

論 文

新薬候補化合物の開発段階で見られた反応性代謝物による
異常な薬物動態特性についての検証

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

Retrospective analysis of reactive metabolite-induced
unusual pharmacokinetics of new chemical entities
observed in clinical development stages

Katsumi Iga

Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal
Arts, Special appointment professor**Abstract**

I encountered several drugs terminated at the clinical development stage because of their unusual reactive-metabolite-involved pharmacokinetic (PK) behaviors when I worked for Takeda Chemical Ind. as a general research manager of their PK study of new chemical entities from 2000 to 2005. In this paper, in order to clarify the true causes of their termination, I chose three typical compounds (Compounds A, B, and C) and analyzed their preclinical and clinical PK data in the light of current scientific findings on reactive-metabolite-induced unusual PK, retrospectively. Additionally, I analyzed the data on pioglitazone and alogliptin, drugs currently used for the treatment of type-II diabetes worldwide, from the same view as above.

As a result, I found that the three compounds would never have been selected as candidates for clinical development, but would have been screened out at earlier optimization stages, in the light of the guidance published by Food and Drug Administration (FDA) in 2009 regarding Metabolite in Safety Testing (MIST). As for pioglitazone and alogliptin, I found a lack of sufficient data to show their safety for long-term usage.

I also identify the following factors as key to success in drug development:

- (i) Chemical design as a function of medical dose and treatment period
- (ii) Clarification of risk and benefit of newly developed medical treatment
- (iii) Differentiation of drug efficacy and PK of reactive metabolites
- (iv) Optimization of new chemical entities after entering the clinical stages (feedback from clinical development to research)
- (v) Specification of places (organs or tissues) where unusual tissue damages occur due to a reactive metabolite
- (vi) Reactivity of a reactive metabolite over metabolic de-toxicity, particularly in the disease states

(vii) Carcinogenicity of a reactive metabolite

(viii) Additional clinical safety study (even after marketed), as required by the FDA

はじめに

筆者は武田薬品（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（PK）試験（放射標識体を用いた吸収・分布・代謝・排泄試験、ADME試験）と臨床研究における薬物動態試験（生体成分の分析とヒトにおけるPK解析）の総括責任者として、また研究本部と開発本部の橋渡し役として、忙殺されていたことがある。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（異常PK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、十分に検証されているわけではない。

昨年、吸収性が懸念された開発化合物について、過去のデータを現在の水準で見直し、真の問題は何であったかについて検証を行ったが¹⁾、開発中止化合物の中には、代謝物の異常蓄積が懸念され、それが中止の原因となったと思われるものも複数ある。そこで代表的な化合物（化合物A、BおよびC）を選び、過去のデータ（前臨床および臨床データ）を見直し、開発中止に至った真の問題は何であったかについて検証を行った。また現在臨床使用されているピオグリタゾンおよびアログリプチンについても、過去に代謝物の異常蓄積が指摘された類似薬（トログリタゾン²⁾とビルダグリプチン³⁾）と比較することにより、異常動態特性の有無について検証を行った。

材料と方法

前臨床における薬物動態試験

図1に示すように⁴⁾、新薬開発は創薬研究、

前臨床試験（開発研究）、臨床試験（開発）の流れで進行する。新薬の創生は、基礎研究（新規治療薬につながる標的分子の探索）や創薬研究（その原理に基づき候補化合物を探索し、最適化する）がすべてと見られがちであるが、むしろその後のプロセスの方がより重要と思われる（本報告の主要テーマ）。特に前臨床試験で実施される薬物動態試験（ADME試験とin vitroでの代謝実験）や安全性試験（動物を用いた安全性試験、GLP試験）は短期間（約1.5年）で実施されるものの、臨床試験へと進めるための判断データを提供する。今回の報告においては、主にこの段階のデータを見直すことにした。

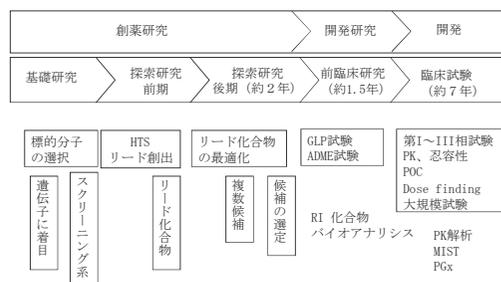


図1 創薬研究と開発研究の流れにおける薬物動態試験

臨床試験における薬物動態試験

臨床試験は第1、2、3相と段階を経て実施されるが、第1相試験では、数十人規模で健康人に治験薬が投与されて、忍容性（どのような投与量で副作用が出始めるかを調べる）とともにヒトでのPK（薬物の血中濃度推移）が調べられる。第1相試験では、まず投与量を漸増する条件での単回投与が実施され、特に問題がなければ、反復投与の試験へと移行する。第2相試験では、数百人の患者を対象に治療コンセプトの確認試験（Proof of Concept試験、POC試験）が実施され、順調に進めば、数百から数千人の規模での用量依存性試験（dose

finding 試験)が実施される。第3相試験では、既存薬を比較対照にして大多数の患者に薬物が投与され、その治療効果が調べられる(大規模治療試験)。既存薬に勝る効果が得られれば、研究開発は成功したことになり、承認申請に向けた手続きが取られる。しかしこの試験(第3相試験)に失敗すると、投じた研究開発費(大型製品であれば数千億円に上る)が無駄になり、企業にとっては相当の消耗(Attrition)となる。

臨床試験における薬物動態試験は、前述のように第1相試験においてなされるが、第2相試験の前期におけるPOCが確認された時点で、dose finding 試験と平行して、放射標識体(主には¹⁴C)を用いたヒトでのADME試験が実施される。今回はヒトADME試験を含めたヒトPK試験のデータについても見直しを行った。

薬物の代謝物経路

薬物の代謝物とその代謝経路の概略は、創薬研究の段階では、主にヒト肝ミクロソーム(HLM)、その中には薬物代謝にとって重要な酸化酵素 Cytochrome P450 (CYP) や抱合反応に使われる転移酵素が含まれているが、それを使った *in vitro* 試験により調べられる。しかし本格的には前臨床ADME試験段階で、放射標識体を用いて、*in vitro* 試験ではあるが、肝細胞なども使って多角的に調べられる。代謝物はこの段階で、見つけられた順番あるいは想定される代謝経路に従って、未変化体(元の化合物)に対しM-I、M-II、M-III…と命名される。しかし、実際にヒトに投与した際の代謝物の解析からは、代謝物の名称や代謝経路などは修正されることもある。今回はこれらのデータについても見直しを行った。

代謝反応の種類

一般に薬物の代謝は肝で起こり、代謝反応には第1相反応(酸化、還元、加水分解)と第2相反応(抱合体の形成)がある⁵⁾。

第1相反応については、そのほとんどが酸化反応によるもので、細胞のオルガネラの一つ

であるミクロソームに分布したCYPが使われる。このCYPには複数の分子種が存在し、分子種特異的な薬物間相互作用の原因になっている。しかし薬物の中には、一般の細胞のミトコンドリア外膜に発現している酸化酵素(Mono-amino-oxidase, MAO)により、代謝されるものもあるので、この代謝反応についても軽視することはできない。したがって今回のデータの見直しの対象とした。

一方、第2相反応は、一般に第1相反応で生成される代謝物に生体成分(グルクロン酸、硫酸、グルタチオンなど)が、結合する反応である。特にアシルグルクロナイド(薬物あるいは代謝物のCOOHにグルクロン酸がエステル結合したもの)とグルタチオン抱合の前駆体は反応性が高く、生体内の高分子(タンパク質)と結合し、体内に異常蓄積する危険性がある。したがって今回はこの点でもデータの見直しを行った。

反応性代謝物のタイプ

反応性代謝物(生体成分と結合するポテンシャルが高い物質)には、上述したように2種類のタイプが挙げられる。

その一つはアセトアミノフェンやロフェコキシブなどに見られるグルタチオン抱合体形成の前駆体(中間体)(図2Aおよび2B)で、キノンやイミン骨格が化学構造内に含まれるものに多い。アセトアミノフェン⁶⁾は肝内でグルタチオン抱合により解毒されるが、何らかの異常でグルタチオン抱合反応が進まなくなると、この反応性代謝物が細胞内のタンパク質と反応し(Hapten化、抗原の形成)、常態化すると劇症肝炎を引き起こす。2015年には厚生労働省からの通達で、アセトアミノフェンの一日当りの安全な使用量の目安(1,500 mg)が示され、それを超えて長期に使用する場合には定期的に肝機能検査をするべきとされている。

一方のロフェコキシブについては胃腸障害の少ない抗炎症薬(COX-II阻害剤)として、海外では幅広く使われてきたが、血管障害(反応

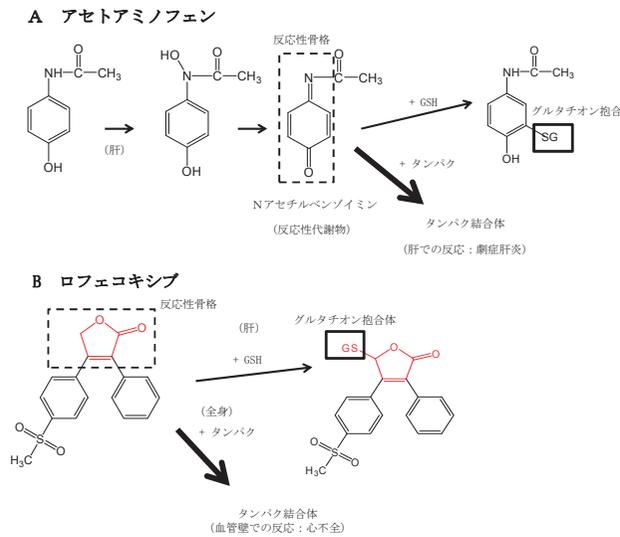


図 2 アセトアミノフェンおよびロフェコキシブに見られる反応性骨格 (グルタチオン抱合形成前駆体) の化学構造

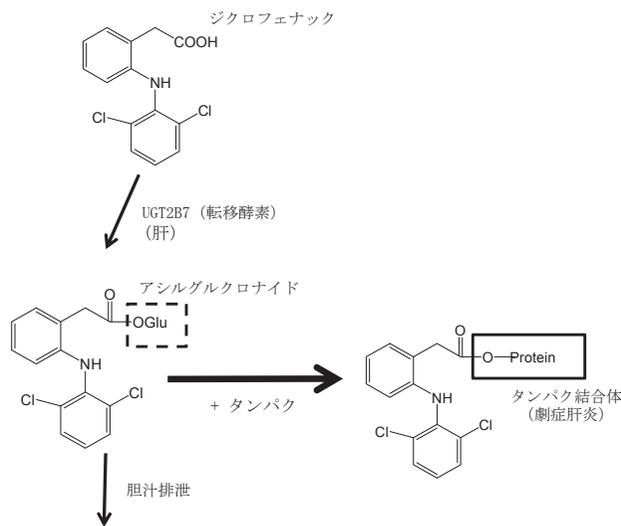


図 3 ジクロフェナックに見られる反応性代謝物 (アシルグルクロナイド)

性代謝物が血管のエラスチンに結合することに基づく心不全) を引き起こす危険があるとして 2004 年に販売が中止された⁷⁾。

反応性代謝物のもう一つのタイプとして、ジクロフェナック (非ステロイド性抗炎症薬、NSAID) などに見られるアシルグルクロナイドが挙げられる (図 3)。これは生体内のタンパク質とエステル交換により、薬物のタンパク結合体を形成し、Hapten となってアレルギー

反応を引き起こす危険性があり、これらについて高用量で長期間使用する際には注意が必要とされている⁸⁾。過去には多数の NSAID が劇症肝炎により販売が中止されている。

代謝物の安全性試験

代謝物は一般に安全なものと思われがちであるが、ロフェコキシブの販売中止などを契機に代謝物の安全性については見直されるようにな

表 1 本研究で取り上げた化合物の開発における背景

化合物	標的疾患	薬理効果	投与経路
化合物 A	アルツハイマー	β -セクレターゼ阻害	PO
化合物 B	CODP	PDE-4 阻害	PO
化合物 C	セブシス (敗血症)	TLR4 signal 伝達阻害	IV

ピオグリタゾン (製品名アクトス)	II 型糖尿病	PPAR γ 活性化	PO

アログリプチン (製品名ネシーナ)	II 型糖尿病	DPP4 阻害	PO

化合物	開発	備考	
化合物 A	Phase I で中止 (2002)、導出 (2012)	代謝物の異常蓄積	
化合物 B	前臨床で中止 (2002)	代謝物の異常蓄積	
化合物 C	Phase III で中止 (2009)	有効性と安全性の問題	

ピオグリタゾン (製品名アクトス)	発売 (1999)	類似薬 (トログリタゾン、販売中止、劇症肝炎) (2000) ぼうこう癌の増悪懸念	

アログリプチン (製品名ネシーナ)	日本発売 (2010) 米国 (2013)	類似薬ビルダグリプチン (米未承認; 血管障害の懸念) ネシーナ、米で追加の安全性に関する臨床試験を経て承認	

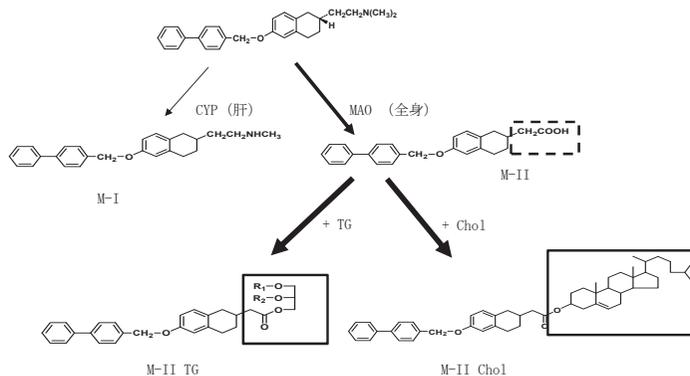


図 4 化合物 A の in vitro 試験により調べられた代謝経路

り、2008 年には米国 FDA より、代謝物の安全性試験に関するガイダンス (MIST、Metabolites in Safety Testing) が出され⁹⁾、いまでは新薬メーカーは創薬の早い段階で MIST に基づく安全性試験を実施するようになって^{10, 11)}。しかし今回検証の対象は、そのようなガイダンスが出る前の化合物となる。

今回取り上げた化合物の開発の経緯

今回取り上げた化合物 A、B、C、ピオグリタゾンおよびアログリプチンで、それらの治療領域およびその他の開発の経緯の概略を表 1 に示している。なお化合物 A については第 1 相試験 (単回投与) 試験後に、薬理効果について

は報告されている¹²⁾。また化合物 C については薬理作用、薬物動態特性データが報告されている¹³⁻¹⁶⁾。

結果および考察

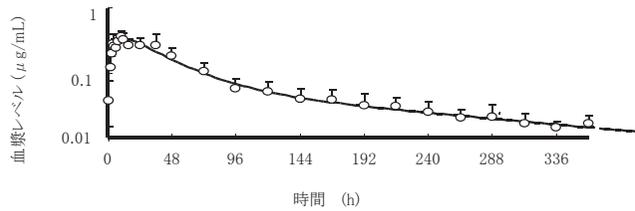
化合物 A の異常動態

第 1 相試験で得られた PK データ

化合物 A の代謝経路は、in vitro 代謝実験により、図 4 に示すように肝での CYP に依存した M-I への代謝 (脱アルキル化; NADPH 依存) と肝非特異的酵素 MAO に依存した M-II への代謝 (酸化的脱アミノ反応) の 2 経路が存在する。

本化合物の第 1 相単回漸増試験では、代謝

A 第1相試験における血漿中 M-II 濃度の時間推移



B 反復投与時の血漿中 M-II 濃度のシミュレーション

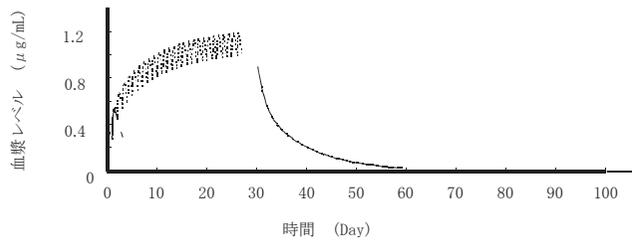


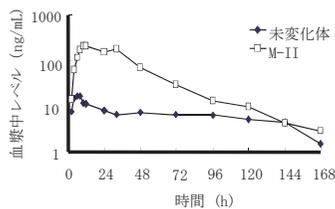
図5 化合物Aの第1相試験における血漿中濃度の時間推移（経口単回 25 mg 投与）と1日1回反復投与後の血漿中 M-II 濃度のシミュレーション

物 M-I の血漿中濃度は検出限界以下であったものの、代謝物 M-II の血漿中濃度は長時間に亘り（半減期、約 2 週間）、高濃度に続く現象が認められた（図 5A）。1日1回の反復試験を仮定した際の、血漿中 M-II 濃度のシミュレーションを行った結果、M-II の蓄積率が 4 を超える可能性が示された（図 5B）。動物を用いた安全性のデータからは、反復試験時の安全性の保障が得られないこと（M-II に関する追加の完全性試験が必要となること）が分かり、最終的には反復投与の試験（開発）は中止された。

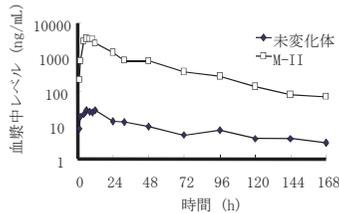
¹⁴C 標識体を用いた ADME 試験データ

ラット、サルおよびヒトに経口投与した後の未変化体および M-II の血漿中濃度を比較すると図 6A、6B および 6C になり、さらにそれぞれの種において未変化体の血中濃度の AUC に対する M-II の AUC の比をとると 8、74 および 1,100 倍の開きがあることが分かった。すなわちラットではそれほどの M-II の持続が見られないものの、サルおよびヒトへと高次動物になるほど半減期が増加していくことが示された。

A ラット (3 mg/kg)



B サル (3 mg/kg)



C ヒト (10 mg)

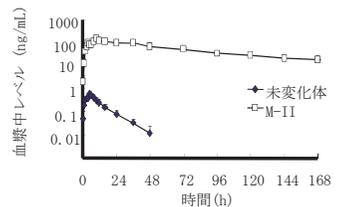


図6 化合物Aをラット、サルおよびヒトに経口投与した後の血漿未変化体および M-II 濃度の時間推移

代謝経路と M-II の血中持続のデータ

動物を用いた ADME 試験からは、M-II への代謝は、薬物が全身に分布した後、全身の組織で起こり、その大部分はその組織内のコレステロール (Chol) やトリグリセリド (TG) と反応し、M-II-Chol あるいは M-II-TG (脂質エステル) へと代謝され、これらの M-II 脂質エステルは脂肪組織 (褐色脂肪) に比較的高濃度に分布し、残留することが示された。

M-II-Chol あるいは M-II-TG は脂質と類似の特性を示し、脂肪組織に組み込まれて分布すると、体内に残留し、脂質の生体内での代謝回転 (約 1ヶ月) に見合った速度で、M-II が切り出されて、これが M-II が血中に長期に亘り持続する原理であることが推察された。

安全性試験 (非臨床) のデータ

非臨床毒性試験の結果を精査してみると、化合物 A の反復投与による毒性試験 (毒性が現れる高投与量 10mg/kg の長期投与) ではラットおよびサルに共通し、肝細胞壊死や胆道炎 (両者は M-II に起因) の他に、リンパ組織への泡沫細胞の浸潤 (M-II 脂質エステルに起因) が見られたが、一方代謝物 (M-II) の反復投与毒性試験 (ラットのみの試験: 化合物 A を投与して得られる M-II の暴露と同じ暴露となる投与量) では化合物 A の投与と同程度の肝細胞壊死や胆道炎が認められたが、リンパ組織への泡沫細胞の浸潤が見られなかった。すなわちこの結果からは M-II の脂質エステルは脂肪組織にはほとんど存在しないと推定された。

前臨床の段階では、サルの M-II の暴露量から推定されるヒトの無毒性量は 250 mg で、ヒトでの推定有効投与量 (25mg) はその 1/10 であると判断され、ヒトでの試験へと移行した。しかしすでに示したように実際の臨床試験の結果からはヒト M-II の暴露量はサルに比べ約 15 倍高く、安全性の担保が取れない結果であった。

MAO が関与するヒト PK の検証

本化合物の動物への投与 (ADME 試験) では、

in vitro 代謝実験から推定された M-I の生成は極めて低く、ヒトを含め、いずれの種においても M-I は、ほとんど検出されず、化合物 A はほぼ完全に MAO に依存して M-II へ、さらには M-II 脂質エステルへの代謝が主流であると判断された。

一般に MAO を介した代謝については、CYP を介した酸化代謝とは異なり、現在においても動物間での相関性は不明で、特に小動物 (ラット) からヒトへの外挿による手法では、PK を正確に予測することは困難であったと思われる。

M-II 脂質エステルの安全性についての検証

M-II の安全性に着目した毒性試験が追加実施されたが、それにより M-II 脂質エステルの安全性を保障する試験とはならない。このことは当時あまり議論にはならなかったが、これらの脂質エステルは化合物 A を投与して、抹消組織で生成するもので、M-II を単に投与してできるものではない。なぜならば M-II は有機酸で化合物 A に比べて組織移行性は低く、抹消組織での脂質エステルの形成は期待できないからである。またこれらの M-II 脂質エステルを経口投与あるいは静脈内投与することにより、安全性を調べることは可能であるが、投与後は肝臓に分布し、期待したような組織への分布が起こるかどうかは不明である。こう考えると M-II 脂質エステルの安全性の担保を調べることは大変難しいと想像される。

なお M-II 脂質エステルの安全性については、ホスホリビドーシス (細胞のエンドソーム内に脂質として大量に取り込まれて、やがては細胞の機能不全を引き起こす現象) のような有害所見が得られる可能性はある。しかし代謝物が脂質と反応する類似例フィンゴリモド (商品名ジレニア、多発性硬化症の治療薬 2010 発売) から推察し、それが重篤な副作用につながる可能性は低いと思われる。なぜならフィンゴリモドは、その末端のアミノ基が遊離脂肪酸と反応し (図 7)、エステルとして長期 (脂質の代謝回転に近い) に体内に留まる (半減期、数週間)

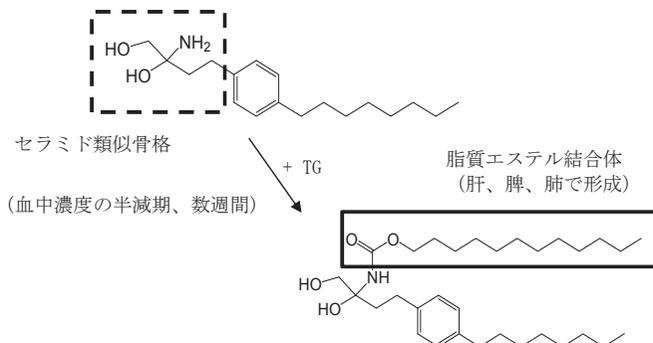


図7 フィンゴリモド (商品名ジレニア) で見られる脂質との結合反応

ことが知られているが¹⁶⁾、その代謝物が安全性上大きな問題にはなっていないからである。

MAO を介した脂質エステル反応の頻度についての検証

化合物 A の M-II は有機アニオン (COOH) であるため、通常代謝では、グルクロン酸とのアシル抱合の可能性が考えられる。しかし一般にアシルグルクロナイド (その安全性上の懸念は既述) は肝細胞内で生成され、通常、CYP による酸化代謝とリンクし、CYP と同一のミクロソーム上の UGT (グルクロン酸転移酵素) を介して起こるために、この化合物のように MAO を介して生成される M-II では起きないと推察される。

しかし当時開発中の薬物で長鎖構造の末端に COOH が付く構造の化合物が脂質とのエステル反応を引き起こす事例がいくつか見られ、決して稀な代謝ではないと思われる。しかしこれらについては複数の経路を経て代謝するために、それほど大きな問題にはならないとも思われる。

候補選定基準の見直しについて

一般にその化合物の代謝が単一の経路で代謝される場合には、その代謝を支配する酵素の個体変動や併用薬の酵素阻害効果を受けるので、そのような化合物を選定することは、安全性の面で好ましくない。むしろ複数の酵素を使って、複数の代謝経路を使って、比較的速く代謝される薬物の方が好ましい。またこの化合物のよう

に MAO 単独で *in vivo* 代謝が決まる化合物は、それが薬効本体に関係しないものであれば、選定時に篩い落とすことが得策と思われる。

薬物の選定においては CYP に着目した代謝実験に重点が置かれるが、その他の酵素 (MAO など) の関与も創薬の段階で早期に調べておく必要がある。

化合物 B の異常動態

In vitro 代謝実験データ

化合物 B の代謝については肝での CYP に依存した M-I (アミノ酸構造) への代謝 (脱アルキル酸化: NADPH 依存) とアシルグルクロナイドへの代謝の 2 経路により起こることが *in vitro* 代謝実験により示されていた (図 8)。しかしその後、¹⁴C 標識体を用いた動物での ADME 試験において、そのうちの一つの経路 (アシルグルクロナイドへの代謝) が主流で、この抱合体は体内でタンパクと容易にエステル交換により、高分子結合体となり、体内に総 ¹⁴C が高濃度に長期に亘り残留することが分かり、薬物の安全性の点で問題となり、前臨床 GLP 試験に移行する直前で、開発が中止された。

¹⁴C 標識体を用いた ADME 試験データ

¹⁴C で標識した化合物 B をラットおよびサルに 1mg/kg の投与量で経口投与した後の血漿中の総 ¹⁴C 濃度を調べてみると図 9A および 9B に示す結果となった。なお図 9B の時間軸の単

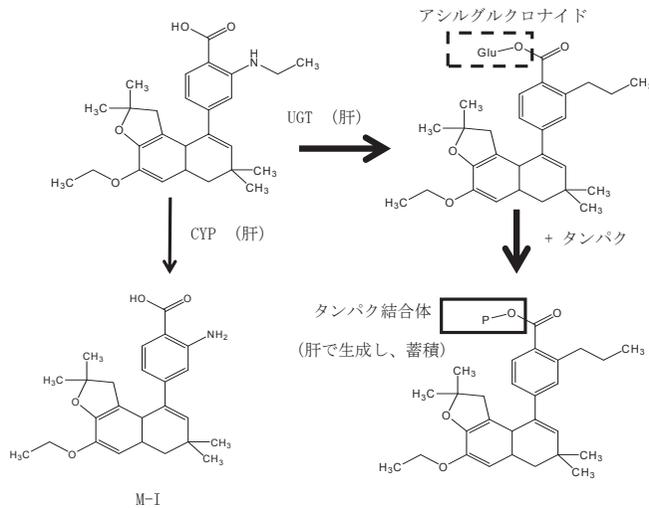
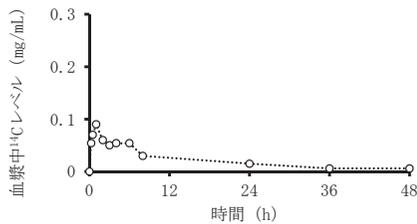


図8 化合物Bの *in vitro* 試験により調べられた代謝経路

A ラット



B サル

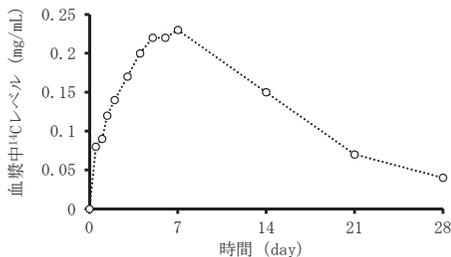


図9 化合物Bの¹⁴C標識体をラットおよびサルに経口投与した後の血漿総¹⁴C濃度の時間推移 (投与量、1 mg/kg)

位は day であることに注意する必要がある。サルに投与した際の総¹⁴Cのピークは約1週間後に出現し、その後の半減期も1週間以上の値を取ることが分かった。ラットではそれほどの持続性は見られていない。このようなことは稀で、当初は実験の手違いによる可能性が疑わ

れたが、繰り返しの実験により正しいことが確認された。上述の *in vitro* 代謝の実験データから、ラットでは見られないことから、サルに特有の現象ではあるものの、抱合体が生体内のタンパク (例えば血清アルブミン) と反応し、化合物Bのタンパク結合体が、血中に残存する可能性が疑われた。一方のラットにおいては、抱合体は生体内タンパクと結合することなく、胆汁中に排泄されると考えた。そこでラットに投与した際の胆汁中排泄成分にβグルコニダーゼ (抱合切断酵素) を作用させ、総¹⁴C中の成分を分析するとほぼ完全に元の化合物が得られることが分かり、すなわち総¹⁴C中の成分は、ほとんどがグルクロン酸抱合体であることが証明された。

血清アルブミンとの結合活性を示す *in vitro* 実験データ

アシルグルクロナイドは血漿中のタンパク質 (血清アルブミン) と非酵素特異的に反応すると考え、¹⁴Cで標識した化合物Bをラットに経口投与して胆汁中に排泄される放射能 (化合物Bのグルクロナイドに相当する) を回収し、各種動物の血漿あるいはヒト血清アルブミン (HSA) 溶液 (pH7.4) に加えて37°C加温下での血清アルブミンとの結合活性を調べた。すな

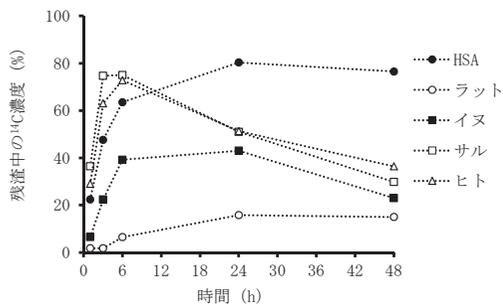


図 10 ^{14}C 標識化した化合物 B のグルクロン酸抱合体の血清アルブミンとの反応性 (in vitro 37°C 加温下)

わち、この試験では経時的に採取したサンプルにアルコールを加えて、遠心分離後の沈殿物（残渣、変性タンパク）中に含まれる放射能を測定することにより、薬物の血清アルブミンとの結合の割合を調べた（図 10）。ラット血漿中でのタンパク結合反応は非常に緩やかに起こるものの、サルやヒトの血漿中あるいは HSA 溶液中では短時間で結合が完結する特性が示された。なおイヌではラットとサルの中間の速さで結合が起こり、それには種差があることも示された。

NSAID で見られる現象（肝障害）との類似性についての検証

すでに述べたようにアシルグルクロナイドとタンパクの反応はほとんどの NSAID に共通して見られる現象でもあり、薬物によっては反復使用で重篤な副作用（肝障害）を引き起こし、市場から撤退を余儀なくされたものも多数ある。ジクロフェナック（NSAID）なども現在臨床使用されているが、制限用量を超えて反復使用すると重篤な肝障害を引き起こす危険が指摘されている。アシルグルクロナイドとタンパクの反応ではタンパクのチロシンあるいはリジン残基が抱合体とエステル交換して起こるもので、その際にグルクロン酸が橋渡しの役割を果たし、その反応には酵素は使われることはないといわれている⁸⁾。

肝障害の原因は、肝細胞内のタンパクに結合

した薬物が、ハプテン (hapten) として働き、反復使用により、やがては抗原抗体反応（アレルギー反応）を引き起こす。肝局所にかかる障害は肝細胞内で抱合体が形成された後に、何らかの異常（胆汁鬱滞など）により、胆汁中に排泄される前あるいは全身循環に分布する前に、細胞内のタンパク（例えば肝ミクロソーム上のタンパク）と反応し、細胞内に残留することによるものと推察されている。血漿中のタンパクとの結合はあくまでも副次的なものと推察される。

したがって化合物 B においても肝細胞内で起こるタンパクとの結合反応は無視できないと思われる。もう一度、サルの ^{14}C 血漿濃度推移（図 9B）を見てみると、単回投与でありながらピークが 1 週間後に出現するのは、全身循環中での反応（血清アルブミンとの反応）によるものではなく、肝臓で形成されたタンパク結合体が肝臓に貯留し、時間をかけて徐々に全身循環に移行したためと推察される。

開発中止の判断が適正であったかどうかの検証

化合物の中止は GLP 試験（安全性試験）を実施する前、ADME データのみをもってなされたが、社内で合意を得るためには、合理的な説明が求められた。中止とすべき根拠は、(i) 化合物 B からの抱合代謝がストレートに起こり、それ以外の分枝代謝は起きていないこと、したがってタンパクとの反応が即起こる危険性が高いこと、また (ii) タンパクとの反応は特に高等動物において非酵素特異的に短時間で起こること、(iii) 肝障害が起きてしまうと致命的な結果につながること（特異体質的反応、idiosyncratic reaction）⁸⁾、(iv) このような薬物とタンパクとの反応は NSAID でも見られるが、比較的安全的な NSAID においては分枝代謝が確保されていること⁸⁾、また今回の in vitro 実験で示したような速さは、他に例を見ない異常に速いものであることなどを挙げて、私がか社の経営幹部に説明したことを記憶しているが、いまでも正しい判断であったと思われる。

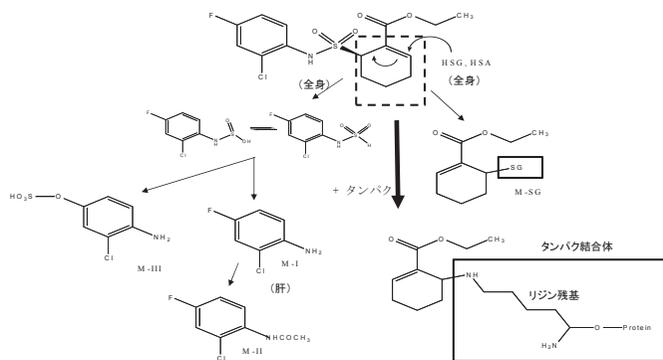


図 11 化合物 C の *in vitro* 試験により調べられた代謝経路

これをきっかけに、社内ではアシルグルクロナイドの生成が主流となる代謝を示す薬物についてはタンパクとの結合性を優先して調べることになり、その *in vitro* スクリーニングシステム (^{14}C 標識体を使った肝ミクロソーム結合実験：現在ではそれは MIST についての試験に相当する) の検討もなされて、この項目は候補選定時の必須の条件に付け加えられるようになった。

化合物 C の異常動態

In vitro 代謝実験データ

化合物 C は図 11 に示すように、フェニル環 (P) とシクロヘキサン環 (C) がスルファミドを介して結合した構造を有し、静脈内投与後に比較的速い速度でその結合が切れ (血液との接触による)、P を主骨格とした代謝物 (最初の段階の代謝物：M-I、M-III および M-IV；M-I

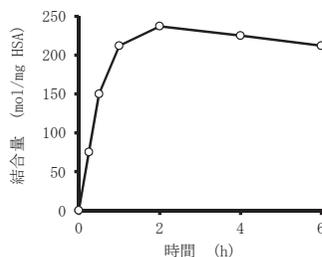
から生成される M-I-Glu および M-II]) と、C を主骨格とした代謝物 (M-SG あるいはタンパク結合体) が生成される。

このような化合物では、中央部から二つに切断され、いずれの部分においても薬物動態および安全性を調べる必要があり、ADME 試験では、P あるいは C を ^{14}C で標識した 2 種類の標識体を用いて、一対の投与実験が実施された。

$\text{C-}^{14}\text{C}$ 標識体を HSA 溶液に添加したときの反応性 (*in vitro* 実験) のデータ

$\text{C-}^{14}\text{C}$ 標識体 (10 μM) を HSA 溶液 (30mg/mL) に加え 37°C でインキュベーションした後の HSA との共有結合体の生成を調べたところ 2 時間までにスルファミド結合が切れ、その結果、C に由来する成分は HSA と結合体を形成し (図 12A)、一方 P に由来する成分からは

A タンパク結合体の生成速度



B M-I の生成速度

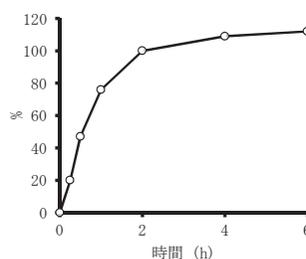


図 12 化合物 C の $\text{C-}^{14}\text{C}$ 標識体 (10 μM) をヒト血清アルブミン (pH7.4、30 mg/mL) に加えた際の反応性 (*in vitro* 37°C加温下)

100%の形でM-Iが生成され(血液では他の代謝物も生成される)、その生成は2時間ではほぼ完結することが示された(図12B)。

C-¹⁴C および P-¹⁴C 標識体を用いた ADME 試験データ

まず前臨床においてラットおよびイヌで、また第2相試験の前期においてヒトで、化合物CのC-¹⁴C および P-¹⁴C 標識体が投与(静注)され、投与後の血漿中の総¹⁴Cが調べられた。図13には、それらの時間推移示されているが、P-¹⁴C 標識体投与においては総放射能の消失はラットで速いもののイヌでは遅く、ヒトではその中間に位置つけられた。一方、C-¹⁴C 標識体の投与においては消失の速さはヒトでも最も遅く長時間持続し、イヌとヒトで逆転する結果であった。

さらにラットおよびイヌにおいてはC-¹⁴C および P-¹⁴C 標識体投与後の血漿中の放射能の組成分析を行ったが、その結果は図14に示され

ている。まずP-¹⁴C 標識体投与について、ラットにおいては投与直後(10分)で総放射能に占めるM-I-Gluの割合が高く、M-Iの主な消失経路はグルクロン酸抱合によることが示されたが、イヌにおいてはM-IIIの占める割合が高く、その比率は時間経過とともに増加し、24時間後では、総放射能のほとんどを占める結果を示した。追加で実施した実験では(イヌにおいてM-IIIを直接静脈内投与)、M-IIIは初期においても高い血漿中濃度推移を示し、M-IIIが後に高まる効果は得られていない。これらの結果からは、この化合物は血漿との反応で、PとCに分かれて、M-Iが生成される経路と、赤血球との反応で、いくぶん違った形でPとCに分かれ(図11)、P部分は赤血球と結合した状態で止まり(デポジット)、そこからM-IIIが切り離され、徐々に血漿中に放出される経路があることが推察された(ただし不明な部分も残っている)。

一方C-¹⁴C 標識体の投与後の組成分析について

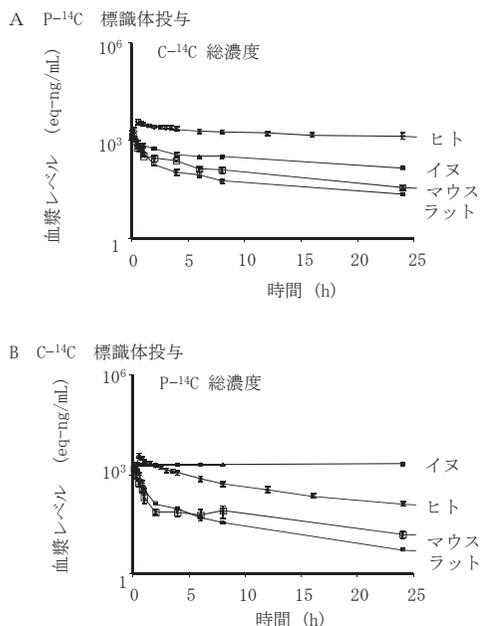


図13 各種動物およびヒトへの化合物CのP-¹⁴CあるいはC-¹⁴C標識体投与後の血漿中総¹⁴C濃度の時間推移(実験動物3mg/kg;ヒト1.2mg/kg)

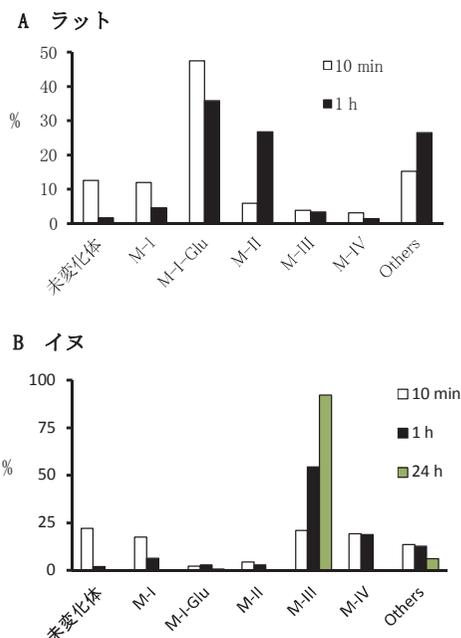


図14 ラットおよびイヌへの化合物CのP-¹⁴C標識体投与後の血漿中代謝物の組成比率の時間推移

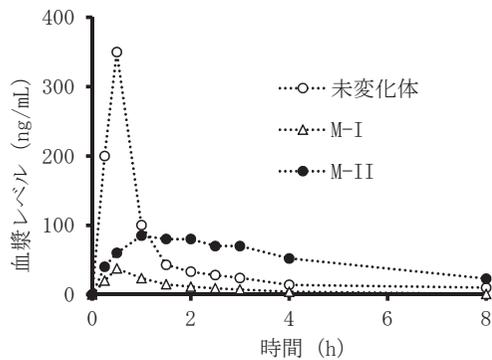


図 15 ヒトにおける化合物 C の P-¹⁴C および C-¹⁴C 標識体投与後の血中に総 ¹⁴C の赤血球に分布する割合の時間推移

ては、24 時間後の血漿サンプル中のタンパクと共有結合した放射能の割合を調べているが、ラットおよびイヌでそれぞれ 29 % および 79 % と、特にイヌで高い数値を示した。

さらにヒトについては P-¹⁴C および C-¹⁴C 標識体投与後の放射能の赤血球への分布が調べられ (図 15)、P-¹⁴C 標識体投与の結果に着目すると、赤血球への分布割合が時間とともに増加し、数日後に最高に達した。M-III の血漿と赤血球間での分配平衡は比較的速く起こり、また高濃度に赤血球に分配すると考えると、ヒトにおいては (たぶんイヌにおいても) M-I 由来の代謝物が比較的速い段階で消失する一方、その後は M-III が血中の総放射能の大部分を占め、赤血球に分布した形で長時間血中に滞留することが推察された。

第 1 相試験における PK データ

上記の前臨床 ADME 試験の結果を踏まえた、第 1 相試験 (静脈内への点滴投与) では、C に由来する成分については、測定不能と考え、とりあえずは未変化体と P に由来する主要な代謝物 (M-I および M-III) が測定された (図 16)。in vitro 実験の結果からは M-I の生成は血中のアルブミンとの接触で起きて (肝代謝にはよらない)、さらに M-I から他の代謝物への代謝は肝での第 1 相あるいは第 2 相反応によることが推察された。M-I 以外の代謝物として

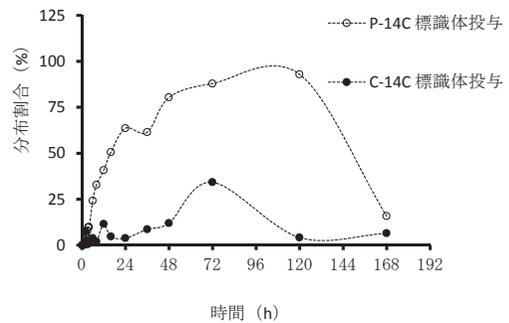


図 16 化合物 C の第 1 相試験における血漿中未変化体および M-III 濃度推移 (単回定速 30min 静注 0.2 mg/kg)

は M-III が高濃度で検出されることが確認された。

P および C に由来した代謝物の安全性についての検証

化合物 A や B においては、代謝物の生体成分 (タンパクや脂質) との結合が、薬物の安全性としての懸念材料として、開発を中止した経緯があるが、本化合物の C 由来の代謝物についても、安全性の懸念の点では全く同じはずであったが、当時は特に問題とされることなく、臨床開発へと進められた経緯がある (私は途中で本プロジェクトを引き継いだので経緯については多くは知らない)。

一方 P 由来の代謝物についても、アニリンを基本骨格 (反応性骨格) としており、現在の MIST の基準からは篩い落とされてしかるべきものであったと思われる。上述のデータからは特に M-III は赤血球との反応性が高いことが示されたが、この基本骨格は p- 硫酸ニトロベンゼン (刺激性物質と知られる) に酷似しており、M-III の赤血球への有害作用が懸念されるが、詳細なデータは取得されていない。

開発方針に関する検証

この化合物については Unmet ニーズが高い治療薬とし FDA からは Fast track の認定を受け、臨床試験による POC を最優先して開発が進められた。すなわち、本化合物の効果

(TLR4 シグナル伝達阻害) は、薬物が P と C に開裂し、どちらかが TLR4 シグナル伝達に関連するキナーゼ (標的タンパクは不明) に結合して、発現すると推察されるが¹²⁾、その詳細については不明なまま、試験は第 3 相まで進められた。

投与量が少ない点とセブシス (敗血症) の治療は短期間で終わることを考えると、反応性代謝物の生成による有害事象の可能性は低いかもしれない。しかし POC が取れた段階で、薬物の分子レベルでの作用機構を明確にし、薬物動態特性 (タンパクとの共有結合体の運命) を見据えて、化合物の最適化を行うべきではなかったかと思われる。どのパーツが薬効の本体であるかが分かっていたら、より単純な化合物に切り替え臨床試験を行っていたら、新薬の承認にこぎつけられていたのではないかと思われる。

本化合物のように P と C の二つに分かれる構造の化合物は、ほとんどの試験項目 (安全性、薬物動態、品質) において 2 倍の作業が必要で、それに要するコストは 2 倍となる。二つに分かれるタイプの薬物は稀に見られるが (例サラゾスルファピリジン、プロドラッグ)、化合物の切断より生成される 5-アミノサリチル酸が薬効の本体であり、残りの部分は薬効上意味を持たない無駄な部分である。現在では薬効の本体部分 (5-アミノサリチル酸) のみを配合した局所放出製剤 (アサコール等) がそれに取って代わって使われるようになっていく。

投与剤の検討に要したコストについての検証

この化合物のもう一つの問題点は、投与経路が静脈内投与で、いかに化合物を注射剤化するかということであった。薬物の疎水性からすると単純な水系溶媒では溶解しないこと、また仮に溶解しても加水分解の問題が指摘された。それを解決する方法として、2 つの特殊製剤が提案された。すなわち (i) 化合物の β -シクロデキストリンによる包接化製剤 (水溶性と安定性の増加) と (ii) エマルジョン製剤 (輸液に用いられる脂肪乳剤における油相に化合物を溶

解させる) で、当時 β -シクロデキストリンを注射剤に用いた際の安全性については不明であったために、後者を選択した。臨床試験用の製剤であるので、大量生産は不要であったが、微粒子製剤であるために製造過程での不純物や発熱性物質の混入などがない GMP に準拠したコストのかかる製剤化検討が必要であった。輸液製剤においては当初、若干の DDS 効果を期待したところがあったが (実際にはそのような効果は期待できない)、今にしてみれば、 β -シクロデキストリン溶液製剤 (安全性は他社で確認済) がより好ましい選択ではなかったかと思われる。

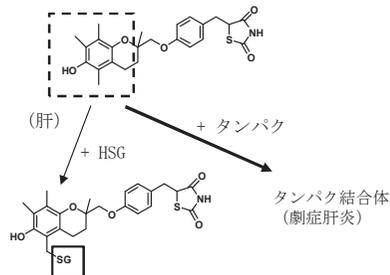
ピオグリタゾンとアログリプチンの長期使用時の安全性

ピオグリタゾンとトログリタゾンの化学構造上の比較

表 1 に示すように、ピオグリタゾンは II 型糖尿病の治療薬として、その類似薬であるトログリタゾンが劇症肝炎により市場から撤退しこともあり²⁾、10 年もの長き亘りこの市場を独占してきたが (2010 年に特許切)、その代謝物の安全性については、必ずしも明快になっているわけではない。

トログリタゾンについてはその後、劇症肝炎が起こるメカニズムが詳細に調べられ²⁾、図 17 に示されるように、化学構造の中に含まれるキノン骨格 (反応性の高い骨格、図では破線で囲った部分) がグルタチオン抱合活性を有し、反復して投与している間に、何らかの引き金により、肝臓中のタンパクとの結合が蓄積され、それが劇症肝炎へと移行したと推定されている。ではピオグリタゾンではどうか、トログリタゾンの化学構造に含まれるキノン骨格はないものの、トログリタゾンと共通の骨格としてチアゾリジン (化学構造式の右手の破線で囲った部分、反応性あり) が含まれ、グルタチオン抱合活性が高いと推察される。

A トログリタゾン



B ピオグリタゾン

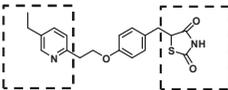
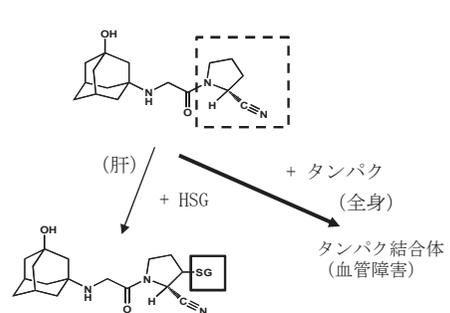


図 17 トログリタゾンとピオグリタゾンの反応性を生じさせる化学構造の違い

アログリプチンとビルダグリプチンの化学構造上の比較

アログリプチンについても、表 1 に示されるように、ポスト-ピオグリタゾンとして、本邦では 2010 年に発売されたものの、米国においては、FDA からはバイオックス（前述）に見られたような血管障害の危険性がないかどうか⁷⁾、心臓病の患者に投与した際の安全性に関する確かなデータが必要であるとして、承認審査後に追加の臨床試験が要求され（2009 年）、追加の安全性のデータ（心臓病患者 2,000 人を集めた 3 年間試験のデータ）を取得して、米国での発売にこぎつけた経緯がある。ビルダグリプチン（ノバルティス社）はアログリプチンとほぼ同時に米国での承認審査において、同様の追加の試験を要請されたが、コストがかかる

A ビルダグリプチン



B アログリプチン

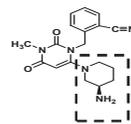


図 18 ビルダグリプチンとネシーナの反応性を生じさせる化学構造の違い

として、米国での開発を断念している。

その後ビルダグリプチンについてはその化学構造の中にグルタチオン抱合活性を示す骨格（破線で囲った部分）が含まれることが発表されているが（図 18）、場合によれば、その特性が血管障害を生む可能性があったかも知れない。一方、アログリプチンについては、ビルダグリプチンにおける反応性骨格に対応するところは、どの程度の反応性が見られるのかは不明である（MIST に関する報告は見当たらない）。

ピオグリタゾンの安全性についての現状

表 2 にはタンパク質と共有結合が起きやすい

表 2 タンパク質との共有結合が起きやすい代表的医薬品（200 化合物からのピックアップ）（文献 11）

医薬品	1 日当りの用量	GSH 抱合活性	タンパク結合活性
アセトアミノフェン	> 200 mg	高	113
ジクロフェナック	100 mg、< 200 mg	中	45
フルタミド	> 200 mg	中	328
イミプラミン	100 mg、< 200 mg	中	203
ネファゾドン	> 200 mg	無	1364
トログリタゾン	> 200 mg (400 mg)	中	1170 中止
ピオグリタゾン	10 mg、< 100 mg (45 mg)	中	295

い代表的医薬品の *in vitro* でのグルタチオン抱合活性とタンパク結合活性を示しているが¹¹⁾、今ではピオグリタゾンとトログリタゾンのタンパク結合活性は MIST 研究における比較標準として使われている。両薬物はいずれも高いタンパク結合活性を示すが、両者間で比較すると、確かにトログリタゾンの方が、タンパク結合活性が4倍ほど高い。また1日当りの用量はピオグリタゾン（最大45 mg）はトログリタゾン（当時人身事故を起こした用量、400 mg）の約10分の1であるので、ピオグリタゾンの劇症肝炎の誘発の危険性は極めて低いと推察される。

しかしピオグリタゾンについては、小動物に長期間投与した際の膀胱癌の発生がある頻度で認められていた事実があり、また現在においては、それがヒトにおいても類似した頻度で起こってきていることが長期試験の結果分かっていた。米国においては、数年前より、医薬品提供者が膀胱癌の恐れのある患者への使用を防ぐことを怠ったとした訴訟が各州で起こるようになり、2015年において、武田薬品ではそれらの訴えを認め、和解金（総額約3,000億円）の支払いに応じている。しかし膀胱癌の誘発が何に起因しているかについてはほとんど調べられていないのが現状である（訴訟においては、物理的あるいはpHの影響とするメカニズムの説明では不十分とする見解が出されている¹⁸⁾）ピオグリタゾンについては女性に投与した際に、心浮腫が見られるケースがあることも分かっている（動物実験においても早くから知られていた）が、それが特に有害事象につながることはないとしても、心浮腫が起きるメカニズムについては不明である。

承認後の医薬品の課題

その医薬品がFDAや厚生労働省により承認されると、比較的速く、製造販売が実施され、新薬として大々的に宣伝をして販売網を広げていくことは、製薬メカにとっては当然と思われる。しかし、その新薬が承認された際に、不

特定多数の患者に長期使用時の有害作用については全く起こらないものとして承認されたわけではない。市販後も安全性に関するデータは、そのときの最高の科学水準で調査し、メカ側（ジェネリック製造販売業者も含め）の責任として、更新していくことが最も重要であるが、必ずしもそれが理想通りに行われているわけではないのが現状と思われる。

総括

筆者が武田薬品において新薬開発における薬物動態試験の総括責任者として勤務した当時を振り返り、代謝物の異常蓄積が懸念されて、開発が中止された代表的な化合物（化合物A、BおよびC）に着目し、当時の薬物動態に関わる非臨床および臨床データを、現在の科学の水準で見直しを行い、それらが開発中止に至った真の問題は何であったかについて検証を行った。またさらに現在、II型糖尿病の治療薬として使われているピオグリタゾンとアログリブヒンについても、反応性代謝物による異常動態の可能性の有無について検証を行った。その結果、まず反応性代謝物の試験に関するガイダンス（MIST）に記載された基準によれば、取り上げた3化合物は、いずれも創薬研究の段階で篩い落とされていた可能性が高い。ピオグリタゾンとアログリブヒンの長期使用時の安全性については、必ずしも十分はデータが出されているわけではないことが分かった。特に新薬開発を効率よく進めるためには、下記に示す項目も重要となることも示された。

- (1) 投与量と治療期間を意識した化合物の設計
- (2) 治療におけるリスクとベネフィットの明確化
- (3) 薬効の本体と反応性代謝物の分離
- (4) 臨床試験を通じての化合物の最適化（創薬研究へのフィードバック）
- (5) 反応性代謝物が反応する臓器（臓器特異性と薬物動態との関係）
- (6) 病態時の反応性代謝物の反応の仕方の

相違 (頻度)

- (7) 反応性代謝物と癌源との関係
- (8) 副作用に照準を当てた臨床試験 (市販後も含む) (FDAが現在進めている)

引用文献

- 1) 伊賀勝美 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 透過試験データおよび前臨床試験データとの照合 同志社女子大学学術研究年報 66 : 89-104 (2015).
- 2) He K, Talaat RE, Pool WF, Reily MD, Reed JE, Bridges AJ, Woolf TF. Metabolic activation of troglitazone: identification of a reactive metabolite and mechanisms involved. *Drug Metab Dispos.* 32:639-646 (2004).
- 3) Kurita N, Ito T, Shimizu S, Hirata T, Uchihara H. Idiosyncratic liver injury induced by vildagliptin with successful switch to linagliptin in a hemodialyzed diabetic patient. *Diabetes Care.* 37:e198-199 (2014).
- 4) 伊賀勝美 探索・非臨床・臨床別薬物動態試験実践資料集 第2部 非臨床薬物動態試験 第6章 非臨床薬物動態試験から臨床薬物動態試験移行への留意点 情報機構 371-385 (2009).
- 5) 金尾義春、森本一洋編集 NEW パワーブック 生物薬剤学 (第3版) 廣川書店 (2016).
- 6) McGarry DJ, Chakravarty P, Wolf CR, Henderson CJ. Altered protein S-glutathionylation identifies a potential mechanism of resistance to acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 355: 137-144 (2015).
- 7) Oitate M, Hirota T, Murai T, Miura S, Ikeda T. Covalent binding of rofecoxib, but not other cyclooxygenase-2 inhibitors, to allysine aldehyde in elastin of human aorta. *Drug Metab Dispos.* 35:1846-1852 (2007).
- 8) Aithal GP, Day CP. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 11::563-575 (2007).
- 9) Senior JR. Evolution of the Food and Drug Administration approach to liver safety assessment for new drugs: current status and challenges. *Drug Saf.* 37: Suppl 1:S9-17 (2014).
- 10) Dahal UP, Obach RS, Gilbert AM. Benchmarking in vitro covalent binding burden as a tool to assess potential toxicity caused by nonspecific covalent binding of covalent drugs. *Chem Res Toxicol.* 26:1739-1745 (2013).
- 11) Sakatis MZ, Reese MJ, Harrell AW, Taylor MA, Baines IA, Chen L, Bloomer JC, Yang EY, Ellens HM, Ambroso JL, Lovatt CA, Ayrton AD, and Clarke SE. Preclinical Strategy to Reduce Clinical Hepatotoxicity Using in Vitro Bioactivation Data for >200 Compounds. *Chem Res Toxicol.* 25:2067-2082 (2012).
- 12) Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, Tomita T, Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M. A noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates Abeta pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 30:11157-11166 (2010).
- 13) Sha T, Sunamoto M, Kitazaki T, Sato J, Ii M, Iizawa Y. Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur J Pharmacol.* 571:231-239 (2007).
- 14) Jinno F1, Yoneyama T, Morohashi A, Kondo T, Asahi S. Chemical reactivity of ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl] cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242) in vitro. *Biopharm Drug Dispos.* 32:408-425 (2011).
- 15) Jinno F, Kakehi M, Takeuchi T, Tagawa Y, Kondo T, Asahi S. Investigation of the unique metabolic fate of ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl] cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242) in rats and dogs using two types of 14C-labeled compounds having different labeled positions.

- Arzneimittelforschung. 61:458-471 (2011).
- 16) Jinno F, Takeuchi T, Tagawa Y, Kondo T, Itoh T, Asahi S. Differences in the pharmacokinetics of 4-amino-3-chlorophenyl hydrogen sulfate, a metabolite of resatorvid, in rats and dogs. Drug Metab Dispos. 40:648-654 (2012).
 - 17) Zollinger M, Gschwind HP, Jin Y, Sayer C, Zécri F, Hartmann S. Absorption and disposition of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in healthy volunteers: a case of xenobiotic biotransformation following endogenous metabolic pathways. Drug Metab Dispos. 39:199-207 (2011).
 - 18) Faillie JL, Hillaire-Buys D. Examples of how the pharmaceutical industries distort the evidence of drug safety: the case of pioglitazone and the bladder cancer issue. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 25:212-214 (2016).