

内因性代謝物プローブを用いた  
合成抗菌薬DX-619による薬物相互作用の定量的解析

今村 勇一郎

# 目次

略語	3 - 4
序論	5 - 16
第 1 章	
DX-619 と腎薬物トランスポーターとの相互作用の定量的解析	
要約	18
序論	19 - 23
結果	24 - 27
考察	28 - 32
図表	33 - 42
第 2 章	
<i>In vitro</i> 試験に基づいた DX-619 の Mechanism-based Inhibition (MBI) による <i>in vivo</i> 肝 CYP3A4 阻害能の定量的予測	
1. DX-619 投与時の CYP3A4 に対する薬物相互作用リスクの評価	
要約	44
序論	45 - 49
結果	50 - 51
考察	52 - 54
図表	55 - 62
2. 6 $\beta$ -hydroxycortisol の腎排泄阻害が CL <sub>6<math>\beta</math>-OHF</sub> に基づいた肝 CYP3A4 活性推定に与える影響	
要約	64 - 65
序論	66 - 68
結果	69 - 74
考察	75 - 79
図表	80 - 100
結論および今後の展望	101 - 104
謝辞	105 - 106
実験方法	107 - 124
参考文献	125 - 138

## 略語

<b>6<math>\beta</math>-OHF</b>	6 $\beta$ -hydroxycortisol
<b>11<math>\beta</math>-HSD</b>	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>AUC</b>	area under the concentration-time curve
<b>C<sub>cre</sub></b>	plasma creatinine concentration
<b>CL<sub>cre</sub></b>	creatinine clearance
<b>CL<sub>6<math>\beta</math>-OHF</sub></b>	apparent cortisol 6 $\beta$ -hydroxylation clearance
<b>CL<sub>renal,6<math>\beta</math>-OHF</sub></b>	renal clearance of 6 $\beta$ -OHF
<b>CL<sub>renal sec,6<math>\beta</math>-OHF</sub></b>	renal secretion clearance of 6 $\beta$ -OHF
<b>CYP</b>	cytochrome P450
<b>DDI</b>	drug-drug interaction
<b>ES</b>	estrone-3-sulfate
<b>E<sub>act</sub></b>	active CYP3A4 in the liver
<b>E<sub>h</sub></b>	liver extraction ratio
<b>FDA</b>	US Food and Drug Administration
<b>f<sub>u</sub></b>	unbound fraction
<b>FR</b>	fraction reabsorbed
<b>GFR</b>	glomerular filtration
<b>HEK</b>	human embryonic kidney
<b>HLM</b>	human liver microsomes
<b>IDT</b>	idiosyncratic drug toxicity
<b>I<sub>u,max</sub></b>	maximum unbound plasma concentration
<b>K<sub>i</sub></b>	inhibition constant
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis-Menten constant
<b>k<sub>deg</sub></b>	degradation rate constant of the liver
<b>k<sub>inact</sub></b>	maximum inactivation rate constant
<b>k<sub>obs</sub></b>	observed inactivation rate constant
<b>MATE</b>	multidrug and toxin extrusion protein
<b>MBI</b>	mechanism-based inhibition
<b>MRCNS</b>	methicillin-resistant coagulase negative staphylococci

<b>MRM</b>	multiple reaction monitoring
<b>MRSA</b>	methicillin-resistant staphylococcus aureus
<b>OAT</b>	organic anion transporter
<b>OCT</b>	organic cation transporter
<b>PAH</b>	<i>p</i> -aminohippurate
<b>PCG</b>	benzylpenicillin
<b>P-gp</b>	p-glycoprotein
<b>PRSP</b>	penicillin-resistant streptococcus pneumoniae
<b>RAF</b>	relative activity factor
<b>TEA</b>	tetraethylammonium
<b>V<sub>max</sub></b>	maximum uptake rate
<b>VRE</b>	vancomycin-resistant enterococcus

## 序論

医薬品開発の成功確率を上昇させるファクターとして、期待された薬効の獲得、予測可能かつ個人内・個人間変動の小さい体内動態、およびより低い毒性リスク等が上げられる。この中で低い bioavailability 等の体内動態を原因とした医薬品開発の中止例は減少傾向 (40% 弱 [1991 年]→10% [2000 年]) にあったが、有効性 (30→30% 弱) および安全性 (10 数%→40%) を原因とした開発中止は依然として多い (1)。特に薬物相互作用および臨床副作用は、患者サイドおよび企業サイド双方に多大な影響を与えるため、メカニズム研究ならびにその回避を目的とした研究が精力的に行われている。また一方で、その薬物相互作用および臨床副作用のモニターの可能性、重篤度および回復性を観測する観点で、biomarker の探索研究も精力的に行われる。

例えば、HMG-CoA 還元酵素阻害剤 cerivastatin 製剤は、フィブレート系高脂血症薬 gemfibrozil との併用により横紋筋融解症が増加したため自主的に販売を中止し、市場から製品を回収した (表 1) (2)。横紋筋融解症は cerivastatin に限らずスタチン系の高脂血症薬において共通の副作用として知られていたが (3)、gemfibrozil と併用した場合において横紋筋融解症を原因とした死亡例が確認された (2)。これは、gemfibrozil の代謝物 gemfibrozil glucuronide が cerivastatin の主代謝酵素であった CYP2C8 を不可逆的に阻害し、cerivastatin の肝初回通過効果の低下によって血漿中 cerivastatin 濃度が上昇することで引き起こされる (4)。また、帯状疱疹治療薬 sorivudine および抗癌剤 5-fluorouracil の併用投与によって日本国内で死亡例が確認されたが (表 1) (5)、これは、sorivudine が 5-fluorouracil から

(E)-5-(2-bromovinyl) uracil (BVU) への代謝を不可逆に阻害し、5-fluorouracil が体内に蓄積し致命的な血球減少を起こしたことによることが明らかとなっている (6)。

製薬企業は、既に引き起こされた薬物相互作用および臨床副作用については、遡及的研究を行うばかりでなく、その回避のための *in vitro* スクリーニングシステムの構築を行い、また今後起こり得る薬物相互作用および臨床副作用については、その兆候を検出するための **biomarker** の探索および妥当性の研究、さらには *in vitro* から *in vivo* への外挿 (予測) 研究が盛んに行われている。本研究では、第一三共で創生されたニューキノロン系合成抗菌薬 (開発コード DX-619、図 1) の非臨床および臨床開発段階でそれぞれ見つけた問題点に対する予測および遡及的研究に関するものである。

キノロン系抗菌薬 (キノロン薬、第一世代) は古くは 1962 年に nalidixic acid が合成されたことに始まり (7)、以後、抗菌活性、代謝安定性、組織移行性との構造相関が精力的に研究され (8)、キノリン骨格の 6 位にフッ素を、7 位にピペラジニル基を有した norfloxacin 以降のキノロン系抗菌薬はニューキノロン (第二世代) と呼ばれている。さらに tosufloxacin が開発されると、肺炎球菌に対しても抗菌作用を有し、同種薬効を有するニューキノロン薬はレスピラトリーキノロン (第三世代) とも呼ばれるようになった (9)。

一方、キノロン薬およびニューキノロン薬の歴史は薬物相互作用・臨床副作用研究の歴史 (表 2) に言い換えることもできる (10)。まず、キノロン薬における薬物相互作用として、チトクロム P450 (CYP) 1A2 阻害による theophylline の副

作用増強を最初に挙げることができる。慢性閉塞性肺疾患時には気管支拡張作用を有する **theophylline** とともに、肺感染症治療のためにキノロン薬を併用投与するケースが多かった。ここで **theophylline** の代謝は主として **CYP1A2** が関与しており (11)、**enoxacin** や **norfloxacin** 等のキノロン薬およびニューキノロンは **CYP1A2** を特異的に阻害していた (12)。その結果、**theophylline** の肝初回通過効果の低下によって血漿中濃度が上昇し、**theophylline** 由来の消化器症状、不整脈、痙攣等が起こりやすくなっていた (13)。また、**enoxacin** をはじめとしたキノロン薬およびニューキノロン薬の多くに薬剤性光線過敏症の一つである光毒性が認められていた (表 2)。これは皮膚内に吸収された薬剤が光エネルギーによって光化学反応を起こし活性化された結果、毒性を獲得し組織を障害すると考えられている (14)。これら臨床副作用については構造-副作用相関研究が精力的に行われ、前者はキノリン骨格 7 位が、後者は 1 位および 8 位が原因であることが分かってきた (15, 16)。

これ以降のニューキノロンは、耐性グラム陽性菌やマイコプラズマ属、クラミジア属に抗菌活性を獲得させたもの、肺炎球菌治療のために肺移行性を高めたものなど、治療目的に応じて化合物の物性および構造が多岐にわたるようになってきたため (17)、臨床副作用・薬物相互作用も各々の薬物固有に出現するようになってきた。例えば **gatifloxacin** は重篤な血糖値不良を起こす報告が紹介され (18)、米国では **public citizen** による販売中止を求めた請願なども影響し、FDA によって承認医薬品リストから削除された (19)。また、**trovafloxacin** は、「低い発生頻度および臨床用量依存性、かつ長期投与によってのみ発現する宿主依

存的な毒性作用」と定義される特異的体質性薬物依存毒性 (idiosyncratic drug toxicity: IDT (20)) による重篤な肝障害を起こすことが知られ (21)、これが原因で市場の撤退をよぎなくされた (22)。

DX-619 (図 1) はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-resistant staphylococcus aureus*, MRSA) に優れた抗菌活性を有し、メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (*methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci*, MRCNS)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (*penicillin-resistant streptococcus pneumoniae*, PRSP)、バンコマイシン耐性腸球菌 (*vancomycin-resistant enterococcus*, VRE) 等による感染症に対しても治療効果が期待されているニューキノロンである (第四世代) (図 2)。MRSA 感染症は、治療薬剤が限られており難治性で重症度が高く死に直結する感染症である。その上、MRSA 感染症はこれまで院内感染症と考えられてきたが、市中での感染報告例が増加している (23)。また、VRE 感染の斬増とともに VRE 保菌者が拡大し、VRE の耐性遺伝子を有する黄色ブドウ球菌 (*vancomycin-resistant staphylococcus aureus*, VRSA) が分離されるに至っている (24)。このような多剤耐性グラム陽性菌感染症に有効な治療薬のニーズは依然として高く、これら感染症の治療を目的とした抗菌薬開発は未だ重要な医療上の意義を有する。

DX-619 の開発過程において、既存のキノロン系抗菌薬では報告されていない 2 つの課題があった。その 1 つは、第 1 相臨床試験 (Phase 1) で実施された単回および連投斬増試験において、軽度かつ一過性の血漿中クレアチニン濃度の上昇が認められた点である (25)。もう一つは、創薬初期の段階で、DX-619 は



CYP3A4 を不可逆的に阻害する mechanism-based inhibition (MBI) 活性を有することが見いだされた点である。血漿中クレアチニン濃度は腎機能の biomarker であり、その上昇は一般的に腎機能 (糸球体ろ過能) の低下を意味する。本上昇が DX-619 の腎毒性によるものであった場合には当該薬剤の適応患者が限定され、また腎毒性由来でなかった場合においても、その原因を精査し、そのメカニズムについて DX-619 を使用する医療機関に周知させる必要があると考えられた。一方、チトクロム P450 (CYP) を介した MBI は、阻害薬が被薬物相互作用薬の血漿中濃度の過剰暴露を惹起するため、医薬品開発においては重要なリスク要因として認識されており、薬効が期待される投与量での相互作用を定量的に予測することが重要である。

このような背景の元、数理モデルを用いて *in vitro* データを統合し、DX-619 により生じる薬物間相互作用を定量的に予測するとともに、臨床データとの比較を行い、予測結果の妥当性について検証した。

第1章では、DX-619 投与時の一過性の血漿中クレアチニン濃度上昇について、creatinine の尿細管分泌に着目した。腎機能の指標の一つに糸球体ろ過速度 (glomerular filtration rate、GFR) があり、GFR の臨床での簡便な指標として内因性物質であるクレアチニンクリアランス ( $CL_{cre}$ ) を挙げるができる。しかし、creatinine が糸球体ろ過に加えて尿細管分泌によって排泄されることから、これまで  $CL_{cre}$  は真の GFR と比較して値を過大評価していることが指摘されてきた (26, 27)。そこで creatinine の尿細管分泌について、腎薬物トランスポーターの関与を網羅的に検討することを目的に、ヒト OAT1-4、OCT1-3 発現  $S_2$

細胞およびヒト MATE1、MATE2-K 発現 HEK293 細胞を用いて creatinine の取り込みおよびその寄与を検討した。また、DX-619 および非イオン性ヨード造影剤 iohexol (GFR の代用として使用) が併用投与された臨床試験について  $CL_{cre}$  および GFR を被験者個別に解析し、DX-619 投与前後の creatinine の尿排泄パラメータの正確な算出を試みた。また、creatinine のトランスポーターを介した尿細管分泌が薬物によって阻害され、その結果血漿中クレアチニン濃度が上昇したことを検討するために、血漿中クレアチニン濃度に関する数理モデルを構築し、DX-619 投与時の各個体の血漿中クレアチニン濃度上昇に関する simulation を試みた。

第 2 章第 1 節では、DX-619 の MBI ポテンシャルについて、2 つのアプローチで評価した。まず、Phase 1 (反復投与) での血漿中 DX-619 濃度および *in vitro* での MBI に関する阻害パラメータ ( $k_{inact}$  および  $K_i$ ) を用いて physiologically-based pharmacokinetic model (PBPK model) によって肝臓中の活性型 CYP3A4 量 ( $E_{act}$ ) を推定した。また、糖質コルチコイド cortisol (F) の見かけの  $6\beta$  水酸化クリアランス (尿中  $6\beta$ -hydroxycortisol ( $6\beta$ -OHF) 量を血漿中 cortisol の AUC で除したもの:  $CL_{6\beta-OHF} = X_{6\beta-OHF}/AUC_F$ ) が *in vivo* CYP3A4 活性の推定手法として利用されつつある (28, 29)。そこで、同 Phase 1 での血漿および尿中の内因性 cortisol および  $6\beta$ -OHF を定量して  $CL_{6\beta-OHF}$  を算出し *in vivo* CYP3A4 活性について  $E_{act}$  と比較した。

医薬候補品が MBI ポテンシャルを有する場合には、CYP3A4 のプローブ薬として、midazolam など市販されている医薬品を併用投与する薬物相互作用試験

(DDI study) を実施して、阻害薬がプローブ薬の体内動態に及ぼす影響を評価するのが一般的である (30)。しかし、DDI study 開始以前に実施される Phase 1 は、その性質上 (単回・反復用量漸増投与によって、医薬候補品の安全性および体内動態を精査する)、用量を漸増していくなかで予期しなかった副作用が確認され、それ以降の開発が中止になるケースも多い。その場合、非臨床段階で薬物相互作用の予測を行ったとしても、その妥当性を検証するまでには至らないことも多い。DDI study は、阻害薬の DDI 能力を被薬物相互薬 (プローブ薬) の血漿中濃度の変動を定量的に評価することで見積もる手法であるが、健常人を対象にした場合であってもプローブ薬由来の副作用を被る場合がある (31)。そこで今回、臨床早期に DDI ポテンシャルを評価する目的で CYP3A4 の代替プローブとして内因性代謝物に注目した。6 $\beta$ -OHF および cortisol は、Phase 1 サンプルのみから評価可能であるため、プローブ薬の投与の必要が無く DDI study を企画、実施する費用および時間コストの点からも利点が多い。CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> は、itraconazole (CYP3A4 の非競合阻害剤 (32)) や、clarithromycin (CYP3A4 の MBI (33)) をヒトに投与した際、CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> の低下が観測されており、その biomarker としての有用性が示されつつある (28, 34)。しかし、CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> は尿中 6 $\beta$ -OHF 量とその算出時に使用するが、6 $\beta$ -OHF の尿中への排泄機構は明らかとなっていない。すなわち、CYP3A4 阻害能を有する化合物が 6 $\beta$ -OHF の尿排泄にどのような影響を与えるかは不明である。

そこで第 2 章第 2 節では、非臨床および臨床の両面より 6 $\beta$ -OHF の腎排泄機構の解明を試みた。はじめに 6 $\beta$ -OHF の寄与する尿細管の輸送担体について、基

底膜側の OAT1、OAT3、OCT2、および刷子縁膜側の P-gp、MATE1、MATE2-K についてそれぞれ発現細胞を用いて 6 $\beta$ -OHF の取り込み試験およびその寄与を検討した。次に、上記 6 $\beta$ -OHF 輸送活性評価で特に活性の高かった OAT3 および MATE1 について、当該トランスポーターの阻害薬である probenecid および pyrimethamine が 6 $\beta$ -OHF の腎排泄に及ぼす影響を検討するため、probenecid および pyrimethamine 投与時の 6 $\beta$ -OHF の腎クリアランス ( $CL_{\text{renal, 6}\beta\text{-OHF}}$ ) を算出し、また 6 $\beta$ -OHF の腎排泄変動が  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  に及ぼす影響を評価した。

本研究で得られた薬物相互作用の方法論を臨床の比較的初期に適用することにより、非臨床試験に基づいた予測と併せて多面的な解析が可能となり、確かなエビデンスをもとにした以降の臨床試験に対する対応策が可能になると期待される。

表 1. 薬物動態分野に関係した重篤な臨床副作用事例と市販後（遡及）研究

市販後に認められた重篤な臨床副作用事例を示す。事例は被薬物相互作用薬および阻害薬をそれぞれ示している。

医薬品（被薬物 相互作用薬/阻害 薬）	事例	市販後（遡及）研究
Cerivastatin / gemfibrozil	Cerivastatin の横紋筋融解症 (死亡例、マーケット撤退) (35)	Gemfibrozil glucuronide の CYP2C8 阻害 (36)
抗癌剤 / sorivudine	抗癌剤による血小板減少増強 (死亡例、マーケット撤退) Pharmaceutical Affairs Bureau, (1994)	Sorivudine 代謝物によるジヒドロ ウラシルデヒドロゲナーゼ阻害 (5)
Terfenadine / ketoconazole	Terfenadine による QT 延長 (マーケット撤退) (37)	Ketoconazole による CYP3A4 阻害 (38)
Troglitazone	重篤な肝機能障害 (死亡例、マーケット撤退) (39)	活性代謝物の共有結合、硫酸抱合 体による胆汁うっ滞 (40)

表 2. キノロン系およびニューキノロン系抗菌薬の副作用

医薬品	臨床副作用 (報告年)	医薬品市場および臨床開発への影響
Enoxacin	CYP1A2 阻害による theophylline の副作用増強 (1985)、痙攣誘発作用 (1991)	
Pefloxacin	光毒性 (薬剤性光線過敏症) (1985)	
Fleroxacin	光毒性 (1990)	製造販売中止
Temafloxacin	溶血性尿毒症症候群 (HUS) (1992)	
Lomefloxacin	光毒性 (1993)	
BA Yy3118	光毒性 (1993)	臨床開発中止
Sparfloxacin	光毒性、QT 延長 (1996)	
Tosufloxacin	重篤な血小板減少、腎炎 (1996)	臨床開発中止
Trovafloxacin	肝障害 (1999)	製造販売中止
Grepafloxacin	重篤な心血管障害 (1999)	製造販売中止
Clinafloxacin	光毒性、低血糖 (1999)	臨床開発中止
Gatifloxacin	低血糖および高血糖症状 (2006)	経口剤は製造販売中止、点眼薬は発売中

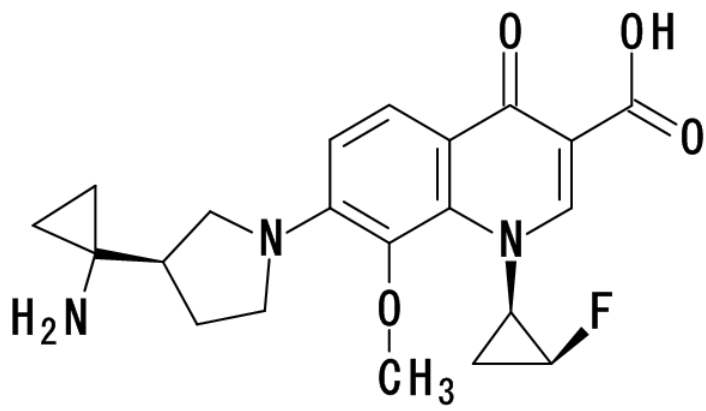


図 1. DX-619 の構造

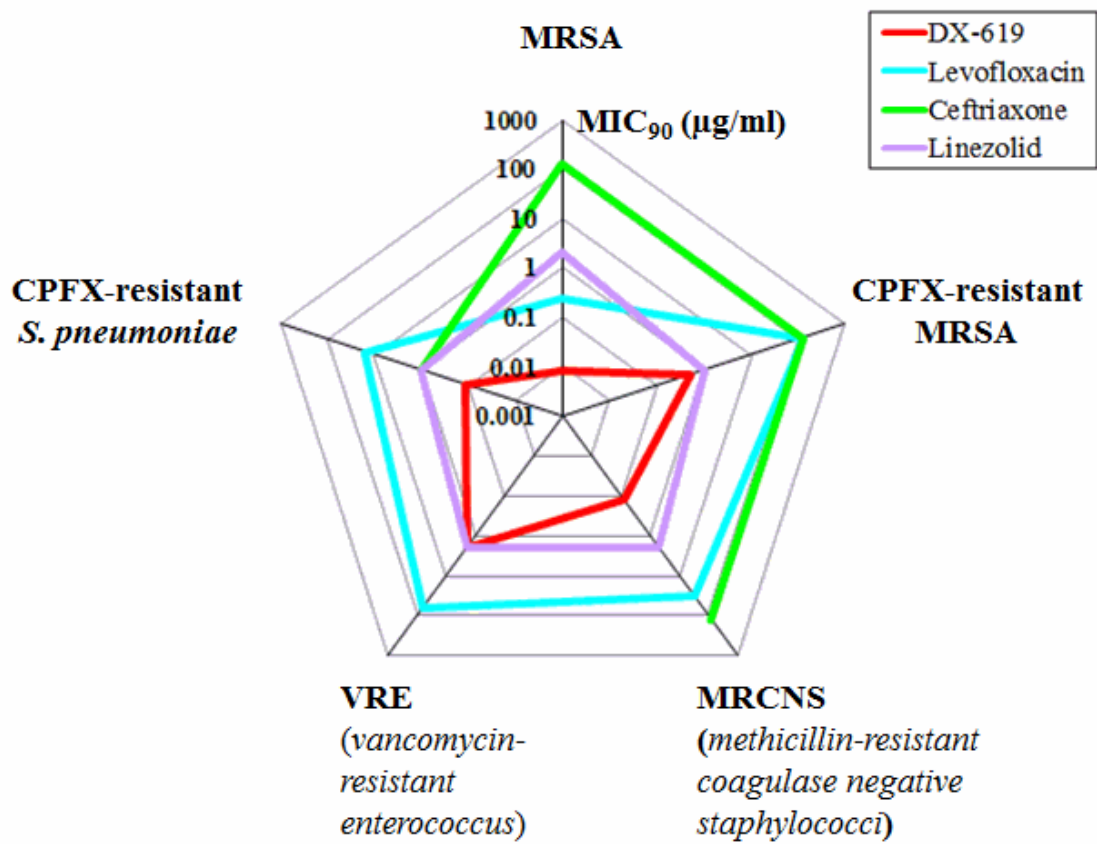


図 2. DX-619 の耐性グラム陽性菌に対する抗菌活性



## 第1章

# DX-619 と腎薬物トランスポーターとの相互作用の 定量的解析

## 要約

Phase 1 で認められた DX-619 投与時の一過性の血漿中クレアチニン濃度の上昇メカニズム解析として、creatinine 分泌に関わる腎有機カチオントランスポーター阻害について検討した。creatinine は OCT2 および OAT3 の基質であり、ヒト腎スライスでの取り込みクリアランスを算出したところ尿細管基底膜側では OCT2 の輸送の寄与が高いことが示唆された。また、腎トランスポーターに対する DX-619 の阻害定数 ( $K_i$ ) と血漿遊離型 DX-619 濃度を比較したところ、DX-619 投与時 OCT2 および MATEs の阻害が生じ得ることが示唆された。DX-619 投与時の血漿中クレアチニン濃度の変動を定量的に評価するために数理モデルを構築し、creatinine の尿細管分泌を DX-619 が競合阻害した場合の血漿中クレアチニン濃度に与える影響を計算した。各被験者の実測された血漿中クレアチニン濃度に対し非線形最小二乗法を用いて数理モデルをフィッティングさせた結果、creatinine の尿細管分泌 (GFR の 50%程度) および再吸収 (同 10%程度) を仮定することで、血漿中 creatinine 濃度の増加を説明することができた。本研究により、DX-619 による血漿中クレアチニン濃度の増大は、creatinine の OCT2/MATEs による尿細管分泌に対する DX-619 による機能阻害によって説明できることを明らかにした。また、DX-619 は薬効が期待される用量 (800 mg) で、metformin などカチオン性薬物の腎排泄を阻害すること、および creatinine は血漿中の OCT2/MATEs の内因性プローブとなり得ることが示された。

## 序論

2005年に行われたDX-619の第1相試験（単回斬増試験および連投斬増試験、Phase 1）において、血漿中クレアチニン濃度の上昇が認められた。この上昇は用量依存性が認められず、投与終了後（連投の場合、最終投与後）には、各被験者におけるbaselineの濃度まで回復しており、一過性のものと考えられた。DX-619はMRSA等の耐性グラム陽性菌感染患者を治療対象にしておりIntensive Care Unit (ICU)での治療が想定されていた。この場合、複数の抗菌剤が併用され、そのなかには血漿中クレアチニン濃度を腎機能の指標として投与計画が行われるケースも想定される。このときDX-619投与による血漿クレアチニン濃度の上昇が、DX-619由来の腎毒性によるものなのか、あるいはそれ以外の要因によるかによって当該薬剤の使用機会は大きく左右されることから、開発戦略上、非常に重要な問題と認識され、DX-619による腎毒性の有無を臨床早期に判断する必要があった。

腎組織はネフロンと呼ばれる構造単位からなり、ネフロンは糸球体を含む腎小体、近位尿細管、Henle係蹄細管部、遠位尿細管、集合管から形成される(図3A)。腎臓における薬物排泄は糸球体におけるろ過と、近位尿細管における尿細管分泌、さらに管腔側からの再吸収で決定される。このとき、体液の維持および老廃物・異物・生体代謝物の排泄恒常性の維持のために尿量の実に約100倍の体液が糸球体でろ過されることから、糸球体ろ過速度 (glomerular filtration rate、GFR) は腎機能を代表する指標として重要である。腎機能を評価する目的でGFRを測定する場合、臨床サイドにおいて最も簡便に行うことのできる指標として

内因性物質である creatinine を利用したクレアチニンクリアランス ( $CL_{cre}$ ) を挙げることができる。Creatinine は筋肉運動のエネルギー源となる creatine の代謝物であり (図 4)、尿酸や尿素窒素と同様に生体内老廃物として主に尿中に排泄されることから、 $CL_{cre}$  は、一定時間に尿中に排泄された creatinine 量 ( $X_{e,cre}$ ) を同期間での血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{cre}$ ) で除して求めて算出される ( $CL_{cre} = X_{e,cre} / AUC_{cre}$ )。臨床現場においては、1~数時点の血漿中クレアチニン濃度 ( $C_{cre}$ ) を 1 式の Cockcroft&Gault の式に代入し、 $CL_{cre}$  を推定することが一般的に採用されている (41)。

$$CL_{cre} = (140 - \text{年齢 [ys]}) \times \text{体重 [kg]} / (72 \times C_{cre} [\text{mg/dL}]) \quad (1 \text{ 式})$$

Cockcroft&Gault の式による  $CL_{cre}$  の推定は、蓄尿による被験者の拘束がないため、簡便な GFR 推定法として臨床検査で汎用されている (42)。しかし、 $C_{cre}$  はクレアチン摂取量、代謝プール、産生量、尿細管での挙動および腎血流量、等の影響を受けるため、 $C_{cre}$  のみから求める Cockcroft&Gault 法による  $CL_{cre}$  の推定は、その値が真の GFR マーカーと解離するケースが報告されている (43, 44)。

一方、creatinine の尿排泄は糸球体ろ過に加えて尿細管分泌が関与するため、 $X_{e,cre}$  および  $AUC_{cre}$  を用いて  $CL_{cre}$  を求めた場合であっても、真の GFR と比較して値を過大評価してしまうと考えられている (45)。糸球体ろ過がある分子量以下の分子を透過させるサイズ選択的な排泄過程であるのに対し、分泌・再吸収は過程にはさまざまなトランスポーターが関与し、医薬品の臓器内への分布および排泄経路の寄与率を支配している (図 3B)。

過去、対象薬物投与時に  $CL_{cre}$  および外因性 GFR マーカーを同時定量した結

果、GFR に影響を与えない一方で、CL<sub>cre</sub>を一時的に低下させた薬物として、cimetidine (26)、pyrimethamine (46)、dronedarone (47) および AZD0837 (48) が報告されている。これらはいずれも薬物が creatinine の尿細管分泌を阻害したと考えられており、cimetidine 投与時の CL<sub>cre</sub> が真の GFR 近い値であると示した報告もある (26)。しかし、薬物による creatinine の尿細管分泌阻害と C<sub>cre</sub> の上昇を定量的に評価した例はない。

腎近位尿細管には多数のトランスポーターが発現している (図 3B)。このうち、トランスポーター発現細胞への取り込み試験によって creatinine は、有機カチオントランスポーターであるヒト OCT2 (49)、および近年、微生物の薬物排出機能を担うことで知られる MATE ファミリーのヒトホモログである MATE1 および MATE2-K で輸送が確認されている (50)。OCT2 は近位尿細管上皮細胞の基底膜、MATE1 および MATE2-K は刷子縁膜に発現し、両トランスポーターの機能連携により、効率的に種々カチオン性薬物の尿細管分泌が達成される (51)。

上記 *in vitro* の報告に加え、creatinine の尿細管分泌について *in vivo* で OCT2 および MATE1 の寄与を検討した報告例がいくつか存在する。Franke らによれば、Oat1/2 (-/-) mice に cisplatin を投与した場合には、Oat1/2 (+/+) mice と比較して cisplatin 由来の重篤な腎毒性 (52, 53) の発症頻度が低下し、同時に GFR を変動させることなく C<sub>cre</sub> の上昇を観測した (54)。また、Tsuda らによれば、Mate1 (-/-) mice は Mate1 (+/+) mice と比較して C<sub>cre</sub> が有意に上昇し、かつ CL<sub>cre</sub> が有意に低下した (55)。しかし同時に Mate1 (-/-) mice は BUN の有意な上昇も観測していることを考慮すると、creatinine の尿細管分泌に関して Oct2 はその関与が示唆され

た一方、MATE1 の寄与については検討の余地があると考えられた。

DX-619 による腎毒性の有無を早期に把握するために、臨床開発段階で DX-619 投与時の GFR を正確に見積もると同時に、血漿中クレアチニン濃度の上昇の作用機作を明らかにすることは非常に重要と考えられた。そこで、DX-619 投与時の  $CL_{cre}$  および GFR をそれぞれ正確に見積もり、DX-619 投与時の  $C_{cre}$  上昇が薬物性腎障害によるものか否かの検証するための臨床試験 (GFR study) を行った。すなわち DX-619 を 4 日間連続投与し (800 mg/日)、DX-619 投与前および投与最終日 (day 4) に  $CL_{cre}$  および、非イオン性ヨード造影剤 iohexol の腎クリアランス ( $CL_{iohexol}$ ) の変動を比較した (25)。GFR は内因性物質 (creatinine) あるいは、外因性物質 (イヌリン、チオ硫酸ナトリウム、EDTA 等) のクリアランス測定により観測可能である。これら外因性物質の特徴として GFR 測定に必要な条件、1) 血漿タンパクと結合しない、2) 糸球体でろ過される、3) 尿細管での分泌・再吸収がない (56)、が挙げられるが、iohexol においてもこれら条件を満たす。そして iohexol の腎クリアランスはイヌリンを用いた GFR 値とほぼ相関することが報告されている (57)。今回、当該目的に追加して、被験者の血漿中クレアチニン濃度、 $CL_{cre}$  および GFR ( $CL_{iohexol}$ ) を個別に解析し、DX-619 投与前後の creatinine の尿排泄パラメータの正確な算出を試みた。さらに、creatinine の尿細管分泌について、網羅的にトランスポーターの関与を検討することを目的として、ヒト OAT1-4, OCT1-3 発現  $S_2$  細胞およびヒト MATE1、MATE2-K 発現 HEK293 細胞を用いて creatinine の取り込み試験を実施した。また、基底膜側において尿細管分泌が強く示唆されるトランスポーターが複数認められた場合、

Matsushima ら (58) の手法にならいヒト腎スライス換算の取り込みクリアランスを算出し、それら腎薬物トランスポーターについて **creatinine** の輸送の寄与を計算した。血漿中クレアチニン濃度上昇が認められた被験者情報 (血漿中 DX-619 濃度、タンパク結合率、クレアチニンクリアランスなど) および *in vitro* 情報 (各トランスポーターの **K<sub>i</sub>** 値など) を、**creatinine** の腎尿細管分泌が **OCT2** と **MATE1/MATE2-K** により説明されるとの仮定のもと、数理モデルを用いて統合し、DX-619 による血漿中クレアチニン濃度上昇に関して定量的に理解するとともに、腎尿細管分泌における薬物間相互作用予測を行った。

## 結果

### hOAT1-4 および hOCT1-3 発現細胞を用いた creatinine の輸送実験

[<sup>14</sup>C]creatinine (5, 50, 250 μM)の hOAT1, hOAT2, hOAT3, hOAT4, hOCT1, hOCT2 および hOCT3 発現細胞への取り込み活性を観察した (図 5A)。hOAT3, hOAT4, hOCT2 および hOCT3 発現細胞への creatinine の取り込みは vector 導入細胞に比べて有意であった。一方、hOAT1, hOAT2 および hOCT1 発現細胞は、vector 導入細胞と比較して creatinine の取り込みに有意な差は観察されなかった。hOAT1, hOAT2, hOAT3, hOAT4, hOCT1, hOCT2 および hOCT3 発現細胞の輸送活性は、それぞれ [<sup>3</sup>H]PAH (hOAT1), [<sup>3</sup>H]PGF2α (hOAT2), [<sup>3</sup>H]ES (hOAT3, 4), [<sup>14</sup>C]TEA (hOCT1, 2) および [<sup>3</sup>H]histamine (hOCT3) の細胞内取り込みによって評価し、いずれも vector 導入細胞に比べ取り込みは有意であった。 [<sup>14</sup>C]creatinine の細胞内取り込みは、5 分まで直線的に増加した (図 5B)。さらに、creatinine の hOCT2 への取り込みの濃度依存性を評価し、速度論的パラメータを算出した (図 5C)。creatinine の hOCT2 への取り込みは飽和性を示し、Km は 56.4±3.4 mM と算出された。

### ヒト腎スライスのデータを用いた creatinine の基底膜トランスポーターに関わる寄与率の算出

上記で有意な取り込みが認められたトランスポーターのうち、ヒト尿細管上皮細胞に発現が認められているものは OAT3 と OCT2 である (59)。一方、ヒト腎切片への取り込みを試みた文献の情報 (58, 60, 61) および、上記で得られた



creatinine および典型基質の取り込みクリアランスを用いて、creatinine の腎切片への取り込みクリアランスを計算したところ、OAT3 および OCT2 でそれぞれ 0.017 および 0.49 ml/min/g kidney であった。

### **hOCT2, hMATE1 および hMATE2-K 発現細胞への<sup>14</sup>C]creatinine あるいは典型的基質の取り込みに及ぼす DX-619 および他の薬物の阻害効果**

[<sup>14</sup>C]creatinine の hOCT2 発現細胞への取り込みに対する DX-619, levofloxacin, grepafloxacin および moxifloxacin の阻害効果を観察した (図 6)。[<sup>14</sup>C]creatinine の取り込みはいずれの薬物においても濃度依存的に阻害された。[<sup>14</sup>C]creatinine の取り込み阻害に際し、Lineweaver-Burk plot を実施したところ DX-619 および grepafloxacin は競合阻害を観測し、 $K_i$  0.94  $\mu$ M および 10.4  $\mu$ M をそれぞれ得た (図 7A)。[<sup>14</sup>C]PAH、[<sup>3</sup>H]ES および[<sup>14</sup>C]TEA の hOAT1、hOAT3、hMATE1 および hMATE2-K 発現細胞への取り込みに対する DX-619 の阻害効果を観察した (図 7B-E)。DX-619 は hOAT1、hOAT3、hMATE1 および hMATE2-K それぞれの基質を濃度依存的に阻害し、 $K_i$  930 $\pm$ 184、241 $\pm$ 36、0.82 $\pm$ 0.14 および 0.10 $\pm$ 0.01  $\mu$ M をそれぞれ得た。

### **ヒト血漿中 DX-619 濃度から計算される、creatinine の hOCT2、hMATE1 および hMATE2-K を介した尿細管分泌に対する阻害効果**

各個体において血漿遊離型 DX-619 が hOCT2, hMATE1 および hMATE2-K を介した creatinine の uptake クリアランスはそれぞれ、投与前と比較してそれぞれ

0.09-0.17, 0.075-0.15 および 0.0098-0.021 まで低下した (表 3)。一方、grepafloxacin は 200 mg, 400 mg, 600 mg および 800 mg の場合でそれぞれ投与前の 0.98, 0.96, 0.94 および 0.90 にとどまった。

#### **GFR study の臨床データの解析**

DX-619 投与前および4日間反復投与後における腎機能パラメータを表4に示す。

DX-619 投与前および反復投与後の iohexol の全身クリアランス ( $GFR_{Day -1}$ ,  $GFR_{Day 4}$ ) の平均はいずれも  $98 \pm 14$  ml/min であった。一方、DX-619 投与前および反復投与後のクレアチニンクリアランス ( $CL_{cre, Day-1}$ ,  $CL_{cre, Day 4}$ ) は、 $132 \pm 25$  ml/min および  $91 \pm 29$  ml/min であった。

#### **数理モデルを用いた DX-619 投与時の血漿中クレアチニン濃度の simulation**

DX-619 および creatinine の消失に関する数理モデルを図 8 に示す。DX-619 は 1-compartment で消失し、また creatinine の血漿中濃度は平時には一定 (生成=排泄) であると仮定した。DX-619 の 4 日間反復投与直後には、尿細管分泌が完全阻害されたと仮定することで尿細管再吸収率 (FR) および分泌固有クリアランス ( $CL_{rs, int all}$ ) がそれぞれ  $0.16 \pm 0.15$  および  $72 \pm 41$  ml/min と求められた (表 4)。これらの値を本モデルでの初期値として使用し、これらの値を非線型最小二乗法で求め血漿中クレアチニン濃度を simulation した。体内からの creatinine の消失には糸球体ろ過および尿細管分泌が関与し、尿細管分泌に OCT2 のみ関与する場合 (Model 1)、および OCT2 および MATEs が関与する場合 (Model 2) に分けた

が、いずれも creatinine の実測値に対して simulation 値は比較的良好に fit した (図 9)。Fitting によって得られた FR および  $CL_{rs, int all}$  を表 4 に示す。GFR 比で、尿細管分泌は 31-59%、再吸収は 5-21% 存在することが確認された。

## 考察

本研究では、creatinine の尿細管分泌に OCT2 ならびに MATE1 および MATE2-K が関与するという仮定に基づいて、これらトランスポーターに対する阻害効果により、DX-619 投与時の血漿クレアチニン濃度上昇の説明を試みた。

過去の報告どおり (49, 50)、hOCT2 発現細胞では、creatinine の細胞内取り込みは vector 細胞に比べ有意に高かった (図 5)。加えて、hOAT3, hOAT4 および hOCT3 発現細胞での creatinine の細胞内取り込みも vector に比べ有意に高かった。この中で、OCT3 は肝臓を除き広く臓器に分布している (62)。一方、OAT4 は胎盤および近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に存在し (63)、尿細管での尿から血液への輸送の方向性を持っていることから、creatinine の尿細管再吸収への関与が示唆された。一方、OAT1, OAT2 および OCT1 発現細胞では vector 細胞と有意な差は観察されなかった。creatinine の OCT2 発現細胞への取り込みは時間依存性および飽和性を示し、Km 値は 56.4 mM であった (図 5)。この値は既報 (4.0 mM(49)) と比較して 10 倍以上高かったが、その原因は不明である。しかし、いずれの値を考慮しても Km 値は、平均的なヒト血漿中クレアチニン濃度 (1 mg/dl、88  $\mu$ M) よりも十分に大きく、ヒトにおいて creatinine の OCT2 を介した輸送は線形領域にあると言える。

前述のトランスポーターの中で、creatinine を基質とし、近位尿細管の基底膜に発現するトランスポーターは OCT2 と OAT3 である。OCT2 と OAT3 の寄与を評価するために、Relative Activity Factor (RAF) 法により、ヒト腎スライス換算の creatinine の腎取り込みクリアランスを計算したところ、OCT2 の寄与は OAT3

のそれと比較して高かった。従って、基底膜における creatinine の取り込みは主に OCT2 が関与していることが示唆された。

creatinine の OCT2 発現細胞に対する取り込みへの DX-619 および市販キノロン 3 種の阻害効果を比較した (図 6)。阻害効果は DX-619 が最も強く、次いで grepafloxacin、moxifloxacin および levofloxacin であった。これらキノロン薬はいずれも zwitter イオン構造を有するが、それぞれの酸解離定数は、DX-619 は  $pK_{a1}$  5.96 および  $pK_{a2}$  8.36、grepafloxacin は  $6.4 \pm 0.5$  および  $8.7 \pm 0.4$ 、moxifloxacin は  $6.4 \pm 0.5$  および  $10.6 \pm 0.2$  および levofloxacin は  $5.2 \pm 0.4$  および  $7.4 \pm 0.4$  (64)であり、取り込み試験時 (pH 7.4) には levofloxacin (anion 型) を除き、主に zwitter イオン型で存在し (64) OCT2 への阻害を発揮すると考えられた。また、anion 型である levofloxacin の OCT2 に対する阻害能が最も小さかったことから、cation 型の割合が OCT2 阻害に影響していると示唆された。OCT2 を介した creatinine 輸送の阻害効果が高い DX-619 および grepafloxacin について  $K_i$  を求めたところ、それぞれ  $0.94$  および  $10.4 \mu\text{M}$  であった (図 7)。Grepafloxacin は 200 および 400 mg 投与時に血漿中クレアチニン濃度の上昇が認められていない。そこで、DX-619 および grepafloxacin (200, 400 mg) について creatinine の取り込み残存活性  $1/(I_{\max,u}/K_i)$  を求めたところ、DX-619 では  $0.09 - 0.17$  であり、OCT2 を強く阻害するのに対して、grepafloxacin では  $0.98$  および  $0.96$  となり、臨床投与量での OCT2 阻害は無視できる程度である。これは臨床で grepafloxacin 投与によって血漿中クレアチニン濃度の上昇が認められていないことと一致している (表 3)。

次に、GFR study のデータについて、被験者個別に、 $CL_{\text{cre}}$ 、GFR、 $CL_{\text{rs,int}}$ 、FR

を求めた。GFR は DX-619 投与前後で変わらず  $98 \pm 14$  ml/min であったのに対し、DX-619 投与前および反復投与後のクレアチンクリアランス ( $CL_{cre, Day -1}$ ,  $CL_{cre, Day 4}$ ) は、 $132 \pm 25$  ml/min から  $91 \pm 29$  ml/min へと減少した (表 4)。Day 4 で creatinine の尿細管分泌が完全に阻害されたと仮定した場合、FR は  $0.16 \pm 0.15$  ml/min、 $CL_{rs, int}$  は  $72 \pm 41$  ml/min であったことから、creatinine の腎排泄には尿細管分泌に加え、尿細管再吸収が存在していることが示唆された。

DX-619 による  $C_{cre}$  の上昇に関して、実測された血漿中 DX-619 濃度 ( $C_{DX-619}$ ) を用いて、個体別に数理モデルを適用し、前述の初期値を free parameter として最小二乗法を行い、各個体での FR および  $CL_{rs, int}$  をそれぞれ決定した。このとき、creatinine が OCT2 のみを介して輸送される場合 (Model 1)、OCT2 に加えて MATE1 (Model 2a) あるいは MATE2-K (Model 2b) を介した場合に場合分けした。結果、いずれのモデルにおいても simulation は実測の  $C_{cre}$  とよく一致していることから、DX-619 による各トランスポーターの阻害は、血漿中クレアチニン濃度の増加を説明するにあたり十分であることが示唆された (図 9)。

今回、医薬候補品が GFR に影響を与えないことを確認できれば、当該化合物を用いた Phase 1 での  $C_{cre}$  は内因性の OCT2 あるいは MATEs のプローブとして有用であることが明らかとなった。これは、OCT2 あるいは MATEs 阻害能を有する医薬候補品について、DDI study を実施するかなり前に当該 DDI ポテンシャルの検討が可能なことを意味し、臨床開発戦略上、時間的なメリットが非常に大きい。同様の検討例として、nicotinamide の代謝物である N-methylnicotinamide (NMN) は内因性の MATEs 基質であり、MATE を介した薬物トランスポーター

の評価に有用であることが示されている (65)。レセプターや酵素等、薬効の標的として重要な生体タンパク表面はマイナスにチャージしていることから、これら生体タンパクとの相互作用を期待して意図的に塩基性を有した医薬品候補品を合成することは珍しくない。しかしその結果、医薬候補品が腎有機カチオントランスポーター阻害能を有してしまうケースは多々ある。そこで有機カチオントランスポーターの阻害能について、創薬早期に *in vitro* 細胞評価系で算出した  $K_i$  値と予測される臨床遊離型薬物濃度を比較して当該トランスポーターを介した薬物相互作用を予測することや、臨床早期のサンプルを用いて血漿中 *N*-methylnicotinamide および creatinine 濃度の変動を観測することは、薬物相互作用リスクを早期に把握するうえで重要である。今回、DX-619 は抗 MRSA 作用が期待される用量 (同 800 mg を想定) では、カチオン性薬物の腎排泄を阻害することが予想された。2型糖尿病薬である metformin (OCT2 および MATEs 基質 (50, 66)) を常時服用している糖尿病患者が MRSA を罹患した場合、DX-619 投与によって血漿中 metformin が上昇し、低血糖を誘発することが示唆される。また、cisplatin の腎毒性作用は同じく抗癌剤である imatinib (OCT2 阻害剤) によって軽減する報告があるが (67)、DX-619 も同様の作用を示すことが示唆された。

本章の結論として、creatinine は主に糸球体ろ過で尿排泄されるが、GFR の約 50%程度の割合で尿細管分泌も受け、さらに約 10%程度尿細管再吸収を受けることを考慮すると、creatinine の尿細管分泌阻害による血漿中 creatinine 濃度上昇を説明することが可能となった。DX-619 投与時の血漿中クレアチニン濃度の増加は DX-619 が腎有機カチオントランスポーターOCT2 および MATEs を阻害して

creatinine の尿細管分泌を低下させたと結論づけた (図 10)。同様の考察によって、cimetidine, pyrimethamine、trimethoprim、dronedarone および AZD0837 の臨床で血漿中クレアチニン濃度上昇 (46-48, 68) を説明できる可能性がある。事実、pyrimethamine および cimetidine による  $C_{cre}$  の上昇は、Ito らによってこれらの MATE 阻害が原因であることが報告されている (65, 69)。また dronedarone の米国の添付文書中 “WARNINGS AND PRECAUTIONS” の項目において、血漿中クレアチニン濃度上昇は尿細管分泌阻害による上昇によるものと明確に記載されている (70)。従って、今後 OCT2 あるいは MATE 阻害能を有した医薬候補品の添付文書を発行する際にはこれらの記載が必須になり、臨床での使用上および経営戦略上不利になることも想定され、このリスク評価として早期臨床サンプルを用いた *N*-methylnicotinamide および creatinine 評価が重要性になってくると思われる。

最後に、creatinine は内因性の OCT2 および MATEs のプローブとなり得ることから、プローブ薬を使った薬物相互作用試験の実施前に腎薬物トランスポーター阻害に起因した DDI の程度を把握できる可能性があり、FDA の薬物相互作用評価に関するガイダンス (30) に積極的に訴える価値があると考えられる。



表 3. DX-619 および grepafloxacin の血漿中濃度、Ki 値および、OCT2、MATE1、および MATE2-K に及ぼす阻害効果

DX-619 (800 mg) および grepafloxacin 投与時の最大血漿中濃度 ( $I_{max}$ )、血漿遊離型分率 ( $f_u$ ) および OCT2、MATE1、および MATE2-K 発現細胞を用いた阻害パラメータ ( $K_i$ ) をそれぞれ示している。また、 $R_{uptake}$  は各薬物投与時のトランスポーター残存活性  $1/(I_{max} \cdot f_u / K_i)$  を示している。

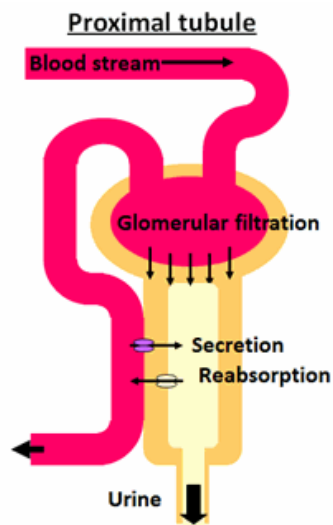
Compound	Dose (mg)	Plasma Concentration ( $I_{max}$ , $\mu\text{M}$ )	$f_u$ (%)	Ki ( $\mu\text{M}$ )	$R_{uptake}$	Creatinine elevation
DX-619 (i.v.)	800	16.17 – 29.64	29 – 34	hOCT2 0.94	0.09 – 0.17	Yes
				hMATE1 0.82	0.075 – 0.15	
				hMATE2-K 0.10	0.0098 – 0.021	
Grepafloxacin (p.o.)	200	$0.45 \pm 0.08$	50	hOCT2 10.4	0.98	no
	400	$0.93 \pm 0.18$			0.96	no
	600	$1.41 \pm 0.28$			0.94	no data
	800	$2.26 \pm 0.53$			0.90	no data

表 4. DX-619 投与前 (baseline) および 4 日間反復投与後 (day 4) の腎機能パラメータ

DX-619 (800 mg) 投与前後の糸球体ろ過速度 (GFR)、クレアチニンクリアランス ( $CL_{cre}$ )、creatinine の尿細管分泌クリアランス ( $CL_{rs}$ )、その  $CL_{cre}$  に占める割合 ( $f_{RS}$ )、creatinine の尿細管分泌固有クリアランス ( $CL_{rs,int}$ ) および再吸収率 (FR) をそれぞれ示している。各パラメータは creatinine の尿細管分泌が OCT2 のみ、OCT2/MATE1 および OCT2/MATE2-K がそれぞれ関与した場合について、DX-619 がそれらを阻害したと仮定した場合に fitting で求めた。

Subject No.	GFR (day)		CL <sub>cre</sub> (day)		Initial parameters				Model fitted with											
	-1	4	-1	4	(A) CL <sub>rs</sub>	(B) f <sub>RS</sub>	(C) CL <sub>rs,int</sub>	(D) FR	Model 1 (hOCT2)				Model 2a (hOCT2/hMATE1)				Model 2b (hOCT2/hMATE2-K)			
									(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)
1	88	94	107	52	105	98	123	0.44	113	106	135	0.47	53	49	57	0.24	37	35	39	0.14
2	95	84	117	68	50	42	55	0.19	93	79	112	0.38	51	44	56	0.20	35	30	38	0.10
3	91	96	132	81	65	49	72	0.16	44	34	47	0.03	41	31	44	0	41	31	44	0
4	107	112	128	135	21	16	21	0	62	48	68	0.24	41	32	44	0.14	32	25	33	0.08
5	123	117	158	114	40	25	42	0.03	105	67	124	0.31	61	39	67	0.14	44	28	47	0.05
6	117	118	180	100	95	53	117	0.15	77	43	90	0.07	63	35	72	0	63	35	72	0
7	95	84	131	111	36	27	38	0	72	55	80	0.21	43	33	46	0.05	36	27	38	0
8	90	86	104	57	67	65	74	0.34	119	115	144	0.50	60	57	65	0.30	42	41	45	0.21
9	88	93	150	132	62	42	71	0	62	41	70	0	62	41	70	0	62	41	70	0
10	106	111	149	75	115	77	147	0.33	43	29	47	0	43	29	47	0	43	29	47	0
11	76	82	98	73	34	34	36	0.11	37	37	39	0.13	26	26	27	0.04	21	22	22	0
Mean	98	98	132	91	63	48	72	0.16	75	59	87	0.21	49	38	54	0.10	41	31	45	0.05
SD	14	14	25	29	31	24	41	0.15	29	29	37	0.18	12	9	14	0.11	12	6	15	0.07

A



B

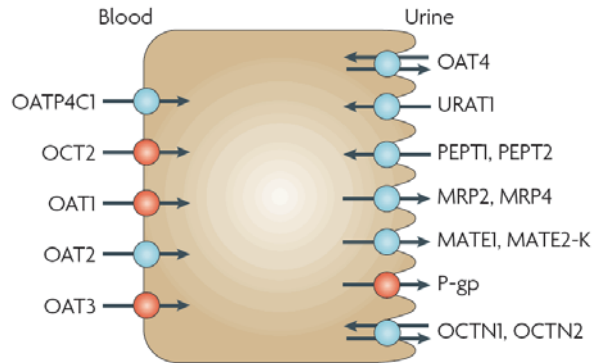


図 3. ネフロンにおける薬物の挙動

A. ネフロンは腎臓の機能単位で、腎小体と糸球体から成る。輸入細動脈よりネフロンに入った薬物はサイズ選択的な排泄過程である「糸球体ろ過」を受ける。アルブミンなどの蛋白に結合した薬物は糸球体ろ過を受けない。糸球体ろ過を受けなかった薬物は近位尿細管で「尿細管分泌」を受け尿中に排泄される。また、一度糸球体ろ過をうけた後に再び血液中へ移行する「尿細管再吸収」を受ける薬物も知られている。B. 分泌および再吸収にはトランスポーターが関わっている。(59)

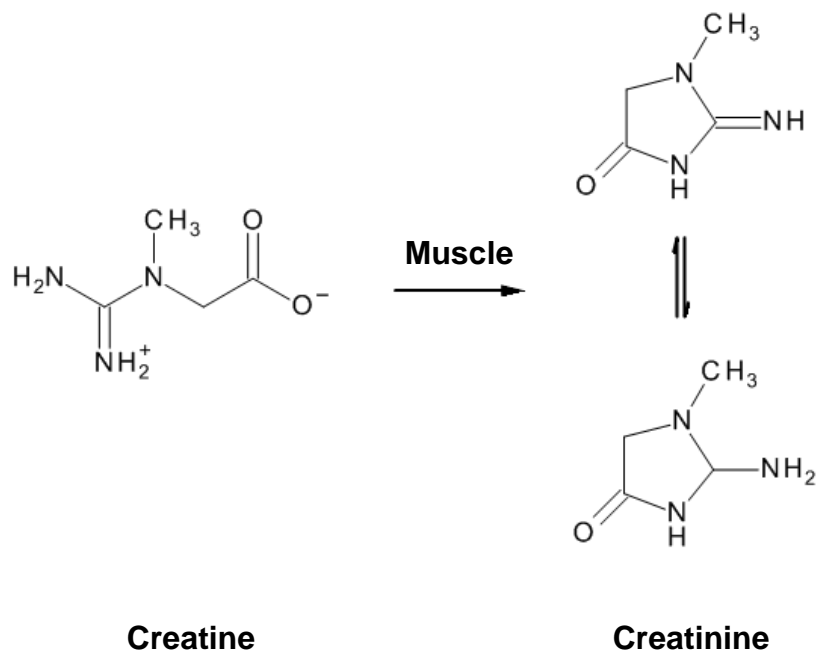


図 4. Creatine と creatinine

Creatine は肝臓で生合成され、生体内でクレアチンリン酸に変換され貯蔵されるが、一方、筋肉で非可逆的な非酵素的脱水を経て creatinine になる。(27)。

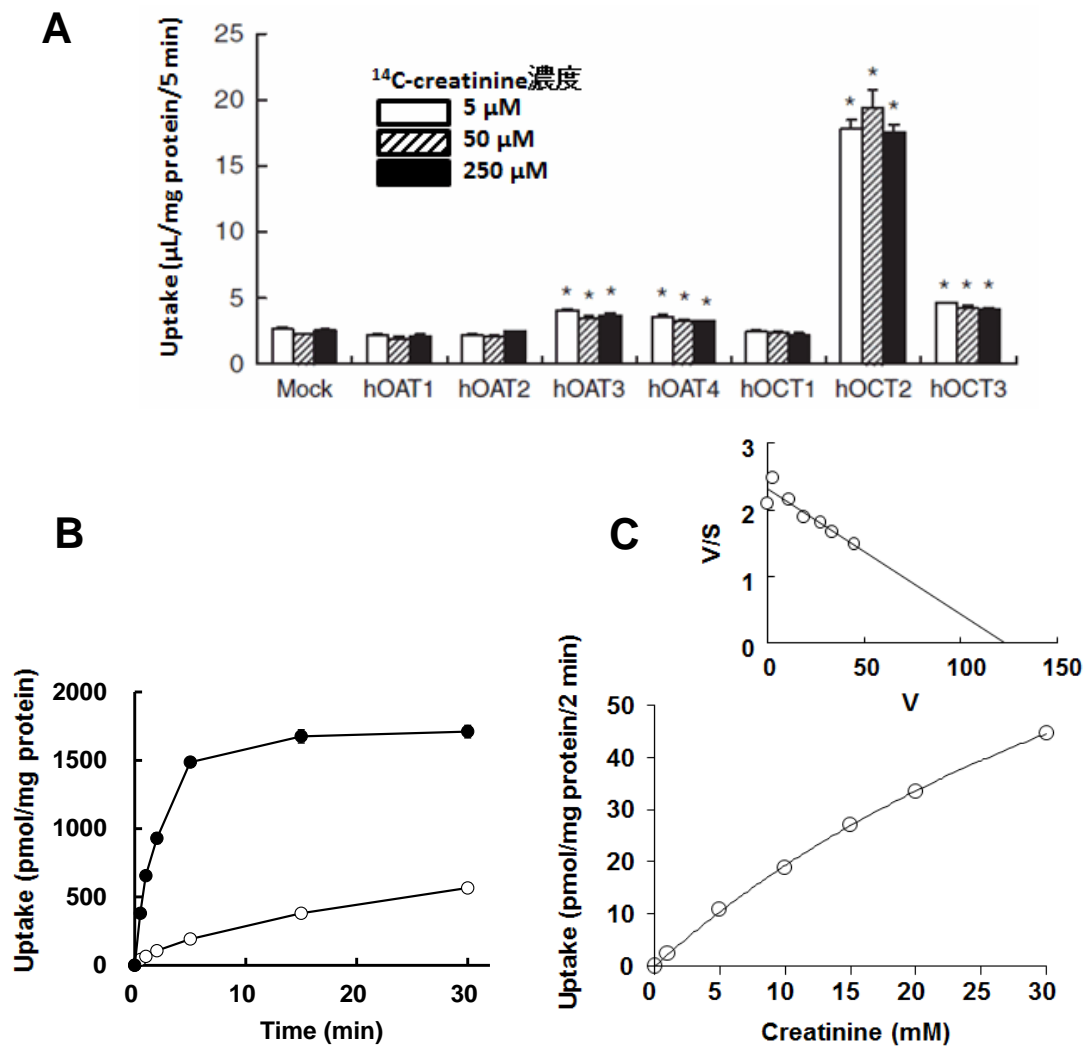


図5. [<sup>14</sup>C]creatinine の各種薬物トランスポーターへの取り込み、および OCT2

取り込みに対する時間および濃度依存性

(A) [<sup>14</sup>C]creatinine (5, 50, 250 μM) の各種薬物トランスポーター発現 S<sub>2</sub>細胞に対

する5分間の取り込みを測定した。(B) OCT2発現 S<sub>2</sub>細胞への [<sup>14</sup>C]creatinine (50

μM) 取り込みの時間依存性を、(C) 2分間における取り込みの濃度依存性 (1-30

mM) をそれぞれ測定した。(C下段) Michaelis-Menten 式に従い、最小二乗法によ

り求められた fitting line を実線で示している。(C上段) Eadie-Hofstee plot を示し

ている。\*; P<0.05

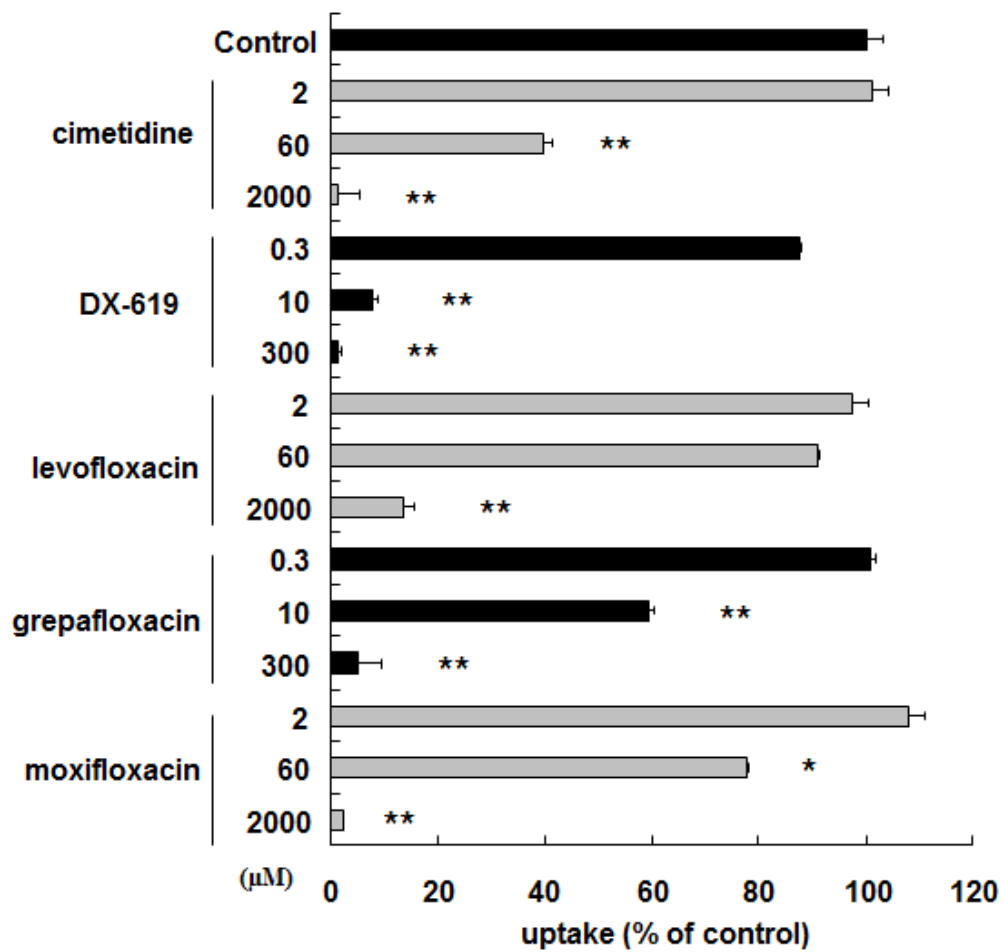


図 6.  $[^{14}\text{C}]$ creatinine の OCT2 取り込みに対する阻害効果

$[^{14}\text{C}]$ creatinine (50  $\mu\text{M}$ ) の OCT2 発現  $\text{S}_2$  細胞への取り込みに対する各種薬物の阻害効果を測定した。縦軸は 2 分における OCT2 取り込み値から mock への取り込み値を差し引いた値 (control) に対する割合を示している。\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$

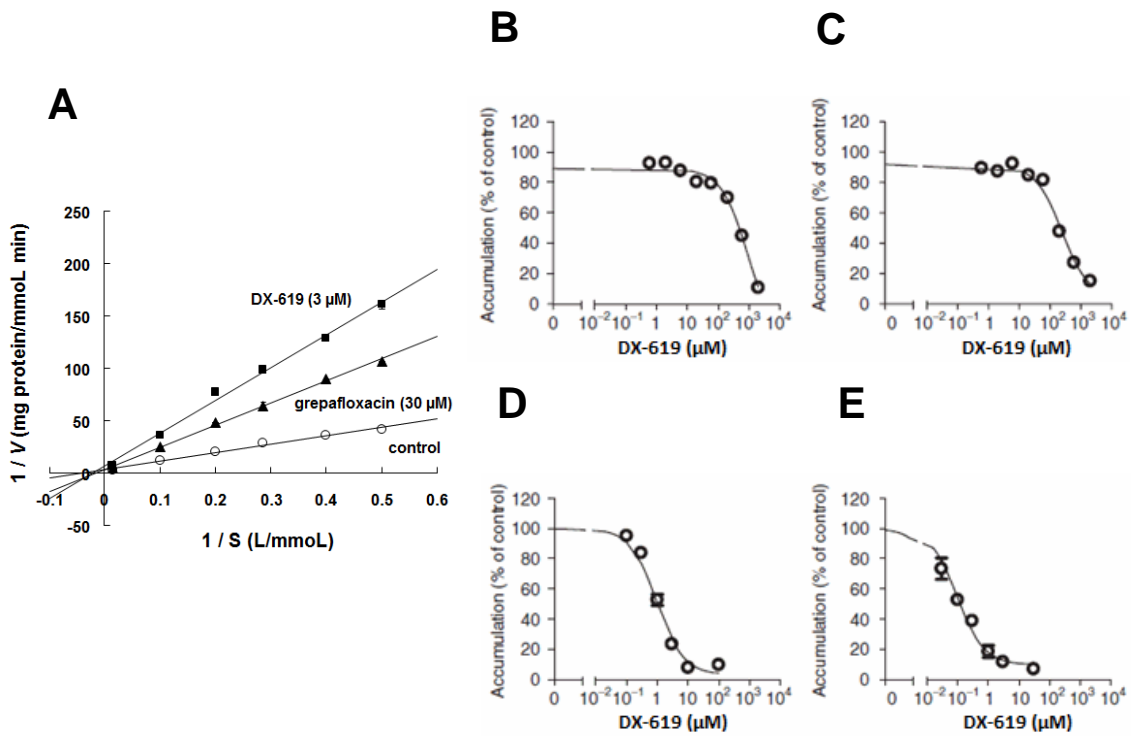


図 7. DX-619 の各種薬物トランスポーターに対する阻害効果

(A)  $[^{14}\text{C}]$ creatinine (2-70 mM, 5 min) の OCT2 発現 S<sub>2</sub> 細胞への取り込みに対する control、DX-619 (3 μM)、grepafloxacin (30 μM) の阻害効果を測定した。(B) OAT1 ( $[^{14}\text{C}]$ PAH, 5 μM, 2 min)、OAT3 [ $^3\text{H}$ ]ES, 5 nM, 2 min)、MATE1、MATE2-K ( $[^{14}\text{C}]$ TEA, 30 μM, 5 min) 発現 HEK293 細胞への取り込みに対する DX-619 の効果を測定した。A は Lineweaver-Burk plot を示している。B-E の縦軸は発現細胞での取り込み値から mock への取り込み値を差し引いた値 (control) に対する割合を示している。





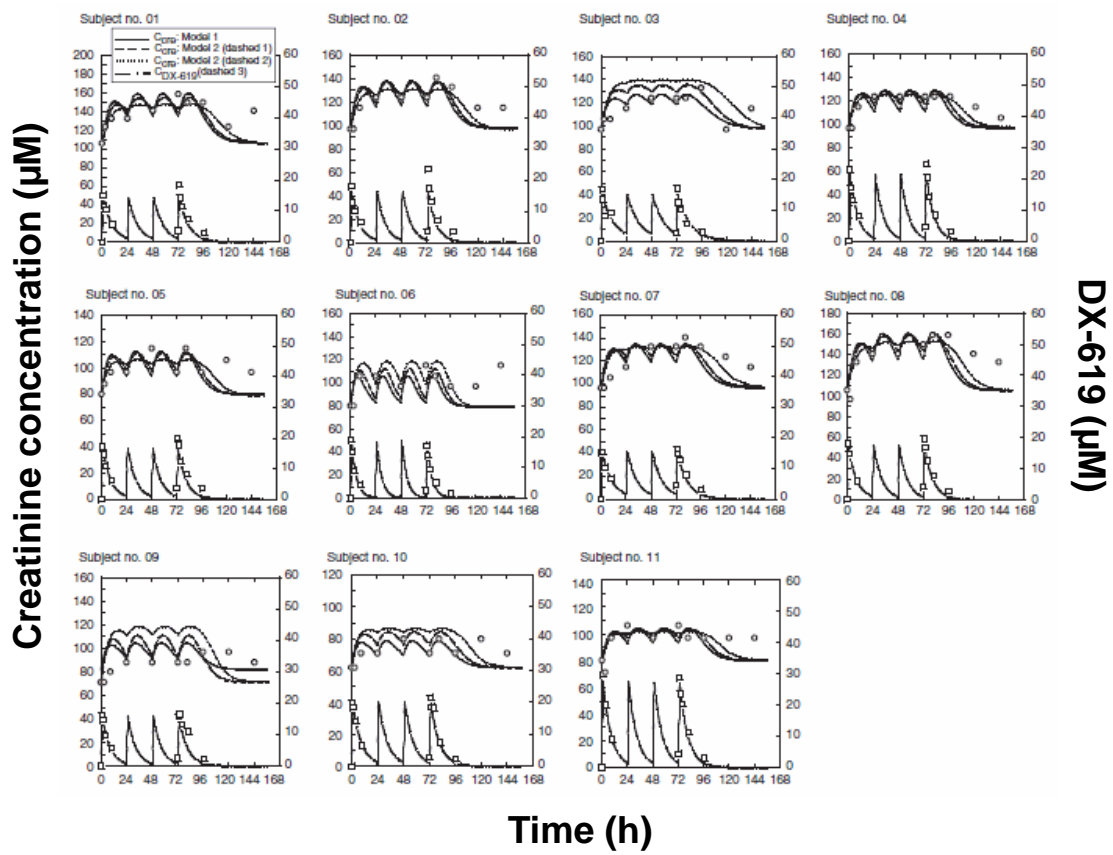


図 9. DX-619 反復投与時の血漿中クレアチニン濃度推移の simulation

DX-619 投与時の creatinine 上昇に関する微分方程式について、血漿中クレアチニン濃度の実測値に対して fitting を行い、分泌固有クリアランス ( $CL_{rs,int all}$ ) および再吸収率 (FR) を非線形最小二乗法で求めた。

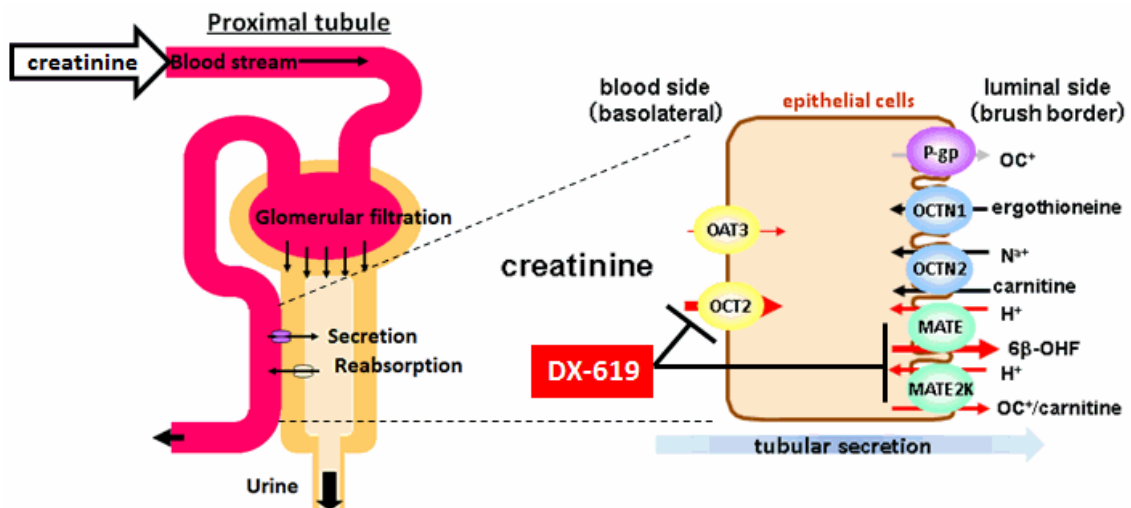


図 10. 考えられる creatinine の腎排泄の模式図

Creatinine の腎排泄には糸球体に加えて尿細管分泌の関与が考えられる。尿細管分泌にはトランスポーターが関わっており、血液側からの取り込みには OCT2 が、管腔側への排泄過程には、MATE1 および MATE2-K の関与が考えられ、DX-619 (800 mg) はその両方を阻害すると考えられる。

## 第2章

*In vitro* 試験に基づいた DX-619 の  
Mechanism-based Inhibition (MBI) による  
*in vivo* 肝 CYP3A4 阻害能の定量的予測

### 第1節

DX-619 投与時の CYP3A4 に対する  
薬物相互作用リスクの評価

## 要約

Mechanism-based inhibition (MBI) は活性代謝物が代謝酵素と共有結合することで酵素が失活し、当該酵素で消失する薬物の血漿中濃度の上昇をもたらすため、臨床では重篤な副作用につながりやすい。ヒト肝ミクロソーム (HLM)において、各種キノロン薬の preincubation 後における midazolam の 1'-hydroxylation 活性を求めたところ、14 種のキノロン薬のうち DX-619 のみにおいて活性が強く低下し MBI が認められた。また、CYP3A4 Supersomes™を用いた検討においても同様に DX-619 存在下で midazolam の 1'-hydroxylation 活性低下が認められたため、DX-619 の MBI は CYP3A4 阻害によるものと考えられた。Midazolam の 1'-hydroxylation 活性は preincubation 時間および DX-619 濃度依存的に低下し、 $k_{inact}$  は  $0.0730 \pm 0.0033 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_I$  は  $59.8 \pm 6.5 \text{ }\mu\text{M}$  と算出された。DX-619 投与時 (1200 mg, 反復 15 日投与) の肝臓中 CYP3A4 含量に関する physiologically-based pharmacokinetic model (PBPK model) を構築したところ、肝臓中 CYP3A4 を最大で平時の 25-53% にまで低下させると予測された。一方、糖質コルチコイドである cortisol (F) とその CYP3A4 による 6 $\beta$ -水酸化体、6 $\beta$ -hydroxycortisol (6 $\beta$ -OHF) より求まる cortisol の見かけの 6 $\beta$  水酸化クリアランス ( $CL_{6\beta\text{-OHF}} = X_{6\beta\text{-OHF}}/AUC_F$ ) を同臨床サンプルを用いて求めたところ、placebo の最大 27% にまで低下し、上記 PBPK model の予測結果とほぼ一致した。

## 序論

チトクロム P450 (CYP) を介した薬物相互作用 (drug-drug interaction; DDI) は、阻害薬が被相互作用薬の血漿中濃度の変動を惹起した結果、被相互作用薬の薬効不足あるいは過剰暴露による毒性発現をもたらすため (71)、製薬企業においては開発リスク要因の 1 つとして認識されている。そこで、創薬初期の非臨床段階でそのポテンシャルを見出すべく *in vitro* および modeling & simulation での評価法が種々提案されており (6)、また FDA のドラフトガイダンスによれば DDI が創薬で確認された場合の検証フローについて、*in vitro* 評価～ヒト DDI study に至るまでの decision tree が提唱されている (30)。

チトクロム P450 (CYP) における薬物相互作用は、主に競合阻害、非競合阻害、誘導および MBI の 4 種が知られている。競合阻害は、阻害剤分子が基質分子と競合して基質結合部位を取り合う。そのため相対的に CYP 分子種に対する親和性の低い薬物の代謝が阻害されその結果血漿中濃度が上昇する (72)。非競合阻害は、窒素原子を含む複素環が CYP タンパクのヘムの第 6 配位子に結合することで、非特異的に複数の CYP 分子種を阻害する (32)。誘導は、薬物が PXR など核内受容体と複合体を形成し CYP の転写を促進して、CYP タンパクが増加することで併用薬物の代謝が促進される (73)。そして MBI は、代謝により生成した活性代謝物が CYP のアポ蛋白あるいはヘムと不可逆的に共有結合する結果、不可逆的に CYP の不活化をもたらす阻害様式である (74)。従って MBI を有する薬物を服用した場合、生体が再び平時と同等の CYP 代謝活性環境を得るまでには時間を要する。そこで MBI を有する医薬品を併用して服用することで被相

相互作用薬の血漿中濃度が急激に上昇し重篤な副作用が発現した結果、市場の撤退をよぎなくされた事例が複数報告されている (5, 36)。

CYP3A4 は、主要な異物解毒臓器である肝臓における総 CYP 量の 30% 近くを占め、承認医薬品の実に 50% が CYP3A4 による代謝を受ける (75)。また、CYP3A4 は小腸にも豊富に発現していることが知られており、経口投与した薬物の初回通過における代謝に重要な役割を果たしている (76)。このように医薬候補品が CYP3A4 に対する阻害能を有することは、開発戦略を左右することがある。ヒト DDI study は、阻害薬の DDI 能力に関して、被薬物相互作用の血漿中濃度の変動を定量的に評価する手法であり、主として健常人に投与して実施される臨床薬理試験のひとつである。例えば、CYP3A4 の場合、midazolam (CYP3A4 のプローブ薬) を被薬物相互作用として、阻害薬併用投与時の midazolam の血漿中濃度の変動を観測する場合がある (77)。Midazolam と同様、CYP3A4 の被薬物相互作用として triazolam が使用されることがあるが、阻害剤によって triazolam の血漿中濃度が阻害剤非投与時と比較して上昇した場合には、triazolam の薬効の延長症状である眠気を生じるときがある (31)。このように、DDI study は被害薬物の動態変化を評価する試験であるがゆえに、被験者に対して被薬物相互作用の薬理作用を発揮させてしまうことがあるため、ヒト DDI 研究には、非臨床の段階での精密なヒト PK 予測と実際の DDI study での慎重な実施が要求される。

一方、DDI study の対象となっている薬物代謝酵素が内因性物質の代謝過程に関与するケースも種々報告されており (78, 79)、内因性物質を CYP プローブとして DDI 評価に利用することが試みられている。これまで糖質コルチコイド

cortisol (F) とその CYP3A4 による 6 $\beta$  水酸化体、6 $\beta$ -hydroxycortisol (6 $\beta$ -OHF) の尿中濃度比 ( $R_{6\beta\text{-OHF/F}}$ ) が、CYP3A4 の発現誘導能評価として汎用されてきた (80)。例えば Eeckhoudt らは、CYP3A4 の誘導剤として知られる rifampicin をヒトに 6 日間連続投与し、さらに投与最終日に CYP3A4 のプローブである midazolam を投与したところ、midazolam の 1'-hydroxylation クリアランスと  $R_{6\beta\text{-OHF/F}}$  は良好な相関を示した (81)。しかし、 $R_{6\beta\text{-OHF/F}}$  が定性的な評価に過ぎず、reversible inhibition (RI) および MBI 等の CYP3A4 の阻害評価に  $R_{6\beta\text{-OHF/F}}$  が利用された例は若干あるものの、その評価に対する異論も多い (28, 82)。そこで、cortisol の見かけの 6 $\beta$  水酸化クリアランス (尿中 6 $\beta$ -OHF 量を血漿中 cortisol の AUC で除したもの:  $CL_{6\beta\text{-OHF}} = X_{6\beta\text{-OHF}}/AUC_F$ ) が  $R_{6\beta\text{-OHF/F}}$  の改良法として RI および MBI の評価法として取り入れられつつある (28, 29)。例えば、Peng らは、CYP3A4 の非競合阻害剤である itraconazole (32) をヒトに単回投与 (50, 200, 400 mg, p.o.) したところ、itraconazole の用量増加に伴い  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  は低下し、投与後 7 日目で回復していることを示した (34)。また、Furuta らは、CYP3A4 に対して MBI を有する clarithromycin (33) をヒトに 6 日間反復投与 (200 mg, p.o.) したところ、投与 1 日目から  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の低下を観測し、さらに  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の低下が投与後 3 日目で定常に達し、休薬後 7 日目で baseline まで復帰したことを示した (28)。このように、CYP3A4 阻害能を有する薬物投与時には  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  が低下することが観測されており、その biomarker としての有用性が示されつつある。

DX-619 は、創薬初期のヒト肝ミクロソーム (HLM) を用いた試験で CYP3A4 の MBI 能を有していることを把握していたが、開発戦略上の risk & benefit の観

点から臨床開発が続行された経緯がある。MBI は、活性代謝物が代謝酵素と共有結合することで酵素が失活し、当該酵素で消失する薬物の血漿中濃度の上昇をもたらすことから、併用薬による重篤な副作用が発現しやすく、臨床およびマーケットに対するインパクトが極めて大きい (35, 36)。DX-619 においても同様なリスクを有していることが示唆されたため、DX-619 の MBI リスクについて、2 つのアプローチから評価した。まず、Phase 1 (反復投与) で得られた血漿中 DX-619 濃度、および *in vitro* での MBI に関する阻害パラメータを用いて physiologically-based pharmacokinetic model (PBPK model) によって肝臓中の活性型 CYP3A4 量 ( $E_{act}$ ) を見積もった。次いで、同 Phase 1 での血漿中 cortisol および尿中 6 $\beta$ -OHF から  $CL_{6\beta-OHF}$  を算出し、DX-619 投与時の *in vivo* CYP3A4 活性について  $E_{act}$  と比較した。さらに 6 $\beta$ -OHF の腎クリアランス ( $CL_{renal, 6\beta-OHF}$ ) の算出を試みた。

MBI では阻害剤濃度だけではなく、マイクロソームとの preincubation 時間に依存して酵素活性は低下する。これは阻害剤もまた酵素の基質となっており、経時的に阻害剤の代謝が進むと生成された代謝物は酵素と共有結合し酵素を不活化するためである。このときの酵素活性の低下 (y 軸) を preincubation time (x 軸) に対してプロットし、その傾き ( $k_{obs}$ ) を阻害剤濃度に対してプロットしたときの最大値が  $k_{inact}$ 、 $k_{obs}$  が  $k_{inact}$  の半分になる阻害剤濃度が  $K_i$  となる (83)。Ito らは、活性型酵素の量 ( $E_{act}$ ) に関する微分方程式を立て、その中に、阻害剤の肝臓中濃度、 $k_{inact}$ 、および  $K_i$  などを組み、*in vitro* データから被薬物相互薬の MBI による体内動態変化を simulation し、*in vivo* で認められた被薬物相互薬の阻害剤によ



る血漿中濃度推移と比較した (33)。このように、*in vitro* で認められた MBI が *in vivo* で被薬物相互薬へ及ぼす影響を予測する試みが種々実施され (84)、今では MBI 評価のリスク評価として FDA のガイダンスに組み込まれている (30)。

そこで、DX-619 に関しても同様に PBPK model による CYP3A4 含量の予測に加え、*in vivo* での CYP3A4 の活性指標を評価し、両者を比較することとした。

## 結果

### HLM および CYP3A4 Supersomes™を用いた midazolam 1'-hydroxylation 活性

HLM において、各種薬物 (100  $\mu\text{M}$ ) の 0 分および 15 分 preincubation 後における midazolam の 1'-hydroxylation 活性を求めた (表 5)。DX-619 の残存活性は 0 分で  $82.0 \pm 6.1\%$ 、15 分で  $25.0 \pm 1.2\%$  と preincubation によって 69.5% の活性低下が認められた。DX-619 以外のキノロン薬については levofloxacin、sparfloxacin、および trovafloxacin において、preincubation による有意な活性低下が認められたものの、いずれも 20% 未満の活性低下にとどまった。Azithromycin、clarithromycin および erythromycin はそれぞれ、preincubation によって有意な活性低下が認められ、これは既報 (33) と一致した。一方、CYP3A4 Supersomes™を用いた検討では、DX-619、clarithromycin および troleandomycin でそれぞれ 15 分 preincubation によって 59.3、42.2 および 68.6% の活性低下が認められた (表 6)。DX-619 による midazolam の 1'-hydroxylation 活性は preincubation 時間および DX-619 濃度依存的に低下し (図 11A)、 $K_I$  および  $k_{\text{inact}}$  はそれぞれ  $67.9 \pm 7.3 \mu\text{M}$  および  $0.0730 \pm 0.0033 \text{ min}^{-1}$  と算出された (図 11B)。また、HLM 中の DX-619 の非結合型分率 ( $f_{u, \text{HLM, DX-619}}$ :  $0.881 \pm 0.014$ ) を考慮すると、 $K_I$  は  $59.8 \pm 6.5 \mu\text{M}$  と補正された。

### DX-619 投与時の肝臓中 CYP3A4 含量 ( $E_{\text{act}}$ ) の simulation

血漿中 DX-619 濃度推移 (day 1) に基づいた DX-619 の PK パラメータおよび PBPK model を用いて、肝臓中の活性型 CYP3A4 含量 ( $E_{\text{act}}$ ) を求めた (図 12)。なお、simulation には現在報告されている 3 種の CYP3A4 に関する不活化速度定

数 ( $k_{deg}$ ) を用いた。 $E_{act}$  は day 1 の DX-619 投与後より速やかに減少し、その減少は定常に達した。 $E_{act}$  の低下は最大で  $k_{deg}$   $0.000481 \text{ min}^{-1}$  のとき 128 h で平常時の 53.3% に、 $k_{deg}$   $0.000321 \text{ min}^{-1}$  のとき 152 h で 43.8% に、 $k_{deg}$   $0.000136 \text{ min}^{-1}$  のとき 200 h で 25.4% にそれぞれ達した。

### **DX-619 投与時の血漿中 cortisol および 6 $\beta$ -OHF、尿中 6 $\beta$ -OHF への影響**

Cortisol および 6 $\beta$ -OHF の血漿中濃度推移を測定した (図 13)。DX-619 投与群における cortisol の  $C_{max}$  は placebo と比較して 2.4 倍高く ( $P=0.0868$ )、また、血漿中 cortisol の AUC は placebo 群と比較して、わずかに上昇したが (表 7、day 1; 115%,  $P=0.0919$ 、day 15; 105%、 $P=0.4049$ )、6 $\beta$ -OHF においてはほとんど変化しなかった (day 1; 104%,  $P=0.5167$ 、day 15; 105%、 $P=0.5059$ )。

DX-619 投与時の尿中 6 $\beta$ -OHF 量は placebo と比較して day 1 ( $P<0.05$ ) および day 15 ( $P<0.01$ ) とともに有意に低かった (図 14A、表 7)。 $CL_{6\beta-OHF}$  は DX-619 投与によって day 1 では若干の低下が認められた (図 14B、 $P=0.0546$ )。一方、投与 15 日後には、 $CL_{6\beta-OHF}$  が placebo と比較して最大 27% に低下した ( $P<0.01$ )。 $CL_{renal,6\beta-OHF}$  は、DX-619 投与によって day 1 および day 15 とともに有意に低下した ( $P<0.05$ 、図 15、表 7)。6 $\beta$ -OHF の血漿遊離型分率は、 $0.192\pm 0.012$  (6 $\beta$ -OHF の血漿添加時; 200 nM) および  $0.208\pm 0.016$  (50 nM) であり、GFR を 98 ml/min とした場合 (85)、 $CL_{renal,6\beta-OHF}$  は糸球体ろ過速度 ( $f_u \cdot \text{GFR}$ : 20.4 ml/min) よりも大きく、6 $\beta$ -OHF は尿細管分泌を受ける。また、DX-619 投与時の  $CL_{renal,6\beta-OHF}$  は  $f_u \cdot \text{GFR}$  にまで低下していた。

## 考察

*In vitro* 代謝試験および DX-619 のヒト血漿中濃度を用いた PBPK model、および DX-619 をヒト投与時の見かけの  $6\beta$  水酸化クリアランスに基づいて、MBI に由来した DX-619 の肝 CYP3A4 を介した薬物相互作用リスクを評価した。

HLM において各種キノロン薬の preincubation 前後における midazolam の 1'-hydroxylation 活性を求めたが、その残存活性が強く低下し MBI が認められたのは DX-619 のみである (表 5、図 11)。また、CYP3A4 Supersomes™を用いた検討において、DX-619、clarithromycin および troleandomycin (clarithromycin および troleandomycin は CYP3A4 に対する MBI を有している) は、preincubation によって midazolam の 1'-hydroxylation 活性低下が認められたため、これらの MBI は CYP3A4 阻害によるものと考えられた (表 6)。DX-619 による midazolam の 1'-hydroxylation 活性は preincubation 時間および DX-619 濃度依存性に基づいて、MBI に関連した速度論パラメータを決定した (図 11、 $K_I$ :  $67.9 \pm 7.3 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{inact}}$ :  $0.0730 \pm 0.0033 \text{ min}^{-1}$ )。本パラメータと、DX-619 のヒト PK パラメータおよび PBPK model を用いて、DX-619 服用時の肝臓中の活性型 CYP3A4 含量 ( $E_{\text{act}}$ ) の simulation を行った。DX-619 投与によって、placebo の最大 25.4-53.3%にまで低下することが示唆された (図 12)。

被験者の血漿中 cortisol ならびに、尿中  $6\beta$ -OHF を測定した (図 13、14)。血漿中 cortisol 濃度は DX-619 投与によって若干上昇したが、血漿中  $6\beta$ -OHF 濃度は変化しなかった。一方、DX-619 投与時の尿中  $6\beta$ -OHF 量は placebo と比較して有意に低く、それに伴い  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  は DX-619 投与後 15 日間で placebo と比較し

で最大 27%に低下した。先に述べた  $E_{act}$  低下率は CYP3A4 の不活化速度定数 ( $k_{inact}$ ) に影響を受ける。 $k_{inact}$  は、rifampicin 等による CYP3A4 の誘導から baseline への復帰時間 (86)あるいは、CYP3A4 の阻害による活性低下からの baseline への復帰時間 (87, 88) 等、*in vivo* での薬物添加によって肝臓中 CYP3A4 量を変動させた後、その回復にかかる時間から求めるのが一般的である。今回、DX-619 による  $CL_{6\beta-OHF}$  の低下 (placebo の 27%) に対して最も近い  $E_{act}$  の低下を示したのは  $0.00123 \text{ min}^{-1}$  を用いた場合 (control の 25.4%) であった。

被験者における  $6\beta-OHF$  の腎クリアランスを測定した (図 15)。Placebo 群における  $CL_{renal,6\beta-OHF}$  は  $84.8 \pm 27.3$  (day 1) および  $78.0 \pm 24.3$  (day 15) であり、糸球体ろ過速度 ( $f_u \cdot GFR$ ,  $20.4 \text{ ml/min}$ ) よりも高く、 $6\beta-OHF$  が尿細管分泌を受けていることを示している。さらに DX-619 投与によって  $CL_{renal,6\beta-OHF}$  は  $f_u \cdot GFR$  近くまで低下しており、 $6\beta-OHF$  の尿細管分泌が DX-619 によって完全に阻害されたと示唆された (図 15)。

ところで、 $CL_{6\beta-OHF}$  は下式で定義される。

$$CL_{6\beta OHF} = \frac{X_{e,6\beta-OHF}}{AUC_{cortisol}} = CL_{CYP3A4} \cdot \frac{CL_{renal,6\beta-OHF}}{CL_{tot,6\beta-OHF}} \quad (2 \text{ 式})$$

ここで、 $CL_{CYP3A4}$  および  $CL_{tot,6\beta-OHF}$  はそれぞれ、真の cortisol の  $6\beta$  水酸化クリアランスおよび  $6\beta-OHF$  の全身クリアランスを示している。2 式によれば、 $CL_{renal,6\beta-OHF}$  および  $CL_{tot,6\beta-OHF}$  の変動は  $CL_{6\beta-OHF}$  に影響を与えることを示している。また、 $6\beta-OHF$  の尿排泄が全身クリアランスにどの程度寄与しているかは明らかとなっていないが、A)  $6\beta-OHF$  の尿排泄が主排泄経路であった場合には、 $6\beta-OHF$  の尿細管分泌阻害による尿排泄低下は、血漿中  $6\beta-OHF$  の上昇および  $CL_{renal,6\beta-OHF}$

の低下をもたらすと予想される。しかしこの場合は、これら変動が  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  に与える影響は小さいと考えられる。一方、B) 尿排泄が主排泄経路でなかった場合には、 $6\beta\text{-OHF}$  の尿細管分泌阻害による尿排泄低下によって  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の低下を招き、肝 CYP3A4 活性の低下を過大評価してしまうと考えられる。第 1 章で述べたように、DX-619 (800 mg, iv infusion) は腎薬物トランスポーター (OCT2 および MATEs) を十分阻害し得る。 $6\beta\text{-OHF}$  がこれらトランスポーターを介して尿細管分泌され、かつ、 $6\beta\text{-OHF}$  の主排泄経路が尿排泄でなかった場合には、DX-619 (1200 mg, iv infusion) によって  $6\beta\text{-OHF}$  の尿細管分泌阻害が起こり、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  が低下することがあり得る ( $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の overestimation)。

そこで、次節では、 $6\beta\text{-OHF}$  の腎排泄メカニズムおよび各種薬物の  $6\beta\text{-OHF}$  の腎排泄に及ぼす影響を検討することとした。

表 5. HLM を用いた各種薬物の midazolam 1'-hydroxylation 阻害活性

HLM と各種薬物の preincubation の有無により 1'-hydroxymidazolam 生成に関する残存活性を算出した。15 min は 15 分 preincubation 後の midazolam 1'-hydroxylation 残存活性の vehicle 比を、0 min は preincubation を実施しない場合の midazolam 1'-hydroxylation 残存活性の vehicle 比をそれぞれ示している。MBI は、15 min / 0 min により算出した。(N=3)、\*;  $P < 0.05$

	CYP3A4 remaining activity (% of control)	
	Preincubation time (min)	
	0 min	15 min
Quinolone antimicrobials		
Ciprofloxacin	81.8±5.3	67.7±4.3
DX-619	82.0±6.1	25.0±1.2*
Enoxacin	92.9±6.8	69.6±1.1
Gatifloxacin	110.7±5.3	102.9±0.6
Gemifloxacin	88.7±6.5	76.7±3.6
Greprofloxacin	103.7±1.6	97.0±0.8
Levofloxacin	85.9±0.6	69.7±0.1*
Lomefloxacin	101.8±1.0	99.5±0.7
Moxifloxacin	92.0±6.3	79.2±5.2
Norfloxacin	95.4±4.8	84.7±1.8
Pazufloxacin	111.5±4.1	101.1±1.2
Sparfloxacin	98.3±1.0	81.9±1.8*
Tosufloxacin	119.0±1.3	117.7±2.1
Trovafloxacin	109.1±0.5	92.9±0.8*
Macrolides		
Azithromycin	87.1±1.8	76.5±0.7*
Clarithromycin	102.5±1.0	42.8±0.4*
Erythromycin	102.2±2.7	43.4±0.7*

**表 6. CYP3A4 Supersomes™を用いた各種薬物の midazolam 1'-hydroxylation 阻害活性**

CYP3A4 Supersomes™ と各種薬物の preincubation の有無により 1'-hydroxymidazolam 生成に関する残存活性を算出した。15 min は 15 分 preincubation 後の midazolam 1'-hydroxylation 残存活性の vehicle 比を、0 min は preincubation を実施しない場合の midazolam 1'-hydroxylation 残存活性の vehicle 比をそれぞれ示している。MBI は、15 min / 0 min により算出した。(N=3)、\*;  $P < 0.05$

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	CYP3A4 remaining activity (% of control)	
		Preincubation time (min)	
		0 min	15 min
DX-619	100	108 $\pm$ 4	44.0 $\pm$ 2.0*
Clarithromycin	100	64.7 $\pm$ 0.3	37.4 $\pm$ 1.3*
Troleandomycin	30	59.9 $\pm$ 1.9	18.8 $\pm$ 0.5*



表 7. DX-619 投与が血漿中 cortisol および 6β-OHF、尿中 6β-OHF に与える影響

DX-619 投与時および非投与時 (placebo) の血漿中 cortisol および 6β-OHF 濃度推移から求まる AUC、尿中 6β-OHF 排泄量 ( $X_e$ ) をそれぞれ示している。また、 $CL_{6\beta-OHF}$ 、 $CL_{renal,6\beta-OHF}$ 、 $f_u \cdot GFR$  および  $CL_{sec, 6\beta-OHF}$  はそれぞれ、cortisol の見かけの 6β 水酸化クリアランス、6β-OHF の腎クリアランス、6β-OHF の糸球体ろ過速度および分泌クリアランスを示している (DX-619: N=6, placebo: N=3)。\*\*,  $P < 0.01$ , \*,  $P < 0.05$

		AUC <sub>cortisol</sub> (ng • h/ml)	AUC <sub>6β-OHF</sub> (ng • h/ml)	$X_e$ , 6β-OHF (μg)	$CL_{6\beta-OHF}$ (ml/min)	$CL_{renal, 6\beta-OHF}$ (ml/min)	$f_u \cdot GFR$ (ml/min)	$CL_{sec, 6\beta-OHF}$ (ml/min)
Placebo	Day 1	1211 ± 206	48.2 ± 4.8	233 ± 59	3.74 ± 1.63	84.8 ± 27.3	20.4	64.4
	Day 15	1472 ± 83	47.9 ± 6.1	212 ± 49	2.49 ± 0.73	78.0 ± 24.3		57.6
DX-619	Day 1	1391 ± 82	49.9 ± 2.9	102 ± 7*	1.24 ± 0.12	34.9 ± 3.7*	20.4	14.5
	Day 15	1539 ± 115	45.8 ± 3.2	60.9 ± 5.1**	0.684 ± 0.083**	23.0 ± 3.5*		2.60

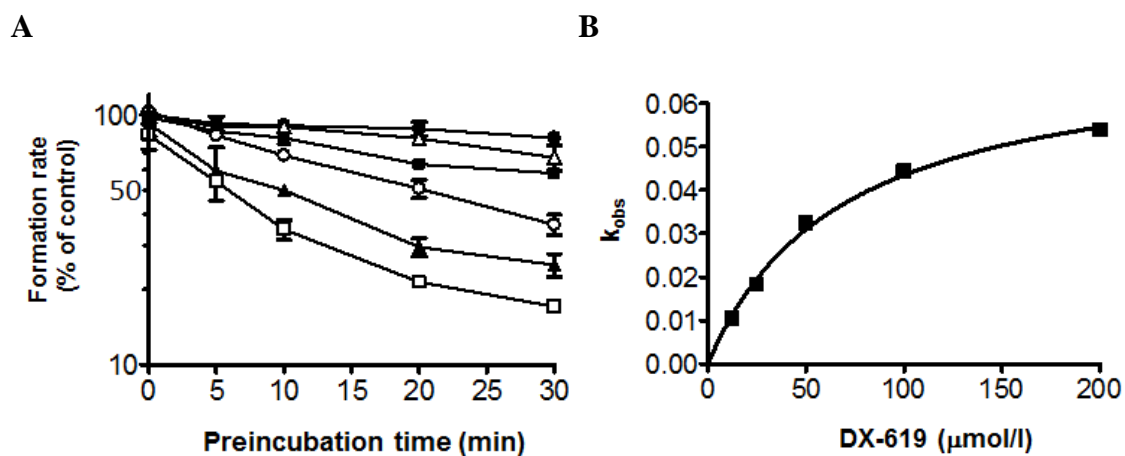


図 11. DX-619 のヒト CYP3A4 に対する preincubation time および濃度依存的な阻害

DX-619 の CYP3A4 に対する MBI を 1'-hydroxymidazolam の生成阻害で評価した。

(A) DX-619 (●, 0; △, 12.5; ■, 25; ○, 50; ▲, 100 および □, 200 μM) と HLM を preincubation (0、5、10、20、30 min) 後、midazolam を incubation し、10 分後の 1'-hydroxymidazolam の生成量を定量した。(B) DX-619 濃度と (A) の傾き ( $k_{obs}$ ) をプロットし、Michaelis-Menten 型の 1 つのコンポーネントを仮定のもと、最小二乗法により求められた fitting line を実線で示している。

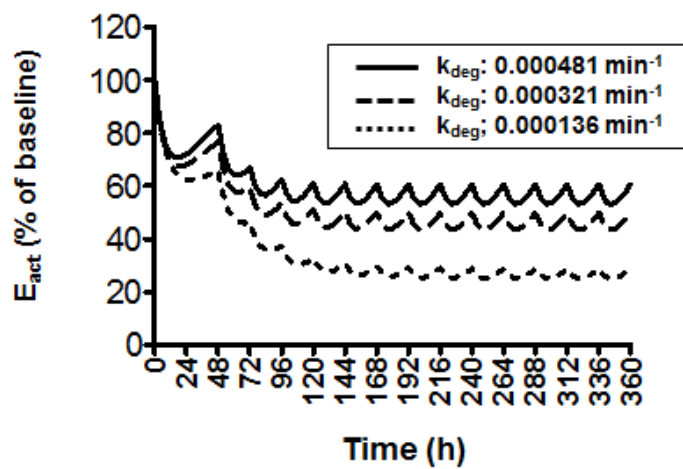


図 12. ヒトに DX-619 を投与した際の肝臓中 CYP3A4 の simulation

DX-619 (1200 mg, 2 h infusion) を反復投与 (day 1, day 3-15) した際の肝臓中 CYP3A4 ( $E_{act}$ ) について PBPK model を用いて simulation した。 $k_{deg}$  は、既報の 3 通りの値で simulation した。

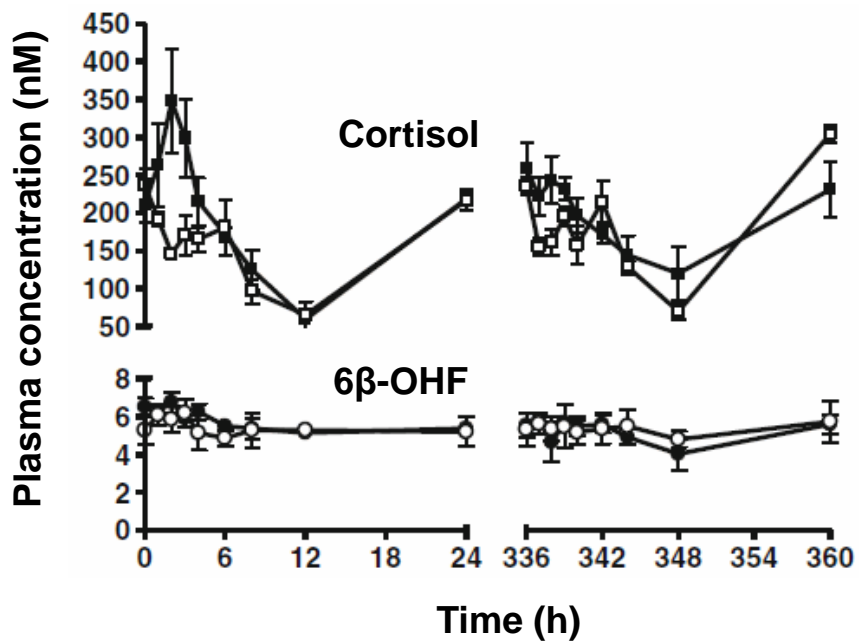


図 13. Cortisol および 6β-OHF の血漿中濃度推移

DX-619 投与時 (■、●) あるいは placebo 投与時 (□、○) の cortisol および 6β-OHF の血漿中濃度をそれぞれ示している。(DX-619: N=6, placebo: N=3)。

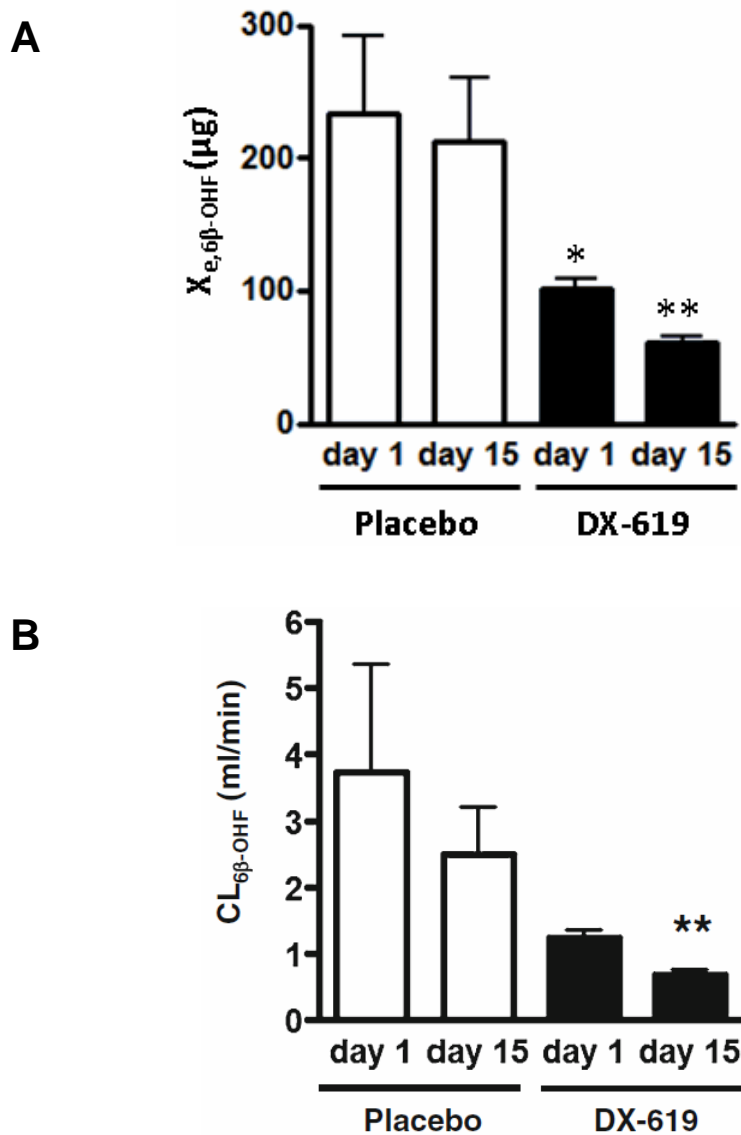


図 14. DX-619 投与時および非投与時の 6 $\beta$ -OHF の尿中排泄量および見かけの 6 $\beta$  水酸化クリアランス

DX-619 投与時 (■) あるいは placebo 投与時 (□) の 6 $\beta$ -OHF の尿中排泄量 (A) および cortisol の見かけの 6 $\beta$  水酸化クリアランス (B) をそれぞれ示している。

(DX-619: N=6, placebo: N=3)。 \*\*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.05$

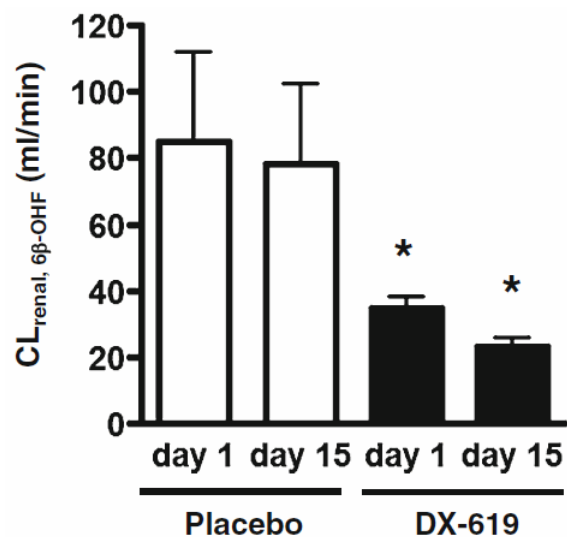


図 15. DX-619 投与時および非投与時の 6β-OHF の腎クリアランス

DX-619 投与時 (■) あるいは placebo 投与時 (□) の 6β-OHF の腎クリアランスを示している。(DX-619: N=6, placebo: N=3)。\*\*;  $P < 0.01$ , \*;  $P < 0.05$

## 第2章

*In vitro* 試験に基づいた DX-619 の  
Mechanism-based Inhibition (MBI) による  
*in vivo* 肝 CYP3A4 阻害能の定量的予測

### 第2節

6 $\beta$ -hydroxycortisol の腎排泄阻害が  
CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> に基づいた肝 CYP3A4 活性推定に  
与える影響

## 要約

第2章第1節では、DX-619のMBIリスク評価として、内因性代謝物を利用したcortisolの見かけの6β水酸化クリアランス ( $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ ) およびPBPK modelによる肝臓中CYP3A4量 ( $E_{\text{act}}$ ) をそれぞれ見積もり、各々の評価値がほぼ一致することを示した。しかし、 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  は糸球体ろ過速度よりも高く6β-OHFは尿細管分泌を受けることが示唆されたため、薬物投与による6β-OHFの腎排泄の変動およびそれに伴う $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  への影響は不明な点が多い。そこで本項では、非臨床および臨床の両面より6β-OHFの腎排泄機構の解明を試みた。

尿細管基底膜側トランスポーターにおいて、6β-OHFのOCT2およびOAT3発現細胞への取り込みがmock細胞のそれと比較して有意に高かった。ヒト腎スライスを用いて6β-OHFの取り込みを評価した結果、6β-OHFの腎スライスへの取り込みはprobenecidによって有意に阻害された。一方、MPP<sup>+</sup>の阻害下、6β-OHFの腎スライスへの取り込みは一部の腎ドナーのみ有意に低下した。刷子縁膜側の腎薬物トランスポーターにおいて、6β-OHFのMATE1およびMATE2-Kによる輸送を確認したが、6β-OHFはMATEsに対して低親和性であることが推察された。また、6β-OHFのP-gpによる輸送は認められなかった。したがって、6β-OHFは糸球体ろ過に加え尿細管分泌によって排泄され、その分泌には主に基底膜側ではOAT3が、刷子縁膜ではMATE1が関与していることが示唆された。

Benzylpenicillin/probenecid および adefovir/probenecid 投与群における6β-OHFの血漿中濃度は、benzylpenicillin および adefovir 単独投与群と比較して有意に増加し、一方、尿中への6β-OHF排泄量は変化しなかった。その結果、probenecid



投与群での 6 $\beta$ -OHF の腎クリアランス ( $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$ ) および分泌クリアランス ( $CL_{\text{renal,sec},6\beta\text{-OHF}}$ ) は *probenecid* 非投与群と比較して有意に低下した。その一方で、*pyrimethamine* 投与は、 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  にはほとんど影響を与えなかった。また、*probenecid* および *pyrimethamine* はいずれも  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  に影響を与えなかった。 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  および 6 $\beta$ -OHF の全身クリアランス ( $CL_{\text{tot},6\beta\text{-OHF}}$ ) の変動は、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  に影響を与えなかったことから、6 $\beta$ -OHF の主排泄経路が尿排泄であると示唆された。そのため、腎排泄過程の相互作用によらず、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  は *in vivo* CYP3A4 活性評価に使用することができると考えられた。すなわち第2章1節での DX-619 投与時の  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  低下は、DX-619 による CYP3A4 に対する MBI の結果生じたものであると考えられた。*Probenecid* 投与時に OAT3 阻害に起因した  $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  の低下および血漿中 6 $\beta$ -OHF 濃度の上昇が認められたことから、6 $\beta$ -OHF が OAT3 活性を示す *biomarker* として有用であると考えられた。

## 序論

第2章第1節では、DX-619による肝CYP3A4へのMBIを見積もる手法として、内因性cortisolのCYP3A4代謝物である6 $\beta$ -OHFを利用したcortisolの見かけの6 $\beta$ 水酸化クリアランス ( $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ ) とPBPK modelによって予測された肝臓中CYP3A4量 ( $E_{act}$ ) の両アプローチを実施し、各々の値がほぼ一致した。

$CL_{6\beta\text{-OHF}}$ は、Phase 1のサンプルのみから算出可能な点に利点を有する。これは、DDI studyのようなプローブ薬の投与の必要が無く、プローブ薬の血漿中濃度の変動による被験者の安全性面を考慮する必要が無い。また、DDI studyを企画、実施する費用および時間の点からも利点が多い。一方、 $R_{6\beta\text{-OHF/F}}$  および  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  はいずれも尿中6 $\beta$ -OHF量をその算出時に使用することから、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  には肝CYP3A4活性だけではなく、6 $\beta$ -OHFの全身クリアランスに占める  $CL_{renal,6\beta\text{-OHF}}$  の割合もパラメータとして含まれる(2式)。そのため、腎排泄以外の消失経路が6 $\beta$ -OHFの主排泄経路となる場合、 $CL_{renal,6\beta\text{-OHF}}$ の変動が  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の変動要因となり得る。事実、6 $\beta$ -OHFの腎クリアランスはGFRよりも大きく、明確に尿細管分泌を受けることを示している。さらに、DX-619投与時、 $CL_{renal,6\beta\text{-OHF}}$ は低下しており、かつその割合は  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ の低下の割合とほぼ一致している。このことは、仮に6 $\beta$ -OHFの全身クリアランスに占める  $CL_{renal,6\beta\text{-OHF}}$ の割合が小さく、その経路に対するDX-619の阻害効果が小さければ、DX-619による肝CYP3A4阻害は無視できるほど小さいという結論にもなり得る。そこで、肝CYP3A4阻害能を有しない阻害剤であり、かつ  $CL_{renal,6\beta\text{-OHF}}$ を低下させる阻害剤の投与により、 $CL_{renal,6\beta\text{-OHF}}$ の変動が  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ に与える影響を

評価することとした。

近位尿細管には分泌・再吸収に働く種々トランスポーターが発現している。薬物輸送に関わるトランスポーターとして、基底膜側には OAT1, OAT3, OCT2 が、刷子縁膜側には P-gp, MATE1, MATE2-K 等が主に存在する (59)。Asif らによれば、副腎皮質細胞 (NCI-H295R) には OAT3 および OAT4 が発現しており、forskolin の刺激によって cortisol が分泌される。この分泌は、probenecid によって阻害されること、さらに、cortisol は OAT3 あるいは OAT4 発現アフリカツメガエル卵母細胞 (*Xenopus laevis oocytes*) への取り込みを示したことから、副腎皮質からの cortisol の分泌には OAT3 および OAT4 がそれぞれ関わっていると示唆された (89)。また、P-gp の過剰発現細胞では、cortisol の経細胞輸送に方向性が見られ、cortisol が P-gp 基質となることも確認されている (90)。そのため、6 $\beta$ -OHF の輸送にもこれらトランスポーターの関与の可能性が十分に考えられた。そこで、OAT1, OAT3, OCT2, P-gp, MATE1 および MATE2-K 発現細胞を用いて 6 $\beta$ -OHF の輸送活性を評価した。尿細管分泌に関わる基底膜トランスポーターが複数認められた場合、ヒト腎スライス試験を実施し、それらトランスポーターについて基底膜での 6 $\beta$ -OHF の輸送の寄与を算出することとした。

6 $\beta$ -OHF の腎クリアランスを測定した結果、明確な尿細管分泌が認められたことから、*in vitro* 試験で特に活性の高かった OAT3 および MATE1 に関して、当該トランスポーターの阻害薬を用いて、*in vivo* で 6 $\beta$ -OHF の腎排泄に対する効果を評価した。Probenecid は古くから腎有機アニオントランスポーターの *in vivo* 阻害剤として知られ、種々薬物の尿中排泄を阻害することが知られている (59,

91-93)。事実、臨床投与量における血漿中遊離型濃度は、OAT1 および OAT3 に対する  $K_i$  値を上回り、これら両トランスポーターを十分に阻害することができる。Tian らは、健常人被験者において、probenecid (750 mg, po) によって OAT1 および OAT3 それぞれの典型的基質 (adefovir および benzylpenicillin) の腎クリアランスが有意に低下することを示している。また、Ito らは pyrimethamine (50 mg, po) が臨床用量で MATE1、MATE2-K を比較的選択的に阻害すること、ならびに健常人において、pyrimethamine が metformin および *N*-methylnicotinamide の腎クリアランスを有意に低下させることから、腎排泄過程における MATEs の役割を検証する上で有用な薬物であることを報告している (94)。そこで、これらの試験における血漿および尿検体中の 6 $\beta$ -OHF 濃度を定量し、各薬剤投与時の 6 $\beta$ -OHF の腎クリアランスの算出を試みた。

## 結果

### HLM を用いた各種薬物の midazolam 1-hydroxylation 活性

HLM において、各種薬物との 0 分および 15 分 preincubation 後における midazolam の 1'-hydroxylation 活性を求めた (表 8)。Troleandomycin (30  $\mu\text{M}$ ) 存在下での midazolam の 1'-hydroxylation 残存活性は 0 分で  $57.1\pm 0.1\%$ 、15 分では  $10.1\pm 0.2\%$  であり preincubation によって 82.3% の活性低下が認められた。一方、probenecid および pyrimethamine (100  $\mu\text{M}$ ) 存在下において、0 分および 15 分 preincubation において、midazolam の 1'-hydroxylation 活性は低下しなかった。

### 各種薬物の 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) 1 および 11 $\beta$ -HSD2 活性に対する阻害効果

Cortisol および 6 $\beta$ -OHF の生体内での代謝経路を図 16 に示す。6 $\beta$ -OHF は 11 $\beta$ -HSD2 によって酸化され 6 $\beta$ -hydroxycortisone を生成する。そこで、11 $\beta$ -HSD1 発現 HEK293 細胞および 11 $\beta$ -HSD2 発現 SF9 細胞からそれぞれミクロソーム画分を抽出し、11 $\beta$ -HSD1 および 11 $\beta$ -HSD2 活性に対する、DX-619 および各種薬物の阻害効果を観察した (図 17、表 9)。11 $\beta$ -HSD1 (cortisone より cortisol 生成) および 11 $\beta$ -HSD2 (cortisol より cortisone 生成) 活性は carbenoxolone により濃度依存的に阻害され、 $K_i$  として  $0.128\pm 0.030 \mu\text{M}$  および  $0.0147\pm 0.0030 \mu\text{M}$  が算出された。11 $\beta$ -HSD1 活性は、DX-619 および clarithromycin によって阻害されず ( $K_i > 100 \mu\text{M}$ )、また、11 $\beta$ -HSD2 活性も DX-619 ( $K_i > 100 \mu\text{M}$ )、clarithromycin ( $K_i > 100 \mu\text{M}$ )、probenecid ( $K_i > 300 \mu\text{M}$ )、pyrimethamine ( $K_i > 300 \mu\text{M}$ ) によって阻害されなかった。

### hOAT1、3 および hOCT2 遺伝子発現系を用いた 6β-OHF の取り込み

6β-OHF の OAT1、OAT3 および OCT2 発現細胞への取り込み活性を評価した (図 18)。hOAT3 および hOCT2 への 6β-OHF への取り込みは vector 導入細胞と比較して有意であり、hOAT3 においては 1 mM probenecid によってその取り込みが有意に阻害された (図 18A)。一方、hOAT1 導入細胞での取り込みは vector 導入細胞と比較して有意な差は認められなかった。6β-OHF の hOAT3 への取り込みは 5 min まで直線的に増加した (図 18B)。さらに、6β-OHF の hOAT3 への取り込みの濃度依存性を評価し、速度論的パラメータを算出した (図 18C)。6β-OHF の hOAT3 への取り込みは飽和性を示し、 $K_m$  および  $V_{max}$  はそれぞれ、 $183 \pm 25 \mu\text{M}$  および  $782 \pm 45 \text{ pmol/min mg protein}$  と算出された。hOAT1、hOAT3 および hOCT2 発現細胞への輸送活性はそれぞれ、 $[^3\text{H}]\text{PAH}$ 、 $[^3\text{H}]\text{ES}$  および  $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$  の細胞内取り込みによって評価し、いずれも vector 導入細胞に比べ取り込みは有意であり、阻害剤によって有意にその取り込みが阻害された。

### 6β-OHF の hOAT3 取り込みに対する各種薬物の阻害効果

6β-OHF の hOAT3 取り込みに対する DX-619、probenecid、pyrimethamine および clarithromycin の阻害効果を評価した (図 19)。6β-OHF の hOAT3 への取り込みに対して DX-619、probenecid、pyrimethamine および clarithromycin は阻害を示し、 $K_i$  はそれぞれ  $239 \pm 36$ 、 $12.1 \pm 3.8$ 、 $32.0 \pm 6.2$  および  $181 \pm 42 \mu\text{M}$  と算出された。

### **hMATE1 および hMATE2-K 遺伝子発現系を用いた 6β-OHF の取り込み**

6β-OHF の MATE1 および MATE2-K 発現細胞への取り込み活性を評価した (図 20)。hMATE1 への 6β-OHF への取り込みは NH<sub>4</sub>Cl 条件下、非条件下ともに vector 導入細胞と比較して有意であり、その取り込みは 10 μM pyrimethamine によって有意に阻害された (図 20A)。一方、hMATE2-K では 6β-OHF は NH<sub>4</sub>Cl 条件下においてのみ vector 導入細胞と比較して有意な取り込みを示し、その取り込みは 10 μM pyrimethamine によって有意に阻害された。6β-OHF の hMATE1 への取り込みは 1 min まで直線的に増加した (図 20B)。さらに、6β-OHF の hMATE1 および hMATE2-K への取り込みの濃度依存性を評価したところ、いずれも取り込みは 100 μM まで直線的に増加した (図 20C、D)。hMATE1 および MATE2-K 発現細胞への輸送活性は [<sup>14</sup>C]TEA の細胞内取り込みによって評価し、いずれも vector 導入細胞に比べ取り込みは有意であり、阻害剤によって有意にその取り込みが阻害された。

### **6β-OHF の hMATE1 取り込みに対する各種薬物の阻害効果**

6β-OHF の hMATE1 取り込みに対する DX-619、probenecid、pyrimethamine および clarithromycin の阻害効果を評価した (図 21)。6β-OHF の hMATE1 への取り込みに対して DX-619、pyrimethamine は阻害を示し、K<sub>i</sub> はそれぞれ 4.32±0.79、0.281±0.033 μM と算出された。一方、probenecid および clarithromycin は阻害を示さなかった。かった (K<sub>i</sub> > 300 μM)。

## P-gp 遺伝子発現細胞系を用いた cortisol および 6 $\beta$ -OHF の経細胞輸送

LLC-PK1 細胞および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞における cortisol (添加時濃度 1  $\mu$ M) および 6 $\beta$ -OHF (10  $\mu$ M) の経時的な細胞膜透過性を測定した (図 22)。

Cortisol は、LLC-PK1 細胞での basal 側から apical 側および apical 側から basal 側への透過性がほぼ等しかった。MDR1 発現 LLC-PK1 細胞においては、basal 側から apical 側への透過性が LLC-PK1 細胞のそれと比較して 3.3 倍高く、輸送に方向性が認められたが、P-gp 阻害剤 (GF120918, 10  $\mu$ M) 存在下でその透過性がほぼ等しくなった (図 22B)。一方、6 $\beta$ -OHF は MDR1 発現 LLC-PK1 細胞において apical 側から basal 側への透過性が basal 側から apical 側へのそれと比較して 1.4 倍高かったが、GF120918 (10  $\mu$ M) 存在下では透過性がほぼ等しくなった (図 22D)。

LLC-PK1 細胞および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞における [ $^3$ H]digoxin (50 nM) の細胞膜透過性に対する、6 $\beta$ -OHF および GF120918 の阻害効果を測定した (表 10)。 [ $^3$ H]digoxin の MDR1 発現 LLC-PK1 細胞における basal 側から apical 側への透過は、LLC-PK1 細胞でのそれと比較して高く (R value 5.91)、basal 側から apical 側への方向性が確認されたが、6 $\beta$ -OHF 存在下ではその方向性は変化しなかった (R value: 4.97; 1,000  $\mu$ M)。一方、GF120918 (10  $\mu$ M) 添加によって R value は 1.49 まで低下し、basal 側から apical 側への [ $^3$ H]digoxin の輸送の方向性が消失した。



## 6β-OHF のヒト腎切片への取り込みおよび、非標識 probenecid および MPP<sup>+</sup> の阻害効果

6β-OHF のヒト腎切片への取り込みを 3 名のドナーから得られた腎組織より評価した (図 23)。6β-OHF はいずれのドナーにおいても probenecid (1 mM) 添加によって control と比較して 20-41% まで有意に低下し ( $P < 0.01$ )、また、MPP<sup>+</sup> (1 mM) によって control の 58-68% (1 例のみ  $P < 0.01$ ) まで低下した。各ドナーの腎切片において、<sup>3</sup>H]adefovir、<sup>14</sup>C]benzylpenicillin および<sup>14</sup>C]TEA の取り込みに対する、probenecid (1 mM、<sup>3</sup>H]adefovir あるいは<sup>14</sup>C]benzylpenicillin 添加時) および、MPP<sup>+</sup> (1 mM、<sup>14</sup>C]TEA 添加時) の阻害効果を観察した (図 24)。<sup>3</sup>H]adefovir、<sup>14</sup>C]benzylpenicillin および<sup>14</sup>C]TEA の取り込みは、各阻害剤によって有意に阻害された。

## 6β-OHF および cortisol に関する体内動態

Probenecid の血漿遊離型分率が 0.05-0.17 (95) であることから、probenecid の最大血漿中遊離型濃度 ( $I_{u,max, \text{probenecid}}$ ) は  $12.2 \pm 0.9 - 41.6 \pm 3.0 \mu\text{M}$  (C 群: benzylpenicillin/probenecid) および  $11.6 \pm 0.9 - 39.4 \pm 3.0 \mu\text{M}$  (A 群: adefovir/probenecid) と算出された。また、pyrimethamine の最大血漿中遊離型濃度 ( $I_{u,max, \text{pyrimethamine}}$ ) は  $\sim 0.3 \mu\text{M}$  との報告がある (94)。

血漿および尿中の 6β-OHF および cortisol のマスクロマトグラムを図 25 に示す。6β-OHF の血漿中濃度は、C 群、A 群共に有意に上昇したが (図 26AB、27AB、表 12、 $AUC_{0-24h}$  における probenecid 非投与群との比較:  $P < 0.01$ )、尿中排泄量は影

響を受けなかった (図 26C、27C、表 12)。一方、pyrimethamine 投与によって 6 $\beta$ -OHF の血漿中濃度は影響をうけず、尿中排泄量は若干低下した (図 28A、B、C、表 12、 $X_{e, 6\beta\text{-OHF}}$  における pyrimethamine 非投与群との比較:  $P=0.0961$ )。

C 群および A 群ともに全ての期間において probenecid 投与群での 6 $\beta$ -OHF の腎クリアランス ( $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$ ) は非投与群でのそれと比較して有意に低下し (図 29A、B)、また、6 $\beta$ -OHF の分泌クリアランス ( $CL_{\text{renal,sec},6\beta\text{-OHF}}$ ) は probenecid 非投与群の 55 および 61% にまで低下した (表 12)。一方、 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  および  $CL_{\text{renal,sec},6\beta\text{-OHF}}$  は pyrimethamine によって若干の低下を示すに留まった (表 12、pyrimethamine 非投与群との比較:  $P=0.1342$  および  $P=0.1841$ )。

8-24 h における  $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  の絶対値 (約 100-300 ml/min) は、他の期間のそれ (約 100-500 ml/min) と比較して低い傾向を示した (図 29)。いずれの投与群においても cortisol の AUC は probenecid および pyrimethamine の影響を受けなかった (図 26DE、27DE、28DE、表 12)。 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  はいずれの阻害剤においても阻害剤非投与群と比較して変化しなかった (図 30、表 12)。

## 考察

本研究では、6 $\beta$ -OHF の腎尿細管分泌における相互作用が、CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> に影響を与える要因となるかを明らかにするため、分泌に関与するトランスポーターならびに薬物相互作用を利用して、*in vivo* における評価を行った。

基底膜側トランスポーターとして、6 $\beta$ -OHF の OCT2 および OAT3 発現細胞への取り込みが mock 細胞のそれと比較して有意であった (図 18)。これらトランスポーターの基底膜での寄与を考察するために、ヒト腎スライスを用いて 6 $\beta$ -OHF の取り込みを評価したところ、3 例の腎ドナー全てにおいて 6 $\beta$ -OHF の腎スライスへの取り込みが probenecid によって有意に阻害された (図 23)。一方、MPP<sup>+</sup> の阻害下、6 $\beta$ -OHF の腎スライスへの取り込みは 1 例の腎ドナーのみ有意に低下した。MPP<sup>+</sup> (1 mM) は OAT3 発現細胞を用いた [<sup>3</sup>H]estrone-3-sulfate および 6 $\beta$ -OHF の取り込みをそれぞれ 42 および 58% 阻害することから、腎スライスへの 6 $\beta$ -OHF の取り込みに対する MPP<sup>+</sup> の阻害は一部 OAT3 が関与している可能性がある。腎スライスでの 6 $\beta$ -OHF 取り込みの大部分が probenecid により阻害されることは、relative activity factor (RAF) に基づいて推定した OAT3 と OCT2 の寄与率と一致した (96)。

刷子縁膜側の腎薬物トランスポーターにおいて、6 $\beta$ -OHF の MATE1 および MATE2-K による輸送を確認した (図 20)。6 $\beta$ -OHF は MATE1 および MATE2-K 発現細胞とともに 100  $\mu$ M まで直線的に取り込まれ (図 20)、1 mM 6 $\beta$ -OHF 添加時の MATE1 を介した [<sup>14</sup>C]TEA の取り込みにおいて、50% 未満の取り込み阻害であったことと合わせると、6 $\beta$ -OHF は MATEs に対して低親和性の基質である。

6 $\beta$ -OHF の尿細管分泌に関与する他の刷子縁膜側トランスポーターとして 6 $\beta$ -OHF の P-gp を介した経細胞輸送を実施したが、P-gp による輸送は認められなかった (図 22)。したがって、6 $\beta$ -OHF の尿細管分泌について、基底膜側では主に OAT3 が、刷子縁膜側は MATEs が関与していると考えられる (図 31、表 11)。

次に、6 $\beta$ -OHF の腎排泄挙動、特に OAT3 および MATE1 を介した尿細管分泌阻害が  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  に与える影響を調べることを考えた。阻害剤として用いた probenecid および pyrimethamine が、6 $\beta$ -OHF の生成に関与する CYP3A4 (cortisol から 6 $\beta$ -OHF への代謝)、および代謝 (6 $\beta$ -OHF から 6 $\beta$ -hydroxycortisone への代謝) に関与する 11 $\beta$ -HSD2 について、共に影響を与えないことを *in vitro* で確認した (表 8、9)。

Benzylpenicillin/probenecid および adefovir/probenecid 投与群における 6 $\beta$ -OHF の血漿中濃度は、benzylpenicillin および adefovir 単独投与群と比較して有意に増加し、一方、尿中への 6 $\beta$ -OHF 排泄量は変化しなかった (図 26、27)。その結果、probenecid 投与群での 6 $\beta$ -OHF の腎クリアランス ( $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$ ) および分泌クリアランス ( $CL_{\text{renal,sec},6\beta\text{-OHF}}$ ) は probenecid 非投与群と比較して有意に低下した (図 29、表 12)。Control 群の benzylpenicillin および adefovir の最大血漿中濃度はそれぞれ、1 および 0.1  $\mu\text{M}$  であり、一方、これらの OAT3 に対する  $K_i$  値はそれぞれ  $27.8 \pm 2.56 \mu\text{M}$  (97) および  $> 3 \mu\text{M}$  であることを考慮すると、これらによって基底膜に存在する OAT3 の飽和あるいは阻害が起こった可能性は低い。ヒト腎スライスにおける 6 $\beta$ -OHF の取り込みを probenecid が有意に阻害したことを考慮すると (図 23)、probenecid による OAT3 阻害によって  $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  および

$CL_{\text{renal,sec,6}\beta\text{-OHF}}$  が低下した可能性が高い (表 12)。ここで  $CL_{\text{renal,6}\beta\text{-OHF}}$  の低下の程度は probenecid 投与直後が最も高く、以後低下している (図 29)。これは時間推移とともに probenecid の血漿中濃度が低下するためであると考えられるが、加えて、8-24 h における  $CL_{\text{renal,6}\beta\text{-OHF}}$  の絶対値が他の時間帯でのそれと比較して小さいことを考慮すると、OAT3 を介した  $6\beta\text{-OHF}$  の排泄にはサーカディアンリズムがあり、8-24 h では OAT3 を介した基底膜での輸送の寄与が低下していると示唆された (図 29)。

一方、pyrimethamine の血漿遊離型濃度および  $K_i$  を考慮すると、MATEs はほぼ完全に阻害することが期待されたが、実際は pyrimethamine 投与によって  $CL_{\text{renal,6}\beta\text{-OHF}}$  がわずかに低下したのみであった (0-6 h において  $P=0.1342$ )。この要因として、1) 刷子縁膜側の排出輸送における MATE1 の寄与率が小さい、あるいは 2)  $6\beta\text{-OHF}$  の腎排泄が取り込み律速である場合、の 2 つが考えられる。後者は、刷子縁膜側における  $6\beta\text{-OHF}$  の輸送活性が基底膜でのそれと比較して非常に高い場合には、基底膜側での取り込みクリアランスが尿細管分泌全体を規定し、このような状況では刷子縁膜側の排泄阻害は尿細管分泌に影響を与えないことに起因する (98)。実際、本試験と同じヒトサンプルにおいて、*N*-methylnicotinamide の尿細管分泌クリアランスはほぼ完全に阻害されているものの (94)、同じく MATEs により尿中へと排泄される metformin の尿細管分泌クリアランスに対する阻害効果は 20-30% に留まり、尿細管分泌における律速段階で説明が試みられている (65)。

Probenecid 投与により、 $CL_{\text{renal,6}\beta\text{-OHF}}$  の低下が認められた場合においても、

$CL_{6\beta\text{-OHF}}$  は変動しないことを確認した。このことは2式に従うと、 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}} / CL_{\text{tot},6\beta\text{-OHF}}$  が1に近い、すなわち  $6\beta\text{-OHF}$  の主排泄経路は尿排泄であると考えられる。そのため  $6\beta\text{-OHF}$  の腎排泄が仮に阻害されたとしても、十分な回復インターバルをおけば、尿中に回収される  $6\beta\text{-OHF}$  量は腎排泄阻害の影響を受けることはなく、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  は肝 CYP3A4 機能を主に反映したパラメータとして利用できると考えられる。すなわち、DX-619 投与時に認められた  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の低下は、DX-619 による肝 CYP3A4 への MBI によるものである。

今回測定した臨床サンプルにおいて、DX-619 および pyrimethamine はともに MATEs を阻害するのに十分な血漿中遊離型濃度であったにも関わらず、 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  の低下の度合いは DX-619 投与時の方が pyrimethamine 投与時よりも高かった。この原因は、 $6\beta\text{-OHF}$  の尿排泄について、MATEs を介した刷子縁膜での排泄速度が OAT3 を介した基底膜での取り込み速度と比較して高い、すなわち  $6\beta\text{-OHF}$  の尿細管分泌が取り込み律速であり、かつ DX-619 による MATEs 阻害が pyrimethamine によるそれよりも強かったことがまず原因として考えられる。この場合、取り込み律速であった  $6\beta\text{-OHF}$  の尿細管分泌が、DX-619 投与時においては刷子縁膜への強い阻害によって排出律速になったことが推測され、pyrimethamine 投与では、血漿中  $6\beta\text{-OHF}$  濃度に変化が認められない一方、DX-619 投与では血漿中  $6\beta\text{-OHF}$  濃度の低下とともに、腎臓中での  $6\beta\text{-OHF}$  濃度が増加されると推察される。しかし、これを実証するためには、positron emission tomography (PET) やバイオプシー等で腎臓中  $6\beta\text{-OHF}$  濃度の増加を確認する必要がある。次に、2)  $6\beta\text{-OHF}$  の尿細管分泌に、取り込み側のトランスポーターに

関して、今回検討した以外のものあるいは未知のものが寄与していることが考えられた。6 $\beta$ -OHF の取り込みに寄与する OAT3 に対する DX-619 および pyrimethamine の  $K_i$  は  $239\pm 36$  および  $32.0\pm 6.2$  と、いずれの血漿中遊離型濃度よりも高い値を示す。そのため、6 $\beta$ -OHF の取り込みに関して OATP4C1 (99) あるいは未知のトランスポーターが関与し (図 3)、そのトランスポーターへの DX-619 の阻害能が pyrimethamine のそれと比較して高いことが考えられた。

Probenecid 投与時に OAT3 阻害に起因した  $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  の低下が認められたが、加えて血漿中 6 $\beta$ -OHF 濃度も有意に上昇したことから、 $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  に加えて血漿中 6 $\beta$ -OHF 濃度も OAT3 活性の biomarker として利用する価値があると考えられる。このとき、被験薬物が肝臓中 CYP3A4 に影響を与えるか否かに留意する必要がある。現に DX-619 投与によって  $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  は低下しているため血漿中 6 $\beta$ -OHF 濃度の上昇が予想されたが、血漿中 6 $\beta$ -OHF 濃度は変動していない。この原因として DX-619 の CYP3A4 に対する MBI によって cortisol からの 6 $\beta$ -OHF 生成が阻害され、血漿中 6 $\beta$ -OHF 濃度の上昇がマスクされたことが考えられる。

本節の結論として、DX-619 投与によって  $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$  および  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  がそれぞれ低下したが、上記考察に基づくと  $CL_{6\beta\text{-OHF}}$  の低下は MBI によって引き起こされたものと考えることができる。また、6 $\beta$ -OHF は肝 CYP3A4 以外に、OAT3 による輸送活性を測定するための biomarker として、相互作用試験に利用可能であることが明らかとなった。

**表 8. HLM を用いた各種薬物の midazolam 1'-hydroxylation 阻害活性**

HLM と各種薬物の preincubation の有無による 1'-hydroxymidazolam 生成に関する残存活性を算出した。15 min は 15 分 preincubation 後の midazolam 1'-hydroxylation 残存活性の vehicle 比を、0 min は preincubation を実施しない場合の midazolam 1'-hydroxylation 残存活性の vehicle 比をそれぞれ示している。MBI は、15 min / 0 min により算出した。(N=3)、\*;  $P < 0.01$

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	CYP3A4 remaining activity (% of control)	
		Preincubation time (min)	
		0 min	15 min
Probenecid	100	105 $\pm$ 2	99.3 $\pm$ 1.4
Pyrimethamine	100	118 $\pm$ 6	103 $\pm$ 1
Troleandomycin	30	57.1 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 0.2*



### 表 9. 各種薬物の 11 $\beta$ -HSD1 および 11 $\beta$ -HSD2 阻害活性

各種薬物の 11 $\beta$ -HSD1 あるいは 11 $\beta$ -HSD2 活性に対する阻害効果を示している。

11 $\beta$ -HSD1 発現 HEK293 細胞および 11 $\beta$ -HSD2 発現 SF9 細胞からそれぞれマイクロソーム画分を抽出し反応溶液とした。11 $\beta$ -HSD1 および 11 $\beta$ -HSD2 活性は、反応溶液にそれぞれ cortisone および cortisol を添加し、20 分間インキュベート後、それぞれの代謝物である cortisol および cortisone を測定した。このとき、上記反応溶液に各種薬物を添加して阻害活性を評価した。(N=3)

Compound	Ki: 11 $\beta$ -HSD1 ( $\mu$ M)	Ki: 11 $\beta$ -HSD2 ( $\mu$ M)
Carbenoxolone	0.128 $\pm$ 0.030	0.0147 $\pm$ 0.0030
DX-619	> 100	> 100
Clarithromycin	> 100	> 100
Probenecid	Not tested	> 300
Pyrimethamine	Not tested	> 300

表 10. 6 $\beta$ -OHF の P-gp 輸送阻害活性

[<sup>3</sup>H]digoxin (50 nM) の経細胞輸送に対する 6 $\beta$ -OHF および GF120918 の阻害効果を示している。6 $\beta$ -OHF および GF120918 は、apical および basal 両方に添加している。各値は膜透過係数を示し、R value は膜透過係数の B to A / A to B 比を示している。 A to B; apical to basal, B to A; basal to apical, (N=3)

Inhibitor concentration ( $\mu$ M)	Transcellular transport ( $\times 10^{-6}$ cm/sec)				R value
	LLC-PK1		MDR1-LLC-PK1		
	A to B	B to A	A to B	B to A	
6 $\beta$ -OHF					
0	3.69 $\pm$ 0.01	7.14 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.02	11.4 $\pm$ 0.8	5.91
3	3.87 $\pm$ 0.09	7.61 $\pm$ 0.25	1.12 $\pm$ 0.01	11.1 $\pm$ 0.7	5.06
10	3.97 $\pm$ 0.05	8.15 $\pm$ 0.23	1.10 $\pm$ 0.08	11.4 $\pm$ 0.5	5.09
30	4.21 $\pm$ 0.17	7.36 $\pm$ 0.26	1.10 $\pm$ 0.06	11.1 $\pm$ 0.9	5.77
100	3.93 $\pm$ 0.17	7.24 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.04	9.77 $\pm$ 0.57	4.93
300	4.41 $\pm$ 0.07	7.57 $\pm$ 0.29	1.10 $\pm$ 0.08	10.4 $\pm$ 0.7	5.53
1000	4.09 $\pm$ 0.08	6.58 $\pm$ 0.19	1.04 $\pm$ 0.02	8.33 $\pm$ 0.36	4.97
GF120918					
5	4.35 $\pm$ 0.15	4.35 $\pm$ 0.05	3.84 $\pm$ 0.16	3.69 $\pm$ 0.01	1.49

表 11. 6β-OHF の腎薬物トランスポーター輸送活性

6β-OHF の各種腎薬物トランスポーター輸送活性を示している。+は輸送活性の相対的な強さを示す。n.t., not transported

Renal transporters		6β-OHF transport activities (Km)
Basal side	OAT1	n.t.
	OAT3	+++ (183 ± 25 μM)
	OCT2	+
Apical side	P-gp	n.t.
	MATE1	+++ (> 100 μM)
	MATE2-K	+

表 12. 健常人に各種薬物投与時の 6β-OHF および cortisol の動態

各種薬物投与時の 6β-OHF のおよび cortisol の体内動態指標を示している。試験 1 および 2 は被験者 6 名に、試験 3 は被験者 8 名にそれぞれ休薬期間を 1 週間設けて実施した。試験 1 および 2 は 0-24 h の期間、試験 3 は 0-8 h までの期間で実施した。CL<sub>renal sec, 6β-OHF</sub> および f<sub>sec</sub> は 6β-OHF の分泌クリアランス (CL<sub>renal sec, 6β-OHF</sub> = CL<sub>renal, 6β-OHF</sub> - f<sub>u</sub> \* GFR) および CL<sub>renal, 6β-OHF</sub> に占める CL<sub>renal sec, 6β-OHF</sub> の割合をそれぞれ示している。 \*\*; P<0.01 \*; P<0.05 (vs. without inhibitor)

Study No.	Substrate (dose)	Inhibitor (dose)	AUC <sub>6β-OHF</sub> (ng • h/ml)	X <sub>e, 6β-OHF</sub> (μg)	CL <sub>renal, 6β-OHF</sub> (ml/min)	CL <sub>renal sec, 6β-OHF</sub> (ml/min)	f <sub>sec</sub> (%)	AUC <sub>cortisol</sub> (μg • h/ml)	CL <sub>6β-OHF</sub> (ml/min)
1	Benzylpenicillin (400,000 U)	-	72.0 ± 7.6	995 ± 108	231 ± 11	211 ± 11	91 ± 1	8.66 ± 0.60	1.90 ± 0.12
		Probenecid (750 mg)	113 ± 6**	917 ± 91	135 ± 9**	114 ± 9**	50 ± 5**	8.75 ± 0.41	1.76 ± 0.18
2	Adefovir (10 mg)	-	74.0 ± 6.9	990 ± 130	225 ± 26	205 ± 26	90 ± 1	7.94 ± 0.73	2.10 ± 0.27
		Probenecid (750 mg)	130 ± 9**	1072 ± 53	141 ± 12*	121 ± 12*	55 ± 5**	8.86 ± 0.45	2.04 ± 0.13
3	Metformin (100 μg)	-	36.2 ± 1.7	480 ± 30	226 ± 19	206 ± 19	90 ± 1	4.45 ± 0.34	1.90 ± 0.24
		Pyrimethamine (50 mg)	41.1 ± 4.2	387 ± 42	174 ± 32	154 ± 32	67 ± 10*	4.59 ± 0.37	1.44 ± 0.15

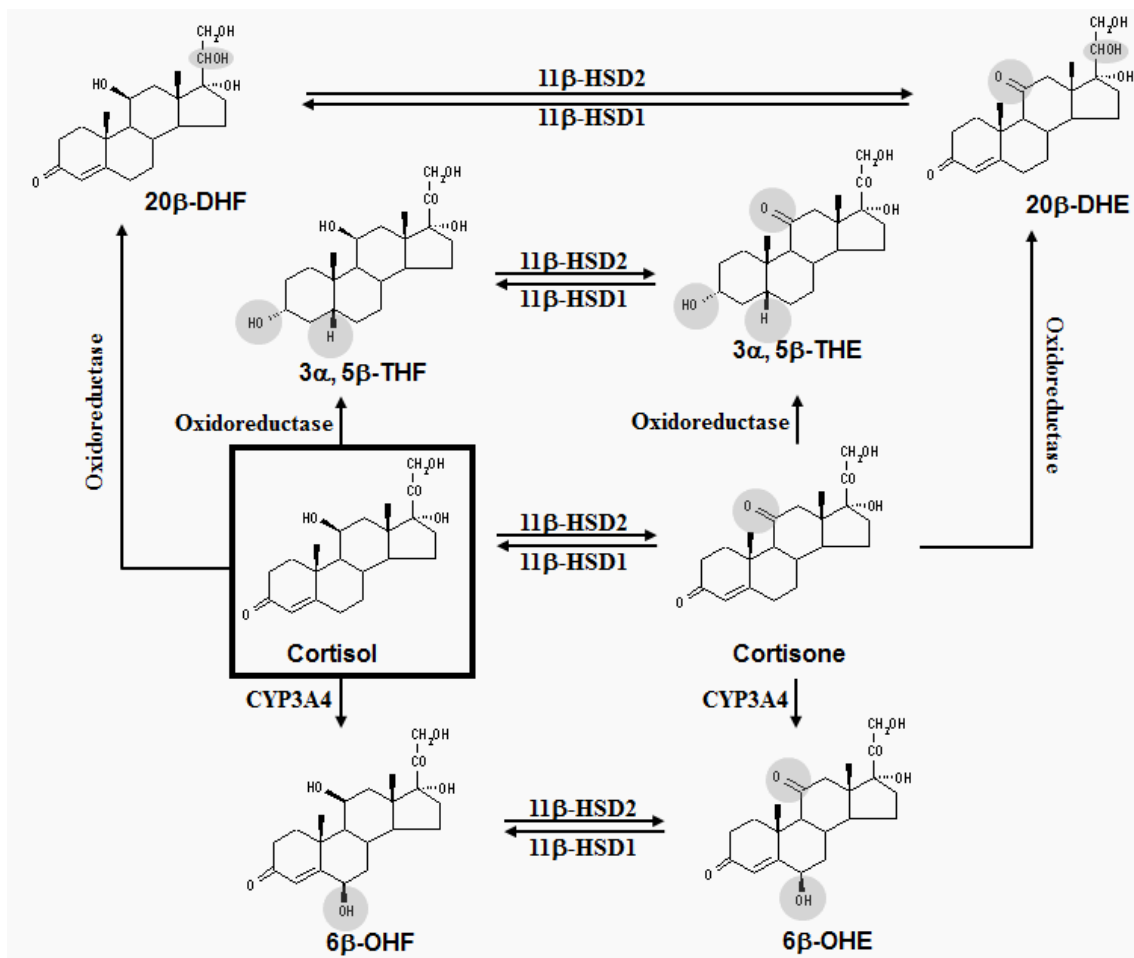


図 16. Cortisol および 6β-OHF の考えられる代謝経路

Cortisol は、oxidoreductase による 2 つの水酸化体 (20β-DHF, 3α,5β-THF)、11β-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β-HSD2) による cortisone、および CYP3A4 による 6β-OHF の 4 つの代謝物に代謝される。一方、6β-OHF は、11β-HSD2 によって 6β-hydroxycortisone (6β-OHE) に代謝される。

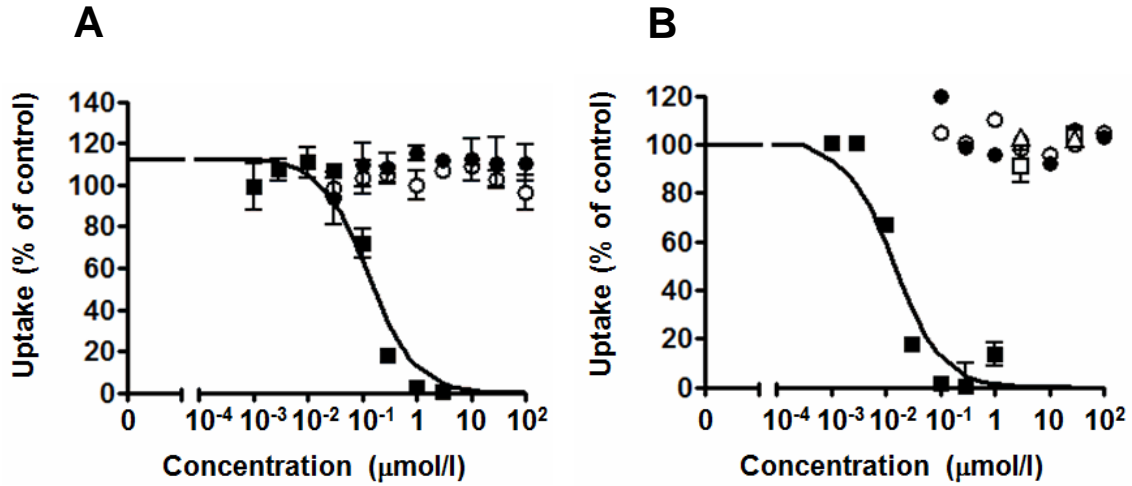


図 17. 各種薬物の 11β-HSD1 および 11β-HSD2 阻害活性

各種薬物の 11β-HSD1 あるいは 11β-HSD2 活性に対する阻害効果を示している。11β-HSD1 発現 HEK293 細胞および 11β-HSD2 発現 SF9 細胞からそれぞれミクロソーム画分を抽出し反応溶液とした。11β-HSD1 (A) および 11β-HSD2 (B) 活性は、反応溶液にそれぞれ cortisone および cortisol を添加し、20 分間インキュベート後、それぞれの代謝物である cortisol および cortisone を測定した。このとき、上記反応溶液に各種薬物 (carbenoxolone; ■, DX-619; ○, clarithromycin; ●, probenecid; □, pyrimethamine; △) を添加して阻害活性を評価した。(N=3)。

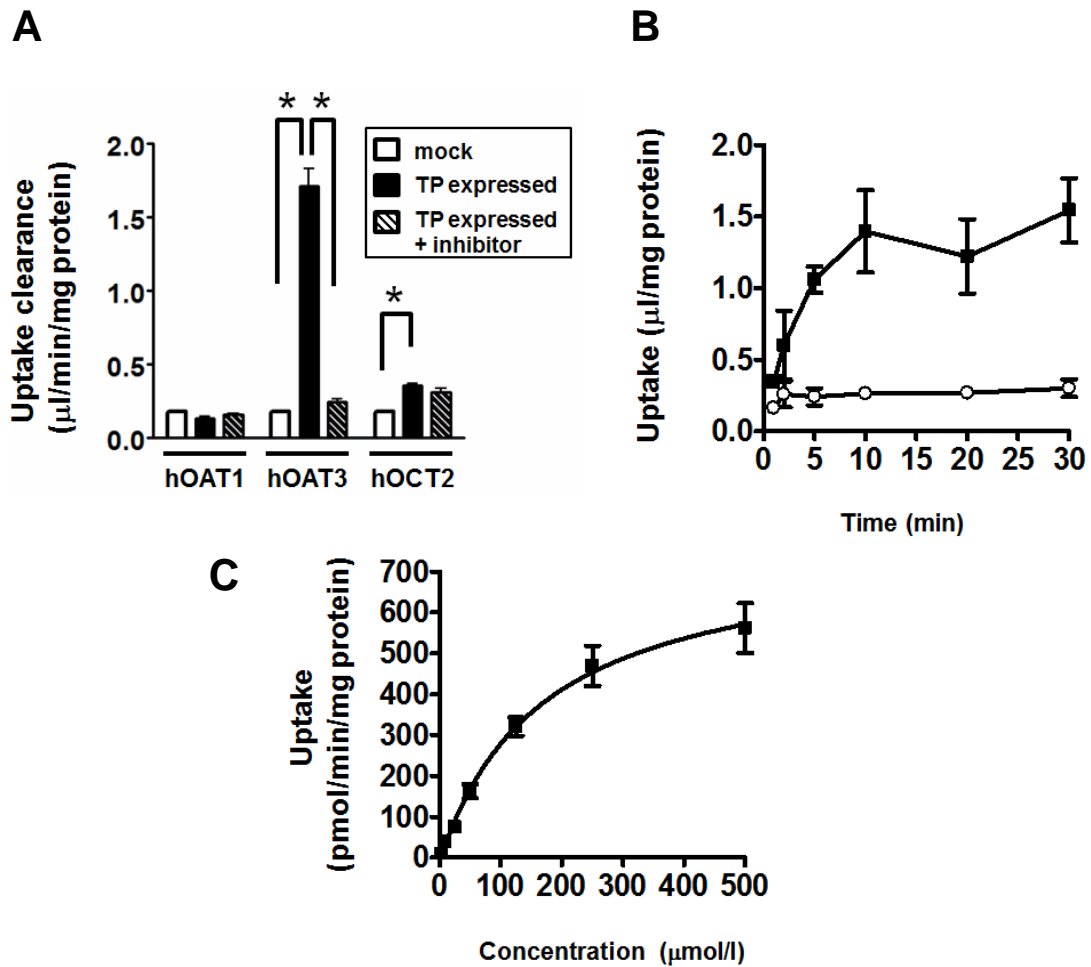


図 18. hOAT1、hOAT3 および hOCT2 発現 HEK293 細胞を介した 6β-OHF の取り込み

hOAT1-HEK、hOAT3-HEK および hOCT2-HEK を介した 6β-OHF (5 μM) の 5 分間の取り込みを観察した (A)。このとき阻害剤として 1 mM probenecid (OAT1、3) および 1 mM quinidine (OCT2) をそれぞれ用いた。また、hOAT3-HEK への取り込みに関して、6β-OHF (25 μM) の時間依存性 (B) および、5 分間における 6β-OHF の濃度依存性 (C) をそれぞれ観察した。縦軸は細胞内への取り込みクリアランス (A,B) または細胞内蓄積量 (C) をそれぞれ示している。また、(N=3)。

\*;  $P < 0.05$

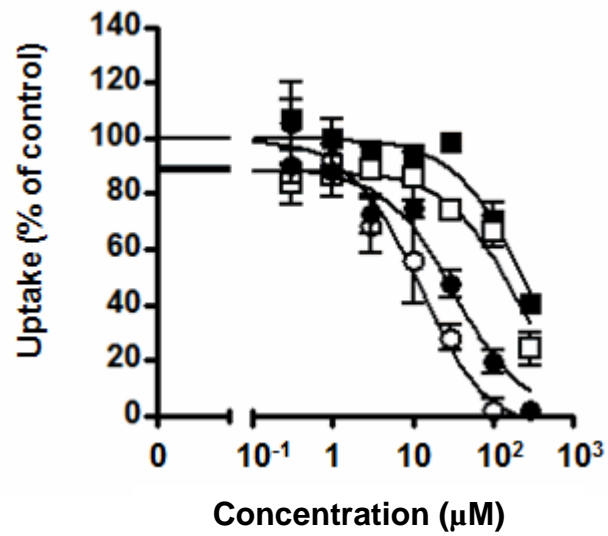


図 19. 各種薬物の OAT3 に対する阻害効果

6β-OHF (5 μM) の OAT3 発現 HEK293 細胞への 5 分間の取り込みに対する各種薬物 (DX-619; ■、probenecid; □、pyrimethamine; ●、clarithromycin; ○) の阻害効果を測定した。縦軸は OAT3 取り込み値から mock への取り込み値を差し引いた値 (control) に対する割合を示している。(N=3)



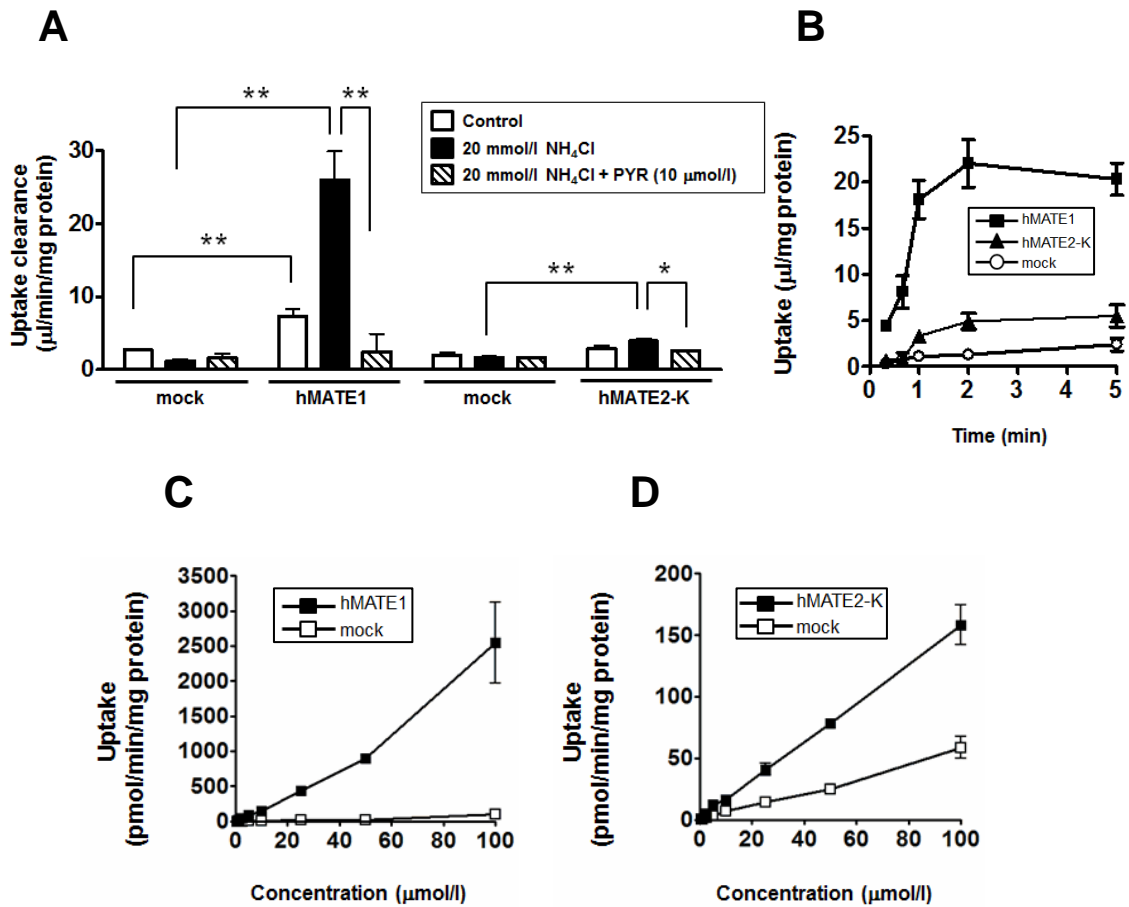


図 20. hMATE1、hMATE2-K 発現 HEK293 細胞を介した 6β-OHF の取り込み  
hMATE1 (1 分間) および hMATE2-K (2 分間) を介した 6β-OHF の取り込みを観察  
した (A)。この取り込み試験に際し、無処理、20 mM NH<sub>4</sub>Cl で preincubation、20  
mM NH<sub>4</sub>Cl 処置後に阻害剤 (10 μM pyrimethamine) を添加、をそれぞれ施した。  
また、hMATE1 への取り込みに関して、6β-OHF (25 μM) の時間依存性 (B) およ  
び、5 分間における濃度依存性 (C: hMATE1, D: hMATE2-K) をそれぞれ観察した。  
縦軸は細胞内への取り込みクリアランス (A, B) または細胞内蓄積量 (C, D) を  
それぞれ示している。 (N=3)。 \*\*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.05$

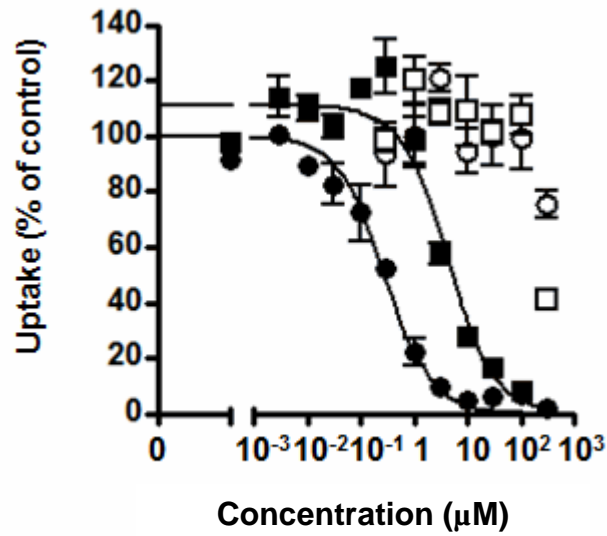


図 21. 各種薬物の MATE1 に対する阻害効果

6β-OHF (5 μM) の MATE1 発現 HEK293 細胞への 1 分間の取り込みに対する各種薬物 (DX-619; ■、probenecid; ○、pyrimethamine; ●、clarithromycin; □) の阻害効果を測定した。6β-OHF の取り込みは 20 mM NH<sub>4</sub>Cl で preincubation 後に実施している。縦軸は MATE1 取り込み値から mock への取り込み値を差し引いた値 (control) に対する割合を示している。(N=3)

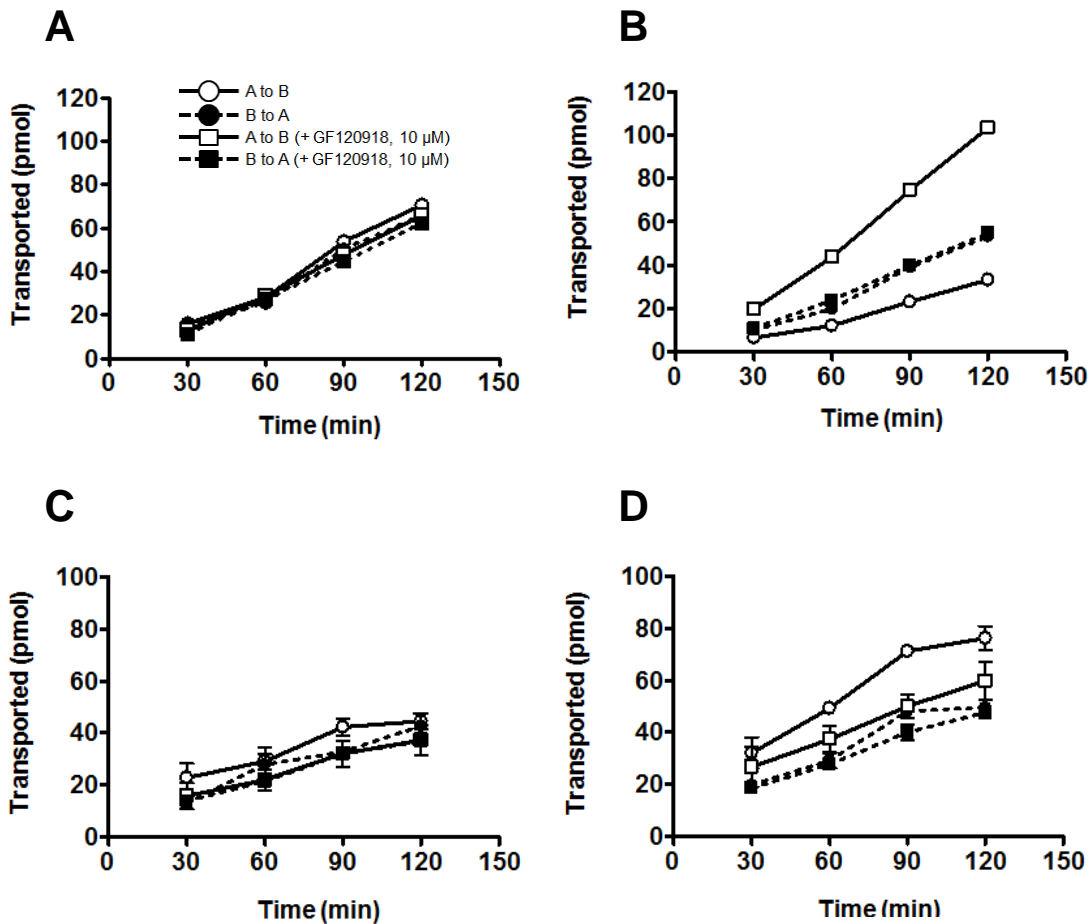


図 22. P-gp 遺伝子 (MDR1) 発現細胞系を用いた cortisol および 6β-OHF の経細胞輸送

Cortisol (1 μM、A、B) および 6β-OHF (10 μM、C、D)の LLC-PK1 細胞 (A、C) および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞 (B、D) に対する apical から basal 側 (A to B) および basal 側から apical 側 (B to A) への経時的な細胞膜透過性を測定した。縦軸は各化合物の経時的な細胞膜透過量を示している。(N=3)

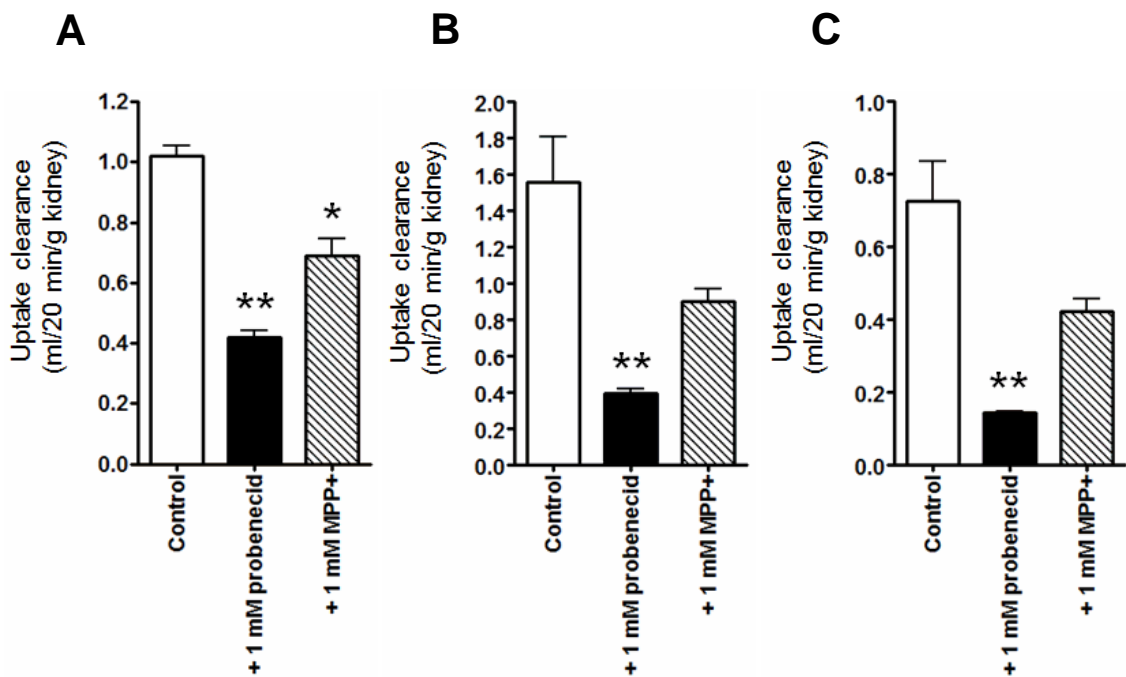


図 23. 6β-OHF のヒト腎切片への取り込みに対する probenecid および MPP<sup>+</sup>の阻害効果

ヒト腎切片への 6β-OHF の 20 分間における取り込みに対する probenecid (1 mM) および MPP<sup>+</sup> (1 mM) の阻害効果を測定した。縦軸は 20 分における細胞内への取り込みクリアランスを示している。腎切片は 3 名 (A; 70 歳男性、B; 51 歳女性、C; 75 歳男性) の腎臓癌患者より摘出された摘出腎組織の正常部位を用いた (N=3)。\*\*,  $P < 0.01$ , \*,  $P < 0.05$

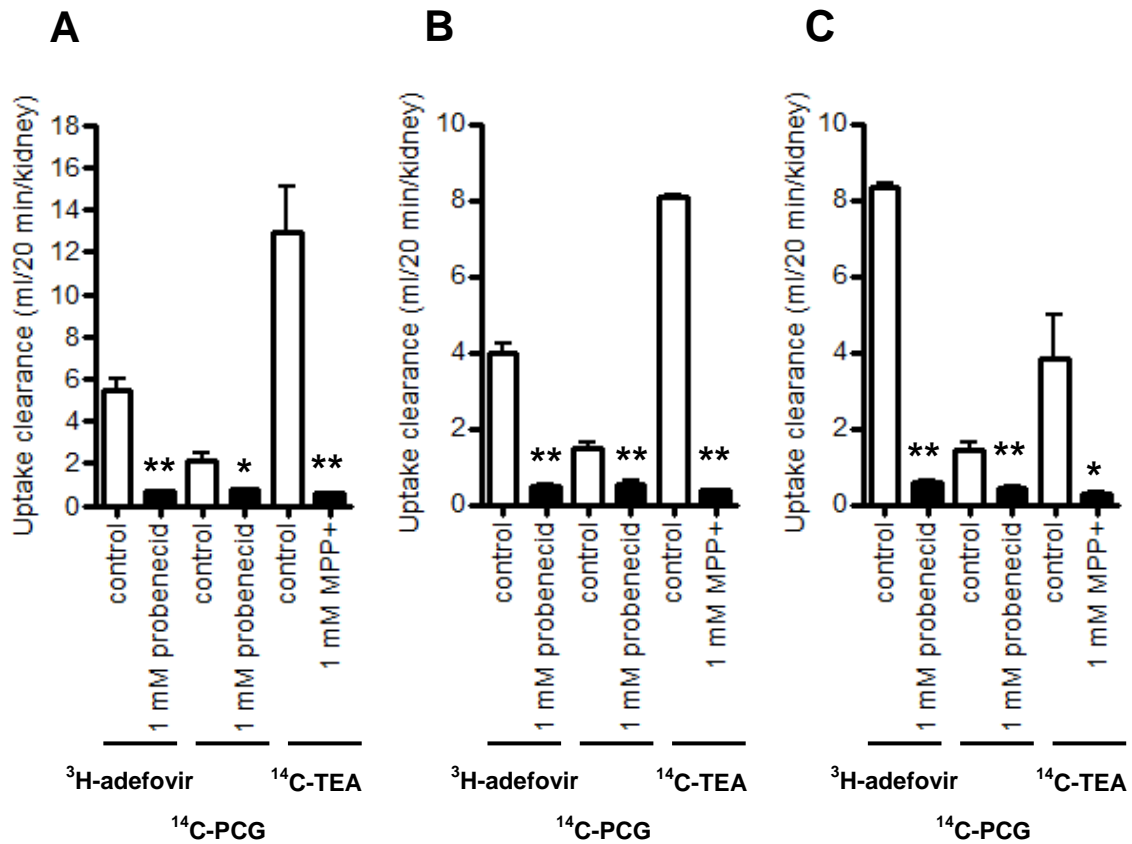


図 24.  $6\beta$ -OHF のヒト腎切片への取り込みに対する probenecid および  $MPP^+$  の阻害効果

ヒト腎切片への $[^3H]$ adefovirovir (0.2  $\mu Ci/ml$ )、 $[^{14}C]$ PCG (0.1  $\mu Ci/ml$ ) および $[^{14}C]$ TEA (0.1  $\mu Ci/ml$ ) の 20 分間における取り込みに対する probenecid (1 mM) あるいは  $MPP^+$  (1 mM) の阻害効果を測定した。縦軸は 20 分における細胞内への取り込みクリアランスを示している。腎切片は 3 名 (A; 70 歳男性、B; 51 歳女性、C; 75 歳男性) の腎臓癌患者より摘出された摘出腎組織の正常部位を用いた (N=3)。

\*\*;  $P < 0.01$ , \*;  $P < 0.05$

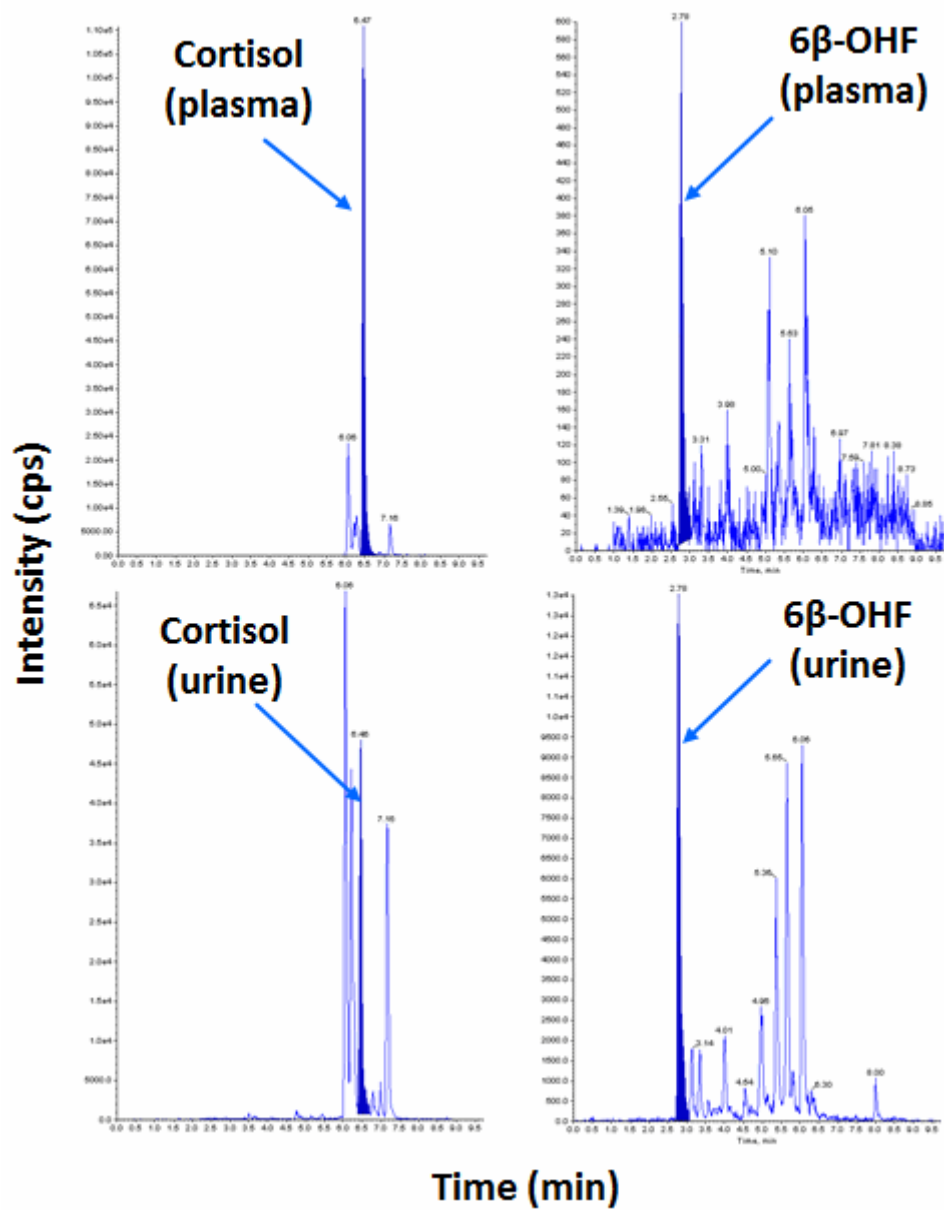


図 25. Cortisol および 6β-OHF のマスクロマトグラム

Benzylpenicillin/probenecid 投与時のヒト血漿および尿中の cortisol および 6β-OHF のマスクロマトグラムを示している。

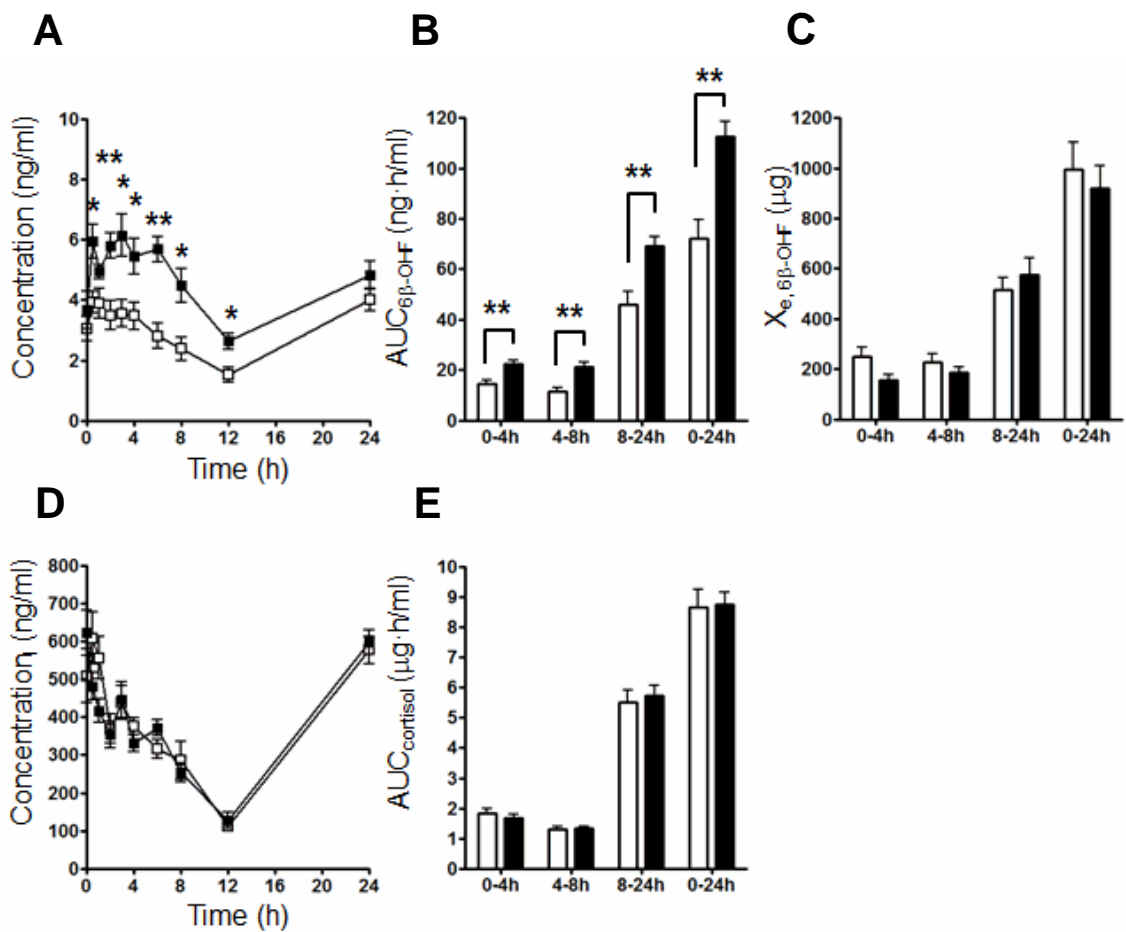


図 26. 健常人における probenecid の血漿中 6β-OHF および cortisol、および尿中 6β-OHF に与える効果 (C 群)

6β-OHF の血漿中濃度推移 (A)、血漿中濃度推移曲線下面積 (AUC, B) および尿中排泄量 (C)、および cortisol の血漿中濃度推移 (D) および AUC (E) をそれぞれ示している。各被験者は benzylpenicillin (□) 投与後、1 週間休薬期間をおき benzylpenicillin / probenecid (■) が投与された。(N=6)、\*\*;  $P < 0.01$ , \*;  $P < 0.05$

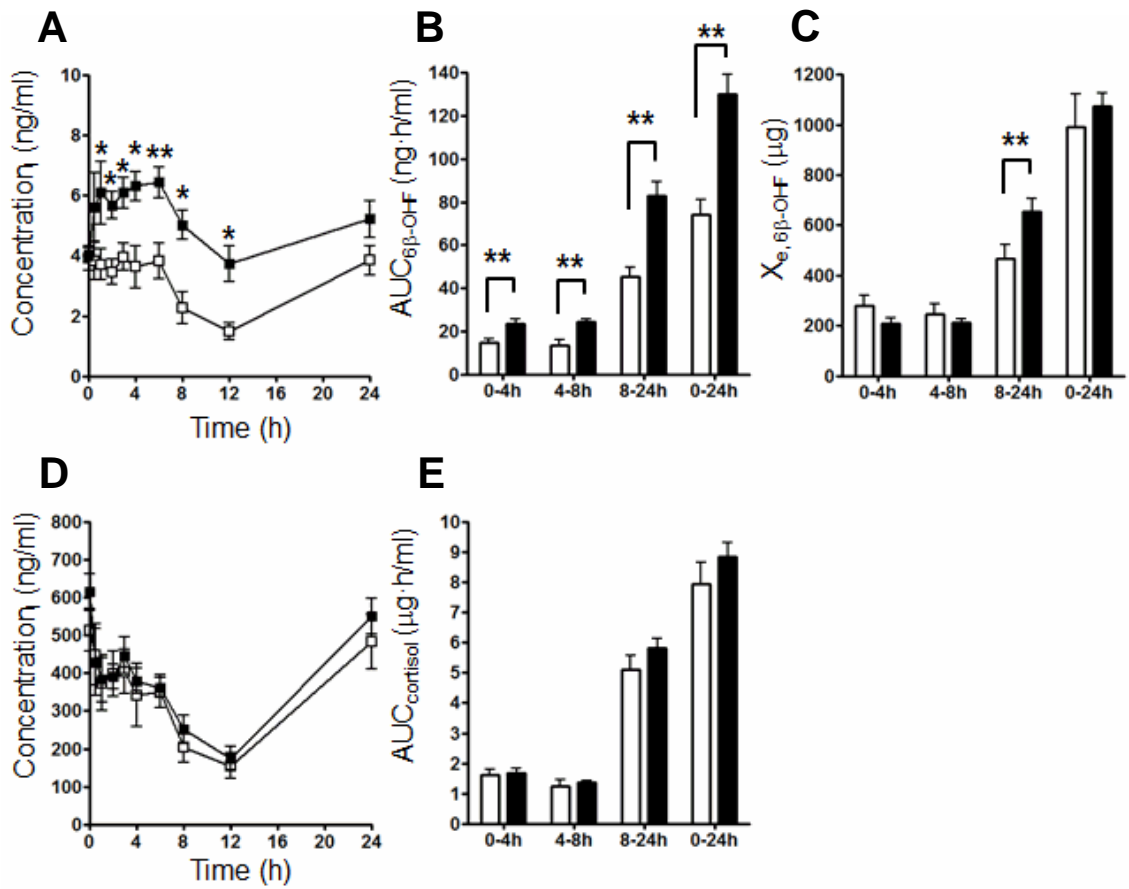


図 27. 健常人における probenecid の血漿中 6β-OHF および cortisol、および尿中 6β-OHF に与える効果 (A 群)

6β-OHF の血漿中濃度推移 (A)、AUC (B) および尿中排泄量 (C)、および cortisol の血漿中濃度推移 (D) および AUC (E) をそれぞれ示している。各被験者は adefovir (□) 投与後、1 週間休薬期間をおき adefovir / probenecid (■) が投与された。

(N=6)、\*\*;  $P < 0.01$ , \*;  $P < 0.05$



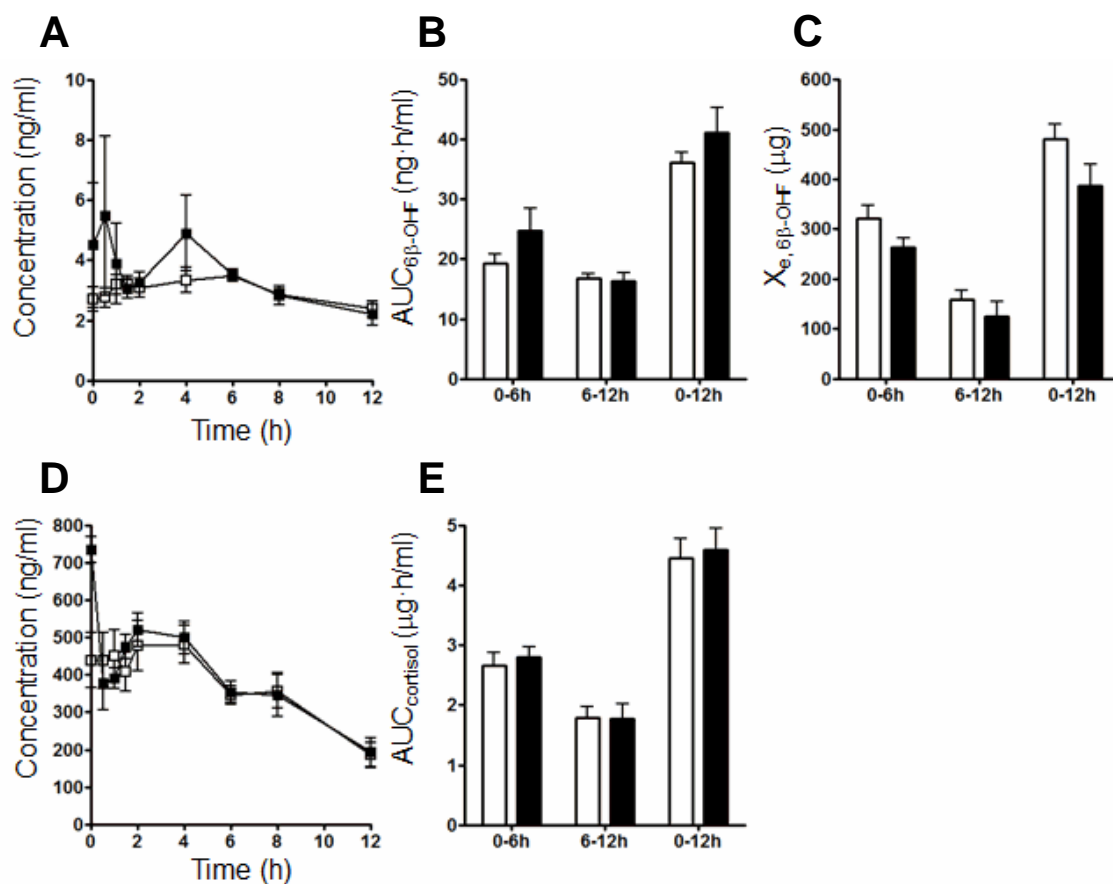


図 28. 健常人における pyrimethamine の血漿中 6β-OHF および cortisol、および尿中 6β-OHF に与える効果

6β-OHF の血漿中濃度推移 (A)、AUC (B) および尿中排泄量 (C)、および cortisol の血漿中濃度推移 (D) および AUC (E) をそれぞれ示している。各被験者は metformin (microdose、□) 投与後、1 週間休薬期間をおき metformin (microdose) / pyrimethamine (■) が投与された。(N=8)、\*\*、 $P < 0.01$ , \*、 $P < 0.05$

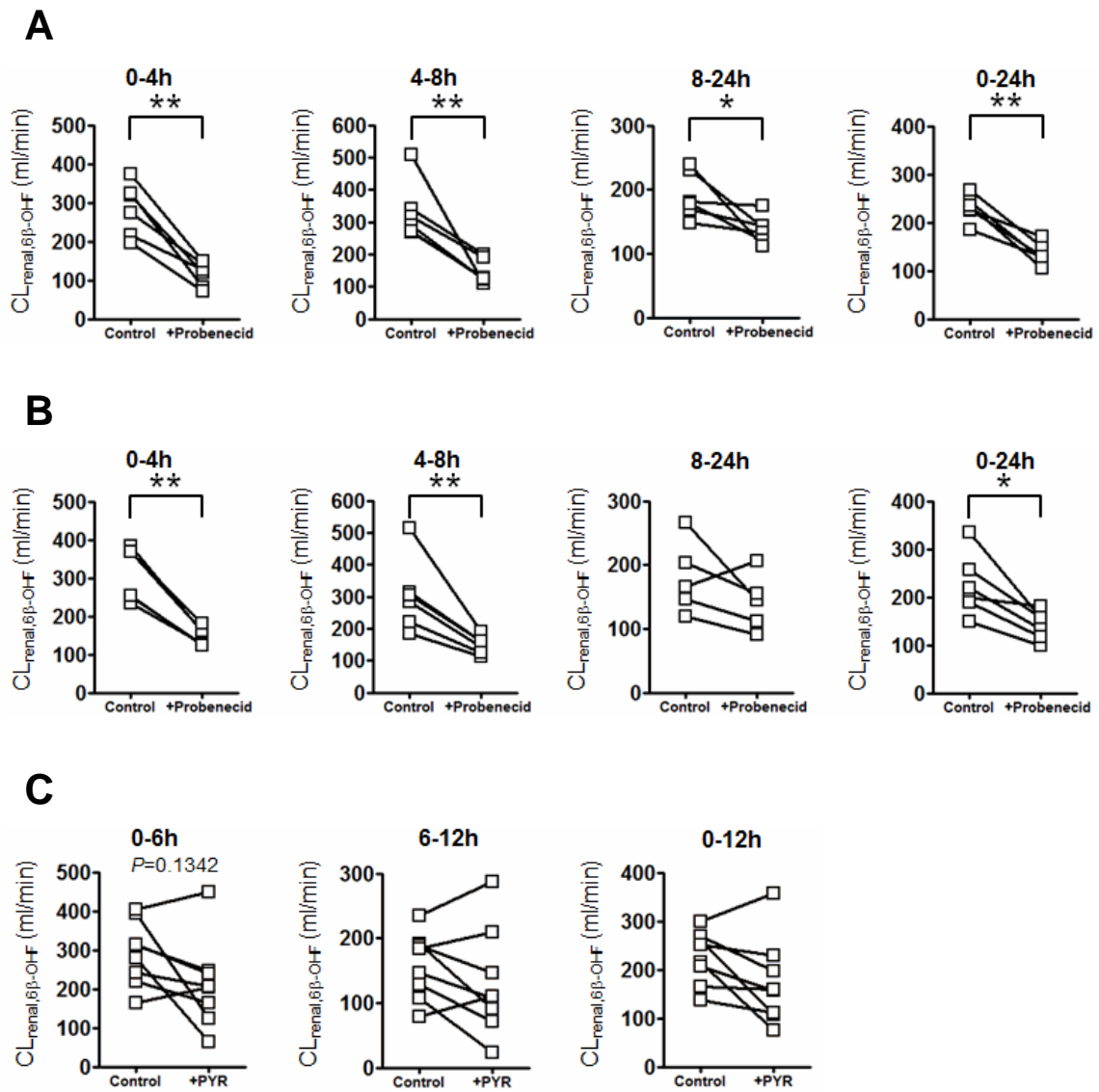


図 29. 健常人における probenecid および pyrimethamine の  $CL_{renal,6\beta-OHF}$  に与える効果

Benzylpenicillin および benzylpenicillin / probenecid 投与時 (A)、adefovir および adefovir / probenecid 投与時 (B)、および metformin および metformin / pyrimethamine 投与時 (C) の  $CL_{renal,6\beta-OHF}$  をそれぞれ示している。 \*\*:  $P<0.01$ , \*:  $P<0.05$

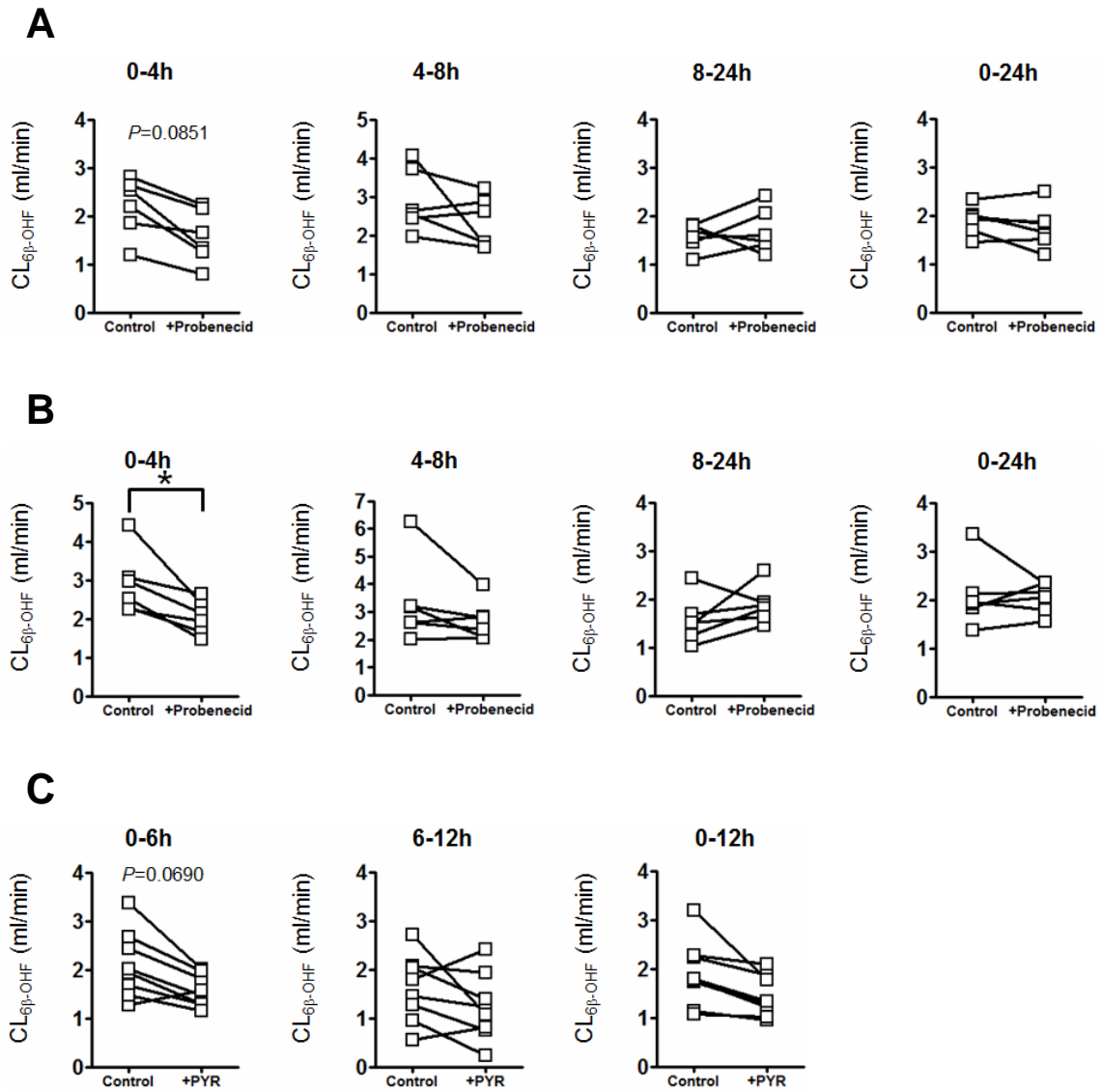


図 30. 健常人における probenecid および pyrimethamine の  $CL_{6\beta-OHF}$  に与える効果

Benzylpenicillin および benzylpenicillin / probenecid 投与時 (A)、adefovir および adefovir / probenecid 投与時 (B)、および metformin および metformin / pyrimethamine 投与時 (C) の  $CL_{6\beta-OHF}$  をそれぞれ示している。\*;  $P<0.05$

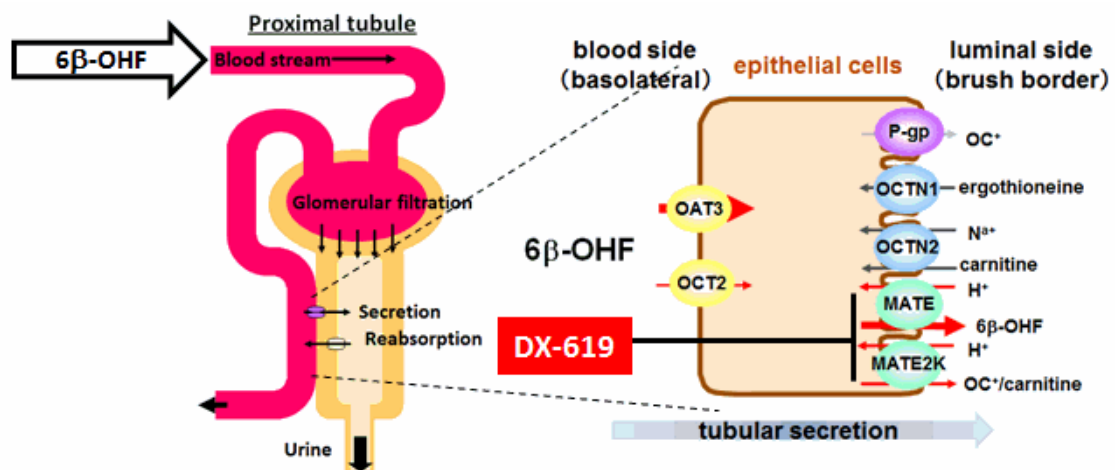


図 31. 考えられる  $6\beta$ -OHF の腎排泄の模式図

$6\beta$ -OHF の腎排泄には糸球体および尿細管分泌が考えられる。尿細管分泌には、血液側からの取り込みに OAT3 および OCT2 が、管腔側への排泄過程には、MATE1 および MATE2-K の関与が考えられ、DX-619 (1200 mg) は管腔側の MATE1 および MATE2-K を阻害すると考えられる。

## 結論および今後の展望

本研究を通じて、DX-619 による血漿中クレアチニン濃度の増大は、creatinine の OCT2/MATEs による尿細管分泌に対する DX-619 による機能阻害によって説明できることを明らかにした。また、ヒト CYP3A4 が関連した薬物相互作用 (MBI) 予測において、内因性 6 $\beta$ -OHF を用いた CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> および PBPK model による肝臓 CYP3A4 含量 (E<sub>act</sub>) の算出アプローチは共に有用であることを示した。6 $\beta$ -OHF は、糸球体ろ過に加えて基底膜側では OAT3、刷子縁膜側では MATE1 によって尿細管分泌をうけるが、その阻害は CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> に影響を与えないことを示した。最後に、今回用いた内因性代謝物の creatinine および 6 $\beta$ -OHF は、それぞれ OCT2/MATEs および OAT3 のプローブとなり得ることを示した。

第 1 章では、Phase 1 で認められた DX-619 投与時の一過性の血漿中クレアチニン濃度の上昇について、これが DX-619 による尿細管分泌阻害であり、DX-619 の腎有機カチオントランスポーター阻害 (OCT2/MATEs) を考慮することで説明することが可能になった。creatinine の尿細管分泌について網羅的に腎薬物トランスポーターの関与を検討したところ、creatinine は OCT2 および OAT3 の基質であり、ヒト腎スライス換算においては尿細管基底膜側では OCT2 の輸送の寄与が高いと考えられた。また、腎トランスポーターに対する DX-619 の阻害定数 (K<sub>i</sub>) と血漿遊離型 DX-619 濃度を比較したところ、本臨床試験において OCT2 および MATEs の阻害が生じることが確認された。DX-619 投与時の creatinine の変動を定量的に評価するために数理モデルを構築し、creatinine の尿細管分泌を DX-619 が競合阻害した場合の血漿中クレアチニン濃度の変動を simulation し

た結果、血漿中クレアチニン濃度上昇が起こるためには、尿細管分泌 (GFR の 50%程度) および再吸収 (同 10%程度) が必要であることが確認された。

第 2 章第 1 節では、創薬初期で確認されていた DX-619 の CYP3A4 に対する MBI リスク評価について 2 つのアプローチを実施した。すなわち *in vitro* パラメータおよび PBPK model を用いて DX-619 投与時 (1200 mg, 反復 15 日投与) の肝臓中 CYP3A4 含量 ( $E_{act}$ ) を予測し、次に、同サンプルの cortisol の見かけの  $6\beta$  水酸化クリアランス ( $CL_{6\beta-OHF}$ ) の低下を評価したところ、両者の評価結果はほぼ一致した。

第 2 章第 2 節では、*in vivo* CYP3A4 活性評価としての  $CL_{6\beta-OHF}$  の妥当性について、 $6\beta$ -OHF の尿排泄メカニズムの解明をすることで考察した。 $6\beta$ -OHF は糸球体ろ過に加え尿細管分泌によって排泄され、その分泌には主に基底膜側では OAT3 が、刷子縁膜では MATE1 が関与していることを明らかにした。このとき、 $6\beta$ -OHF の腎クリアランスが全身クリアランスに占める割合は高いことが推定され、薬物による  $6\beta$ -OHF の尿細管分泌阻害は  $CL_{6\beta-OHF}$  に影響を与えないことを明らかにした。また、probenecid による OAT3 阻害によって  $6\beta$ -OHF の腎クリアランスが有意に低下する一方、pyrimethamine による MATE1 阻害は  $6\beta$ -OHF の腎クリアランスに影響を与えないことを示し、 $6\beta$ -OHF が OAT3 の内因性プローブとして有用であることを初めて示した。

本研究では、比較的古くから biomarker として知られていた creatinine および  $6\beta$ -OHF を取り上げてきたが、これらはその biomarker としての使用に疑問を持つ報告があった (28, 100, 101)。その原因としてこれら内因性代謝物の体内動態、

特に排泄過程が不明であったことが挙げられる。今回、これが明らかとなったことで、**biomarker** としての **creatinine** および **6 $\beta$ -OHF** の変動を不安なく解析することができる。

1962年に **nalidixic acid** が創生されたように、キノロン薬およびニューキノロンの創薬は歴史が古い (7)。これまで **medicinal chemist** は、母核の構造をほぼキノリンで固定し、側鎖の構造変換およびその組み合わせによって、グラム陰性菌、グラム陽性菌、ブドウ球菌、肺炎球菌、嫌気性菌、クラミジア、マイコプラズマなど多種多様な抗菌活性を獲得するとともに構造-活性相関を見出してきた (8)。また一方で **CYP1A2** 阻害および光毒性等、キノロン薬およびニューキノロン特有の副作用を伴うようになったが、これらも精力的な構造-副作用相関研究によって回避が可能となった (102)。また全てのキノロン薬およびニューキノロンは、バクテリアの **DNA** ジャイレース結合性に必須であるがゆえにキノリン3位にカルボン酸を有している (8)。そのためこれまでのキノロン薬およびニューキノロンは、程度の差はあるもののグルクロン酸抱合を受け易く、カルボン酸のアニオン性のために組織分布性が低いことに起因して主に尿中に排泄されていたために、尿路感染症や消化管感染症に限っての適応が多かった。しかし、薬物動態研究によって尿中排泄-構造-物性相関が精査され、化合物の塩基性化および組織移行性の向上にともなって肺感染症を代表とした組織感染症へと適応症が広がった (64)。しかし、組織移行性の向上は尿排泄型から肝排泄型へのシフトにもつながり、**grepafloxacin** や **trovafloxacin** のような肝臓における臨床副作用を発現したり (21, 103)、**DX-619** のようなカチオン系トランスポーター阻害能

を有するに至っている。このように、ニューキノロンの創薬は、これまで以上の抗菌活性向上や耐性菌への薬理作用が期待される一方、新たに発生してしまった臨床副作用をどのように回避あるいは低減させるかが今なお課題である。本研究では臨床副作用が実際に起こりえるのか、そしてその副作用がどの程度なのかを、1) 血漿中遊離型阻害剤濃度と  $K_i$  の比較を用いた定量的な評価、および 2) 数理学モデル等を使った *in vitro* からの予測と biomarker による検証、の 2 つのアプローチから検討してきた。本研究が今後のニューキノロン創薬における副作用の早期回避に活かされることを期待する。

また、本研究成果はニューキノロンへの適用にとどまらず、多くの医薬候補品の臨床の比較的初期に適用することにより、臨床副作用および薬物相互作用に対して多面的な解析が可能となり、確かなエビデンスをもとにした以降の臨床試験に対する対応策が可能になると期待される。一方、新規内因性プローブの知見から、トランスポーター阻害能を有する医薬候補化合物について、臨床早期にそのリスクが予測できると期待される。現在、 $6\beta$ -OHF が OAT3 の、creatinine および *N*-methylnicotinamide がそれぞれ OCT2/MATEs および MATEs の内因性プローブとして利用可能である (65, 85)。これらは臨床早期のヒトサンプルで評価可能な点が特徴であり、各腎薬物トランスポーターが関与する重篤な臨床副作用を事前に予測することが可能となり、医薬品開発の意思決定のための重要な情報となり得る。本内因性代謝物を用いた DDI 評価の蓄積による妥当性の検証と FDA の薬物相互作用ガイダンス等において、これら biomarker の積極的な利用を期待してやまない。



## 謝辞

本研究の推進にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました理化学研究所イノベーションセンター杉山特別研究室 杉山 雄一 先生、ならびに東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 教授 楠原 洋之 先生に深謝いたします。

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

本研究の機会を与えてくださり、研究の推進に多大なるご支援を賜りました第一三共株式会社 泉 高司博士ならびにヒューマンサイエンス振興財団 岡崎 治博士に深謝致します。

MATE 発現細胞の提供に際しご尽力いただきました、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 教授 湯浅 博昭 先生ならびに東京薬科大学薬学部医療薬学科薬物動態制御学教室 教授 井上 勝央 先生に深謝いたします。

臨床サンプルの提供に際しご尽力いただきました、学校法人北里研究所北里大学東病院治験管理センター長 熊谷 雄治 先生に深謝いたします。

ヒト腎スライスの作成および研究に共に携わって戴きました Tissue and Cell Research Center Munich Dominik Heer 博士ならびに Katja Damme 修士に深謝いたします。

そして、本研究にご協力いただきました被験者様に謹んで感謝の意を表します。

最後に私の研究を支えてくださいました、伊藤 澄人さんを始めとする分子薬物動態学教室の皆様、第一三共株式会社薬物動態研究所の皆さま、そして私の家族に深く感謝の意を表します。

平成 25 年 3 月 22 日  
今村 勇一郎

## 実験方法

### 第1章 creatinine の腎排泄メカニズムの解析

#### 試薬

[<sup>14</sup>C]creatinine (2.035 GBq/mmol)、[<sup>14</sup>C]PAH (1.898 GBq/mmol)、[<sup>3</sup>H]ES (2120 GBq/mmol)、[<sup>3</sup>H]histamine (459 GBq/mmol) は Perkin Elmer (Waltham, MA) より購入した。[<sup>14</sup>C]TEA (2.049 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals (Saint Louis, MO) より購入した。非標識 creatinine, cimetidine は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、grepafloxacin、moxifloxacin は Sequoia Research Products (Pangbourne, UK) より購入した。DX-619 および levofloxacin は第一三共株式会社より合成したものを使用した。他の試薬は市販の特級品、もしくは分析用を購入し用いた。

#### hOATs、hOCTs および MATEs 遺伝子発現系を用いた [<sup>14</sup>C]creatinine および典型基質の取り込み

hOAT1, 2, 3, 4 および hOCT1, 2, 3 を導入した S<sub>2</sub> 細胞の樹立および培養操作は既報に則って行った (104)。また、hOAT1, 3、hOCT2、MATE1 および MATE2-K 発現 HEK293 細胞の樹立および培養操作は既報に則って行った (58, 105)。24 well dish に細胞を  $2 \times 10^5$  cells / well 播種後 3 日間培養した。過去の報告に則り、輸送実験の 24 時間前に 5 mM sodium butyrate を含むメEDIUMに交換した。取り込み実験に際しては hOAT1, 2, 3, 4 および hOCT1, 2, 3 については Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 118 mM NaCl、23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>、4.83 mM KCl、0.96 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.20 mM MgSO<sub>4</sub>、12.5 mM HEPES、5

mM glucose、1.53 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4) となるよう調製し、細胞を当該 buffer で 37 °C、15 分間 pre-incubation し、被験化合物を含んだ 37 °C の buffer を添加することで実験を開始した。MATE1 および MATE2-K 細胞については、Krebs-Henseleit buffer (118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.8 mM KCl, 1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 12.5 mM HEPES, 5.0 mM glucose、1.5 mM CaCl<sub>2</sub>、pH 7.4) となるよう調製した。Pre-incubation は、細胞を 20 mM NH<sub>4</sub>Cl 含有の Krebs-Henseleit buffer で 37 °C、10 分間 pre-incubation し、被験化合物を含んだ 37 °C の buffer を添加することで実験を開始した。

輸送実験は buffer を吸引し、4 °C の氷冷した buffer にて 2 回洗浄することで反応を停止させた。輸送実験終了後、放射性化合物については 0.2 N NaOH にて細胞を可溶化させ、2 N HCl で中和後、シンチレーションカクテル (Hionic Fluor; Perkin Elmer) を加え放射活性を測定した。非放射性化合物については、0.3% ギ酸/acetonitrile (7:3) を添加して細胞を回収・抽出し、LC-MS/MS で測定した。また、蛋白濃度は bovine serum albumin を標品として BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) を用いて測定した。

### 速度論的解析 (*in vitro*)

トランスポーター発現細胞を用いた解析は以下の手法にて行った。

速度論的パラメータは Michaelis-Menten 式 (3 式) により算出した。

$$V = V_{\max} * S / (K_m + S) \quad (3 \text{ 式})$$

ここで V は基質の取り込み速度 (pmol / mg protein / min) を、S はメディウム中の

基質濃度 ( $\mu\text{M}$ )を、 $K_m$  は Michaelis 定数 ( $\mu\text{M}$ )、 $V_{\max}$  は最大取り込み速度 ( $\text{pmol} / \text{mg protein} / \text{min}$ ) を表している。

DX-619 および grepafloxacin の OCT2 に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は以下の式 (4 式) により算出した。

$$K_i = I / (K_{m(+inhibitor)} / K_{m(\text{control})}) - 1 \quad (4 \text{ 式})$$

ここで、 $I$  は阻害剤濃度を、 $K_{m(+inhibitor)}$  および  $K_{m(\text{control})}$  は阻害剤存在下、非存在下で求まる  $K_m$  値を表している。

DX-619 の OAT1、OAT3、MATE1 および MATE2-K に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は以下の式 (5 式) により算出した。

$$CL_{\text{uptake} (+inhibitor)} = CL_{\text{uptake} (\text{control})} / (1 + I/K_i) \quad (5 \text{ 式})$$

ここで、 $CL_{\text{uptake} (+inhibitor)}$  および  $CL_{\text{uptake} (\text{control})}$  は、阻害剤存在下および非存在下での uptake clearance を表している。

Fitting は GraphPad Prism 4 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) を用いて実行した。

腎スライス基準の creatinine の OAT3 および OCT2 を介した uptake clearance は RAF 法 (relative activity factor, RAF) にならい、以下の式に従い算出した (85)。

$$RAF_{\text{hOAT3}} = CL_{\text{kidney slice, ES}} / CL_{\text{hOAT3, ES}} \quad (6 \text{ 式})$$

$$RAF_{\text{hOCT2}} = CL_{\text{kidney slice, TEA}} / CL_{\text{hOCT2, TEA}} \quad (7 \text{ 式})$$

$$CL_{\text{kidney slice, creatinine, OAT3}} = CL_{\text{hOAT3, creatinine}} * RAF_{\text{hOAT3}} \quad (8 \text{ 式})$$

$$CL_{\text{kidney slice, creatinine, OCT2}} = CL_{\text{hOCT2, creatinine}} * RAF_{\text{hOCT2}} \quad (9 \text{ 式})$$

ここで、 $CL_{\text{kidney slice, ES}}$  および  $CL_{\text{kidney slice, TEA}}$  は、腎スライスへの ES および TEA の uptake clearance を、 $CL_{\text{hOAT3, ES}}$  および  $CL_{\text{hOCT2, TEA}}$  は OAT3 発現細胞に対する ES の uptake clearance および OCT2 発現細胞に対する TEA の uptake clearance を、 $CL_{\text{hOAT3, creatinine}}$  および  $CL_{\text{hOCT2, creatinine}}$  は OAT3 および OCT2 発現細胞に対する creatinine の uptake clearance をそれぞれ表している。

### 臨床データの取り扱い

臨床データおよび被験者情報は以下の社内報告書および論文 (25) を参照した。

Study name: 619A-PRT009

Report title: A Single-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Parallel Group Trial to Evaluate the Effect of DX 619 on Renal Function as Determined by Glomerular Filtration Rate (GFR) Measured by Serum Clearance of a Single Bolus Infusion of Cold Iohexol

### 試験概要

対象薬物 : DX-619 (800 mg)、iohexol (600 mg)

被験者 : 健常男女 20-46 歳。  $CL_{\text{cre}} > 90$  ml/min、身長  $176 \pm 8$  cm、体重  $78 \pm 9$  kg

臨床施設 : Da Vita Clinical Research Unit (Minneapolis, MN)

被験者に DX-619 (800 mg) を 4 日間連続で静脈内定速注入 (1 h, 400 ml バック) を実施した。DX-619 投与前 (baseline) 及び投与後 4 日目における DX-619 投与後 1 h に 20 ml の iohexol (Omnipaque として 300 mg/ml 含有) を静脈内投与した。血液を遠心分離して得られた血漿および尿サンプルは  $-20^{\circ}\text{C}$  保管した。臨床試験

計画書およびインフォームドコンセントは Da Vita Clinical Research Unit 内審査委員会で承認された。

### 速度論的解析 (*in vivo*)

Iohexol は生体内で代謝を受けず、組織内にもほとんど分布されずに全てが糸球体を通して尿中に排泄されることから、iohexol の全身クリアランス ( $CL_{\text{iohexol}}$ ) は GFR (糸球体ろ過速度) にほぼ等しいことが報告されている (57, 106)。そこで、 $CL_{\text{iohexol}}$  を GFR に代用した (10 式)。

$$GFR = CL_{\text{iohexol}} = \text{Dose} / AUC_{\text{iohexol}} * 1.73 / \text{body surface area} \quad (10 \text{ 式})$$

また、 $CL_{\text{cre}}$  は、以下の式 (11 式) により算出した。

$$CL_{\text{cre}} = X_{\text{creatinine}} / AUC_{\text{creatinine}} * 1.73 / \text{body surface area} \quad (11 \text{ 式})$$

ここで、 $X_{\text{creatinine}}$  は尿中 creatinine 量を示している。

### DX-619 投与時の血漿中クレアチニン濃度上昇の数理モデル

以下の仮定に基づき数理モデルを構築した。

1. 循環血中 creatinine の主排泄経路は腎臓からの尿排泄である。
2. creatinine の近位尿細管基底膜側の取り込みには hOCT2 が寄与する
3. creatinine の近位尿細管刷子縁膜側からの排出には MATE1 および MATE2-K のいずれかが寄与する。

creatinine の pharmacokinetic model は以下の式 (12 式) により算出した。

$$dC_{\text{cre}} / dt = R_{\text{inf}} / V_{\text{cre}} - CL_{\text{cre}} * C_{\text{cre}} / V_{\text{cre}} \quad (12 \text{ 式})$$

ここで  $R_{inf}$  は creatinine の生合成速度を、 $V_{cre}$  は creatinine の分布体積をそれぞれ示している。

$CL_{cre}$  は以下の式 (13 式) により算出した。

$$\begin{aligned} CL_{cre} &= (1 - FR) * (f_u * GFR + CL_{rs}) \\ &= (1 - FR) * f_u * GFR + \frac{RPF * f_u * CL_{rs, int all}}{RPF + f_u * CL_{rs, int all}} \end{aligned} \quad (13 \text{ 式})$$

ここで、FR、GFR、 $f_u$ 、RPF および  $CL_{rs, int all}$  はそれぞれ、再吸収率、糸球体ろ過速度、血漿タンパク非結合型分率、腎血漿流量および分泌固有クリアランスを示している。

creatinine の  $f_u$  は 1 であり (43)、RPF は Berg らのデータを参照した (107)。 $V_{cre}$  の IBW (ideal body weight) に対する比は 0.49 とした (108)。各被験者の IBW は以下の 14 式より算出した。

$$IBW = 0.9 * (H - 100) \quad (14 \text{ 式})$$

ここで、H は身長を示している。

本モデルでは、DX-619 非投与時では、血漿中クレアチニンの濃度は定常状態、すなわち生合成速度と排泄速度が等しい。そこで、血漿中クレアチニン濃度は 12 式および 13 式で記述できる。初期状態 ( $t=0$ ) での  $C_{cre}$ 、GFR および  $CL_{rs, int all}$  はそれぞれ  $C_{cre \text{ day } -1}$ 、 $GFR_{\text{day } -1}$  および  $CL_{rs, int all}$  と表すこととした。Model 1 では、creatinine の分泌に OCT2 のみに関わり、Model 2 では OCT2 に加え MATE1 (model 2a) あるいは MATE2-K (model 2b) が関わるとした。

血漿中 DX-619 濃度は、以下の 1-compartment model に当てはめた。

$$C_{DX-619}(t) = A * (1 - e^{-\alpha t}) \quad (0 \leq t \leq 1h) \quad (15 \text{ 式})$$



$$C_{DX-619}(t) = A * (1 - e^{-\alpha * (t-1)} - e^{-\alpha * t}) \quad (1 \text{ h} < t) \quad (16 \text{ 式})$$

ここで、 $C_{DX-619}$ 、 $A$  および  $\alpha$  は時間  $t$  のときの血漿中 DX-619 濃度、 $t = 0$  のときの DX-619 濃度および DX-619 の排泄速度定数をそれぞれ示している。DX-619 の腎クリアランスは腎血流量と比較して十分低いため、血漿遊離型 DX-619 濃度ベースで各  $K_i$  値と比較してもよい。

### 数理モデルにおける creatinine に関する初期値の見積もり

DX-619 連投後 4 日目で creatinine の分泌が完全に阻害されたと仮定すると ( $CL_{rs, \text{int all}} = 0$ )、FR の初期値は以下の式 (17 式) および GFR により求めることができる。

$$CL_{\text{cre, day 4}} = GFR_{\text{day 4}} * (1 - FR) \quad (17 \text{ 式})$$

さらに、 $CL_{rs}$  および  $CL_{rs, \text{int all}}$  は 13 式を用いて算出した。

WinNonlin Professional software version 5.0 (Pharsight, Mountain View, CA)、血漿中 DX-619 濃度および上記初期値を用いて血漿中クレアチニン濃度に関する微分方程式を解いて得られる血漿中クレアチニン濃度と実測の血漿中クレアチニン濃度を fitting させ、収束される  $C_{\text{cre}}$ 、FR、および  $CL_{rs, \text{int all}}$  を求めた。

### 統計解析

2 群間データは、student の t-test により、3 群以上のデータ間においては ANOVA の後に、Bonferroni の post test を行うことによって統計的有意差解析を行った。

## 第2章 コルチゾールの代謝クリアランスの算出

### 試薬

Cortisol、6 $\beta$ -OHF、probenecid、quinidine、pyrimethamine、carbenoxolone、clarithromycin および 6 $\beta$ -methylprednisolone は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。d4-cortisol、d4-6 $\beta$ -OHF および GF120918 は Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada) から購入した。DX-619 および重水素ラベルした DX-619 (d3-DX-619) は第一三共株式会社で合成されたものを用いた。ヒトミクロソーム (HLM) および CYP3A4 発現 Supersomes™は BD Gentest より購入した。他の試薬は市販の特級品、もしくは分析用を購入し用いた。

### HLM を用いた midazolam 1-hydroxylation の MBI

CYP3A4 と DX-619 に関する見かけの乖離定数 ( $K_i$ ) および最大不活化速度定数 ( $k_{inact}$ ) は以下の方法で求めた。

1. Preincubation buffer (1.0 mg/ml HLM、55 mM phosphate buffer、1.3 mM  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、3.3 mM G6P、0.4 units/ml G6PDH および 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>) 中で一定濃度の DX-619 と preincubation。
2. Incubation buffer (5  $\mu$ M midazolam、55 mM phosphate buffer、1.3 mM  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、3.3 mM G6P、0.4 units/ml G6PDH および 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>) に、1/10 用量の 1 液を添加し、midazolam 1-hydroxylation を開始。一定時間後、反応は氷冷した acetonitrile で停止させる。1'-hydroxymidazolam は LC-MS/MS を用いて定量。

3. CYP3A4 の残存活性の自然対数を x 軸に、preincubation time (min) を y 軸にとり、その傾き ( $k_{obs}$ ) を算出。

4.  $k_{obs}$  と DX-619 濃度を WinNonlin Professional version 5.0 を用いて下式 (18 式) に fitting させ  $K_i$  および  $k_{inact}$  求める。

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} * I}{K_i * I} \quad (18 \text{ 式})$$

また、MBI および direct inhibition (DI) 阻害能 (% of control) は、19 式および 20 式より求めた。

$$\text{MBI (\% of control)} = \frac{\frac{C_{x \text{ min} + \text{inhibitor}}}{C_{x \text{ min}}}}{\frac{C_{0 \text{ min} + \text{inhibitor}}}{C_{0 \text{ min}}}} \quad (19 \text{ 式})$$

$$\text{DI (\% of control)} = \frac{C_{x \text{ min} + \text{inhibitor}}}{C_{0 \text{ min} + \text{inhibitor}}} \quad (20 \text{ 式})$$

ここで、 $C_{0 \text{ min}}$ 、 $C_{0 \text{ min} + \text{inhibitor}}$ 、 $C_{x \text{ min}}$ 、 $C_{x \text{ min} + \text{inhibitor}}$  はそれぞれ、preincubation なしの場合の 1'-hydroxymidazolam 濃度、preincubation なし、かつ阻害剤存在下の 1'-hydroxymidazolam 濃度、x min preincubation した場合の 1'-hydroxymidazolam 濃度および preincubation を x min 実施し、かつ阻害剤存在下の 1'-hydroxymidazolam 濃度をそれぞれ示す。

#### **HLM 中の DX-619 の遊離分率 ( $f_{u, \text{HLM, DX-619}}$ )**

HLM (1 mg/ml) に DX-619 を溶解させ (溶液 1)、CS 150 GXII (Hitachi Koki Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用いて超遠心させた上清 (溶液 2) を得た。HLM 中の DX-619 の非結合型分率 ( $f_{u, \text{HLM, DX-619}}$ ) は以下の式 (21 式) により算出した。

$$f_{u, \text{HLM, DX-619}} = 1 - (C_{\text{溶液 2}} / C_{\text{溶液 1}}) \quad (21 \text{ 式})$$

ここで、 $C_{\text{溶液1}}$  は HLM 中の DX-619 濃度を  $C_{\text{溶液2}}$  は超遠心後の上清中の DX-619 濃度をそれぞれ示している。

### 6 $\beta$ -OHF のヒト血漿タンパク結合率 ( $f_{u,6\beta\text{-OHF}}$ )

ヒト血漿は、Biopredic International (Rennes, France) より購入した。ヒト血漿タンパク結合率は Red device (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて、平衡透析法により求めた (109)。すなわち、ヒト血漿に 6 $\beta$ -OHF を添加し (最終濃度として 50 および 200 nM)、37 °C で 6 h incubation した後、血漿側および PBS 側の 6 $\beta$ -OHF を LC-MS/MS で定量した。

### DX-619 投与時の肝臓中 CYP3A4 含量の simulation

以下の肝臓中 CYP3A4 ( $E_{\text{act}}$ ) に関する微分方程式は既報にならった (22 式)。

$$\frac{dE_{\text{act}}}{dt} = - \frac{k_{\text{inact}} * E_{\text{act}} * f_{u,\text{DX-619}} * C_{p,\text{DX-619}}}{K_I + f_{u,\text{DX-619}} * C_{p,\text{DX-619}}} + k_{\text{deg}} (E_0 - E_{\text{act}}) \quad (22 \text{ 式})$$

ここで、 $E_0$ ,  $k_{\text{deg}}$ ,  $f_{u,\text{DX-619}}$  および  $C_{p,\text{DX-619}}$  はそれぞれ肝臓中 CYP3A4 の初期値、肝臓 CYP3A4 の消失速度定数、DX-619 の血漿遊離型分率 (85)、および血漿中 DX-619 濃度をそれぞれ示している。肝臓 CYP3A4 の生合成速度は同消失速度の初期値 ( $k_{\text{deg}} * E_0$ ) と同じであり、さらに DX-619 は CYP3A4 の合成や消失には影響を与えないと仮定した。

DX-619 の肝抽出率は 0.1 と低いため、血液中の非結合型 DX-619 は肝細胞外液中濃度と近似でき、さらに血液-肝臓間で DX-619 濃度は瞬時に平衡に達すると仮定して、以後、血液中の DX-619 濃度で肝臓中濃度の解析を行うこととした。

微分方程式は DX-619 投与時 (1,200 mg, 2 h infusion) の肝臓中の活性型 CYP3A4 を WinNonlin Professional version 5.0 であらかじめセットアップされている”2-compartment IV-infusion, micro-constants, no lag time, 1<sup>st</sup> order elimination”を用いてシミュレートした。ここで、 $k_{deg}$  については種々報告されているため、 $0.000481 \text{ min}^{-1}$  (88)、 $0.000321 \text{ min}^{-1}$  (86) および  $0.000136 \text{ min}^{-1}$  (87) をそれぞれ使用して simulation した。

### **hOATs、hOCT2 および MATEs 遺伝子発現系を用いた 6 $\beta$ -OHF のの取り込み**

hOAT1、3、hOCT2、MATE1 および MATE2-K を導入した HEK293 細胞の樹立、培養操作および細胞内取り込みは第 1 章と同様に行った。細胞は 0.3% ギ酸/acetonitrile (7:3) を添加して回収・抽出し、LC-MS/MS で測定した。また、細胞蛋白濃度の測定は第 1 章と同様に行った。

### **P-gp 遺伝子発現細胞系を用いた 6 $\beta$ -OHF の経細胞輸送**

Mock 細胞および、および MDR1-LLC-PK1 細胞は Dr. Piet Borst より供与していただいた。Transwell® (polycarbonate membrane, 0.4 mm pore size, 24 mm diameter, Corning Inc., Corning, NY) に各細胞を  $1 \times 10^5$  cells / well 播種後 3 日間培養した。輸送試験に際しては Medium 199 (Invitrogen, Grand Island, NY) を 25 mM HEPES (pH 7.4) となるよう調製し (以下 transport buffer)、細胞を当該 transport buffer で 37 °C、10 分間 pre-incubation し、6 $\beta$ -OHF (10  $\mu$ M) あるいは cortisol (1  $\mu$ M, positive control) を含んだ 37 °C の transport buffer を apical または basal 側に添加すること

で実験を開始した。Acceptor 側には 4% BSA を含有した transport buffer を添加した。細胞を一定時間 incubation 後、acceptor 側の一部を採取し同量の 4% BSA 含有 transport buffer で再び満たした。6 $\beta$ -OHF の P-gp 輸送における阻害効果は、apical および basal 双方に 6 $\beta$ -OHF を添加し [<sup>3</sup>H]digoxin の輸送を確認することで評価した。回収された 6 $\beta$ -OHF あるいは cortisol 溶液は、アセトニトリルで除タンパク後、LC-MS/MS で測定した。また、 [<sup>3</sup>H]digoxin はシンチレーションカクテル (Hionic Fluor; Perkin Elmer) を加え放射活性を測定した。経細胞輸送速度は、輸送量を輸送時間で除して算出した。

## 臨床試験概要

Benzylpenicillin、benzylpenicillin/probenecid および adefovir、adefovir/probenecid に関する臨床試験の概要を以下に示す。

試験名：腎取り込みトランスポーターOAT1, OAT3 のプローブ薬探索のための薬物間相互作用試験

対象薬物：以下 4 群に分けて被験者に投与した。

A : Hespera® tablet (adefovир dipivoxil、10 mg、経口) / Benecid® (probenecid、0、500、750、1500 mg、経口)

B : Hespera® tablet (adefovир dipivoxil、10 mg、経口) / パラアミノ馬尿酸ソーダ注射液 10% (PAH、0、70、120、210 mg/min/person、90 分点滴)

C : Bicillin® G (benzylpenicillin benzathine hydrate、400,000 U、経口) / Benecid® (probenecid、0、500、750、1500 mg、経口)

D : Bicillin® G (benzylpenicillin benzathine hydrate、400,000 U、経口) / パラア  
ミノ馬尿酸ソーダ注射液 10% (PAH、0、70、120、210 mg/min/person、90  
分点滴)

被験者：健常男性 24 名 (20-35 歳)。Body mass index 18.5-28.5 kg/m<sup>2</sup>

臨床施設：北里大学東病院治験管理センター

用法：被験者を無作為に 6 名ずつ 4 グループに分けた。Hepsera® (10 mg) ある  
いは Bicillin® G (400,000 U) 投与前に、Benecid® (0、500、750 および 1500 mg) は  
2 h、PAH (0、70、120、210 mg/min/person) は 90 分および 30 分、被験者に投与  
した。血液を遠心分離して得られた血漿および尿サンプルは-80 °Cで保管した。  
臨床試験計画書およびインフォームドコンセントは北里大学東病院治験管理セ  
ンター内審査委員会で承認された。なお、6β-OHF 等の分析には、A 群および C  
群における Benecid® 0 および 750 mg 投与群のサンプルを使用した。

Pyrimethamine/metformin 併用投与に関する臨床試験の概要を以下に示す。

試験名：metformin と pyrimethamine の薬物相互作用を評価するための健常成人を  
対象としたマイクロドーズ (MD) および臨床用量 (ThD) での薬物動態試験

対象薬物：metformin (microdose: MD 100 µg、therapeutic dose: ThD 250 mg)、  
pyrimethamine (50 mg)

被験者：健常男性 24 名 (22-34 歳)。体重 54.1–76.6 kg

臨床施設：北里大学東病院治験管理センター

用法：各被験者は以下 4 ステップ同一とし、4 用量を順次投与された。

I 期 MD (metformin) → 1 週間の休薬

II 期 MD (metformin) + pyrimethamine → 4 週間の休薬

III 期 ThD (metformin) → 1 週間の休薬

IV 期 ThD (metformin) → pyrimethamine

臨床試験計画書およびインフォームドコンセントは北里大学東病院治験管理センター内審査委員会で承認された。なお、6 $\beta$ -OHF 等の分析には、I 期およびII 期のサンプルを使用した。

DX-619 に関する臨床試験の概要を以下に示す。

試験名：DX619-PRT011 (A Phase 1, Double-blind, Sponsor-open, Intravenous Ascending Multi-dose Study in Healthy Adult Subjects to Investigate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of DX-619)

対象薬物：DX-619 (800, 1200, 1600 mg)

被験者：健常男女 18-50 歳。Body mass index 19-30 kg/m<sup>2</sup>

臨床施設：MDS Pharma Services (Neptune, NJ)

用法：被験者に DX-619 (800-1600 mg) を 1 日 1 回、day 1 および day 3-15 に連続で静脈内定速注入 (2 h, 400 ml バック) を実施。placebo として生理食塩水投与群を設けた。血液を遠心分離して得られた血漿および尿サンプルは-20°C保管した。分析には、1200 mg 投与群および対応する placebo 群のサンプルを使用した。臨床試験計画書およびインフォームドコンセントはMDS Pharma Services 内審査委員会で承認された。



## ヒトサンプル中 DX-619 の定量

DX-619 の定量には、d3-DX-619 を内部標準として用いた。血漿サンプルは、Oasis HLB 96-well SPE カートリッジ (Waters Corporation, Milford, MA) を用いて抽出し、ギ酸/アセトニトリル (75:25, v/v) で再構成した。尿はギ酸/アセトニトリル (75:25, v/v) で希釈した。DX-619 の LC-MS/MS 測定は以下の機器を用いて行った。

HPLC システム : Shimadzu LC-10 AD HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

Mass Spectrometry : API 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

カラム : ODS-AQ 5  $\mu$ m 50\*3.0-mm column (YMC Co., Ltd. Kyoto, Japan)

移動相 : ギ酸/アセトニトリル (80:20, v/v), isocratic mode

検出モード : MRM (multiple reaction monitoring)

検出イオン : DX-619 m/z 402→384

d3-DX-619 m/z 405→387

## ヒトサンプル中 cortisol および 6 $\beta$ -OHF の定量

血漿および尿中の 6 $\beta$ -OHF および cortisol、ヒト肝ミクロソーム中の 6 $\beta$ -OHF の定量には、d4-6 $\beta$ -hydroxycortisol および d4-cortisol を内部標準として用いた。血漿サンプルは、Oasis HLB m Elution SPE plates (Waters Corporation) を用いて抽出し、H<sub>2</sub>O/メタノール (11:2, v/v) で再構成した。6 $\beta$ -OHF および cortisol の LC-MS/MS 測定は以下の機器を用いて行った。

HPLC システム : UFLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

Mass Spectrometry : QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA)

カラム : AccuCORE RP-MS 2.6  $\mu$ m 50\*2.1-mm column (Shiseido Co., Ltd. Tokyo, Japan)

移動相 : A 12 mM ammonium acetate (methanol/H<sub>2</sub>O, 1/9)  
 B 12 mM ammonium acetate (methanol/H<sub>2</sub>O, 9/1)

グラジエント : B 20% (0-3 min)、80% (3-7.5 min)

検出モード : MRM

検出イオン : 6 $\beta$ -OHF m/z 377→347  
 d4-6 $\beta$ -OHF m/z 381→351  
 Cortisol m/z 361→331  
 d4-cortisol m/z 365→335

### 速度論的解析 (*in vivo*)

CL<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> および CL<sub>renal,6 $\beta$ -OHF</sub> は以下の式 (23、24 式) により算出した。

$$CL_{6\beta\text{-OHF}} = X_{6\beta\text{-OHF}} / AUC_{\text{cortisol}} \quad (23 \text{ 式})$$

$$CL_{\text{renal, } 6\beta\text{-OHF}} = X_{6\beta\text{-OHF}} / AUC_{6\beta\text{-OHF}} \quad (24 \text{ 式})$$

ここで、X<sub>6 $\beta$ -OHF</sub>、AUC<sub>6 $\beta$ -OHF</sub> および AUC<sub>cortisol</sub> は尿中 6 $\beta$ -OHF 量、6 $\beta$ -OHF および cortisol の AUC をそれぞれ示している。

## 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) 1 および 11 $\beta$ -HSD2 活性測定

11 $\beta$ HSD1 および 11 $\beta$ -HSD2 をそれぞれ HEK-293 細胞および SF9 細胞に強制発現し、回収された細胞から各発現系ミクロソームを調製した (110, 111) 。ミクロソームを buffer (20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, pH 8.0) に懸濁して-80 °Cで保存した。11 $\beta$ -HSD1 活性は buffer (3.2 mM NADPH, 24 mM D-glucose 6-phosphate, 1.38 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 12 mM MgCl<sub>2</sub>) に 11 $\beta$ -HSD1 ミクロソームを加え、cortisone を添加することで、反応を開始した。11 $\beta$ -HSD2 活性は 170 mM NAD<sup>+</sup>溶液に 11 $\beta$ -HSD2 ミクロソームを加え、cortisol を添加することで反応を開始した。両反応は、室温で 20 min incubation 後 50  $\mu$ M carbenoxolone を加えることで停止させた。各反応の代謝物である cortisol および cortisone は LC-MS/MS で測定した。

## ヒト腎切片の調製および腎切片への取り込み試験

臨床試験計画書およびインフォームドコンセントはレーゲンスブルク大学内審査委員会で承認された。摘出された腎臓の皮質正常部位より 200  $\mu$ m 厚の皮質切片 (10 mg 前後) を作成した。実験まで切片は酸素供給した実験まで切片は酸素供給下、4 °Cの buffer (120 mM NaCl, 16.2 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) にて保存した。各切片は酸素供給下の buffer で 37 °C、3 分間の preincubation 後、基質および阻害剤存在下にて酸素供給下の buffer で 37 °C、20 分間 incubation した。実験後、切片を 4 °Cの上述した buffer で 2 度洗い、ペーパータオルで水分を除き、秤量により湿重量を求めた。切片

は PBS を加えてホモジナイズし、放射標識体は NaOH で可溶化させた後、Hionic Flour (Perkin Elmer Life Science) を加え放射活性を測定した。非放射体は acetonitrile で除タンパク後、LC-MS/MS で測定した。

### 統計解析

2 群間データは、student の t-test により、3 群以上のデータ間においては ANOVA の後に、Bonferroni の post test を行うことによって統計的有意差解析を行った。

## 参考文献

1. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:711-5.
2. Griffin JP. The withdrawal of Baycol (cerivastatin). *Adverse Drug React Toxicol Rev* 2001;20:177-80.
3. Vu D, Murty M, McMorran M. Statins: rhabdomyolysis and myopathy. *CMAJ* 2002;166:85-6, 90-1.
4. Shitara Y, Hirano M, Sato H, et al. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:228-36.
5. Okuda H, Nishiyama T, Ogura K, et al. Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *Drug Metab Dispos* 1997;25:270-3.
6. Kanamitsu SI, Ito K, Okuda H, et al. Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from in vitro data: inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil. *Drug Metab Dispos* 2000;28:467-74.
7. Atlas E, Clark H, Silverblatt F, et al. Nalidixic acid and oxolinic acid in the treatment of chronic bacteriuria. *Ann Intern Med* 1969;70:713-21.
8. Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. *J Antimicrob*

- Chemother 2003;51 Suppl 1:1-11.
9. Hasegawa M, Sato Y, Kanayama A, et al. Antibacterial activity of tosufloxacin against major organisms detected from patients with respiratory or otorhinological infections: comparison with the results obtained from organisms isolated about 10 years ago. *J Infect Chemother* 2006;12:152-6.
  10. Rubinstein E. History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* 2001;47 Suppl 3:3-8; discussion 44-8.
  11. Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, et al. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 1992;2:73-7.
  12. Fuhr U, Anders EM, Mahr G, et al. Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:942-8.
  13. Hooper DC, Wolfson JS. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med* 1991;324:384-94.
  14. Ray RS, Agrawal N, Misra RB, et al. Radiation-induced in vitro phototoxic potential of some fluoroquinolones. *Drug Chem Toxicol* 2006;29:25-38.
  15. Mandell L, Tillotson G. Safety of fluoroquinolones: An update. *Can J Infect Dis* 2002;13:54-61.
  16. Hayashi N. [New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones]. *Yakugaku Zasshi* 2005;125:255-61.
  17. Hayashi K, Takahata M, Kawamura Y, et al. Synthesis, antibacterial activity, and toxicity of 7-(isoindolin-5-yl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. Discovery of the novel des-F(6)-quinolone antibacterial agent garenoxacin (T-3811 or

- BMS-284756). *Arzneimittelforschung* 2002;52:903-13.
18. Yadav V, Deopujari K. Gatifloxacin and dysglycemia in older adults. *N Engl J Med* 2006;354:2725-6; author reply 2725-6.
  19. Services. UFaDADoHaH. Determination That TEQUIN (Gatifloxacin) Was Withdrawn From Sale for Reasons of Safety or Effectiveness. <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/E8-20938.pdf> 2006.
  20. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:489-99.
  21. Shaw PJ, Ganey PE, Roth RA. Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2010;118:7-18.
  22. Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, et al. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs* 2002;62:13-59.
  23. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:193-200.
  24. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N Engl J Med* 1999;340:493-501.
  25. Sarapa N, Wickremasingha P, Ge N, et al. Lack of effect of DX-619, a novel des-fluoro(6)-quinolone, on glomerular filtration rate measured by serum clearance of cold iothexol. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1912-7.
  26. Morley JJ, Ballou SP. Cimetidine-induced elevation of serum creatinine in a patient with lupus nephritis. *J Rheumatol* 1983;10:520-2.

27. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992;38:1933-53.
28. Furuta T, Suzuki A, Mori C, et al. Evidence for the validity of cortisol 6 beta-hydroxylation clearance as a new index for in vivo cytochrome P450 3A phenotyping in humans. *Drug Metab Dispos* 2003;31:1283-7.
29. Ushiyama H, Echizen H, Nachi S, et al. Dose-dependent inhibition of CYP3A activity by clarithromycin during *Helicobacter pylori* eradication therapy assessed by changes in plasma lansoprazole levels and partial cortisol clearance to 6beta-hydroxycortisol. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:33-43.
30. Research. UFaDACfDEa. US Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Draft guidance for industry: drug interaction studies-study design, data analysis, and implications for dosing and labeling  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf> 2012;Accessed February
31. Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Fluconazole, but not terbinafine, enhances the effects of triazolam by inhibiting its metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41:319-23.
32. Isoherranen N, Kunze KL, Allen KE, et al. Role of itraconazole metabolites in CYP3A4 inhibition. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1121-31.
33. Ito K, Ogihara K, Kanamitsu S, et al. Prediction of the in vivo interaction between midazolam and macrolides based on in vitro studies using human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2003;31:945-54.
34. Peng CC, Templeton I, Thummel KE, et al. Evaluation of 6beta-hydroxycortisol,



- 6beta-hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:888-95.
35. Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 2002;346:539-40.
  36. Ogilvie BW, Zhang D, Li W, et al. Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2006;34:191-7.
  37. Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, et al. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* 1990;264:2788-90.
  38. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, et al. In vitro prediction of the terfenadine-ketoconazole pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol* 1994;34:1222-7.
  39. Gitlin N, Julie NL, Spurr CL, et al. Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone. *Ann Intern Med* 1998;129:36-8.
  40. Tetley JN, Maggs JL, Rapeport WG, et al. Enzyme-induction dependent bioactivation of troglitazone and troglitazone quinone in vivo. *Chem Res Toxicol* 2001;14:965-74.
  41. Gault MH, Cockcroft DW. Letter: Creatinine clearance and age. *Lancet* 1975;2:612-3.
  42. Toto RD. Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:505-9; discussion 503-4.
  43. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med* 1988;39:465-90.

44. Andreev E, Koopman M, Arisz L. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure: which drugs can be responsible? *J Intern Med* 1999;246:247-52.
45. Kabat-Koperska J, Motyl W, Domanski L, et al. Methods of GFR determination--creatinine clearance after cimetidine administration in clinical practice. *Acta Med Austriaca* 2004;31:51-5.
46. Opravil M, Keusch G, Luthy R. Pyrimethamine inhibits renal secretion of creatinine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1056-60.
47. Tschuppert Y, Buclin T, Rothuizen LE, et al. Effect of dronedarone on renal function in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007;64:785-91.
48. Schutzer KM, Svensson MK, Zetterstrand S, et al. Reversible elevations of serum creatinine levels but no effect on glomerular filtration during treatment with the direct thrombin inhibitor AZD0837. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:903-10.
49. Urakami Y, Kimura N, Okuda M, et al. Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. *Pharm Res* 2004;21:976-81.
50. Tanihara Y, Masuda S, Sato T, et al. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol* 2007;74:359-71.
51. Yonezawa A, Inui K. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol* 2011;81:563-8.
52. Sueishi K, Mishima K, Makino K, et al. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*

- 2002;451:203-8.
53. Mishima K, Baba A, Matsuo M, et al. Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1564-77.
  54. Franke RM, Kosloske AM, Lancaster CS, et al. Influence of Oct1/Oct2-deficiency on cisplatin-induced changes in urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Clin Cancer Res* 2010;16:4198-206.
  55. Tsuda M, Terada T, Mizuno T, et al. Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (mate1) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol Pharmacol* 2009;75:1280-6.
  56. 折田義正. 腎機能(GFR)・尿蛋白測定ガイドライン. 2003.
  57. Krutzen E, Back SE, Nilsson-Ehle I, et al. Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: a method for the assessment of glomerular filtration rate. *J Lab Clin Med* 1984;104:955-61.
  58. Matsushima S, Maeda K, Inoue K, et al. The inhibition of human multidrug and toxin extrusion 1 is involved in the drug-drug interaction caused by cimetidine. *Drug Metab Dispos* 2009;37:555-9.
  59. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215-36.
  60. Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H, et al. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:1087-97.
  61. Nozaki Y, Kusuhara H, Kondo T, et al. Characterization of the uptake of organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 substrates by human kidney slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:362-9.

62. Slitt AL, Cherrington NJ, Hartley DP, et al. Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos* 2002;30:212-9.
63. Alcorn J, Lu X, Moscow JA, et al. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:487-96.
64. Mulgaonkar A, Venitz J, Sweet DH. Fluoroquinolone disposition: identification of the contribution of renal secretory and reabsorptive drug transporters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8:553-69.
65. Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, et al. N-methylnicotinamide is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:635-41.
66. Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, et al. Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:379-86.
67. Tanihara Y, Masuda S, Katsura T, et al. Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2. *Biochem Pharmacol* 2009;78:1263-71.
68. Naderer O, Nafziger AN, Bertino JS, Jr. Effects of moderate-dose versus high-dose trimethoprim on serum creatinine and creatinine clearance and adverse reactions. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2466-70.
69. Ito S, Kusuhara H, Yokochi M, et al. Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation

- transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;340:393-403.
70. US SA. Label: MULTAQ (dronedarone) Tablets.  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/022425s016s017s018lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/022425s016s017s018lbl.pdf) 2009.
71. Honig PK, Wortham DC, Zamani K, et al. Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA* 1993;269:1513-8.
72. Hamaoka N, Oda Y, Hase I, et al. Propofol decreases the clearance of midazolam by inhibiting CYP3A4: an in vivo and in vitro study. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:110-7.
73. Johnson BM, Adams LM, Zhang K, et al. Ketoconazole and rifampin significantly affect the pharmacokinetics, but not the safety or QTc interval, of casopitant, a neurokinin-1 receptor antagonist. *J Clin Pharmacol* 2010;50:951-9.
74. Veronese ML, Gillen LP, Dorval EP, et al. Effect of mibefradil on CYP3A4 in vivo. *J Clin Pharmacol* 2003;43:1091-100.
75. Kumar S, Sharma R, Roychowdhury A. Modulation of cytochrome-P450 inhibition (CYP) in drug discovery: a medicinal chemistry perspective. *Curr Med Chem* 2012;19:3605-21.
76. Galetin A, Gertz M, Houston JB. Potential role of intestinal first-pass metabolism in the prediction of drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:909-22.
77. Prueksaritanont T, Vega JM, Rogers JD, et al. Simvastatin does not affect

- CYP3A activity, quantified by the erythromycin breath test and oral midazolam pharmacokinetics, in healthy male subjects. *J Clin Pharmacol* 2000;40:1274-9.
78. Kanebratt KP, Diczfalusy U, Backstrom T, et al. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:589-94.
  79. Abel SM, Maggs JL, Back DJ, et al. Cortisol metabolism by human liver in vitro--I. Metabolite identification and inter-individual variability. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43:713-9.
  80. Bienvenu T, Rey E, Pons G, et al. A simple non-invasive procedure for the investigation of cytochrome P-450 IIIA dependent enzymes in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1991;29:441-5.
  81. Eeckhoudt SL, Desager JP, Robert AR, et al. Midazolam and cortisol metabolism before and after CYP3A induction in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001;39:293-9.
  82. Chen YC, Gotzkowsky SK, Nafziger AN, et al. Poor correlation between 6beta-hydroxycortisol:cortisol molar ratios and midazolam clearance as measure of hepatic CYP3A activity. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:187-95.
  83. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, et al. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 1998;50:387-412.
  84. Kato M, Shitara Y, Sato H, et al. The quantitative prediction of CYP-mediated drug interaction by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Pharm Res* 2008;25:1891-901.

85. Imamura Y, Murayama N, Okudaira N, et al. Prediction of fluoroquinolone-induced elevation in serum creatinine levels: a case of drug-endogenous substance interaction involving the inhibition of renal secretion. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:81-8.
86. Fromm MF, Busse D, Kroemer HK, et al. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology* 1996;24:796-801.
87. Hsu A, Granneman GR, Witt G, et al. Multiple-dose pharmacokinetics of ritonavir in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:898-905.
88. Lai AA, Levy RH, Cutler RE. Time-course of interaction between carbamazepine and clonazepam in normal man. *Clin Pharmacol Ther* 1978;24:316-23.
89. Asif AR, Steffgen J, Metten M, et al. Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells. *Pflugers Arch* 2005;450:88-95.
90. Ueda K, Okamura N, Hirai M, et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992;267:24248-52.
91. Laskin OL, de Miranda P, King DH, et al. Effects of probenecid on the pharmacokinetics and elimination of acyclovir in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;21:804-7.
92. Landersdorfer CB, Kirkpatrick CM, Kinzig M, et al. Competitive inhibition of renal tubular secretion of gemifloxacin by probenecid. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3902-7.

93. Landersdorfer CB, Kirkpatrick CM, Kinzig M, et al. Competitive inhibition of renal tubular secretion of ciprofloxacin and metabolite by probenecid. *Br J Clin Pharmacol* 2010;69:167-78.
94. Kusuhara H, Ito S, Kumagai Y, et al. Effects of a MATE protein inhibitor, pyrimethamine, on the renal elimination of metformin at oral microdose and at therapeutic dose in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:837-44.
95. Selen A, Amidon GL, Welling PG. Pharmacokinetics of probenecid following oral doses to human volunteers. *J Pharm Sci* 1982;71:1238-42.
96. Imamura Y, Murayama N, Okudaira N, et al. Effect of the Fluoroquinolone Antibacterial Agent DX-619 on the Apparent Formation and Renal Clearances of  $\beta$ -Hydroxycortisol, an Endogenous Probe for CYP3A4 Inhibition, in Healthy Subjects. *Pharm Res* 2013;30:447-57.
97. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, et al. Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:666-71.
98. Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:425-46.
99. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3569-74.
100. Carrie BJ, Golbetz HV, Michaels AS, et al. Creatinine: an inadequate filtration marker in glomerular diseases. *Am J Med* 1980;69:177-82.
101. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, et al. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 1985;28:830-8.



102. Domagala JM. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:685-706.
103. Suzuki T, Kato Y, Sasabe H, et al. Mechanism for the tissue distribution of grepafloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, in rats. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1393-9.
104. Enomoto A, Takeda M, Taki K, et al. Interactions of human organic anion as well as cation transporters with indoxyl sulfate. *Eur J Pharmacol* 2003;466:13-20.
105. Ito S, Kusuhara H, Kuroiwa Y, et al. Potent and specific inhibition of mMate1-mediated efflux of type I organic cations in the liver and kidney by pyrimethamine. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:341-50.
106. Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1839-48.
107. Berg UB. Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2577-82.
108. Shinzato T, Nakai S, Miwa M, et al. New method to calculate creatinine generation rate using pre- and postdialysis creatinine concentrations. *Artif Organs* 1997;21:864-72.
109. Waters NJ, Jones R, Williams G, et al. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci* 2008;97:4586-95.
110. Brown RW, Chapman KE, Kotelevtsev Y, et al. Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

Biochem J 1996;313 ( Pt 3):1007-17.

111. Cho YS, Kim CH, Cheon HG. Cell-based assay for screening 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors. Anal Biochem 2009;392:110-6.