

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

「トランスポーターによる医薬品肝腎排泄振り分けの *in vitro* 予測法の開発」

氏名 渡邊 友子

### 【背景・目的】

医薬品の薬理効果や有害作用の発現を決定する要因として、標的タンパク質への親和性など薬理学的要因と並び、薬効標的やその発現部位への薬物の暴露を支配する薬物動態学的要因も考慮する必要がある。そのため近年では、医薬品開発の初期段階で肝代謝や消化管吸収の評価が行われ、適切な体内動態特性を持つ化合物が早期に選別されるようになってきている。投与後循環血中に到達した薬物は、主に肝臓、腎臓から代謝・排泄される。肝臓や腎臓には異物解毒に関わる種々の代謝酵素や薬物トランスポーターが発現しており、肝臓では代謝による物質変換および胆汁中への排泄、腎臓では尿中への排泄が、これらタンパク質によって効率的に行なわれている。代謝酵素やトランスポーターの機能は、加齢や疾病、併用薬との薬物間相互作用や遺伝子多型等様々な要因によって変動することが知られており、その影響を受けにくくするためには、複数の代謝・排泄経路を確保することが必要である。代謝酵素については *in vitro* 試験法が確立されているが、排泄経路を推定するための予測法は未だ確立されていない。薬物の排泄過程は、①血中から臓器への取り込み、②臓器から血中への backflux、③代謝及び臓器内から胆汁中あるいは尿中への排泄、の各素過程から構成されている。本研究では、医薬品の排泄経路の肝腎振り分けを決定する要因を速度論的に解析することで、*in vitro* 実験系の結果に基づく *in vivo* における排泄能力の予測精度について検証した。詳細な *in vivo* 薬物動態の検討を可能とするためにラットを用いて、4つの薬効群 (HMG-CoA 還元酵素阻害薬、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質) から代謝を受けにくい12化合物を対象として検討を行った。さらにヒトにおいても同様の検討を行い、最終的に目標とするヒト肝・腎クリアランスの *in vitro* 実験データからの予測が、どの程度良好に可能であるかについて検討を進めた。

### 【方法・結果】

#### 1. ラットにおける肝および腎臓器クリアランスの予測性の検討

##### 臓器クリアランスと取り込みクリアランスの比較

臓器クリアランス (代謝・排泄により薬物を消失させる能力) の決定要因に占める取り込みクリアランスの重要性を明らかにするため、取り込みクリアランスとの比較を行った。

*in vivo* における実測のクリアランスを求め、12 化合物をそれぞれ SD ラットに投与後、経時的に血漿、胆汁、尿を採取、LC/MS で測定し、胆汁及び尿中排泄クリアランス、胆汁及び尿中排泄率を

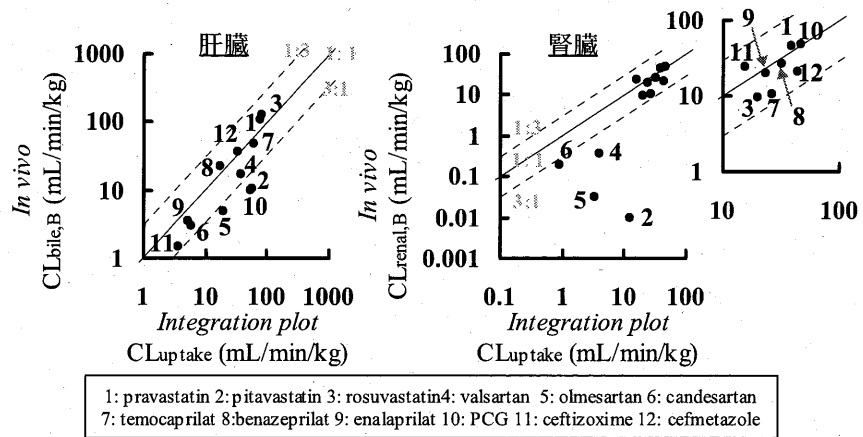


図 1. *In vivo* における臓器取り込みクリアランスと臓器クリアランスの比較

求めた。また、12 化合物をそれぞれ SD ラットに瞬時投与し、極めて短い時間における血中濃度、肝臓及び腎臓中濃度を LC/MS で測定し、臓器への取り込みクリアランスを求めた (Integration plot 法)。図 1 には、*in vivo* における各臓器における取り込みクリアランスと臓器クリアランスの比較を示した。肝臓では、ほぼ 1:1 の関係が観察されており、取り込み過程が肝消失全体を決定づけていることが明らかになった。一方腎臓では、再吸収などの機構の関与が推察される腎クリアランスが非常に小さい化合物 (図 1 中 2, 4, 5) を除くと、ほぼ 1:1 の関係が観察されており、腎臓における消失についても、大部分の化合物で、肝臓同様に取り込み過程が重要であることが示唆された。

### *In vitro* 実験から得られた取り込みクリアランスと *in vivo* 取り込み固有クリアランスの比較

さらに *in vitro* 実験の結果からの予測を行うために、遊離肝細胞、腎スライスを用いて取り込み実験を行い、取り込みクリアランス ( $P_{1\text{HEP}}$  および  $P_{1\text{KID}}$ ) を求めた。本実験では定量的な比較を行うため、取り込みクリアランスが

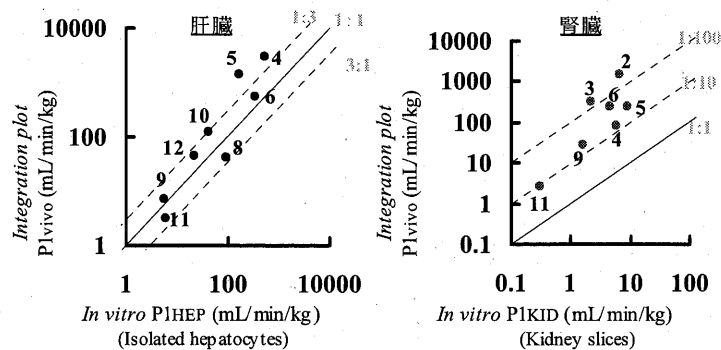


図 2. *In vitro* と *in vivo* における取り込み固有クリアランスの比較

非常に高く、*in vivo* で血流による供給が律速となっており、定量的に取り込み能力を *in vivo* で測定することが困難な化合物は対象から除外した。図 2 に示すように、肝臓ではほぼ 1:1 の関係が見られ、遊離肝細胞を用いた輸送実験を基にした予測性が良好であることが示唆された。一方、腎臓では、*in vitro* 実験から得られた値に対し *in vivo* 実験から求めた値が 10 ~ 100 倍大きいこと、*in vivo* の腎クリアランスが大きいものは相関から乖離する傾向があることがわかった。乖離の原因として、腎スライスには厚みがあるため、スライス内部の細胞層にまで薬液が効率よく浸透できないため、単位重量あたりの取り込み能力を過小評価してしまうことや、薬液が腎スライス表面に到達する過程で非攪拌水層などに起因する拡

散が律速段階となってしまう、真の取り込みを正確に評価できないことが考えられる。

*In vitro* 実験から得られた取り込みクリアランスを用いて、*in vivo* における臓器クリアランスを dispersion model に基づき予測した。肝臓では予測値と実測値の差異は、ほぼ3倍の範囲内におさまっていたが、腎臓では、valsartan, olmesartan, candesartan, pitavastatin において予測値が実測値より大きくなった。これらの結果は、*in vivo* における取り込みクリアランスと臓器クリアランスの比較における結果 (図1) と一致するものであった。一方、腎臓でも *in vivo* における腎クリアランスが良好に予測できることが示唆された。

### 取り込み側、排泄側各過程の輸送能力の変動が予測に与える影響に関する検討

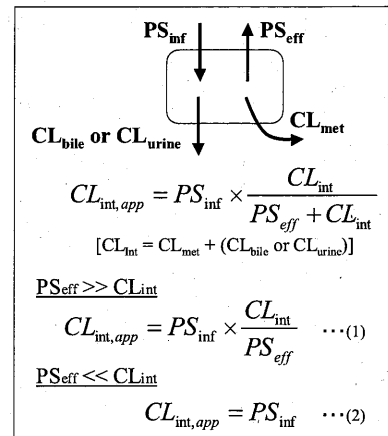
血中からの消失を規定する“みかけの”固有クリアランス ( $CL_{int,app}$ ) をさらに素過程に細分化して速度論的に考察すると、各過程の能力の大小関係により、 $CL_{int,app}$  を支配する各要因の相対的な重要性が異なることがわかる。細胞内で大部分が代謝・排泄されてしまい循環血中への戻り (backflux) が小さい場合、代謝や排泄のパラメータの変動は  $CL_{int,app}$  には大きな影響を与えず、取り込み過程の変動のみで説明できることが予想される (図3 (2) 式)。そこで、この仮説を実験的に実証するために、取り込み、排泄及びその両方の輸送過程を、阻害剤や遺伝子欠損動物を利用して変動させ、素過程のクリアランスの変動が  $CL_{int,app}$  に与える影響について検討を加えた。

#### — Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) を用いた検討 —

*Mrp2* を遺伝的に欠損しているラット (EHBR) を用いて、*Mrp2* の基質である rosuvastatin, valsartan, temocaprilat, PCG (benzylpenicillin) を用いて同様の検討を行った。*in vivo* 実験において valsartan, temocaprilat, PCG の胆汁排泄クリアランスは SD ラットに比べて大幅に減少した。EHBR で *in vivo* における取り込みと胆汁排泄クリアランスを比較したところ、temocaprilat, PCG では取り込みクリアランスが胆汁排泄クリアランスより大きく、排泄側の輸送活性が減少することにより、取り込み律速の仮定が破綻していることが示唆された。一方、rosuvastatin では *in vivo* における胆汁排泄クリアランスが EHBR で SD ラットの半分程度にしか減少しなかった。このとき、取り込みクリアランスと胆汁排泄クリアランスはほぼ同程度であったことから、*Mrp2* の機能が消失した後も、取り込み過程が依然として律速段階となっているものと考えられる。

#### — 阻害剤を用いた検討 —

肝胆系輸送に関わる主な分子が、肝取り込みは *Oatp*、胆汁排泄は *Mrp2* であることが知られており、かつ図3 (2) 式の条件を満たす temocaprilat をモデル基質として用いて、阻害剤共存下における遊離肝細胞を用いた *in vitro* 取り込み実験および *in vivo* 実験を行った。阻害剤



$CL_{int,app}$ : みかけの固有クリアランス  
 $PS_{inf}$ : 取り込みクリアランス  
 $PS_{eff}$ : 血中から臓器へのbackflux  
 $CL_{met}$ : 代謝クリアランス  
 $CL_{bile}$ : 胆汁排泄クリアランス  
 $CL_{urine}$ : 尿中排泄クリアランス

図3. “みかけの” 固有クリアランス

としては、種々の条件検討の結果、肝取り込みの阻害剤として rifampicin を、また低濃度条件下で胆汁排泄のみを、高濃度条件下で取り込み・排泄両方のトランスポーターを阻害できる阻害剤として glycyrrhizin を選択した。rifampicin で temocaprilat の輸送を阻害した場合、取り込みの阻害により *in vivo* 実験から見積もられた  $CL_{int,app}$  は低下した。一方、glycyrrhizin で阻害した場合には、低濃度域では細胞内から胆汁中への排泄が大きく阻害され、 $CL_{int,app}$  が低下した。これは取り込み過程が  $CL_{int,app}$  全体の律速段階でなくなったためだと考えられる。一方、高濃度域では、取り込み、排泄の両方が阻害され、 $CL_{int,app}$  が低下した。これら結果は、*in vitro* 実験の結果と一致し、図3で示した理論的考察と合致している。

## 2. ヒトにおける肝および腎クリアランスの予測性の検討

### In vitro 実験から得られた取り込みクリアランスに基づく in vivo 臓器クリアランスの予測

ヒト遊離肝細胞およびヒト腎スライスを用いた取り込み実験を行うことで、ラットと同様にヒトでも *in vitro* 実験より得られた取り込みクリアランスから *in vivo* 臓器クリアランスが予測できるかについて検討を行った。これまでの当研究室の他の報告の結果もあわせて、肝臓では8化合物、腎臓では11化合物で検討した。その結果、*in vitro* 実験からの予測値と *in vivo* の実測値との間には比較的良好な相関が認められた。

#### 【考察・結論】

本研究において、代謝をうけにくい医薬品の胆汁排泄や尿細管分泌では、取り込み過程が全体の消失を決定付ける重要な要因であることを明らかにした。しかし、腎クリアランスが小さい化合物では、取り込みクリアランスとの乖離も大きく、細胞内からの排出過程や尿中からの再吸収など他の要因も考慮する必要がある。また、取り込み過程が全体の消失の律速段階になっている場合、理論的考察どおり、取り込みの阻害は血中濃度の時間推移に影響を与えるものの、細胞内からの排出の阻害は律速段階が変わるほど強く阻害されたときにのみ血中濃度に影響を与えることも実証することができた。細胞内からの排泄過程における薬物間相互作用が臨床的に意味を持つかどうかは、こうした消失の律速段階の考察も必要であるといえる。

本研究により、循環血中からの薬物の消失における肝腎振り分けを支配する要因として、各臓器への取り込みの相対的な能力の重要性が明らかになった。また、取り込み過程を評価する *in vitro* 実験系として、遊離肝細胞やヒト腎スライスの利用が有効であることが示唆された。ラット腎スライスでは、一部スライスへの拡散過程が律速となると思われる化合物も見出され *in vitro* 実験結果に基づく予測精度が低くなったが、ヒト腎スライスではそのような化合物は見られなかった。