

ヒト肝代謝クリアランスの *in vitro* 試験から  
の予測に関する新規方法論構築

森田 圭一

# 目次

論文目録.....	3
略語一覧.....	4
序論.....	6
第1章 HLMsを用いたIVIVEにおける変動要因.....	11
1.1. 緒言.....	12
1.2. 調査.....	14
1.2.1. HLMsの $CL_{int}$ ( $CL_{int,u}$ ).....	14
1.2.2. 生理学的パラメータ.....	14
1.2.3. ヒト <i>in vivo</i> 全身クリアランス.....	14
1.3. 結果.....	15
1.3.1. HLMsの $CL_{int}$ ( $CL_{int,u}$ ).....	15
1.3.2. 生理学的パラメータ.....	19
1.3.3. ヒト <i>in vivo</i> 全身クリアランス.....	19
1.4. 考察.....	21
第2章 CYP3A基質を用いた <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> $CL_{int}$ の検証.....	23
2.1. 緒言.....	24
2.2. 方法.....	25
2.2.1. 実験材料および試薬.....	25
2.2.2. <i>In vitro</i> $CL_{int}$ .....	25
2.2.3. <i>In vivo</i> $CL_{int}$ .....	29
2.2.4. IVIVE (Physiologically based Scaling).....	31
2.3. 結果.....	32

2.3.1.	<i>In vitro</i> CL <sub>int</sub> .....	32
2.3.2.	<i>In vivo</i> CL <sub>int</sub> .....	36
2.3.3.	IVIVE (Physiologically based Scaling) .....	38
2.4.	考察.....	41
第3章	スケーリングファクターを用いた新規方法論の検証.....	43
3.1.	緒言.....	44
3.2.	方法.....	45
3.2.1.	スケーリングファクターの定義.....	45
3.2.2.	スケーリングファクターおよび midazolam の CL <sub>int, u</sub> 値による補正.....	46
3.3.	結果.....	48
3.3.1.	スケーリングファクターの定義.....	48
3.3.2.	スケーリングファクターおよび midazolam の CL <sub>int, u</sub> 値による補正.....	48
3.4.	考察.....	52
総括	.....	54
謝辞	.....	58
引用文献	.....	59

## 論文目録

本論文の内容は以下の原著論文に基づいたものである。

Keiichi Morita, Motohiro Kato, Toshiyuki Kudo, Kiyomi Ito

*In vitro-in vivo* extrapolation of metabolic clearance using human liver microsomes: factors showing variability and their normalization

Xenobiotica 50 (9): 1064-1075 (2020)

## 略語一覧

CL <sub>h</sub>	hepatic clearance、肝クリアランス
CL <sub>int</sub>	intrinsic clearance、代謝固有クリアランス
CL <sub>int, u</sub>	intrinsic clearance corrected by unbound fraction、 非結合形分率補正代謝固有クリアランス
CL <sub>int, u, vivo</sub>	<i>in vivo</i> 試験から求めた肝代謝固有クリアランス
CL <sub>r</sub>	renal clearance、腎クリアランス
CL <sub>tot, b</sub>	systemic blood clearance、全身血液クリアランス
CL <sub>tot, p</sub>	systemic plasma clearance、全身血漿クリアランス
CYP	cytochrome P450、チトクロム P450
DMSO	dimethyl sulfoxide、ジメチルスルホキシド
f <sub>B</sub>	unbound fraction in blood、血中非結合形分率
f <sub>e</sub>	urinary excretion ratio of unchanged drug、尿中未変化体排泄率
f <sub>u, mic</sub>	microsomal unbound fraction、マイクロゾーム非結合形分率
HLMs	human liver microsomes、ヒト肝マイクロゾーム
HPLC	high performance liquid chromatography、 高速液体クロマトグラフィー
IVIVE	<i>in vitro-in vivo</i> extrapolation、 <i>in vitro-in vivo</i> 補外
LC/MS/MS	high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry、 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置
MPPGL	microsomal protein per gram of liver、 肝臓 1 g あたりのマイクロゾーム蛋白量
MS/MS	tandem mass spectrometry、タンデム質量分析装置

NADPH	nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form、 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸
$Q_h$	hepatic blood flow、肝血流速度
$R_B$	blood-to-plasma concentration ratio、血液/血漿中濃度比

## 序論

医薬品開発において開発候補薬物のヒト投与量を予測することは、製造および臨床試験計画の観点から極めて重要であり、早期段階かつ精度の高い方法が求められている。

ヒト予測投与量は以下により表される。

$$\text{ヒト予測投与量} = \text{有効 AUC} \times \frac{\text{全身クリアランス}}{\text{バイオアベイラビリティ}}$$

ここで AUC は血中濃度時間曲線下面積であり、動物実験などから薬効を示す有効値（有効 AUC）が、有効血中濃度などと併せ、予測される。ヒト投与量を予測するためにはこのファクターに加え、全身クリアランスやバイオアベイラビリティ（生物学的利用率）といったヒトの薬物動態学的パラメータの見積もりが必要となる。全身クリアランスは各臓器の薬物排泄能力の総和であり、腎臓から排泄される腎排泄クリアランス、肝臓で代謝あるいは胆汁排泄される肝代謝/排泄クリアランスなどが主に知られ、その総和をさす。バイオアベイラビリティは循環血に到達するまでの振り分け効率であり、静脈内投与薬物の場合は 1 であるが、経口投与薬物においては、1)消化管に到達し消化管上皮細胞に取り込まれる効率 ( $F_a$ )、2)消化管上皮細胞内での代謝を逃れ門脈に移行する効率 ( $F_g$ )、3)肝臓を 1 回通過して代謝、排泄を逃れる効率 ( $F_h$ ) の 3 者の積で表される[1]。  $F_h$  の値は肝代謝/排泄クリアランスおよび肝血流量 (hepatic blood flow;  $Q_h$ ) から算出される[1]。

全身クリアランスに関し、一般に水溶性であり分子量が比較的小さい薬物は腎排泄クリアランスが占める割合が大きいが、近年開発される医薬品は脂溶性が高く分子量が大きいものが増えており、肝代謝クリアランスが占める割合が大きい。そのため、医薬品開発企業において肝代謝クリアランス予測が不可欠となっている。ヒトクリアランス予測法は用いるデータの観点から表 1 のように分類される。動物データを用いた主な方法としてアロメトリック式に当てはめるアロメトリックスケーリング（薬物動態パラメー

タが体重のべき乗に比例するという考え) が知られており、体重以外にも補正項を導入した精度向上が試みられている[2, 3]。アロメトリックスケーリングは経験則であり、特に代謝に関してはヒトと動物の種差が大きいことから、代謝クリアランス予測には理論的なアプローチが望まれてきた。その中で近年、ヒト由来試料が使用できるようになった歴史的背景から、*in vitro-in vivo* 補外 (*in vitro-in vivo* extrapolation; IVIVE) [4]が多用されるようになってきた。さらに、ヒト由来試料を用いた IVIVE に動物データの補正項を導入する方法も報告されている[5, 6]。

表 1 ヒトクリアランス予測法の種類

データ	<i>in vitro/in vivo</i>	方法
動物	<i>in vivo</i>	アロメトリックスケーリングなどの経験則
ヒト	<i>in vitro</i>	ヒト由来試料を用いた IVIVE
ヒト/動物	<i>in vitro/in vivo</i>	ヒト由来試料を用いた IVIVE を動物データで補正

IVIVE で肝代謝クリアランスを予測する場合、主なヒト由来試料として肝細胞画分や肝細胞が知られており、ともに複数の市販品が購入可能である。肝薬物代謝酵素では酸化代謝酵素であるチトクロム P450 (cytochrome P450; CYP) が代表的であり、最も多くの研究が行われている。CYP は小胞体に多く局在しており、肝細胞画分のマイクロゾームに回収されてくるため、CYP 代謝を想定した肝代謝クリアランス予測ではヒト肝マイクロゾーム (human liver microsomes; HLMs) が広く使用されている[7, 8]。CYP 代謝を想定した HLMs による肝代謝クリアランス評価は、医薬品開発における創薬初期段階から候補化合物選定後の開発段階に至る広いステージで実施されている (図 1)。第一段階として、*in vitro* 条件下で代謝実験から HLMs の代謝固有クリアランス (intrinsic clearance;  $CL_{int}$ ) を算出する方法として複数の実験法がある[7, 9]。創薬初期段階では代謝経路や生



成代謝物が不明であることが多く、簡易的に化合物の未変化体減少を経時的に測定し、HLMs の  $CL_{int}$  を求める方法が一般的である (Substrate depletion approach)。一方、開発段階では選定された候補化合物の代謝経路が明らかとなり、代謝物生成から HLMs の  $CL_{int}$  を求めることが可能となる。代謝物が利用できない創薬初期段階において Substrate depletion approach による簡易的かつ精度の高い方法が確立されれば、ヒト肝代謝クリアランス予測への貢献は大きい。

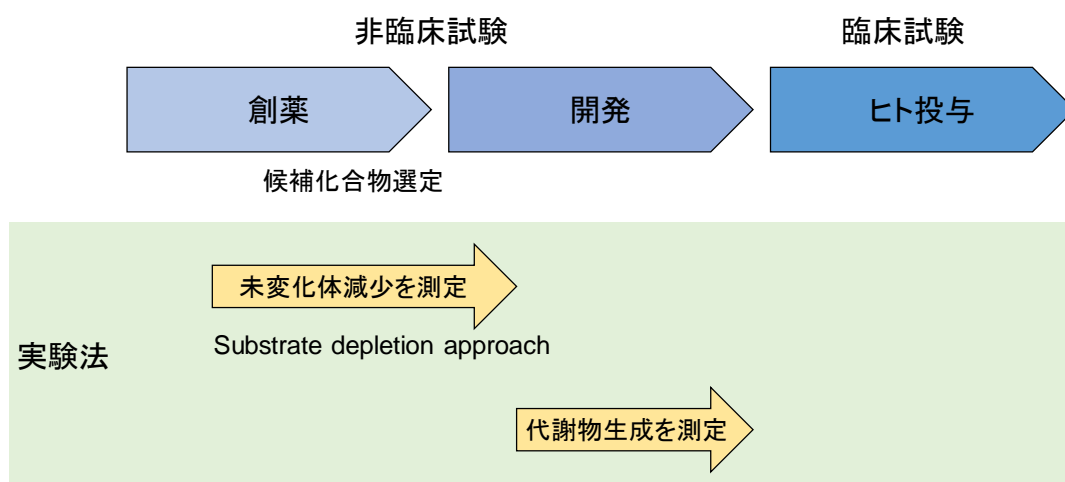


図 1 医薬品開発における肝代謝クリアランス評価 (HLMs の  $CL_{int}$  算出)

HLMs を用いた IVIVE の考え方は以下のように示される (図 2)。 *In vitro* 試験から求めた HLMs の  $CL_{int}$  は生理学的パラメータを用いて、肝全体の肝代謝固有クリアランス (*in vivo*  $CL_{int}$ ) に変換するスケールアップを行う。得られた *in vivo*  $CL_{int}$  は、肝モデルを用い、実際の生体内を反映する肝クリアランス (hepatic clearance;  $CL_h$ ) に変換される。一方、IVIVE の予測精度を検証するためには、実際のヒト  $CL_h$  との比較が必要であるが、ヒト *in vivo* 全身クリアランスのデータがある場合はこの値から  $CL_h$  への変換が可能である。HLMs を用いた IVIVE 手法は過去数十年にわたり使用される間、経験則を用いた方法 (*in vitro/in vivo* 回帰分析より求めたスケールアップ因子で補正) [6]だけではなく

mechanistic な方法（肝モデルにおける化合物の非結合形分率を補正）[10]など、予測精度改善に関わる研究が続けられているが、*in vitro* と *in vivo* から求めた値のギャップは存在し、その理由は完全に解明されていない[11, 12]。IVIVE は図 2 で示した手順に沿って行われているが、このプロセスにおいても解決すべき問題はある。すなわち、*in vitro* 試験条件やスケールアップに用いる生理学的パラメータ値は標準化されておらず、同一化合物においても異なる予測値が得られる。さらに、予測精度を検証する際に用いるヒトの全身クリアランスデータも標準化されていない。このように、IVIVE のプロセスには複数の変動要因が存在するが、この差にフォーカスし、特定の化合物で詳細な検討は実施されていない。今回 CYP 分子種の中でも肝臓に最も多く含まれ、ヒトで多くの薬物の代謝に関与している CYP3A [13]の基質を用いて検討を行うこととした。

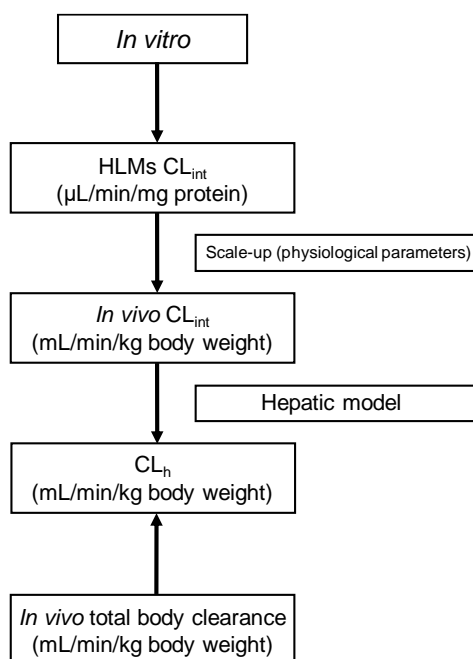


図 2 HLMs を用いた IVIVE

HLMs  $CL_{int}$  : ヒト肝マイクロゾーム代謝固有クリアランス、*In vivo*  $CL_{int}$  : 肝代謝固有クリアランス、 $CL_h$  : 肝クリアランス、*In vivo* total body clearance : *in vivo* 全身クリアランス

## 目的

本研究では、HLMs を用いた IVIVE のプロセスにおける変動要因に着目し、それらの補正を可能とする新規方法論構築に関する検討を行った。

1. HLMs を用いた IVIVE のプロセスにおける 3 つの変動要因に関し、文献報告値からその変動幅について調査を行った。
2. 2 つの変動要因について CYP3A 基質を用いた *in vitro* 代謝実験 (Substrate depletion approach) および多数の *in vivo* 文献データ収集を行い、*in vitro* と *in vivo* の  $CL_{int}$  比較を行った。
3. 新規方法論構築を目的とし、変動要因を補正するためのスケーリングファクターを定義した。さらに本実験以外の *in vitro* 代謝試験結果を用い、スケーリングファクターにさらなる補正を加えた新規方法の有用性を検討した。

## 第 1 章 HLMs を用いた IVIVE における変動要因

## 1.1. 緒言

HLMs を用いた IVIVE のプロセスには複数の変動要因が存在し、同一化合物においても異なる結果が得られる。本章では 3 つの変動要因に着目した (図 3)。

第一に、*in vitro* 代謝試験から求める HLMs の  $CL_{int}$  がある。この値は、用いる HLMs バッチや反応液組成といった *in vitro* 試験条件の影響を受ける。HLMs は複数ドナーから調製された市販品が入手可能であるが、これらのプールドバッチにおいても酵素活性のバッチ間差は存在する。また、反応液中の緩衝液や基質溶解に用いる有機溶媒組成の違いが CYP で代謝される化合物の  $CL_{int}$  や活性値に影響を及ぼすことが報告されている[14-17]。さらに、Obach は IVIVE の *in vitro* 代謝試験におけるマイクロゾームの非特異結合と非結合形分率補正の重要性を報告しており[18]、HLMs の  $CL_{int}$  は通常、非結合形分率補正代謝固有クリアランス (intrinsic clearance corrected by unbound fraction;  $CL_{int, u}$ ) として求められる。非結合形分率補正の方法の違いは  $CL_{int, u}$  の値に影響を及ぼすと考えられる。

第二に、*in vitro* 代謝試験から求めた HLMs の  $CL_{int}$  を肝全体の *in vivo*  $CL_{int}$  に変換するための生理学的パラメータがある。肝臓 1 g あたりのマイクロゾーム蛋白量 (microsomal protein per gram of liver; MPPGL) および肝重量が生理学的パラメータとして用いられるが、これら 2 つのパラメータとして用いる値の違いが予測値に影響を与える。

第三に、IVIVE の予測精度を検証するために用いられるヒト *in vivo* 全身クリアランスがある。健康成人のデータにおいても個体間差が認められ、使用される臨床データは標準化されていない。また、薬物によってはデータ利用が患者母集団のみに制限される場合も考えられる。

以上、HLMs を用いた IVIVE のプロセスの 3 つの変動要因について実際にどの程度の変動幅があるか、本章では文献調査より明らかにした。

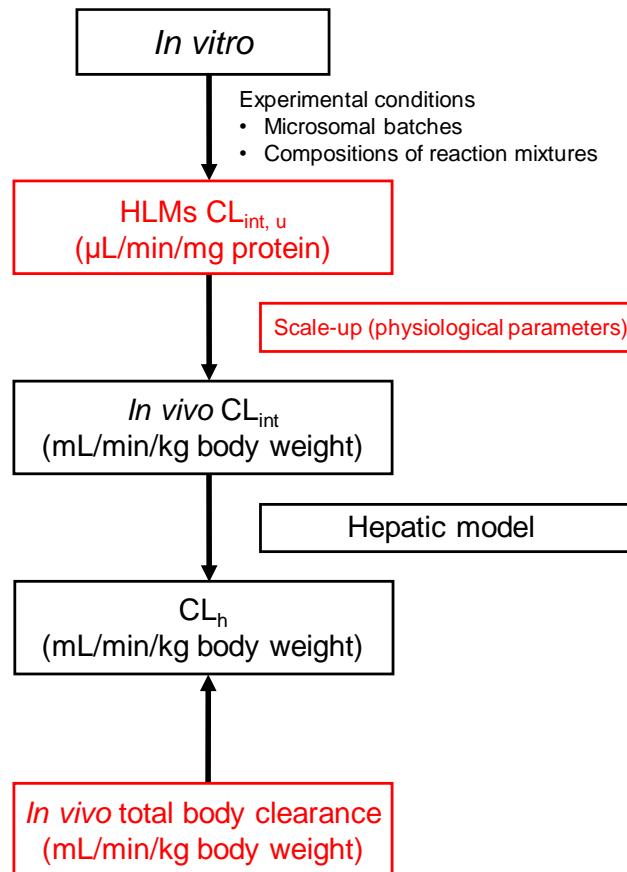


図 3 HLMs を用いた IVIVE (本研究で着目した変動要因を赤字で示す)

HLMs  $CL_{int, u}$  : ヒト肝マイクロゾーム非結合形分率補正代謝固有クリアランス、*In vivo*  $CL_{int}$  : 肝代謝固有クリアランス、 $CL_h$  : 肝クリアランス、*In vivo* total body clearance : *in vivo* 全身クリアランス

## 1.2. 調査

### 1.2.1. HLMs の $CL_{int, u}$

CYP3A 基質として、高  $CL_{int}$  基質 (midazolam、nifedipine)、中  $CL_{int}$  基質 (diltiazem、quinidine)、低  $CL_{int}$  基質 (alprazolam、clonazepam) を選択した。Midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine、alprazolam の HLMs における  $CL_{int}$  に占める CYP3A 寄与率はそれぞれ 92%、95%、79%、93%、62% である[19] (clonazepam は不明)。各基質について HLMs を用いた代謝実験 (Substrate depletion approach) から HLMs の  $CL_{int}$  あるいは  $CL_{int, u}$  が算出されている場合、その値を文献から収集した。HLMs は個別ドナーではなく、複数ドナーから調製されているバッチを使用している実験に限った。HLMs のプールドドナー数および購入元も調査した。 $CL_{int, u}$  が算出されている場合はマイクロソーム非結合形分率 (microsomal unbound fraction;  $f_{u, mic}$ ) の値も調査した。併せて、反応液中の緩衝液および有機溶媒組成についても調査した。

### 1.2.2. 生理学的パラメータ

HLMs の  $CL_{int, u}$  をスケールアップする際に用いる MPPGL および肝重量の値を文献から収集した。

### 1.2.3. ヒト *in vivo* 全身クリアランス

CYP3A 基質 (midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine) について、HLMs を用いた IVIVE を行っている文献を収集し、その中から予測精度検証に用いたヒトの全身血漿クリアランス (systemic plasma clearance;  $CL_{tot, p}$ ) の値が確認できるものをピックアップした。併せて、 $CL_{tot, p}$  の引用元 (reference あるいは dataset 数) についても調査した。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. HLMs の $CL_{int}$ ( $CL_{int, u}$ )

調査結果を表 2 に示す。Clonazepam に関しては文献から HLMs の  $CL_{int}$  算出値を収集することができなかった。その他 5 基質における HLMs の  $CL_{int, u}$  に関し、midazolam では最大 4 倍程度の差が実験あるいは HLMs バッチ間で認められた。Nifedipine、diltiazem、quinidine においても最大 2~5 倍程度の差が実験あるいは HLMs バッチ間で認められた。HLMs のプールドドナー数は購入元により異なっており、記載があるもので 6~60 個体の範囲内であった。 $f_{u, mic}$  算出は実測あるいはモデル式からの予測で行われていたが、 $f_{u, mic}$  が算出されておらず  $CL_{int}$  で示されている報告もあった。反応液中の緩衝液組成に関し、記載があるものはすべてリン酸緩衝液であり、その多くが 0.05~0.1 M であった。反応液中における基質溶解に用いる有機溶媒は dimethyl sulfoxide (DMSO)、acetonitrile、methanol あるいはその混液であり、反応液中割合はいずれも 1%以下であった。



表 2 文献における HLMs の  $CL_{int}$  値および実験条件

基質	HLMs のプールドドナー数 (購入元) <sup>b</sup>	$CL_{int}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	$f_{u, mic}$ (protein concentration; $\text{mg}/\text{mL}$ )	$CL_{int, u}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	反応液中有機溶媒	反応液中緩衝液 <sup>c</sup>	Reference
Midazolam	>30 (BD)	290.5	NT	NC	UNK	0.1 M phosphate	[20]
	UNK (Xenotech)	UNK	UNK	390	0.5% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN}$	0.05 M phosphate	[21]
	50 (Xenotech)	UNK	UNK	389	0.5% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN}$	0.05 M phosphate	[22]
	50 (BD)	410	NT	NC	UNK	0.05 M phosphate	[23]
	60 (UNK)	196	0.88 (0.71)	223	1% (v/v) DMSO	0.1 M phosphate	[24]
	33 (BD)	353	Predicted	UNK	UNK	UNK	[25]
	22 (BD)	UNK	UNK <sup>a</sup>	264	0.1% (v/v) $\text{CH}_3\text{OH}$	0.1 M phosphate	
	50 (BD)	UNK	UNK <sup>a</sup>	419	0.1% (v/v) $\text{CH}_3\text{OH}$	0.1 M phosphate	[26]
	33 (BD)	UNK	UNK <sup>a</sup>	589	0.1% (v/v) $\text{CH}_3\text{OH}$	0.1 M phosphate	
	16 (Xenotech)	UNK	Predicted	828	0.25% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN}$ /0.01% (v/v) DMSO	0.1 M phosphate	[27]
	UNK (BD)	253	NT	NC	0.015% (v/v) DMSO/0.01% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN}$	0.1 M phosphate	[28]
	11 (BD)	640	NT	NC	UNK	0.1 M phosphate	[29]
	6 (UNK)	178	0.88 (1.0)	202	UNK	0.025 M phosphate	[30]
Nifedipine	>30 (BD)	191.9	NT	NC	UNK	0.1 M phosphate	[20]
	UNK (Xenotech)	UNK	UNK	160	0.5% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN}$	0.05 M phosphate	[21]

	50 (Xenotech)	UNK	UNK	159	0.5% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.05 M phosphate	[22]
	50 (BD)	210	NT	NC	UNK	0.05 M phosphate	[23]
	33 (BD)	96	Predicted	UNK	UNK	UNK	[25]
	22 (BD)	UNK	UNK <sup>a</sup>	295	0.1% (v/v) CH <sub>3</sub> OH	0.1 M phosphate	
	50 (BD)	UNK	UNK <sup>a</sup>	264	0.1% (v/v) CH <sub>3</sub> OH	0.1 M phosphate	[26]
	33 (BD)	UNK	UNK <sup>a</sup>	341	0.1% (v/v) CH <sub>3</sub> OH	0.1 M phosphate	
	UNK (Xenotech)	UNK	UNK	81	0.5% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.05 M phosphate	[21]
	50 (Xenotech)	UNK	UNK	65	0.5% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.05 M phosphate	[22]
	60 (UNK)	39	0.72 (0.71)	54	1% (v/v) DMSO	0.1 M phosphate	[24]
	33 (BD)	31	Predicted	UNK	UNK	UNK	[25]
	UNK (BD)	18	NT	NC	0.015% (v/v) DMSO/0.01% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.1 M phosphate	[28]
Diltiazem	15 (Human Biologics International)	94	0.863 (0.2)	109	1% (v/v) CH <sub>3</sub> OH	0.1 M phosphate	[5]
	UNK (IIAM or IVT)	56	NT	NC	1% (v/v) DMSO or CH <sub>3</sub> CN	0.1 M phosphate	
	UNK (IIAM or IVT)	22	NT	NC	1% (v/v) DMSO or CH <sub>3</sub> CN	0.1 M phosphate	[31]
	UNK (IIAM or IVT)	22	NT	NC	1% (v/v) DMSO or CH <sub>3</sub> CN	0.1 M phosphate	
	6 (UNK)	17	0.76 (2.0)	22	UNK	0.025 M phosphate	[30]

Quinidine	UNK (Xenotech)	<18	UNK	NC	0.5% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.05 M phosphate	[21]
	50 (Xenotech)	UNK	UNK	19	0.5% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.05 M phosphate	[22]
	60 (UNK)	<7	1 (0.71)	NC	1% (v/v) DMSO	0.1 M phosphate	[24]
	33 (BD)	25	Predicted	UNK	UNK	UNK	[25]
	UNK (BD)	16	NT	NC	0.015% (v/v) DMSO/0.01% (v/v) CH <sub>3</sub> CN	0.1 M phosphate	[28]
	6 (UNK)	4	0.32 (5.0)	12	UNK	0.025 M phosphate	[30]
Alprazolam	>30 (BD)	NC	NT	NC	UNK	0.1 M phosphate	[20]
	60 (UNK)	<7	0.46 (0.71)	NC	1% (v/v) DMSO	0.1 M phosphate	[24]
	6 (UNK)	2	0.66 (5.0)	3	UNK	0.025 M phosphate	[30]

UNK : 不明、NC : 算出せず、NT : 試験未実施、Predicted : 以下式より予測[32]:  $\frac{1}{1+P \times 10^{0.072 \times \log P/D^2 + 0.067 \times \log P/D - 1.126}}$ 。P はマイクロゾーム蛋白濃

度を表し、log P/D は diltiazem および quinidine では log P 値、midazolam および nifedipine では log D 値を用いている。

<sup>a</sup> プールドドナー数 22 個体の HLMs からのみ値を求めている。

<sup>b</sup> BD; BD Biosciences, IIAM; International Institute for the Advancement of Medicine, IVT; In Vitro Technologies

<sup>c</sup> pH は 7.4 – 7.5 に調整している。

### 1.3.2. 生理学的パラメータ

調査結果を表 3 に示す。

ヒト MPPGL に関し、報告値で最大 10 倍程度の大きな差が認められた。算出に用いられている肝試料数は報告により異なっていた。Barter らのメタアナリシスでは、加重幾何平均値（加重算術平均値）は 32 mg protein/g liver（34 mg protein/g liver）であり、IVIVE において一般的に使用されている値（45 mg protein/g liver）よりも低い傾向にあった[33]。上記メタアナリシスで検討されたドナーの大部分は Caucasian である。一方、128 例の肝試料（Chinese ドナー）を用いて算出された平均値は 39.46 mg protein/g liver であり、試料間で最大 19 倍の値の差が認められている[34]。

ヒト肝重量に関しては報告間で大きな差は認められなかった。1,500 g liver [8]、1,613.6 g liver [35]、1,800 g liver/70 kg body weight [36]の報告があった。

### 1.3.3. ヒト *in vivo* 全身クリアランス

調査結果を表 4 に示す。Midazolam、quinidine では IVIVE の検討を行っている文献間で  $CL_{tot, p}$  の値にそれぞれ最大 2.5、1.8 倍の差が認められた。一方、nifedipine、diltiazem では文献間で値に大きな差は認められなかった。各文献で使用している  $CL_{tot, p}$  の引用元に関しては、大部分が 1~2 種類の reference/dataset を使用していたが、midazolam では多くの reference/dataset を用いている例もあった。

表 3 HLMs の  $CL_{int,u}$  をスケールアップする際に用いる生理学的パラメータ値の範囲

生理学的パラメータ	値の範囲	Reference
肝臓 1 g あたりのマイクロゾーム蛋白量 (MPPGL) (mg protein/g liver)	7 — 77	[33, 34, 37]
肝重量 <sup>a</sup> (g liver/kg body weight)	21.4 — 25.7	[8, 35, 36]

<sup>a</sup>体重は 70 kg として算出した。

表 4 HLMs の IVIVE で用いられているヒト *in vivo* 全身クリアランス値

$CL_{tot,p}$ (mL/min/kg body weight)				Reference
Midazolam	Nifedipine	Diltiazem	Quinidine	
6.4 (1)	-	12.0 (1)	2.5 (1)	[10]
11.4 (1)	-	13.0 (1)	4.5 (1)	[24]
6.5 (2)	8.1 (1)	12.0 (1)	4.0 (1)	[38]
5.3 (1)	7.3 (1)	13.0 (1)	4.0 (1)	[25]
7.0 (22)	-	-	-	[27]
6.6 (1)	-	-	-	[39]
4.6 <sup>a</sup> (1)	-	12.0 <sup>a</sup> (1)	2.5 <sup>a</sup> (2)	[30]

括弧内は reference あるいは dataset 数を表す。

<sup>a</sup>非腎クリアランスを表す。

#### 1.4. 考察

HLMsを用いたIVIVEにおける3つの変動要因について、その変動幅を明らかにした。

HLMsの $CL_{int,u}$ に関しては、使用するHLMsのバッチ、反応液組成、 $f_{u,mic}$ の差が変動因子になると推察される(表2)。HLMsのバッチ間差について、今回調査した文献はいずれもプールドバッチであったが、調製ドナー数は異なっている。BD Biosciences社資料によると、300以上のドナーから単離されたHLMsを用いてCYP3A活性を測定した結果、正規分布時のCV値は85%であり、モンテカルロ法で計算したCV値はプールサイズが増加するに従って減少していき、150ドナーを超えると横ばいになる傾向がある。今回調査したHLMsのプールドドナー数は最大で60ドナーであった。調製ドナー数に加え、購入元による調製法相違もバッチ間差を生じる要因になりうると考えられる。反応液組成に関しては、緩衝液と基質溶解に用いる有機溶媒に着目した。リン酸緩衝液濃度がCYP3Aに及ぼす影響については、HLMsの $CL_{int}$ 値が0.1Mの場合と比較し、0.05Mでは77%、0.01Mでは24%に低下するとの報告がある[15]。今回の調査では、記載があるものはすべてリン酸緩衝液であり、その多くが0.05~0.1Mであったが、変動因子となる点は留意が必要である。反応液中の有機溶媒組成がCYP3Aに及ぼす影響については、CYP3A4発現系活性が1% DMSOおよびacetonitrileでそれぞれ43%および11%阻害されるとの報告がある[14]。今回の調査では1% DMSO使用例もあり、HLMsの $CL_{int}$ 低下への影響が大きいと考えられる。活性への影響が少ない有機溶媒を用いることが推奨されるが、化合物溶解度やスループットの観点から統一されておらず、変動因子となる点は留意が必要である。 $f_{u,mic}$ に関しては、物性に基づきモデル式から予測する方法が複数提唱されている[32, 40, 41]が、脂溶性の高い化合物の予測精度は不十分であることが近年報告されている[42]。 $f_{u,mic}$ の算出法については完全に標準化されておらず、IVIVEにおいてもモデル式から予測する場合と実験から実測値を算出する場合が混在している。

生理学的パラメータに関しては、ヒトMPPGLで大きな差が認められた(表3)。要因

のひとつとして、MPPGL の個体間差が大きく、各報告の平均値算出に使用されている例数の違いが考えられた。1.3.2.項で示したようにメタアナリシスや例数の多い報告では値の差は大きくなかった。Barter らは、MPPGL を既報の 21、45、77 mg protein/g liver およびメタアナリシスの加重算術平均値 (34 mg protein/g liver) に変更した場合の 21 薬物の経口クリアランスの IVIVE 予測精度を比較するとともに、MPPGL の値の差が予測絶対値に与えるインパクトを指摘している[33]。IVIVE に用いられる肝重量含めた生理学的パラメータが完全には標準化されておらず、変動要因となる。

ヒト *in vivo* 全身クリアランスに関しては、実際の IVIVE 検討に用いられていた  $CL_{tot,p}$  の値を調査したが、報告間で差が認められた (表 4)。特に、midazolam は CYP3A 基質として臨床薬物相互作用試験における指標薬として推奨されており[43]、臨床試験データ数は多い。 $CL_{tot,p}$  の引用元として 1~2 種類の reference/dataset を使用している場合が多かったが、midazolam のように臨床試験データ数が多い薬物は引用元による変動が生じる。十分な臨床試験データ (母集団) からの平均値を引用するなど標準化が重要である。

## 第2章 CYP3A 基質を用いた *in vitro* と *in vivo* $CL_{int}$ の検証



## 2.1. 緒言

1章において、HLMsを用いたIVIVEの3つの変動要因の変動幅を文献調査により明らかにした。これらの差は肝代謝クリアランス予測値や予測精度検証に影響を及ぼすと考えられる。変動要因のさらなる検証のため、3つの変動要因のうち2つ(HLMsの $CL_{int,u}$ およびヒト *in vivo* 全身クリアランス)について既知のCYP3A基質を用いた代謝実験と多数の文献データ収集を行い、*in vitro* および *in vivo* から求めた $CL_{int}$ 値の比較を行った。変動要因であるHLMsの $CL_{int,u}$ については実際に代謝実験を行い、もうひとつの変動要因であるヒト *in vivo* 全身クリアランスについてはより多くのデータから平均値を求めることで適切な *in vitro* と *in vivo* の比較が可能と考えた。

まず、HLMsを用いた代謝実験からCYP3A基質の $CL_{int,u}$ 値を算出した。本実験では反応液中の緩衝液および有機溶媒組成を一律にし、 $f_{u,mic}$ の値も実験より求めた。HLMsは4バッチ用意し、バッチ間差を評価した。

次に、代謝実験を行ったCYP3A基質について、多数のヒト文献データ収集を行い、*in vivo* 全身クリアランスの平均値を算出した。1章の文献調査から、IVIVEに用いられるヒト *in vivo* 全身クリアランス報告値には差が認められた。今回、より多くのデータから平均値を求め、その値から *in vivo*  $CL_{int}$  値を算出した。

最後に、*in vitro* から求めたHLMsの $CL_{int,u}$ は定法である生理学的パラメータを用いたスケールアップにより *in vivo*  $CL_{int}$  予測値に変換し、*in vivo* 全身クリアランスから求めた *in vivo*  $CL_{int}$  値との比較を行った。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 実験材料および試薬

Midazolam、nifedipine、diltiazem hydrochloride、alprazolam、clonazepam は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。Quinidine、(±)-verapamil hydrochloride は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form; NADPH) は Oriental Yeast (Tokyo, Japan) から購入した。その他の試薬や溶媒は市販の特級あるいは分析用を購入した。

Mixed-gender のプールド HLMs (24、50、50、150 ドナーから調製した 4 種類のプールドバッチ：各々 HLMs\_24、HLMs\_50a、HLMs\_50b、HLMs\_150 と表記) は BD Biosciences (Woburn, MA, USA) から購入した。各 HLMs のドナー性別は HLMs\_24 (男性 17 個体、女性 7 個体)、HLMs\_50a (男性 27 個体、女性 23 個体)、HLMs\_50b (男性 27 個体、女性 23 個体)、HLMs\_150 (男性 75 個体、女性 75 個体) であり、人種構成は HLMs\_24 (Caucasian 22 個体、African American 1 個体、Hispanic 1 個体)、HLMs\_50a (Caucasian 46 個体、African American 3 個体、Hispanic 1 個体)、HLMs\_50b (Caucasian 43 個体、African American 4 個体、Hispanic 2 個体、Asian 1 個体)、HLMs\_150 (Caucasian 150 個体) である。HLMs\_24 は各ドナーから異なる蛋白量割合で調製されているが、HLMs\_50a、HLMs\_50b、HLMs\_150 は全てのドナーから等しい蛋白量になるよう調製されている。

### 2.2.2. *In vitro* CL<sub>int</sub>

#### 2.2.2.1. 代謝安定性試験 (Substrate depletion approach)

ポリプロピレン製の 96 ウェルプレートを用い、反応液 (500  $\mu$ L) を 37°C でインキュベーションした。反応液組成 (最終濃度) は基質 (1  $\mu$ M)、potassium phosphate buffer (pH 7.4) (100 mM)、NADPH (1 mM)、HLMs (midazolam および nifedipine は 0.2 mg/mL、

diltiazem および quinidine は 0.5 mg/mL、alprazolam および clonazepam は 1 mg/mL) とした。基質溶媒には DMSO を用い、反応液中の最終濃度は 0.1% (v/v) となるようにした。37°C、5 分間プレインキュベーション後、NADPH 溶液を添加することにより反応を開始した。インキュベーションは 37°C triplicate で行った。反応液の採取時点は midazolam (0、3、5、10、15 分)、nifedipine (0、5、10、15、20 分)、diltiazem および quinidine (0、10、20、30、40 分)、alprazolam および clonazepam (0、15、30、45、60 分) とした。反応液の採取時点 (0 分) は NADPH 溶液を添加したときとした。各々の採取時点において、30  $\mu$ L の反応液を氷上の 96 ウェルプレート内の内部標準溶液 (100 ng/mL verapamil、溶媒 : DMSO/acetonitrile (1/9,999)) 90  $\mu$ L と混合し、反応を停止した。混合液を 96 ウェルフィルタープレート (0.45  $\mu$ m MultiScreen、Millipore Corp.、Billerica、MA、USA) に移し、4°C、500 g で 10 分間遠心操作を行った。遠心後のろ液全量を 60  $\mu$ L の精製水と混合し、試料として 10  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置 (high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry; LC/MS/MS) にインジェクションした。

#### 2.2.2.2. 平衡透析試験

平衡透析装置として Rapid Equilibrium Dialysis (RED) device (Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham、MA、USA) を使用した (透析膜分画分子量 :  $\sim$ 8,000)。各々の基質および HLMs について、代謝安定性試験 (2.2.2.1.項) と同一の組成溶液 (NADPH を除く) をポリプロピレンチューブに調製した。上記 HLMs 溶液 (200  $\mu$ L) および 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) (350  $\mu$ L) を RED device の試料側およびバッファー側チャンバーにそれぞれ添加し、チャンバーをプレートに装着した。実験は各々の基質および HLMs について triplicate で実施した。シーリングしたプレートを 37°C、800 rpm で 4 時間振とうした。振とう後、RED device の試料側およびバッファー側チャンバーから各々 30  $\mu$ L を

96 ウェルプレートに採取し、それぞれ 30  $\mu$ L の 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) およびブランク HLMs 溶液 (上記 HLMs 溶液において基質のかわりに DMSO を使用) と混合した。その後、内部標準溶液 (100 ng/mL verapamil、溶媒 : DMSO/acetonitrile (1/9,999)) 90  $\mu$ L と混合し、混合液を 96 ウェルフィルタープレート (0.45  $\mu$ m MultiScreen) に移し、4 $^{\circ}$ C、500 g で 10 分間遠心操作を行った。遠心後のろ液全量を 30  $\mu$ L の精製水と混合し、試料として 10  $\mu$ L を LC/MS/MS にインジェクションした。

### 2.2.2.3. 生体試料分析

LC/MS/MS 分析により分析試料中の化合物ピーク面積比を求めた。高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) およびタンデム質量分析装置 (tandem mass spectrometry; MS/MS) 分析条件を以下に示した。

#### HPLC 条件

HPLC 装置 : Shimadzu VP/10A series (Shimadzu Corporation、Kyoto、Japan)

分析カラム : Phenomenex Luna C18(2), 5  $\mu$ m, 2.0 mm I.D.  $\times$  50 mm L

(Phenomenex、Torrance、CA、USA)

移動相 (midazolam、nifedipine、diltiazem、alprazolam、clonazepam) :

(A) 0.1% v/v formic acid in purified water

(B) 0.1% v/v formic acid in acetonitrile

移動相 (quinidine) :

(A) 0.2% v/v ammonia solution\* in purified water

(B) 0.2% v/v ammonia solution\* in methanol

\*ammonia solution: 28% ammonia in water

流速 : 0.6 mL/min

グラジエント条件：

min	B%	gradient/linear
0	5	-
2	100	gradient
3	100	linear
3.5	5	gradient
4.5	5	linear

#### MS/MS 条件

MS/MS 装置：API4000 (AB/MDS SCIEX、Forester City、CA、USA)

イオン化法：Positive ionization electrospray

Selective reaction monitoring (*m/z*: precursor ion/product ion)：

midazolam (326.0/291.2)

nifedipine (346.9/315.2)

diltiazem (415.0/178.1)

quinidine (325.2/160.1)

alprazolam (308.9/281.1)

clonazepam (316.1/270.0)

verapamil (454.9/303.3) (内部標準物質)

#### 2.2.2.4. *In vitro* CL<sub>int</sub> の算出

代謝安定性試験の LC/MS/MS 分析から求めた内部標準物質に対する CYP3A 基質のピーク面積比を計算に用いた。代謝安定性試験における CYP3A 基質の未変化体残存率 (y 軸、%) をインキュベーション時間 (x 軸、min) に対し、片対数プロットした。未変化体残存率は 0 min のピーク面積比を 100% とし、各時点における割合を算出した。線形回

帰より傾きを求め、消失速度定数 ( $k_e$ ) とした。HLMs の  $CL_{int}$  を以下 (1) 式により算出した。

$$\text{HLMs の } CL_{int} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}) = 1,000 \times \frac{k_e (\text{min}^{-1})}{\text{HLMs 蛋白濃度 (mg protein/mL)}} \quad (1)$$

平衡透析試験の LC/MS/MS 分析から求めた内部標準物質に対する CYP3A 基質のピーク面積比から  $f_{u, mic}$  を以下 (2) 式により算出した。

$$f_{u, mic} = \frac{\text{バッファー側チャンバーサンプルのピーク面積比}}{\text{試料側チャンバーサンプルのピーク面積比}} \quad (2)$$

HLMs の  $CL_{int, u}$  を以下 (3) 式により算出した。

$$\text{HLMs の } CL_{int, u} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}) = \frac{\text{HLMs の } CL_{int}}{f_{u, mic} (\text{triplicate の平均値})} \quad (3)$$

### 2.2.3. *In vivo* $CL_{int}$

#### 2.2.3.1. *In vivo* $CL_{tot, p}$

*In vivo* 試験の結果から  $CL_{int}$  を算出するため、まず *in vivo* の  $CL_{tot, p}$  の算出を行った。 $CL_{tot, p}$  の算出にあたり、多数のヒト文献データ収集を行った。調査対象は、健康成人における静脈内投与時の値とした。性別は男女混合とし、患者や高齢者などの特殊集団は除外した。また、CYP3A 基質においては代謝クリアランスの明確な人種間差が報告されていないため、人種の除外規定は設けなかった。体重が明記されていない場合は 70 kg とし、 $CL_{tot, p}$  (mL/min/kg body weight) の算出を行った。各 CYP3A 基質について、各文献の値、文献間の算術平均値±標準偏差および中央値の算出を行った。また、全被験者の加重算術平均値を以下 (4) 式により算出した (文献数を  $n$  とする)。

加重算術平均値 =

$$\frac{(\text{文献 1 の平均値} \times \text{文献 1 の被験者数}) + (\text{文献 2 の平均値} \times \text{文献 2 の被験者数}) + \dots + (\text{文献 n の平均値} \times \text{文献 n の被験者数})}{\text{文献 1 の被験者数} + \text{文献 2 の被験者数} + \dots + \text{文献 n の被験者数}} \quad (4)$$

### 2.2.3.2. *In vivo* CL<sub>int</sub> の算出

2.2.3.1.項で算出した CL<sub>tot,p</sub> の文献間平均値から、全身血液クリアランス (systemic blood clearance; CL<sub>tot,b</sub>)、腎クリアランス (renal clearance; CL<sub>r</sub>)、CL<sub>h</sub> を以下 (5) (6) (7) 式により算出した。なお、算出に必要な血液/血漿中濃度比 (blood-to-plasma concentration ratio; R<sub>B</sub>)、尿中未変化体排泄率 (urinary excretion ratio of unchanged drug; f<sub>e</sub>) は報告値[44]を用いた。

$$CL_{\text{tot,b}} \text{ (mL/min/kg body weight)} = \frac{CL_{\text{tot,p}}}{R_B} \quad (5)$$

$$CL_r \text{ (mL/min/kg body weight)} = \frac{CL_{\text{tot,b}} \times f_e}{100} \quad (6)$$

$$CL_h \text{ (mL/min/kg body weight)} = CL_{\text{tot,b}} - CL_r \quad (7)$$

Microsoft Excel 2013 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) のゴールシーク機能を用い、dispersion モデルの以下 (8) (9) (10) 式により CL<sub>h</sub> から CL<sub>int</sub> を算出した。これを *in vivo* 試験から求めた肝代謝固有クリアランス (CL<sub>int,u,vivo</sub>) とした。dispersion number (D<sub>N</sub>) は 0.17 を用いた[45]。なお、算出に必要な Q<sub>h</sub> は 20.7 mL/min/kg body weight [36]、血中非結合形分率 (unbound fraction in blood; f<sub>B</sub>) は報告値[44]を用いた。

$$CL_h = Q_h \times \left\{ 1 - \frac{4a}{(1+a)^2 \exp\left[\frac{(a-1)}{2D_N}\right] - (1-a)^2 \exp\left[-\frac{(a+1)}{2D_N}\right]} \right\} \quad (8)$$

$$a = (1 + 4R_N \times D_N)^{1/2} \quad (9)$$

$$R_N = \frac{f_B \times CL_{int, u, vivo}}{Q_h} \quad (10)$$

#### 2.2.4. IVIVE (Physiologically based Scaling)

2.2.2.4.項で算出した HLMs の  $CL_{int, u}$  から定法である以下(11)式の Physiologically based Scaling により *in vivo*  $CL_{int}$  予測値を算出した。MPPGL および肝重量は一般的に使用されている値として 45 (mg protein/g liver) [33]および 25.7 (1,800 g liver/70 kg body weight) [36]を用いた。

$$\begin{aligned} &In\ vivo\ CL_{int}\ 予測値\ (mL/min/kg\ body\ weight) = \\ &個々の\ CYP3A\ 基質\ における\ HLMs\ の\ CL_{int, u}\ (mL/min/mg\ protein) \times \\ &MPPGL\ (mg\ protein/g\ liver) \times 肝重量\ (g\ liver/kg\ body\ weight) \end{aligned} \quad (11)$$

2.2.3.2.項で算出した  $CL_{int, u, vivo}$  と比較し、予測精度について検証した。



## 2.3. 結果

### 2.3.1. *In vitro* CL<sub>int</sub>

#### 2.3.1.1. 代謝安定性試験 (HLMs の CL<sub>int</sub> 算出)

代謝安定性試験では、4種類の異なる HLMs バッチを用い、CYP3A 基質における HLMs の CL<sub>int</sub> を求めた。Alprazolam および clonazepam については代謝安定性が高く、alprazolam の 60 分間インキュベーション後の未変化体残存率は 82~102% (HLMs\_24)、93~104% (HLMs\_50a)、90~107% (HLMs\_50b)、80~93% (HLMs\_150) であり、clonazepam は 95~123% (HLMs\_24)、94~102% (HLMs\_50a)、109~114% (HLMs\_50b)、92~110% (HLMs\_150) であった。両基質の triplicate で取得した未変化体残存率の値の変動は大きく、一次消失の指数関数にもフィッティングしなかったため、CL<sub>int</sub> は算出できなかった。

#### 2.3.1.2. 平衡透析試験 (f<sub>u, mic</sub> 算出)

平衡透析試験では、代謝安定性試験に用いた 4 種類の HLMs バッチを用い、f<sub>u, mic</sub> を求めた (表 5)。いずれの基質も値のバッチ間差は小さく、CV 値は 2.7% (quinidine) ~8.9% (alprazolam) であった。

表 5 4 種類の HLMs バッチで求めた CYP3A 基質における  $f_{u, mic}$  値

HLMs バッチ	基質					
	Midazolam	Nifedipine	Diltiazem	Quinidine	Alprazolam	Clonazepam
HLMs_24	0.79 ± 0.08	0.81 ± 0.02	0.84 ± 0.06	0.76 ± 0.07	0.90 ± 0.10	0.68 ± 0.04
HLMs_50a	0.84 ± 0.06	0.81 ± 0.01	0.79 ± 0.03	0.77 ± 0.01	0.85 ± 0.04	0.74 ± 0.03
HLMs_50b	0.87 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.86 ± 0.03	0.77 ± 0.03	0.80 ± 0.04	0.70 ± 0.01
HLMs_150	0.88 ± 0.04	0.77 ± 0.02	0.83 ± 0.09	0.81 ± 0.04	0.73 ± 0.03	0.69 ± 0.04
Mean ± SD (バッチ間)	0.85 ± 0.04	0.79 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.78 ± 0.02	0.82 ± 0.07	0.70 ± 0.03
CV (%) (バッチ間)	5.0	3.2	3.7	2.7	8.9	3.6

各 HLMs バッチの値は mean ± SD (n=3) を表す。Midazolam, nifedipine, diltiazem, quinidine, alprazolam, clonazepam の HLMs 濃度はそれぞれ 0.2, 0.2, 0.5, 0.5, 1, 1 mg/mL である。

### 2.3.1.3. *In vitro* CL<sub>int</sub> の算出 (HLMs の CL<sub>int, u</sub> 算出)

HLMs の CL<sub>int</sub> を算出することができた 4 基質 (midazolam, nifedipine, diltiazem, quinidine) について HLMs の CL<sub>int, u</sub> を算出した (図 4)。いずれの基質も値のバッチ間差は小さく、CV 値は 11% (diltiazem) ~19% (nifedipine) であった。4 基質いずれも HLMs\_24 が最も小さい値を示した。CYP3A 基質として最も共通に使用されている midazolam の値は 344 ~467  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  であり、平均値は 407  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  であった。

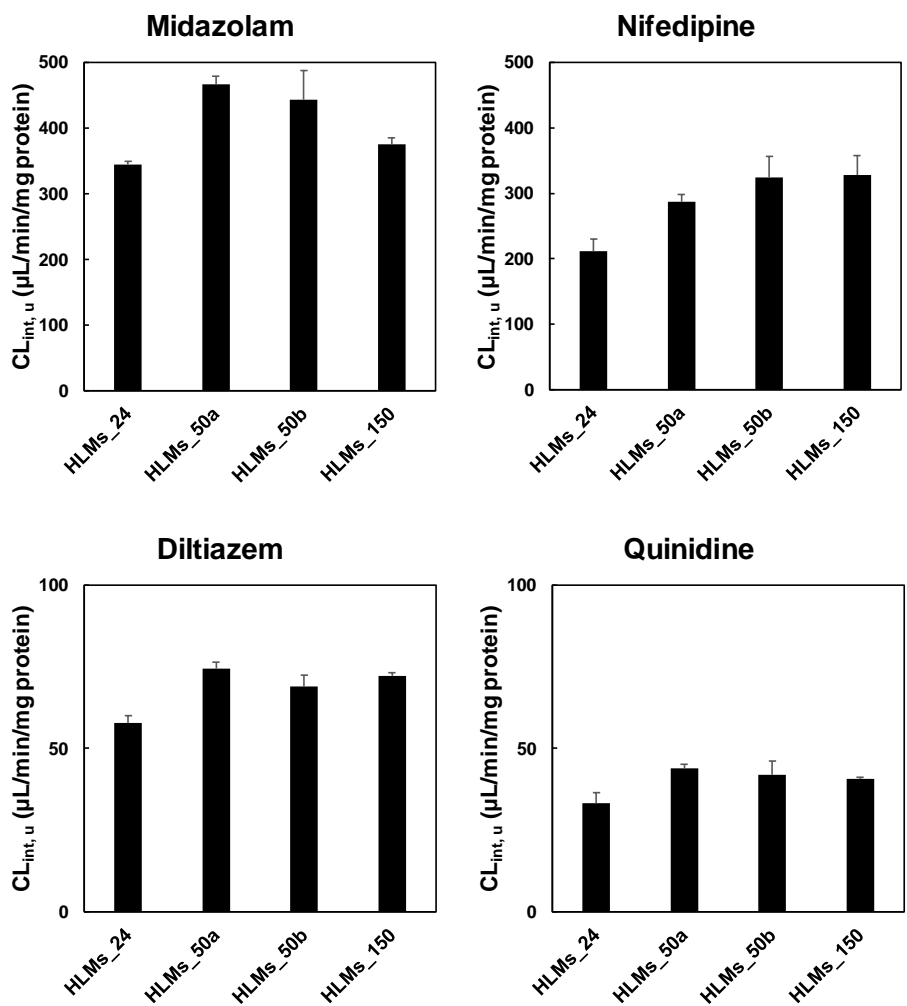


図 4 4 種類の HLMs バッチで求めた CYP3A 基質における HLMs の  $CL_{int,u}$  値

HLMs の  $CL_{int,u}$  値は、substrate depletion approach から求めた  $CL_{int}$  値および  $f_{u,mic}$  値（表 5）より算出した。

## 2.3.2. *In vivo* CL<sub>int</sub>

### 2.3.2.1. *In vivo* CL<sub>tot, p</sub>

4 基質 (midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine) について健康成人における静脈内投与時の CL<sub>tot, p</sub> を多くの文献から収集した。収集した文献数は midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine において、それぞれ 32、9、3、3 であった。各文献の値、文献間の平均値および中央値をプロットした (図 5)。各文献における被験者数は midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine において、それぞれ 5~99、5~23、3~10、5~14 人であり、全文献における総被験者数はそれぞれ 494、75、19、30 人であった。Midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine における CL<sub>tot, p</sub> の文献間平均値±標準偏差はそれぞれ 6.5±1.7、7.3±1.7、12.4±1.2、3.9±0.1 mL/min/kg body weight であった。特に、midazolam および nifedipine は文献間で約 3 倍の差が認められた。Midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine における CL<sub>tot, p</sub> の文献間中央値はそれぞれ 6.4、7.1、12.0、3.9 mL/min/kg body weight であり、平均値と近似した値であった。文献間平均値および全被験者の加重算術平均値は、いずれの基質も両方で近い値を示した (表 6)。

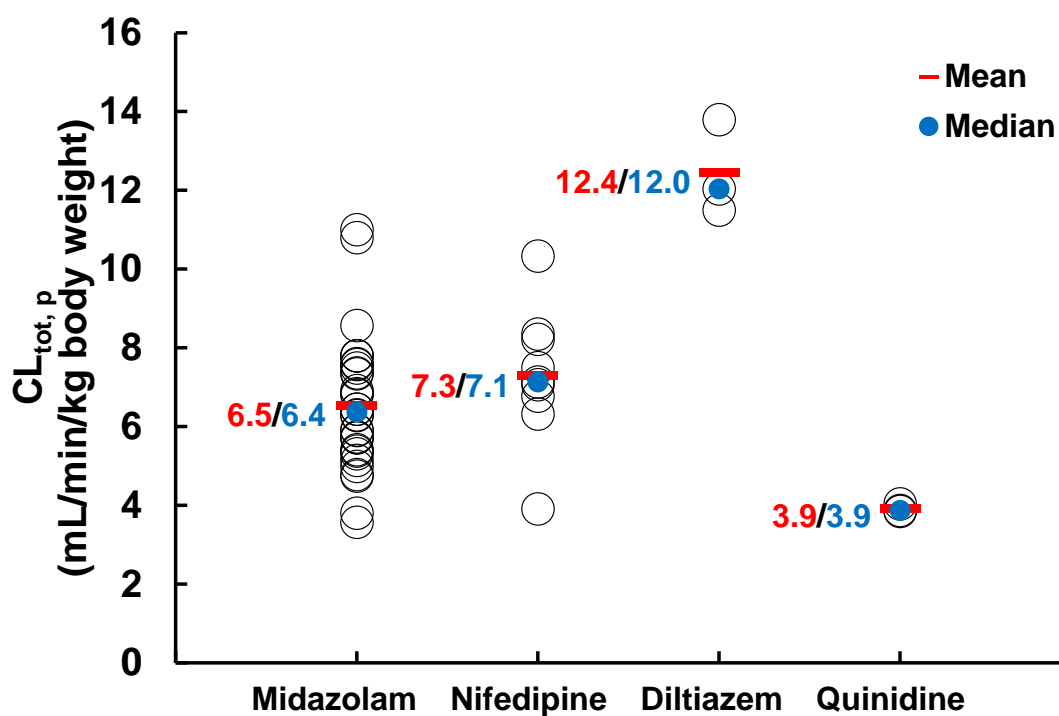


図 5 文献から収集した CYP3A 基質における健康成人の  $CL_{tot,p}$  値

収集した文献数は、midazolam において 32 [46-77]、nifedipine において 9 [78-86]、diltiazem において 3 [87-89]、quinidine において 3 [90-92]である。赤および青はそれぞれ  $CL_{tot,p}$  の文献間平均値 (Mean) および中央値 (Median) を表す。

表 6  $CL_{tot,p}$  の文献間平均値と全被験者加重算術平均値の比較

平均値 (mL/min/kg body weight)	基質			
	Midazolam	Nifedipine	Diltiazem	Quinidine
文献間平均値	6.5	7.3	12.4	3.9
全被験者加重算術平均値	6.6	7.4	12.8	3.9

### 2.3.2.2. *In vivo* CL<sub>int</sub> の算出

2.3.2.1.項で算出した CL<sub>tot, p</sub> の平均値とその他のパラメータから各基質の CL<sub>int, u, vivo</sub> を算出した (表 7)。Midazolam、nifedipine、diltiazem、quinidine はいずれも肝代謝により主に消失するが、quinidine においては相対的に高い CL<sub>r</sub> の寄与 (全身クリアランスの 18%) が認められた。Quinidine および diltiazem においては、CL<sub>r</sub> の寄与を考慮し、CL<sub>int, u, vivo</sub> を算出した。

### 2.3.3. IVIVE (Physiologically based Scaling)

Physiologically based Scaling による IVIVE 相関をプロットした (図 6)。*In vivo* CL<sub>int</sub> 予測値は CL<sub>int, u, vivo</sub> に対し、0.50~0.97 倍であり、いずれの基質においても過小評価の傾向にあった。また、各基質の予測精度は、用いる HLMs バッチの種類によって異なっていた。

表 7 CYP3A 基質の  $CL_{int, u, vivo}$  および算出に用いられたパラメータ

基質	$CL_{tot, p}$		$CL_{tot, b}$		$f_c$ (% of dose) <sup>b</sup>	$CL_r$ (mL/min/kg body weight)	$CL_h$ (mL/min/kg body weight)	$f_B^b$	$CL_{int, u, vivo}$ (mL/min/kg body weight)
	(mL/min/kg body weight) <sup>a</sup>	$R_B^b$	(mL/min/kg body weight)						
Midazolam	6.5	0.653	10.0	0 <sup>c</sup>	0	10.0	0.025	598	
Nifedipine	7.3	0.670	10.9	0 <sup>c</sup>	0	10.9	0.035	489	
Diltiazem	12.4	0.976	12.7	4	0.5	12.2	0.166	125	
Quinidine	3.9	0.930	4.2	18	0.8	3.5	0.074	52.5	

<sup>a</sup> 図 5 参照

<sup>b</sup> Ogawa らの報告[44]

<sup>c</sup> n.d. (1% of dose 未満) は 0 とした。



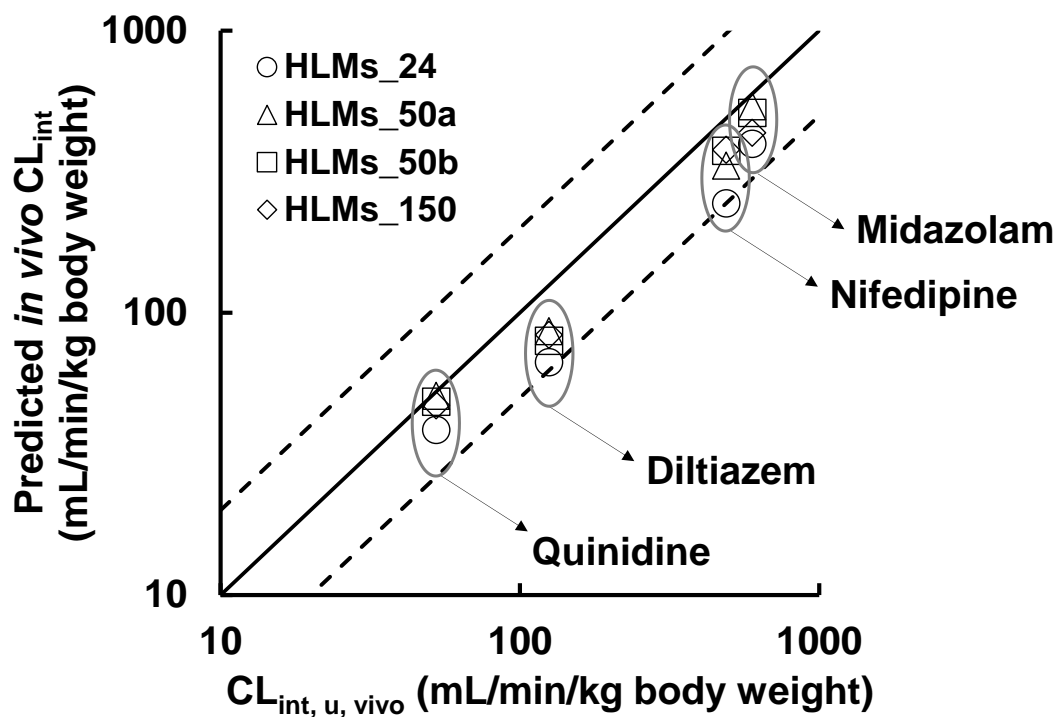


図 6 Physiologically based Scaling による *in vivo*  $CL_{int}$  予測値と  $CL_{int, u, vivo}$  の相関

実線は予測の一致を表し、実線と破線の間は前後 2 倍以内の予測精度を表す。

## 2.4. 考察

代謝安定性試験における反応液の緩衝液および有機溶媒組成はそれぞれ 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) および 0.1% (v/v) DMSO とし、CYP3A 活性に及ぼす影響が少なくなるよう設定した。Substrate depletion approach は、代謝経路が不明な場合においても未変化体残存率測定のみで HLMs の  $CL_{int}$  を算出できる利点がある一方、代謝安定性の高い化合物は未変化体残存率の経時推移を精度良く測定できない欠点がある。今回の *in vitro* 実験条件において、低  $CL_{int}$  基質である alprazolam および clonazepam では HLMs の  $CL_{int}$  を算出することができなかった。本実験では、未変化体残存率および一次消失の指数関数フィッティングにおける再現性を確認するため、各例 triplicate で評価を行っている。IVIVE 検討における Substrate depletion approach を用いた代謝安定性試験では、特に代謝安定性の高い化合物について、HLMs の  $CL_{int}$  値を決めるクライテリア設定に留意する必要がある。

$f_{u, mic}$  値について、6 基質いずれも用いた 4 バッチのバッチ間差は小さかった (表 5)。 $f_{u, mic}$  値については種間比較の報告があり、ヒトと動物で高い相関が認められている[93]。今回は同一種間 (ヒト) の比較であるが、少なくともプールされた 4 バッチ間において差は認められないことが明らかとなった。

HLMs の  $CL_{int}$  を求めることができた 4 基質について、各々の  $f_{u, mic}$  値から各 HLMs バッチで  $CL_{int, u}$  を算出したが、バッチ間差は小さかった (図 4)。HLMs の個体間差は内的要因 (遺伝的多型、喫煙、飲酒、服薬) および外的要因 (肝試料の調製プロセスおよび保存条件) からなると考えられ[94]、プールドバッチにおいてもバッチ間差の問題は存在する。今回用いた HLMs のバッチ間差が小さかった要因として、いずれのバッチも同一供給元から購入したものであり、同じプロセスで調製したと推定されること、ならびにバッチ間差を最小化するため多くの個体からプール調製されていることが考えられる。4 基質いずれも  $CL_{int, u}$  の値が最も小さい HLMs\_24 はプールしたドナー規模が一番小さ

いことから、プール個体数とバッチ間差に関係のある可能性が推察される。

変動要因のひとつである  $CL_{tot, p}$  については、多数の文献データから平均値を算出することにより、標準化を試みた (図 5)。特に多くの文献を収集することができた midazolam および nifedipine では文献間差が認められ、選択する文献により異なる IVIVE 予測精度結果が得られることに注意が必要である。いずれの基質も文献間平均値と全被験者の加重算術平均値が相似していた (表 6) ことから、文献間平均値による標準化が可能であると考えられた。

$CL_{tot, p}$  の平均値から  $CL_{int, u, vivo}$  を算出する際、肝モデルとして dispersion モデルを選択した。一般に肝モデルは、dispersion モデルに加え、well-stirred モデルや parallel tube モデルが使用される [9]。Well-stirred モデルは数学的取り扱いが簡単であるため IVIVE に良く使用されるが、他の 2 モデルと比較し、予測精度が低い [95]。高次モデルである dispersion モデルは高  $CL_{int}$  化合物に対しても高い予測精度を有する [94] ことから、本研究の肝モデルとして選択した。

定法である Physiologically based Scaling による IVIVE は、いずれの基質も HLMs の 4 バッチすべてで過小評価であった (図 6) が、予測精度は変動要因である HLMs の  $CL_{int, u}$  やスケールアップに用いる生理学的パラメータ相違の影響を受けると考えられた。特に、HLMs のバッチ間差は小さかったが、HLMs の  $CL_{int, u}$  の変動因子のひとつとなっていた。4 バッチすべてが過小評価であった理由のひとつとして、先に述べた HLMs の個体間差における外的要因 (肝試料の調製プロセスおよび保存条件) が artificial な活性低下を引き起こしていた可能性が考えられた。

### 第3章 スケーリングファクターを用いた新規方法論の検証

### 3.1. 緒言

2章では、収集した多数の文献データを基にヒト *in vivo* 全身クリアランスを平均値として固定するとともに代謝実験を行い、*in vitro/in vivo* 相関を確認した。本章では、1章で着目した IVIVE の3つの変動要因をスケーリングファクターで補正（標準化）できないか、検討を行った。

まず、2章で求めた  $CL_{int, u, vivo}$  を代謝実験から求めた HLMs の  $CL_{int, u}$  で割ることによりスケーリングファクターを定義し、標準化できないか検討を行った。このスケーリングファクターは生理学的パラメータを用いずに、HLMs の  $CL_{int, u}$  からダイレクトに使用できるスケーリングファクター ( $SF_{direct}$ ) になりうると考えた。様々な HLMs バッチにおいて同じ CYP 分子種で代謝される化合物の代謝活性に良好な相関があることが良く知られており[96]、 $SF_{direct}$  は同じ CYP3A で代謝される化合物間で定義できる可能性があると考えた。HLMs バッチ含む同じ実験条件では CYP3A 基質の種類によらず  $SF_{direct}$  は等しいという仮説を検証した（表 8）。次に、HLMs バッチ間差含む実験間差（HLMs の  $CL_{int, u}$ ）を補正する方法について、上記  $SF_{direct}$  を利用したさらなる検討を行った。

表 8 スケーリングファクターの概念（同じ HLMs バッチでは  $SF_{direct}$  の値が等しい）

HLMs バッチ	CYP3A 基質				
	Midazolam	Nifedipine	Diltiazem	Quinidine	その他基質
HLMs_24	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$
HLMs_50a	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$
HLMs_50b	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$
HLMs_150	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$	$SF_{direct}$

## 3.2. 方法

### 3.2.1. スケーリングファクターの定義

2章で求めた HLMs の  $CL_{int, u}$  および *in vivo* 試験から算出した  $CL_{int, u, vivo}$  を用い、以下 (12) 式により  $SF_{direct}$  を定義した。

$$SF_{direct} \text{ (mg protein per kg body weight)} = \frac{CL_{int, u, vivo} \text{ (mL/min/kg body weight)}}{\text{HLMs の } CL_{int, u} \text{ (mL/min/mg protein)}} \quad (12)$$

HLMs を用いた IVIVE 手順と  $SF_{direct}$  の関係を示す (図 7)。

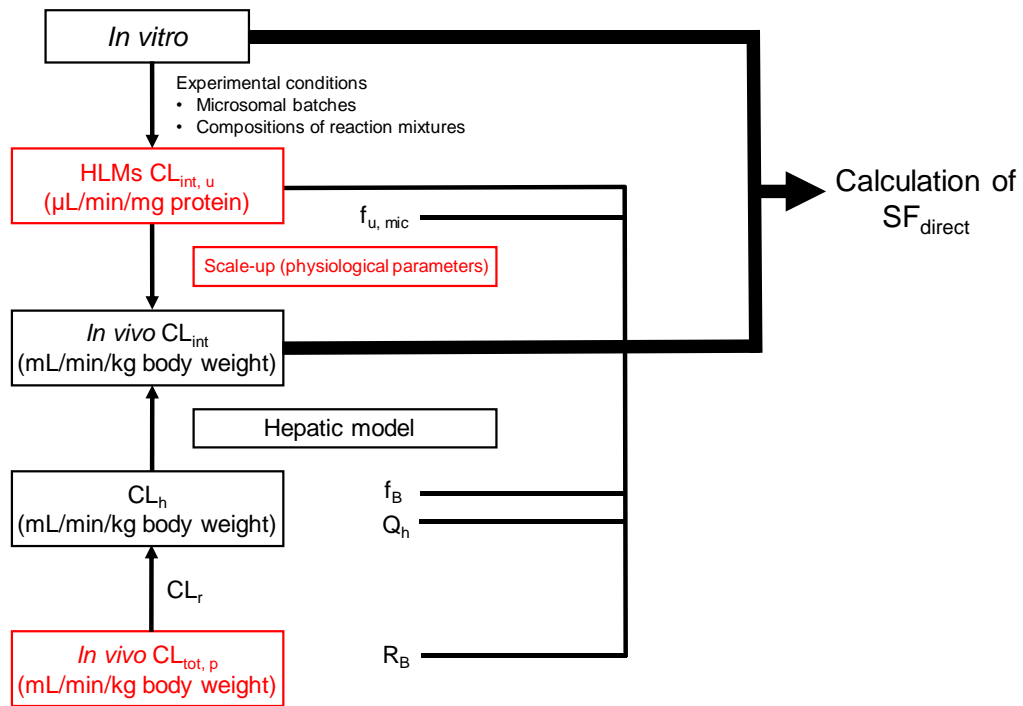


図 7 HLMs を用いた IVIVE 手順と  $SF_{direct}$  の関係 (本研究で着目した変動要因を赤字で示す)

HLMs  $CL_{int, u}$  : ヒト肝マイクロゾーム非結合形分率補正代謝固有クリアランス、*In vivo*  $CL_{int}$  : 肝代謝固有クリアランス、 $CL_h$  : 肝クリアランス、 $CL_r$  : 腎クリアランス、*In vivo*  $CL_{tot, p}$  : *in vivo* 全身血漿クリアランス、 $f_{u, mic}$  : マイクロゾーム非結合形分率、 $f_B$  : 血中非結合形分率、 $Q_h$  : 肝血流速度、 $R_B$  : 血液/血漿中濃度比

各々の基質およびHLMs バッチについて、個別に  $SF_{\text{direct}}$  を算出した。その後、基質およびHLMs バッチごとに  $SF_{\text{direct}}$  の平均値、標準偏差、CV 値を算出するとともに、全  $SF_{\text{direct}}$  の平均値、標準偏差、CV 値を同様に算出した。

さらに、*in vivo*  $CL_{\text{int}}$  予測における  $SF_{\text{direct}}$  の有用性について検証するため、2.3.1.3.項で算出したHLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  から全  $SF_{\text{direct}}$  の平均値 (1,600 mg protein per kg body weight) を用い、以下 (13) 式により *in vivo*  $CL_{\text{int}}$  予測値を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{In vivo } CL_{\text{int}} \text{ 予測値 (mL/min/kg body weight) =} \\ & \text{個々の CYP3A 基質における HLMs の } CL_{\text{int, u}} \text{ (mL/min/mg protein)} \times SF_{\text{direct}} \text{ 平均値} \\ & \text{(1,600 mg protein per kg body weight)} \end{aligned} \quad (13)$$

2.3.2.2.項で算出した  $CL_{\text{int, u, vivo}}$  と比較し、予測精度について検証した。

### 3.2.2. スケーリングファクターおよび midazolam の $CL_{\text{int, u}}$ 値による補正

3.2.1.項で算出した  $SF_{\text{direct}}$  に加え、HLMs バッチ間差を含む実験間差補正のさらなる検討を行うため、今回検討を行った CYP3A 基質における様々な HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  報告値を文献から収集した (7 種類の HLMs バッチ: A~G と表記、プールドバッチ A~C および個別ドナーバッチ D~G) [22, 24, 30, 97]。収集した HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  から当該基質の *in vivo*  $CL_{\text{int}}$  予測値を算出するにあたり、以下 (14) 式に従い、 $SF_{\text{direct}}$  (1,600 mg protein per kg body weight) および midazolam における HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  値比 (2.3.1.3.項で算出した平均値 407  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  の当該基質と同じ試験で求められた報告値に対する比) による補正を試みた (Direct Scaling)。

$$\begin{aligned} & \textit{In vivo} \text{ CL}_{\text{int}} \text{ 予測値 (mL/min/kg body weight) =} \\ & \text{文献から収集した CYP3A 基質における HLMs の } \text{CL}_{\text{int, u}} \text{ (mL/min/mg protein) } \times \\ & \text{SF}_{\text{direct}} \text{ 平均値 (1,600 mg protein per kg body weight) } \times \\ & \text{midazolam における HLMs の } \text{CL}_{\text{int, u}} \text{ 値比} \end{aligned} \tag{14}$$

上記 Direct Scaling による予測値と (11) 式の Physiologically based Scaling による予測値の精度を比較した。



### 3.3. 結果

#### 3.3.1. スケーリングファクターの定義

各々の基質および HLMs バッチについて  $SF_{direct}$  を算出した (表 9)。算出した  $SF_{direct}$  の個別値は 1,190~2,310 mg protein per kg body weight であり、HLMs\_24、HLMs\_50a、HLMs\_50b、HLMs\_150 における値は、それぞれ 1,580~2,310、1,190~1,700、1,250~1,810、1,290~1,730 mg protein per kg body weight であった。 $SF_{direct}$  の基質間の CV 値は 12% (HLMs\_150) ~18% (HLMs\_24、HLMs\_50a) であった。基質間の CV 値が小さかったことから、CYP3A 基質共通のスケーリングファクターとして適用できる可能性が示された。また、バッチ間の CV 値も小さかった (12~22%) ことから、全  $SF_{direct}$  の平均値 (1,600 mg protein per kg body weight) を用い、*in vivo*  $CL_{int}$  値の予測を行った。予測精度は高く、すべての基質および HLMs バッチにおいて 2 倍以内 (0.69~1.3 倍) で予測することができた (図 8)。

#### 3.3.2. スケーリングファクターおよび midazolam の $CL_{int, u}$ 値による補正

*In vivo*  $CL_{int}$  値予測における Direct Scaling ( $SF_{direct}$  および midazolam における HLMs の  $CL_{int, u}$  値比による補正) の有用性について、文献から様々な HLMs バッチの値を用い、評価した。2つの方法 (Direct Scaling および Physiologically based Scaling) の予測精度を比較した (図 9)。プールドバッチ (A~C) は、Physiologically based Scaling においていずれも過小評価傾向にあったが、Direct Scaling により予測精度は改善した。個別ドナーから調製されたバッチ (D~G) は、Physiologically based Scaling において幅のある予測精度を示したが、特に過小あるいは過大評価傾向にあったバッチ (D、F、G) において、Direct Scaling により予測精度は改善した。

表 9 4 種類の HLMs バッチで求めた CYP3A 基質の SF<sub>direct</sub> (mg protein per kg body weight)

HLMs バッチ	基質				Mean ± SD	CV (%)
	Midazolam	Nifedipine	Diltiazem	Quinidine		
HLMs_24	1,740	2,310	2,160	1,580	1,950 ± 347	18
HLMs_50a	1,280	1,700	1,680	1,190	1,460 ± 264	18
HLMs_50b	1,350	1,510	1,810	1,250	1,480 ± 246	17
HLMs_150	1,590	1,490	1,730	1,290	1,530 ± 184	12
Mean ± SD	1,490 ± 212	1,750 ± 385	1,850 ± 217	1,330 ± 170	1,600 ± 315	-
CV (%)	14	22	12	13	-	20

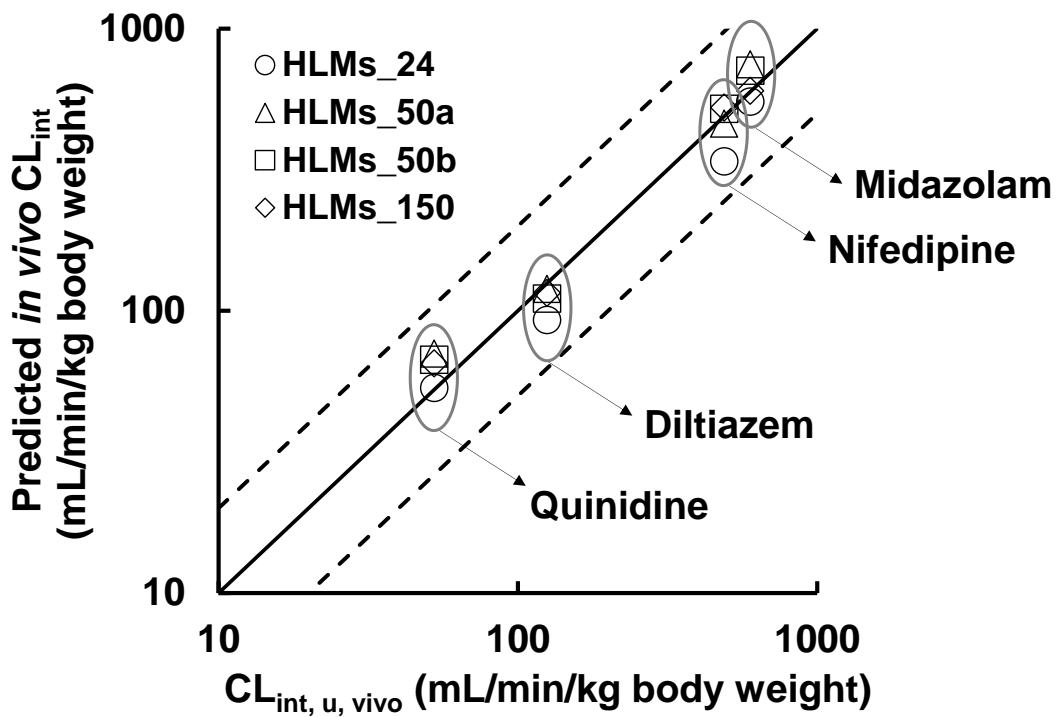


図 8  $SF_{direct}$  の平均値 (1,600 mg protein per kg body weight) を用いたときの *in vivo*

$CL_{int}$  予測値と  $CL_{int, u, vivo}$  の相関

実線は予測の一致を表し、実線と破線の間は前後 2 倍以内の予測精度を表す。

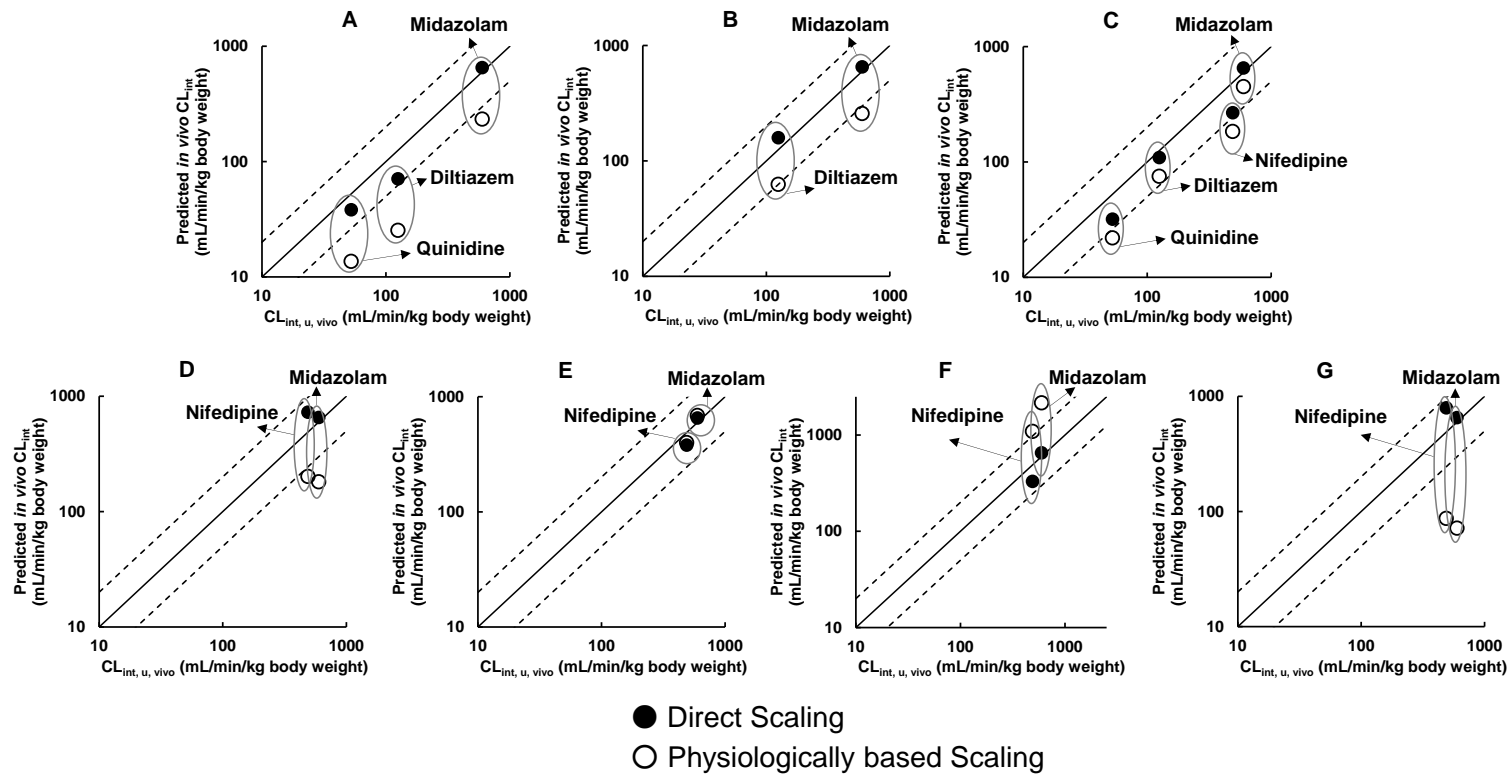


図 9 新規方法 (Direct Scaling) および定法 (Physiologically based Scaling) の予測精度比較

文献から収集した 7 種類の HLMs バッチ (プールドバッチ A~C および個別ドナーバッチ D~G) の  $CL_{int, u}$  値から算出した *in vivo*  $CL_{int}$  予測値と  $CL_{int, u, vivo}$  の相関。実線は予測の一致を表し、実線と破線の間は前後 2 倍以内の予測精度を表す。

### 3.4. 考察

本章において、CYP3A 基質かつ 4 つの HLMs バッチに共通な  $SF_{\text{direct}}$  を定義した (表 9)。 $SF_{\text{direct}}$  の定義に関し、代謝関与酵素、HLMs への非特異結合、臨床データの観点から基質を選択することは重要である。 $SF_{\text{direct}}$  算出に用いた 4 基質の CYP3A 代謝寄与率は 79%以上 (midazolam : 92%、nifedipine : 95%、diltiazem : 79%、quinidine : 93%) [19]であるが、基質間で異なる特徴がある。例えば、ヒト CYP3A の主な分子種は CYP3A4 であるが、CYP3A5 の寄与も一部知られている。今回用いた 4 基質の CYP3A 代謝に占める CYP3A5 寄与率は大きく異なっている (midazolam : 49%、nifedipine : 14%、diltiazem : 14%、quinidine : <10%) [19]。また、CYP3A4 については基質との複数結合サイトに関する報告[98]があり、今回用いた基質の少なくとも midazolam と nifedipine は異なるドメインに結合すると考えられている。このように、本研究で定義した  $SF_{\text{direct}}$  は異なる特徴を有する CYP3A 基質を用いて算出された。用いた基質の CYP3A 代謝寄与率から、少なくとも約 80%の CYP3A 代謝寄与率があれば  $SF_{\text{direct}}$  (1,600 mg protein per kg body weight) を使用することが可能と考えられる。 $SF_{\text{direct}}$  を定義するにあたり、代謝関与酵素だけではなく、HLMs への非特異結合の観点からも基質を選択した。CYP3A 基質には felodipine のように高い非特異結合を示すものもあり[24]、このような基質の  $f_{u, \text{mic}}$  の算出は実験誤差を引き起こす可能性があるため除外した。今回定義した  $SF_{\text{direct}}$  を用いる場合、 $f_{u, \text{mic}}$  の小さい化合物を試験する場合は予測精度への影響に注意が必要である。2 章における検討 (表 5) から  $f_{u, \text{mic}}$  のバッチ間差は小さいことが明らかになったが、各バッチにおける  $SF_{\text{direct}}$  を正確に見積もるためそれぞれの  $f_{u, \text{mic}}$  値を用いた。 $SF_{\text{direct}}$  の定義における基質選択では、定義式からもわかるように、臨床で薬物動態パラメータが良く特徴づけられている点も重要である。2 章における検討 (図 5) から midazolam および nifedipine は十分な文献ならびに被験者数から  $CL_{\text{tot}, p}$  の平均値を算出することができた。Diltiazem および quinidine は限られた文献数であるが、 $CL_{\text{tot}, p}$  の文献間差が小さかったため、これら 2 基

質も  $SF_{\text{direct}}$  の算出に含めた。1章における検討（表 4）からも IVIVE 検討に用いられている CYP3A 基質の  $CL_{\text{tot, p}}$  は変動幅が認められており、各基質における  $SF_{\text{direct}}$  を正確に求めるため、全文献からの平均値を用いた。なお、高～低  $CL_{\text{int}}$  の様々な基質へ  $SF_{\text{direct}}$  を適用するため、肝モデルは dispersion モデルを用いている（2章参照）。

実験間差を考慮した新規方法である Direct Scaling は、CYP3A 基質の *in vivo*  $CL_{\text{int}}$  を様々な HLMs バッチから予測しうる有用なツールになることが期待される。Midazolam は創薬および開発の代謝安定性試験においてリファレンス化合物として最も共通に使用されている。医薬候補化合物が主に CYP3A によって代謝される場合、Substrate depletion approach により midazolam と医薬候補化合物の代謝安定性試験を同時に行い HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  を決定することで、*in vivo*  $CL_{\text{int}}$  を簡易かつ精度良く予測することが可能となる。HLMs は商用の製品を複数の購入元から入手可能であり、標準基質として midazolam における HLMs の  $CL_{\text{int}}$  あるいは  $CL_{\text{int, u}}$  のデータが添付されていることが多い。しかし、Direct Scaling を用いる場合、 $SF_{\text{direct}}$  のコンセプトに基づき、midazolam と医薬候補化合物の  $CL_{\text{int, u}}$  は同一実験条件下で決定する必要があると考えられる。その場合、midazolam における HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  値が本実験の範囲内（344～467  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ ）あるいは近い値であれば、midazolam の値による補正を行わず、本実験で定義した  $SF_{\text{direct}}$ （1,600 mg protein per kg body weight）のみ使用することで簡易的に予測することも可能と考えられる。今後、多くの CYP3A 基質を用い、Direct Scaling から予測した *in vivo*  $CL_{\text{int}}$  値の精度を検証することで本法の堅牢性を確認することが重要である。

## 総括

医薬品の創薬開発段階において化合物のヒトクリアランスを予測することは極めて重要である。開発される医薬品において、肝代謝クリアランスにより体内から消失するものは多いが、肝代謝クリアランスには大きな種差が知られており、HLMs などのヒト由来試料を用いた IVIVE が予測法として汎用されている。IVIVE では、ヒト試料を用いた実験から生理学的パラメータおよび数学モデルによるスケールアップを行い、実際の生体内を反映する肝代謝クリアランスを求める。しかしながら、そのプロセスには複数の変動要因が存在し、同一化合物においても異なる結果が得られる。本研究では、酸化代謝の代表的酵素である CYP3A 基質を用い、3 つの変動要因に着目し、HLMs を用いた実験 (Substrate depletion approach) から変動要因補正を可能とする新規方法論の構築を行った。

まず、本研究で着目した 3 つの変動要因①～③に関し、文献報告値からその変動幅について調査を行った。

### ① HLMs の $CL_{int, u}$

CYP3A 基質において、HLMs を用いた *in vitro* 代謝試験から求めた  $CL_{int, u}$  報告値の調査を行った。*In vitro* 実験条件の相違 (HLMs のバッチ間差、反応液組成の違いなど) に基づくと考えられる  $CL_{int, u}$  値の差が認められた (CYP3A 標準基質として汎用される midazolam で最大 4 倍程度)。

### ② スケールアップに用いる生理学的パラメータ

$CL_{int, u}$  値は生理学的パラメータ (MPPGL、肝重量) を用いて肝全体の *in vivo*  $CL_{int}$  にスケールアップされる。特に MPPGL の報告値に大きな差が認められ、*in vivo*  $CL_{int}$  予測値は用いる値により影響を受けると推察される。

### ③ ヒト *in vivo* 全身クリアランス

HLMs を用いた IVIVE 検討では、①②で予測された *in vivo*  $CL_{int}$  と *in vivo* 全身クリアランスから変換された  $CL_{int}$  値を比較し、予測精度の検証を行う。IVIVE の検討を行っている文献間で CYP3A 基質のヒト *in vivo* 全身クリアランス値は異なり、midazolam で最大 2.5 倍の差が認められた。

次ステップとして、多数のヒト文献データから上記③の平均値算出を行うとともに、代謝実験から①を算出し、*in vitro* と *in vivo* の  $CL_{int}$  比較を行った。異なる 4 バッチのプールド HLMs を用いた CYP3A 基質の代謝実験を行い、代謝実験条件下における基質の非結合形分率を平衡透析試験より求めた。その結果、CYP3A 基質における HLMs の  $CL_{int,u}$  に大きなバッチ間差は認められなかった。代謝実験を行った CYP3A 基質についてヒト *in vivo* 全身クリアランス（平均値）を多数の文献データから求め、この平均値から肝モデルを用い、*in vivo* 試験から求めた肝代謝固有クリアランス ( $CL_{int,u,vivo}$ ) を算出した。HLMs の  $CL_{int,u}$  から定法である生理学的パラメータによるスケールアップ (Physiologically based Scaling) で *in vivo*  $CL_{int}$  を予測したところ過小評価傾向にあったが、予測精度は HLMs のバッチ間差やスケールアップに用いる生理学的パラメータ相違の影響を受けると考えられた。

上記 3 つの変動要因①②③を標準化する新規方法論構築のため、まず上記で求めた  $CL_{int,u,vivo}$  を代謝実験から求めた HLMs の  $CL_{int,u}$  で割ることによりスケールアップ因子 ( $SF_{direct}$ ) を定義した。 $SF_{direct}$  の基質間変動値は小さかったことから、CYP3A 基質共通のスケールアップ因子として変動要因を補正できる可能性が示された。 $SF_{direct}$  の平均値 (1,600 mg protein per kg body weight) を用いたときの *in vivo*  $CL_{int}$  値の予測精度は高かった。本研究における代謝実験では HLMs バッチ間差に起因する  $CL_{int,u}$  の変動幅が小さかったことから共通の  $SF_{direct}$  (1,600 mg protein per kg body weight) を用いたが、HLMs バッチ間差含む実験条件は研究所間で異なると考えられるため、様々な HLMs の  $CL_{int,u}$



(文献値)から  $SF_{\text{direct}}$  を用いた変動要因補正が可能か検討した。 $SF_{\text{direct}}$  (1,600 mg protein per kg body weight) に加え、midazolam における HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  値比を用い、様々なバッチで算出されている CYP3A 基質における HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  値の補正を試みた (Direct Scaling)。その結果、Direct Scaling の予測精度は高く、Physiologically based Scaling による予測精度が低いバッチについても精度の改善が認められた。

以上、HLMs を用いた IVIVE による肝代謝クリアランス予測に関し、プロセスにおける変動要因について問題提起し、それらを補正する方法論について実験および文献調査から有用性を確認した。CYP3A で代謝される医薬候補化合物のクリアランス値が、 $SF_{\text{direct}}$  値および midazolam における HLMs の  $CL_{\text{int, u}}$  値比から簡便かつ精度良く予測できる可能性が示唆された。CYP3A で代謝される医薬品は多く、本研究で構築した方法論はヒトクリアランス予測法のひとつとして、医薬品研究開発の効率化・成功確率向上に貢献することが期待される。具体的には、創薬段階で CYP3A 代謝寄与率が高いと推定された化合物に本法を適用し、肝代謝クリアランス予測を行う。開発段階では、候補化合物選定後すみやかに予測値から投与量を見積もり、化合物合成量や臨床試験計画に反映させる。臨床試験結果が得られた後、本法予測精度の検証を行い、方法改善に役立てる。このサイクルを繰り返すことにより、トランスレーショナルリサーチを加速させることを提案したい (図 10)。

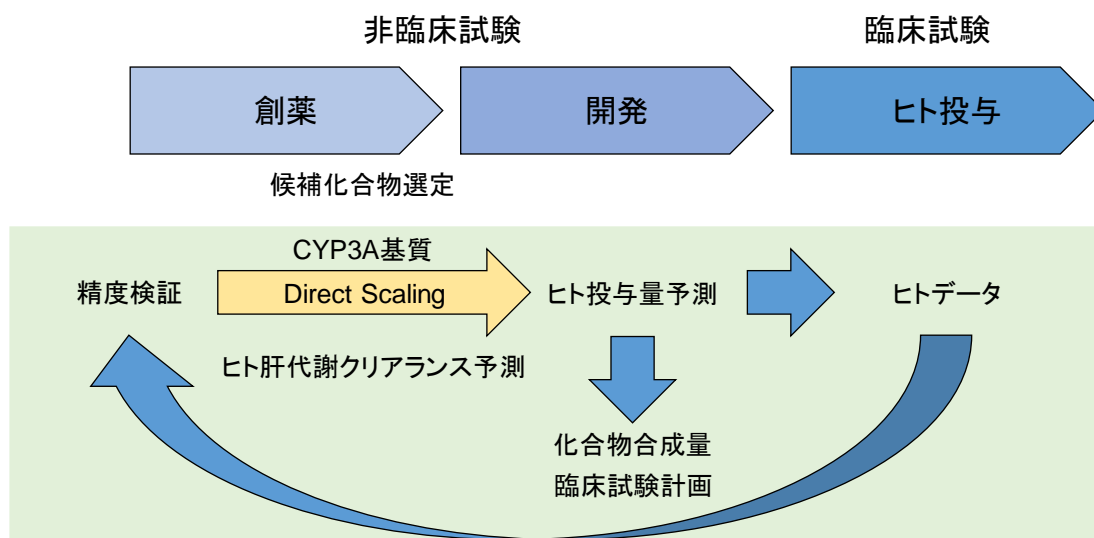


図 10 医薬品開発における新規方法（Direct Scaling）の適用

本研究で検証した  $SF_{\text{direct}}$  の概念は、CYP3A 以外の CYP 分子種や Non-CYP 代謝酵素にも適用できる可能性が考えられる。各薬物代謝酵素について複数基質を用い、共通の  $SF_{\text{direct}}$  が定義できるか否か、本研究と同様なアプローチが必要とされる。*In vitro* 実験条件の相違に基づくと考えられる  $SF_{\text{direct}}$  のバリエーションが各薬物代謝酵素に存在すると考えられるが、いずれも CYP3A の midazolam のような標準基質を用いることにより、生体試料のバッチ間差含む実験条件の補正が可能となる。本研究における代謝実験では HLMs バッチ間差は小さく、4 バッチ共通の  $SF_{\text{direct}}$  を定義した。一方、CYP2C19、CYP2D6 など遺伝的多型を示す代謝酵素では HLMs バッチ間差が大きくなる可能性も考えられるため、実験結果から  $SF_{\text{direct}}$  の定義ならびにバッチ間差補正の十分な考察が必要である。また、ヒト肝代謝クリアランス予測における IVIVE では HLMs の他にも肝細胞などの生体試料が用いられるが、バッチ間差が問題となる[99]。さらに、本研究で着目した変動要因は IVIVE における経験則を用いた方法や mechanistic な方法のいずれにも明らかに影響を及ぼす。IVIVE 手法全般の発展に貢献できるよう、今後  $SF_{\text{direct}}$  の適用範囲を広げるためのさらなる研究が必要である。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かい御指導、御助言ならびに御鞭撻を賜りました武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室 伊藤清美 教授に心から感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くの御指導、御助言を賜りました同研究室 加藤基浩 客員教授に心から感謝申し上げます。

本研究にあたり、御助言、御協力を賜りました同研究室 工藤敏之 講師に深く感謝申し上げます。

本論文の審査にあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました武蔵野大学薬学部 永井尚美 教授ならびに三原潔 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、御協力を賜りました中外製薬株式会社 小川浩太郎 氏ならびに梶晶代 氏に心から感謝致します。

## 引用文献

1. 杉山雄一, 山下伸二, 加藤基浩, *ファーマコキネティクス 演習による理解*. 2003, 南山堂, 東京.
2. Boxenbaum, H., *Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin*. J Pharmacokinet Biopharm, 1980. **8**(2): p. 165-76.
3. Mahmood, I. and J.D. Balian, *Interspecies scaling: predicting clearance of drugs in humans. Three different approaches*. Xenobiotica, 1996. **26**(9): p. 887-95.
4. Iwatsubo, T., et al., *Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data*. Pharmacol Ther, 1997. **73**(2): p. 147-71.
5. Naritomi, Y., et al., *Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(10): p. 1316-24.
6. Ito, K. and J.B. Houston, *Prediction of human drug clearance from in vitro and preclinical data using physiologically based and empirical approaches*. Pharm Res, 2005. **22**(1): p. 103-12.
7. Obach, R.S., *The prediction of human clearance from hepatic microsomal metabolism data*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2001. **4**(1): p. 36-44.
8. Pelkonen, O. and M. Turpeinen, *In vitro-in vivo extrapolation of hepatic clearance: biological tools, scaling factors, model assumptions and correct concentrations*. Xenobiotica, 2007. **37**(10-11): p. 1066-89.
9. 杉山雄一, 楠原洋之, *分子薬物動態学*. 2008, 南山堂, 東京.
10. Poulin, P., et al., *Comparative assessment of in vitro-in vivo extrapolation methods used for*

- predicting hepatic metabolic clearance of drugs*. J Pharm Sci, 2012. **101**(11): p. 4308-26.
11. Wood, F.L., J.B. Houston, and D. Hallifax, *Clearance prediction methodology needs fundamental improvement: trends common to rat and human hepatocytes/microsomes and implications for experimental methodology*. Drug Metab Dispos, 2017. **45**(11): p. 1178-88.
  12. Bowman, C.M. and L.Z. Benet, *In vitro-in vivo extrapolation and hepatic clearance-dependent underprediction*. J Pharm Sci, 2019. **108**(7): p. 2500-4.
  13. de Wildt, S.N., et al., *Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition*. Clin Pharmacokinet, 1999. **37**(6): p. 485-505.
  14. Busby, W.F., Jr., J.M. Ackermann, and C.L. Crespi, *Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450*. Drug Metab Dispos, 1999. **27**(2): p. 246-9.
  15. Kudo, T., et al., *Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated paclitaxel 6alpha-hydroxylation and CYP3A4-mediated triazolam alpha- and 4-hydroxylation by human liver microsomes*. Xenobiotica, 2016. **46**(3): p. 241-6.
  16. Kudo, T., et al., *Estimation of the contribution of CYP2C8 and CYP3A4 in repaglinide metabolism by human liver microsomes under various buffer conditions*. J Pharm Sci, 2017. **106**(9): p. 2847-52.
  17. Vuppugalla, R., et al., *Effect of commonly used organic solvents on the kinetics of cytochrome P450 2B6- and 2C8-dependent activity in human liver microsomes*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(11): p. 1990-5.
  18. Obach, R.S., *Nonspecific binding to microsomes: impact on scale-up of in vitro intrinsic clearance to hepatic clearance as assessed through examination of warfarin, imipramine, and propranolol*. Drug Metab Dispos, 1997. **25**(12): p. 1359-69.
  19. Tseng, E., et al., *Relative contributions of cytochrome CYP3A4 versus CYP3A5 for CYP3A-*

- cleared drugs assessed in vitro using a CYP3A4-selective inactivator (CYP3cide)*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(7): p. 1163-73.
20. Karlsson, F.H., et al., *Utility of in vitro systems and preclinical data for the prediction of human intestinal first-pass metabolism during drug discovery and preclinical development*. Drug Metab Dispos, 2013. **41**(12): p. 2033-46.
21. Nishimuta, H., et al., *Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs*. Xenobiotica, 2013. **43**(11): p. 948-55.
22. Nishimuta, H., et al., *Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A and UGT substrates in humans from in vitro data*. Drug Metab Pharmacokinet, 2011. **26**(6): p. 592-601.
23. Chen, Y., et al., *Utility of intersystem extrapolation factors in early reaction phenotyping and the quantitative extrapolation of human liver microsomal intrinsic clearance using recombinant cytochromes P450*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(3): p. 373-82.
24. Beaumont, K., et al., *Toward an integrated human clearance prediction strategy that minimizes animal use*. J Pharm Sci, 2011. **100**(10): p. 4518-35.
25. Sohlenius-Sternbeck, A.K., et al., *Evaluation of the human prediction of clearance from hepatocyte and microsome intrinsic clearance for 52 drug compounds*. Xenobiotica, 2010. **40**(9): p. 637-49.
26. Gertz, M., et al., *Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(7): p. 1147-58.
27. Stringer, R., P.L. Nicklin, and J.B. Houston, *Reliability of human cryopreserved hepatocytes and liver microsomes as in vitro systems to predict metabolic clearance*. Xenobiotica, 2008. **38**(10): p. 1313-29.
28. McNaney, C.A., et al., *An automated liquid chromatography-mass spectrometry process to*

- determine metabolic stability half-life and intrinsic clearance of drug candidates by substrate depletion. *Assay Drug Dev Technol*, 2008. **6**(1): p. 121-9.
29. Emoto, C. and K. Iwasaki, *Approach to predict the contribution of cytochrome P450 enzymes to drug metabolism in the early drug-discovery stage: the effect of the expression of cytochrome b(5) with recombinant P450 enzymes*. *Xenobiotica*, 2007. **37**(9): p. 986-99.
30. Obach, R.S., *Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes*. *Drug Metab Dispos*, 1999. **27**(11): p. 1350-9.
31. McGinnity, D.F., et al., *Automated definition of the enzymology of drug oxidation by the major human drug metabolizing cytochrome P450s*. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(11): p. 1327-34.
32. Hallifax, D. and J.B. Houston, *Binding of drugs to hepatic microsomes: comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(4): p. 724-6.
33. Barter, Z.E., et al., *Scaling factors for the extrapolation of in vivo metabolic drug clearance from in vitro data: reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver*. *Curr Drug Metab*, 2007. **8**(1): p. 33-45.
34. Zhang, H., et al., *Content and activity of human liver microsomal protein and prediction of individual hepatic clearance in vivo*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17671.
35. Heinemann, A., et al., *Standard liver volume in the Caucasian population*. *Liver Transpl Surg*, 1999. **5**(5): p. 366-8.
36. Davies, B. and T. Morris, *Physiological parameters in laboratory animals and humans*. *Pharm Res*, 1993. **10**(7): p. 1093-5.
37. Barter, Z.E., et al., *Covariation of human microsomal protein per gram of liver with age: absence of influence of operator and sample storage may justify interlaboratory data pooling*.

- Drug Metab Dispos, 2008. **36**(12): p. 2405-9.
38. Hallifax, D., J.A. Foster, and J.B. Houston, *Prediction of human metabolic clearance from in vitro systems: retrospective analysis and prospective view*. Pharm Res, 2010. **27**(10): p. 2150-61.
39. Mohutsky, M.A., et al., *Predictions of the in vivo clearance of drugs from rate of loss using human liver microsomes for phase I and phase II biotransformations*. Pharm Res, 2006. **23**(4): p. 654-62.
40. Austin, R.P., et al., *The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(12): p. 1497-503.
41. Poulin, P. and S. Haddad, *Microsome composition-based model as a mechanistic tool to predict nonspecific binding of drugs in liver microsomes*. J Pharm Sci, 2011. **100**(10): p. 4501-17.
42. Winiwarter, S., et al., *Prediction of fraction unbound in microsomal and hepatocyte incubations: a comparison of methods across industry datasets*. Mol Pharm, 2019. **16**(9): p. 4077-85.
43. 厚生労働省, *医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン*. 2018, <https://www.pmda.go.jp/files/000225191.pdf>.
44. Ogawa, K., et al., *A new approach to predicting human hepatic clearance of CYP3A4 substrates using monkey pharmacokinetic data*. Xenobiotica, 2013. **43**(5): p. 468-78.
45. Roberts, M.S. and M. Rowland, *Correlation between in-vitro microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics: analysis with a dispersion model*. J Pharm Pharmacol, 1986. **38**(3): p. 177-81.
46. Balson, K.R., et al., *Pharmacokinetics of midazolam in Vietnamese subjects*. J Gastroenterol Hepatol, 1996. **11**(12): p. 1177-80.



47. Bancke, L.L., et al., *Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of USL261, a midazolam formulation optimized for intranasal delivery, in a randomized study with healthy volunteers*. *Epilepsia*, 2015. **56**(11): p. 1723-31.
48. Breimer, L.T., et al., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the interaction between flumazenil and midazolam in volunteers by aperiodic EEG analysis*. *Clin Pharmacokinet*, 1991. **20**(6): p. 497-508.
49. Clausen, T.G., et al., *Pharmacokinetics of midazolam and alpha-hydroxy-midazolam following rectal and intravenous administration*. *Br J Clin Pharmacol*, 1988. **25**(4): p. 457-63.
50. Eeckhoudt, S.L., et al., *Midazolam and cortisol metabolism before and after CYP3A induction in humans*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2001. **39**(7): p. 293-9.
51. Farkas, D., et al., *Pomegranate juice does not impair clearance of oral or intravenous midazolam, a probe for cytochrome P450-3A activity: comparison with grapefruit juice*. *J Clin Pharmacol*, 2007. **47**(3): p. 286-94.
52. Garg, V., et al., *Effect of telaprevir on the pharmacokinetics of midazolam and digoxin*. *J Clin Pharmacol*, 2012. **52**(10): p. 1566-73.
53. Greenblatt, D.J., et al., *Effect of age, gender, and obesity on midazolam kinetics*. *Anesthesiology*, 1984. **61**(1): p. 27-35.
54. Greenblatt, D.J., et al., *Absence of interaction of cimetidine and ranitidine with intravenous and oral midazolam*. *Anesth Analg*, 1986. **65**(2): p. 176-80.
55. Greenblatt, D.J., et al., *Pharmacokinetic and electroencephalographic study of intravenous diazepam, midazolam, and placebo*. *Clin Pharmacol Ther*, 1989. **45**(4): p. 356-65.
56. Gudmundsdottir, H., et al., *Intranasal administration of midazolam in a cyclodextrin based formulation: bioavailability and clinical evaluation in humans*. *Pharmazie*, 2001. **56**(12): p. 963-6.

57. Hardmeier, M., et al., *Intranasal midazolam: pharmacokinetics and pharmacodynamics assessed by quantitative EEG in healthy volunteers*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **91**(5): p. 856-62.
58. Heizmann, P., M. Eckert, and W.H. Ziegler, *Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man*. Br J Clin Pharmacol, 1983. **16 Suppl 1**: p. 43S-49S.
59. Ibrahim, A., et al., *The influence of parecoxib, a parenteral cyclooxygenase-2 specific inhibitor, on the pharmacokinetics and clinical effects of midazolam*. Anesth Analg, 2002. **95**(3): p. 667-73.
60. Kharasch, E.D., et al., *Influence of CYP3A5 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytochrome P4503A probes alfentanil and midazolam*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(4): p. 410-26.
61. Lee, J.I., et al., *Application of semisimultaneous midazolam administration for hepatic and intestinal cytochrome P450 3A phenotyping*. Clin Pharmacol Ther, 2002. **72**(6): p. 718-28.
62. Lu, J.F., et al., *Midazolam pharmacokinetics and electroencephalographic changes in eight Chinese men*. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1993. **14**(6): p. 485-8.
63. Palkama, V.J., et al., *Effect of saquinavir on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral and intravenous midazolam*. Clin Pharmacol Ther, 1999. **66**(1): p. 33-9.
64. Pentikis, H.S., et al., *The effect of multiple-dose, oral rifaximin on the pharmacokinetics of intravenous and oral midazolam in healthy volunteers*. Pharmacotherapy, 2007. **27**(10): p. 1361-9.
65. Mandema, J.W., et al., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite alpha-hydroxymidazolam in healthy volunteers*. Clin Pharmacol Ther, 1992. **51**(6): p. 715-28.
66. Misaka, S., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low doses of midazolam*

- administered intravenously and orally to healthy volunteers. Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010. **37**(3): p. 290-5.
67. Olkkola, K.T., et al., *A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. Clin Pharmacol Ther*, 1993. **53**(3): p. 298-305.
68. Saari, T.I., et al., *Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam. Clin Pharmacol Ther*, 2006. **79**(4): p. 362-70.
69. Schwagmeier, R., S. Alincic, and H.W. Striebel, *Midazolam pharmacokinetics following intravenous and buccal administration. Br J Clin Pharmacol*, 1998. **46**(3): p. 203-6.
70. Shimizu, M., et al., *A developed determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: application of human pharmacokinetic study for measurement of CYP3A activity. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007. **847**(2): p. 275-81.
71. Shord, S.S., et al., *Effects of oral clotrimazole troches on the pharmacokinetics of oral and intravenous midazolam. Br J Clin Pharmacol*, 2010. **69**(2): p. 160-6.
72. Teng, R. and K. Butler, *The effect of ticagrelor on the metabolism of midazolam in healthy volunteers. Clin Ther*, 2013. **35**(7): p. 1025-37.
73. Thummel, K.E., et al., *Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. Clin Pharmacol Ther*, 1996. **59**(5): p. 491-502.
74. Vanakoski, J., et al., *Effects of heat exposure in a Finnish sauna on the pharmacokinetics and metabolism of midazolam. Eur J Clin Pharmacol*, 1996. **51**(3-4): p. 335-8.
75. Wermeling, D.P., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new intranasal midazolam formulation in healthy volunteers. Anesth Analg*, 2006. **103**(2): p. 344-9.
76. Wermeling, D.P., et al., *A pharmacokinetic and pharmacodynamic study, in healthy volunteers, of a rapidly absorbed intranasal midazolam formulation. Epilepsy Res*, 2009. **83**(2-3): p. 124-

- 32.
77. Yan, D., et al., *Effects of ursodeoxycholic acid on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam in healthy volunteers*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 629-36.
78. Debbas, N.M., et al., *The bioavailability and pharmacokinetics of slow release nifedipine during chronic dosing in volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 1986. **21**(4): p. 385-8.
79. Foster, T.S., et al., *Nifedipine kinetics and bioavailability after single intravenous and oral doses in normal subjects*. J Clin Pharmacol, 1983. **23**(4): p. 161-70.
80. Holtbecker, N., et al., *The nifedipine-rifampin interaction. Evidence for induction of gut wall metabolism*. Drug Metab Dispos, 1996. **24**(10): p. 1121-3.
81. Kleinbloesem, C.H., et al., *Nifedipine: kinetics and dynamics in healthy subjects*. Clin Pharmacol Ther, 1984. **35**(6): p. 742-9.
82. Leucuta, S.E., et al., *Bioavailability of nifedipine from different oral dosage forms in healthy volunteers*. Pharmazie, 1989. **44**(5): p. 336-8.
83. Palma-Aguirre, J.A., et al., *Bioavailability and pharmacokinetics of nifedipine administered by different routes in healthy volunteers*. Arch Invest Med (Mex), 1989. **20**(2): p. 129-35.
84. Raemsch, K.D. and J. Sommer, *Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine*. Hypertension, 1983. **5**(4 Pt 2): p. II18-24.
85. Rashid, T.J., et al., *Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipine*. Br J Clin Pharmacol, 1995. **40**(1): p. 51-8.
86. Waller, D.G., et al., *The first pass metabolism of nifedipine in man*. Br J Clin Pharmacol, 1984. **18**(6): p. 951-4.
87. Hoglund, P. and L.G. Nilsson, *Physiological disposition of intravenously administered <sup>14</sup>C-labeled diltiazem in healthy volunteers*. Ther Drug Monit, 1988. **10**(4): p. 401-9.

88. Ochs, H.R. and M. Knuchel, *Pharmacokinetics and absolute bioavailability of diltiazem in humans*. *Klin Wochenschr*, 1984. **62**(7): p. 303-6.
89. Tawashi, M., et al., *Pharmacokinetics of intravenous diltiazem and five of its metabolites in patients with chronic renal failure and in healthy volunteers*. *Biopharm Drug Dispos*, 1991. **12**(2): p. 105-12.
90. Greenblatt, D.J., et al., *Pharmacokinetics of quinidine in humans after intravenous, intramuscular and oral administration*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1977. **202**(2): p. 365-78.
91. Ochs, H.R., et al., *Reduced quinidine clearance in elderly persons*. *Am J Cardiol*, 1978. **42**(3): p. 481-5.
92. Rakhit, A., et al., *Pharmacokinetics of quinidine and three of its metabolites in man*. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1984. **12**(1): p. 1-21.
93. Zhang, Y., et al., *Lack of appreciable species differences in nonspecific microsomal binding*. *J Pharm Sci*, 2010. **99**(8): p. 3620-7.
94. Chiba, M., Y. Ishii, and Y. Sugiyama, *Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development*. *AAPS J*, 2009. **11**(2): p. 262-76.
95. Ito, K. and J.B. Houston, *Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes*. *Pharm Res*, 2004. **21**(5): p. 785-92.
96. Shimada, T., et al., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(1): p. 414-23.
97. Foster, J.A., J.B. Houston, and D. Hallifax, *Comparison of intrinsic clearances in human liver microsomes and suspended hepatocytes from the same donor livers: clearance-dependent*

- relationship and implications for prediction of in vivo clearance. Xenobiotica, 2011. 41(2): p. 124-36.*
98. Galetin, A., S.E. Clarke, and J.B. Houston, *Multisite kinetic analysis of interactions between prototypical CYP3A4 subgroup substrates: midazolam, testosterone, and nifedipine. Drug Metab Dispos, 2003. 31(9): p. 1108-16.*
99. Hallifax, D. and J.B. Houston, *Methodological uncertainty in quantitative prediction of human hepatic clearance from in vitro experimental systems. Curr Drug Metab, 2009. 10(3): p. 307-21.*