

博士学位論文

胆汁排泄の飽和に起因する 血中曝露に反映されない肝臓中非線形薬物動態のモデル解析

2024年3月

武蔵野大学大学院 薬科学研究科

大山 みずき

投稿論文

本博士論文は、以下の投稿論文に基づきまとめた。

1. Yamane, M., Ozeki, K., Okano, K., Kudo, T. and Ito, K., Evaluation of the non-linearity of NA808 in liver not reflected in plasma using a rat pharmacokinetic study and PBPK modelling, *Xenobiotica*, 2023. **53**(6-7): 498-506.

略語一覧

略語	英名	和名
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve	血漿（液）中濃度－時間曲線下面積
AUC _{inf}	AUC from 0h to infinity	投与後0時間から無限大時間まで外挿した AUC
AUC _{0-t}	AUC from 0h to the final point	投与後0時間から最終時点までの AUC
AUC _{0-24h}	AUC from 0 to 24h	投与後0時間から24時間までの AUC
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的 DNA
f_p	plasma unbound fraction	血漿中非結合形分率
GMFE	geometric mean-fold error	幾何学的平均誤差
HCV	human hepatitis C virus	C 型肝炎ウイルス
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATEs	multidrug and toxin extrusion protein	多剤及び毒性化合物排出トランスポーター
MDCK	Madin-Darby canine kidney cell	犬腎由来細胞
MRP	multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連タンパク質
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P_{app}	apparent permeability	見かけの透過係数

PBPK	physiologically based pharmacokinetic	生理学的藥物速度論
R_b	blood-to-plasma ratio	血液/血漿濃度比
SD	standard deviation	標準偏差
SE	Standard error	標準誤差
$t_{1/2}$	terminal phase half-life	半減期

目次

1. 序論.....	7
2. 非臨床薬物動態試験.....	11
2.1 実験.....	11
2.1.1 試薬.....	11
2.1.2 細胞.....	11
2.1.3 動物.....	11
2.1.4 NA808 の単回静脈内投与試験.....	12
2.1.5 トランスポーター発現細胞を用いた NA808 の経細胞輸送評価.....	15
2.2 結果.....	16
2.2.1 NA808 の単回静脈内投与試験.....	16
2.2.2 トランスポーター発現細胞を用いた NA808 の経細胞輸送評価.....	19
2.3 考察.....	20
2.4 小括.....	22
3. 簡易的 PBPK モデルを用いた解析.....	24
3.1 NA808 の物性情報の取得.....	24
3.1.1 血液/血漿濃度比 (R_b).....	24
3.1.2 血漿中非結合形分率 (f_p).....	25
3.1.3 測定.....	25
3.2 簡易的 PBPK モデル解析.....	25
3.2.1 簡易的 PBPK モデルの構築.....	25
3.2.2 パラメータ初期値の設定.....	30
3.2.2 モデル解析.....	31
3.2.3 感度分析.....	33
3.3 結果.....	34
3.3.1 血液/血漿濃度比 (R_b).....	34
3.3.2 血漿中非結合形率 (f_p).....	34
3.3.3 簡易的 PBPK モデル解析.....	35
3.4 考察.....	43
3.5 小括.....	44
4. C 型肝炎ウイルス複製阻害剤 NA808 について.....	45
5. 総括.....	47
6. 謝辞.....	49
7. 引用文献.....	50

図表目次

表一覧

表1	ラットに NA808を単回静脈内投与したときの薬物動態パラメータ	18
表2	ラットに NA808を単回静脈内投与したときの投与量に対する累積胆汁排泄率	18
表3	各トランスポーター発現細胞における NA808及び陽性対象の P_{app} ratio	20
表4	簡易的 PBPK モデル解析に使用した NA808の物性情報や生理学的情報の文献値	26
表5	NA808の簡易的 PBPK モデル解析のためのパラメータ初期値	31
表6	ラット血液における NA808の R_b	34
表7	ラット血漿における NA808の f_p	34
表8	モデル解析の第1ステップで最適化されたパラメータ	35
表9	モデル解析の第2ステップで最適化されたパラメータ	37
表10	NA808の簡易的 PBPK モデル解析で最適化されたパラメータ	39
表11	実測および解析で求めた AUC と 2 mg/kg 投与群に対する AUC 比	40

図一覧

図1	臨床開発段階の各相の試験内容	7
図2	肝臓に発現しているトランスポーター	9
図3	ラットに NA808を単回静脈内投与したときの血漿中および肝臓中 NA808濃度	17
図4	トランスポーター発現細胞における NA808の透過係数 \pm SE	19
図5	NA808のラット薬物動態解析のための簡易的 PBPK モデル	27
図6	第1ステップで用いた2-コンパートメントモデル	32
図7	第2ステップで用いたモデル	33
図8	モデル解析の第1ステップで得られた血液中濃度のフィッティングカーブ	36
図9	モデル解析の第2ステップで得られた血液中及び肝臓中濃度 (A) と 累積胆汁排泄量 (B) のフィッティングカーブ	38
図10	NA808の簡易的 PBPK モデル解析で得られた血液中及び肝臓中濃度 (A) と 累積胆汁排泄量 (B) のフィッティングカーブ	41
図11	NA808の簡易的 PBPK モデルにおける感度分析	42
図12	NA808の構造	45
図13	臨床開発段階の各相の試験内容とモデルアプローチの有用性	48

1. 序論

医薬品の開発過程において、臨床試験は新しい薬剤が患者にとって安全で効果的であることを確認し、既存の治療法と比較してその優位性を評価するために行われる重要なステップである。また、薬物動態は、薬物が体内でどのように吸収、分布、代謝、排泄されるかを理解するために不可欠なものであり、その情報は薬物の効果的で安全な使用に直結する。

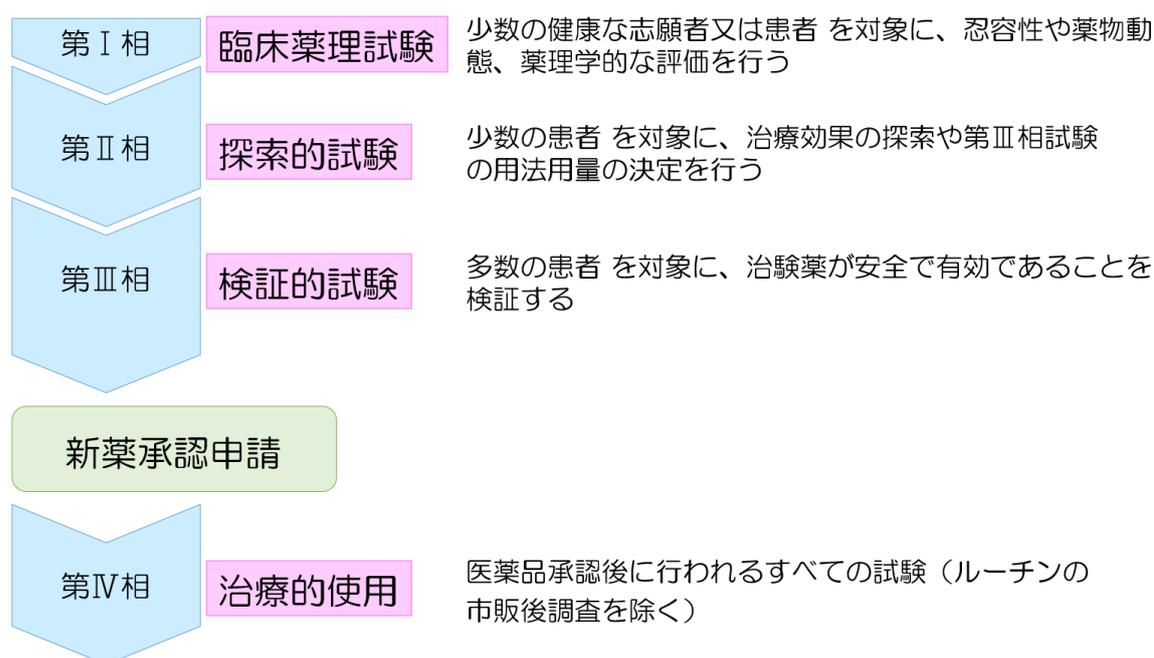


図1 臨床開発段階の各相の試験内容

薬物の臨床開発は図1で示すように4つの相に分けられる [1,2]：

<第Ⅰ相> 第Ⅰ相は、治験薬を初めて人に投与することから開始される。治療効果のみを目的としない試験であり、健康な志願者又は特定のタイプの患者（例えば強い毒性を持つ医薬品である抗悪性腫瘍薬では、通常、患者が対象）で実施される。第Ⅰ相において実施される試験は、初期の安全性及び忍容性や薬物動態、薬力学の評価を行う。

<第Ⅱ相> 第Ⅱ相は、通常、患者における治療効果の探索を主要な目的とする試験を開始する段階である。同時対照や投与前の状態との比較、あるいは特定の適応に対するそ

の治験薬の有効性と安全性の評価や用量－反応関係の確認を目的とする。

<第Ⅲ相> 第Ⅲ相は、意図した適応及び対象患者群においてその治験薬が安全で有効であるということを検証する段階であり、承認のための適切な根拠となるデータを得ることを目的としている。

<第Ⅳ相> 承認された適応に関連して医薬品承認後に行われるすべての試験（ルーチンの市販後調査を除く）が対象となる。追加的な薬物相互作用試験、用量－反応試験、又は安全性試験、疫学試験などが含まれる。

ここで示した流れは一般的なものであり、具体的な試験内容は治験薬の種類や目的により異なる場合がある。

第Ⅰ相臨床試験において、薬物動態の情報は、薬剤の用法や用量を決定するために重要であり、その後の臨床試験計画に影響を与える。非線形薬物動態を示す薬剤の場合、血中曝露が用量に依存しない場合があるため、望ましくない事象を引き起こす可能性のある予想より高い血中曝露を避けるため、用量漸増は血中濃度を見ながら慎重に検討する必要がある。薬物動態の非線形性は主に、消化管、肝臓、腎臓のトランスポーター及び代謝酵素の飽和に起因するため、非線形薬物動態を示す薬剤の効果や副作用を正確に予測するためには、薬物動態の理解が非常に重要となる。しかし、血中濃度が線形である場合においても、薬剤が排出トランスポーターの基質である場合には、組織中濃度が非線形を示す可能性があることは注意が必要である。

組織中濃度に影響を及ぼすトランスポーターを介した組織クリアランスの変化の例として、Ito らはマウスにおけるシメチジン併用により、血漿中よりも腎臓においてメトホルミンの曝露量が大きく増加すると報告した [3]。この現象は、シメチジンが有機カチオントランスポーター（OCT）によるメトホルミンの側底膜における血管から腎細胞への取込みよりも、多剤及び毒性化合物排出トランスポーター（MATEs）による刷子縁膜での腎細胞からの排出輸送をより強く阻害するために生じたと考えられる [4]。このように血中濃度のモニタリングだけでは、排出トランスポーターの阻害による組織中濃度の上昇を認識できない場

合がある。この現象は併用薬によるトランスポーターの阻害だけではなく、薬剤が排出トランスポーターの基質であった場合にはその薬剤のトランスポーター輸送の飽和によっても起こり得る。

腎臓と同様に排出トランスポーターの阻害あるいは飽和による非線形が起こり得る組織として肝臓があげられる。肝臓には代謝酵素の他に、肝臓への取込みを担うトランスポーターや胆汁への排泄を担うトランスポーターが多く発現しており（図2）、薬物の代謝と排泄を担う主要な臓器である。肝臓での薬物動態を適切に理解することは、薬物の効果と安全性を評価するために不可欠となる。

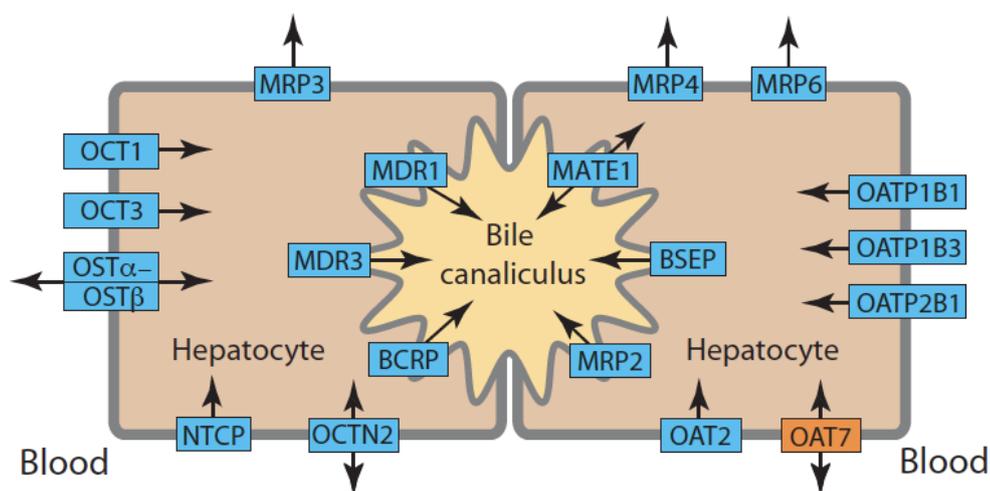


図2 肝臓に発現しているトランスポーター

UCSF-FDA TransPortal + UCSD/UCD-NIEHS TICBase [5]より引用

近年では、医薬品の開発過程を通じて、薬物の効果や安全性を予測する方法として生理学的薬物速度論（PBPK）モデルの使用が注目されている。非臨床試験の知見に基づき生理学的プロセスを考慮して構築された PBPK モデルは、臨床環境での薬物動態を予測し、リスクを低減させるための有力なツールである。これにより、薬物の投与量や投与スケジュールを最適化することが可能になる。

本研究では、このような背景を踏まえ、C 型肝炎ウイルス (HCV) 複製阻害剤である NA808 について、非臨床動態試験及び簡易的 PBPK モデル解析を行い、血中では捉えきれな

い肝臓中濃度の非線形性について評価した。これは、肝臓における排出トランスポーターの飽和に起因する、血中曝露には反映されない肝臓中曝露の非線形的な増加の実例を初めて示すものである。さらには、この問題に対する一つの解決策として、簡易的 PBPK モデルを構築し、そのモデルを用いて肝臓中濃度の変動についての理解を進めた。これらの知見は、臨床試験計画に反映することで、用量比以上の曝露上昇に伴う毒性を回避するための重要な手がかりとなる。これは、医薬品の安全性を確保するために重要な要素となると考える。

2. 非臨床薬物動態試験

本項では、NA808のラット薬物動態試験およびトランスポーター試験に基づき、NA808の薬物動態に関わる考察を行う。NA808は HCV の複製阻害剤であり、疾患の標的組織である肝臓へ移行しやすい薬物動態の特徴を有するように開発された化合物である（4項参照）。本研究では、肝臓へ移行しやすい化合物における、薬物動態及び安全性リスクの評価を行うことを目的とし、NA808を被験物質として選択した。

2.1 実験

2.1.1 試薬

NA808, d₄-labeled NA808及び¹⁴C-labeled NA808 (¹⁴C]NA808) は中外製薬株式会社にて合成した (Tokyo, Japan)。Estradiol 17β-D-glucuronide [estradiol-6,7-³H(N)] (³H]E₂17βG), Estrone sulfate ammonium salt [6,7-³H(N)] (³H]ES), 及び Mannitol D-[1-¹⁴C] (¹⁴C]Mannitol) は PerkinElmer Japan G.K. (Kanagawa, Japan)より購入した。

2.1.2 細胞

積水メディカル株式会社が Sasaki らの方法 [6]を参考に確立した OATP1B1-MRP2共発現細胞（ヒト OATP1B1及び MRP2 cDNA を組み込んだベクターを導入した MDCK II 細胞）、OATP1B1-BCRP 共発現細胞（ヒト OATP1B1及び BCRP cDNA を組み込んだベクターを導入した MDCK II 細胞）、OATP1B1発現細胞（ヒト OATP1B1 cDNA を組み込んだベクターを導入した MDCK II 細胞）、及びコントロール細胞（ベクターのみを導入した MDCK II 細胞）を使用した。

2.1.3 動物

雄性 CrI:CD(SD) ラットはジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社 (Shiga, Japan)

から購入した。ラットは暗光サイクルの標準条件下で飼育され、実験前に少なくとも5日以上の上順化期間を置いた。本試験は国際医学団体協議会によって策定された「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」に従い、中外製薬株式会社の動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

2.1.4 NA808の単回静脈内投与試験

2.1.4.1 NA808の単回静脈内投与試験サンプル採取

雄性 Crl:CD(SD) ラット (8週齢、n=3) に NA808 (0.2, 2, 20 mg/kg) を約10秒間で単回静脈内に投与し、血漿中と肝臓中の薬物動態を評価した。投与後0.5, 1, 2, 4, 8, 24時間で後大静脈から血液を採取した。血液サンプルは採取後速やかに氷冷し、遠心分離 (4°C, 1,600 g, 10分間) を行うことで血漿を得た。肝臓は血液採取後に動物を安楽死させて摘出し、重量を測定した後に、外科用ハサミで大まかに刻んだ。約5 g の刻んだ肝臓を秤量し、アセトニトリル/ギ酸 [98:2, v/v] を肝臓の秤量値の4倍の体積で混合した後に、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。本作業は氷冷下で行った。胆汁サンプルは胆管カニューレした雄性 Crl:CD(SD) ラット (8週齢、n=3) に¹⁴C]NA808 (0.2, 2, 20 mg/MBq/kg) を静脈内投与し、投与後0.5, 1, 2, 4, 8, 24時間で胆汁サンプルを採取した。

2.1.4.2 測定

2.1.4.1.1 血漿及び肝臓サンプルの分析

血漿サンプル (50 µL) あるいは肝ホモジネートサンプル (1000 µL) にアセトニトリル/水 [50:50, v/v] (血漿10 µL、肝ホモジネート20 µL) と d₄-labeled NA808 (20 ng/mL、血漿150 µL、肝ホモジネート20 µL、 Internal standard (IS) として使用) を添加した。血漿については、30秒間混合した後、遠心分離 (4°C, 12,000 g, 5分間) を行い、上清を別のアシストチューブに移し、上清の0.05倍量の0.1 mol/L 水酸化ナトリウムを添加した。この混合物を、メタ

ノールと水各1 mL であらかじめ前処理した固相抽出カラム (OASIS MAX, 30 mg/1 mL, Waters Corporation, Milford, MA) に添加した。固相抽出カラムを0.05 mol/L の水酸化ナトリウムとメタノール各1 mL で洗浄した後、エチル酢酸/トリフルオロ酢酸 [100:2, v/v] 1 mL を用いて溶出した。溶出液は、40°C、窒素ガス気流下で乾燥させた。得られた残渣は、溶解液 (アセトニトリル/水/ギ酸 [70:30:0.5, v/v/v]) 75 μ L で溶解した。遠心分離 (4°C, 750 g, 3分間) した後、上清20 μ L を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) に注入して分析した。肝ホモジネートについては、30秒間混合した後、遠心分離 (4°C, 750 g, 5分間) を行い、上清を別のポリプロピレン試験管に移した。窒素ガス気流下 (40°C) で乾燥させた後、試験管に水/ギ酸 [98:2, v/v] 1 mL を添加し、30秒間混合した。試験管にエチル酢酸 4 mL を添加して10分間混和した後に、4°C、750 g で10分間遠心分離した。各チューブからの上清 (有機層) を別のポリプロピレン試験管に移し、40°C、窒素ガス流下で乾燥させた。得られた残渣は溶解液400 μ L で溶解し、アシストチューブに移した。遠心分離 (4°C, 8,250 g, 10分間) 後、上清20 μ L を質量分析装置 API3000 (AB Sciex Pte. Ltd., Tokyo, Japan) を備えた Waters 2690 XE LC システム (Waters) に注入して分析した。分離は、逆相カラム (Xbridge C18, 2.1 mm I.D. \times 50 mm, 3.5 μ m, Waters) とガードカラム (Xbridge C18, 2.1 mm I.D. \times 10 mm, 3.5 μ m) を用いて行われた。移動相は A 液 (0.5%ギ酸) と B 液 (0.5%ギ酸 in acetonitrile) のグラジエントとした。B 液 50%から開始し、8分間で直線的に B 液を65%まで増加させ、さらに2分かけて90%まで増加させた。次の5分間は B 液90%を保持し、最後に次のサンプルの分析のために6分間かけて B 液50%で平衡化した。流速は0.3 ml/min に設定した。MS/MS 分析は、electrospray ion source (ESI) を用いた multiple reaction monitoring (MRM) スキャンでイオンを検出した (イオンソース電圧-4 kV、カピラリー温度450°C)。モニタリングイオンは NA808は642/562 (Q1/Q3)、d₄-labeled NA808は646/566 (Q1/Q3) を設定した。検量線範囲は血漿では1から1000 ng/mL、肝ホモジネートでは1から300 ng/mL とし、濃度が検量線の上限を超える可能性がある分析サンプルは、ラットブランク血漿またはブランク肝ホモジネートで希釈してから処理を行った。

2.1.4.1.2 胆汁サンプルの分析

胆汁中の放射能を測定するために、胆汁サンプルから約0.05 g を採取し、重量を計測した後、Clear-sol I (NACALAITESQUE, INC., Kyoto, Japan) 10 mL と混合した。放射能は、液体シンチレーションカウンター (LSC) (TRI-CARB 2300TR, PerkinElmer Japan G.K., Kanagawa, Japan) を使用して、5分間の測定を実施した。各サンプルの放射能は、シンチレーションカウンターのみのバックグラウンド (cpm) を引いた値で表され、バックグラウンドの2倍以下の放射能は検出限界以下とした。胆汁サンプル中の $[^{14}\text{C}]$ NA808関連物質の組成を評価するために、胆汁サンプルを遠心分離 (4°C, 600 g, 5分間) して得られた上清を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) サンプルとして使用した。得られた HPLC サンプルは、radioisotope detector (RID) (Rasiomatic 150TR, PerkinElmer Japan G.K.) を備えた HPLC システム (L-7000、日立製作所、Tokyo, Japan) に注入した。分離は、逆相カラム (CAPCELL PAK C18 MG, 4.6 mm I.D. × 150 mm, 3 μm, OSAKA SODA CO., LTD., Osaka, Japan) とガードカートリッジ (C18 MG, 4.0 mm I.D. × 10 mm, 3 μm, OSAKA SODA CO., LTD.) を使用して行われた。移動相は A 液 (0.5%ギ酸) と B 液 (0.5%ギ酸 in acetonitrile) からなる。グラジエントは B 液50%から開始し、40分間かけて B 液60%まで直線的に増加させた。その後1分間で B 液95%に増加させ、9分間 B 液95%を保持した後に、次のサンプル分析のために10分間かけて B 液50%で平衡化を行った。流速は1 ml/min に設定した。HPLC System Manager, Ver.4.0 (日立製作所) を用いて、ラジオクロマトグラム上の各放射能ピークの面積%を計算した。検出された放射性ピークは、その保持時間を標品と比較して同定した。

2.1.4.3 解析

NA808の血漿および肝臓における投与後0時間から最終採血時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-t})、投与後0時間から無限大時間まで外挿した AUC (AUC_{inf})、および半減期 ($t_{1/2}$) は、WinNonlin (Pharsight Corporation, Ver. 5.0.1) を用いた non-compartmental analysis

により算出した。血液中の NA808濃度と AUC_{0-t} は、血漿中濃度あるいは血漿中 AUC_{0-t} と血液/血漿濃度比 (R_b , 3.3.1項参照) の積によって計算された。 $AUC\ ratio$ は、各投与量群の AUC_{0-t} を 2 mg/kg 投与群の AUC_{0-t} で割ることにより得られた。

2.1.5 トランスポーター発現細胞を用いた NA808の経細胞輸送評価

2.1.5.1 経細胞輸送活性の評価

被験物質として $[^{14}C]$ NA808を、OATP1B1とMRP2基質の陽性対象として $[^3H]$ E₂17βGを、OATP1B1とBCRP基質の陽性対象として $[^3H]$ ESを用い、Apical側からBasal側への輸送及びBasal側からApical側への輸送を評価した。細胞はトランスウエル(6.5 mm Transwell with 0.4 μm pore polycarbonate membrane, Corning Incorporated, Corning, NY)の膜上に7.55から7.975 × 10⁵ cells/insertの濃度で播種し、CO₂インキュベーター(37°C, CO₂ 5%)で基礎培地(100 units/mL ペニシリン G ナトリウム、100 μg/mL ストレプトマイシン硫酸塩、及び25 μg/mL アンホテリシン B を含む10%FBS-DMEM)を用いて培養した。試験の48時間前に5 mmol/Lの酪酸ナトリウムを含む基礎培地に交換した。評価に供する1時間前にカルチャーインサートとプレートの基礎培地を吸引し、それぞれ250 μLと950 μLの0.5% BSA-KHBに置換して37°Cでプレインキュベーションした。透過性の評価はApical側またはBasal側の培地を、試験物質を含む0.5% BSA-KHB溶液(1~100 μM $[^{14}C]$ NA808, 1 μM $[^3H]$ E₂17βG, 0.02 μmol/L $[^3H]$ ES, または1 μM $[^{14}C]$ mannitol)で置換することで開始した(n=3)。37°Cで一定時間(1, 2, 3, 及び4時間)インキュベーションした後、試験物質を添加した反対側から培地を採取し(Apical側から100 μLまたはBasal側から600 μL)、採取した培地量を補うために採取した側へ採取した量と同量の0.5% BSA-KHBを添加した。採取した培地は10 mLのHionic-Fluor(PerkinElmer Japan G. K.)と混合し、LSC(2500TRまたは1900CA, PerkinElmer Japan G. K.)を使用して放射能を測定した。

2.1.5.2 解析

見かけの透過係数 (P_{app}) および P_{app} の比率 ($P_{app} \text{ ratio}$) は、以下の式に従って計算した。

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = [dQ/dt]/A/C_0 \quad (\text{式1})$$

dQ/dt: 輸送速度

A: メンブレン面積 (0.33 cm²)

C₀: 初期濃度

$$P_{app} \text{ ratio} = \frac{\text{Basal to apical } P_{app}}{\text{Apical to basal } P_{app}} \quad (\text{式2})$$

dQ/dt は、0, 1, 2, 3, および4時間培養後の透過量から線形回帰により算出した。このとき、0時間の培養後の透過量はゼロと定義した。 $P_{app} \text{ ratio}$ は n=3の P_{app} の平均値を用いて計算した。

2.2 結果

2.2.1 NA808の単回静脈内投与試験

図3に NA808を0.2, 2, 及び20 mg/kg の投与量で雄性 Crl:CD(SD)ラットに単回静脈投与した後の血漿および肝臓中濃度推移を示した。0.2 mg/kg 投与群では、投与後24時間の NA808 濃度は定量下限未満となった。血漿中濃度推移は本試験条件においては1次消失に見えているが、2.2.2項で示すように OATP の基質であることを考慮すると、 α 相が初回の採血時点30分よりも前に存在している可能性がある。20 mg/kg 投与群における4時間までの肝臓中濃度の消失速度は、2及び2 mg/kg 投与群と比較して遅くなっており、高濃度領域における肝臓からの消失の飽和が認められた。また、4時間以降は血漿中及び肝臓中濃度は概ね平衡であった。

表1に NA808を0.2, 2, 及び20 mg/kg の投与量でラットに単回静脈投与した時の薬物動態

パラメータを示す。0.2から2 mg/kg の投与量範囲において、肝臓中曝露は投与量比の10倍と同等かそれ以下の増加を示したのに対し、血漿中曝露は投与量比を上回る増加を示した。一方、2から20 mg/kg の投与量範囲においては、血漿中濃度は投与量比の10倍と同程度の増加を示したが、肝臓中濃度は投与量比以上に増加していた。

表2に、 $[^{14}\text{C}]$ NA808を0.2, 2, 及び20 mg/kg の投与量で単回静脈投与したラットにおける $[^{14}\text{C}]$ NA808関連物質及び $[^{14}\text{C}]$ NA808の投与量に対する累積胆汁排泄率を示した。いずれの投与群においても、投与した放射エネルギーの90%以上が投与後24時間以内に排泄された。 $[^{14}\text{C}]$ NA808の胆汁中排泄率は0.2及び2 mg/kg 投与群で70~80%にまで達していた一方で、20 mg/kg 投与群では約55%にとどまった。この結果から、20 mg/kg ではNA808の胆汁中への排泄が飽和していることが示唆された。NA808関連物質の24時間における胆汁中排泄率は各投与量で大きく変わらなかったため、代謝への寄与が大きくなったことが推測された。

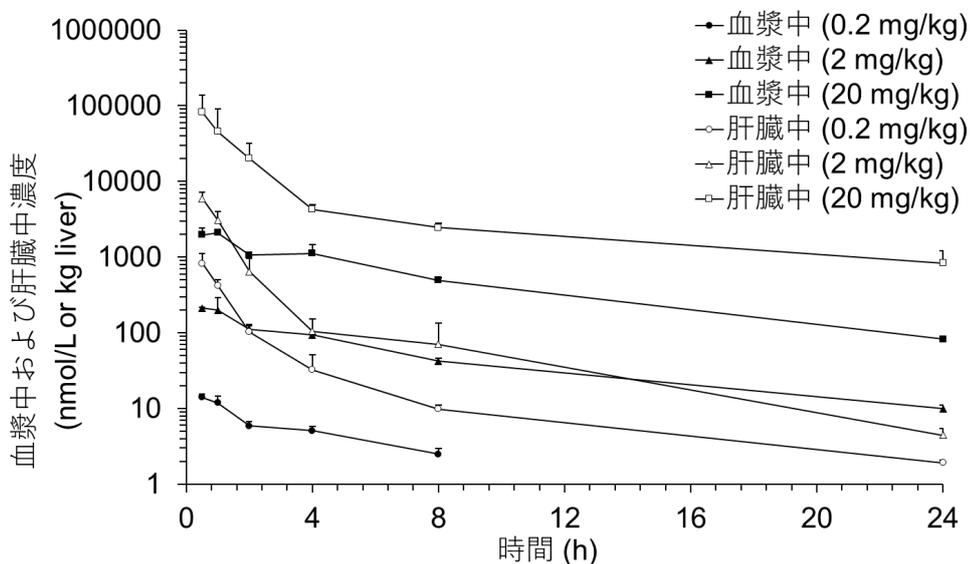


図3 ラットにNA808を単回静脈内投与したときの血漿中および肝臓中NA808濃度
 実測値はn=3の平均値+SDとして示した。

表1 ラットに NA808を単回静脈内投与したときの薬物動態パラメータ

Parameters			0.2 mg/kg	2 mg/kg	20 mg/kg
Plasma	$t_{1/2}$	(hr) ^{a)}	4.67	6.36	5.73
	AUC _{0-t}	(nmol·hr/L)	48.2	1180	12500
	AUC _{0-inf}	(nmol·hr/L)	64.9	1270	13100
	AUC ratio ^{b)}		0.05	1	10
Blood*	AUC _{0-t}	(nmol·hr/L)	28.1	689	7260
	AUC _{0-inf}	(nmol·hr/L)	37.9	743	7660
Liver	$t_{1/2\alpha}$	(hr) ^{c)}	0.76	0.60	0.84
	$t_{1/2\beta}$	(hr) ^{d)}	5.33	4.26	8.99
	AUC _{0-t}	(nmol·hr/kg liver)	1390	9240	176000
	AUC _{0-inf}	(nmol·hr/kg liver)	1400	9270	187000
	AUC ratio ^{d)}		0.15	1	19

* 血液中における AUC は血漿における AUC と R_b (3.3.1項参照) の積とした。

a) $t_{1/2}$ は2時間から最終時点までの濃度から算出した。

b) 2 mg/kg 群と各投与量群の AUC_{0-t} の比

c) $t_{1/2}$ は0.5時間から4時間時点までの濃度から算出した。

d) $t_{1/2}$ は4時間から24時間時点までの濃度から算出した。

表2 ラットに NA808を単回静脈内投与したときの投与量に対する累積胆汁排泄率

Time (h)	¹⁴ C]NA808			¹⁴ C]NA808 related materials		
	0.2 mg/kg	2 mg/kg	20 mg/kg	0.2 mg/kg	2 mg/kg	20 mg/kg
0.5	46.2 ± 2.8	58.3 ± 5.1	19 ± 6.8	54.2 ± 3.2	67.6 ± 6.0	22.4 ± 7.9
1	62.7 ± 2.9	70.3 ± 4.4	28 ± 9.0	77.1 ± 3.0	83.8 ± 4.4	34.9 ± 10.7
2	70.2 ± 3.0	76.2 ± 3.1	39.7 ± 9.1	89.5 ± 2.4	93.3 ± 2.2	53.4 ± 11.4
4	72.7 ± 3.3	77.7 ± 2.8	46.9 ± 8.9	94.3 ± 1.7	96.3 ± 1.3	67.2 ± 11.1
8	73.3 ± 3.4	78.0 ± 3.0	50.1 ± 8.7	96.3 ± 1.6	97.3 ± 1.0	75.9 ± 12.1
24 *	-	-	54.9 ± 6.5	97.4 ± 1.6	98.2 ± 0.9	92.1 ± 3.8

* 0.2及び2 mg/kg 群における投与後8~24時間のサンプルは放射能が低すぎたため、胆汁中の組成比は求めている。

2.2.2 トランスポーター発現細胞を用いた NA808の経細胞輸送評価

OATP1B1-MRP2共発現細胞及び OATP1B1-BCRP 共発現細胞における $[^{14}\text{C}]\text{NA808}$ の P_{app} 値を図4に、OATP1B1-MRP2共発現細胞、OATP1B1-BCRP 共発現細胞、OATP1B1発現細胞、及びコントロール細胞における $[^{14}\text{C}]\text{NA808}$ 及び陽性対象の P_{app} ratio を表3に示した。1, 10, 及び100 $\mu\text{mol/L}$ $[^{14}\text{C}]\text{NA808}$ の OATP1B1-MRP2共発現細胞における P_{app} ratio はそれぞれ70.2, 33.4, 及び24.2であり、基質の濃度が増えるにつれて P_{app} ratio が減少することが示された。OATP1B1-BCRP 共発現細胞および OATP1B1発現細胞における P_{app} ratio は約1.0であった。OATP1B1-MRP2共発現細胞における $[^3\text{H}]\text{E}_217\beta\text{G}$ の P_{app} ratio、及び OATP1B1-BCRP 共発現細胞における $[^3\text{H}]\text{ES}$ の P_{app} ratio はそれぞれ11.1および2.7であった。Paracellular marker である $[^{14}\text{C}]\text{mannitol}$ の P_{app} は、いずれの細胞においても 4.5×10^{-6} cm/sec 以下であった。

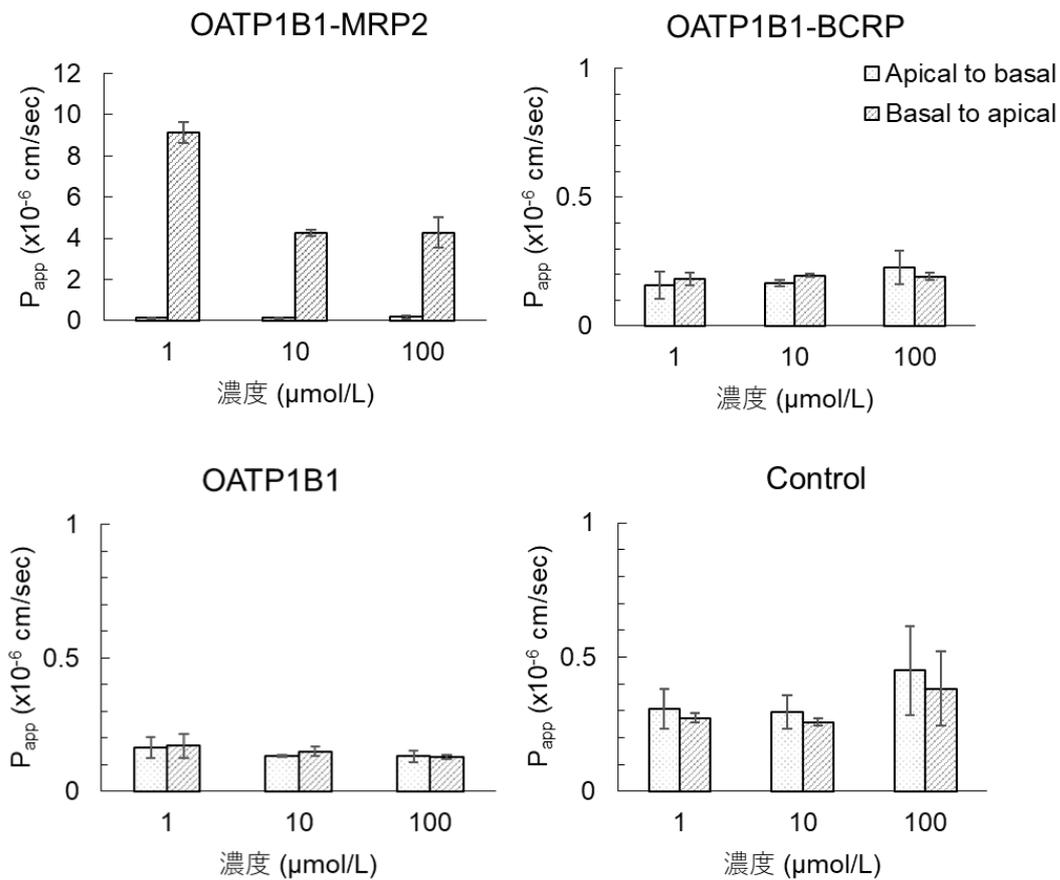


図4 トランスポーター発現細胞における NA808の透過係数±SE

表3 各トランスポーター発現細胞における NA808及び陽性対象の P_{app} ratio

Compound	Concentration (μmol/L)	OATP1B1-MRP2 expressing cells	OATP1B1-BCRP expressing cells
[¹⁴ C]NA808	1	70.2	1.1
	10	33.4	1.2
	100	24.2	0.8
[³ H]Estradiol 17β-D-glucuronide	1	11.1	NA
[³ H]Estrone sulfate	0.02	NA	2.7

Compound	Concentration (μmol/L)	OATP1B1 expressing cells	Control cells
[¹⁴ C]NA808	1	1.0	0.9
	10	1.1	0.9
	100	1.0	0.9
[³ H]Estradiol 17β-D-glucuronide	1	1.1	1.0
[³ H]Estrone sulfate	0.02	0.7	0.8

NA: Not applicable (該当なし)

2.3 考察

NA808を0.2から20 mg/kg の投与量で雄性ラットに単回静脈内投与したところ、いずれの投与量においても血漿中 NA808濃度より肝臓中濃度が高い結果となった (図3)。肝臓/血漿比 (T/P) は、投与後0.5時間で最も高くなり、全ての投与群で T/P=25以上を示し、NA808が静脈内投与後速やかに肝臓に分布することが明らかとなった。また、0.2から2 mg/kg の投与量範囲における曝露は血漿中で投与量比以上の増加を示し、肝臓中では投与量比と同等かそれ以下の増加であった。一方、2から20 mg/kg の投与量範囲においては、血漿中濃度は投与量比と同程度の増加であったが、肝臓中濃度は投与量比以上の増加を示した (表1)。これら

の結果から、0.2から2 mg/kg までの投与量範囲においては NA808の血液中から肝臓への移行過程に飽和が起きている可能性があり、さらに2から20 mg/kg の投与量範囲においては肝臓からの消失過程に飽和が起きている可能性があることが示唆された。NA808の胆汁排泄は、すべての投与量群において投与された放射能のうち90%以上が投与後24時間以内に胆汁に排泄され、主な排泄経路は胆汁であることが示された (表2)。また、0.2及び2 mg/kg 投与群においては投与量の70~80%が $[^{14}\text{C}]$ NA808未変化体として排泄されており、胆汁中の放射能の主な構成成分は未変化体の NA808であることが明らかとなった。20 mg/kg では投与量に対する $[^{14}\text{C}]$ NA808未変化体の排泄割合は約50%となり、NA808未変化体の胆汁排泄の飽和が示唆された。さらに、NA808の消失に対する代謝物の割合が増えたことが推察されることから、NA808の消失には代謝も重要な要素であることが明らかとなった。本研究では、1) NA808の予測臨床用量は2から20 mg/kg 付近に該当すると考えていること、2) 血漿中濃度は急激な濃度上昇を捉えるために血漿中濃度を測定することで注意深くモニター可能であるが、肝臓中の急激な上昇は臨床試験においてモニターが難しく血漿中以上に注意を払う必要があることから、2から20 mg/kg で認められた血漿中に反映されない肝臓中曝露の投与量比以上の増加に注目して検討を進めることとした。なお、0.2から2 mg/kg にかけての NA808の薬物動態に関しては、本研究の目的とは外れるため本論文では議論しない。

肝臓中の非線形の原因を明らかにするため、NA808が肝臓に発現するトランスポーターの基質であるかどうかを検討した。Double transfectant は取込みと排出トランスポーターの両方の基質を同定するのに有用であることが知られている [5, 6]。OATP1B1と MRP2の基質である $[^3\text{H}]$ E₂17βG は、OATP1B1-MRP2共発現細胞において P_{app} ratio が11.1であり、Basal 側から Apical 側への輸送が Apical 側から Basal 側への輸送に比べて有意に速かった (表3)。一方、OATP1B1発現細胞では、 $[^3\text{H}]$ E₂17βG の P_{app} ratio は1.1であり、両側方向の透過係数は同等であった。さらに、OATP1B1と BCRP の基質である $[^3\text{H}]$ ES の経細胞輸送が OATP1B1-BCRP 共発現細胞で観察された (P_{app} ratio : 2.7)。しかし、 $[^3\text{H}]$ E₂17βG と同様に OATP1B1発現細胞では、 $[^3\text{H}]$ ES の Basal 側から Apical 側への有意な輸送は観察されなかった (P_{app} ratio : 0.7)。

OATP1B1発現細胞では、 $[^3\text{H}]E_217\beta\text{G}$ および $[^3\text{H}]ES$ は OATP1B1によって能動的に取り込まれたが、頂端膜に排出トランスポーターを発現していないため透過係数が低かったことが考えられた。以上の通り、陽性対象を用いた評価から、各細胞を用いた評価系が妥当であること、OATP1B1及び MRP2あるいは OATP1B1及び BCRP の基質である場合に Basal 側から Apical 側への能動輸送が観察可能であることが確認できた。本評価系で $[^{14}\text{C}]NA808$ を評価したところ、 $[^{14}\text{C}]NA808$ の Basal 側から Apical 側への透過係数は、OATP1B1-MRP2共発現細胞では Apical 側から Basal 側への透過係数よりも明らかに大きく (P_{app} ratio : 24.2-70.2)、 $[^{14}\text{C}]NA808$ が OATP1B1によって細胞内に取り込まれ、MRP2によって細胞から排出されたことを示唆した。この時、 $[^{14}\text{C}]NA808$ の P_{app} ratio は基質 ($[^{14}\text{C}]NA808$) 濃度が高くなるに従い小さくなったことから、OATP1B1及び MRP2による輸送は $[^{14}\text{C}]NA808$ の濃度が高くなると飽和すると考えられた。一方、 $[^{14}\text{C}]NA808$ は、OATP1B1-BCRP 共発現細胞 (P_{app} ratio : 0.8-1.2) 及び OATP1B1発現細胞 (P_{app} ratio : 1.0-1.1) では、Basal 側から Apical 側と Apical 側から Basal 側の両方向で同等の透過係数を示した。これより、 $[^{14}\text{C}]NA808$ が BCRP を発現する頂端膜ではトランスポーターを発現しない頂端膜と同程度の輸送活性しかないことが考えられた。これらの結果は、 $[^{14}\text{C}]NA808$ が OATP1B1と MRP2の基質であるが、BCRP の基質ではないことを示唆している。また、ヒトの OATP 及び/あるいは MRP2の基質である薬物が、ラットの Oatp 及び/あるいは Mrp2の基質であると報告されている事例が複数あることから [8-10]、 $[^{14}\text{C}]NA808$ についてもラットの Oatp および Mrp2の基質となる可能性があると考えた。

2.4 小括

NA808を0.2から20 mg/kg の投与量でラットに単回静脈内投与したところ、速やかに肝臓に移行し、主に未変化体として胆汁から排泄された。また、臨床用量相当と考えられる2から20 mg/kg にかけて、血漿中曝露は用量に比例したにも関わらず、肝臓中曝露は用量比以上の増加が認められた。トランスポーター試験により、NA808は OATP1B1および MRP2の基質であることが示唆され、基質濃度が高い場合においては輸送の飽和が確認できた。以上より、

排出トランスポーター（MRP2）の輸送能を超えた高投与量域では、NA808の排泄速度が飽和し、投与量比以上に肝臓中濃度が上昇すると考えられた。また、本研究では単回投与のみの非線形性を評価したが、トランスポーター輸送に伴う非線形が原因であるため、反復投与においても同様の現象が認められることが考えられた。

3. 簡易的 PBPK モデルを用いた解析

本項では、モデル解析のための NA808の物性情報の取得および PBPK モデル構築によって、NA808の薬物動態に関連する毒性リスクの考察を行う。モデル構築（フィッティング）には MATLAB R2021b (MathWorks, Natick, MA)を使用した。

3.1 NA808の物性情報の取得

3.1.1 血液/血漿濃度比 (R_b)

[^{14}C]NA808溶液を、あらかじめ37°Cに加温したラット血液に添加した（最終濃度：0.1, 1, 及び10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.155, 1.55, 及び15.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), $n=3$)。本試験で用いた NA808の濃度は、図1で示す血漿中濃度を参考に設定した。血液は3匹のラットから得たものを個別別で使用した。最終有機溶媒（エタノール）含有量は1%未満とした。血液サンプルは[^{14}C]NA808を添加した直後に37°Cで5分間インキュベートし、その後、各血液サンプルから50 μL を採取して放射能濃度 (C_b) を測定した。ヘマトクリット値 (H_t) を決定するために、インキュベーション後の血液サンプルから一部をキャピラリーガラス管に取り、遠心分離（15,000 g, 5分間）することで H_t を求めた。残った血液サンプルは遠心分離して血漿を分離し（4°C, 1,200 g, 10分間）、100 μL を採取して放射能濃度を測定した (C_p)。血液サンプル50 μL は tissue-solubilizing agent (BIOMERIT、NACALAI TESQUE、INC., Kyoto, Japan) 1 mL で約30分間融解させ、シンチレーションカクテル (HIONIC-FLUOR、PerkinElmer Japan G.K., Kanagawa, Japan) 15 mL と混合した。血漿サンプル100 μL は約1 mL の精製水で希釈し、シンチレーションカクテル (Clearsol I、NACALAI TESQUE、INC.) 10 mL と混合した。これらのサンプルは3.1.3項に記載の通りに測定し、 R_b は以下の式に従って計算した。

$$R_b = C_b/C_p \quad (\text{式 3})$$

3.1.2 血漿中非結合形分率 (f_p)

[¹⁴C]NA808溶液を、あらかじめ37°Cに加熱したラット血漿に添加した（最終濃度：0.1, 1, 及び10 µg/mL, n=3）。血漿は10匹のラットのプール血漿を使用した。最終有機溶媒（エタノール）含有量は1%未満とした。血漿サンプルは[¹⁴C]NA808を添加した直後に37°Cで5分間インキュベートし、2 mLを遠心チューブに分取して遠心分離した（20°C, 200,000 g, 18時間）。遠心分離後、得られた上清各200 µLをゆっくりと取り、10 mLのClear-sol Iと混合した(C_f)。残りの血漿サンプル(C_p) 100 µLをClear-sol Iの10 mLと混合し、各サンプルの放射能を3.1.3項に記載の通りに測定した。 f_p は以下の式に従って計算した。

$$f_p = C_f / C_p \quad (\text{式 4})$$

3.1.3 測定

放射能は、LSC (TRI-CARB 2300TR, PerkinElmer Japan G.K.) を使用して、5分間の測定を実施した。各サンプルの放射能は、シンチレーションカクテルのみのバックグラウンド (cpm) を引いた値で表され、バックグラウンドの2倍以下の放射能は検出限界以下とした。

3.2 簡易的 PBPK モデル解析

3.2.1 簡易的 PBPK モデルの構築

雄性ラットに NA808を単回静脈内投与した薬物動態試験から得られた血漿中および肝臓中 NA808濃度推移と累積胆汁排泄量を基に、NA808の物性情報や生理学的情報の文献値を用いて (表4)、中心、末梢、及び肝臓コンパートメントからなる簡易的 PBPK モデルを構築した (図5)。PBPK モデルとは血液、肝臓、小腸などのヒトの臓器をそれぞれコンパートメントとして設定し、血流、尿、胆汁などの液体成分や代謝及び細胞膜透過を組み込んだモデルで、血液や体内の各臓器中に存在する薬物濃度の時間推移を値として説明するものである。本研究では、ラットにおける非臨床薬物動態試験の結果に基づき、NA808がほぼすべて肝臓

(代謝及び胆汁排泄)を介して消失すると考えられたことから、臓器としては肝臓のみをコンパートメントとして設定した簡易的な PBPK モデルを用いた。また、高クリアランス薬物の肝臓からの消失を表現するためには dispersion model が適切であることが知られているが [11-13]、dispersion model の理論を PBPK モデルに反映するには複雑な計算が必要となる。Watanabe らは、より簡便に計算が可能な well-stirred model を用いて肝臓における速やかな消失を再現できる方法として、肝臓を5つに分けて記述する方法を提唱した [14]。この方法は、現在では多くの研究で用いられており [15-18]、高クリアランス薬物の PBPK モデルを構築する際のゴールドスタンダードとなっている。本研究では、NA808の血液中からの早い消失を表現するために、Watanabe らのモデルを参考にした。

表4 簡易的 PBPK モデル解析に使用した NA808の物性情報や生理学的情報の文献値

Parameters	Unit	Values	Sources
Q_h	L/h/kg	3.31	[19]
V_e	L/kg	0.115	[20]
V_c	L/kg	0.297	[20]
f_p		0.00184	3.3.2項参照
f_b		0.00316	f_p / R_b
R_b		0.583	3.3.1項参照

Q_h :

肝血流量、 V_e : 肝細胞外スペースの容積、 V_c : 肝細胞内スペースの容積、 f_p : 血漿中非結合形分率、 f_b : 血液中非結合形分率、 R_b : 血液/血漿濃度比

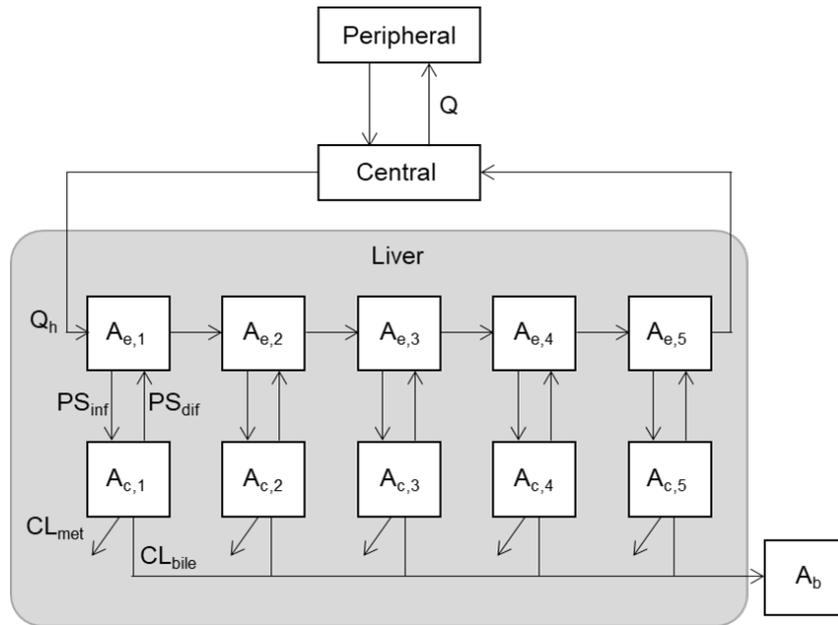


図5 NA808のラット薬物動態解析のための簡易的PBPKモデル

A_1 及び A_2 : 中心及び末梢コンパートメントにおける薬物量、 $A_{c,i}$ 及び $A_{e,i}$: 肝細胞内及び肝細胞外コンパートメントにおける薬物量、 PS_{dif} : 受動拡散クリアランス、 PS_{inf} : 肝取り込みクリアランス、 Q : コンパートメント間クリアランス、 Q_h : 肝血流量、 CL_{bile} : 胆汁排泄クリアランス、 CL_{met} : 代謝クリアランス

本PBPKモデルにおいて、NA808の薬物動態は以下の式5から式10の微分方程式で表現される。

Central compartment ($i = 5$)

$$\frac{dA_1}{dt} = -Q_h \cdot \frac{A_1}{V_1} + Q \cdot \left(\frac{A_2}{V_2} - \frac{A_1}{V_1} \right) + Q_h \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e} \quad (\text{式5})$$

Peripheral compartment

$$\frac{dA_2}{dt} = Q \cdot \left(\frac{A_1}{V_1} - \frac{A_2}{V_2} \right) \quad (\text{式6})$$

Hepatic extracellular compartments (He,i; i = 1~5)

$$\begin{aligned} \frac{dA_{e,i}}{dt} = & Q_h \cdot \left(\frac{A_1}{V_1} - \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e} \right) + \frac{1}{5} \cdot f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c} \cdot PS_{dif} - \frac{1}{5} \cdot f_b \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e} \\ & \cdot \left(PS_{dif} + \frac{V_{max,uptake}}{K_{m,uptake} + f_b \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e}} \right) \end{aligned} \quad (i=1) \text{ (式7)}$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_{e,i}}{dt} = & Q_h \cdot \left(\frac{A_{e,i-1}}{1/5 \cdot V_e} - \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e} \right) + \frac{1}{5} \cdot f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c} \cdot PS_{dif} - \frac{1}{5} \cdot f_b \\ & \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e} \cdot \left(PS_{dif} + \frac{V_{max,uptake}}{K_{m,uptake} + f_b \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e}} \right) \end{aligned} \quad (i=2\sim5) \text{ (式8)}$$

Hepatic intracellular compartments (Hc,i; i = 1~5)

$$\begin{aligned} \frac{dA_{c,i}}{dt} = & \frac{1}{5} \cdot f_b \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e} \cdot \left(PS_{dif} + \frac{V_{max,uptake}}{K_{m,uptake} + f_b \cdot \frac{A_{e,i}}{1/5 \cdot V_e}} \right) - \frac{1}{5} \cdot f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c} \cdot PS_{dif} \\ & - \frac{1}{5} \cdot f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c} \cdot CL_{met} - \frac{1}{5} \cdot f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c} \cdot \left(\frac{V_{max,bile}}{K_{m,bile} + f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c}} \right) \end{aligned} \quad (式9)$$

Biliary compartment

$$\frac{dA_b}{dt} = \sum_{i=1}^5 \frac{1}{5} \cdot f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c} \cdot \left(\frac{V_{max,bile}}{K_{m,bile} + f_h \cdot \frac{A_{c,i}}{1/5 \cdot V_c}} \right) \quad (式10)$$

モデルの構築にあたっては、以下の点を考慮した：

- 1) 肝臓を肝細胞外スペースと肝細胞にコンパートメントを分け、肝臓への取込みにトランスporter輸送過程を組み込んだ。
- 2) 胆汁排泄過程にトランスporter輸送過程を組み込んだ。

3) NA808の血液中からの速やかな消失を再現することを目的として、Well-stirred model を用いて肝臓中の濃度勾配を表現するために肝臓を5つに分けた。

さらに、以下の仮定を置いた：

1) NA808が尿中からほとんど排泄されず、主に胆汁から排泄された事実に基づき、NA808の総クリアランスは肝クリアランスに等しいとした。

2) 肝臓の類洞側の細胞膜における単純拡散は取込みと排泄の両方向で同じとした（式11）。

肝固有クリアランス ($CL_{int,all}$) は類洞側の受動的な拡散による肝臓細胞への取込みおよび排出クリアランス (PS_{dif})、肝臓へのトランスポーターによる取込みクリアランス ($PS_{act,inf}$)、胆汁排泄クリアランス (CL_{bile}) と代謝クリアランス (CL_{met}) を用いて定義した（式12）。非臨床動態試験の結果より、代謝過程も関与していることが推察されたため、代謝過程も組み込んだ。また、 β を肝固有クリアランスの律速過程を定義するために設定した（式13）。非臨床動態試験の結果からは律速過程を評価することが困難であったが、律速過程の設定により $V_{max,uptake}$ の初期値が大きく異なるため、Yoshikado らの方法 [18] を参考に、本研究では β を 0.2, 0.5, 0.8 と振って検討した。 $CL_{int} (= CL_{int,bile} + CL_{int,met})$ が PS_{dif} より十分に大きいとき、 β の値が大きくなり、 $CL_{int,all}$ は PS_{inf} に近似できるため、肝臓からの消失の律速過程は肝臓への取込み過程と考えられる。反対に CL_{int} が PS_{dif} よりも十分に小さい場合 (β の値が小さい時) は、肝臓からの消失の律速過程は肝臓への取込みだけではなく、代謝や胆汁排泄にも影響を受けると考えられる。 $PS_{act,inf}$ と CL_{bile} は、肝取込み及び胆汁排泄過程にトランスポーターが関与していることがトランスポーター試験から示唆されたことから、トランスポーター輸送の飽和を表現できるように、類洞膜を介した肝取込みトランスポーター輸送のミカエリス定数 ($K_{m,uptake}$) と最大輸送速度 ($V_{max,uptake}$)、及び頂端膜側の胆汁排泄トランスポーター輸送のミカエリス定数 ($K_{m,bile}$) と最大輸送速度 ($V_{max,bile}$) を用いて式14及び15のように定義した。肝臓中非結合形分率 (f_h) は Watanabe らの方法を参考にして式16を用いて計算した [14]。

$$PS_{inf} = PS_{dif} + PS_{act,inf} \quad (式11)$$

$$CL_{int,all} = PS_{inf} \times \frac{CL_{bile} + CL_{met}}{CL_{bile} + CL_{met} + PS_{dif}} = PS_{inf} \times \beta \quad (式12)$$

$$\beta = \frac{CL_{bile} + CL_{met}}{CL_{bile} + CL_{met} + PS_{dif}} \quad (式13)$$

$$PS_{act,inf} = \frac{V_{max,uptake}}{K_{m,uptake} + C_{e,i} \times f_b} \quad (式14)$$

$$CL_{bile} = \frac{V_{max,bile}}{K_{m,bile} + C_{c,i} \times f_h} \quad (式15)$$

$$f_p / f_h = 0.5 \times (f_p + 1) \quad (式16)$$

3.2.2 パラメータ初期値の設定

$K_{m,uptake}$, $V_{max,uptake}$, CL_{met} , $K_{m,bile}$, $V_{max,bile}$ について、ラットにおける NA808 の血液及び肝臓中濃度推移と累積胆汁排泄データに基づいて、初期値を設定した。

$K_{m,uptake}$ は最低用量 0.2 mg/kg における非結合形の平均血液中濃度を初期値として用いた。次に、20 mg/kg の時にトランスポーター輸送が飽和していることを考慮して、0.2 mg/kg を線形領域と仮定し、それぞれの肝取込みクリアランスの差分をトランスポーターによる肝取込みクリアランスとした。このクリアランス値と $K_{m,uptake}$ 初期値との積を $V_{max,uptake}$ 初期値として設定した。 $V_{max,uptake}$ 初期値は $\beta = 0.2, 0.5, 0.8$ のそれぞれについて求めた。 CL_{int} は別研究として実施されたヒト in vitro 代謝実験の結果を参考にして初期値を設定した。 $K_{m,bile}$ は 2 mg/kg における非結合形の平均肝臓中濃度を初期値とし、 $V_{max,bile}$ は 0.2 および 2 mg/kg の線形領域の胆汁排泄クリアランスを参考にして設定した。設定した初期値のリストは表 5 に示す。

表5 NA808の簡易的PBPKモデル解析のためのパラメータ初期値

Parameters	Unit	Initial values		
		β 0.2	β 0.5	β 0.8
$K_{m,uptake}$	nmol/L		0.01	
$V_{max,uptake}$	nmol/h/kg	6378	2551	1595
CL_{met}	L/h/kg		10.9	
$K_{m,bile}$	nmol/L		1.5	
$V_{max,bile}$	nmol/h/kg		75	

$K_{m,uptake}$ ：血管からの肝取込みに対するミカエリス定数、 $V_{max,uptake}$ ：血管からの肝取込みに対する最大輸送速度、 CL_{met} ：代謝クリアランス、 $K_{m,bile}$ ：胆汁排泄に対するミカエリス定数、 $V_{max,bile}$ ：胆汁排泄に対する最大輸送速度

3.2.2 モデル解析

本解析では多数のパラメータを最適化する必要があり、同時にフィッティングを行うことが困難であったため、本解析は非臨床試験から得られた知見から NA808の薬物動態に関連する生理的な状況を考慮して、3ステップで段階的にパラメータを最適化する手法を採用した。非臨床動態試験で得られた血漿中濃度推移は1次消失を示していたが (図3)、OATP1B1の基質であることを考慮すると、初回採血時点以前に α 相が存在していることが予想された。そのため、まず第1ステップとして、NA808の血液中濃度推移に対して2-コンパートメントモデル (図6) を用いてフィッティングを行い、 CL, V_1, V_2, Q について仮のパラメータ最適値を求めた。本モデルにおける NA808の薬物動態は以下の式17と式18の微分方程式で表現される。

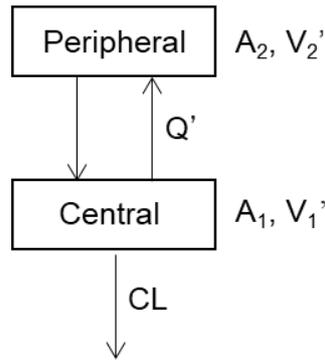


図6 第1ステップで用いた2-コンパートメントモデル

A_1 及び A_2 ：中心及び末梢コンパートメントにおける薬物量、 V_1' 及び V_2' ：中心及び末梢コンパートメントにおける分布容積、 Q' ：コンパートメント間クリアランス、 CL ：クリアランス

Central compartment

$$\frac{dA_1}{dt} = Q' \cdot \left(\frac{A_2}{V_2'} - \frac{A_1}{V_1'} \right) - CL \cdot \frac{A_1}{V_1'} \quad (\text{式17})$$

Peripheral compartment

$$\frac{dA_2}{dt} = Q' \cdot \left(\frac{A_1}{V_1'} - \frac{A_2}{V_2'} \right) \quad (\text{式18})$$

次に、第1ステップで求めたパラメータを固定し、肝臓中濃度推移および胆汁排泄量に対してもフィッティングを行った（図7）。最適化すべきパラメータは8つであるが、すべてのパラメータを最適化し、なおかつ同時に最適な β を探索していくことは困難であったため、第2ステップとして、まずは最適化すべき8つのパラメータのうち $K_{m,\text{uptake}}$, $V_{\max,\text{uptake}}$, CL_{met} , $K_{m,\text{bile}}$, $V_{\max,\text{bile}}$ の5つのパラメータの最適値を、 β が0.2、0.5、0.8のそれぞれの値に対して求めた。この時の各パラメータの初期値は表5に記載のものを用いた。ここでは、NA808の薬物動態は式7から式10及び式17から式18の微分方程式で表した。

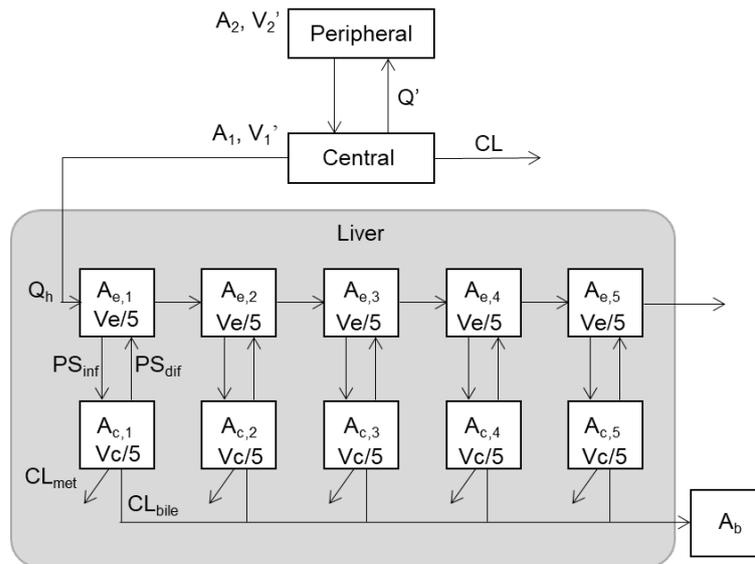


図7 第2ステップで用いたモデル

A_1 及び A_2 :中心および末梢コンパートメントにおける薬物量、 $A_{c,i}$ 及び $A_{e,i}$: 肝細胞内および肝細胞外コンパートメントにおける薬物量、 V_1' および V_2' :中心および末梢コンパートメントにおける分布容積、 V_c 及び $V_{c,i}$:肝細胞外および肝細胞内コンパートメントにおける実容積、 Q' : コンパートメント間クリアランス、 CL :クリアランス、 PS_{dif} : 受動拡散クリアランス、 PS_{inf} :肝取込みクリアランス、 Q : コンパートメント間クリアランス、 Q_h : 肝血流量、 CL_{bile} :胆汁排泄クリアランス、 CL_{met} : 代謝クリアランス

最後のステップでは、図5の簡易的 PBPK モデルを用いて第2ステップで求めた5つのパラメータを固定し、血液中濃度推移、肝臓中濃度推移及び胆汁中排泄量のすべてをフィッティングさせることで、 Q, V_1, V_2 についての最適値を求めた。この時の各パラメータの初期値は第1ステップで求めた Q', V_1', V_2' を用いた。

3.2.3 感度分析

MATLAB R2021b (MathWorks) の Calculate Sensitivity Program を使用して、肝臓コンパートメントにおける各パラメータ ($\beta, K_{m,uptake}, V_{max,uptake}, CL_{met}, K_{m,bile}$, 及び $V_{max,bile}$) の感度分析を実施した。

3.3 結果

3.3.1 血液/血漿濃度比 (R_b)

表6にラット血液における R_b の結果を示す。ラット血液における R_b は、0.1、1及び10 $\mu\text{g/mL}$ のいずれの濃度においても約0.6であった。NA808が濃度に関わらず血球にほとんど分布しないことが示唆された。

表6 ラット血液における NA808の R_b

Concentration (mg/mL)	R_b
0.1	0.58 ± 0.01
1	0.59 ± 0.02
10	0.58 ± 0.01

値は n=3の平均値 ± SD として示す。

3.3.2 血漿中非結合形率 (f_p)

表7にラット血漿における f_p の結果を示す。基質濃度0.1 mg/mL では遠心上清の濃度が定量限界未満 (<約0.0004 mg/mL) であったため、 f_p は算出しなかった。算出できた基質濃度1及び10 mg/mL において、 f_p は約0.002であり、NA808はラット血漿タンパクに強く結合することが明らかとなった。

表7 ラット血漿における NA808の f_p

Concentration (mg/mL)	f_p
0.1	NC
1	0.00203 ± 0.00092
10	0.00164 ± 0.00057

NC: 遠心上清 (C_f) が定量下限未満 (< 約0.0004 mg/mL) であったため、算出していない。

値は n=3の平均値 ± SD として示す。

3.3.3 簡易的 PBPK モデル解析

NA808の血液および肝臓濃度推移と胆汁中累積排泄量の結果に基づいて、簡易的 PBPK モデルを用いてフィッティングし、 Q , V_1 , V_2 , $K_{m,uptake}$, $V_{max,uptake}$, CL_{met} , $K_{m,bile}$, 及び $V_{max,bile}$ の8つのパラメータ値を最適化した。本研究では、3ステップで解析を行ったため、それぞれのステップにおける結果を次に示す。

3.3.3.1 第1ステップ

NA808の血液中濃度推移に対して2-コンパートメントモデルを用いてフィッティングを行い、 CL , V_1' , V_2' , Q' についてパラメータ最適値を求めた。解析ソフトの都合上、 V_1' と V_2' は第1ステップでは逆数とした(表8)。得られたフィッティングカーブは実測値をよく再現しながらも、 α 相の推移を予測することができた(図8)。

表8 モデル解析の第1ステップで最適化されたパラメータ±SE

Parameters	Unit	Optimized values					
		0.2 mg/kg		2 mg/kg		20 mg/kg	
CL	L/h/kg	6.21	± 0.855	3.40	± 0.489	2.36	± 0.104
$1/V_1'$	(L/kg) ⁻¹	1.80	± 0.731	2.05	± 0.437	4.41	± 2.08
$1/V_2'$	(L/kg) ⁻¹	0.0513	± 0.0137	0.0491	± 0.00448	0.103	± 0.0397
Q'	L/h/kg	10.4	± 3.74	10.5	± 1.76	3.90	± 1.77

CL：クリアランス、 V_1' 及び V_2' ：中心及び末梢コンパートメントにおける分布容積、 Q' ：コンパートメント間クリアランス

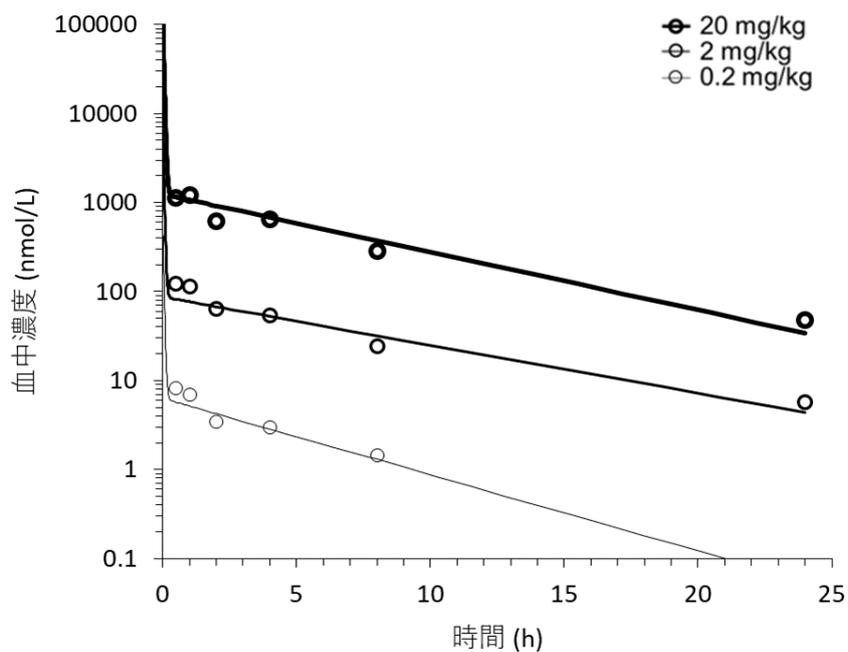


図8 モデル解析の第1ステップで得られた血液中濃度のフィッティングカーブ
 実測値は n=3の平均値として示した。

3.3.3.2 第2ステップ

第1ステップで求めたパラメータを固定し、肝臓中濃度推移及び胆汁排泄量も含めて解析した。肝臓に関する5つのパラメータ ($K_{m,uptake}$, $V_{max,uptake}$, CL_{met} , $K_{m,bile}$, $V_{max,bile}$) について、 β が0.2, 0.5, 0.8のそれぞれにおける最適値を求めた。最適化されたパラメータは表9に示した。 β が0.2の時に、標準誤差 (SE) が最も小さい結果となった。この時のフィッティングカーブを図9に示す。本ステップでは血液中の濃度は固定しているため肝臓から血液中への戻りが反映されず、肝臓中濃度及び胆汁中排泄量のフィッティングカーブが実測から少し外れていた。

表9 モデル解析の第2ステップで最適化されたパラメータ±SE

Parameters	Unit	Optimized values		
		β 0.2	β 0.5	β 0.8
$K_{m,uptake}$	nmol/L	0.0838 ± 0.0064	0.00968 ± 1.58	0.00961 ± 0.776
$V_{max,uptake}$	nmol/h/kg	106000 ± 99800	2170 ± 30200	1420 ± 15200
CL_{met}	L/h/kg	11.1 ± 3.5	13.7 ± 721	13.6 ± 498
$K_{m,bile}$	nmol/L	129 ± 54	1.16 ± 20.3	1.14 ± 9.52
$V_{max,bile}$	nmol/h/kg	11200 ± 4570	398 ± 1800	403 ± 1540

$K_{m,uptake}$: 血管からの肝取込みに対するミカエリス定数、 $V_{max,uptake}$: 血管からの肝取込みに対する最大輸送速度、 CL_{met} : 代謝クリアランス、 $K_{m,bile}$: 胆汁排泄に対するミカエリス定数、 $V_{max,bile}$: 胆汁排泄に対する最大輸送速度

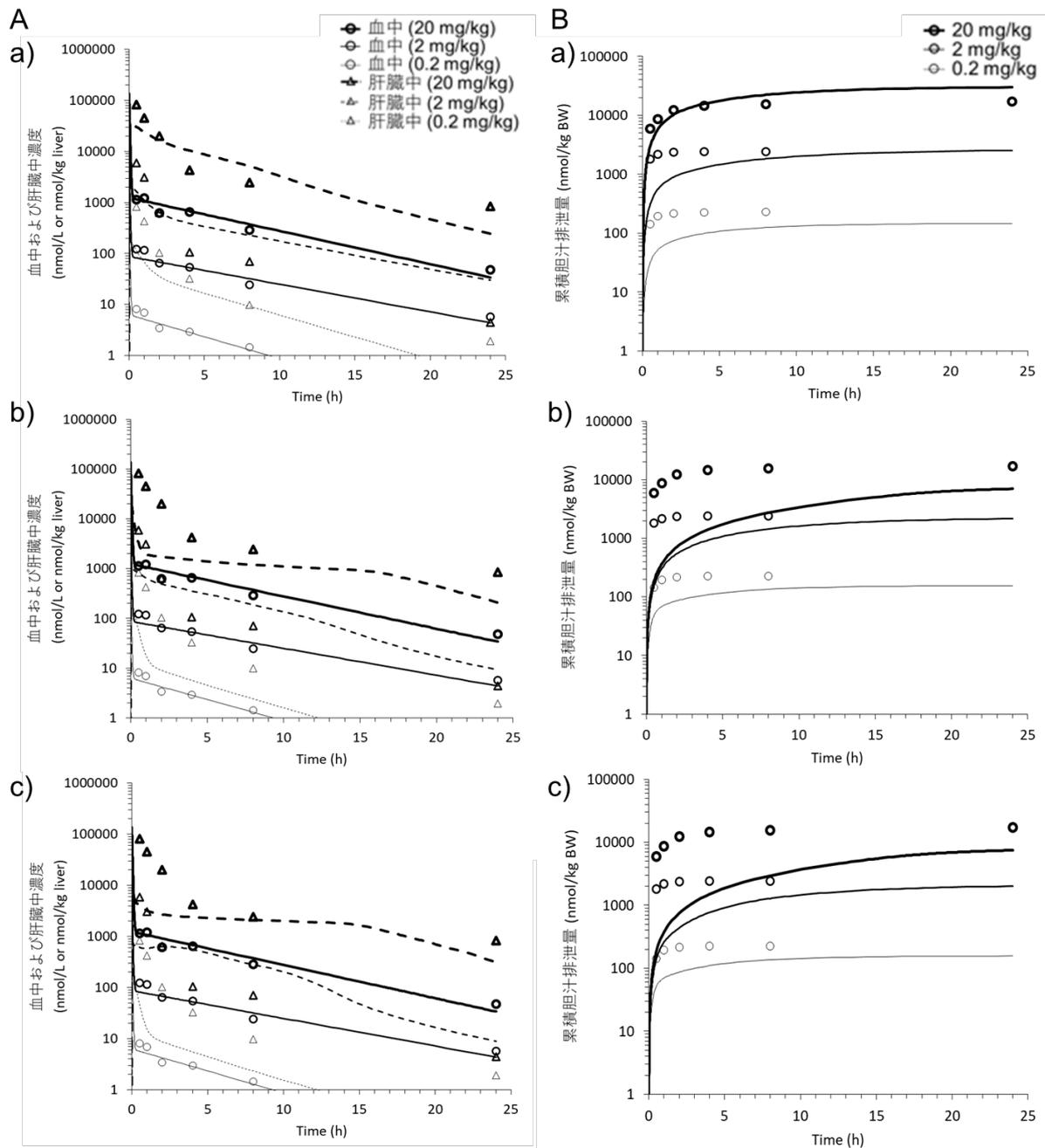


図9 モデル解析の第2ステップで得られた血液中及び肝臓中濃度 (A) と累積胆汁排泄量 (B) のフィッティングカーブ

実測値は $n=3$ の平均値として示し、フィッティング時の β 値は 0.2 (a)、0.5 (b) 及び 0.8 (c) を設定した。

3.3.3.3 第3ステップ

NA808の血液および肝臓濃度推移と胆汁中累積排泄量の結果に基づいて、図5に示した簡

易的 PBPK モデルを用いてフィッティングし、Q, V₁, V₂の3つのパラメータ値を最適化した。最適化されたパラメータ及び、実測値とフィッティング解析で得られた値の幾何学的平均誤差を表10に、実測の血液中及び肝臓中 AUC とフィッティング解析によって得られた AUC を表11にまとめた。NA808の血液中および肝臓中濃度推移と胆汁中累積排泄量のフィッティングカーブは図10に示した。本ステップでは、肝臓へ分布した NA808の血液中の戻りや血液中濃度に対するフィッティングも行ったため、第2ステップではフィッティングしきれなかった肝臓中の濃度推移もより良く再現できた。

表10 NA808の簡易的 PBPK モデル解析で最適化されたパラメータ±SE

Parameters	Unit	Optimized values		
		β 0.2	β 0.5	β 0.8
Q	L/h/kg	3.23 ± 0.20	3.52 ± 100	4.03 ± 21.8
V ₁	L/kg	0.269 ± 0.029	0.0286 ± 38.3	0.209 ± 7.34
V ₂	L/kg	16.2 ± 2.3	93.2 ± 1612	89.4 ± 460
GMFE*		1.74	4.81	4.66

Q:コンパートメント間クリアランス、V₁:中心コンパートメントにおける分布容積、V₂:末梢コンパートメントにおける分布容積

* GMFE: Geometric Mean-Fold Error (幾何学的平均誤差)

$$GMFE = 10^{\text{mean}|\log(\frac{\text{predicted value}}{\text{observed value}})|}$$

表11 実測および解析で求めた AUC と2 mg/kg 投与群に対する AUC 比

	Dose (mg/kg)	AUC _{0-24h} (nmol*h/L)		Ratio of AUC _{0-24h} to 2 mg/kg	
		Observed	Simulated	Observed	Simulated
Blood ^{a)}	0.2	28.1	89.9	0.0408	0.100
	2	689	897	1.00	1.00
	20	7260	10200	10.5	11.4
Liver	0.2	1390	560	0.150	0.0868
	2	9240	6450	1.00	1.00
	20	176000	86300	19.0	13.4

^{a)} 血液中 AUC は血漿中 AUC に R_b をかけることで求めた。

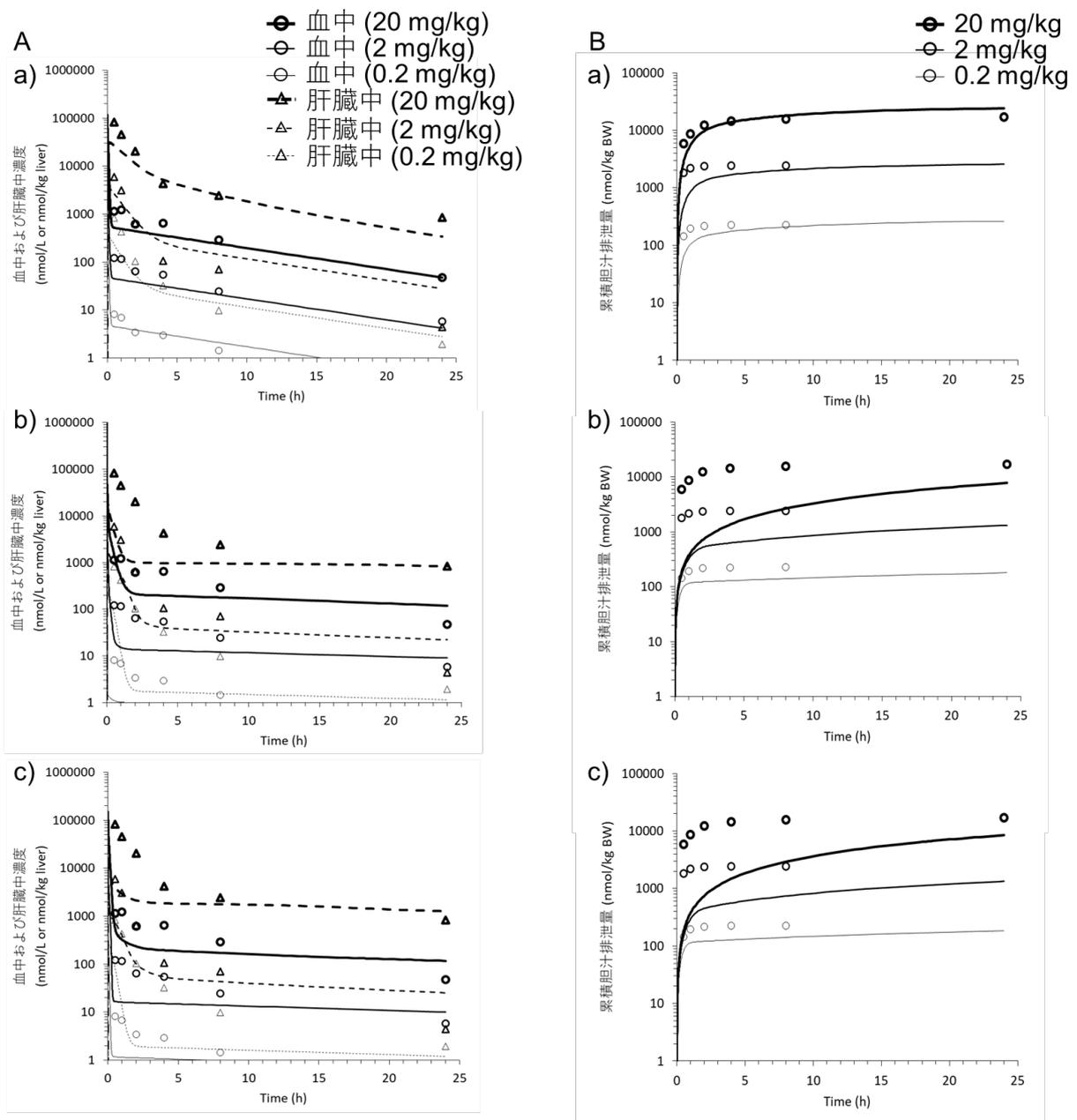


図10 NA808の簡易的PBPKモデル解析で得られた血液中及び肝臓中濃度（A）と累積胆汁排泄量（B）のフィッティングカーブ

実測値は $n=3$ の平均値として示し、フィッティング時の β 値は0.2 (a)、0.5 (b) 及び0.8 (c) を設定した。

3.3.3.4 感度分析

感度分析の結果を図11に示す。 $K_{m,uptake}$, $V_{max,uptake}$, 及び β が CL_{met} , $K_{m,bile}$, 及び $V_{max,bile}$ と比較して高い感度を示した。

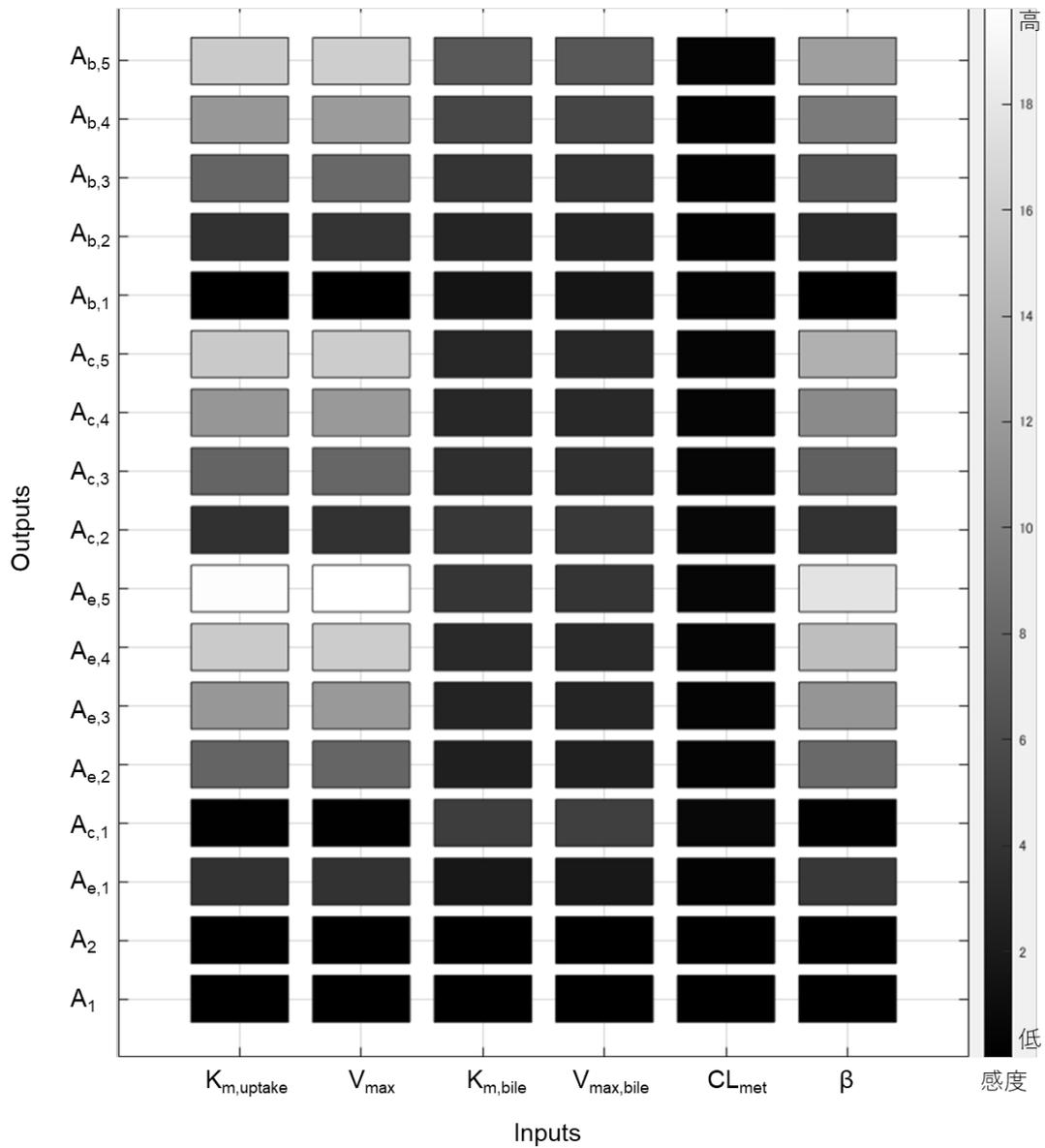


図11 NA808の簡易的PBPKモデルにおける感度分析

横軸は、血液中、肝臓中及び胆汁中のNA808量に対する感度を評価したパラメータを、縦軸は感度分析の対象を示す。色が濃いほど感度が低く、薄いほど感度が高いことを示す。

A_1 及び A_2 : 中心及び末梢コンパートメントにおける薬物量、 $A_{c,i}$ 及び $A_{e,i}$: 肝細胞内及び肝細胞外コンパートメントにおける薬物量、 $A_{b,i}$: 胆汁に排泄された薬物量 ($i = 1\sim 5$)

3.4 考察

NA808はラットにおいて、2から20 mg/kg の投与量範囲で血漿中では捉えられない肝臓での非線形薬物動態を示した。この知見は、臨床現場で血漿中濃度のみをモニターすると、予期しないNA808の肝臓濃度の増加を見逃すリスクがあるということを示している。NA808の薬物動態を理解し、薬物動態に関連するリスクを評価するために、簡易的PBPKモデル解析を用いてラットにおけるNA808の薬物動態の特徴を捉えることを試みた。ステップ1では各排泄過程の寄与度が不明であったため、 β を肝固有クリアランスにおける肝取込みクリアランスの割合として、3つの異なる β 値(0.2, 0.5, 0.8)を設定した。その結果、 β 値を0.2に設定したときが最もよくin vivoの結果を再現できており、フィッティングカーブの幾何学的平均誤差(GMFE)および各パラメータのSEの値が最も小さかった。これはNA808の排泄が肝取込み律速ではなく、肝臓への取込みクリアランス、代謝クリアランス、及び胆汁排泄クリアランスのそれぞれに依存することを示している。 β が0.5および0.8の時のフィッティングカーブは、血液中および肝臓中濃度推移と胆汁中累積排泄量の結果を適切に再現していなかった。肝臓コンパートメントの各パラメータに関して感度分析を行ったところ、 $K_{m,uptake}$ 、 $V_{max,uptake}$ 、及び β がNA808の薬物動態に大きな影響を与えることが明らかとなった。実際、 β が0.2の時と0.5または0.8の時では、上述のようにフィッティング結果が大きく異なっており、さらに $K_{m,uptake}$ と $V_{max,uptake}$ の最適化値及びSEの値も大きくなっていったことから、これらのパラメータがフィッティングに影響していることが示唆された。最適化された $K_{m,bile}$ (129 nmol/L)はNA808の肝臓中の非結合形分率(0.004)を考慮するとトータル濃度として32,300 nmol/L相当になる。この値は、2と20 mg/kgの間の肝臓中濃度に相当し(図3)、2から20 mg/kgの投与量において用量比以上の肝臓中曝露増加を示したラットの非臨床薬物動態試験と一致する結果であった。しかし、肝臓中の投与後0時間から24時間までのAUC(AUC_{0-24h})が20 mg/kgで若干過小評価されていた点については、改良の余地がある。本研究では2から20 mg/kgの肝臓中非線形について注目していたが、表8のCLに示されるようにラットにおいて

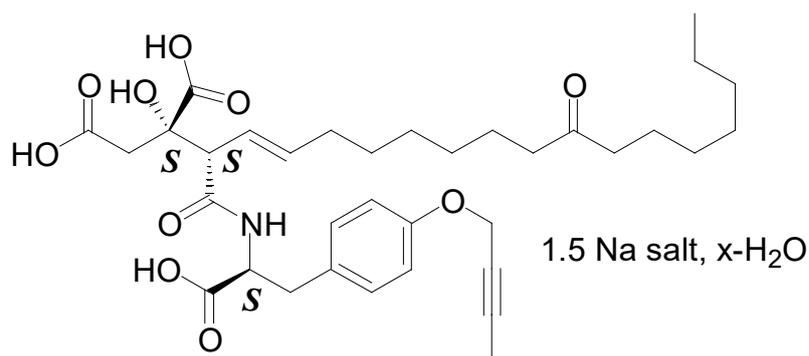
0.2から2 mg/kg の間で血液中曝露の非線形が認められている。この原因として、0.2 mg/kg 投与群では血漿中濃度が低値であったために8時間値までしか値が出ておらず AUC を低く見積もっている可能性があること、また、NA808の OATP1B1を介した血液中から肝臓への輸送に飽和が認められている可能性があることが考えられる。最適化された $K_{m,uptake}$ (0.0838 nmol/L、表9) は0.2 mg/kg 投与群の0.5h 値の非結合形 NA808濃度 (0.0258 nmol/L) と同等であり、0.2から2 mg/kg の間で飽和が生じる可能性があったが、 $V_{max,uptake}$ を $K_{m,uptake}$ で除した肝取込み輸送における固有クリアランスは 1.26×10^6 L/h/kg となり、 f_p の値を考慮しても肝血流 (3.31 L/h/kg) と比較して非常に大きな値であった。そのため、今回のフィッティングカーブにおいては、0.2から20 mg/kg の濃度範囲においては肝取込み輸送がいずれも血流に依存し、線形となった可能性が考えられた。より最適なパラメータ値を求めるためには、in vitro トランスポーター試験や代謝試験等のさらなる検討が役立つ可能性があると考え [21-23]。

3.5 小括

肝取込み及び胆汁中排泄にトランスポーター輸送過程を組み込んだ簡易的 PBPK モデルを構築し、in vivo 試験で得られたデータをもとに解析を行った。各排泄過程の寄与を定義した β が0.2の場合において、NA808の血液中濃度、肝臓中濃度、及び胆汁中排泄量を最もよく再現できた。以上のことから、簡易的 PBPK モデルを用いることで、血液中に反映されない肝臓中濃度の用量比以上の上昇について、再現可能であることが示唆された。

4. C型肝炎ウイルス複製阻害剤 NA808について

NA808 は、HCV の複製を強力に阻害する化合物である (図 12)。C型肝炎は、HCV へ感染することによって引き起こされる肝臓の病気で、急性から慢性の肝炎を生じさせ、最悪の場合、肝硬変や肝癌を引き起こす [24,25]。全世界で約 5800 万人が慢性 HCV 感染を持ち、毎年約 150 万人の新規感染が報告されている。WHO によれば、2019 年には肝硬変や肝癌により約 29 万人が C型肝炎で亡くなったとされている。C型肝炎に対する効果的なワクチンは現在存在せず、診断と治療へのアクセスも限られている。しかし、直接作用型抗ウイルス薬 (DAAs) は、HCV 感染者の 95%以上を治療することが可能で、この治療法の普及が求められている。一方、DAAs には薬剤耐性の問題が依然として残っており [26]、未だ C型肝炎の治療に対するアンメットニーズは高い。



組成式：C₃₅H₄₉NO₁₀ (as CH4630808-000)

分子量：643.8 (as CH4630808-000)

図12 NA808の構造

NA808 は宿主細胞のセリンパルミトイルトランスフェラーゼの強力な阻害剤であり、スフィンゴリエリンの合成を減少させる [27,29]。スフィンゴリエリンは HCV の複製に必須な要素であるため [30]、NA808 はセリンパルミトイルトランスフェラーゼを阻害すること

でスフィンゴミエリンの量を減少させ、肝細胞内のスフィンゴ脂質骨格上での HCV 複製を抑制する。薬物動態学的な観点から見ると、NA808 はターゲット組織である肝臓へ積極的に輸送されるため、肝炎治療薬として理想的なプロファイルを持つ。非臨床試験では、ラットだけでなくカニクイザルにおいても、速やかに肝臓に取込まれていることが示唆されるような血漿中濃度推移が認められている。毒性試験ではラットにおいて、推定臨床用量の 2 倍程度の投与量を反復投与した際に、可逆的ではあるものの肝臓における毒性所見が観察されており、臨床における肝機能モニターの重要性が明らかとなっている。

NA808 は 2010 年に C 型肝炎患者を対象とした薬物動態及び安全性を評価するための臨床試験を行っている。2010 年の臨床試験は最大用量 400 mg/body（典型的な成人体重 70 kg を想定したときに 5.71 mg/kg 相当）での投与が予定されていた。ラットとヒトの体表面積の違いを考慮すると [31]、ヒト 400 mg/body はラット 35.4 mg/kg に相当する。本試験ではヒトにおける初回用量から有効用量までを考慮し、0.2 から 20 mg/kg までのラットにおける薬物動態を評価した。ラットにおいて 2 から 20 mg/kg の用量で血液中に反映されない肝臓中の非線形があったことを考慮すると、臨床においても高用量で用量比以上に肝臓中曝露が増加する可能性は否定できず、慎重に肝機能をモニターすることが重要だと考えられた。

5. 総括

非臨床薬物動態試験の結果から、単回静脈内投与された NA808は速やかに肝臓へ移行し、主に肝臓を介して排泄され、肝臓への取込みと胆汁排泄はそれぞれ OATP1B1と MRP2による輸送が関わっていることを明らかにした。高投与量においては、血漿中曝露が用量に比例していたにも関わらず、肝臓中濃度は投与量比以上に上昇することが明らかとなった。これは、高濃度領域では MRP2の NA808輸送能力が飽和することによるものと示唆された。この現象は、簡易的 PBPK モデルを用いて再現可能であり、このモデルは胆汁排泄トランスポーターの基質となる薬剤の体内動態を理解する上で有用なツールとなると考えられた。組織中濃度の予期しない増加は、毒性の原因となることがある。そのようなリスクを避けるために、PBPK モデル解析に基づいて、血漿あるいは血液中曝露が用量に比例する場合においても組織中曝露に非線形性の可能性がないかどうかを考慮することが重要となる。

本研究では、使用した簡易的 PBPK モデルとパラメータは、ラットへの NA808静脈内投与後の血漿および肝臓中濃度と胆汁中累積排泄量を含む *in vivo* データに基づいて最適化されたが、臨床研究で肝臓および胆汁データを得ることは難しい。そのような場合、動物の *in vivo* データを参考にして、ヒト肝細胞やトランスポーター発現細胞等を用いた *in vitro* 系を基にモデル構造とパラメータを決定することが必要となるが、このモデルやパラメータは第1相臨床試験で得られた薬物動態の結果を使用して最適化することで、より精緻な考察が可能となる。しかしながら、モデルやパラメータが臨床情報により最適化されたものでなかったとしても、非臨床研究と PBPK モデリング解析の結果に基づいて検討した場合に、NA808のように排出トランスポーターの飽和に関連した非線形薬物動態を持つ可能性があるとし唆され、さらにその組織が安全性に重要な部位であった場合、その治験薬の用量増加は、血漿中濃度だけでなく対象組織の安全性評価を慎重に行うべきである。例えば、肝臓の場合であれば、ALT やアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) などの肝機能をモニターしながら、慎重に用量漸増を行うべきである。これにより、臨床現場において予期しない毒性を早期に診断することが可能となる。薬物の体内動態を理解することは、それに基づいて

最適な投与法を開発するための重要な一步である。PBPK モデルは、薬物動態のプロセスを数学的に表現することで、肝臓に限らず種々の臓器における薬物の体内動態を予測するのに役立つツールである。このような手法により、薬物の効果を最大化しながら副作用を最小限に抑えるための、より効率的な薬物投与法を開発するための提案が可能となる (図13)。

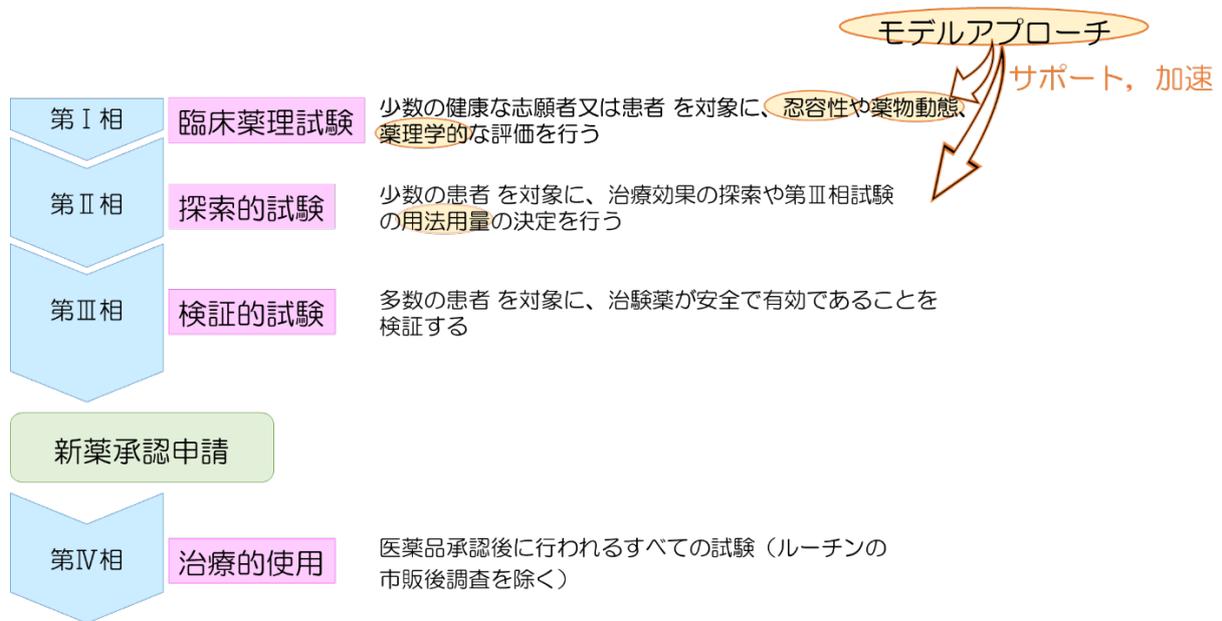


図13 臨床開発段階の各相の試験内容とモデルアプローチの有用性

6. 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。

本研究にあたり、多くの御助言、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。

本論文の主査として審査を賜りました武蔵野大学大学院薬科学研究科 臨床薬学センター 三原 潔 教授、副査として審査を賜りました 同 レギュラトリーサイエンス研究室 永井 尚美 教授に厚く御礼申し上げます。

そして、本研究にあたり、御協力を賜りました中外製薬株式会社 尾関 和久 博士、岡野 健 博士、森田 圭一 博士、大湊 紀明 博士、橘 達彦 博士に心から感謝致します。

7. 引用文献

1. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 ICH E8 臨床試験 「臨床試験の一般指針」 (通知 : 1998年4月21日) , Available from: <https://www.pmda.go.jp/files/000156372.pdf>, Accessed: 27 Dec, 2023.
2. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 ICH E8 (R1) 臨床試験 「臨床試験の一般指針」 の改正について (通知 : 令和4年12月23日) , Available from: <https://www.pmda.go.jp/files/000250244.pdf>, Accessed: 6 Mar, 2024.
3. Ito, S., Kusuhara, H., Yokochi, M., Toyoshima, J., Inoue, K., Yuasa, H., and Sugiyama, Y., Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. **340**(2): 393-403.
4. Nishiyama, K., Toshimoto, K., Lee, W., Ishiguro, N., Bister, B., and Sugiyama, Y., Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling Analysis for Quantitative Prediction of Renal Transporter-Mediated Interactions Between Metformin and Cimetidine. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2019. **8**(6): 396-406.
5. University of California, UCSF-FDA TransPortal + UCSD/UCD-NIEHS TICBase, Available from: <https://transportal.compbio.ucsf.edu/organs/liver/>, Accessed: 25 Dec, 2023.
6. Sasaki, M., Suzuki, H., Ito, K., Abe, T., and Sugiyama, Y., Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): 6497-6503.
7. Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H., and Sugiyama, Y., Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(3): 1059-1067.
8. Ellis, L. C., Hawksworth, G. M., and Weaver, R. J., ATP-dependent transport of statins by human and rat MRP2/Mrp2. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **269**(2): 187-194.
9. Liao, M., Zhu, Q., Zhu, A., Gemski, C., Ma, B., Guan, E., Li, A.P., Xiao, G. and Xia, C. Q., Comparison of uptake transporter functions in hepatocytes in different species to determine the optimal model for evaluating drug transporter activities in humans. *Xenobiotica*, 2019. **49**(7): 852-862.
10. Sun, P., Wang, C., Liu, Q., Meng, Q., Zhang, A., Huo, X., Sun, H. and Liu, K., OATP and MRP2-mediated hepatic uptake and biliary excretion of eprosartan in rat and human. *Pharmacol Rep*,

2014. **66**(2): 311-319.
11. Roberts, M.S. and Rowland, M., Correlation between in-vitro microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics: analysis with a dispersion model. *J Pharm Pharmacol*, 1986. **38**(3): 177-81.
 12. Iwatsubo, T., Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., Ishizaki, T., Green, C. E., Tyson, C. A., Sugiyama, Y., Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther*, 1997. **73**(2): 147-71.
 13. Naritomi, Y., Terashita, S., Kimura, S., Suzuki, A., Kagayama, A., Sugiyama, Y., 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): 1316-24.
 14. Watanabe, T., Kusuhara, H., Maeda, K., Shitara, Y., and Sugiyama, Y., Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **328**(2): 652-62.
 15. Nakayama, S., et al., Physiologically-based pharmacokinetic modeling for investigating the effect of simeprevir on concomitant drugs and an endogenous biomarker of OATP1B. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2023. **12**(10): 1461-1472.
 16. Morse, B.L., MacGuire, J.G., Marino, A.M., Zhao, Y., Fox, M., Zhang, Y., Shen, H., Griffith Humphreys, W., Marathe, P., Lai, Y., Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Transporter-Mediated Hepatic Clearance and Liver Partitioning of OATP and OCT Substrates in Cynomolgus Monkeys. *Aaps j*, 2017. **19**(6): 878-1889.
 17. Park, J.E., Shitara, Y., Lee, W., Morita, S., Sahi, J., Toshimoto, K., Sugiyama, Y., Improved Prediction of the Drug-Drug Interactions of Pemafibrate Caused by Cyclosporine A and Rifampicin via PBPK Modeling: Consideration of the Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Pemafibrate and Inhibition Constants With Preincubation Against OATP1B. *J Pharm Sci*, 2021. **110**(1): 17-528.
 18. Yoshikado, T., Yoshida, K., Kotani, N., Nakada, T., Asaumi, R., Toshimoto, K., Maeda, K., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., Quantitative Analyses of Hepatic OATP-Mediated Interactions Between Statins and Inhibitors Using PBPK Modeling With a Parameter Optimization Method. *Clin Pharmacol Ther*, 2016. **100**(5): 513-523.
 19. Davies, B. and T. Morris, Physiological-Parameters in Laboratory-Animals and Humans. *Pharmaceutical Research*, 1993. **10**(7): 1093-1095.
 20. Kawai, R., Mathew, D., Tanaka, C., and Rowland, M., Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. **287**(2): 57-68.
 21. Fardel, O., Moreau, A., Le Vee, M., Denizot, C., and Parmentier, Y., Evaluation of Drug Biliary Excretion Using Sandwich-Cultured Human Hepatocytes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*,

2019. **44**(1): 13-30.
22. Horiuchi, S., Kuroda, Y., Oyafuso, R., Komizu, Y., Takaki, T., Maeda, K., and Ishida, S., Construction of a culture protocol for functional bile canaliculi formation to apply human iPS cell-derived hepatocytes for cholestasis evaluation. *Sci Rep*, 2022. **12**(1): 15192.
 23. Kitaguchi, T., Horiuchi, S., Kuroda, Y., Ohno, K., Kobayashi, K., Tanaka, M., and Ishida, S., Construction of extended and functional bile canaliculi using long-term sandwich-cultured cryopreserved human hepatocytes and the application of hepatocytes for predicting the biliary excretion of pharmaceutical and food-related compounds. *J Toxicol Sci*, 2023. **48**(5): 251-261.
 24. World Health Organization, Hepatitis C., Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/hepatitis-c>, Accessed: 25 Dec. 2023.
 25. U.S. Department of Health and Human Services, Hepatitis C Basics, Available from: <https://www.hhs.gov/hepatitis/learn-about-viral-hepatitis/hepatitis-c-basics/index.html>, Accessed: 25 Dec. 2023.
 26. Howe, A. Y. M., Rodrigo, C., Cunningham, E. B., Douglas, M. W., Dietz, J., Grebely, J., Popping, S., Sfalcin, J.A., Parczewski, M., Sarrazin, C., Salazar, A., Fuentes, A., Sayan, M., Quer, J., Kjellin, M., Kileng, H., Mor, O., Lennerstrand, J., Fourati, S., Maio, V. C. D., Chulanov, V., Pawlotsky, J. M., Harrigan, P. R., Silberstein, F. C., Garcia, F. and Collaborators, S., Characteristics of hepatitis C virus resistance in an international cohort after a decade of direct-acting antivirals. *JHEP Rep*, 2022. **4**(5): 100462.
 27. Hirata, Y., Ikeda, K., Sudoh, M., Tokunaga, Y., Suzuki, A., Weng, L., Ohta, M., Tobita, Y., Okano, K., Ozeki, K., Kawasaki, K., Tsukuda, T., Katsume, A., Aoki, Y., Umehara, T., Sekiguchi, S., Toyoda, T., Shimotohno, K., Soga, T., Nishijima, M., Taguchi, R., and Kohara, M., Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(8): e1002860.
 28. Katsume, A., Tokunaga, Y., Hirata, Y., Munakata, T., Saito, M., Hayashi, H., Okamoto, K., Ohmori, Y., Kusanagi, I., Fujiwara, S., Tsukuda, T., Aoki, Y., Klumpp, K., Kohara, K. T., Gohary, A. E., Sydoh, M., and Kohara, M., A serine palmitoyltransferase inhibitor blocks hepatitis C virus replication in human hepatocytes. *Gastroenterology*, 2013. **145**(4): 865-873.
 29. Murakata, M. and T. Ikeda, Stereoselective synthesis of the viridiofungin analogue NA808 from a chiral tetrahydrofuran-carboxylic acid. *Org Biomol Chem*, 2017. **15**(31): 6632-6639.
 30. Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., Kohara, M., and Sudoh, M., Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(6): 333-337.
 31. FDA, Guidance for Industry “Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers”, Available from: <https://www.fda.gov/media/72309/download>, Accessed: 4 Jan. 2024.