

論 文

# 吸収性が懸念された新薬候補化合物の臨床第 I 相試験における 動態解析と *in vitro* 透過性試験データおよび前臨床試験データとの照合

伊 賀 勝 美

同志社女子大学  
薬学部・医療薬学科  
特別任用教授

A pharmacokinetic analysis of new drug candidates which showed poor absorption in the clinical phase I study, and collation with *in vitro* membrane permeability data and preclinical study data

Katsumi Iga

Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts,  
Special Appointment Professor

## 要 旨

臨床第 I 相試験の途中で低吸収ならびに吸収の変動の問題が指摘された 6 化合物について、クリアランス (CL/F) 用量曲線を使った解析および吸収率マトリックス上への配置による解析を行った結果、Caco-2細胞膜透過性 (*in vitro* 特性) はヒトでの吸収性と強く相関し、薬物の吸収率のマトリックス上への正確な配置を可能にし、ヒトにおける吸収性の低さとその変動の問題を前臨床段階から予測できることがわかった。

粘膜透過性の低い薬物で溶解度が低い薬物 (クラス IV あるいはクラス II に分類) においては、絶食下投与では吸収性が低く、食後投与で、胆汁分泌に依存した吸収の上昇が見られる確率が高く、これらの特性は胆汁酸との複合体形成能を調べること (*in vitro*) により、予測できることが示された。

一方、溶解性が高いものの粘膜透過性の低い薬物 (クラス III に分類) については P<sub>gp</sub> の基質であることが多く、それらの薬物は、不完全吸収を示すだけでなく、吸収に関する変動要因 (二峰性等) を抱えていて、新薬候補の選定においては慎重を期すべきものと位置付けられた。二峰性を示す薬物は稀ではあるが、クラス III に分類され、かつ胆汁酸と強く複合体を形成する化合物に見られる可能性が高いことが示された。

また CL/F 用量曲線を用いた線形性解析 (D<sub>max</sub> の概念) は、ヒトにおける薬物の吸収率の把握に有用であることが確認された。ただし CL/F 用量曲線で線形性から上方に外れる場合には不完全吸収に限らず、代謝誘導が起きている場合にも見られ、代謝物の線形性を同時に調べ判断することが重要となることも示された。

## はじめに

新薬の創生は、基礎研究（疾患）、創薬研究（探索と最適化）、前臨床研究（安全性と薬物動態）さらには臨床研究（第Ⅰ～Ⅲ相）を経てなされる。筆者は新薬メーカーに勤務した終盤の約5年間（2000～2005）に、研究部門が創生した新薬候補化合物の前臨床における薬物動態試験、さらには臨床研究における薬物動態試験（生体成分の分析と解析）を担当した経験がある。臨床試験を実施したものは、生活習慣病から感染症疾患に至る7疾患領域の化合物（約30品目）であったが、残念ながら新薬となったものは1品目（ロゼレム、睡眠誘導薬）のみで、その他は全て、安全性や有効性（吸収性などの動態特性を含む）に不具合が認められ開発は中止されている。しかしその間に実施された試験（研究）の成績については、十分に吟味され、検証されているわけではない。

そこで本研究においては、当時、臨床試験の途中で吸収性の改善等が議論された化合物（表1に示した6化合物）に絞って、第Ⅰ相試験における動態特性と薬物の *in vitro* 特性（Caco-2細胞膜透過）さらには前臨床試験データ（<sup>14</sup>C標識体を用いたADME特性）との照合を試みた。

6化合物の臨床試験において問題となった内容は、表1に示した通りで、(i) 絶食下投与では殆ど吸収せず食後投与で吸収率が増大したこと、(ii) Pgp（排出のトランスポーター）により吸収が大きく変動したこと、(iii) 実際にはそうではないものの不完全吸収が疑われて、製剤改良が議論されたことの三点である。

また筆者は、すでに薬物の吸収性の予測手法として、薬物の吸収率を溶解性と粘膜透過性の尺度を用いてマトリックス上に表示する方法とそれに基づく製剤設計上の基準に

表1 本研究において解析対象となった難吸収性化合物

化合物	治療領域	第Ⅰ相試験で見られた吸収特性
A	糖尿病	絶食下投与ではほとんど吸収せず食後投与で吸収率が増大した。
B	認知症	
C	アレルギー	Pgpによる排出効果を受け吸収が大きく変動した。
D	感染症	
E	リウマチ	不完全吸収が疑われて、製剤改良が議論された。
F	がん	

ついて報告しているが<sup>1</sup>、本研究においては、これらの化合物の吸収率マトリックスへの位置付けを行うことにより、化合物の潜在的な問題についても明らかにし、新薬候補の選定基準の見直しや薬物動態特性上の問題の解決に向けたクリアランス（CL/F）用量曲線を用いた解析<sup>2</sup>の有用性についても検証を行った。

## 材料と方法

## 薬物の吸収率を決める要素

薬物の吸収率は不完全吸収の裏返しで、不完全吸収は、薬物が吸収部位である小腸を通過する間（通常3～4時間）に完全に吸収されずに、大腸に移行することにより生じる（図1）<sup>1,2</sup>。吸収を妨げる要素は、その薬物の消化管液中での溶解度（ $C_s$ ）の低さ、投与量の大きさ（完全溶解が得られにくい）と粘膜透過性の低さにつきる。

## 吸収に関する生物薬剤学的分類システム（BCS）

BCSとは薬物の吸収性について、溶解性と粘膜透過性の関係で分類したものである<sup>3,4</sup>。すなわち、BCSでは溶解性、粘膜透過性が共に高い場合はクラスⅠ、粘膜透過性

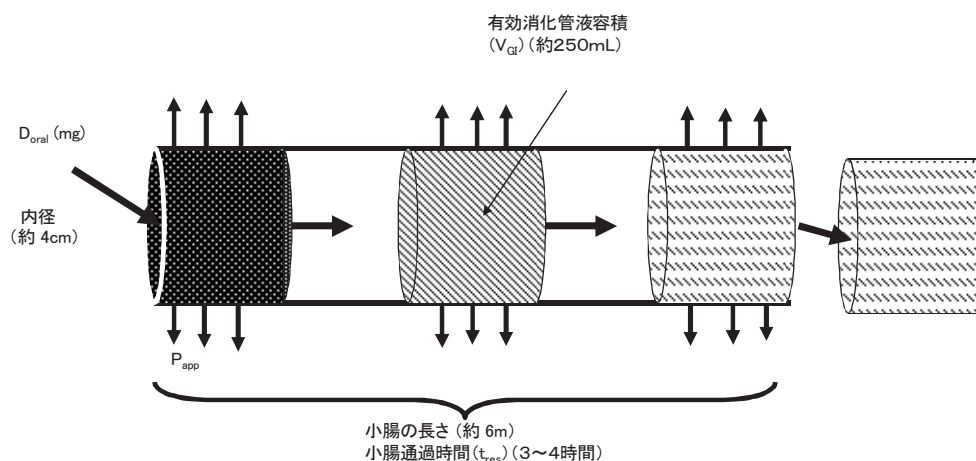


図1 吸収率と粘膜透過性の関係を示す消化管吸収モデル

が高いものの溶解性が低いものはクラス II、逆に溶解性が高いものの粘膜透過性が低いものはクラス III、さらにいずれも低いものはクラス IV に分類される。米国では、クラス I に分類される薬物においては、製剤の溶出プロファイルが同等であることを示せば、生物学的同等性を示すための臨床試験は必要とされない（ジェネリック医薬品の開発や新薬の製剤処方の一部変更の際に有利）。

### 吸収率の簡易計算とマトリックス表示

すでに著者が報告するように<sup>1</sup>、クラス II に分類される薬物では、ほとんどの不完全吸収は高い投与量による溶解の飽和によるもので、溶出速度は律速とはならないということになる。それを基本にして考えると、吸収率はより簡単な式を用いて計算することができる。

まず、薬物の溶解度は投与量に比して高く、消化管内で、いつも溶液の状態である場合を考えてみる。

#### (i) $D_{\text{oral}} / (C_s \cdot V_{\text{GI}}) < 1$ の場合

薬液は一定の容積を持って、小腸のチューブを移動して、やがて大腸に出るが、実質的には、薬液はチューブの一箇所に留まり、一次速度に従って、消化管粘膜から吸収され、時間が  $t_{\text{res}}$  (約 3 h) で完了すると考えればよい。したがってこの場合の吸収率は式 1 のように表される。

$$F_a = 100 \cdot [1 - \exp(-K_a \cdot t_{\text{res}})] \quad \text{式 1}$$

一方で、薬物の溶解度は投与量に比して低く、少なくとも薬物が小腸に入ったときには懸濁状態で飽和溶解に達している場合について考えてみる。

#### (ii) $D_{\text{oral}} / (C_s \cdot V_{\text{GI}}) > 1$ の場合

その場合においては、さらに 2 つの場合分けをして、吸収率を求める式を導くことができる。まず薬物が常に飽和溶解に達している場合について考えてみる。

##### (a) $D_{\text{oral}} / (C_s \cdot V_{\text{GI}}) - (K_a \cdot t_{\text{res}}) > 1$ の場合

吸収率はより単純に次式のように表される。

$$F_a = 100 \cdot (K_a \cdot t_{\text{res}}) \cdot \left( \frac{C_s \cdot V_{\text{GI}}}{D_{\text{oral}}} \right) \quad \text{式 2}$$

途中で完全溶解する場合についてはどうであろうか。

##### (b) $D_{\text{oral}} / (C_s \cdot V_{\text{GI}}) - K_a \cdot t_{\text{res}} < 1$ の場合

(i) の場合と (ii) の (a) の組み合わせを考えて、

次式のように表される。

$$F_a = 100 \cdot \left[ 1 - \left( \frac{C_s \cdot V_{\text{GI}}}{D_{\text{oral}}} \right) \right] \cdot \exp \left[ -1 - K_a \cdot t_{\text{res}} + \left( \frac{D_{\text{oral}}}{C_s \cdot V_{\text{GI}}} \right) \right] \quad \text{式 3}$$

### 吸収率のマトリックス表示

上記の吸収率に関する簡易計算法を用いて、吸収率に関するマトリックス表示が可能である。図 2 a は列の並びが  $D_{\text{oral}} / (C_s \cdot V_{\text{GI}})$  であるとし、一方、行の並びが  $K_a \cdot t_{\text{res}}$  であるとして、それぞれに対応した吸収率を示したものである（この図では便宜上、行の数値は 1 を基準に 2<sup>nd</sup> 倍とし、列の数値も 0.1 を基準に 2<sup>nd</sup> 倍としている）。また図 2 b は吸収率のマトリックス表示と BCS 分類との関係を示したものである。本研究においては各薬物の吸収マトリックス上で位置付けを試みた。

### Caco-2 細胞膜透過試験による透過係数および Efflux 効果の見積もり

クラス III に分類される薬物について Caco-2 細胞膜透過速度（排出のトランスポーターである Pgp による Efflux 効果を含めた透過速度）とヒト消化管粘膜透過速度との間には良好な相関が認められるために<sup>5</sup>、一般には他クラスの薬物にも適用できると考えられている<sup>6</sup>。

創薬研究においては初期の段階から Caco-2 細胞を用いた膜透過試験が実施され<sup>6</sup>、臨床試験候補の選定の判断材料とされている。その際の比較標準物質にはプロプラノロール（溶液を投与した際にはほぼ完全に近い吸収率が得られる薬物）が用いられ、その  $P_{\text{app}}$  値 (300nm/s) が目安となっている。また Efflux（吸収方向に対する分泌方向での透過速度の比が 1 を超えるか否か）については 10 を超えると、薬物は Pgp の基質である可能性が高く、その場合は排出効果による著しい吸収性の低下がみられることが多い<sup>6</sup>。今回の吸収性の解析においてもこれらのデータを活用した。

### 完全吸収を与える最大投与量 ( $D_{\text{max}}$ ) の見積もり

すでに著者が報告するように<sup>1</sup>、クラス II に分類される薬物の吸収率の簡易計算法に従えば、消化管液は絶えず飽和溶解に達していると考え、不完全吸収における吸収率は式 5 で示され、その式において完全吸収の条件 ( $F_a = 1$ ) を入れると、完全吸収を与える最大投与量 ( $D_{\text{max}}$ ) が求められる (式 5)。

$$D_{\text{max}} = K_a \cdot t_{\text{res}} \cdot C_s \cdot V_{\text{GI}} \quad \text{式 5}$$

その際、 $K_a$  の値は Caco-2 膜透過性のデータを使って、 $K_a$  (1/hr) = 0.011 ·  $P_{app, caco-2}$  (nm/s) の関係から<sup>1</sup>、見積もることにもできる。また  $D_{max}$  は動物への投与実験データからも推定することができる。例えばある投与量でラットに経口投与した際の  $^{14}C$  標識体の BA からはその投与量  $D$  における吸収率 ( $F_a$ ) を見積もることができるので、結果的には式 6 を使って、 $D_{max}$  が求められる。

$$D_{max} = F_a \cdot D \tag{式 6}$$

今回の吸収性の解析においてもこれらの計算を行った。

### Lipinski の Rule of Five (Drug likeness)

吸収のよし悪し (医薬品らしさの指標 : Drug likeness) は、その薬物の化学構造を見て、大まかに判断することができる。Lipinski によれば、( i ) 分子量が 500 以上、

( ii ) 水分分配特性を示す LogP 値が 5 以上、また ( iii ) 水素結合ドナーの数が 5 個以上、( iv ) 水素結合アクセプターの数 10 ( 5 × 2 ) 個以上となるような条件が重なると、薬物の粘膜透過性が低下するといわれている ( 数字 5 を目安にした経験則 )<sup>7</sup>。今回の吸収性の解析においてもこの経験則を参照した。

### 肝消失型薬物の経口クリアランス (CL/F) と投与量 ( $D_{oral}$ ) との関係

肝消失型薬物の経口クリアランス (CL/F) と投与量 ( $D_{oral}$ ) との関係については、図 3 に示すように 4 つの場合に分けて説明することができる。まず基本パターンとして、薬物が完全吸収される場合、CL/F は肝固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) と血漿中タンパク非結合分率 ( $f_u$ ) の積で表され、投与量には依存しない<sup>8</sup>。したがって種々の投与

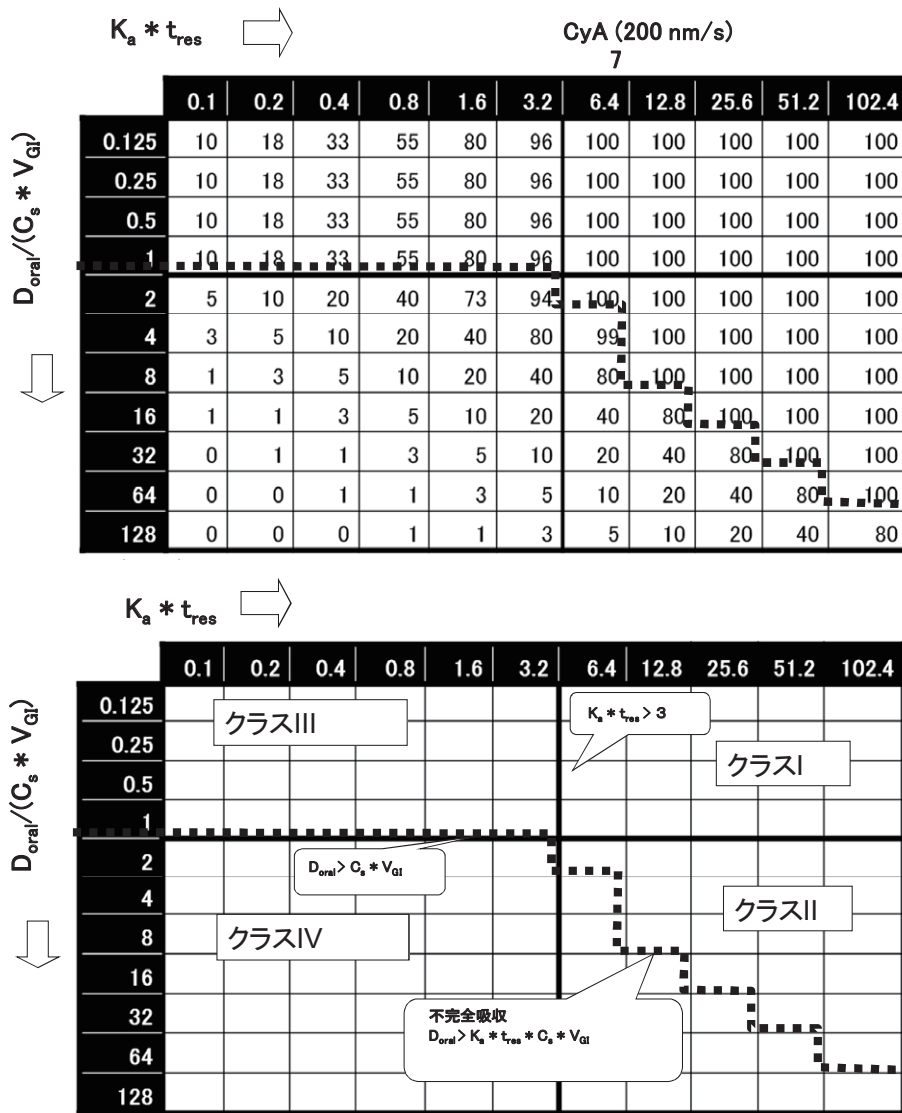


図 2 吸収率のマトリックス表示

量で得られる CL/F の値が一定である限り、その薬物の吸収は完全 ( $F_a = 1$ ) と見なすことができる。しかし投与量を高めていくと不完全吸収 ( $F_a < 1$ ) となり、その結果 CL/F 値が上昇し始める。これが通常のパターンといえる (図 3 a)。しかし特殊なケースとして、薬物が Pgp の基質となる場合、より低い投与量において排出を受けて、吸収率は低下する。しかし投与量が増加するにつれ、Pgp は飽和し、完全吸収に近づいていく (図 3 b)。

以上は薬物の代謝クリアランスが変化しない場合であるが、高投与量あるいは長期の反復投与の場合、代謝誘導 (薬物の毒性と密接した特性) が起きて、CL/F が増加する (図 3 c)。また別のケースとして、高投与量において代謝の飽和が起こると、逆に CL/F は低下していく (図 3 d)。したがって第 I 相試験を順調に進めていくためには、絶えず CL/F と投与量の関係をチェックしていくことが重要となる。不完全吸収が疑われる場合には、絶えず代謝の異常を伴っていないかどうかを見極め、吸収を高める製剤の検討を早急に行うことが重要となる。今回の吸収性の解析においても、まず最初に、この CL/F 用量依存性を調べた。

## 結果および考察

### 化学構造から推察される *Drug likeness* 特性

まず 6 種類の化合物の化学構造は図 4 に示す通りで、水素結合の供与基および受容基は基準値を超えないものの、分子量は C<sup>9</sup>、D<sup>10</sup> および F<sup>11</sup> において 500 を超え、特に化合物 F (ペプチドミメティック構造) については 600 を超え、さらに A、B および E<sup>12</sup> の LogP は 6 を超え (極めて水に難溶)、ほとんどの化合物で膜透過性の点で問題となることが推察された。

またこれらの化合物の解離特性に着目すると、化合物 C および D 以外の化合物では酸性あるいは塩基性を示す解離基はなく、解離による溶解度の上昇は期待できないことが推察された。一方化合物 C (ピペリジン基とカルボン酸基、両性) では両性を示し、中性 pH で溶解性が低下することが推察された。化合物 D (2 個のピペリジン基、塩基性) については、比較的水溶性が高いことが推察された。これらの特性は、後に示す薬物の吸収マトリックス上への位置付けと概ね一致することが確認された。

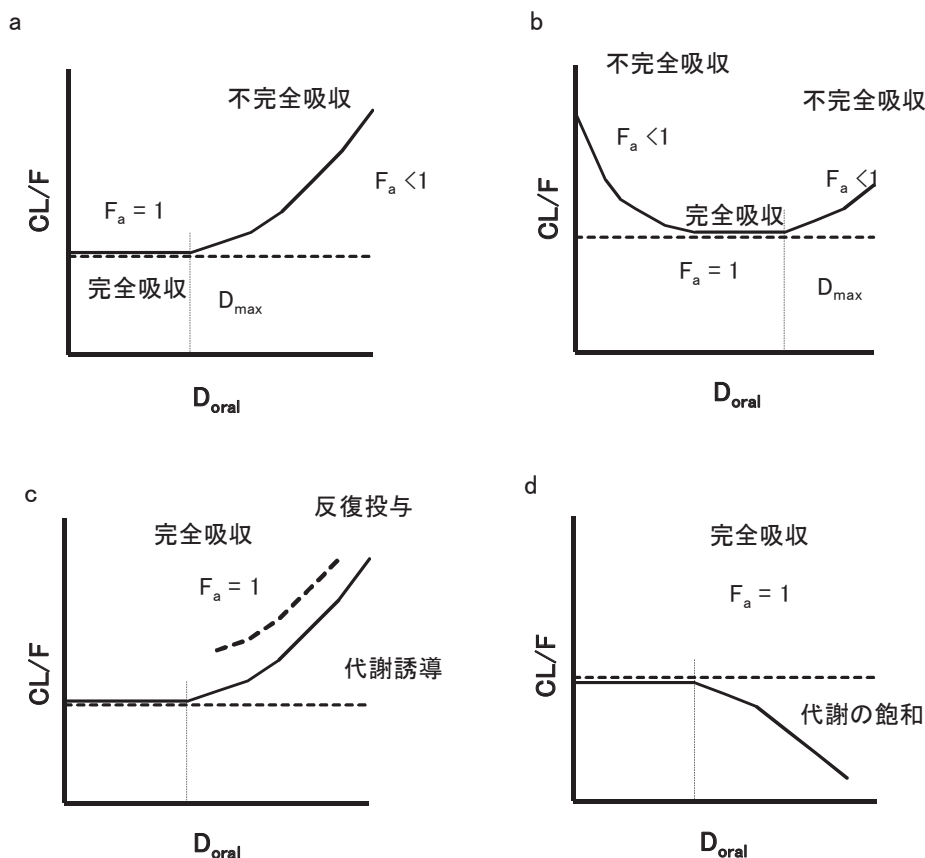


図 3 肝消失型薬物の経口クリアランス (CL/F) と投与量 ( $D_{oral}$ ) との関係

### In vitro 特性

6種類の化合物の *In vitro* 特性（溶解性と膜透過性）は表2に示す通りである。

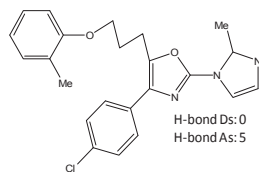
JP2での溶解度は化合物Dを除いて低く、とりわけ化合物AおよびBは油性薬物に位置付けられ、溶解度は極端に低いことが示された。これらの薬物においては胆汁酸（10mM）存在下でそれぞれ1100倍および600倍に増加することが示された（胆汁酸との複合体形成）<sup>13</sup>。また化合物Cについては胆汁酸存在下で溶解度は約30倍増加したが、化合物DについてはJP2での溶解度は十分に高いものの胆汁酸存在下で1/3に低下した（この場合は胆汁酸との複合体形成後の不溶化）。

Caco-2細胞膜透過における  $P_{app}$ （吸収方向）は、化合物間で大きく異なり（1.7nm/sから51nm/s）、化合物F > 化合物E > 化合物A > 化合物B > 化合物D > 化合物Cの順と低下した。透過の標準物質（プロプラノロール）の  $P_{app}$  値（約300nm/s）<sup>5</sup>と比較するとかなり低い値であったが、透過試験においては薬物の容器への吸着を防止するために、Donor、Acceptor両側にBSA（1%）を添加しており、そのため低く、真の  $P_{app}$  を見積もるためにはタンパク結合の補正を行う必要があった。補正後の  $P_{app}$  は化合物CおよびDを除いて十分に高く、特に化合物EおよびFの  $P_{app}$  値については  $f_u$  (< 0.01)の精度に依存するものの、非攪拌水層における薬物の拡散速度に近い大きな値を示した（表2）。

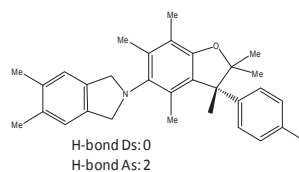
Efflux効果は、化合物CおよびDにおいては、有意に1を超える値を示し（それぞれ18および7）、 $P_{gp}$ の基質であることが示され、それらの薬物の膜透過性が極めて低い原因となっていることが示された。

また化合物CおよびDの粘膜透過性とEfflux効果については、ヒト、ラットおよびサルの高抽出回腸組織を使って、ピオグリタゾン（粘膜透過性が良好）、アセプトロールお

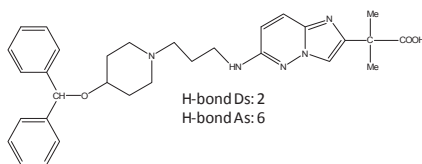
a 化合物 A (mw = 407; logP = 6.0)



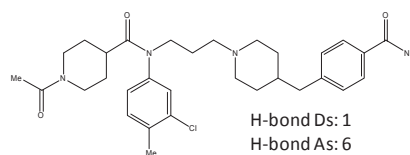
b 化合物 B (mw = 457; logP = 6.0)



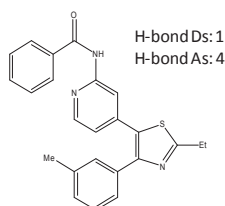
c 化合物 C (mw = 563; logP = 4.8)



d 化合物 D (mw = 553; logP = 4.2)



e 化合物 E (mw = 399; logP = 4.3)



f 化合物 F (mw = 667; logP = 6.6)

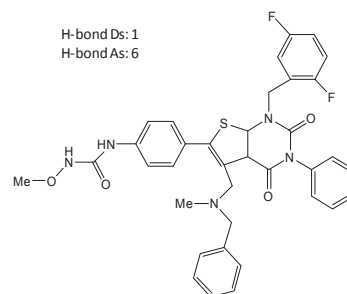


図4 化合物の化学構造から推測される Drug likeness

表 2 各種 *in vitro* 特性（溶解度と Caco-2細胞膜透過速度）およびラットにおける <sup>14</sup>C 標識体を用いた ADME 特性

化合物			A	B	C	D	E	F
<i>In vitro</i> (Caco-2)	JP2 (pH7.2)	mg/mL	0.07	0.05	6.1	3900	0.2	0.4
	JP2 + bile (10mM)		80	30	166	1200	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
	P <sub>app</sub> (A to B)	nm/s	16.1	6.8	1.7	1.8	51.3	44.7
	Efflux ratio		0.7	1	18	7.0	–	–
	f <sub>u</sub> (4% HSA)		0.07	0.01	0.07	0.43	0.001	0.005
	f <sub>u</sub> (1% BSA) (推定)		0.21	0.04	0.21	0.75	0.04	0.02
	P <sub>app</sub> (f <sub>u</sub> -補正後)	nm/s	77	170	8.1	2.4	1283	2235
P <sub>app</sub> (f <sub>u</sub> -補正後 Efflux = 1)	nm/s	77	170	146	12.7	1283	2235	
D <sub>max</sub> 予測	D <sub>max</sub> (JP2)	mg	0.16	0.26	1.5	281	7.7	27
	D <sub>max</sub> (JP2 + bile)	mg	184	153	40	86	7.695 <sup>b</sup>	26.82 <sup>b</sup>
	D <sub>max</sub> (JP2 + bile; Efflux = 1)	mg			726	605		
<i>In vivo</i> (rat)	D food	mg/kg	10 fed <sup>c</sup>	3 fed <sup>c</sup>	5 fasted	5 fasted	10 fasted	1 fasted
	F		0.21	0.36	0.07	0.1	0.21	0.23
	F <sub>a</sub>		0.35	0.33	0.1	0.13	0.43	0.37
	F <sub>g</sub> × F <sub>h</sub>		0.58	1	0.64	0.7	0.48	0.61
	A <sub>e</sub>		0	0	0	0	0	0
	CL/F	L/h/kg	14.9	0.68	7.2	63.7	8.62	1.75
D <sub>max</sub> 予測	D <sub>max</sub>	mg/kg	2.5	1	0.51	0.67	4.36	0.37
	D <sub>max</sub>	mg	245	70	35	47	305	26

a No data

b 胆汁の影響はないと仮定。

c fasted での F は0.1以下。

表 3 化合物 C および D のヒト、ラットおよびサルにおける回腸粘膜透過性 (Efflux ratio) のカセットドージングによる相互比較

化合物 (カセット)	ヒト回腸		ラット回腸		サル回腸	
	P <sub>app</sub> (A to B) nm/s	Efflux ratio	P <sub>app</sub> (A to B) nm/s	Efflux ratio	P <sub>app</sub> (A to B) nm/s	Efflux ratio
C	3.7	16.7	19.5	4.2	4.2	1.7
D	3.8	35.8	25.8	5.5	14.8	2
Acebutolol	12.6	7.3	65.4	2.6	33.2	1.2
Cimetidine	63.7	1.8	121	1.9	99.4	0.9
Pioglitazole	65	0.43	260	0.8	27.2	1.7

およびシメチジン（いずれも P<sub>gp</sub> の基質）を比較基準としたカセットドージングにより透過性試験を実施しており、Caco-2 細胞膜を用いた実験結果がヒトにおける Efflux 効果を正確に反映していることが確認されている（表 3）。

#### ADME 特性 (F、F<sub>a</sub> および CL/F)

ラットに <sup>14</sup>C 標識化合物を投与量 1~10mg/kg で静脈内および経口投与して得られる ADME データを表 2 に示

す。F<sub>a</sub> は静脈内投与に対する経口投与後の血中総放射能濃度の AUC の比から算出したものである。F<sub>a</sub> 値は化合物で大きくことなり (0.1~0.43)、とりわけ P<sub>gp</sub> の基質である化合物 C および D においては比較的投与量において 0.1程度と低い値を示した。なお化合物 A および B は絶食下での F<sub>a</sub> は0.1以下であった。

いずれの化合物も未変化体の尿中排泄率 (A<sub>e</sub>) はゼロで、肝消失型薬物であることが確認された。F<sub>h</sub> × F<sub>g</sub> は

$F/F_a$  から算出され、いずれの化合物も0.5以上の値を示し、肝および消化管での初回通過効果は比較的小さく、またいずれの化合物も CYP3A 単独による代謝は見られないために、特に消化管での初回通過効果 (CYP3A に依存) は無視できると推察された ( $F_g = 1$ )。

これらの ADME 特性からヒトにおける  $D_{max}$  値 (表 2) が予測できるが、臨床試験で見積もられる  $D_{max}$  とも概ね一致していることが確認された (後述)。

### Caco-2 細胞膜透過から推定される $D_{max}$ 値

$P_{app}$  (BSA による結合率の補正後の値) と JP2 あるいは JP2 (+胆汁酸) での溶解度の積から、式 5 を用いてヒトにおける  $D_{max}$  を見積もることができる。各種条件下 (胆汁酸あるいは Efflux の飽和の有無) での  $D_{max}$  は図 5 に示す結果となった。化合物 A および B の吸収率は前臨床研究の段階で食事の有無で大きく変動することが予想されていたが、この  $D_{max}$  の予測結果は前臨床、臨床試験における吸収率の変動結果とも一致した。化合物 B および C においても胆汁酸の有無により  $D_{max}$  値は幾分変動したが、 $P_{gp}$  の飽和 (高投与量で起きる) による変動も大きく、いずれの薬物の吸収率も投与条件で大きく変動することが推察され、その結果は臨床試験で見られた結果とも概ね一致した。

### 第 I 相試験における単回・反復 PK 試験データ

6 化合物の第 I 相試験 (健常成人) における単回・反復投与における投与量と CL/F の関係およびその単回投与における血中濃度推移の代表例を図 6 および図 7 に示す。

化合物 A においては、前臨床試験の段階 (ビーグル犬を用いた吸収実験) で絶食下投与での吸収は極めて低いことが分かっていたが、定法により絶食下投与の試験が先行された。しかしいずれの投与量においても、血中濃度は極めて低く、CL/F は一定化しない (血中濃度の投与量に比例して増加しない) パターン (図 3 a) を示した。しかしその後実施した食後投与 (高脂肪食) での血中濃度は投与量に比例し、CL/F は少なくとも試験実施の最高投与量 (480mg) まで一定の値をとり、完全吸収が得られることが示めされた (図 6 a)。投与量 120mg における絶食および食後投与の血中濃度は図 7 a に示す通りである。これらの結果は、ラットあるいは Caco-2 から計算される  $D_{max}$  (図 5) とも概ね一致した。

化合物 B については A と同様に絶食下での吸収性に問題のある化合物に位置つけられ (図 3 a)、その経験を生か

して、臨床試験の早い段階から、吸収に及ぼす食事の影響が調べられた。結果は予想した通りで、絶食下では吸収性は極めて低いものの高脂肪食を摂った後の吸収は、試験実施の最高投与量 (800mg) まで完全であることが示めされた (図 6 b、図 7 b)。

化合物 C については臨床試験における CL/F 用量依存曲線は図 3 b のパターンを示し、低投与量での吸収性は不良であることが示された (図 6 c)。また血中濃度の個体間ばらつきも大きいことが示された (図 7 c)。これらの結果は、ラットあるいは Caco-2 から計算される  $D_{max}$  (図 5) からも十分に予測されたが、吸収不良の原因としては、小腸移行後の pH 上昇による急激な溶解性の低下と、特に低投与量における  $P_{gp}$  による排出効果が挙げられた。小腸移行後の溶解性の低下の可能性については、その懸念を払しょくすべく、臨床試験の後半 (高投与量での臨床試験) からは酸を添加した新製剤に切り替えた試験が実施された。その結果、高投与量 (絶食下投与) では CL/F の値は一定値を示すようになった (本臨床試験から推定される  $D_{max}$  は 400mg)。しかしこの化合物については化合物 A や B と異なり、食後投与で CL/F が約 2 倍に上昇し、食後投与による吸収の低下傾向が見られた。その原因として溶解薬物が食後の pH 上昇時に食物中の成分と不溶性の複合体を形成することが挙げられた。

化合物 D については単回投与における CL/F 用量依存曲線で見ると化合物 C と類似し (図 6 d)、図 3 b の

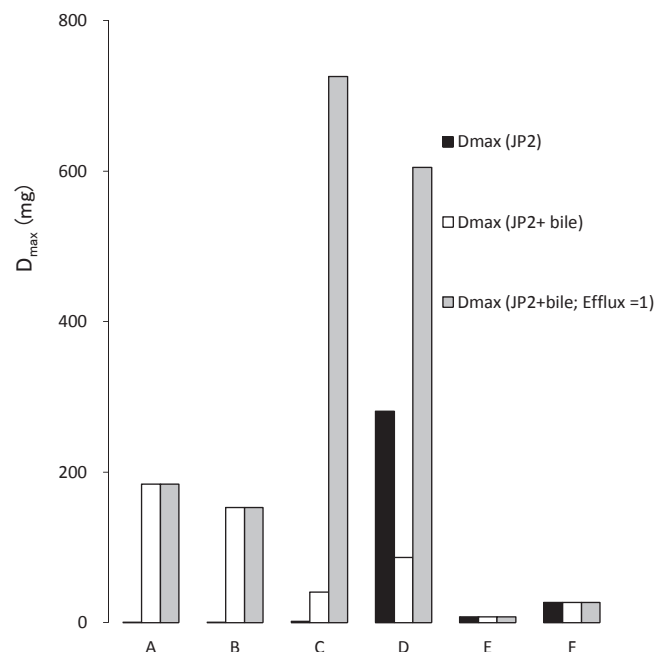


図 5 Caco-2 細胞膜透過より見積もられるヒトにおける  $D_{max}$  値



パターンを示した。ただし異なる点は、投与量を高めても完全吸収は得られず、反復投与で CL/F は低下（吸収性の増加）し、いずれの投与量においても、各被験者で血中濃度は二峰性を示し（絶食投与）、ばらつく推移を示した（図 7 d）。なお二峰性は食後投与で消失する傾向が見られた。

化合物 E については Caco-2 から計算される  $D_{max}$  値は 10mg 程度で（図 5）（消化管液における溶解度の過小評価の可能性）、それよりも高投与量で吸収は不完全となることが懸念された（図 3 a）。しかし実際に得られた CL/F

用量依存曲線からは少なくとも投与量 100mg までは線形性を示し、完全吸収が得られることが示唆された（図 6 e、図 7 e）。

化合物 F については、化合物 E とも類似して、JP2 での溶解度から推定される  $D_{max}$  値は低く（図 5）、高投与量で吸収は不完全となることが懸念された（図 3 a）。しかし実際の単回投与で得られた CL/F の用量依存曲線からは投与量が 100mg までは線形性を示し、完全吸収が得られることが示唆された（図 6 d、図 7 d）。

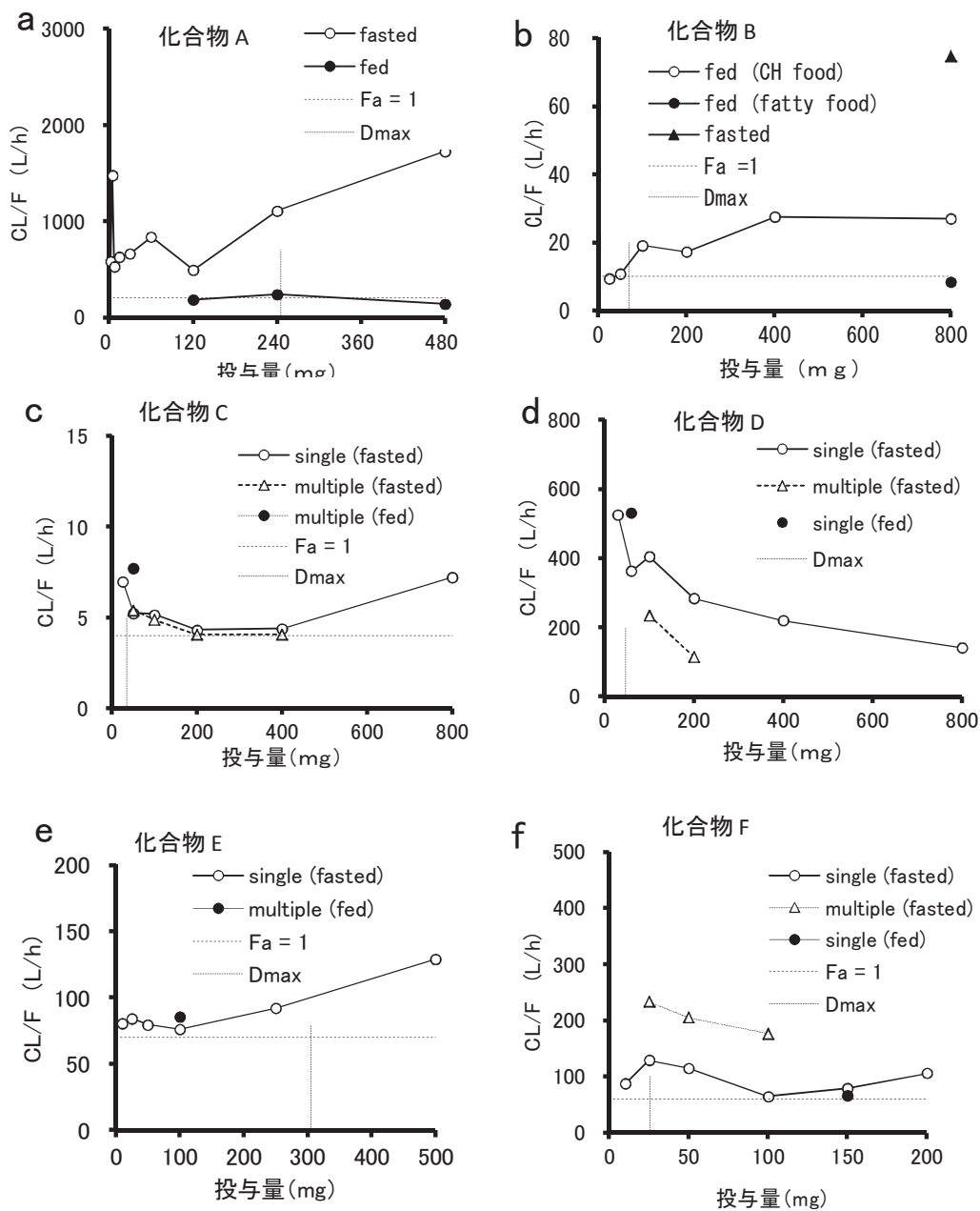


図 6 臨床第 I 相試験における単回投与後の経口クリアランス (CL/F) の投与量の関係  
 図中の  $D_{max}$  はおよび  $F_a = 1$  はそれぞれラット ADME のデータからの予測値および臨床試験において得られた最少 CL/F からの予測値

化合物 D の二峰性の推定される機構

化合物 D に見られた二峰性については、前臨床試験の段階でラットで確認されていた (図 8 a)。その原因として、当初 (i) 胃内残存薬物の間欠的 (不規則) な排出あるいは (ii) 腸肝循環の可能性が疑われた。しかしラットへの十二指腸内投与においても二峰性が認められたこと、また静脈内投与では二峰性は見られないことから、いずれの可能性もないことが確認される。

この化合物は Pgp の基質であり (表 2)、Pgp は小腸の中部 (回腸) に多く発現しているため<sup>14</sup>、当初は薬物が小腸を移動する間に、空腸における Pgp による排出を受け、それが二峰性を生じさせるのではないかと推論された。しかし Pgp の腸管内分布における違いだけで、不連続的な吸収パターンを説明することは困難であるようにも思われ

た (図 8 b)。

この化合物で見られた二峰性はタリノロール (Pgp の基質) で報告される二峰性に近いと思われる<sup>15</sup>。この著者らは、タリノロールの第二のピークは薬物が小腸の中下部で胆汁酸と混合ミセルを形成し (図 8 c)、小腸下部 (回腸) から、選択的に吸収されたもので、一方、第一のピークは、薬物が胆汁酸と接触する前に吸収されたものである (図 8 d) と推察している。

化合物 D においても恐らく、これに類似した機構で二峰性を生じさせていると思われるが、図 8 c、図 8 d および図 9 は、その機構をより分かりやすく模式的に示したものである。二峰性を生じさせる薬物特性としては、(i) 薬物が BCS 分類上のクラス III (よく水に溶けるが粘膜透過は遅い) に分類されること (第一のピークを生む条件)、

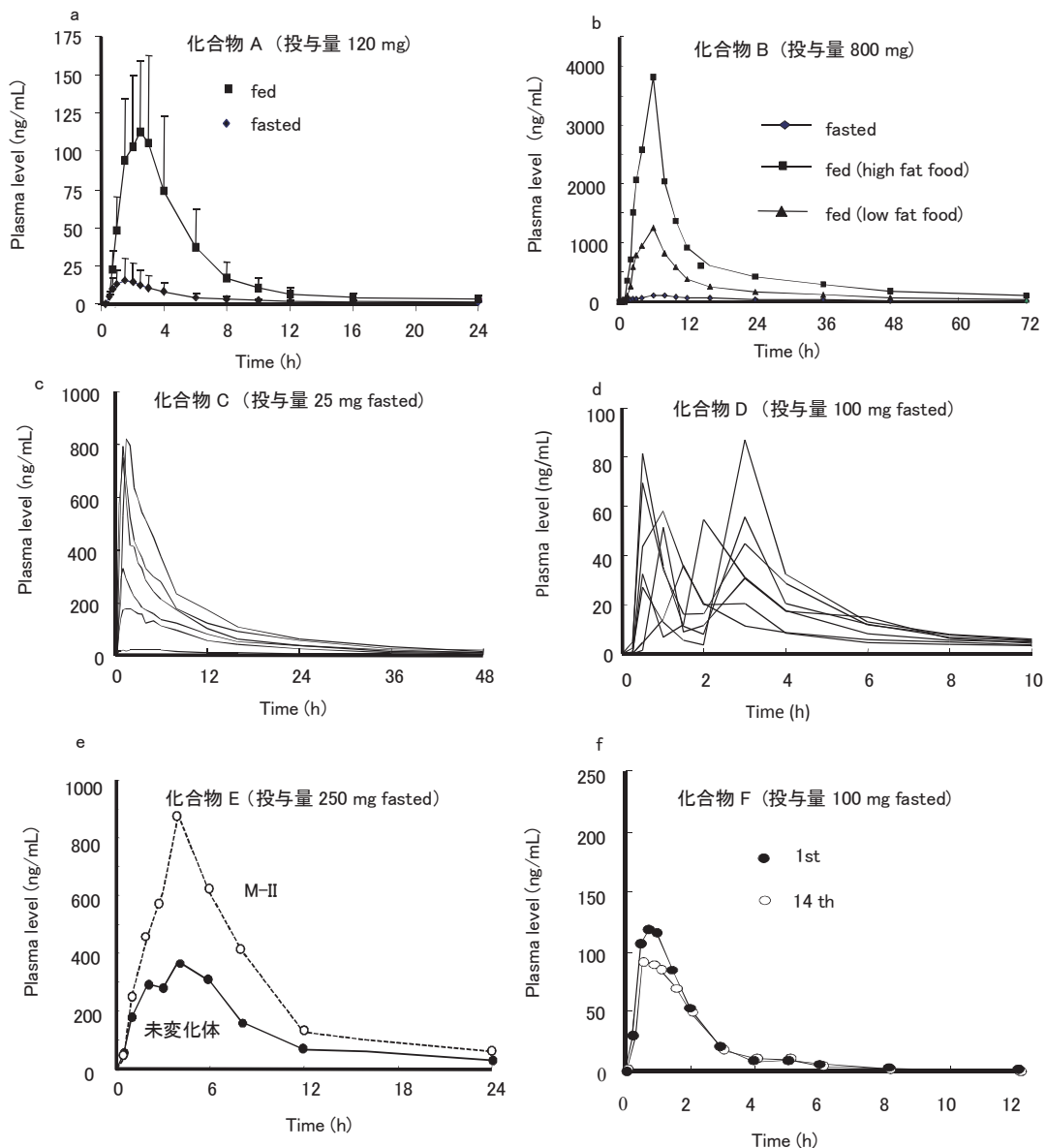


図 7 臨床第 I 相試験における単回投与後の血中濃度推移 (健康人)

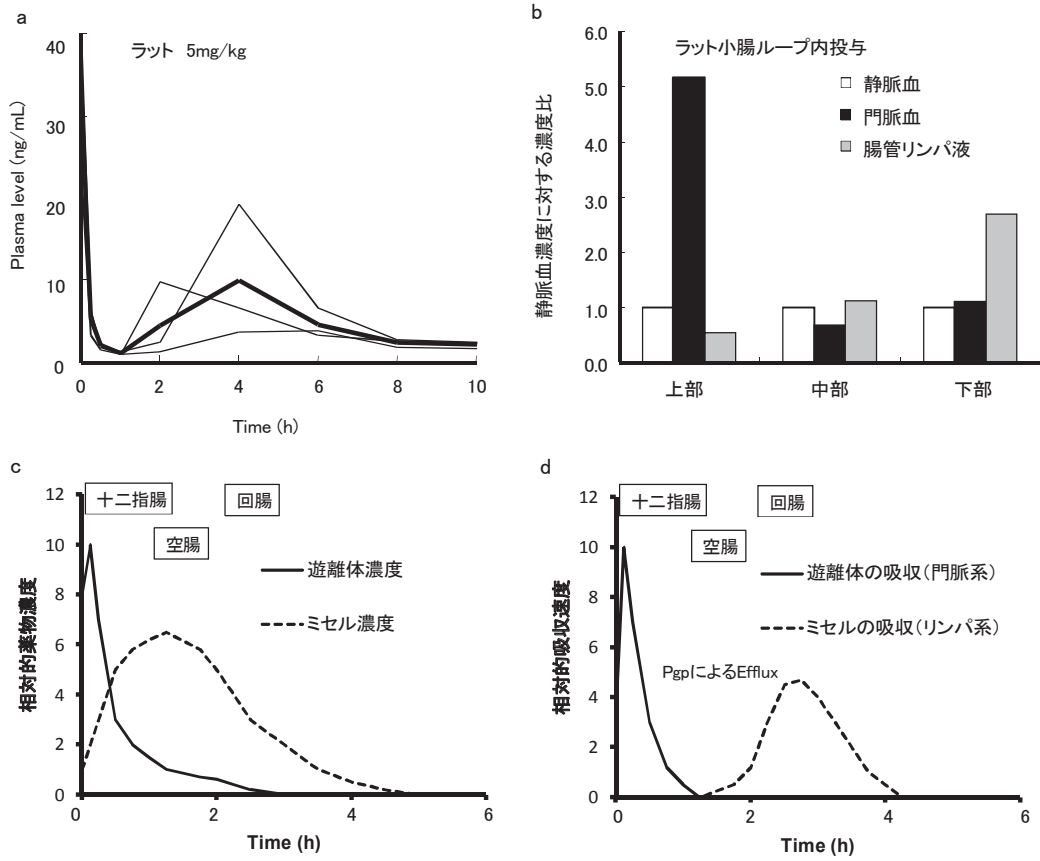


図8 化合物Dの二峰性血中濃度の推定メカニズム

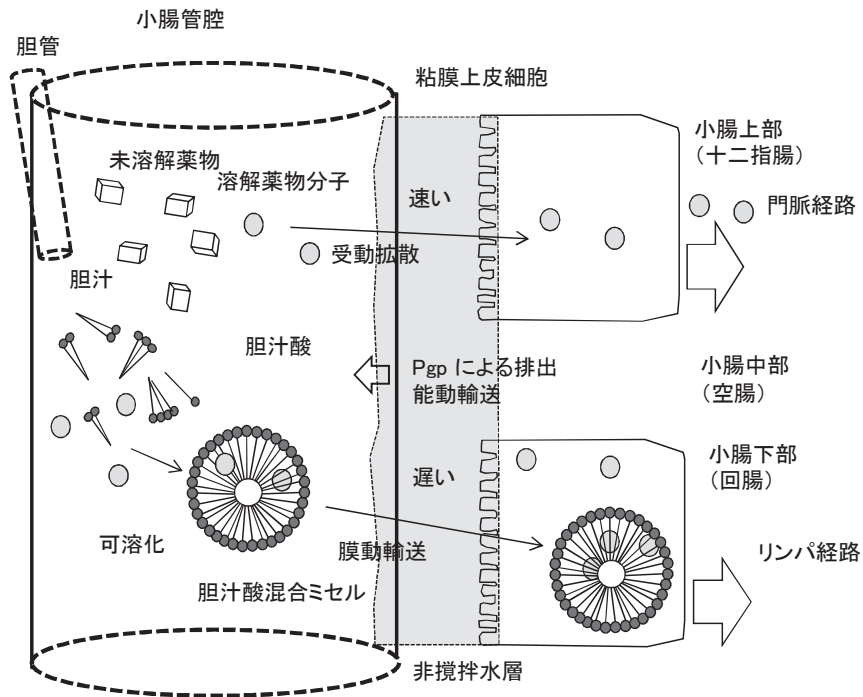


図9 薬物の胆汁酸混合ミセルを介した吸収の模式図

かつ (ii) 薬物が胆汁酸と強く複合体を形成すること (第二のピークを生む条件) が挙げられる。薬物が小腸内で胆汁酸と混合ミセルを形成すると、小腸の中下部では遊離の薬物濃度が低下し (図8c)、それにより中下部からは遊離体の吸収が減少し、特に中部からの吸収は Pgp による Efflux を受けて、極度に制限を受けることになる (図8d)。一方で薬物は混合ミセルの形態で小腸下部 (回腸) から膜動輸送により吸収され、リンパ経路を経て全身循環に移行する (単純拡散に比べ遅い)。この特性が第二のピークとなって現れる。食後投与では二峰性が消失した理由として、食事により胃内容排出時間に遅れが生じ、鋭敏な第一のピークが見られなくなった点と、食後胆汁分泌の亢進が薬物の遊離体濃度の低下を引き起こしたためと推論される。

化合物 A、B や C では二峰性が見られていない理由として、特に化合物 A や B では薬物の水への溶解性は低く (クラス III あるいはクラス IV)、それが第一のピークを生じにくくしているためと推察される。また図7a および図7b に示される血中濃度のピーク ( $t_{max}$  は4h 近辺でピーク出現は比較的遅い) は化合物 D の第二のピークに相当すると考えられる<sup>16</sup>。化合物 C についてはクラス III に分類され、胆汁酸との複合体の形成が見られる (表2) が、複合体形成の強さは他の三化合物 (A、B、C) ほど強くはないことによると推察される。なお化合物 D の胆汁酸との複合体形成能については、表2 に示す溶解度法からではなく、遊離体濃度を測定することにより初めて知ることができるが、現時点ではその複合体形成の強さについては不明である。

### 化合物 E および F の代謝誘導の可能性

化合物 E と化合物 F については、当初は図3a に示す CL/F 用量曲線のパターンに従い、投与量が100mg を超えると吸収率が低下すると見られて、明確な POC を得るためには、薬物の吸収性の改善の製剤化検討の必要性が議論された。特に化合物 F については、高投与量においては錠剤中の薬物含有率の上昇に伴う溶出速度の低下が懸念され、その影響を除去する目的で、POC 試験には錠剤の代わりに懸濁液が用いられた。

しかし両化合物の代謝物の血中濃度推移を含めて CL/F 用量曲線を精査してみると、化合物 E については250mg の反復投与で単回投与に比べ有意な CL/F の増加と代謝物 (MII) の生成の増加がみられ、また同様の特性が化合物 F においても100mg の反復投与において認められ (図10)、CL/F の増加は代謝誘導によりもたらされた可能性が示唆

された。化合物 F については、代謝誘導に呼応する形で、反復投与の途中 (1週間後) で一過的な ALT および AST の上昇が起きていることが確認された<sup>17</sup>。

### 各化合物の吸収マトリックスにおける位置付け

筆者の報告によれば<sup>1</sup> シクロスポリン A (CyA) は Pgp の基質で膜透過性が低く (Efflux = 1 としたときの Caco-2 細胞膜透過の  $P_{app}$  は200nm/s)、吸収率のマトリックス上では  $K_a \times t_{res}$  値は約7と推定されている。これを基準にすると、今回の解析対象となった6化合物の  $K_a \times t_{re}$  値は、Caco-2 細胞膜透過の  $P_{app}$  値 (表2) から見積もることができる。また CL/F 用量曲線の図3a から、CL/F が増加し始める投与量から、ヒトにおける実際の  $D_{max}$  を推定することができる (図11の下段の表)。なお化合物 D については CL/F 用量曲線からは  $D_{max}$  の推定は困難であった。したがってこれらの値を用いて、各薬物の吸収マトリックス上の位置付けができる。

化合物 A および B については共にクラス III あるいは III に近い II に位置付けられ (図11a および図11b)、CyA とほぼ類似し<sup>18,19</sup>、膜透過性が比較的小さいために、臨床用量で消化管内液中の溶解度に大きく依存し、臨床用量の範囲で吸収率は変動する特性が示された (表の  $D_{max}$  に対応した  $C_{s,max}$  値は式5より算出)。食後投与に応じた胆汁分泌による溶解性の高まりは、吸収率を大いに向上させる薬物 (油溶性) として位置付けられた。

化合物 C については、低投与量でクラス III (Pgp による Efflux 効果を受けることを考慮) に、高投与量ではクラス II (Efflux = 1) に位置付けられ (図11c)、臨床試験中では酸を添加した製剤に切り替えられたが、この位置付けからは必ずしも薬物の溶解性が吸収率に特に大きく影響するわけではないことが示された。

化合物 D については Pgp の基質で粘膜透過性は低いものの溶解性が高く、クラス III に位置付けられ (図11d)、Pgp の飽和が起きる条件においても、完全吸収は得られないことが示された。またこの化合物はすでに述べたように、大部分は胆汁酸ミセルと混合ミセルを形成し、リンパ経路で吸収される可能性があり、吸収マトリックスへの正確な位置付けは容易でないことが確認された。

化合物 E および F については共にクラス II に位置付けられ (図11e および図11f)、当初臨床試験中に不完全吸収が懸念されたが、膜透過性が比較的高く、特に高い溶解性が見られないものの、比較的高い投与量においても完全吸収が得られることが示された。

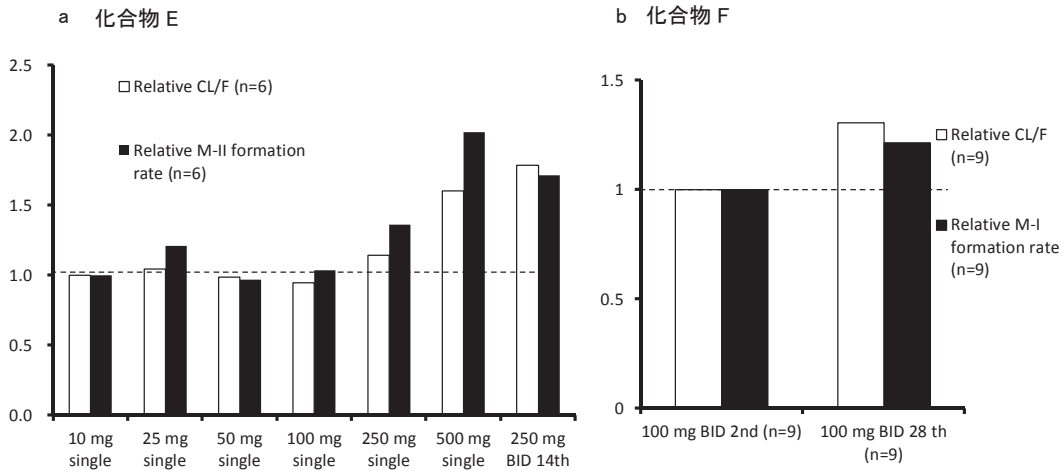
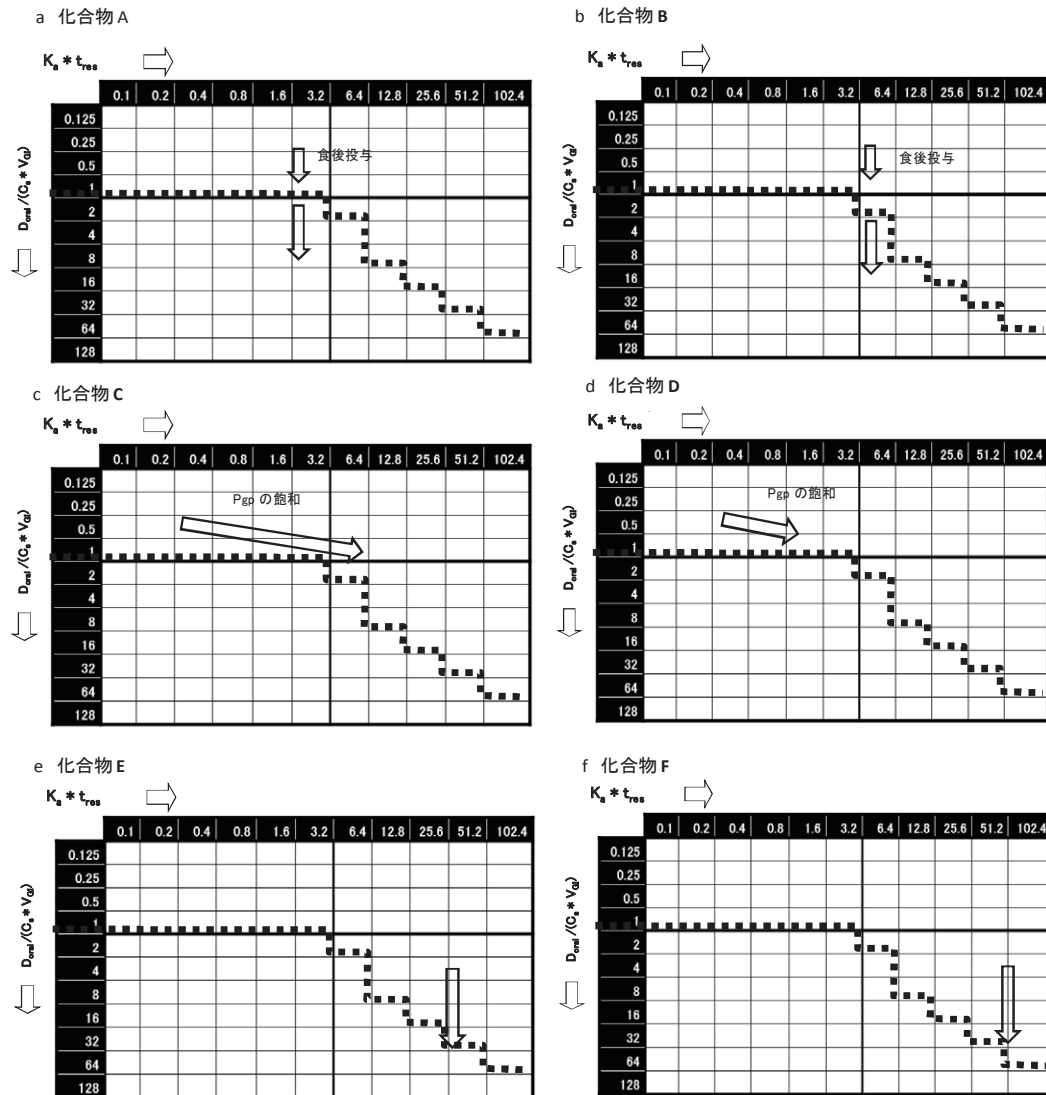


図10 第 I 相試験（単回および反復投与）で見られた化合物 E および F における代謝誘導特性



化合物		C,A (旧製剤)	A	B	C	D	E	F
$K_a \times T_{res}$ 下限			2.7	5.9	0.28	0.08	45	78
$K_a \times T_{res}$ 上限			7		5.1	0.45		
推定 $D_{max}$	mg	300	500	800	400		400 >	200 >
推定 $C_{max}$	μg/mL	170	740	540	310		3.5 >	1.0 >

図11 各化合物の吸収マトリクスにおける位置付け (→は投与量を増やした場合の変化)

## 第 I 相試験結果の総括

化合物 A、B、D および E については POC 試験を実施することがなく終了した。化合物 A および B の共通する問題として、忍容試験（第 I 相試験）で MTD（最大忍容投与量）が得られたにも関わらず、それまでの前臨床試験においては、投与量に見合った副作用が見られておらず、安全域（NOAEL）の把握が困難であったことが指摘される。その原因として、前臨床試験では結晶微粉末の MC 懸濁液が用いられ、薬物の溶解不良（吸収不良）により、投与量に見合った暴露（血中濃度の AUC）が得られなかった可能性がある。なお溶解性を高めた投与剤での安全性試験は理想であるが、製剤の高張りや基剤（溶媒）の安全性への影響を考えると容易ではない。化合物 B については前臨床試験の段階で製剤の最適化検討がなされ、マイクロエマルジョン組成（SNEDDS）<sup>16,18,19</sup> を用いた特殊製剤が準備されたが用量（最大100mg）に制限があり、実際には使われることはなかった。

化合物 C については第 II 相試験（国内）を実施したが、臨床試験の時期が季節に依存し、順調には進まず、他社先行品を上回る効果を出すに至らず、開発は終了した。この化合物は、治療効果を示す投与量では血中濃度は線形性を示したが、食後投与で、AUC が半減する問題が指摘されていた。またさらに血中濃度の上昇による QT 延長の可能性が指摘されていた。そのため絶食投与（これ以上血中濃度は上昇しない最適吸収の条件）を基本にした用量設定が行われ、食後投与（吸収率低下）の被験者では、十分な治療成績が出せなかった可能性がある。

化合物 D については二峰性という特殊な血中濃度推移を示したが、国内での市場性は必ずしも大きくはないため、海外のベンチャー企業に導出された。

化合物 E については、第 I 相試験の単回漸増試験での MTD は 250mg で、この投与量ではほとんど全例に嘔吐が見られ、治療効果を示す投与量が近接していることから、開発を断念した。PK 解析では投与量 250mg では代謝誘導が起き始めることが示されたが、代謝誘導は肝毒性とよく相関することも知られており、臨床試験で見られた副作用との関係は精査するに値したが、必ずしも十分なデータを取得せずにテーマは終了した。

化合物 F については、グローバルでの第 III 相試験（臨床試験の究極）が行われ、用量設定を安全性重視（肝毒性）の低めの設定で行ったために十分な治療効果を出すに至らなかった可能性がある。肝毒性の所見は、第 I 相試験（忍容性試験）の反復投与においても投与 1、2 週間後に

一過的に ALT や AST が上昇する現象を捉えていたが、一過的な上昇に過ぎない点で、それほど深く検査はなされなかった。しかし反復投与による ALT や AST の一過の上昇は、最近では分子標的薬（抗がん剤）などで取り上げられていて<sup>17</sup>、代謝誘導（毒性の強い化合物を高用量で反復した際によく見られる）との関連性が強く、ALT や AST が元のレベルに戻ってもそれに付随する代謝サイクルの変化を誘発し、有害事象に繋がる可能性が高いと思われる。

さらに化合物 E および F の薬物動態特性として血漿タンパク結合率が極めて高いことが指摘される（表 2）。一般的には作用部位における薬物濃度は血中の遊離体濃度に等しいと考えられ、そのことを考慮すると、極めて不利で、十分な治療効果を期待するためには、その分、高投与量が必要となり、肝への有害作用を引き起こす要素を含んでいたのではないかと思われる。

## 結 論

本研究を通じて下記の点が明らかになった。

(i) 吸収に関する *in vitro* 特性（Caco-2 細胞膜透過性や胆汁酸の有無での溶解性）はヒトでの吸収性と強く相関し、薬物の吸収率のマトリックス上への正確な配置を可能にした。

(ii) 薬物の吸収率マトリックス上への配置はその薬物の臨床試験における吸収の問題を前臨床段階から把握する上で大いに役立つことが確認された。

(iii) 粘膜透過性の低い薬物で溶解度が低い薬物（クラス IV あるいはクラス II に分類）においては、絶食下投与では吸収性が低く、食後投与で、胆汁分泌に依存した吸収の上昇が見られる確率が高い。これらの特性は胆汁酸との複合体形成能試験（*in vitro*）で十分に予測できることがわかった。化合物 A と B においてその実例が示された。

(iv) クラス III に分類される薬物は Pgp の基質であることが多く、それらの薬物は吸収性の点で不完全吸収を含めた多くの変動要因を抱えていて、新薬候補の選定においては慎重を期すべきものと位置付けられる（Pgp の基質か否かの判定は Caco-2 細胞膜透過性を調べることにより可能である）。化合物 C と D においてその実例が示された。

(v) 二峰性を示す薬物（新薬候補の選定から篩落とされるべき薬物）は稀ではあるが、比較的水に溶けるが粘膜透過性が低い薬物（クラス III に分類）でかつ胆汁酸と強く複合体を形成する化合物に見られる（胆汁酸との複合体形成

能は、薬物の血漿タンパク結合活性と同様に、遊離体濃度を測定することにより調べられる)。化合物 D においてその実例が示された。

(vi) CL/F 用量曲線を用いた線形性解析 ( $D_{max}$  の概念) は、臨床試験中の薬物の吸収率の把握に有用であることが確認された。

(vii) ただし CL/F 用量曲線で線形性から上方に外れる可能性 (図 3 a または図 3 c) は不完全吸収に限らず、代謝誘導が起きてる場合にも見られ、そのような場合には、代謝物の線形性を同時に調べ判断することが重要である。化合物 E と F においてその実例が示された。

### 引用文献

- 1 伊賀勝美 難吸収性薬物の吸収性に関する評価基準とそれに基づく製剤設計 同志社女子大学総合文化研究所紀要28 : 80-92(2011).
- 2 伊賀勝美 DDS 製剤の開発・評価と実用化手法 : 薬物動態研究から見た開発段階における製剤検討の考え方 技術情報協会 pp278-290(2013).
- 3 Dahan A, Miller JM, Amidon GL, Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs, AAPS J. 11: 740-746 (2009).
- 4 Amidon GL, H. Lennernas, Shah VP, Crison JR, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability, Pharm. Res., 12: 413-420 (1995).
- 5 Artursson P, Palm K, Luthman K, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, Adv. Drug. Deliv. Rev. 46: 27-43 (2001).
- 6 Lin X, Skolnik S, Chen X, Wang J. Attenuation of intestinal absorption by major efflux transporters: quantitative tools and strategies using a Caco-2 model. Drug Metab Dispos. 39: 265-274 (2011).
- 7 Lipinski CA Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. Drug Discov Today Technol. 1: 337-341 (2004).
- 8 Gibaldi M, Perrier D. pharmacokinetics: Revised and expanded. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc. (1982).
- 9 Fukuda S, Midoro K, Yamasaki M, Gyoten M, Kawano Y, Fukui H, Ashida Y, Nagaya H. Characteristics of the antihistamine effect of TAK-427, a novel imidazo-pyridazine derivative. Inflamm Res. 52: 206-214 (2003).
- 10 Imamura S, Ichikawa T, Nishikawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Niwa S, Iizawa Y, Baba M, Sugihara Y. Discovery of a piperidine-4-carboxamide CCR5 antagonist (TAK-220) with highly potent Anti-HIV-1 activity. J Med Chem. 49: 2784-2793 (2006).
- 11 Miwatashi S, Arikawa Y, Kotani E, Miyamoto M, Naruo K, Kimura H, Tanaka T, Asahi S, Ohkawa S. Novel inhibitor of p38 MAP kinase as an anti-TNF-alpha drug: discovery of N-[4-[2-ethyl-4-(3-methylphenyl)-1,3-thiazol-5-yl]-2-pyridyl]benzamide (TAK-715) as a potent and orally active anti-rheumatoid arthritis agent. J Med Chem. 48: 5966-5979 (2005).
- 12 Hara T, Araki H, Kusaka M, Harada M, Cho N, Suzuki N, Furuya S, Fujino M. Suppression of a pituitary-ovarian axis by chronic oral administration of a novel nonpeptide gonadotropin-releasing hormone antagonist, TAK-013, in cynomolgus monkeys. J Clin Endocrinol Metab. 88: 1697-1704 (2003).
- 13 Mithani SD, Bakatselou V, TenHoor CN, Dressman JB, Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration, Pharm. Res. 13: 163-167 (1996).
- 14 Zimmermann C, Gutmann H, Hruz P, Gutzwiller JP, Beglinger C, Drewe J. Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. Drug Metab Dispos. 33: 219-224 (2005).
- 15 Weitschies W, Bernsdorf A, Giessmann T, Zschesche M, Modess C, Hartmann V, Mrazek C, Wegner D, Nagel S, Siegmund W. The talinolol double-peak phenomenon is likely caused by presystemic processing after uptake from gut lumen. Pharm Res. 22: 728-735 (2005).
- 16 Elgart A, Cherniakov I, Aldouby Y, Domb AJ, Hoffman A. Improved oral bioavailability of BCS class 2 compounds by self nano-emulsifying drug delivery systems (SNEDDS): the underlying mechanisms for amiodarone and talinolol. Pharm Res. 30:

3029-3044 (2013).

- 17 Woreta TA, Alqahtani SA Evaluation of abnormal liver tests. *Med Clin North Am.* 98: 1-16 (2014).
- 18 Schroeder TJ, Cho MJ, Pollack GM, Floch R, Moran HB, Levy R, Moore LW, Pouletty P, Comparison of two cyclosporine formulations in healthy volunteers: bioequivalence of the New Sang-35 formulation and Neoral. *J. Clin. Pharmacol.* 38: 807-814 (1996).
- 19 Muleller EA, Kovarik JM, van Bree JB, Crevel J, Lucker PW, Kutz K, Influence of a fat-rich meal on the pharmacokinetics of a new oral formulation of cyclosporine in a crossover comparison with the market formulation. *Pharm. Res.* 11: 151-155 (1994).