

博士論文

消化管のシトクロム P450 3A を介した
薬物間相互作用の
生理学的薬物動態モデルによる予測性評価及び
新規降圧薬エサキセレノンの薬物相互作用評価

山田 真起子

博士論文

消化管のシトクロム P450 3A を介した
薬物間相互作用の
生理学的薬物動態モデルによる予測性評価及び
新規降圧薬エサキセレノンの薬物相互作用評価

山田 真起子

目次

略語	3
パラメータ	4
序論	6
第 1 章.....	15
要約.....	16
序論.....	17
結果.....	19
考察.....	23
図表.....	30
第 2 章.....	51
要約.....	52
序論.....	53
結果.....	56
考察.....	63
図表.....	69
結論	84
謝辞	86
実験方法	87
参考文献.....	113

略語

略語	略していない表現 (英)	略していない表現 (日)
ACAT	Advanced Compartmental Absorption and Transit	-
AIC	Akaike's Information Criterion	赤池情報量規準
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUCR	AUC ratio	AUC 比
AUCR _g	AUCR based on intestinal DDI	消化管での DDI に由来する AUCR
AUCR _h	AUCR based on hepatic DDI	肝臓での DDI に由来する AUCR
CI	Confidence interval	信頼区間
CL	total body clearance	全身クリアランス
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
FPE	first-pass effect	初回通過効果
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MSPK	mechanistic static pharmacokinetic	静的薬物速度論
PBPK	physiologically based pharmacokinetic	生理学的薬物動態
PK	pharmacokinetic	薬物動態
TDI	time-dependent inhibition	時間依存的阻害

パラメータ

	パラメータ名 (英)	パラメータ名 (日)
C_{inlet}	maximum plasma concentration at the inlet to the liver	肝臓入口での最高血漿中濃度
CL	total body clearance	全身クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
C_{ss}	steady-state plasma concentration	定常状態の血漿中濃度
EC_{50}	half maximum effective concentration	50%効果濃度
E_{max}	maximum effect	最大効果
F_a	fraction absorbed	吸収率
F_g	intestinal availability	消化管アベイラビリティ
f_m	fraction of CL of a substrate mediated by CYP3A	CLに対する CYP3A の寄与率
FPE	first-pass effect	初回通過効果
$f_{u,inc}$	in vitro unbound fraction	in vitro 非結合形分率
$f_{u,p}$	unbound fraction in plasma	血漿非結合形分率
K_{12}	rate constant for the distribution of the drug to the second compartment	末梢コンパートメントへの分布速度定数
K_{21}	rate constant for the distribution of the drug from the second compartment	末梢コンパートメントからの分布速度定数
k_a	first-order absorption rate constant	吸収速度定数
K_i	inhibition rate constant	阻害定数

	パラメータ名 (英)	パラメータ名 (日)
K_I	concentration at half k_{inact}	k_{inact} の半分になるときの濃度
k_{inact}	inactivation rate constant	最大不活化速度定数
K_m	Michaelis–Menten constant	ミカエリスメンテン定数
k_{obs}	apparent inactivation rate constant	みかけの不活化速度定数
$\log D$	distribution coefficient	分配係数
$\log P$	partition coefficient	分配係数
P_{eff}	effective permeability	有効膜透過係数
Q_{en}	blood flow through enterocytes	消化管血流量
Q_h	hepatic blood flow rate	肝血流量
R_b	blood/plasma concentration ratio	血液/血漿濃度比
V_c	central compartment volume	中心コンパートメントの分布容積
V_{max}	maximum metabolic rate	最大代謝速度

序論

薬物相互作用 (drug-drug interaction, DDI) とは、複数の薬物の併用により、薬効の減弱や増強、副作用の増強などが起きることであり、薬力学的相互作用と薬物動態学的相互作用に分類される。薬力学的相互作用は、同じあるいは逆の薬理作用を持つ薬物の併用あるいは同じ副作用を持つ薬物の併用により起こる。薬物動態学的相互作用は、吸収、分布、代謝、排泄の過程で相互作用薬が被相互作用薬の体内動態に影響を与え、体内の薬物濃度の上昇や低下を起こす。薬物動態学的相互作用の多くが薬物代謝を介するもので、DDI 全体の約40%を占めることが過去に報告されている (日本医療薬学会, 2019)。

薬物代謝を介したDDIには、薬物が相互作用薬として他の薬物の体内動態に影響を与えるリスクと、自身の体内動態が他の薬物から影響を受ける被相互作用薬としてのリスクがある (厚生労働省, 2018)。相互作用薬としてのリスクは現在、その機序に従い、可逆的阻害、時間依存的阻害 (time-dependent inhibition, TDI)、誘導の3つに分類される。可逆的阻害は共存する薬物が代謝酵素の活性部位において基質と競合することで阻害するもので、相互作用薬が体内に存在するときのみ起こる。TDIでは、共存する薬物 (相互作用薬) が反応性代謝物の生成を経て代謝酵素を不可逆的に不活化するため、相互作用薬が体内から消失した後も阻害作用が持続する。誘導は通常、薬物 (相互作用薬) が核内受容体に対してアゴニストとして作用することで代謝酵素遺伝子の転写を促進し、代謝酵素の発現量が増大することで、代謝能が増大することを指す。相互作用薬が阻害作用を有する場合には、被相互作用薬の消失が遅延する他、経口薬の場合には、循環血中へ到達する割合 (バイオアベイラビリティ) の増大を生じ、その結果、血中濃度の時間曲線下面積 (area under the plasma

concentration-time curve, AUC) は増大する。一方で、誘導作用を有する場合には、被相互作用薬のAUCは低下する。

薬物の代謝は酸化や還元などの第I相反応と、水溶性の高い分子による抱合の第II相反応に大別される。第I相反応にはシトクロムP450 (cytochrome P450, CYP) が関与することが多く、中でもCYP3AはCYP代謝の約50%に関与するとされ特に重要である (Wienkers and Heath, 2005)。なお、CYP3Aには3A4と3A5があるが、両者は基質認識性の類似性が高く分離評価が困難な場合が多いため、本稿ではまとめてCYP3Aと表記している。CYP3Aを介したDDIにより重篤な副作用が引き起こされた薬物の例として、降圧薬であるミベフラジルや抗ヒスタミン薬であるテルフェナジンが挙げられる。強いCYP3A阻害作用を持つミベフラジルは併用により高脂血症薬であるアトルバスタチンのAUCを3倍程度上昇させ (Jacobson, 2004)、このことが副作用である横紋筋融解症の発症に関与したと考えられている (Thompson et al., 2003)。また、CYP3Aの基質であるテルフェナジンは抗菌薬であるケトコナゾールなどの強いCYP3A阻害薬により血中濃度が上昇し、QT延長を発症したことから市場撤退に至った (Mathews et al., 1991; von Moltke et al., 1994)。代謝酵素の多くは肝臓での発現が高いが、CYP3Aは肝臓だけでなく消化管での発現も高い。消化管でのCYP3Aの存在比はCYP全体の82%を占めており (Paine et al., 2006)、循環血中への到達前の代謝、すなわち初回通過効果 (first-pass effect, FPE) に関与する。

医薬品開発においては、まず探索段階で合成される多くの誘導体を、ヒト肝ミクロソームや肝細胞などを用いたin vitro試験によりスクリーニングし、なるべく相互作用薬としてのリスクが低い化合物を選択する。その後、選択された開発候補化合物について、想定される薬効用量において生じ得るDDIを定量的に予測する。予測の結果、併用薬 (被相互作用薬) の単独投与時と併用時の

AUC比（area under the plasma concentration-time curve ratio, AUCR）が0.8以下の場合は誘導リスクが、1.25以上の場合は阻害リスクがあり臨床DDI試験での確認が必要と判断される（厚生労働省, 2018）。臨床DDI試験の実施時期は、予測されるDDIの程度や適応症等に応じて検討する。臨床DDI試験実施前に有効性の確認のための臨床試験が実施される場合は、リスクのある薬剤との併用が禁止される場合もある。臨床試験での併用禁止は、被験者のリクルーティングに影響し、臨床DDI試験のコストは医薬品の開発コストを押し上げることから、DDIを高精度に予測することは開発戦略を考える上で重要である。

臨床試験の結果、DDIが認められた場合、その程度及び被相互作用薬の安全域に応じて、添付文書に併用を禁止する（併用禁忌）あるいは併用に注意が必要である（併用注意）旨が記載される。例えば強力なCYP3A阻害剤であるイトラコナゾールの添付文書では、CYP3A基質である多数の薬剤との併用が禁止されており、その数は2020年10月現在25種類に及ぶ（イトリゾールカプセル50 添付文書）。このうちED治療薬タダラフィルのAUCRは4.1（イトラコナゾールの類薬であるケトコナゾールによる結果）、降圧薬アリスキレンは5.8で併用禁止であるが、抗凝固薬リバーロキサバンは安全域が狭いため、AUCRが2.6（ケトコナゾールによる結果）でも併用禁止になっている。一方、併用注意が記載されるDDIの程度には明確な基準は無いが、抗精神病薬アリピプラゾール及びオピオイド系鎮痛剤オキシコドンはいずれもAUCRが1.5で併用注意の記載があり、AUCRが1.5程度から記載される場合が多いようである。併用注意が記載されている場合の具体的な対応は医師に任されることが多いが、添付文書上で投与量が制限される場合もある。例えば降圧薬エプレレノン強いCYP3A阻害剤との併用が禁止されているが、その他のCYP3A阻害剤併用時にはエプレレノンの投与量の上限を25 mg（承認最大用量は100 mg）とするよう指示されている

(セララ錠添付文書)。このように一見わずかに見えるDDIリスクも重要視されており、予測の過小評価によるDDIの見落とし、すなわち偽陰性は避けるべきである。

DDI を予測する際の肝臓及び消化管上皮細胞中濃度の推定には、静的薬物速度論 (mechanistic static pharmacokinetic, MSPK) モデルや生理学的薬物動態

(physiologically based pharmacokinetic, PBPK) モデルが用いられる。MSPK モデルは図 1 左のように、投与量から推定される理論上最大濃度の薬物が一定濃度で持続すると仮定するもので、偽陰性を出さないことを重視しており偽陽性が出やすい。一方、PBPK モデルは薬物動態を生理的な構造 (代謝能、血流量、臓器体積など) に基づき数式により解析し経時的な濃度推移を表現するもので (図 1 右に例示)、方法の自由度が高く、用いる手法や生理学的パラメータ等により結果が変動する。DDI の予測性検証のための研究は過去に精力的に行われており、例えば、Vieira らが典型的な CYP3A 基質であるミダゾラムを用いた 119 の臨床 DDI 試験結果を用いて MSPK モデルの予測性を評価した際

(図 2)、偽陰性率 (臨床 DDI 試験結果が陽性の薬物のうち偽陰性となった割合) は低かったものの (2.3%)、偽陽性率 (臨床 DDI 試験結果が陰性の薬物のうち偽陽性となった割合) は約 70%であった (Vieira et al., 2014)。一方、Hsueh らが文献上の PBPK モデルの予測性について系統的に評価した結果、負の予測誤差 (陰性と予測された薬物のうち偽陰性であった割合) は約 50%であり、偽陰性が比較的多いことが示された (Hsueh et al., 2018)。偽陰性を示した割合が比較的高い文献を確認したところ、多くは AUCR が 2 倍以内の弱い相互作用薬によるものであった (図 3)。PBPK モデルを臨床試験の要否の判断に用いるには、まず、弱い相互作用薬による DDI を過小評価する要因を突き止める必要があると考えられる。

前述のとおり、CYP3A は肝臓に加え消化管での発現も高く、消化管における初回通過効果に關与することが知られているため、CYP3A を介した DDI の推定には、肝臓のみならず消化管の薬物濃度及び代謝をモデルに組み込む必要がある。図 4 に示したように、経口投与された薬物は消化管管腔内で崩壊、溶出し、上皮細胞を通過して、血液中に吸収される。一般的に、吸収時の薬物濃度は肝臓よりも、消化管のほうが高くなり、消化管での DDI は肝臓よりも低い投与量で起こり得る。消化管における DDI リスク評価に薬物濃度を一定と仮定する MSPK モデルを適用する場合、消化管上皮細胞における薬物濃度 ($[I]_g$) を図 5 のように投与量 (Dose)、吸収率 (F_a)、吸収速度定数 (k_a)、及び消化管血流量 (Q_{en}) を用いて算出する (厚生労働省, 2018; Food and Drug Administration, 2020)。PBPK モデルを作成し、解析することができるソフトウェアは多数市販されているが、本研究に用いた GastroPlus (Simulations Plus) には Advanced Compartmental Absorption and Transit (ACAT) モデルが組み込まれており、消化管各部位における経時的な濃度変化をシミュレートすることができる (Agoram et al., 2001)。ACAT モデルでは図 6 に示されるように消化管が多数のコンパートメントに分かれており、消化管の各部位における薬物の管腔内での溶出、下流のコンパートメントへの移動、管腔から上皮細胞内への移行及び上皮細胞内から血液中への移行 (吸収)、上皮細胞中での代謝等を考慮することにより、消化管上皮細胞中濃度推移を推定する。

消化管の CYP3A が關連している薬物速度論パラメータは上皮細胞に移行後、門脈中に移行する薬物量の割合 (消化管アベイラビリティ) であり、循環血中からのクリアランスに与える影響は小さい。そのため、消化管 CYP3A の DDI に由来する AUCR は、被相互作用薬の消化管アベイラビリティの逆数 ($1/F_g$) が上限となり (例えば F_g が 0.5 なら 2 倍の AUC 上昇)、強い CYP3A

阻害薬による DDI は肝臓での DDI に由来する予測 AUCR に $1/F_g$ をかけることで予測できる (Galetin et al., 2007, 2008)。しかし、規制当局のガイドライン上、臨床薬物相互作用試験の要否を判断する閾値 (AUCR が 0.8 から 1.25) 付近である比較的弱い DDI を正確に予測するためには、消化管における精密な DDI 予測が必要である。DDI の予測性に関する過去の研究は強い DDI に着目しているものが多く、弱い DDI の予測性の研究は不十分である。そこで本研究では、PBPK モデルの臨床 DDI 試験の要否の判断への利用可能性を高める目的で、以下の研究に取り組んだ。

第1章では、CYP3Aの基質であるミダゾラムとの臨床試験で弱い相互作用を示した (ミダゾラムのAUCを0.8~1.5倍に変化させた) 市販薬17薬物について、*in vitro*試験によりDDIパラメータを取得後、MSPKモデル及びPBPKモデルを用いて、予測手法の有用性及び予測精度を評価した。予測結果を精査することにより、DDI予測のMSPKモデルによる過大評価の程度及びPBPKモデルによる過小評価の要因について考察した。また、CYP3A阻害と誘導を併せ持つ薬物について、阻害と誘導の相殺、すなわち、阻害によって低下した代謝活性が誘導された代謝酵素により補われる現象の予測についても検討した。

第2章では、最近承認された薬物であるエサキセレノンのDDIを*in vitro*で評価し、第1章で検証したモデルを用いてCYP3Aを介したDDIリスクについて検討するとともに、本予測手法の新規薬物によるDDI予測への適用について検討した。シミュレーション結果を臨床DDI試験結果と比較後、投与条件 (エサキセレノンの投与期間、投与量、エサキセレノン投与後のミダゾラム投与タイミング) の違いによるDDIの違いについてもシミュレートした。

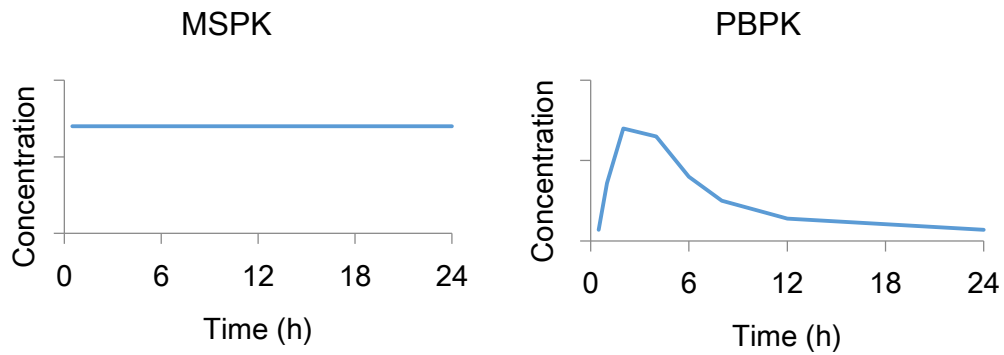


図 1 静的薬物速度論 (MSPK) モデル及び生理学的薬物動態 (PBPK) モデルにおける相互作用薬の血漿中濃度推移のイメージ

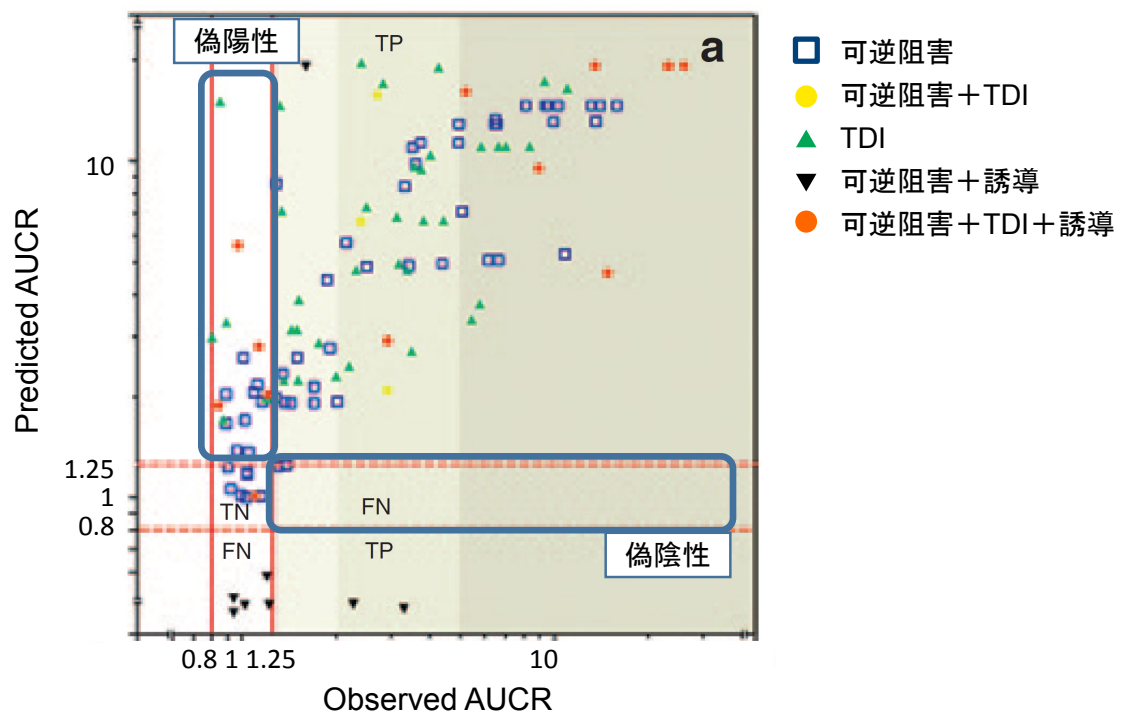


図 2 静的薬物速度論モデルにより算出された相互作用薬併用時のミダゾラムの血漿中濃度-時間曲線下面積比 (AUCR)

Vieira et al., Clin Pharmacol Ther 95:189–198, 2014 Figure 3a 改変。

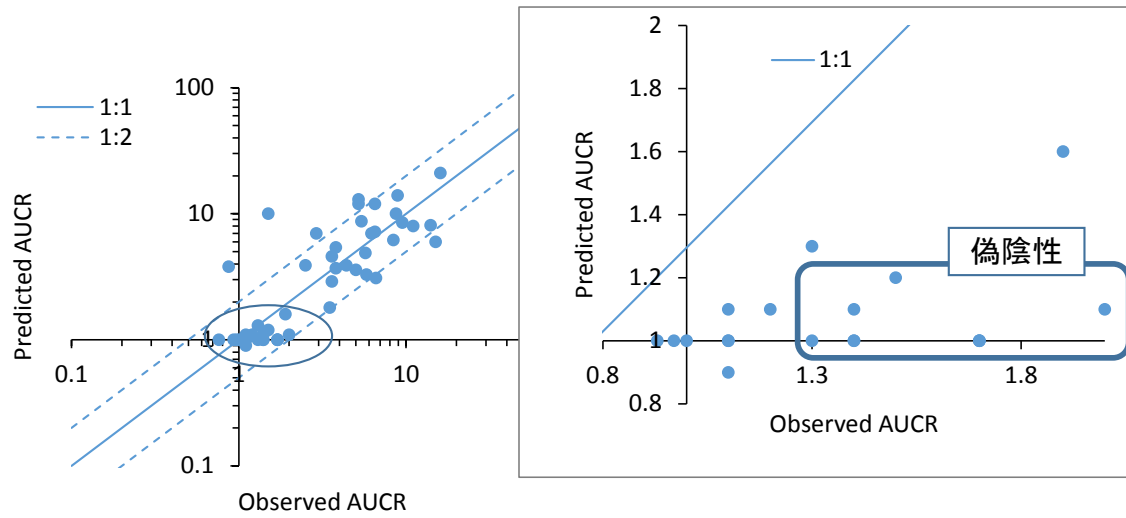


図 3 生理学的薬物動態モデルにより算出された相互作用薬併用時のミダゾラムの血漿中濃度-時間曲線下面積比 (AUCR)

Fahmi et al., Drug Metab Dispos 37:1658–1666, 2009 Figure 1C 改変。右側の図は左側の図の青丸部分を拡大したもの。

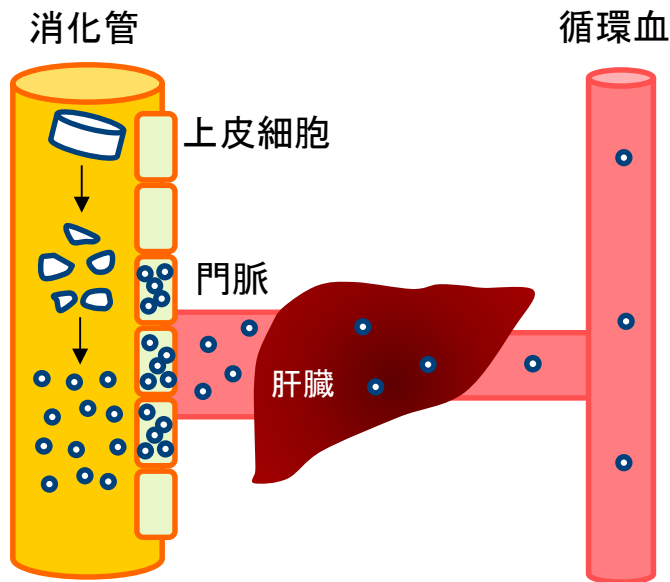
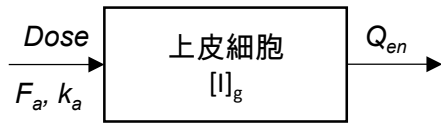


図 4 経口投与後の薬物の消化管吸収及び初回通過効果のイメージ



$$[I]_g = F_a \times k_a \times \text{Dose} / Q_{en}$$

$[I]_g$: MSPKモデルで用いられる消化管上皮細胞中濃度

F_a : 吸収率、 k_a : 吸収速度定数、 Q_{en} : 消化管血流量

図 5 静的薬物速度論モデルの消化管上皮細胞中濃度

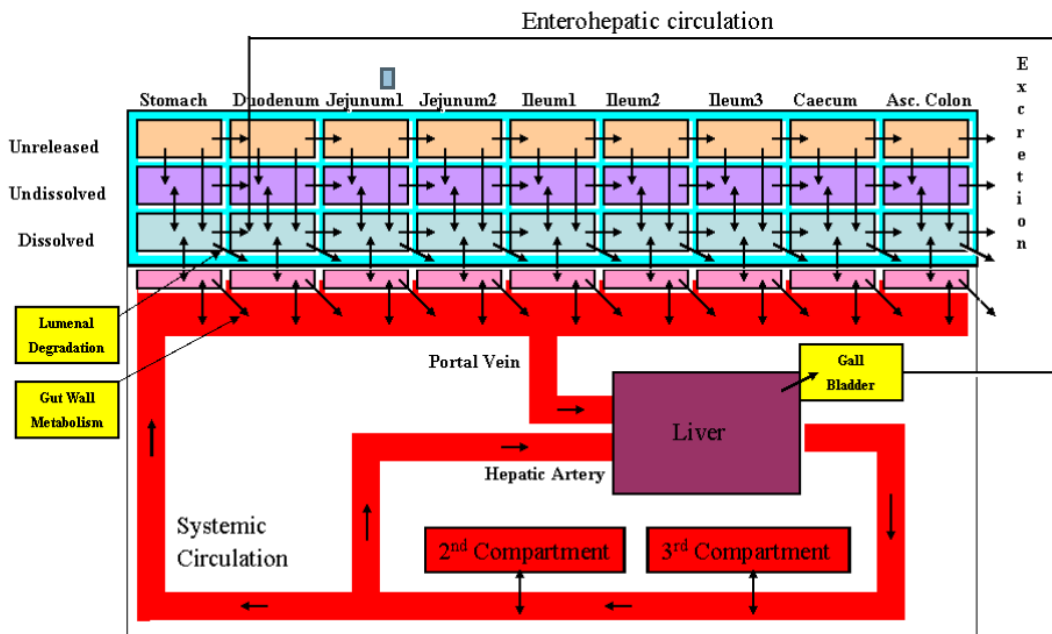


図 6 Advanced Compartmental Absorption and Transit (ACAT) モデル

GastroPlus 9.7 Manual Figure 4-2 転載

第 1 章

市販薬 17 薬物とミダゾラムの DDI の予測性評価

要約

DDI の予測精度を改善するためにこれまで多くの研究がされているが、CYP3A を介した弱い DDI に関する研究は十分ではない。本研究では、代表的な CYP3A 基質であるミダゾラムの AUC を 0.84~1.47 倍変化させることが報告されている 17 種類の経口投与薬物を選択し、予測性の評価を行った。弱い CYP3A 相互作用薬については、消化管上皮細胞中の薬物濃度が高いため、予測される AUCR は肝臓よりも消化管における DDI に依存する。そこで、消化管の各セグメントにおける濃度推移を用いた DDI 予測を、PBPK モデリングソフトウェアである GastroPlus により行った。MSPK モデルは患者の安全性を保証するためにリスクを過大評価する傾向がある一方、PBPK モデリングについては過小評価の例が報告されている。本研究では、*in vitro* で評価した 17 薬物のうち 16 薬物が CYP3A の時間依存的阻害 (TDI) を示し、これらの TDI を無視して DDI をシミュレートすると偽陰性が見られることを明らかにした。このことは過去に報告された過小評価の一因と考えられる。PBPK モデルに対して全ての既知の DDI メカニズム、すなわち可逆的阻害、TDI、及び誘導のパラメータを含めることにより、偽陰性を増加させることなく DDI の予測性を改善することに成功した。これらの包括的な解析により、CYP3A を介した弱い DDI 予測における消化管の重要性と消化管での DDI 予測における PBPK の有用性が示された。

序論

新薬開発中の *in vitro* 試験の結果から DDI の可能性が示唆された場合には、MSPK モデルや PBPK モデル等を用いて *in vivo* DDI の大きさを予測し、臨床試験の要否を判断する (Food and Drug Administration, 2020)。一般に、相互作用薬を併用時と非併用時の被相互作用薬の AUCR が 0.8~1.25 の場合、DDI はないと判断される。これまでの多くの研究は強い相互作用の予測に焦点を当ててきたが、閾値周辺の弱い DDI を正確に予測することは、薬物開発の戦略に影響するため重要である。また、臨床 DDI 試験における被験者にとっての危険性は低いもののゼロではなく、医薬品開発コストは薬価に反映されるため、必要性の低い試験は避けるべきである (Greenblatt, 2014)。

ベンゾジアゼピン系鎮静剤ミダゾラムは CYP3A の典型的な基質であり (Galetin et al., 2005)、消失における CYP3A の寄与が大きいため、肝臓の CYP3A 発現量とミダゾラムの全身クリアランス (total body clearance, CL) には相関が見られる (Thummel et al., 1994)。ミダゾラムのバイオアベイラビリティは約 30% であり (Thummel et al., 1996; Tsunoda et al., 1999; Kirby et al., 2011)、 F_g (代謝されずに消化管上皮細胞を通過し、門脈中に到達する割合) は 0.4~0.8 と計算されている。ケトコナゾールやリトナビルなどの強い CYP3A 阻害剤により F_g が 1 に近い値になることから (Tsunoda et al., 1999; Kirby et al., 2011)、ミダゾラムの初回通過効果への CYP3A の寄与が大きいがわかる。以上のような特性を持つことから、ミダゾラムは CYP3A を介した DDI を評価する臨床試験でもっともよく使われている。医薬品承認文書のデータベースである PharmaPendium (Elsevier, Amsterdam, Netherlands) を用いて調査したところ、添付文書にミダゾラムを用いた臨床 DDI 試験の結果が記載されている 83 薬物

のうち、半数以上の 47 薬物で相互作用はないと記載されていた。DDI 予測の精度が上がれば、このような臨床試験を省略できるようになる可能性がある。

前述のとおり、弱い DDI の予測には消化管が重要であるが、もう一つの重要な点は、適切な *in vitro* DDI パラメータの使用である。過去の研究 (Hsueh et al., 2018) で偽陰性を示したモデルを個別に検討したところ、一部の相互作用薬について、他の試験で TDI や誘導の可能性が示唆されているにもかかわらず (Zimmerlin et al., 2011; Vieira et al., 2014)、可逆的阻害の阻害定数 (K_i) のみが予測に用いられていることがわかった。可逆的阻害と TDI の両方を示す薬物については、TDI を無視すると過小評価を引き起こす可能性がある。また、阻害と誘導の両方を示す薬物に対する DDI の予測性の評価は不十分である。このため、DDI ガイダンスでは、阻害と誘導を別々に考える保守的なアプローチが推奨されており (Food and Drug Administration, 2020)、このことも DDI リスクの過大評価につながっている。

本研究では、DDI 予測における消化管の重要性を示すために、まず種々の CYP3A 阻害活性を有する仮想相互作用薬を用いて MSPK モデルによる計算を行った。その後、臨床 DDI 試験でミダゾラムの AUCR が 2 未満であった弱い相互作用薬 17 薬物について、CYP3A の可逆的阻害、TDI、及び誘導を *in vitro* 試験により評価した。消化管の各セグメントにおける濃度推移を GastroPlus (ver. 9.6.0001、Simulation Plus、Lancaster、CA) によりシミュレートし、DDI モジュールを用いて、可逆的阻害、TDI、誘導の影響を別々あるいは同時に予測した場合の予測性を評価した。

結果

仮想相互作用薬の MSPK モデル解析

肝臓及び消化管における DDI の寄与をそれぞれ示すために、MSPK モデルにより仮想相互作用薬併用時のミダゾラムの AUCR を計算した。K_i を 0.2~100 μM に変化させ投与量を 100 mg に固定した場合と、K_i を 1 μM に固定し投与量を 1~500 mg に変化させた場合の結果をそれぞれ図 7 (A および B) に示す。仮想相互作用薬を 100 mg 投与した際の [I]_g 及び [I]_h はそれぞれ 11.1 及び 0.416 μM であった (仮想相互作用薬の詳細は方法に記載)。阻害が弱い場合、すなわち K_i が大きい場合や投与量が小さい場合、消化管での DDI に由来する AUCR が肝臓より大きくなった。阻害が強い場合、消化管での DDI は飽和して AUCR_g は 1/F_g (1.85) となり、肝臓での影響がより大きくなった。

In vitro DDI 試験

市販薬 17 薬物 (アトモキセチン、アジスロマイシン、アトルバスタチン、カソピタント、シメチジン、デフェラシロクス、エチニルエストラジオール、エベロリムス、フェロジピン、フルオキセチン、フルボキサミン、パゾパニブ、ラニチジン、ロキシスロマイシン、シンバスタチン、スボレキサント、タダラフィル) のうち、16 薬物 (アジスロマイシン以外の全薬物) が可逆的阻害を示し、K_i が算出された (表 1 及び図 8)。アジスロマイシンの可逆的阻害は非常に弱く、K_i は試験に用いた最大濃度 (1000 μM) より大きかった。エチニルエストラジオール及びタダラフィルは赤池情報量規準 (Akaike's Information Criterion, AIC) による分析から非競合的阻害剤と考えられ、他の 14 薬物は競合的阻害剤と考えられた。ほとんどの薬物で、過去に報告されたものと同等の K_i が得られた (表 2)。市販薬 17 薬物のうち、16 薬物が TDI を示し、最大不

活化速度定数 (k_{inact}) 及び k_{inact} の半分になるときの濃度 (K_I) が算出された (表 1 及び図 9)。アトモキセチンは TDI を示さなかった。得られた K_I 及び k_{inact} を文献値と比較したところ、一部の薬物で大きな差が認められ、実験条件の違いによるものと思われた (表 2)。本研究で得られた k_{inact}/K_I を文献の k_{inact}/K_I と比較したところ、 K_I 及び k_{inact} をそれぞれ比較した際より近い値になった。誘導を評価した市販薬 13 薬物のうち、7 薬物 (カソピタント、エベロリムス、フェロジピン、フルボキサミン、パゾパニブ、シンバスタチン、タダラフィル) が誘導作用を示し、50%効果濃度 (EC_{50}) と最大効果 (E_{max}) が算出された (表 1 及び図 10)。残りの 6 薬物 (アトモキセチン、アジスロマイシン、シメチジン、デフェラシロクス、ラニチジン、ロキシスロマイシン) については、濃度依存的な mRNA の変化は認められず、誘導倍数 (mRNA の倍数変化) は 2 未満であった。陽性対照の誘導倍数はリファンピシン ($10 \mu\text{M}$) 及びオメプラゾール ($50 \mu\text{M}$) でそれぞれ 15.5~24.5 及び 5.42~12.7 であった。陰性対照のガチフロキサシン ($10 \mu\text{M}$) による誘導は認められなかった。

GastroPlus を用いた DDI 予測

DDI シミュレーションは DDI モジュールにおける dynamic シミュレーションを用いて行った。シミュレーションに用いた投与条件は臨床 DDI 試験の条件 (表 8) を用いた。可逆的阻害のパラメータのみを用いて GastroPlus により予測したミダゾラムの AUCR を実測値に対してプロットしたものを図 11A に、可逆的阻害および TDI パラメータの両方を用いたものを図 11B に示す。 K_i のみを用いた場合、臨床試験で DDI が陽性であった 7 薬物のうち 5 薬物が陰性と予測された (偽陰性)。TDI パラメータを用いた場合、7 薬物すべてが陽性と予測されたが、臨床試験で DDI が陰性であった 10 薬物のうち 4 薬物も陽性と

予測された（偽陽性）。すべての *in vitro* DDI パラメータ（可逆的阻害、TDI、誘導）を用いて GastroPlus により予測されたミダゾラムの AUCR を表 3 に示す。Guest らが提唱した弱い相互作用薬のための予測性評価法を用いて予測性を評価し（図 12A）、MSPK モデルによる結果（図 12B）と比較した。グラフの y 軸は予測誤差（予測/実測）を示している。GastroPlus および MSPK モデルを用いた予測の成功率はそれぞれ 76% および 65% と算出された。一部の薬物で過大評価が認められたものの、過小評価は認められなかった。また、AUCR を消化管（ $AUCR_g$ ）及び肝臓（ $AUCR_h$ ）に分けて算出したところ、大部分の薬物の $AUCR_h$ は約 1 であり、 $AUCR_g$ が AUCR に対してより大きく寄与していることが示された（表 3）。阻害作用（可逆的阻害及び TDI）と誘導作用を別々に組み込んだ場合の $AUCR_g$ を GastroPlus でシミュレートし、MSPK モデルと比較した結果を図 13 に示す。阻害による $AUCR_g$ は、エチニルエストラジオール、ラニチジン、及びアジスロマイシンが GastroPlus 及び MSPK モデルでいずれも小さく、パゾパニブは GastroPlus 及び MSPK モデルで同等、エベロリムスおよびスポレキサントは GastroPlus のほうが大きな値を示した（図 13A）。その他の薬物については、GastroPlus より MSPK モデルがより強い阻害を予測する傾向があった。誘導については、投与量が低いために相互作用が非常に弱かったエチニルエストラジオールを除き、MSPK モデルで GastroPlus よりも小さな $AUCR_g$ 、すなわちより強い相互作用が予測された（図 13B）。肝臓に関しては、 $[I]_h$ に定常状態の非結合血漿中濃度（ $C_{ss,u}$ ）を用いた場合、 $AUCR_h$ が GastroPlus と MSPK モデルで同等になった。DDI ガイダンスで推奨されている肝臓入口での最高非結合形血漿中濃度（ $C_{inlet,u}$ ）及び最高非結合形血漿中濃度（ $C_{max,u}$ ）を用いると、MSPK モデルのほうが GastroPlus よりも相互作用を強く予測した（図 14）。ただし肝臓では大部分の薬物で阻害または誘導が非常に

弱かったため、比較に使用できた薬物は少なかった。阻害、誘導、および阻害と誘導の両方を用いた予測 AUCR の関係を図 15 に示す。阻害と誘導の両方を組み込むことにより相殺、すなわち、阻害による活性の減少が誘導による酵素の増加によって軽減される現象が見られた。DDI パラメータの実験誤差の影響について考察するため、代表的な薬物（アトモキセチン、アジスロマイシン、カゾピタント、スポレキサント）について、 K_i 、 k_{inact} 、 K_I 、 E_{max} 、 EC_{50} を 0.5 倍及び 2 倍にした場合のミダゾラムの AUCR を、阻害のみ、誘導のみ、及び両方のメカニズムを組み込みシミュレートした。結果を図 16 に示す。誘導作用を示さないアトモキセチン及びアジスロマイシンを併用した際のミダゾラムの AUCR の予測値は、いずれも Guest らが提唱した弱い相互作用薬のための予測性評価法の基準内となり、阻害と誘導を併せ持つカゾピタントを併用した際は阻害と誘導の相殺を考慮した結果が Guest らの基準内となった。一方で、スポレキサントは臨床試験により弱い相互作用薬であることが確認されているものの、本研究におけるシミュレーションでは中等度の DDI 強度が予測され、過大評価されている。スポレキサント併用時のミダゾラムの予測 AUCR は DDI パラメータの変動の影響を弱い相互作用薬より大きく受けた。

考察

臨床 DDI 試験の要否を判断するためには、弱い DDI の予測の精度が重要であり、弱い DDI を正確に予測するためには、消化管での DDI が重要であると考えられる。理解を助けるために、仮想相互作用薬を用いて消化管と肝臓の DDI の関係を図示した (図 7)。 K_i が大きいあるいは投与量が小さいとき (それぞれ図 7A 及び B の左端)、消化管の CYP3A は完全には阻害されておらず、肝臓での相互作用はほとんど起きていない。このことから、弱い DDI を議論する際の消化管の重要性が示唆される。ミダゾラムは CYP3A プローブ基質として使用されることが多いため、多くの臨床 DDI 試験結果が報告されている。ミダゾラムの DDI 予測はこれまで広く行われてきたが、多くは強い DDI に焦点を当てている。しかし、消化管の CYP3A を介した DDI の予測性を評価するためには、弱い DDI に焦点を当てるべきである。そこで、臨床 DDI 試験でミダゾラムの AUCR が 0.8~1.47 を示した弱い相互作用薬 17 薬物の DDI を GastroPlus によりシミュレートすることで、弱い DDI の予測性を検討した。当初、文献で報告されている *in vitro* の値を用いて *in vivo* DDI の予測を試みたが、文献間のパラメータのばらつきが大きい、*in vitro* 非結合形分率 ($f_{u,inc}$) の計算に必要なマイクロソームタンパク濃度が不明である、TDI や誘導が報告されているもののパラメータが算出されていない、などの制約があった。そこで、新たに *in vitro* 試験を実施してデータを取得した。

予測が実測データの 2 倍の範囲内に収まるかどうかに基づいて予測性を評価する従来のアプローチは、弱い相互作用薬には適していない。例えば、実測の AUCR が 1.5 (弱い阻害薬) の場合、許容範囲は 0.75 (誘導薬) ~3 (中程度の阻害薬) になってしまう。そこで、Guest らが提唱した弱い相互作用薬のための厳しい基準を用いた評価法 (Guest, Aarons, et al., 2011) に基づき予測の成功率

を算出した。GastroPlus で予測したミダゾラムの AUCR を実測値と比較したところ、Guest らの評価法での成功率は 76%であり、PBPK モデルを用いた手法の有用性が示された。予測成功の基準を満たさなかった薬物は 17 薬物中 3 薬物のみであり、その全てが過大評価であった。過小評価が高頻度に起こるモデルは臨床 DDI 試験の要否を判断するのに用いることができないため、過小評価がないことは非常に重要である。予測結果が不良な薬物のうちパゾパニブについては、ミクロソーム由来の TDI パラメータを用いた場合に DDI リスクを過大評価し、肝細胞由来のパラメータを用いることで予測が改善されることが報告されている (Mao et al., 2016)。その理由は十分には解明されていないが、細胞膜の存在やトランスポーターの関与が指摘されている。従って、本研究における過大評価の原因は PBPK モデルではなく *in vitro* 評価系である可能性がある。また、パゾパニブの阻害および誘導を別々に評価した場合、2 倍以上及び 0.5 倍未満の比較的強い相互作用が予測された (図 15)。これらの結果は、強い阻害と強い誘導の相殺の予測が困難であることを示している可能性がある。また、スポレキサントも予測の結果 DDI が過大評価されているが、消化管及び肝臓におけるスポレキサントの代謝を組み込んでいないことが一因である可能性が考えられる。スポレキサントは CYP3A の基質であることが報告されているが (ベルソムラ錠添付文書, 2020)、消化管における CYP3A4 代謝の固有クリアランスや寄与率等に関する十分な情報が得られなかったため、本研究では、スポレキサントの消化管内代謝を考慮していない。PBPK モデリング解析が弱い DDI のリスクを過小評価する可能性があることが過去に報告されているが (Hsueh et al., 2018)、我々の研究では、TDI を組み込んだ場合過小評価は観察されなかった (図 11 B)。TDI は通常、プレインキュベーションの有無により IC₅₀ に差がない場合には陰性と判断されるが、過去に IC₅₀ シフトを示さなかったことが

報告されている薬物も、我々の試験において陽性 TDI を示した（例えば、シメチジン、フェロジピン、およびフルボキサミン）(Haarhoff et al., 2017)。プレインキュベーションにより阻害薬が代謝されると、可逆的阻害が経時的に減弱し、TDI による経時的な阻害の増強が不明瞭になる場合がある。IC₅₀ シフトに基づかないスクリーニング試験で多くの薬物が TDI の可能性を示していることから (Zimmerlin et al., 2011)、TDI なしの判断は慎重にすべきである。以上のことから、TDI の見落としが過去の過小評価の一因であり、PBPK モデル自体の問題ではない可能性が考えられた。予測に用いた DDI パラメータ (K_i 、 k_{inact} 、 K_I 、 E_{max} 、 EC_{50}) には実験誤差等によるばらつきが考えられるため、17 種類の薬物から 4 薬物を選択し、各パラメータを 0.5 倍及び 2 倍に変化させ、予測性への影響を確認した (図 16)。選択した 4 薬物のうち、アトモキセチンは可逆阻害のみを示す薬物、アジスロマイシンは TDI のみを示す薬物、カソピタントは可逆阻害、TDI、誘導をすべて示す薬物、スポレキサントはカソピタントと同様にすべての機序を併せ持ち、DDI を過大に予測している薬物として選択した。弱い DDI が予測されているアトモキセチン、アジスロマイシン、カソピタントは DDI パラメータの変動の影響をほとんど受けず、中等度の DDI が予測されているスポレキサントは相対的に強い影響を受けていた。これは、DDI パラメータの変動により AUCR ではなく AUC の変化率の部分が影響を受けるためと考えられる。例えば、ミダゾラムの AUC を 10% 上昇させる薬物の阻害が 2 倍強くなると、AUC の上昇率は 20% になるが、AUCR としては 1.1 から 1.2 への変化となり、影響は小さい。したがって、弱い相互作用薬について予測結果を元に臨床 DDI 試験省略の判断が可能と考えられる。一方、AUC を 200% 上昇させる薬物の阻害が 2 倍になると、AUC の上昇率は 400% になり、AUCR は 3 から 5 になるため、無視できない影響となる。したがって、中等度

の DDI が予測された場合、併用禁止や用量調節の必要性等を判断するには、臨床 DDI 試験実施が必要であると考えられる。

本研究におけるモデルにはいくつかの制約がある。溶解度、膜透過性、親油性 (LogP または LogD) などの物理化学的パラメータは、予測される消化管上皮細胞濃度に重大な影響を及ぼすため、実験値の使用が望ましい。しかし、本研究では実験値が文献等から入手できなかった場合に ADMET predictor による予測値を用いた。CL、中心コンパートメントの分布容積 (central compartment volume, V_c)、抹消コンパートメントへの分布速度定数 (K_{12})、抹消コンパートメントからの分布速度定数 (K_{21}) などの、吸収後の薬物動態

(pharmacokinetic, PK) パラメータは、静脈内投与後の血漿中濃度推移を用いて算出することが望ましい。しかし、医薬品開発の初期段階ではそのような情報は入手できないことが多いため、経口投与後のデータに当てはめることで相互作用薬の PK パラメータを最適化した (表 13、図 17)。P-gp や BCRP のような排出トランスポーターは、上皮細胞中の基質濃度を低下させると考えられる。本研究で用いた相互作用薬の一部は P-gp および BCRP の基質であることが報告されているが、今回作成したモデルにはこれらのトランスポーターの寄与は組み込んでいない。このような制約にもかかわらず、GastroPlus による AUCR 予測の成功率は 76% であり、本研究で用いた方法が弱い相互作用薬の DDI リスクの予測に十分に有用であることが示唆された。初回通過効果 (first-pass effect, FPE) が大きいことが知られている一部の相互作用薬については、文献の PK パラメータから算出した FPE を入力した。消化管および肝臓における相互作用薬の代謝を考慮することは MSPK モデルでは不可能であり、PBPK モデルの利点の 1 つである。

阻害と誘導の DDI を別々にシミュレーションし、 $AUCR_g$ を GastroPlus と MSPK モデルで比較したところ、MSPK モデルは GastroPlus よりも相互作用を強く予測する傾向があった。このことは、MSPK モデルで最高濃度が長期間持続すると仮定していることを考えると妥当であると思われた。しかし、GastroPlus で計算した消化管上皮細胞濃度を MSPK モデルの消化管内濃度 (I_g) と比較すると、FPE を入力した薬物を除いて、最大濃度は I_g より高かった。例として、シミュレートした空腸コンパートメント 1 の上皮細胞中濃度と I_g の関係を図 18 に示す。MSPK モデルで $AUCR_g$ が高い理由は必ずしも濃度が高いことによるものではなく、曝露時間が重要であることが示唆された。GastroPlus のほうが高濃度を示した理由は、 I_g が薬物の上皮細胞への流入と上皮細胞からの流出の速度が等しいと仮定して算出されるのに対し、GastroPlus での吸収開始時の流入速度は流出速度よりも大きいためと考えられる。また、ミダゾラムの F_g が GastroPlus と MSPK モデルで異なることも、MSPK モデルで高い $AUCR_g$ が見られた理由のひとつであると考えられる。MSPK モデルでは F_g は一定であるが、GastroPlus は代謝の飽和が表現できるように作られているため (Agoram et al., 2001)、投与量が低いとき (例: 2 mg) の F_g は高いとき (例: 15 mg) よりも小さくなる。そのため、高投与量のミダゾラムを用いた臨床 DDI 試験をシミュレートした際、ミダゾラム単独投与時の F_g が 1 に近いため、消化管の CYP3A が完全に阻害されても $AUCR$ は小さくなった。このような薬物は、低投与量のミダゾラムまたは F_g の小さい他の薬物とより強い相互作用を引き起こす可能性がある。肝臓での DDI の予測性に関しては、MSPK モデルで $C_{ss,u}$ を使用した場合に、GastroPlus モデルと MSPK モデルとの間の $AUCR_h$ の相関が良好であった (図 14)。偽陰性を避けるために DDI ガイダンスで推奨されている $C_{inlet,u}$ は、ほとんどの薬物について GastroPlus で予測され

た肝臓での最大濃度よりも高く（図 19）、 $C_{inlet,u}$ の使用が MSPK モデルの過大評価の一因であると考えられた。

阻害と誘導の両方を同時に考慮した場合、作用の相殺が観察された（図 15）。阻害と誘導の相殺の予測は難しいため、DDI ガイダンスでは阻害と誘導を別々に評価する保守的なアプローチが推奨されている（Food and Drug Administration, 2020）。強い阻害作用と誘導作用の相殺により偽陰性が生じる可能性があるが、我々の予測では AUCR の明らかな過小評価は観察されなかった。したがって、予測された阻害および誘導が弱い場合（それぞれ $AUCR < 2$ および > 0.5 ）、相殺後の値は臨床 DDI 試験の省略の根拠として使用可能と考えられた。なお、本研究は強い相互作用薬を含まないため、強い阻害と強い誘導の相殺の予測性については別途評価されるべきである。MSPK モデルも比較的良好的な予測性を示したが（図 12）、強い阻害と強い誘導が予測される薬物もあり（図 15）、そのような予測から臨床 DDI 試験の必要性がないと判断するのは困難である。

阻害と誘導のバランスは、相互作用薬と被相互作用薬の投与タイミングによって異なる。本試験では、元になる臨床 DDI 試験と同じ投与タイミングを用いており（表 8）、一部の試験では相互作用薬より 0.5～2 時間遅れてミダゾラムが投与されていた。TDI と誘導の相殺は投与タイミングの影響を受けにくかったが、可逆的阻害と誘導の相殺は、ミダゾラムの遅延投与により阻害が弱くなると予測された（詳細は第 2 章）。したがって、PBPK モデルは、臨床試験の要否だけでなく、デザインの検討にも用いるべきである。

以上のように、本研究により、CYP3A を介した弱い DDI を評価する際の消化管での DDI の重要性が示された。PBPK モデルは、可逆的阻害、TDI、及び誘導を含む全てのメカニズムを組み込むことにより、過小評価することなく、

消化管の CYP3A を介した弱い DDI を適切に予測できることを示した。PBPK モデルを用いて、CYP3A の相互作用薬を対象とした臨床 DDI 試験の要否を阻害・誘導の両面から判断することで、治験参加者や患者の安全性を確保した上での、臨床開発の効率化が期待される。

図表

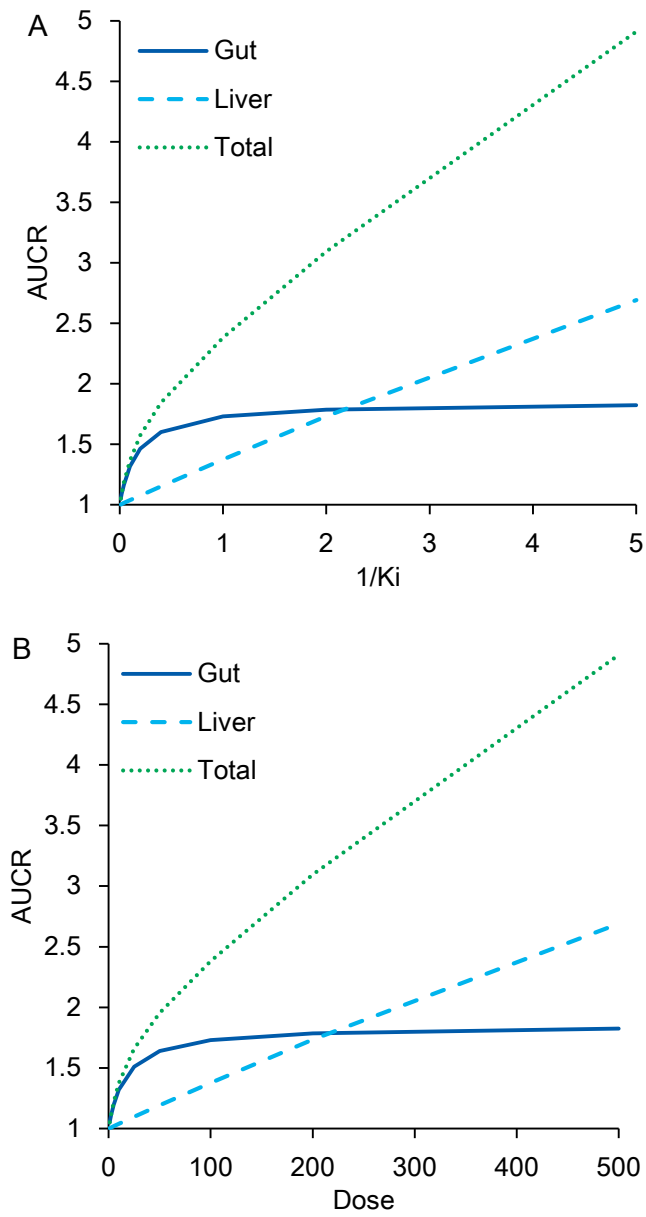


図 7 MSPK モデル解析における仮想相互作用薬併用時のミダゾラムの AUCR と K_i (A) 又は投与量 (B) の関係

表 1 市販薬の *in vitro* 阻害及び誘導パラメータ

Precipitant	Reversible inhibition	Time-dependent inhibition		Induction	
	K _i (μM)	K _I (μM)	k _{inact} (/min)	EC ₅₀ (μM)	E _{max}
atomoxetine	41.6 (5.7)	-	-	-	-
atorvastatin	51.8 (5.8)	29.9 (4.6)	0.019 (0.001)	16.6 ^a	13.5 ^a
azithromycin	-	599 (266)	0.013 (0.005)	-	-
casopitant	4.26 (0.80)	0.474 (0.127)	0.011 (0.000)	2.04 (0.84)	9.22 (1.10)
cimetidine	202 (7)	76.8 (51.4)	0.0060 (0.0022)	-	-
deferasirox	106 (30)	58.6 (58.8)	0.0044 (0.0022)	-	-
ethinyl estradiol	78.1 (9.8)	12.3 (3.5)	0.053 (0.005)	20.0 ^b	69.0 ^b
everolimus	0.647 (0.058)	0.675 (0.073)	0.016 (0.000)	0.00657 (0.0019)	2.42 (0.13)
felodipine	0.982 (0.121)	4.49 (1.19)	0.015 (0.001)	1.07 (0.31)	6.66 (0.49)
fluoxetine	13.5 (1.1)	3.90 (3.38)	0.0015 (0.0005)	0.50 ^b	2.1 ^b
fluvoxamine	23.5 (1.1)	1.85 (2.19)	0.00087 (0.00028)	28.0 (10.0)	4.42 (0.88)
pazopanib	9.31 (1.71)	4.00 (0.42)	0.017 (0.000)	0.807 (0.776)	2.43 (0.61)
ranitidine	847 (77)	491 (3970)	0.0036 (0.0245)	-	-
roxithromycin	43.9 (8.4)	0.926 (0.788)	0.0014 (0.0002)	-	-
simvastatin	0.462 (0.059)	19.4 (8.1)	0.0071 (0.0017)	5.75 (7.95)	43.6 (19.6)
suvorexant	1.11 (0.22)	0.797 (0.153)	0.039 (0.001)	14.0 ^c	11.0 ^c
tadalafil	32.7 (3.0)	4.74 (0.81)	0.043 (0.002)	1.82 (0.55)	21.0 (1.4)

- : 阻害あるいは誘導なし。括弧内の数値は標準誤差。^aVieira et al., 2014、^bFahmi et al., 2008、^cPrueksaritanont et al., 2013

表 2 市販薬の既存の文献上の *in vitro* 阻害パラメータ

Precipitant	Reversible inhibition		Time-dependent inhibition		
	K _i (μ M)	Reference	K _I (μ M)	k _{inact} (/min)	Reference
atomoxetine	34	Sauer <i>et al.</i> , 2004	-	-	
atorvastatin	12.4	Mc Donnell <i>et al.</i> , 2005	-	-	
azithromycin	85 ^a	Gascon and Dayer, 1991	105	0.0102	Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2011
casopitant	4.93 ^a	Motta <i>et al.</i> , 2011	3.1	0.0199	Motta <i>et al.</i> , 2011
cimetidine	275 ^a	Gascon and Dayer, 1991	-	-	
deferasirox	100 ^a	Skerjanec <i>et al.</i> , 2010	-	-	
ethinyl estradiol	21 ^a	Chang <i>et al.</i> , 2009	58.6	0.254	Zimmerlin <i>et al.</i> , 2011
everolimus	-		0.9	0.022	Kenny <i>et al.</i> , 2012
felodipine	0.25	Foti <i>et al.</i> , 2010	-	-	
fluoxetine	11.5	von Moltke <i>et al.</i> , 1996	8.6	0.005	Albaugh <i>et al.</i> , 2012
fluvoxamine	21.5 ^a	Obach <i>et al.</i> , 2006	-	-	
pazopanib	6 ^a	pazopanib NDA 022465	2.9	0.021	Mao <i>et al.</i> , 2016
ranitidine	-		-	-	
roxithromycin	34 ^a	Obach <i>et al.</i> , 2006	72	0.023	Fahmi <i>et al.</i> , 2008
simvastatin	0.385 ^a	Obach <i>et al.</i> , 2006	4.6	0.006	Zimmerlin <i>et al.</i> , 2011
suvorexant	2 ^a	Cui <i>et al.</i> , 2016	11.6	0.136	suvorexant NDA 204569
tadalafil	41	Ring <i>et al.</i> , 2005	27.5	0.228	Zimmerlin <i>et al.</i> , 2011

-, Drug Interaction Database (<https://www.druginteractioninfo.org>, University of

Washington, Seattle, WA) 内にデータなし

a, IC₅₀ の半分の値

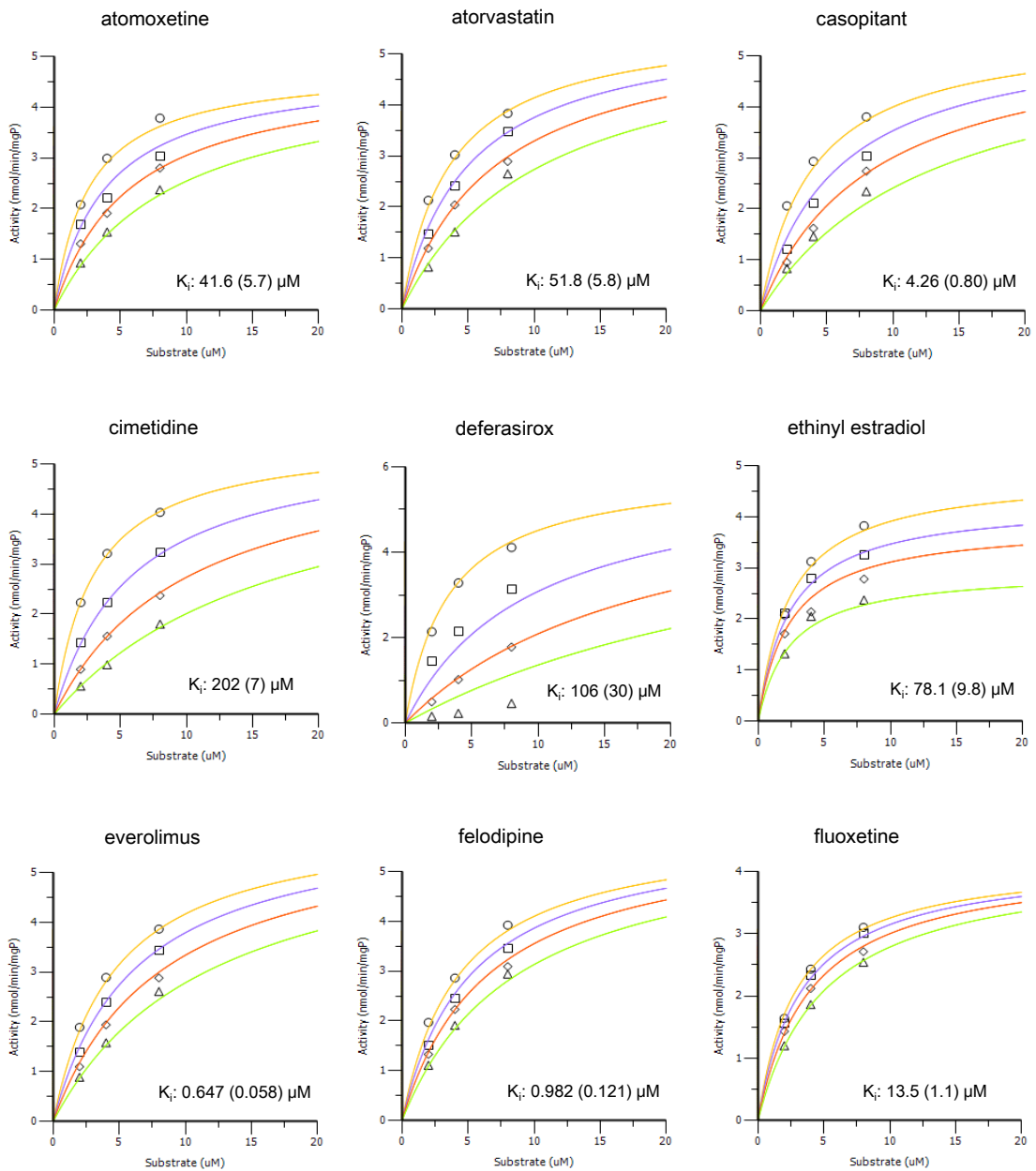


図 8 (1/2) ヒト肝ミクロソーム中の CYP3A の市販薬による可逆的阻害

X 軸はミダゾラム濃度、Y 軸はミダゾラム 1'-水酸化活性を表す。括弧内の数値は標準誤差。 Δ 、 \diamond 、 \square 、及び \circ はそれぞれ阻害剤なし、低濃度、中濃度、及び高濃度を表す。

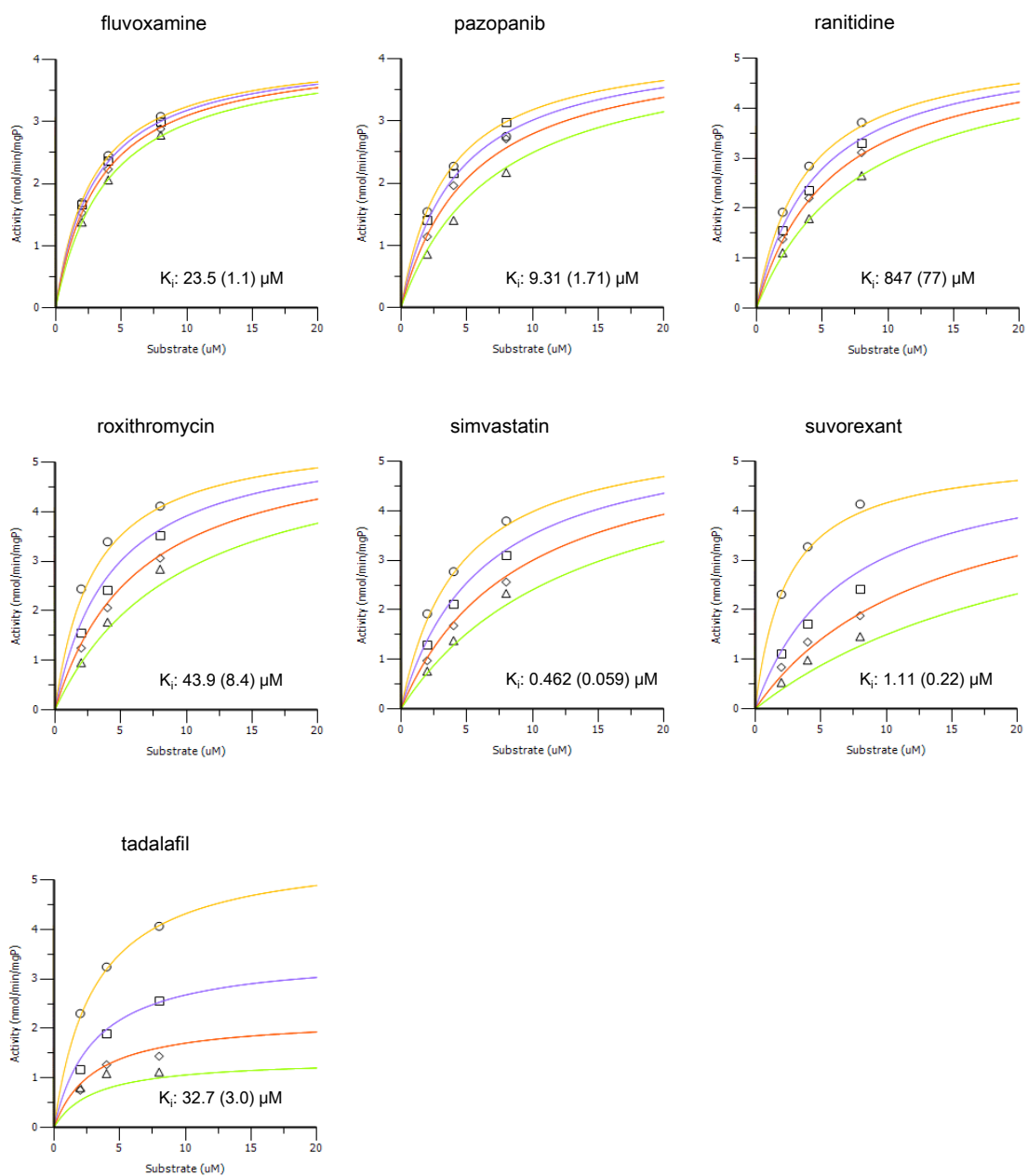


図 8 (2/2) ヒト肝ミクロソーム中の CYP3A の市販薬による可逆的阻害

X 軸はミダゾラム濃度、Y 軸はミダゾラム 1'-水酸化活性を表す。括弧内の数値は標準誤差。△、◇、□、及び○はそれぞれ阻害剤なし、低濃度、中濃度、及び高濃度を表す。

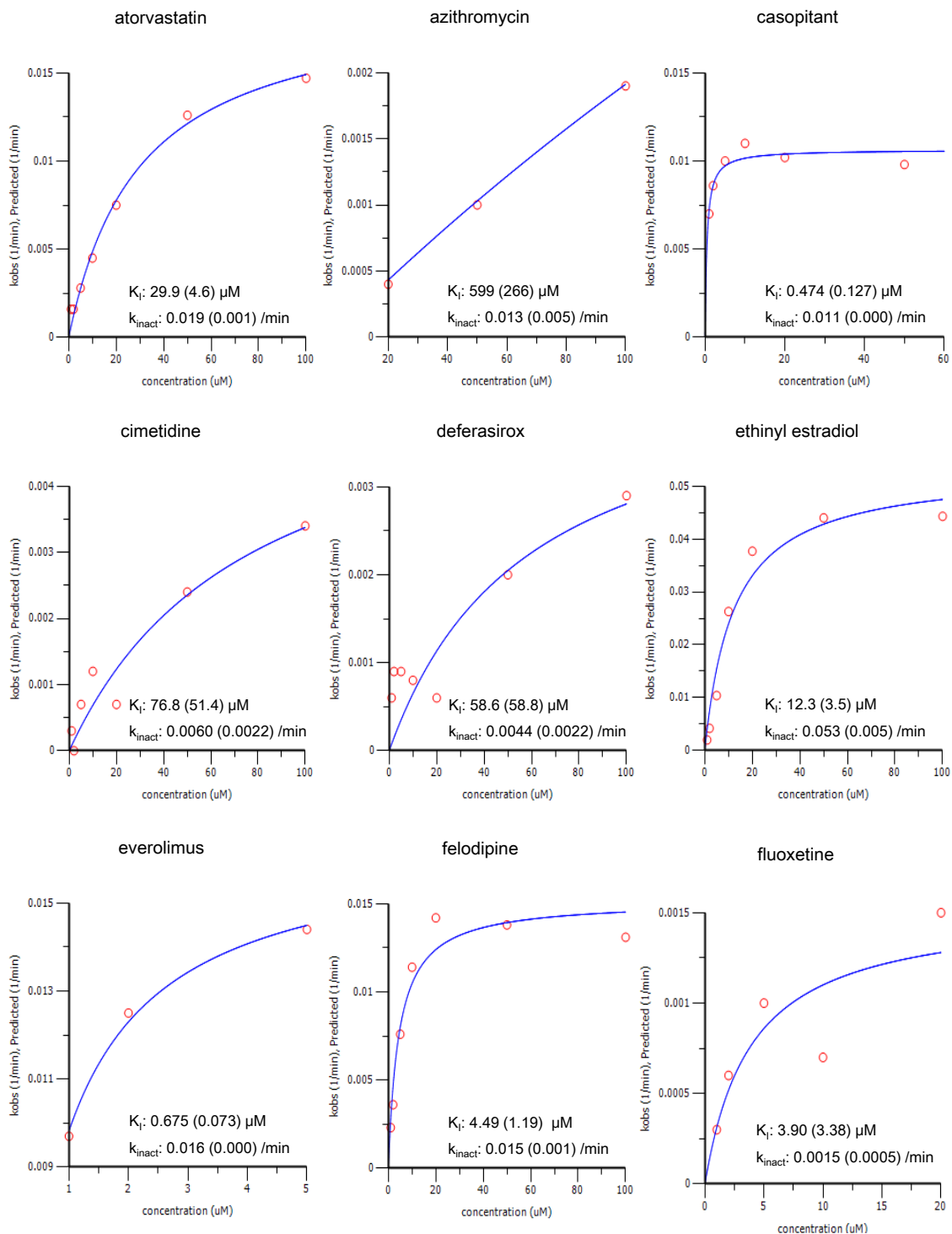


図 9 (1/2) ヒト肝ミクロソーム中の CYP3A の市販薬による時間依存的阻害

X 軸は相互作用薬濃度、Y 軸は見かけの不活化速度定数 (k_{obs}) を表す。括弧内の数値は標準誤差。

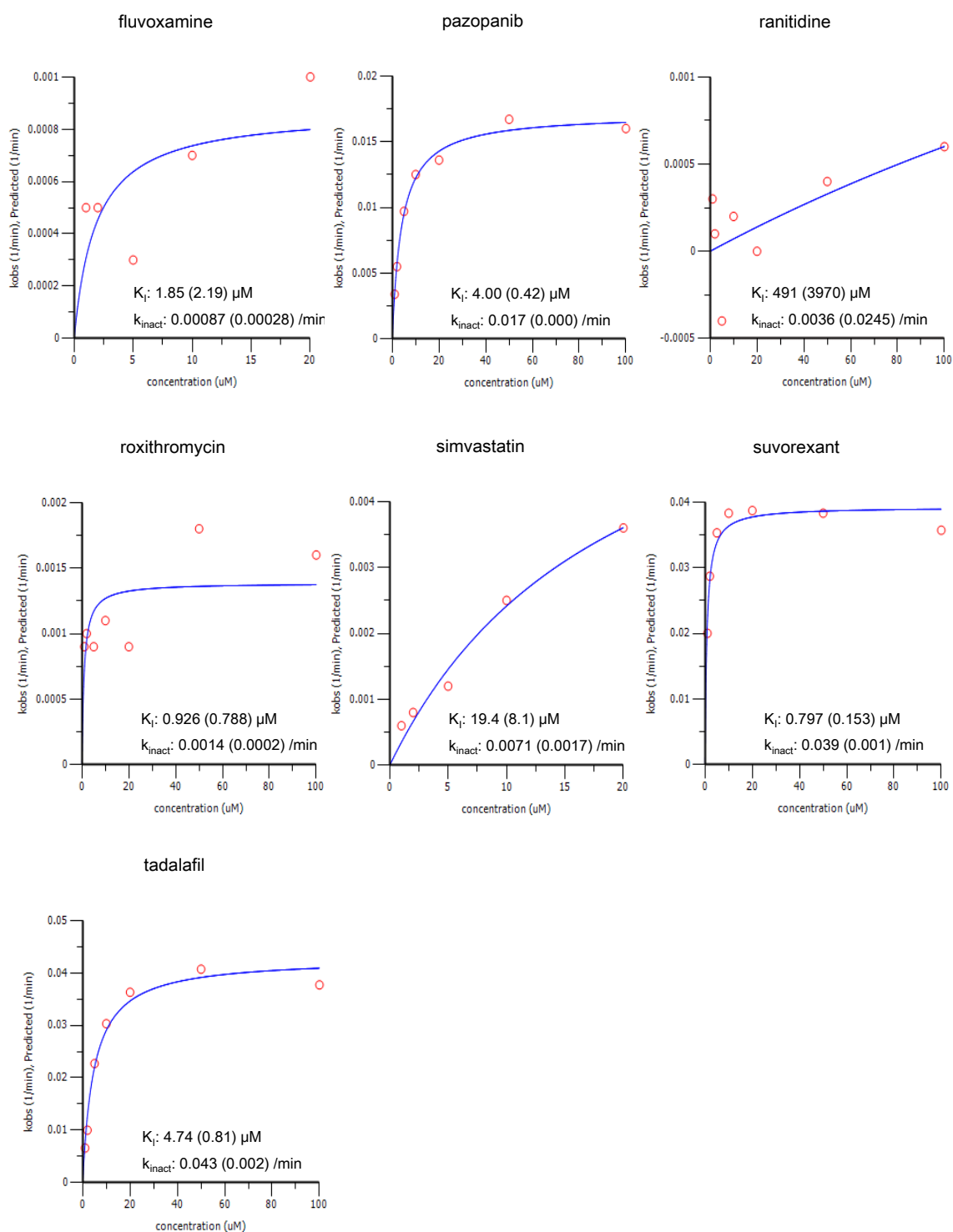


図 9 (2/2) ヒト肝ミクロソーム中の CYP3A の市販薬による時間依存的阻害

X 軸は相互作用薬濃度、Y 軸は見かけの不活化速度定数 (k_{obs}) を表す。括弧内の数値は標準誤差。

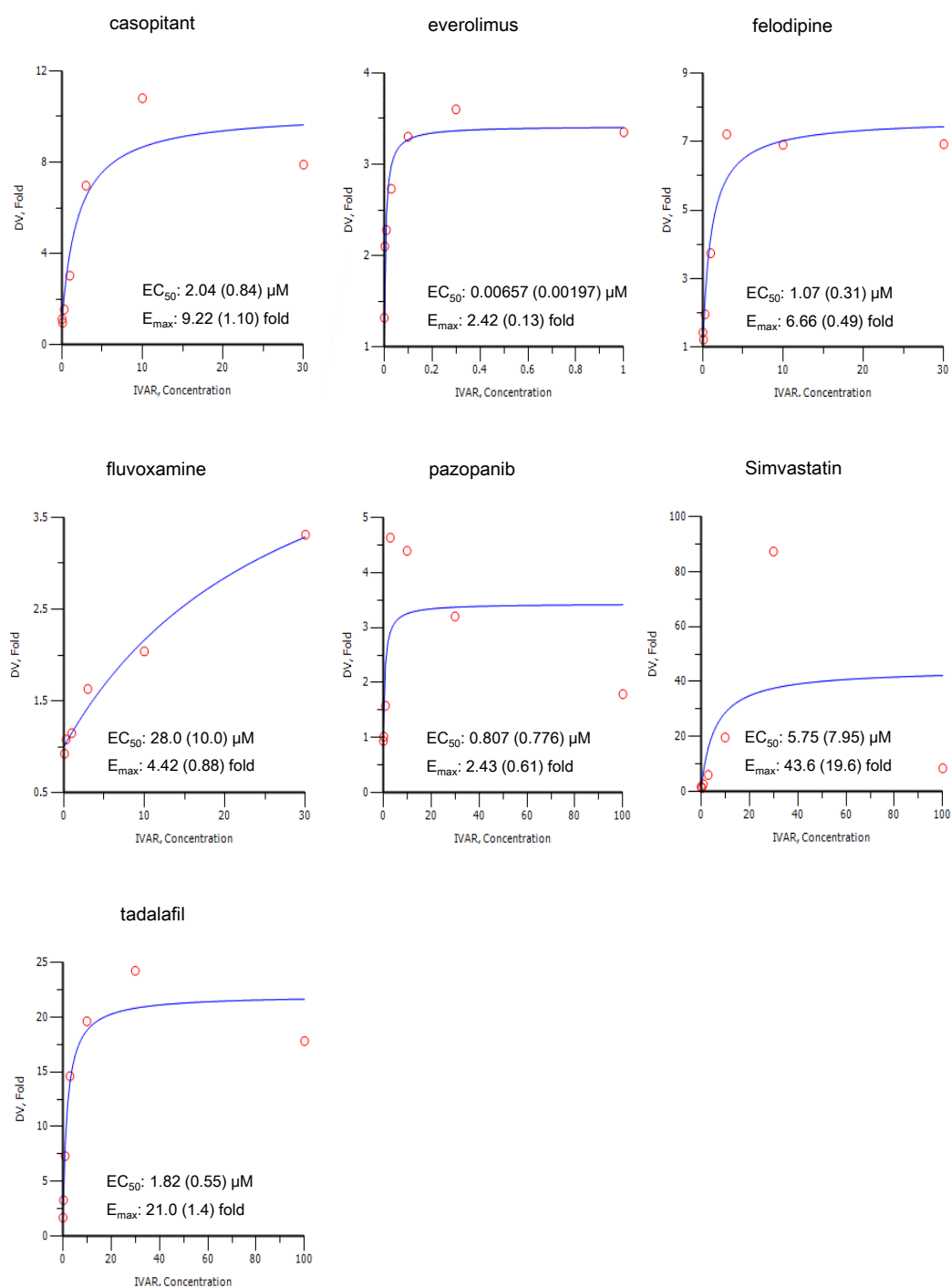


図 10 ヒト肝細胞中の CYP3A の市販薬による誘導

X 軸は相互作用薬濃度、Y 軸は mRNA レベルを表す。括弧内の数値は標準誤差。

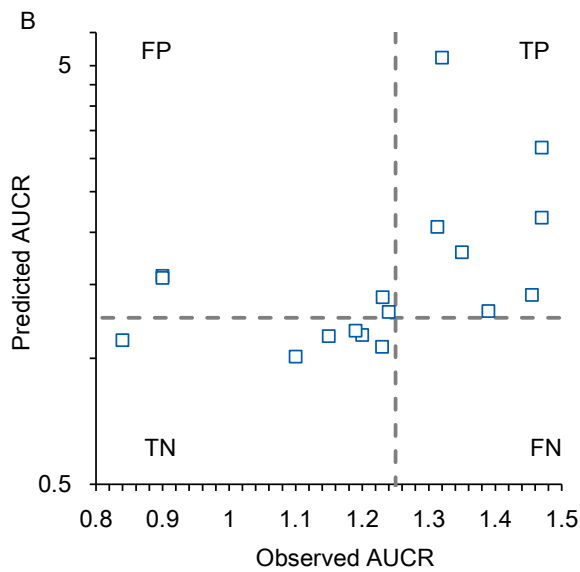
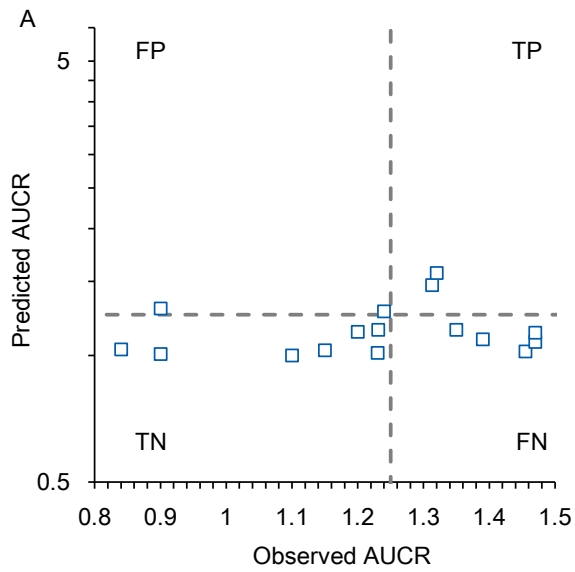
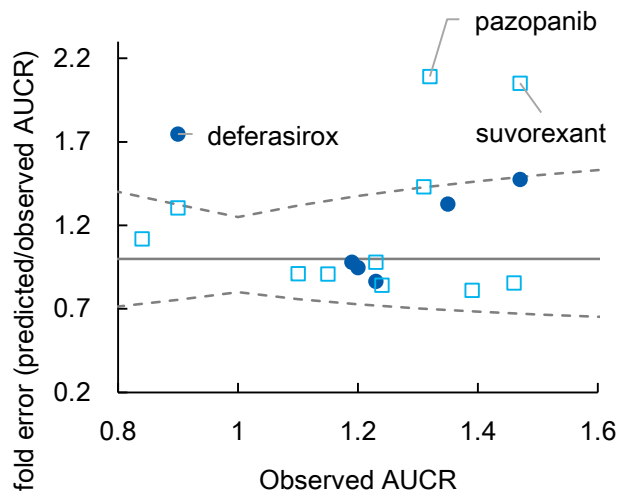


図 11 可逆的阻害のみ (A) あるいは可逆的及び時間依存的阻害 (B) を用いた GastroPlus による市販薬併用時のミダゾラムの予測 AUCR の実測値との比較

破線は 1.25 倍の AUCR を表す。FN: false negative、FP: false positive、TN: true negative、TP: true positive

A



B

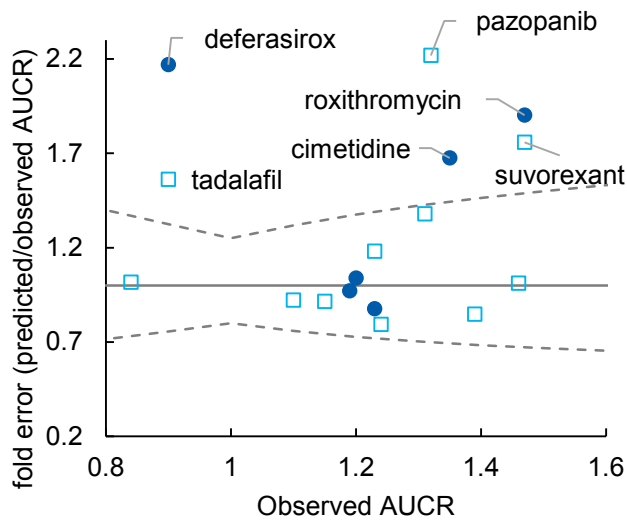


図 12 GastroPlus (A) 及び MSPK モデル (B) により予測された市販薬併用時のミダゾラムの AUCR の予測誤差 ●は阻害のみが観察された薬物、□は in vitro で阻害と誘導の両方を有する薬物を表す。実線は 1、破線は予測の成功の上限と下限を表す。

表 3 GastroPlus によりシミュレートされた市販薬併用時のミダゾラムの
AUCR まとめ

	Observed	Predicted			Predicted /Observed
		Gut (AUCR _g)	Liver (AUCR _h)	Gut and Liver (AUCR)	
atomoxetine	1.20	1.13	1.00	1.14	0.95
atorvastatin	1.15	1.05	1.00	1.05	0.91
azithromycin	1.19	1.15	1.01	1.17	0.98
casopitant	1.46	1.24	1.01	1.25	0.86
cimetidine	1.35	1.24	1.44	1.79	1.33
deferasirox	0.90	1.44	1.09	1.57	1.75
ethinyl estradiol	1.10	1.00	1.00	1.00	0.91
everolimus	1.31	1.90	0.99	1.88	1.43
felodipine	1.23	1.21	1.00	1.21	0.98
fluoxetine	0.84	1.02	0.92	0.94	1.12
fluvoxamine	1.39	1.04	1.08	1.13	0.81
pazopanib	1.32	1.72	1.61	2.76	2.09
ranitidine	1.23	1.05	1.01	1.07	0.87
roxithromycin	1.47	1.18	1.84	2.17	1.48
simvastatin	1.24	1.04	1.00	1.04	0.84
suvorexant	1.47	1.96	1.54	3.01	2.05
tadalafil	0.90	1.10	1.06	1.18	1.31

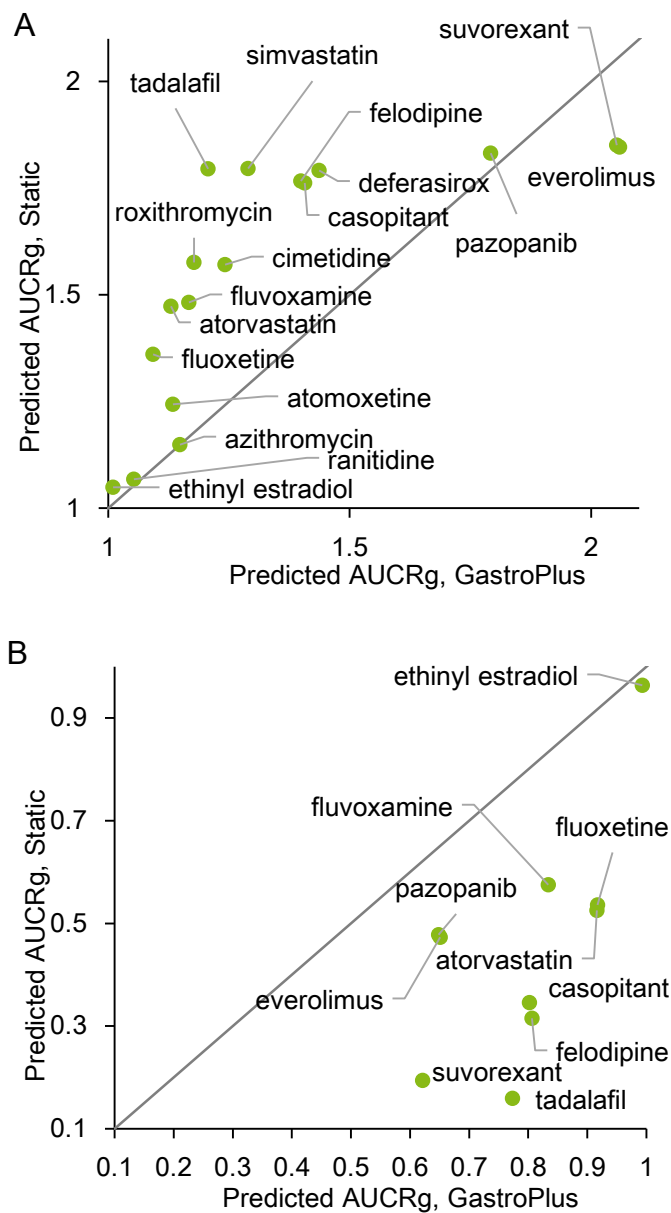


図 13 CYP3A 阻害 (A) あるいは誘導 (B) を用いた市販薬併用時のミダゾラムの消化管における予測 AUCR の GastroPlus と MSPK モデルの比較
実線は 1:1 を表す。

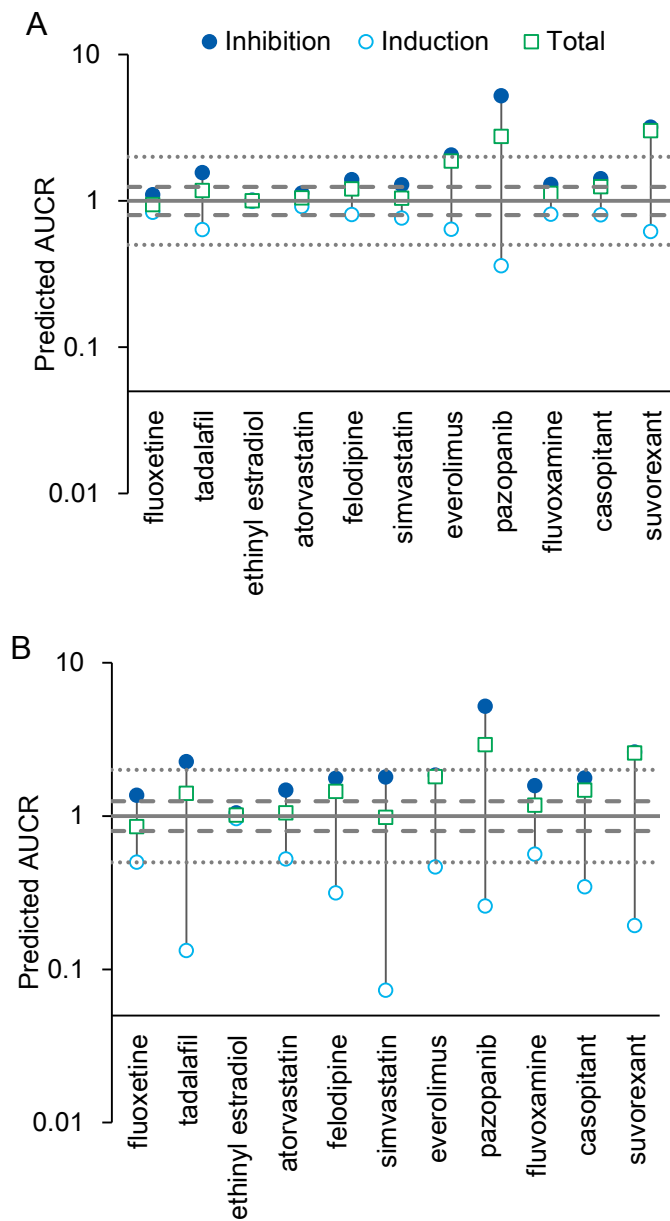


図 15 CYP3A の阻害と誘導の両方を示す相互作用薬における GastroPlus

(A) 及び MSPK モデル (B) による阻害と誘導の相殺

実線、破線、点線はそれぞれ AUCR が 1 倍、1.25 あるいは 0.8 倍、2 あるいは 0.5 倍を表す。左から 6 薬物は臨床試験で相互作用のない薬物。

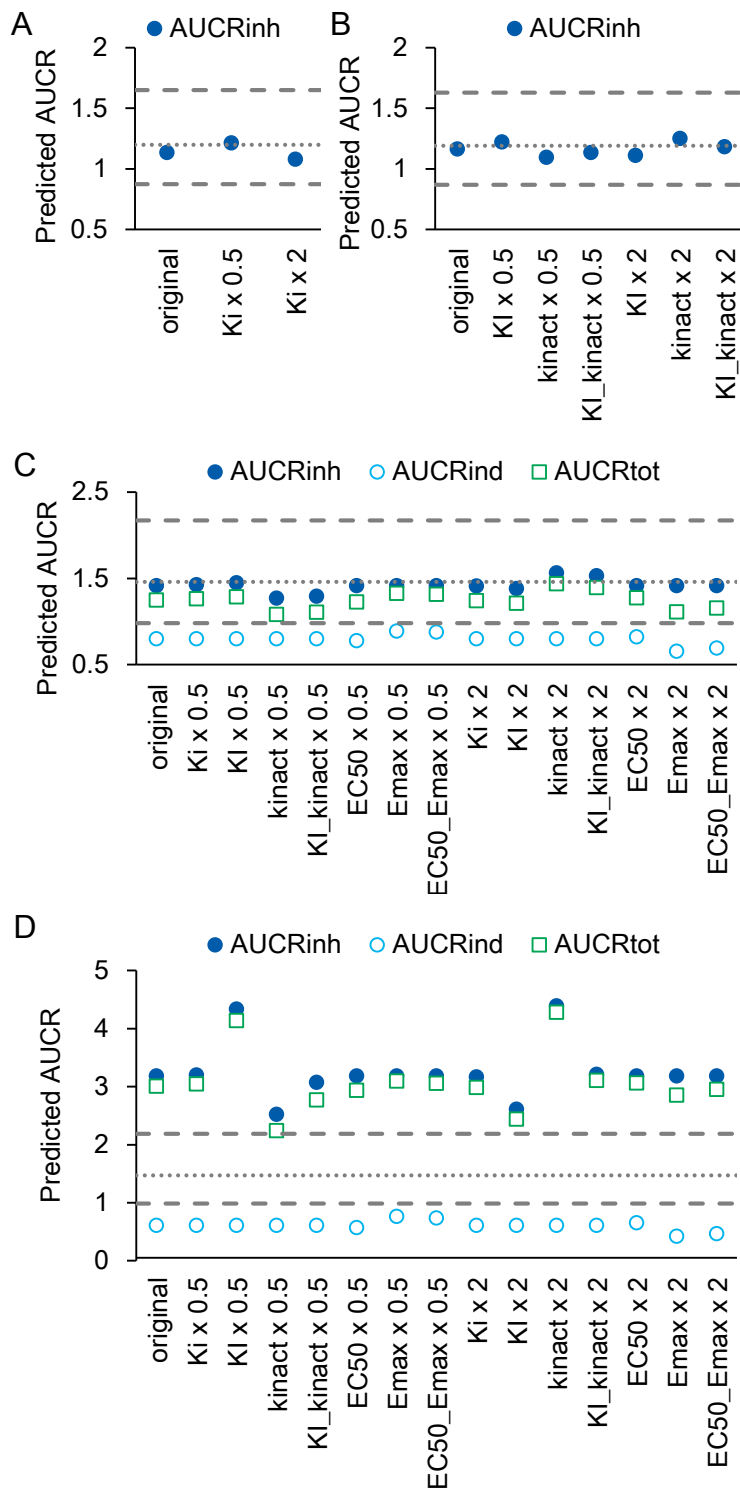


図 16 アトモキセチン

(A)、アジスロマイシン (B)、カソピタント (C)、及びスボレキサント (D) の DDI パラメータを変動させた場合の GastroPlus によるミダゾラムの推定

AUCR

阻害定数 (K_i)、最大不活化速度定数 (k_{inact})、 k_{inact} が半分になるときの濃度 (K_I)、誘導の最大効果 (E_{max})、誘導の 50% 効果濃度 (EC_{50}) を 0.5 倍及び 2 倍にし、ミダゾラムの AUCR を阻害のみ ($AUCR_{inh}$)、誘導のみ ($AUCR_{ind}$)、両方 ($AUCR_{tot}$) のメカニズムを組み込んでシミュレートした。破線は

Guest らの許容範囲の上限及び下限、点線は臨床試験結果を表す。

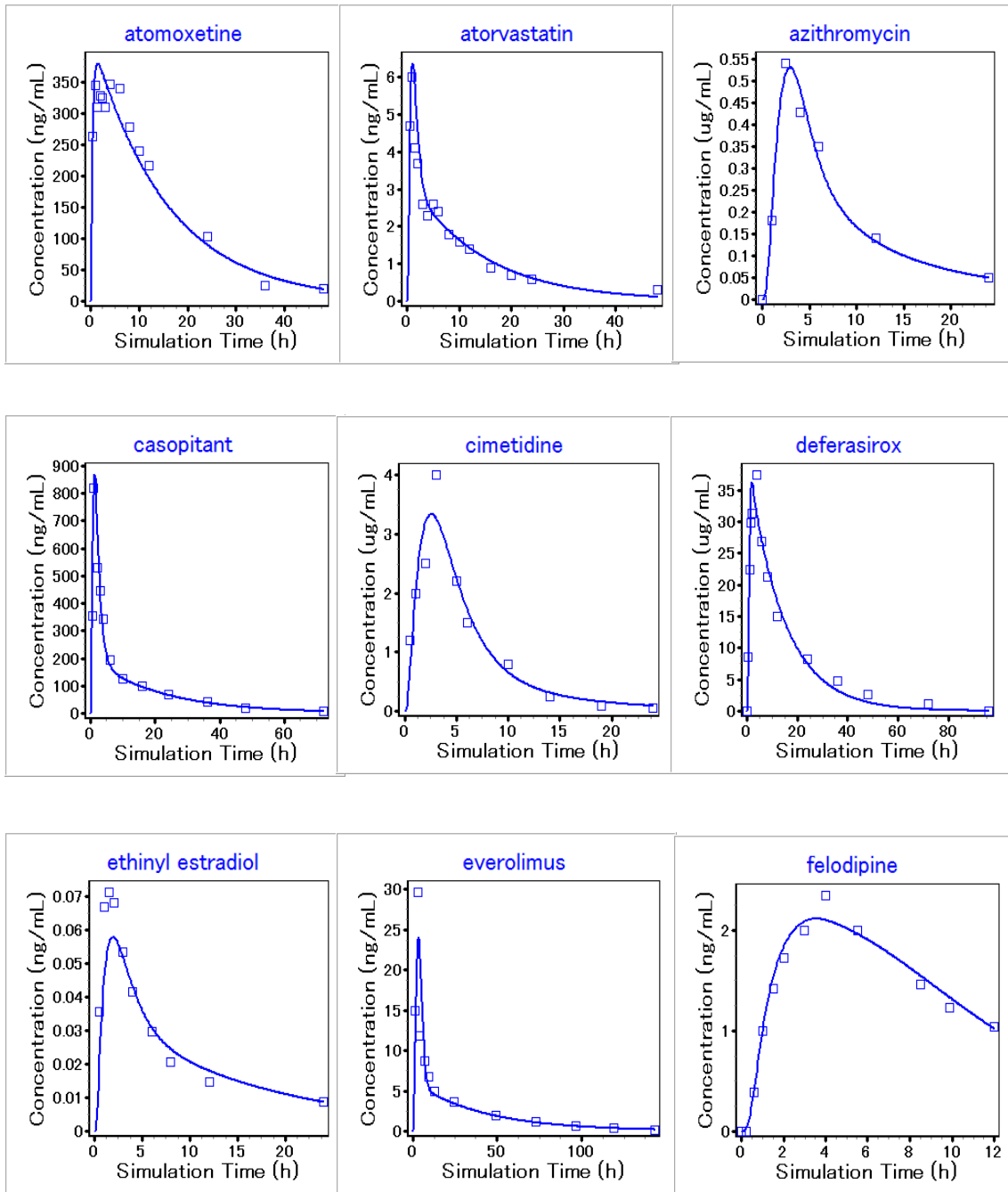


図 17 (1/2) GastroPlus によりシミュレートされた市販薬の血漿中濃度

□ : 実測値

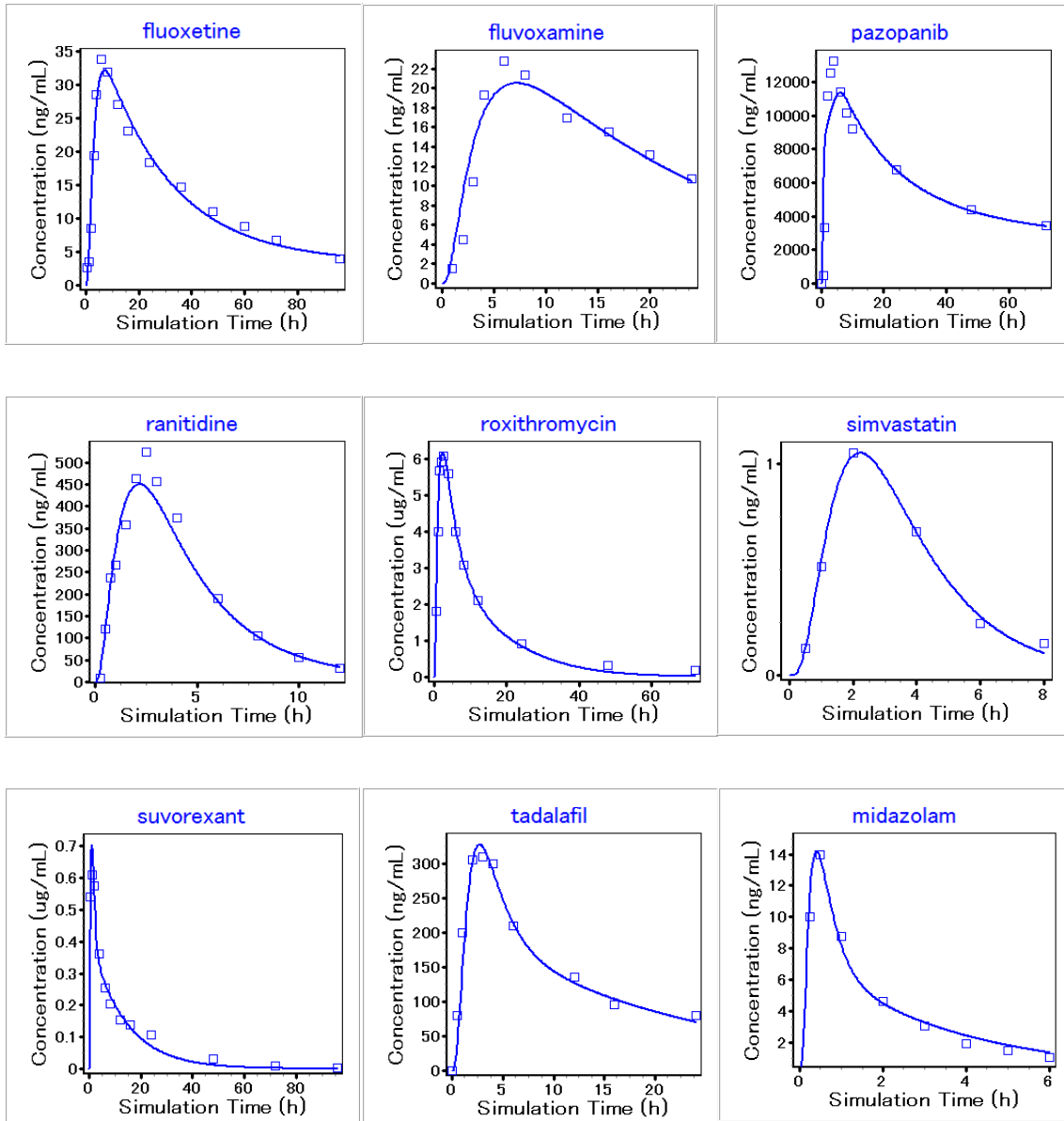


図 17 (2/2) GastroPlus によりシミュレートされた市販薬の血漿中濃度

□ : 実測値

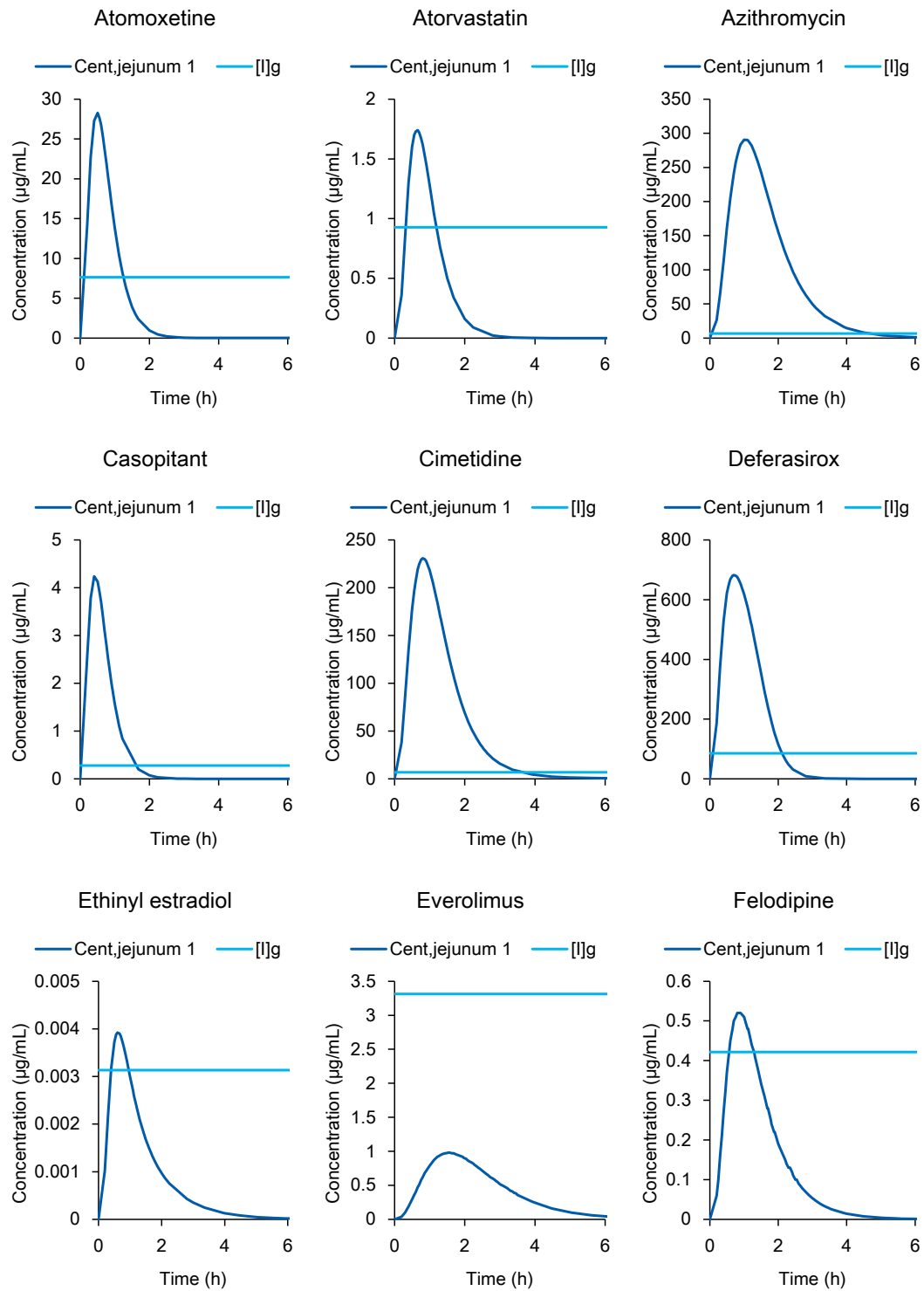


図 18 (1/2) GastroPlus によりシミュレートされた消化管濃度 (Cent, jejunum 1) 及び MSPK モデルで消化管濃度として用いられた濃度 ([I]g)

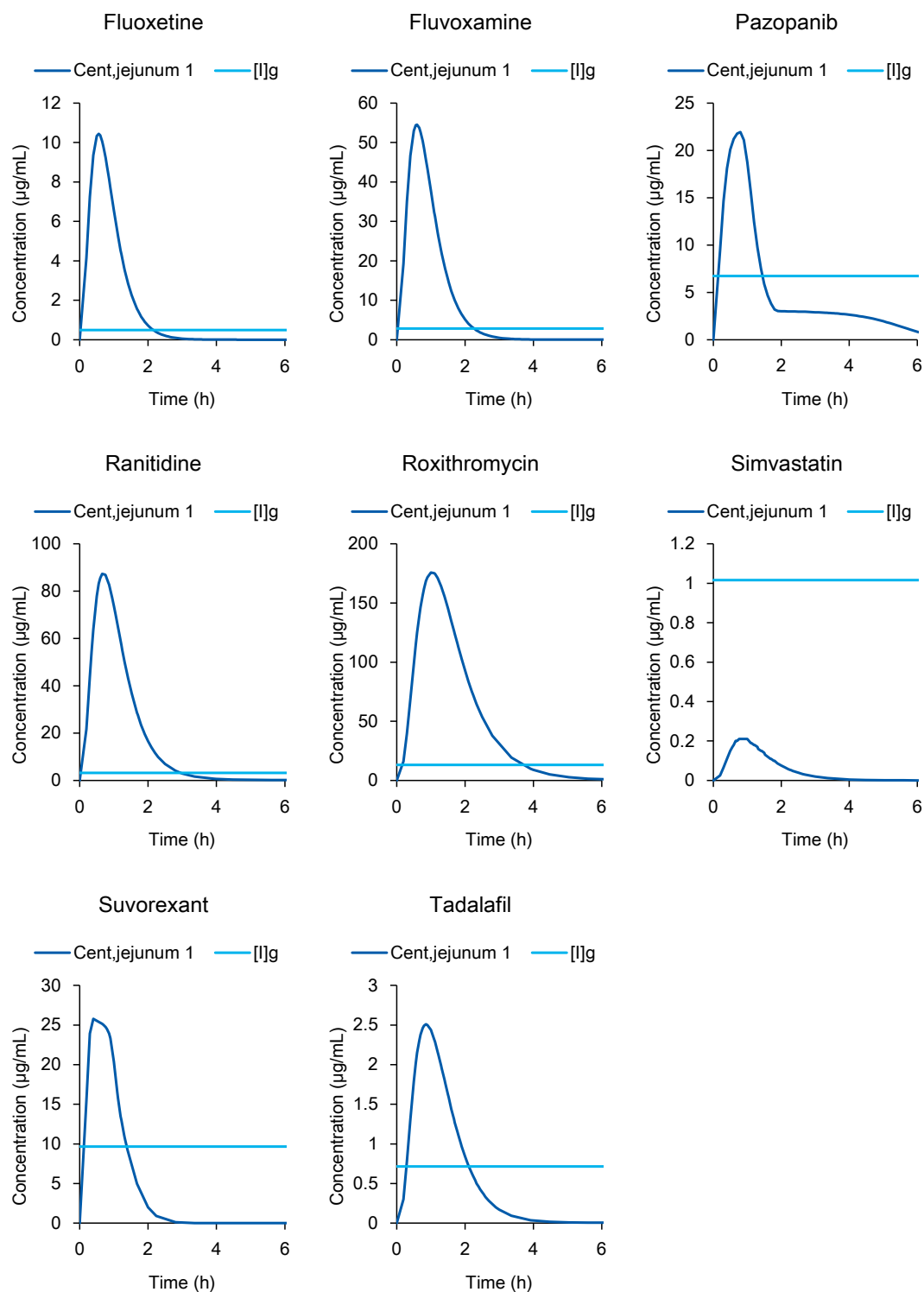


図 18 (2/2) GastroPlus によりシミュレートされた消化管濃度 ($C_{\text{Cent, jejunum 1}}$)
及び MSPK モデルで消化管濃度として用いられた濃度 ($[I]_g$)

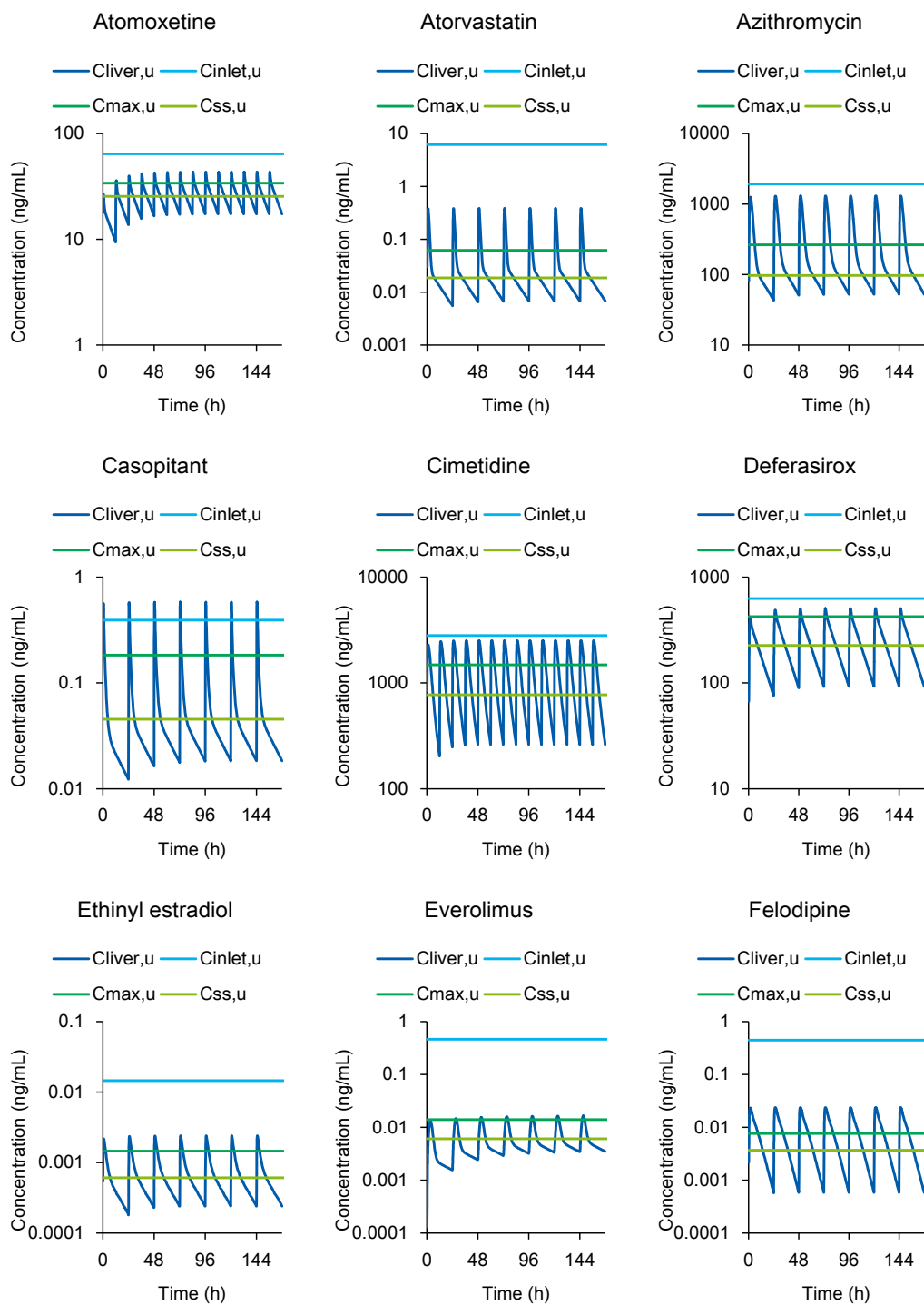


図 19 (1/2) GastroPlus によりシミュレートされた肝臓中濃度 ($C_{liver,u}$) 及び MSPK モデルで肝臓中濃度として用いられた濃度 ($C_{inlet,u}$ 、 $C_{max,u}$ 、及び $C_{ss,u}$)

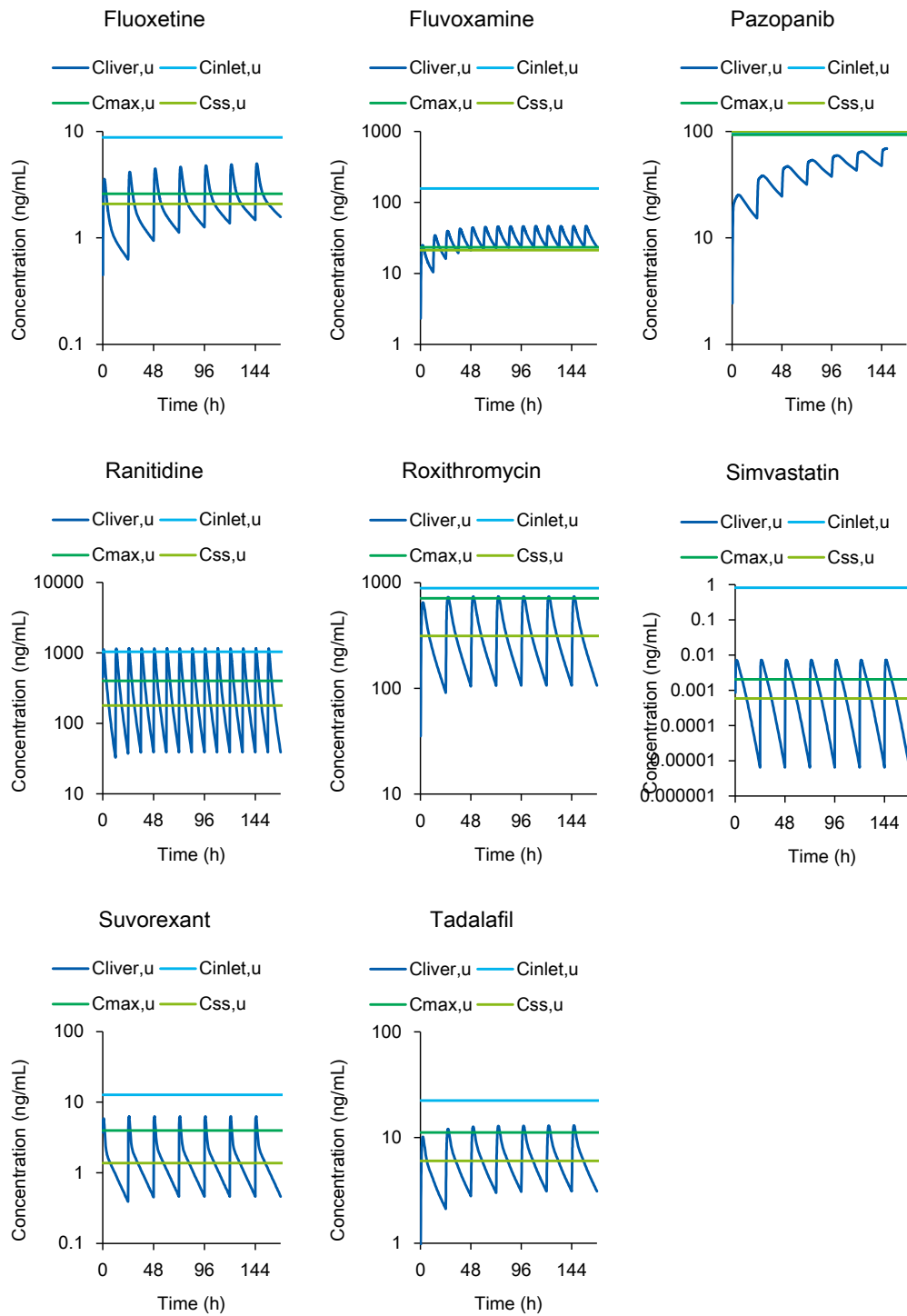


図 19 (2/2) GastroPlus によりシミュレートされた肝臓中濃度 ($C_{liver,u}$) 及び MSPK モデルで肝臓中濃度として用いられた濃度 ($C_{inlet,u}$ 、 $C_{max,u}$ 、及び $C_{ss,u}$)

第 2 章

新規降圧薬エサキセレノンの DDI 評価

要約

エサキセレノン (CS-3150) は、日本で高血圧治療薬として承認された新規経口非ステロイド型選択的ミネラルコルチコイド受容体ブロッカーである。本研究では、エサキセレノンの DDI リスクを *in vitro* で評価し、臨床における影響を推定した。エサキセレノンは CYP3A の TDI と誘導を示した。CYP3A に対するエサキセレノンの臨床での影響を、MSPK モデルを用いて阻害及び誘導について別々に推定したところ、典型的な CYP3A 基質であるミダゾラムの AUCR はそれぞれ 1.80 及び 0.31 であり、エサキセレノンと CYP3A の典型的基質との臨床 DDI 試験が必要と判断された。エサキセレノンとミダゾラムの DDI は主に消化管で起こることが示唆されたため、消化管の各セグメントにおける濃度推移を用いた予測を、PBPK 解析用ソフトである GastroPlus で実施した。阻害作用と誘導作用の両方を有する薬物の DDI 予測は通常困難であるが、エサキセレノン併用時のミダゾラムの予測 AUCR は臨床試験結果と近い値 (約 1.2) となった。阻害又は誘導のみをモデルに組み込んだ場合、ミダゾラムの AUCR はエサキセレノンの投与期間及び投与量、及びエサキセレノン投与後のミダゾラム投与のタイミングに応じて変化した。両作用を組み込んで算出した AUCR はほぼ一定であった。本研究は、消化管の CYP3A を介する弱い DDI をシミュレートするための PBPK モデルの有用性を示した。また、エサキセレノンは阻害と誘導の相殺のために相互作用薬としての DDI リスクが低いことが示唆された。

序論

エサキセレノン (CS-3150) は、新規経口非ステロイド型選択的ミネラルコルチコイド受容体ブロッカーであり、2019年1月に日本で高血圧症治療薬として承認を取得した。エサキセレノンは、グルココルチコイド、アンドロゲン又はプロゲステロン受容体に対してアゴニスト又はアンタゴニスト作用を示さず (Arai *et al.*, 2015a)、ラットモデルにおいて、アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体への結合を阻害し、強力かつ持続的な降圧及び心腎保護作用を示す (Arai *et al.*, 2015a; 2015b; Arai *et al.*, 2016)。臨床現場において、エサキセレノンは高血圧症患者の血圧を用量依存的に低下させ (Itoh *et al.*, 2019a; Ito *et al.*, 2020)、レニン・アンジオテンシン系阻害薬及びカルシウムチャネル遮断薬で降圧効果が不十分な患者において、52週間の持続的な作用を示した (Rakugi *et al.*, 2019)。また、微量アルブミン尿を伴う2型糖尿病患者における尿中アルブミンの低下は、エサキセレノンの腎保護作用を示している (Ito *et al.*, 2019b)。エサキセレノンは膜透過性が高く (Yamada *et al.*, 2019)、経口投与後に速やかに吸収され、90%前後の高いバイオアベイラビリティを示す (Kurata *et al.*, 2019)。エサキセレノンの主要な消失経路は代謝であるが、酸化、加水分解、グルクロン酸抱合等の複数の経路を介して代謝されることから、代謝酵素阻害薬により相互作用を受ける可能性は低いと考えられる (Yamada *et al.*, 2019; Kirigaya *et al.*, 2020a)。

他剤と併用されることの多い生活習慣病治療薬は、DDIを詳細に評価することが患者の安全性のために特に重要である。FDA、欧州医薬品庁、日本厚生労働省などの規制当局は、医薬品開発時に *in vitro* DDI試験を要求している。*in vitro*試験で、薬物が代謝酵素およびトランスポーターに対して阻害または誘導活性を有することが示唆される場合、臨床用量でのDDIリスクが予測される

が、理論的な最大濃度が持続すると仮定する MSPK モデルは DDI リスクを過大評価する傾向があるため (Vieira et al., 2014)、DDI を推定するためのより現実的な予測アプローチとして、PBPK モデルが用いられている (Jones et al., 2015; Guo et al., 2018; Shebley et al., 2018)。PBPK モデルを用いて臨床 DDI 試験の要否を判断できることが報告されているが (Hsueh et al., 2018)、被相互作用薬ではなく相互作用薬の DDI をシミュレートするための PBPK モデルが FDA に提出された例は少ない (Grimstein et al., 2019、補遺)。また、PBPK モデルの解析結果を根拠に相互作用薬としての臨床 DDI 試験を実施せずに承認されている薬剤はわずかである (Shebley et al., 2018)。阻害と誘導の両方を有する薬物については、同時予測は偽陰性につながる可能性があるため、DDI ガイダンスでは阻害と誘導を別々にシミュレートし保守的に判断することが推奨されており (Food and Drug Administration, 2020)、このことが臨床 DDI 試験数の増加につながっている。また、CYP3A を介した弱い DDI を予測する場合、消化管上皮細胞内の薬物濃度は通常肝細胞よりも高いため、相互作用の有無は通常消化管内での酵素活性の変化に依存する (図 7)。DDI 予測に関するこれまでの研究の多くは、消化管の CYP3A が完全に阻害される強い阻害剤を用いているため、消化管での弱い DDI の予測精度はより詳細に検討されるべきである。例えば、消化管 DDI 予測が不確実であることを理由に、レンバチニブの臨床 DDI 試験が規制当局によって要求されたという事例がある (Shebley et al., 2018)。

本研究では、まず、CYP 分子種、UGT1A1、UGT2B7、及び主要なトランスポーターに対するエサキセレノンの阻害能、ならびに CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 に対する誘導能を *in vitro* で評価した。*In vitro* 試験の結果を最高血漿中濃度 (C_{max}) と比較することによって臨床における DDI リスクが示唆された場合、MSPK モデルおよび PBPK モデリングソフトウェア (GastroPlus ver.

9.7.0009、Simulations Plus、Lancaster、CA) を用いて DDI リスクを評価した。製薬企業は、動物および in vitro データしか入手できない探索段階から PBPK モデルを用いるため (Jones et al., 2015)、モデル作成に実測のヒト PK データを用いた場合と用いない場合での DDI 予測性の比較も行った。入手可能なすべてのデータを用いて作成した最終的な GastroPlus モデルを用いて、エサキセレノンの投与期間および投与量、ならびにエサキセレノン投与後のミダゾラム投与タイミングの DDI に対する影響をシミュレーションし、阻害と誘導の相殺について考察した。

結果

In vitro DDI

ヒト肝ミクロソームにおける CYP および UGT の各分子種活性に対するエサキセレノンの阻害能

30 分間のプレインキュベーションを実施した場合としない場合の、CYP の各分子種に対するエサキセレノンの IC₅₀ 値を表 4 に示す。Eadie-Hofstee プロットおよび Dixon プロットをそれぞれ図 20 および図 21 に示す。エサキセレノンは CYP2B6 (K_i = 4.91 μM) 、 CYP2C8 (K_i = 13.1 μM) 、 CYP2C9 (K_i = 9.88 μM) 、 CYP2C19 (K_i = 8.52 μM) 及び CYP3A (K_i = 40.3 μM、ミダゾラム) に対して阻害を示した。いずれの分子種でも阻害様式は競合阻害と考えられた。エサキセレノン 5 mg を反復経口投与後の C_{max} が約 0.2 μM であることから考えると、これらの酵素の基質の体内動態を可逆的阻害により変化させる可能性は低いと考えられた。エサキセレノンは CYP1A2、CYP2A6、CYP2D6 又は CYP2E1 の活性を阻害せず、CYP3A4 基質としてテストステロンを使用した場合の IC₅₀ は 100 μM より大きかった。エサキセレノンは CYP3A4 の活性に対して TDI を示し、30 分間のプレインキュベーションをした場合の CYP3A4 の活性に対するエサキセレノンの IC₅₀ は、プレインキュベーションしない場合よりも小さかった (表 4) 。そこで、CYP3A4 基質としてミダゾラム及びテストステロンを用い、不活化試験を実施したところ、エサキセレノンの k_{inact} 及び K_I は、ミダゾラムに対してそれぞれ 0.0235 min⁻¹ 及び 44.8 μM であり、テストステロンに対してはそれぞれ 0.0306 min⁻¹ 及び 54.6 μM であった (表 4 及び図 22) 。

プールしたヒト肝ミクロソームを用いて、エサキセレノンの UGT1A1 及び UGT2B7 に対する阻害能を評価した。エサキセレノンの UGT1A1 及び UGT2B7

に対する IC_{50} (95% 信頼区間, confidence interval [CI]) はそれぞれ $23.6 \mu\text{M}$ (15.6-31.6) 及び $>100 \mu\text{M}$ であり、エサキセレノンの UGT1A1 に対する K_i (95% CI) は $23.6 \mu\text{M}$ (15.6-31.6) であった。

新鮮ヒト肝細胞における CYP 分子種に対する誘導能

エサキセレノンの CYP1A2、CYP2B6、または CYP3A4 に対する誘導能を、初代培養新鮮ヒト肝細胞 (3 例) を用いて検討した。エサキセレノンは細胞毒性作用を示さず、陽性対照であるオメプラゾール、リファンピシン、及びフェノバルビタールは十分な誘導を示した。各薬物の最大濃度における mRNA および酵素活性の倍数変化を図 23 に示す。エサキセレノンは CYP1A2 の mRNA 又は活性を誘導しなかったが、CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導能を示した。エサキセレノンによる CYP3A4 活性の増加は、エサキセレノンの阻害能のために、mRNA の増加よりも小さくなった。一般に、mRNA は代謝活性よりも誘導能の指標として優れていると考えられているため (Food and Drug Administration, 2020)、CYP3A4 誘導に関する E_{\max} 及び EC_{50} は mRNA のデータを用いて算出した。しかし、CYP2B6 については、CYP2B6 の代謝活性の変化が mRNA よりも大きかったことから、代謝活性を用いて誘導パラメータを算出した。エサキセレノン及び参照薬物 (CYP3A4 ではリファンピシン、CYP2B6 ではフェノバルビタール) の誘導パラメータを表 5 に示し、速度論的プロットを図 24 に示す。エサキセレノンの E_{\max} 及び EC_{50} は、CYP3A4 に対してそれぞれ 24.0~61.2 倍及び $4.1\sim 16.4 \mu\text{M}$ 、CYP2B6 に対してそれぞれ 5.52~15.5 倍及び $4.70\sim 21.0 \mu\text{M}$ であった。

トランスポーターに対する阻害能

MDCK-II 細胞に発現させた organic anion transporter (OAT) 1、OAT3、organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1、OATP1B3、organic cation transporter (OCT) 1、及び OCT2、HEK293 細胞に発現させた multidrug and toxin extrusion transporter (MATE) 1 及び MATE2-K、並びに Caco-2 細胞におけるヒト breast cancer resistance protein (BCRP) 及び p-glycoprotein (P-gp) の基質輸送に対するエサキセレノンの阻害作用を検討した。エサキセレノンの IC₅₀ (95% CI) 値は、OCT1 で 9.84 µM (3.79-15.9)、OCT2 で 31.0 µM (24.2-37.7)、MATE1 で 9.70 µM (6.78-12.6)、MATE2-K で 5.64 µM (4.38-6.91)、BCRP で 24.6 µM (4.81-44.5)、P-gp で 16.3 µM (12.2-20.5) であった。これらのトランスポーターに対する速度論的プロットを図 25 に示す。OAT1、OAT3、OATP1B1、及び OATP1B3 に対するエサキセレノンの IC₅₀ はいずれも 30 µM 以上であった。エサキセレノンの循環血中濃度を考慮すると、エサキセレノンが OCT1、OCT2、MATE1、及び MATE2-K の基質の体内動態に影響する可能性は低いと考えられた。P-gp および BCRP に関しては、相互作用薬の消化管内濃度 (I_{gut} 、 $[\text{dose}] / [250\text{mL}]$ の式により算出) を IC₅₀ で割った値 ($I_{\text{gut}}/\text{IC}_{50}$) がそれぞれ 2.63 及び 1.74 であったため、臨床で DDI を起こす可能性は低いと考えられた ($I_{\text{gut}}/\text{IC}_{50} \geq 10$ で DDI の可能性あり) (Food and Drug Administration, 2020)。

In vitro タンパク結合率及び血液/血漿中濃度比 (R_b)

血漿及び肝ミクロソームへのタンパク結合を、超遠心法を用いて測定した。エサキセレノン 30、300、及び 3000 ng/mL の血漿蛋白結合率 (平均値 ± S.D.) は、それぞれ 99.0 ± 0.3%、98.5 ± 0.5%、及び 98.2 ± 0.3% であった。肝ミクロソーム (0.2 又は 2 mg protein/mL) に対するエサキセレノン (50 µM) の非結合画分は、それぞれ 0.434 及び 0.066 であった。エサキセレノン 30、300、及び

3000 ng/mL の R_b (平均値 \pm S.D.) は、それぞれ 0.758 ± 0.114 、 0.772 ± 0.067 、及び 0.770 ± 0.044 であった。

MSPK モデルを用いた DDI リスク評価

エサキセレノン試験した CYP 分子種の中で CYP2B6 に対して最小の K_i を示し、CYP3A に対して TDI を起こした。また、CYP2B6 及び CYP3A4 に対して誘導が認められた。CYP2B6 または CYP3A4 基質とエサキセレノンとの臨床 DDI 試験の必要性について評価するために、MSPK モデルを用いて *in vivo* での DDI の可能性を解析した。可逆的阻害および誘導による CYP2B6 の酵素活性変化の予測値はそれぞれ 1.00 (A_h) および 1.02 (C_h) であり、CYP2B6 を介した DDI は臨床では起こらないと考えられた。CYP3A4 については、消化管上皮細胞中での発現が高いことから、消化管での DDI の可能性を考慮する必要がある。エサキセレノンの可逆的阻害、TDI、及び誘導による CYP3A4 の酵素活性変化は、消化管でそれぞれ 0.961 (A_g)、0.096 (B_g)、5.76 (C_g)、肝臓でそれぞれ 1.00 (A_h)、0.917 (B_h)、及び 1.03 (C_h) と推定された。これらの結果は、相互作用薬としてのエサキセレノンの DDI リスクを考える際、消化管における TDI と誘導が重要な因子であることを示している。FDA の DDI ガイダンス (Food and Drug Administration, 2020) の推奨に従い阻害と誘導を別々に考慮した場合、算出されたミダゾラムの $AUCR_{inh}$ 及び $AUCR_{ind}$ はそれぞれ 1.80 および 0.31 であったため、エサキセレノンは CYP3A を介した DDI を起こす可能性があると考えられた。なお、阻害と誘導の両方を組み込んで計算した $AUCR$ は 1.30 であった。

GastroPlus を用いた CYP3A を介した DDI の動的モデルシミュレーション

エサキセレノンの GastroPlus モデルは、以下の 3 種の PK パラメータを用いて作成した (表 14)。(1) 一種アロメトリックスケーリングによりサル PK データから予測、(2) 経口投与後の臨床 PK データに適合するように最適化、(3) 静脈内及び経口投与後の臨床 PK データから計算。シミュレートされたエサキセレノンの血漿および消化管上皮細胞 (例として空腸コンパートメント 1 の結果を表示) における濃度を図 26 に示す。シミュレートされた血漿中濃度はモデル 1 と 2 で異なるが (図 26 の A 及び B)、シミュレートされた消化管上皮細胞中濃度 (C_{ent} 、図 26 の C 及び D) は完全に同じになった。これは、 C_{ent} が主に溶解度、溶解速度、及び膜透過に基づいてシミュレートされたためであり、計算された $AUCR_g$ も等しくなった。モデル 3 については、絶対的バイオアベイラビリティ (89.0%) (Kurata et al., 2019) を用いて算出した FPE (肝臓で 4.86%、小腸で 6.41%) を入力した。 T_{max} が早すぎることから、粒子半径より予測された溶解速度が大きすぎると考え、粒子半径を最適化した結果、 C_{ent} が低くなった。臨床試験と同じ投与条件を用いてモデル 1~3 により算出した阻害のみ、誘導のみ、及び阻害と誘導の両方の条件下における消化管及び肝臓の $AUCR$ を表 6 に示す。算出されたミダゾラムの $AUCR$ は 3 つのモデル間で同等であったが、 $AUCR_{inh}$ 及び $AUCR_{ind}$ の変化はモデル 1 または 2 よりもモデル 3 で小さかった。3 つのモデルを用いた $AUCR_{tot}$ は、1.17~1.23 であり、エサキセレノンは CYP3A 阻害と誘導の両方を併せ持つことにより DDI リスクが低くなっていることが示唆された。また、これらの値は臨床試験で報告された値 (約 1.2) に近かった (Furuie et al., 2019)。3 つのモデルのいずれにおいても、 $AUCR_h$ は阻害あるいは誘導を別々に評価した場合でも 1 に近い値になった。このことから、相互作用は主に小腸で起こっており、肝臓における相互作用は無視できることが示唆される。エサキセレノンの K_i 、 K_{inact} 、 K_I 、 E_{max} 、

EC₅₀を0.5倍及び2倍にした場合、0.1倍及び10倍にした場合、及びエサキセレノンの溶解度、P_{eff}、粒子半径を0.5倍及び2倍にした場合の、エサキセレノン5mgを14日間併用時のミダゾラムのAUCRを図27に示す。DDIパラメータ及び物性パラメータを2倍変動させた場合、阻害のみ、誘導のみを組み込んだ場合のAUCRは変動させたパラメータに応じて変動したが、阻害と誘導の両方を組み込んだ場合のAUCRはいずれもGuestらが提唱した弱い相互作用薬のための予測性評価の基準内であった。DDIパラメータを大きく(10倍)変動させた場合は、一部の条件でAUCRがGuestらの基準を外れた。エサキセレノンの投与期間(5mg、1日1回、1、2、3、14日間)、ミダゾラムの投与タイミング(エサキセレノン投与後0、1、2、12時間)、またはエサキセレノンの投与量(1.25、2.5、5、10mg)を変化させた場合のミダゾラムのAUCRを図28に示す。エサキセレノン5mg単回投与によるミダゾラムのAUCR_{inh}は14日間投与時より小さかった。3日間投与後のAUCR_{inh}は14日間投与後に比べてやや小さかった。しかし、3日間投与後の誘導も14日間投与後に比べてやや弱かったため、3日目と14日目のAUCR_{tot}はほぼ同じであった。ミダゾラムとエサキセレノンを同時投与した場合と比較して、エサキセレノン投与の1時間後または2時間後にミダゾラムを投与すると、AUCR_{inh}は大きく、AUCR_{ind}は小さくなり、結果としてAUCR_{tot}は同等になった。ミダゾラムをエサキセレノン投与の12時間後に投与した場合、1または2時間後に投与した場合よりもAUCR_{inh}が小さくなったが、これはおそらく酵素のターンオーバーのためである。エサキセレノンの投与量を1.25~10mgに変化させてDDIシミュレーションを行うと、用量依存的にAUCR_{inh}は大きくなりAUC_{ind}は小さくなったが、AUCR_{tot}は相殺のためほぼ一定であった。すなわち、阻害による代謝活性の低下は、誘導による酵素の増加によって軽減された。MSPKモデルの結果と比較して、

PBPK モデルは、いずれの条件においても阻害及び誘導を弱くシミュレートした (図 28)。TDI が無く可逆的阻害と誘導作用がエサキセレノンより強い仮想相互作用薬 (K_I と EC_{50} がエサキセレノンの 1/50) を用いてシミュレーションを行った結果を図 29 に、可逆的阻害、TDI、誘導、およびそれらが相殺された場合の酵素活性の変化を図 30 に示す。仮想相互作用薬では投与期間や投与タイミングによる酵素活性の変動は大きく、ミダゾラムの AUC_{tot} も大きく変化した。ミダゾラムの消化管 CYP3A に対する V_{max} を 2、4、及び 8 倍にすることでミダゾラムより小さい F_g を有する仮想基質モデルを作成したところ、 F_g はそれぞれ 0.31、0.16、及び 0.08 となった。仮想基質とエサキセレノンの DDI シミュレーション結果を図 31 に示す。 F_g の小さい基質と併用した場合でもエサキセレノンの DDI リスクは低いことが示唆された。

考察

本研究では、相互作用薬としてのエサキセレノンの DDI リスクを *in vitro*、MSPK モデル、及び PBPK モデルで評価し、消化管における弱い DDI の予測に対する PBPK モデリングソフト GastroPlus の有用性についても考察した。エサキセレノンは、CYP3A 以外の主要な酵素及びトランスポーターの阻害を介した臨床的に重要な DDI を起こす可能性が低い、全くないことが示された。今回の結果から、P-gp を介した DDI の可能性は低いことが示唆されたが、P-gp の代表的な基質であるジゴキシンは治療域が狭いこととエサキセレノンとの併用の可能性が高いことから、ジゴキシンの PK に対するエサキセレノンの併用投与の影響を検討するため、健康成人を対象とした臨床 DDI 試験が実施された。当該試験において、エサキセレノンはジゴキシンの定常状態における PK に臨床的に問題となる影響を及ぼさず (Kirigaya et al., 2020b)、MSPK モデル解析結果と一致した。エサキセレノンの循環血中の代謝物については、O-グルクロン酸抱合体の存在比が最も高く（未変化体の約 50%）(Yamada et al., 2019)、極性の高い代謝物の代謝阻害が通常未変化体よりも弱いことを考慮すると (Yu and Tweedie, 2013)、エサキセレノンの代謝物による DDI リスクは低いと考えられる。

エサキセレノンによる CYP3A の TDI 及び誘導の臨床における DDI リスクを評価するためには、モデリング解析が必要と考えられた。阻害と誘導の相殺（すなわち、阻害による酵素活性の低下が誘導による酵素発現の増加により打ち消される現象）を正確に推定することは困難であるため、FDA の DDI ガイダンスでは阻害と誘導を別々に評価することを推奨している (Food and Drug Administration, 2020)。MSPK モデルにより阻害と誘導を別々に評価したところ、消化管における DDI の可能性が示唆されたため、ミダゾラムを用いた臨床

DDI 試験が実施された (Furuie et al., 2019)。しかしながら、MSPK モデルは偽陰性を避けるために、相互作用薬の理論上の最大濃度が持続するという非現実的な仮定がされており、リスクを過大評価する傾向があるため (Vieira et al., 2014)、より現実的な予測には PBPK モデリングアプローチが用いられる。CYP3A を介した DDI の PBPK モデルを用いた解析はこれまで広く行われてきたが、強い相互作用に焦点を当てたものが多く、消化管の CYP3A を介した弱い DDI の予測性の検証は不十分であった。そこで我々は、第 1 章において弱い阻害または阻害と誘導の両方を示す 17 種類の薬物を用いて弱い DDI の予測性を確認し、GastroPlus が弱い CYP3A に対する相互作用薬とミダゾラムの DDI を良好に予測することを確認した。

今回の研究では、CYP3A の阻害と誘導の両方を介したエサキセレノンとミダゾラムの DDI を、第 1 章に準じた方法を用いて GastroPlus によりシミュレートした。限られたデータで作成されたモデルの予測性を比較するために、3 つの GastroPlus モデルを、実際の医薬品開発プロセスを考慮して段階的に作成した。通常臨床試験開始前のモデルの構築には、非臨床データから予測したヒトの PK パラメータが用いられる。臨床試験開始後、モデルはヒトの PK データを用いて精緻化される。前臨床段階ではヒト PK を予測するために複数のアプローチが用いられるが、本研究では例として、静脈内投与後のサル PK データを用いたアロメトリックスケーリング (Lombardo et al., 2013a, b) を使用し、モデル 1 を構築した。臨床開発初期段階の経口薬については経口投与後のデータしか入手できないことが多いため、モデル 2 にはエサキセレノン経口投与後の血漿中濃度推移 (Kato et al., 2018) を用いた。DDI が主に消化管内で起こる場合、経口投与時のデータから推定された PK パラメータ (CL、 V_c 、 K_{12} 、及び K_{21}) と静脈内投与時のデータから算出された真の PK パラメータとの間に違い

があっても DDI を予測することができた。言い換えると、モデル 2 のように経口投与後の PK プロファイルについて PK パラメータを最適化した場合、血漿中濃度推移が実測値に近いだけでは消化管 DDI 予測モデルの妥当性の根拠として不十分である。消化管 DDI 予測には、適切な溶解度と膜透過性を用い、必要に応じて消化管代謝を考慮することが重要である。モデル 3 では、初回通過効果を入力し溶出速度を遅くしたことにより C_{ent} が低下し (図 26C、D)、その結果予測 $AUCR_{inh}$ が小さくなった。しかし、 $AUCR_{ind}$ が大きく予測されたため、誘導による阻害の相殺後の $AUCR_{tot}$ は、モデル 1 および 2 のものと同等であった。静脈内データを用いることにより一般的には予測精度が向上すると考えられるが、今回の試験では明らかな差は認められなかった。これらの結果から、エサキセレノンのように阻害と誘導の両方が弱い薬物については、経口投与後のデータのみを用いて妥当なモデルを作成することができると考えられた。実際、第 1 章では経口投与後のデータを用いて作成したモデルにより良好な予測性が得られた。

予測に用いたパラメータの実験誤差等によるばらつきの影響を考察するため、DDI パラメータ及び物性パラメータを変化させ、予測性への影響を確認した (図 27)。弱い DDI の予測が DDI パラメータの変動の影響を受けにくい理由は、第 1 章での市販薬を用いた検証と同様、 $AUCR$ ではなく AUC の変化率が影響を受けるためと考えられる。また、物性パラメータの変動は消化管上皮細胞中濃度に影響するが、阻害と誘導の強弱が同時に逆方向に変動するため、阻害と誘導を両方組み込んだ場合の $AUCR$ はほとんど変動しなかった。阻害と誘導の両方を組み込んだ場合の $AUCR$ は Guest らの基準内であるものの、一部の条件で、臨床 DDI 試験の要否を判断する基準である 1.25 を超えている。しかし、ほぼすべての条件で弱い相互作用薬の基準の範囲内 ($AUCR : 0.5-2$) で

あり、任意の実験データから臨床試験が不要と判断した際に、臨床現場で予想外に強い DDI が起こる可能性は低いと考えられた。

阻害と誘導の両方が起こった場合、DDI の程度が投与期間によって変わる可能性がある。例えば、リトナビルは CYP3A4 の可逆的阻害、TDI、および誘導を併せ持っている。リトナビルを 9 日間経口投与し、1、2、3、5、8 及び 9 日目にミダゾラムを経口投与したとき、ミダゾラムの AUCR は 3 日目にピークに達し、その後有意に低下した (Katzenmaier et al., 2011)。同様に、別の試験では、チプラナビル/リトナビルを単回投与したときのミダゾラムの AUCR は、チプラナビル/リトナビルを 10 日間反復投与したときよりも大きかった (Dumond et al., 2010)。以上のように、臨床現場では誘導による阻害の相殺が起こる場合があるため、臨床 DDI 試験は最大効果を見逃さないようにデザインすべきである。これまでも、複雑な DDI のメカニズムを理解し、臨床試験をデザインするために、PBPK モデルが用いられている (Guest, Rowland-Yeo, et al., 2011; Gertz et al., 2013; Liu et al., 2017)。本研究で、エサキセレノンの投与期間とエサキセレノン投与後のミダゾラムの投与タイミングを変化させて DDI をシミュレートしたところ、ミダゾラムの AUCR の変化は投与条件の影響を受けにくかった。これは、エサキセレノンの可逆的阻害が弱く、臨床では TDI と誘導のみが DDI に影響を及ぼす可能性があるためである。可逆的阻害と誘導のみがエサキセレノンより強い仮想相互作用薬を用いてシミュレーションを行った場合、投与期間や投与タイミングに応じて $AUCR_{tot}$ が大きく変化した (図 29)。可逆的阻害、TDI、誘導、およびそれらが相殺された場合の酵素活性の変化 (図 30) より、投与タイミングを遅らせることにより可逆的阻害による変化は減少し、TDI による変化はわずかに増加することが示唆された。いずれの場合も、消化管の CYP3A が最大限に阻害されると、明確な変化が見られない可能性がある

る。弱い TDI と弱い誘導を併せ持つ場合には、投与タイミングを遅らせることで阻害も誘導も強くなるため、相殺により影響が緩和されることになる。同一の薬物を用いて複数の投与条件で実施された臨床試験結果の報告は少ないため、強い阻害及び強い誘導の相殺の予測の信頼性については、更なる評価が必要である。本研究では、エサキセレノンの DDI は、阻害と誘導の相殺のため投与量による影響を受けにくく（図 28C）、エサキセレノンは承認最大用量の 2 倍にあたる 10 mg を投与しても DDI リスクが低いことが示唆された。エサキセレノンは高血圧症の治療薬であるため様々な薬剤と併用されることが想定され、その中には低 F_g の薬剤が含まれる可能性もある。消化管の CYP3A を最大に阻害する薬物は、低 F_g の基質の AUCR を大きく増加させる可能性があるが、エサキセレノンは相互作用が弱いため、AUCR の増加は限定的であり、誘導による相殺により更に変化が緩和されると予測された（図 31）。第 1 章の研究でも同様の傾向が認められたが、残念ながら弱い相互作用薬が複数の CYP3A 基質と臨床試験を実施した例は少なく、この仮説の検証には更なる検討が必要である。

結論として、相互作用薬としてのエサキセレノンの DDI リスクは低い。エサキセレノンは *in vitro* でいくつかの酵素及びトランスポーターに対して可逆的な阻害作用を示したが、臨床曝露を考慮すると他剤の動態に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。TDI と誘導の相殺のため、エサキセレノンと CYP3A 基質との DDI は、投与期間やタイミングなどの投与条件の影響をほとんど受けないと考えられる。本研究では消化管の CYP3A を介した DDI を予測するための GastroPlus の有用性も確認された。動物データを用いて作成したモデルが良好な予測性を示したことから、GastroPlus は医薬品開発初期から消化管における弱い DDI を予測するために有用であることが示唆された。消化管における酵素

活性の経時的变化を考慮した予測には、濃度推移を記述できる PBPK モデルを用いたシミュレーションが不可欠である。

図表

表 4 ヒト肝ミクロソーム中の CYP 各分子種に対するエサキセレノンの阻害能

CYP isoform	IC ₅₀ (μM)		K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	K _I (μM)
	Pre-incubation				
	0 min	30 min			
CYP1A2	>100	>100	NT	NT	NT
CYP2A6	>100	>100	NT	NT	NT
CYP2B6	18.5 (17.3-19.7)	30.4 (24.0-36.7)	4.91 (3.55-6.28)	NT	NT
CYP2C8	49.6 (43.1-56.0)	53.7 (48.0-59.3)	13.1 (7.51-18.8)	NT	NT
CYP2C9	20.0 (17.5-22.4)	25.5 (21.7-29.2)	9.88 (8.81-11.0)	NT	NT
CYP2C19	31.4 (22.9-39.9)	33.7 (24.4-43.0)	8.52 (4.36-12.7)	NT	NT
CYP2D6	>100	>100	NT	NT	NT
CYP2E1	>100	>100	NT	NT	NT
CYP3A4 (MDZ)	55.1 (48.8-61.4)	14.0 (11.9-16.2)	40.3 (30.3-50.2)	0.0235 (0.021-0.0261)	44.8 (31.5-58.1)
CYP3A4 (TST)	>100	37.6 (27.1-48.2)	NT	0.0306 (0.029-0.0322)	54.6 (47.2-62.0)

IC₅₀ : 50%阻害濃度、K_i : 阻害定数、k_{inact} : 最大不活化速度定数、K_I : k_{inact} が半分になるときの濃度、NT : 評価なし、MDZ:ミダゾラム、TST:テストステロン。K_i、k_{inact}、及び K_I は平均値 (95%CI) で表示。

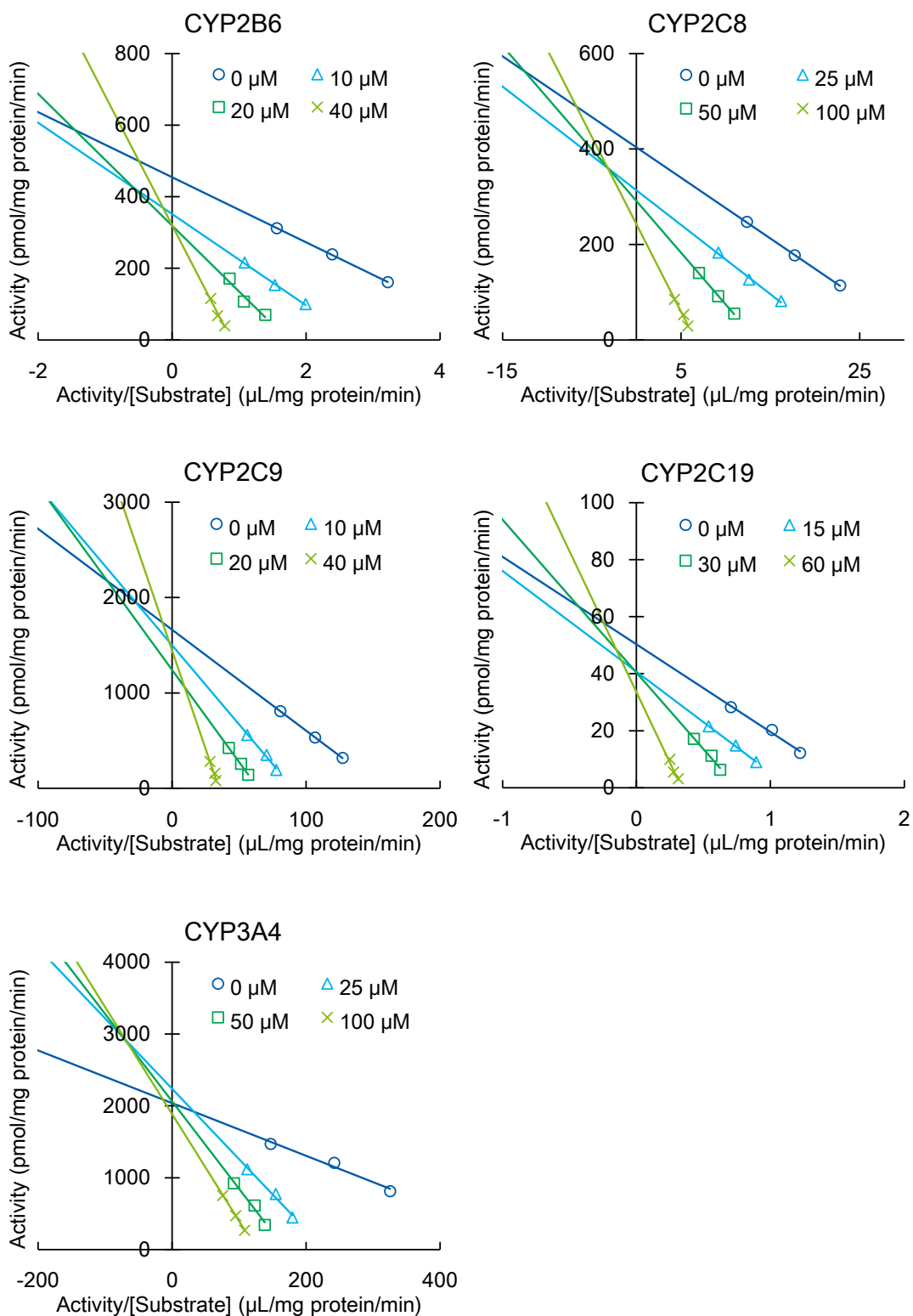


図 20 ヒト肝ミクロソーム中の CYP 分子種に対するエサキセレノンの可逆的阻害 (Eadie-Hofstee plot)

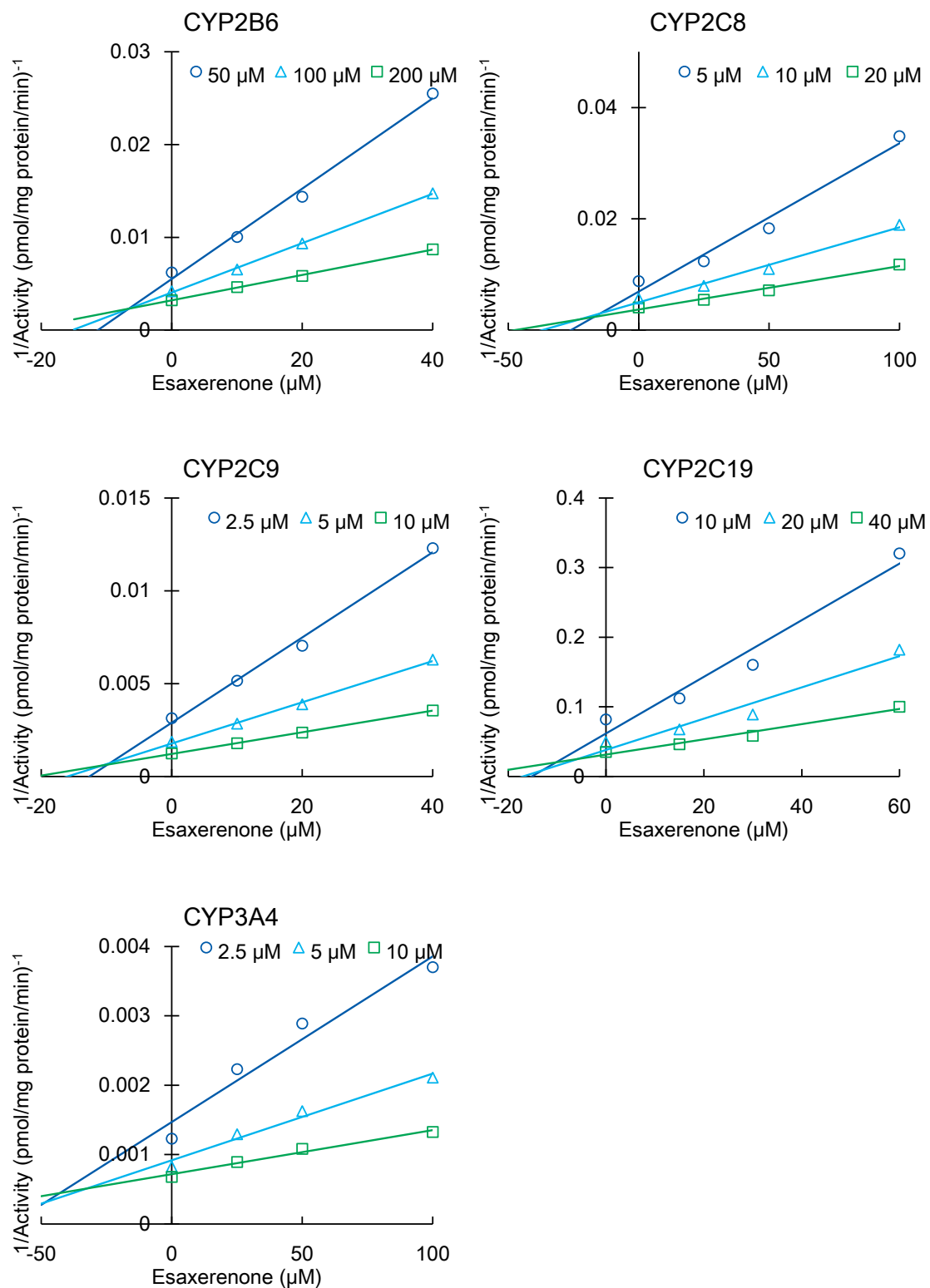


図 21 ヒト肝ミクロソーム中の各 CYP 分子種に対するエサキセレノンの可逆的阻害 (Dixon plot)

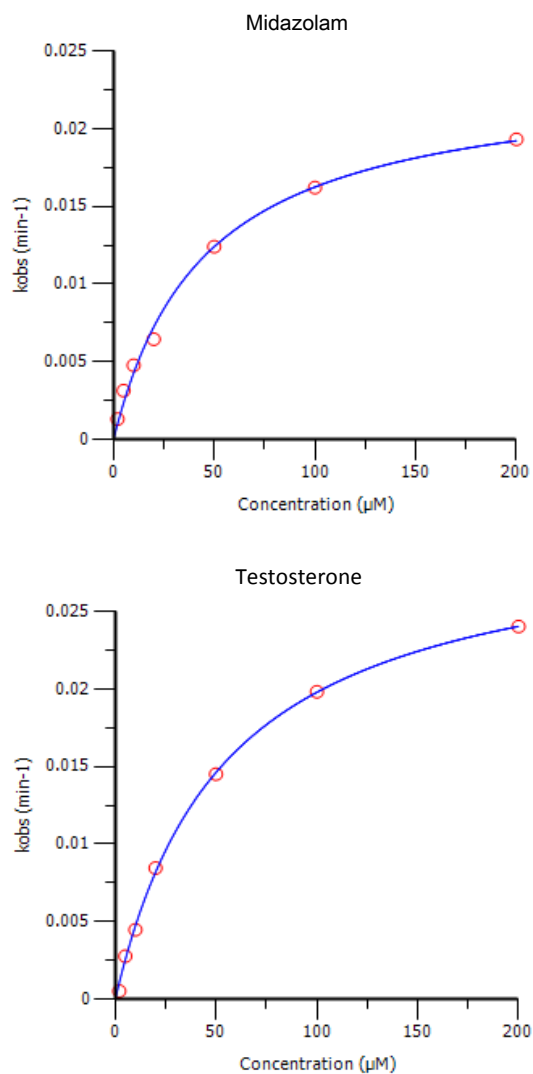


図 22 ヒト肝ミクロソーム中のエサキセレノンによる CYP3A の時間依存的阻害

X 軸はエサキセレノン濃度、Y 軸は見かけの不活化速度定数 (k_{obs}) を表す。

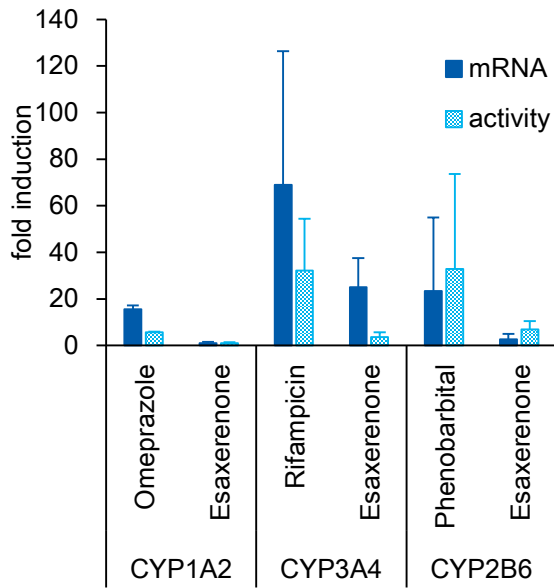


図 23 エサキセレンオン及び陽性対照薬による CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 の mRNA 及び活性の倍数変化

CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 の mRNA 及び活性の倍数変化を初代培養ヒト肝細胞を用いて評価し、最高濃度における結果をグラフに示した（オメプラゾール：50 μ M、リファンピシン：30 μ M、フェノバルビタール：3000 μ M、及びエサキセレンオン：10 μ M [CYP1A2]あるいは 30 μ M [CYP3A4]）。CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 の活性として、フェナセチン O-脱エチル化、ブプロピオン水酸化、及びテストステロン 6 β -水酸化反応を測定した。結果は 3 例の肝細胞による平均 + S.D.で表示。

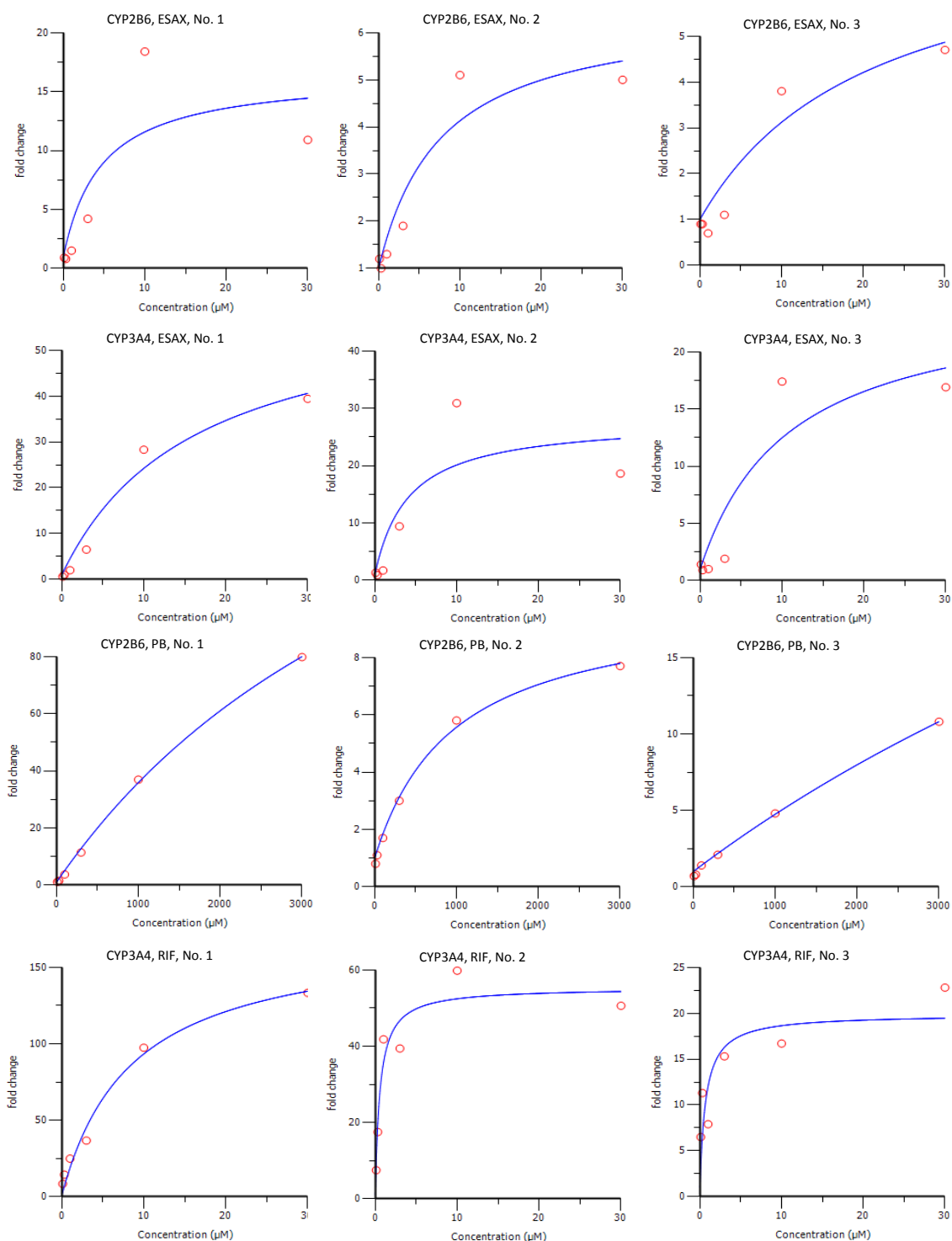


図 24 ヒト肝細胞中の CYP2B6 及び CYP3A4 に対するエサキセレン (ESAX)、フェノバルビタール (PB)、及びリファンピシン (RIF) による誘導

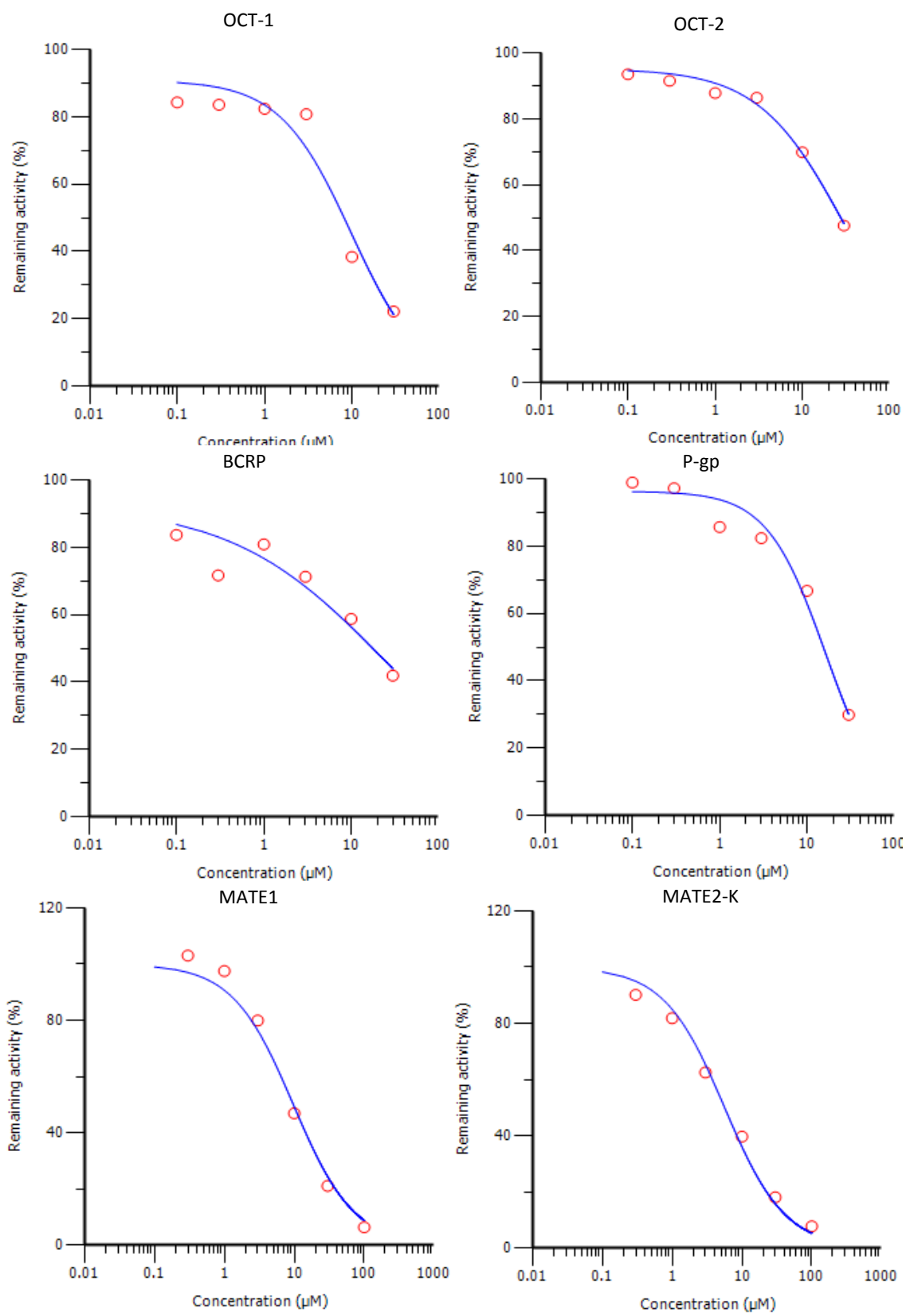


図 25 発現細胞中のトランスポーターに対するエサキセレノンの阻害

表 5 ヒト肝細胞中の CYP2B6 及び CYP3A4 に対するエサキセレノン、フェノバルビタール、及びリファンピシンの誘導パラメータ

			No. 1	No. 2	No. 3	Mean ± SD
CYP2B6	Esaxerenone	E_{max}	15.5	5.52	6.57	9.21 ± 5.51
		EC_{50} (µM)	4.70	7.64	21.0	11.1 ± 8.7
	Phenobarbital	E_{max}	215	8.98	51.4	91.8 ± 108.8
		EC_{50} (µM)	5170	968	12700	6280 ± 5940
CYP3A4	Esaxerenone	E_{max}	61.2	26.9	24.0	37.4 ± 20.7
		EC_{50} (µM)	16.4	4.10	10.9	10.5 ± 6.1
	Rifampicin	E_{max}	171.5	54.3	18.9	81.6 ± 79.9
		EC_{50} (µM)	8.57	0.566	0.709	3.28 ± 4.58

ヒト初代培養肝細胞（3例）を使用。 E_{max} ：最大効果、 EC_{50} ：50%効果濃度。

パラメータは CYP2B6 については代謝活性、CYP3A4 については mRNA の倍数変化を用いて算出した。エサキセレノンによる CYP1A2 の誘導は観察されなかったためパラメータは算出されていない。

表 6 GastroPlus によりシミュレートされたエサキセレノン併用時のミダゾラムの AUCR

	Mechanism	AUCR _g	AUCR _h	AUCR
Model 1	Inhibition ^a	1.49	1.01	1.51
	Induction	0.68	0.99	0.67
	Total	1.22	1.01	1.23
Model 2	Inhibition ^a	1.49	1.02	1.51
	Induction	0.68	0.99	0.67
	Total	1.22	1.01	1.23
Model 3	Inhibition ^a	1.34	1.02	1.36
	Induction	0.79	0.99	0.79
	Total	1.16	1.01	1.17

AUCR_g : 消化管での DDI による AUCR、AUCR_h : 肝臓での DDI による

AUCR、 Model 1 : サルデータから予測した PK パラメータを使用、 Model 2 : 経口投与後のデータから最適化した PK パラメータを使用、 Model 3 : 静脈内投与後のデータから算出した PK パラメータを使用、投与条件は臨床試験と同じ (エサキセレノン 5 mg を 14 日間投与)

^a 可逆的阻害及び TDI

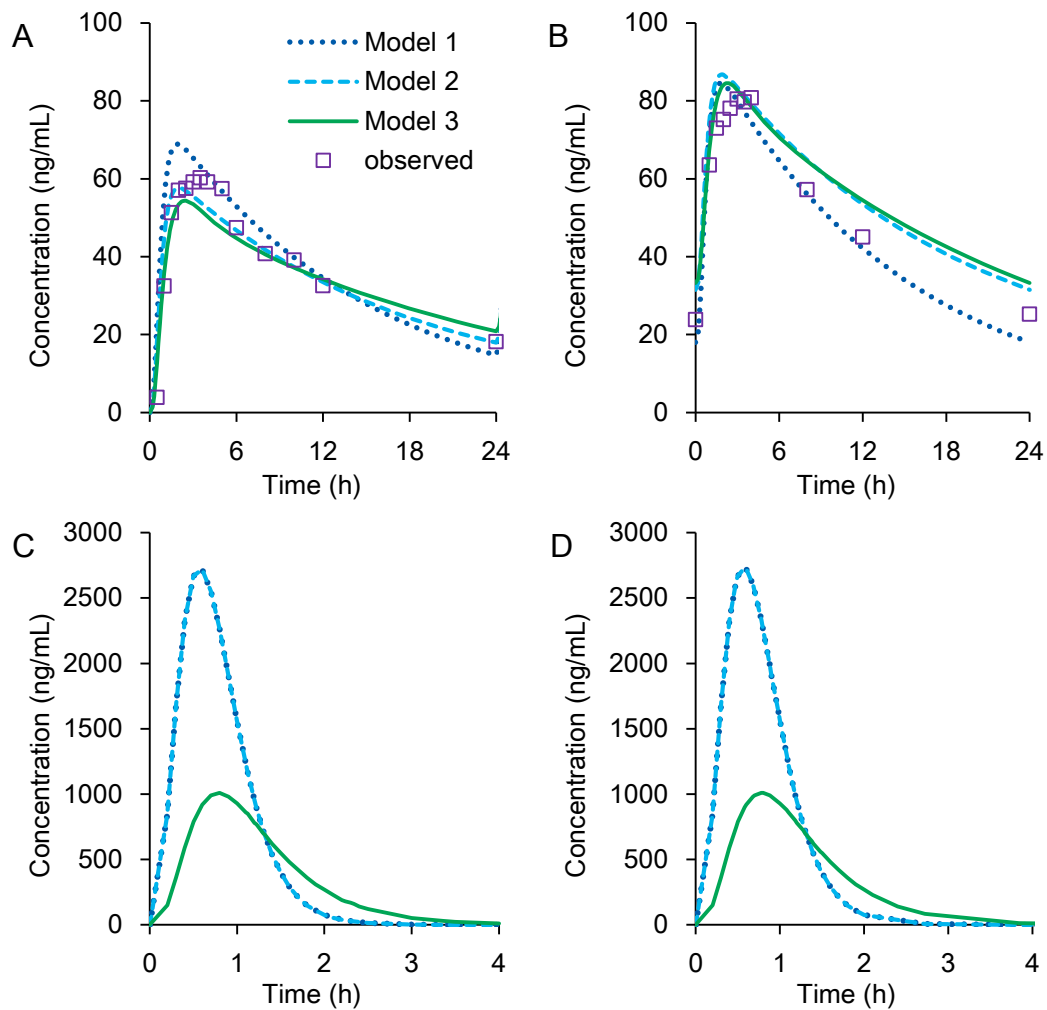


図 26 GastroPlus によりシミュレートされたエサキセレノンの血漿中及び消化管上皮細胞中濃度

エサキセレノンの単回投与 (A) 及び 14 日間投与 (B) 後の血漿中濃度を GastroPlus によりシミュレートした。同様に、単回投与 (C) 及び 14 日間投与 (D) 後の消化管上皮細胞濃度をシミュレートした (例として空腸コンパートメント 1 の結果を表示)。実測値は臨床試験結果 (Kato et al., 2018) によるもので、5 mg を複数回投与後の定常状態の濃度は 10 mg を 10 日間投与後の値から線形を仮定して算出した。

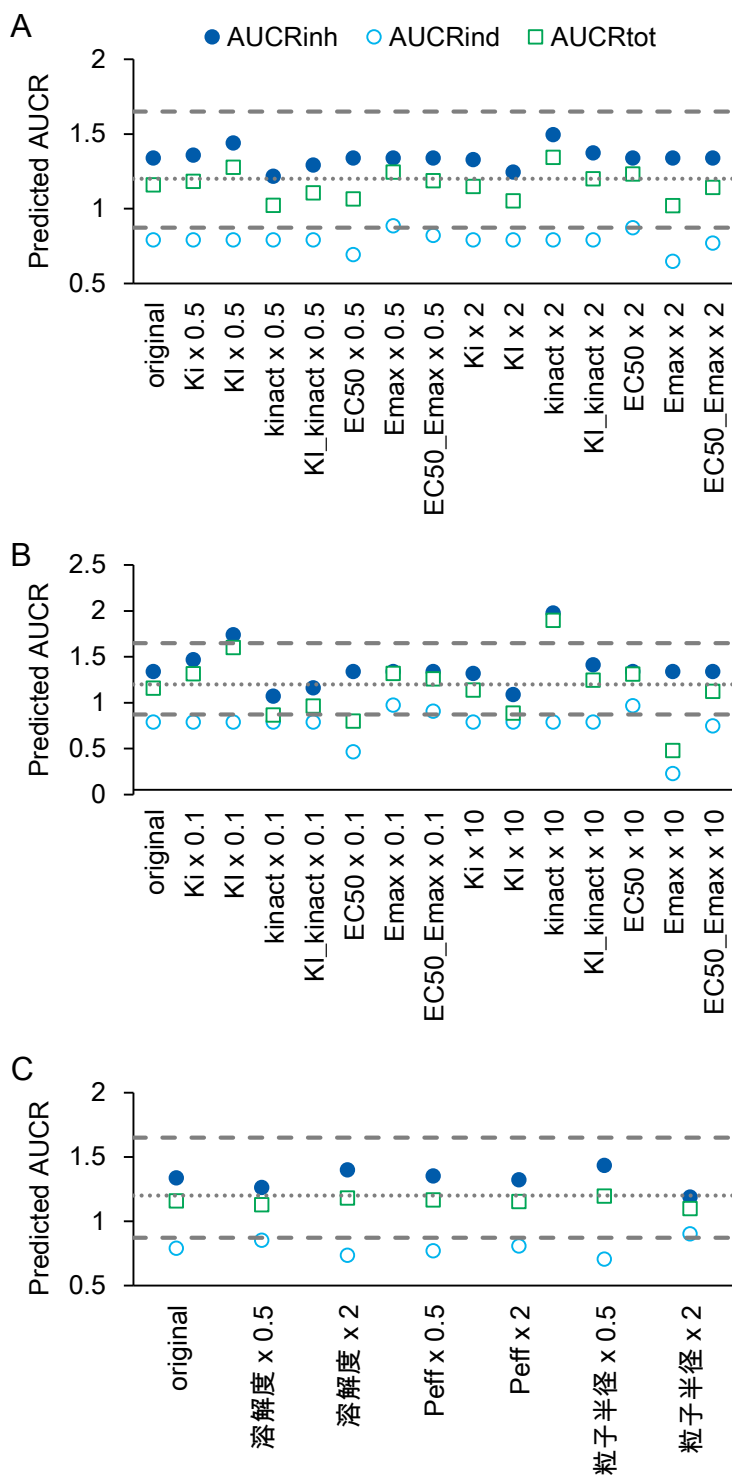


図 27 エサキセレノンの DDI 及び物性パラメータを変動させた場合の GastroPlus によるミダゾラムの推定 AUCR

エサキセレノンの阻害定数 (K_i)、最大不活化速度定数 (k_{inact})、 k_{inact} が半分になるときの濃度 (K_i)、誘導の最大効果 (E_{max})、誘導の 50% 効果濃度 (EC_{50}) を 0.5 倍及び 2 倍にした場合 (A)、0.1 倍及び 10 倍にした場合 (B)、及びエサキセレノンの溶解度、有効膜透過係数 (P_{eff})、粒子半径を 0.5 倍及び 2 倍にした場合 (C) の、エサキセレノン併用時のミダゾラムの

AUCR を阻害のみ ($AUCR_{inh}$)、誘導のみ ($AUCR_{ind}$)、両方 ($AUCR_{tot}$) のメカニズムを組み込んでシミュレートした。破線は Guest らの許容範囲の上限及び下限、点線は臨床試験結果を表す。

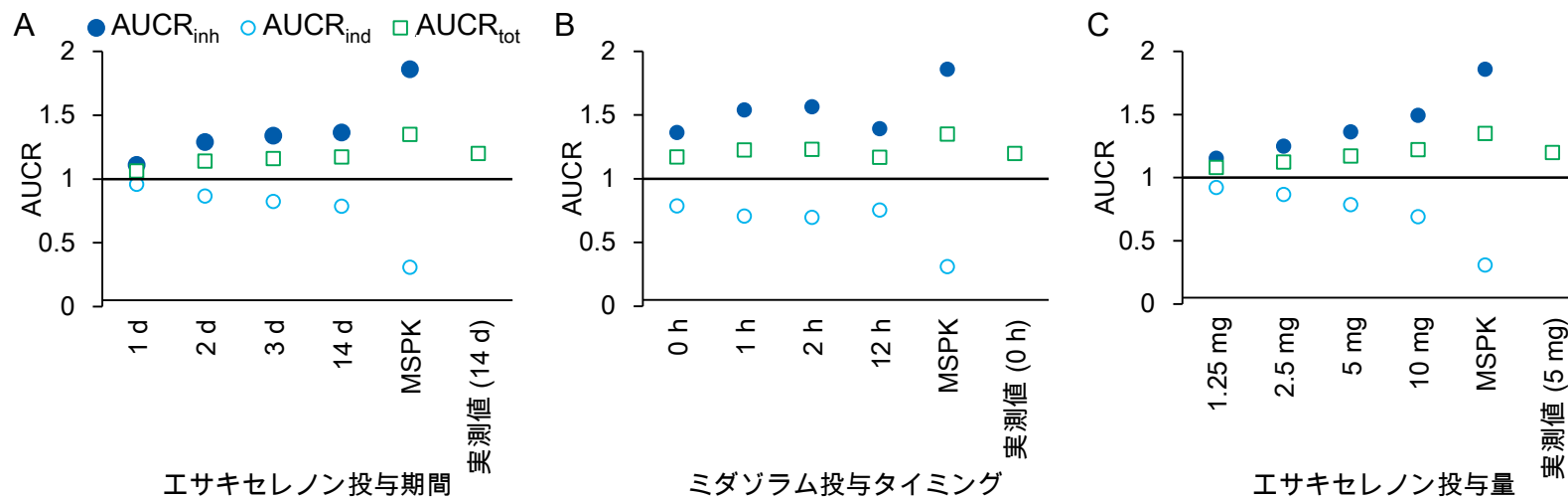


図 28 種々の投与条件下でのエサキセレノン併用時のミダゾラムの推定 AUCR

エサキセレノンの投与期間を変えた場合 (A)、エサキセレノン投与後のミダゾラムの投与タイミングを変えた場合 (B)、エサキセレノンの投与量を変えた場合 (C) のミダゾラムとエサキセレノンの DDI を、阻害のみ (AUCR_{inh})、誘導のみ (AUCR_{ind})、及び阻害と誘導の両方 (AUCR_{tot}) についてシミュレートした。「MSPK」は MSPK モデルによる解析結果を示し、「実測値」は臨床試験結果 (Furuie et al., 2019) を示す。

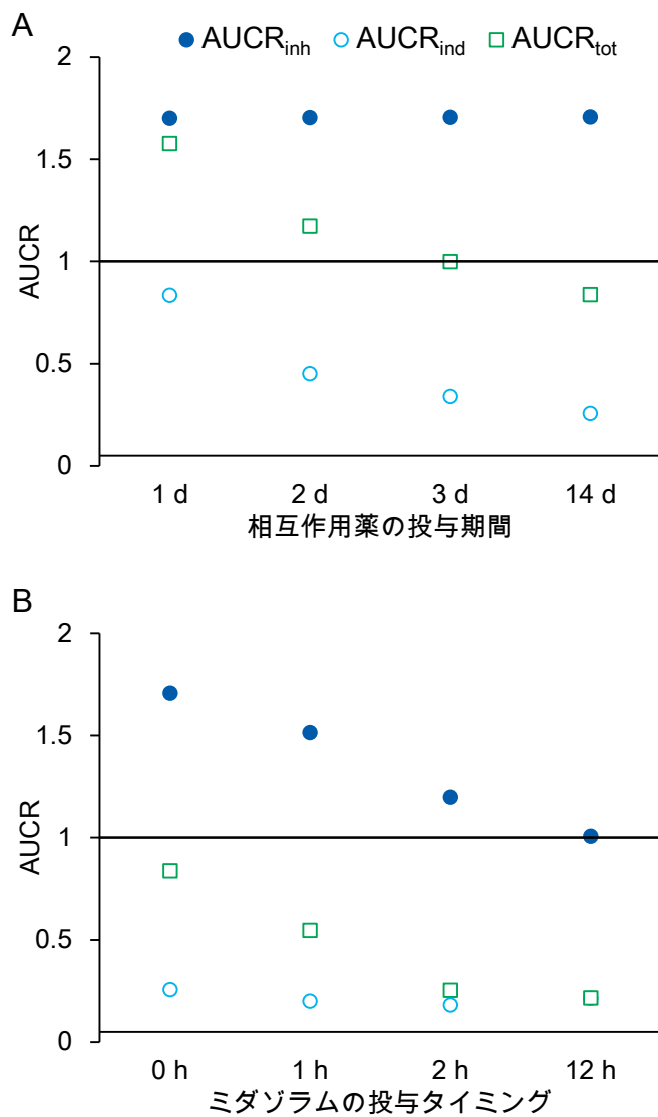


図 29 種々の投与条件下での仮想相互作用薬併用時のミダゾラムの推定

AUCR

仮想相互作用薬 (K_I と EC_{50} がエサキセレノンの 1/50) の投与期間を変えた場合 (A)、仮想相互作用薬投与後のミダゾラムの投与タイミングを変えた場合 (B) のミダゾラムの AUCR を、阻害のみ ($AUCR_{inh}$)、誘導のみ ($AUCR_{ind}$)、及び阻害と誘導の両方 ($AUCR_{tot}$) についてシミュレートした。

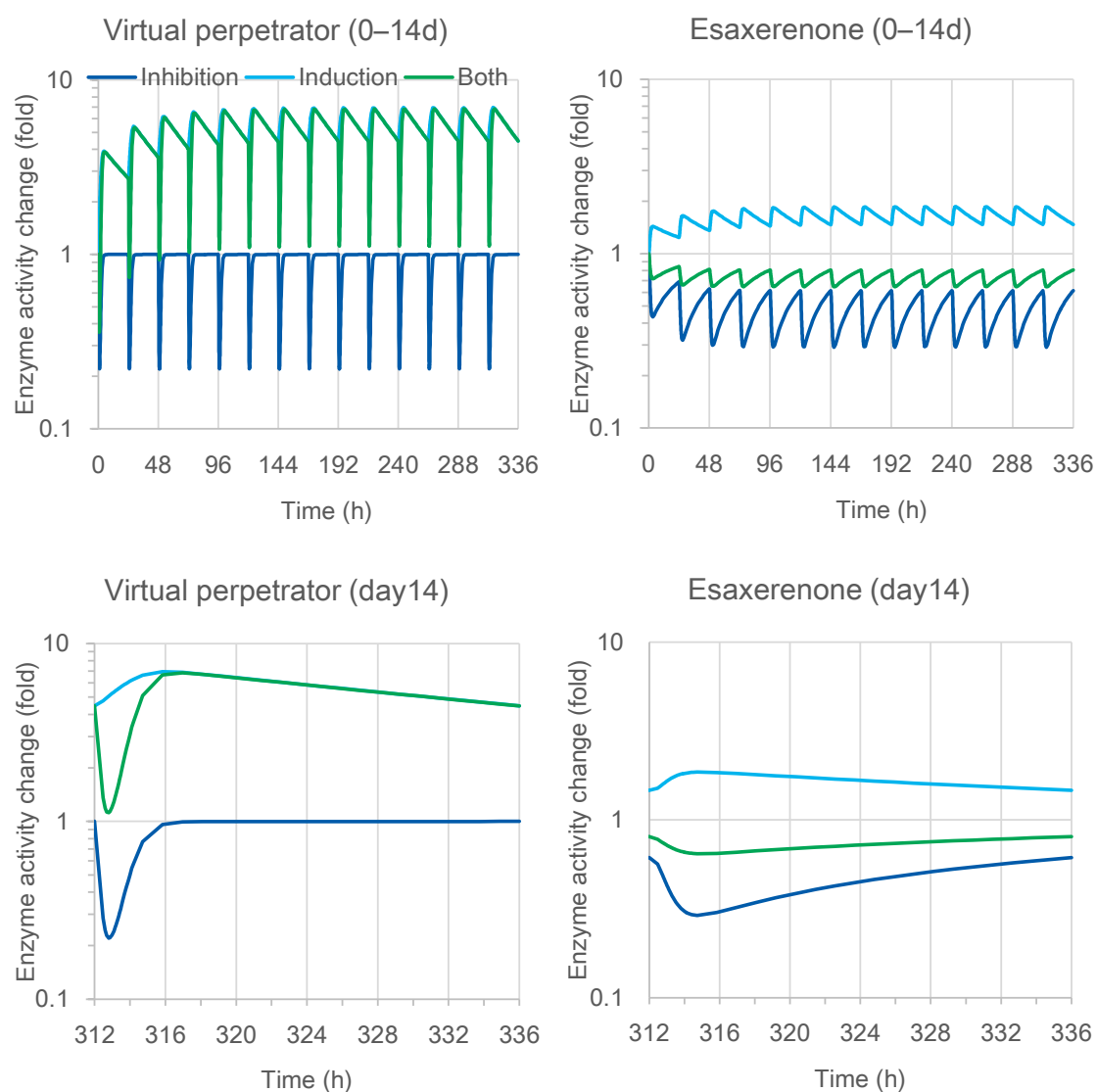


図 30 消化管上皮細胞中の酵素活性-時間推移

消化管上皮細胞での酵素活性の変化をプロットした。TDI 及び誘導による活性の変化は GastroPlus により算出されたが、可逆的阻害による活性の変化は GastroPlus により算出されないため、シミュレートされた消化管上皮細胞中濃度推移を $1 / (1 + [I]/K_i)$ の式に当てはめることにより、Microsoft Excel を用いて算出した。

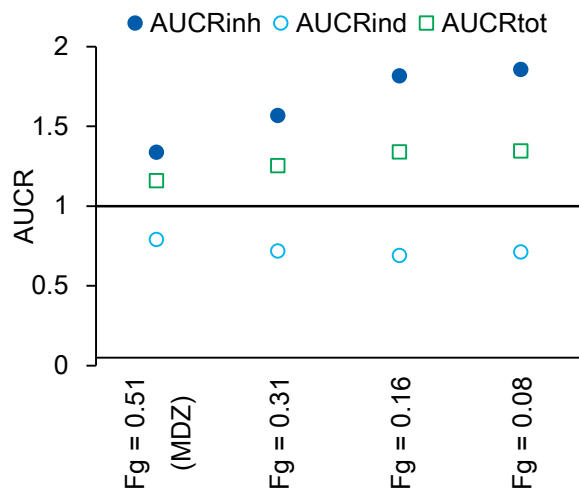


図 31 エサキセレノン併用時の仮想基質の推定 AUCR

仮想基質はミダゾラムの消化管 CYP3A に対する V_{max} を 2、4、及び 8 倍にすることで作成した。

結論

本研究では、これまでは強いDDIに焦点が当てられていたために十分に評価されていなかった、CYP3Aを介した弱いDDIの予測性についての検討を行い、PBPKモデルを用いることで臨床開発に応用可能なレベルの予測性が期待できることを示した。

第1章では、CYP3Aの基質であるミダゾラムとの臨床試験でミダゾラムのAUCの変化が0.84~1.47倍であった17種類の弱い相互作用薬を用いた検討を行った。本研究の結果、17薬物中16薬物がCYP3Aに対するTDIを示したことから、CYP3Aを可逆的に阻害する薬物がTDIを起こす割合は高いと考えられた。PBPKモデルを用いたDDI予測で弱い相互作用薬によるDDIを過小評価する可能性があることが過去に報告されているが、予測にTDIが組み込まれていないケースが多かったため、TDIの見落としが過小評価の一因と考えられた。実際、本研究でTDIを組み込まずに予測を行ったところ、多くの偽陰性が認められた。また、本研究の*in vitro*試験により、評価した17薬物の半数以上が阻害と誘導を併せ持つことが明らかとなった。阻害のみ、誘導のみを組み込んだ予測ではMSPKモデルがPBPKモデルよりDDIを強く予測したが、両方を組み込んだ場合のミダゾラムのAUCRには大きな差はなく、予測手法や濃度の違いの影響が、阻害と誘導の相殺により緩和されていると考えられた。一部の薬物が阻害を過大評価したことを除けば予測性は良好であり、本手法が*in vitro*データを用いた臨床試験の要否の判断に利用できる可能性が示された。

第2章では、最近開発された薬物であるエサキセレノンのDDIを*in vitro*で評価し、相互作用薬としてのエサキセレノンの着目すべきDDIがCYP3AのTDI及び誘導であることを示した。第1章で検証したPBPKモデルを用いた手法でDDIをシミュレートしたところ、臨床試験結果と一致する値（ミダゾラムのAUCR：1.2）となったため、本手法の有用性が確認され、今後同様の薬物を開発する際に応用できる可能性が示された。開発過程

でモデル構築に必要な情報が充分得られない段階を想定して作成した、動物データから予測されたヒトPKを用いたモデルも同様に良好な予測性を示し、消化管のCYP3Aを介したDDIのPBPKモデルを用いた予測手法は開発初期から有用であると言える。更に、構築したモデルで様々な投与条件下におけるDDIをシミュレートすることにより、エサキセレノンとCYP3A基質のDDIはエサキセレノンの投与期間、エサキセレノンの投与量、エサキセレノン投与後のCYP3A基質の投与タイミングの影響を受けにくいことを示した。エサキセレノンの臨床における投与量が低く、阻害及び誘導を起しにくいことが一番の理由であるが、阻害と誘導が相殺されることによって影響が緩和されていることも、エサキセレノンのDDIリスクが弱い一因と考えられた。また、同様の理由から、 F_g がミダゾラムより小さい相互作用薬と併用したとしてもエサキセレノンのDDIリスクは低いと考えられた。なお、相互作用薬のプロファイルによっては投与条件の影響を大きく受ける可能性があるため、PBPKモデルは臨床試験の要否だけでなく、臨床試験のデザインの妥当性を検討する目的でも活用されるべきである。

本研究の成果を今後開発されるCYP3Aの阻害あるいは誘導作用を持つ薬物に応用することで、治験参加者や患者の安全性を確保した上での臨床開発戦略の効率化が期待される。

謝辞

本研究の推進にあたり、終始懇切なる御指導、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 先生に深謝致します。

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、元第一三共株式会社 薬物動態研究所長（現公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団）泉 高司 博士、元第一三共株式会社 薬物動態研究所長（現第一三共 RD ノバーレ取締役）安東 治 博士、第一三共株式会社 薬物動態研究所長 渡邊 伸明 博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、直接の御指導、御助言を頂きました、摂南大学薬学部 薬剤学研究室 教授 山下 伸二 先生、第一三共株式会社 井上 晋一 博士、杉山 大介 博士に深謝致します。また、有益な御指導と御助言を賜りました、武蔵野大学薬学部 薬物動態学研究室 教授 伊藤 清美 先生、東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室 准教授 前田 和哉 先生、第一三共 RD ノバーレ株式会社 高橋 雅行 博士、Simulations Plus 社 Michael Bolger 博士、Viera Lukacova 博士に深謝致します。

本研究を共に遂行していただいた第一三共株式会社 石塚 智子 博士、西矢 由美 博士、渡邊 健悟 博士、渡邊 亜紀子 博士、Daiichi Sankyo Europe GmbH Veronika Rozehnal 博士、Thomas Fischer 博士をはじめとする共同研究者の皆様、討論に参加してくださいましたすべての皆様に深謝致します。

実験方法

第1章 17種類の市販薬とミダゾラムのDDIの予測性評価

試薬及び材料

ミダゾラムは和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。ミダゾラムの代謝物である1'-ヒドロキシミダゾラムはSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。内部標準物質として、¹³C-1'-ヒドロキシミダゾラムをCorning (Corning, NY) から入手した。CYP3Aの阻害及び誘導の評価には、以下の市販薬を使用した。塩酸アトモキセチン (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)、アトルバスタチン (LKT Laboratories, St. Paul, MN)、アジスロマイシン (LKT Laboratories)、カソピタント (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、シメチジン (Sigma-Aldrich)、デフェラシロクス (Toronto Research Chemicals, North York, Canada)、エチニルエストラジオール (Sigma-Aldrich)、エベロリムス (Selleck Chemicals, Houston, TX)、フェロジピン (Sigma-Aldrich)、フルボキサミン (Sigma-Aldrich)、パゾパニブ (ChemieTek, Indianapolis, IN)、ラニチジン (Sigma-Aldrich)、シンバスタチン (Wako Pure Chemical)、スボレキサント (AdooQ-BioScience, Irvine, CA)、タダラフィル (Selleck Chemicals)。プールしたヒト肝ミクロソーム (性別混合、20 mg protein/mL) およびプールしたヒト凍結肝細胞は、Sekisui XenoTech, LLC (Kansas City, KS) から購入した。NADPH Regeneration System Solution A 及び NADPH Regeneration System Solution B は Corning から購入した。

臨床DDI試験データ収集

臨床DDI試験におけるCYP3A相互作用薬存在下でのミダゾラムのAUCRは、Drug interaction database (ワシントン大学、ワシントン州シアトル、<https://www.druginteractioninfo.org/>) から収集した。in vitro DDI データも Drug interaction database データベースから同様に収集した。本研究では、臨床DDI試験においてミダゾ

ラムの AUCR が 0.8~2 であり、*in vitro* 試験において CYP3A に対する阻害作用が認められた 17 薬物を選択した。予測に用いた臨床試験の概要を表 8 に示す。

CYP3A に対する *in vitro* DDI パラメータの測定

阻害

17 種類の市販薬（アトモキセチン、アジスロマイシン、アトルバスタチン、カゾピタント、シメチジン、デフェラシロクス、エチニルエストラジオール、エベロリムス、フェロジピン、フルオキセチン、フルボキサミン、パゾパニブ、ラニチジン、ロキシスロマイシン、シンバスタチン、スポレキサント、タダラフィル）の CYP3A に対する可逆的阻害及び時間依存的阻害を、ヒト肝ミクロソームを用いて検討した。ミクロソームタンパクへの結合の影響を軽減するため、比較的低いタンパク質濃度（可逆的阻害では 0.02 mg/mL、TDI では 0.2 mg/mL）を用いた。CYP3A の活性はミダゾラム 1'-水酸化活性を指標とした。評価薬物はアセトニトリルまたはメタノールに溶解し、ミダゾラムは 50%メタノール（メタノール:水=1:1）に溶解した（有機溶媒の最終濃度は 1.5%）。脂溶性の高い薬物の溶媒としてジメチルスルホキシドがよく用いられるが、代謝を阻害して TDI 活性に影響することが知られているため (Nishiya et al., 2010; Aasa et al., 2013) 本研究では使用を避けた。可逆的阻害の評価は以下の方法で行った。ヒト肝ミクロソーム、リン酸カリウムバッファー、ミダゾラム（2、4、8 μ M）及び評価薬物を含む incubation mixture を 37°C で 5 分間加温し、NADPHgs（NADPH Regeneration System Solution A は最終濃度 5%、NADPH Regeneration System Solution B は 1%）の添加により反応を開始した。37°C で 5 分間インキュベートした後、stop solution（内標準物質を含むアセトニトリル:メタノール[1:1]）と混合して反応を停止させた。TDI の不活化パラメータの算出の際は、ミダゾラムを含まない incubation mixture を 37°C で 5 分間加温し、NADPHgs を加えて反応を開始した。開始直後（0 分）及び 15、30、60 分後に試料

を採取し、NADPHgs 及びミダゾラム (40 μ M) を含む incubation mixture で 10 倍希釈し、5 分間インキュベート後に stop solution と混合して反応を停止した。試料を遠心分離し、上清中のミダゾラム代謝物である 1'-ヒドロキシミダゾラムの濃度を液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いて測定した。

CYP3A の代謝活性 (pmol/min/mg protein) は、1'-ヒドロキシミダゾラム濃度をマイクロソーム蛋白質濃度とインキュベーション時間で除して求め、Phoenix WinNonlin Ver.6.3 (Certara, Princeton, NJ) を用いて式 1-3 により解析した。

$$\text{競合阻害: } E = V_{\max} \times S / (K_m \times (1 + I/K_i) + S) \quad (1)$$

$$\text{非競合阻害: } E = V_{\max} \times S / ((K_m + S) \times (1 + I/K_i)) \quad (2)$$

$$\text{不競合阻害: } E = V_{\max} \times S / (K_m + S \times (1 + I/K_i)) \quad (3)$$

ここで、E は代謝活性、 V_{\max} は代謝活性の最高値、S は基質濃度、 K_m はミカエリス定数、I は評価薬物の濃度を示す。赤池情報量規準 (AIC) に基づいて、 K_i を決定するために最も適切なモデルを選択した。

不活化パラメータを算出する際は、各薬物濃度における残存活性の自然対数をプレインキュベーション時間に対してプロットした。薬物濃度ごとに阻害の初速度を示す直線の負の傾きから k_{obs} を求めた。本薬の k_{inact} 及び K_I は、 k_{obs} と I との関係を示す式 4 により WinNonlin を用いて解析することで求めた。高濃度で k_{obs} の低下が認められた場合は、高濃度のデータを削除し、残りのデータを用いてパラメータを算出した。

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} \times I / (K_I + I) \quad (4)$$

誘導

13 種類の市販薬 (アジスロマイシン、アトモキセチン、シメチジン、カソピタント、デフェラシロクス、エベロリムス、フェロジピン、フルボキサミン、パゾパニブ、ラニチジン、ロキシスロマイシン、シンバスタチン、タダラフィル) の CYP3A4 誘導を、

ヒト凍結肝細胞を用いて検討した。残りの4薬物（アトルバスタチン、エチニルエストラジオール、フルオキセチン、およびスボレキサント）については、文献値が入手できなかったため評価しなかった。陽性対照としてリファンピシン（10 μM）及びオメプラゾール（50 μM）、陰性対照としてガチフロキサシン（10 μM）を用いた。これらの薬物をDMSOに溶解し、modified Lanford medium（Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan）で1000倍に希釈した。肝細胞を96 wellプレートに 6×10^4 cells/wellで播種し、一晚接着させた。翌日、インキュベーション培地を薬物含有培地に交換し、プレートを一晚培養した。これらのステップを繰り返し、合計処理時間を48時間とした。実験はtriplicateで行った。インキュベーション後、RNAを抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により分析した。相対的なmRNA発現量は、CYP3A4のmRNA量をGAPDHのmRNA量で除して算出した。

mRNAの倍数変化は、評価薬物のmRNA発現をDMSO対照試料中の同一遺伝子のmRNA発現で除して算出した。誘導パラメータである E_{max} および EC_{50} は、Phoenix WinNonlin（ver. 6.3）を用いて式5により計算した。

$$\text{Fold induction} = 1 + E_{max} \times I / (EC_{50} + I) \quad (5)$$

MSPK モデルを用いた予測

相互作用薬の有無によるミダゾラムのAUCRを、FDAによるDDIガイダンス（Food and Drug Administration, 2020）に従い、式6によるMSPKモデルを用いて予測した。

$$\text{AUCR} = [1 / [(A_g \times B_g \times C_g) \times (1 - F_g) + F_g]] \times [1 / [(A_h \times B_h \times C_h) \times f_m + (1 - f_m)]] \quad (6)$$

ここで、 F_g は消化管アベイラビリティ、 f_m は全身クリアランス（CL）に対するCYP3Aの寄与率、下付き文字hおよびgは、それぞれ肝臓および消化管を示す。ミダゾラムの F_g は、文献（Thummel et al., 1996）のバイオアベイラビリティ（0.30）および肝アベイラビリティ（0.56）を用いて算出した値（0.54）を用い、吸収率（ F_a ）は1と仮定した。

なお、ミダゾラムの f_m には 0.94 を用いた (Brown et al., 2005)。 F_g 及び f_m は本来ミダゾラムの投与量に依存して変化する値であるが、MSPK モデルで解析する際には一定の値を用いた。用語 A、B、C はそれぞれ可逆的阻害、TDI、誘導を表し、次の式 (7-9) から算出した。

$$A = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (7)$$

$$B = \frac{k_{deg}}{k_{deg} + \frac{[I] \times K_{inact}}{[I] + K_I}} \quad (8)$$

$$C = 1 + \frac{d \cdot E_{max} \cdot [I]}{[I] + EC_{50}} \quad (9)$$

k_{deg} は CYP3A の見かけの一次分解速度定数であり、GastroPlus Version 9.6.0001 で使用されている値を用いた (消化管と肝臓のいずれも 0.0005 min^{-1} 、Zhang et al., 2009)。d は補正係数であり、1 を用いた。

消化管における相互作用薬の濃度 ($[I]_g$) の計算には、FDA による DDI ガイダンスで推奨されている式 10 (Rostami-Hodjegan and Tucker, 2004) を用いた。

$$[I]_g = F_a \times k_a \times \text{Dose} / Q_{en} \quad (10)$$

ここで、 k_a は一次吸収速度定数、 Q_{en} (18 L/h) は消化管血流量である (Yang, Jamei, Yeo, Tucker, et al., 2007)。MSPK モデルによる解析に用いた相互作用薬の F_a は、解析結果を比較しやすくするため、GastroPlus により算出された値を用いた (表 9)。GastroPlus により算出される k_a は経時的に変化しているため、MSPK モデル解析に用いる k_a は Phoenix WinNonlin を用いて文献の血漿中濃度推移から算出した (表 9)。

肝臓における相互作用薬の濃度 ($[I]_h$) には、肝臓の入口における最高非結合形血漿中濃度 ($C_{inlet,u}$)、最高非結合形血漿中濃度 ($C_{max,u}$)、及び定常状態非結合形血漿中濃度

($C_{ss,u}$) の3種を用い、結果を比較した。 $C_{inlet,u}$ の算出には、式 11 (Ito et al., 1998) を用いた。

$$C_{inlet,u} = f_{u,p} \times (C_{max} + F_a \times k_a \times Dose / Q_h / R_b) \quad (11)$$

ここで、 $f_{u,p}$ は血漿中の非結合形分率、 C_{max} は定常状態における相互作用薬の最大血漿中濃度 (非結合形及び結合形)、 Q_h は肝血流量 (97L/h/70kg) (Yang, Jamei, Yeo, Rostami-Hodjegan, et al., 2007)、 R_b は血液血漿中濃度比である。 C_{ss} は AUC_{inf} を投与間隔で除して算出した。 $[I]_h$ を算出する際の単回投与時の AUC_{inf} と反復投与時の C_{max} は、DDI をシミュレートする際と同じ条件を用いて GastroPlus でシミュレートし使用した。MSPK モデル分析に用いた F_a 、 k_a 、 R_b 、 AUC_{inf} 及び C_{max} を表 9 に示す。

血漿脂質との結合を考慮し $f_{u,p}$ は GastroPlus によって補正された値を用いた ($f_{u,p,adj}$ 、表 10)。解析に使用した in vitro DDI パラメータのほとんどは本研究中で得られたものであるが、アトルバスタチン (Vieira et al., 2014)、エチニルエストラジオール (Fahmi et al., 2008)、フルオキシセチン (Fahmi et al., 2008)、スボレキサント (Prueksaritanont et al., 2013) の誘導データは文献値を使用した。 K_i 、 K_I 、および EC_{50} は、GastroPlus により予測された $f_{u,inc}$ を用いて非結合形濃度に補正した (表 10)。ミクロソームおよび肝細胞中の $f_{u,inc}$ の予測には、Calc(Hallifax)-HLM (Hallifax and Houston, 2006) 及び Calc(Austin)-Hep (Austin et al., 2005) をそれぞれ用いた。

仮想相互作用薬の MSPK モデル解析

小腸における相互作用の重要性を示すために、種々の K_i (0.2~100 μ M) を持つ仮想相互作用薬併用時のミダゾラムの AUCR を MSPK モデルにより解析した。仮想相互作用薬の特性は以下の通り。分子量 : 500、 F_a : 1、 k_a : 1 h^{-1} 、 CL : 20 L/h、 $f_{u,p}$: 0.1。投与量を CL で割って AUC を算出し、AUC を投与間隔 (24 時間) で割って $C_{ss,u}$ を算出した。消化管、肝臓、および消化管と肝臓の両方における CYP3A 阻害に基づく AUCR

を、投与量 100 mg で計算した。また、 K_i を 1 μ M に固定し投与量を変化させた場合 (1 ~500mg) の AUCR も算出した。

PBPK モデルを用いた DDI 予測

ヒト PBPK モデルの構築には GastroPlus version 9.6.0001 を用いた。GastroPlus の ACAT モデル、コンパートメント PK モデル、DDI モジュールを用いて、それぞれ消化管吸収・代謝、全身分布・消失、DDI をシミュレートした。以下に具体的に記載されていないパラメータ (ヒトの生理学的パラメータなど) については、GastroPlus に組み込まれた値、または GastroPlus により予測された値を用いた。

基質 (ミダゾラム) モデル

ミダゾラムモデルに用いたパラメータを表 7 に示す。有効膜透過係数 (P_{eff})、オクタノール-水分配係数 ($\log P$)、 R_b 、 f_{up} 、及び溶解度データは文献から得られた値を用いた (Andersin, 1991; Gertz et al., 2011)。 f_{up} は血漿脂質との結合を GastroPlus で補正した。ミダゾラムの静脈内投与および経口投与後の血漿中濃度推移 (Thummel et al., 1996) を GastroPlus の PKPlus モジュールで解析し、薬物のセントラルコンパートメントへの分布容積 (V_c)、及び第 2 コンパートメントへの分布及び第 2 コンパートメントからの分布の速度定数 (K_{12} 及び K_{21}) を算出した。CYP3A によるミダゾラム代謝の in vitro 動態パラメータ、すなわちミカエリスメンテン定数 (K_m) と最大代謝速度 (V_{max}) を文献 (Thummel et al., 1996) から入手し、GastroPlus に組み込まれているミクロソームタンパク濃度 (38mg/g liver) と肝臓重量 (1800g) を用いて V_{max} を in vivo の値に変換した (Agoram et al., 2001)。消化管における代謝を予測する際、GastroPlus は肝臓における代謝パラメータを酵素の存在比に基づいて消化管の値に変換して用いる。ヒト肝ミクロソーム及びヒト小腸ミクロソームから得られた固有クリアランス値は、組織特異的

CYP3A 存在量で補正すると大きな差がないことが報告されており (Gertz et al., 2010)、GastroPlus により算出された F_g の予測誤差は 2 倍未満である (Heikkinen et al., 2012)。しかし今回の研究では、肝臓と消化管に対して同じ V_{max} を用いた場合にミダゾラムの F_g が約 2 倍過小評価されたため、消化管 CYP3A に対する V_{max} を F_g の実測値 (0.54) にあわせて約半分にした。肝臓と消化管に異なる V_{max} を用いることはソフトウェアの使用方法として本来意図されたものではないが、予測の精度を向上させるためには本操作が必要であった。

相互作用薬モデル

17 種類の市販薬の溶解度、膜透過性、脂溶性、 f_{up} を Drug interaction database、in vitro 試験結果、文献、ADMET Predictor による化合物構造からの予測値などから収集し、相互作用薬のモデルを構築した (表 10、表 11、表 12)。水での溶解度が知られており水溶液の pH が不明な場合、ADMET Predictor を用いて飽和水溶液の pH を予測した。消化管での溶解度に対する胆汁酸塩の影響 (bile salt solubilization ratio: BSSR) は、GastroPlus により予測される biorelevant solubility から算出した (表 11)。溶解度-pH プロファイルは GastroPlus により予測された値を用いた。算出された pKa を表 11 に示す。7 薬物について、粒子半径から予測された溶出速度が遅すぎると思われたため、実測の血漿中濃度推移に合うように粒子半径を初期値の 25 μm から減少させた。薬物によっては precipitation time を変更する必要があるかもしれないが、本研究ではすべての薬物について初期値 (900 秒) を用いた。CL、 V_c 、 K_{12} 、 K_{21} などの薬物動態パラメータは、文献から得られた経口投与後の血漿中濃度推移に合うように最適化した (表 13)。薬物動態パラメータは静脈内投与後のプロファイルを用いて算出するほうが望ましいが、ほとんどの薬物についてデータが入手できなかったため経口投与後のデータを用いた。FPE が大きいことが知られている薬物については、Fa が 1 であると仮定し

て、文献およびデータベースから得られた F 、 CL (肝クリアランスに等しいと仮定)、 Q_h 、あるいは F_g を用いて FPE を計算し、GastroPlus モデルに入力した。算出された FPE を表 13 に示す。Gut physiology model については、臨床試験の食事条件に応じて、GastroPlus に組み込まれている「Human-Physiological-Fasted」又は「Human-Physiological-Fed」を用いた。Absorption scaling factor (ASF) は GastroPlus に組み込まれた Opt logD Model SA/V 6.1 により算出した。消化管上皮細胞内の非結合形分率は 100% (初期値) に設定した。

DDI シミュレーション

ミダゾラムと各相互作用薬の DDI シミュレーションは、GastroPlus の DDI モジュールにおける Dynamic シミュレーションを用いて行った。基質および相互作用薬の投与情報を表 8 に要約する。シミュレーションでは、(1) 可逆的阻害パラメータのみ、(2) 可逆的阻害及び TDI パラメータの両方、(3) 誘導パラメータのみ、(4) 利用可能なすべてのパラメータ、の 4 つの異なる設定を用いて、各メカニズムの効果を比較した。また、消化管と肝臓における相互作用に基づく $AUCR$ を別々に計算した (それぞれ $AUCR_g$ 及び $AUCR_h$)。代表的な薬物 (アトモキセチン、アジスロマイシン、カゾピタント、スポレキサント) について、予測に用いたパラメータの実験誤差等によるばらつきの影響を評価する目的で、DDI パラメータ (K_i 、 k_{inact} 、 K_I 、 E_{max} 、 EC_{50}) を 0.5 倍及び 2 倍に変化させた条件でのシミュレーションも行った。 k_{inact} 及び K_I 、 E_{max} 及び EC_{50} については、同時に 0.5 倍及び 2 倍に変動させる条件でのシミュレーションも行った。

予測性の評価

Guest らが提唱した方法に基づき (Guest, Aarons, et al., 2011)、式 12~14 を用いて予測の成功率を算出した。

$$\text{Upper limit} = R_{\text{obs}} \times \text{Limit} \quad (12)$$

$$\text{Lower limit} = R_{\text{obs}} / \text{Limit} \quad (13)$$

$$\text{Limit} = \frac{\delta + 2(R_{\text{obs}} - 1)}{R_{\text{obs}}} \quad (14)$$

ここで、 R_{obs} は阻害 ($\text{AUCR} > 1$) 又は誘導 ($\text{AUCR} < 1$) に対してそれぞれ AUCR 又は AUCR の逆数を示す。 δ は変動を説明するパラメータであり、 $\delta = 1$ の場合はばらつきがないことを示す。本研究では $\delta = 1.25$ を用いた。このとき $R_{\text{obs}} = 1$ の場合の AUCR のクライテリアは $0.80 \sim 1.25$ となり、生物学的同等性試験で通常用いられるクライテリアと一致する。

表 7 シミュレーションに用いたミダゾラムの物理化学的及び薬物動態的パラメータ

Parameters (units)			
Molecular weight	325.77	V_c (L/kg)	0.326
logP	3.25 ^a	K_{12} (1/h)	1.57
f_u (%)	3.1 ^a (2.32 ^c)	K_{21} (1/h)	1.05
R_b	0.55 ^a	V_2 (L/kg)	0.489
P_{eff} (cm/s $\times 10^{-4}$)	6.73 ^a	CYP3A_ K_m (μ g/mL)	0.896 ^d
Solubility (mg/mL)	0.082 ^b	CYP3A_ $V_{max, liver}$ (mg/s)	0.373 ^d
		CYP3A_ $V_{max, gut}$ (mg/s)	0.184 ^e

^aGertz et al., 2011、^bAndersin, 1991、pH 6.39、^c血漿中の脂質への結合を GastroPlus により補正した値、^dThummel et al., 1996 (GastroPlus の unit converter により補正)、^e消化管 CYP3A に対する V_{max} (臨床試験で観察された F_g にあわせて調整)

表 8 予測に用いた市販薬のミダゾラム (MDZ) との臨床試験の概要

Precipitant	Observed	Precipitant	MDZ	MDZ	Reference
	AUCR	dose	dose	dosing time	
atomoxetine	1.20	60 mg (12 days), b.i.d.	5 mg	0.5 h	Sauer <i>et al.</i> , 2004
atorvastatin	1.15	10 mg (14 days), q.d.	15 µg/kg	0 h	Kokudai <i>et al.</i> , 2009
azithromycin	1.19	500 mg (3 days), q.d.	15 mg	1.5 h	Yeates <i>et al.</i> , 1996
casopitant	1.46	10 mg (3 days), q.d.	5 mg	1 h	Zamuner <i>et al.</i> , 2010
cimetidine	1.35	400 mg (2 days), b.i.d.	15 mg	0.5 h	Fee <i>et al.</i> , 1987
deferasirox	0.90	30 mg/kg (4 days), q.d.	5 mg	1 h	Skerjanec <i>et al.</i> , 2010
ethinyl estradiol	1.10	0.03 mg (10 days), q.d.	3 mg	0 h	Belle <i>et al.</i> , 2002
everolimus	1.31	10 mg (5 days), q.d.	4 mg	0 h	Urva <i>et al.</i> , 2013
felodipine	1.23	10 mg (7 days), q.d.	2 mg	1 h	Snyder <i>et al.</i> , 2014
fluoxetine	0.84	20 mg (12 days), q.d.	10 mg	1 h	Lam <i>et al.</i> , 2003
fluvoxamine	1.39	100 mg (12 days), b.i.d.	10 mg	1 h	Lam <i>et al.</i> , 2003
pazopanib	1.32	800 mg (17 days), q.d.	3 mg	0 h	Goh <i>et al.</i> , 2010
ranitidine	1.23	150 mg (2 days), b.i.d.	15 mg	0.5 h	Fee <i>et al.</i> , 1987
roxithromycin	1.47	300 mg (6 days), q.d.	15 mg	2 h	Backman <i>et al.</i> , 1994
simvastatin	1.24	10 mg (14 days), q.d.	15 µg/kg	0 h	Kokudai <i>et al.</i> , 2009
suvorexant	1.47	80 mg (14 days), q.d.	2 mg	2 h	NDA 204569
tadalafil	0.90	10 mg (14 days), q.d.	15 mg	0 h	Ring <i>et al.</i> , 2005

表 9 MSPK モデル解析に用いた市販薬の k_a 、 R_b 、 F_a 、 AUC_{inf} 、及び C_{max}

	k_a (1/h)	R_b	F_a	AUC_{inf} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)
atomoxetine ^a	2.29	0.93	1.00	15400	1710
atorvastatin ^b	1.67	0.49	1.00	25.6	3.53
azithromycin ^c	0.435	0.66	0.54	2550	289
casopitant ^d	0.503	0.69	1.00	391	66.0
cimetidine ^e	0.371	0.78	0.84	11600	1860
deferasirox ^f	0.736	0.78	1.00	543000	42440
ethinyl estradiol ^g	1.88	0.95	1.00	0.683	0.0679
everolimus ^h	5.96	0.62	1.00	324	31.0
felodipine ⁱ	0.817	0.62	0.93	25.3	2.20
fluoxetine ^j	0.442	0.87	1.00	850	44.0
fluvoxamine ^k	0.512	0.86	1.00	1171	107
pazopanib ^l	1.17	0.88	0.13	1260000	48900
ranitidine ^m	0.411	0.78	0.92	2540	474
roxithromycin ⁿ	1.23	0.64	0.59	151000	14230
simvastatin ^o	1.83	0.75	1.00	4.32	0.635
suvorexant ^p	2.17	0.69	1.00	9750	1180
tadalafil ^q	1.31	0.70	0.98	2450	189

k_a は a~q の注釈で示した文献の PK データを用いて Phoenix WinNonlin により算出した。 R_b は ADMET predictor を用いて予測した。 F_a 、単回投与後の AUC_{inf} 、及び複数回投与後の C_{max} は臨床 DDI 試験の投与条件を用いて GastroPlus により算出した。

^aTodor et al., 2016、^bYamazaki et al., 2017、^cCook et al., 2006、^dPellegatti et al., 2009、^eTiseo et al., 1998、^fSkerjanec et al., 2010、^gMarshall et al., 2017、^hPeveling-Oberhag et al., 2013、ⁱEdgar et al., 1987、^jZhi et al., 2003、^kFleishaker and Hulst, 1994、^lHeath et al., 2012、^mvan Crugten et al., 1986、ⁿHang et al., 2007、^oWu et al., 2016、^pCui et al., 2016、^qRing et al., 2005

表 10 シミュレーションに用いた市販薬の血漿タンパク非結合形分率 ($f_{u,p}$)、補正された血漿タンパク非結合形分率 ($f_{u,p,adj}$)、及びインキュベーション中の非結合形分率 ($f_{u,inc}$)

Precipitant	$f_{u,p}$	Data Source of $f_{u,p}$	$f_{u,p,adj}$	$f_{u,inc}$		
				Reversible inhibition	Time- dependent inhibition	Induction
atomoxetine	0.02	DIDB	0.020	0.967	-	-
atorvastatin	0.02	DIDB	0.018	0.989	0.898	0.588
azithromycin	0.94	In-house	0.92	-	0.944	-
casopitant	0.0060	In-house	0.0029	0.921	0.538	0.275
cimetidine	0.81	DIDB	0.80	0.998	0.984	-
deferasirox	0.01	DIDB	0.010	0.998	0.985	-
ethinyl estradiol	0.054	ADMET predictor	0.021	0.976	0.803	0.450
everolimus	0.078	ADMET predictor	0.00045	0.628	0.144	0.125
felodipine	0.004	DIDB	0.0035	0.971	0.772	0.420
fluoxetine	0.06	DIDB	0.059	0.959	0.702	0.365
fluvoxamine	0.23	DIDB	0.22	0.987	0.882	0.557
pazopanib	0.002	In-house	0.0019	0.978	0.817	0.466
ranitidine	0.85	DIDB	0.85	0.998	0.984	-
roxithromycin	0.05	Chantot et al., 1986	0.05	0.989	0.901	-
simvastatin	0.06	DIDB	0.0032	0.896	0.462	0.244
suvorexant	0.005	In-house	0.0034	0.949	0.652	0.334
tadalafil	0.06	DIDB	0.059	0.997	0.970	0.834

表 11 シミュレーションに用いた市販薬の溶解度、pKa、及び BSSR

	Reference solubility (mg/mL)	pH	Data source	pKa1 ^a	pKa2 ^a	BSSR ^b
atomoxetine	27.8	11.4	PubChem ^c	9.72 (base)	-	0
atorvastatin	1.23	6.0	PubChem	11.05 (acid)	4.71 (acid)	0
azithromycin	0.514	9.76	PubChem ^c	8.72 (base)	7.63 (base)	0
casopitant	0.034	6.8	In-house	6.74 (base)	-	0
cimetidine	9.38	8.79	PubChem ^c	6.85 (base)	4.16 (base)	0
deferasirox	0.33	6.8	In-house	8.75 (acid)	3.8 (acid)	1.4E+05
ethinyl estradiol	0.0113	6.98	PubChem ^c	10.32 (acid)	-	3.9E+04
everolimus	0.008	7	Predicted ^d	-	-	2.2E+05
felodipine	0.0034	6.8	In-house	0.51 (base)	10.95 (acid)	1.7E+05
fluoxetine	50	11.5	PubChem ^c	9.82 (base)	-	0
fluvoxamine	14.869	10.9	Literature ^{c,e}	9.05 (base)	-2.06 (base)	0
pazopanib	0.0001	6.8	In-house	5.14 (base)	3.09 (base)	1.4E+06
ranitidine	24.7	9.31	PubChem ^c	7.85 (base)	3.75 (base)	0
roxithromycin	0.283	9.45	Literature ^{c,f}	8.4 (base)	1.04 (base)	0
simvastatin	0.0014	5	Literature ^g	-	-	2.7E+05
suvorexant	0.022	6.8	In-house	2.22 (base)	0.048 (base)	2.3E+04
tadalafil	0.0032	7.00	PubChem ^c	11.47 (acid)	-	1.7E+05

^a ADMET predictor による予測値 (3 つ以上の pKa が予測された場合は生理的 pH の値のみ記載した)、^bBile salt solubilization ratio (GastroPlus による予測値)、^c水への溶解度 (水溶液の pH は ADMET predictor により予測)、^dATMET predictor による予測値、

^e Kwon and Armbrust, 2008、^fBiradar *et al.*, 2006、^gSerajuddin *et al.*, 1991

表 12 シミュレーションに用いた市販薬の膜透過性及び脂溶性

	P_{eff}	Data source	LogP or logD ^a	pH	Data source
atomoxetine	4.19	ADMET predictor	3.9	-	PubChem
atorvastatin	1.73	ADMET predictor	5.7	-	PubChem
azithromycin	0.27	ADMET predictor	0.7	7.4	In-house
casopitant	6.51	In-house	4.5	7.4	In-house
cimetidine	0.79	ADMET predictor	0.4	-	PubChem
deferasirox	8.18	ADMET predictor	3.52	-	PubChem
ethinyl estradiol	6.98	ADMET predictor	3.67	-	PubChem
everolimus	0.28	ADMET predictor	5.56		ADMET predictor
felodipine	3.97	ADMET predictor	3.8	-	PubChem
fluoxetine	2.71	ADMET predictor	4.05	-	PubChem
fluvoxamine	2.19	ADMET predictor	3.2	-	PubChem
pazopanib	3.62	In-house	3.6	7.4	In-house
ranitidine	1.24	ADMET predictor	0.27	-	PubChem
roxithromycin	0.27	ADMET predictor	1.7	-	PubChem
simvastatin	3.83	ADMET predictor	4.68	-	PubChem
suvorexant	6.34	ADMET predictor	4.2	7.4	In-house
tadalafil	2.98	ADMET predictor	1.7	-	PubChem

^apH が記載されている値は logD (distribution coefficient) でその他は logP (partition coefficient)

表 13 シミュレーションに用いた市販薬の薬物動態パラメータ

	CL	V _c	K ₁₂	K ₂₁	V ₂	FPE _{gut}	FPE _{liver}
	(L/h/kg)	(L/kg)	(1/h)	(1/h)	(L/kg)	(%)	(%)
atomoxetine	0.0558	0.363	3.73	2.93	0.463	-	-
atorvastatin	0.779	0.168	21.7	0.413	8.82	76	42
azithromycin	1.54	3.46	0.520	0.352	5.12	-	-
casopitant	0.365	1.28	0.470	0.138	4.34	-	-
cimetidine	0.420	1.40	-	-	-	-	-
deferasirox	0.0553	0.683	0.099	0.920	0.0737	-	-
ethinyl estradiol	0.265	1.62	0.282	0.231	1.97	46	32
everolimus	0.0746	0.0310	5.91	0.0847	2.17	78	23
felodipine	0.79	1.47	1.28	0.849	2.21	56	66
fluoxetine	0.0817	11.4	0.0377	0.00407	105	-	-
fluvoxamine	0.57	7.9	0.0099	0.00046	170	-	47
pazopanib	0.00118	0.0802	0.0279	0.0199	0.113	-	-
ranitidine	0.781	2.47	-	-	-	-	-
roxithromycin	0.0169	0.0186	2.80	0.600	0.0865	-	-
simvastatin	1.68	3.11	-	-	-	86	64
suvorexant	0.1172	0.490	0.827	0.463	0.873	-	-
tadalafil	0.0571	0.450	0.260	0.209	0.558	-	-

- : not calculated

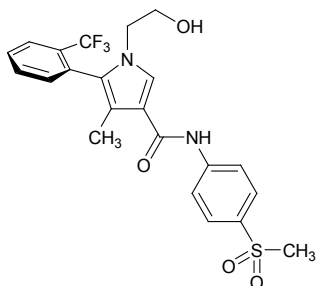
FPE は初回通過効果 (first pass effect) が大きいことが知られている薬物について算出した。

第2章 新規降圧薬エサキセレノンのDDI評価

試薬及び材料

エサキセレノン ((*S*)-1-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-*N*-[4-(methylsulfonyl) phenyl]-5-[2-(trifluoromethyl) phenyl]-1*H*-pyrrole-3-carboxamide) は第一三共 (Tokyo, Japan) において合成された (図 32)。^[14 C]エサキセレノンは積水メディカル (Ibaraki, Japan) において合成された。プールしたヒト肝ミクロソーム (50 例、性別混合、ロット番号: 0910398) は積水メディカルから購入した。6名のドナー (年齢: 48~89歳、男女) の新鮮ヒト肝細胞はHTCR Foundation (Regensburg, Germany) から入手した。フェナセチン、クマリン、ブプロピオン、パクリタキセル、ジクロフェナク、ブフラロール、クロゾキサゾン、テストステロン、オメプラゾール、フェノバルビタール、リファンピシン、 β -エストラジオール、およびジドブジンは、Sigma-Aldrich から購入し、メフェニトインは、Toronto Research Chemicals から購入した。ミダゾラムは和光純薬工業から購入した。他の試薬は市販されている特級、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) グレード、LC-MS グレード、または同等のグレードのものを使用した。

図 32 エサキセレノンの構造



In vitro DDI 試験

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、及びCYP3A4の可逆的阻害及びTDIを評価した。エサ

キサセレンンは UGT の基質であるため (Yamada et al., 2019)、UGT1A1 および UGT2B7 の可逆的阻害についてもヒト肝ミクロソームを用いて評価した。これらの UGT 分子種を選択した理由は、比較的多くの医薬品がこれらの分子種の基質になるために、日本の規制当局が阻害作用の評価を推奨しているためである (厚生労働省, 2018)。プローブ基質には以下の化合物を用いた。フェナセチン (CYP1A2, 30 μ M) 、クマリン (CYP2A6, 1 μ M) 、ブプロピオン (CYP2B6, 100 μ M) 、パクリタキセル (CYP2C8, 10 μ M) 、ジクロフェナク (CYP2C9, 5 μ M) 、(S)-メフェニトイン (CYP2C19, 20 μ M) 、ブフラロール (CYP2D6, 10 μ M) 、クロルゾキサゾン (CYP2E1, 40 μ M) 、ミダゾラム (CYP3A4, 5 μ M) 、テストステロン (CYP3A4, 50 μ M) 、 β -エストラジオール (UGT1A1, 15 μ M) 、及びジドブジン (UGT2B7, 600 μ M) 。プローブ基質濃度は、文献に基づいて K_m 値と同等かそれ以下になるように設定した。ただし、CYP3A 不活化パラメータを算出する際には、競合阻害の影響を除外するために、意図的に K_m より高い濃度を使用した (ミダゾラム 25 μ M、テストステロン 250 μ M)。ヒト肝ミクロソームの濃度は、CYP の可逆的阻害で 0.2 mg/mL、TDI で 2 mg/mL、UGT 阻害で 0.05 mg/mL を用いた。試験した最大キサセレンン濃度 (100 μ M) で 50%以上の阻害が認められた場合、50%阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。 IC_{50} が計算された薬物について追加の実験を行い、 K_i を算出した。CYP 分子種については、キサセレンンの阻害能を、NADPHgs との 30 分プレインキュベーションの有無で評価した。プレインキュベーションをした時の IC_{50} がプレインキュベーションをしない時より小さい場合、追加の実験を行い、 k_{inact} と K_i を算出した。インキュベーションは duplicate で実施した。新鮮ヒト初代培養肝細胞 (CYP1A2 について 3 例、CYP2B6 及び CYP3A4 について 3 例) を用いて、キサセレンンの CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 誘導能を評価した (キサセレンン濃度は CYP1A2 では 0.1~10 μ M、その他は 0.1~30 μ M) 。フェナセチン O-脱エチル化、ブプロピオン水酸化、

及びテストステロン 6 β -水酸化反応を用いて、それぞれ CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 の酵素活性を測定し、qRT-PCR 法により mRNA レベルを定量した。陽性対照には、オメプラゾール (CYP1A2、50 μ M)、フェノバルビタール (CYP2B6、10~3000 μ M)、及びリファンピシン (CYP3A4、0.1~30 μ M) を用いた。インキュベーションは、CYP1A2 については duplicate で、CYP2B6 及び CYP3A4 については triplicate で実施した。濃度依存的な誘導が見られた場合、E_{max} と EC₅₀ を算出した。OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OATP1B3、OCT1、及び OCT2 を発現させた MDCK-II 細胞、MATE1 及び MATE2-K を発現させた HEK293 細胞、及び BCRP 及び P-gp を発現する Caco-2 細胞を用いてエサキセレノンのトランスポーターに対する阻害を評価した。プローブ基質には以下の化合物を用いた。 [¹⁴C]メトホルミン (OCT1、OCT2、MATE1、及び MATE2-K、10 μ M)、 [³H]パラアミノ馬尿酸 (OAT1、2 μ M)、 [³H]エストロン-3-硫酸塩 (OAT3、0.75 μ M)、 [³H]エストラジオール-17 β -d-グルクロニド (OATP1B1、2 μ M)、 [³H]コレシストキニン-8 (OATP1B3、10 μ M)、 [³H]ジゴキシン (P-gp、100 nM)、及び [³H]ゲニステイン (BCRP、25 nM)。インキュベーションは triplicate で行い、インキュベーション時間は取り込みが線形になる範囲で行った (OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、及び OATP1B3 については 5 分、MATE1 については 1 分、MATE2-K については 2 分、P-gp 及び BCRP については 120 分)。

ヒト血漿およびヒト肝ミクロソームへの *in vitro* 蛋白結合

血漿への蛋白結合を測定するために、健康成人 (男性、3 例) の血漿にエサキセレノンのメタノール溶液 (最終濃度 : 0.03、0.3、及び 3 μ g/mL) を添加した。ミクロソームへの蛋白結合を測定するために、 [¹⁴C]エサキセレノンのエタノール溶液 (終濃度 : 50 μ M) をヒト肝ミクロソーム (タンパク濃度 : 0.2 または 2 mg/mL) に添加した。試料を 37°C で 10 分間インキュベート後、各試料を超遠心用チューブに移し、サンプルの

一部を総濃度サンプルとして分取後、超遠心した (4°C、436,000×g、140 分間)。超遠心後、各サンプルの上清の一部を非結合画分サンプルとして分取した。エサキセレンと¹⁴C]エサキセレンの濃度を、それぞれ LC-MS/MS 及び液体シンチレーションカウンタ (LSC) により測定した。非結合形分率は、遠心上清中の濃度を血漿またはミクロソーム中の濃度で除して算出した。血漿蛋白結合は、100 から非結合形分率 (%) を差し引いて算出した。

in vitro の血液/血漿中濃度比

健康成人 (男性、3 例) の血液に¹⁴C]エサキセレンのメタノール溶液 (終濃度 : 0.03、0.3、及び 3 µg/mL) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした後、一部をバイアルに採取した。残りの血液を遠心分離し (37°C、8,000×g、5 分間)、得られた血漿試料の一部をバイアルに採取した。放射能を LSC で測定し、血液/血漿濃度比 (R_b) を、血液の放射能を血漿の放射能で除して算出した。

DDI の MSPK モデル解析

P-gp および BCRP に対するエサキセレンの臨床での作用は、FDA の DDI ガイダンス (Food and Drug Administration, 2020) に準拠し、MSPK モデルを用いて予測した。相互作用薬の消化管内濃度 (I_{gut}) は $[dose]/[250mL]=42.9 \mu M$ と算出された。 I_{gut}/IC_{50} が 10 未満であれば、エサキセレンが生体内でこれらのトランスポーターを阻害する可能性は低いと考えられている (Food and Drug Administration, 2020)(Food and Drug Administration, 2020)(Food and Drug Administration, 2020)(Food and Drug Administration, 2020)。

CYP3A 及び CYP2B6 の阻害及び誘導を介したミダゾラムの AUC に対するエサキセレンの影響の MSPK モデルによる予測は、第 1 章と同様の方法で実施した。CYP2B6 基質の f_m は 1 を仮定した。エサキセレンの k_a は、5 mg 経口投与後の血漿中濃度推移

(Kato et al., 2018) から Phoenix WinNonlin version 6.3 を用いて 1.19 (1/h) と計算された。 f_{up} および R_b については、エサキセレノン 30 ng/mL での数値を用いた。5 mg を複数回経口投与後の C_{max} は、10 mg を 10 日間投与後の値 (Kato et al., 2018) から線形な PK を仮定して 87.2 ng/mL (約 0.2 μ M) と計算された。 K_i 、 K_l 、および EC_{50} は $f_{u,inc}$ を用いて非結合形の値に補正した。ミクロソーム中の $f_{u,inc}$ は実験により算出し、肝細胞中の $f_{u,inc}$ は Austin らの式 (Austin et al., 2005) を用いて GastroPlus により算出された値 (0.512) を用いた。利用可能なすべてのメカニズムを組み込んだ AUCR ($AUCR_{tot}$) に加えて、阻害と誘導を別々に組み込んだ AUCR (それぞれ $AUCR_{inh}$ 及び $AUCR_{ind}$) を計算した。消化管と肝臓における相互作用に基づく AUCR も別々に計算した (それぞれ $AUCR_g$ 及び $AUCR_h$)。

GastroPlus を用いた DDI の Dynamic モデル解析

ヒト PBPK モデルの構築には GastroPlus version 9.7.0009 を用いた。GastroPlus の ACAT モデル、コンパートメント PK モデル、DDI モジュールを用いて、それぞれ消化管吸収・代謝、全身分布・消失、DDI をシミュレーションした。以下に特に記載のないパラメータ (ヒトの生理学的パラメータなど) については、GastroPlus に組み込まれた値または GastroPlus により予測された値を用いた。エサキセレノンモデルに用いたパラメータを表 14 および表 15 に示す。消化管上皮細胞中の非結合形分率は 100% に設定した。基質モデルには第 1 章で用いたものと同じミダゾラムモデルを用いた (表 7)。異なるヒト PK パラメータで 3 つのエサキセレノンモデルを作成し、DDI の予測性を比較した。モデル 1 のヒト PK パラメータは、サルに 0.1 mg/kg で静脈内投与したときの CL 及び分布容積 (V_d) (Yamada et al., 2017) を、式 15 及び 16 を用いて一種アロメトリックスケーリングにより予測した (Lombardo et al., 2013a; b)

$$V_d \text{ human} = 0.79 \times V_d \text{ monkey} \quad (15)$$

$$CL_{\text{human}} = 0.40 \times CL_{\text{monkey}} \quad (16)$$

最大のリスクを評価するために、バイオアベイラビリティは1と仮定した。K₁₂およびK₂₁を予測することは困難であるため、モデル1には1コンパートメントモデルを用いた。モデル2のPKパラメータ (CL、V_c、K₁₂、及びK₂₁) は、エサキセレノン5 mgの経口投与後の血漿中濃度推移 (Kato et al., 2018) に適合するように GastroPlus 上で最適化した。モデル3については、CL、V_c、K₁₂、及びK₂₁を、エサキセレノン5 mgの静脈内投与後のデータ (Kurata et al., 2019) を用いて計算した。また、モデル3についてはFPEを入力した。肝臓のFPEはCLが肝クリアランスに等しいと仮定して算出し、F_gはF_aを1と仮定してエサキセレノンのバイオアベイラビリティ (89.0%) (Kurata et al., 2019) を用いて算出した。モデル3のPKパラメータを用いると溶出速度が高すぎるように思われたが、平均粒子半径から推定された溶出速度が不正確なためであると考え、経口投与後の血漿中濃度推移に適合するように粒子半径を3.5 μmから10 μmに増加させた。DDIシミュレーションはGastroPlusのDDIモジュールにおけるDynamicシミュレーションを用いて行った。AUCR_{tot}に加えて、阻害パラメータ (可逆的阻害及びTDI) 及び誘導パラメータを別々に組み込んだAUCR_{inh}及びAUCR_{ind}を算出した。MSPKモデル解析時と同様に、K_i、K_I、及びEC₅₀は非結合形濃度に補正した値を用いた。CYP3Aのk_{deg}には、肝臓と消化管の両方に0.0005 (min⁻¹)を用いた (Zhang et al., 2009)。F_gの比をAUCR_gとし、AUCR_hはAUCR_{tot}をAUCR_gで除算して計算した。予測に用いたパラメータの実験誤差等によるばらつきの影響を評価する目的で、DDIパラメータ (K_i、k_{inact}、K_I、E_{max}、EC₅₀) を0.5倍及び2倍、0.1倍及び10倍、及び物性パラメータ (溶解度、膜透過性、粒子半径) を0.5倍及び2倍に変化させた条件でシミュレーションを行った。k_{inact}及びK_I、E_{max}及びEC₅₀については、同時に同じ比率で変動させる条件でのシミュレーションも行った。臨床試験では、エサキセレノン5 mgを1日1回14日間経口投与し、ミダゾラム2 mgを14日目にエサキセレノンと同時投与した

(Furuie et al., 2019)。DDI シミュレーションは原則臨床試験と同じ投与条件で実施したが、投与条件の予測への影響を評価する目的で、モデル3を用いて、実際の臨床試験とは異なる投与条件でのシミュレーションを実施した。エサキセレノンの反復投与期間の影響を検討するため、1、2、3、14日目にミダゾラムを投与し、投与タイミングの影響を検討するため、エサキセレノンを14日間投与後の0、1、2、12時間後にミダゾラムを投与した場合のシミュレーションを行った。さらに、エサキセレノン1.25~10 mgの投与時のシミュレーションも行った。比較のために、強い可逆的阻害及び誘導を併せ持つ仮想相互作用薬モデルを、エサキセレノンの K_i および EC_{50} をそれぞれ1/50にすることにより作成し、相互作用薬の投与期間及び基質の投与タイミングの影響を評価した。また、ミダゾラムより小さい F_g を持つ仮想基質モデルを、ミダゾラムの消化管CYP3Aに対する V_{max} を2、4、及び8倍にすることで作成し、エサキセレノン併用の影響をシミュレートした。投与期間や投与タイミングの違いによるDDIの違いの理解を助けるため、消化管（例として空腸コンパートメント1）のCYP3A活性をプロットした。この際、TDIと誘導による活性の変動はGastroPlusにより算出されたが、可逆的阻害については算出されなかったため、可逆的阻害についてはシミュレートされた消化管上皮細胞中濃度推移を $1/(1+[I]/K_i)$ の式に当てはめることにより、Microsoft Excelを用いて算出した。

表 14 GastroPlus によるシミュレーションに用いたエサキセレノンの薬物動態パラメータ

	Model 1	Model 2	Model 3
CL (L/h/kg)	0.0773	0.0631	0.0553
V _c (L/kg)	1.06	1.27	0.332
V ₂ (L/kg)	-	0.520	0.896
K ₁₂ (1/h)	-	0.0111	1.26
K ₂₁ (1/h)	-	0.0272	0.467
FPE _{liver} (%)	-	-	4.86
FPE _{gut} (%)	-	-	6.41

CL : クリアランス、V_c : セントラルコンパートメントの分布容積、V₂ : 第2コンパートメントの分布容積、K₁₂ : 第2コンパートメントへの分布速度定数、K₂₁ : 第2コンパートメントからの分布速度定数、FPE : 初回通過効果、Model 1 : サルデータから予測した PK パラメータを使用、Model 2 : 経口投与後のデータから最適化した PK パラメータを使用、Model 3 : 静脈内投与後のデータから算出した PK パラメータを使用、投与条件は臨床試験と同じ (エサキセレノン 5 mg を 1 日 1 回 14 日間投与)

表 15 GastroPlus によるシミュレーションに用いたエサキセレノンの物性パラメータ

Parameters (units)			
Molecular weight	466.47	Particle radius (μm)	3.5 (model 1 and 2)
Solubility (mg/mL)	0.01 (water, pH 8.5)		10^e (model 3)
	0.0395 (FaSSIF) ^{a,c}	R_b	0.758 ^f
	0.15 (FeSSIF) ^{b,c}	$f_{u,p}$ (%)	1.0 ^f (0.867 ^g)
logD	3.4 (pH 7.4)	$f_{u,inc, \text{microsome}}$	0.434 (at 0.2 mg/mL)
pKa	10.7 ^c		0.066 (at 2 mg/mL)
P_{eff} (cm/s $\times 10^{-4}$)	4.93 ^d	$f_{u,inc, \text{hepatocyte}}$	0.512 ^c

^a fasted-state simulated intestinal fluid (pH 6.5, bile salt conc.: 3 mM)、^b fed-state simulated intestinal fluid (pH 5, bile salt conc.: 15 mM)、^c GastroPlus により予測、^d エサキセレノンの Caco-2 膜透過性 (Yamada et al., 2019) より算出、^e 血漿中濃度推移に合わせて最適化した値、^f エサキセレノン濃度 : 30 ng/mL、^g 血漿中の脂質への結合を GastroPlus により補正した値

参考文献

- Aasa J, Hu Y, Eklund G, Lindgren A, Baranczewski P, Malmquist J, Turek D, and Bueters T (2013) Effect of solvents on the time-dependent inhibition of CYP3A4 and the biotransformation of AZD3839 in human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **41**:159–169.
- Agoram B, Woltosz WS, and Bolger MB (2001) Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* **50**.
- Albaugh DR, Fullenwider CL, Fisher MB, and Hutzler JM (2012) Time-dependent inhibition and estimation of CYP3A clinical pharmacokinetic drug-drug interactions using plated human cell systems. *Drug Metab Dispos* **40**:1336–1344.
- Andersin R (1991) Solubility and acid-base behaviour of midazolam in media of different pH, studied by ultraviolet spectrophotometry with multicomponent software. *J Pharm Biomed Anal* **9**:451–455.
- Arai K, Homma T, Morikawa Y, Ubukata N, Tsuruoka H, Aoki K, Ishikawa H, Mizuno M, and Sada T (2015) Pharmacological profile of CS-3150, a novel, highly potent and selective non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **761**:226–234.
- Arai K, Morikawa Y, Ubukata N, Tsuruoka H, and Homma T (2016) CS-3150, a novel nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist, shows preventive and therapeutic effects on renal injury in deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **358**:548–557.

- Arai K, Tsuruoka H, and Homma T (2015) CS-3150, a novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist, prevents hypertension and cardiorenal injury in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **769**:266–273.
- Austin RP, Barton P, Mohamed S, and Riley RJ (2005) The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. **33**:419–425.
- Backman JT, Aranko K, Himberg JJ, and Olkkola KT (1994) A pharmacokinetic interaction between roxithromycin and midazolam. *Eur J Clin Pharmacol* **46**:551–555.
- Belle DJ, Callaghan JT, Gorski JC, Maya JF, Mousa O, Wrighton SA, and Hall SD (2002) The effects of an oral contraceptive containing ethinylloestradiol and norgestrel on CYP3A activity. Sekisui Medical Co., Ltd. Research Report. 2016;No. GE-1416-G (Daiichi Sankyo Report No. AM15-C0070-R01). *Br J Clin Pharmacol* **53**:67–74.
- Biradar S V., Patil AR, Sudarsan G V., and Pokharkar VB (2006) A comparative study of approaches used to improve solubility of roxithromycin. *Powder Technol* **169**:22–32.
- Brown HS, Ito K, Galetin A, and Houston JB (2005) Prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data: impact of incorporating parallel pathways of drug elimination and inhibitor absorption rate constant. *Br J Clin Pharmacol* **60**:508–518.
- Chang SY, Chen C, Yang Z, and Rodrigues AD (2009) Further assessment of 17alpha-ethinyl estradiol as an inhibitor of different human cytochrome P450 forms in vitro. *Drug Metab Dispos* **37**:1667–1675.
- Chantot J, Bryskier A, and Gasc J (1986) Antibacterial activity of roxithromycin: a laboratory evaluation. *J Antibiot* **39**:660–668.

- Cook JA, Randinitis EJ, Bramson CR, and Wesche DL (2006) Lack of a pharmacokinetic interaction between azithromycin and chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* **74**:407–412.
- Cui D, Cabalu T, Yee KL, Small J, Li X, Liu B, Maciolek C, Smith S, Liu W, McCrea JB, and Prueksaritanont T (2016) In vitro and in vivo characterisation of the metabolism and disposition of suvorexant in humans. *Xenobiotica* **46**:882–895.
- Dumond JB, Vourvahis M, Rezk NL, Patterson KB, Tien HC, White N, Jennings SH, Choi SO, Li J, Wagner MJ, La-Beck NM, Drulak M, Sabo JP, Castles MA, MacGregor TR, and Kashuba AD (2010) A phenotype-genotype approach to predicting CYP450 and P-glycoprotein drug interactions with the mixed inhibitor/inducer tipranavir/ritonavir. *Clin Pharmacol Ther* **87**:735–742.
- Edgar B, Lundborg P, and Regårdh CG (1987) Clinical Pharmacokinetics of Felodipine. *Drugs* **34 Suppl 3**:16–27.
- Fahmi OA, Hurst S, Plowchalk D, Cook J, Guo F, Youdim K, Dickins M, Phipps A, Darekar A, Hyland R, and Obach RS (2009) Comparison of different algorithms for predicting clinical drug-drug interactions, based on the use of CYP3A4 in vitro data: Predictions of compounds as precipitants of interaction. *Drug Metab Dispos* **37**:1658–1666.
- Fahmi OA, Maurer TS, Kish M, Cardenas E, Boldt S, and Nettleton D (2008) A combined model for predicting CYP3A4 clinical net drug-drug interaction based on CYP3A4 inhibition, inactivation, and induction determined in vitro. *Drug Metab Dispos* **36**:1698–1708.
- Fee JPH, Collier PS, Howard PJ, and Dundee JW (1987) Cimetidine and ranitidine increase midazolam bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* **41**:80–84.
- Fleishaker JC, and Hulst LK (1994) A pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the combined administration of alprazolam and fluvoxamine. *Eur J Clin Pharmacol* **46**:35–39.

Food and Drug Administration (2020) In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450

Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry, US

Department of Health and Human Services Center for Drug Evaluation and Research, FDA,
Silver Spring, MD.

Foti RS, Rock DA, Wienkers LC, and Wahlstrom JL (2010) Selection of alternative CYP3A4

probe substrates for clinical drug interaction studies using in vitro data and in vivo simulation.

Drug Metab Dispos **38**:981–987.

Furuie H, Toyama K, Okuda Y, Kuroda K, Shimizu T, Kato M, and Ishizuka H (2019) The effect

of multiple oral administration of esaxerenone on the pharmacokinetics of midazolam in

healthy Japanese males. *Eur J Clin Pharmacol* **75**:Supple 1:S38.

Galetin A, Gertz M, and Houston JB (2008) Potential role of intestinal first-pass metabolism in the

prediction of drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:909–922.

Galetin A, Hinton LK, Burt H, Obach RS, and Houston JB (2007) Maximal inhibition of intestinal

first-pass metabolism as a pragmatic indicator of intestinal contribution to the drug-drug

interactions for CYP3A4 cleared drugs. *Curr Drug Metab* **8**:685–693.

Galetin A, Ito K, Hallifax D, and Houston JB (2005) CYP3A4 substrate selection and substitution

in the prediction of potential drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther* **314**:180–190.

Gascon MP, and Dayer P (1991) In vitro forecasting of drugs which may interfere with the

biotransformation of midazolam. *Eur J Clin Pharmacol* **41**:573–578.

GastroPlus 9.7 Manual (2019) . *Simulations Plus, Inc.*

Gertz M, Cartwright CM, Hobbs MJ, Kenworthy KE, Rowland M, Houston JB, and Galetin A

(2013) Cyclosporine inhibition of hepatic and intestinal CYP3A4, uptake and efflux

transporters: application of PBPK Modeling in the assessment of drug-drug interaction potential. *Pharm Res* **30**:761–780.

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

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

Goh BC, Reddy NJ, Dandamudi UB, Laubscher KH, Peckham T, Hodge JP, Suttle AB, Arumugham T, Xu Y, Xu CF, Lager J, Dar MM, and Lewis LD (2010) An evaluation of the drug interaction potential of pazopanib, an oral vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, using a modified cooperstown 5+1 cocktail in patients with advanced solid tumors. *Clin Pharmacol Ther* **88**:652–659.

Greenblatt DJ (2014) In vitro prediction of clinical drug interactions with CYP3A substrates: we are not there yet. *Clin Pharmacol Ther* **95**:133–135.

Grimstein M, Yang Y, Zhang X, Grillo J, Huang SM, Zineh I, and Wang Y (2019) Physiologically based pharmacokinetic modeling in regulatory science: An update from the U.S. Food and Drug Administration's Office of Clinical Pharmacology. *J Pharm Sci* **108**:21–25.

Guest EJ, Aarons L, Houston JB, Rostami-Hodjegan A, and Galetin A (2011) Critique of the two-fold measure of prediction success for ratios: Application for the assessment of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **39**:170–173.

- Guest EJ, Rowland-Yeo K, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT, Houston JB, and Galetin A (2011) Assessment of algorithms for predicting drug-drug interactions via inhibition mechanisms: comparison of dynamic and static models. *Br J Clin Pharmacol* **71**:72–87.
- Guo Y, Chu X, Parrott NJ, Brouwer KLR, Hsu V, Nagar S, Matsson P, Sharma P, Snoeys J, Sugiyama Y, Tatosian D, Unadkat JD, Huang SM, Galetin A, and Consortium IT (2018) Advancing Predictions of Tissue and Intracellular Drug Concentrations Using In Vitro, Imaging and Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling Approaches. *Clin Pharmacol Ther* **104**:865–889.
- Haarhoff ZE, Kramer MA, Zvyaga TA, Zhang J, Bhutani P, Subramanian M, and Rodrigues AD (2017) Comprehensive evaluation of liver microsomal cytochrome P450 3A (CYP3A) inhibition: comparison of cynomolgus monkey and human. *Xenobiotica* **47**:470–478.
- Hallifax D, and Houston J (2006) Binding of drugs to hepatic microsomes: comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement. *Drug Metab Dispos* **34**:724–726.
- Hang TJ, Zhang M, Song M, Shen JP, and Zhang YD (2007) Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta* **382**:20–24.
- Heath EI, Forman K, Malburg L, Gainer S, Suttle AB, Adams L, Ball H, and LoRusso P (2012) A phase I pharmacokinetic and safety evaluation of oral pazopanib dosing administered as crushed tablet or oral suspension in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **30**:1566–1574.

- Heikkinen AT, Baneyx G, Caruso A, and Parrott N (2012) Application of PBPK modeling to predict human intestinal metabolism of CYP3A substrates - An evaluation and case study using GastroPlus™. *Eur J Pharm Sci* **47**:375–386.
- Hsueh CH, Hsu V, Pan Y, and Zhao P (2018) Predictive performance of physiologically-based pharmacokinetic models in predicting drug–drug interactions involving enzyme modulation. *Clin Pharmacokinet* **57**:1337–1346.
- Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, and Sugiyama Y (1998) Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug–drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* **50**:387–412.
- Ito S, Itoh H, Rakugi H, Okuda Y, Yoshimura M, and Yamakawa S (2020) Double-Blind Randomized Phase 3 Study Comparing Esaxerenone (CS-3150) and Eplerenone in Patients With Essential Hypertension (ESAX-HTN Study). *Hypertension* **75**:51–58, Am Heart Assoc.
- Ito S, Shikata K, Nangaku M, Okuda Y, and Sawanobori T (2019) Efficacy and safety of esaxerenone (CS-3150) for the treatment of type 2 diabetes with microalbuminuria: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. *Clin J Am Soc Nephrol* **14**:1161–1172.
- Itoh H, Ito S, Rakugi H, Okuda Y, and Nishioka S (2019) Efficacy and safety of dosage-escalation of low-dosage esaxerenone added to a RAS inhibitor in hypertensive patients with type 2 diabetes and albuminuria: a single-arm, open-label study. *Hypertens Res* **42**:1572–1581.
- Jacobson TA (2004) Comparative pharmacokinetic interaction profiles of Pravastatin, Simvastatin, and Atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol* **94**:1140–1146.

- Jones HM, Chen Y, Gibson C, Heimbach T, Parrott N, Peters SA, Snoeys J, Upreti VV, Zheng M, and Hall SD (2015) Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: a pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacol Ther* **97**:247–262.
- Kato M, Furuie H, Shimizu T, Miyazaki A, Kobayashi F, and Ishizuka H (2018) Single - and multiple - dose escalation study to assess pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of oral esaxerenone in healthy Japanese subjects. *Br J Clin Pharmacol* **84**:1821–1829.
- Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, Burhenne J, Haefeli WE, and Mikus G (2011) Determining the time course of CYP3A inhibition by potent reversible and irreversible CYP3A inhibitors using a limited sampling strategy. *Clin Pharmacol Ther* **90**:666–673.
- Kenny JR, Mukadam S, Zhang C, Tay S, Collins C, Galetin A, and Khojasteh SC (2012) Drug-drug interaction potential of marketed oncology drugs: In vitro assessment of time-dependent cytochrome P450 inhibition, reactive metabolite formation and drug-drug interaction prediction. *Pharm Res* **29**:1960–1976.
- Kirby BJ, Collier AC, Kharasch ED, Whittington D, Thummel KE, and Unadkat JD (2011) Complex Drug Interactions of HIV Protease Inhibitors 1 : Inactivation , Induction , and Inhibition of Cytochrome P450 3A by Ritonavir or Nelfinavir. **39**:1070–1078.
- Kirigaya Y, Shiramoto M, Ishizuka T, Uchimarui H, Irie S, Kato M, Shimizu T, Nakatsu T, Nishikawa Y, and Ishizuka H (2020a) Effects of itraconazole and rifampicin on the single-dose pharmacokinetics of the non-steroidal mineralocorticoid receptor blocker esaxerenone in healthy Japanese subjects. *Br J Clin Pharmacol* doi: 10.1111/bcp.14302.
- Kirigaya Y, Shiramoto M, Ishizuka T, Uchimarui H, Irie S, Kato M, Shimizu T, Nakatsu T, Nishikawa Y, and Ishizuka H (2020b) Pharmacokinetic interactions of esaxerenone with amlodipine and digoxin in healthy Japanese subjects. *BMC Pharmacol Toxicol* In press.

Kokudai M, Inui N, Takeuchi K, Sakaeda T, Kagawa Y, and Watanabe H (2009) Effects of statins on the pharmacokinetics of midazolam in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **49**:568–573.

Kurata A, Furuie H, Ishizuka T, Nakatsu T, Shimizu T, Kato M, Nishikawa Y, and Ishizuka H (2019) Absolute bioavailability of esaxerenone and food effects on its pharmacokinetics after a single oral dose in healthy Japanese subjects: an open-label crossover study. *Adv Ther* **36**:1618–1627.

Kwon JW, and Armbrust KL (2008) Aqueous solubility, n-octanol-water partition coefficient, and sorption of five selective serotonin reuptake inhibitors to sediments and soils. *Bull Environ Contam Toxicol* **81**:128–135.

Lam YWF, Alfaro CL, Ereshefsky L, and Miller M (2003) Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions of Oral Midazolam with Ketoconazole, Fluoxetine, Fluvoxamine, and Nefazodone. *J Clin Pharmacol* **43**:1274–1282.

Liu B, Crewe HK, Ozdemir M, Rowland Yeo K, Tucker G, and Rostami-Hodjegan A (2017) The absorption kinetics of ketoconazole plays a major role in explaining the reported variability in the level of interaction with midazolam: Interplay between formulation and inhibition of gut wall and liver metabolism. *Biopharm Drug Dispos* **38**:260–270.

Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Liric Rajlic I, and Obach RS (2013a) Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 2: clearance. *J Clin Pharmacol* **53**:178–191.

Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Liric Rajlic I, and Obach RS (2013b) Comprehensive assessment of human

pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data , part 1: volume of distribution at steady state. *J Clin Pharmacol* **53**:167–177.

Mao J, Tay S, Khojasteh CS, Chen Y, Hop CE, and Kenny JR (2016) Evaluation of time dependent inhibition assays for marketed oncology drugs: comparison of human hepatocytes and liver microsomes in the presence and absence of human plasma. *Pharm Res* **33**:1204–1219.

Marshall WL, Feng HP, Caro L, Talaty J, Guo Z, Huang X, Panebianco D, Ma J, Mangin E, O'Reilly TE, Butterson JR, and Yeh WW (2017) No clinically meaningful pharmacokinetic interaction between the hepatitis C virus inhibitors elbasvir and grazoprevir and the oral contraceptives ethinyl estradiol and levonorgestrel. *Eur J Clin Pharmacol* **73**:593–600.

Mathews D, McNutt B, Okerholm R, Flicker M, and McBride G (1991) Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* **266**:2375–2376.

Mc Donnell CG, Shorten G, and Van Pelt FN (2005) Effect of atorvastatin and fluvastatin on the metabolism of midazolam by cytochrome P450 in vitro. *Anaesthesia* **60**:747–753.

Motta P, Pons N, Pagliaruso S, Pellegatti M, and Bonomo F (2011) Casopitant: in vitro data and SimCyp simulation to predict in vivo metabolic interactions involving cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* **39**:363–372.

Nishiya Y, Nakamura K, Okudaira N, Abe K, Kobayashi N, and Okazaki O (2010) Effects of organic solvents on the time-dependent inhibition of CYP3A4 by diazepam. *Xenobiotica* **40**:1–8.

Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, and Tremaine LM (2006) The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:336–348.

- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, and Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 “pie.” *Drug Metab Dispos* **34**:880–886.
- Pellegatti M, Bordini E, Fizzotti P, Roberts A, and Johnson BM (2009) Disposition and metabolism of radiolabeled casopitant in humans. *Drug Metab Dispos* **37**:1635–1645.
- Peveling-Oberhag J, Zeuzem S, Yong WP, Kunz T, Paquet T, Bouillaud E, Urva S, Anak O, Sellami D, and Kobalava Z (2013) Effects of Hepatic Impairment on the Pharmacokinetics of Everolimus: A Single-Dose, Open-Label, Parallel-Group Study. *Clin Ther* **35**:215–225.
- Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, Cabalu T, and Hochman J (2013) Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J* **15**:629–645.
- Rakugi H, Ito S, Itoh H, Okuda Y, and Yamakawa S (2019) Long-term phase 3 study of esaxerenone as mono or combination therapy with other antihypertensive drugs in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* **42**:1932–1941.
- Ring BJ, Patterson BE, Mitchell MI, Vandenbranden M, Gillespie J, Bedding AW, Jewell H, Payne CD, Forgue ST, Eckstein J, Wrighton SA, and Phillips DL (2005) Effect of tadalafil on cytochrome P450 3A4-mediated clearance: Studies in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* **77**:63–75.
- Rostami-Hodjegan A, and Tucker G (2004) “In silico” simulations to assess the “in vivo” consequences of “in vitro” metabolic drug-drug interactions. *Drug Discov Today Technol* **1**:441–448.
- Rowland Yeo K, Walsky RL, Jamei M, Rostami-Hodjegan A, and Tucker GT (2011) Prediction of time-dependent CYP3A4 drug-drug interactions by physiologically based

pharmacokinetic modelling: Impact of inactivation parameters and enzyme turnover. *Eur J Pharm Sci* **43**:160–173.

Sauer JM, Long AJ, Ring B, Gillespie JS, Sanburn NP, DeSante KA, Petullo D, VandenBranden MR, Jensen CB, Wrighton SA, Smith BP, Read HA, and Witcher JW (2004) Atomoxetine hydrochloride: clinical drug-drug interaction prediction and outcome. *J Pharmacol Exp Ther* **308**:410–418.

Serajuddin AT, Ranadive SA, and Mahoney EM (1991) Relative lipophilicities, solubilities, and structure - pharmacological considerations of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A (HMG - CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J Pharm Sci* **80**:830–834.

Shebley M, Sandhu P, Emami Riedmaier A, Jamei M, Narayanan R, Patel A, Peters SA, Reddy VP, Zheng M, de Zwart L, Beneton M, Bouzom F, Chen J, Chen Y, Cleary Y, Collins C, Dickinson GL, Djebli N, Einolf HJ, Gardner I, Huth F, Kazmi F, Khalil F, Lin J, Odinecs A, Patel C, Rong H, Schuck E, Sharma P, Wu SP, Xu Y, Yamazaki S, Yoshida K, and Rowland M (2018) Physiologically based pharmacokinetic model qualification and reporting procedures for regulatory submissions: a consortium perspective. *Clin Pharmacol Ther* **104**:88–110.

Skerjanec A, Wang J, Maren K, and Rojkjaer L (2010) Investigation of the pharmacokinetic interactions of deferasirox, a once-daily oral iron chelator, with midazolam, rifampin, and repaglinide in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **50**:205–213.

Snyder BD, Rowland A, Polasek TM, Miners JO, and Doogue MP (2014) Evaluation of felodipine as a potential perpetrator of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol* **70**:1115–1122.

- Thompson PD, Priscilla C, and Karas RH (2003) Statin-associated myopathy. *JAMA* **289**:1681–1690.
- Thummel KE, O’Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, and Wilkinson GR (1996) Oral first - pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A - mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **59**:491–502.
- Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, Raisys VA, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Perkins JD, and Carithers RL (1994) Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther* **271**:549–556.
- Tiseo PJ, Perdomo CA, and Friedhoff LT (1998) Concurrent administration of donepezil HCl and cimetidine: assessment of pharmacokinetic changes following single and multiple doses. *Br J Clin Pharmacol* **46 Suppl 1**:25–29.
- Todor I, Popa A, Neag M, Muntean D, Bocsan C, Buzoianu A, Vlase L, Gheldiu AM, and Briciu C (2016) Evaluation of a potential metabolism-mediated drug-drug interaction between atomoxetine and bupropion in healthy volunteers. *J Pharm Pharm Sci* **19**:198–207.
- Tsunoda SM, Velez RL, Von Moltke LL, and Greenblatt DJ (1999) Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: Effect of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther* **66**:461–471.
- Urva S, Bouillaud E, Delaney R, Jappe A, and Cheung W (2013) A phase I study evaluating the effect of everolimus on the pharmacokinetics of midazolam in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* **53**:444–450.

- van Crugten J, Bochner F, Keal J, and Somogyi A (1986) Selectivity of the cimetidine-induced alterations in the renal handling of organic substrates in humans. Studies with anionic, cationic and zwitterionic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **236**:481–487.
- Vieira ML, Kirby B, Ragueneau-Majlessi I, Galetin A, Chien JY, Einolf HJ, Fahmi OA, Fischer V, Fretland A, Grime K, Hall SD, Higgs R, Plowchalk D, Riley R, Seibert E, Skordos K, Snoeys J, Venkatakrishnan K, Waterhouse T, Obach RS, Berglund EG, Zhang L, Zhao P, Reynolds KS, and Huang SM (2014) Evaluation of various static in vitro-in vivo extrapolation models for risk assessment of the CYP3A inhibition potential of an investigational drug. *Clin Pharmacol Ther* **95**:189–198.
- von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, Harmatz JS, and Shader RI (1994) In vitro prediction of the terfenadine-ketoconazole pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol* **34**:1222–1227.
- von Moltke LL, Greenblatt DJ, Schmider J, Duan SX, Wright CE, Harmatz JS, and Shader RI (1996) Midazolam hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by fluoxetine, norfluoxetine, and by azole antifungal agents. *J Clin Pharmacol* **36**:783–791.
- Wu K, Xu J, Fong R, Yao X, Xu Y, Guiney W, Gray F, and Lockhart A (2016) Evaluation of the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug-drug interaction potential of a selective Lp-PLA2 inhibitor (GSK2647544) in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* **54**:935–949.
- Yamada M, Mendell J, Takakusa H, Shimizu T, and Ando O (2019) Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of [¹⁴C]esaxerenone, a novel mineralocorticoid receptor blocker in humans. *Drug Metab Dispos* **47**:340–349.
- Yamada M, Takei M, Suzuki E, Takakusa H, Kotsuma M, Washio T, Murayama N, Inoue S, and Izumi T (2017) Pharmacokinetics, distribution, and disposition of esaxerenone, a novel,

- highly potent and selective non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist, in rats and monkeys. *Xenobiotica* **47**:1090–1103.
- Yamazaki T, Desai A, Goldwater R, Han D, Lasseter KC, Howieson C, Akhtar S, Kowalski D, Lademacher C, Rammelsberg D, and Townsend R (2017) Pharmacokinetic Interactions Between Isavuconazole and the Drug Transporter Substrates Atorvastatin, Digoxin, Metformin, and Methotrexate in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev* **6**:66–75.
- Yang J, Jamei M, Yeo KR, Rostami-Hodjegan A, and Tucker GT (2007) Misuse of the well-stirred model of hepatic drug clearance. *Drug Metab Dispos* **35**:501–502.
- Yang J, Jamei M, Yeo KR, Tucker GT, and Rostami-Hodjegan A (2007) Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr Drug Metab* **8**:676–684.
- Yeates RA, Laufen H, and Zimmermann T (1996) Interaction between midazolam and clarithromycin: comparison with azithromycin. *Int J Clin Pharmacol Ther* **34**:400–405.
- Yu H, and Tweedie D (2013) A Perspective on the contribution of metabolites to drug-drug interaction potential: the need to consider both circulating levels and inhibition potency. *Drug Metab Dispos* **41**:536–540.
- Zamuner S, Johnson BM, Pagliarusco S, Fina P, Peroni M, Fiore M, Adams LM, and Fernandes SA (2010) Effect of single and repeat doses of casopitant on the pharmacokinetics of CYP450 3A4 substrates midazolam and nifedipine. *Br J Clin Pharmacol* **70**:537–546.
- Zhang X, Quinney SK, Gorski JC, Jones DR, and Hall SD (2009) Semiphysiologically based pharmacokinetic models for the inhibition of midazolam clearance by diltiazem and its major metabolite. *Drug Metab Dispos* **37**:1587–1597, ASPET.

Zhi J, Moore R, Kanitra L, and Mulligan TE (2003) Effects of orlistat, a lipase inhibitor, on the pharmacokinetics of three highly lipophilic drugs (amiodarone, fluoxetine, and simvastatin) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **43**:428–435.

Zimmerlin A, Trunzer M, and Faller B (2011) CYP3A time-dependent inhibition risk assessment validated with 400 reference drugs. *Drug Metab Dispos* **39**:1039–1046.

イトリゾールカプセル添付文書 (2017). 2017年7月改訂 (第28版) .

セララ錠添付文書 (2019). 2019年9月改訂 (第1版) .

ベルソムラ錠添付文書 (2020). 2020年1 月改訂 (第7 版) .

厚生労働省 (2018) 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.

日本医療薬学会 (2019) 医療現場における薬物相互作用へのかかわり方ガイド.