

論 文

新薬候補化合物の開発段階で見られた異常な薬物動態特性
についての検証：その2

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 unusual pharmacokinetics of
new chemical entities observed in clinical development
stages: II

Katsumi Iga

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

Retrospective analysis of the unusual pharmacokinetic (PK) behaviors of four new chemical compounds of Takeda Chem. Ind. [compounds A, B, C, and ramelteon (RAM)] observed in the clinical development stages revealed interesting findings, which are summarized as follows:

1) *High affinity of compound A to RBCs.* The phase I study performed in those days, showed that compound A exhibits an unusually high value of blood-plasma ratio (R_b , ~15) and non-linear PK characteristics were observed for the drug due to saturation in the distribution to RBCs. Ultimately, this compound was not advanced to the next phase. The author still approves of the decision, considering retinopathy induced by chloroquine. Both the drugs have the structure of a cationic amphiphilic drug (CAD). In general, a CAD tends to accumulate in the lysosomes in cells and induces cell lysis, and this characteristic is related to its high affinity to the RBCs. ADME studies performed by administering the radiolabeled compound to rats showed that the compound distributes to the orbits of the eyes at high concentrations for a long time period. Thus, it seemed reasonable to correlate the high affinity to RBCs to the cellular toxicity.

2) *Variability in PK of compound B.* The phase I study performed in those days showed that both the plasma levels of the unchanged drug and one of the metabolites (M-I) of the compound changed largely in response to the polymorphisms of one of the UDP-glucuronosyl transferases (UGT2B25). Because M-I was produced by CYP2C8-mediated oxidation of compound B, the variability in plasma M-I level appeared to be indifferent to the UGT polymorphisms. However, extensive PK analysis suggested that glucuronidation of the compound through UGT2B25 is associated with CYP2C8 function and is essential for the oxidation of

the compound to M-I. Unfortunately, this interplay between UGT and CYP2C8 in M-I formation has never been studied since the termination of the study. Nevertheless, in 2015 it was reported that one of the active metabolites of loratadine (a 2nd generation antihistamine) is produced by the same mechanism as for M-I formation. This report convinced us that the UGT-CYP2C8 interplay was responsible for the PK variability of compound B.

3) *Difference in PK of compound C between rat and human and its relevance for pharmacological activity.* The phase I study performed in those days showed that the C_{max} and AUC of compound C after oral administration to humans were almost 20 and 50 times, respectively, more than those observed in rats, and the AUC was almost 10 times of that observed for TAK-475 (the preceding compound of the same class) and atorvastatin (marketed HMG-CoA reductase inhibitor) in humans. The clinical pharmacological activity, examined parallel to the PK study, was not as high as expected. In those days, the major cause of this insufficient activity was explained by the stronger plasma protein-binding of the compound in humans than expected, thereby decreasing the unbound active drug level in the liver as the target organ. Indeed, it was confirmed in the present study that species differences in the CL_{oral} and V_{dss} of the compound can be successfully explained by the species difference in the blood unbound fraction ($f_{u,b}$). However, theoretically, such a change in the $f_{u,b}$ must have little impact on the unbound drug level in the hepatic cells, relevant for the pharmacological activity of this compound, and it was suggested that the insufficient clinical pharmacological activity of the compound would owe largely to its intrinsic pharmacological activity.

4) *Changes in plasma metabolite levels as observed in drug-drug interaction (DDI) between RAM and fluvoxamine (FLV).* Usually, the analysis of DDI focuses on increases in the plasma unchanged drug levels. However, the present study analyzed the RAM-FLV DDI, focusing on the increases/decreases in the plasma levels of the multiple metabolites of RAM. The method assumed that the change in metabolite formation in response to DDI approximately equals to the change in the $AUC/t_{1/2}$ of the metabolite. This approach would be helpful for the graphical analysis of the changes in the blood drug/metabolite levels due to DDI, and ultimately could allow more accurate and reliable prediction of DDI, when combined with the approach focusing on the increases in the unchanged drug levels.

These findings on the PK characteristics seem be applicable to commonly used drugs. They would be useful for researchers developing new medicines.

はじめに

創薬研究により見出された開発候補化合物は、基礎研究のデータを基にして、短期間(約1年)ではあるが、動物を用いた安全性試験 (GLP試験) と放射標識体 (RI) を用いた薬物動態 (PK) 試験 [吸収・分布・代謝・排泄 (ADME)] にかけて、ひとまずはヒトに投与した際の安全が担保されているとして、臨床試験へと進められる (図1)¹⁾。

臨床試験では、最初に健常人を対象とした忍容性試験 (第1相試験、約1年) が実施され、その際に平行して PK 試験も実施される。PK 試験では、未変化体とそれまでに判明している代謝物の血中濃度推移や尿中排泄量が調べられ、さらに採取した血液を用いて、未知な代謝物の有無や PK 変動をもたらす諸要因が調べられる。これらの試験の結果、問題がなければ次の相 [第II相試験 (前期)、患者への投与] へと進められ、その化合物の動物実験により実証済み

創薬	前臨床 (1Y)		臨床 (5Y)				承認 申請
			第 I 相試験 (1Y)	第 II 相試験 (1Y)		第 III 相試験 (3Y)	
				前期	後期		
候補の選択		GLP 試験	忍容試験	POC	用量設定	拡大臨床	
	準備 (RI) 準備 (標品)	動物での ADME 試験 代謝物を含む分析法 の確立	PK 試験 (単回、反復) 代謝物検索 PK 解析 遺伝子多型、MIST	PK PPK PK/PD	DDI 試験 BA 試験 ヒト ADME 試験		
Back-up 態勢			化合物 2 (1 の back-up)	化合物 1 →			

図 1 新薬開発における各段階での薬物動態試験の内容

の治療コンセプトの確認 (Proof of Concept : POC) や、治療における最適投与量を調べるための後期試験が実施され、問題がなければ第 III 相試験 (拡大臨床試験) へと進められる。

第 II 相における PK 試験では、主に患者の PK 特性が調べられるが、候補化合物の開発の見通しが得られた段階では、健常人を用いたバイオアベイラビリティ (BA : 静脈内投与を比較対照とした絶対的 BA) 試験や RI を用いた ADME 試験が追加的に実施される。

ところで開発候補化合物 (化合物 1) が、今までにない画期的な治療システムの創生に繋がる場合には、何らかの不具合で開発が中止されても、同じコンセプトで新薬開発を遅滞なく進められるようにと、別の化合物 (化合物 2 : back-up 化合物) を立てて、幾分時期を遅らせて進めることもある。

さて筆者は、武田薬品に勤務した終盤の約 5 年間 (2000~2005) に、研究本部が創生した新薬候補化合物の前臨床における ADME 試験と臨床研究における PK 試験 (バイオアナリシスと PK 解析) の総括責任者で、研究本部と開発本部との間の情報の橋渡し役として、勤務したことがある。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 [商品名、ロゼレム ; 化合物名、ラメルテオン (RAM) ; 睡眠誘導薬] のみで、その他は安全性や有効性 (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の成績については、その後に得られた情報と照らし合わせて、十分に検証されているわけではない。

筆者は本学に赴任後 (2005~)、そのような開発候補化合物の開発中止に至った理由について、PK 特性の異常の有無の観点から、検証することを、主たるテーマに掲げて研究を行ってきたが、2015 年には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し報告した²⁾。また 2016 年には、開発化合物の中には、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ものも複数あり、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も検証し報告した³⁾。しかし当時の開発化合物の中には、今なお解明されていない異常な PK 特性を示す化合物が多く残されていて、今回は、今後の医薬品開発において大いに参考になるであろうと思われる 4 化合物を選び、PK 特性の検証を行なったので報告する。

材料と方法

本研究では表 1 に示されるような 4 つの化合物 [化合物 A⁴⁾、化合物 B⁵⁾、化合物 C⁶⁾ およびラメルテオン (RAM)] を取り上げた。

表1 本研究で取り上げた化合物の開発の経緯と薬物動態特性の異常

薬物	標的疾患	開発コードと関連化合物	薬理効果
化合物 A	排尿障害	TAK-802 ⁴⁾	α_1 および AchE 阻害
化合物 B	II 型糖尿病	TAK-654 [TAK-559 (2005 中止) ⁵⁾ の back up]	PPAR γ 活性化
化合物 C	高脂血症	TAK-194 [TAK-475 (2007 中止) ⁶⁾ の back up]	スクワレン合成酵素阻害
ラメルテオン (RAM)	睡眠障害	TAK-375	メラトニン作動

薬物	開発状況	今回着目した PK 特性の異常
化合物 A	中止 (P-I) (2002)	薬物の血球分配における非線形 ⁷⁾
化合物 B	中止 (P-I) (2004)	UGT2B15 の遺伝子多型 ⁸⁾ による PK 変動
化合物 C	中止 (P-I) (2003)	血漿タンパク結合性の違いによる PK および薬効上の種差 肝取り込みにおける OATP1B3 の関与 ⁹⁾
RAM	発売 (2005)	フルボキサミン (FLV) との併用で生じた相互作用 ¹⁰⁻¹⁵⁾ 代謝物を含めた血中濃度変動

化合物 A について

本化合物 (TAK-802) は α_1 および AchE 阻害に基づく排尿障害の治療薬を目指したもので⁴⁾、元々は、AchE 阻害に基づく抗認知症薬から派生して生まれた化合物であり、AchE 阻害による膀胱の収縮力の増強と α_1 を阻害することにより膀胱入り口での緊張を和らげる効果 (タムスロシンなどの治療コンセプト) を併せ持つ治療薬を目指して開発が進められたものである。第 I 相試験で実施した PK 試験において、薬物の血球への異常分配が問題となり⁷⁾、開発が中止された。そこで本報告においてはそのデータについての検証を行なった。

化合物 B について

本化合物 (TAK-654: 先行する化合物の back-up⁵⁾) は PPAR γ の活性化に基づくインスリン抵抗性の改善による II 型糖尿病治療薬として、すでに臨床使用されているアクトスの後継品 (アクトスにおけるチアゾリジオン基を回避した化合物) を目指して開発が進められたものである。しかし第 I 相試験で実施した PK 試験において、未変化体ならびに代謝物 M-I の血漿中濃度が被験者間で大きく変動し、back-up としての価値を見出すことができず、開発は中止された。M-I の生成には酸化酵素で

ある CYP2C8 が関与するが、それ以外にもグルクロン酸転移酵素 (UGT) が関係し、UGT の遺伝子多型 (UGT2B15) が⁸⁾、この薬物の動態変動に関わっていることが指摘されていたので、本報告においてはそのデータについて検証を行なった。

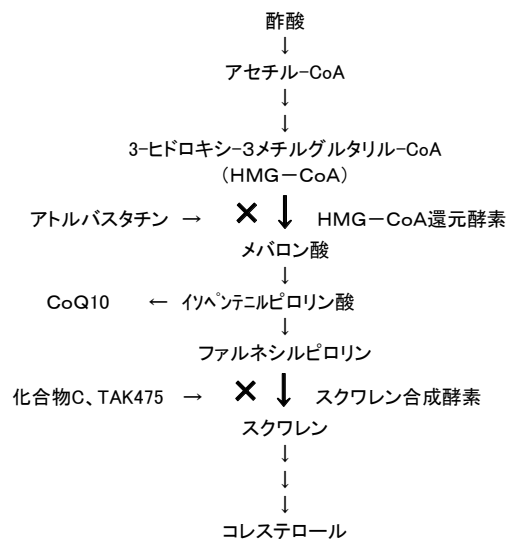


図2 コレステロールの生合成阻害における HMG-CoA 還元酵素薬とスクワレン合成酵素阻害薬の違い

化合物 C について

本化合物 (TAK-194: 先行する化合物 (TAK-475) の back-up⁶⁾) はスクワレン合成酵素阻害に基づく肝でのコレステロール (chol) 合成の抑制による高脂血症治療薬として開発が進められていたものである。スタチン類の HMG-CoA 還元酵素阻害とは異なり、chol の生合成において HMG-CoA より下流にあるスクワレンの合成を抑制することで、Co-Q10 (ミトコンドリアでのエネルギー産生における補酵素として働く) などの生合成には影響せずに、chol の産生を抑えることができることを利点に掲げて開発が進められた。

しかしこの化合物は第 I 相試験 (反復投与) の段階で、すでに臨床使用されているスタチン類 (例えばアトルバスタチンなど) あるいは先行の同効薬 TAK-475 (プロドラッグ; TAK-475 M-I、プロドラッグの親化合物) と比べ、効果が弱いことが判明し、本化合物は第 I 相試験の段階で開発が中止された。

本化合物がヒトにおいてどうして十分な効果が得られなかったかについては、当時、筆者は非臨床ならびに臨床での PK 試験を総括する立場から、会社上層部より説明を求められ、当時の薬理担当者や創薬物性の担当者の協力を得て、“動物とヒト間での血漿タンパク結合性の違いが薬効の違いを生む結果となり、ヒトで見られたような異常に高いタンパク結合性については当時において予測できていなかった”との仮説に立って、当時では尤もらしい説明を行い納得をしてもらったことを覚えている。しかしそれが本当に正しいものであったかどうかについては、トランスポーター等の情報⁹⁾と合わせ、評価する必要があり、本報告ではそれを取り上げ、過去のデータを検証した。

ラメルテオン (RAM) について

本化合物 (メラトニン作動薬) は従来の睡眠薬とは大きく異なり、脳内のメラトニン様物質を、夜間の限られた時間帯に高めることにより睡眠障害を治療するという新規な治療コンセプト

により開発された新薬であり (2005 年に米国で発売され、数年後にも本邦でも発売)、当時の武田 (1990 から 2005 年の間) における開発化合物の中で開発に成功した唯一の化合物である。この化合物については、経口投与後の BA が極めて低いことが指摘されていて (BA = 0.05)、また臨床での相互作用試験においてフルボキサミン (FLV) との併用で世に例を見ない大きな相互作用 (RAM の AUC が約 130 倍に上昇) が見られ、その相互作用の原因については、筆者が本学に赴任した後の研究により解明されることになった (その研究については複数の雑誌に論文発表¹⁰⁻¹⁴⁾)。

しかし RAM と FLV の相互作用試験においては、未変化体としての RAM の血中濃度の上昇だけではなく、それに付随し、複数の代謝物の血中濃度の変動についてもデータが得られていたので、本報告においては、RAM の代謝経路を基に¹⁵⁾、それらの変動についても検証を行なった。

結果および考察

化合物 A の血球への分配に見られた非線形

第 I 相試験で得られた PK データ

図 3 には化合物 A を投与量 0.1 mg および 0.5 mg で健常人に反復経口投与した際の、最終投与後の血漿中および全血中薬物濃度 (いずれも 0.1 mg 投与量当りに換算した値) の時間推移を示している。2 投与量間で、血中濃度推移が同じであれば PK において線形性が成り立つと考えられるが、本化合物については、高投与量 (0.5 mg 投与) において T_{max} 近辺での血漿中濃度が有意に高く、非線形 PK を示す結果となった。一方、全血中濃度推移については、そのような食い違いは見られず、PK はほぼ線形性を示した。

さらに細かく投与量を変化させた場合の AUC および C_{max} 値の用量依存性について調べてみると (図 4)、全血中濃度の AUC に関する限り、用量に比例する線形性が認められたが

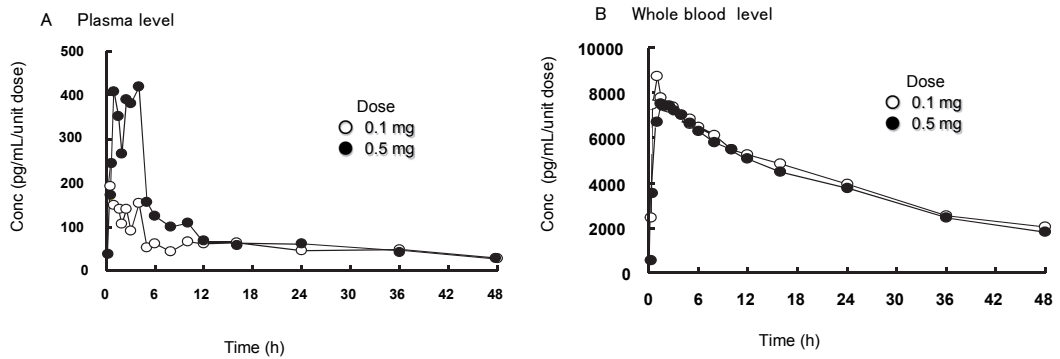


図3 化合物Aの反復投与後の血漿および全血中濃度の時間推移
(濃度は投与量0.1 mgを基準とした単位投与量当りの値に換算)

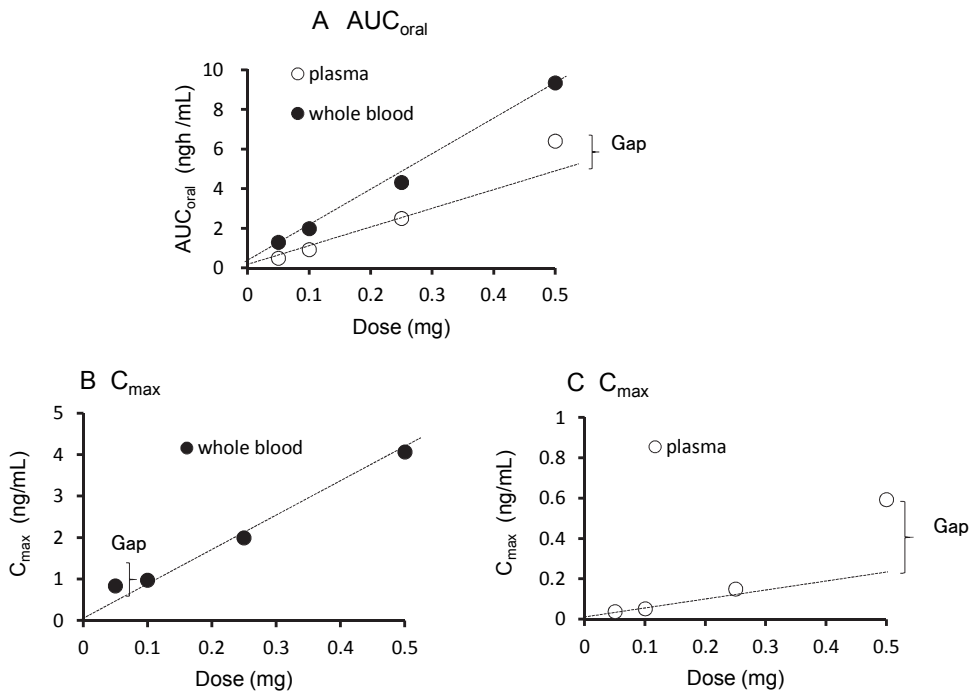


図4 化合物Aの反復投与後の血漿中および全血中濃度のAUCおよび C_{max} 値の投与量依存性

(図4A)、血漿中濃度については、特に高投与量(0.5 mg)において、AUCの値は用量比を上回ることが確認された。また全血中濃度の C_{max} については線形性が認められたが(図4B)、血漿中濃度の C_{max} についてはAUCで見られた線形性からの乖離が、さらに顕著となる結果を示した(図4C)。

化合物Aの血球移行における非線形(結合の飽和)

反復投与で得られた投与後の個々の被験者の血漿中および全血中濃度について(時間経過の異なるすべてのサンプルについて)、横軸を血漿中濃度、縦軸を全血中濃度としてプロットし

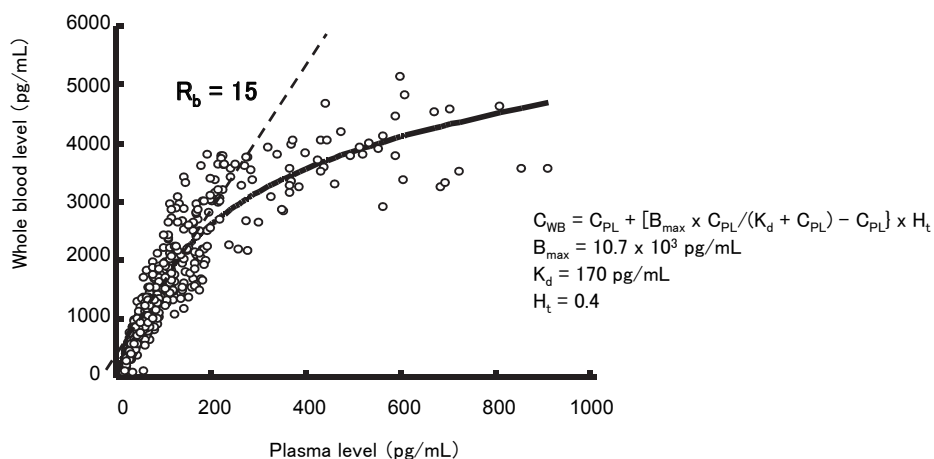
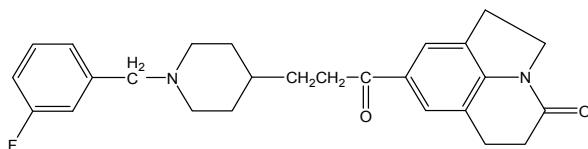


図5 化合物Aの反復投与後の血漿中および全血中濃度の相関

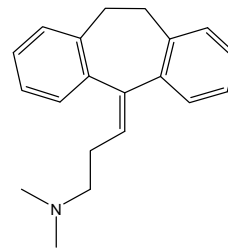
てみると (図5: 濃度の単位は pg/mL)、血漿中濃度において 200 pg/mL 以下であれば、全血中濃度は血漿中濃度に比例して推移し、200 pg/mL を超えると血球への移行に飽和が見られる結果を示した。血漿中濃度と全血中濃度の間で見られる比例関係から全血-血漿比 (R_b) を計算してみると約 15 となり、薬物が赤血球

に分布しないと仮定した場合の R_b 値 (0.6) と比べると、異常に大きい値を示した。得られた飽和曲線からは薬物の血球への移行は可逆的な結合 (ラングミュアの吸着式に従う) によるものと考えられ、ラングミュア式を用いて解析してみると、図中に示す特性が得られた。すなわちヘマトクリット値 ($H_t = 0.4$) において、

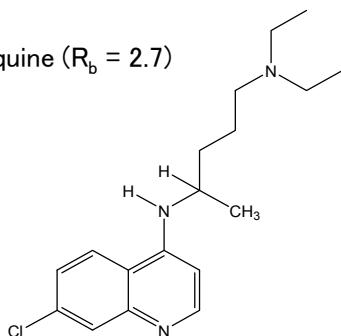
化合物A ($R_b = 15$)



Nortriptyline ($R_b = 1.7$)



Chloroquine ($R_b = 2.7$)



Chlorthalidone ($R_b = 20$)

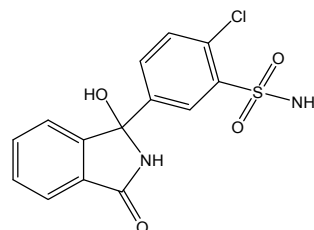


図6 血球によく移行することが知られている薬物の R_b 値の比較

結合における最大値 (B_{\max}) は 10.7×10^3 pg/mL で、解離定数 (K_d) は 170 pg/mL となり、結合における親和性が非常に高いことが示された。

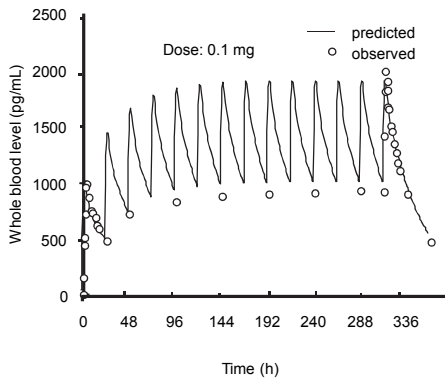
赤血球への高い親和性を示す薬物は、カチオン性両親媒性構造 (CAD: 3級アミンを有する疎水性薬物; 化合物 A もそれに分類される) を有するものによく見られ、その親和性は赤血球膜表面のシアール酸残基とのイオン結合によるものと想像される¹⁶⁾。代表的なものにはノルトリプチリンやクロロキンを挙げられ、特に後者は過去に網膜症などの薬害を引き起こしたことが知られている¹⁷⁾。しかしそれらの化合物においても R_b 値は 3 を超えることはなく、

化合物 A の赤血球への異常に高い親和性は CAD 構造を有さないクロルタリドン (サイアザイド系利尿薬、副作用が強く本邦では使用されていない) に近いものであった (図 6)¹⁸⁾。

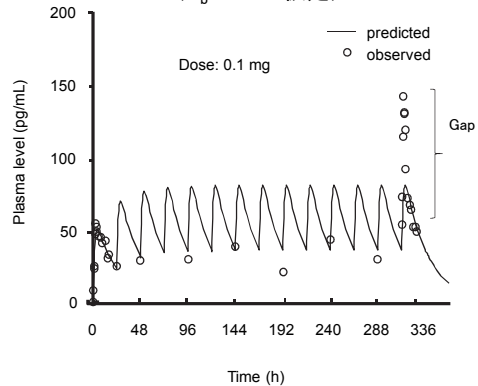
反復投与における血漿中濃度の異常上昇のシミュレーションによる予測

単回投与後の血中濃度のデータから、反復投与後の血中濃度をシミュレーションすることにより、実際に得られている結果と比べてどのような違いが生じるかについて調べてみた (図 7)。全血中濃度に関する限り、反復投与後の予測値は、実際に得られた結果とよく一致し (図 7A)、一方血漿中濃度のシミュレーション値は下方に

A 全血中濃度推移のシミュレーション



B 血漿中濃度推移のシミュレーション ($R_b = 15$ と仮定)



C 血漿中濃度推移のシミュレーション (血球への分布に飽和があると仮定)

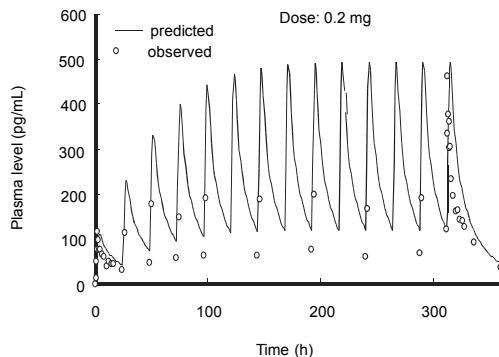


図7 単回投与後のデータからの化合物 A の反復投与後の血漿および全血中濃度推移のシミュレーションによる予測

大きくずれる結果が示された (図 7B: C_{max} 値は実際に得られている結果の約 1/2)。しかし全血濃度のシミュレーション結果から得られる各時点での濃度をラングミュアース式に当てはめ血漿中濃度を計算し、反復投与後の血漿中濃度をシミュレーションしてみると、消失において幾分子遅れるものの、少なくとも C_{max} 値については、よく一致した (図 7C)。すなわち血漿中濃度推移に見られた非線形プロファイルは、血球移行における非線形では説明できることがわかった。

非臨床および臨床データからの安全性についての検証

化合物 A の次の第 II 相試験 (POC 試験) に向けての Go/No Go の判断については、単に臨床試験で得られた非線形 PK 特性からだけで No go を判断することは難しいが、最終的にはクロロキンなどに見られた有害事象を参考にして、開発は中止し、別の化合物で POC 試験を進めることとなった。

R_b 値や血球移行による非線形 PK についてはクロルタリドンに極めて類似しているが、化学構造上からは、血球への取り込み機構は (CAD 構造を介する)、クロロキンに近いと思われた。そこでクロロキンにより引起された網膜症などと照合しながら振り返ってみると、やはりこの判断は正しかったと思われる。クロロキンは前述のように化合物 A と同様の CAD 構造を有し、そのような物質は細胞のライソソーム画分に高濃度に取り込まれて細胞障害 (ホスホリピドーシス) を引起し、それは血球移行特性とも相関することが知られている^{16, 17)}。化合物 A の非臨床試験 (ADME 試験: ラット、イヌおよびサル) においては、ヒトで見られたような血球分配特性とともに眼の陰窩部分などに放射能が長期に残留する特性 (安全性の観点からは避けるべき特性) が見られているので、血球への高濃度移行と細胞障害性との関連付ける見方は正しいものであったと思われる。

化合物 B の UGT2B15 の遺伝子多型による血中濃度の変動

第 I 相試験で得られた PK データ

化合物 B については非臨床試験の段階から、図 8 に示すように脱エチル体 (M-I) およびベンゼン環の水酸化 (M-II) への酸化代謝が起こることが知られていた (特に M-I への酸化には CYP2C8 が関与)、第 I 相試験 (国内) における単回での用量漸増試験においては、未変化体と M-I および M-II の血漿中濃度が測定された。

図 9 は投与量 16 mg における未変化体ならびに M-I の血漿中濃度の時間推移を示している。未変化体レベル (図 9A) において、消失には大きなばらつきが見られ、薬物 B の消失には通常とは異なる slow タイプの被験者 (日本人) が 1、2 割の頻度で見られ、slow タイプにおいてそれに呼応するように、M-I 濃度は初期に低く (図 9B)、未変化体の消失の遅れが、M-I への代謝 (M-I の生成) の遅れと強く相関することが示された。

このことから、当初は化合物 B の消失の変動は、M-I への酸化代謝に関わる CYP2C8 の遺伝多型によるのではないかと思われたが、CYP2C8 遺伝子多型による PK の変動に関する報告は皆無であったので (現在においても状況は変わらず)、他の何らかの要因が関与しているのではないかと考え詳細に調べられた。

まず臨床試験で得られた血漿サンプルを用いて代謝物検索を行なった結果、血漿にアルカリを添加すると、容易に未変化体が“切り出されてくる”ことがわかり、血漿中には、低濃度ではあるものの、化合物 C のアシル型グルクロン酸抱合体が存在することが確認された。さらに詳細に調査を進めた結果、図 8 に示したように、M-I は未変化体が CYP2C8 による直接的に酸化を受けて生成されるのではなく、最初のステップとして、未変化体がミクロソーム上のグルクロン酸転移酵素 (UGT) に捕捉され、

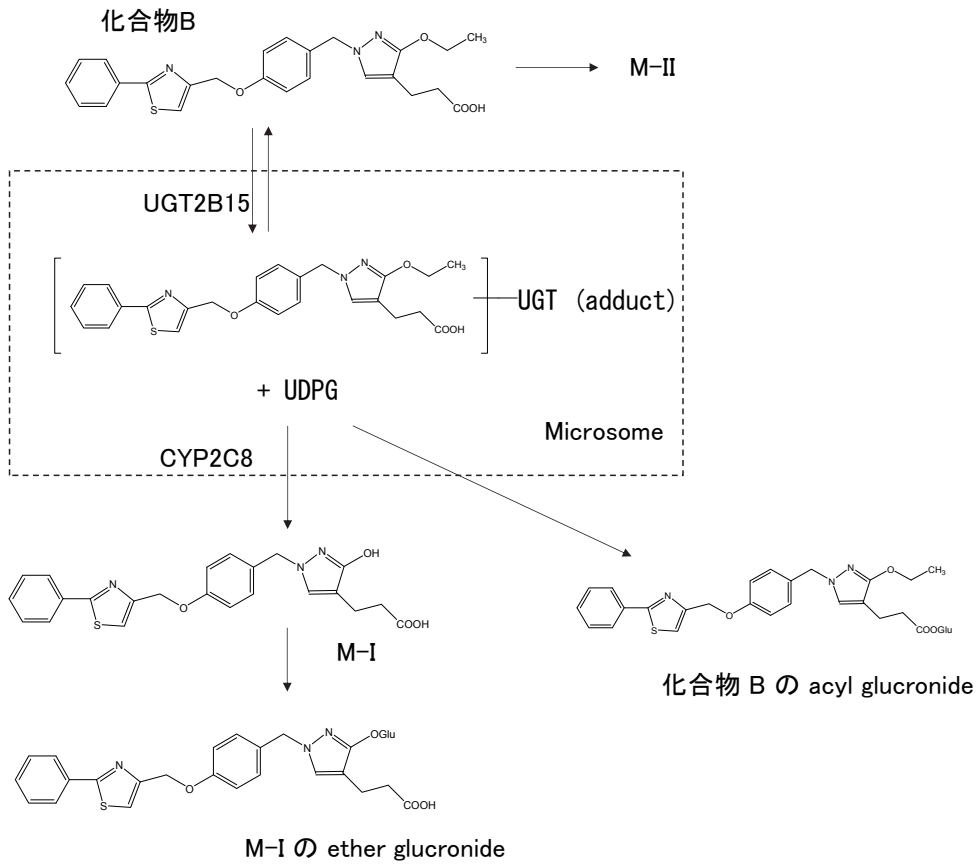


図8 化合物Bの抱合代謝の遺伝子多型が関与する推定代謝経路

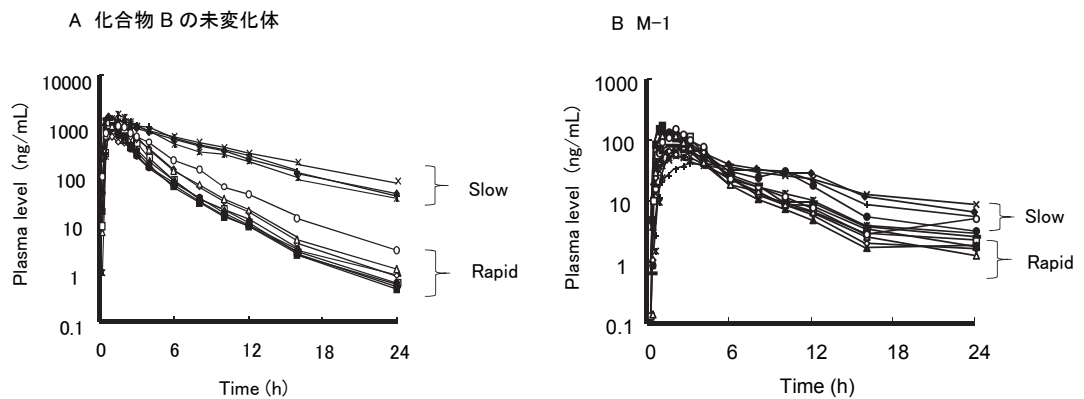


図9 化合物Bの経口投与後の未変化体およびM-1の血漿中濃度推移 (投与量: 16 mg; n = 12)

そこに UDPG が加わってアシル抱合体が形成され、その一部はマイクロソーム外へと放出され(体循環系に入る)、残りの抱合体は、近傍に存在する CYP2C8 の作用を受けて脱抱合し、さらに M-I へと酸化されるステップを経ることがわかった。すなわち中間過程にアシルグルクロナイドが存在することから、未変化体および M-I の血漿中濃度の変動は UGT の遺伝子多型に基づいているのではなかろうかと推察された。

血中濃度の変動についての解析 (UGT2B15 の遺伝子多型の関与)

UGT の遺伝子多型については、イリノテカンの活性代謝物 (SN-38) が抱合代謝を受けて不活性化する過程で、UGT1A1 の遺伝子多型が関わることは知られている。これらの情報を元に、化合物 B の抱合代謝に関わる UGT の分子種を突き止める目的で、ヒト UGT 発現マイクロソームを用いて、化合物 B のアシルグルクロナイドの生成速度(その裏返しとしての化合物 B の消失速度)について調べた。その結果、化合物 B のグルクロン酸抱合代謝には 4 種類の UGT 分子種 (UGT1A1、UGT1A3、UGT1A6 および UGT2B15) が関わっている可能性が示された (図 10)。

そこでさらに遺伝子多型を最もうまく説明できる分子種として UGT2B15 に着目し¹⁹⁾、単

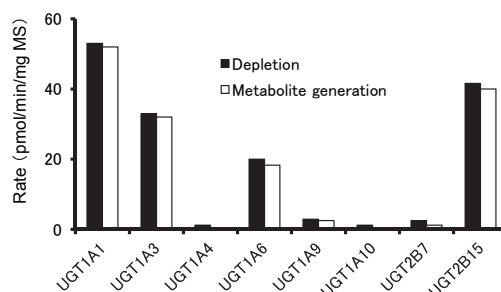


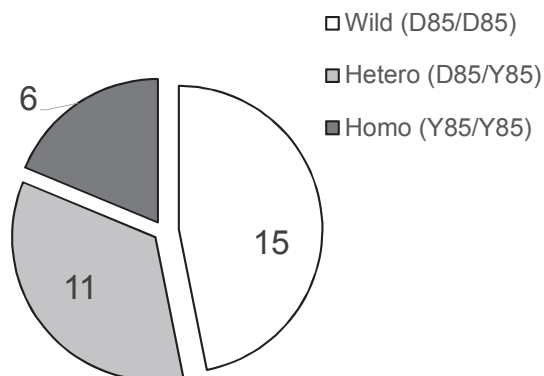
図 10 ヒト UGT 発現マイクロソームを用いた化合物 B のアシルグルクロナイドの生成速度とその裏返しとしての化合物 B の消失速度

回漸増試験における被験者 32 人(日本人)の遺伝子多型について調べたところ (図 11A)、その存在割合は wild (D85/D85) /hetero (D85/Y85) /homo (Y85/Y85) = 15/11/6 となることが分かった。一方、被験者 32 人中の slow タイプは 4 人で (図 11B)、ホモ変異型 [homo(Y85/Y85)] であることが確認された。すなわち化合物 B の抱合代謝には UGT2B15 が関与し、化合物 B および M-I の血漿中濃度の変動は、UGT2B15 の遺伝子多型によるものであことが示された。

UGT と CYP2C8 の密接な関係についての検証

化合物 B の代謝経路に関し、当時の臨床試

A Genotype (UGT2B15)



B Phenotype

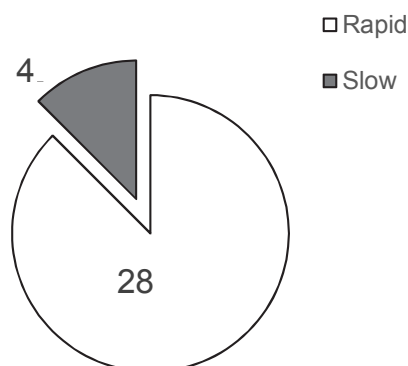


図 11 化合物 B を投与した被験者 (32 人) の UGT2B15 に関する genotype と薬物消失に関する phenotype

験における化合物 B の PK 解析からは、化合物 B が CYP2C8 により酸化を受けて M-I へと代謝される際に、化合物 B がマイクロソーム上の UGT と結合し、グルクロン酸抱合体を形成する段階を経る必要があることを見出していた。しかし化合物 B は PK 変動が大きい点で、当時進められていた先行化合物の back-up とはならず、それ以降の開発は中止され、UGT と CYP2C8 の密接な関係（例えば *in vitro* 試験において、UGT の存在下で CYP2C8 による M-I の生成がどのように促進されるか）については、検討されることはなく、現在に至っている。

しかしその後、ロラタジン（第 2 世代の抗ヒスタミン薬）の活性代謝物が本化合物と全く同じ過程を経て生成されることが報告され²⁰⁾、また CYP2C8 に関する膨大なデータを集めた総説が発表されるようになり²¹⁾、我々の当時の仮説（UGT と CYP2C8 が連動する酸化代謝経路）は、間違いではなかったことが確認された。

化合物 C の血漿タンパク結合性の種差をもたらす PK 変動と薬効との関係

化合物 C と同効薬の化学構造と血漿タンパク結合性の比較

図 12 は、化合物 C と同効薬（TAK-475 M-I とアトルバスタチン）の化学構造ならびにヒト血漿タンパク非結合分率 (f_{u_b} ：この値が小さいほど血漿タンパクとの結合性が大きい)の違いについて示している。

第 I 相試験で得られた化合物 C のヒト PK データ

図 13 には化合物 C をラットおよびヒトに経口投与後の血漿中濃度推移 (1mg/kg 投与当りに換算して比較) とラットに ¹⁴C 標識体の経口投与後の血漿および肝臓中の ¹⁴C 濃度の時間推移を示している。ヒトにおける血漿中濃度の C_{max} 値はラットに比べ約 20 倍高い値を示し、AUC においても約 50 倍大きい値を示した (図 13A)。またラットに経口投与した際の投与 30 分後の肝臓中総放射能の値は血漿中濃度の約

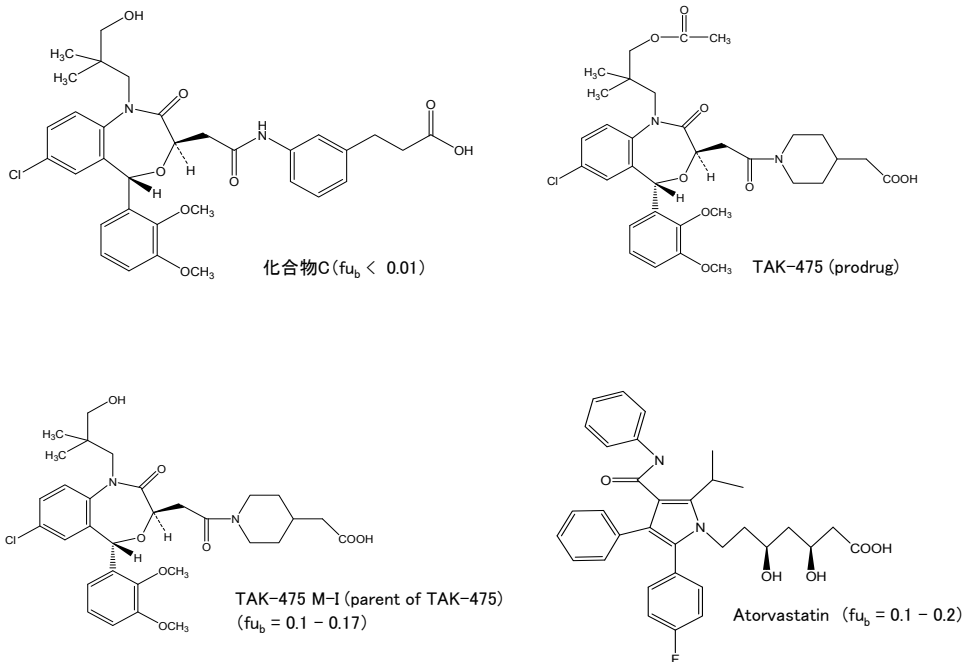


図 12 化合物 C の同効薬との血漿タンパク結合性の比較 (f_{u_b} ：血中タンパク非結合分率)

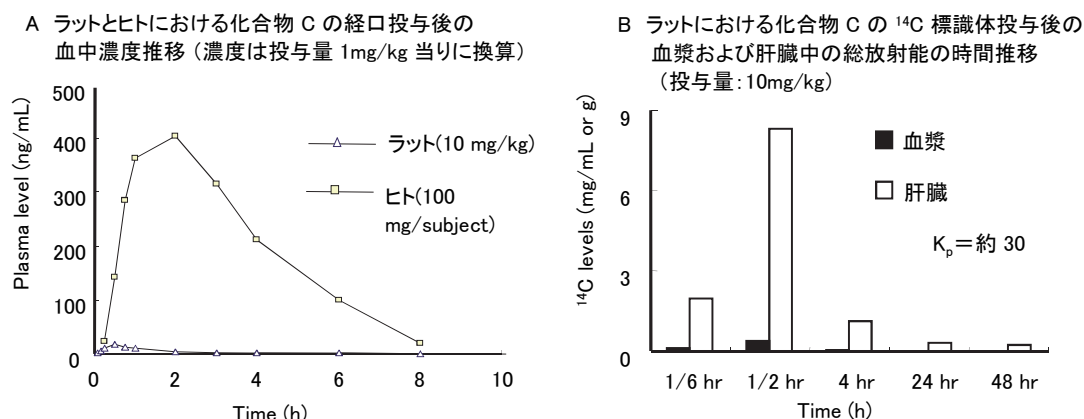


図 13 化合物 C の非臨床および臨床試験で得られた PK 特性

20 倍で、各時点の血漿中濃度に対する肝臓中濃度の比から算出される平均 K_p (分配係数) 値は約 30 であった (図 13B)。

このように化合物 C においては血漿中濃度に大きな種差が認められ、ヒトへの単回投与の結果が出た当時では、相反する議論がなされた。すなわち薬効の強さは血漿中濃度 (正確には血漿中遊離形濃度) に比例すると考えると、ヒトのほうが動物に比べて、より高い治療効果が期待できるのではなかろうか。またそれとは反対にこの薬物の標的臓器は肝臓であるため、図 13B から推察されるように、ラットでは、ヒトに比べて血漿中濃度が低い分、薬物がより高濃度に肝臓に分布する可能性、すなわち薬効面ではラットの方がヒトに比べて高いのではなかろうか。しかし化合物 C の反復投与の試験により chol 低下作用について negative 結果が出るようになって、この化合物に関しては、ヒトにおいては肝で有効に作用していない疑問 (それは化合物 C の PK 特性によるものなのか、それとも化合物自身の薬効の弱さによるものなのかといった疑問) が生じてきた。

そこで筆者は PK 試験を統括する立場から、本化合物の Go/Nogo の判断のための追加の試験を関連部門に依頼した。追加の試験は最終的には血漿タンパク結合における種差を想定とした chol 合成阻害に関する in vitro 実験になった。

化合物 C の血漿タンパク結合における種差

すでに図 12 に示したように、薬物 C のヒト血漿タンパク結合性は TAK-475 M-I やアトルバスタチンに比べて強く、非結合分率 (fu_b) は 0.01 以下の値を示すが、ラットにおいても結合性は高く ($fu_b = 0.01$)、単に fu_b で見る限り、ヒトとの違いを明確に示すものではなかった。そこで当時の研究者らは、化合物 C と TAK-475 M-I の血漿タンパク結合性における種差の有無を確認するために、血漿中に 8% の濃度となるように dextran-coated charcoal (DCC: 活性炭の表面の一部をデキストランで被覆したもの: 薬物の血漿タンパクへの結合を競合的に阻害する効果が期待できる) を添加し、タンパク結合における阻害実験を行なった。その結果、化合物 C においてはラットの血漿中でのタンパク結合が、DCC により大いに抑制されるのに対し、ヒトにおいてはその抑制効果は限定的であることが分かった (図 14)。一方 TAK-475 M-I については、元々いずれの種においてもタンパク結合性は強くはなく、特にヒトにおいて DCC 添加によりタンパク結合抑制が大きく出ることが示された。すなわち、これらの実験データからは、化合物 C のヒトにおける血漿タンパク結合性はラットに比べ有意に大きいことが示された。

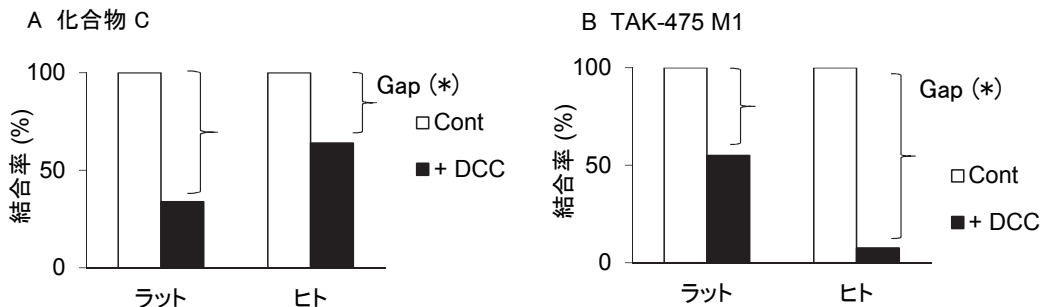


図 14 化合物 C および TAK-475 M-1 の血漿タンパク結合に対する dextran-coated charcoal (DCC 8%) の添加効果 (Gap が小さいほど薬物のタンパク結合性は大きい)

化合物 C のヒトにおける血漿タンパク非結合分率 (fu_b) の推定

タンパク結合率が 99% 以上 ($fb_b > 0.99$) の薬物の非結合分率は一般的によく用いられる残差法 ($fu_b = 1 - fb_b$) では正確に求めることはできない。正式にはタンパク濃度を種々に変化させて得られる fb_b の値を解析し、結合定数 (K_p) を求めて、最終的には $fu_b = 1/(1+K_p \times P_T : P_T$ は血漿中アルブミン濃度) から計算で見積もることが好ましい。本化合物においては、そのようなデータは取得されていないものの、本論文をまとめる過程で上述の DCC によるタンパク結合阻害実験から、以下に示す式を使って、 fu_b のラット-ヒト間の相対的な違いを予測できることがわかった。

$$\frac{X(\text{human})}{X(\text{animal})} = \left[1 + \frac{1}{D_T \times K_c \times fu_b(\text{human})} \right] \times \left[\left[1 + \frac{1}{D_T \times K_c \times fu_b(\text{human})} \right] \right]^{-1} \quad (1)$$

なお D_T 、 X および K_c は上記の実験における総薬物濃度、DCC に結合した割合および化合物の DCC に対する結合定数を表す。

表 2 には化合物 C の fu_b (rat) および $K_c \times D_T$ をそれぞれ 0.01 および 350 とし、また

表 2 化合物 C および TAK-475 M-1 の DCC 結合阻害実験から推定されるラットおよびヒトの fu_b 値

	化合物 C		TAK-475 M-1	
ラット	0.01 ^{o)}	× 4.5	0.1	× 0.57
ヒト	0.002	1	0.17 ^{o)}	1
$D_T \times K_c$	318		0.29	

^{o)}Observed

TAK-474 (M-I) の fu_b (human) および $K_c \times D_T$ をそれぞれ 0.17 (図 12 に示した値) および 0.29 と仮定したときのそれぞれの化合物のラットあるいはヒトにおける fu_b の予測結果を示している。化合物 C のラット fu_b 値はヒトの約 4.5 倍と見積もられたが、一方 TAK-475 M-I においては、0.57 倍であった。すなわち化合物 C の血漿タンパク結合率は、ラットに比べて約 5 倍大きく、TAK-475 M-I では約 1/2 と見積もられた。

PK 特性 (F_h 、 $CL_{\text{int, overall}}$ および V_{dss}) からみた血漿中濃度推移における種差の検証

化合物 C のラットおよびヒトでの血漿中濃度推移 (AUC と C_{max}) の種差は一義的には CL_{oral} (AUC に反比例) および V_{dss} (C_{max} に反比例) により評価することができるが、とりわけ CL_{oral} については生理学的パラメータ (例えば Q_h) における種差を含むために、正味の化合物特性 ($CL_{\text{int, overall}} = fu_b \times K_{\text{puu}} \times CL_{\text{int}}$; $CL_{\text{int, overall}}$ 、 CL_{int} および K_{puu} はそれぞれ見かけの肝固有クリアランス、肝固有クリアランスおよび肝における血漿遊離体濃度に対する肝細胞内遊離体濃度の比) の種差に着目し、検証を行なう必要がある。これらの特性値は、tube モデル (肝抽出モデル) を基本にして (いくつかの仮定を含む)、 CL_{oral} (実測値) から順次計算で求めることができる。表 3 にはその計算のプロセスと最終的に求められた $CL_{\text{int, overall}}$ と V_{dss} の値が示されている。

表3 ラットおよびヒトにおける化合物CのPK解析 (CL_{int, overall}とV_{dss}の見積もり)

PK parameter	Input/output	Rat	Human	Ratio (rat/human)	
CL _{oral} (L/h/kg)	[= D _{oral} /AUC _{oral}]	Observed	32.6	0.59	55
MRT _{oral} (h)		Observed	2.8	3.6	0.78
MAT (h)		Assumed	1	1	
F _a		Observed/Assumed ^{c)}	0.2	0.2 - 0.6 ^{o)}	
Q _h (L/h/kg)		Reported	4	1.28	0.3
F _h	[= Q _h /(Q _h + F _a × CL _{oral})]	Calculated	0.38	0.8 - 0.9	2.1 - 2.3
F	[= F _a × F _h]	Calculated	0.076	0.18 - 0.48	2.3 - 6.3
fu _b		Observed/Assumed ^{b)}	0.01	0.0022 ^{b)}	4.5
CL _{int, overall} (L/h/kg)	[= Q _h × Ln (1/F _h)] ^{c)} [= fu _b × K _{puu} ^{d)} × CL _{int}]	Calculated	1.52	0.13 - 0.28	5.4 - 11
fu _b / CL _{int, overall} [(L/h/kg) ⁻¹]		Calculated	0.007	0.0078 - 0.017	0.38 - 0.83
CL _{tot} (L/h/kg)	[= CL _{oral} × F]	Calculated	2.47	0.1 - 0.28	8.8 - 24
MRT _{iv} (h)	[= MRT _{oral} - MAT]	Calculated	1.8	2.6	0.69
V _{dss} (L/kg)	[= CL _{tot} × MRT _{iv}]	Calculated	4.4	0.26 - 0.78	5.6 - 17
V _{dss} /fu _b (L/kg)		Calculated	110	118 - 354	1 - 3.2

^{o)} Referred to F_a of atorvastatin (F_a = 0.6)

^{b)} From Table 2 ^{c)} Tube model ^{d)} Cytosol-plasma unbound drug level ratio

すなわち化合物CはP_{gp}の基質で非臨床ADME試験の結果からは、ラット（投与量10 mg/kg）における吸収率（F_a）は約0.2と見積もられた。また化合物Cは肝消失型の薬物（尿中未変化体排泄率A_{e, oral} = 0）であるため、CL_{oral} (= D_{oral}/AUC_{oral})から、F_h [= Q_h/(Q_h + F_a × CL_{oral})]を見積もることができた。一方ヒトにおいてはF_aに関するデータはないものの、類似薬であるアトルバスタチン（P_{gp}の基質）のF_a値が約0.6であることから、化合物

Cの吸収率をF_a = 0.2（ラット）～0.6（アトルバスタチン）の範囲にあると仮定して、F_h値を見積もることができた。

またF_hの値からは、CL_{int, overall}を見積もることができるが、そうして見積もられるラットおよびヒトにおける値はそれぞれ1.5および0.13～0.28と計算され、ラットではヒトに比べて5～11倍となることが示された（図15A）。またCL_{int, overall}はfu_b値に比例することから、CL_{int, overall}/fu_b (= K_{puu} × CL_{int})を計算してみ

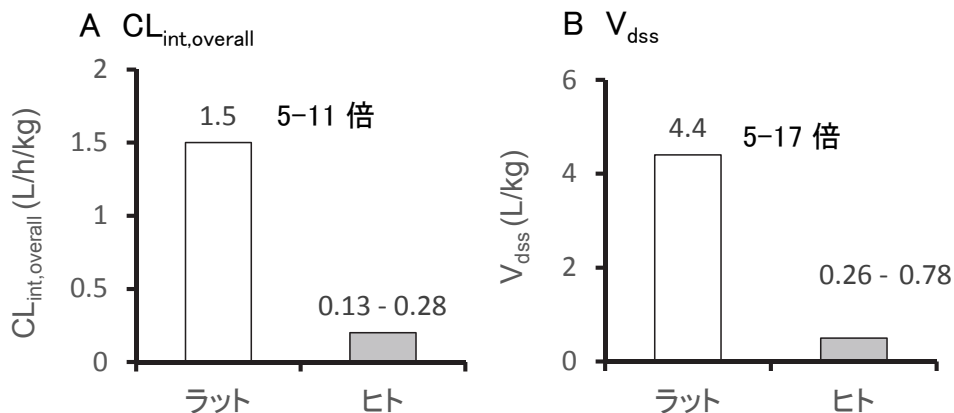


図15 化合物Cのラットおよびヒトにおける見かけの肝固有クリアランス (CL_{int, overall}) と分布容積 (V_{dss})

ると、ラットとヒトでそれぞれ 152 および 65 ~140 となり、両者はほぼ類似する結果となった。すなわち CL_{oral} で見られた大きな種差 (55 倍) は、 $CL_{int, overall}$ でみると種差は約 5~10 倍に留まり、その差は、ほぼ fu_b の種差 (4.5 倍) に一致した。

さらに F_h からは $F (= F_a \times F_h)$ および $CL_{tot} (= F \times CL_{oral})$ を見積もることができる。また T_{max} 値 (1~2 h) を参考して、平均吸収時間 ($MAT = 1/K_{abs}$) を 1h と仮定すると、実測される MRT_{oral} から $MRT_{iv} (= MRT_{oral} - MAT)$ が見積もることができるので、最終的には CL_{tot} と MRT_{iv} から $V_{dss} (= CL_{tot} \times MRT_{iv})$ を見積もることができる。そうして見積もられるラットおよびヒトにおける V_{dss} はそれぞれ 4.4 および 0.26~0.78 となり、ラットではヒトに比べ 5.6~17 倍となることが示された (図 15B)。また $V_{dss} [= (fu_b/fu_T) \times V_T]$ はほぼ fu_b 値に比例することから、 V_{dss}/fu_b を計算してみると、ラットとヒトでそれぞれ 110 および 118 ~354 となり、両者はほぼ類似する結果となった。すなわち V_{dss} で見られた種差についても、ほぼ fu_b の種差 (4.5 倍) に一致した。

すなわち化合物 C の血漿濃度推移に見られたラットとヒト間での大きな種差は fu_b の種差でほぼ説明できることが確認された。

肝細胞内の遊離薬物濃度 (C_{hu}) の見積もり

PK と薬効の強さとの関係については、肝細

胞内の遊離薬物濃度 (C_{hu}) が key となる (薬効の強さは C_{hu} に比例)。肝消失型薬物において tube モデルを仮定した肝抽出機構によれば、反復投与 (投与間隔 τ) において定常状態に達した後の平均 C_{hu} 値 (mC_{hu}) は、以下のように表すことができる¹⁴⁾。

$$mC_{hu} = \frac{AUC(C_{hu})_{oral}}{\tau} = fu_b \times K_{puu} \times \delta \times F_h \times \frac{AUC(C_b)_{oral}}{\tau} \quad (2)$$

$$= \left(\frac{F_a \times D_{oral}}{\tau} \right) \times \left(\frac{fu_b}{CL_{int, overall}} \right)$$

したがって同一投与条件下では、化合物の種類および動物種を超えて、薬効の強さは $fu_b/CL_{int, overall}$ (薬効濃度の指標) に比例する関係が成り立つと考えられる。

その観点で、化合物 C のラットとヒト間での相違について振り返って見ると、両者間でそれほど大きな差は見られず (ラットにおいてはヒトの 0.4~0.8 倍: 表 3)、上述したような PK 特性 (CL_{oral} あるいは V_{dss}) 上の種差は、本化合物の薬効の強さを左右しているものではないことが確認できた。

なお薬効に関わる肝細胞内の遊離薬物濃度は肝における総薬物濃度からは容易に求めることはできない。したがって、当初の肝臓中総薬物濃度に着目した議論は正しくはなかったことが確認された。

化合物 C とその同効薬との PK 比較

同効薬 [TAK-475 M-I (TAK-475 の親化合物)]

表 4 同効薬の PK 解析 ($CL_{int, overall}$ および $fu_b/CL_{int, overall}$ の見積もり)

PK parameter	Input/Output	TAK-475 M-I	Atorvastatin	Ratio (TAK-475 M-I/ATR)
CL_{oral} (L/h)	Observed	510	344	1.4
F_a	Assumed ^{a)} /Observed	0.2 - 0.6 ^{a)}	0.6	0.3 - 1
F_h	Calculated	0.09 - 0.13	0.2 ^{b)}	0.45 - 0.65
F	Calculated/Observed	0.018 - 0.055	0.12 ^{a)}	0.15 - 0.45
fu_b	Observed	0.17	0.2	0.85
$CL_{int, overall}$ (L/h)	Calculated	180 - 210	108 ^{b)} - 144	1.2 - 1.9
$fu_b/CL_{int, overall}$ [(L/h) ⁻¹]	Calculated	0.00081 - 0.00094	0.0013 - 0.0018	0.45 - 0.72

^{a)} The same as compound C

^{b)} $F_h = F/F_a$ から計算 (CL_{oral} から計算すると $F_h = 0.3$, $F = 0.17$) ^{c)} Reported

およびアトルバスタチン] のヒトにおける PK 特性は化合物 C と同様の方法で算出することができるが、TAK-475 M-I とアトルバスタチン間では、それほど大きな PK 特性上の相違がないことが確認された (表 4)。しかしヒトにおける化合物 C の CL_{oral} は同効薬の 1/8~1/12 倍と小さく、逆に薬効濃度の指標となる $f_u/CL_{int, overall}$ は 4~13 倍大きいことが確認された (図 16)。すなわち化合物 C は、他の同効薬に比べ、肝からの消失が遅い分、薬効濃度面では有利に作用していることが確認された。

化合物 C の血清添加による *in vitro* での chol 合成抑制の低下

化合物 C の chol 合成阻害活性については、創薬研究の段階において、ラットを用いた *in vivo* 実験 (図 17A) およびヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験 (図 17B) により、アトルバスタチンに比べ弱いものの、TAK-475 M-I と同程度であることが確認されていた。しかし、HpG2 細胞を用いた追加の試験 (化合物 C の第 I 相試験と平行して実施された試験) で、化合物 C の chol 合成阻害活性が、ヒト血清添加で大きく低下することが示された (図 17C)。しかし、この *in vitro* で見られた血清添加の効果は、次節で説明されるように、*in vivo* での

効果を直接反映されるものではない点、注意が必要である。

化合物 C が臨床試験において十分な効果が得られなかった原因の検証

今回の検討においては、入手できるデータには限度はあったものの、ラット-ヒト間で見られた化合物 C の PK 特性 (AUC と C_{max}) 上の相違は、血漿タンパク結合における種差で説明することができた。しかしこの f_u に見られた種差は、薬効濃度 (C_{hu}) の指標となる $f_u/CL_{int, overall}$ ($=1/CL_{int}$) には影響しないことが確認された。すなわち化合物 C が臨床試験において十分な薬効を示さなかった原因については、ラット-ヒト間での f_u に依存した PK 特性の違いによるものでないことを明確に示すことができた。

さらに化合物 C の PK 特性 (とりわけ CL_{oral} と $f_u/CL_{int, overall}$) については、TAK-475 M-I やアトルバスタチンとの比較により、薬効上に及ぼす影響についても調べることができた。 $f_u/CL_{int, overall}$ については、薬効結果と相反する形で、化合物 C の方が他の同効薬に比べ有意に大きい値を示した (化合物が十分な活性を持っていれば、期待した薬効が得られていたはずと見られる)。

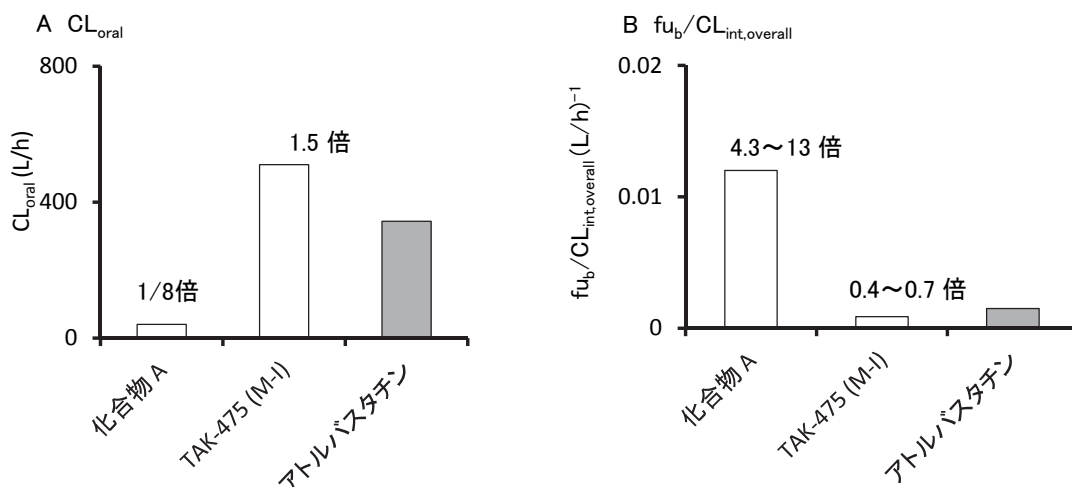


図 16 化合物 C および同効薬間での CL_{oral} および $f_u/CL_{int, overall}$ の比較

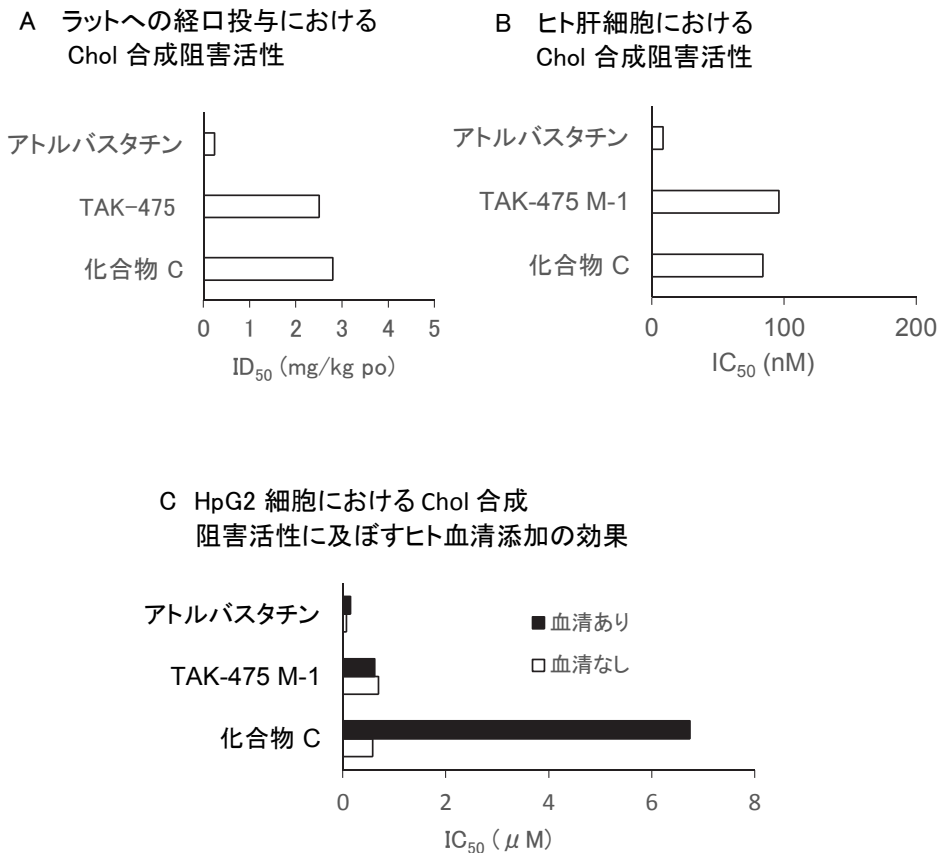


図 17 化合物 C の Chol 合成阻害活性 (同効薬との比較)

このように、化合物 C の薬効の低さの原因は、化合物本来の活性の低さによるもので、そもものところ非臨床試験からのヒト薬効用量の推定に問題があったのではなかろうかと推察された。

なお *in vitro* 試験においては血清添加により薬効が現弱する *in vivo* とは相反する結果が示されたが、*in vitro* では、薬物代謝に基づく薬物の消失 (f_{u_b} に比例) はなく、 f_{u_b} は細胞内濃度のみを規定するためによる相違として説明することができる。

今回の PK と薬効との相関においては K_{puu} の種間および化合物間での相違はないことを前提にして解析を進めてきたが、TAK-475 M-1⁹⁾ やアトルバスタチンは OATP1B3 の基質²²⁾ であり ($K_{puu} > 1$)、当然ながらそのことを考慮に

入れておく必要がある。アトルバスタチンの K_{puu} 値については、多くの研究者が、*in vitro* での肝細胞への取り込み実験を報告してきているが、実験手法上の問題があり、データは大きくばらつくことが指摘されてきた。しかし現在最も信頼できる値が報告されるようになってきている²³⁾。しかしその値は高々 1.6 程度の値であるので、 K_{puu} 値の種差あるいは化合物の違いによる影響は少ないのではなかろうかとも推察される。また式 2 からも明らかのように、 K_{puu} 値は f_{u_b} と同様に化合物の PK (CL_{oral} 値や $CL_{int, overall}$ 値) に影響を与えるが、薬効濃度 (C_{hu}) には影響を与えることはない。このことについては、すでにレバグリニド (糖尿病薬) の PK および PD (肝での糖の産生抑制効果) に及ぼす OATP1B1 (肝取り込みのトランス

ポーター) の遺伝子多型の影響についての研究においても実証されている²⁴⁾。

RAM と FLV の併用で見られた異常に大きな相互作用

RAM と FLV の併用で見られた未変化体および代謝物の血漿中濃度の変動

RAM (16 mg : victim, CYP の基質薬) と FLV (100 mg BID : perpetrator, CYP 阻害剤) の併用における RAM およびその代謝物 (M-I, M-II, M-III および M-IV) の血漿中濃度の時間推移は、それぞれ図 18 および図 19 に、また相互作用により生じた RAM およびその代謝物の AUC および $t_{1/2}$ の変化は、表 5 に示す通りである。相互作用により RAM の AUC は約 130 倍に、また M-I および M-III の AUC はそれぞれ約 4 倍および約 40 倍に上昇し、M-II の AUC には大きな変化はないものの、M-IV の AUC は逆に約 1/3 に減少する結果を示した。

RAM と FLV の併用による異常に大きな相互作用の原因

RAM の未変化体の異常に大きな AUC の増

加は、すでに報告しているように¹⁰⁻¹⁴⁾、二つの要因の重なりが原因していると考えられる。1 つ目の要因として、RAM は CYP1A2、CYP2C19 および CYP3A4 の基質で、RAM の代謝にはそれぞれの分子種が $vf_{m, CYP1A2}/vf_{m, CYP2C19}/vf_{m, CYP3A4} = 0.73/0.2/0.07$ の割合で使われるのに対して ($vf_{m, CYP}$: victim の総クリアランスに対する CYP 分子種の使われる割合)、FLV がいずれの分子種に対しても阻害的に働き、特に CYP1A2 と CYP2C19 を強く阻害した結果と考えられる (阻害剤固有の CYP 分子種に対する阻害活性 : $pA_{i, CYP1A2}/pA_{i, CYP2C19}/pA_{i, CYP3A4} = 30/20/2.5$)。なお $vf_{m, CYP}$ と $pA_{i, CYP}$ の値から見積もられる見かけの阻害活性 ($A_{i, overall}$) は約 16 と見積もられ、初回通過が無視できる (F_h が限りなく 1 に近い) 場合には、この値が AUC 上昇倍率に等しくなる。

また 2 つ目の要因として、RAM は肝臓での初回通過効果を大きく受ける薬物であり、相互作用により、その初回通過効果は大幅に軽減されたこと (RAM の F_h は相互作用により 0.03 から 0.75 へと増加) が指摘される。肝抽出機構として旧来の well-stirred モデルを仮定して相互作用を予測すると、後者の要因が無視され、

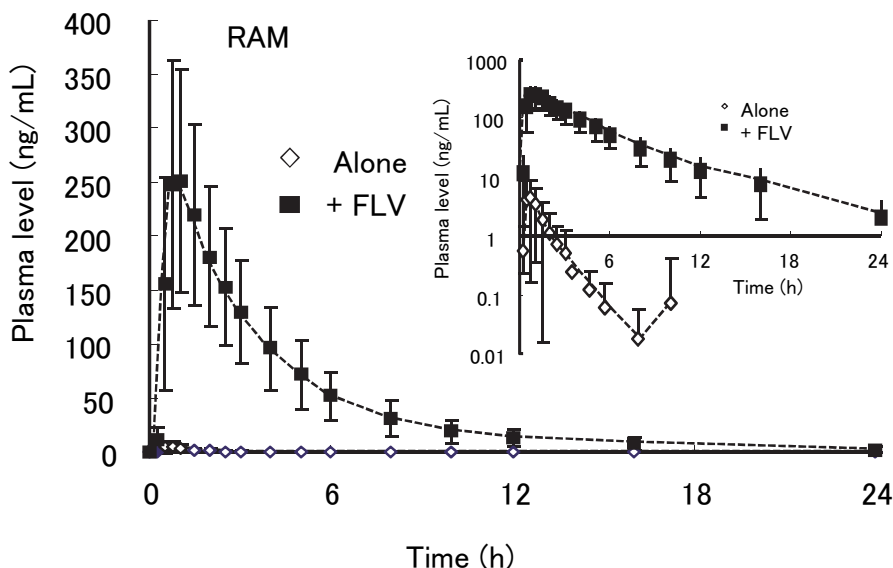


図 18 RAM (16 mg) と FLV (100 mg BID) の併用における RAM の血漿中濃度の異常上昇

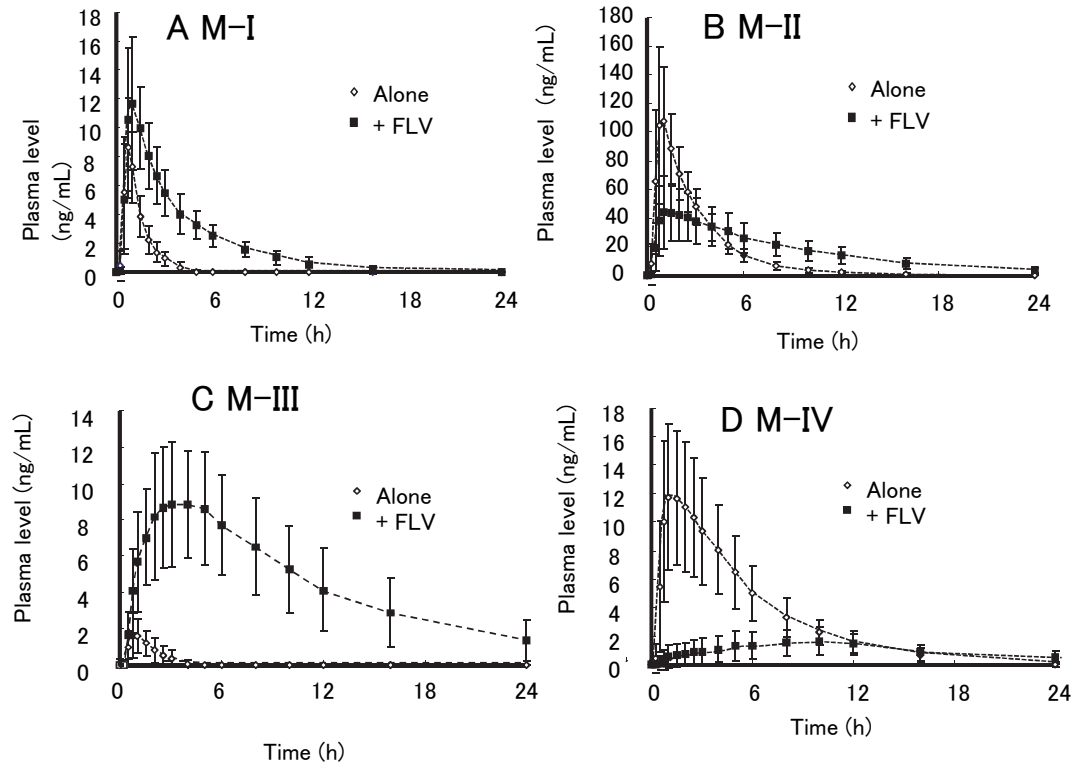


図 19 RAM (16 mg) と FLV (100 mg BID) の併用における RAM の血漿中代謝物濃度の異常変動

表 5 RAM と FLV の併用による AUC と $t_{1/2}$ における変化およびその変化から見積もられる代謝物の生成割合の変化

		AUC (0-24)	Ratio	$t_{1/2}$	Ratio	AUC/ $t_{1/2}$	Ratio ^{a)}
		ng·h/mL		h		ng/mL	
Control	Unchanged	8		1.1			
	M-I	11.1		0.8		13.9	
	M-II	337		2.2		153.2	
	M-III	2.8		1.2		2.3	
	M-IV	73.5		3.7		19.9	
+FLV	Unchanged	1014	127	3.9	3.5		
	M-I	43.8	3.9	3.5	4.4	12.5	0.90
	M-II	411	1.2	6.2	2.8	66.3	0.43
	M-III	110	39.3	7.2	6.0	15.3	6.55
	M-IV	25.6	0.3	6.2	1.7	4.1	0.21

^{a)} 相互作用による代謝物の生成割合の変化を示す尺度となる。

RAM のような薬物の場合には、相互作用が過小に評価されることになる。そのため我々は well-stirred モデルに代わる肝抽出機構として

tube モデルを仮定し、より simple かつ正確に相互作用を予測する方法を見出し、またこの方法を用いることにより、各種の薬物 (CYP

の基質薬) の $vf_{m, CYP}$ の値および阻害剤の $pA_{i, CYP}$ の値を推定し、それらをデータベース化し、報告している¹⁰⁻¹⁴⁾。

相互作用により変動する代謝物の生成割合およびその AUC の増減の見積もり

RAM の主要な代謝物 (M-I、M-II、M-III および M-IV) は、Obach らの報告している *in vitro* 代謝実験のデータと合わせ考え (彼らは代謝物の名称を A ~ H として代謝物の生成速度を解析している)¹⁵⁾、図 20 に示すような代謝経路を経て生成されることが確認できる。すなわち M-I は代謝物 B の加水分解体で、代謝物 B は RAM が主として CYP2C19 により酸化代謝されることにより生成される。M-II (あるいは A) と M-III (あるいは H) は RAM がそれぞれ CYP1A2 および CYP3A4 により酸化を受けて生成される。M-IV については、RAM の代謝により生成される M-III がさらに枝分かれの代謝を経てできると推測される (その際に使われる酸化酵素は主として CYP2C19 で部分的には CYP1A2 も関与)。

相互作用により生じる代謝物の AUC の増減は、その代謝物が未変化体から直接生成される場合 (M-II および M-III) あるいは M-I (RAM の直接的な代謝産物 B の加水分解体) のような場合に、代謝物の生成速度とその代謝物の消失速度の変化により決まると考えられる。さらに我々の理論によれば、消失速度は消失相における半減期 ($t_{1/2}$) に反比例すると考えられるので、相互作用により AUC を半減期で除した値 ($AUC/t_{1/2}$) がどのように変化したかを調べることで、その代謝物の生成割合の変化を見積もることができる。

そうして求めた相互作用による代謝物の生成割合の変化は表 5 に示す通りで、M-I においては、大きな変化は見られないものの、M-II、M-III および M-IV においては、その生成割合は、それぞれ約 1/2、約 6 倍および約 1/5 倍に変化することがわかった。

相互作用による代謝物の生成割合の変化についての $vf_{m, CYP}$ および $pA_{i, CYP}$ からの検証

我々が以前より報告している理論に従えば^{11, 12)}、RAM と FLV の相互作用においては、 $A_{i, overall}$ は以下に示す関係で決まる。

$$\frac{vf_{m, CYP1A2}(0.73)}{pA_{i, CYP1A2}(30)} + \frac{vf_{m, CYP2C19}(0.2)}{pA_{i, CYP2C19}(20)} + \frac{vf_{m, CYP3A4}(0.07)}{pA_{i, CYP3A4}(2.5)} = \frac{1}{A_{i, overall}(16)} \quad (3)$$

さらにこの式を変形すると、

$$\frac{A_{i, overall}(16)}{pA_{i, CYP1A2}(30)} \times vf_{m, CYP1A2}(0.73) + \frac{A_{i, overall}(16)}{pA_{i, CYP2C19}(20)} \times vf_{m, CYP2C19}(0.2) + \frac{A_{i, overall}(16)}{pA_{i, CYP3A4}(2.5)} \times vf_{m, CYP3A4}(0.07) = 1 \quad (4)$$

すなわち相互作用により $vf_{m, CYP1A2}$ は 0.73 から $16/30 \times 0.73 = 0.39$ へと約 1/2 倍に、また $vf_{m, CYP2C19}$ は 0.2 から $16/20 \times 0.2 = 0.16$ へと約 0.8 倍に、さらに $vf_{m, CYP3A4}$ は 0.07 から $16/2.5 \times 0.07 = 0.44$ へと約 6 倍に変化することになる。これらの変化の度合いは、M-I (CYP2C19 に依存)、M-II (CYP1A2 に依存) および M-III (CYP3A4 に依存) の生成割合の変化に相当し、このようにして見積もられる代謝物の生成割合は、先ほど示したような代謝物の PK 変化から見積もられる代謝物の生成割合とほぼ一致し、上記のような解析が正しかったことが確認された。

さらに M-IV についても M-III を経て生成されると考えると、M-III の代謝産物 (M-IV とそれ以外のもの) の生成割合は約 6 倍に増加するが、M-III が M-IV に代謝する際に CYP1A2 が関与し、その寄与率 ($vf_{m, CYP1A2}$) を 0.1 とし、また M-IV 以外の代謝物には CYP が関与しないと仮定すると、前述と同様の関係が成り立ち、

$$\frac{vf_{m, CYP1A2}(0.1)}{pA_{i, CYP1A2}(30)} + vf_{m, nonCYP}(0.9) = \frac{1}{A_{i, overall}(1.1)} \quad (5)$$

$$\frac{A_{i, overall}(1.1)}{pA_{i, CYP1A2}(30)} \times vf_{m, CYP1A2}(0.1) + A_{i, overall}(1.1) \times vf_{m, non-CYP}(0.9) = 1 \quad (6)$$

すなわち相互作用を受けない場合に比べ、M-IV の生成割合は 0.1 から $1.1/30 \times 6 \times 0.1 = 0.02$ に変化する (約 1/5 倍)。この結果についても、上記の M-IV の生成割合の減少結果と一致することが確認された。

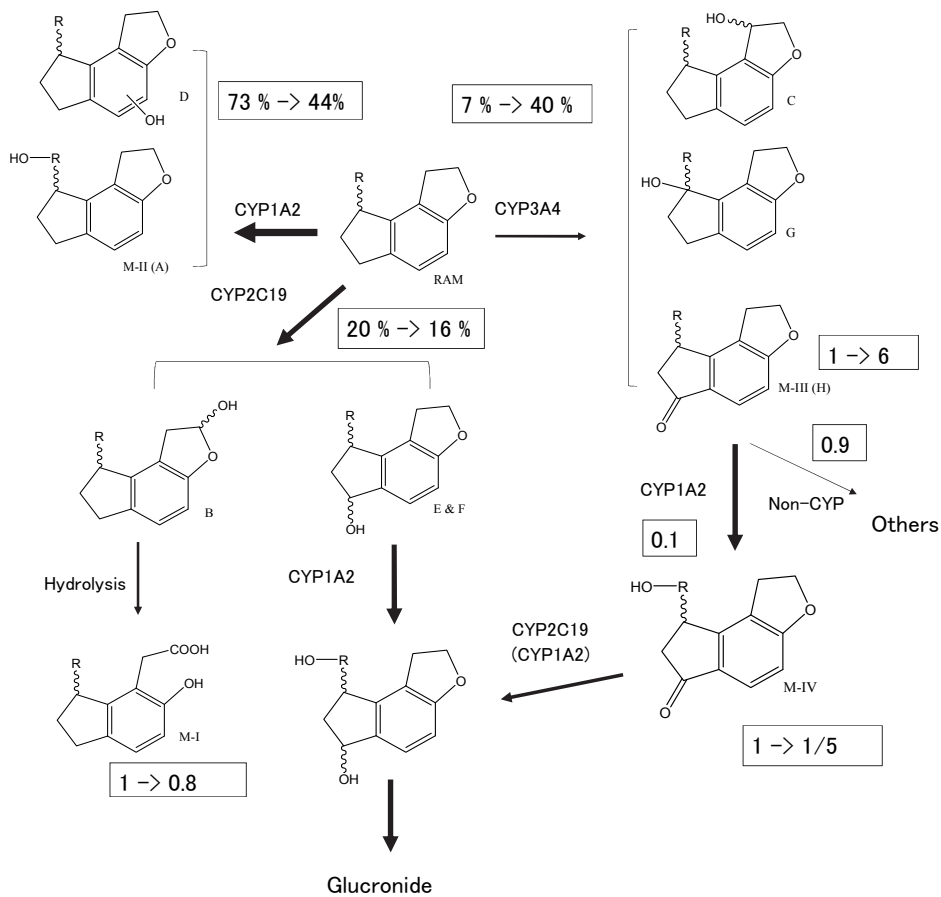


図 20 RAM の推定代謝経路と FLV 併用による代謝物の生成割合の変化の見積もり

以上の相互作用による代謝物の生成割合変化については、2つの異なる方法（代謝物の PK パラメータから見積もる方法と $v_{f,m,CYP}$ および $pA_{i,CYP}$ に関するデータベースから見積もる方法）から求めた値が、ほぼ一致し、図 20 に示すように、M-I、M-II、M-III および M-IV の生成の割合は 1 から 0.8（相対比）、73% から 44%（投与量に対する比率）、1 から 0.8（相対比）および 1 から 1/5（相対比）として示すことができた。

総括

本研究では、4 化合物の開発段階で見られた異常な PK 特性について、その後の PK 上の知見と照らして検証を行なった結果、以下に示す

ように、異常 PK の原因解明に繋がる複数の知見を得ることができた。

(1) 化合物 A の血球への分配特性：化合物 A は当時の第 I 相試験において、異常に高い血球 - 血漿分配比 ($R_b = \text{約 } 15$) を示し、高投与量側で血球への移行が飽和し、血漿中濃度推移は非線形を示した。最終的には次の相への試験は中止された。クロロキニンにより引起された網膜症などと照合しながらこの中止判断を振り返ってみると、やはり正しいものであったと思われる。いずれの化合物も CAD 構造を有し、そのような薬物は一般的には細胞のライソソーム画分に高濃度に取り込まれて細胞障害（ホスホリピドーシス）を引起す傾向にあり、それは血球移行特性とも相関する。化合物 A の非臨

床試験においては、ヒトで見られたような血球分配特性とともに眼の陰窩部分などに放射能が長期に残留する特性が見られていたので、血球への高濃度移行と細胞障害性との関連付ける見方は間違ではなかったと思われる。

(2) 化合物 B の PK 変動: 当時の臨床試験において、化合物 B の未変化体および代謝物 (M-I) の血中濃度は UGT2B15 の遺伝子多型により大きく変動することが示されていた。また M-I は未変化体の CYP2C8 を介した酸化代謝により生成されるために、UGT の遺伝多型は無関係に見えたが、未変化体が M-I へと代謝される際に、化合物 B がミクロソーム上の UGT と結合し、グルクロン酸抱合体を形成する段階を経る必要があることが示されていた。この化合物は第 I 相試験終了の段階で中止され、UGT と CYP2C8 の関係については、詳細には検討されることはなかったが、2015 年にロラタジン (第 2 世代の抗ヒスタミン薬) の活性代謝物が本化合物と全く同じ過程を経て生成されることが報告され、我々の当時の仮説 (UGT と CYP2C8 が連動する酸化代謝経路) は間違いではなかったことが確認された。

(3) 化合物 C の PK における種差と薬効との関係: 化合物 C は当時の第 I 相試験において、経口投与後の C_{max} が単位投与量当りにして、ラットに比べ約 20 倍高く、AUC についても約 50 倍大きいことが分かり、AUC については先行化合物 (TAK-475) やアトルバスタチンと比べても約 10 倍大きいことが確認されていた。また PK 試験と平行して薬効 (chol 低下作用) が調べられたが、本化合物においては十分な効果が得られていないことが示された。化合物 C が有効性を発揮しなかった原因として、当初はヒトにおける血漿タンパク結合性が想像以上に高く、薬物が肝に有効に作用しなかったためと説明されてきた。しかし今回の検証によれば、ヒトの f_{u_b} はラットの約 1/5 と小さく、クリアランスや分布容積における種差の原因と

なっていることは確かではあるものの、理論的には“肝細胞内の有効薬物濃度は f_{u_b} の変動の影響を受けることはない”ため、化合物 C の効果の低さの原因は、化合物本来の活性の低さによるもので、非臨床試験からのヒト薬効用量の推定に問題があったと推察された。

(4) RAM-FLV の相互作用における代謝物の変動: 一般的に薬物間相互作用の解析においては阻害を受ける側の未変化体の血中濃度の上昇に焦点が当てられ、その代謝物の血中濃度がどのように変化するかについてあまり着目されてこなかった。しかし RAM-FLV の相互作用試験では、複数の代謝物の血漿中濃度推移の変化についても調べられていたので、それらのデータを使って相互作用の解析を試みたところ、代謝の生成割合の変化の度合いは、代謝物の血中濃度の AUC をその代謝物の消失半減期で除した値 ($AUC/t_{1/2}$) の変化に等しいとする方法で、すでに報告している未変化体の血中濃度変化に着目した解析結果とよく一致することが分かった。このようなアプローチによる代謝物の血中濃度推移の変化をグラフ上から読み解く場合にも役立つことができるとともに、正確な相互作用の予測に繋がるものと思われた。

これらの薬物動態学上の新知見は、単に 4 化合物に限定されるものではなく、他の化合物にも当てはまる可能性があり、創薬を目指す研究者にとっては、大いに参考になるものと思われる。

謝辞

本学の紀要ならびに年報 (総論文数: 14 報) を通じ、学内外の研究者への発信を試みて参りました。その成果もあって紀要 (2016) および年報 (2015) に発表した論文は、2018 年 3 月末の時点で、Research Gate (<http://www.researchgate.net/>) を通じて、それぞれ 500 および 600 回の download がありました。このように私の研究を理解し支援して下さい

る研究者が大勢いることを知り、勇気付けられる思いであります。今回の論文は、紀要を通じての最後の発信となりますが、研究活動は続けて参りますので、引き続き宜しくお願い申し上げます。

引用文献

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 伊賀勝美 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 同志社女子大学総合文化研究所紀要 33: 124-141 (2016).
- 4) Ishichi Y, Sasaki M, Setoh M, Tsukamoto T, Miwatashi S, Nagabukuro H, Okanishi S, Imai S, Saikawa R, Doi T, Ishihara Y. Novel acetylcholinesterase inhibitor as increasing agent on rhythmic bladder contractions: SAR of 8-[3-[1-(3-fluorobenzyl) piperidin-4-yl] propanoyl]-1,2,5,6-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one (TAK-802) and related compounds. *Bioorg Med Chem.* **15**: 1901-1911 (2005).
- 5) Imoto H, Matsumoto M, Odaka H, Sakamoto J, Kimura H, Nonaka M, Kiyota Y, Momose Y. Studies on non-thiazolidinedione antidiabetic agents. 3. Preparation and biological activity of the metabolites of TAK-559. *Chem Pharm Bull.* **52**: 120-124 (2004).
- 6) Nishimoto T, Amano Y, Tozawa R, Ishikawa E, Imura Y, Yukimasa H, Sugiyama Y. Lipid-lowering properties of TAK-475, a squalene synthase inhibitor, in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* **139**: 911-918 (2003).
- 7) Kakehi M, Tagawa Y, Kondo T, Asahi S. Disposition of the new potent acetylcholinesterase inhibitor 8-[3-[1-[(3-fluorophenyl) methyl]-4-piperidiny]-1-oxopropyl]-1, 2, 5, 6-tetrahydro-4H-pyrrolo [3, 2, 1-ij] quinolin-4-one (TAK-802) in rats, dogs and monkeys. *Drug Res.* **63**: 293-299 (2013).
- 8) Lampe JW, Bigler J, Bush AC, Potter JD. Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4 (D458E), UGT2B7 (H268Y), and UGT2B15 (D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**: 329-333 (2000).
- 9) Ebihara T, Takeuchi T, Moriya Y, Tagawa Y, Kondo T, Moriwaki T, Asahi S. Characterization of transporters in the hepatic uptake of TAK-475 M-I, a squalene synthase inhibitor, in rats and humans. *Drug Res.* **66**: 316-323 (2016).
- 10) Iga K. Use of three-compartment physiologically based pharmacokinetic modeling to predict hepatic blood levels of fluvoxamine relevant for drug-drug interactions. *J Pharm Sci.* **104**: 1478-1491 (2015).
- 11) Iga K. Simulation of Metabolic drug-drug interactions perpetrated by fluvoxamine using hybridized two-compartment hepatic drug-pool-based tube modeling and estimation of in vivo inhibition constants. *J Pharm Sci.* **104**: 3565-3577 (2015).
- 12) Iga K. Dynamic and static simulations of fluvoxamine-perpetrated drug-drug interactions using multiple cytochrome P450 inhibition modeling, and determination of perpetrator-specific CYP isoform inhibition constants and fractional CYP isoform contributions to victim clearance. *J Pharm Sci.* **105**: 1307-1317 (2016).
- 13) Iga K, Kiriyama A. Simulations of cytochrome P450 3A4-mediated drug-drug interactions by simple two-compartment model-assisted static method. *J Pharm Sci.* **106**: 1426-1438 (2017).
- 14) Iga K, Kiriyama A. Usefulness of two-compartment model-assisted and static overall inhibitory-activity method for prediction of drug-drug interaction. *Biol*

- Pharm Bull.* 40: 2024–2037 (2017).
- 15) Obach RS, Ryder TF. Metabolism of ramelteon in human liver microsomes and correlation with the effect of fluvoxamine on ramelteon pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos.* 38: 1381–1391 (2010).
 - 16) Poulin P, Theil FP. Development of a novel method for predicting human volume of distribution at steady-state of basic drugs and comparative assessment with existing methods. *J Pharm Sci.* 98: 4941–4961 (2009).
 - 17) Lezmi S, Rokh N, Saint-Macary G, Pino M, Sallez V, Thevenard F, Roome N, Rosolen. Chloroquine causes similar electroretinogram modifications, neuronal phospholipidosis and marked impairment of synaptic vesicle transport in albino and pigmented rats. *Toxicology.* 308: 50–59 (2013).
 - 18) Fleuren HL, van Rossum JM. Nonlinear relationship between plasma and red blood cell pharmacokinetics of chlorthalidone in man. *J Pharmacokinet Biopharm.* 5: 359–375 (1977).
 - 19) Lampe JW, Bigler J, Bush AC, Potter JD. Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y), and UGT2B15(D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9: 329–333 (2000).
 - 20) Kazmi F, Barbara JE, Yerino P, Parkinson A. A long-standing mystery solved: the formation of 3-hydroxydesloratadine is catalyzed by CYP2C8 but prior glucuronidation of desloratadine by UDP-glucuronosyltransferase 2B10 is an obligatory requirement. *Drug Metab Dispos.* 43: 523–533 (2015).
 - 21) Backman JT, Filppula AM, Niemi M², Neuvonen PJ. Role of cytochrome P450 2C8 in drug metabolism and interactions. *Pharmacol Rev.* 68: 168–241 (2016).
 - 22) Lennernäs H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet.* 42: 1141–1160 (2003).
 - 23) Cantrill C, Houston JB. Understanding the interplay between uptake and efflux transporters within in vitro systems in defining hepatocellular drug concentrations. *J Pharm Sci.* 106: 2815–2825 (2017).
 - 24) He J, Qiu Z, Li N, Yu Y, Lu Y, Han D, Li T, Zhao D, Sun W, Fang F, Zheng J, Fan H, Chen X. Effects of SLCO1B1 polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide in healthy Chinese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 67: 701–707 (2011).