に入れ体温管理を行った。

カニクイザル試験デザイン

BDC 非処置サル 3 例、BDC サル 2 例それぞれの検討において、同一個体を用いたクロスオーバー試験を行った。それぞれの投与の間には 2 週間のウォッシュアウト期間を設けた。試験前日において 1 晩絶食を行い、試験開始後 6 時間のサンプリング後に復食した。飲水に関しては制限を行わなかった。BDC 非処置サルにおいて、rifampicin 0 (コントロール) および 18 mg/kg に調製した 0.5% (w/v) メチルセルロース懸濁液を 5 mL/kg 経口投与した。血液は投与前および投与後 0.25、0.5、1、2、4、6、8 および 24 時間に大腿静脈より EDTA 採血管を用いて採取した。採取後は氷上に静置後、遠心処理 (15,000 rpm, 2 min, 4°C) を行い、血漿を得た。尿サンプルにおいては代謝ケージを用いて投与前および投与後 0-8 時間、8-24 時間で氷上にて回収した。BDC サルにおいて、rifampicin 0 (コントロール) および 18 mg/kg に調製した

pitavastatin (0.1 mg/kg) を含む、0.5% (w/v) メチルセルロース懸濁液を 5 mL/kg 経口投与した。投与後 2 時間後、生理食塩水に溶解させた TCA-d5 を 0.3 mg/kg (1 mL/kg) を経静脈投与した。血液は投与前および投与後 0.25、0.5、1、2、2.25、2.5、3、4、6、8 および 24 時間に大腿静脈より EDTA 採血管を用いて採取し、血漿を得た。尿サンプルにおいては投与前および投与後 0-2 時間、2-8 時間、8-24 時間で氷上にて回収した。胆汁採取は投与前および投与後 0-2 時間、2-8 時間、8-24 時間で回収した。採取の際は、モンキーチェアに保定した。収集バルブ用ヒューバ N セット (プライムテック) を穿刺し、チューブ内が胆汁で満たされたことを確認後穿刺部位が外れないようテープで固定し、チューブの先端をダイボールリリアパック (株式会社メディコン) に接続し胆汁の吸引を行い、氷上にて回収を行った。

PXB マウス試験デザイン

GBC 非処置の PXB マウス (n=3) において、同一個体を用いた計 3 相のクロスオーバー試験を行った。ベースライン群 (第 1 相) として 0.5% (w/v) メチルセルロース液を投与し、投与前および投与後 1、2、4、6、8 および 24 時間に静脈より EDTA 採血管を用いて血液を採取し、血漿を得た。その翌日にプローブ薬単独投与群 (第 2 相) として、pitavastatin (0.1 mg/kg) を投与した。1 週間のウォッシュアウト期間を設けた後、第 3 相として pitavastatin (0.1 mg/kg) および rifampicin (60 mg/kg) を投与した。薬物投与時においては、投与前および投与後 0、0.5、1、2、4、6、8 および 24 時間に静脈より EDTA 採血管を用いて血漿を得た。GBC マウスにおける検討では 8 例のマウスを用いた。コントロール群 (n=4) として 0.5% (w/v) メチルセルロース液を投与し、また rifampicin 投与群 (n=4) として rifampicin (60 mg/kg) に調製した懸濁液を投与した。投与後すぐに、胆嚢カニューレションを施した。血液は投与前および投与後 1、2、4、6 時間に EDTA 採血管を用いて採取した。コントロール群 2 例、rifampicin 投与群 3 例が試験途中で状態悪化したため、安楽死処置を行った。結果として 4 時間までデータが得られた両群それぞれ 2 例について解析を行うこととした (コントロール群を P-201、P-202、rifampicin

投与群を P-203、P-204)。なお、双方の試験とも胆汁酸の食事による変動を回避するため投与 2 時間前に絶食を行った。

pitavastatin および rifampicin の LC-MS/MS 分析

分析には 20 nM niflumic acid を内部標準として用いた。内部標準を含む水:アセトニトリル溶液 (1:2) を用いて抽出し Captiva® (Agilent Technologies) でろ過後、96 ウェルプレートに移して分析を行った。LC-MS/MS 分析には以下の機器を用いて行った。

LC システム: ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA)

Mass Spectrometry: API4000 system (Applied Biosystems/MDS SCIEX)

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1mm × 50 mm) (Waters) 、 50°C

移動相: (A) 5 mM ammonium acetate (0.2% formic acid および 5% acetonitrile)

(B) 5 mM ammonium acetate (0.2% formic acid および 95% acetonitrile)

流速: 0.8 mL/min

グラジエント: (B) 5-50% (0-0.2 min)、50-95% (0.2-0.6 min)、95% (0.6-0.9 min)

検出モード: MRM (positive)

| Compound | Q1 [Da] | Q3 [Da] | DP [V] | CE [V] | CXP [V] |
|---------------|---------|---------|--------|--------|---------|
| pitavastatin | 422.1 | 318.2 | 40 | 45 | 14 |
| rifampicin | 821.3 | 789.1 | 96 | 25 | 14 |
| niflumic acid | 283.2 | 265.1 | 80 | 52 | 14 |

ピーク積分およびデータ処理は全て SCIEX Analyst 1.6.1 (Applied Biosystems/MDS SCIEX) を用いて行った。

内因性化合物の LC-MS/MS 分析

サンプル中の胆汁酸の分析には TCA-d5 を用いて前述と同様に分析を行った。CPs の分析は 50nM CP-I-¹⁵N₄ を内部標準として用いた。内部標準を含む 12 M formic acid:ethyl acetate (1:10) を用いて抽出し、遠心後上清 100 μ L を回収した。0.1% formic acid を含む 50 μ L の 50% acetonitrile を添加し分析を行った。LC-MS/MS 分析には以下の機器を用いて行った。

LC システム: Nexera UHPLC system (島津製作所)

Mass Spectrometry: LCMS-8050 mass spectrometer (島津製作所)

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1mm \times 100 mm) (Waters)、60°C

移動相: (A) 0.1% formic acid (water)

(B) acetonitrile

流速: 0.6 mL/min

グラジエント: (B) 20% (0-0.5 min)、20-50% (6.0-6.5 min)、50-98% (6.5-7.0 min)、98% (7.0-7.5 min)

検出モード: MRM (positive/negative)

| Compound | Ion mode | Q1 [Da] | Q3 [Da] | DP [V] | CE [V] | CXP [V] |
|------------------------------------|----------|---------|---------|--------|--------|---------|
| GLCA-S | Negative | 512.2 | 432.2 | -120 | -44 | -13 |
| LCA-S | Negative | 455.2 | 96.8 | -120 | -90 | -8 |
| TLCA-S | Negative | 455.2 | 96.8 | -120 | -90 | -8 |
| CP-I | Positive | 655.0 | 596.4 | -32 | -48 | -28 |
| CP-III | Positive | 655.0 | 596.4 | -32 | -48 | -28 |
| CP-I- ¹⁵ N ₄ | Positive | 659.4 | 600.3 | -40 | -47 | -28 |

第二章 OATP1B 内因性基質の臨床 DDI バイオマーカーとしての実用に向けた検討

試薬

atorvastatin-d5 sodium、pitavastatin-d5 sodium、rosuvastatin-d6 sodium、rifampicin-d3、CP-I-¹⁵N₄ sodium bisulfate salt、GCDCA-S disodium salt、CDCA-24G、sodium TCA-d5 は Toronto Research Chemicals より購入した。CA、DCA、LCA、sodium TCA、rifampicin、atorvastatin calcium hydrate、fluvastatin sodium、pitavastatin calcium、rosuvastatin calcium は富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。sodium GLCA、sodium TCDCA および sodium TUDCA は EMD Biosciences より購入した。GCA および sodium GDCA は Steraloids より購入した。CDCA および CP-I は Sigma-Aldrich より購入した。UDCA、TDCA はそれぞれ東京化成工業株式会社、MP Biomedicals より購入した。その他、用いた試薬は全て市販の特級品、もしくは分析用のものを購入し使用した。

臨床試験デザイン

本試験で用いた検体を得た臨床試験について概要を以下に示す。

試験名: 内在性基質を用いた OATP を介した薬物間相互作用評価に関する研究

対象薬物: カクテルプローブ薬として、rosuvastatin (0.5 mg)、fluvastatin (2 mg)、pitavastatin (0.2 mg)、atorvastatin (1 mg)、阻害剤として、rifampicin 300 mg および 600 mg を用いた。

試験概略: 以下の 4 相にわたる同一被験者によるクロスオーバー試験を実施。薬物投与後は休薬期間をそれぞれ 1 週間設けた。また、絶食状態で開始し、投与後 4 時間および 10 時間に食事を提供した。

1 相 プラセボ (lactate)

2 相 カクテルプローブ薬のみ

3 相 カクテルプローブ薬および rifampicin 300 mg

4相 カクテルプロローブ薬および rifampicin 600 mg

血液採取: 投与前および投与後 0.5、1、2、4、8、10、12、24 時間に採取。ヘパリンチューブを用いて各時点 11 mL を得た。遠心処理後、スタチンの測定のため血漿に対して半量の 100 mM acetate buffer を加えた後、分析まで-80°C下で保存した。

研究プロトコールは理化学研究所、東京大学大学院薬学系研究科、ピーワンクリニックの倫理審査委員会の承認を受けた。参加者全員より書面によるインフォームドコンセントを得た。本試験は大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) に登録され公開されている (UMIN000028684)。竹原は、東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室の受託研究生として、本臨床研究に参加した。

薬物の LC-MS/MS 分析

サンプル中のスタチンの分析には atorvastatin-d5 (0.4 nM)、pitavastatin-d5 (0.4 nM)、rosuvastatin-d6 (0.4 nM) および chlorpropamide (10 nM) を内部標準として用いた。内部標準を含む acetonitrile を用いて抽出し、遠心後上清を SpeedVac Concentrator System (Thermo Fisher Scientific) を用いて遠心濃縮を行い、0.1% formic acid を含む 50% acetonitrile で再溶解し分析を行った。rifampicin の分析は rifampicin-d3 (10 nM) を内部標準として用いた。血漿 40 μ L に水 160 μ L を加え希釈し、0.8 mL の内部標準を含む acetonitrile を添加後、遠心上清を分析に供した。LC-MS/MS 分析には以下の機器を用いて行った。

LC システム: Nexera UHPLC system (島津製作所)

Mass Spectrometry: LCMS-8050 mass spectrometer (島津製作所)

カラム: Kinetex C18 column (2.6 μ m, 3 mm i.d. \times 100 mm) (Phenomenex, Torrance, CA)、
40°C

移動相: (A) 0.1% formic acid (water)

(B) 0.1% formic acid (acetonitrile)

流速: 0.3 mL/min

グラジエント: [スタチン] (B) 5% (0-0.5 min)、5-75% (0.5-7.5 min)、75-95% (7.5-7.6 min)、95% (7.6-8.5 min); [rifampicin] (B) 20% (0-0.5 min)、20-90% (0.5-3.5 min)、90% (3.5-6.5 min)

検出モード: MRM (positive/negative)

| Compound | Ion mode | Q1 [Da] | Q3 [Da] | Q1 Pre-bias [V] | CE [V] | Q3 Pre-bias [V] |
|-----------------|----------|---------|---------|-----------------|--------|-----------------|
| atorvastatin | Positive | 559.0 | 440.2 | -20 | -22 | -22 |
| pitavastatin | Positive | 422.0 | 290.2 | -11 | -27 | -20 |
| rosuvastatin | Positive | 482.0 | 258.1 | -17 | -35 | -28 |
| fluvastatin | Negative | 410.3 | 348.4 | 28 | 15 | 25 |
| atorvastatin-d5 | Positive | 564.0 | 445.2 | -20 | -23 | -22 |
| pitavastatin-d5 | Positive | 427.0 | 295.2 | -20 | -29 | -20 |
| rosuvastatin-d6 | Positive | 488.0 | 264.2 | -17 | -34 | -29 |
| chlorpropamide | Negative | 275.4 | 190.2 | 19 | 14 | 21 |
| rifampicin | Positive | 823.4 | 791.3 | -22 | -19 | -40 |
| rifampicin-d3 | Positive | 826.4 | 794.3 | -22 | -20 | -40 |

ピーク積分およびデータ処理は全て SCIEX Analyst 1.6.1 (Applied Biosystems/MDS SCIEX) を用いて行った。

内因性化合物の LC-MS/MS 分析

サンプル中の胆汁酸の分析には TCA-d5 を用いて前述と同様に分析を行った。CPs の分析は CP-I-¹⁵N₄ を内部標準として分析を行った。分析には以下の機器を用いて行った。

LC システム: Prominence LC system (島津製作所)

Mass Spectrometry: SCIEX QTRAP5500 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1mm × 100 mm) (Waters)、60°C

移動相: (A) 0.1% formic acid (water)

(B) 0.1% formic acid (acetonitrile)

流速: 0.4 mL/min

グラジエント: (B) 20-50% (0-7.0 min)、50-98% (7.0-7.3 min)、98% (7.3-7.6 min)

検出モード: MRM (positive/negative)

| Compound | Ion mode | Q1 [Da] | Q3 [Da] | DP [V] | CE [V] | CXP [V] |
|------------------------------------|----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| CP-I | Positive | 328.3 | 298.2 | 61 | 23 | 34 |
| CP-I- ¹⁵ N ₄ | Positive | 330.1 | 300.1 | 76 | 23 | 36 |

血漿中ビリルビン濃度の定量分析

酵素法に基づく測定キットであるイアトロ LQ T-Bil およびイアトロ LQ D-Bil (株式会社 LSI メディエンス, Tokyo, Japan) を用いて、それぞれ血漿中の total bilirubin、direct bilirubin を測定した。

速度論的解析 (in vitro)

発現細胞を用いた検討では、各時点における濃度は累積取り込み量 (μL/mg protein) を基準として解析した。速度論的パラメータは以下の Michaelis-Menten 式により算出した。

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

ここで V は基質の取り込み速度 (pmol/min/mg protein) を、 $[S]$ はメディウム中の基質濃度 (μM) を、 K_m は Michaelis 定数 (μM)、 V_{\max} は最大取り込み速度 (pmol/min/mg protein) を示す。

IC₅₀ 値は以下の式により算出した。

$$V = \frac{V_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)} + V_{ns}$$

ここで V_0 は阻害剤非存在下における取り込み速度 (pmol/min/mg protein) を、 $[I]$ はメディアウム中の阻害剤濃度 (μM) を、 V_{ns} は非飽和性取り込み (pmol/min/mg protein) を示す。

速度論的解析 (in vivo)

実際に観測された血漿中濃度で最大のものを最大血漿中濃度 C_{\max} とした。また AUC はある時点までの血中濃度から台形法を用いて算出した。

経口投与時のクリアランス (CL_{tot} / F) は以下の式より算出した。

$$CL_{\text{tot}} / F = \text{Dose} / \text{AUC}$$

また、腎クリアランス (CL_r) および胆汁排泄クリアランス (CL_b) はそれぞれ以下の式により算出した。

$$CL_r = X_{\text{urine}} / \text{AUC}$$

$$CL_b = X_{\text{bile}} / \text{AUC}$$

ここで X_{urine} および X_{bile} はそれぞれある時点までの累積尿中排泄量、累積胆汁中排泄量を示し、これらは各時点におけるサンプルの濃度と排泄量の積の総和により算出した。

BDC サルにおける血漿中 TCA-d5 に関して、PhoenixWinNonlin v. 6.3 (Pharsight Corp, Certara, St. Louis, MI) を用いてノンコンパートメント解析により各パラメータ (V_d , CL および AUC_{inf}) を算出した。濃度が LLOQ を下回った場合、その前後の時点で検出可能であった場合を除き 0 として計算し、前後の時点で検出可能であった際には、その時点は欠測として扱った。

統計解析

2 群間データは paired t-test を用い、3 群間データについては one-way ANOVA の後、対照群と処理群の対比較には Dunnett 検定、群間ですべての対比較には Tukey 検定をそれぞれ多重検

定として用いて統計解析を行った。検定には全て GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA) を用いた。

参考文献

1. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry <https://www.fda.gov/media/134582/download> January 2020
2. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry <https://www.fda.gov/media/134581/download> January 2020
3. European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP) Guideline on the Investigation of Drug Interactions https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf June 2012
4. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン <https://www.pmda.go.jp/files/000225191.pdf> 2018. 7
5. Maeda K. Organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs *Biol Pharm Bull.* 2015; 38(2) :155-68.
6. Patel M, Taskar KS, Zamek-Gliszczyński MJ. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites *J Clin Pharmacol.* 2016 Jul;56 Suppl 7:S23-39.

7. International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Mar;9(3) :215-36.
8. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, et al. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption *Biopharm Drug Dispos.* 2013 Jan;34(1) :45-78.
9. Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Transporter-mediated drug-drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies *Clin Pharmacol Ther.* 2012 Jun;91(6) :1053-64.
10. Chauvin B, Drouot S, Barrail-Tran A, Taburet AM. Drug-drug interactions between HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and antiviral protease inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 2013 Oct;52(10) :815-31.
11. Tamraz B, Fukushima H, Wolfe AR, et al. OATP1B1-related drug-drug and drug-gene interactions as potential risk factors for cerivastatin-induced rhabdomyolysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2013 Jul;23(7) :355-64.
12. Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *J Clin Pharmacol.* 2008 Mar;48(3) :311-21.
13. Han JY, Lim HS, Shin ES, et al. Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2008 Jan;59(1) :69-75.
14. Vaidyanathan J, Yoshida K, Arya V, Zhang L. Comparing Various In Vitro Prediction Criteria to Assess the Potential of a New Molecular Entity to Inhibit Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 *J Clin Pharmacol.* 2016 Jul;56 Suppl 7:S59-72.

15. Rodrigues AD, Taskar KS, Kusuhara H, Sugiyama Y. Endogenous Probes for Drug Transporters: Balancing Vision With Reality. *Clin Pharmacol Ther.* 2018 Mar;103(3) :434-448.
16. International Transporter Consortium, Chu X, Liao M, Shen H, et al. Clinical Probes and Endogenous Biomarkers as Substrates for Transporter Drug - Drug Interaction Evaluation: Perspectives From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2018 Nov;104(5) :836-864.
17. van de Steeg E, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, et al. Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. *J Clin Invest.* 2010 Aug;120(8) :2942-52.
18. Chu X, Shih SJ, Shaw R, et al. Evaluation of cynomolgus monkeys for the identification of endogenous biomarkers for hepatic transporter inhibition and as a translatable model to predict pharmacokinetic interactions with statins in humans. *Drug Metab Dispos.* 2015 Jun;43(6) :851-63.
19. Yee SW, Giacomini MM, Hsueh CH, et al. Metabolomic and Genome-wide Association Studies Reveal Potential Endogenous Biomarkers for OATP1B1. *Clin Pharmacol Ther.* 2016 Nov;100(5) :524-536.
20. Watanabe M, Watanabe T, Yabuki M, Tamai I. Dehydroepiandrosterone sulfate, a useful endogenous probe for evaluation of drug-drug interaction on hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP) in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015 Apr;30(2) :198-204.
21. Bednarczyk D, Boiselle C. Organic anion transporting polypeptide (OATP) -mediated transport of coproporphyrins I and III. *Xenobiotica.* 2016; 46(5) :457-66.

22. Lai Y, Mandlekar S, Shen H, et al. Coproporphyrins in Plasma and Urine Can Be Appropriate Clinical Biomarkers to Recapitulate Drug-Drug Interactions Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide Inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 Sep;358(3) :397-404.
23. Shen H, Dai J, Liu T, et al. Coproporphyrins I and III as Functional Markers of OATP1B Activity: In Vitro and In Vivo Evaluation in Preclinical Species. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 May;357(2) :382-93.
24. Shen H, Christopher L, Lai Y, et al. Further Studies to Support the Use of Coproporphyrin I and III as Novel Clinical Biomarkers for Evaluating the Potential for Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 and OATP1B3 Inhibition. *Drug Metab Dispos.* 2018 Aug;46(8) :1075-1082.
25. Shen H, Chen W, Drexler DM, et al. Comparative Evaluation of Plasma Bile Acids, Dehydroepiandrosterone Sulfate, Hexadecanedioate, and Tetradecanedioate with Coproporphyrins I and III as Markers of OATP Inhibition in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos.* 2017 Aug;45(8) :908-919.
26. Jirsa M, Knisely AS, Schinkel A, Kmoch S. Rotor Syndrome. GeneReviews® <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114805/> University of Washington, Seattle; 1993-2020.
27. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology.* 2004 Jan;126(1) :322-42.
28. Tsuruya Y, Kato K, Sano Y, et al. Investigation of Endogenous Compounds Applicable to Drug-Drug Interaction Studies Involving the Renal Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3, in Humans. *Drug Metab Dispos.* 2016 Dec;44(12) :1925-1933.

29. Stieger B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol.* 2011; (201) :205-59.
30. Dong Z, Ekins S, Polli JE. Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition. *Eur J Pharm Sci.* 2015 Jan 23;66:1-9.
31. Hachad H, Ragueneau-Majlessi I, Levy RH. A useful tool for drug interaction evaluation: the University of Washington Metabolism and Transport Drug Interaction Database. *Hum Genomics.* 2010 Oct;5(1) :61-72.
32. Prueksaritanont T, Chu X, Evers R, et al. Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *Br J Clin Pharmacol.* 2014 Sep;78(3) :587-98.
33. Vildhede A, Karlgren M, Svedberg EK, et al. Hepatic uptake of atorvastatin: influence of variability in transporter expression on uptake clearance and drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2014 Jul;42(7) :1210-8.
34. Karlgren M, Vildhede A, Norinder U, et al. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *J Med Chem.* 2012 May 24;55(10) :4740-63.
35. Yoshikado T, Maeda K, Furihata S, et al. A Clinical Cassette Dosing Study for Evaluating the Contribution of Hepatic OATPs and CYP3A to Drug-Drug Interactions. *Pharm Res.* 2017 Aug;34(8) :1570-1583.
36. Akita H, Suzuki H, Ito K, et al. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Mar 9;1511(1) :7-16.

37. Kuipers F, Enserink M, Havinga R, et al. Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat. *J Clin Invest.* 1988 May;81(5) :1593-9.
38. Sasaki M, Suzuki H, Ito K, et al. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8) :6497-503.
39. Uegaki S, Takikawa H, Yamanaka M. Effect of organic anions and bile acid conjugates on biliary excretion of taurine-conjugated bile acid sulfates in the rat. *Steroids.* 1999 Nov;64(11) :790-5.
40. van der Schoor LW, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015 Feb;11(2) :273-93.
41. Xiang X, Han Y, Neuvonen M, et al. Effect of SLCO1B1 polymorphism on the plasma concentrations of bile acids and bile acid synthesis marker in humans *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Jun;19(6) :447-57.
42. Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, et al. Species differences in bile acids I. Plasma and urine bile acid composition. *J Appl Toxicol.* 2018 Oct;38(10) :1323-1335.
43. Han J, Liu Y, Wang R, Yang J, et al. Metabolic Profiling of Bile Acids in Human and Mouse Blood by LC-MS/MS in Combination with Phospholipid-Depletion Solid-Phase Extraction. *Anal Chem.* 2015 Jan 20;87(2) :1127-36.
44. Galeazzi R, Lorenzini I, Orlandi F. Rifampicin-induced elevation of serum bile acids in man. *Dig Dis Sci.* 1980 Feb;25(2) :108-12.

45. Te Brake LH, Russel FG, van den Heuvel JJ, et al. Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters. *Tuberculosis*. 2016 Jan;96:150-7.
46. Takashima T, Kitamura S, Wada Y, et al. PET imaging-based evaluation of hepatobiliary transport in humans with (15R)-11C-TIC-Me. *J Nucl Med*. 2012 May;53(5) :741-8.
47. Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Oct;25(10) :2020-30.
48. Gälman C, Angelin B, Rudling M. Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology*. 2005 Nov;129(5) :1445-53.
49. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res*. 2017 Jun;1(1) :3-9.
50. Thakare R, Gao H, Kosa RE, et al. Leveraging of Rifampicin-Dosed Cynomolgus Monkeys to Identify Bile Acid 3-O-Sulfate Conjugates as Potential Novel Biomarkers for Organic Anion-Transporting Polypeptides. *Drug Metab Dispos*. 2017 Jul;45(7) :721-733.
51. Shen H, Yang Z, Mintier G, et al. Cynomolgus monkey as a potential model to assess drug interactions involving hepatic organic anion transporting polypeptides: in vitro, in vivo, and in vitro-to-in vivo extrapolation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Mar;344(3) :673-85.
52. Takahashi T, Ohtsuka T, Yoshikawa T, et al. Pitavastatin as an in vivo probe for studying hepatic organic anion transporting polypeptide-mediated drug-drug interactions in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos*. 2013 Oct;41(10) :1875-82.

53. Shen H, Su H, Liu T, et al. Evaluation of rosuvastatin as an organic anion transporting polypeptide (OATP) probe substrate: in vitro transport and in vivo disposition in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015 May;353(2) :380-91.
54. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993 Jul;10(7) :1093-5.
55. P Koskelo, M Kekki. Multicompartment analysis of ¹⁴C-labelled coproporphyrin and uroporphyrin kinetics in human beings. *Ann Clin Res.* 1976; 8 Suppl 17:198-202.
56. Sanoh S, Ohta S. Chimeric mice transplanted with human hepatocytes as a model for prediction of human drug metabolism and pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos.* 2014 Mar;35(2) :71-86.
57. Naritomi Y, Sanoh S, Ohta S. Chimeric mice with humanized liver: Application in drug metabolism and pharmacokinetics studies for drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2018 Feb;33(1) :31-39.
58. Uchida M, Tajima Y, Kakuni M, et al. Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP)-Mediated Drug-Drug Interaction Study between Rosuvastatin and Cyclosporine A in Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab Dispos.* 2018 Jan;46(1) :11-19.
59. Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near Completely Humanized Liver in Mice Shows Human-Type Metabolic Responses to Drugs *Am J Pathol.* 2004 Sep;165(3) :901-12.
60. Takehara I, Yoshikado T, Ishigame K, et al. Comparative Study of the Dose-Dependence of OATP1B Inhibition by Rifampicin Using Probe Drugs and Endogenous Substrates in Healthy Volunteers. *Pharm Res.* 2018 May 10;35(7) :138.
61. Toshimoto K, Tomoda Y, Chiba K, Sugiyama Y. Analysis of the Change in the Blood Concentration-Time Profile Caused by Complex Drug-Drug Interactions in the Liver Considering the Enterohepatic Circulation: Examining Whether the Inhibition

- Constants for Uptake, Metabolism, and Biliary Excretion Can be Recovered by the Analyses Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *J Pharm Sci.* 2017 Sep;106(9) :2727-2738.
62. Takehara I, Watanabe N, Mori D, et al. Effect of Rifampicin on the Plasma Concentrations of Bile Acid-O-Sulfates in Monkeys and Human Liver-Transplanted Chimeric Mice With or Without Bile Flow Diversion *J Pharm Sci.* 2019 Aug;108(8) :2756-2764.
63. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Dec;80(6) :565-81.
64. Hirano M, Maeda K, Matsushima S, et al. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol.* 2005 Sep;68(3) :800-7.
65. Kanda K, Takahashi R, Yoshikado T, et al. Total hepatocellular disposition profiling of rosuvastatin and pitavastatin in sandwich-cultured human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2018 Jun;33(3) :164-172.
66. Park JW, Siekmeier R, Lattke P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluvastatin in heart transplant recipients taking cyclosporine A. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2001 Oct;6(4) :351-61.
67. Yoshikado T, Yoshida K, Kotani N, et al. Quantitative Analyses of Hepatic OATP-Mediated Interactions Between Statins and Inhibitors Using PBPK Modeling With a Parameter Optimization Method. *Clin Pharmacol Ther.* 2016 Nov;100(5) :513-523.
68. Prueksaritanont T, Tatosian DA, Chu X, et al. Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Apr;101(4) :519-530.

69. Tomita Y, Maeda K, Sugiyama Y. Ethnic variability in the plasma exposures of OATP1B1 substrates such as HMG-CoA reductase inhibitors: a kinetic consideration of its mechanism. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Jul;94(1) :37-51.
70. Chan KM, Scott MG, Wu TW, et al. Inaccurate values for direct bilirubin with some commonly used direct bilirubin procedures. *Clin Chem.* 1985 Sep;31(9) :1560-3.
71. Suga T, Yamaguchi H, Sato T, et al. Preference of Conjugated Bile Acids over Unconjugated Bile Acids as Substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PLoS One.* 2017 Jan 6;12(1) :e0169719.
72. Mori D, Kashihara Y, Yoshikado T, et al. Effect of OATP1B1 genotypes on plasma concentrations of endogenous OATP1B1 substrates and drugs, and their association in healthy volunteers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019 Feb;34(1) :78-86.
73. Yee SW, Giacomini MM, Shen H, et al. Organic Anion Transporter Polypeptide 1B1 Polymorphism Modulates the Extent of Drug-Drug Interaction and Associated Biomarker Levels in Healthy Volunteers. *Clin Transl Sci.* 2019 Jul;12(4) :388-399.
74. Mori D, Kimoto E, Rago B, et al. Dose-Dependent Inhibition of OATP1B by Rifampicin in Healthy Volunteers: Comprehensive Evaluation of Candidate Biomarkers and OATP1B Probe Drugs. *Clin Pharmacol Ther.* 2020 Apr;107(4) :1004-1013.
75. Yoshikado T, Toshimoto K, Maeda K, et al. PBPK Modeling of Coproporphyrin I as an Endogenous Biomarker for Drug Interactions Involving Inhibition of Hepatic OATP1B1 and OATP1B3. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2018 Nov;7(11) :739-747.
76. Asaumi R, Menzel K, Lee W, et al. Expanded Physiologically - Based Pharmacokinetic Model of Rifampicin for Predicting Interactions With Drugs and an Endogenous Biomarker via Complex Mechanisms Including Organic Anion Transporting

Polypeptide 1B Induction. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2019
Nov;8(11) :845-857.

77. Takehara I, TerashimaH, Nakayama T, Yoshikado T, Yoshida M, Furihata K, et al.
Investigation of Glycochenodeoxycholate Sulfate and Chenodeoxycholate Glucuronide
as Surrogate Endogenous Probes for Drug Interaction Studies of OATP1B1 and
OATP1B3 in Healthy Japanese Volunteers. *Pharm Res.* 2017 Aug;34(8) :1601-1614.