

博士論文

全身暴露およびインビトロ結合試験を基にした，ドパミンD2受容体拮抗薬およびヒスタミンH1受容体拮抗薬の中枢における受容体占有率予測

金光 佳世子

目次

謝辞.....	1
略語表.....	3
第一章 諸言.....	5
第二章 ドパミン D2 受容体占有率時間推移の予測.....	9
要約.....	9
諸言.....	10
結果.....	12
1 [3H]raclopride の D2 受容体拮抗薬結合パラメータ評価.....	12
2 D2 拮抗薬の <i>in vitro</i> 及び <i>in silico</i> 非結合形分率.....	15
3 D2 拮抗薬の <i>in vivo</i> 脳内非結合形分率.....	16
4 P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送.....	17
5 PET によるヒトドパミン D2 受容体占有率.....	18
6 脳内非結合形濃度及び D2RO の予測.....	18
7 感度分析.....	20
8 パラメータの最適化.....	22
9 Quetiapine の代謝物に関する検討.....	25
10 薬物間相互作用(DDI)予測.....	25
11 他の受容体における占有率予測.....	28
考察.....	29
第三章 ヒスタミン H1 受容体占有率時間推移の予測.....	33
要旨.....	33
諸言.....	34
結果.....	36
1 ヒト H1 受容体との結合パラメータ評価.....	36
2 抗ヒスタミン薬の血清・血漿・脳内非結合形分率及び R_B	39
3 マウス及びサル脳マイクロダイアリシス法による抗ヒスタミン薬の C_{ISF}	40
4 脳内非結合形濃度及び RO の予測.....	41
5 P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送及び relative activity factor (RAF)法による予測.....	44
6 感度分析.....	47
7 Bepotastine のパラメータ最適化検討.....	49
8 Olopatadine を反復投与後の RO 予測.....	49
9 Ketotifen グルクロン酸抱合体による結合試験.....	50
考察.....	51
第四章 結語.....	56
第五章 実験の部.....	58
第六章 参考文献.....	73

謝辞

本研究を進めるに際し、ご指導ご鞭撻を賜りました元東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室・教授、現理化学研究所・イノベーション推進センター・杉山特別研究室・特別招聘研究員 杉山雄一博士に謹んで感謝の意を表します。

また研究に際し終始懇篤なるご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室・教授 楠原洋之博士に心より感謝いたします。さらに有益な御教示と臨床 PET 試験成績の御提供を頂きました放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター 須原哲也博士ならびに荒川亮介博士に深く感謝いたします。論文の作成にあたり貴重な御助言とサルマイクロダイアリンスデータの御提供を頂きましたエーザイ株式会社・筑波研究所 野崎芳胤博士ならびに永治陽子博士に深謝いたします。またヒスタミン H1 受容体占有率の PET 試験について御指導頂きました東北大学大学院・医学系研究科・機能薬理学分野教授 谷内一彦博士に感謝いたします。

Bepotastine を御供与頂いた田辺三菱製薬株式会社に深謝いたします。本研究は New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO)が出資する NEDO MicroDose-PJ(日本)の一環で実施しました。またこの研究の一部は Japan Agency for Medical Research and development, AMED, (JSPS KAKENHI 26293032; 26293032)の the Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies (Brain/MINDS)により支援を受けました。

本研究は東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室において、2009年4月より2011年3月に行い、さらにその後徳島研究所で機会を頂き実施した結果をまとめたものです。本研究遂行の機会ならびに多大なる御便宜を賜りました、大塚製薬株式会社・医薬品事業部・元研究統括 夏目国昭執行役員ならびに藪内洋一博士、元徳島研究所 高橋伸夫所長、徳島研究所・元安全性研究センター代謝分析研究部部長、現所長 榎山英二博士、前臨床研究センター・センター長 梅原健博士に厚く御礼申し上げます。

また ID-15036 を合成して頂きました、大塚製薬株式会社・元有機化学研究所所長 小松真博士、創薬化学研究所 田中理紀博士、マウスマイクロダイアリンス試験を御教示頂きました、中枢神経疾患研究所 榎本琢巳研究員、MOEによる計算を実施頂きました、元 Qs'研究所・合成室室長 小川英則博士、創薬化学研究所 中石雄一郎博士、ADMET predictorによる計算を実施頂きました、製剤研究所 宮田憲一博士、研究遂行に御助言、御協力を頂きました、徳島研究所・前臨床安全センター・薬物動態研究部 笹辺裕行博士、柴田昌和研究員、瀬川雅博研究員をはじめ、薬物動態研究部の皆様に心より感謝いたします。

さらに研究全般にわたり有益な御助言を頂きました東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室講師 前田和哉博士、助教 林久允博士、分子薬物動態学教室の学生の方々ならびに研究生の方々に心より御礼申し上げます。

最後に私事ではありますが、支えてくれた家族、友人、息子に感謝いたします。

本研究は以下の原著論文に基づいたものである。

Kayoko Kanamitsu, Ryosuke Arakawa, Yuichi Sugiyama, Tetsuya Suhara, and Hiroyuki Kusuhara. Prediction of CNS occupancy of dopamine D2 receptor based on systemic exposure and in vitro experiments. *Drug Metab Pharmacokinet.* 31:395-404, 2016.

Kayoko Kanamitsu, Yoshitane Nozaki, Yoko Nagaya, Yuichi Sugiyama, and Hiroyuki Kusuhara. Quantitative prediction of histamine H1 receptor occupancy by the sedative and non-sedative antagonists in the human central nervous system based on systemic exposure and preclinical data. *Drug Metab Pharmacokinet.* 32:135-144, 2017.

略語表

BBB	blood–brain barrier, 血液脳関門
BSA	bovine serum albumin
CSF	cerebrospinal fluid, 脳脊髄液
CYP	チトクローム P450
DDI	drug–drug interaction, 薬物間相互作用
ISF	interstitial fluid, 間質液
KO	knockout, 欠損
LC–MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
PBPK	physiologically based pharmacokinetic, 生理学的薬物動態
PBS	phosphate-buffered saline
PET	positron emission tomography, 陽電子放射断層撮影
P-gp	P-glycoprotein
pK _a	酸解離定数
RAF	relative activity factor
RO	receptor occupancy; 占有率
UDPGA	Uridine diphosphate-glucuronic acid

薬物動態関連パラメータ

-2LL	Objective function,
AIC	Akaike Information Criteria
AUC	血液中濃度時間曲線下面積
B _{max}	最大結合量
C _{blood}	血液中濃度
C _{max}	最高濃度

$C_{u,brain}$	脳内非結合形濃度
$C_{u,plasma}$	血漿中非結合形濃度
f_{br}	脳内非結合形分率
$f_{u,BSA}$	0.1% BSA 中の非結合形分率
$f_{u,brain\ homogenate}$	マウス大脳ホモジネートにおける脳内非結合形分率
$f_{u,brain\ silico}$	<i>in silico</i> 脳内非結合形分率
$f_{u,brain\ slice}$	マウス大脳スライスにおける脳内非結合形分率
$f_{u,brain\ vivo}$	<i>in vivo</i> 脳内非結合形分率
$f_{u,human}$	ヒト血清における非結合形分率
$f_{u,monkey}$	サル血清における非結合形分率
$f_{u,mouse}$	マウス血漿における非結合形分率
K_d	結合親和性
K_i	阻害定数
K_p	血漿中脳内濃度比
$K_{p,uu}$	非結合形濃度基準の血漿中脳内濃度比
k_{on}	結合速度定数
k_{off}	解離速度定数
PS	BBB を介した受動輸送クリアランス
PS _{eff}	脳から血液方向の透過クリアランス
PS _{inf}	血液から脳方向の透過クリアランス
R _B	血中濃度/血漿中濃度比
T _{max}	time to maximum concentration, 最高濃度到達時間
V _{u,brain}	脳内非結合形分布容積

第一章 諸言

はじめに

2014年度の治療満足度調査によると、アルツハイマー病の治療満足度(16.7%)、血管性認知症(17.9%)、統合失調症(26.0%)、パーキンソン病(43.6%)、うつ病(46.7%)、及び不安神経症(48.1%)と、治療満足度が50%以下の17疾患中、6疾患が中枢神経系に関する疾患であり、中枢薬のアンメット・メディカル・ニーズは高いことが知られている¹。しかしながら、一般に中枢薬の開発は難しいと言われており、実際1999-2000年にヒト初回投与試験から登録申請までの中枢薬の成功確率(8%以下)は、女性医療領域(4%)及び腫瘍(5%)を除くと、他の薬効分類(9-20%)と比較して低い²。また、中枢薬として望ましい物理化学的性質は、他の疾患領域の医薬品と比較して限定されており、分子量(MW)は < 450 、LogDの値は1-3、極性表面積(PSA)は $\leq 90 \text{ \AA}$ 、水素結合供与体数 < 3 、水素結合受容体数 < 7 とされている³。48化合物の中枢薬と45化合物の非中枢薬を比較したところ、それぞれ中枢薬及び非中枢薬では、MWは平均319(範囲151-655)及び330(163-671)、cLogPは 3.43^* (0.16-6.59)及び 2.78^* (-2.81-6.09)、cLogDは2.08(-1.34-6.57)及び1.07(-2.81-5.53)、PSAは40.5(4.63-108)及び56.1(3.25-151)、水素結合供与体数は 0.85^* (0-3)及び 1.56^* (0-6)、水素結合受容体数3.56(1-10)及び4.51(1-11)であったと報告されている(*は統計的に有意な差があったもの)⁴。

中枢薬の脳内動態の決定要因

中枢薬の脳内動態の決定要因として、血中滞留性及び血液脳関門(Blood-brain barrier, BBB)透過性が挙げられる。BBB透過性は $\text{LogD}/\sqrt{\text{MW}}$ に相関し、脂溶性が高いほど透過性が高い傾向にあるが、P-glycoprotein (P-gp)をはじめとするトランスポーターによる能動輸送が関わる場合には、この相関から外れることが知られている⁵。従って、化合物の脳移行性を予測する際には、分子量や脂溶性に加え、トランスポーターの基質になるかどうかを検討する必要がある。

中枢薬開発のバイオマーカー

中枢薬の開発の際、薬効のサロゲートマーカーとして、標的とする脳内の受容体占有率(receptor occupancy, RO)を評価する方法が知られている。医薬品の薬効を予測する際、フリー薬物仮説に基づいて unbound fraction を考慮する必要があるが、中枢薬の場合、BBB は血管内皮細胞の密着した単層構造により中枢を血管循環から隔離しているため⁶、血中の非結合形薬物濃度は必ずしも薬物の中枢における薬効の指標とはならない。事実、実験動物を用いた検討では、脳内非結合形薬物濃度は脳脊髄液(cerebrospinal fluid, CSF)中濃度や血中非結合形濃度よりも受容体占有率(RO)を良く予測することができる⁷。

ヒトにおいて、陽電子放射断層撮影(positron emission tomography, PET)は標的タンパク質に適した PET プローブを用いることにより、治験薬の脳内濃度や、脳内の標的タンパク質との相互作用の定量化に利用されている。実際、中枢薬の開発では、Phase I の後期または Phase II の初期に proof of concept 試験の 1 つとして、PET によるターゲットの RO が測定される。開発薬物の選択やその後の PET 試験のデザインにあたり、RO 最高値やその到達時間、持続時間などに関する議論が行われるが、実験動物や経験に基づいて結論されることが多い。多くの PET 試験において、通常標的タンパク質との相互作用は、血液の最高濃度到達時間(time to maximum concentration, T_{max})を含めたわずかな時点で評価されている。薬物の動態特性によっては、脳内非結合形濃度は血液の T_{max} に最高濃度に達しないことがあり、このことは治験薬の中枢作用を過小評価する原因にもなりうる。血漿中濃度の T_{max} において $C_{u,brain}$ がピークとなるかどうかは、その薬物の薬物動態特性、特に脳内の分布容積に依存する。従って、モデリング&シミュレーションは中枢薬において薬物投与量と RO の関係を明らかにするために適した方法であり、薬物を経口投与後の臨床データを補間することが可能になるため、開発中の中枢治験薬の臨床 PET 試験について合理的な試験デザインを提供することにも役立ち、薬物動態の変動が中枢作用に与える影響についても明らかにすることができると考えられる。

Phase I 試験では、候補化合物そのものが標識されて中枢移行性が評価される場合もある。中枢神経系では、脳実質内の lysosome や mitochondria など酸性コンパートメントへの塩基性薬物の蓄積などもあることから、脳内の薬物総濃度を議論しても直接薬効を予測することはできない。

マイクロドース臨床試験の活用

一方、マイクロドース臨床試験⁸はヒトにおいて薬理作用を発現すると推定される投与量の1/100を超えない用量又は100 μ gのいずれか少ない用量の被験物質を、健康な被験者に単回投与することにより行われる臨床試験で、被験物質のヒトにおける薬物動態に関する情報を医薬品の臨床開発の初期段階に得ることができる。この試験により、初期段階で、ヒトにおける血漿中濃度推移の情報が得られるが、薬効を早期に評価することは困難であり、臨床用量を推定することも難しい。CSFは脳内の非結合形濃度の代替指標として利用されることがあるが、P-gpやbreast cancer resistance protein (BCRP)により能動的な排泄がある場合等、必ずしも脳内の非結合形濃度と一致するわけではないことが報告されている⁹。そこで、ヒトにおける血漿中濃度の時間推移が得られた段階で、薬効の指標となるROを定量的に予測することは、早期に薬効や臨床用量を推定するのに役立つと考えられる。

脳内標的分子と薬物との相互作用の速度論

通常、被験物質の受容体との結合親和性を表す阻害定数(K_i)を評価するには、放射性リガンドと被験物質の平衡時の競合結合試験を実施する。この試験とは別に、標識体リガンドと被験物質の結合時間推移を評価することにより、平衡試験では得られない被験物質の結合速度定数(k_{on})と解離速度定数(k_{off})を算出することが可能となる。

$$K_i = k_{off} / k_{on}$$

さらに、後者の方法では結合が平衡に達する前に K_i を得ることができるというメリットがあり、 k_{off} の値から、平衡に達する時間を推測することも可能となる。平衡に達していない状態で競合試験を行った場合、正しい K_i 値を得ることはできない¹⁰。さらに、ROは中枢の非結合形薬物濃度($C_{u,brain}$)とターゲットとなる受容体との k_{on} 及び k_{off} により決定される¹¹。

本研究の目的

そこで、本研究では、PET試験実施前に合理的な試験計画を立案できないか、またROの持続にはどのような特性が関係するのか。薬物間相互作用が生じた場合薬効にどの程度影響するの

か。について検証するため、①受容体との相互作用に関わるパラメータの測定(受容体からの解離の半減期の評価)、②脳内における非特異的結合評価、③血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)における能動輸送に関わるトランスポーター評価、④血漿中の滞留性(全身クリアランス、分布容積、非結合形分率)に関する薬物動態パラメータの取得を行い、生理学的薬物動態 (physiologically based pharmacokinetic, PBPK)モデルを用いて検討を行った。前臨床試験において取得するデータ及び Phase I 試験で得られる血漿中濃度推移を用いて脳内受容体占有率の時間推移を前向きに予測し、報告されている臨床 PET 試験のデータと比較した。

第二章 ドパミン D2 受容体占有率時間推移の予測

要約

中枢における薬効の発現はターゲットとなる受容体の占有と密接な関係がある。本研究では、血漿中濃度、受容体結合やタンパク結合、*in silico* のデータを用いて生理学的薬物動態 (PBPK) モデルによりヒトにおける受容体占有率(RO)の予測を試みた。抗精神病薬である quetiapine 及び perospirone のヒトにおけるドパミン D2 受容体の占有率及び血漿中濃度は臨床試験を実施または報告値を利用した。受容体への結合速度定数及び解離速度定数は *in vitro* でヒトの D2 受容体発現膜画分を用い、血清中タンパク結合率はヒトの血清を用いて *in vitro* で、脳内のタンパク結合率はマウス脳を用いて *in vivo* で評価した。血液脳関門(BBB)を介した薬物の透過性は物理化学的特性を基に計算した。Perospirone の主代謝物である ID-15036 の影響も考慮に入れた。Quetiapine または perospirone を経口投与後の RO の時間推移は実データと同程度だった。

諸言

統合失調症には、幻覚、妄想、思考混乱、奇異な行動を示す陽性症状と、意欲低下、感情鈍麻、思考貧困、引きこもりなどの症状を示す陰性症状とがある。ほとんどの抗精神病薬が D2 受容体遮断作用を持つこと、線条体での D2 受容体遮断作用が統合失調症の陽性症状改善効果と相関することから、ドパミン D2 受容体と統合失調症との関連が良く知られている¹²。

ドパミン D2 受容体拮抗薬は統合失調症及び関連疾患の治療に用いられている。PET を含めたいくつかの試験に基づき、D2 の RO は 70-80% の間が適した範囲であると提唱されている¹³。さらに、手のふるえ、こわばり、じっとできないといったパーキンソン病に類似した症状を示す錐体外路への副作用のリスクは RO が 80% を超えた患者で高くなることが示されている¹³。本試験では、日本において第二世代の統合失調症治療薬として用いられている quetiapine と perospirone に着目した。経口投与後、perospirone (消失半減期 $t_{1/2}$: 1.9 時間¹⁴)は quetiapine ($t_{1/2}$: 3.1-5.5 時間¹⁵)よりも速く体循環から消失する。既に perospirone による RO の時間推移については [¹¹C]raclopride を D2 受容体の PET トレーサーとして健常人男性で実施されている¹⁶。本試験では、さらに PET 試験を実施し quetiapine の RO 時間推移を評価した。その結果 perospirone による RO は投与後 25.5 時間において 31% 以上だったのに対し¹⁶、quetiapine による同じ時点の RO は 1% 以下であったことから、perospirone の脳内での RO の持続が quetiapine よりも長いことが判明した。Quetiapine と perospirone のラット脳におけるドパミン D2 受容体に対する阻害定数 (K_i) には顕著な違い(それぞれ 329 nM¹⁷ および 1.77 nM¹⁸)があるため、perospirone の RO の持続は、D2 受容体からの解離速度が決定因子になっている可能性が考えられた。さらに perospirone の代謝物には血漿中濃度(AUC)が未変化体の約 4 倍で¹⁹、薬理活性を持つ ID-15036 が含まれており、これが perospirone の中枢作用に関与している可能性も考えられた。

本試験の目的は、生理学的薬物動態(PBPK)モデルを用いて、臨床用量における血漿中非結合形薬物濃度推移と、ドパミン D2 受容体に対する結合(結合及び解離速度定数)、脳内の非特異的な結合、BBB の透過性などの非臨床データを統合することにより quetiapine 及び perospirone を経口投与後の脳内 RO 時間推移を説明可能であることを実証することである。このアプローチは次の

開発段階に進む見込みのある候補化合物を選択することや、動態の薬物間相互作用(drug–drug interactions, DDI)が中枢作用に与える影響を予測することにも貢献すると考えられる。

結果

1 $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の D2 受容体拮抗薬結合パラメータ評価

$[^3\text{H}]\text{raclopride}$ はヒトドパミン D2 受容体発現細胞膜に対して飽和性があり (Fig. 2- 1A) 結合親和性(K_d)及び最大結合量(B_{\max})及びはそれぞれ 1.75 ± 0.10 nmol/L (mean \pm calculated S.D.)及び 18.2 ± 0.6 pmol/mg protein であった。さらに $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の結合を被験物質(quetiapine, perospirone, 及び ID-15036)存在下で評価し K_i を算出した (Fig. 2- 1B, Table 2- 1)。

Butaclamol 添加後の $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の解離速度定数(k_{off})は 0.288 ± 0.008 min⁻¹ であり, この値を用いて $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の結合速度定数(k_{on})及び B_{\max} を計算したところ, それぞれ 361 ± 44 mL/nmol/min 及び 15.5 ± 1.1 pmol/mg protein と算出された (Fig. 2- 1C)。 $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の結合を 80%程度阻害する被験物質濃度を共存させた条件下における $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の結合時間推移を評価し, 算出された $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の k_{on} , k_{off} , 及び B_{\max} を用いて被験物質の k_{on} 及び k_{off} を算出した (Fig. 2- 1D)。これらのデータは Table 2- 1 にまとめた。Perospirone 結合試験時の回収率が悪かったため(約 30%), 回収率を上げる目的で perospirone 及び ID-15036 の反応液に BSA(0.1%)を添加した(回収率>60%)。パラメータは 0.1% BSA 中の非結合形分率($f_{u,\text{BSA}}$)で補正した。 $[^3\text{H}]\text{raclopride}$ の結合パラメータは 0.1% BSA の有無で変化がなかった (Table 2- 1)。

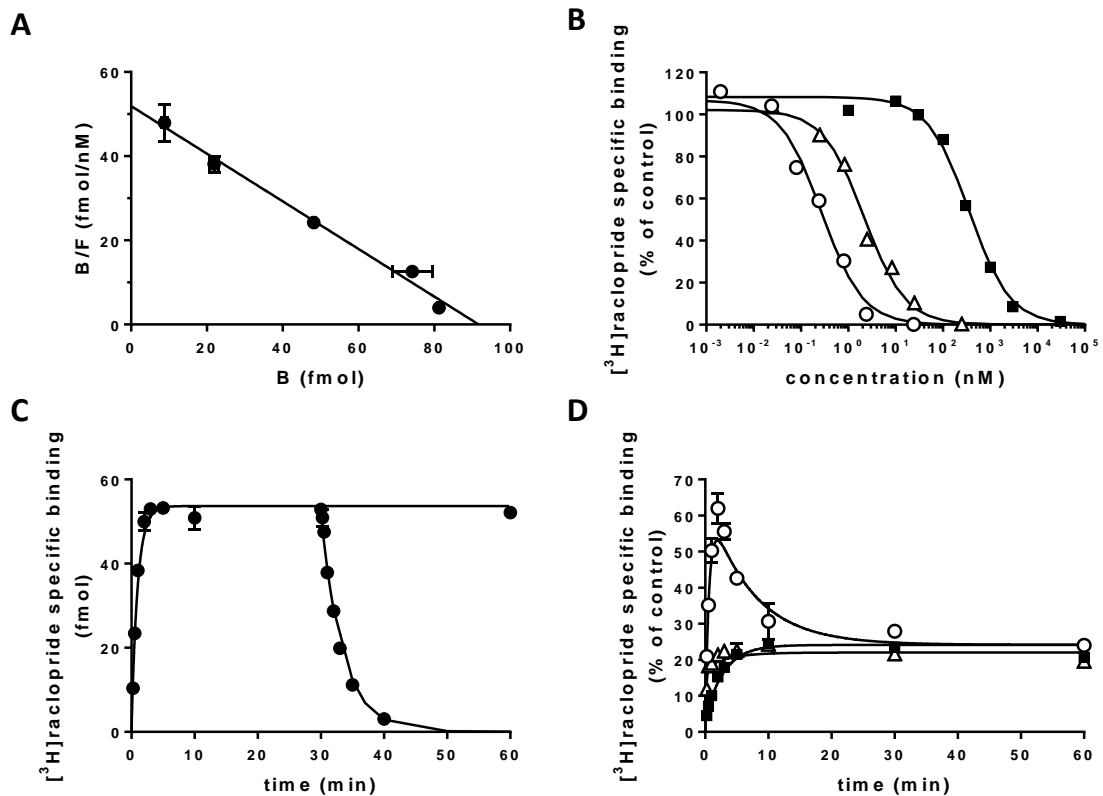


Fig. 2- 1 Effect of D2 receptor antagonists on the [³H]raclopride binding to human dopamine D2 receptor.

(A) Scatchard plots of human dopamine D2 receptors (5 μ g/assay) derived from saturation curves performed for 60 min with [³H]raclopride at concentrations ranging from 0.2 to 20 nM. (B) Competition curves of D2 antagonists against [³H]raclopride performed for 60–90 min. ■: quetiapine, ○: perospirone, △: ID-15036. (C) Binding kinetics of [³H]raclopride to human dopamine D2 receptors. After 30 min incubation, [³H]raclopride dissociation was induced by the addition of 10 μ M butaclamol. (D) Binding kinetics of D2 antagonists. [³H]raclopride association kinetics were performed in the presence of a single concentration of D2 antagonists (chosen to inhibit approximately 80% of [³H]raclopride-specific binding at equilibrium, quetiapine: 1000 nM ■; perospirone: 1 nM ○; ID-15036: 10 nM △). Binding experiments and data analysis were performed as described in 第五章 3. Results are reported in Table 2- 1. Solid lines represent the fitted line. Each symbol represents the mean \pm S.E.M. (n = 3). Some error bars were concealed in the symbols.

Table 2- 1 Obtained binding kinetic constants of dopamine D2 receptor antagonists

Compound	K_d or K_i^a (nM)	B_{max}^a (pmol/mg protein)	k_{on}^b (mL/nmol/min)	k_{off}^b (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	K_d or K_i (k_{off}/k_{on}) (nM)	Matrix
[³ H]Raclopride	1.75 ± 0.10	18.2 ± 0.6	361 ± 44	0.288 ± 0.008	2.41	0.80	0% BSA
Quetiapine	167 ± 16	-	393 ± 37	0.251 ± 0.020	2.76	0.64	0.1% BSA
Perospirone ^c	0.128 ± 0.025	-	29.1 ± 3.9	2.52 ± 0.40	0.28	86.6	0% BSA
ID-15036 ^c	1.02 ± 0.13	-	940 ± 79	0.0477 ± 0.0059	15	0.0507	0.1% BSA
			577 ± 50	0.320 ± 0.041	2.2	0.555	0.1% BSA

Each value represents the calculated mean ± calculated S.D.

^a Data were cited from Fig. 2- 1A for raclopride, and from Fig. 2- 1B for other compounds

^b Data were cited from Fig. 2- 1C for raclopride, and from Fig. 2- 1D for others.

^c Parameters for perospirone and ID-15036 were corrected with $f_{in,BSA}$.

2 D2 拮抗薬の *in vitro* 及び *in silico* 非結合形分率

平衡透析法により、被験物質のヒト血清($f_{u, \text{human}}$), 雄 *ICR* マウス血漿($f_{u, \text{mouse}}$), 0.1% BSA($f_{u, \text{BSA}}$), 及びマウス大脳ホモジネート($f_{u, \text{brain homogenate}}$)における非結合形分率を測定し、結果を Table 2- 2 にまとめた。

Raclopride の $f_{u, \text{BSA}}$ は 0.945 であった。

Table 2- 2 Unbound fractions and calculated parameters of quetiapine, perospirone and ID-15036

Parameter	Quetiapine	Perospirone	ID-15036 ^a
$f_{u, \text{human}}$	0.096 ± 0.005	0.015 ± 0.001	0.043 ± 0.005
$f_{u, \text{mouse}}$	0.10 ± 0.00	0.064 ± 0.003	0.13 ± 0.00
$f_{u, \text{BSA}}$	Not tested	0.81 ± 0.06	0.84 ± 0.06
$f_{u, \text{brain homogenate}}$	0.036 ± 0.004	0.020 ± 0.003	0.034 ± 0.005
$f_{u, \text{brain vivo}}$	0.037 ± 0.010	0.0054 ± 0.0008	0.015 ± 0.001
$f_{u, \text{brain silico}}$	0.059	0.024	0.047
f_b	0.12	0.017	0.050
PS (mL/min/g)	0.637	0.889	0.398

Each value represents the mean ± S.E.M. For $f_{u, \text{brain homogenate}}$, each value represents the mean ± S.E.M of 2 nM–2 µM (quetiapine; 60 nM–10 µM). For $f_{u, \text{brain vivo}}$, each value represents the calculated mean ± calculated S.D. $f_{u, \text{brain silico}} = 1/V_{u, \text{brain}}$, $\text{Log } V_{u, \text{brain}} = 0.47 * \text{Log } D_{7.4} + 0.045^{20}$, $f_b = f_{u, \text{human}} \times R_B$. PS was calculated as described in 第五章 12.

被験物質の物理化学パラメータ (Table 2- 3)を用いて計算により求めた *in silico* 脳内非結合形分率 ($f_{u, \text{brain silico}}$)²⁰, 血中非結合形分率 (f_b), さらに BBB を介した受動的な透過クリアランス (PS)についても Table 2- 2 にまとめた。

Table 2- 3 Calculated physicochemical parameters of quetiapine, perospirone, and ID-15036

Parameter	Quetiapine	Perospirone	ID-15036	Software
TPSA	49.5	58.0	78.2	MOE
V_{sa_base}	0	0	0	MOE
$\text{Log}D_{7.4}$	2.52	3.36	2.72	ADMET predictor
R_B	0.79	0.86	0.86	ADMET predictor
Acid pKa	3.3	-	-	ADMET predictor
Base pKa	6.8	7.2	7.20	ADMET predictor

3 D2拮抗薬の *in vivo* 脳内非結合形分率

被験物質をマウスに静脈内投与後の血液(血中濃度/血漿中濃度比(R_B) \times 血漿中濃度で計算)及び脳内濃度時間推移を Fig. 2- 2 に示した。Quetiapine の血液及び脳内濃度はほぼ平行に消失したものの、perospirone 及び ID-15036 は脳からの消失に遅れが生じた。脳内濃度時間推移を説明するために Fig. 2- 3 に示すモデルを用い、フィッティングにより *in vivo* の脳内非結合形分率($f_{u,brain vivo}$)を求めた(Table 2- 2)。

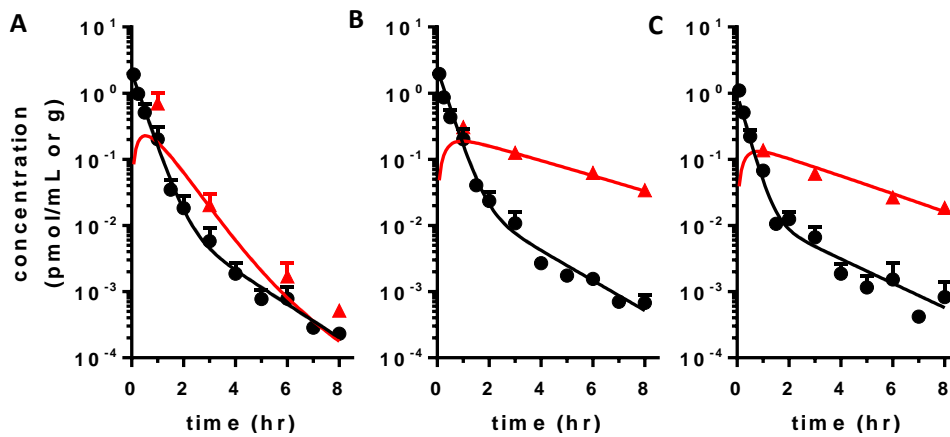


Fig. 2- 2 Blood (●) and brain (▲) concentration time profiles of (A) quetiapine, (B) perospirone, and (C) ID-15036 after intravenous administration (5 μ mol/kg) to ICR mice.

Blood samples were collected from the jugular vein at 5, 15, and 30 min, and 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 h after the administration, and brain was collected at 1, 3, 6, and 8 h. Solid lines represent the fitted line. Each symbol represents the mean + S.E.M. ($n = 3-4$; quetiapine 7 and 8 h, $n = 1$ ID-15036 1.5 h, $n = 2$).

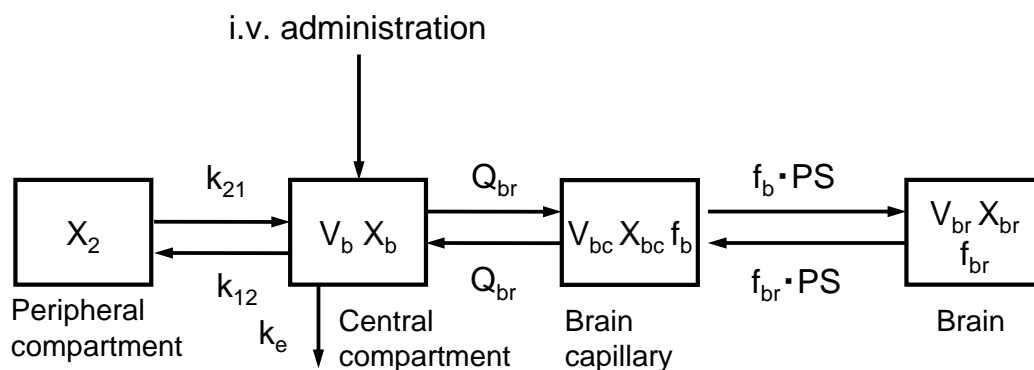


Fig. 2- 3 PKPD model describing the pharmacokinetics in mice after intravenous administration of D2 antagonists.

X, V, k, Q, PS, and f represent the amount of drug in each compartment, the volume of the compartment, the rate constant (k_e, elimination; k₁₂, transfer from central to peripheral compartment; k₂₁, transfer from peripheral to central compartment), the blood flow rate, the permeability clearance across the BBB, and the free fraction, respectively. Subscripts represent the name of the compartment: b, blood; bc, brain capillary; br, brain; and 2, peripheral. The obtained plasma concentrations after intravenous injection of test compounds in mice were multiplied by R_B (Table 2- 3) and converted to blood concentration. Using blood and brain concentration time profiles, kinetic parameters (V_b, k_e, k₁₂, k₂₁ and f_{br} = f_{u,brain vivo}) of test compounds were obtained by fitting in this model assuming f_b = f_{b, mouse} = f_{u, mouse} /R_B (Table 2- 2 and Table 2- 3), Q_{br} (1.07 mL/min/g brain, C57BL6 mice)²¹, PS (Table 2- 2), V_{br} (1 mL/g brain), and V_{bc} (0.011 mL/g brain, the geometric mean of the reported arterial cerebral blood volume in humans measured by PET²²) values are the fixed parameters. Obtained parameters and used f_b (f_{b, mouse}) were summarized in Table 2- 2 (f_{u,brain vivo}) and Table 2- 4. Mass balance equations are described in 第五章 19.

Table 2- 4 Pharmacokinetic parameters of quetiapine, perospirone, and ID-15036 in mouse

Parameter	Units	Quetiapine	Perospirone	ID-15036
V _b	mL	2409	2141	5056
k _e	min ⁻¹	0.0421	0.0432	0.0487
k ₁₂	min ⁻¹	0.00115	0.00212	0.00479
k ₂₁	min ⁻¹	0.01005	0.00925	0.00790
f _{b, mouse}		0.127	0.0747	0.156

4 P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送

Quetiapine 及び perospirone の P-gp 発現細胞 (LLC-GA5-COL150^{23,24})における経細胞輸送を評

価したところ、コントロール細胞(LLC-PK1 細胞)と同様な輸送推移を示した(Fig. 2- 4)。P-gp の典型的基質である verapamil の net flux ratio は 19.6 であったのに対し、quetiapine 及び perospirone ではそれぞれ 1.12 及び 0.88 であったことから quetiapine 及び perospirone のいずれも P-gp の基質ではないと考えられた。

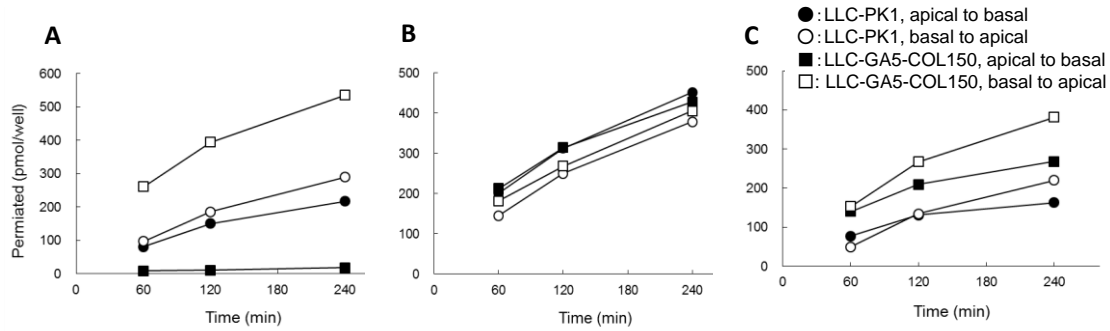


Fig. 2- 4 The transcellular transport of (A) verapamil, (B) quetiapine and (C) perospirone (each 1 μ M) across LLC-PK1 and LLC-GA5-COL150 cell monolayers (n=2).

5 PET によるヒトドパミン D2 受容体占有率

臨床 PET 試験における quetiapine の、平均血漿中濃度推移を R_B で補正した、血液中濃度推移を Fig. 2- 5A に示した。Quetiapine によるドパミン D2 の RO は投与後 1.5, 8, 及び 25.5 時間でそれぞれ $45.1 \pm 2.2\%$, $24.8 \pm 4.9\%$, 及び $0.7 \pm 0.5\%$ (mean \pm S.E.M.)であった。

6 脳内非結合形濃度及び D2RO の予測

被験物質の血液濃度時間推移をフィッティングした結果を Fig. 2- 5A, D 及び Table 2- 5 に示した。これらのデータと Table 2- 1 の k_{on} 及び k_{off} , Table 2- 2 の f_b , PS, 及び脳内非結合形分率(f_{br})として $f_{u,brain vivo}$ を用いて Fig. 2- 6 に示すモデルを用い、被験物質の脳内非結合形濃度及び D2 受容体の占有率をシミュレーションした(Fig. 2- 5B, C, E, 及び F)。Quetiapine 及び perospirone の予測 RO と実測値はよく合っていた。ID-15036 は D2 受容体に対して perospirone よりも 10 倍程度阻害活性が低いものの(Table 2- 1), ID-15036 の最高血液中濃度(C_{max})は perospirone よりも 4 倍高く(Fig. 2- 5D), 結果的に ID-15036 は T_{max} における RO の 50%程度を占めると予測された(Fig. 2- 5F)。

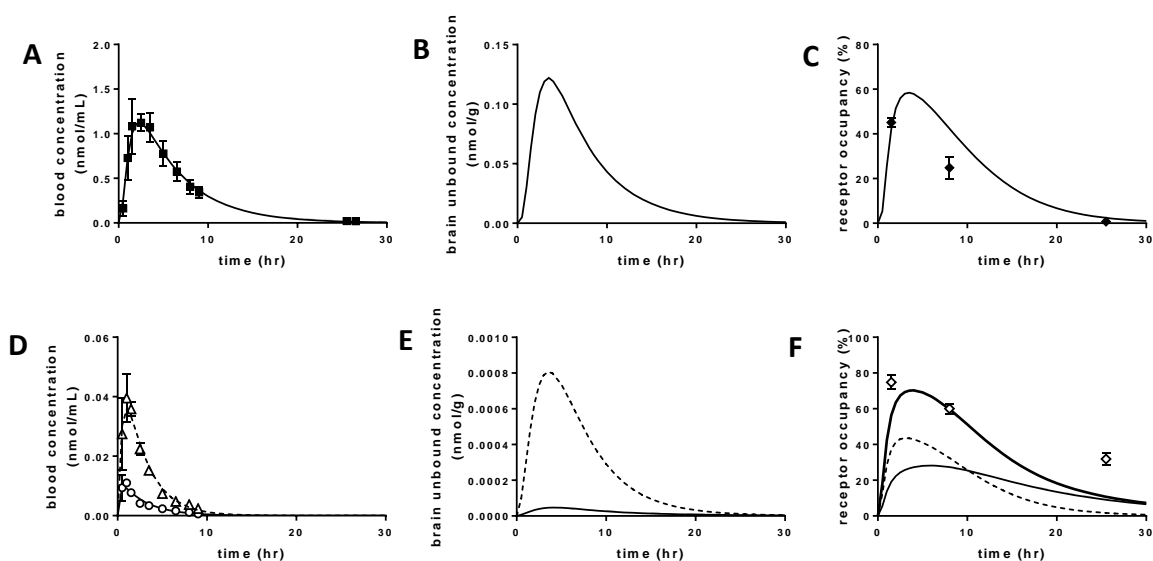


Fig. 2- 5 Time profiles of the blood and brain concentration of the D2 receptor antagonists, and RO in the brain.

(A, D) Blood concentration time profiles after oral administration of 400 mg of quetiapine (A) and 16 mg of perospirone (D). Each point represents the observed data in the PET study of quetiapine (■), perospirone (○), and ID-15036 (△)¹⁶; the line is the fitted line. (B, E) Estimated brain unbound concentration time profiles of quetiapine (B), perospirone (E, solid line), and ID-15036 (E, dashed line). (C, F) Observed receptor occupancy in the PET study after administration of quetiapine (C, ◆) and perospirone (F, ◇)¹⁶; bold line: estimated receptor occupancy time profiles. Solid and dashed lines represent the contributions of perospirone and ID-15036, respectively. Estimations were performed as described in the 第五章 16. Each point represents the mean ± S.E.M. (n = 4).

Table 2- 5 Pharmacokinetic parameters of quetiapine, perospirone and ID-15036 for the estimation of receptor occupancy

Parameter	Quetiapine	Perospirone	ID-15036 ^a
k_a (min ⁻¹)	0.0202	0.0743	0.0334
k_e (min ⁻¹)	0.00324	0.00578	0.00664
t_{lag} (min)	24.8	-	-
V_b (L)	647	3080	702

^a k_a , k_e and V_b of ID-15036 were calculated assuming the same dose as perospirone (based on the molecular weight) was administered. The parameter definitions are described in Fig. 2- 6.

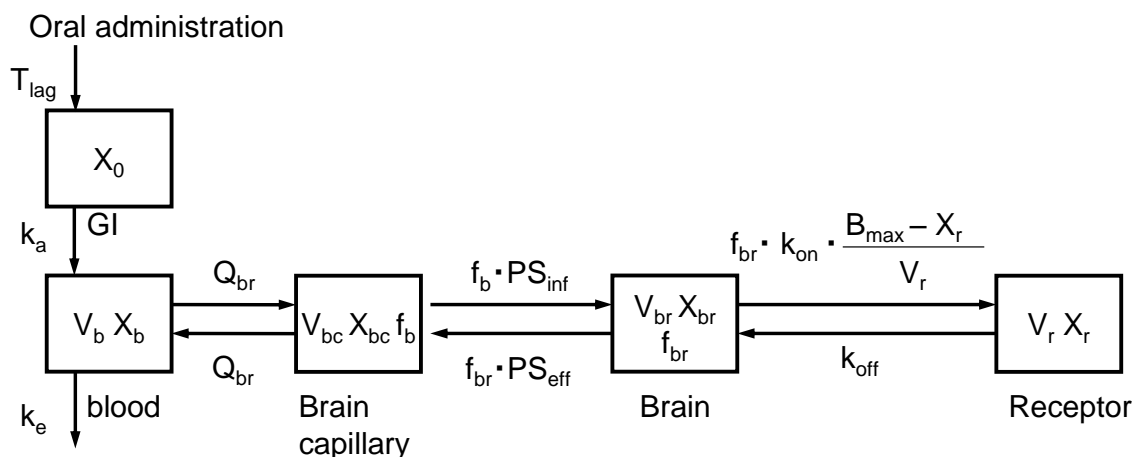


Fig. 2- 6 PKPD model describing the pharmacokinetics and receptor binding of D2 antagonists after their oral administration.

X , V , k_a , k_e , Q_{br} , PS , f , and B_{max} represent the amount of drug in each compartment, the volume of the compartment, the absorption rate constant, the elimination rate constant, the blood flow rate of brain capillaries ($0.31 \text{ mL/min/g brain}$)²⁵, the permeability clearance across the blood–brain barrier (PS_{inf} , influx from blood to brain; PS_{eff} , efflux from brain to blood; assuming $PS_{inf} = PS_{eff}$), the free fraction, and the maximal number of binding sites ($0.027 \text{ nmol/g brain}$)²⁶, respectively. Subscripts represent the name of the compartment: 0, GI tract; b, blood; bc, brain capillary; br, brain (unbound form to the receptor); and r, receptor (bound form to the receptor). V_b includes bioavailability, V_{br} and V_r are assumed to be 1 mL/g brain , and the volume of brain capillaries (V_{bc} , 0.011 mL/g brain) is the geometric mean of the reported arterial cerebral blood volume in humans measured by PET²². Mass balance equations are described in 第五章 19.

7 感度分析

予測 RO に対する K_i (k_{off}/k_{on}), BBB を介した受動輸送クリアランス(PS), 及び f_{br} の影響を評価した。報告されている K_i 値(quetiapine, 322 nM ²⁷; perospirone, 1.77 nM ; ID-15036, 5.8 nM ¹⁸)を用いた場合, RO を過小評価した(Fig. 2- 7A 及び B)。シミュレーションの際, k_{on} は k_{off}/K_i により, k_{off} は $k_{on} \times K_i$ により算出したが, k_{on} 及び k_{off} のどちらを初期値に合わせて計算した場合にも予測 RO に影響は認められなかった。PS の値を初期値よりも大きくすると quetiapine の場合は影響がなく, perospirone 投与後の場合 RO が早い推移を示した Fig. 2- 7C 及び D)。反対に, PS の値が初期値より小さい場合, 両化合物とも RO の推移に遅れが認められた(Fig. 2- 7C 及び D)。 f_{br} の値を変化させると, quetiapine による RO の予測には影響を与えなかったが, perospirone 及び ID-15036 による RO の予測には $f_{u,brain vivo}$ が最も適していると考えられた。

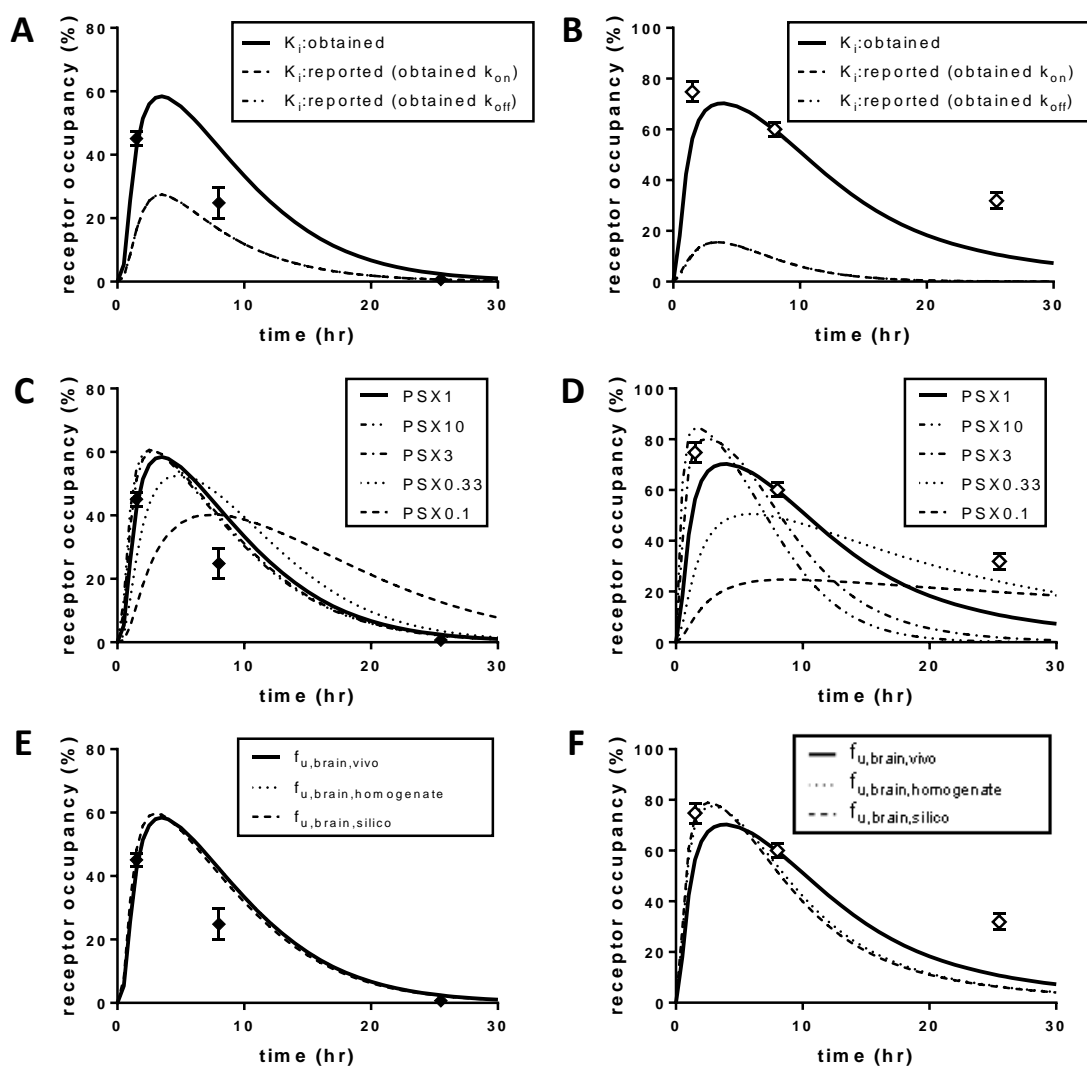


Fig. 2- 7 Sensitivity analysis of pharmacokinetic and pharmacodynamics parameters for RO.

Effect of the K_i (k_{off}/k_{on}), PS, and f_{br} on the estimation of receptor occupancy in the brain. (A: 400 mg of quetiapine, B; 16 mg of perospirone) K_i (k_{off}/k_{on}) values were changed at 86.6 nM (k_{off} : 2.52 /min, k_{on} : 29.1 mL/nmol/min; quetiapine), 0.0507 (0.0477, 940; perospirone), and 0.555 (0.320, 577; ID-15036); K_i : obtained (bold solid line), previously reported value (322 nM; quetiapine²⁷, 1.77; perospirone and 5.8; ID-15036¹⁸ data from animal) assuming k_{on} values were the same as obtained (k_{off} : 9.37 /min, k_{on} : 29.1 mL/nmol/min; quetiapine, 1.66, 940; perospirone, and 3.35, 577; ID-15036); K_i : reported (obtained k_{on}) (dashed line), or assuming k_{off} values were the same as obtained (k_{off} : 2.52 /min, k_{on} : 7.83 mL/nmol/min; quetiapine, 0.0477, 26.9; perospirone, and 0.320, 55.2; ID-15036); K_i : reported (obtained k_{off}) (two-dot chain line). The dashed line [K_i : reported (obtained k_{on})] and the two-dot chain line [K_i : reported (obtained k_{off})] overlap each other. (C: 400 mg of quetiapine, D; 16 mg of perospirone) PS values were changed at 0.637 mL/min/g brain (quetiapine), 0.889 (perospirone), and 0.398 (ID-15036); PS = $\times 1$ (bold solid line), their one-tenth; PS = $\times 0.1$ (dashed line), one third; PS = $\times 0.33$ (dotted line), three times; PS =

×3 (chain line) and ten times; PS = ×10 (two-dot chain line). (E; 400 mg of quetiapine, F; 16 mg of perospirone) The values for f_{br} were changed at $f_{u,brain vivo}$ (data obtained from mouse *in vivo* study, bold solid line), $f_{u,brain silico}$ ²⁰ (*in silico* estimation, dashed line) and $f_{u,brain homogenate}$ (obtained in the *in vitro* mouse brain homogenate study, dotted line). The other parameters were the same as in Fig. 2- 5. Each point represents the observed receptor occupancy in PET study after administration of quetiapine (◆) and perospirone (◇), mean ± S.E.M.

8 パラメータの最適化

最尤法を用いて quetiapine 及び perospirone のパラメータを最適化した。パラメータの予測を次の5つの場合で実施した(Fig. 2- 8); ①他は初期値のまま f_{br} のみを最適化した場合, ②PS 及び f_{br} を最適化した場合, ③ k_{on} 及び k_{off} を最適化した場合, ④PS, f_{br} , 及び k_{off} を最適化した場合, ⑤PS, f_{br} , 及び k_{on} を最適化した場合。Perospirone では, perospirone と ID-15036 のパラメータが収束しないことを避けるため, ID-15036 のパラメータを固定した。Table 2- 6 に示すように, 結果として, f_{br} 及び PS の片方または両方を変化させても実測値と予測値の違いを説明できなかったが, k_{on} または k_{off} の両方を変化させるとその差を説明することができた。この K_i 値の違いは quetiapine 及び perospirone でそれぞれ 1.4 及び 0.43 倍であった。

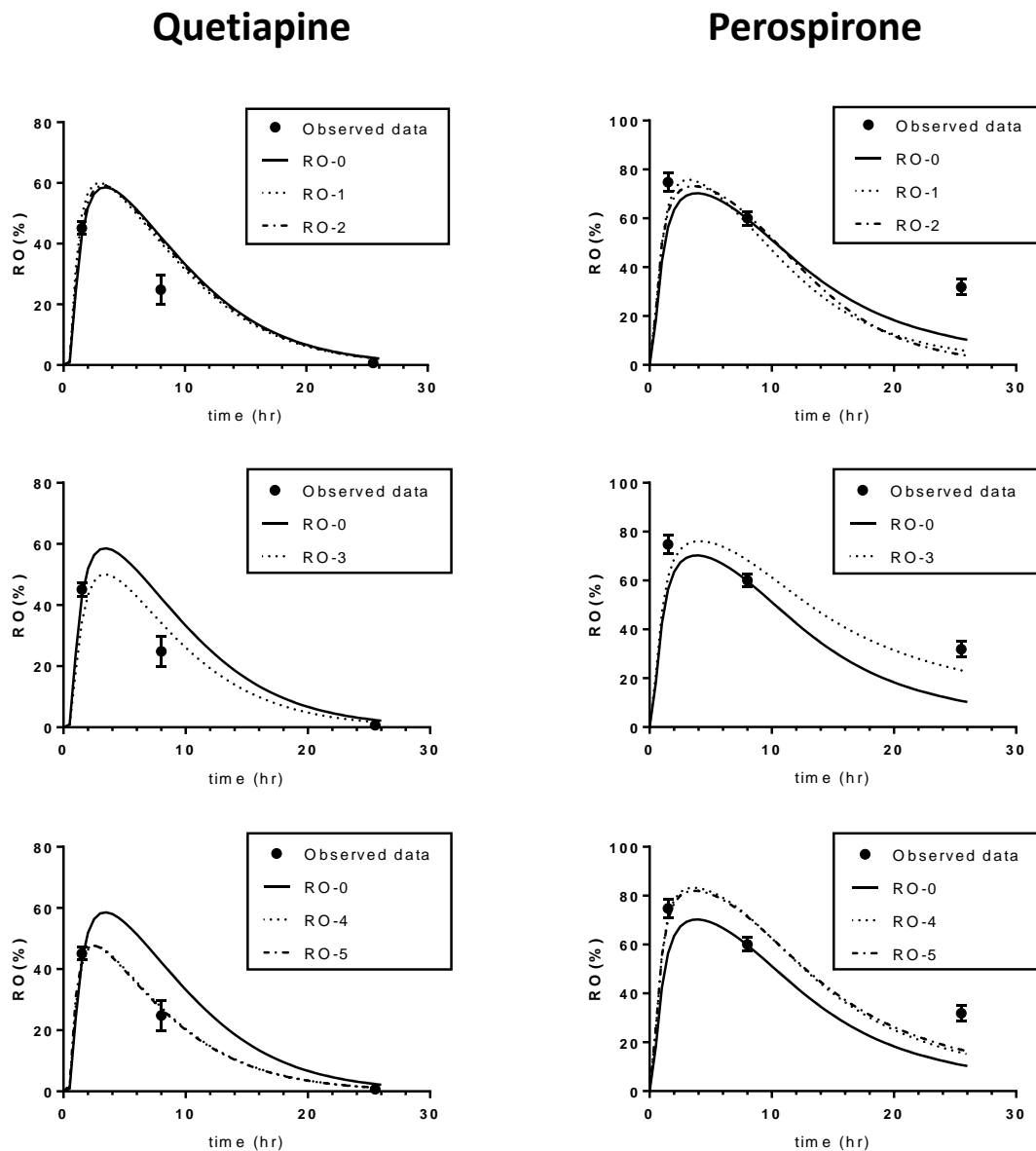


Fig. 2- 8 Simulation of RO in the central nervous system using the optimized parameters.

Parameters were optimized to account for the observed RO(%) following quetiapine (400 mg) and perospirone (16 mg) administration using Phoenix Winnonlin with the Maximum Likelihood Estimation method. RO-0 represents the simulated data using initial parameter set. The optimized parameters were as follows; RO-1, f_{br} ; RO-2, PS and f_{br} ; RO-3, k_{on} and k_{off} ; RO-4, PS, f_{br} and k_{off} ; RO-5, PS, f_{br} and k_{on} .

Each point represents the observed RO(%) \pm S.E.M.

Table 2- 6 Optimized parameters of quetiapine and perospirone account for the observed RO

Conditions	Quetiapine				Perospirone			
	Estimate	Calculated SD	-2LL	AIC	Estimate	Calculated SD	-2LL	AIC
Initial	f_{br} 0.0370				0.0054			
	PS 0.637				0.889			
	k_{on} 29.1				940			
	k_{off} 2.52				0.0477			
1	f_{br} 0.0624 ± 0.0010		22.5	26.5	4.87 ± 0.87		19.3	23.3
2	PS 1.074 ± 2.234		22.9	28.9	13.6 ± 0.2		21.1	27.1
	f_{br} 0.0300 ± 0.0399				0.000587 ± 0.000009			
3	k_{on} 24.1 ± 2.0		21.5	27.5	185000 ± 15000		21.8	27.8
	k_{off} 2.94 ± 0.83				4.03 ± 0.14			
4	PS 0.971 ± 3.836		16.6	24.6	1.88 ± 0.03		21.1	29.1
	f_{br} 0.0805 ± 0.2014				0.00638 ± 0.00013			
	k_{off} 4.30 ± 0.80				0.0180 ± 0.0008			
5	PS 1.12 ± 0.01		15.8	23.8	1.60 ± 5.22		20.9	28.9
	f_{br} 0.105 ± 0.001				0.00603 ± 0.05785			
	k_{on} 17.0 ± 0.8				2400 ± 1590			

Parameter optimizations were performed using Maximum Likelihood Estimation method (weight: uniform) to account for the observed RO using Phoenix Winnonlin v. 6.4. (Condition 1, f_{br} ; condition 2, f_{br} and PS; condition 3, k_{on} and k_{off} ; condition 4:PS, f_{br} and k_{off} ; condition 5, PS, f_{br} and k_{on} .) For the optimization after perospirone administration, parameters of ID-15036 were not changed.

-2LL: Objective function, AIC: Akaike Information Criteria

9 Quetiapine の代謝物に関する検討

Norquetiapine (N-desalkylquetiapine)は quetiapine の主要代謝物の一つであり、D2 受容体に対して quetiapine と同程度の阻害活性を有している(ヒト D2 受容体に対し 196 nM²⁸)。既報によると、quetiapine (300 mg) 投与後の norquetiapine の C_{max} 及び AUC_{0-24h} は quetiapine のそれぞれ約 34% 及び 75% であった²⁹。ここで norquetiapine も考慮に入れた RO の予測を行うため、norquetiapine の血中濃度は quetiapine の 2 分の 1 で推移し、ヒト D2 受容体に対する K_i 値がそれぞれ 196²⁸ 及び 86.6 nM (Table 2- 1)であり、他のパラメータについては全て quetiapine と同様であると仮定した場合、Fig. 2- 9 のように予測された。

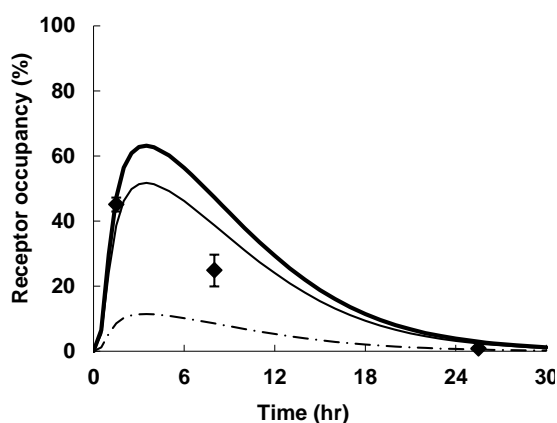


Fig. 2- 9 Simulation of D2 receptor occupancy considering the effect of quetiapine metabolite.

D2 receptor occupancy time profiles was simulated assuming the blood concentration time profile of norquetiapine is the half of that of quetiapine and the pharmacokinetic parameters of norquetiapine are the same as those of quetiapine, except for K_i values (196 and 86.6 nM, respectively, assuming k_{on} 29. 1 mL/nmol/min is the same). Each point represents the observed receptor occupancy in the PET study after administration of 400 mg of quetiapine (◆), mean \pm S.E.M.

10 薬物間相互作用(DDI)予測

Quetiapine 及び perospirone の主な消失経路はチトクローム P450(CYP)3A4 による肝代謝であると考
えられている^{30,31}。CYP3A4 を誘導または阻害すると顕著な DDI を引き起こすことが知られている^{30,32,33}。
このような誘導剤または阻害剤を併用後の、quetiapine 及び perospirone 投与(本試験の投与量、それぞ
れ 400 及び 16 mg, に補正)後の RO への影響を予測した。誘導試験において、血漿中濃度の減少とと
もに quetiapine 及び perospirone による RO はコントロールと比較して低く予想された(Fig. 2- 10B 及び
D)。一方、阻害試験においては quetiapine 及び perospirone による RO はコントロールと比較して高く予
想された(Fig. 2- 10F 及び H)。CYP3A4 の阻害が起きている際には、perospirone の寄与率は ID-15036
よりも大きいと予想された(Fig. 2- 10H)。DDI 試験における実際の投与量を用いたシミュレーションの結
果は Fig. 2- 11 に示した。

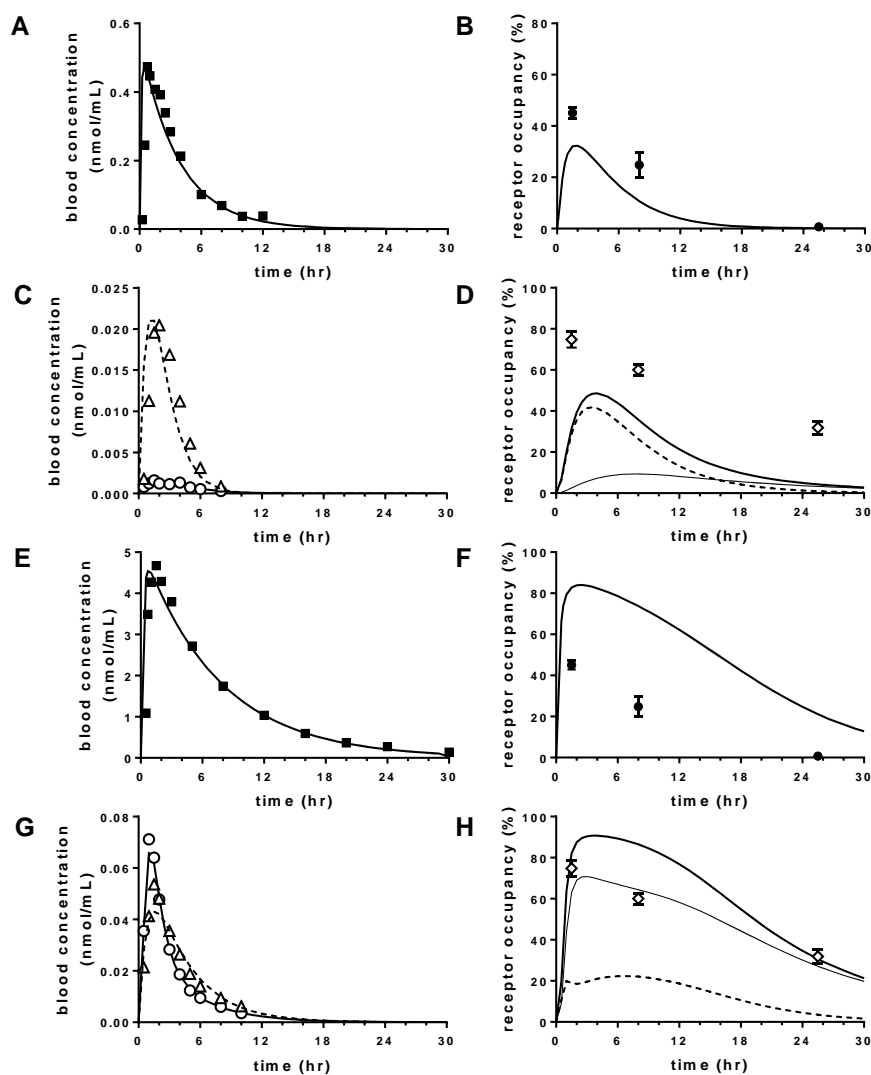


Fig. 2- 10 Simulation of receptor occupancy in the case of induction or inhibition of quetiapine and perospirone elimination.

(A, C, E, G) Blood concentration time profiles after oral administration of 400 mg of quetiapine (A, E) and 16 mg of perospirone (C, G). Each point represents the observed data corrected based on the dose of the present study of quetiapine (■), perospirone (○), and ID-15036 (Δ); the line is the fitted line. (A, C); CYP3A4 induction study by coadministration of carbamazepine (200 mg) three times daily for more than 21 days (A) or for 5 days (C), (E, G); CYP3A4 inhibition study by coadministration of ketoconazole (200 mg) for 4 days (E) or coadministration of itraconazole (50 mg) for 5 days (G). (B, F) Observed receptor occupancy \pm S.E.M. in the PET study of quetiapine (400 mg, ◆); bold line: estimated receptor occupancy time profiles. (B); induction study, (F); inhibition study. (D, H) Observed receptor occupancy \pm S.E.M. in the PET study of perospirone (16 mg, ◇); bold line: estimated receptor occupancy time profiles. Thin solid and dashed lines represent the contribution of perospirone and ID-15036, respectively. (D); induction study, (H); inhibition study.

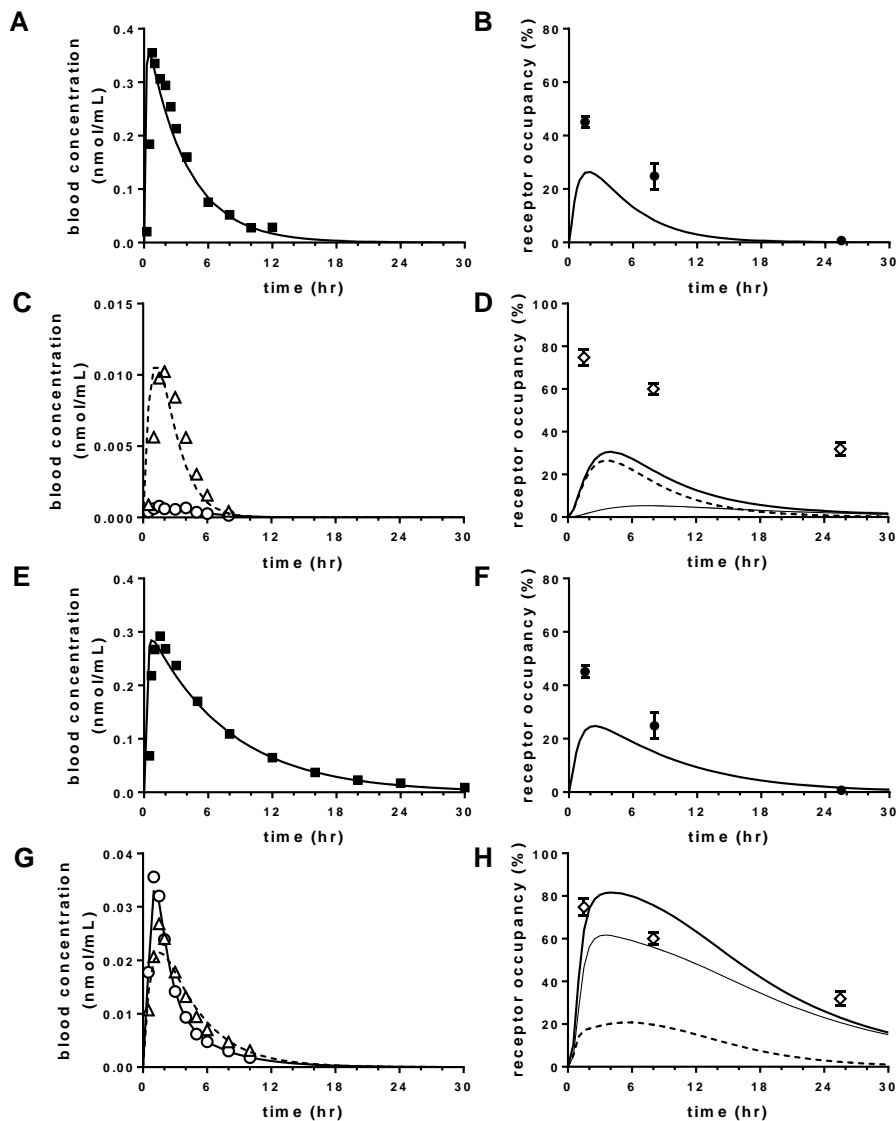


Fig. 2- 11 Simulation of receptor occupancy when induction or inhibition of quetiapine and perospirone elimination occurs.

(A, C, E, G) Blood concentration time profiles after oral administration of 300 (A) or 25 mg (E) of quetiapine and 8 mg of perospirone (C, G). Each point represents the observed data in the DDI study of quetiapine (■), perospirone (○), and ID-15036 (Δ); the line is the fitted line. (A, C); CYP3A4 induction study by coadministration of carbamazepine (200 mg) three times daily for more than 21 days (A) or for 5 days (C), (E, G); CYP3A4 inhibition study by coadministration of ketoconazole (200 mg) for 4 days (E) or coadministration of itraconazole (50 mg) for 5 days (G). (B, F) Observed receptor occupancy \pm S.E.M. in the PET study of quetiapine (300, 25 mg, ◆); bold line: estimated receptor occupancy time profiles. (B); induction study, (F); inhibition study. (D, H) Observed receptor occupancy \pm S.E.M. in the PET study of perospirone (8 mg, ◇); bold line: estimated receptor occupancy time profiles. Thin solid and dashed lines represent the contribution of perospirone and ID-15036, respectively. (D); induction study, (H); inhibition study.

11 他の受容体における占有率予測

D2 受容体拮抗薬は脳内の他のタンパクにも作用することが知られており、quetiapine のヒトヒスタミン H1 受容体に対する K_i 値は 2.2³⁴, 7.5³⁵ 及び 11 nM³⁶ と報告されている。そこで H1 受容体に対する結合を瞬時平衡であり、その他のパラメータは本検討で用いたモデルと同様と仮定して RO を予測した。 K_i 値として 2.2 nM を用いた場合、ヒト PET 試験 (投与量 25 mg) で評価した H1 受容体の RO³⁷ を再現することができた (Fig. 2- 12B)。Quetiapine 400 mg 投与では RO が 90% 以上になると予測された (Fig. 2- 12C)。また、アドレナリン α 1A ($K_i = 22$ nM³⁵) 及び α 2C 受容体 ($K_i = 28.85$ nM³⁵) に対しても 400 mg 投与では顕著な占有を示すと予測された (Fig. 2- 12D)

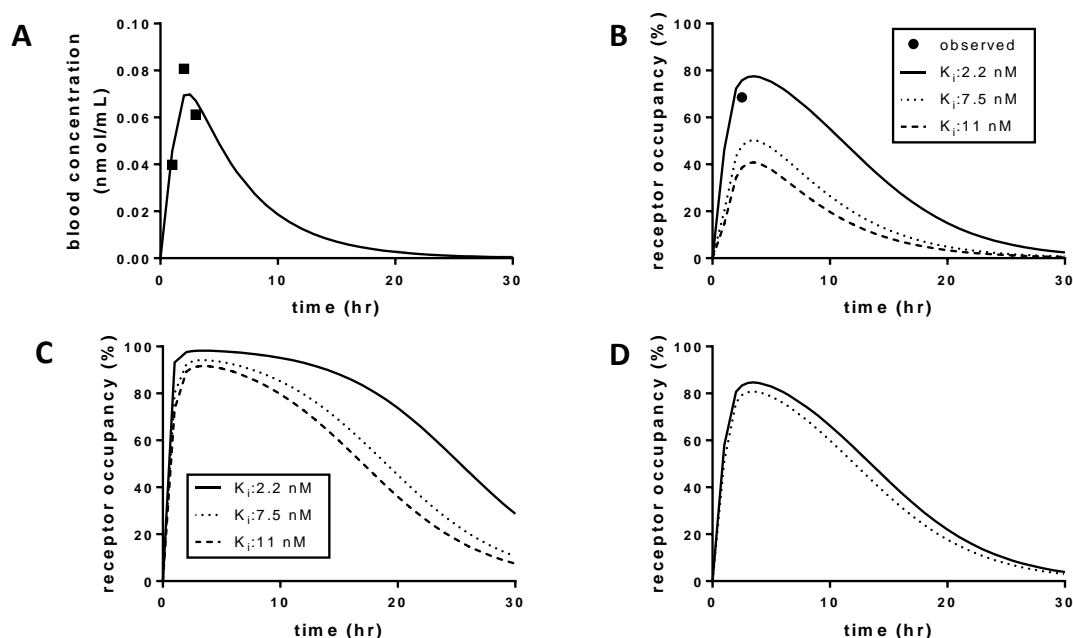


Fig. 2- 12 Blood concentration time profiles after oral administration of quetiapine, and simulation of H1-, α 1A- and α 2C receptor occupancy.

(A) Blood concentration time profiles after oral administration of 25 mg of quetiapine. Each point represents the observed data in reported PET study of histamine H1 receptor by quetiapine³⁷ (■), the line represented the simulated data using parameters in Table 2- 2 and Table 2- 5. (B) Observed receptor occupancy in the PET study after administration of 25 mg of quetiapine³⁷ (●). (B, C) H1 receptor occupancy time profiles after administration of 25 (B) or 400 mg (C) of quetiapine was simulated assuming rapid equilibrium of the receptor binding. Bold line: $K_i = 2.2$ nM³⁴; dotted line: $K_i = 7.5$ nM³⁵; and dashed line: $K_i = 11$ nM³⁶. (D) Adrenergic α 1A (bold line, $K_i = 22$ nM³⁵) and α 2C (dotted line, $K_i = 28.85$ nM³⁵) receptor occupancy time profiles after administration of 400 mg of quetiapine were simulated assuming rapid equilibrium of the receptor binding.

考察

本研究では、PBPK モデルを用いて *in vivo*, *in vitro* 及び *in silico* パラメータを統合することにより、D2 受容体拮抗薬である quetiapine 及び perospirone を経口投与後の RO 時間推移を予測した。シミュレーションの精度は PET 試験により得られた RO 時間推移と比較することで評価した。体循環からの消失は quetiapine と比較して perospirone の方が早いにもかかわらず、RO の持続は perospirone の方が長いいため、RO の持続を決定する要因を深く理解する目的で D2 受容体結合及び脳内動態の速度論解析を実施した。

始めに D2 受容体発現膜画分を用いて速度論パラメータを算出した。このヒト D2 受容体発現系では、raclopride の K_d 値は 1.6 nM と算出され、既報の値(1.3 nM³⁸)と同程度であった。被験物質 (quetiapine, perospirone, 及び ID-15036) の K_i 値は 2 つの方法で評価した。①定常状態における競合阻害、及び②結合時間推移から算出した k_{off}/k_{on} である。この 2 つの方法から同程度の K_i 値が得られたが、全ての被験物質で k_{off}/k_{on} の方が 2 倍程度小さい結果となった(Table 2- 1)。Quetiapine の K_i 値は既報のヒト D2 受容体への 286³⁹ 及び 322 nM²⁷と同程度か若干小さかった。Perospirone 及び ID-15036 の D2 受容体に対する K_i 値はラット脳ホモジネートのみで評価されており(それぞれ 1.77 及び 5.8 nM¹⁸)、本試験で得られた値よりも 5—14 倍大きかったことから、 K_i 値にはラットとヒトで種差の存在する可能性がある。

本検討の実施前、quetiapine 及び perospirone は受容体からの解離の半減期が異なるために RO の持続が異なるのではないかと推測していた。実際、perospirone の解離の半減期は quetiapine よりも 54 倍長かった(Table 2- 1)。しかしながら、perospirone の半減期は長くて 15 分であり、ヒトにおけるこれら 2 化合物の RO 持続の違いを説明するには明らかに不十分であった。このことから、quetiapine 及び perospirone の脳内動態に潜在しているメカニズムが原因であると考えに至った。

これら薬物の脳内動態を特徴づけるためには、脳内非結合形分率及び BBB を介した受動輸送クリアランスを予測する必要がある。本試験において脳内非結合形分率は次の 3 種の方法で予測した。①マウス脳ホモジネートを用いた非特異的結合評価($f_{u,brain\ homogenate}$)、②定量的物理化学パラメータ-活性相関($f_{u,brain\ silico}$)、及び③*in vivo* 動物試験($f_{u,brain\ vivo}$)である(Table 2- 2)。マウス *in vivo* 試験において Fig. 2-

3 に示したように Q_{br} , f_b 及び PS の値を固定したモデルフィッティングにより $f_{u,brain\ vivo}$ を算出した。算出された $f_{u,brain\ vivo}$ は quetiapine の場合 $f_{u,brain\ homogenate}$ とほぼ同程度であったが, perospirone 及び ID-15036 の場合 $f_{u,brain\ homogenate}$ よりもそれぞれ 3.7 及び 2.3 倍低かった(Table 2- 2)。このような過大評価を避けるため, 細胞構造の保たれている系である脳スライスが *in vitro* のモデルとして提案されている⁴⁰。 $f_{u,brain\ homogenate}$ 及び薬物の酸解離定数(pK_a)を基に脳スライスの脳内非結合形分布容積($V_{u,brain}$)を予測するために用いられる数学モデル⁴⁰によると, 予測された $f_{u,brain\ slice} (1/ V_{u,brain})$ はそれぞれ 0.049, 0.011, 及び 0.019 であり, $f_{u,brain\ vivo}$ の値と同等であった。

本モデルでは BBB を介した薬物の透過を受動拡散と仮定した(Fig. 2- 6)。Perospirone は P-糖タンパク(P-glycoprotein, P-gp)の阻害剤であり, Caco-2 細胞における rhodamine 123 の蓄積を顕著に促進したと報告されている⁴¹。Quetiapine 及び perospirone の P-gp 発現 LLC-PK1 細胞 (LLC-GA5-COL150)における経細胞輸送はコントロール細胞である LLC-PK1 細胞と同程度であったため, quetiapine 及び perospirone のいずれも P-gp の基質ではないと考えられ, quetiapine は既報³²と同様であった。

これらパラメータを用いたシミュレーションでは, 臨床 PET 試験で測定した場合と同程度の RO を予測することができた。予測した最高 RO は実測値と同程度であった(Fig. 2- 5C 及び F)。Perospirone の代謝物には薬理活性のある ID-15036 が含まれているため, D2 受容体結合に対する ID-15036 の寄与についても検討した。ID-15036 の D2 受容体に対する阻害活性は perospirone よりも 10 倍程度低いものの (Table 2- 1), ID-15036 の最高血液中濃度及び予測した脳内非結合形濃度は perospirone よりもそれぞれ 4 及び 12 倍高く(Fig. 2- 5D 及び E), したがって投与後初期の段階では ID-15036 及び perospirone は RO に対して同程度寄与しているが, ID-15036 の RO の持続は perospirone よりも短い (Fig. 2- 5F)と予測された。

さらに, K_i , PS , 及び f_{br} の値を変化させることで感度分析を行った。 K_i 値として報告値を用いた場合, RO を過小評価した(Fig. 2- 7A 及び B)。 PS 値を増やすと RO は早く上昇し, RO の持続は短くなり, PS 値を減らすと逆の現象が起きた(Fig. 2- 7C 及び D)。Quetiapine の場合 f_{br} は RO に影響を及ぼさなかったが(Fig. 2- 7E), perospirone の RO 持続には影響を与え, 脳ホモジネートや *in silico* で得られた f_{br} では perospirone の RO の持続を説明することができなかった(Fig. 2-

7F)。従って、中枢および血液間の薬物の交換に瞬時平衡を仮定すると、perospirone 投与後の RO 時間推移を説明できないと考えられた。

ボトムアップの手法でシミュレーションした場合、全ての実測値を説明できなかった(Fig. 2-5)のは、*in vitro* パラメータ評価における誤差が原因であると考えられる。そこで最尤法を用いて quetiapine 及び perospirone のパラメータを最適化した。 k_{on} と k_{off} の両方を変化させるとその差を説明することができ、このときの K_i 値の違いの程度は許容範囲であると考えられた(Table 2-6 及び Fig. 2-8)。しかし perospirone の k_{on} 、 k_{off} の絶対値は初期値と大きく異なった。

Norquetiapine は quetiapine の主要代謝物の一つであり、D2 受容体に対して quetiapine と同程度の阻害活性を有している。 $[^{14}C]$ raclopride をリガンドに用いた別の PET 試験において、300 mg の quetiapine 投与後 2 時間及び 24 時間の RO は $50 \pm 4\%$ 及び $7 \pm 7\%$ (mean \pm S.D.)であった²⁹。この報告では norquetiapine の C_{max} 及び AUC_{0-24h} は quetiapine のそれぞれ約 34% 及び 75%であった。仮に norquetiapine の血中濃度が quetiapine の 2 分の 1 で、ヒト D2 受容体に対する K_i 値がそれぞれ 196, 86.6 nM であり、他のパラメータについては全て quetiapine と同様であると仮定した場合、norquetiapine の影響も加味した RO は Fig. 2-9 のように予測され、norquetiapine も一部 RO に関与すると考えられた。本試験で用いた PET 解析では norquetiapine の血漿中濃度を評価していないが、D2RO に対する norquetiapine の寄与も本モデルに組み込むべきであると考えられる。

本試験で構築したモデルは薬物動態 DDI の脳内 RO に対する影響を予測する手がかりとなる。Quetiapine 及び perospirone の主要消失経路は CYP3A4 による代謝である。従って、CYP3A4 の誘導や阻害はこれら薬物の全身暴露に影響を及ぼす。CYP3A4 の誘導作用を有する carbamazepine (200 mg) 併用時、quetiapine 及び perospirone の血液中濃度時間曲線下面積(AUC)はそれぞれ 86% 及び 77% 低下した^{32,30}。CYP3A4 誘導後の quetiapine 及び perospirone の RO 予測から、RO の減少の程度は血液 AUC ほど大きくないことが示唆された(Fig. 2-10B 及び D)。特に perospirone 投与後の RO の減少は、ID-15036 の影響である程度補われていると考えられた(Fig. 2-10D)。CYP3A4 阻害作用を有する ketoconazole (200 mg) または itraconazole (50 mg)を併用後、quetiapine 及び perospirone の AUC がそれぞれ 523% 及び 582% 上昇した^{32,33}。実際の DDI 試験に用いられた quetiapine の投与量(25 mg)は、恐らく錐体外路症状を避けるため、臨床投与量(400 mg)よりも低く設定されている。実際、本シミュレーシ

オンによると、この 25 mg という投与量では、RO は T_{max} であっても最大で 20%と予想された(Fig. 2-11)。臨床投与量の場合、RO は T_{max} で副作用の発現に対する閾値(80%¹³)を超える 90%になると予想された。CYP3A4 の阻害は ID-15036 の全身暴露に影響を与えなかったが³³、perospirone の全身暴露の増加のため、RO に対する ID-15036 の寄与は減少した (Fig. 2- 10H)。

本試験では D2RO に着目したが、D2 受容体拮抗薬は脳内の他のタンパクにも作用することが知られており、 K_i 値が D2 受容体と同程度かそれより低いタンパクもあるため、臨床投与量においてはこれらタンパクに対し顕著な阻害を引き起こすことが予想される。例えば、quetiapine のヒトヒスタミン H1 受容体に対する K_i 値として 2.2 nM を用いた際、本シミュレーションはヒト PET 試験で評価した H1 受容体の RO を再現できた(Fig. 2- 12)。さらに、quetiapine はアドレナリン α 1A 及び α 2C 受容体に対しても顕著な占有を示すと予想された(Fig. 2- 12)ため、PET による検証が望まれる。しかしながら、臨床適用可能な選択的プローブが確立され、かつ利用可能かどうかに依存しており、全ての活性を持つ脳内タンパクに対して PET を用いてヒトにおける作用を確認するのは必ずしも現実的ではない。モデリング&シミュレーションは *in vitro* データを統合することで欠測データを補う事ができ、中枢薬の薬理作用を深く理解するのに役立つ。近年、被験薬を微量(100 μ g 以下)投与後の薬物動態特性を検討するため、マイクロドージングが新しい治験薬の評価過程の一つとして取り入れられている。本アプローチでは原則的に薬理応答性は評価することができないため、マイクロドースのデータをモデリング&シミュレーションと組み合わせることで、治験薬の次の開発段階への候補選択に対しても一助となると期待できる。

D2 受容体拮抗薬である olanzapine, haloperidol, 及び risperidone が PET 試験において、下垂体よりも大脳皮質で高い RO を示し、sulpiride では逆の結果になったとの報告がある⁴²。薬物は、血液から下垂体にある受容体へはバリアーが欠損しているため自由に近づくことができるが、大脳は BBB により保護されている。この知見は olanzapine, haloperidol, 及び risperidone に能動的な取り込み機構が関与していることを示唆している。このような薬物のヒトにおける BBB 透過性を予測することも課題である。

第三章 ヒスタミン H1 受容体占有率時間推移の予測

要旨

中枢におけるヒスタミン H1 受容体の顕著な占有は鎮静作用に繋がる。本研究では鎮静性 (diphenhydramine 及び ketotifen) と非鎮静性 (bepotastine 及び olopatadine) の H1 受容体拮抗薬 (抗ヒスタミン薬) を用い *in vitro* 及び動物のデータを統合することで、臨床投与量における中枢 H1 受容体占有率 (RO) の時間推移を検討した。血漿中濃度及び受容体の結合を関連付けた薬物動態モデルを構築した。H1 受容体との解離及び結合速度定数と血漿中や脳内の非結合形分率は *in vitro* で評価した。血液脳関門 (BBB) を介した受動および能動的な透過クリアランスは、物理化学的特性とマウス及びサルにおけるマイクロダイアリスの結果を基に予測した。予測した RO は、ヒトにおいて陽電子放出断層撮影により血漿中の最高濃度到達時間 (T_{max}) で評価した報告値と同等であった。シミュレーションから、bepotastine と olopatadine による最高 RO は報告値よりも大きいことが示唆された。感度分析により、BBB を介した能動輸送が、評価した抗ヒスタミン薬の RO の持続に大きく影響を与えていることが示された。

諸言

ヒスタミン H1 受容体拮抗薬（抗ヒスタミン薬）は鼻炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患治療に広く用いられている⁴³。特に第一世代薬に見られる副作用の1つである鎮静は、中枢の H1 受容体の占有に原因があると考えられている⁴⁴。これまで [¹¹C]doxepin などの H1 受容体のリガンドを用いた PET 試験により、ヒト脳内での抗ヒスタミン薬と H1 受容体の相互作用が実証されてきた。抗ヒスタミン薬を臨床投与量投与すると、 [¹¹C]doxepin の中枢における放射活性が著しく減少した。抗ヒスタミン薬を投与前後の被験者の放射活性を比較することで、薬物の中枢における RO が明らかになる。抗ヒスタミン薬は RO の大きさに基づき、鎮静性(50~100%の占有率)、弱鎮静性(20~100%)及び非鎮静性(0~20%)に分類される⁴⁵。臨床試験における RO の評価時点は限られているため（血漿の T_{max} ^{46,47,48,49,50}または他のより遅い時点⁵¹）、抗ヒスタミン薬の投与量または血漿中濃度と RO の関係について定量的な解析はなされていない。従って、H1 の RO が *in vitro* データにより説明できるかどうかは未だ解明されていない。

第二章 では、ドパミン D2 受容体拮抗薬である quetiapine と perospirone において、動態パラメータを統合することで、D2 受容体や、これら薬物がヒトの脳内で相互作用する他の受容体の占有率の時間推移を予測できることを示した。

いくつかの抗ヒスタミン薬は BBB において P-gp を介した能動的な排泄を受ける。P-gp 遺伝子(*Mdr1a* または *Mdr1a/1b*)欠損(knockout, KO)マウスにおいて、抗ヒスタミン薬である bepotastine や olopatadine の脳内/血漿中濃度比は、正常マウスと比較して 2.9-5.3 倍高い^{52,53}。反対に、ヒトの不死化脳血管内皮細胞 (hCMEC/D3) において、diphenhydramine の細胞内取り込みに、プロトン共役有機カチオン輸送の関与が示唆されている⁵⁴。さらに、ラットにおけるマイクロダイアリス試験から diphenhydramine の $C_{u,brain}$ が血漿中非結合形濃度($C_{u,plasma}$)よりも 5.5 倍高いことが示されている⁵⁵。従って、抗ヒスタミン薬の中枢における分布を表現する薬物動態モデルには、BBB を介した能動的な取り込みや排泄を考慮に入れる必要がある。

本研究では抗ヒスタミン薬の非臨床 (*in vitro*, 動物, 及び *in silico*)データ及び臨床 PET 試験における投与量投与後の血液中濃度 (C_{blood}) 時間推移を基に、中枢における RO 時間推移を予測し

た。RO の予測値は臨床 PET 試験で得られた値と比較した。モデル化合物として、鎮静性の抗ヒスタミン薬(diphenhydramine 及び ketotifen)と非鎮静性の抗ヒスタミン薬(bepotastine 及び olopatadine)を選択した。

結果

1 ヒト H1 受容体との結合パラメータ評価

ヒト H1 受容体への ^3H mepyramine の結合飽和性を検討し(Fig. 3- 1A), K_d 及び B_{\max} はそれぞれ $4.35 \pm 0.63 \text{ nM}$ 及び $4.11 \pm 0.38 \text{ pmol/mg protein}$ (mean \pm calculated S.D.)と算出された (Table 3- 1)。抗ヒスタミン薬は ^3H mepyramine のヒト H1 受容体への結合を濃度依存的に阻害した(Fig. 3- 1B)。算出した K_i 値は Table 3- 1 にまとめた。

^3H mepyramine のヒト H1 受容体への結合時間推移を cetirizine 存在下及び非存在下で評価し, ^3H mepyramine の k_{off} 及び k_{on} はそれぞれ $1.41 \pm 0.07 /\text{min}$ 及び $195 \pm 0.66 \text{ mL/nmol/min}$ と算出された(Fig. 3- 1C)。 ^3H mepyramine の結合時間推移は抗ヒスタミン薬が 80%の阻害を起こす濃度存在下でも評価した(Fig. 3- 1D)。Diphenhydramine 存在下では, ^3H mepyramine の H1 受容体への結合が瞬時に定常状態に達したため, その他の抗ヒスタミン薬の k_{on} 及び k_{off} のみ算出した(Table 3- 1)。Olopatadine は H1 受容体からの解離に最も長い半減期(2 時間以上)を示した。

さらに, リガンドの違いによる影響を検討するため, ^3H doxepine の結合飽和性を検討し K_d を算出した後, 抗ヒスタミン薬の K_i 値を評価した(Table 3- 2)。リガンドによらず同程度の K_i 値が得られた。

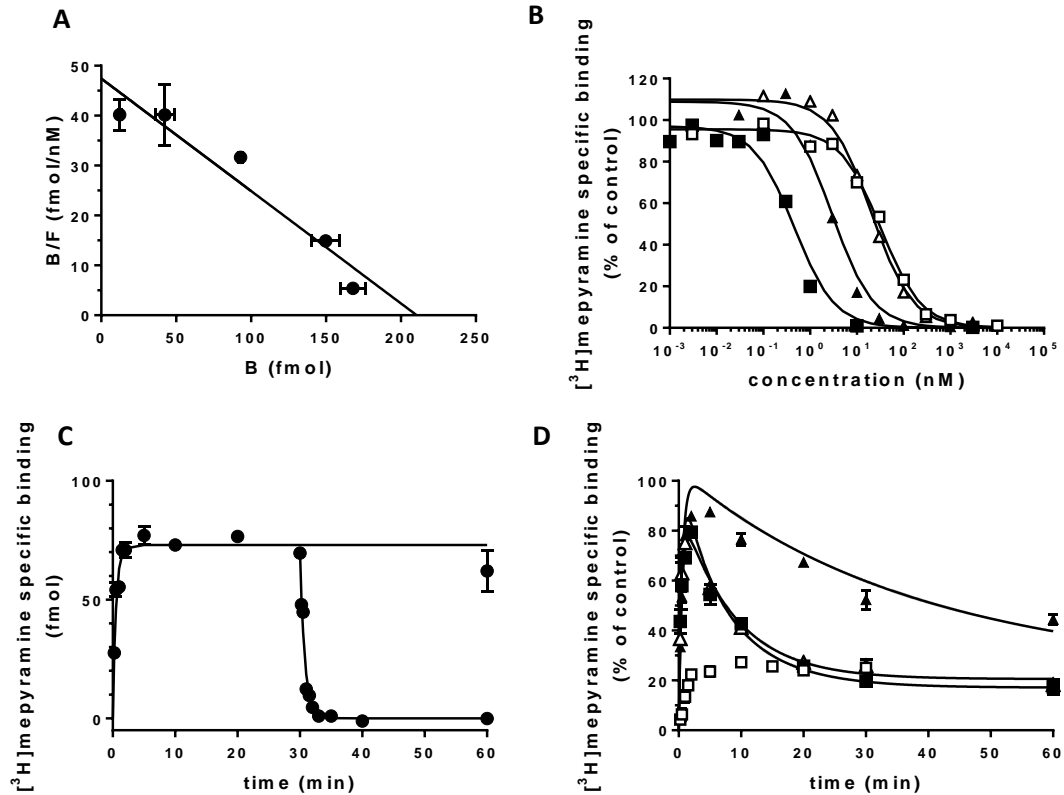


Fig. 3- 1 Kinetic analysis of association and dissociation of H1 antagonists with human H1 receptor (A) $[^3\text{H}]$ Mepyramine (0.3-30 nM) was incubated with the human H1 receptor expressing membrane (50 $\mu\text{g}/\text{assay}$) for 2 h at 37°C . Concentration dependence was shown in Scatchard plots. (B) $[^3\text{H}]$ Mepyramine (3 nM) binding to the human H1 receptor (25 $\mu\text{g}/\text{assay}$) was determined at 37°C for 3 h (olopatadine) or 2 h (the others) in the presence or absence of an H1 antagonist; \square , diphenhydramine (0.003–10000 nM); \blacksquare , ketotifen (0.001–3000 nM); \triangle , bepotastine (0.1–3000 nM); \blacktriangle , olopatadine (0.03–1000 nM). (C) After incubation of $[^3\text{H}]$ mepyramine (3 nM) with the human H1 receptor (25 $\mu\text{g}/\text{assay}$) for 30 min at 37°C , $[^3\text{H}]$ mepyramine dissociation was induced by the addition of 10 μM cetirizine. (D) $[^3\text{H}]$ Mepyramine (3 nM) association kinetics were examined at 37°C in the presence or absence of a single concentration of the H1 antagonists (chosen to inhibit approximately 80% of $[^3\text{H}]$ mepyramine-specific binding at equilibrium). \square , diphenhydramine (100 nM); \blacksquare , ketotifen (1 nM); \triangle , bepotastine (50 nM); \blacktriangle , olopatadine (5 nM). Binding experiments and data analysis were performed as described in 第五章 3. Solid lines represent the fitted line. Each symbol represents the mean \pm S.E.M ($n = 3$). Some error bars are concealed by symbols.

Table 3-1 Binding kinetic constants of H1 antagonists using [³H]mepyramine as a ligand

Compound	K _d or K _i ^{a)} nM	B _{max} pmol/mg protein	K _{on} mL/nmol/min	k _{off} min ⁻¹	t _{1/2} ^{b)} min	Calculated K _d or K _i ^{c)} nM
[³ H]mepyramine	4.35 ± 0.63	4.11 ± 0.38	195 ± 66	1.41 ± 0.07	0.49	7.23
Diphenhydramine	19.0 ± 1.9	NA	NC	NC	NC	NC
Ketotifen	0.265 ± 0.057	NA	204 ± 15	0.0156 ± 0.0019	44	0.0765
Bepotastine	11.3 ± 1.6	NA	2.55 ± 0.36	0.0267 ± 0.0064	26	10.5
Olopatadine	1.62 ± 0.37	NA	5.32 ± 0.96	0.00440 ± 0.00249	158	0.827

Each value represents the parameter estimated ± calculated S.D. NA, Not applicable. NC, Not calculated.

a) [³H]Mepyramine, K_d; the others, K_i.

b) Calculated by LN(2)/k_{off}.

c) Calculated by k_{off}/k_{on}. [³H]Mepyramine, K_d; the others, K_i.

Table 3-2 Binding affinity of H1 antagonists using [³H]doxepin as a ligand

Compound	K _d or K _i nM
[³ H]doxepin	0.137 ± 0.013
Diphenhydramine	30.4 ± 1.9
Ketotifen	0.239 ± 0.042
Bepotastine	19.0 ± 0.8
Olopatadine	0.880 ± 0.156

Each value represents the parameter estimated ± calculated S.D.

K_d value was obtained in the presence of [³H]doxepin 0.02-0.6 nmol/L and K_i value was obtained in the presence of [³H]doxepin 0.08 nmol/L and several concentrations of test compounds.

2 抗ヒスタミン薬の血清・血漿・脳内非結合形分率及び R_B

抗ヒスタミン薬のヒト血清($f_{u, human}$), サル血清($f_{u, monkey}$), マウス血漿($f_{u, mouse}$)及びマウス脳ホモジネート($f_{u, brain\ homogenate}$)における非結合形分率を *in vitro* で評価した(Table 3- 3)。脳スライス取り込み試験において, [^{14}C]carboxyl-inulin の脳スライスへの取り込みは 0.23 mL/g brain であり, 既報⁵⁶と同程度であった。 $f_{u, brain\ silico}$ の値は被験物質の物理化学パラメータ (Table 3- 4)を用いて計算により求めた。 $f_{u, brain\ homogenate}$ の値は脳スライスで求めた $f_{u, brain\ slice}$ と同程度 (3 倍以内の差) であったが, diphenhydramine 及び ketotifen の $f_{u, brain\ silico}$ の値は $f_{u, brain\ slice}$ よりも 5-7 倍高かった。血中濃度/血漿中濃度比(R_B 値)はヒト血液で評価し Table 3- 3 にまとめた。

Table 3- 3 Unbound fractions and R_B of H1 antagonists

Parameter	Diphenhydramine	Ketotifen	Bepotastine	Olopatadine
R_B	0.733 ± 0.064	1.02 ± 0.05	0.841 ± 0.121	0.919 ± 0.012
$f_{u, human}$	0.378 ± 0.012	0.337 ± 0.004	0.684 ± 0.011	0.604 ± 0.026
$f_{u, monkey}$	0.277 ± 0.001	0.287 ± 0.002	0.740 ± 0.021	0.630 ± 0.017
$f_{u, mouse}$	0.325 ± 0.010	0.193 ± 0.012	0.790 ± 0.035	0.784 ± 0.090
$f_{u, brain\ slice}$	0.0193 ± 0.0018	0.0125 ± 0.0019	0.238 ± 0.024	0.180 ± 0.007
$f_{u, brain\ homogenate}$	0.0531 ± 0.0020	0.0373 ± 0.0015	0.218 ± 0.009	0.213 ± 0.030
$f_{u, brain\ silico}$	0.142	0.0583	0.437	0.172

R_B and $f_{u, human}$ were determined in human, $f_{u, monkey}$ was determined in monkey, and $f_{u, mouse}$, $f_{u, brain\ slice}$ and $f_{u, brain\ homogenate}$ were determined in mouse. Each value represents the mean ± S.E.M. or the calculated S.D. ($f_{u, brain\ homogenate}$) (n = 3). Determination of these parameters were performed as described in 第五章 4, 5, 7, and 12.

Table 3- 4 Calculated physicochemical parameters of diphenhydramine, ketotifen, bepotastine, and olopatadine

parameter	Diphenhydramine	Ketotifen	Bepotastine	Olopatadine	Software
TPSA	12.5	20.3	62.7	49.8	MOE
V_{sa_base}	0	0	0	0	MOE
LogD _{7.4}	1.71	2.53	0.670	1.53	ADMET predictor

3 マウス及びサル脳マイクロダイアリシス法による抗ヒスタミン薬の C_{ISF}

マウスにおいて抗ヒスタミン薬の間質液(ISF)中濃度(C_{ISF}) は迅速に定常状態に達した(Fig. 3-2A)。定速静脈内投与開始から 90 分後に評価したマウスにおける diphenhydramine, ketotifen, bepotastine 及び olopatadine の非結合形濃度基準の血漿中脳内濃度比($K_{p,uu}$, mL/g brain)はそれぞれ 8.33 ± 0.78 , 5.18 ± 0.69 , 0.124 ± 0.019 , 及び 0.157 ± 0.018 (mean \pm S.E.M.)であった。

Diphenhydramine 及び ketotifen の C_{ISF} 及び $C_{u,plasma}$ はサルにおいても評価した。いずれの濃度も 4 時間までに定常状態に達した(Fig. 3-2B)。定速静脈内投与開始 240 分後の diphenhydramine 及び ketotifen のサルにおける $K_{p,uu}$ (mL/g brain) はそれぞれ 1.16 ± 0.29 及び 2.39 ± 0.36 であった。

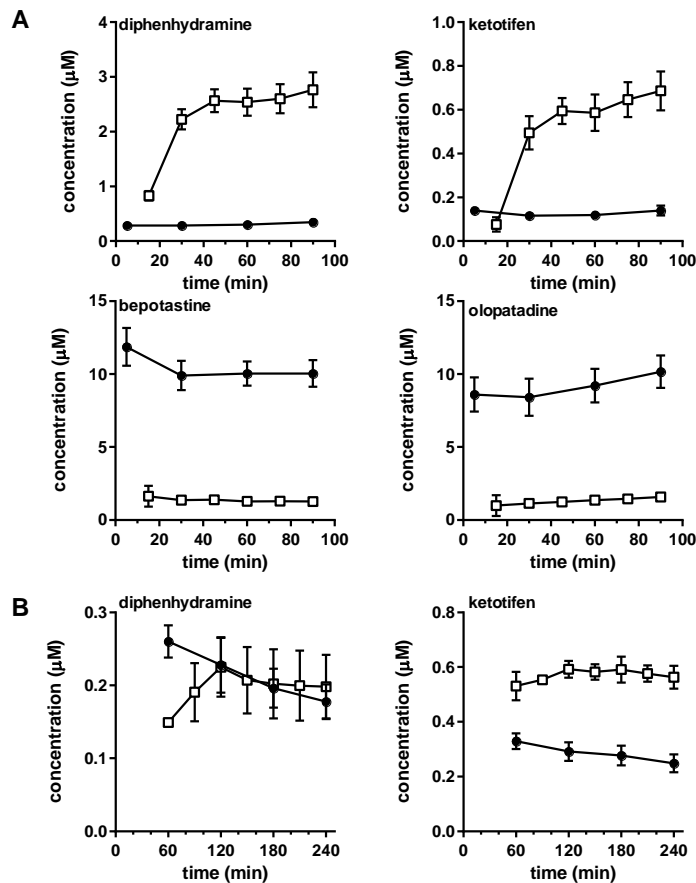


Fig. 3-2 Time profiles of H1 antagonists concentrations in the interstitial fluid of mice and monkeys using microdialysis

Unbound plasma (●) and interstitial fluid (□) concentration-time profiles of diphenhydramine, ketotifen, bepotastine, and olopatadine in *ddY* mice (A) and those of diphenhydramine and ketotifen in cynomolgus monkeys (B) after constant intravenous infusion with a bolus dose. Priming doses and infusion rates are given in 第五章 9. Each point represents the mean \pm S.E.M. of six (A, diphenhydramine and ketotifen), five (A, bepotastine and olopatadine), or four (B) animals.

4 脳内非結合形濃度及びROの予測

抗ヒスタミン薬の C_{blood} -時間推移は Fig. 3-3 に示した。PET 試験時に得られた C_{blood} ($R_B \times$ 血漿中濃度) は他の臨床試験で得られた濃度^{57,58,59,60} と同程度であった (Fig. 3-3)。

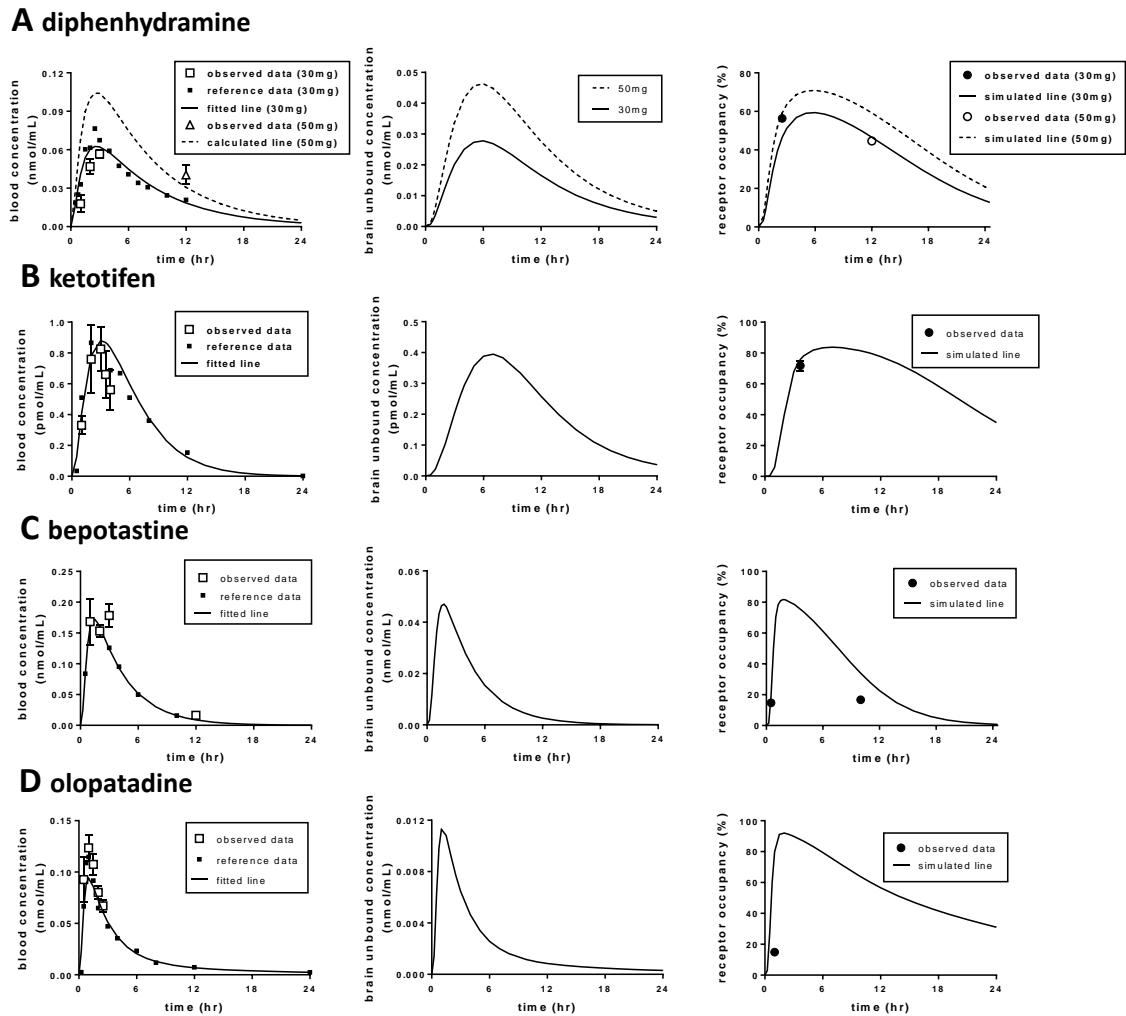


Fig. 3-3 Simulation of blood concentrations, and brain unbound concentrations of H1 antagonists, and the RO in the brain

The blood concentration-time profiles (left panel), estimated unbound brain concentration-time profiles (middle panel), and estimated RO (right panel) in human brain following an oral administration of 30 and 50 mg diphenhydramine (A), 1 mg ketotifen (B), 10 mg bepotastine (C), and 5 mg olopatadine (D) were shown. Estimations were performed as described in the 第五章 16. The details are summarized in Table 3-5.

Table 3-5 Legend of Fig. 3- 3 in tabular form

Fig	Oral administration	Time profiles ^a	Observed data in PET study (Dose)	Reference data ^b	Solid line	Dotted line	Used f_{br} , PS_{inf} and PS_{eff} in the estimation ^c
A	Diphenhydramine	Blood	□ (30 mg ⁵⁰) and Δ (50 mg ⁵¹)	■ (corrected from 50 mg to 30 mg of dose ⁵⁷)	Fitted line (30 mg) of ■	Estimated line	$f_{br} = f_{u,brain\ slice}$; $PS_{inf} = K_{p,uu}$ in monkey×PS; $PS_{eff} = PS$
		Unbound brain	NA	NA	Estimated line	Estimated line (50 mg)	
		H1 RO (%)	● (30 mg ⁵⁰) and ○ (50 mg ⁵¹)	NA	Estimated line	Estimated line	
B	Ketotifen	Blood	□ (1 mg ⁴⁹)	■ (corrected from 1.45 mg to 1 mg of dose ⁵⁸)	Fitted line of ■	NA	$f_{br} = f_{u,brain\ slice}$; $PS_{inf} = K_{p,uu}$ in monkey×PS; $PS_{eff} = PS$
		Unbound brain	NA	NA	Estimated line	NA	
		H1 RO (%)	● (1 mg ⁴⁹)	NA	Estimated line	Estimated line	
C	Bepotastine	Blood	□ (10 mg at 1,2,3 h ⁵⁰ and at 12 h ⁵¹)	■ (corrected from 20 mg to 10 mg of dose ⁵⁹)	Fitted line of ■	NA	$f_{br} = f_{u,brain\ slice}$; $PS_{inf} = PS$; $PS_{eff} = K_p$ brain ratio in the P-gp KO mice×PS
		Unbound brain	NA	NA	Estimated line	NA	
		H1 RO (%)	● (10 mg at 1 h ⁵⁰ and at 12 h ⁵¹)	NA	Estimated line	Estimated line	
D	Olopatadine	Blood	□ (5 mg ⁴⁹)	■ (5 mg ⁶⁰)	Fitted line of ■	NA	$f_{br} = f_{u,brain\ slice}$; $PS_{inf} = PS$; $PS_{eff} = K_p$ brain ratio in the P-gp KO mice×PS
		Unbound brain	NA	NA	Estimated line	NA	
		H1 RO (%)	● (5 mg ⁴⁹)	NA	Estimated line	Estimated line	

NA: not applicable, Each point represents the mean ± S.E.M, or the mean (reference data).

^a Left panel, Blood (blood concentration = plasma concentration × R_B , nmol/mL); middle panel, Unbound brain (brain unbound concentration, nmol/mL); right panel, H1 RO (%).

^b Another representative pharmacokinetic data. ^c K_p brain ratio in the P-gp KO mice is described in 第五章 16.

Table 3- 6 Pharmacokinetic parameters used for prediction of H1 RO

Parameter		Diphenhydramine	Ketotifen	Bepotastine	Olopatadine
f_b^a		0.516	0.33	0.813	0.657
PS	mL/min/g brain	0.84	1.17	0.159	0.349
k_a	/min	0.0149	0.00758	0.0362	0.168
k_e	/min	0.00252	0.00565	0.00491	0.0046
k_{12}	/min	-	-	-	0.00174
k_{21}	/min	-	-	-	0.00187
t_{lag}	min	15.2	27.8	17.6	25.4
V_b	L	1140	1540	76.4	107

^a $f_b = f_{u, human} / R_B$. The parameter definitions are described in Fig. 3- 4.

Table 3- 6 に示したように、得られた薬物動態パラメータ及び PS (Table 3- 6), k_{on} 及び k_{off} (Table 3- 1), 及び $f_{u, brain slice}$ (Table 3- 3)を用いて、PBPK モデル(Fig. 3- 4)により抗ヒスタミン薬の $C_{u, brain}$ 時間推移を予測し(Fig. 3- 3), さらに H1 受容体の RO 時間推移を予測した。予測 RO は既報の臨床 PET 試験における報告値と比較した^{49,50,51}。Diphenhydramine 及び ketotifen の予測と実測の RO の値はよく合っていた(Fig. 3- 3A 及び B)。Bepotastine 及び olopatadine による予測 RO 値は、RO を測定した時点付近では同程度であった (bepotastine, 1 h の実測 RO, 15%; 0.5 h の予測値, 19%; 1 h の予測値, 70%; olopatadine, 1 h の実測 RO, 15%; 0.4 h の予測値, 15%; 1 h の予測値, 80%)が、予測した最高 RO 値は血漿中濃度の T_{max} (1 h)で実測した値より著しく高かった(Fig. 3- 3C 及び D)。

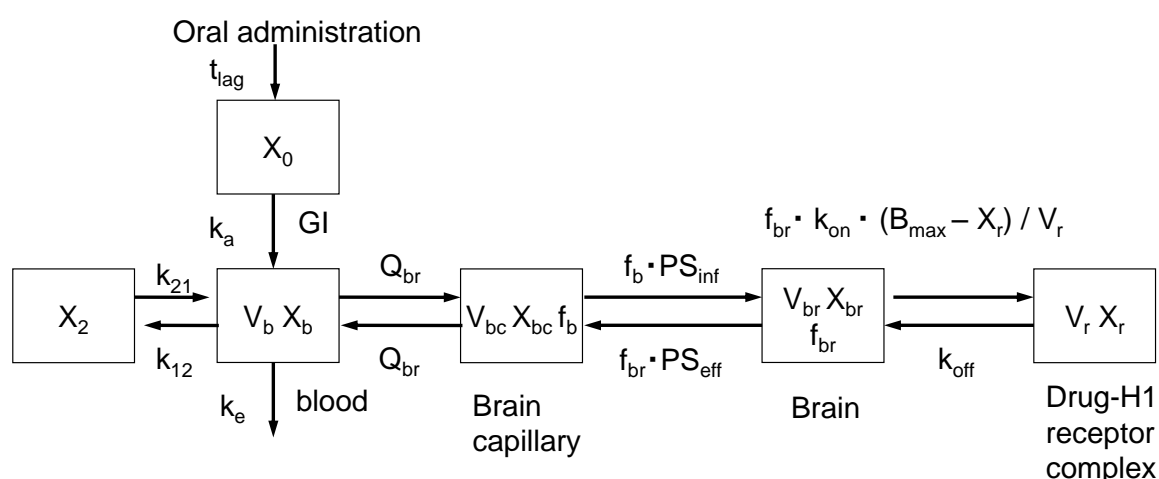


Fig. 3- 4 PKPD model describing the pharmacokinetics and receptor binding of H1 antagonists after their oral administration

The definition of X , V , k_a , k_e , Q_{br} , PS , f , B_{max} , V_b , V_{br} , and V_r are the same as described in Fig. 2- 6 except for k_{12} (transfer from central to peripheral compartment rate constant), k_{21} (transfer from peripheral to central compartment rate constant), PS (PS_{inf} , influx from blood to brain; PS_{eff} , efflux from brain to blood), B_{max} (the maximal number of binding sites of H1 receptor, 0.0036 nmol/g brain)⁶¹, respectively. Subscripts represent the name of the compartment: 0, GI tract; b, blood; 2, peripheral; bc, brain capillary; br, brain (unbound form to the receptor); and r, receptor (bound form to the receptor). Mass balance equations were described in 第五章 19. RO by diphenhydramine was calculated assuming rapid equilibrium: $RO(\%) = f_{br} \times X_{br}/V_{br} \times 100/(K_i + f_{br} \times X_{br}/V_{br})$

5 P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送及び relative activity factor (RAF)法による予測

Bepotastine 及び olopatadine の P-gp 発現細胞における経細胞輸送を検討したところ、典型的基質である verapamil と同様に、コントロール細胞(LLC-PK1)が A to B, B to A とともに同程度の輸送を示しているのに対し P-gp 発現細胞(LLC-GA5-COL150)では P-gp の発現している apical 側への輸送 (B to A)が上昇し、逆方向は低下した(Fig. 3- 5)。算出された net flux ratio は bepotastine 及び olopatadine でそれぞれ 2.38 及び 2.60 であり、P-gp の阻害剤である GF-120918 存在下では net flux ratio が bepotastine 及び olopatadine でそれぞれ 1.32 及び 1.24 まで低下した(Table 3- 7)。PET イメージングデータの速度論解析で得られた¹⁴C]verapamil の排泄速度定数⁶²が P-gp 活性に相関していると仮定し、RAF メソッドにより外挿した bepotastine 及び olopatadine の排泄能 ($PS_{brain\ to\ blood} / PS_{blood\ to\ brain}$)はそれぞれ 3.0 及び 3.2 であった(Table 3- 8)。

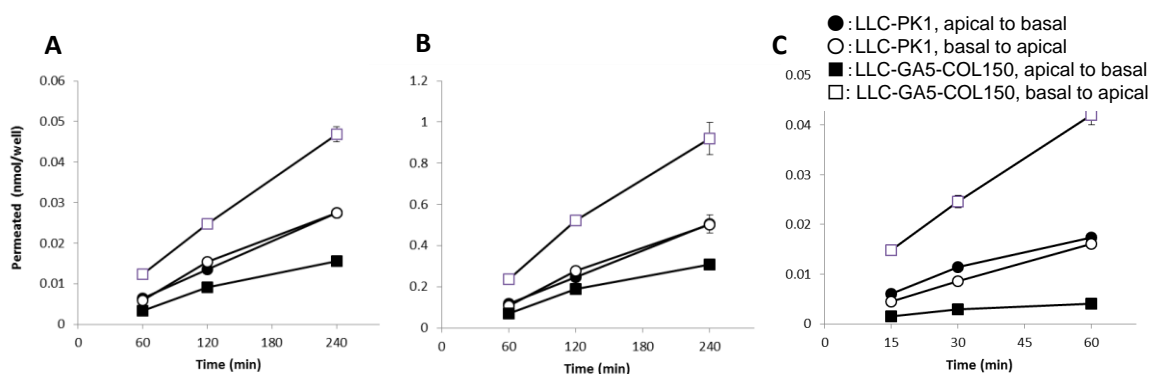


Fig. 3- 5 The transcellular transport of (A) bepotastine (1 μM), (B) olopatadine (10 μM), and (C) verapamil (0.2 μM) across LLC-PK1 and LLC-GA5-COL150 cell monolayers (n=3).

Table 3- 7 Permeability for the transcellular transport of bepotastine, olopatadine, and verapamil in LLC-PK1 and LLC-GA5-COL150 cells

Compound	Inhibitor	LLC-PK1 P _{app}			LLC-GA5-COL150 P _{app}			net flux ratio
		(× 10 ⁻⁶ cm/s)			(× 10 ⁻⁶ cm/s)			
		A to B	B to A	Flux ratio	A to B	B to A	Flux ratio	
Bepotastine	none	2.06	2.20	1.07	1.33	3.38	2.54	2.38
Bepotastine	GF-120918	2.74	2.05	0.75	2.17	2.15	0.99	1.32
Olopatadine	none	2.01	2.08	1.03	1.50	4.03	2.69	2.60
Olopatadine	GF-120918	2.55	2.26	0.89	2.16	2.38	1.10	1.24
Verapamil	none	47.8	30.7	0.64	11.8	85.3	7.22	11.3
Verapamil	GF-120918	48.2	41.9	0.87	55.0	49.2	0.89	1.03

The transcellular transport of bepotastine (1 μM), olopatadine (10 μM), and verapamil (0.2 μM) across LLC-PK1 and LLC-GA5-COL150 cell monolayers in the presence or absence of a P-gp inhibitor (GF-120918, 2 μM) was evaluated. Each P_{app} value represents the calculated slope from 1, 2, and 4 h (bepotastine and olopatadine) or 0.25, 0.5, and 1 h (verapamil) and is expressed as the mean of each permeated amount of compounds (n=3).

Table 3- 8 In vitro to in vivo extrapolation of permeability across the BBB

in vivo	k		calculation method
	(1/min)		
Verapamil	K1(f _p ×PS _{blood to brain})	0.048	mean of cortex ⁶²
	k2(f _{br} ×PS _{brain to blood})	0.070	mean of cortex ⁶²
	f _p	0.104	⁶³
	f _{br}	0.0165	⁹
	PS _{blood to brain}	0.46	K1/f _p
	PS _{brain to blood}	4.2	k2/f _{br}
	PS _{brain to blood} /PS _{blood to brain}	9.2	
	PS _{passive,vivo}	4.7	adjusted using PS _{blood to brain} = (PS _{passive,vivo}) ² /(2×PS _{passive,vivo} +PS _{P-gp,vivo})
PS _{P-gp,vivo}	39	(PS _{brain to blood} /PS _{blood to brain} -1)×PS _{passive,vivo}	
in vitro	LLC-GA5-COL150 P _{app}		
	(× 10 ⁻⁶ cm/s)		
Verapamil	P _{app} A to B (+GF-120918)	55.0	
	P _{app} B to A (+GF-120918)	49.2	
	P _{app} A to B	11.8	
	P _{app} B to A	85.3	
	Flux ratio	7.22	P _{app} B to A/P _{app} A to B
	PS _{passive,vitro}	104	[mean of P _{app} A to B (+GF-120918) and P _{app} B to A (+GF-120918)] ×2
	PS _{P-gp, vitro}	648	([Flux ratio]-1) ×PS _{passive,vitro}

Bepotastine	$P_{app\ A\ to\ B\ (+GF-120918)}$	2.17	
	$P_{app\ B\ to\ A\ (+GF-120918)}$	2.15	
	$P_{app\ A\ to\ B}$	1.33	
	$P_{app\ B\ to\ A}$	3.38	
	Flux ratio	2.54	$P_{app\ B\ to\ A}/P_{app\ A\ to\ B}$
	$PS_{passive,\ vitro}$	4.32	$[\text{mean of } P_{app\ A\ to\ B\ (+GF-120918)} \text{ and } P_{app\ B\ to\ A\ (+GF-120918)}] \times 2$
	$PS_{P-gp,\ vitro}$	6.66	$([\text{Flux ratio}]-1) \times PS_{passive,\ vitro}$
	Ratio of $PS_{passive,\ vitro}$	24.1	$PS_{passive,\ vitro}(\text{verapamil})/PS_{passive,\ vitro}(\text{bepotastine})$
	Ratio of $PS_{P-gp,\ vitro}$	97.3	$PS_{P-gp,\ vitro}(\text{verapamil})/PS_{P-gp,\ vitro}(\text{bepotastine})$
Olopatadine	$P_{app\ A\ to\ B\ (+GF120918)}$	2.16	
	$P_{app\ B\ to\ A\ (+GF120918)}$	2.38	
	$P_{app\ A\ to\ B}$	1.50	
	$P_{app\ B\ to\ A}$	4.03	
	Flux ratio	2.69	$P_{app\ B\ to\ A}/P_{app\ A\ to\ B}$
	$PS_{passive,\ vitro}$	4.54	$[\text{mean of } P_{app\ A\ to\ B\ (+GF-120918)} \text{ and } P_{app\ B\ to\ A\ (+GF-120918)}] \times 2$
	$PS_{P-gp,\ vitro}$	7.66	$([\text{Flux ratio}]-1) \times PS_{passive,\ vitro}$
	Ratio of $PS_{passive,\ vitro}$	22.9	$PS_{passive,\ vitro}(\text{verapamil})/PS_{passive,\ vitro}(\text{olopatadine})$
	Ratio of $PS_{P-gp,\ vitro}$	84.6	$PS_{P-gp,\ vitro}(\text{verapamil})/PS_{P-gp,\ vitro}(\text{olopatadine})$
Predicted in vivo	k (1/min)		
Bepotastine	$PS_{passive,\ vivo}$	0.20	$PS_{passive,\ vivo}(\text{verapamil})/[\text{Ratio of } PS_{passive,\ vitro}(\text{bepotastine})]$
	$PS_{P-gp,\ vivo}$	0.40	$PS_{P-gp,\ vivo}(\text{verapamil})/[\text{Ratio of } PS_{P-gp,\ vitro}(\text{bepotastine})]$
	$PS_{blood\ to\ brain}$	0.048	$(PS_{passive,\ vivo})^2/(2 \times PS_{passive,\ vivo} + PS_{P-gp,\ vivo})$
	$PS_{brain\ to\ blood}$	0.15	$PS_{passive,\ vivo} \times (PS_{passive,\ vivo} + PS_{P-gp,\ vivo}) / (2 \times PS_{passive,\ vivo} + PS_{P-gp,\ vivo})$
	$PS_{brain\ to\ blood}/PS_{blood\ to\ brain}$	3.0	
Olopatadine	$PS_{passive,\ vivo}$	0.21	$PS_{passive,\ vivo}(\text{verapamil})/[\text{Ratio of } PS_{passive,\ vitro}(\text{olopatadine})]$
	$PS_{P-gp,\ vivo}$	0.46	$PS_{P-gp,\ vivo}(\text{verapamil})/[\text{Ratio of } PS_{P-gp,\ vitro}(\text{olopatadine})]$
	$PS_{blood\ to\ brain}$	0.049	$(PS_{passive,\ vivo})^2/(2 \times PS_{passive,\ vivo} + PS_{P-gp,\ vivo})$
	$PS_{brain\ to\ blood}$	0.16	$PS_{passive,\ vivo} \times (PS_{passive,\ vivo} + PS_{P-gp,\ vivo}) / (2 \times PS_{passive,\ vivo} + PS_{P-gp,\ vivo})$
	$PS_{brain\ to\ blood}/PS_{blood\ to\ brain}$	3.2	

Calculation was carried out in accordance with the described order.

Equations were referred from Adachi et al⁶⁴ assuming passive permeability is the same value.

LLC-GA5-COL150 P_{app} is from Table 3- 7.

6 感度分析

Diphenhydramine 及び ketotifen について、 f_{br} の値を $f_{u,brain slice}$ から $f_{u,brain homogenate}$ や $f_{u,brain silico}$ に変更したところ、初期の時間では明らかな RO の過大評価が、後期には過小評価が認められた(Fig. 3- 6A 及び B)。一方, bepotastine 及び olopatadine では影響が認められなかった(Fig. 3- 6C 及び D)。

全ての被験物質について、PS の値を初期値から 10 倍大きくしたところ、RO の予測には影響を及ぼさなかった(Fig. 3- 6)。逆に PS の値を初期値から 10 倍低くしたところ、diphenhydramine, ketotifen, 及び bepotastine については反応の遅延が認められ、oloapatadine では認められなかった。

Diphenhydramine 及び ketotifen について、 PS_{eff} は一定にして、血液から脳方向の透過クリアランス(PS_{inf})と脳から血液方向の透過クリアランス(PS_{eff})の比の値(PS_{inf} / PS_{eff})として、サルのマウロダイアリスで評価した $K_{p,uu}$ からマウスの値に変更した場合、中枢における RO の持続が延長した(Fig. 3- 6A 及び B)。 PS_{inf} 及び PS_{eff} が一定であると仮定した場合 diphenhydramine の RO にはほとんど影響しなかったが、ketotifen の RO の持続は減少した。

Bepotastine 及び olopatadine について、 PS_{inf} は一定にして、 PS_{inf} と PS_{eff} の比の値として、P-gp KO マウスにおける血漿中脳内濃度比 (K_p)と正常マウス K_p の比の逆数から、マウスマウロダイアリスで評価した $K_{p,uu}$ に変更した(Fig. 3- 6C 及び D)。Bepotastine の $K_{p,uu}$ (0.124)は P-gp KO マウスの K_p 比の逆数($1/2.9 = 0.345$)よりも小さいため⁵²、計算した RO は低くなった。一方 olopatadine の場合は $K_{p,uu}$ (0.157)が P-gp KO マウスの K_p 比の逆数($1/5.3 = 0.189$)と同程度であるため⁵³、RO に対する影響は無視できる程度であった。

Bepotastine の *in vitro* 経細胞輸送のデータから RAF メソッドにより予測したヒト BBB における PS_{inf} 及び PS_{eff} の比 (3.0)は P-gp KO マウスにおける脳の K_p 比 (2.9)と同程度だった(Table 3- 8)。しかしながら、oloapatadine では RAF により予測した PS_{inf} 及び PS_{eff} の比 (3.2)が P-gp KO マウスの K_p 比 (5.3)より小さいことから、RO の持続が少し長くなった(Fig. 3- 6D)。

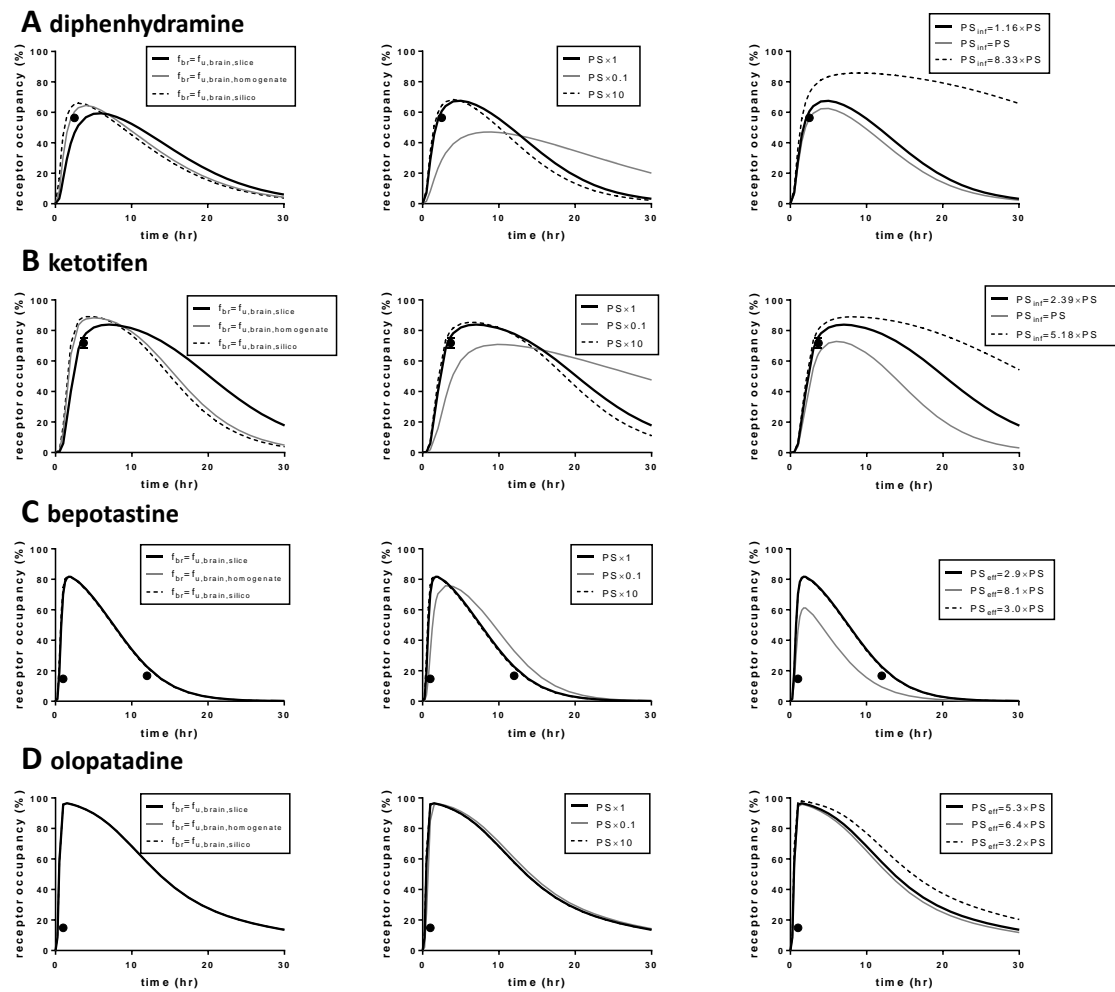


Fig. 3- 6 Sensitivity analysis of RO estimation

The effect of the unbound fraction in the brain (f_{br}), passive permeability across the blood–brain barrier (PS), and PS_{inf} or PS_{eff} on the estimation of RO in human brain after the administration of 30 mg diphenhydramine (A), 1 mg ketotifen (B), 10 mg bepotastine (C), or 5 mg olopatadine (D). (Left panel) The f_{br} values differed between $f_{u,brain\ slice}$ (data obtained in the *in vitro* mouse brain slice study, black solid line), $f_{u,brain\ homogenate}$ (data obtained in the *in vitro* mouse brain homogenate study, gray solid line), and $f_{u,brain\ silico}$ (*in silico* estimation, dotted line). (Middle panel) The PS values were changed to their one-tenth (gray solid line) or ten times (dashed line), keeping the $PS_{inf}:PS_{eff}$ ratio constant. (Right panel of A and B) The PS_{inf} values changed (without changing the value of $PS_{eff} = PS$) from $PS_{inf} = K_{p,uu}$ in monkeys $\times PS$ (black solid line) to $PS_{inf} = PS$ (gray solid line) or $PS_{inf} = K_{p,uu}$ in mice $\times PS$ (dashed line). (Right panel of C and D) The PS_{eff} values changed (without changing the value of $PS_{inf} = PS$) from $PS_{eff} = K_p$ brain ratio in the P-gp KO mice $\times PS$ (black solid line) to $PS_{eff} = PS/K_{p,uu}$ in mice (gray solid line) or $PS_{eff} =$ calculated permeability ratio across the BBB *in vivo* described in Table 3- 8 $[PS_{brain-to-blood}/PS_{blood-to-brain}] \times PS$ (dashed line). ●, the observed RO \pm S.E.M in the PET study^{49,50,51}.

7 Bepotastine のパラメータ最適化検討

Bepotastine の投与後 1 時間で得られた RO に合うように k_{on} の値を 20 分の 1 または k_{off} の値を 20 倍にしたところ、12 時間後の RO はそれぞれ 1.5, 1.3% と予測され、実測値(17%) を説明できなかった(Fig. 3- 7)。

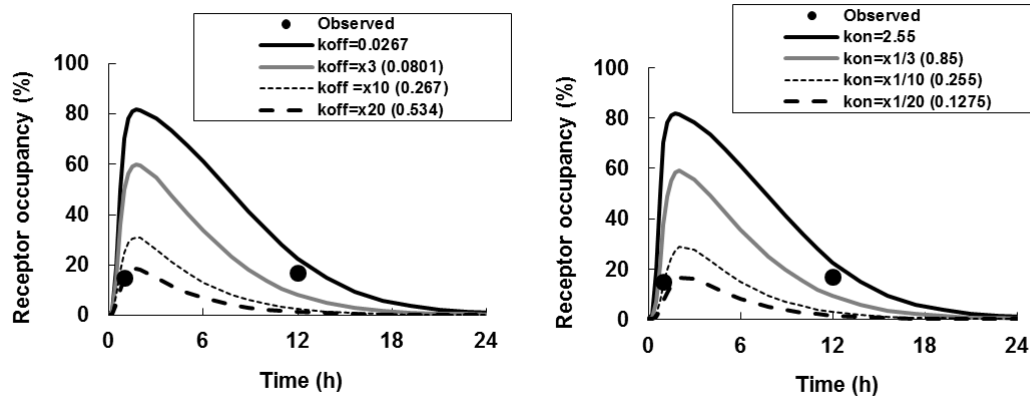


Fig. 3- 7 Parameter optimization for bepotastine

The effect of the k_{off} and k_{on} on the estimation of RO in human brain after the administration of 10 mg bepotastine. (Left panel) The k_{off} value was changed at initial value 0.0267/min, to its three times, ten times, and twenty times. (Right panel) The k_{on} value was changed at initial value 2.56mL/nmol/min, to its one-third, one-tenth, and one-twentieth. ●, the observed RO \pm S.E.M in the PET study.^{50,51}

8 Olopatadine を反復投与後の RO 予測

本モデルを用いて olopatadine (5 mg) 1 日 2 回反復投与後の RO を予測したところ、報告されている 1 日目と 4 週間目の RO^{49,65}をほぼ再現することができた(Fig. 3- 8)。

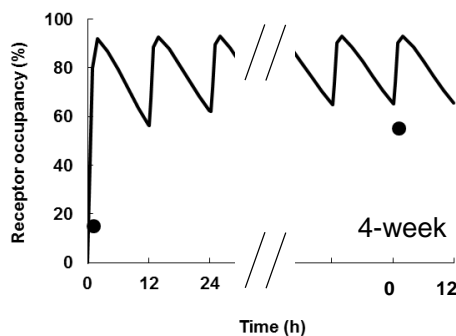


Fig. 3- 8 Simulation of the RO in the brain after repeated administration of 5 mg olopatadine bid for 4 weeks.

Estimated RO in human brain following an oral administration of olopatadine (5 mg, bid) was shown. Estimations were performed as described in the 第五章 16. ●, the observed RO \pm S.E.M in the PET study.^{49,65}

9 Ketotifen グルクロン酸抱合体による結合試験

Uridine diphosphate-glucuronic acid (UDPGA)存在下及び非存在下において, ketotifen (1 μM) をヒト肝ミクロソーム (1 mg/mL)とインキュベーションした反応液の上清を用いて結合試験を実施した。添加 ketotifen 濃度として終濃度が 1 nM の UDPGA 存在下の反応液上清を用いた場合, $[^3\text{H}]$ mepyramine の H1 受容体への結合は非存在下と比較して 40%増加した(Fig. 3- 9A)。ヒト肝ミクロソームとのインキュベーションにより ketotifen 濃度は 52%減少しており, UDPGA 存在下及び非存在下における残存 ketotifen 濃度を横軸にプロットしたところ, 結合曲線はほぼ一致した(Fig. 3- 9B)。これらのことから $[^3\text{H}]$ mepyramine の H1 受容体への結合には未変化体の ketotifen が影響を及ぼし, ketotifen グルクロン酸抱合体は H1 受容体に対する結合能を示さないと考えられた。

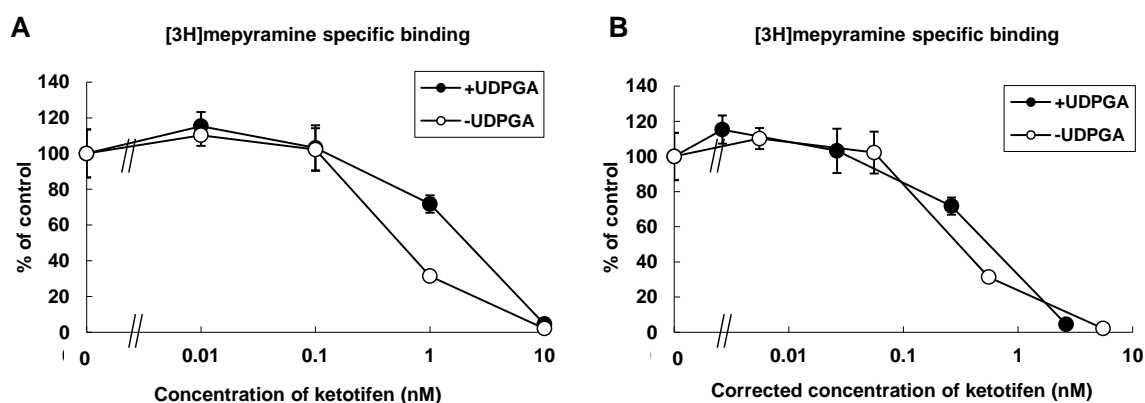


Fig. 3- 9 Competitive inhibition of $[^3\text{H}]$ Mepyramine (3 nM) binding to human H1 receptor with ketotifen-glucuronide

$[^3\text{H}]$ Mepyramine (3 nM) binding to the human H1 receptor (25 $\mu\text{g}/\text{assay}$) was determined at 37°C for 2 h in the presence or absence of ketotifen; ketotifen was incubated with human liver microsome, \circ , in the absence of UDPGA; in the presence of UDPGA. The concentration of ketotifen were based on the (A), before incubation (added concentration); (B), after incubation (remained concentration). Binding experiments and data analysis were performed as described in 第五章 3 and 10. Each symbol represents the mean \pm S.E.M ($n = 3$).

考察

中枢神経系にある標的タンパク質に対する RO は、薬物の薬効発現のバイオマーカーとなる。さらに、RO 推移の正確な予測は、医薬品開発にとって、①非臨床段階から臨床段階への橋渡しのため、②候補化合物を選択するため、③臨床試験のデザイン設計のため、④臨床試験における DDI の影響を予測するため、に大変重要な課題である。第三章 では、鎮静性および非鎮静性の抗ヒスタミン薬を用い、非臨床データを基に臨床投与量単回経口投与後の RO 推移を予測した。

H1 受容体に対する K_i 値は、競合阻害試験及び k_{off}/k_{on} の 2 種類の方法で評価した。阻害試験は解離の半減期を考慮に入れて実施したため、bepotastine 及び olopatadine では 2 種類の方法で同様な K_i 値が得られたものの、ketotifen では競合試験の K_i 値よりも k_{off}/k_{on} のほうが若干低い値となった。既報の K_i 値と比較すると、ヒト H1 受容体発現細胞膜において ^3H mepyramine をリガンドに用いた際 diphenhydramine では 9.57⁶⁶ 及び 13.5 nM⁶⁷であり、モルモット脳において ^3H mepyramine をリガンドに用いた際 ketotifen では 0.31–1.26 nM⁶⁸, bepotastine では 34 nM⁶⁹であったことから、本検討において評価した値と矛盾がなかった。一方、olopatadine の K_i 値には 20 倍の差(32 nM⁷⁰に対し本検討では 1.62 nM)があり、モルモットとヒトにおける種差の可能性が考えられた。これら化合物の間で diphenhydramine による ^3H mepyramine の H1 受容体への結合阻害は瞬時に定常状態に達した(Fig. 3- 1D)ため、以降の解析には瞬時平衡を仮定した。

本検討ではリガンドとして ^3H mepyramine を用いたが、臨床 PET 試験においては H1 受容体リガンドとして ^{14}C doxepin が用いられている。三環系抗うつ薬は、ラット脳組織において ^3H mepyramine の結合よりも ^3H doxepin の結合に対し 10 倍以上の強い競合活性を持つが⁷¹, 少なくとも本検討に用いた抗ヒスタミン薬は ^3H doxepin (Table 3- 2) 及び ^3H mepyramine (Table 3- 1) 結合に対して同様の阻害活性を有していた。従って、本シミュレーションではリガンドの依存性は考慮しなかった。

BBB を介した能動輸送は $C_{u,brain} : C_{u,plasma}$ 比を変化させるため、基質となる薬物の中枢での薬効に影響を及ぼす。既報のラットの結果⁵⁵と同様に、マウスにおいても diphenhydramine の C_{ISF} は $C_{u,plasma}$ よりも高かった(Fig. 3- 2A)。マウスにおいて ketotifen の C_{ISF} も $C_{u,plasma}$ より高いものの、

bepotastine 及び olopatadine の C_{ISF} は $C_{u,plasma}$ よりも低かった。特にマイクロダイアリス試験では diphenhydramine 及び ketotifen の $C_{ISF} : C_{u,plasma}$ 比にマウスとサルの間で種差があることが示唆された。サルでは、diphenhydramine の C_{ISF} は $C_{u,plasma}$ と同程度であり、ketotifen の C_{ISF} は $C_{u,plasma}$ より若干高いままであった (Fig. 3- 2B)。この比は非結合形濃度に基づいて定義されているため、この種差は BBB に存在する仮説のカチオン性薬物トランスポーター⁵⁴の基質特異性による可能性も考えられる。RO の予測では、diphenhydramine 及び ketotifen の $PS_{inf} : PS_{eff}$ 比としてサルマイクロダイアリスデータを用いたが、bepotastine 及び olopatadine では正常マウスと P-gp KO マウス間の $K_{p,brain}$ 比を用いた。

抗ヒスタミン薬を投与後の RO 予測は C_{blood} 時間推移及び非臨床での取得データを用いて実施した (Fig. 3- 3)。予測した RO は、少なくとも報告されている時点付近ではよく合っていたが、予想に反して bepotastine 及び olopatadine による RO は血漿中濃度が T_{max} に達したところで最高値に達しなかった。予測された RO の最高値は鎮静性の抗ヒスタミン薬で認められた値に近かったが、bepotastine 及び olopatadine による RO は BBB を介した排泄クリアランスの大きさ ($f_{u,brain,slice} \times PS_{eff}$) と脳内の分布容積の小ささのため、diphenhydramine や ketotifen よりも速く減衰した。既報では bepotastine の C_{blood} が最高値に達する時間は 1-3 時間の間であった⁵⁹。PET 試験は T_{max} (すなわち bepotastine 及び olopatadine 投与 1-2 時間後) に [¹¹C]doxepin を投与した 70-85 分後に行っている^{49,50}。この期間中 RO は時間と共に増加すると予測され、RO の過小評価を引き起こす可能性がある。さらに、olopatadine による RO はその RO 結合からの解離に関する半減期が長いいため、 T_{max} の後においても時間と共に増加し続けると予想された。5 mg の olopatadine を 1 日 2 回反復投与した被験者において、1 日目と 4 週間目の投与後 75 分の RO を本シミュレーションでほぼ再現することができた (Fig. 3- 8) ことから、olopatadine による RO の最高値は 15% 以上であるという結論が裏付けられた。本研究における *in vitro* 試験において、bepotastine 及び olopatadine の K_i (k_{off}/k_{on}) 値を過小評価した可能性もある。しかしながら、bepotastine では投与後 1 時間で得られた RO に合うように K_i 値を増加させると、12 時間後の RO を説明できなかった (Fig. 3- 7)。その他に考えられる原因は、これらの化合物がヒト BBB においてマウス BBB よりも効率的に排泄されているという可能性である。

Diphenhydramine の眠気の発生確率(35%⁷²)は他の抗ヒスタミン薬の値(4.4%–7.0%^{73,74,75})よりも高い。Tashiro らは diphenhydramine 及び bepotastine の投与後、眠気を line analogue rating scale という方法を用いて評価したところ⁵⁰、diphenhydramine 投与 120–180 分後ではプラセボと比較して眠気は有意に増加したが、bepotastine 投与後では有意な増加は認められなかった⁵⁰。血漿の T_{max} で得られた RO (diphenhydramine, 56%; ketotifen, 72%; bepotastine, 15%; olopatadine, 15%) または予測した $RO > 50\%$ となる持続時間(diphenhydramine 50 mg, 12 h; ketotifen, 16 h; bepotastine, 5 h; olopatadine, 13 h)は、抗ヒスタミン薬による鎮静効果の良い測定基準にならない可能性がある。この RO 予測の正当性を立証するには、さらなる臨床試験が望まれる。

RO 予測における各パラメータの影響を評価するため、感度分析を行った(Fig. 3- 6)。 f_{br} として $f_{u,brain,homogenate}$ または $f_{u,brain,silico}$ を用いた場合、RO の中枢での持続は diphenhydramine 及び ketotifen で短くなったものの、bepotastine 及び olopatadine では変わらなかった。細胞内の pH が低いため、diphenhydramine 及び ketotifen といった塩基性化合物は細胞内にトラップされ²⁰、結果として $f_{u,brain,homogenate}$ や $f_{u,brain,silico}$ と比較して $f_{u,brain,slice}$ では低い f_{br} の値となっていると考えられる。 $PS_{inf} : PS_{eff}$ 比を一定にして受動輸送クリアランスを 10 分の 1 にした場合、diphenhydramine 及び ketotifen では RO の最高値が減少するとともに RO 推移が遅くなった。これらのパラメータ推移の精度が diphenhydramine 及び ketotifen の RO の持続に影響すると考えられる。

Diphenhydramine 及び ketotifen では RO に対する能動的な取り込みの影響も評価した(Fig. 3- 6)。マウスのマイクロダイアリシスデータを用いた場合 diphenhydramine による RO の持続は延長したものの、 PS_{inf} を PS_{eff} と等しくした場合には顕著な影響はなかった(Fig. 3- 6A)。シミュレーションデータを考慮すると、サルマイクロダイアリシスのデータが diphenhydramine による RO に適していると考えられ(Fig. 3- 3)、ヒト BBB においては能動的な取り込みの寄与が無視できるかまたは低いと考えられた。Ketotifen による血漿 T_{max} での予測 RO は能動的な取り込みがない場合やマウスマイクロダイアリシスのデータを用いた場合でも影響がなかったが、RO の持続は顕著に短縮または延長した(Fig. 3- 6B)。Ketotifen でヒト BBB を介した能動的な取り込みの重要性を結論付けるためには、投与後 12 h またはそれよりの後の RO の評価が望まれる。

RO 予測の際、bepotastine や olopatadine の BBB を介した能動的な排泄クリアランスはマウスの

P-gp KO データを基に予測した値を暫定的に用いた (Fig. 3- 3)。マウスマイクロダイアリスのデータから予測した bepotastine の $PS_{eff} : PS_{inf}$ 比は P-gp KO マウスにおける $K_{p,brain}$ 比から予測した値よりも 2.8 倍大きく、その結果 RO を低く予測した (Fig. 3- 6C)。一方、olopatadine の比は試験方法に関係なく同程度であった (Fig. 3- 6D)。BBB における P-gp タンパクの発現はマウスと比較してヒトで低いため^{76,77}、試験方法以外にも、P-gp を介したクリアランスに関する種差についても議論すべきである。この問題を解決するため、PET イメージングデータの速度論解析で得られた [¹⁴C]verapamil の排泄速度定数⁶² が P-gp 活性に相関していると仮定し、RAF メソッドにより verapamil をリファレンスとしてヒト P-gp による bepotastine 及び olopatadine の排泄能を *in vitro* から *in vivo* へ外挿した (Table 3- 8)。RAF を基にした bepotastine の $PS_{eff} : PS_{inf}$ 比は P-gp KO マウスにおける $K_{p,brain}$ 比と同程度であった (Fig. 3- 6C)。一方、RAF を基にした olopatadine の $PS_{eff} : PS_{inf}$ 比は P-gp KO マウスにおける $K_{p,brain}$ 比やマイクロダイアリスの解析で得られた値よりも低かった。この結果は種差の存在を示唆しており、RAF を基にした値は olopatadine の RO 持続を若干延長させた (Fig. 3- 6D)。投与後 3-5 時間付近の RO 評価をすることにより bepotastine や olopatadine のヒト P-gp 能を予測することに役立つと考えられる。

ヒト血漿において、ketotifen のグルクロン酸抱合体の AUC は ketotifen よりも 6 倍程度大きい⁵⁸。グルクロン酸抱合体が薬効を持つこともあるため、ketotifen グルクロン酸抱合体の H1 受容体に対する影響を評価した。UDPGA 存在下及び非存在下、ketotifen をヒト肝ミクロソームインキュベーションした反応液の上清を用いて結合試験を実施したところ、[³H]mepyramine の H1 受容体への結合は補酵素存在下でのインキュベーションによる ketotifen 濃度の減少に伴い増加したことから、ketotifen グルクロン酸抱合体は H1 受容体に対する結合能を示さないと考えられた (Fig. 3- 9)。従って ketotifen の RO 予測の際には代謝物を考慮に入れる必要はないと考えられた。

第二章 では、D2 受容体について非臨床データや PET 試験での投与量における C_{blood} 時間推移を統合することで、ヒト中枢における RO 時間推移を予測することが可能であると示してきた。第三章 のモデルやパラメータでは BBB における能動的な取り込みや排泄が関与するような複雑な PK の場合でもヒト中枢における RO の値を予測することができた。PET 試験の前にモデリング&シミュレーションを実施することは、臨床 PET 試験の設計時に薬物の中枢作用に関連する

測定基準を提供することにも役立つ。単回・連投後の薬物の中枢作用について PK と PD の関係を深く理解することにもつながる。さらに、一度モデルが確立されれば、PK の変化が PD に及ぼす影響や他の中枢標的タンパク質への影響を予測する手助けにもなると考えられる。

第四章 結語

一般に、中枢薬はアンメット・メディカル・ニーズが高いものの、開発は困難であると言われている。その理由の一つとして、血中の非結合形薬物濃度は必ずしも薬物の中枢における薬効の指標とはならず、容易に薬効の予測ができないことが挙げられる。本研究では薬効または副作用の指標として、PBPK モデルを用いたボトムアップアプローチにより、ターゲットの占有率(RO)の時間推移の予測を行った。この方法は、有効性が期待できる化合物の選別、第 I 相試験のデザインにも貢献するものと期待される。このような予測が受け入れられるため、かつその課題を見出すためには具体例に基づいた、予測と実測値との比較検証が不可欠である。そこで、本論文では、D2 受容体拮抗薬（薬効）、H1 受容体拮抗薬（有害事象に関連）に注目した。

第二章では、ドパミン D2 受容体拮抗薬である *quetiapine* と *perospiron* をモデル化合物とした。*in vitro*, *in silico*, *in vivo* パラメータを統合することにより臨床用量の D2 拮抗薬を投与後の脳内 D2 受容体に対する RO を予測することができた。*Perospirone* は *quetiapine* と比較して血漿中濃度の半減期が速いにもかかわらず、RO の持続が長い原因は、脳からの消失が遅いためであることが示唆された。*Perospirone* の代謝物である ID-15036 も RO に関与すると考えられたが、RO の持続には関与しないと予想された。また、*quetiapine* の他の相互作用受容体に対しても、別試験で行われた臨床研究の結果を説明可能であることを示した。

第三章では、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬である *diphenhydramine*, *ketotifen*, *bepotastine* 及び *olopatadine* をモデル化合物とした。BBB を介した能動輸送についても考慮することで、より正確な予測が可能であることが判明した。また投与後何時間の PET を評価すれば、副作用と RO の関係やヒトにおける能動輸送の影響について推察が可能であるか、について予め予測することができ、PET 試験実施前に合理的な試験計画を立案することにも役立つと考えられた。血液脳関門における能動輸送については、マウスとサルとの種差も見つかり、ヒトへの外挿するデータにも注意を払うべきである。

PK/PD パラメータに関する非臨床データや一部臨床データを統合することで、臨床投与量における D2 拮抗薬や抗ヒスタミン薬の、臨床で得られた RO を合理的に説明可能であることを実

証することができた。RO の持続には k_{off} の半減期や脳内からの半減期 $[1/(f_{br} \times PS_{eff})]$ が関わり、これらの半減期が長い場合には血漿中濃度半減期と比較して RO が持続すると考えられた。血液脳関門で能動輸送を受ける薬物の場合には、予測精度の改善のための複数の時点での RO 測定など、臨床データのさらなる収集が必要である。

本取り組みは、医薬品開発のための臨床試験デザイン、オンターゲット及びオフターゲット作用の予測、臨床における薬物間相互作用が中枢作用に及ぼす影響の予測にも役立つと考えられる。

第五章 実験の部

1 化合物・血清・酵素・細胞等

[Methoxy-³H]raclopride (76 Ci/mmol), [Pyridinyl-5-³H]pyrilamine [(³H)mepyramine, 20 Ci/mmol], [¹⁴C]carboxyl-inulin (2 mCi/g), 及び human Histamine H1 receptor は PerkinElmer, Inc. (Boston, MA) から購入した。Doxepin hydrochloride, [N-methyl-³H] [(³H)doxepin, 80 Ci/mmol] は室町薬品から購入した。Bepotastine は田辺三菱製薬から提供を受けた。ID-15036 (hydroxyperospirone) は大塚製薬株式会社 (Tokyo, Japan) で合成した。プールドヒト血清, raclopride, butaclamol, diphenhydramine hydrochloride, cetirizine, antipyrine, colchicine, verapamil, Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid trisodium salt (UDPGA), β -glucuronidase TypeH-2 from *Helix pomatia*, Medium 199 及び phosphate-buffered saline (PBS) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。ヒト肝マイクロソーム (50 ドナープール, gibco) 及び Hank's balanced salt solution (HBSS) は Life technologies (Carlsbad, CA) から, 雄サルプールド血清は Hamri Co., Ltd. (Ibaraki, Japan) から購入した。ブタ腎上皮細胞由来 LLC-PK1 細胞は JCRB 細胞バンク (医薬基盤・健康・栄養研究所 (Osaka, Japan) から, ヒト P-gp 発現 LLC-PK1 細胞である LLC-GA5-COL150 細胞は, 文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して, 理化学研究所バイオリソースセンター (Ibaraki, Japan) から提供された。Perospirone, 及び ketotifen は和光純薬工業 (Osaka, Japan) から, quetiapine は LKT Laboratories, Inc. (St Paul, MN) から, olopatadine は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から, fetal bovine serum (FBS) は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から, human dopamine D2L receptor-expressing cell membrane (HTS039M ChemiscreenTM) は Millipore Corp. (Bedford, MA) から, それぞれ購入した。その他の試薬は全て市販の特級を用いた。

2 動物

雄 *ICR* マウス (体重 30–43g) は Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan) から購入し, 少なくとも 7 日間飼育した後に, 雄 *ddY* マウス (8–9 週令) は日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) から購入し, 少なくとも 4 日間飼育した後に試験に用いた。飼育は明暗周期下自

由摂餌・摂水の標準的な条件下で行った。動物試験は東京大学動物管理委員会(Tokyo, Japan)によるガイドラインに従って実施した。マウスを用いたマイクロダイアリシス試験は「大塚製薬株式会社 動物実験指針」(Tokushima, Japan).に従った。

サルを用いたマイクロダイアリシス試験の手順は株式会社トランスジェニック(Kumamoto, Japan)及びエーザイ株式会社(Ibaraki, Japan)における実験動物委員会に承認を受けた。本試験には雄のカニクイザル 8 匹(4-7 歳 3.6-5.1 kg)を用いた。全ての手術及び処置は株式会社トランスジェニックの獣医が実施し、手術前後及び手術中の状態は獣医が厳密に監視した。苦痛を最小限にするよう努めた。

3 膜調製及び結合試験

HEK293 細胞への一過性のヒト H1 受容体(D28481.1)発現は pcDNA3.1(+) (Life Technologies)及び FuGENE HD (Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany)を用いてメーカーの手順書に従い実施した。膜面分は 4°C で既報に従い調製した⁷⁸。

ドパミン D2 受容体及びヒスタミン H1 受容体に対する結合試験は既述の方法で実施した⁷⁹。D2 受容体の場合は発現膜(タンパク量 5 µg)を 0.2 mL の 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4) 中、^[3H]raclopride (0.2-20 nM または 2 nM)と各濃度の非標識の D2 拮抗薬とともに 37°Cで 1-2 時間インキュベーションした。非特異的結合は butaclamol (10 µM)共存下で評価した。H1 受容体の場合は発現膜(タンパク量 25-50 µg, 購入した human Histamine H1 receptor は 5 µg)を 0.5 mL の 50 mM Na₂K phosphate 緩衝液 (pH 7.4) 中、^[3H]mepyramine (0.3-30 nM または 3 nM)または^[3H]doxepine (0.02-20 nM または 0.1 nM)と各濃度の非標識の抗ヒスタミン薬とともに 37°Cで 2-3 時間インキュベーションした。購入した human Histamine H1 receptor はリガンドの違いによる検討にのみ用い、RO の予測には、調製した膜を用いて得られたデータを使用した。非特異的結合は cetirizine (10 µM) 共存下で評価した。Perospirone 及び ID-15036 は結合試験時の回収率を上げるため、0.1% bovine serum albumin (BSA)存在下で実施した。

その後反応混液を迅速にガラス繊維ろ紙(24 mm, GF/C; Whatman, Clifton, NJ)に添加し、氷冷した 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (D2)または Na₂/K phosphate 緩衝液 (H1) で 2 回洗浄した。放射活性は

液体シンチレーションカウンター(LSC-6101, Aloka Co, Ltd, Tokyo, Japan または LS 6000SE; Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA)で測定した。

K_d (結合親和性), B_{max} (最大結合量)及び K_i (阻害定数)は反復非線形最小二乗法を用いアルゴリズムを Damping-Gauss-Newton として MULTI⁸⁰にて次の式に従い算出した。

$$C_b = B_{max} \times C_f / (K_d + C_f),$$

$$\% \text{ of control} = (K_d + C_f) \times 100 / (K_d \times (1 + I/K_i) + C_f)$$

ここで C_b は D2 または H1 受容体特異的なリガンド ($[^3H]$ raclopride, $[^3H]$ mepyramine, または $[^3H]$ doxepine) 特異的結合濃度, C_f はリガンドの非結合形濃度, I は非標識の被験物質濃度である。

受容体に対する結合及び解離速度定数(k_{on} 及び k_{off})は既報に従い評価した⁷⁹。 k_{off} を評価する際は、発現膜をリガンド ($[^3H]$ raclopride (2 nM)または $[^3H]$ mepyramine (3 nM)) と 30 分間インキュベーション後, butaclamol (10 μ M)または cetirizine (10 μ M)を添加することでリガンドを解離させた。 k_{on} 及び B_{max} はさらに非結合形及び結合型のリガンド濃度時間推移に当てはめて算出した。非標識体の被験物質の k_{on} 及び k_{off} を求める際は、定常状態におけるリガンド結合が 80%程度になる濃度の被験物質存在下でリガンドの結合反応時間推移を評価した。データは Motulsky 及び Mahan¹⁰の提唱したモデルに従い PhoenixTM WinNonlin[®] version 6.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA)を用いて解析した。微分方程式は第五章 19 に示した。

4 血清、血漿および脳ホモジネート中非結合形分率の評価

被験物質のプールドヒト血清, サル血清, マウス血漿およびマウス大脳ホモジネート, 0.1% BSA に対する非結合形分率を平衡透析法により評価した。平衡透析装置及び透析膜は High Throughput Dialysis Model HTD96b 及び Dialysis Membrane Strips MWCO 12–14kDa を HTDialysis, LLC (Gales Ferry, CT)から, rapid equilibrium dialysis (RED) を Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)から購入した。マウス大脳は 0.067 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4)を用いてホモジナイズし 1%, 3% 及び 5% (または 8%, 16%及び 24%)ホモジネートを調製した。BSA は 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)に溶解させた。血清, 血漿, 脳ホモジネートまたは 0.1%BSA に被験物質(1–10000 nM)を添加し, 150 μ l (HTD)または 200 μ l (RED)を装置に充填して 150 μ l (HTD)または

350µl (RED)のコントロール緩衝液(血清および血漿: 0.1 M PBS; 脳: 0.067 M PBS;及び 0.1% BSA: 50 mM Tris-HCl 緩衝液) に対して 37°C で 5-6 時間透析を行った。非結合形分率(f_u)はレシーバー(コントロール緩衝液) 側濃度(C_f)のドナー(試料)側濃度(C_s)に対する比(C_f / C_s)で計算した。脳ホモジネートの非結合形分率 $f_{u,brain\ homogenate}$ の評価では, 結合型濃度($C_b = C_s - C_f$)を非結合形濃度(C_f)で除した値(C_b/C_f)に対してホモジネートの%をプロットし, Phoenix™ WinNonlin®を用いて 100%ホモジネートに補外した。全ての被験物質において濃度依存性がなかったため, 結果は各濃度の平均値で表した。

5 脳スライスを用いた非結合形分率評価

抗ヒスタミン薬の脳における分布容積($V_{d,brain}$)は *in vitro* 脳スライス取り込み試験により評価した。脳スライスは, *ddY* マウスを用いて既述の方法⁹により調製した。すなわち, 300 µm の厚さのスライスを, マイクロスライサー (DTK-2000, Dosaka EM, Kyoto, Japan)を用いて調製し, 95% O₂-5% CO₂ で平衡化させた酸素飽和 extracellular fluid (ECF)緩衝液で維持した。37°C 5 分間のプレインキュベーション後, 2 枚の脳スライスを抗ヒスタミン薬(1-3 µM)を含む酸素飽和 ECF に添加し, 1, 2, 及び 4 時間 37°C でインキュベーションした。脳スライスは回収し 2 倍量の PBS と共に超音波処理し, LC-MS/MS による測定を実施した。付着水の容量は別の試験で [¹⁴C]carboxyl-inulin (0.02 µCi/mL)を脳スライスと 1, 5, 及び 10 分間インキュベーションすることで算出した。inulin の取り込みを時間に対してプロットし, 直線回帰により y 切片を付着水とした。 $V_{d,brain}$ は脳スライスで評価した被験物質の総取り込み量から付着水の用量を差し引くことで算出した。脳スライスにおける脳内非結合形分率は $f_{u,brain\ slice} = 1/V_{d,brain}$ により算出した。

6 マウス脳における *in vivo* 非結合形分率評価

イソフルラン麻酔下, quetiapine, perospirone, 及び ID-15036 (5 µmol in 5 mL 1% dimethyl sulfoxide -saline/kg)を *ICR* マウスに静脈内瞬時投与した。血液は投与後 5,15,30 分, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 時間に, 大脳は 1, 3, 6, 8 時間に採取した。血漿は血液試料を 15,000 ×g で遠心することにより得た。大脳試料は 4 倍量の PBS でホモジナイズした。血液及び脳内濃度時間推移を用い, Fig.

2-3に記載したモデルで Phoenix™ WinNonlin®によりフィッティングし動態パラメータを得た。

7 血中濃度/血漿中濃度比 R_B 値の評価

ヒト新鮮全血は健常人男性ボランティア(n = 3)から採取し、抗ヒスタミン薬(終濃度 1 μM)を添加して室温で45分間インキュベーションした。その後血液を4°C, 1,800 \times g で15分間遠心して血漿を調製し、血漿中測定濃度及び血液中理論濃度から R_B 値を計算した。本試験のヒト血液の使用は大塚製薬株式会社研究倫理委員会に承認された。D2拮抗薬の R_B 値は ADMET Predictor で計算した(Table 2-3)。

8 P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送及び relative activity factor (RAF)法による予測

LLC-PK1 細胞及び LLC-GA5-COL150 細胞をそれぞれコントロール細胞及び P-gp 発現細胞として使用した。コントロール細胞の培地には 10% FBS 含有 Medium 199 を、P-gp 発現細胞の培地には 10% FBS 及び 150 ng/mL colchicine 含有 Medium 199 を使用した。Transwell プレート(0.4 μm pore size, 12 mm diameter; Corning, Corning, NY)の apical 側に細胞浮遊液を添加し (3.6×10^5 cells/cm²) 8日間培養した。試験前日に 10% FBS 含有 Medium 199 で培地交換し、試験当日膜抵抗値が 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上であることを確認した。輸送用緩衝液 (HBSS, 25 mmol/L glucose, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4) に被験物質(quetiapine, perospirone, bepotastine, 1 $\mu\text{mol/L}$; olopatadine, 10 $\mu\text{mol/L}$),及び基質(verapamil 0.2 または 1 $\mu\text{mol/L}$)を添加し、ドナー溶液とした。ドナー溶液と同じ有機溶媒含有率の輸送用緩衝液をレシーバー溶液とした。阻害の影響を評価する際はドナー及びレシーバー溶液ともに阻害薬 (GF-120918, 2 $\mu\text{mol/L}$) を添加した。Apical to basal (A to B) 及び basal to apical (B to A) 方向の透過試験を実施した。

輸送用緩衝液で洗浄した各ウェルにレシーバー溶液を添加し、30-60分間、37°C でプレインキュベーションした。レシーバー溶液を除去した後、apical 側及び basal 側にドナー溶液あるいはレシーバー溶液を添加し (透過開始), 37°C でインキュベーションした。ドナー側から溶液の一部を採取し、初期濃度測定用試料とした。所定時間経過後にレシーバー側から溶液の一部を採取し、各時点の透過量測定用試料とした後、レシーバー側にレシーバー溶液を補充し、引き続きイ

ンキュベーションした。最終時点でレシーバー側から溶液の一部を採取し（透過終了），最終時点の透過量測定用試料とした。apical 側から basal 側への透過係数を $P_{app A to B}$ ，逆方向への透過係数を $P_{app B to A}$ として，次の式により算出した。

$$P_{app A to B} \text{ 及び } P_{app B to A} \text{ (cm/second)} = dQ/dt \times l / (A \times C_0)$$

ここで dQ/dt は単位時間あたりの透過量 (nmol/second)， A は単層膜の表面積 (1.12 cm^2)， C_0 は初期濃度測定用試料の濃度 ($\mu\text{mol/L}$) である。なお， dQ/dt は透過量 (Q_1, Q_2, \dots, Q_k nmol, 但し k は時点数) を縦軸に，インキュベーション時間 (t_1, t_2, \dots, t_k second) を横軸にプロットした回帰直線の傾きより求めた。透過量は次の式により算出した。

$$Q_1 = C_1 \times V_r, \quad Q_2 = C_1 \times V_s + C_2 \times V_r, \quad Q_k = (C_1 + C_2 + \dots + C_{k-1}) \times V_s + C_k \times V_r$$

ここで C_1, C_2, \dots, C_k は各透過量測定用試料の濃度 ($\mu\text{mol/L}$)， V_r はレシーバー側の液量 (mL)， V_s は採取した液量 (mL) である。また 1 時点における透過係数(verapamil: 30 分, olopatadine, bepotastine: 120 分) を，以下の式により算出した。

$$P_{app A to B} \text{ 及び } P_{app B to A} \text{ (cm/second)} = Q_1 / (t_1 \times A \times C_0)$$

以下の式に従い，コントロール細胞及び P-gp 発現細胞における flux ratio，及び net flux ratio を算出した。

$$\text{Flux ratio} = P_{app B to A} / P_{app A to B}$$

$$\text{Net flux ratio} = \text{flux ratio of P-gp expressing cells} / \text{flux ratio of control cells}$$

Bepotastine 及び olopatadine については，P-gp 発現細胞における阻害剤存在下及び非存在下における $P_{app B to A}$ 及び $P_{app A to B}$ の値を用いて，PET イメージングデータの数値論解析で得られた [^{14}C]verapamil の排泄速度定数⁶² が P-gp 活性に相関していると仮定し，RAF メソッドにより verapamil をリファレンスとして，ヒト BBB の P-gp を介した排泄能を *in vitro* から *in vivo* へ外挿した。計算方法の詳細は(Table 3-7 及び Table 3-8)に示した。

9 マウス及びサルにおける *in vitro* 及び *in vivo* マイクロダイアリシス

マウス及びサルにおける脳マイクロダイアリシスは既報に従い実施した⁸¹。

1)マウスマイクロダイアリシス：プローブは D-I-4-2, shaft length: 4 mm, membrane length: 2

mm (Eicom, Kyoto, Japan)を用いた。

In vitro マイクロダイアリシス試験は antipyrine (500 μ M, リファレンス化合物), diphenhydramine (1 μ M), ketotifen (1 μ M), bepotastine (0.1 μ M), または olopatadine (0.1 μ M)を含む Krebs-Ringer phosphate 緩衝液で実施した。被験物質及びリファレンス化合物の *in vitro* 透過クリアランス(PA_{vitro}) は次の式により求めた

$$PA_{\text{vitro}} = -F \times \ln(1 - C_d/C_r)$$

ここで C_d 及び C_r はそれぞれ *in vitro* 試験における透析液及びリザーバー濃度, F は透析の流速 (1 μ L/min)である。antipyrine, diphenhydramine, ketotifen, bepotastine, 及び olopatadine の PA_{vitro} μ L/min はそれぞれ 0.301 ± 0.01 , 0.171 ± 0.013 , 0.257 ± 0.034 , 0.0798 ± 0.0058 , and 0.111 ± 0.005 であった。

In vivo マイクロダイアリシス試験は次のように実施した。プローブは *ddY* マウス大脳皮質 (lateral 1.1 mm, anterior 1.1 mm, depth 3 mm from the bregma)に挿入した。手術の翌日試験を実施し, マウスはイソフルランで麻酔した。プローブを 1-2 時間平衡化した後, 初回投与量(mg/kg) 及び維持用量(mg/h/kg)をそれぞれ antipyrine, 50 及び 58; diphenhydramine, 1 及び 1.2; ketotifen, 3 及び 3.4; bepotastine, 7 及び 3.1; olopatadine, 2.7 及び 3.4 として静脈内投与した。透析液は 15 分間隔で回収した。投与後 5, 30, 60, 及び 90 分に頸静脈から採血し 4°C , $20,400 \times g$ で 10 分遠心し血漿を得た。マウスは迅速に断頭し, 大脳を分析に用いた。

In vivo 透過クリアランス (PA_{vivo}) は次の式により求めた

$$PA_{\text{vivo}} = -F \times \ln(1 - C_d/C_{\text{ISF}})$$

ここで C_{ISF} は間質液(ISF)中濃度である。リファレンス化合物では血漿中非結合形濃度が C_{ISF} に等しいと仮定した。Effective dialysis coefficient ($R_{d,\text{ref}}$) を次のように定義した。

$$R_{d,\text{ref}} = PA_{\text{vivo}}/PA_{\text{vitro}}$$

Antipyrine の PA_{vivo} (μ L/min) は 0.0639 ± 0.0035 であり, *in vitro-in vivo* スケーリングファクター ($R_{d,\text{ref}}$) は 0.213 ± 0.01 と算出された。 $R_{d,\text{ref}}$ 値は化合物によらず一定と仮定し ($R_{d,\text{drug}} = R_{d,\text{ref}}$), 被験物質の C_{ISF} ($C_{\text{ISF},\text{drug}}$)を次のように計算した

$$C_{\text{ISF},\text{drug}} = C_d / [1 - \exp(-R_{d,\text{ref}} \times PA_{\text{vitro},\text{drug}}/F)]$$

投与後 75-90 分における透析液中の diphenhydramine, ketotifen, bepotastine,及び olopatadine の濃度

(C_d, nM)はそれぞれ 104 ± 10, 37.3 ± 5.1, 18.1 ± 2.6, 及び 32.5 ± 5.1 であった。

非結合形濃度基準の血漿中脳内濃度比(K_{p,uu})は次のように算出した

$$K_{p,uu} = C_{ISF}/(C_p \times f_u) = C_{ISF}/C_{u, plasma}$$

ここでC_p, f_u及びC_{u, plasma} はそれぞれ血漿中濃度, 非結合形分率, 及び血漿中非結合形濃度である。

2)サルマイクロダイアリシス：初回投与量(mg/kg) 及び維持用量 (mg/h/kg)はそれぞれ diphenhydramine, 0.55及び0.3; ketotifen, 2.6 及び1とした。Diphenhydramine及びketotifen のC_{ISF}は既報⁸²に従いC_dから算出した。Diphenhydramine及びketotifenの*in vitro*における損失回収率(recovery loss, RL_{vitro}), 増加回収率 (recovery gain, RG_{vitro}), 及び*in vivo* における損失回収率(RL_{vivo}) は それぞれ0.316 ± 0.018 及び0.248 ± 0.021, 0.317 ± 0.012及び0.254 ± 0.006, 0.114 ± 0.021及び0.195 ± 0.034, であった。プローブ回収率は次のように計算した

$$\text{Probe recovery} = \text{RL}_{vivo} \times \text{RG}_{vitro} / \text{RL}_{vitro}$$

Diphenhydramine 及び ketotifen のプローブ回収率はそれぞれ 0.114 ± 0.021 及び 0.199 ± 0.035 であった。150–240 分に回収した透析液中の diphenhydramine 及び ketotifen 濃度(C_d, nM) はそれぞれ 22.6 ± 4.9 及び 112 ± 8 であった。C_{ISF} は C_d をプローブ回収率で除して算出した。K_{p,uu} はマウス マイクロダイアリシスと同様に算出した。

10 Ketotifen のグルクロン酸抱合体生成及び確認

UDPGA, 2 mM 存在下及び非存在下, ketotifen (1 µM) をヒト肝ミクロソーム (1 mg/mL)と 37°C で 60 分インキュベーションした。反応液を超遠心 (43000 rpm, 100000 x g, 4°C, 1 h)後, 上清を希釈して (終濃度: 添加 ketotifen として 0.01, 0.1, 1, 10 nM), 3 項に示した結合試験を実施した。また, β-glucuronidase (2000 U/mL) 存在下及び非存在下, 上記の上清を NH₄H₂PO₄ 50 mM 緩衝液 (pH4.5) と 37°C で一晩インキュベーションし, 内標準物質入りのアセトニトリルを添加して反応を停止した。β-glucuronidase とインキュベーションしていない上記上清にも内標準物質入りのアセトニトリルを添加し, 4°C, 20,400 × g で 10 分遠心した後の上清中 ketotifen 濃度を測定した。ketotifen グルクロン酸抱合体の生成は, β-glucuronidase 処理により未変化体濃度が増えること,

LC-MS/MS を用いて、UDPGA との反応後に未変化体より分子量が 192 増加しているピークが認められることにより確認した。

11 薬物濃度測定

血清，血漿，脳ホモジネート，透析液及び他の分析用試料は 1-2 倍量の内標準物質(IS)を含んだアセトニトリルを添加し 4°C, 20,400 ×g で 10 分遠心して除蛋白した。上清を必要に応じて水で希釈し液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)により分析した。Shimadzu Prominence HPLC System (島津製作所 Kyoto, Japan)を装備した API 5500 Qtrap または API 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いた。分析条件の詳細は Table 5-1 に示した。サル試料中における diphenhydramine 及び ketotifen 測定の分析条件は既に報告されている⁸²。

Table 5-1 The selected ion monitoring transitions in LC-MS/MS analysis

Compounds	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)
Quetiapine	384	253
Perospirone	427	177
ID-15036	443	177
Raclopride	347	112
Chloropropamide (IS)	277	175
Diphenhydramine	256	167
Ketotifen	310	96
Bepotastine	389	202
Olopatadine	338	165
Antipyrine	189	56

API5500 Qtrap or API4000 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a Shimadzu prominence series LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) with curtain gas, 10 psi; collision gas, 6 psi; ion spray voltage, 5000 V; temperature, 400°C; ion source gas 1, 60 psi; and ion source gas 2, 80 psi were used for quetiapine, perospirone, ID-15036, raclopride, and chloropropamide (internal standard) analysis. The curtain gas, 30 psi; collision gas, 7 psi; ion-spray voltage, 5500 V; temperature, 500°C; ion source gas 1, 70 psi; and ion source gas 2, 80 psi were used for diphenhydramine, ketotifen, bepotastine, olopatadine,

antipyrine, and chlorpropamide (internal standard) analysis. For the mobile phase, 1% formic acid and acetonitrile were used. All compounds were analyzed in multi reaction monitoring mode under positive electron spray ionization conditions. The analytical columns used were Ascentis Express C18 (2.7 μm, 2.1 mm ID x 50 mm; Supelco, St. Louis, MO) at 40°C. The gradient mobile phase, 1% formic acid and acetonitrile were used at a flow rate of 0.25 mL/min. The acetonitrile concentration was initially 10%, then linearly increased to 90% over 1 min, and maintained at 90% for a further 2.5 min. Finally, the column was re-equilibrated at an acetonitrile concentration of 10% for 3.5 min, at a flow rate of 0.25 mL/min. The total run time was 7 min.

12 BBB 透過性及び脳内非結合形分率の *in silico* 予測

BBB を介した受動的な透過性(PS, mL/sec/g brain)は既報の *in silico* データから予測した⁸³。

$$\text{Log PS} = -2.19 + 0.262 * \text{LogD}_{7.4} + 0.0583 * \text{vsa_base} - 0.00897 * \text{TPSA}$$

topological polar surface area (TPSA)及び van der Waals surface area of the basic atoms (vsa_base) は MOE 2008 または 2012 (Chemical Computing Group, Montreal, QB, Canada)を用いて計算し, LogD_{7.4} は ADMET Predictor (Simulations Plus, Lancaster, CA)で計算した。各パラメータは Table 2- 3 及び Table 3- 4 にまとめた。算出した PS の単位を mL/min/g brain に変換して予測に用いた。

In silico 脳内非結合形分率 ($f_{u,\text{brain silico}}$)は既述の方法²⁰を基に $f_{u,\text{brain silico}} = 1/V_{u,\text{brain}}$, ($\text{Log } V_{u,\text{brain}} = 0.47 * \text{Log } D_{7.4} + 0.045$) により算出した。

13 PET によるヒトドパミン D2 受容体占有率

本試験は Radiation Safety Committee of the National Institute of Radiological Sciences (Chiba, Japan) に承認された。試験の説明後にすべての被験者からインフォームドコンセントを得た。

8 例の健常人男性(年齢: 22–33 歳, 25.5 ± 1.8 , mean \pm S.E.M.)が本試験に参加した。いずれの被験者も精神科, 神経系や身体疾患の病歴が無く, 本試験の前の少なくとも 2 週間は薬物投与も無かった。PET スキャンのベースラインは被験薬投与前の 2 週間にスキャンした。4 例の被験者が quetiapine 400 mg を単回経口投与した。被験薬投与後の 1.5, 8 及び 25.5 時間に連続的に 3 回の

PET スキャンを ECAT EXACT HR+ (CTI-Siemens, Knoxville, TN)にて実施した。被験薬の血漿中濃度を測定するため、投与後 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0, 9.0, 25.5, 及び 26.5 時間の計 11 回、静脈から血液を採取し、既報の¹⁶方法で測定した。

線条体におけるドパミン D2 受容体の Binding potential (BP_{ND} , 特異的な結合を nondisplaceable コンパートメントへの取り込みと比較したパラメータ)を three-parameter simplified reference tissue model^{84,85}を用いて計算した。小脳をリファレンス組織とした。受容体占有率は次のように算出した

$$RO (\%) = (BP_{baseline} - BP_{drug}) / BP_{baseline} \times 100$$

ここで $BP_{baseline}$ は被験物質がない状態での BP_{ND} であり、 BP_{drug} は被験物質投与後の BP_{ND} である。

頭部の動きを最小限にするため頭部を固定する装置を用いた。放射スキャンの前に減衰補正のための透過スキャンを ⁶⁸Ge-⁶⁸Ga source を用いて実施した。^{[11C]raclopride} (165.3–246.8 MBq, 215.5 ± 4.1 MBq, mean ± S.E.M.)を静脈内投与後、60 分間ダイナミック PET スキャンを実施した。^{[11C]raclopride} の比活性は 135.1–320.9 MBq/nmol (210.3 ± 11.1 MBq/nmol, mean ± S.E.M.)であった。脳の Magnetic resonance images (MRI)を 1.5 Tesla MRI (Gyrosan NT, Philips Medical Systems, Best, Netherlands)で取得した。1 mm スライスでの T1-weighted images を得た。

全ての放射スキャンデータは Hanning filter を用いて再構築した。関心領域は線条体及び小脳皮質とし、個々の MRI を参照しながら PET images を手動で作成した。

Perospirone 16 mg 投与後の perospirone, ID-15036 の血漿中濃度推移及びについては既報の PET 試験から引用した¹⁶。

14 D2 拮抗薬の臨床データ解析

Carbamazepine, ketoconazole, または itraconazole による CYP3A4 誘導または阻害の quetiapine, perospirone, ID-15036 の血漿中濃度に及ぼす影響は既報の薬物相互作用(DDI)試験を参照した^{32,30,33}。前項の PET 試験及び DDI 試験における血漿中濃度は、 R_B を乗ずることにより血液中濃度に変換した。

PET 試験時及び DDI 試験時の被験物質の血漿中濃度時間推移のパラメータ(V_b , k_a , k_e , t_{lag} , 各

パラメータの定義は Fig. 2- 3 に記載)は Phoenix Winnonlin を用いて 1-コンパートメントモデル(ラグタイムありまたはなし)にフィッティングすることで算出した。ID-15036 のパラメータは ID-15036 を perospirone と等モル投与したと仮定して算出した。DDI 試験での投与量を PET 試験での投与量に補正する場合は線形を仮定した。

15 抗ヒスタミン薬の臨床データ

Diphenhydramine, ketotifen, bepotastine, 及び olopatadine の RO は既報の PET 試験から引用した^{49,50,51}。引用に用いた PET 試験では血液採取ポイントが限られていたため, diphenhydramine⁵⁷, ketotifen⁵⁸, bepotastine⁵⁹,及び olopatadine⁶⁰ の血漿中濃度時間推移は他の臨床試験の成績を引用し pharmacokinetic model を構築した。血漿中濃度の報告値は血漿中濃度に R_B 値を乗ずることによって血液中濃度に変換した。被験物質の血液中濃度時間推移を表すパラメータ (V_b , k_a , k_e , k_{12} , k_{21} , 及び t_{lag} , 各パラメータの定義は Fig. 3- 4 に記載)は Phoenix™ WinNonlin® を用いて, ラグタイムのある 1-または 2-コンパートメントモデルにデータを当てはめることで算出した。

16 PBPK モデル解析

ヒト中枢における D2 受容体または H1 受容体の RO は Fig. 2- 3 及び Fig. 3- 4 に示した PBPK モデルに従って SAAMII (University of Washington, Seattle, WA) を用いてシミュレーションした。微分方程式は第五章 19 に示した。Quetiapine, perospirone 及び ID-15036 の血液から脳への取り込みクリアランス(PS_{inf})及び脳から血液への排泄クリアランス (PS_{eff})は PS と同一と等しいと仮定した。Diphenhydramine 及び ketotifen の PS_{eff} は PS と同一と仮定し, 血液から脳への取り込みクリアランス PS_{inf} は PS 及びサルマイクロダイアリシスにおける $K_{p,uu}$ との積として計算した。Bepotastine 及び olopatadine の場合, PS_{inf} は PS と同一と仮定し, PS_{eff} は次のように計算した

$$PS_{eff} = K_{p,brain} \text{ ratio in the P-gp KO mice} \times PS$$

$$K_{p,brain} \text{ ratio in the P-gp KO mice} = K_{p,brain} \text{ in KO} / K_{p,brain} \text{ in wild-type mice},$$

$K_{p,brain} \text{ ratio in the P-gp KO mice}$ は bepotastine で 2.9⁵², olopatadine で 5.3⁵³ と算出された。

17 感度分析

構築した PBPK モデルの各パラメータに対し、 $K_i(k_{on}, k_{off})$, PS の絶対値, f_{br} , $K_{p,uu}$, PS_{inf}/PS_{eff} の値を変化させた場合の RO 予測を行い、それぞれのパラメータの変動が及ぼす影響を検討した。

18 最尤法によるパラメータの最適化

Phoenix™ WinNonlin®を用いて PBPK モデルを作成し、初期値のパラメータを固定値として入力した後、得られた RO に合うように一部のパラメータのみを可変にしてフィッティングを行った。次の 5 種類① f_{br} のみ、②PS 及び f_{br} 、③ k_{on} 及び k_{off} 、④PS, f_{br} , 及び k_{off} 、⑤PS, f_{br} , 及び k_{on} のパラメータをフィッティングにより求めた。

19 各モデルの微分方程式

➤ k_{on}, k_{off}, B_{max} のフィッティング;

D2 の場合 butaclamol 添加後の $[^3H]$ raclopride の解離, H1 の場合 cetirizine 添加後の $[^3H]$ mepyramine の解離から、次の式により解離速度定数(k_{off})を算出した。

$$A = A_0 * e^{-k_{off} * t}$$

次に、算出した k_{off} を以下の式で固定し、 k_{on}, B_{max} を(非標識体を添加した場合は k_{on_i}, k_{off_i} についても)算出した。

$$dA1/dt = -A1 * k_{12} + A2 * k_{off}$$

$$dA2/dt = A1 * k_{12} - A2 * k_{off}$$

$$dA3/dt = -A3 * k_{34} + A4 * k_{off_i}$$

$$dA4/dt = A3 * k_{34} - A4 * k_{off_i}$$

$$k_{12} = k_{on} * (B_{max} - A2 - A4) / 1$$

$$k_{34} = k_{on_i} * (B_{max} - A2 - A4) / 1$$

➤ $f_{u,brain vivo}$ のフィッティング;

$$dX_b/dt = -k_e \times X_b - k_{12} \times X_b + k_{21} \times X_2 - Q_{br} \times X_b / V_b + Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc}$$

$$dX_2/dt = -k_{12} \times X_b - k_{21} \times X_2$$

$$dX_{bc}/dt = Q_{br} \times X_b / V_b - Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc} - f_b \times PS \times X_{bc} / V_{bc} + f_{br} \times PS \times X_{br} / V_{br}$$

$$dX_{br}/dt = f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} - f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br}$$

➤ Quetiapine, ketotifen, bepotastine, 及び olopatadine 投与後の $C_{u,brain}$, RO の予測;

$$dX_0/dt = -k_a \times X_0$$

$$dX_b/dt = k_a \times X_0 - k_e \times X_b - Q_{br} \times X_b / V_b + Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc} \text{ (quetiapine, ketotifen, bepotastine の場合)}$$

$$dX_b/dt = k_a \times X_0 - k_e \times X_b - k_{12} \times X_b + k_{21} \times X_2 - Q_{br} \times X_b / V_b + Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc} \text{ (olopatadine の場合)}$$

$$dX_2/dt = -k_{12} \times X_b - k_{21} \times X_2 \text{ (olopatadine の場合)}$$

$$dX_{bc}/dt = Q_{br} \times X_b / V_b - Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc} - f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} + f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br}$$

$$dX_{br}/dt = f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} - f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br} - f_{br} \times k_{on} \times (B_{max} - X_r) / V_r \times X_{br} + k_{off} \times X_r$$

$$dX_r/dt = f_{br} \times k_{on} \times (B_{max} - X_r) / V_r \times X_{br} - k_{off} \times X_r$$

$$C_{u,brain} = f_{br} \times X_{br} / V_{br}$$

$$RO(\%) = 100 \times X_r / B_{max}$$

➤ Perospirone 投与後の RO の予測;

(下付きの“m”は ID-15036 のパラメータを表す)

$$dX_0/dt = -k_a \times X_0$$

$$dX_b/dt = k_a \times X_0 - k_e \times X_b - Q_{br} \times X_b / V_b + Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc}$$

$$dX_{bc}/dt = Q_{br} \times X_b / V_b - Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc} - f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} + f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br}$$

$$dX_{br}/dt = f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} - f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br} - f_{br} \times k_{on} \times \{B_{max} - (X_r + X_{r,m})\} / V_r \times X_{br} + k_{off} \times X_r$$

$$dX_r/dt = f_{br} \times k_{on} \times \{B_{max} - (X_r + X_{r,m})\} / V_r \times X_{br} - k_{off} \times X_r$$

$$dX_{0,m}/dt = -k_{a,m} \times X_{0,m}$$

$$dX_{b,m}/dt = k_{a,m} \times X_{0,m} - k_{e,m} \times X_{b,m} - Q_{br} \times X_{b,m} / V_{b,m} + Q_{br} \times X_{bc,m} / V_{bc}$$

$$dX_{bc,m}/dt = Q_{br} \times X_{b,m} / V_{b,m} - Q_{br} \times X_{bc,m} / V_{bc} - f_{b,m} \times PS_{inf,m} \times X_{bc,m} / V_{bc} + f_{br,m} \times PS_{eff,m} \times X_{br,m} / V_{br}$$

$$dX_{br,m}/dt = f_{b,m} \times PS_{inf,m} \times X_{bc,m} / V_{bc} - f_{br,m} \times PS_{eff,m} \times X_{br,m} / V_{br} - f_{br,m} \times k_{on,m} \times \{B_{max} - (X_r + X_{r,m})\} / V_r \times X_{br,m} + k_{off,m} \times X_{r,m}$$

$$dX_{r,m}/dt = f_{br,m} \times k_{on,m} \times \{B_{max} - (X_r + X_{r,m})\} / V_r \times X_{br,m} - k_{off,m} \times X_{r,m}$$

$$C_{u,brain} = f_{br} \times X_{br} / V_{br}, C_{u,brain,m} = f_{br,m} \times X_{br,m} / V_{br}$$

$$RO(\%) = 100 \times (X_r + X_{r,m}) / B_{max}$$

➤ Diphenhydramine 投与後の $C_{u,brain}$, RO の予測;

$$dX_0/dt = -k_a \times X_0$$

$$dX_b/dt = k_a \times X_0 - k_e \times X_b - Q_{br} \times X_b / V_b + Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc}$$

$$dX_{bc}/dt = Q_{br} \times X_b / V_b - Q_{br} \times X_{bc} / V_{bc} - f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} + f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br}$$

$$dX_{br}/dt = f_b \times PS_{inf} \times X_{bc} / V_{bc} - f_{br} \times PS_{eff} \times X_{br} / V_{br}$$

$$C_{u,brain} = f_{br} \times X_{br} / V_{br}$$

$$RO(\%) = 100 \times C_{u,brain} / (K_i + C_{u,brain})$$

第六章 参考文献

- ¹ 白神昇平. アンメット・メディカル・ニーズに対する医薬品の開発状況—2015年の動向—. 政策研ニュース 2015;45:30—33
- ² Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:711—5.
- ³ 鈴木 豊史. 中枢神経系薬の創薬開発における血液脳関門透過の重要性. *ファルマシア* 48 :761-766, 2012.
- ⁴ Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*. 2:541-53, 2005.
- ⁵ Kusuhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1). *Drug Discov Today*. 6:150-156, 2001.
- ⁶ Sugiyama Y, Kusuhara H, Suzuki H. Kinetic and biochemical analysis of carrier-mediated efflux of drugs through the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: importance in the drug delivery to the brain. *J Control Release* 1999;62:179—86.
- ⁷ Watson J, Wright S, Lucas A, Clarke KL, Viggers J, Cheetham S, et al. Receptor occupancy and brain free fraction. *Drug Metab Dispos* 2009;37:753—60.
- ⁸ 薬食審査発第 0603001 号平成 20 年 6 月 3 日
- ⁹ Kodaira H, Kusuhara H, Fujita T, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the impact of active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as a surrogate. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;339:935-44.
- ¹⁰ Motulsky HJ, Mahan LC. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol* 1984;25:1—9.
- ¹¹ Yanai K, Yagi N, Watanabe T, Itoh M, Ishiwata K, Ido T, et al. Specific binding of [3H]pyrilamine to histamine H1 receptors in guinea pig brain in vivo: determination of binding parameters by a kinetic four-

compartment model. *J Neurochem* 1990;55:409—20.

¹² 福永浩司, 竹内有輔. ドーパミン D2 受容体の新しい細胞内シグナル伝達系と統合失調症. *蛋白質核酸酵素* 2006, 51:1602—8.

¹³ Nyberg S, Nordström AL, Halldin C, Farde L. Positron emission tomography studies on D2 dopamine receptor occupancy and antipsychotic drug plasma levels in man. *Int Clin Psychopharmacol* 1995;10(suppl 3):81—5.

¹⁴ Yasui-Furukori N, Furukori H, Nakagami T, Saito M, Inoue Y, Kaneko S, et al. Steady-state pharmacokinetics of a new antipsychotic agent perospirone and its active metabolite, and its relationship with prolactin response. *Ther Drug Monit* 2004;26:361—365.

¹⁵ DeVane CL, Nemeroff CB. Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:509—22.

¹⁶ Arakawa R, Ito H, Takano A, Okumura M, Takahashi H, Takano H, et al. Dopamine D2 receptor occupancy by perospirone: a positron emission tomography study in patients with schizophrenia and healthy subjects. *Psychopharmacology* 2010;209:285—90.

¹⁷ Saller CF, Salama AI. Seroquel: biochemical profile of a potential atypical antipsychotic. *Psychopharmacology (Berl)* 1993;112:285—92.

¹⁸ Takahashi Y, Kusumi I, Ishikane T, Koyama T. In vivo occupation of dopamine D1, D2 and serotonin2A receptors by novel antipsychotic drug, SM-9018 and its metabolite, in rat brain. *J Neural Transm* 1998;105:181—91.

¹⁹ https://ds-pharma.jp/product/lullan/pdf/lullan_tab_interv.pdf

²⁰ Fridén M, Gupta A, Antonsson M, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M. In vitro methods for estimating unbound drug concentrations in the brain interstitial and intracellular fluids. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1711—9.

²¹ Muir ER, Shen Q, Duong TQ. Cerebral blood flow MRI in mice using the cardiac-spin-labeling technique. *Magn Reson Med* 2008;60:744-8.

²² Hua J, Qin Q, Pekar JJ, van Zijl PC. Measurement of absolute arterial cerebral blood volume in human brain without using a contrast agent. *NMR Biomed* 2011; 24:1313-25.

²³ Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, et al. Transport of digoxin by

human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:840—5.

²⁴ Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992;267:24248—52.

²⁵ Sasongko L, Link JM, Muzi M, Mankoff DA, Yang X, Collier AC, et al. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:503-14.

²⁶ Hietala J, Någren K, Lehtikoinen P, Ruotsalainen U, Syvälahti E. Measurement of striatal D2 dopamine receptor density and affinity with [¹¹C]-raclopride in vivo: a test-retest analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:210-7.

²⁷ Tadori Y, Forbes RA, McQuade RD, Kikuchi T. Functional potencies of dopamine agonists and antagonists at human dopamine D2 and D3 receptors. *Eur J Pharmacol* 2011;666:43—52.

²⁸ Jensen NH, Rodriguiz RM, Caron MG, Wetsel WC, Rothman RB, Roth BL. N-desalkylquetiapine, a potent norepinephrine reuptake inhibitor and partial 5-HT_{1A} agonist, as a putative mediator of quetiapine's antidepressant activity. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:2303—12.

²⁹ Nord M, Nyberg S, Brogren J, Jucaite A, Halldin C, Farde L. Comparison of D₂ dopamine receptor occupancy after oral administration of quetiapine fumarate immediate-release and extended-release formulations in healthy subjects. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14:1357—66.

³⁰ Masui T, Kusumi I, Takahashi Y, Koyama T. Effect of carbamazepine on the single oral dose pharmacokinetics of perospirone and its active metabolite. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:1330—3.

³¹ Mizuno Y, Tani N, Komuro S, Kanamaru H, Nakatsuka I. In vitro metabolism of perospirone in rat, monkey, and human liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2003;28:59—65.

³² Grimm SW, et al. Effects of cytochrome P450 3A modulators ketoconazole and carbamazepine on quetiapine pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61:58—69.

³³ Masui T, Kusumi I, Takahashi Y, Koyama T. Effects of itraconazole and tandospirone on the pharmacokinetics of perospirone. *Ther Drug Monit* 2006;28:73—5

³⁴ Schotte A, Janssen PF, Gommeren W, Luyten WH, Van Gompel P, Lesage AS, et al. Risperidone

compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding.

Psychopharmacology 1996;124:57—73.

³⁵ <http://kiddbdev.med.unc.edu/databases/pdsp.php>

³⁶ Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, et al. H₁-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs.

Neuropsychopharmacology 2003;28:519—26.

³⁷ Sato H, Ito C, Hiraoka K, Tashiro M, Shibuya K, Funaki Y, et al. Histamine H₁ receptor occupancy by the new-generation antipsychotics olanzapine and quetiapine: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2015;232:3497-505.

³⁸ Tadori Y, Miwa T, Tottori K, Burris KD, Stark A, Mori T, Kikuchi T. Aripiprazole's low intrinsic activities at human dopamine D_{2L} and D_{2S} receptors render it a unique antipsychotic. *Eur J Pharmacol* 2005;515:10—9.

³⁹ Tadori Y, Forbes RA, McQuade RD, Kikuchi T. Receptor reserve-dependent properties of antipsychotics at human dopamine D₂ receptors. *Eur J Pharmacol* 2009;607:35—40.

⁴⁰ Fridén M, Bergström F, Wan H, Rehngrén M, Ahlin G, Hammarlund-Udenaes M, et al. Measurement of unbound drug exposure in brain: modeling of pH partitioning explains diverging results between the brain slice and brain homogenate methods. *Drug Metab Dispos* 2011;39:353—62.

⁴¹ Zhou YG, Li KY, Li HD. Effect of the novel antipsychotic drug perospirone on P-glycoprotein function and expression in Caco-2 cells. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:697—703.

⁴² Arakawa R, Okumura M, Ito H, Takano A, Takahashi H, Takano H, et al. Positron emission tomography measurement of dopamine D₂ receptor occupancy in the pituitary and cerebral cortex: relation to antipsychotic-induced hyperprolactinemia. *J Clin Psychiatry* 2010;71:1131—7.

⁴³ Simons FE, Simons KJ. The pharmacology and use of H₁-receptor-antagonist drugs. *N Engl J Med* 1994;330:1663—70.

⁴⁴ Yanai K, Ryu JH, Watanabe T, Iwata R, Ido T, Sawai Y, et al. Histamine H₁ receptor occupancy in human brains after single oral doses of histamine H₁ antagonists measured by positron emission tomography. *Br J Pharmacol* 1995;116:1649—55.

⁴⁵ Yanai K, Tashiro M. The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: an insight

from human positron emission tomography studies. *Pharmacol Ther* 2007;113:1—15.

⁴⁶ Tagawa M, Kano M, Okamura N, Higuchi M, Matsuda M, Mizuki Y, et al. Neuroimaging of histamine H1-receptor occupancy in human brain by positron emission tomography (PET): a comparative study of ebastine, a second-generation antihistamine, and (+)-chlorpheniramine, a classical antihistamine. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:501—9.

⁴⁷ Tagawa M, Kano M, Okamura N, Higuchi M, Matsuda M, Mizuki Y, et al. Differential cognitive effects of ebastine and (+)-chlorpheniramine in healthy subjects: correlation between cognitive impairment and plasma drug concentration. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:296—304.

⁴⁸ Tashiro M, Sakurada Y, Iwabuchi K, Mochizuki H, Kato M, Aoki M, et al. Central effects of fexofenadine and cetirizine: measurement of psychomotor performance, subjective sleepiness, and brain histamine H1-receptor occupancy using ¹¹C-doxepin positron emission tomography. *J Clin Pharmacol* 2004;44:890—900.

⁴⁹ Tashiro M, Mochizuki H, Sakurada Y, Ishii K, Oda K, Kimura Y, et al. Brain histamine H receptor occupancy of orally administered antihistamines measured by positron emission tomography with (¹¹C)-doxepin in a placebo-controlled crossover study design in healthy subjects: a comparison of olopatadine and ketotifen. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61:16—26.

⁵⁰ Tashiro M, Duan X, Kato M, Miyake M, Watanuki S, Ishikawa Y, et al. Brain histamine H1 receptor occupancy of orally administered antihistamines, bepotastine and diphenhydramine, measured by PET with ¹¹C-doxepin. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:811—21.

⁵¹ Zhang D, Tashiro M, Shibuya K, Okamura N, Funaki Y, Yoshikawa T, et al. Next-day residual sedative effect after nighttime administration of an over-the-counter antihistamine sleep aid, diphenhydramine, measured by positron emission tomography. *J Clin Psychopharmacol* 2010;30:694—701.

⁵² Ohashi R, Kamikozawa Y, Sugiura M, Fukuda H, Yabuuchi H, Tamai I. Effect of P-glycoprotein on intestinal absorption and brain penetration of antiallergic agent bepotastine besilate. *Drug Metab Dispos* 2006;34:793—9.

⁵³ Mimura N, Nagata Y, Kuwabara T, Kubo N, Fuse E. P-glycoprotein limits the brain penetration of olopatadine hydrochloride, H1-receptor antagonist. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23:106—14.

⁵⁴ Shimomura K, Okura T, Kato S, Couraud PO, Schermann JM, Terasaki T, et al. Functional expression of

a proton-coupled organic cation (H⁺/OC) antiporter in human brain capillary endothelial cell line

hCMEC/D3, a human blood-brain barrier model. *Fluids Barriers CNS* 2013;10:8.

⁵⁵ Sadiq MW, Borgs A, Okura T, Shimomura K, Kato S, Deguchi Y, et al. Diphenhydramine active uptake at the blood-brain barrier and its interaction with oxycodone in vitro and in vivo. *J Pharm Sci*. 2011;100:3912—23.

⁵⁶ Kakee A, Terasaki T, Sugiyama Y. Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood–brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1550–9.

⁵⁷ Scavone JM, Luna BG, Harmatz JS, von Moltke L, Greenblatt DJ. Diphenhydramine kinetics following intravenous, oral, and sublingual dimenhydrinate administration. *Biopharm Drug Dispos*. 1990;11:185—9

⁵⁸ Chen X, Zhong D, Liu D, Wang Y, Han Y, Gu J. Determination of ketotifen and its conjugated metabolite in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:2459—63.

⁵⁹ Yokota H, Mizuuchi H, Maki T, Banno K, Sato T. Phase I study of TAU-284: single oral administration in healthy male volunteers [in Japanese]. *Rinsho Iyaku* 1997;13:1137—53.

⁶⁰ Zhu P, Wen YG, Fan XP, Zhou ZL, Fan RX, Chen JM, et al. A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of olopatadine concentration in human plasma. *J Anal Toxicol*. 2011;35:113—8.

⁶¹ Yanai K, Watanabe T, Yokoyama H, Hatazawa J, Iwata R, Ishiwata K, et al. Mapping of histamine H1 receptors in the human brain using [¹¹C]pyrilamine and positron emission tomography. *J Neurochem* 1992;59:128-36.

⁶² Ikoma Y, Takano A, Ito H, Kusuhara H, Sugiyama Y, Arakawa R, et al. Quantitative analysis of ¹¹C-verapamil transfer at the human blood-brain barrier for evaluation of P-glycoprotein function. *J Nucl Med*. 2006;47:1531—7.

⁶³ http://www.eisai.jp/medical/products/di/IF/VA_T_IF/VA_T_IF.pdf

⁶⁴ Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm Res* 2001;18:1660-8.

⁶⁵ Senda M, Kubo N, Adachi K, Ikari Y, Matsumoto K, Shimizu K, et al. Cerebral histamine H1 receptor binding potential measured with PET under a test dose of olopatadine, an antihistamine, is reduced after

repeated administration of olopatadine. *J Nucl Med.* 2009;50:887—92.

⁶⁶ Ghoneim OM, Legere JA, Golbraikh A, Tropsha A, Booth RG. Novel ligands for the human histamine H1 receptor: synthesis, pharmacology, and comparative molecular field analysis studies of 2-dimethylamino-5-(6)-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenes. *Bioorg Med Chem* 2006 ;14:6640—58.

⁶⁷ Booth RG, Moniri NH, Bakker RA, Choksi NY, Nix WB, Timmerman H, et al. A novel phenylaminotetralin radioligand reveals a subpopulation of histamine H(1) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:328—36.

⁶⁸ Ohshima E, Otaki S, Sato H, Kumazawa T, Obase H, Ishii A, et al. Synthesis and antiallergic activity of 11-(aminoalkylidene)-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin derivatives. *J Med Chem* 1992 ;35:2074—84.

⁶⁹ Kato M, Nishida A, Aga Y, Kita J, Kudo Y, Narita H, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of central effect of the novel antiallergic agent betotastine besilate. *Arzneimittelforschung* 1997 ;47:1116—24.

⁷⁰ Sharif NA, Xu SX, Miller ST, Gamache DA, Yanni JM. Characterization of the ocular antiallergic and antihistaminic effects of olopatadine (AL-4943A), a novel drug for treating ocular allergic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:1252—61.

⁷¹ Taylor JE, Richelson E. High-affinity binding of [3H]doxepin to histamine H1-receptors in rat brain: possible identification of a subclass of histamine H1-receptors. *Eur J Pharmacol* 1982;78:279—85.

⁷² http://www.kowa-souyaku.co.jp/upload/item/51/1-pi_128.pdf

⁷³ http://product.novartis.co.jp/zen/if/if_zen_cap1503.pdf

⁷⁴ https://medical.mt-pharma.co.jp/di/file/if/f_tln.pdf

⁷⁵ http://www.kksmile.com/druginfo/interv/alk_in.pdf

⁷⁶ Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm.* 2011;8:1332—41.

⁷⁷ Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, et al. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10:21.

- ⁷⁸ Ohuchi Y, Yanai K, Sakurai E, Fukui H, Yanagisawa T, Watanabe T. Histamine-induced calcium mobilization in single cultured cells expressing histamine H1 receptors: a relationship between its sensitivity and the density of H1 receptors. *Int J Mol Med* 1998;1:355—60.
- ⁷⁹ Gillard M, Chatelain P. Changes in pH differently affect the binding properties of histamine H1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2006;530:205—14.
- ⁸⁰ Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 1981;4:879—85.
- ⁸¹ Miyajima M, Kusuvara H, Takahashi K, Takashima T, Hosoya T, Watanabe Y, et al. Investigation of the effect of active efflux at the blood-brain barrier on the distribution of nonsteroidal aromatase inhibitors in the central nervous system. *J Pharm Sci* 2013;102:3309—19.
- ⁸² Nagaya Y, Nozaki Y, Kobayashi K, Takenaka O, Nakatani Y, Kusano K, et al. Utility of cerebrospinal fluid drug concentration as a surrogate for unbound brain concentration in nonhuman primates. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014;29:419—26.
- ⁸³ Lanevskij K, Japertas P, Didziapetris R, Petrauskas A. Ionization-specific prediction of blood-brain permeability. *J Pharm Sci* 2009;98:122—34.
- ⁸⁴ Innis RB, Cunningham VJ, Delforge J, Fujita M, Gjedde A, Gunn RN, et al. Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1533—9.
- ⁸⁵ Lammertsma AA, Hume SP. Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *Neuroimage* 1996;4:153—8.