

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 友子

医薬品開発の問題点として、依然として臨床試験の段階に至って、ヒトにおける効果や副作用が原因でドロップアウトする薬物が少なくないことが挙げられる。また、その理由の中には、薬物動態特性の悪さが原因となっているものも数多い。臨床試験は莫大な費用と時間を要することから、創薬を効率的に進めるためには、開発の初期段階からヒトにおける薬理活性のみならず薬物動態特性の優れた化合物を選択するために、近年では、開発初期のスクリーニング段階から種々の *in vitro* 実験系を用いて、合理的な医薬品の選択が進められてきている。

投与後循環血中に到達した薬物の多くは、主に肝臓と腎臓から代謝・排泄される。特に、肝臓や腎臓の機能が低下している患者に用いることがあらかじめ予想される医薬品や、薬効標的が肝臓や腎臓であるような医薬品においては、肝臓と腎臓から排泄される割合、すなわち「肝腎振り分け」の情報が、医薬品の薬効や副作用の予測をする上で重要な情報となる。肝代謝により主に消失する薬物については、これまでマイクロソームを用いた検討などから代謝速度の予測が進められてきた。しかしながら、トランスポーター基質となる薬物を対象とした *in vitro* 実験からの肝腎振り分けの予測法は未だ系統的な解析が進められていない。

申請者は、本研究を通して、代謝を受けにくいトランスポーター基質となる医薬品の消失における血中から臓器への取り込み過程の重要性を明らかにし、検討に用いた多くの医薬品で、臓器クリアランスが取り込みクリアランスと類似した値になることを示した。また、肝臓・腎臓における取り込み過程を評価する *in vitro* 実験系として、遊離肝細胞と腎スライスを用いた取り込み実験を用いることで、*in vivo* における取り込みクリアランスを一定の精度で予測できることを示した。さらに、*in vitro* 取り込み実験の結果から *in vivo* の臓器クリアランス、さらには肝腎振り分け率が良好に予測可能であることを示した。

また、血中からの消失を規定する”みかけの”固有クリアランスをさらに素過程に細分化して速度論的に考察すると、細胞内から血中への *backflux* と細胞内から胆汁ないしは尿中への排泄能力の大小関係により、各要因の相対的な重要性が異なる。細胞内から循環血中への *backflux* が、代謝・排泄される能力より小さい場合については、代謝・排泄能力を表すパラメーターの変動は、”みかけの”固有クリアランスに影響しないが、逆のケースでは、影響することが予想される。申請者は、臓器クリアランスが取り込みクリアランスに近似できない場合について、理論的な考察に基づき、遺伝子変異動物や阻害剤を用いて、各素過程が”みかけの”固有クリアランスに与える影響について検討を行った。その結果、排泄の輸送能力が大きく阻害された場合のみ、取り込み律速の仮定が破綻し、臓器クリアランスが取り込みクリアランスに近似できなくなることを実験的に証明した。以下に、詳細を示す。

1. 肝・腎臓器クリアランスを決定する要因における取り込み過程の重要性

申請者は、ラットにおいて、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、 β -ラクタム系抗生物質) から、代謝を受けにくく、比較的肝腎振り分けの割合が多様な 12 化合物をモデル化合物として選択し、肝臓と腎臓からの消失過程における取り込み過程の重要性について検討を行った。

まず、臓器クリアランス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、integration plot 法により *in vivo* における取り込みクリアランスを測定し、臓器クリアランスとの比較を行った。その結果、腎クリアランスが非常に小さい化合物を除くと、肝臓及び腎臓において、臓器クリアランスは、取り込みクリアランスから 3 倍以内の精度で予測できることを確認した。腎クリアランスが小さい化合物が予測から大きく外れた原因として、申請者は、尿中からの再吸収や、腎細胞中から血管側への backflux の関与があるためであると考察している。

次に、申請者は、遊離肝細胞と腎スライスを用いた *in vitro* 取り込み実験の結果から、*in vivo* 臓器クリアランスが予測可能であるか検討した。*in vitro* 実験と *in vivo* 実験から求められた取り込み固有クリアランスの比較を行ったところ、肝臓においては概ね 3 倍以内の差であったが、腎臓においては、*in vivo* の値が *in vitro* 実験の予測値の約 10~100 倍大きくなった。そこで、申請者は、腎スライスの厚みに注目し、スライス内への薬液の浸透を考慮した簡易モデルを用いて理論式を導き、補正を行った。また、遊離肝細胞・腎スライスを用いた取り込み実験の結果を補正した値を用いて、*in vivo* 臓器クリアランスを予測した。その結果、取り込み律速でないことが示された腎クリアランスの小さい一部の化合物を除けば、概ね 3 倍程度の範囲で肝及び腎クリアランスの予測が可能であることを示した。また、これらの比から求められる消失の肝腎振り分け率についても一定の精度で予測が可能であることを示し、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能力の重要性を示した。

2. 肝臓における律速段階の変化が固有クリアランスに及ぼす影響に関する実験的考察

申請者は、肝臓でのクリアランスを決定付ける各素過程の能力の相対的な重要性について、理論的に導かれる結果を実験的に証明するために、排泄トランスポーターの遺伝子欠損動物および取り込み・排泄段階の阻害剤を利用することで考察を行った。

肝臓の胆管膜側に発現する Mrp2 を遺伝的に欠損する Eisai Hyperbilirubinemic Rat (EHBR) では、Mrp2 基質薬物の肝臓から胆汁中への輸送能が大きく減少する。そこで申請者は、EHBR を用いて排泄輸送が阻害された場合の検討を行った。その結果、temocaprilat と benzylpenicillin (PCG) において、EHBR で血中濃度基準の胆汁排泄クリアランスが大幅に減少した結果、胆汁排泄能力が血中への backflux の能力より小さくなり、肝固有クリアランスは、取り込みクリアランスより小さい値になることを示した。これは、理論的に導かれ

た取り込み律速が破綻する条件と一致している。

さらに、SD ラットに対して阻害剤を用いて、取り込み・排泄のトランスポーターをそれぞれ阻害した場合について検討した。取り込み過程の阻害剤として rifampicin、排泄過程の阻害剤として glycyrrhizin、基質は肝消失が取り込み律速であることがわかっている temocaprilat を用いて、*in vivo* 実験ならびに遊離肝細胞を用いた *in vitro* 取り込み実験を行った。理論的考察どおり、rifampicin によって取り込み過程を阻害したときには、取り込み律速は成立しており、*in vitro* 取り込み実験から予測されるクリアランスと実測の胆汁排泄クリアランスは近い値を示した。一方、glycyrrhizin によって排泄過程を強く阻害したときには、*in vitro* 取り込み実験の結果から予測されるクリアランスは実測の胆汁排泄クリアランスより大きな値となり、取り込み律速が破綻することを示唆する結果を得た。

以上のように、申請者は、代謝を受けにくい医薬品では、多くの場合、臓器への取り込み過程の能力が、薬物の臓器からの消失を決定付ける要因であることを示した。一方、腎クリアランスが比較的小さい化合物では、臓器への取り込みクリアランスは、臓器クリアランスと比較して非常に小さい値を示しており、細胞内から血管側への backflux や尿中からの再吸収など、他の要因の関与が考えられる。また、取り込み過程を評価する *in vitro* 実験系として、遊離肝細胞と腎スライスを用いた取り込み実験を用いた予測が比較的良好に成り立つことを示し、適切な補正係数を用いることで、*in vitro* 実験の結果から臓器クリアランスを一定の精度で予測できることを示した。一方で、排泄過程が阻害されるなど、取り込み律速が破綻するようなケースでは、理論どおり取り込み能力だけから臓器クリアランスの予測はできなくなることを実験的に示した。

本研究は、代謝を受けにくい医薬品の臓器クリアランスが、取り込みクリアランスに良好に近似される傾向が見られ、固有クリアランスを決める要因として取り込み過程の能力が重要であることを示した。さらに遊離肝細胞や腎スライスを用いた *in vitro* 取り込み実験を利用することで、適切な補正係数を用いることで、*in vivo* における取り込み能力を予測可能であることを示した。今回、一部の薬物で見出された、腎クリアランスが比較的小さい化合物については、backflux や再吸収過程の関与について、今後、腎臓におけるそれらの分子メカニズムを解明することで、より正確な予測につながることを示唆されている。本研究の成果は、今後、医薬品開発の初期段階における肝細胞や腎スライスを用いた取り込み実験による肝腎クリアランスの予測法を提案するものである。また、複数の化合物を用いた横断的な解析を通じて、予測の程度や予測が成立する条件を実験的に示しており、薬物動態の理論を活用した応用研究として意義深いものである。よって、申請者を、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。