

博士論文

酸性医薬候補品の代謝物生成機序および
その予測精度向上に関する研究

平成 27 年度
関口 和孝

目次

略語表	4
序論	6
第1章 <i>In vitro/in vivo</i> 間で認められた S-777469 代謝物プロファイルの乖離の精査	
第1節 緒論	11
第2節 実験材料および実験方法	
第1項 化合物および試薬	12
第2項 [¹⁴ C]-S-777469 の臨床薬物動態試験	12
第3項 ヒト凍結肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 代謝物分析	14
第3節 結果	
第1項 代謝物の生体内蓄積に関する検証	16
第2項 <i>In vitro</i> 試験条件に関する検証	18
第4節 考察	21
第5節 まとめ	22
第2章 ヒトにおける S-777469 主代謝物の生成機序および <i>in vitro/in vivo</i> 乖離の原因の解明	
第1節 緒論	24
第2節 実験材料および実験方法	
第1項 化合物および試薬	26
第2項 5-HM および 5-CA 生成時の補酵素依存性試験	26
第3項 各種 P450 組換え酵素, P450 阻害剤および抗 P450 抗体を用いた主代謝酵素同定試験	27
第4項 血清アルブミン添加時の 5-HM, 5-CA 生成変動	28
第5項 CYP2C9 組換え酵素における血清アルブミン添加時の	

S-777469 代謝の変動	29
第 6 項 CYP2C9 組換え酵素における長鎖脂肪酸添加時の 5-HM, 5-CA 生成速度の変動.....	29
第 7 項 LC-MS/MS を用いた定量	30
第 8 項 データ解析.....	30
第 3 節 結果	
第 1 項 5-HM および 5-CA 生成に関わる主代謝酵素同定	31
第 2 項 血清アルブミン添加による 5-HM, 5-CA 生成変動.....	35
第 3 項 CYP2C9 組換え酵素における 5-HM, 5-CA 生成に及ぼす各種 脂肪酸の影響.....	43
第 4 節 考察.....	45
第 5 節 まとめ.....	48
第 3 章 HepaRG 細胞およびヒト肝細胞移植マウスを用いた S-777469 代謝予測	
第 1 節 緒論	49
第 2 節 実験材料および実験方法	
第 1 項 化合物および試薬.....	50
第 2 項 ヒト凍結肝細胞および HepaRG 細胞における S-777469 代謝物生 成比較	50
第 3 項 コントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスにおける S-777469 薬物動態試験.....	51
第 3 節 結果	
第 1 項 ヒト凍結肝細胞および HepaRG 細胞における S-777469 代謝物 生成比較.....	51
第 2 項 コントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスにおける S-777469 薬物動態試験	52

第4節 考察	55
第5節 まとめ	56
総括	57
本研究の誌上発表	61
謝辞	62
参考文献	67

略語表

本論文では以下の略語を使用した.

AG;	acyl-glucuronide
AKR;	aldo-keto reductase
AUC _{all} ;	area under the plasma concentrationtime curve from 0 hr to the last time point
AUC _{inf} ;	area under the plasma concentrationtime curve from 0 hr to infinity
BSA;	bovine serum albumin
5-CA;	S-777469 5-carboxylic acid
CB;	cannabinoid
CL _{int} ;	intrinsic clearance
CV;	coefficient of variation
CYP;	cytochrome P450
C _{max} ;	maximum concentration
DDI;	drug-drug interaction
DMSO;	dimethyl sulfoxide
FDA;	Food and Drug Administration
F _a ;	fraction absorbed
F _g ;	intestinal availability
4-HC;	S-777469 4-hydroxycyclohexane
6-HE;	S-777469 6-hydroxyethyl
5-HM;	S-777469 5-hydroxymethyl
5-HM-AG;	S-777469 5-hydroxymethyl acyl-glucuronide
HPLC;	high-performance liquid chromatography

IC ₅₀ ;	50% inhibitory concentration
ICH;	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
k _a ;	absorption rate constant
K _m ;	apparent substrate concentration at half-maximal velocity
LC-MS/MS;	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Ms;	microsome
m/z;	mass-to-charge ratio
NAD ⁺ ;	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form)
NADH;	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
β-NADP ⁺ ;	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form)
β-NADPH;	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
P450;	cytochrome P450
Q _h ;	hepatic blood flow
S.D.;	standard deviation
t _{1/2} ;	elimination half-life
T _{max} ;	time to maximum concentration
UGT;	uridine diphosphate glucuronosyltransferase
V/[S];	velocity per substrate concentration
V _{max} ;	maximal velocity

序論

生体は、医薬品や環境化学物質など多くの外来異物に曝露されているが、通常、肝臓や小腸などにおいて、これら外来異物を水溶性の高い無害な代謝物へと変換・排泄しその恒常性を維持している。一方、benzo[α]pyreneなどの多環芳香族炭化水素においては、代表的な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (P450, CYP) などにより代謝的活性化を受け、生体タンパクや DNA と結合し変異原性を発揮することが知られている (Baird, Hooven et al. 2005)。また、これまでの研究から、acetaminophen や flutamide など複数の医薬品においても、未変化体そのものには毒性はないものの、代謝過程で生成する代謝物が肝障害や腎障害など生体に副作用を起こすことが明らかとなっている (James, Mayeux et al. 2003, Srivastava, Maggs et al. 2010)。また、近年、薬物性肝障害に関する作用機序や報告例は LiverTox としてオンライン上で纏められている。さらに、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) や新薬承認審査基準の標準化を行う日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) は代謝物の安全性試験に関するガイダンス (Guidance for Industry - Safety Testing of Drug Metabolites, MIST guidance, FDA 2008) ・ガイドライン (Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3 (R2), ICH M3 (R2) guideline, ICH 2009) をそれぞれ策定しており、ICH M3 (R2) guidance においては、ヒトで生成する医薬品の代謝物が総曝露の 10% を超え、且つ、その代謝物の曝露量が非臨床評価動物で担保出来ない場合、phase III 試験までに代謝物自身の安全性試験を実施すべきであることが記載されている。そのため、非臨床段階でヒト代謝物を定性的、定量的に予測できずヒト代謝物の安全性を非臨床評価動物で担保出来ない場合、

開発スケジュールの遅延に繋がる恐れがある。このことから、より安全性の高い医薬品を創製するためには、まず、臨床試験前にヒト代謝物を精度高く予測し、代謝物の安全性評価が必要か判断することが重要と考えられる（戸塚ら編著、薬物（ヒト）代謝物の構造解析・同定と承認申請/照会事項対応、2015）。

現在、加齢とともに複数の疾患を合併することが多くなることから、高齢者を中心に複数の薬剤を組み合わせる多剤併用療法が行われている（林ら、高齢者における医薬品の適正使用と安全管理、2006）。また、癌や後天性免疫不全症候群などに対する化学療法においても、治療効果増強や副作用低減の目的から、異なる作用機序を有する薬剤の併用が一般的である。しかし、医薬品の併用は併用薬同士の薬物間相互作用（drug-drug interaction, DDI）により薬効の変動や副作用発現に繋がる可能性がある（杉山ら、薬の相互作用としくみ、改訂第9版、2010）。そのため、新薬の研究開発段階においては、出来るだけ DDI ポテンシャルが少ない医薬品の創製および医薬品候補化合物が有する DDI ポテンシャルの把握が行われている。これまで、代謝物の多くは水溶性が高く無害と考えられてきたため、医薬品候補化合物の DDI ポテンシャルも未変化体を中心に行われてきた。しかし、gemfibrozil や bupropion などの医薬品においては、代謝物が、未変化体と比較して、より高い DDI ポテンシャルを有することも報告されている（Ogilvie, Zhang et al. 2006, Reese, Wurm et al. 2008）。さらに、FDA が発出した DDI に関するガイダンスには、ヒトで生成する医薬品の代謝物が未変化体の曝露の 25%以上を示す場合、代謝物自身の DDI ポテンシャルを検証すべきであることが記載されている（Guidance for Industry – Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, FDA 2012）。このことから、より DDI ポテンシャルの低い医薬品創製には、代謝物の安全性の観点と同様に、代謝物も含めた DDI ポテンシャルの把握が重要と考えられる。

通常、ヒトで生成する代謝物の予測には、ヒト肝ミクロソーム (Ms) やヒト凍結肝細胞などのヒト由来の *in vitro* 試料が用いられる。これまでの研究から、これら *in vitro* 試験系は概ねヒト代謝物を予測できることが示されているが、肝代謝型の医薬品であってもこれらの試験系ではヒト代謝物の予測が困難な場合も多く報告されている (Dalvie, Obach et al. 2009, Wang, Khetani et al. 2010)。そのため、精度高くヒト代謝物を予測し安全性および DDI ポテンシャルに及ぼす代謝物の影響を精査するため、非臨床段階でのヒト代謝物の予測精度向上は急務である。

アトピー性皮膚炎は皮膚疾患の中で頻度の高い疾患の一つであり、日本におけるアトピー性皮膚炎患者数は約 37 万人に上る (平成 23 年患者調査 (傷病分類編), 2011)。アトピー性皮膚炎においては、炎症性サイトカインが掻痒を誘発するため、治療においては、抗ヒスタミン薬などの抗炎症薬などが処方される。カンナビノイド受容体 (CB 受容体) は様々な内因性/合成カンナビノイドにより活性化する G-タンパク共役型受容体である。CB 受容体は 2 つのサブファミリーに分類され、脳において精神活性作用に関わる CB1 受容体および白血球や角化細胞などにおいて抗炎症作用に関わる CB2 受容体が存在する (Herkenham, Lynn et al. 1990, Mailleux and Vanderhaeghen 1992)。1-((6-ethyl-1-(4-fluorobenzyl)-5-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonyl)amino)-cyclohexanecarboxylic acid (S-777469) は、CB2 受容体の選択的アゴニストであり、末端にカルボキシル基を有する酸性化合物である (Odan, Ishizuka et al. 2012)。また、中枢移行性が低く、CB1 への結合親和性が低いことから、現在、中枢性副作用の少ないアトピー性皮膚炎、掻痒治療薬として開発されている。未変化体および代謝物の構造を **Fig. 1** に示す。非臨床段階におけるヒト肝 Ms およびヒト凍結肝細胞を用いた代謝物分析の結果、これら *in vitro* 試料においては 5 位-水酸化体 (S-777469 5-hydroxymethyl, 5-HM) が主に検出された (**Fig. 3**)。また、

5-HM は非臨床動物の肝細胞でより多く生成すること、非臨床動物における代謝物プロファイルに肝細胞、血漿間で大きな差はなかったことから、臨床においても 5-HM が主代謝物として検出されることが示唆された。しかし、本薬剤の第 I 相臨床試験の結果、ヒト血漿における主代謝物は 5-HM が二次代謝を受けた 5 位-カルボン酸体 (S-777469 5-carboxylic acid, 5-CA) であり、その血漿中曝露は総曝露の約 24% を占めた (Fig. 2)。一方、ヒト肝 Ms およびヒト凍結肝細胞における 5-CA 生成量は全体の 1% 未満であり、非臨床/臨床間で代謝物プロファイルに大きな乖離が認められた。

そこで本研究では、より安全で DDI ポテンシャルの低い医薬品創製に繋がるヒト代謝物プロファイルの予測精度向上を目的に、本薬剤の非臨床/臨床薬物動態試験の条件および結果を基に、*in vitro/in vivo* 間で認められた代謝物プロファイルの乖離の原因を精査した (第 1 章)。次に、ヒト肝 Ms およびヒト凍結肝細胞において 5-CA 生成が予測できなかった原因を 5-HM および 5-CA 生成に関わる薬物代謝酵素の同定も含めて検討した (第 2 章)。さらに、代謝物生成予測に対する培養細胞およびヒト肝細胞移植マウス (ヒト肝キメラマウス) の有用性についても検証を加えた (第 3 章)。その結果、*in vitro/in vivo* 間で認められた S-777469 代謝物プロファイルの乖離の原因は *in vitro* 試験系において CYP2C9 の触媒活性が抑制されているためであること、本薬剤を含む酸性医薬品のヒト代謝物生成をより精度高く予測するには、血清アルブミン添加ヒト肝 Ms や HepaRG 細胞、ヒト肝キメラマウスなどを用いることが重要であることが示された。以上、本研究によって、*in vitro/in vivo* 間で認められた代謝物生成の乖離の原因が明確となるとともに、より安全で DDI ポテンシャルの低い医薬品創製に繋がるヒト代謝物生成の予測精度向上に貢献する重要な因子を明らかにしたので、以下に詳述する。

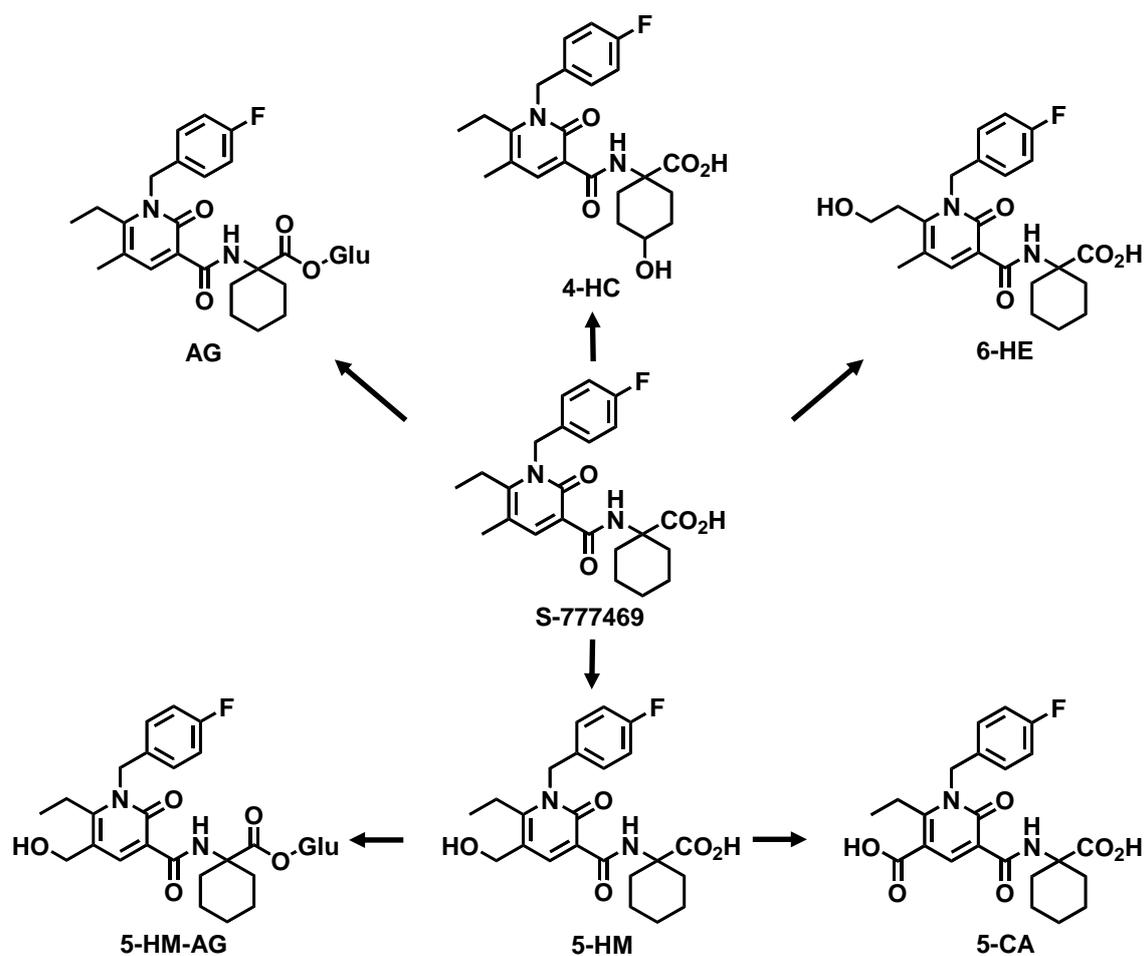


Fig. 1. Structure of S-777469 and its metabolites in rat, dog and humans. 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid; 6-HE, S-777469 6-hydroxyethyl; 4-HC, S-777469 4-hydroxycyclohexane; 5-HM-AG, S-777469 5-hydroxymethyl acyl-glucuronide; AG, acyl-glucuronide.

第1章 *In vitro/in vivo* 間で認められた S-777469 代謝物プロファイルの乖離の精査

第1節 緒論

これまで、さまざまな医薬品において、生成した代謝物が肝障害などの副作用や併用薬との DDI を引き起こすことが報告されており、より安全で DDI リスクの低い医薬品を創製するためには、代謝物も含めたリスク評価が重要と考えられている。現在、ヒト肝 Ms やヒト凍結肝細胞を用いたヒト代謝物予測が広く行われているが、代謝物の特性によって、これら *in vitro* 試料を用いた試験では *in vivo* における代謝物プロファイルを予測できない場合がある。代謝物プロファイルに *in vitro/in vivo* 間での乖離がある場合、その要因には様々な可能性が考えられる。まず、代謝物の消失半減期が未変化体より長くなり生体内で蓄積した可能性が考えられる。通常、代謝過程により生成した代謝物は未変化体よりも反応性が低くなる。一方、一部の医薬品代謝物においては、タンパク結合率などの物性値が未変化体に比較して上昇することや反応性を有するために、代謝物が未変化体に比較して蓄積傾向を示すことが報告されている (Karazniewicz, Dorota et al. 2014)。この場合、*in vitro* 試験における代謝物の生成量は低くとも、*in vivo* における代謝物の曝露は高くなることが予想される。つぎに、*in vitro* 試験における基質濃度や反応時間などの試験条件が *in vivo* 条件を反映していない可能性が考えられる。また、その他に、*in vitro/in vivo* 間の環境の違いで十分に酵素活性が発揮されない薬物代謝酵素が存在することが報告されていることから、*in vitro* 試験系では検出が困難な二次代謝反応が *in vivo* で起きた可能性などが考えられる (水垂ら, 第 16 回 HAB 研究機構学術年会, 2009)。そこで、本章では、*in vitro/in vivo* 間で見られた代謝物プロファイルの乖離の原因を明らかにすることを目的に、非臨床および臨床段階において実施した本薬剤の薬物動態

試験の条件および結果を基に、生体において S-777469 代謝物が蓄積した可能性および肝細胞を用いた *in vitro* 試験の条件が生体条件を反映していたかについて精査した。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 化合物および試薬

[¹⁴C]-S-777469, S-777469, 5-HM, 5-CA および 6 位-水酸化体 (S-777469 6-hydroxyethyl, 6-HE) は塩野義製薬株式会社にて合成された。 [¹⁴C]-S-777469 の比放射能は 1.0 μCi/mg, 放射化学的純度は 99.4%であった。ヒト凍結肝細胞は XenoTech, LLC (Lenexa, KS, USA) より購入した。その他の試薬および溶媒は HPLC 用, LC-MS/MS 用あるいは特級品の市販品を使用した。

第 2 項 [¹⁴C]-S-777469 の臨床薬物動態試験

[¹⁴C]-S-777469 の臨床薬物動態試験は非盲検, 非ランダム化比較試験として 6 名の健常者に対して行われた。被験者の年齢は 18 ~ 55 歳で肥満度指数は 18.5 ~ 29.9 kg/m²であった。全ての被験者に対しインフォームドコンセントが実施された。本試験は Protection of Human Subjects, Financial Disclosure by Clinical Investigations, Institutional Review Board, Investigational New Drug Application および Applications for the FDA Approval to Market a New Drug に関する連邦規則集に従って実施された。全ての被験者は, 8 時間絶食の後, 800 mg/100 μCi/man の用量で [¹⁴C]-S-777469 懸濁液を経口投与された。投与後, 0.5, 0.75, 1, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48 時間後に血漿サンプルを採取した。1 例の被験者に関しては,

採血が困難であったため、採血を中断し、解析から除外した。全てのサンプルは解析まで-80℃にて保存された。2 gの血漿に8 mlのアセトニトリルを添加した後、4℃で3,000 rpmにて10分間遠心した。この作業は2回繰り返した。上清の重量を測定後、EZ-2 (Genevac, Suffolk, UK)にて乾燥させた。その後、300 mlの0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(80:20, v/v)にて再溶解させた。再溶解溶液をcentricut ultra mini (Kurabo, Osaka, Japan)にて濾過した。血漿サンプルの測定にはHP 1100 システム (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) およびTSQ API2 performance pack (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK)を用いた。カラムはXTerra RP18 カラム (150 mm×4.6 mm i.d, 5 μm, Waters Corporation, Milford, MA)を1.0 ml/minにて使用した。移動相は水/ギ酸(99.9/0.1, v/v) およびアセトニトリル/ギ酸(99.9/0.1, v/v)を使用した。まず、20%有機相を2分間流したのち52分に渡り有機相を40%まで引き上げた。その後、6分間、90%の有機相を流した。質量分析は陽イオン検出モードのエレクトロスプレーイオン化法を用いて、各化合物の選択的なm/zをモニターした。血漿中におけるS-777469 および代謝物の定量限界値は1.0 ng/mlであり、1.0-1000 ng/mlの範囲で定量した。薬物動態学的パラメーターの算出はWinNonlin Version 5.2 (Certara, St. Louis, MO, USA)の非コンパートメント法を使用した。血漿中濃度下面積(AUC)は台形近似法にて算出した。消失半減期($t_{1/2}$)は消失相の対数値の傾きから算出した。血漿中最大薬物濃度(C_{max})および血漿中最大薬物濃度到達時間(T_{max})は測定値を用いた。また、吸収速度定数(k_a)も血漿中濃度推移から算出した。測定対象化合物のキャリブレーションカーブパラメーターを**Table 1**に示す。

Table 1 The calibration curve parameters for S-777469 and its metabolites.

Theoretical conc.(ng/ml)	Mean measured conc. (ng/ml), CV (%)			
	S-777469	5-HM	5-CA	6-HE
1	1.00, 2.0	0.97, 2.0	0.97, 3.7	1.01, 2.4
2	2.00, 4.3	2.14, 2.0	2.14, 8.2	1.93, 5.9
10	10.4, 1.6	10.3, 2.0	10.6, 4.0	10.7, 4.9
50	51.3, 2.2	51.6, 2.0	51.5, 1.0	52.3, 4.1
200	201, 1.8	202, 2.0	201, 1.8	202, 2.2
400	387, 1.2	383, 2.0	379, 1.8	380, 3.0
800	782, 1.1	787, 2.0	771, 2.7	797, 8.3
1000	989, 2.8	968, 2.0	966, 3.5	949, 2.8

conc., concentration; CV, coefficient of variation.

5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 6-HE, S-777469 6-hydroxyethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

第3項 ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝物分析

ヒト凍結肝細胞は 1×10^6 cells/ml の濃度にて William's E 培地 (pH 7.4) に懸濁させた。20 μ M [14 C]-S-777469 をヒト凍結肝細胞に添加し、5% CO₂ インキュベーター (Hirasawa Works, Tokyo, Japan) 内で 37°C にて 4 時間反応させた。反応は氷冷した 4 倍量のアセトニトリルで停止し、反応溶液を 10 分間 3000 rpm にて遠心した。サンプルの測定には Agilent 1100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Radiomatic 525TR Radio-Chromatography detector (PerkinElmer) および TSQ API2 performance pack (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK) を用いた。カラムは XTerra RP18 カラム (150 mm×4.6 mm i.d, 5 μ m, Waters

Corporation, Milford, MA, USA) を 1.0 ml/min にて使用した。移動相は水/ギ酸 (99.9/0.1, v/v) およびアセトニトリル/ギ酸 (99.9/0.1, v/v) を 68:32 の割合で使用した。移動相を Radio-Chromatography detector と TSQ API2 performance pack に対し 3:1 の割合で分離させた。質量分析は陽イオン検出モードのエレクトロスプレーイオン化法を用いて、各化合物の選択的な m/z をモニターし、標品と照合した。なお、本試験に用いたヒト凍結肝細胞の各種 P450 代謝活性を **Table 2** に示す。

Table 2 The metabolic activity for P450 marker substrate of cryopreserved human hepatocytes used in this study.

Enzyme	Marker substrate reaction	Activity (pmol/min/million cells)
CYP1A2	Phenacetin O-dealkylation	58.4 ± 10.1
CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylation	35.7 ± 9.90
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	155 ± 22.0
CYP2C8	Amodiaquine N-dealkylation	422 ± 87.0
CYP2C9	Diclofenac 4-hydroxylation	441 ± 51.0
CYP2C19	S-mephenytoin 4-hydroxylation	13.1 ± 1.50
CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylation	133 ± 11.0
CYP2E1	Chlozoxazone 6-hydroxylation	144 ± 10.0
CYP3A4/5	Testosterone 6b-hydroxylation	1470 ± 100.0
CYP3A4	Midazolam 1-hydroxylation	212 ± 10.0
CYP4A11	Lauric acid 12-hydroxylation	25.5 ± 4.10

第3節 結果

第1項 代謝物の生体内蓄積に関する検証

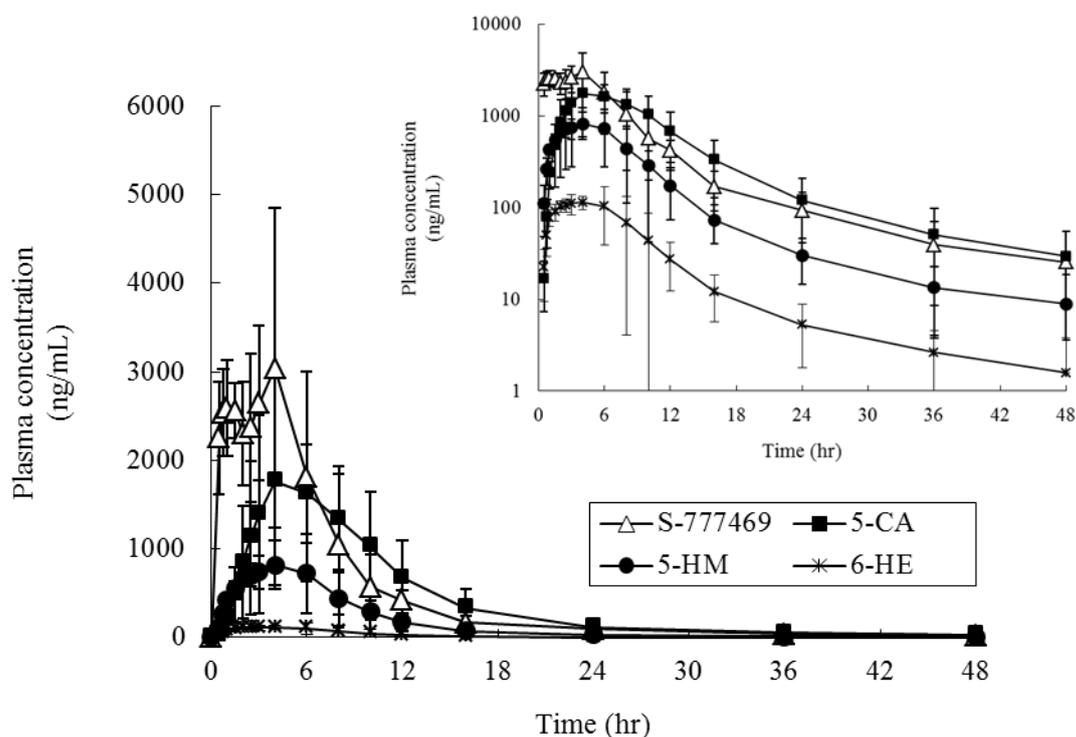


Fig. 2. Mean plasma concentration-time profiles for S-777469 and its main metabolites after a single oral administration of [14 C]-S-777469 to healthy human subjects. 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 6-HE, S-777469 6-hydroxyethyl.

健常者に 800 mg [14 C]-S-777469 を単回経口投与した後の S-777469 および代謝物の血漿中濃度推移および薬物動態学的パラメーター (PK parameter) を **Fig. 2** および **Table 3** に示す. S-777469, 5-HM, 5-CA および 6-HE の C_{max} 値はそれぞれ 3948, 998, 2100 および 147 ng/ml であった (**Table 3, Fig. 2**). また, S-777469, 5-HM, 5-CA および 6-HE の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{inf}) 値はそれぞれ

23802, 7556, 19570 および 1169 ng·hr/ml であった。消失相における S-777469, 5-HM, 5-CA および 6-HE の血漿中濃度推移から $t_{1/2}$ 値を算出したところ, S-777469, 5-HM, 5-CA および 6-HE の $t_{1/2}$ はそれぞれ 7.6 ± 3.7 , 8.8 ± 4.6 , 9.1 ± 5.1 および 9.7 ± 5.2 hr であった。このことから, S-777469 および代謝物間において, 血漿からの消失に差はなかった。また, 排泄物中の S-777469, 5-HM および 5-CA の排泄量を測定したところ, それぞれ総曝露の 13.1%, 29.1%, 9.03% であった (Table 4)。

Table 3 Pharmacokinetic parameters of S-777469 and its metabolites after a single oral administration of [14 C]-S-777469 to healthy human subjects.

PK parameter	S-777469	5-CA	5-HM	6-HE
C_{\max} (ng/ml)	3948 \pm 1098	2100 \pm 988	998 \pm 237	147 \pm 29.8
AUC_{inf} (ng·hr/ml)	23802 \pm 5929	19570 \pm 9762	7556 \pm 2595	1169 \pm 507
T_{\max} (hr)	4.0 (2.0, 6.0)	6.0 (4.0, 8.0)	4.0 (2.5, 6.0)	4.0 (2.0, 6.0)
$t_{1/2}$ (hr)	7.6 \pm 3.7	9.1 \pm 5.1	8.8 \pm 4.6	9.7 \pm 5.2

Data were expressed as the mean \pm S.D. of five subjects.

Median (min, max) was presented for T_{\max} values.

5-CA, S-777469 5-carboxylic acid; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 6-HE, S-777469 6-hydroxyethyl.

Table 4 Percentage of total radioactivity due to S-777469 and its metabolites in urine, feces and sum of excreta after a single oral administration of [¹⁴C]-S-777469 to healthy human subjects.

Percent of radioactive dose	S-777469	5-CA	5-HM	6-HE
Mean urinary excretion	0.65	5.85	5.67	1.04
Mean fecal excretion	12.4	3.18	23.4	5.16
Total	13.1	9.03	29.1	6.20

Data were expressed as the mean of five subjects.

Mean urinary and fecal excretion was determined by using 0–72 hr pooled urine and 0–144 hr pooled fecal samples, respectively.

5-CA, S-777469 5-carboxylic acid; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 6-HE, S-777469 6-hydroxyethyl.

第 2 項 *In vitro* 試験条件に関する検証

まず、ヒトにおける 5-CA 生成条件を検証した。 [¹⁴C]-S-777469 を用いた臨床薬物動態試験の結果から、800 mg [¹⁴C]-S-777469 を単回経口投与した後の C_{max} 値は 3948 ng/ml であった (Table 3)。また、WinNonlin を用いた解析から、吸収速度定数は 0.1 min⁻¹ と計算された。さらに、これまで有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1 発現細胞を用いた検討から、S-777469 はほとんど能動的に肝臓に移行しないことが示唆された (Data not shown)。以上の結果から、Ito らが提唱した式 (1) より、S-777469 の最大肝臓中濃度 (I_{in, max}) を見積もった (Ito, Iwatsubo et al. 1998)。

$$I_{in, max} = C_{max} + (Dose \cdot Fa \cdot Fg \cdot ka / Qh) \quad (1)$$

ここで、Dose は投与量を、 F_a は吸収率を、 F_g は消化管代謝回避率を、 k_a は吸収速度定数を、また Q_h は肝血流量を表す。ヒトにおける $F_a \cdot F_g$ は 1 であると仮定 ($F_g = 1$ も仮定) した。また、報告値に則り、ヒト肝血流量は 1450 ml/min と設定した (Davies and Morris 1993)。

その結果、S-777469 のヒト肝臓中最大濃度は 9.4 μM と算出された。また、ヒトにおける 5-CA の T_{max} 値は 4.0 hr であった (Table 3)。 T_{max} 値は、経口投与された薬物が消化管での吸収、肝臓での代謝を受け血漿中に最大濃度曝露されるまでの時間を表しているため、ヒトにおいて、本薬剤は肝臓に 4 時間曝露されれば充分 5-CA を生成すると推察された。つぎに、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験条件について精査した。ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験においては、 $[^{14}\text{C}]$ -S-777469 濃度は 20 μM 、反応時間は 4 時間に設定された。ヒト凍結肝細胞における代謝物生成プロファイルを Fig. 3 および Table 4 に示す。反応後の S-777469 のピークが占める割合は全体の 62% であった。また、ヒト凍結肝細胞においては、合計 8 個の代謝物ピークが認められた。ヒト凍結肝細胞における主代謝物は 5-HM であり、その割合は全体の 14% であった。その他の代謝物の生成量はいずれも全体の 5% 以下であった。5-CA の割合は全体の 0.7% であった。以上のことから、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験における基質濃度および反応時間はヒトにおける肝臓中最大濃度および 5-CA の T_{max} 値と同等であったが、*in vitro/in vivo* 間において 5-CA 生成に乖離が認められた。

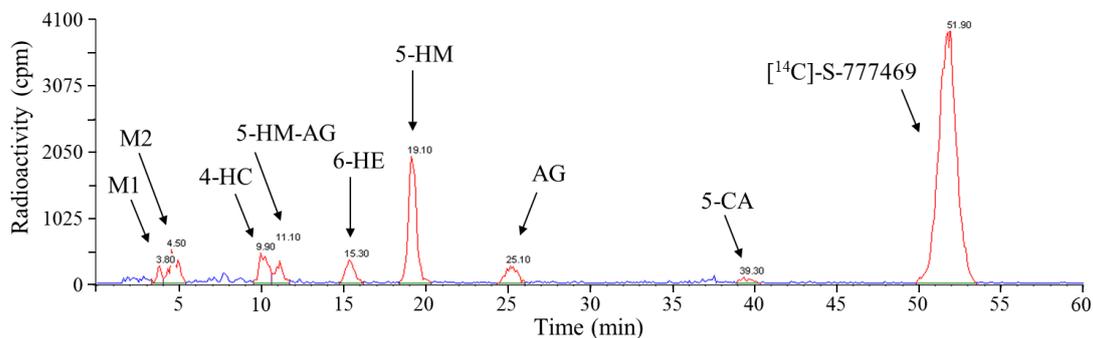


Fig. 3. Representative HPLC radiochromatogram of reaction mixture extract after incubation of [¹⁴C]-S-777469 with cryopreserved human hepatocytes.

Table 4 Percentage of radioactivity due to S-777469 and its metabolites after incubation of [¹⁴C]-S-777469 with cryopreserved human hepatocytes.

Metabolite	Retention time (min)	% of total radioactivity	Mass difference	Identification
M1	4.30	1.1	+32	+2O
M2	5.00	3.7	+32	+2O
M3	10.2	3.8	+16	4-HC
M4	11.0	2.1	+192	5-HM-AG
M5	15.3	2.8	+16	6-HE
M6	19.2	14	+16	5-HM
M7	25.0	2.7	+176	AG
M8	39.4	0.7	+30	5-CA
[¹⁴ C]-S-777469	51.8	62		

4-HC, S-777469 4-hydroxycyclohexane; 5-HM-AG, S-777469 5-hydroxymethyl

acyl-glucuronide; 6-HE, S-777469 6-hydroxyethyl; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; AG,

acyl-glucuronide; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

第4節 考察

これまで、いくつかの医薬品において、代謝物プロファイルがヒト肝 Ms やヒト凍結肝細胞などの *in vitro* 試験系での結果とヒト血漿などの *in vivo* 試料での結果で異なることが報告されている (Dalvie, Obach et al. 2009). この代謝物プロファイルの *in vitro/in vivo* 乖離の原因として、未変化体と生成する代謝物の物性や反応性などの特性の違いから、いくつかの可能性が考えられる. 本章では、S-777469 において、*in vitro/in vivo* 間で代謝物プロファイルが乖離した原因を明らかにするため、代謝物の生体内蓄積の可能性および *in vitro* 試験の条件が生体条件を反映していない可能性について精査した.

まず、S-777469 の臨床薬物動態試験における S-777469 および代謝物の消失半減期を基に、代謝物が生体内で蓄積した可能性を検証した. その結果、S-777469 および定量した全ての代謝物において、消失半減期は 7.6 ~ 9.7 hr と同程度であり、代謝物がヒト血漿内で蓄積した可能性は低いことが示された (Fig. 2, Table 3). また、一般的に代謝物は未変化体よりも脂溶性が低下するため、組織移行性が低くなり血漿中の曝露量が高くなる場合がある. しかし、排泄物中の未変化体および代謝物量を測定したところ、5-CA の排泄量は投与量の約 10%であった. このことは、生体では投与された S-777469 の約 10%が 5-CA に代謝されていることを示唆しており、代謝物生成量に *in vitro/in vivo* 間で乖離があったことを裏付けている.

つぎに、基質濃度および反応時間など、*in vitro* 試験の条件が生体で 5-CA が生成した条件を反映していなかった可能性について検証した. まず、S-777469 の臨床薬物動態試験の結果を基に、S-777469 の肝臓中最大濃度を見積もった結果、S-777469 の肝臓中最大濃度は約 9.4 μM と推察された. また、5-CA の T_{max} 値から、ヒトにおいて、S-777469 は肝臓に 4 時間曝露されれば充分 5-CA を生成する

と推察された。一方、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝物分析においては、基質濃度は 20 μM 、反応時間は 4 hr であった。一方、ヒト凍結肝細胞における主代謝物は 5-HM であり、その他の代謝物の生成量は 5% 以下であった。このことから、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験は、ヒトで 5-CA が生成する条件を網羅できていたのにも関わらず、*in vitro/in vivo* 間において 5-CA 生成に乖離が認められた。

これまで、複数の医薬品において、*in vitro/in vivo* 間で代謝物プロファイルが乖離した事例が報告されている。Dalvie らはヒト肝 Ms やヒト肝細胞など *in vitro* 試験系におけるヒト代謝物の予測精度は、一次代謝物では 75%、二次代謝物では 38% と報告している (Dalvie, Obach et al. 2009)。この *in vitro/in vivo* 乖離の原因は完全には明らかとなっていないが、*in vitro/in vivo* 間の環境の違いで十分に酵素活性が発揮されない薬物代謝酵素が存在することが発表されている (水垂ら, 第 16 回 HAB 研究機構学術年会, 2009) ことから、5-HM および 5-CA 生成に関わる薬物代謝酵素を同定することでその原因を明らかにできる可能性があると考えられる。

本研究によって、S-777469 において、*in vitro/in vivo* 間で代謝物プロファイルに乖離が生じた原因は、*in vitro* 試験系では十分予測できない二次代謝反応が生体で起きた可能性が高いと推察された。一方、ある種の医薬品においては、反応性の高い代謝物が生体内で蓄積する事例も報告されている。そのため、今後、ヒト代謝物を精度高く予測するには、代謝物の蓄積性や組織移行性、*in vitro* 試験の条件などを網羅的に考察する必要があると考えられる。

第 5 節 まとめ

ヒト血漿において、S-777469、5-HM および 5-CA に生体内蓄積の傾向は認め

られなかった。また、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験における反応条件は生体の条件と同等であり、*in vitro* 試験に問題はないことが示唆された。そのため、S-777469 においては、*in vitro* 試験では予測が困難な二次代謝反応が生体で起きたと推察された。これまで、*in vitro/in vivo* 環境の違いにより、*in vitro* の状況下では酵素機能を十分発揮できない薬物代謝酵素があることが報告されているため、S-777469 代謝に関与する薬物代謝酵素の同定が、*in vitro/in vivo* 乖離の原因説明の一助になることが示唆された。

第2章 ヒトにおける S-777469 主代謝物の生成機序および *in vitro/in vivo* 乖離の原因の解明

第1節 序論

これまで、生体において、医薬品から生成する代謝物が副作用を起こすことが数多く報告されている (Amacher 2012). また、副作用リスクと同様に、代謝物による薬物間相互作用の事例も報告されている (Ogilvie, Zhang et al. 2006). そのため、より安全で薬物相互作用リスクの少ない医薬品を創製するためには、未変化体のみだけでなく、代謝物の安全性、薬物間相互作用評価が重要と考えられる. 通常、ヒト代謝物の生成予測はヒト肝臓から単離したヒト肝 Ms やヒト凍結肝細胞が使用されている. これら *in vitro* 試験系においては、代謝物生成に関わる種々薬物代謝酵素が機能的に発現していることが知られている. 一方、いくつかの医薬品において、ヒト代謝物が上記試験系で予測できない事例、代謝物生成に関する *in vitro/in vivo* 間の乖離が報告されている (Dalvie, Obach et al. 2009). 抗 HIV 治療薬として開発された S-1360 は、ヒト血漿中の主代謝物は還元代謝物であるが、好氣的条件で培養したヒト凍結肝細胞においては、本代謝物は検出されなかった (水垂ら, 第 16 回 HAB 研究機構学術年会, 2009). これまで、S-1360 の還元体生成には *aldo-keto reductase* (AKR) が関与することが明らかとなっており、*in vitro/in vivo* の環境の違いにより一部の薬物代謝酵素は十分な酵素活性を発揮できないことが推察されている (Rosemond, St John-Williams et al. 2004). そのため、代謝物生成に関与する代謝酵素を同定することで、*in vitro/in vivo* 乖離の原因を解明できる可能性が高い.

そこで本章では、S-777469 代謝物生成に関する *in vitro/in vivo* 乖離の原因を解明することを目的とし、まず、5-HM, 5-CA 生成に関与する薬物代謝酵素の同定

を行った。つぎに、*in vitro/in vivo* 乖離の原因究明のため、CYP2C9 活性に及ぼす血清アルブミン、長鎖脂肪酸の影響を検証した。

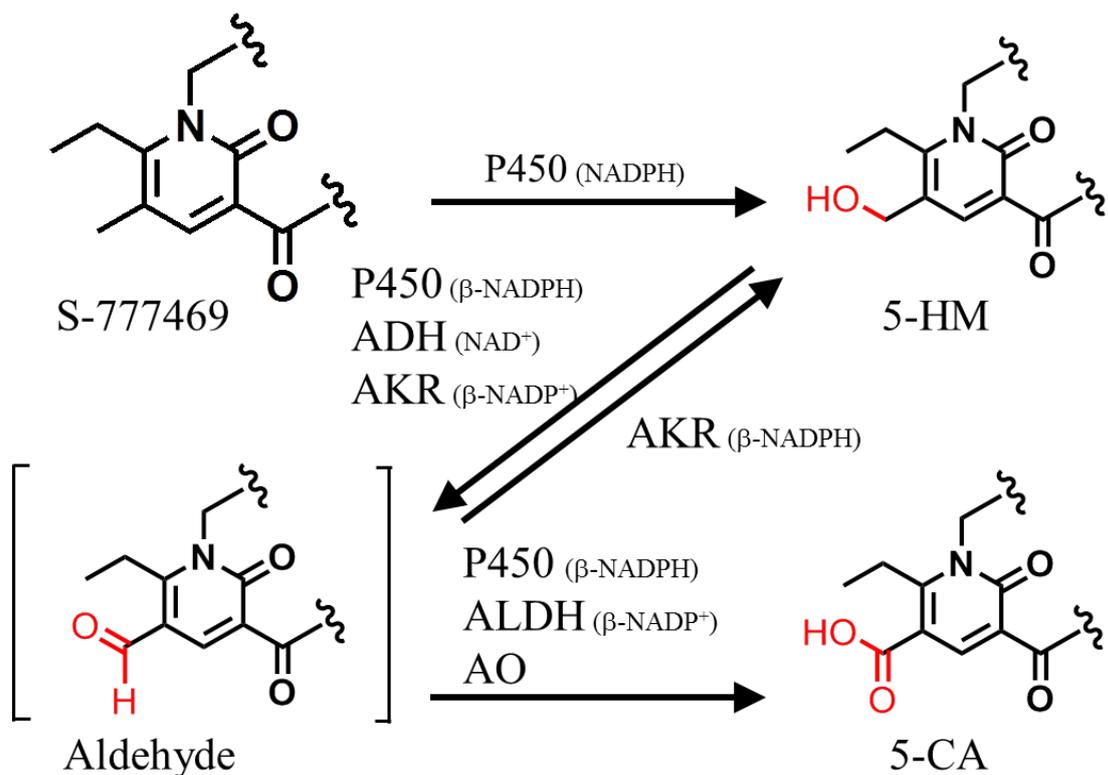


Fig. 4. Putative metabolic pathway of S-777469 to 5-CA and drug-metabolizing enzymes involved in the formation of 5-CA. P450, cytochrome P450; ADH, alcohol dehydrogenase; AKR, aldo-keto reductase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; AO, aldehyde oxidase; β -NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form); β -NADP $^+$, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form); NAD^+ , nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 化合物および試薬

S-777469, 5-HM および 5-CA は塩野義製薬株式会社にて合成された。ヒト肝 Ms, ヒト肝 S9 画分は XenoTech, LLC より購入した。各種組換え P450 酵素 (supersome) は BD Gentest (Wolburn, MA, USA) より購入した。β-NADPH, β-NADP⁺はオリエンタル酵母工業 (Tokyo, Japan)より, NAD⁺は Roche diagnostics (Mannheim, Germany), NADH は sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。その他の試薬および溶媒は HPLC 用, LC-MS/MS 用あるいは特級品の市販品を使用した。

第 2 項 5-HM, 5-CA 生成時の補酵素依存性試験

5-HM, 5-CA 生成時の補酵素依存性試験にはヒト肝 S9 画分を使用した。S-777469 および 5-HM はジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO) に溶解し, 反応中の最終 DMSO 濃度は 0.1% (v/v) とした。ヒト肝 S9 画分 (1.0 mg/ml) に S-777469 もしくは 5-HM (100 μM) と 1 mM 各種補酵素溶液 (β-NADP⁺, β-NADPH, NAD⁺, NADH) を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 0.5 時間反応させた。また, 補酵素の組み合わせ検討時も同様のタンパク濃度, 基質濃度, 補酵素濃度で実施した。反応後, 氷冷した 2 倍量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を添加し, 3,000 rpm で 10 分間遠心した後, 上清を LC-MS/MS にて測定した。

第 3 項 各種 P450 組換え酵素, P450 阻害剤および抗 P450 抗体を用いた主代謝

酵素同定試験

S-777469 および 5-HM は DMSO に溶解し，反応中の最終 DMSO 濃度は 0.1% (v/v) とした．P450 組換え酵素（コントロール, rCYP1A2, rCYP2C8, rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6, rCYP2E1, rCYP3A4, 100 pmol/ml）に S-777469 もしくは 5-HM (100 μ M) と 1 mM β -NADPH を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 1 時間反応させた．反応後，氷冷した 2 倍量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を添加し，3,000 rpm で 10 分間遠心した後，上清を LC-MS/MS にて測定した．各種 P450 阻害剤もしくは抗 P450 抗体を用いた阻害試験においては，ヒト肝 Ms を用いた．S-777469 および 5-HM は 10% アセトニトリル水溶液に溶解した．ヒト肝 Ms 画分 (0.5 mg/ml)，S-777469 もしくは 5-HM (40 μ M)，2 mM β -NADPH および **Table 5** に示す各種 P450 阻害剤もしくは抗 P450 抗体を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 20 分反応させた．反応後，氷冷した 2 倍量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を添加し，3,000 rpm で 10 分間遠心した後，上清を LC-MS/MS にて測定した．

Table 5. The list of each P450 inhibitors and anti-P450 monoclonal antibody.

P450 inhibitor or antibody	Target P450	Concentration	Pretreatment condition
			preincubation for 15 min at 37°C
furafylline	CYP1A2	50 µM	with microsomes and β-NADPH prior to initiation with substrate
anti-CYP2C8 monoclonal antibody	CYP2C8	antibody:protein ratio = 1:5	preincubation for 15 min at r. t. with microsomes prior to initiation with substrate and β -NADPH
sulfaphenazole	CYP2C9	20 µM	preincubation at 37°C for 5 min prior to initiation with β -NADPH
benzylrinivanol	CYP2C19	10 µM	preincubation at 37°C for 5 min prior to initiation with β -NADPH
quinidine	CYP2D6	3 µM	preincubation at 37°C for 5 min prior to initiation with β -NADPH
anti-CYP2E1 monoclonal antibody	CYP2E1	antibody:protein ratio = 1:5	preincubation for 15 min at r. t. with microsomes prior to initiation with substrate and β -NADPH
ketoconazole	CYP3A4	1 µM	preincubation at 37°C for 5 min prior to initiation with β -NADPH

r.t., room temperature

第 4 項 血清アルブミン添加時の 5-HM, 5-CA 生成変動

本研究では, S-777469 代謝に及ぼす血清アルブミンの影響を検証するため,

ウシ血清アルブミン (BSA) を使用した。また, BSA 添加時の 5-HM, 5-CA 生成試験にはヒト肝 Ms 画分を使用した。S-777469 および 5-HM は DMSO に溶解し, 反応中の最終 DMSO 濃度は 0.1% (v/v) とした。ヒト肝 Ms (0.5 mg/ml) に S-777469 もしくは 5-HM (300 μ M) と 1 mM β -NADPH を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で反応させた。S-777469 および 5-HM の反応時間はそれぞれ 15, 30 分とした。反応後, 氷冷した 2 倍量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を添加し, 3,000 rpm で 10 分間遠心した後, 上清を LC-MS/MS にて測定した。0.3% BSA 添加時の酵素速度論的解析には 1 ~ 300 μ M S-777469 および 1 ~ 500 μ M 5-HM を使用した。いずれも DMSO に溶解し, 反応中の最終 DMSO 濃度は 0.1% (v/v) とした。タンパク濃度, 反応時間は上記と同様に設定した。

第 5 項 CYP2C9 組換え酵素における血清アルブミン添加時の S-777469 代謝の変動

S-777469 および 5-HM は DMSO に溶解し, 反応中の最終 DMSO 濃度は 0.1% (v/v) とした。CYP2C9 組換え酵素 (100 pmol/ml) に S-777469 (10, 100 μ M) と 1 mM β -NADPH を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 30 分間反応させた。反応後, 氷冷した 2 倍量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を添加し, 3,000 rpm で 10 分間遠心した後, 上清を LC-MS/MS にて測定した。

第 6 項 CYP2C9 組換え酵素における長鎖脂肪酸添加時の 5-HM, 5-CA 生成速度の変動

各種長鎖脂肪酸添加時の 5-HM, 5-CA 生成試験には CYP2C9 組換え酵素を使用した。S-777469 および 5-HM は DMSO に溶解し, 反応中の最終 DMSO 濃度は

0.1% (v/v) とした。CYP2C9 組換え酵素 (100 pmol/ml) を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に 0 ~ 30 μ M アラキドン酸, α -リノレン酸, オレイン酸, ミリスチン酸を添加し 37°C で約 5 分間反応させた。つぎに, S-777469 もしくは 5-HM (10 μ M) と 1 mM β -NADPH を添加し, 37°C で 15 分間反応させた。反応後, 氷冷した 2 倍量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を添加し, 3,000 rpm で 10 分間遠心した後, 上清を LC-MS/MS にて測定した。

第 7 項 LC-MS/MS を用いた定量

サンプルの測定には Acquity UPLC システムおよび Micromass Quattro Ultima (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いた。カラムは YMC-Triart C18 カラム (50 mm \times 2.0 mm i.d, 1.9 μ m, YMC CO., LTD., Kyoto, Japan) を 0.75 ml/min にて使用した。移動相は水/ギ酸 (99.9/0.1, v/v) およびアセトニトリル/ギ酸 (99.9/0.1, v/v) を使用した。まず, 2 分に渡り有機相を 5% から 95% まで引き上げた。その後, 0.5 分間, 5% の有機相を流した。質量分析は陽イオン検出モードのエレクトロスプレーイオン化法を用いて, 各化合物の選択的な m/z をモニターし, 標品と照合した。

第 8 項 データ解析

酵素学的速度論の解析には, WinNonlin Version5.2 (Certara, St. Louis, MO, USA) を使用した。また, 種々の統計解析には, XLSTAT (無料ソフトウェア) を使用した。

第3節 結果

第1項 5-HM および 5-CA 生成に関わる主代謝酵素同定

1) 5-HM および 5-CA 生成時の補酵素依存性試験

まず、5-HM, 5-CA 生成時の各種補酵素の依存性を解析した。その結果、 β -NADP⁺, β -NADPH, NAD⁺, NADH 単独添加時においては、両代謝物ともに、 β -NADPH 添加群の生成が最も高値を示した。また、 β -NADPH 添加群の 5-HM 生成および 5-CA 生成はそれぞれ 4.04, 1.82 pmol/min/mg protein であった (**Fig. 5**)。また、複数の補酵素存在下の 5-HM および 5-CA 生成を検討した。その結果、 β -NADPH 添加群, β -NADPH および β -NADP⁺ 添加群, β -NADPH, β -NADP⁺ および NAD⁺ 添加群の 5-CA 生成量はと 1.6 ~ 1.9 pmol/min/mg と同程度を示した。一方、 β -NADP⁺ および NAD⁺ 添加群における 5-CA 生成量は 0.3 pmol/min/mg と、上記 3 群に比較して低値を示した (**Fig. 6**)。以上の結果から、5-HM および 5-CA は P450 の機能発現に必要な β -NADPH 存在下で生成することが明らかとなった。

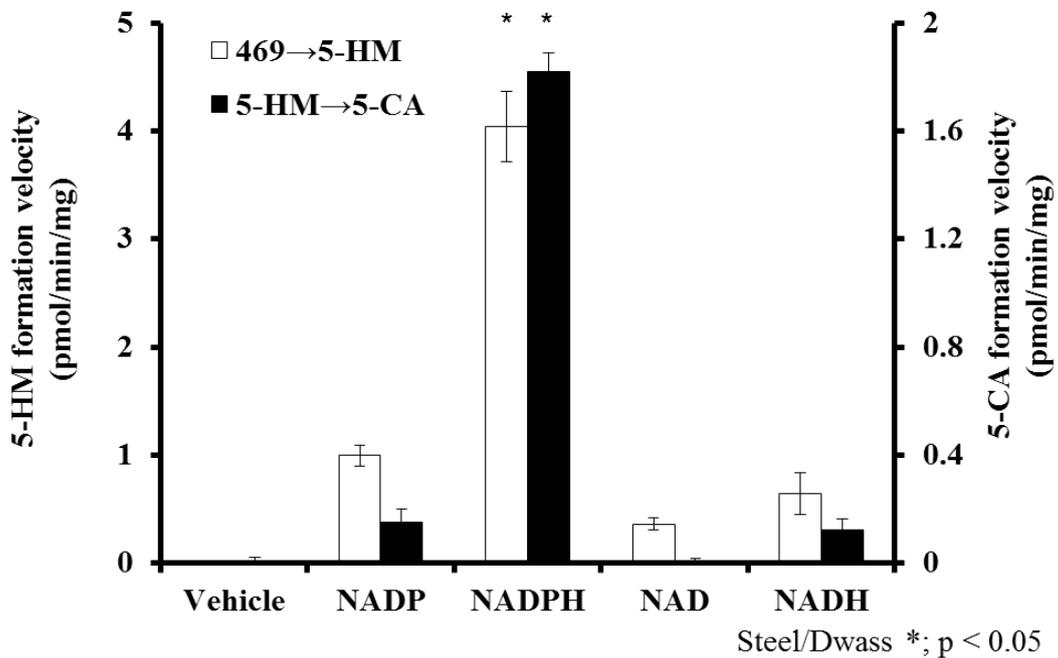


Fig. 5. Effect of cofactors on 5-HM and 5-CA formation by human liver S9 fractions.

Data represents mean \pm S.D. (N = 3). β -NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form); β -NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form); NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form); 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

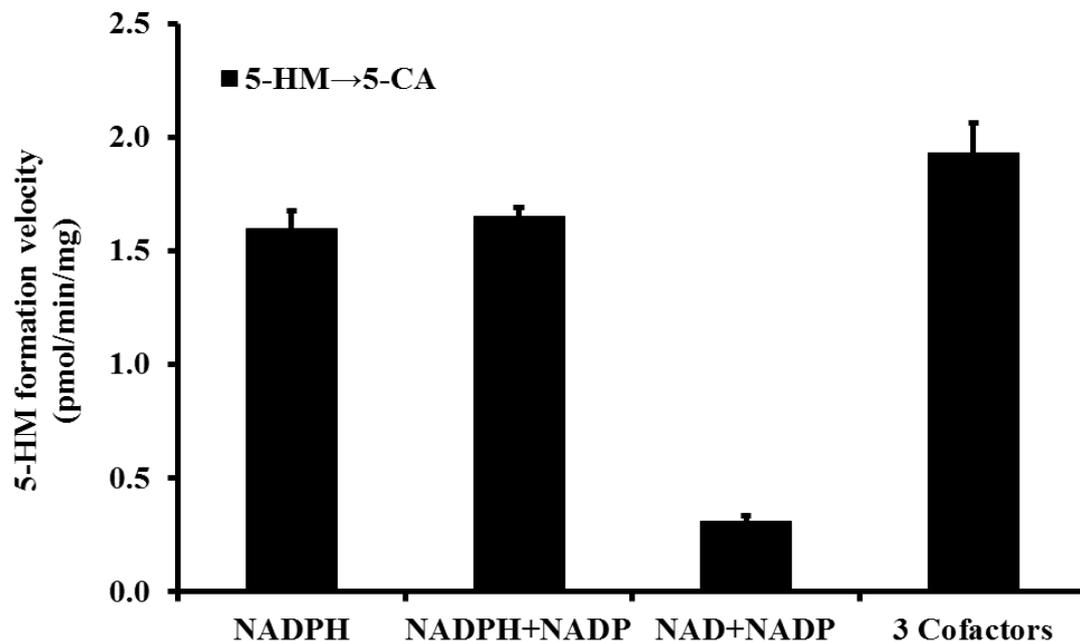


Fig. 6. Effect of cofactor combination on 5-CA formation by human liver S9 fractions.

Data represents mean \pm S.D. (N = 3). β -NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form); β -NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form); NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

2) 各種 P450 組換え酵素, P450 阻害剤および抗 P450 抗体を用いた主代謝酵素同定試験

各種 P450 組換え酵素による 5-HM および 5-CA 生成を検討した。本研究においては、コントロールスーパーソーム, rCYP1A2, rCYP2C8, rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6, rCYP2E1, rCYP3A4 を用いた。その結果, rCYP2C9 および rCYP2C19 添加群においてのみ, 5-HM 生成が認められた。また, rCYP2C9 および rCYP2C19 添加群における 5-HM 生成量はそれぞれ 49 および 71 pmol/min/nmol P450 であつ

た. 一方, 5-CA 生成は rCYP2C9 添加群においてのみ認められ, 5-CA 生成量は 22 pmol/min/nmol P450 であった (Fig. 7). つぎに, 両代謝物生成に及ぼす各種 P450 阻害剤もしくは抗 P450 抗体の影響を検証した. その結果, ヒト肝 Ms において, 5-HM および 5-CA 生成はともに CYP2C9 阻害剤である sulfaphenazole によって 95%以上が阻害された (Table 6). また, P450 組換え酵素を用いた検討から, 5-HM 生成に関与すると示唆された CYP2C19 に関しては, CYP2C19 阻害剤である benzylnirvanol 添加時の両代謝物生成はともに 10%未満であった. このことから, 5-HM および 5-CA 生成に関わる主代謝酵素は CYP2C9 であることが明らかとなった. さらに, 5-CA 生成に対する肝外組織の寄与を検証するため, CYP2C9 発現組織である小腸 Ms における 5-CA 生成を検証した. しかし, 小腸 Ms においては, 5-CA は生成しなかった (Data not shown).

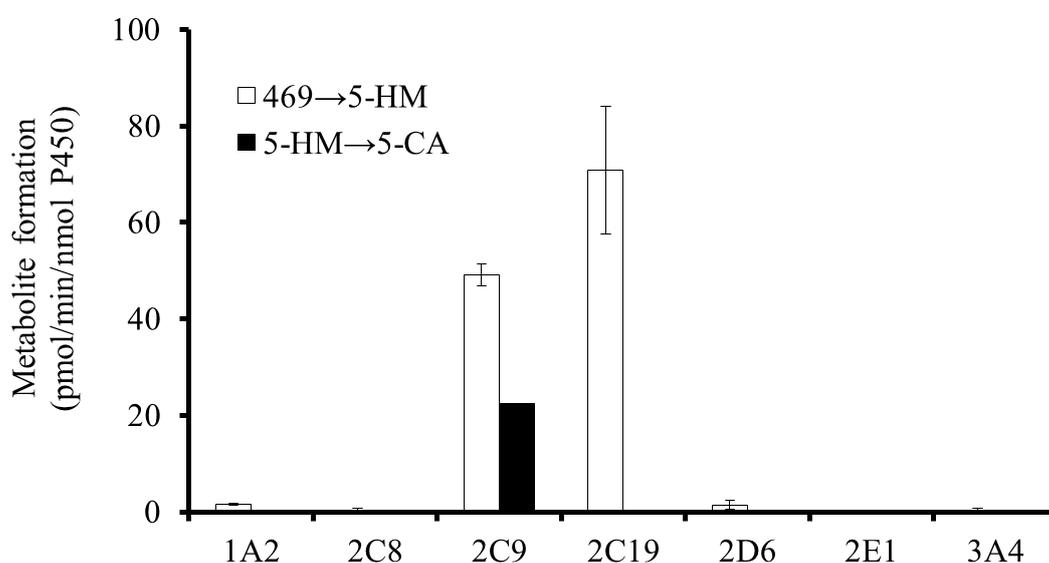


Fig. 7. 5-HM and 5-CA formation by each recombinant P450 enzymes. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). 1A2, rCYP1A2; 2C8, rCYP2C8; 2C9, rCYP2C9; 2C19, rCYP2C19; 2D6, rCYP2D6; 2E1, rCYP2E1; 3A4, rCYP3A4; 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

Table 6. Effect of chemical inhibitors and monoclonal antibody on the formation of 5-HM and 5-CA.

P450 inhibitor or antibody	% of inhibition from appropriate control	
	5-HM formation	5-CA formation
furafylline	17	6.2
anti-CYP2C8 monoclonal antibody	1.5	2.3
sulfaphenazole	97	95
benzylrivanol	9.2	8.7
quinidine	0.1	0.2
anti-CYP2E1 monoclonal antibody	2.5	0.3
ketoconazole	1.4	2.0

5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

第2項 血清アルブミン添加による 5-HM, 5-CA 生成変動

1) ヒト肝 Ms における 5-HM, 5-CA 生成に及ぼす血清アルブミン濃度の影響

これまで CYP2C9 の酵素活性は血清アルブミンにより変動することが報告されている。そこで、5-HM, 5-CA 生成に及ぼす BSA の影響を検証するため、まず、5-HM, 5-CA 生成に及ぼす BSA 濃度の影響を検証した。健常者における血漿中アルブミン濃度は 3 ~ 5% と報告されているため、本研究では、BSA の添加濃度を 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3% と設定した (山川ら, 生化学データブック 第 5 刷, 1989)。また、BSA 添加により反応中の基質濃度が変動することが考えられたので、試験系における基質のタンパク結合率を測定し、総濃度もしくは非結合型の単位基質濃度あたりの代謝物生成速度 ($V/[S_{total}]$ 値, $V/[S_{free}]$ 値) を算出

した。その結果、5-HM 生成においては、0~3% BSA 添加時の $V/[S_{total}]$ 値は 0.14 ~ 0.18 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ であり、ほぼ変動しなかった。一方、5-CA 生成においては、BSA 非添加時の $V/[S_{total}]$ 値は 0.03 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ であったが、0.1% BSA 添加により $V/[S_{total}]$ 値は 0.11 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ まで上昇したものの、0.03% 以上では、添加濃度に伴い $V/[S_{total}]$ 値は低下し、3% BSA 添加により 0.06 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ まで低下した (Fig. 8)。

0~3% BSA 含有ヒト肝 Ms における S-777469 および 5-HM のタンパク非結合率はそれぞれ 96% から 18%、80% から 49% まで低下した (Fig. 9)。

5-HM 生成における $V/[S_{free}]$ 値は 0.20 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ から 0.90 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ まで BSA 濃度依存的に上昇した。一方、5-CA 生成における $V/[S_{free}]$ 値はコントロール群では 0.04 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ であったが、0.3% BSA 添加時に最大値を示した。0.3% BSA 添加時の $V/[S_{free}]$ 値は 0.14 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ であった (Fig. 10)。

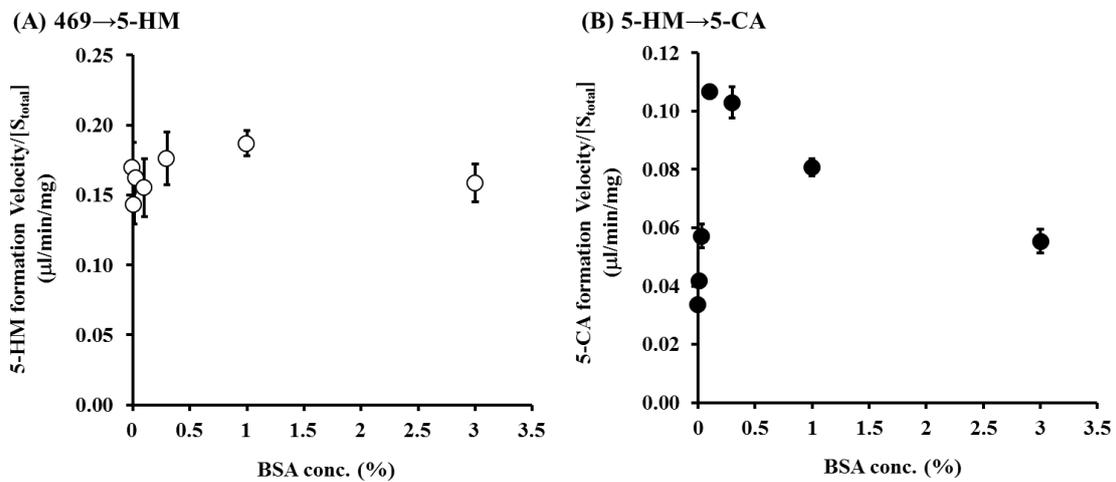


Fig. 8. The effect of BSA concentration on the velocity per total concentration of 5-HM (A) and 5-CA formation (B) by human liver microsomes. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

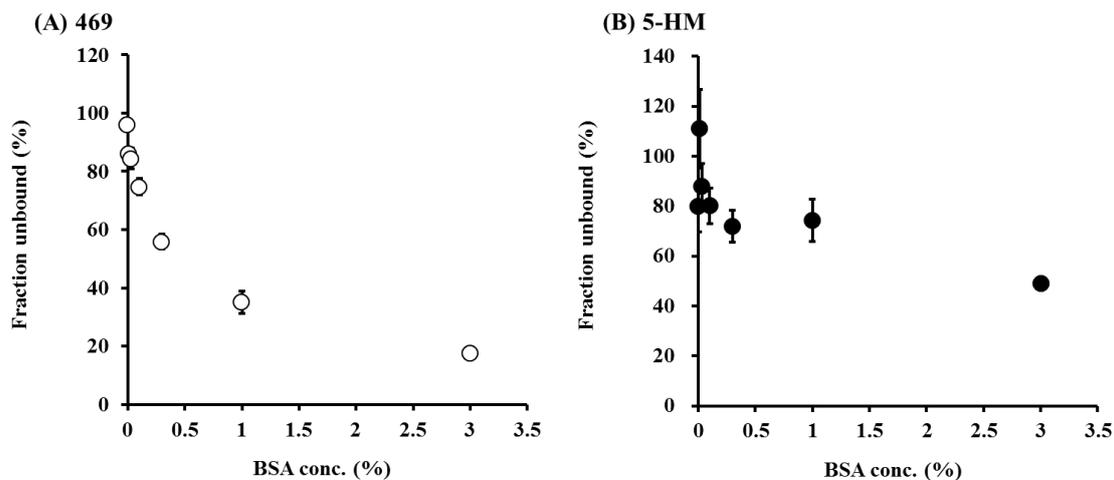


Fig. 9. The effect of BSA concentration on the binding of S-777469 (A) and 5-HM (B) in *in vitro* system. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl.

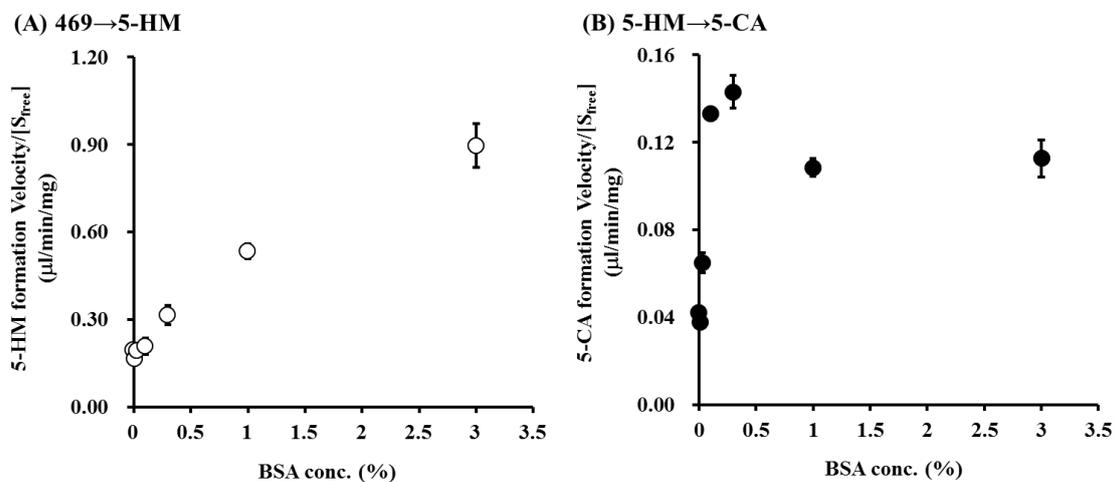


Fig. 10. The effect of BSA concentration on the velocity per free concentration of 5-HM (A) and 5-CA (B) formation by human liver microsomes. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

2) ヒト肝 Ms における 0.3% BSA 添加時の 5-HM, 5-CA 生成変動

5-HM, 5-CA 生成時の P450 との親和性および最大代謝速度に及ぼす BSA の影響を検証するため、5-CA 生成速度に対して最も大きな影響が観察された 0.3% BSA 添加時の 5-HM, 5-CA 生成の酵素学的速度論解析を実施した。本試験においても、BSA 添加により反応中の基質濃度が変動することが考えられたので、試験系における基質のタンパク結合率を測定し、総濃度もしくは非結合型基質濃度における親和性および最大代謝速度を算出した。その結果、5-HM 生成において、コントロールおよび 0.3% BSA 添加時の K_m 値はそれぞれ 23.0 および 11.0 μM であり、BSA 添加により K_m 値が 47.8%まで低下した。一方、両群における V_{\max} 値はそれぞれ 49.8 および 48.8 pmol/min/mg であり、BSA 添加によりほぼ変動しないことが明らかとなった (Fig. 11, Table 7)。また、5-CA 生成においては、コントロールおよび 0.3% BSA 添加時の K_m 値はそれぞれ 352 および 111 μM であり、5-HM と同様に、BSA 添加により K_m 値が 31.5%に低下した。さらに、 V_{\max} 値はそれぞれ 19.7 および 50.0 pmol/min/mg であり、BSA 添加により 5-CA の最大代謝速度が 254%まで上昇した。

コントロールおよび 0.3% BSA 含有ヒト肝 Ms における S-777469 および 5-HM のタンパク非結合率を測定した。その結果、コントロールおよび 0.3% BSA 含有ヒト肝 Ms における S-777469 のタンパク非結合率はそれぞれ 96 ~ 103%, 45 ~ 57%であった (Fig. 12)。一方、コントロールおよび 0.3% BSA 含有ヒト肝 Ms における 5-HM のタンパク非結合率はそれぞれ 78 ~ 98%, 67 ~ 95%であった。

各反応時点での基質のタンパク非結合率の結果から、非結合型基質濃度を基に親和性および最大代謝速度を算出した。その結果、5-HM 生成においては、コントロールおよび 0.3% BSA 添加時の K_m 値はそれぞれ 23.1 および 5.61 μM であり、BSA 添加により K_m 値が 24.3%まで低下した。一方、両群における V_{\max} 値

はそれぞれ 50.0 および 48.2 pmol/min/mg でありほぼ変動しなかった (Fig. 13, Table 7). また, 5-CA 生成においては, コントロールおよび 0.3% BSA 添加時の K_m 値はそれぞれ 273 および 79.9 μM を示し, 5-HM と同様に, BSA 添加により K_m 値が 29.3%まで低下した. さらに, V_{\max} 値はそれぞれ 19.0, 49.2 pmol/min/mg と, BSA 添加により 5-CA の最大代謝速度が 259%まで上昇した.

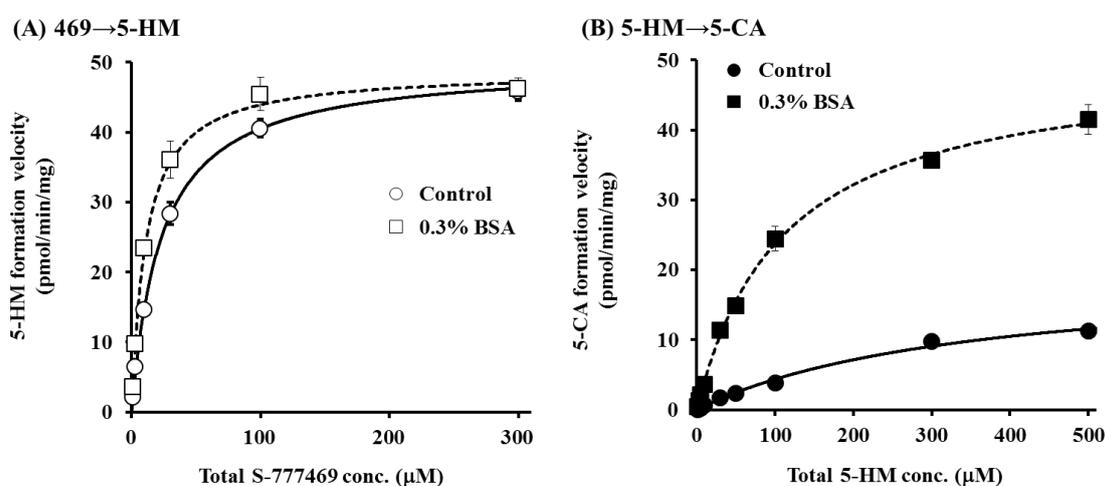


Fig. 11. Enzyme kinetics of 5-HM (A) and 5-CA (B) formation by human liver

microsomes in the absence and presence of 0.3% BSA. Data represents mean \pm S.D. (N =

3). Open circle and square represent the formation velocity of 5-HM from S-777469 in the

absence or presence of BSA, respectively. Closed circle and square represent the formation

velocity of 5-CA from 5-HM in the absence or presence of BSA, respectively. Points are

experimentally determined values, whereas lines are from model fitting. 469; S-777469, 5-HM,

S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

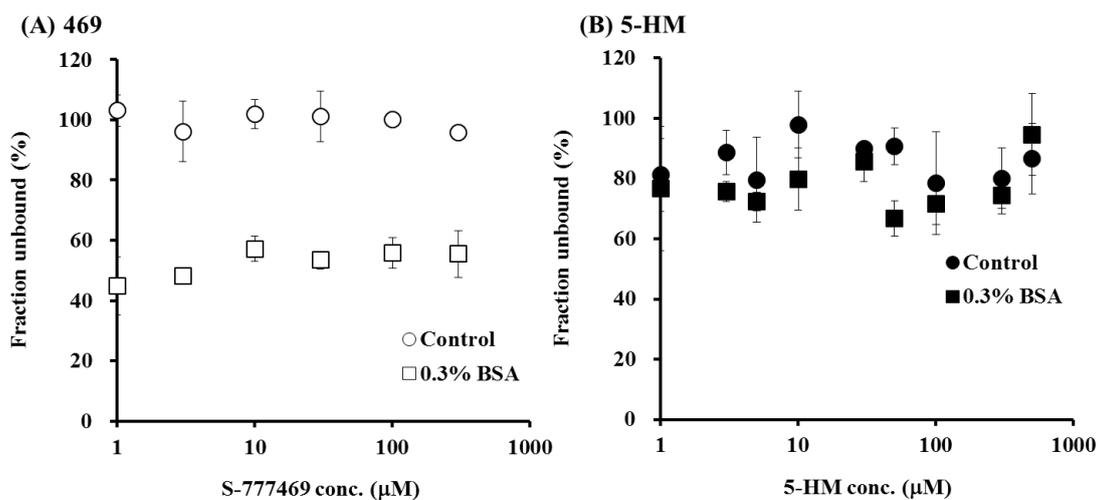


Fig. 12. The effect of 0.3% BSA on the binding of S-777469 (A) and 5-HM (B) in human liver microsomes. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). Open circle and square represent the unbound fraction ratio of S-777469 in the absence or presence of BSA, respectively. Closed circle and square represent the unbound fraction ratio of 5-HM in the absence or presence of BSA, respectively. 469; S-777469, 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

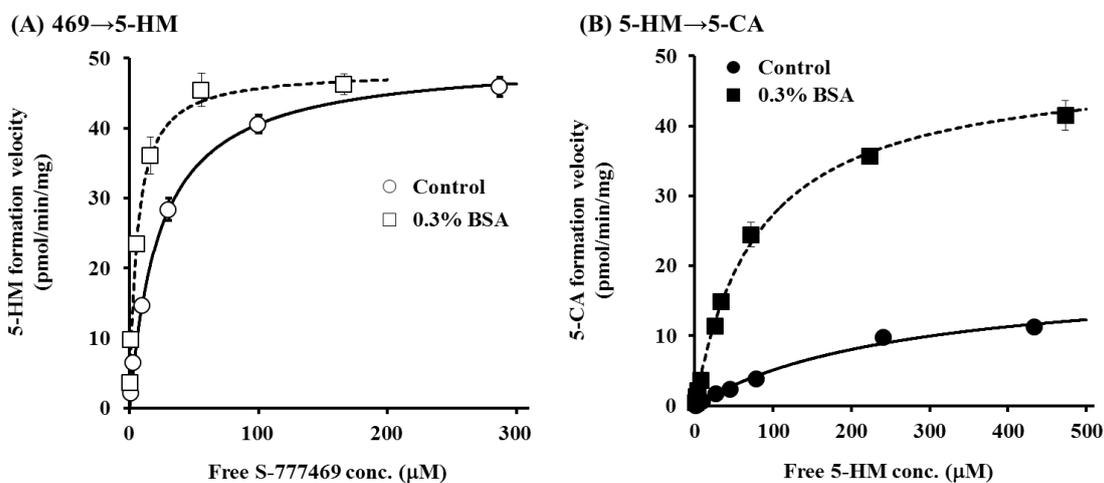


Fig. 13. Enzyme kinetics of 5-HM (A) and 5-CA (B) formation by human liver microsomes in the absence and presence of 0.3% BSA. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). Open circle and square represent the formation velocity of 5-HM from S-777469 in the absence or presence of BSA, respectively. Closed circle and square represent the formation velocity of 5-CA from 5-HM in the absence or presence of BSA, respectively. Points are experimentally determined values, whereas lines are from model fitting. 469; S-777469, 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

Table 7. The effect of 0.3% BSA on the enzymatic kinetic parameters of 5-HM (A) and 5-CA (B) formation by human liver microsomes.

(A)

Parameter	Total concentration						Free concentration					
	Control			0.3% BSA			Control			0.3% BSA		
	Mean	SE	CV (%)	Mean	SE	CV (%)	Mean	SE	CV (%)	Mean	SE	CV (%)
K_m (μM)	23.0	0.61	2.67	11.0	0.66	5.99	23.1	0.56	2.44	5.61	1.24	22.2
V_{\max} (pmol/min/mg)	49.8	0.36	0.73	48.8	0.69	1.42	50.0	0.33	0.67	48.2	2.33	4.83
CL_{int} ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$)	2.17			4.42			2.16			8.60		

(B)

Parameter	Total concentration						Free concentration					
	Control			0.3% BSA			Control			0.3% BSA		
	Mean	SE	CV (%)	Mean	SE	CV (%)	Mean	SE	CV (%)	Mean	SE	CV (%)
K_m (μM)	352	69.4	19.7	111	6.36	5.75	273	56.7	20.7	79.9	4.19	5.24
V_{\max} (pmol/min/mg)	19.7	2.01	10.2	50.0	1.04	2.07	19.0	1.98	10.4	49.2	0.90	1.83
CL_{int} ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$)	0.06			0.45			0.07			0.62		

K_m , apparent substrate concentration at half-maximal velocity; V_{\max} , maximal velocity; CL_{int} , intrinsic clearance; CV, coefficient of variation.

3) CYP2C9 組換え酵素における 0.3% BSA 添加時の 5-HM, 5-CA 生成変動

CYP2C9 による S-777469 の代謝に及ぼす BSA の影響を検証するため、CYP2C9 組換え酵素において、0.3% BSA を添加した時の 5-HM, 5-CA 生成を検証した。本試験においては、10, 100 μM S-777469 からの 5-HM, 5-CA 生成量を測定した。その結果、両基質濃度において、0.3% BSA 添加により 5-HM 生成速度は 2.3 倍上昇した (Fig. 14)。また、5-CA 生成においては、0.3% BSA 添加により、5-CA 生成速度はそれぞれ 2.8 ~ 3.2 倍上昇した (Fig. 14)。

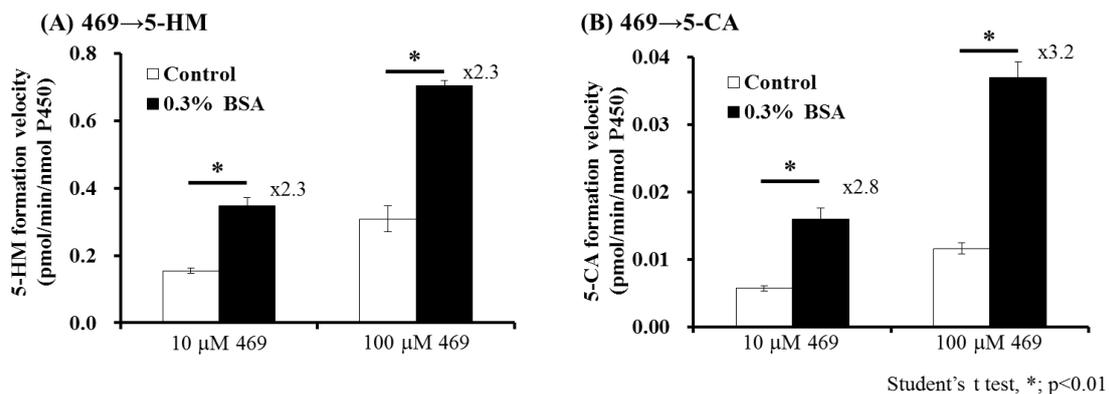


Fig. 14. The effect of 0.3% BSA on the formation of 5-HM (A) and 5-CA (B) by recombinant CYP2C9. 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

第 3 項 CYP2C9 組換え酵素における 5-HM, 5-CA 生成に及ぼす各種脂肪酸の影響

前項において、BSA が S-777469 代謝を亢進することが明らかとなった。また、これまでの上述の検討の結果、ヒト肝 Ms や P450 組換え酵素において、BSA は内在性脂肪酸を吸着し P450 活性を向上することが示唆されている。そこで、ヒ

ト肝 Ms に多く含まれていると報告されている 4 種の長鎖脂肪酸を用いて、S-777469 代謝に及ぼす長鎖脂肪酸の影響を検証した (Rowland, Gaganis et al. 2007, Bushee, Liang et al. 2014). 本試験においては、ヒト肝 Ms に多く含まれることが報告されている 0 ~ 30 μM のアラキドン酸, α -リノレン酸, オレイン酸, ミリスチン酸を使用した. その結果, 5-HM 生成および 5-CA 生成ともに, 長鎖脂肪酸の添加濃度依存的に生成量が低下した (Fig. 15). また, 代謝物生成阻害に対する各種長鎖脂肪酸の IC_{50} 値を算出したところ, アラキドン酸の IC_{50} 値が最も低く, 両代謝物生成に対する IC_{50} 値はそれぞれ 6.2, 3.0 μM であった (Table 8). さらに, 5-HM および 5-CA 生成に対する各種長鎖脂肪酸の IC_{50} 値を比較したところ, 全ての長鎖脂肪酸において, 5-HM 生成に比較して, 5-CA 生成に対する IC_{50} 値が低く, 5-CA 生成がより長鎖脂肪酸の阻害を受けることが示唆された.

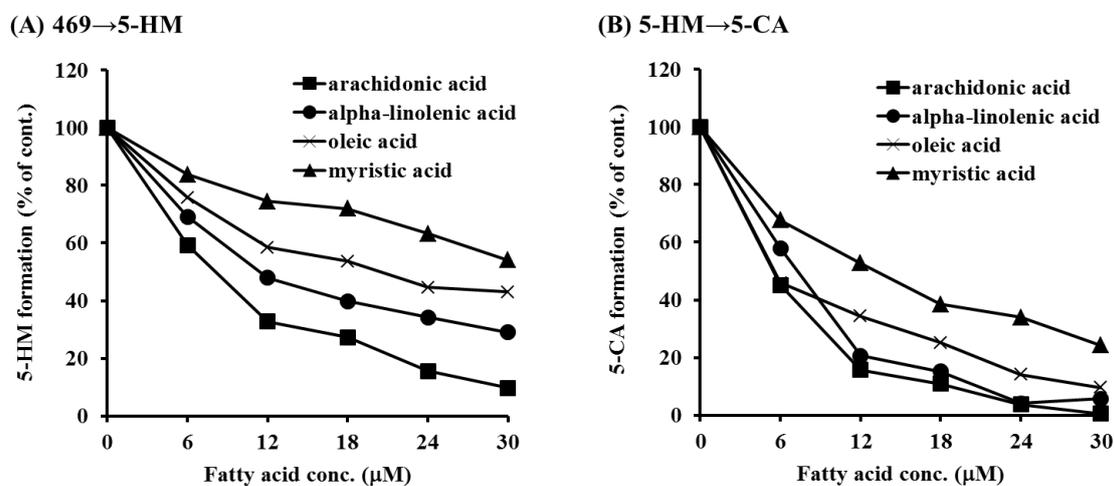


Fig. 15. The effect of fatty acid on the formation of 5-HM and 5-CA by recombinant CYP2C9. 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

Table 8. The IC₅₀ values of each fatty acids for 5-HM and 5-CA formation by recombinant CYP2C9.

Fatty acid	IC ₅₀ for 5-HM production (μM)	IC ₅₀ for 5-CA production (μM)
arachidonic acid	6.2	3.0
α-linolenic acid	12	4.2
oleic acid	20	5.2
myristic acid	>30	12

IC₅₀, 50% inhibitory concentration

第4節 考察

本章では、S-777469 代謝物生成の *in vitro/in vivo* 乖離の原因を 5-HM および 5-CA 生成に関わる薬物代謝酵素の同定も含めて検討した。

まず、5-HM および 5-CA 生成に関わる主代謝酵素を同定するため、各種補酵素存在時の代謝物生成を検討した。その結果、両代謝物は P450 の機能発現に必要なβ-NADPH 存在下で生成することが明らかとなった (**Fig. 5**)。また、各種 P450 組換え酵素および P450 阻害剤もしくは抗 P450 抗体を用いた検討の結果、両代謝物の生成は酸性医薬品の代謝に深く関わる CYP2C9 により触媒されることが明らかとなった (**Fig. 7, Table 6**)。

これまで、ヒト肝 Ms や P450 組換え酵素において、CYP2C9 をはじめとする多くの薬物代謝酵素の触媒活性が血清アルブミンにより向上すること、アラキドン酸やオレイン酸などの内在性長鎖脂肪酸により減弱することが報告されている (Yao, Chang et al. 2006, Tang, Lin et al. 2002, Wattanachai, Polasek et al. 2011, Wattanachai, Tassaneeyakul et al. 2012)。Rowland らは、CYP2C9 組換え酵素を用いて、1.5 μM アラキドン酸、3 μM オレイン酸および 3 μM リノール酸混合溶液が

CYP2C9 により代謝を受ける抗てんかん薬 phenytoin の代謝を競合的に阻害すること、また、BSA が上記長鎖脂肪酸混合溶液による競合阻害効果を消失させることを報告した (Rowland, Elliot et al. 2008). 内在性長鎖脂肪酸がこれら *in vitro* 試験系に多く含まれる原因は完全には明らかとなっていないが、これら長鎖脂肪酸は組織画分の調製やインキュベーションにより膜タンパクを構成するリン脂質から遊離すると考えられている。さらに、ヒト肝 Ms における脂肪酸の含有量や組成は、ヒト肝ロットや脂肪酸の種類によって異なるが、アラキドン酸は 32.9 μM 、オレイン酸は 67.3 μM と報告されている (Rowland, Gaganis et al. 2007, Bushee, Liang et al. 2014). また、血清アルブミンはミクロソーム膜と相互作用することが知られている。そのため、血清アルブミンによる薬物代謝酵素活性の向上機序は、上述した脂肪酸による阻害効果の減弱だけでなく、ミクロソーム膜に存在する薬物代謝酵素と基質の親和性を変動させるためと考えられる。そこで、つぎに、S-777469 代謝に及ぼす血清アルブミンおよび長鎖脂肪酸の影響を精査した。

ヒトにおいて、血清アルブミンは血漿中に約 3 ~ 5% 程度含まれていることが知られている (山川ら, 生化学データブック 第 5 刷, 1989). また、ヒト肝臓中のアルブミン含量は解明されていないが、ラットにおいては、肝臓中アルブミン含量は血漿中アルブミン含量の 0.083 倍であることが報告されている (Poulin, Kenny et al. 2011). そこで、本研究では、0 ~ 3% BSA 存在下での 5-HM, 5-CA 生成変動を検討した。その結果、BSA の添加濃度依存的に基質濃度あたりの 5-HM, 5-CA 生成速度が上昇した (Fig. 10). また、5-CA 生成速度に対して最も大きな影響が観察された 0.3% BSA 添加時において、5-HM, 5-CA 生成時の P450 との親和性および最大代謝速度を解析した。その結果、5-HM 生成に関しては、0.3% BSA 添加により、 V_{\max} 値には変動がなかったものの、 K_m 値は約 24.2% まで低下した (Fig. 13, Table 7). また、3% BSA 添加群においても、 V_{\max} 値およ

び K_m 値の変動は同様であった (Data not shown). 一方, 5-CA 生成に関しては, 0.3% BSA 添加により, V_{max} 値は約 259% 上昇, K_m 値は約 29.3% まで低下した. また, S-777469 を用いて, S-777469 の一次代謝反応および二次代謝反応に及ぼす BSA の影響を検証した. その結果, BSA 添加により, BSA 非添加時に比較して, 5-HM 生成量は 2.3 倍, 5-CA 生成量は 2.8 ~ 3.2 倍上昇した (Fig. 14). また, ヒト血清アルブミン, ラット血清アルブミン添加によっても代謝物生成の向上は認められた (Data not shown). 以上の結果から, BSA は, ミクロソーム膜への基質薬物の移行を促進し, *in vitro* 試験系におけるヒト代謝物生成の予測精度を向上できることが示唆された. さらに, 5-HM および 5-CA 生成に及ぼす長鎖脂肪酸の影響を検証した結果, 今回検討したアラキドン酸, α -リノレン酸, オレイン酸およびミリスチン酸は全て 5-HM, 5-CA 生成を阻害した (Fig. 15). また, 5-HM, 5-CA 生成に対する長鎖脂肪酸の IC_{50} 値の比較から, 5-HM 生成に比較して, 5-CA 生成はより長鎖脂肪酸による阻害を受けることが明らかとなった (Table 8).

通常, 基質と代謝酵素の活性部位を取り合う競合阻害剤は代謝反応の K_m 値を上昇させ, 代謝酵素の活性部位以外に結合, 活性部位の構造などを変化させる非競合阻害剤は代謝反応の V_{max} 値を低下させることが知られている. 今回の結果から, BSA 添加により, 5-HM 生成時において K_m 値が低下したこと, 5-CA 生成時においては K_m 値が低下, V_{max} 値が上昇したことから, 5-HM 生成反応は競合的な阻害, 5-CA 生成反応は競合および非競合的な阻害を受けていることが考えられた. さらに, 複数の長鎖脂肪酸により 5-HM, 5-CA 生成が阻害されたこと, これまで長鎖脂肪酸は競合的に P450 触媒活性を阻害することが報告されていることから, *in vitro* 試験系において, 両代謝物の生成は長鎖脂肪酸による競合的な阻害を受けていることが示唆された. 一方, BSA 添加により V_{max} 値が上昇した事例は未だ少ない. Walsky らは, ヒト肝 Ms および UGT2B7 (uridine

diphosphate glucuronosyltransferase 2B7) 組換え酵素に 2% BSA 添加を添加することで、UGT2B7 による atazanavir のグルクロン酸抱合代謝速度の V_{max} 値が BSA 非添加時に比較して 2.2 ~ 3.4 倍増加することを報告しているが、その機序は明らかとはされていない (Manevski, Moreolo et al. 2011). 今後、基質薬物のミクロソーム膜への移行促進作用や血清アルブミンによる脂肪酸除去作用、薬物代謝酵素タンパクの構造変化などの観点から、血清アルブミンによる酵素活性の向上メカニズムが解明されることが望まれる。

今回の結果から、ヒト肝 Ms および CYP2C9 組換え酵素において、酸性医薬品の代謝に関わる CYP2C9 の酵素機能が内在性長鎖脂肪酸などにより抑制的に観察されていることが示唆された。そのため、今後、より精度高く酸性医薬品のヒト代謝物生成を予測するには、ヒト肝 Ms など *in vitro* 試験系に血清アルブミンを添加するとともに、血清アルブミンによる薬物代謝酵素の触媒活性の変動機序を解明する必要があると考えられる。

第 5 節 まとめ

本章では、まず、酸性医薬品の代謝に関与する CYP2C9 が、S-777469 の代謝に関与することが明らかとなった。また、アルブミンもしくは長鎖脂肪酸存在下での S-777469 代謝試験の結果から、*in vitro* 試験系において 5-CA 生成が予測できなかった原因は、*in vitro* 試験系での CYP2C9 の酵素機能が抑制的に観察されているためと推察された。CYP2C9 組換え酵素に BSA を添加することで S-777469 のヒト代謝物の予測精度を向上できたことから、酸性医薬品のヒト代謝物を精度高く予測するには、*in vitro* 試験系に血清アルブミンを添加するなど、*in vitro* 試験系の血清アルブミン、内在性脂肪酸含量を制御することが重要であることが明らかとなった。

第3章 HepaRG 細胞およびヒト肝細胞移植マウスを用いた S-777469 代謝予測

第1節 序論

肝臓は薬物代謝を担う中心的な臓器である。一方、肝臓から単離された肝細胞は、培養後、急激に薬物代謝能を失うため、これまで、肝細胞の薬物代謝能を *in vitro* 条件下で高く維持することは極めて困難であった (Ambrosino, Basso et al. 2005)。近年、薬物代謝 (代謝クリアランス, 代謝物生成) に関する臨床予測性向上のため、種々の *in vitro* 試験系の開発が行われている。

HepaRG 細胞はヒト肝癌由来の培養細胞であり、P450 や UGT などの薬物代謝酵素の発現量がヒト肝細胞に近いことが報告されている (Hart, Li et al. 2010)。また、アルブミンやグルコースの合成などの肝機能が維持されていること、また、ヒト肝細胞に比較してロットによるばらつきが少ないことが報告されている (Gripon, Rumin et al. 2002)。ヒト肝キメラマウスは、遺伝的もしくは薬剤により肝障害を誘発させた免疫不全マウスに、ヒト肝細胞を移植することでマウス肝細胞をヒト肝細胞で置換させたモデル動物である。これまで、複数のヒト肝キメラマウスが作製されており、いずれのヒト肝キメラマウスにおいても、ヒト P450 がマウス肝臓に発現していることや血漿中にヒトアルブミンが分泌されるなどのヒト肝臓の機能が維持されていることが報告されている (Hasegawa, Kawai et al. 2011, Kikuchi, McCown et al. 2010)。

これまでの検討結果から、S-777469 における *in vitro/in vivo* 代謝物プロファイルの乖離の原因は、*in vitro* 試験系において、内在性長鎖脂肪酸などにより S-777469 代謝に関わる CYP2C9 の酵素機能が抑制的に観察されているためと示唆された。また、血清アルブミンを *in vitro* 試験系に添加することで、ヒト代謝物生成の予測性向上に繋がることが示唆された。そこで、本章では、S-777469

をモデル薬物として、アルブミン分泌の維持が報告されている HepaRG 細胞およびヒト肝キメラマウスがヒト代謝物生成予測に有用か検証した。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 化合物および試薬

S-777469, 5-HM および 5-CA は塩野義製薬株式会社にて合成された。ヒト凍結肝細胞は XenoTech, LLC より購入した。HepaRG 細胞は Gibco-Life Technologies (Grand Island, NY, USA) より購入した。ヒト肝キメラマウスは株式会社フェニックスバイオ (Hiroshima, Japan) より購入した。その他の試薬および溶媒は HPLC 用, LC-MS/MS 用あるいは特級品の市販品を使用した。

第 2 項 ヒト凍結肝細胞および HepaRG 細胞における S-777469 代謝物生成比較

ヒト凍結肝細胞は 1×10^6 cells/ml の濃度にて William's E 培地 (pH 7.4) に懸濁させた。30 μ M S-777469 をヒト凍結肝細胞に添加し, 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて 4 時間反応させた。一方, HepaRG 細胞は, 説明書に従って, 1 週間前培養した。まず, HepaRG™ Thaw, Plate, & General Purpose Working Medium にて HepaRG 細胞を融解し, 1×10^6 cells/ml の濃度にてコラーゲン I でコートしたプレートに播種した。その後, 播種 1, 4, 6 日後に培地除去および HepaRG™ Maintenance/Metabolism Working Medium を添加した。播種 7 日後, 培地を除去し, 30 μ M S-777469 含有 William's E 培地 (pH 7.4) を添加し, 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて 4 時間反応させた。反応後, 氷冷した 4 倍量のアセトニトリルで停止し, 反応溶液を 10 分間 3,000 rpm にて遠心した。測定は第 2 章第 2 節

LC-MS/MS を用いた定量の項に準ずる。

第3項 コントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスにおける S-777469 薬物動態試験

本動物実験は塩野義製薬株式会社動物実験適正運用員会の承認下で実施された。本試験においては、コントロールマウスとしてヒト肝細胞を移植していない免疫不全マウス (Severe Combined immune deficiency マウス, SCID マウス) を使用した。また, S-777469 は 0.5% MC 水溶液に 1 mg/ml となるように懸濁させた。経口投与用ゾンデを用いて, 10 mg/kg の用量で S-777469 懸濁液をコントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスに胃内に強制経口投与した。投与 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間後, マウスにイソフルラン (エスカイン[®], Mylan, Osaka, Japan) 麻酔を施し, ヘパリンナトリウム処理したガラス毛細管 (Drummond Scientific Company, PA, USA) を用いて眼窩静脈叢より 25 μ L を採血した。血液は, 1,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C の条件で, 10 分間の遠心分離を行った。全ての血漿サンプルは解析まで-80 $^{\circ}$ C にて保存した。測定は第2章第2節 LC-MS/MS を用いた定量の項に準ずる。

第3節 結果

第1項 ヒト凍結肝細胞および HepaRG 細胞における S-777469 代謝物生成比較

ヒト代謝物生成予測に対する HepaRG 細胞の有用性を検証するため, ヒト凍結肝細胞および HepaRG 細胞における S-777469 代謝物生成を比較した。その結果, 2 ロットのヒト凍結肝細胞における 5-HM 生成量は 5, 6 nmol/million cells であった (Fig. 16)。一方, HepaRG 細胞における 5-HM 生成量は 19 nmol/million cells

であり、ヒト凍結肝細胞の 3.2~3.8 倍を示した。同様に、2 ロットのヒト凍結肝細胞における 5-CA 生成量は 81, 98 nmol/million cells であった。一方、HepaRG 細胞における 5-HM 生成量は 859 nmol/million cells であり、ヒト凍結肝細胞の 8.8~11 倍を示した。

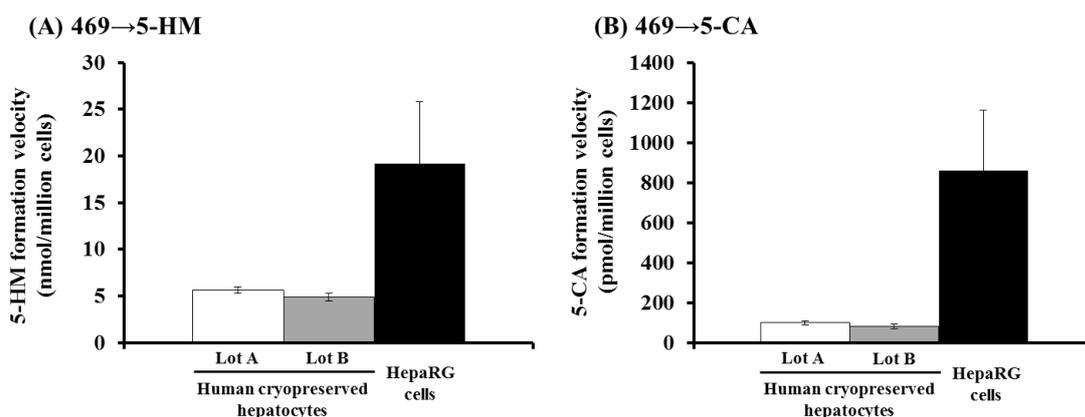


Fig. 16. Metabolite formation of S-777469 by cryopreserved human hepatocytes and HepaRG cells. (A) and (B) represent 5-HM and 5-CA formation from S-777469, respectively. Data represents mean \pm S.D. (N = 3). 469, S-777469; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid.

第 2 項 コントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスにおける S-777469 薬物動態試験

10 mg/kg S-777469 をコントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスに単回経口投与した後の S-777469 および代謝物の血漿中濃度推移および PK parameter を **Fig. 17** および **Table 9** に示す。コントロールマウスにおける S-777469, 5-HM および 5-CA の C_{max} 値はそれぞれ 283, 41.3 および 49.3 ng/ml であった。また、コントロールマウスにおける S-777469, 5-HM および 5-CA の AUC_{all} 値はそれぞれ

れ 1410, 164.8 および 214.0 ng·hr/ml であった。一方、ヒト肝キメラマウスにおける S-777469, 5-HM および 5-CA の C_{max} 値はそれぞれ 1739, 262.7 および 1383 ng/ml, S-777469, 5-HM および 5-CA の AUC_{all} 値はそれぞれ 6701, 774.3 および 17143 ng·hr/ml であった。コントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスにおいて、S-777469, 5-CA および 5-HM がどの程度曝露したかを検討するため、3 化合物の AUC_{all} の総和に対する各化合物の AUC_{all} 比を算出した。その結果、コントロールマウスにおける S-777469, 5-HM および 5-CA の AUC_{all} 比はそれぞれ 78.8, 12.0 および 9.21% であった。一方、ヒト肝キメラマウスにおける S-777469, 5-HM および 5-CA の AUC_{all} 比はそれぞれ 27.2, 69.6, 3.14% であり、ヒト主代謝物である 5-CA がヒト肝キメラマウスで最も高濃度に検出された。

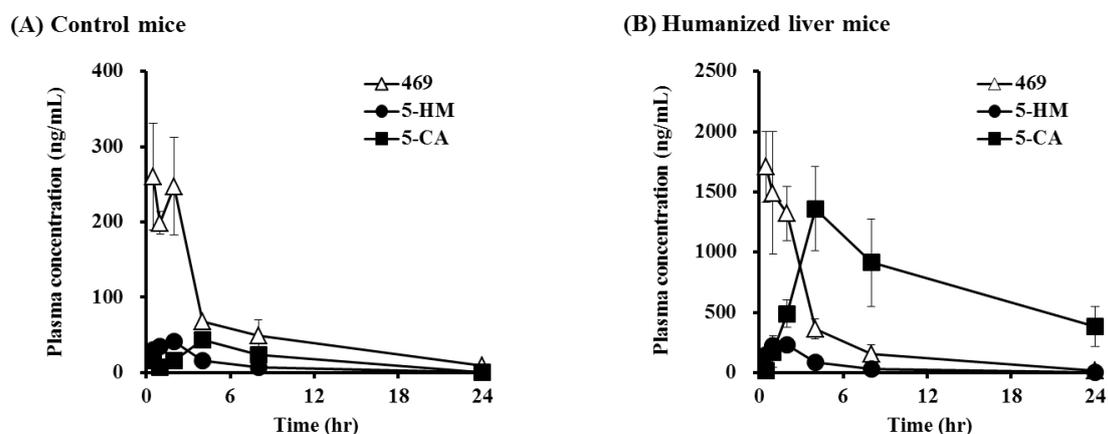


Fig. 17. Mean plasma concentration-time profiles for S-777469 and its main metabolites after a single oral administration of S-777469 to control mice (A) and humanized liver mice (B). Data represents mean \pm S.D. (N = 3). 469, S-777469; 5-CA, S-777469 5-carboxylic acid; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl.

Table 9 Pharmacokinetic parameters of S-777469 and its metabolites after a single oral administration of S-777469 to control mice and humanized liver mice.

Pharmacokinetic parameter	Control mice			Humanized liver mice		
	S-777469	5-CA	5-HM	S-777469	5-CA	5-HM
C_{\max} (ng/ml)	283 ± 60.3	49.3 ± 4.04	41.3 ± 7.77	1739 ± 332.3	1383 ± 336.5	262.7 ± 52.54
AUC _{all} (ng·hr/ml)	1410 ± 119	214.0 ± 15.61	164.8 ± 23.03	6701 ± 470.4	17143 ± 5225	774.3 ± 595
T_{\max} (hr)	1.0 (0.5, 2.0)	4.0 (4.0, 4.0)	2.0 (2.0, 2.0)	1.0 (0.5, 1.0)	4.0 (4.0, 8.0)	2.0 (1.0, 2.0)
Percentage of AUC _{all} to AUC _{all, S-777469+5-CA+5-HM} (%)	78.8	12.0	9.21	27.2	69.6	3.14

Data were expressed as the mean ± S.D.

Median (min, max) was presented for T_{\max} values.

5-CA, S-777469 5-carboxylic acid; 5-HM, S-777469 5-hydroxymethyl.

第4節 考察

第2章までにおいて、S-777469における *in vitro/in vivo* 代謝物プロファイルの乖離の原因は、*in vitro* 試験系において、内在性長鎖脂肪酸などにより S-777469 代謝に関わる CYP2C9 の酵素機能が抑制的に観察されているためと示唆された。また、血清アルブミンが CYP2C9 触媒活性の向上に繋がることが示唆された。そこで、本章では、S-777469 をモデル薬物として、アルブミン分泌の維持が報告されている HepaRG 細胞およびヒト肝キメラマウスがヒト代謝物生成予測に有用か検証した。

まず、2ロットのヒト凍結肝細胞および HepaRG 細胞を用いて、S-777469 代謝物生成量を比較した。その結果、HepaRG 細胞における 5-HM 生成量はヒト凍結肝細胞の 3.2 ~ 3.8 倍を示した (Fig. 16)。また、HepaRG 細胞における 5-HM 生成量はヒト凍結肝細胞の 8.8 ~ 11 倍を示した。

つぎに、コントロールマウスおよびヒト肝キメラマウスにおける S-777469 代謝物生成を比較した。その結果、コントロールマウスでは、5-HM および 5-CA の AUC_{all} 比はそれぞれ 9.21% および 12.0% を示し、5-CA は 5-HM と同程度しか生成されなかった (Fig. 17, Table 9)。一方、ヒト肝キメラマウスでは、5-HM および 5-CA の AUC_{all} 比はそれぞれ 3.14% および 69.6% を示し、ヒト主代謝物である 5-CA がヒト肝キメラマウスで最も高濃度に検出された。

本章の検討結果から、HepaRG 細胞およびヒト肝キメラマウスはともに、ヒト凍結肝細胞に比較して、S-777469 の主代謝物である 5-CA をより高感度で検出することができ、臨床における代謝物プロファイルをより精度高く予測できることが示唆された。しかし、ヒト代謝物プロファイルを精度高く予測するには、両試験系の特徴を把握する必要がある。HepaRG 細胞を用いた *in vitro* での代謝物分析では、代謝物の生成のみを検討できるため、代謝物の蓄積や体外排泄に

関する検証は困難である。一方、ヒト肝キメラマウスの課題点として、マウス由来の肝細胞が残存する可能性があり、検出された代謝物がどちらの動物種に起因するか検証する必要がある。そのため、医薬品開発においては、血清アルブミンを添加したヒト肝 Ms や HepaRG 細胞、ヒト肝キメラマウスを用いて代謝物評価の結果を総合的に検証し、ヒト代謝物を精度高く予測することが望まれる。また、近年、ヒト肝細胞を三次元的に長期培養することで薬物代謝活性のみならずアルブミン合成量も増加させられることが報告されている。そのため、今後、ヒト代謝物生成予測に対する長期培養ヒト肝細胞の応用研究も期待される。

第5節 まとめ

HepaRG 細胞において、ヒト凍結肝細胞と比較して、S-777469 のヒト主代謝物である 5-CA の生成量が向上した。また、ヒト肝キメラマウスにおける S-777469 の主代謝物は、ヒトと同様、5-CA であった。HepaRG 細胞やヒト肝キメラマウスなど、アルブミン合成が維持された試験系は、臨床における代謝物プロファイルをより精度高く予測し、より安全な医薬品創製、医薬品開発の迅速化に貢献できることが示唆された。

総括

これまで、多くの医薬品において、代謝物による重篤な副作用例が知られている。また、代謝物が未変化体に比較して高い DDI ポテンシャルを有する医薬品も存在することも報告されている。近年、副作用および DDI 発現に及ぼす代謝物の影響は非常に注目されており、医薬品候補化合物の安全性および DDI ポテンシャルを代謝物も含め網羅的に担保するためにも、非臨床段階からヒト代謝物を精度高く予測し、安全性および DDI ポテンシャルに及ぼす代謝物の影響を精査することが重要である。しかし、これまでの報告から、ヒト肝 Ms やヒト凍結肝細胞など *in vitro* 試料を用いた非臨床段階での代謝物分析では、十分にヒト代謝物を予測できない場合があることが明らかとなっている。そのため、より安全かつ DDI ポテンシャルの低い医薬品を創製する上で、非臨床段階でのヒト代謝物の予測精度向上は急務である。

S-777469 は、CB2 受容体に選択的に作用する酸性化合物であり、中枢性副作用の低いアトピー性皮膚炎、掻痒治療薬として開発されている。ヒト肝 Ms およびヒト凍結肝細胞を用いた代謝物分析の結果、5-HM が主代謝物として検出され、5-CA の生成量は全体の 1%未満であった。一方、ヒト血漿における主代謝物は 5-CA であり、上記 *in vitro* 試験系を用いたヒト代謝物の予測が困難であった。そこで、本研究では、より安全で DDI ポテンシャルの低い医薬品創製に繋がるヒト代謝物プロファイルの予測精度向上を目的に、S-777469 において認められた *in vitro/in vivo* 間の代謝物プロファイルの乖離の原因を解明し、非臨床段階におけるヒト代謝物生成の予測精度が向上可能か検証を行った。

第 1 章では、*in vitro/in vivo* 間の代謝物プロファイルの乖離の原因が主に代謝物の蓄積性や基質濃度や反応時間など *in vitro* 試験の条件、*in vitro* 試験では予測が困難な代謝反応の進行などに起因することから、まず、代謝物の蓄積性およ

び *in vitro* における試験条件の妥当性の観点から、代謝物プロファイルの乖離の原因を精査した。S-777469 の臨床薬物動態試験で得られた S-777469 および代謝物の消失半減期を比較した結果、S-777469 および全ての代謝物の消失半減期は同程度であり、代謝物は血漿中で蓄積しないことが明らかとなった。また、排泄物中の未変化体および代謝物量の比較から、生体では投与量の約 10% が 5-CA に代謝されたことが示唆された。また、S-777469 の臨床薬物動態試験の結果から推察された S-777469 の肝臓中最大濃度および 5-CA の T_{max} 値はヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝物分析における基質濃度および反応時間と同等であり、基質濃度や反応時間に関する *in vitro* の試験条件に問題はないことが示唆された。これらのことから、S-777469 における *in vitro/in vivo* 間の代謝物プロファイルの乖離の原因は、*in vitro* 試験では予測が困難な二次代謝反応が生体で起きたことが要因と考えられた。

第 2 章では、ヒト肝 Ms およびヒト凍結肝細胞において 5-CA 生成が予測できなかった原因を 5-HM および 5-CA 生成に関わる薬物代謝酵素の同定も含めて検討した。まず、5-HM および 5-CA 生成に関わる主代謝酵素を同定した結果、両代謝物は酸性医薬品の代謝に深く関わる CYP2C9 により生成することが明らかとなった。これまで、*in vitro* 試験系における CYP2C9 の触媒活性は血清アルブミンや内在性長鎖脂肪酸によって変動することが報告されている。そこで、つぎに、S-777469 代謝に及ぼす血清アルブミンおよび長鎖脂肪酸の影響を精査した。その結果、BSA は、ヒト肝 Ms において、5-HM および 5-CA 生成反応時の K_m 値を低下させ、S-777469 もしくは 5-HM と CYP2C9 の親和性を向上させることが示唆された。また、CYP2C9 組換え酵素において、BSA 非添加時に比較して、BSA 添加時の 5-HM および 5-CA 生成量が高値を示しており、BSA は S-777469 のヒト代謝物の予測精度を向上させることが明らかとなった。さらに、5-HM および 5-CA 生成に及ぼす内在性長鎖脂肪酸の影響を検討した結果、アラキドン酸

や α -リノレン酸など複数の長鎖脂肪酸が CYP2C9 による両代謝物の生成を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、*in vitro* 試験系において、内在性長鎖脂肪酸などにより酸性医薬品の代謝に関わる CYP2C9 の酵素機能が抑制的に観察されていることが推察された。さらに、血清アルブミンはミクロソーム膜への基質薬物の移行促進作用や内在性脂肪酸除去作用により CYP2C9 触媒活性が向上させることが示唆された。今後、より精度高く酸性医薬品のヒト代謝物生成を予測するには、血清アルブミン添加ヒト肝 Ms などを用いることにより、*in vitro* 試験系のアルブミン、内在性脂肪酸含量を制御することが重要であると考えられた。

第 3 章では、S-777469 をモデル薬物として、アルブミン分泌が維持された HepaRG 細胞およびヒト肝キメラマウスがヒト代謝物生成予測に有用か検証を行った。その結果、HepaRG 細胞における 5-HM および 5-CA 生成量はヒト凍結肝細胞に比較して高値を示した。また、ヒト肝キメラマウスにおける主代謝物は、臨床試験で得られた血漿中主代謝物である 5-CA であり、HepaRG 細胞やヒト肝キメラマウスはヒト代謝物生成予測に有用であることが示唆された。

本研究では、S-777469 において認められた *in vitro/in vivo* 間の代謝物プロファイルの乖離の原因を解明し、非臨床段階におけるヒト代謝物生成の予測精度が向上可能か検証を行った。その結果、*in vitro/in vivo* 間で認められた S-777469 代謝物プロファイルの乖離の原因は、*in vitro* 試験系において、CYP2C9 の触媒活性が内在性長鎖脂肪酸などにより阻害されているためであることを明らかにした。また、血清アルブミン添加ヒト肝 Ms や HepaRG 細胞、ヒト肝キメラマウスはヒト主代謝物である 5-CA をより高感度で検出することができたことから、医薬品開発において、これら試験系は、ヒト代謝物生成の予測精度を向上させ、より安全で DDI ポテンシャルの低い医薬品創製に貢献できることを明らかにした。これらの新知見は、ヒト型代謝物の評価やリスクの低い医薬品の創製に繋

がる極めて重要な情報になるとともに，生体での P450 の機能解明の基盤研究に役立つものと考えられる．

本研究の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

K. Sekiguchi, T. Kanazu, M. Takeuchi, H. Hasegawa, Y. Yamaguchi. (2014) Non-clinical evaluation of the metabolism, pharmacokinetics and excretion of S-777469, a new cannabinoid receptor 2 selective agonist. *Xenobiotica*. 44(1):48-58.

K. Sekiguchi, K. Fukumura, H. Hasegawa, T. Kanazu. (2015) The metabolism and pharmacokinetics of [14C]-S-777469, a new cannabinoid receptor 2 selective agonist, in healthy human subjects. *Xenobiotica*. 45(2):150-157.

K. Sekiguchi, N. Murayama, T. Kanazu, H. Yamazaki, Y. Yamaguchi. (2015). *In vitro* inhibition and enhancement of liver microsomal S-777469 metabolism by long-chain fatty acids and serum albumin: insight into *in vitro* and *in vivo* discrepancy of metabolite formation in humans *Xenobiotica*. (in press)

謝辞

本論文は筆者が塩野義製薬株式会社 開発研究所 薬物動態研究部門において、カンナビノイド受容体 2 選択的アゴニスト S-777469 のヒト代謝物生成に関する基盤研究の成果をまとめたものです。

本稿を終えるにあたり、本論文の主査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬物治療学研究室教授 水谷颯洋先生に謹んで深謝の意を表します。また、本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬理学研究室教授 渡邊泰男先生および同大学 統合感染免疫学研究室教授 石戸聡先生に深謝の意を表します。

昭和薬科大学 薬物動態学研究室教授 山崎浩史先生には、論文作成にあたり終始多大なるご指導をいただくとともに、成果発表の機会を与えていただきました。謹んで深謝の意を表します。

昭和薬科大学 薬物動態学研究室講師 村山典恵先生には、論文作成にあたり終始有意義なご助言とご支援をいただき、ここに深謝の意を表します。また、昭和薬科大学 薬物動態学研究室講師 清水万紀子先生、同特任助教 上原正太郎先生並びに同研究室の皆様には、種々のご便宜を計らいいただき、ここに感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導ご鞭撻をいただいた塩野義製薬株式会社 開発研究所 薬物動態研究部門 山口嘉隆部門長に厚く御礼申し上げます。

塩野義製薬株式会社 開発研究所 薬物動態研究部門 金津卓史氏および佐藤準人氏には、研究遂行および論文作成にあたり日頃より有益なご討論とご助言をいただき、心から御礼申し上げます。また、日ごろ変わらぬご支援、ご協力をいただきました塩野義製薬株式会社 開発研究所 薬物動態研究部門の諸氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、私の研究に理解を示し、常に応援してくれた妻の智枝および娘の結椛に深く感謝します。

参考文献

- Amacher D. E. (2012). "The primary role of hepatic metabolism in idiosyncratic drug-induced liver injury." Expert Opin Drug Metab Toxicol **8**(3): 335-47.
- Ambrosino G., S. M. Basso, et al. (2005). "Isolated hepatocytes versus hepatocyte spheroids: in vitro culture of rat hepatocytes." Cell Transplant **14**(6): 397-401.
- Baird W. M., L. A. Hooven, et al. (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." Environ Mol Mutagen **45**(2-3): 106-14.
- Bushee J. L., G. Liang, et al. (2014). "Identification of saturated and unsaturated fatty acids released during microsomal incubations." Xenobiotica **44**(8): 687-95.
- Dalvie D., R. S. Obach, et al. (2009). "Assessment of three human in vitro systems in the generation of major human excretory and circulating metabolites." Chem Res Toxicol **22**(2): 357-68.
- Davies B. and T. Morris (1993). "Physiological parameters in laboratory animals and humans." Pharm Res **10**(7): 1093-5.
- Gripon P., S. Rumin, et al. (2002). "Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15655-60.
- Hart S. N., Y. Li, et al. (2010). "A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues." Drug Metab Dispos **38**(6): 988-94.
- Hasegawa M., K. Kawai, et al. (2011). "The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional." Biochem Biophys Res Commun **405**(3): 405-10.
- 林 昌洋, 岩月 進 (2006). 高齢者における医薬品の適正使用と安全管理 Available at: <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/11/dl/s1120-7b01.pdf> [last accessed 22 July 2014].
- Herkenham M., A. B. Lynn, et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." Proc

Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1932-6.

International Conference on Harmonization. (2009) M3(R2): Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Available at:

<http://www.pharmafacts.com/images/stories/Resources/ICHM3R2.pdf> [last accessed 4 June 2015].

Ito K., T. Iwatsubo, et al. (1998). "Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver." Pharmacol Rev **50**(3): 387-412.

James L. P., P. R. Mayeux, et al. (2003). "Acetaminophen-induced hepatotoxicity." Drug Metab Dispos **31**(12): 1499-506.

Kikuchi R., M. McCown, et al. (2010). "Effect of hepatitis C virus infection on the mRNA expression of drug transporters and cytochrome p450 enzymes in chimeric mice with humanized liver." Drug Metab Dispos **38**(11): 1954-61.

厚生労働省大臣官房統計情報部 (2011). 平成23年患者調査 (傷病分類編) Available at: Available at: <http://www.pharmafacts.com/images/stories/Resources/ICHM3R2.pdf> [last accessed 4 June 2015].

Mailleux P. and J. J. Vanderhaeghen (1992). "Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry." Neuroscience **48**(3): 655-68.

Karazniewicz-Lada M, et al. (2014). "Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases." Clin Pharmacokinet **2**(53): 155-164

Manevski N., P. S. Moreolo, et al. (2011). "Bovine serum albumin decreases Km values of human UDP-glucuronosyltransferases 1A9 and 2B7 and increases Vmax values of UGT1A9." Drug Metab Dispos **39**(11): 2117-29.

水垂 亨, 佐藤 準人, 戸内 明, 山口 嘉隆, 馬場 隆彦, 石崎 順 (2009). 嫌氣的

- 条件下におけるヒト肝細胞代謝試験の必要性について, 第16回HAB研究機構学術年会
- Odan M., N. Ishizuka, et al. (2012). "Discovery of S-777469: an orally available CB2 agonist as an antipruritic agent." Bioorg Med Chem Lett **22**(8): 2803-6.
- Ogilvie B. W., D. Zhang, et al. (2006). "Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions." Drug Metab Dispos **34**(1): 191-7.
- Poulin P., J. R. Kenny, et al. (2011). "In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods." J Pharm Sci **101**(2): 838-51.
- Reese M. J., R. M. Wurm, et al. (2008). "An in vitro mechanistic study to elucidate the desipramine/bupropion clinical drug-drug interaction." Drug Metab Dispos **36**(7): 1198-201.
- Rosemond M. J., L. St John-Williams, et al. (2004). "Enzymology of a carbonyl reduction clearance pathway for the HIV integrase inhibitor, S-1360: role of human liver cytosolic aldo-keto reductases." Chem Biol Interact **147**(2): 129-39.
- Rowland A., D. J. Elliot, et al. (2008). "The "albumin effect" and in vitro-in vivo extrapolation: sequestration of long-chain unsaturated fatty acids enhances phenytoin hydroxylation by human liver microsomal and recombinant cytochrome P450 2C9." Drug Metab Dispos **36**(5): 870-7.
- Rowland A., P. Gaganis, et al. (2007). "Binding of inhibitory fatty acids is responsible for the enhancement of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 activity by albumin: implications for in vitro-in vivo extrapolation." J Pharmacol Exp Ther **321**(1): 137-47.
- Srivastava A., J. L. Maggs, et al. (2010). "Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity." Handb Exp Pharmacol(196): 165-94.
- 杉山 正康 編著 (2010). 薬の相互作用としくみ 改訂第9版, 医歯薬出版株式会社, 1-27
- Tang, C., Y. Lin, et al. (2002). "Effect of albumin on phenytoin and tolbutamide metabolism in

human liver microsomes: an impact more than protein binding." Drug Metab Dispos **30**(6): 648-54.

戸塚 善三郎 編著 (2015). 薬物 (ヒト) 代謝物の構造解析・同定と承認申請/照会事項対応, サイエンス&テクノロジー

US FDA. (2008). United States Food and Drug Administration Guidance for Industry, Safety testing of drug metabolites, February 2008. Available at:

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm079266.pdf> [last accessed 4 June 2015].

US FDA. (2012). United States Food and Drug Administration Guidance for Industry, Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, February 2012. Available at:

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf> [last accessed 4 June 2015].

Wang, W. W., S. R. Khetani, et al. (2010). "Assessment of a micropatterned hepatocyte coculture system to generate major human excretory and circulating drug metabolites." Drug Metab Dispos **38**(10): 1900-5.

Wattanachai, N., T. M. Polasek, et al. (2011). "In vitro-in vivo extrapolation of CYP2C8-catalyzed paclitaxel 6alpha-hydroxylation: effects of albumin on in vitro kinetic parameters and assessment of interindividual variability in predicted clearance." Eur J Clin Pharmacol **67**(8): 815-24.

Wattanachai, N., W. Tassaneeyakul, et al. (2012). "Effect of albumin on human liver microsomal and recombinant CYP1A2 activities: impact on in vitro-in vivo extrapolation of drug clearance." Drug Metab Dispos **40**(5): 982-9.

山川 民夫, 今堀 和友ら (1989). 生化学データブック [I]第5刷, 東京化学同人, 91-135

Yao, H. T., Y. W. Chang, et al. (2006). "The inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on

human CYP enzymes." Life Sci **79**(26): 2432-40.