

審査の結果の要旨

氏名 成 富 洋 一

従来、医薬品開発においてキャンディデイト化合物は主に薬効や毒性面の評価により選択されてきた。しかしながら、多くの化合物が臨床試験で薬物動態学的問題点から開発を断念してきたことから近年、創薬初期段階における薬物動態研究、特に P450(CYP)などによる薬物代謝に関する研究が重要視されている。この薬物代謝研究を実施する際、創薬初期段階の状況を踏まえた予測評価系を構築することが必要である。本研究は創薬初期段階における薬物代謝研究として、肝ミクロゾーム・肝細胞を用いたヒト肝クリアランスの予測法の構築とその際観察された *in vitro* と *in vivo* の乖離の原因について検討した。さらに薬物代謝に関与する CYP 分子種の同定について、創薬初期段階を想定した方法を検討した。

1 肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝及び実験動物の *in vivo* 試験によるヒト肝クリアランスの予測

血中濃度を規定するパラメーターとして重要な肝クリアランスの予測については生理学的モデル、クリアランスコンセプトに基づく方法が確立されてきた。すなわち、肝ミクロゾーム、肝細胞等による *in vitro* 代謝試験から得られた代謝固有クリアランス ($CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$) を *in vivo* 代謝固有クリアランス ($CL_{\text{int}, \text{in vivo}}$) の予測値とし、数学モデルを用いて肝クリアランスを定量的に予測する。しかしながら、両代謝固有クリアランスが一致せず、予測が困難な場合も多い。本研究では P450 で代謝される 8 モデル化合物について、実験動物及びヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* *in vivo* scaling を再検討した。まずモデル化合物をラット、イヌ、ヒト肝ミクロゾームで代謝させた際の未変化体濃度推移から $CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$ を算出した。 $CL_{\text{int}, \text{in vivo}}$ は *in vivo* データより数学モデルを用いて算出した。さらに各化合物について、scaling factor ($CL_{\text{int}, \text{in vivo}} / CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$) を評価した。ヒト scaling factor の値は化合物間で大きな違いが認められた。一方、同一化合物においてほとんどの動物 scaling factor はヒトと比べて 2 倍以内とほぼ同じ値を示した。そこで、ヒト $CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$ を動物 scaling factor で補正することにより、ヒトにおける予測精度の向上を試みた。その結果、動物 scaling factor で補正していない $CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$ は $CL_{\text{int}, \text{in vivo}}$ とほとんどの化合物で 2 倍以上の違いを示したのに対し、動物 scaling factor で補正した場合には 2 倍以内と良好な相関が得られた。さらに動物 scaling factor で補正したヒト $CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$ を用いて予測した薬物代謝能の指標である肝抽出率も実測値と良く一致した。

以上の結果より、ヒト肝ミクロゾームによる $CL_{\text{int}, \text{in vitro}}$ を実験動物 scaling factor で補正する方法はヒト肝クリアランス予測をより正確なものにすることが示された。

2 薬物代謝の予測における肝細胞の有用性：ラットおよびヒトにおける $CL_{\text{int, in vitro}}$, $CL_{\text{int, in vivo}}$ の比較

本研究では肝細胞を用いた肝クリアランスの予測性について、P450 以外にグルクロン酸転移酵素、硫酸転移酵素、エステラーゼで代謝される 9 モデル化合物を用いて検討を行なった。まずモデル化合物をラット遊離肝細胞で代謝させた際の未変化体濃度推移から $CL_{\text{int, in vitro}}$ を算出、さらに scaling factor を評価したところ、ラット scaling factor は化合物間で大きな違いが認められた。また、ラットの非凍結と凍結肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ には良好な相関が認められ両肝細胞間で代謝活性は維持されていることが示唆された。次に各化合物について 5~7 検体のヒト凍結肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ を測定したところ、その値には大きな個体差が認められた。 $CL_{\text{int, in vitro}}$ の平均値を $CL_{\text{int, in vivo}}$ の予測値とした場合、実測値との差は化合物で異なり、いくつかの化合物では 10-200 倍の大きな違いが認められた。一方、ヒト $CL_{\text{int, in vitro}}$ をラット scaling factor で補正し、ヒト $CL_{\text{int, in vivo}}$ を予測したところ、その予測値と実測値はほとんどが 5 倍の範囲内で一致した。

以上より、ヒト凍結肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ をラット scaling factor で補正することで $CL_{\text{int, in vivo}}$ をより正確に予測できることを示唆した。

3 $CL_{\text{int, in vitro}}$, $CL_{\text{int, in vivo}}$ における乖離の原因に関する検討

肝ミクロゾーム、肝細胞を用いた *in vitro in vivo* scaling において、いくつかの化合物では $CL_{\text{int, in vitro}}$, $CL_{\text{int, in vivo}}$ 間の乖離が観察された。ここで、P450 で主に代謝される化合物について、実験動物における全血中非蛋白結合率と scaling factor との相関を検討したところ、両値に逆相関の傾向が認められた。また乖離の原因として、反応液中の肝ミクロゾームや肝細胞への結合による $CL_{\text{int, in vitro}}$ の過少評価が考えられた。しかしながら、ヒト肝ミクロゾーム、ラット肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ を反応液中の非結合率で補正してもなおいくつかの化合物では $CL_{\text{int, in vivo}}$ との一致は見られなかった。さらに乖離が化合物の血液から肝細胞への移行に起因する可能性を考え、ラット肝細胞による代謝を血清中で実施した。しかし、全ての化合物で *in vitro* と *in vivo* の一致は見られなかった。

以上より、 $CL_{\text{int, in vivo}}$, $CL_{\text{int, in vitro}}$ における乖離の原因は、化合物の血中蛋白結合と関連性のあることを示唆した。一方、これらの乖離は反応液中での結合性や血液から肝細胞への移行に起因する可能性のみでは説明できなかったものの、その他の要因として *in vitro* 代謝試験が *in vivo* における肝組織としての形態や肝組織を血流が還流する動的状態を反映していないことなどが考えられ、今後の研究の方向性を示した。

4 Glibenclamide, lansoprazole 代謝に関与するヒト cytochrome P450 分子種の同定と寄与率：未変化体の消失による評価

薬物動態における個体差や薬物間相互作用を予測する上で重要である代謝に関与する

CYP 分子種の同定は発現系による代謝，分子種マーカー活性との相関，分子種阻害剤・抗体を用いた検討や relative activity factor(RAF)を用いた各分子種の寄与率評価などにより行われる。これらは一般に代謝物の生成速度を用いるが，代謝物に関する情報が少ない創薬初期段階では適用され難い。そこで，創薬初期段階を想定した CYP 分子種同定法として，肝クリアランス予測でも用いた基質の消失による方法を適用，glibenclamide, lansoprazole 代謝に関与する CYP 分子種の同定を行った。ヒト CYP 分子種発現系のうち，CYP2C19, 3A4 で両化合物の代謝が認められた。CYP2C19, 3A4 発現系，ヒト肝マイクロゾームで代謝させた際の未変化体濃度推移より算出した CL_{int} ，および CYP2C19, 3A4 の RAF から，ヒト肝マイクロゾームの glibenclamide, lansoprazole 代謝における CYP2C19, 3A4 の寄与率の定量的評価を行なった。その結果，glibenclamide では CYP3A4 が主に代謝に関与していたのに対し，lansoprazole では CYP2C19, 3A4 ともある程度の寄与を示した。この結果は，個別ヒト肝マイクロゾームを用いた CYP 分子種マーカー活性との相関，分子種阻害剤・抗体を用いた検討結果と良く一致し，本評価法の妥当性を示すことができた。特に RAF を用いた各 CYP 分子種の寄与率の定量的評価は創薬初期段階において有用と考えられる。

以上，ヒト肝クリアランスの予測における *in vitro*, *in vivo* 間の乖離を克服する解決策として，ヒト肝マイクロゾームによる $CL_{int, in vitro}$ に実験動物の scaling factor を導入し，ヒト肝クリアランスの予測をより正確なものにする簡便な方法論を提唱した。また，肝細胞による代謝についても検討を加え，肝細胞における *in vitro*, *in vivo* 間の乖離についても実験動物の scaling factor による補正が有効であることを示した。この scaling factor は全血中非蛋白結合率が低い化合物ほど大きい傾向を認め，いかなる化合物で *in vitro*, *in vivo* 間の乖離が生じるのかその特性を示唆した。代謝に関与する CYP 分子種同定法については，創薬初期段階を想定した方法として基質の消失を用いて評価を採用した。各同定法で結果はよく一致し，本評価法の妥当性を示唆した。これらの知見は今後の医薬品開発に重要な知見を与える情報であると考えられ，ヒトにおける薬物代謝プロファイルの良好な新薬の創出，さらには創薬の効率化や質的向上に貢献できることを提起しており，博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。