

博士論文

血清懸濁ヒト肝細胞と老齢動物モデルを活用した
高齢者における薬物体内動態予測基盤に関する研究

平成30年度

小柳 孝史

目次

略語一覧	iv
序論	1
第 I 章 血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価系の構築	5
第 1 節 緒言	5
第 2 節 実験材料および方法	8
I-2-i) 試薬	8
I-2-ii) LogD (pH 7.4) 計算	9
I-2-iii) SD ラット, Hartley モルモットおよびカニクイザルを用いた血中動態試験	9
II-2-iii) 血漿中薬物濃度の測定	10
I-2-iv) ヒト肝細胞中代謝安定性試験	10
I-2-v) 肝取り込み試験	11
I-2-vi) データ解析	12
第 3 節 結果	14
第 4 節 考察	20
第 5 節 小括	23
第 II 章 サルおよびイヌにおける加齢による生理学的パラメータの変動	24
第 1 節 緒言	24
第 2 節 実験材料および方法	26
II-2-i) 試薬	26
II-2-ii) カニクイザルおよびビーグル犬を用いた血中動態試験	26
II-2-iii) 血漿中薬物濃度の測定	27
II-2-iv) 胃内 pH, 血漿アルブミン濃度および血漿蛋白結合率測定	27

II-2-v) 薬物動態データ解析	28
第 3 節 結果	28
II-3-i) 胃内 pH, 血漿アルブミン濃度および血漿蛋白結合率測定	28
II-3-ii) 血漿アルブミン濃度測定	29
II-3-iii) 血漿蛋白結合率測定	29
II-3-iv) 血中動態試験	33
第 4 節 考察	43
第 5 節 小括	47
第 III 章 サルにおける加齢による P450 代謝活性の変動	48
第 1 節 緒言	48
第 2 節 実験材料および方法	49
III-2-i) 試薬	49
III-2-ii) カニクイザルを用いた血中動態試験	49
III-2-iii) 血漿中薬物濃度の測定	50
III-2-iv) カニクイザルの血液/血漿中濃度比 (R_b) 測定	50
III-2-v) カニクイザル肝ミクロソーム中安定性	51
III-2-vi) カニクイザル血漿および肝ミクロソーム蛋白結合率測定	51
III-2-vii) データ解析	52
第 3 節 結果	54
III-3-i) 血中動態試験	54
III-3-ii) R_b , $f_{u,mic}$, 個体別 $f_{u,p}$ および $CL_{int,vitro}$ に基づく予測 CL と実測 CL の比較	61
III-3-iii) 加齢による $CL_{int,vitro}$ の変動	66
III-3-iv) Metoprolol <i>O</i> -demethylation 代謝活性の種差の検討	68
第 4 節 考察	68

第5節 小括	72
総括	73
本研究の誌上発表	77
謝辞	78
参考文献	79

略語一覧

AUC	血漿中濃度曲線下面積
BA	バイオアベイラビリティ
CL	クリアランス
CL _{B,observed}	実測の <i>in vivo</i> 血液クリアランス
CL _{B,predicted}	<i>In vitro</i> 試験より算出した <i>in vivo</i> 血液クリアランス
CL _{int}	固有クリアランス
CL _{int,vitro}	<i>In vitro</i> 試験より算出した固有クリアランス
CL _{int,met,in vitro}	<i>In vitro</i> 試験より算出した代謝固有クリアランス
CL _{int,uptake,in vitro}	<i>In vitro</i> 試験より算出した肝取り込み固有クリアランス
CL _{h,met,predicted}	<i>In vitro</i> 試験より算出した <i>in vivo</i> 肝代謝クリアランス
CL _{h,uptake,predicted}	<i>In vitro</i> 試験より算出した <i>in vivo</i> 肝取り込みクリアランス
CL _{tot}	全身クリアランス
CYP	チトクロム P450 の個別分子種
C _{max}	循環血漿中最大濃度
DMSO	Dimethylsulphoxide
D _N	dispersion number
F	バイオアベイラビリティ
F _h	肝通過率
f _u	フリー体分率
f _{u,inc,hep}	緩衝液懸濁肝細胞液中フリー体分率
f _{u,mic}	肝ミクロソーム反応液中フリー体分率
f _{u,p}	血漿中フリー体分率
HPLC	高速液体クロマトグラフィー

k_e	消失速度定数
LC-MS/MS	高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
P450	チトクロム P450 の総称
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
Q_h	肝血流量
R_b	血液／血漿中濃度比
R_N	efficiency number
$t_{1/2}$	半減期
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間
V_d	分布容積
V_{ss}	定常状態分布容積

序論

医薬品開発において、薬剤の血漿中濃度は有効性や副作用を予測する上で極めて重要な評価項目である。有効性を発揮するためには疾患および臨床試験を実施する薬剤候補（開発候補化合物）は適正な血漿中濃度である必要があり、血漿中濃度が低ければ有効性を発揮できず、逆に高すぎると副作用を発現してしまう。そのため、医薬品開発において、開発候補化合物のヒト血漿中濃度予測を予測する必要がある。ヒト血漿中濃度予測は非臨床段階初期から実施される。多くの化合物から開発候補化合物を絞り込む過程では、主にヒト組織を用いた *in vitro* 試験による吸収性や肝臓における代謝安定性に関する評価を行う。開発候補化合物を選択する段階では、複数の候補化合物についてより詳細な *in vitro* および *in vivo* 評価を行い、それらのデータを用いてヒト血漿中濃度を予測し、化合物の選択および臨床試験に進むか否かの意思決定を行う。その際に得られるヒト血漿中濃度予測結果は、第一相臨床試験における投与量および用法の設定や、投与量依存的な安全性を確認する用量漸増試験においてどこまで投与量を漸増していくか、またそれに応じた開発候補化合物の原薬供給計画など、臨床試験計画全体に多大な影響を与える。そして第一相臨床試験において実測のヒト血漿中濃度が予測と異なり低すぎた場合には有効性が期待できず、逆に血漿中濃度が高すぎる場合は重篤な副作用が生じてしまうなどにより、臨床試験が中止となる可能性がある。したがって、開発候補化合物のヒト血漿中濃度予測精度を向上させることは、医薬品開発における重要課題である。

医薬品を最も多く服用するのは高齢者である。厚生労働省の 2014 年患者調査の概況によると 65 歳以上の高齢患者数が全患者数の 52% であり、2015 年 9 月調査の薬剤料は 65 歳以上が全体の 61 % を占める。また、高齢者は複数の薬剤を同時に服用することが多く、臨床試験において高齢者で開発候補化合物の血漿中濃度が予想より高い場合には、薬物間相互作用により副作用が発現してしまう可能性もある。したがって、開発化合物のヒト血漿中濃度予測の中でも、特に高齢者血漿中濃度の予測は医薬品開発において重要である。

化合物の薬物動態を考える上で重要な因子は消化管吸収、体内分布、代謝排泄臓器である肝臓および腎臓への取り込み、代謝および排泄である。経口投与された化合物は胃内で溶解するが、その際に胃内 pH 値に影響を受ける。溶解した薬剤は胃から排出されるが、消化管から吸収されるまでにかかる時間はこの胃排出速度に影響を受ける。消化管から吸収された化合物は血中に移行し全身に分布することになり、脂溶性の高い化合物は脂肪組織に多く分布し、逆に脂溶性が低く水溶性が高い化合物は体液に主に分布するため、化合物の分布は体脂肪率や体水分率に影響を受ける。消化管から吸収される際、また吸収され全身に分布した後も、化合物は継続的に代謝排泄臓器である肝臓および腎臓を循環し、体内から消失するため、その消失は肝臓および腎臓の代謝排泄能（クリアランス、CL）に影響を受ける。高齢者では若年者に比べこれらの種々生理学的パラメータが変化することが知られており (Corsonello et al., 2010; Klotz 2009; McLachlan & Pont 2012), その変動を考慮したヒト血漿中濃度予測が必須となる。ヒト血漿中濃度予測は動物およびヒト組織を用いた *in vitro* 評価および動物を用いた *in vivo* 評価により実施される (Ring et al., 2011). 2002 年の米国における最頻処方薬上位 200 の医薬品について、73%が肝臓で代謝され体内から消失するため (Wienkers & Heath 2005), *in vitro* 評価で特に重要となるのは肝 CL の予測である。肝臓での消失を考える上で重要な因子は、血漿から肝臓への化合物の移行（肝取り込み）と、肝臓内の代謝酵素による化合物の代謝である。血漿から肝臓への移行には、化合物の血漿蛋白との結合率が影響を与える。アルブミンや $\alpha 1$ 酸性糖蛋白などの血漿蛋白に結合している化合物は肝臓に移行することはできず、結合していないフリー体だけが肝臓に移行することができる（フリー体理論）。したがって、肝 CL 予測のための *in vitro* 評価として、化合物の肝細胞への取り込み速度の評価および血漿蛋白結合率の測定が重要である。一方、動物を用いた *in vivo* 評価として、ラット、イヌおよびサル等に化合物を投与し、経時的に採血し血漿中濃度を測定する、いわゆる血中動態試験が行われる。その結果を用いてアロメトリックスケーリング法や *in vitro*–*in vivo* extrapolation (IVIVE) などの手法 (Ring et al., 2011)

により、ヒトにおける消化管吸収、体内分布、代謝および排泄を考慮したヒト血漿中濃度を予測する。これらのように *in vitro* および *in vivo* の両面からヒト血漿中濃度を予測するが、高齢者血漿中濃度を予測する際にはそれぞれ大きな課題がある。肝取り込み CL に及ぼす加齢の影響についてはこれまでに報告がなく、その影響を予測する上で高齢者の肝細胞を用いた肝取り込み評価を実施する必要があるが、*in vitro* 肝取り込み評価系において、高脂溶性および高蛋白結合率の化合物は、容器および肝細胞への吸着等により、精度の高い肝取り込み速度の評価および血漿蛋白結合率測定が困難であることが課題である。*In vivo* に関しては、老齢動物がヒトにおける各種生理学的パラメータの加齢による変動を反映するかどうかの情報がないことが課題である。

そこで本研究では、化合物の肝取り込みに及ぼす加齢の影響を評価するための基盤を構築すべく、高脂溶性・高蛋白結合率化合物についても精度の高いヒト肝取り込み CL 予測が可能となる新規 *in vitro* 肝取り込み評価系を構築すること、また、高齢者血漿中濃度予測モデル動物としての老齢カニクイザルおよびビーグル犬の有用性を検証すべく、加齢による種々生理学的パラメータの変動を確認することを目的とした。第 I 章では、肝臓での消失が肝取り込み律速である薬物について、肝細胞表面や試験容器への非特異的吸着を防ぎ、別途血漿蛋白結合率を評価する必要のない、血清で懸濁した肝細胞を用いた肝取り込み評価を行い、ヒト肝 CL 予測精度を検証した。第 II 章では、若齢および老齢のカニクイザルおよびビーグル犬を用いて、血清アルブミン濃度、 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白濃度、胃内 pH、胃排出速度、体水分率、体脂肪率、肝血流量、肝代謝能および腎排泄能などの種々生理学的パラメータの加齢による変動を測定、もしくは指標薬物の血中動態試験により推定し、加齢によるそれらの変動をヒトと比較した。第 III 章では、若齢および老齢のカニクイザルを用いて、薬物の体内動態において最も重要な肝臓における薬物の酸化代謝活性について、各代謝酵素の指標薬物の血中動態試験、および若齢から老齢の 55 頭のサルから調製した個体別の肝ミクロソームを用いた指標薬物の *in vitro* 代謝安定性試験を行い、サルにおける酸化代謝活性

の加齢による変動がヒトにおける変動を反映するかを検証した。本研究によって、高脂溶性・高蛋白結合率化合物について簡便に精度良く肝取り込み CL 予測が可能となる新規 *in vitro* 評価系を構築し、高齢者における薬物の体内動態予測に貢献した。さらに、高齢者血漿中濃度予測モデル動物としての老齡カニクイザルの有用性を明らかにしたので、以下に詳述する。

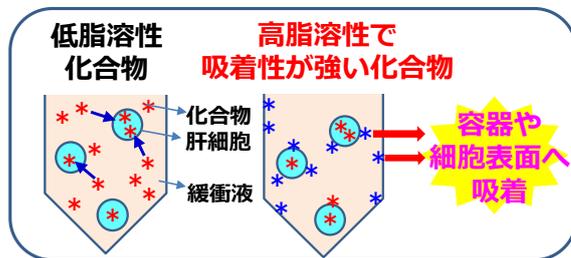
第 I 章 血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価系の構築

第 1 節 緒言

化合物の肝臓での消失には、血漿中の化合物の肝細胞への移行および肝細胞中から血漿中への排出、肝細胞中での代謝、もしくは未変化体のまま胆汁排泄されるなど、複雑な要因が絡み合う。肝代謝型の化合物については、肝ミクロソームもしくは緩衝液に懸濁させた肝細胞を用いた代謝安定性評価により *in vivo* 肝クリアランス (CL) 予測が行われる (Chiba et al., 2009)。一方、pravastatin などの複数のスタチン系に代表されるように、薬物によっては肝臓への取り込みにアニオン系化合物を認識する OATP などの取り込みトランスポーターが関与しており、代謝ではなく肝細胞への取り込みが血中からの消失の律速過程である化合物が存在する。緩衝液に懸濁させた肝細胞には肝臓組織と同程度の OATP1B1, OATP1B3 および OATP2B1 蛋白が発現しており (Badee et al., 2015)、代謝安定性評価同様、緩衝液に懸濁させた肝細胞を用いて化合物の肝細胞内への取り込み評価を実施して取り込み CL を算出し、*in vitro*-*in vivo* extrapolation (IVIVE) により *in vivo* 肝 CL を予測できることが報告されている (Watanabe et al., 2010; Watanabe et al., 2011)。しかしながら、脂溶性の高い化合物については、*in vitro* 試験時の容器や肝細胞表面への非特異的吸着により、肝取り込み速度を精度良く評価するのが困難な場合がある (Figure I-1)。また、IVIVE に必要な血漿 (または血清) 蛋白結合率についても、脂溶性の高い化合物については測定が困難、または測定値の信頼度が低い場合がある。蛋白結合率測定には、限外濾過法、超遠心法および平衡透析法が用いられる。限外濾過法においては化合物添加血漿を限外濾過器フィルターにより濾過し、濾液中の薬物濃度を測定し、濾液中濃度と血漿中濃度の比から非結合型 (フリー体) 分率および血漿蛋白結合率を算出するが、濾液中には蛋白質が存在しないため、化合物が限外濾過フィルターや容器に吸着してしまい、蛋白結合率を過大評価する。超遠心法では化合物添加血漿を超遠心することで血漿蛋白質を沈殿させ、上清中の化合物濃度を測定す

るが、限外濾過法同様、蛋白質が存在しない上清中の化合物が容器に吸着する。平衡透析法では化合物添加血漿と緩衝液を平衡透析膜で区切り、透析を行い、緩衝液中の化合物濃度を測定するが、化合物が容器に吸着しても平衡状態においては緩衝液側と血漿側の濃度比が変わらないため、蛋白結合率に与える影響は小さい。しかしながら、限外濾過法および超遠心法にも共通した課題であるが、高脂溶性・高蛋白結合率化合物については、吸着の影響および測定検出限界の問題から測定できない場合がある。また、平衡透析法ではインキュベーション時間が長く、化合物によっては平衡状態に達するまで24時間以上かかるため、血漿中で不安定な化合物の測定には適していない。そこで、高脂溶性・高蛋白結合率化合物の肝取り込みCL予測における課題を解決するため、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価を考案した (Figure I-1)。血清懸濁法では、緩衝液の代わりに血清で肝細胞を懸濁して取り込み評価を行うため、高脂溶性化合物についても容器や細胞表面への吸着を防止することで正確な取り込み速度が算出できる可能性がある。また、血清で懸濁させた状態での取り込み評価であるため、すでに化合物の血漿蛋白結合率を反映した状態であり、別途血清蛋白結合率を測定する必要がない。さらに、緩衝液懸濁法においては吸着により緩衝液中の化合物濃度が大きく低下している場合があるため、緩衝液中の化合物フリー濃度の測定が必要であるが、血清懸濁法においては吸着が防がれることにより血清中の化合物濃度はほとんど変化がなく、別途血清中濃度を測定する必要はない。このように緩衝液懸濁法では肝取り込み評価、血漿蛋白結合率および緩衝液中の化合物フリー濃度の3種類の評価が必要であるのに対し、血清懸濁法では肝取り込み評価のみを測定すればよい。以上より、血清懸濁法は簡便でスループットが高く、予測精度の高い評価系となる可能性がある。

緩衝液懸濁法（従来法）



血清懸濁法

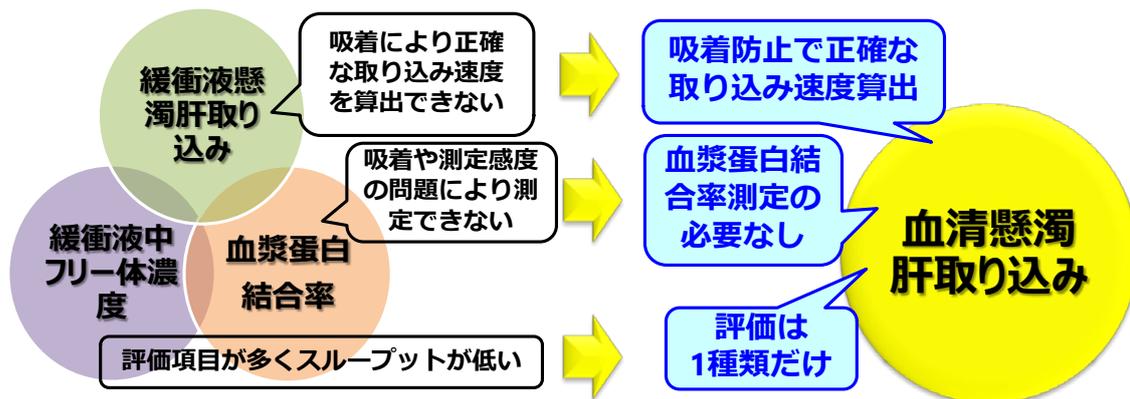
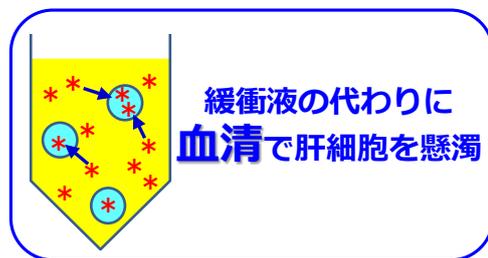


Figure I-1. 緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み評価（従来法）における課題と血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価による課題解決の可能性

そこで本研究では、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価の有用性を検証すべく、血清の pH 7.4 ではマイナスに帯電しており、血漿蛋白結合率が 99%以上と高く脂溶性の低い diflunisal, cerivastatin, fluvastatin, および脂溶性の高い montelukast および telmisartan を検証薬物として選択した。Cerivastatin, fluvastatin, montelukast および telmisartan は、いずれも肝取り込みトランスポーターである OATP の基質であることが報告されている (Ishiguro et al., 2006; Kameyama et al., 2005; Kopplow et al., 2005; Matsushima et al., 2005; Noe et al., 2007; Varma et al., 2017)。ヒト肝細胞を用いた取り込み試験において、cerivastatin, fluvastatin および telmisartan 肝取り込み固有 CL は 37°C でそれぞれ 89.2, 101 および 268 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells, 4°C ではそれぞれ 7.52, 9.76 および 12.4 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells であり (Izumi et al., 2018), montelukast の 4°C における肝取り込み固有 CL は 37°C におけるその 25% の値に低下している (Varma et

al., 2017). これらのことから, これらの薬物の肝取り込みにおいてはトランスポーターによる能動輸送が優位であると考えられる. 本研究では, これら薬物の血清懸濁肝細胞取り込み評価を行い, 肝細胞を用いた代謝安定性評価および緩衝液懸濁法による取り込み評価と *in vivo* CL の予測精度を比較した. また, 自社プロジェクトにおいて, 脂溶性が高く蛋白結合率が 99.97%以上で試験容器への吸着および測定感度の問題から蛋白結合率測定ができない化合物群があり, それらは肝細胞などを用いた代謝安定性試験によるヒト肝 CL 予測が困難であった. 一方, これらの化合物はカルボン酸を有する酸性化合物であることから, OATP などの肝取り込みトランスポーターの基質であり肝取り込み過程が CL を規定する可能性が考えられた. そこで, 血清懸濁肝細胞取り込み評価によりヒト肝 CL を予測できる可能性があると考え, 本手法で *in vivo* CL を予測し得るかを検証するため, SD ラット (ラット), Hartley モルモット (モルモット) およびカニクイザル (サル) の血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価を行い, *in vivo* CL との相関性を確認した.

第 2 節 実験材料および方法

I-2-i) 試薬

Diffunisal, montelukast sodium, cerivastatin sodium salt hydrate および telmisartan は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した. ONO 化合物 (ONO-A, B, C, D, E および F) は小野薬品工業にて合成された (Osaka, Japan). Fluvastatin sodium は Sequoia Research Products (Pangbourne, UK) より購入した. SD ラット凍結肝細胞 (雄性 8 匹混合), Dunkin-Hartley モルモット凍結肝細胞 (single donor), カニクイザル凍結肝細胞 (雄性 3 頭混合) およびヒト凍結肝細胞 (22~74 歳の男性 5 例および女性 5 例の混合) は Celsis IVT (Baltimore, MD, USA) より購入した. ラット血清およびモルモット血清 (それぞれ雄性 10 匹混合) は社内で調製した. サル血清 (雄性 10 頭混合) はハムリー (Ibaraki, Japan) より購入した. ヒト血清 (18~62 歳の男性 5 例および女性 5 例の混合) は Biopredic International

(Rennes, France) より購入した. Hepatocyte Isolation kit (K2000) は XenoTech (Kansas City, KS, USA)より購入した. HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, with Calcium Chloride and Magnesium Chloride) および 1 mol/L HEPES (pH 7.55) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した. KHEM5100 培地は株式会社ケー・エー・シー (Kyoto, Japan) より購入した. Silicone oil (high temperature. Density 1.05 g/mL) および mineral oil (heavy. Density 0.862 g/mL) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した. Sucrose はナカライテスク (kyoto, Japan) より購入した. Microcentrifuge Tube (0.4 mL Microcentrifuge Tube & Cap Low Density Polyethylene, Natural) はビーエム機器 (Tokyo, Japan) より購入した. WellSolve はセレステ (Tokyo, Japan) より購入した. その他の試薬および溶媒は HPLC 用, LC-MS/MS 用もしくは特級品を購入した.

I-2-ii) LogD (pH 7.4) 計算

LogD (pH 7.4) は ACD/LogD (version: 12.01, ACD/Labs. Toronto, Canada) により計算した.

I-2-iii) SD ラット, Hartley モルモットおよびカニクイザルを用いた血中動態試験

血中動態試験 (静脈内投与) は, ONO-A, ONO-B, ONO-C, ONO-D, ONO-E および ONO-F と, 同一プロジェクト内の類似化合物について, 複数の組み合わせの混合投与液を用いて実施した. SD ラット (ラット), Hartley モルモット (モルモット) への採血および血漿の採取は小野薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) で実施した. すべての動物実験計画は小野薬品工業株式会社の動物実験委員会で承認された. カニクイザル (サル) への採血および血漿の採取はハムリー株式会社 (Tsukuba, Japan) で実施した. すべての動物実験計画はハムリー株式会社の動物実験倫理委員会で承認された. SD ラット (CrI:CD (SD) IGS 系, 雄, 8 週齢) は日本チャールス・リバーより購入した. Hartley モルモット (雄, 6~7 週齢) は日

本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。カニクイザル (雄, 3 歳齢) はハムリー株式会社にて小野薬品工業株式会社が委託飼育しているサルを使用した。化合物投与前日の夕方から絶食を施し, 飲水は自由飲水とした。投与液は, 投与液中における各化合物の濃度がそれぞれ 0.1 mg/mL (10%Wellsolve および化合物に対し 2 等量の NaOH を含有) となるよう調製した。調製した投与液を, ラットおよびサルについては 1 mL/kg, モルモットについては 2 mL/kg の用量で静脈内投与した。ラットについては投与後 0.033, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 および 24 時間後, モルモットおよびサルについては投与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 および 24 時間後にヘパリンナトリウム添加シリンジを用いて採血した。血液を遠心して血漿を分取し, 測定に供するまで -80°C で保存した。

II-2-iii) 血漿中薬物濃度の測定

検量線用添加試料は, ブランク血漿 25 μ L に, 測定対象物質の混合溶液 5 μ L を添加することで調製した。測定試料 25 μ L 及び検量線用添加試料に, 内標 (自社化合物) を含むアセトニトリル/エタノール (7/3) 混合液を 200 μ L 添加し, 全量をフィルタープレートにアプライし, 吸引濾過した。ろ液を蒸留水にて 2 倍希釈し, LC-MS/MS 装置 (Agilent 1100 HPLC System, AB SCIEX API4000) で薬物濃度を測定した。

I-2-iv) ヒト肝細胞中代謝安定性試験

化合物溶液は, diflunisal, montelukast, cerivastatin, telmisartan および fluvastatin をそれぞれアセトニトリルで溶解して等量混和し, 各化合物あたり 10 μ mol/L となるよう調製した。凍結肝細胞を Hepatocyte isolation kit を用いて融解及び精製し, KHEM5100 培地を加えて生細胞数 1.0×10^6 cells/mL となるように細胞懸濁液を調製した。マイクロチューブに細胞懸濁液 500 μ L を分注後, 化合物溶液を 5 μ L 加え攪拌し, 100 μ L ずつ別のマイクロチューブに等分し, 37°C の 5% CO₂ インキュベータでインキュベーションした。反応開始直後, 反応 0.5,

1 および 2 時間後に 400 μL の内標準物質 (自社化合物) 含有アセトニトリルを添加して vortex し, 反応を停止させた. 検量線試料は化合物を添加していない肝細胞懸濁液に化合物溶液を添加し, 内標準物質 (自社化合物) 含有アセトニトリルを添加し vortex して調製した. 代謝安定性試料および検量線試料を遠心して上清を別の容器に移し, LC-MS/MS (Prominence UFLCXR, Shimadzu, Kyoto, Japan, and API5000, AB SCIEX, Framingham, MA) で測定した.

I-2-v) 肝取り込み試験

化合物溶液は, diflunisal, montelukast, cerivastatin, telmisartan および fluvastatin をそれぞれ DMSO で溶解して等量混和し, 各化合物あたり 200 および 10 $\mu\text{mol/L}$ (肝細胞懸濁液中化合物濃度は, 緩衝液懸濁法においては各化合物あたり 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 血清懸濁法においては各化合物あたり 2 $\mu\text{mol/L}$. 化合物濃度は測定の検出限界を考慮して設定した) となるよう調製した. また, diflunisal, montelukast, cerivastatin, ONO-A, ONO-B, ONO-C, ONO-D, ONO-E および ONO-F をそれぞれ DMSO で溶解して等量混和し, 各化合物あたり 200 $\mu\text{mol/L}$ (血清懸濁肝細胞反応液中化合物濃度は各化合物あたり 2 $\mu\text{mol/L}$. 化合物濃度は測定の検出限界を考慮して設定した) となるよう調製した. Hanks' 緩衝液 (20 mmol/L HEPES, pH 7.4) は, 500mL の HBSS に, 1 mol/L HEPES を 10 mL 加え, 2 mol/L NaOH を用いて pH 7.4 に調整することで調製した. シリコンレイヤーチューブは, 0.4 ml Microcentrifuge Tube に 1 mol/L スクロースを 50 μL 入れ, その上からシリコンレイヤーオイル (Silicone oil (high temperature) / Mineral oil (heavy) = 81.7 / 18.3, v/v) 100 μL を重層して調製した. 氷上で凍結肝細胞を融解して Hepatocyte isolation kit を用いて精製し, 緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み試験においては Hanks' 緩衝液, 血清懸濁肝細胞を用いた取り込み試験においては血清を加えて, 生細胞数 1.0×10^6 cells/mL となるように細胞懸濁液を調製した. 37°C で 5 分間プレインキュベーションした肝細胞懸濁液 0.5 mL に化合物溶液 5 μL を添加 (DMSO 最終濃度 1%) し, 緩

やかに vortex して反応開始した。反応開始後、緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み試験においては 0.5, 1 および 3 分後に、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み試験においては 1, 3 および 10 分後に 100 μ L サンプリングし、シリコンレイヤーチューブに慎重に添加した。ただちにエッペンドルフミニスピンプラスを用いて 14500 rpm で 1 分間遠心し、ドライアイスで凍結した。検量線調製用試料として、化合物非添加の肝細胞懸濁液 100 μ L をシリコンレイヤーチューブに慎重に添加し、エッペンドルフミニスピンプラスを用いて 14500 rpm で 1 分間遠心し、ドライアイスで凍結した。取り込み試験検体およびブランク試料について、ハサミを用いてオイル部分でチューブをカットし、下層、上層それぞれをチューブ切片と共に 200 μ L (下層) もしくは 1 mL (上層) の内標準物質 (自社化合物) 含有メタノール溶液を加えた 1.5 mL 容器に添加した。検量線用ブランク試料には化合物溶液を添加した。ピペッティングにより細胞ペレットを破碎し、vortex した。卓上遠心機で 13000 rpm で 3 分遠心後、上清を 96 well plate に移し、LC-MS/MS (Prominence UFLCXR, Shimadzu, Kyoto, Japan, and API5000, AB SCIEX, Framingham, MA) で測定した。

I-2-vi) データ解析

I-2-vi-a) 血中動態試験データ解析

薬物動態パラメータは PhoenixTM WinNonlin[®] 6.1 (Pharsight, Mountain View, CA) を用いてノンコンパートメント解析により算出した。

I-2-vi-a) 予測肝 CL の算出

代謝固有 CL ($CL_{int,met,in vitro}$, mL/min/kg) は以下の式により算出した。

$$CL_{int,met,in vitro} = k_e / \text{肝細胞数(cells/mL)} \cdot \text{肝臓 1g 当たりの肝細胞数(cells/g liver)} \cdot \text{体重 1 kg 当たりの肝重量(g/kg body weight)} / f_{u,inc,hep}$$

この式において k_e は消失速度定数 (1/min) であり、肝細胞中代謝安定性試験における代謝

反応時間 0~120 分の薬物の残存率より算出した。 $f_{u,inc,hep}$ は緩衝液懸濁肝細胞溶液 (1×10^6 cells/mL) における緩衝液中フリー体分率であり、緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み試験における化合物添加 30 秒後のシリコンレイヤータンク遠心後の上層中の化合物濃度を化合物添加理論値で除した値を用いた。ヒト肝臓 1g 当たりの肝細胞数として 1.2×10^8 cells/g (Iwatsubo et al., 1997), ヒト体重 1 kg 当たりの肝重量として 25.7 g/kg body weight (Davies & Morris 1993)を用いた

肝取り込み固有 CL ($CL_{int,uptake,in vitro}$, mL/min/kg) は以下の式により算出した。

$CL_{int,uptake,in vitro} = \text{Uptake CL (mL/min/10}^6 \text{ cells)} / \text{肝細胞数}(10^6 \text{ cells}) \cdot \text{肝臓 1g 当たりの肝細胞数(cells/g liver)} \cdot \text{体重 1 kg 当たりの肝重量(g/kg body weight)}$

この式において、Uptake CL (mL/min/10⁶ cells) は、肝細胞懸濁液へ化合物添加後の各時点における細胞側濃度を、緩衝液懸濁法においては化合物添加 30 秒後のシリコンレイヤータンク遠心後上層中の化合物濃度、血清懸濁法では化合物添加濃度理論値で除することで uptake volume (mL/10⁶ cells) を算出し、さらにインキュベーション時間 (min) で除することで算出した。Uptake CL は初期取り込み速度評価に適した 2 時点を用いて算出した。ラット、サルおよびヒトの肝臓 1g 当たりの肝細胞数としてそれぞれ 1.25×10^8 (Watanabe et al., 2009b), 1.20×10^8 (de Bruyn et al., 2018) および 1.20×10^8 (Iwatsubo et al., 1997; Watanabe et al., 2011) cells/g liver を用い、モルモットはラットと同じ値を用いた。ラット、サルおよびヒトの体重 1 kg 当たりの肝重量として 40.0, 30.0 および 25.7 g/kg body weight を用い (Davies & Morris 1993), モルモットはラットと同じ値を用いた。 *In vivo* 血漿 CL ($CL_{h,predicted}$, 代謝 CL については $CL_{h,met,predicted}$, 取り込み CL については $CL_{h,uptake,predicted}$) は Naritomi らの報告に従い、dispersion model を用いて算出した (Naritomi et al., 2001).

$$CL_{h,predicted} = Q_h (1 - F_h) \cdot R_b$$

$$F_h = \frac{4a}{(1+a)^2 \exp\{(a-1)/2D_N\} - (1-a)^2 \exp\{-(a+1)/2D_N\}}$$

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

$$R_N = (f_{u,p} / R_b) \cdot CL_{int,vitro} / Q_h$$

$$D_N = 0.17$$

この式において、 Q_h は肝血流量であり、ラット、サルおよびヒトの Q_h は55.2, 43.6および20.7 mL/min/kgを用い(Davies & Morris 1993), モルモットはラットと同じ値を用いた。 F_h は肝通過率, R_N は efficiency number, D_N は dispersion number を表した。 $CL_{int,vitro}$ は肝細胞代謝安定性試験においては $CL_{int,met,in vitro}$, 肝取り込み試験においては $CL_{int,uptake,in vitro}$ を用いた。

Diflunisal, montelukast, cerivastatin, telmisartan および fluvastatin のヒト血漿中フリー体分率 ($f_{u,p}$) および全身クリアランス (CL_{tot}) は文献より引用した(Obach et al., 2008). 血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価においては $CL_{int,uptake,in vitro}$ にフリー体分率がすでに加味されているため, dispersion model による計算において $f_{u,p}$ は 1 とした。 R_b は 0.6 と仮定した。

第3節 結果

Diflunisal, montelukast, cerivastatin, telmisartan および fluvastatin の ACD/LogD により計算された LogD (ph 7.4)は montelukast および telmisartan でそれぞれ 3.2 および 3.5 であり, diflunisal, cerivastatin および fluvastatin のそれぞれ 0.51, 0.071 および 1.5 に比べ高い値であった (Table I-1). 緩衝液懸濁ヒト肝細胞を用いた取り込み試験において測定された, 化合物を肝細胞懸濁液に添加して 30 秒後における緩衝液中フリー体分率 ($f_{u,inc,hep}$) は montelukast および telmisartan でそれぞれ 0.603 および 0.565 であり, diflunisal, cerivastatin および fluvastatin のそれぞれ 0.798, 0.718 および 0.778 に比べ低い値であった (Table I-1). Montelukast, cerivastatin, telmisartan および fluvastatin のヒト肝細胞を用いた代謝安定性試験より予測したヒト肝 CL はそれぞれ 0.00276, 0.00802, 0.00987, および 0.358 mL/min/kg であり (Table I-1), ヒト CL_{tot} の 0.10, 0.68, 2.9, 8.4 および 16 mL/min/kg (Obach et al., 2008) に比べ 1/45~1/851

と大幅に小さい値であった (Figure I-2 A). Diflunisal については今回の試験条件では消失が認められずヒト肝 CL を算出できなかった. 一方, 緩衝液懸濁ヒト肝細胞を用いた取り込み試験より予測したヒト肝 CL はそれぞれ 0.369, 0.0642, 3.18, 4.92 および 2.16 mL/min/kg であり (Table I-1), 代謝安定性試験より求めた予測肝 CL に比べ, いずれの薬物もヒト CL_{tot} に近い値を示したが, 脂溶性の高い montelukast の予測肝 CL は CL_{tot} の 1/11 の値であり, 依然として大きく過小評価していた (Figure I-2 B). そこで今回考案した血清懸濁ヒト肝細胞を用いた取り込み試験を実施したところ, 予測ヒト肝 CL はそれぞれ 0.287, 0.172, 1.66, 7.56 および 1.26 mL/min/kg であり (Table I-1), 脂溶性の高い montelukast および telmisartan の予測肝 CL は CL_{tot} のそれぞれ 1/4.0 および 1/1.1 と緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み試験に比べ CL_{tot} により近い値を示した (Figure I-2 C).

Table I-1 Chemical properties and values of *in vivo* total clearance (CL_{tot}) reported and *in vitro* hepatic clearance ($CL_{h,met,predicted}$) and uptake ($CL_{h,uptake,predicted}$) determined using human hepatocytes in the absence and presence of human sera of the 5 drugs.

	Molecular weight	f_u^a	LogD (pH 7.4)	$f_{u,inc,hep}^b$	CL_{tot}^a (mL/min/kg)	$CL_{h,met,predicted}^b$ (mL/min/kg)	$CL_{h,uptake,predicted}$ (mL/min/kg) ^b	
							Conventional	Serum suspension
Diflunisal	250	0.0016	0.51	0.798	0.10	not calculated	0.369	0.287
Montelukast	585	0.0020	3.2	0.603	0.68	0.00276	0.0642	0.172
Cerivastatin	460	0.010	0.071	0.718	2.9	0.00802	3.18	1.66
Telmisartan	515	0.0040	3.5	0.565	8.4	0.00987	4.92	7.56
Fluvastatin	411	0.0079	1.5	0.778	16	0.358	2.16	1.26

^a Plasma unbound fraction ($f_{u,p}$) and total clearance (CL_{tot}) values were taken from literature (Obach et al., 2008).

^b Human hepatocyte unbound fraction ($f_{u,inc,hep}$), $CL_{h,met,predicted}$, and $CL_{h,uptake,predicted}$ suspended in buffer (conventional) or human sera (serum suspension) values were determined in duplicate.

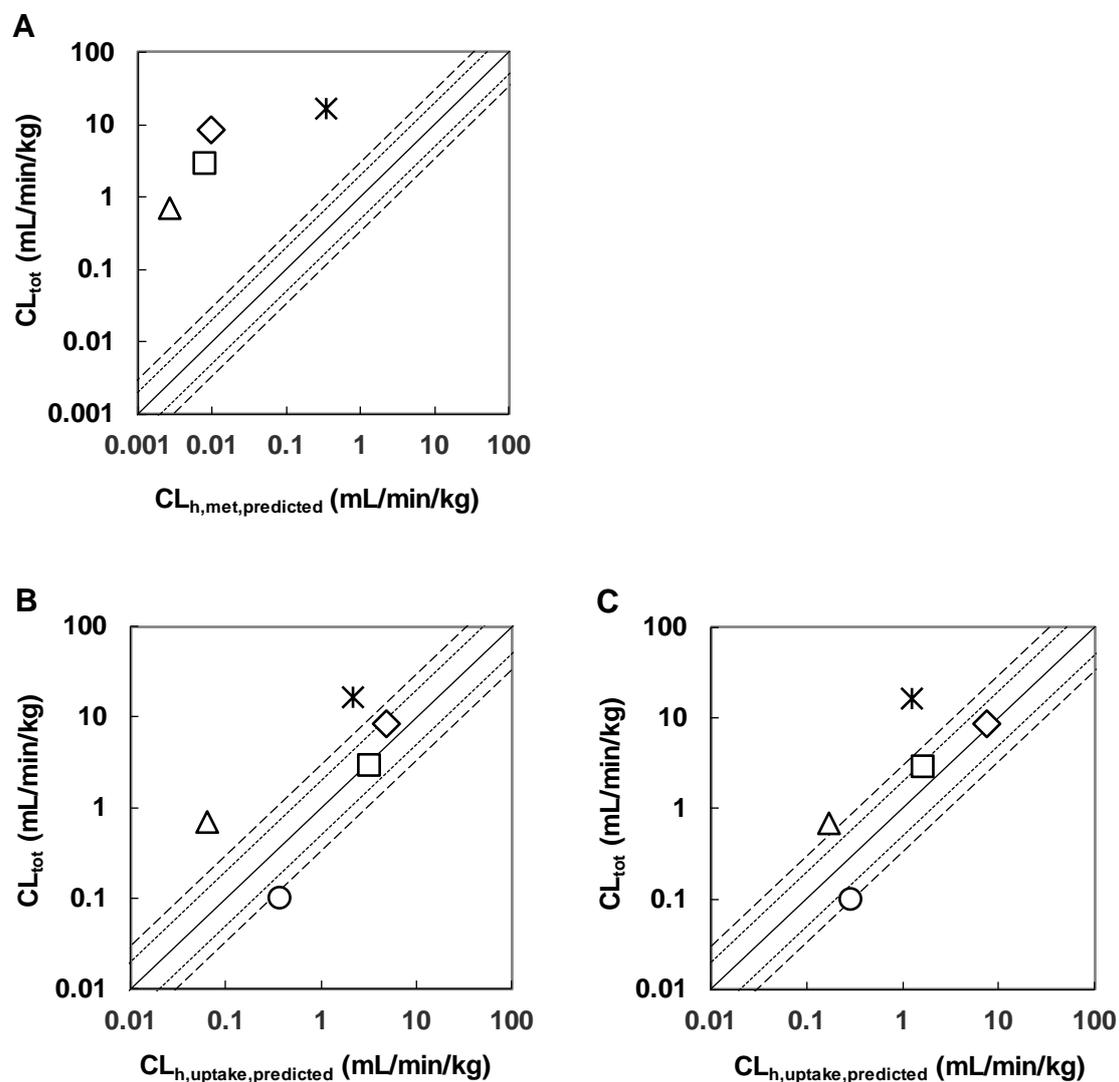


Figure I-2 Comparison of observed human CL_{tot} values with hepatic clearance values predicted from *in vitro* hepatic clearance with human hepatocytes (A) and uptake using hepatocytes in the absence (B) and presence of human sera (C).

Plots indicate results for diflunisal (circles), montelukast (triangles), cericastatin (squares), telmisartan (diamonds), and fluvastatin (asterisks). Data represent mean values in duplicate. Solid line, dotted line, and dashed line represent unity, two-times and three-times differences, respectively.

次に、pH 7.4 における LogD 計算値が 3.4~4.7 と脂溶性が高く高蛋白結合率である自社化合物について、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価により予測肝 CL を算出し、それぞれの *in vivo* 血中動態試験より得られたラット、モルモットおよびサルの CL_{tot} と比較した (Table I-2 および Figure I-3)。血中動態試験により算出された自社化合物の CL_{tot} は、ラットで 0.294~1.01, モルモットで 0.580~3.90, サルで 1.18~6.77 mL/min/kg であった (Table I-2)。ラット、モルモットおよびサルの血清および肝細胞を用いた血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価により算出した自社化合物の予測肝 CL はそれぞれ 0.499~0.96, 1.09~3.39 および 1.08~6.70 mL/min/kg であり、同時に評価した diflunisal, montelukast および cerivastatin を含め、サルにおける montelukast が 1/5.8 である以外、いずれも CL_{tot} の 3 倍以内の予測精度であった (Table I-2 および Figure I-3)。

Table I-2 Chemical properties and values of *in vivo* total clearance (CL_{tot}) and *in vitro* hepatic uptake ($CL_{h,uptake,predicted}$) determined using hepatocytes of rats, guinea pigs, and monkeys in the presence of sera of the nine drugs.

Compound	Molecular weight	LogD (pH 7.4)	CL_{tot} (mL/min/kg) ^a			$CL_{h,uptake,predicted}$ (mL/min/kg) ^b		
			Rat	Guinea pig	Monkey	Rat	Guinea pig	Monkey
ONO-A	584	3.9	0.294	0.580	1.28	0.547	1.09	1.08
ONO-B	618	4.6	0.308	2.52	1.47	0.499	3.39	1.52
ONO-C	624	3.5	0.425	0.706	2.17	0.667	1.29	1.78
ONO-D	600	4.7	0.484	1.04	1.18	0.96	1.68	1.16
ONO-E	642	3.4	1.01	1.60	3.10	0.705	2.09	2.54
ONO-F	668	3.5	NT	3.90	6.77	not tested	3.32	6.70
Diflunisal	250	0.51	1.73	not available	not available	0.762	not tested	not tested
Montelukast	585	3.2	15.0	1.00	2.30	6.59	0.473	0.399
Cerivastatin	460	0.071	27.0	not available	not available	25.6	not tested	not tested

^a Each data represents mean value in triplicate, except for rat CL_{tot} values of diflunisal and cerivastatin taken from literature (Lin et al., 1985; Watanabe et al., 2009a).

^b Data represent mean values in duplicate for rats and monkeys and in triplicate for guinea pigs.

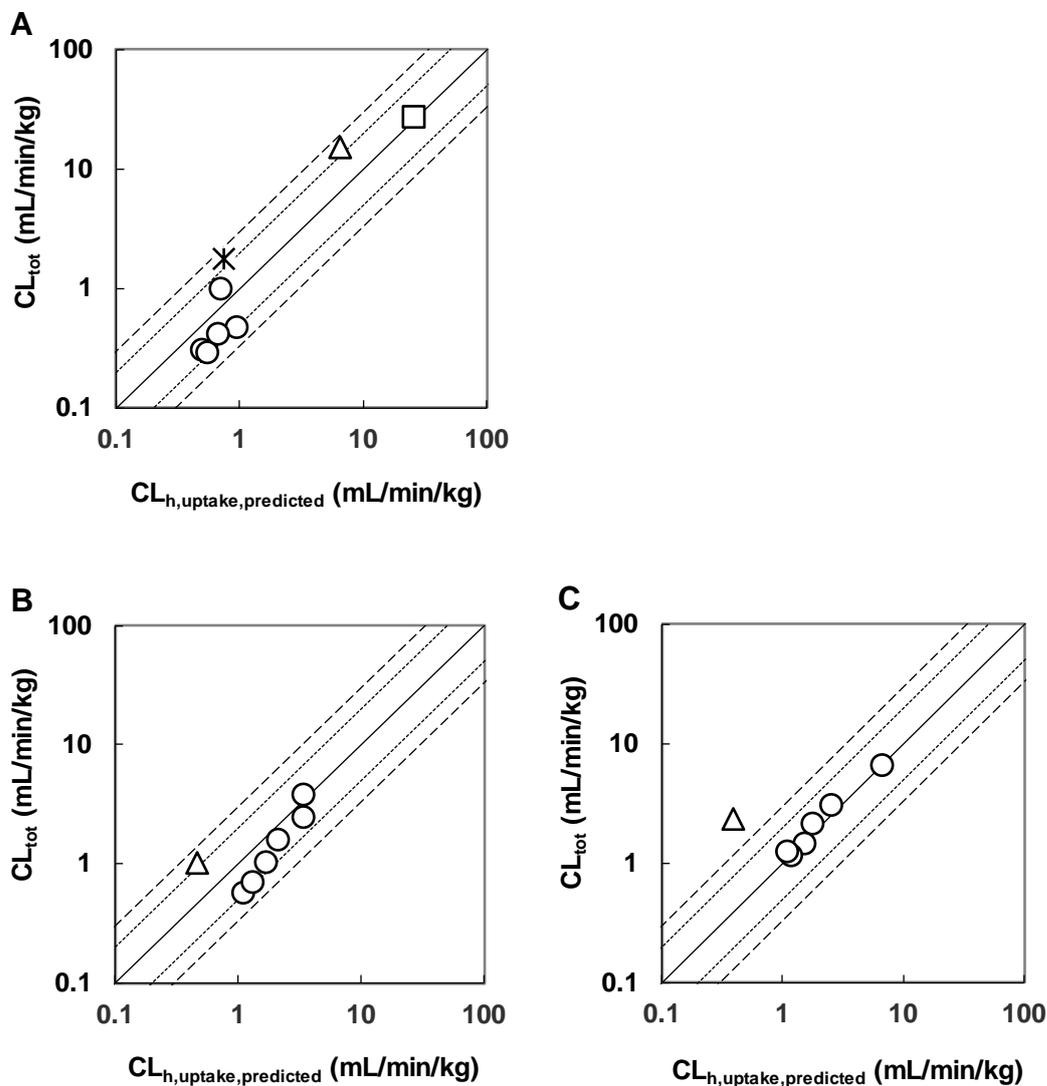


Figure I-3 Comparison of observed CL_{tot} values with hepatic clearance values predicted from hepatic uptake using hepatocytes of rats (A), guinea pigs (B) and monkeys (C) in the presence of corresponding sera.

Plots indicate diflunisal (asterisks), montelukas (triangles), cericastatin (squares), and five (rats) or six (guinea pigs and monkeys) ONO compounds (circles). Data represent mean values in duplicate for rats and monkeys and in triplicate for guinea pigs. Solid, dotted, and dashed lines represent unity, two-times, and three-times differences, respectively.

第4節 考察

高脂溶性・高蛋白結合率化合物について体内動態を予測するのに緩衝液懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価を行う上で、i) 化合物の細胞表面や容器への吸着により正確な取り込み速度の算出が困難、ii) 別途血漿（または血清）蛋白結合率測定が必要であるが、試験容器や測定感度の問題から測定が困難、iii) 緩衝液懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価における緩衝液中の化合物フリー体濃度を測定する必要があるため、i) ～iii) の3種類の評価が必要となりスループットが低いことなどの課題がある。緩衝液懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価においては、細胞表面や試験容器への吸着防止のために、緩衝液中にヒト血清アルブミン添加を添加して取り込み評価がなされている(Ishiguro et al., 2006)。また、酸性化合物で血漿蛋白結合率が高い場合、化合物の肝細胞への取り込みがフリー体理論に従わず、血清アルブミンにより化合物の肝取り込みが促進され、血清中フリー体分率以上に化合物が肝臓へ取り込まれる可能性が示唆されている(Baker & Parton 2007; Burczynski et al., 2001; Miyauchi et al., 2018)。肝取り込み試験における緩衝液中に血漿中と同じ濃度の血清アルブミンを添加することで反応液中フリー体分率と血漿中フリー体分率が等しくなるのであれば、別途血漿蛋白結合率および緩衝液懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価における緩衝液中化合物フリー体濃度を測定する必要はないが、血漿中には、化合物との結合に関与する蛋白質として、血清アルブミン以外に $\alpha 1$ 酸性糖蛋白やリポタンパク質、免疫グロブリンなどが存在する。酸性化合物は主に血清アルブミンに結合するが、高脂溶性・高蛋白結合率の酸性化合物は、化合物によっては血清アルブミン以外にも結合する(Colussi et al., 1999)。また、血清アルブミン以外による化合物の肝取り込みに及ぼす影響については報告がなく、可能性は否定できない。したがって、アルブミン以外の蛋白が共存している状況、すなわち *in vivo* を反映した状況における化合物の肝取り込み速度を算出するには、血清アルブミンではなく、血清そのものを用いることが最適であると考え、血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価を考案した。本血清懸濁法では、血清で肝細胞を懸濁させているため別途血漿蛋白結

合率を測定する必要がなく、また、緩衝液懸濁法と異なり高脂溶性化合物の細胞表面や試験容器への吸着が防がれることにより、特に高蛋白結合率化合物については肝取り込み試験において血清中の化合物濃度の減少はほとんど認められないため濃度測定が不要である。このように、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価は、細胞表面や容器への吸着を防ぎ、緩衝液懸濁法に比べ評価項目が少ないためスループットが高く、*in vivo* の状況を反映し精度良く肝取り込み CL を予測し得る可能性があると考えられた。

そこで本検討では、血漿蛋白結合率が 99%以上と高く脂溶性の低い diflunisal, cerivastatin および fluvastatin と、脂溶性の高い montelukast および telmisartan を検証薬物として、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価について緩衝液懸濁法との比較検討を行った。Cerivastatin はヒトにおいて尿中に未変化体として排泄されず、主な消失経路は肝代謝であることが報告されている(Muck 2000)。Fluvastatin はヒトにおいて代謝され、主に胆汁および糞中に排泄される(Tse et al., 1992)。[¹⁴C]montelukast をヒトに経口投与した場合、放射活性の大部分は糞中に排泄され、尿中には 0.2%以下しか排泄されない(Balani et al., 1997)。[¹¹C]telmisartan を用いたヒト全身 PET 試験において、静脈内投与後の大部分の放射活性は速やかに肝臓に取り込まれ、尿中に排泄される割合は 1.5%である(Shimizu et al., 2012)。Diflunisal は一部腎ミクロソームで代謝されるものの、主にヒト肝臓でグルクロン酸抱合代謝を受け(Brunelle & Verbeeck 1996; Cappiello et al., 1991)、ヒトに経口投与後、投与された 78%が主代謝物であるグルクロン酸抱合体として尿中に排泄される(Addison et al., 2000)。このように、diflunisal, cerivastatin, fluvastatin, montelukast および telmisartan の消失経路は肝臓であると考えられたことから、本研究では CL_{tot} は肝 CL に等しいと仮定し、肝代謝試験および肝取り込み試験より算出した *in vivo* CL を CL_{tot} と比較し、その予測精度を比較した。緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み評価における緩衝液中薬物濃度を測定したところ、脂溶性の高い montelukast と telmisartan は緩衝液中フリー体分率が他の薬物より低いことから、細胞表面や容器への吸着が大きいと考えられた (Table I-1)。肝細胞代謝安定性評価により予測され

た肝 CL は、緩衝液懸濁肝細胞および血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価による予測肝 CL に比べて CL_{tot} を大きく過小評価したことから、これらの薬物の肝消失は肝取り込み律速であると考えられた。一方、緩衝液懸濁肝細胞および血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価を実施したところ、両方法から予測された肝 CL は montelukast 以外いずれも 2 倍未満の差であったが、脂溶性の高い montelukast および telmisartan の血清懸濁法による予測 CL は緩衝液懸濁法に比べ CL_{tot} に近い値を示した。血清懸濁法により CL 予測精度が向上した一つの要因として、細胞や試験容器への吸着が防がれたことにより正確な肝取り込み速度が算出できた可能性が考えられた。他にも、脂溶性が高いほどフリー体理論に従わない可能性や、試験容器への吸着により血漿蛋白結合率の測定精度が低い可能性などの要因も考えられ、それらのいずれか、もしくは複合的な要因が血清懸濁法では改善されたことにより CL 予測精度が向上した可能性が考えられた。以上より、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価は簡便でスループットが高く、脂溶性の低い薬物にも適応でき、脂溶性の高い薬物については肝 CL 予測性を向上させる可能性のある評価系であることが示唆された。なお、緩衝液懸濁肝細胞および血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価により算出した fluvastatin の予測 CL は、いずれも CL_{tot} の 1/7 以下の値であった。緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み評価による fluvastatin の予測肝取り込み CL の過小評価は Watanabe らによっても報告されており、ラットにおける *in vivo* 肝取り込み CL を *in vitro* 肝取り込み評価により算出した肝取り込み CL で除することでスケールリングファクター (SF) を算出し、SF をヒト *in vitro* 肝取り込み CL に乗ずることで *in vivo* 肝取り込み CL を精度良く予測している (Watanabe et al., 2010)。SF は化合物ごとに異なる値を示しており、ヒトにおける肝取り込み CL を予測する際には、今回の社内化合物における検討のように動物における IVIVE を実施し、予測肝 CL と実測肝 CL の相関性を確認することが重要であり、予測肝 CL と実測肝 CL に乖離が認められる場合には、SF を算出しヒト肝 CL を予測することが重要であると考えられた。

本評価系の有用性をさらに示すため、これまで高脂溶性のため容器への吸着や測定感度

の問題から血漿蛋白結合率を測定できず（定量下限より 99.97%以上と算出），*in vitro* によるヒト CL 予測ができなかった社内プロジェクトの化合物群について，血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価によりヒト CL を予測した．これら化合物の同一プロジェクト内の類似化合物について，SD ラットおよびカニクイザルに静脈内投与したところ，尿中に未変化体は検出されなかったことから，本研究においては，ラット，モルモットおよびサルにおいて，それら社内化合物の CL_{tot} は肝 CL に等しいと仮定した．ラット，モルモットおよびサルの血清および肝細胞を用いて血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価を実施し，*in vivo* CL の予測精度を検証した結果，いずれの動物においても本血清懸濁法により *in vivo* CL を精度良く予測することができた（Table I-3 および Figure I-3）．このように，本血清懸濁法はヒトだけでなくラット，モルモットおよびサルにおいても *in vivo* CL 予測の上で有用であることが示された．これらのことから，本化合物群について血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価によりヒト CL 予測が可能であると判断し，血清懸濁ヒト肝細胞を用いた取り込み評価により，高いヒト血漿中濃度が期待される化合物を選択することができた．

第 5 節 小括

簡便でスループットが高く，脂溶性の低い化合物にも適応でき，高脂溶性・高蛋白結合率化合物については，従来法である緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み評価に比べ肝取り込み CL 予測精度が高いことが示唆される，血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価系を構築した．以上のことから，高齢者血漿中濃度予測に重要な肝取り込みに及ぼす加齢の影響を検討するための基盤を構築することができた．今後，若齢者および高齢者の血清および肝細胞を用いた肝取り込み評価を実施することで，肝取り込みに及ぼす加齢の影響を検討することが可能になると考えられる．

第 II 章 サルおよびイヌにおける加齢による生理学的パラメータの変動

第 1 節 緒言

多くの国で高齢者人口比率は増え続けており、様々な疾患の罹患率も上昇している。高齢者は多くの薬剤を服用するが、加齢に伴い生理学的パラメータが変化し、薬剤の血漿中濃度推移も変動する(Corsonello et al., 2010; Klotz 2009; McLachlan & Pont 2012)。一般的に、加齢に伴い胃内 pH は上昇し、また、体脂肪率が増加することにより脂溶性薬物の分布容積は増大する。血漿中のアルブミン濃度は減少し、逆に α_1 酸性糖蛋白質濃度は増加する。肝臓における薬物代謝活性や肝血流量は減少し、薬剤の CL は減少する。腎血流量と糸球体濾過量も減少することで、腎排泄される薬剤の CL も減少する。これらの加齢に伴う血漿中濃度の変化は、薬効の変化や副作用を引き起こす可能性がある。これらのリスクを低下させるために、開発候補化合物の高齢者血漿中濃度を予測することは医薬品開発の上で極めて重要である。サルおよびイヌなどに開発候補化合物を投与して経時的に採血し血漿中濃度を測定する *in vivo* 血中動態試験がヒト血漿中濃度予測を行う上で重要であるが、老齢動物がヒトにおける加齢の影響を反映するかの情報がなく、老齢動物を用いた *in vivo* 薬物血中動態試験による高齢者血漿中濃度予測ができないことが大きな課題である。そこで本研究では、老齢カニクイザルおよびビーグル犬が、ヒトにおける加齢による種々生理学的パラメータ変動を反映するか、すなわち高齢者血漿中濃度予測モデル動物として有用であるかを確認するため、各種生理学的パラメータの指標となる薬物を用いて、若齢および老齢のサルおよびイヌにおける血中動態試験を実施した。若齢および老齢イヌとしてそれぞれ 2 歳齢および 11 歳齢を用いた。ビーグル犬の典型的寿命が 12.9 年(Horiuchi 2003)であること、日本人男性の平均寿命が 80.98 歳（平成 28 年簡易生命表の概況。厚生労働省）であることから、寿命に対し比例計算すると、若齢および老齢イヌはヒトではそれぞれおよそ 13~19 歳および 69~75 歳に相当すると考えられる。若齢および老齢サルとしてそれぞれ 3 歳齢お

よび 14~18 歳齢を用いた。カニクイザルの寿命は 15~30 年と言われているが明確でないため、ヒトの年齢との対応は、Hood の報告における若年期におけるサルおよびヒトの年齢の関係性から比例計算した(Hood 2006)。その結果、今回用いた若齢および老齢サルはヒトではそれぞれおよそ 12~16 歳および 56~76 歳に相当すると考えられる。指標薬物として、acetaminophen, antipyrine, diazepam, diphenhydramine および ofloxacin を選択した。ヒトにおいて、acetaminophen は胃からは吸収されず、小腸から速やかに吸収されるため、胃排出速度のマーカーとして使用されている(Heading et al., 1973; Petring & Flachs 1990)。ヒトと同様に、サルおよびイヌにおいても acetaminophen は同じ目的で指標薬物として使用されている(Ikegami et al., 2003; Mizuta et al., 1990a; Mizuta et al., 1990b)。Antipyrine のヒトにおける代謝には少なくとも 6 種類の肝 P450 (CYPIA2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 および 3A4) が関与しており、ヒトの肝機能検査における酸化的肝代謝活性の評価に使用されている(Engel et al., 1996)。サルおよびイヌにおける antipyrine の全身 CL は肝 CL を反映しており(Vickers et al., 1989)、両動物種においても肝代謝能を評価する指標薬物として使用されている(Balani et al., 2002; Branch et al., 1974)。さらに、antipyrine はヒトや多くの動物種において体水分率と同程度に体内分布するため、ヒト、サルおよびイヌにおいて体水分率のマーカーとして使用されている(Soberman et al., 1949; Soberman 1950)。Diphenhydramine はサルおよびイヌにおける代謝が肝血流律速である薬物として選択した。Diphenhydramine は CYP2D6, 1A2, 2C9 および 2C19 を含むいくつかのヒト肝 P450 により代謝される(Akutsu et al., 2007)。ヒト、サルおよびイヌに投与された diphenhydramine は最大で 85%が代謝物である diphenylmethoxyacetic acid および diphenhydramine *N*-oxide に変換される(Chang et al., 1974; Drach & Howell 1968; Drach et al., 1970)。雄性アカゲザルおよびビーグル犬に diphenhydramine を静脈内投与した時の血漿中濃度(Drach et al., 1970)および雄性カニクイザルおよびビーグル犬の血液/血漿中濃度比 (R_b) (それぞれ 1.06 および 1.46。社内予備検討結果) より算出した血液 CL はそれぞれ 39 および 53 mL/min/kg であり、肝血流量に比べ高

い値である。Diazepamは高脂溶性薬物であり，体脂肪率(Kumana et al., 1987)および年齢(Klotz et al., 1975)の増加に応じた V_{ss} の増加と血漿中 $t_{1/2}$ の延長がヒトにおいて認められている。また，ヒトと類似した diazepam の二相性の血漿中濃度推移がサルおよびイヌにおいても認められている(Curry et al., 1977; Klotz et al., 1976)。Ofloxacin は腎排泄型の薬物であり，ヒトにおいて加齢により CL が低下する(Molinario et al., 1992)。同様に，ヒトと同様，サルおよびイヌにおいても未変化体として腎排泄される(Okazaki 1984; Sudo et al., 1984)。これらの指標薬物の若齢および老齢サルおよびイヌにおける血中動態パラメータを若齢と老齢で比較し，また各動物の胃内 pH，血漿中アルブミン濃度および薬物の蛋白結合率を測定し，種々生理学的パラメータに及ぼす加齢の影響をヒトのそれと比較した。

第2節 実験材料および方法

II-2-i) 試薬

Acetaminophen, antipyrine および diphenhydramine hydrochloride は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。Diazepam, ofloxacin, acetaminophen (13C2, 15N), antipyrined3, diphenhydramine-d6 hydrochloride, ofloxacin-d8 および desalkylflurazepam were purchased from 和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。WellSolve はセレステ (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬および溶媒は HPLC 用，LC-MS/MS 用もしくは特級品を購入した。

II-2-ii) カニクイザルおよびビーグル犬を用いた血中動態試験

カニクイザルおよびビーグル犬への投与，採血および血漿の採取は NAS 研究所 (Chiba, Japan) で実施した。すべての動物実験計画は NAS 研究所の Institutional Animal Care and Use Committee で承認された。12 頭の雄性カニクイザル (3 歳齢 6 頭および 14 - 18 歳齢 6 頭) および 6 頭の雄性ビーグル犬 (2 歳齢 3 頭および 11 歳齢 3 頭) は GMJ (Hyogo, Japan) より購入した。薬物投与 17 時間前から絶食を施した。飲水は自由飲水とした。投与液は 5 種類

の薬物の混合液として調製した（カセット投与）．経口投与用として Wellsolve／生理食塩水溶液，静脈内投与用として DMSO／5%グルコース溶液に薬物を溶解させて投与液を調製した．投与液中における acetaminophen, antipyrine, diphenhydramine, diazepam および ofloxacin の濃度がそれぞれ 0.2, 0.2, 0.2, 0.04 および 0.2 mg/mL となるよう調製した．調製した投与液を 5 mL/kg の用量で経口投与した．その後 7 日間以上のウォッシュアウト期間後，調製した投与液を 1 mL/kg の用量で静脈内投与した．投与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 および 24 時間後に，ヘパリンナトリウム添加シリンジを用いて約 1 mL ずつ採血した．血液を遠心して血漿を分取し，測定に供するまで -80°C で保存した．

II-2-iii) 血漿中薬物濃度の測定

検量線試料はそれぞれの薬物をブランク血漿に添加することで調製した．50 μ L の採取試料もしくは検量線試料に 20 μ L の内標準物質を添加して混和した後，2 mL のアセトニトリルを添加して混和した．Acetaminophen, antipyrine, diphenhydramine および ofloxacin の内標準物質としてそれぞれの重水素標識体，diazepam の内標準物質として desalkylflurazepam を用いた．遠心後，上清を別の新しい容器に移して蒸発乾固させた後，0.1% ギ酸／アセトニトリル (80:20, v/v) で再溶解させた．薬物濃度は LC-MS/MS (Prominence FLCXR (Shimadzu, Kyoto, Japan) および API4000 (AB SCIEX Framingham, MA)) を用いて測定した．

II-2-iv) 胃内 pH, 血漿アルブミン濃度および血漿蛋白結合率測定

胃内 pH はマイクロ pH ガラス電極を胃内に挿入しデジタル pH 測定器を用いて測定した．血漿アルブミン濃度は Albumin II-HA kit (和光純薬工業) を用い，BCG 法により測定した．5 mL の血漿に BCG 溶液を添加した 1 分後に吸光度を測定し，検量線の吸光度を用いてアルブミン濃度を定量した．血漿蛋白結合率は Rapid Equilibrium Dialysis Device (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いて平衡透析法により測定した．Acetaminophen, antipyrine,

diphenhydramine, diazepam および ofloxacin の混合溶液を添加した各動物の血漿（各薬物あたり最終濃度 300 nmol/L. 最終 DMSO 濃度 1%）を透析膜チャンバーに添加し，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を緩衝液チャンバーに添加した．37°C，80 rpm で 24 時間振とう後，血漿及び PBS を採取し，内標準物質として candesartan を含む acetonitrile/ethanol（80:20, v/v）に添加して混和した．遠心後，上清を新しいチューブに移し，薬物濃度を LC-MS/MS（Prominence UFLCXR（Shimadzu）および API5000（AB SCIEX））を用いて定量した．蛋白結合率は以下の式により算出した．

$$\text{蛋白結合率 (\%)} = (1 - \text{PBS 中薬物濃度} / \text{血漿中薬物濃度}) \times 100$$

II-2-v) 薬物動態データ解析

薬物動態パラメータは血漿中濃度データを用い，Phoenix™ WinNonlin® 6.1（Pharsight, Mountain View, CA）によりノンコンパートメント解析法により算出した．統計的有意性は *t*-test により評価した．

第 3 節 結果

II-3-i) 胃内 pH, 血漿アルブミン濃度および血漿蛋白結合率測定

6 頭ずつの若齢および老齢のサルおよび 3 頭ずつの若齢及び老齢のイヌの胃内 pH を測定した（Table II-1）．若齢および老齢サルの胃内 pH はそれぞれ 2.11～2.51 および 1.28～4.12 であり，若齢および老齢イヌの胃内 pH はそれぞれ 2.50～3.10 および 1.50～4.70 であった．

Table II-1. Gastric pH of young and aged monkeys and dogs.

Animal	Age	Animal No.	pH	Mean	SD	RSD (%)
Monkey	Young	1	2.21	2.24	0.15	6.9
		2	2.51			
		3	2.14			
		4	2.13			
		5	2.11			
		6	2.32			
	Aged	1	1.87	2.34	0.96	41.2
		2	2.02			
		3	1.28			
		4	4.12			
		5	2.31			
		6	2.41			
Dog	Young	1	2.70	2.77	0.31	11.0
		2	3.10			
		3	2.50			
	Aged	1	1.50	3.27	1.63	49.8
		2	3.60			
		3	4.70			

II-3-ii) 血漿アルブミン濃度測定

血漿アルブミン濃度を測定した結果、サルおよびイヌともに血漿アルブミン濃度の年齢による有意な違いは認められなかった (Table II-2).

Table II-2. Concentrations of plasma albumin in young and aged monkeys and dogs.

Animal	<i>n</i>	Age	Plasma albumin conc. (g/L)
Monkey	6	Young	39.3 ± 1.2
	6	Aged	38.8 ± 2.9
Dog	3	Young	29.3 ± 0.6
	3	Aged	29.3 ± 1.2

Each value represents the mean ±S.D.

II-3-iii) 血漿蛋白結合率測定

Acetaminophen, antipyrine, diphenhydramine, diazepam および ofloxacin の血漿蛋白結合率

を測定した結果、イヌにおいては加齢による有意な蛋白結合率の変動は認められなかった。一方、サルでは、antipyrene で若齢および老齢の蛋白結合率はそれぞれ 9.3%および 17.0%であった。Ofloxacin に関しても同様に若齢および老齢でそれぞれ 16.7%および 29.9%となり、年齢による有意な違いが認められた (Table II-3)。Diphenhydramine の蛋白結合率はサルおよびイヌ共に加齢による有意差はなかったが、イヌにおいては若齢の 95%信頼区間を上回る老齢個体が認められた (Figure II-1)。

Table II-3. Protein binding of acetaminophen, antipyrine, diazepam, diphenhydramine and ofloxacin in plasma of young and aged monkeys and dogs.

Animal	Age	n	Protein binding (%)				
			AAP	AP	DZP	DPH	OFX
Monkey	Young	6	18.0 ± 8.6	9.3 ± 6.1	91.6 ± 1.1	87.7 ± 2.7	16.7 ± 6.0
	Aged	6	18.0 ± 3.0	17.0 ± 4.9*	92.2 ± 1.0	89.8 ± 2.0	29.9 ± 6.4**
Dog	Young	3	27.8 ± 6.1	4.5 ± 2.5	93.8 ± 0.8	78.4 ± 1.1	35.4 ± 5.3
	Aged	3	23.8 ± 0.3	3.3 ± 7.9	94.5 ± 0.4	80.5 ± 2.6	27.5 ± 11.6
<hr/>							
Monkey	Young	6	0.820 ± 0.086	0.907 ± 0.061	0.0843 ± 0.0111	0.123 ± 0.027	0.833 ± 0.060
	Aged	6	0.820 ± 0.030	0.830 ± 0.049*	0.0780 ± 0.0103	0.102 ± 0.020	0.701 ± 0.064**
Dog	Young	3	0.722 ± 0.061	0.955 ± 0.025	0.0620 ± 0.0078	0.216 ± 0.011	0.646 ± 0.053
	Aged	3	0.762 ± 0.003	0.967 ± 0.079	0.0550 ± 0.0040	0.195 ± 0.026	0.725 ± 0.116

Each value represents the mean±S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus young group. AAP, acetaminophen; AP, antipyrine; DPH, diphenhydramine; DZP, diazepam; and OFX, ofloxacin; $f_{u,p}$, fraction unbound in plasma.

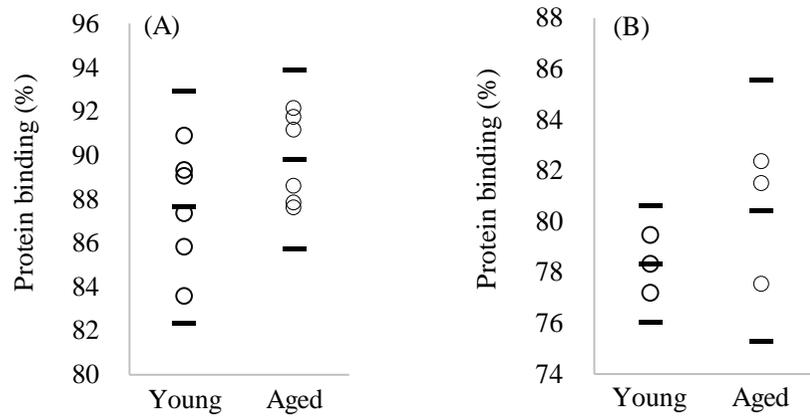


Figure II-1. Individual protein binding data of diphenhydramine of monkeys (A) and dogs (B)

Each circle represents individual protein binding. Top bar, middle bar and bottom bar represent upper limit of 95% confidence interval, mean, and lower limit of 95% confidence interval, respectively.

II-3-iv) 血中動態試験

若齢および老齢のサル(n=6)およびイヌ(n=3)に acetaminophen, antipyrene, diphenhydramine, diazepam および ofloxacin をそれぞれ 1, 1, 1, 0.2 および 1 mg/kg ずつ単回カセット経口投与, また, 0.2, 0.2, 0.2, 0.04 および 0.2 mg/kg ずつ単回カセット静脈内投与した結果, 胃排出速度のマーカである acetaminophen の血中動態パラメータについては, サルにおける $t_{1/2}$ およびイヌにおける C_{max} 以外, T_{max} を含め加齢による影響は認められなかった (Figure II-2 A, Table II-4).

肝代謝機能のマーカである antipyrene については, 静脈内投与した時の CL は老齢サルでは有意に減少した(若齢および老齢でそれぞれ 9.17 および 4.72 mL/min/kg) (Figure II-2 B, Table II-4). また, サルに経口投与した時の AUC は有意に増加し (若齢および老齢でそれぞれ 3290 および 5990 ng·h/mL), $t_{1/2}$ は有意な延長が認められた (若齢および老齢でそれぞれ 2.3 および 3.3 h) (Figure II-2 B, Table II-4). 一方, イヌにおいては薬物動態パラメータの加齢による有意な変動は認められなかったが, CL の個別別プロットにおいて若齢の 95% 信頼区間を下回る老齢個体が 3 例中 1 例認められた (Figure II-4 A). 体内水分量の指標でもある antipyrene のサルにおける V_{ss} は加齢による有意差はなく (Figure II-2 B, Table II-4), 個別別プロットにおいて若齢の 95% 信頼区間を下回る老齢個体も認められなかった (Figure II-4 B). 一方, イヌにおいても加齢による有意差は認められなかったものの, 個別別プロットにおいて若齢の 95% 信頼区間を下回る老齢個体と上回る老齢個体が 3 例中 1 例ずつ確認された (Figure II-4 C).

代謝が肝血流律速である diphenhydramine の若齢サルおよびイヌにおける静脈内投与時の CL は高く (それぞれ 51.8 および 70.1 mL/min/kg), 経口投与時の F は小さかった (それぞれ 3.3 および 7.3%) (Figure II-2 C および II-3 C, Table II-4 および II-5). 老齢サルおよびイヌに静脈内投与した時の CL はそれぞれ 30.9 および 33.8 mL/min/kg であり, 若齢動物に比べ有意に低い値を示した. サルにおいては加齢により有意な $t_{1/2}$ の延長が認められたが (若

齢および老齢でそれぞれ 1.3 および 1.7 h), イヌではその差は有意ではなかった。

脂溶性が高く分布容積の大きい diazepam について, V_{ss} の平均値は若齢サルおよび老齢サルでそれぞれ 909 および 1280 mL/kg, 若齢イヌおよび老齢イヌでそれぞれ 3830 および 8690 mL/kg であり (Figure II-2 D および II-3 D, Table II-4 および II-5), 有意差はなかったが, V_{ss} の個別別プロットにおいて, 若齢の 95%信頼区間を上回る個体が老齢サルでは 6 例中 2 例, 老齢イヌでは 3 例中 1 例認められた (Figure II-4 D および E). Diazepam の CL は若齢サルおよび老齢サルでそれぞれ 24.5 および 17.5 mL/min/kg, 若齢イヌおよび老齢イヌでそれぞれ 53.7 および 35.7 mL/min/kg であり, 両動物種において加齢による有意な CL の減少が認められた (Figure II-2 D および II-3 D, Table II-4 および II-5). 静脈内投与時の $t_{1/2}$ はサルにおいて加齢により有意に延長したが (若齢および老齢でそれぞれ 0.80 および 1.4 h), イヌでは有意差は認められなかった。

腎排泄型薬物である ofloxacin の静脈内投与時の CL は, サルにおいて加齢により有意に減少した (若齢および老齢でそれぞれ 10.9 および 5.96 mL/min/kg) (Figure II-2 E および Table II-4). 静脈内投与時の有意な V_{ss} の減少 (若齢および老齢でそれぞれ 1880 および 1480 mL/Kg) および $t_{1/2}$ 延長 (若齢および老齢でそれぞれ 2.2 および 2.9 h), および経口投与時の AUC の有意な増加もサルにおいて認められた (1900 および 2640 ng·h/mL). 一方, イヌにおける CL は若齢および老齢でそれぞれ 1.54 および 1.07 mL/min/kg であり (Figure II-3 E および Table II-5), 有意差はなかったが, 個別別プロットにおいて若齢イヌの 95%信頼区間を下回る老齢イヌが 3 例中 1 例認められた (Figure II-4 F).

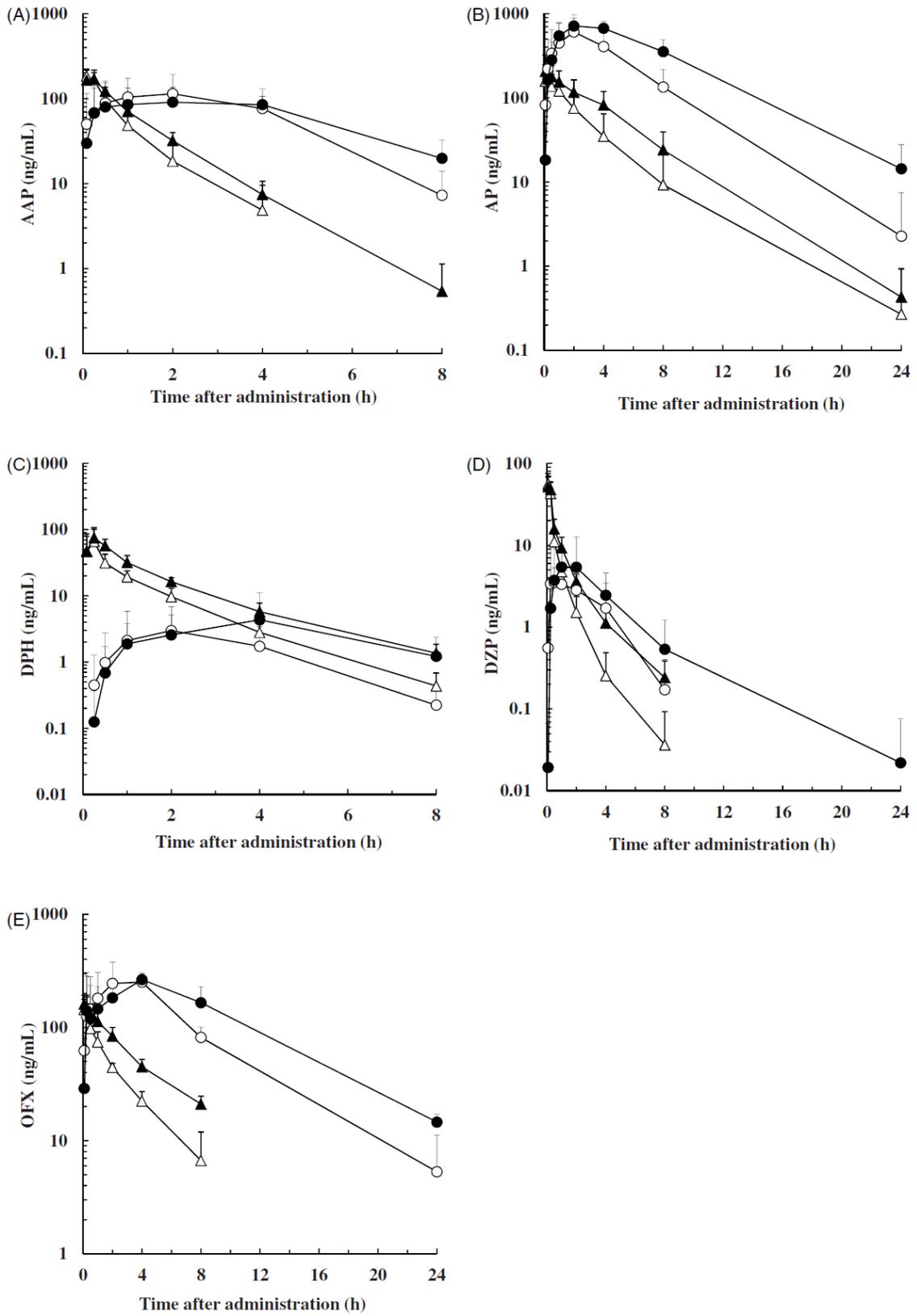


Figure II-2. Plasma concentrations of acetaminophen (A), antipyrine (B), diphenhydramine

(C), diazepam (D) and ofloxacin (E) in young (open triangles and circles) and aged (filled triangles and circles) monkeys after single simultaneous administration intravenously (0.2, 0.2, 0.2, 0.04 and 0.2 mg kg⁻¹, respectively; open and filled triangles) or orally (1, 1, 1, 0.2 and 1mg kg⁻¹, respectively; open and filled circles). Symbols and bars show the mean±SD, *n*=6 for each dosing. AAP, acetaminophen; AP, antipyrine; DPH, diphenhydramine; DZP, diazepam; and OFX, ofloxacin.

Table II-4. Pharmacokinetic parameters of acetaminophen, antipyrine, diphenhydramine, diazepam and ofloxacin in young and aged monkeys after single simultaneous administration intravenously (0.2, 0.2, 0.2, 0.04 and 0.2 mg kg⁻¹, respectively) or orally (1, 1, 1, 0.2 and 1mg kg⁻¹, respectively).

	Route	Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC (ng·h/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (mL/kg)	F (%)
AAP									
Young	i.v.	0.2			0.87 ± 0.15	170 ± 60	21.1 ± 4.9	1200 ± 120	
	p.o.	1	147 ± 65	2.0 (0.25–4.0)	1.1 ± 0.2	499 ± 301			55.7 ± 11.4
Aged	i.v.	0.2			1.0 ± 0.2	220 ± 43	15.7 ± 3.5	1200 ± 170	
	p.o.	1	126 ± 58	2.0 (0.50–4.0)	1.9 ± 0.6*	570 ± 166			51.3 ± 7.7
AP									
Young	i.v.	0.2			1.7 ± 0.9	456 ± 266	9.17 ± 4.28	1200 ± 450	
	p.o.	1	615 ± 275	2.0 (2.0–4.0)	2.3 ± 0.6	3290 ± 2010			152.6 ± 46.7
Aged	i.v.	0.2			2.4 ± 0.8	798 ± 253*	4.72 ± 2.12*	916 ± 288	
	p.o.	1	748 ± 248	3.0 (1.0–4.0)	3.3 ± 0.8*	5990 ± 1790*			152.9 ± 24.8
DPH									
Young	i.v.	0.2			1.3 ± 0.1	67.9 ± 15.9	51.8 ± 14.6	4780 ± 1930	
	p.o.	1	3.14 ± 3.78	3.0 (2.0–4.0)	NC	11.3 ± 12.1			3.3 ± 3.7
Aged	i.v.	0.2			1.7 ± 0.2**	111 ± 18**	30.9 ± 6.1**	3830 ± 1690	
	p.o.	1	4.79 ± 6.49	4.0 (1.0–4.0)	NC	20.6 ± 26.6			3.4 ± 4.1
DZP									
Young	i.v.	0.04			0.80 ± 0.46	27.4 ± 2.4	24.5 ± 2.3	909 ± 379	
	p.o.	0.2	5.36 ± 5.55	1.5 (0.25–4.0)	1.6 ± 0.7	13.5 ± 6.9			10.1 ± 5.5
Aged	i.v.	0.04			1.4 ± 0.4*	39.1 ± 6.5**	17.5 ± 3.0**	1280 ± 470	
	p.o.	0.2	6.98 ± 6.56	0.75 (0.50–2.0)	2.7 ± 0.9	23.8 ± 21.1			11.3 ± 8.4
OFX									
Young	i.v.	0.2			2.2 ± 0.4	313 ± 56	10.9 ± 2.0	1880 ± 260	
	p.o.	1	320 ± 74	3.0 (0.25–4.0)	3.7 ± 1.4	1900 ± 410			121.6 ± 15.7
Aged	i.v.	0.2			2.9 ± 0.2**	574 ± 96**	5.96 ± 1.12**	1480 ± 290*	
	p.o.	1	293 ± 80	4.0 (0.25–8.0)	4.8 ± 0.3	2640 ± 350**			92.8 ± 8.1**

Each value represents the mean ± S.D. of 6 monkeys. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus young group. AAP, acetaminophen; AP, antipyrine; DPH,

diphenhydramine; DZP, diazepam; and OFX, ofloxacin; C_{\max} , maximal observed concentration; T_{\max} , time of maximal observed concentration; $t_{1/2}$, terminal half-life; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, clearance; V_{ss} , steady state volume of distribution; F, oral bioavailability; NC, not calculated.

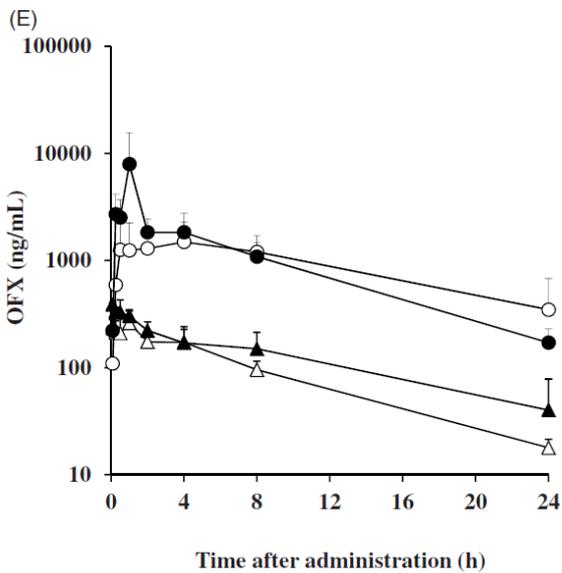
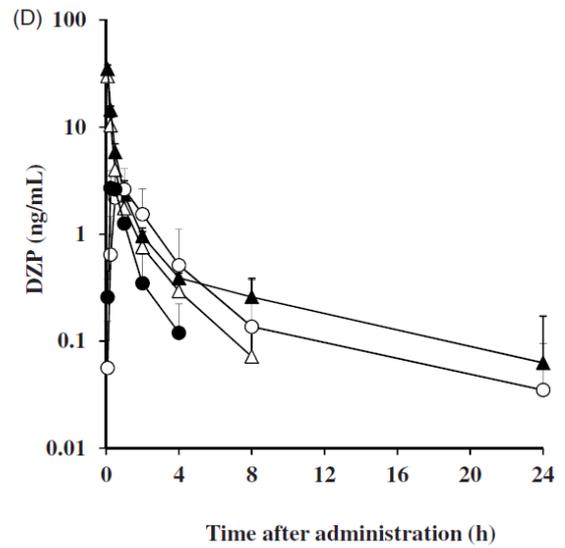
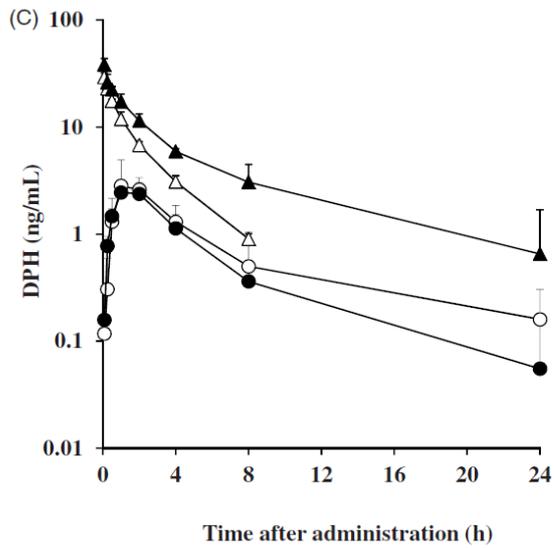
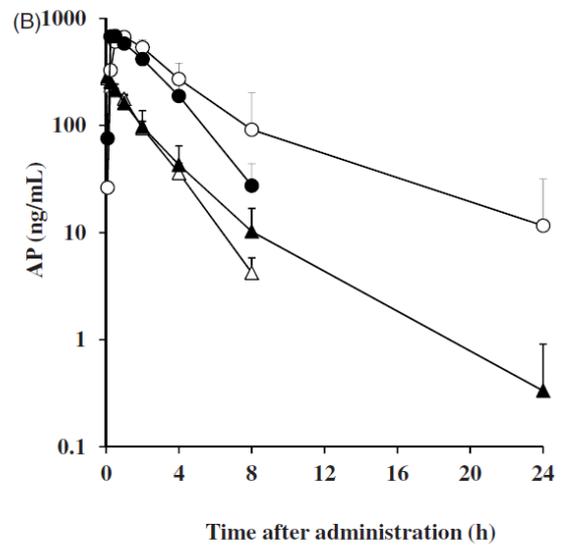
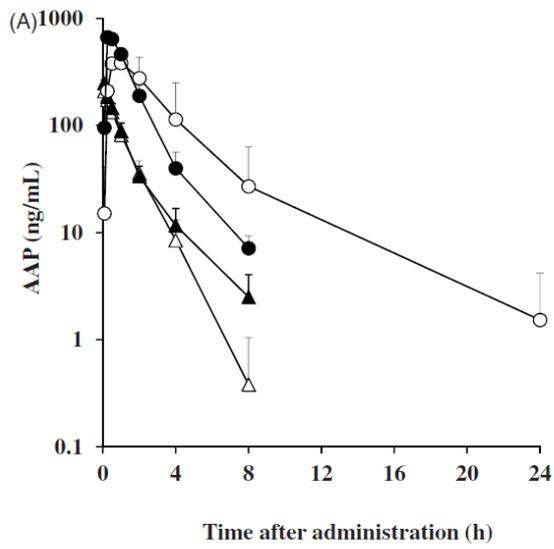


Figure II-3. Plasma concentrations of acetaminophen, (A), antipyrine (B), diphenhydramine (C), diazepam (D) and ofloxacin (E) in young (open triangles and circles) and aged (filled triangles and circles) dogs after single simultaneous administration intravenously (0.2, 0.2, 0.2, 0.04 and 0.2 mg kg⁻¹, respectively; open and filled triangles) or orally (1, 1, 1, 0.2 and 1mg kg⁻¹, respectively; open and filled circles). Symbols and bars show the mean±SD, *n*=3 for each dosing. AAP, acetaminophen; AP, antipyrine; DPH, diphenhydramine; DZP, diazepam; and OFX, ofloxacin.

Table II-5. Pharmacokinetic parameters of acetaminophen, antipyrine, diphenhydramine, diazepam and ofloxacin in young and aged dogs after single simultaneous administration intravenously (0.2, 0.2, 0.2, 0.04 and 0.2 mg kg⁻¹, respectively) or orally (1, 1, 1, 0.2 and 1mg kg⁻¹, respectively).

	Route	Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC (ng·h/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (mL/kg)	F (%)
AAP									
Young	i.v.	0.2			0.94 ± 0.17	260 ± 57	13.2 ± 2.9	900 ± 24	
	p.o.	1	429 ± 65	0.5 (0.50–1.0)	2.3 ± 1.1	1500 ± 1070			108.3 ± 54.9
Aged	i.v.	0.2			1.7 ± 0.6	300 ± 16	11.1 ± 0.6	1040 ± 350	
	p.o.	1	681 ± 49**	0.25 (0.25–0.50)	1.7 ± 0.2	1170 ± 200			77.9 ± 10.3
AP									
Young	i.v.	0.2			1.3 ± 0.1	540 ± 62	6.23 ± 0.71	704 ± 19	
	p.o.	1	699 ± 77	1.0 (0.50–2.0)	2.8 ± 2.5	3150 ± 1670			121.8 ± 77.3
Aged	i.v.	0.2			2.3 ± 1.5	613 ± 143	5.62 ± 1.17	924 ± 447	
	p.o.	1	686 ± 89	0.50 (0.25–0.50)	1.4 ± 0.2	2010 ± 600			67.2 ± 23.8
DPH									
Young	i.v.	0.2			2.1 ± 0.1	47.5 ± 0.6	70.1 ± 0.9	10500 ± 1000	
	p.o.	1	3.34 ± 1.62	2.0 (1.0–2.0)	6.6 ± 4.4	17.4 ± 9.8			7.3 ± 4.1
Aged	i.v.	0.2			5.9 ± 5.3	106 ± 38	33.8 ± 10.3**	12100 ± 6700	
	p.o.	1	2.66 ± 0.90	1.0 (1.0–2.0)	4.2 ± 2.9	12.7 ± 5.7			2.8 ± 1.8
DZP									
Young	i.v.	0.04			2.5 ± 1.2	12.5 ± 1.5	53.7 ± 6.6	3830 ± 1220	
	p.o.	0.2	3.08 ± 1.49	1.0 (0.50–2.0)	2.3 ± 2.5	7.57 ± 6.62			13.6 ± 13.4
Aged	i.v.	0.04			7.5 ± 6.7	19.4 ± 5.1	35.7 ± 8.1*	8690 ± 7320	
	p.o.	0.2	2.72 ± 1.20	0.25 (0.25–0.50)	1.0 ± 0.6	2.93 ± 1.78			3.8 ± 2.5
OFX									
Young	i.v.	0.2			6.4 ± 0.7	2210 ± 360	1.54 ± 0.28	841 ± 146	
	p.o.	1	1690 ± 910	2.0 (0.50–8.0)	8.7 ± 4.8	27 000 ± 16000			234.3 ± 121.9
Aged	i.v.	0.2			8.2 ± 4.1	3530 ± 1600	1.07 ± 0.44	687 ± 127	
	p.o.	1	8100 ± 7520	1.0 (1.0–4.0)	6.1 ± 1.0	26 100 ± 5400			175.3 ± 90.2

Each value represents the mean ±S.D. of 3 dogs. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus young group. AAP, acetaminophen; AP, antipyrine; DPH, diphenhydramine; DZP, diazepam; and OFX, ofloxacin.

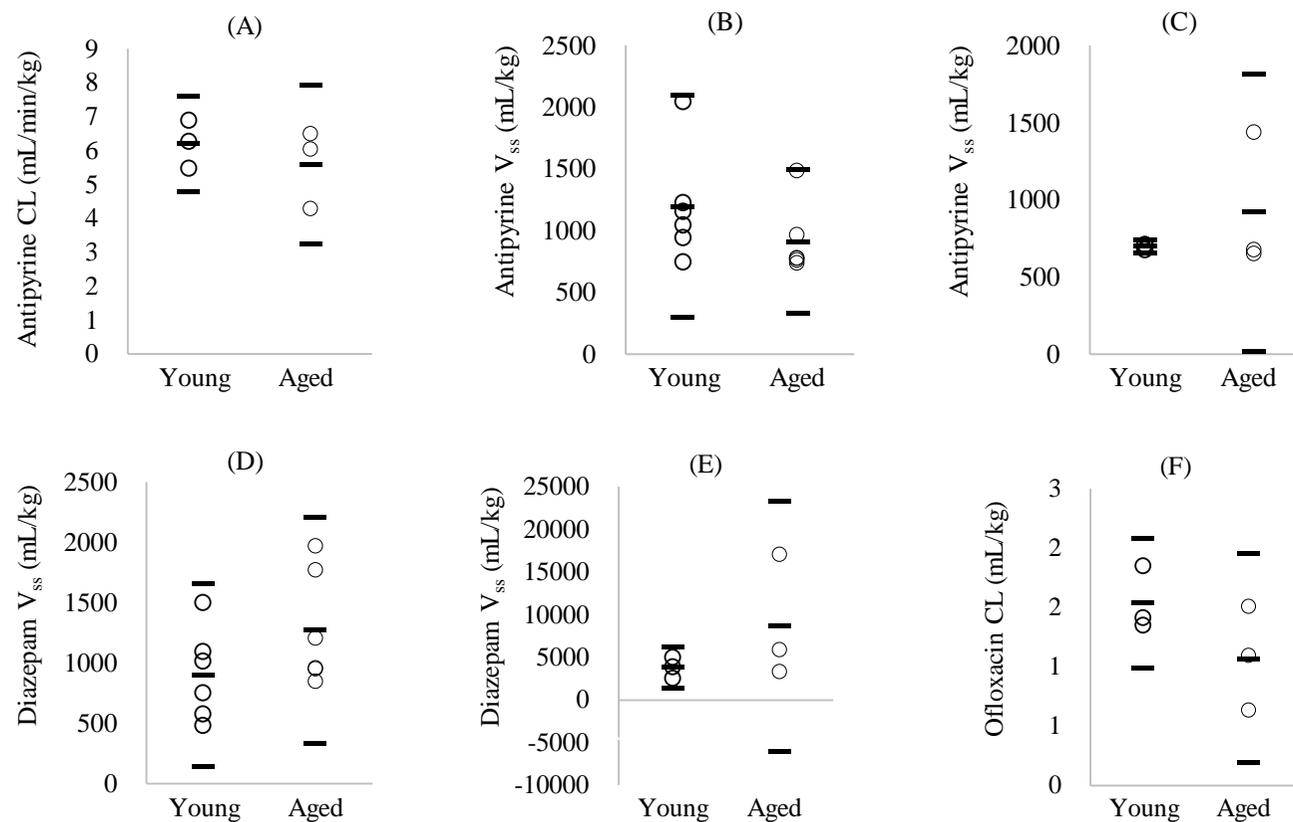


Figure II-4. Individual plots of antipyrine CL of dogs (A), antipyrine V_{ss} of dogs (B) and monkeys (C), diazepam V_{ss} of dogs (D) and monkeys (E), and ofloxacin CL of dogs (F).

Each circle represents individual pharmacokinetic parameters. Top bar, middle bar and bottom bar represent upper limit of 95% confidence interval, mean and lower limit of 95% confidence interval, respectively.

第4節 考察

高齢者においては胃腸の生理学的パラメータが変化する。北米においては、40歳以下における無酸症（胃内 pH が高くなる）の頻度が1%未満であるのに対し高齢者ではおよそ11%と高くなる(Russell et al., 1993)。一方、日本人においては無酸症の割合は加齢とともに増加し、60歳以上では70%以上と高い(Morihara et al., 2001)。このように人種差はあるが、いずれも加齢により無酸症の割合は増加している。今回の試験では、若齢サルおよび若齢イヌの胃内 pH はそれぞれ 2.11~2.51 および 2.50~3.10 であった。一方、老齢サル及びイヌにおいては若齢サルおよびイヌの胃内 pH の 95%信頼区間上限を超える個体が存在し、サルでは6例中1例で4.12、イヌでは3例中2例で3.60および4.70の pH 値であった(Table II-1)。このように、老齢サルおよび老齢イヌにおいてもヒトと同様に高い pH の個体が存在し、これら動物における胃内 pH の変化に認められる加齢の影響はヒトと類似の傾向が認められた。

ヒトで若年者および高齢者における血漿中アルブミン濃度はそれぞれ 49.5 および 36.3 g/L と報告されており、(Viani et al., 1992)、加齢により有意に減少することが示されている。対照的に、血漿中 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質濃度は若齢者および高齢者でそれぞれ 0.622 および 0.731 g/L であり、加齢により有意に増加することが示されている(Paxton & Briant 1984)。今回の試験においては、ヒトと異なり、サルおよびイヌにおいて加齢による血漿アルブミン濃度の変動は認められなかった (Table II-2)。ヒトにおいて $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質濃度の減少に伴い diphenhydramine の蛋白結合率は低下している(Zhou et al., 1990)ことが報告されている。今回の試験において、サルおよびイヌにおける diphenhydramine の蛋白結合率の平均値に加齢による有意差はなかったが (Table II-3)、イヌでは若齢の 95%信頼区間を上回る老齢個体が3例中2例認められた (Figure II-1) ことから、加齢による $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質濃度の増加が示唆された。

胃排出は経口投与される薬剤の吸収において重要な律速過程である。Acetaminophen は胃からは吸収されず小腸から速やかに吸収されるため、胃排出のモデル薬物として使用さ

れている(Heading et al., 1973; Petring & Flachs 1990). ヒトにおいて acetaminophen の T_{max} は加齢により変化しないことが報告されている(Divoll et al., 1982; Gainsborough et al., 1993). 今回の実験では, ヒトと同様, サルおよびイヌにおいて acetaminophen の T_{max} に加齢による有意な変動は認められなかった (Table II-4 および II-5). これらの結果から, サルおよびイヌにおける胃排出速度は, ヒトと同様に加齢により影響を受けないことが示唆された.

Antipyrine はヒトの肝臓における酸化代謝活性の指標として使用されており(Engel et al., 1996), 加齢により antipyrine の CL が約 29~40%有意に低下することが報告されている(Greenblatt et al., 1982; Sotaniemi et al., 1997). 今回, 若齢および老齢サルにおける静脈内投与時の CL はそれぞれ 9.17 および 4.72 mL/min/kg であり (Table II-4), 加齢により約 49%有意に低下していることから, サルの肝臓における酸化代謝活性に及ぼす加齢の影響は, その低下率も含め, ヒトと類似していることが示唆された. 一方, 若齢及び老齢イヌにおける CL はそれぞれ 6.23 および 5.62 mL/min/kg であり (Table II-5), 有意差はなかった. CL の個別プロットにおいて若齢の 95%信頼区間を下回る老齢個体が 3 例中 1 例認められたものの (Figure II-4 A), イヌにおける加齢による CL 平均値の減少率は約 10%でありヒトに比べ小さく, 加齢による影響がヒトと異なる可能性が示唆された. 肝 CL の低い薬物については, 肝固有 CL (CL_{int}) および血漿中フリー体分率 ($f_{u,p}$) の変動によって影響を受ける. 今回, 若齢及び老齢サルにおける antipyrine の $f_{u,p}$ 値はそれぞれ 0.907 および 0.830 であり (Table II-3), 加齢による $f_{u,p}$ 値の低下は 10%未満であった. したがって, 老齢サルにおける CL の低下は, $f_{u,p}$ 値の低下だけではなく CL_{int} などの変化を伴った複合的なものに起因することが示唆された.

ヒトにおいて加齢により肝血流量は低下し, 22 歳に比べ 82 歳では 49%有意に低下することが報告されている(Wynne et al., 1990). 今回の試験において, diphenhydramine の若齢サルおよびイヌにおける血漿 CL はそれぞれ 51.8 および 70.1 mL/min/kg であった (Table II-4 および II-5). 血液 CL は血漿 CL を血液/血漿中濃度比 (R_b) で割ることで算出される. 予

備的に評価した若齢サルおよびイヌにおける diphenhydramine の R_b はそれぞれ 1.06 および 1.46 である。算出された若齢サルおよびイヌにおける血液 CL はそれぞれ 48.9 および 47.9 mL/min/kg であり、サルおよびイヌにおける肝血流量である 43.6 および 30.9 mL/min/kg (Davies & Morris 1993) より高い値を示した。サルおよびイヌにおける diphenhydramine の未変化体尿中排泄率が低いこと (Chang et al., 1974; Drach & Howell 1968; Drach et al., 1970)、およびバイオアベイラビリティが若齢サルおよびイヌでそれぞれ 3.3 および 7.3% と低いことから (Tables II-4 および II-5)、サルおよびイヌにおける CL は肝 CL を反映していると考えられる。老齢サルおよびイヌにおける diphenhydramine の血漿 CL はそれぞれ 30.9 および 33.8 mL/min/kg であり (Tables II-4 および II-5)、若齢動物に比べ有意に低下した。様々な動物における研究で、diazepam の主な消失経路は代謝であることが示されている (De Silva et al., 1966; Marcucci et al., 1970; Marcucci et al., 1968; Schwartz et al., 1965; Schwartz & Postma 1968)。サル、イヌおよびヒト肝細胞を用いた代謝安定性試験において、代謝物として temazepam および nordiazepam が生成することから、これら 3 種において代謝経路が類似していると考えられる (Seddon et al., 1989)。予備的に評価した R_b を用いて算出した diazepam の若齢サルおよびイヌの血液 CL はそれぞれ 37.0 および 93.0 mL/min/kg と高い値である。Diazepam のイヌにおける高い血液 CL (35 mL/min/kg) は他のグループによっても報告されている (Klotz et al., 1976)。今回の試験において、サルおよびイヌにおける diazepam の CL は加齢により有意に減少した (Table II-4 および II-5)。これらの diphenhydramine および diazepam の結果より、サルおよびイヌにおいて、ヒトと同様に加齢により肝血流量が減少したことが示唆された。

加齢による体脂肪率の増加および体水分率の減少に伴い、極性薬物の分布容積は低下し、脂溶性薬物の分布容積は増加する (Klotz 2009)。極性薬物である antipyrine の分布容積 (V_d) は、23~43 歳の若齢者では 660 mL/kg であるのに対し、60~76 歳の高齢者では 550 mL/kg と有意に減少することが報告されている (Greenblatt et al., 1982)。今回の試験ではサルおよび

イヌのいずれにおいても加齢による有意な antipyrine の V_{ss} の低下は認められず (Table II-4 および II-5), 個別プロットでも傾向は認められなかった (イヌは若齢の 95% 真楽区間を下回る個体もあったが, 逆に上回る個体もあった) ことから, 今回の試験条件では, ヒトと異なり, サルおよびイヌにおける加齢による体水分率の減少は示唆されなかった.

ヒトにおいて, 加齢により diazepam の V_{ss} は増加し, $t_{1/2}$ が延長されることが報告されている (Klotz et al., 1976). 今回の試験では, サルおよびイヌにおいて, ヒトと同様に, diazepam は二相性の血漿中濃度推移を示し (Figure II-1 および II-2), 加齢により V_{ss} が増加する傾向が示されたことから (Figure II-4 D および E), サルおよびイヌにおける体脂肪量は, ヒトと同様に, 加齢により増加する可能性が示唆された.

Ofloxacin は腎排泄型の薬物であり, 健常若年者, 健常高齢者および腎機能に障害のない高齢患者における経口 CL はそれぞれ 233, 169 および 83.3 mL/min であり, ヒトにおいては加齢により CL が有意に低下する (Molinario et al., 1992; Rademaker et al., 1989). Ofloxacin の健常者におけるバイオアベイラビリティは 95% 以上であることから (Lode et al., 1987), ヒトにおける CL の加齢による低下は腎 CL の低下によると考えられる. 25~75 歳におけるクレアチニン CL は加齢により減少しており (Elseviers et al., 1987), 健常高齢者において ofloxacin の腎 CL とクレアチニン CL の間には相関関係がある. このように, ヒトにおける ofloxacin の CL の加齢による低下はクレアチニン CL の低下を反映していると考えられる. 今回の試験において, 若齢および老齢サルにおける ofloxacin の CL はそれぞれ 10.9 および 5.96 mL/min/kg であり, 加齢による有意な減少を示した (Table II-4). イヌにおいても加齢により CL が低下する傾向が認められた (Figure II-4 F). これらのことから, サルおよびイヌにおいて, ヒトと同様に加齢によりクレアチニン CL が低下し腎 CL が低下したことが示唆された.

第5節 小括

サルおよびイヌにおける加齢による胃内 pH の変化はヒトと類似していたが、血漿中アルブミンの加齢による変化はヒトと異なっていた。イヌではヒトと同様に加齢により $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質が増加する可能性が示唆されたが、サルではその変動は認められなかった。サルおよびイヌにおける胃排出速度は、ヒトと同様に加齢により変化しなかった。肝血流はヒト同様、サルおよびイヌにおいて加齢により低下したことが示唆された。体水分率については、サルおよびイヌともにヒトと異なり加齢による低下が認められなかったが、体脂肪率については両動物種ともにヒトと同様に加齢により増加する可能性が示唆された。サルにおける肝代謝活性は、ヒトと同様に加齢により有意に低下し、その低下率もヒトと類似していたが、イヌにおいては肝代謝活性の有意な変動は認められなかった。腎排泄能については、サルはヒトと同様に加齢により有意に低下し、イヌにおいては低下傾向を示した。以上のことから、老齢サルおよび老齢イヌはヒトにおける複数の生理学的パラメータの加齢による変動を反映することが明らかとなったが、特に薬物動態において極めて重要な肝代謝能の加齢による変動を反映する老齢サルは、ヒトにおける血中動態に及ぼす加齢の影響を予測する上で有用な動物モデルであると考えられた。

第 III 章 サルにおける加齢による P450 代謝活性の変動

第 1 節 緒言

第 II 章では、サルもヒトと同様に加齢に伴った生理学的パラメータの変動が認められた。本研究においては、薬物の体内動態において最も重要な肝臓における酸化代謝酵素である P450 の各分子種に着目し、その活性のヒトにおける加齢による変動をサルが反映するかについて確認することを目的とした。医薬品の代謝に主に関与するのは、主に肝臓の小胞体に存在する P450 と呼ばれる代謝酵素であり、P450 は CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A およびその他分子種を含む総称である。2002 年の米国における最頻処方薬上位 200 の医薬品について、73%が代謝により体内から消失し、その代謝の中で P450 の寄与率は約 75%であり、その P450 分子種ごとの寄与率の内訳は、高い方から CYP3A (46%), CYP2C9 (16%), CYP2C19 (12%), CYP2D6 (12%), CYP1A (9%) であることが報告されている(Wienkers & Heath 2005)。このように、P450 は薬物動態上非常に重要な代謝分子種であるが、サルにおける P450 による薬物酸化酵素活性の加齢による変動については研究されていない。

Caffeine, *S*-warfarin, omeprazole, metoprolol および midazolam は、ヒト CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 および 3A の指標薬物として、ヒトにおいて混合液（カセット）投与で用いられている (Turpault et al., 2009)。一方、P450 の基質認識性には種差があることが知られており、サルにおいては、caffeine は CYP2C9 (Utoh et al., 2013), *S*-warfarin は CYP2C19, 3A4, および 3A5 など複数の分子種 (Hosoi et al., 2012), omeprazole はヒトと同様に CYP2C19 (Uno et al., 2014b), midazolam はヒトと同様に CYP3A (Kanazu et al., 2004)によって代謝される。

Metoprolol のヒトにおける主代謝分子種は CYP2D6 であるが、サルにおける代謝分子種は明らかにされていない。本研究では、metoprolol の代謝分子種を明らかにするとともに、これらの指標薬物の混合溶液を 3 頭ずつの若齢（3 歳齢）および老齢（16 歳齢）サルに静脈内および経口投与した時の血中動態を確認した。16 歳齢は Hood の報告における若年期におけるサルおよびヒトの年齢の関係性から比例計算すると、ヒトではおよそ 64~68 歳に相当す

る(Hood 2006). さらに, 3~16 歳齢の 55 頭のサルから調製した個別の肝ミクロソームを用いた指標薬物の代謝安定性試験を行い, ヒトにおける P450 の加齢による変動をサルが反映するかを確認した.

第 2 節 実験材料および方法

III-2-i) 試薬

Caffeine, warfarin (R 体, S 体及びラセミ体), metoprolol, paraxanthine および 1,3,7-trimethyluric acid は Sigma-Aldrich Ultrafine (St. Louis, MO, USA) より購入した. Midazolam, theophylline および theobromine は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した. Omeprazole は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した. Caffeine-d9 および candesartan は Toronto Research Chemicals (North York, ON Canada)より購入した. WellSolve はセレステ (Tokyo, Japan) より購入した. ヒト肝ミクロソームは Xenotech (Kansas, KA) から購入した. カニクイザル肝ミクロソームは Xenotech (Kansas, KA) から購入もしくは Uehara らの手法に従い調製した(Uehara et al., 2011). サルおよびヒトの P450 組み換え蛋白質は, Iwasaki らおよび Uno らの手法 (Iwasaki et al., 2010; Uno et al., 2010)に従い, 大腸菌を宿主として発現させた後に精製したものを使用した. その他の試薬および溶媒は HPLC 用, LC-MS/MS 用もしくは特級品を購入した.

III-2-ii) カニクイザルを用いた血中動態試験

薬物の投与, 採血および血漿の採取は NAS 研究所 (Chiba, Japan) で実施した. すべての動物実験計画は NAS 研究所の Institutional Animal Care and Use Committee で承認された. 3 頭の 3 歳齢雄性カニクイザル (若齢サル) および 3 頭の 16 歳齢雄性カニクイザル (老齢サル) は GMJ (Hyogo, Japan) より購入した. 若齢および老齢サルについて薬物投与 17 時間前から絶食を施し, 飲水は自由飲水とした. 投与液は caffeine, warfarin (ラセミ体), omeprazole,

metoprolol および midazolam の 5 種類の薬物の混合液として調製した (カセット投与)。 静脈内投与用として 35% hydroxypropyl- β -cyclodextrin 水溶液, 経口投与用として 10%Wellsolve 水溶液に薬物を溶解させて投与液を調製した。 投与液中における各薬物の濃度が各薬物あたり 0.2 mg/mL となるよう調製した。 調製した投与液を 1 mL/kg の用量で静脈内投与した。 その後 7 日間以上のウォッシュアウト期間後, 5 mL/kg の用量で経口投与した。 投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 および 24 時間後に, ヘパリンナトリウム添加シリンジを用いて約 0.5 mL ずつ採血した。 血液を遠心して血漿を分取し, 測定に供するまで -80°C で保存した。

III-2-iii) 血漿中薬物濃度の測定

検量線試料はそれぞれの薬物をブランク血漿に添加することで調製した。 50 μ L の採取試料もしくは検量線試料に内標準物質として candesartan を含むアセトニトリル 200 μ L を添加して混和した後, その遠心上清を別の容器に移し, LC-MS/MS (Prominence UFLCXR, Shimadzu, Kyoto, Japan, and API5000, AB SCIEX, Framingham, MA) で測定した。 測定方法は Mogi らの方法に従った (Mogi et al., 2012)。 ただし R-warfarin および S-warfarin は Chiralcel OD-RH analytical カラム (Daicel, Tokyo, Japan) を用いて分離測定した。

III-2-iv) カニクイザルの血液/血漿中濃度比 (R_b) 測定

カニクイザルからの採血および血漿の採取はハムリー (Ibaraki, Japan) で実施した。 すべての動物実験計画はハムリーの Institutional Animal Care and Use Committee で承認された。 ハムリー社所有の 3 頭の 5 歳齢雄性カニクイザル (ハムリー, Ibaraki, Japan) について, 17 時間の絶食後 (飲水は自由飲水) に採血し, 一部を遠心して血漿を得た。 caffeine, warfarin (ラセミ体), omeprazole, metoprolol および midazolam の混合溶液を血液および血漿に添加 (各薬物の最終濃度は R-warfarin および S-warfarin はそれぞれ 0.15 μ mol/L, それ以外の薬物は 0.3 μ mol/L. アセトニトリルの最終濃度 1%) して混和し, 37°C で 10 分間インキュベートし

た。血液試料については遠心して血漿を分取し、血漿試料とともに、III-2-iii)項に従い薬物濃度を LC-MS/MS により測定した。

III-2-v) カニクイザル肝ミクロソーム中安定性

3～9 歳齢の雄性 26 頭および雌性 23 頭（新日本科学、Kainan, Japan）、および血中動態試験に用いた若齢および老齢サルから調製された肝ミクロソームを代謝安定性試験に使用した。Caffeine および warfarin（ラセミ体）はそれぞれ単独の調製液、omeprazole, metoprolol および midazolam は 3 種混合溶液を使用した。サル肝ミクロソーム反応液は、肝ミクロソーム（caffeine および warfarin 用反応液は 1 mg protein/mL, 3 種混合溶液用反応液は 0.1 mg protein/mL）、NADPH 生成系（1.3 mmol/L NADP⁺, 3.3mM glucose 6-phosphate, 0.4 unit/mL glucose 6-phosphate dehydrogenase および 3.3mM magnesium chloride）、薬物（各化合物の反応液中薬物濃度は、caffeine は 100 μmol/L, R-warfarin および S-warfarin は 0.05 μmol/L, omeprazole, metoprolol および midazolam は 0.1 μmol/L）および 100 mmol/L リン酸緩衝液（pH 7.4）の混合液を使用した。代謝反応は 37°C で実施し、midazolam については 5 分、それ以外の薬物については 2 時間インキュベート後、内標準物質として caffeine については caffeine-d₉、それ以外の薬物については candesartan を含む acetonitrile/ethanol（70:30 v/v）溶液を反応液の 4 倍量添加することで代謝反応を終了させた。混和して遠心し、その上清を新しい容器に移し、薬物濃度を III-2-iii) 項に従い LC-MS/MS で測定した。

III-2-vi) カニクイザル血漿および肝ミクロソーム蛋白結合率測定

蛋白結合率を Rapid Equilibrium Dialysis Device（Thermo Scientific, Tokyo, Japan）を用いた平衡透析法により測定した。血漿蛋白結合率測定においては、若齢および老齢サルの各個体から得られた血漿に caffeine, warfarin（ラセミ体）、omeprazole, metoprolol および midazolam の混合溶液を添加（各薬物の最終濃度は R-warfarin および S-warfarin はそれぞれ 0.15 μmol/L,

それ以外の薬物は 0.3 $\mu\text{mol/L}$. アセトニトリルの最終濃度 1%) して混和した.

肝ミクロソーム結合率測定においては, Xenotech (Kansas, KA) から購入した肝ミクロソームを使用した. 5 種の薬物の混合溶液を各薬物の最終濃度が *R*-warfarin および *S*-warfarin はそれぞれ 0.05 $\mu\text{mol/L}$, それ以外の薬物は 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (アセトニトリルの最終濃度 1%) となるよう, NADPH 生成系を含まない肝ミクロソーム反応液に添加して混和した. 各薬物添加試料を透析膜チャンバーに添加し, 緩衝液チャンバーにはリン酸緩衝液を添加した. 37°C, 80 rpm で 24 時間振とう後, 添加試料およびリン酸緩衝液試料を, 内標準物質として candesartan を含む acetonitrile/ethanol (70:30 v/v) 溶液に添加した. 混和して遠心し, その上清を新しい容器に移し, 薬物濃度を III-2-iii) 項に従い LC-MS/MS で測定した.

III-2-vii) データ解析

薬物動態パラメータは PhoenixTM WinNonlin[®] 6.1 (Pharsight, Mountain View, CA) を用いてノンコンパートメント解析により算出した. *R*-warfarin および *S*-warfarin の薬物動態パラメータ算出の際の投与量は, warfarin ラセミ体の投与量を 2 で割った値 (静脈内および経口投与でそれぞれ 0.1 および 0.5 mg/kg) を用いた.

R_b は以下の式により算出した.

$$R_b = \text{血液中理論濃度} / \text{血漿中濃度}$$

血漿中フリー体分率 ($f_{u,p}$) および肝ミクロソーム反応液中フリー体分率 ($f_{u,mic}$) は以下の式により算出した

$$f_u = \text{リン酸緩衝液中濃度} / \text{血漿もしくは肝ミクロソーム反応液中濃度}$$

カフェイン以外の薬物の肝固有 CL ($CL_{int,vitro}$. mL/min/mg microsomal protein) は以下の式により算出した.

$$CL_{int,vitro} = k_e / [MS_{prot}] / f_{u,mic}$$

この式において k_e は肝ミクロソーム反応液中における未変化体の消失速度定数, $[MS_{prot}]$ は

反応液中肝ミクロソーム蛋白濃度である。

カフェインの $CL_{int,vitro}$ は以下の式により算出した。

$$[\text{Metabolites}] / [S] / [\text{MS}_{prot}] / t / f_{u,mic}$$

この式において、[Metabolites]は肝ミクロソーム反応2時間後におけるカフェインの代謝物 (1,3,7-trimethyluric acid, paraxanthine, theobromine および theophylline) 濃度の総和, [S]は添加 caffeine 濃度, そして t は肝ミクロソーム反応時間である。

In vivo 血液 CL ($CL_{B,predicted}$) は Naritomi らの報告に従い, dispersion model を用いて算出した (Naritomi et al., 2001)。

$$CL_{B,predicted} = Q_h (1 - F_h)$$

$$F_h = \frac{4a}{(1+a)^2 \exp\{(a-1)/2D_N\} - (1-a)^2 \exp\{-(a+1)/2D_N\}}$$

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

$$R_N = (f_{u,p} / R_b) \cdot CL_{int,vitro} MA \cdot LW / Q_h$$

$$D_N = 0.17$$

この式において, Q_h は肝血流量であり, 若齢サル値として 43.6 mL/min/kg を使用した (Davies & Morris 1993). F_h は肝通過率, MA は肝臓 1 g あたりのミクロソーム蛋白含有率 (45 mg/g (Houston 1994)), LW は体重 1 kg あたりの肝臓重量 (30 g/kg (Davies & Morris 1993)), R_N は efficiency number, そして D_N は dispersion number を表す. 老齢サルにおける肝血流量 ($Q_{h,aged}$) は, 以下の式のように若齢および老齢サルにおける diphenhydramine の CL (Koyanagi et al., 2014)を用いて算出した 26.0 mL/min/kg を使用した。

$$Q_{h,aged} = 43.6 \times [\text{老齢サルにおける diphenhydramine の CL} / \text{若齢サルにおける diphenhydramine の CL}]$$

肝ミクロソームおよび組換え CYP2D および 3A による metoprolol O-demethylation は Johnson

& Burlew らの方法に従い測定した(Johnson & Burlew 1996). 速度パラメータは非線形回帰によるフィッティング曲線より算出した (mean \pm SE). 統計的有意性は *t*-test により評価した.

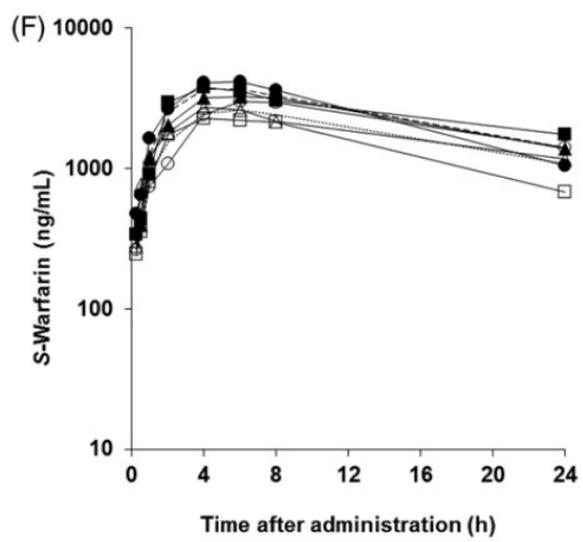
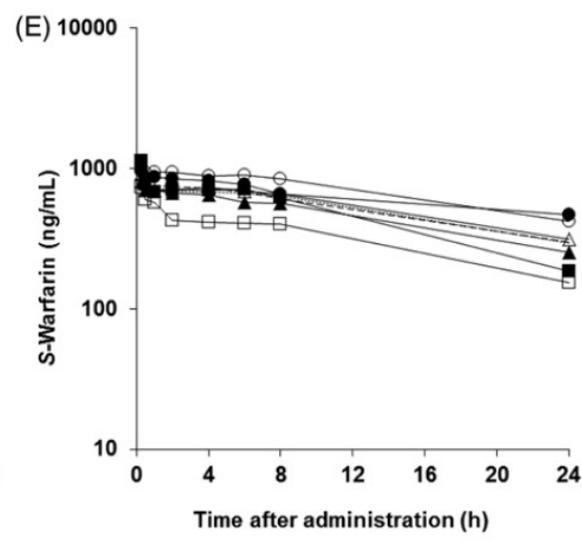
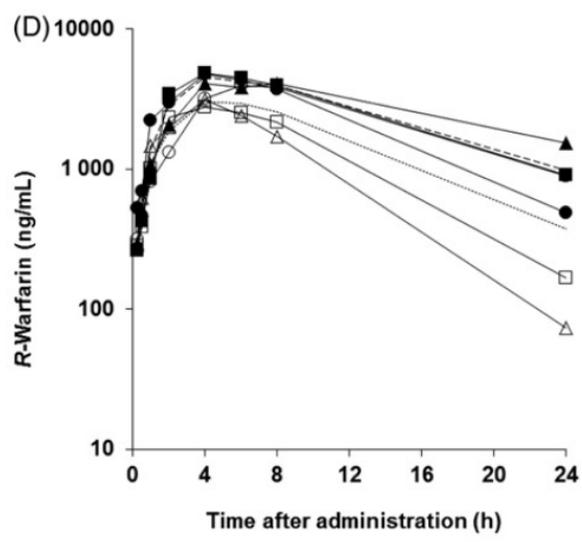
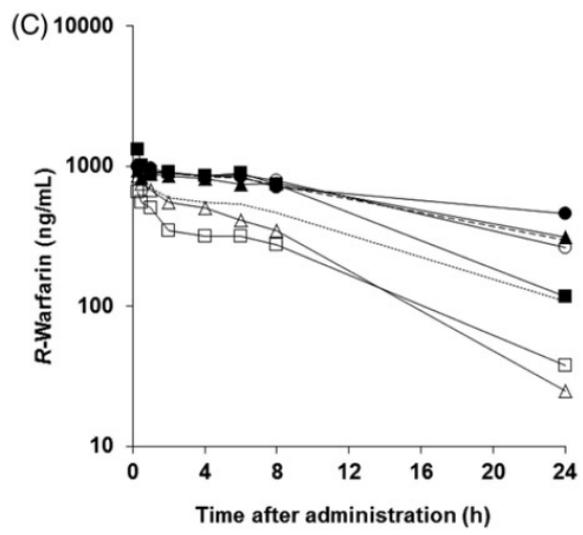
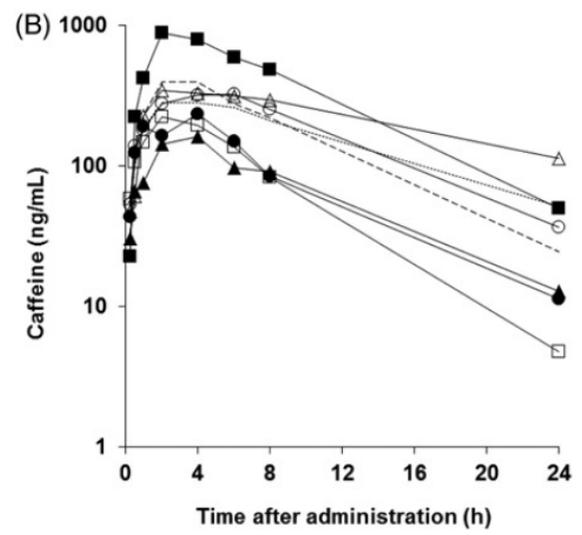
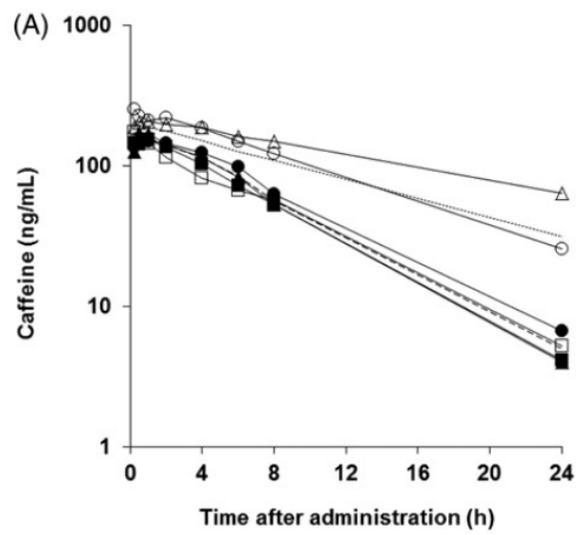
第3節 結果

III-3-i) 血中動態試験

3頭ずつの若齢および老齢のサルに Caffeine, warfarin (ラセミ体), omeprazole, metoprolol および midazolam を各 0.20 mg/kg (*R*-warfarin および *S*-warfarin としてそれぞれ 0.10 mg/kg ずつ) 単回カセット静脈内投与, 各 1.0 mg/kg (*R*-warfarin および *S*-warfarin としてそれぞれ 0.50 mg/kg ずつ単回カセット経口投与し, 血漿中濃度推移を測定し (Figure III-1), 薬物動態パラメータを算出した (Table III-1). Caffeine を経口および静脈内投与した時の血漿中濃度は単相性の消失を示した (Figure III-1A および B). 若齢及び老齢サルにおける静脈内投与時の caffeine の AUC はそれぞれ 2690 および 1250 ng·h/mL (Table III-1) であった. 若齢及び老齢サルにおける経口投与時の caffeine の C_{max} はそれぞれ 297 および 422 μ g/mL であり, AUC はそれぞれ 4380 および 3960 ng·h/mL であった. Caffeine の若齢および老齢サルにおけるバイオアベイラビリティ (BA) はそれぞれ 31.7 および 66.2% であった. 同様に, *R*-warfarin および *S*-warfarin は経口および静脈内投与時の血漿中濃度は単相性の緩やかな消失を示した (Figure III-1C~F). Warfarin 静脈内投与時の AUC は, *R*-warfarin では若齢及び老齢でそれぞれ 9980 および 21900 ng·h/mL, *S*-warfarin はそれぞれ 19100 および 21300 ng·h/mL であった (Table III-1). *R*-warfarin の老齢サルにおける CL (0.0854 mL/min/kg) は若齢サルにおけるそれ CL (0.228 mL/min/kg) と有意差はなかったが, 老齢サルの CL 平均値は若齢サルに比べ 62% 低い値であった. Warfarin 経口投与時の *R*-warfarin の C_{max} は若齢及び老齢サルでそれぞれ 3290 および 4580 ng/mL, *S*-warfarin の C_{max} はそれぞれ 2650 および 3700 ng/mL, *R*-warfarin の AUC は若齢及び老齢サルでそれぞれ 40200 および 74800 ng·h/mL, *S*-warfarin の AUC はそれぞれ 65200 および 87300 ng·h/mL であった. 特に, 老齢サルにおけ

る *R*-warfarin および *S*-warfarin 経口投与時の C_{max} は若齢よりも有意に高かった。 *R*-warfarin の BA は若齢及び老齢サルでそれぞれ 90.8 および 78.0% であり、 *S*-warfarin の BA は 71.9 および 99.1% であった。 対照的に、 omeprazole を静脈内投与した時の血漿中濃度は、単相性の速やかな消失を示した (Figure III-1G)。 若齢及び老齢サルにおける omeprazole 静脈内投与時の AUC はそれぞれ 322 および 377 ng·h/mL であった (Table III-1)。 Omeprazole 経口投与時の若齢及び老齢サルにおける C_{max} はそれぞれ 11.8 および 41.3 ng/mL、 AUC はそれぞれ 37.5 および 120 ng·h/mL、 BA は 2.1 および 7.0% であった。 若齢および老齢サルに metoprolol を静脈内投与した時の血漿中濃度は、単相性の速やかな消失を示した (Figure III-1I)。

Metoprolol 静脈内投与時の AUC は若齢および老齢サルにおいてそれぞれ 73.7 および 86.3 ng·h/mL であった (Table III-1)。 Metoprolol 経口投与時の若齢および老齢サルにおける C_{max} はそれぞれ 0.643 および 0.751 ng/mL、 AUC はそれぞれ 3.77 および 4.05 ng·h/mL であり、 BA はそれぞれ 1.1 および 0.9% であった。 同様に、 midazolam 静脈内投与時の血漿中濃度は単相性の速やかな消失を示した (Figure III-1K)。 Midazolam 静脈内投与時の老齢サルにおける AUC は 357 ng·h/mL であり、若齢サルの 251 ng·h/mL に比べ有意に高い値を示し (Table III-1)、 midazolam の老齢サルにおける CL (9.47 mL/min/kg) は若齢サル (13.3 mL/min/kg) に比べ有意に小さい値であった。 Midazolam 経口投与後の C_{max} は、若齢および老齢サルにおいてそれぞれ 5.87 および 7.58 ng/mL、 AUC はそれぞれ 48.5 および 58.6 ng·h/mL であり、 BA はそれぞれ 3.9 および 3.5% であった。 今回の実験条件下では、 caffeine、 omeprazole および metoprolol の経口および静脈内投与時の若齢および老齢サルにおける血中動態パラメータに統計的有意差は認められなかった。



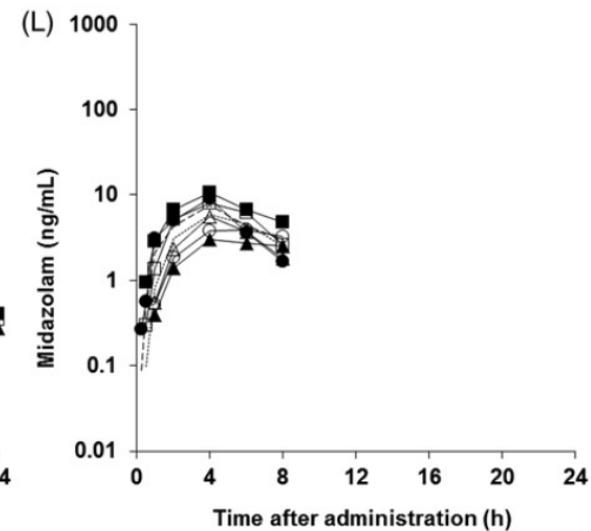
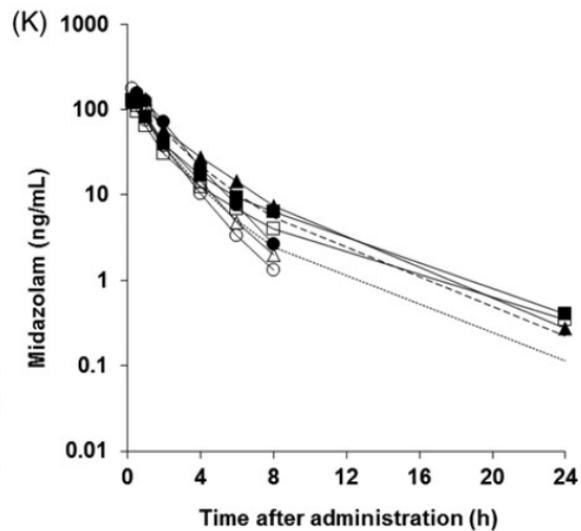
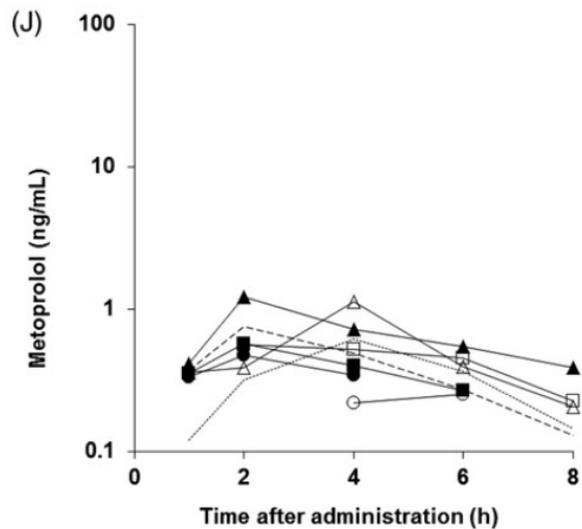
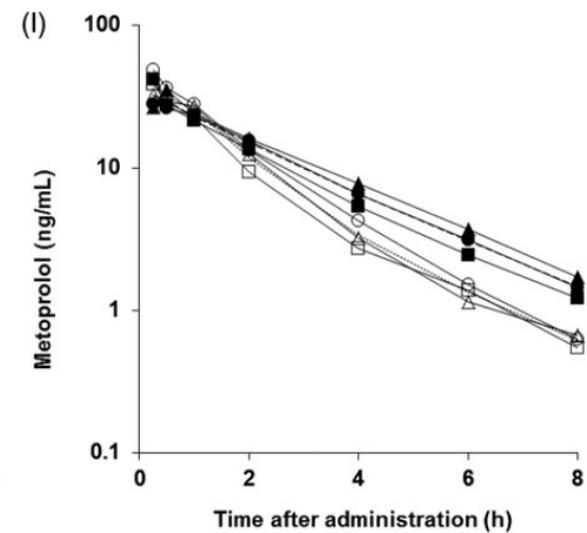
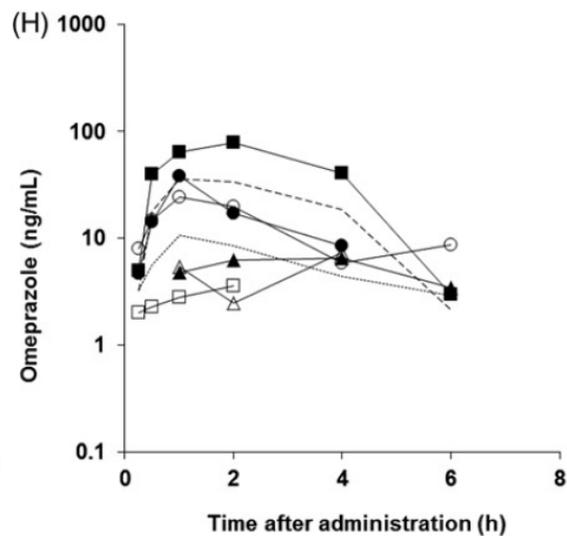
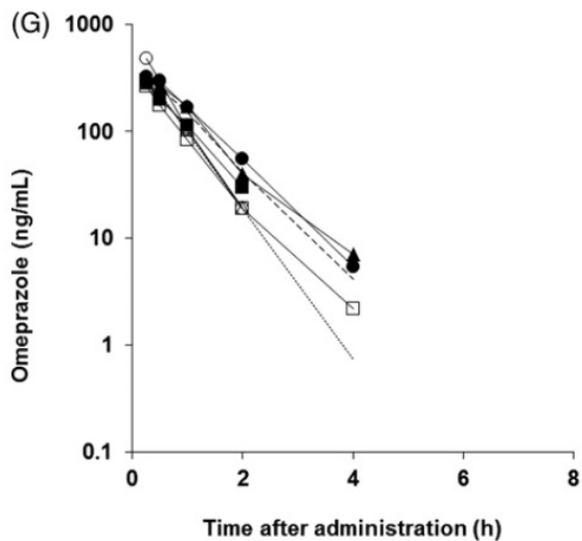


Figure III-1. Plasma concentrations of caffeine (A and B), *R*-warfarin (C and D), *S*-warfarin (E and F), omeprazole (G and H), metoprolol (I and J) and midazolam (K and L) in young (open circles, triangles and squares for each animal and dotted line for mean of three animals) and aged (filled circles, triangles and squares for each animal and long dashed line for mean of three animals) monkeys after single simultaneous administration of five-probes intravenously (A, C, E, G, I and K, 0.20 mg kg⁻¹) or orally (B, D, F, H, J and L, 1.0 mg kg⁻¹). Symbols and bars show the mean±SD, *n*=3 for each dosing.

Table III-1. Pharmacokinetic parameters of caffeine, *R*-/*S*-warfarin, omeprazole, metoprolol and midazolam in young and aged monkeys after single simultaneous administration of five-probes intravenously (0.20 mg kg⁻¹) or orally (1.0 mg kg⁻¹).

Compound	Young							Aged						
	Animal No.	i.v.			p.o.			Animal No.	i.v.			p.o.		
		AUC (ng h/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (mL/kg)	C _{max} (ng/mL)	AUC (ng h/mL)	BA (%)		AUC (ng h/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (mL/kg)	C _{max} (ng/mL)	AUC (ng h/mL)	BA (%)
Caffeine	1	2700	1.24	765	324	4220	31.3	4	1370	2.43	1060	232	1940	28.2
	2	4240	0.786	906	343	7230	34.1	5	1210	2.74	1030	160	1640	27.0
	3	1140	2.93	1250	223	1690	29.7	6	1160	2.88	1110	874	8300	144.0
	Mean	2690	1.65	974	297	4380	31.7	Mean	1250	2.68	1070	422	3960	66.2
	SD	1550	1.13	250	65	2770	2.2	SD	110	0.23	40	393	3760	66.9
<i>R</i> -Warfarin	1	18 600	0.0896	84.7	3960	63 700	68.5	4	31 300	0.0533	106	4780	58 200	37.2
	2	6220	0.268	114	3130	25 900	83.3	5	20600	0.0811	96.8	4110	94 000	91.5
	3	5120	0.325	175	2780	30 900	121.0	6	13 700	0.122	72.3	4840	72 100	105
	Mean	9980	0.228	125	3290	40 200	90.8	Mean	21 900	0.0854	91.6	4580 ^a	74 800	78.0
	SD	7490	0.123	46	610	20 500	26.8	SD	8900	0.0344	17.3	410	18 000	36.0
<i>S</i> -Warfarin	1	26 900	0.0620	89.6	2980	81 300	60.5	4	33 600	0.0497	118	4150	71 900	42.9
	2	20 100	0.0829	113	2720	69 500	69.1	5	16 500	0.101	128	3220	83 000	101.0
	3	10 400	0.160	172	2240	44 800	86.1	6	13 900	0.120	101	3740	107 000	154.0
	Mean	19 100	0.102	125	2650	65 200	71.9	Mean	21 300	0.0902	115	3700 ^a	87 300	99.1
	SD	8300	0.052	42	380	18 600	13.0	SD	10 700	0.0363	14	470	17 900	55.5
Omeprazole	1	407	8.18	259	24.3	81.4	4.0	4	426	7.83	444	38.3	75.5	3.5
	2	300	11.1	423	7.36	22.3	1.5	5	388	8.58	501	6.55	32.6	1.7
	3	259	12.9	547	3.61	8.86	0.7	6	318	10.5	478	79.1	251	15.8
	Mean	322	10.7	410	11.8	37.5	2.1	Mean	377	8.96	474	41.3	120	7.0
	SD	76	2.4	145	11.0	38.6	1.7	SD	55	1.37	29	36.4	116	7.7
Metoprolol	1	85.1	39.2	3960	0.252	0.938	0.2	4	83.8	39.8	6130	0.475	1.64	0.4
	2	70.5	47.3	5200	1.12	5.57	1.6	5	92.3	36.1	5780	1.21	8.07	1.7
	3	65.6	50.9	5190	0.557	4.80	1.5	6	82.7	40.3	5400	0.569	2.44	0.6
	Mean	73.7	45.8	4780	0.643	3.77	1.1	Mean	86.3	38.7	5770	0.751	4.05	0.9
	SD	10.1	6.0	710	0.440	2.48	0.8	SD	5.3	2.3	370	0.400	3.51	0.7
Midazolam	1	256	13.0	1120	3.86	47.6	3.7	4	357	9.33	1070	9.15	49.6	2.8
	2	252	13.2	1420	5.63	38.4	3.0	5	410	8.14	1480	3.00	36.7	1.8
	3	245	13.6	2550	8.12	59.6	4.9	6	304	11.0	2220	10.6	89.4	5.9
	Mean	251	13.3	1700	5.87	48.5	3.9	Mean	357 ^a	9.47 ^a	1590	7.58	58.6	3.5
	SD	6	0.3	750	2.14	10.6	0.9	SD	53	1.41	580	4.03	27.5	2.1

^a $p < 0.05$ versus young group (*t*-test). AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, clearance; V_{ss} , steady state volume of distribution; C_{max} , maximal observed concentration; BA, oral bioavailability. The warfarin doses divided by two (0.1 and 0.5 mg/kg for intravenous and oral administration, respectively) were used for the calculations of the pharmacokinetic parameters of *R*- and *S*-warfarin.

III-3-ii) R_b , $f_{u,mic}$, 個体別 $f_{u,p}$ および $CL_{int,vitro}$ に基づく予測 CL と実測 CL の比較

Caffeine, *R*-warfarin, *S*-warfarin, omeprazole, metoprolol および midazolam の R_b , $f_{u,mic}$, 若齢および老齢サルにおける個体別血漿中 $f_{u,p}$ を Table III-2 に示した。これら薬物のサル R_b は 0.692~1.44, $f_{u,mic}$ は 0.457~1.00 であった。若齢および老齢動物の $f_{u,p}$ について、加齢による有意な変化は認められなかった。Metoprolol および caffeine の若齢サルにおける $f_{u,p}$ は 0.767 および 0.761 であり, omeprazole, *R*-warfarin, *S*-warfarin, および midazolam のそれぞれ 0.0532, 0.0122, 0.0137, および 0.0372 に比べ高い値を示した。血中動態試験に用いた個別の若齢および老齢サルから調製した肝ミクロソームを用いて代謝安定性試験を実施し, $CL_{int,vitro}$ を算出した (Table III-3)。若齢および老齢動物の間で、各薬物とも $CL_{int,vitro}$ に有意な違いは認められなかった。若齢サルにおいて、Midazolam の $CL_{int,vitro}$ は評価した薬物の中で最も大きな値を示し (1.97 mL/min/mg protein), それに次いで omeprazole (0.0970 mL/min/mg protein) および metoprolol (0.0555 mL/min/mg protein) が高い値を示した。対照的に, *R*-warfarin (0.00684 mL/min/mg protein), *S*-warfarin (0.00263 mL/min/mg protein) および caffeine (0.000315 mL/min/mg protein) の $CL_{int,vitro}$ は低い値を示した。

Table III-2. Blood to plasma ratios, plasma and microsomal protein bindings of caffeine, *R*-/*S*-warfarin, omeprazole, metoprolol and midazolam.

Compound	R_b Mean	Young					Aged				
		1	2	3	Mean	SD	4	5	6	Mean	SD
Caffeine	1.09	0.755	0.735	0.794	0.761	0.030	0.729	0.760	0.671	0.720	0.045
<i>R</i> -Warfarin	0.692	0.00763	0.00847	0.0206	0.0122	0.0073	0.00575	0.00567	0.00646	0.00596	0.00044
<i>S</i> -Warfarin	0.694	0.0103	0.0107	0.0199	0.0137	0.0054	0.00736	0.00765	0.00844	0.00782	0.00056
Omeprazole	0.776	0.0502	0.0494	0.0599	0.0532	0.0058	0.0469	0.0525	0.0526	0.0507	0.0033
Metoprolol	1.44	0.766	0.753	0.781	0.767	0.014	0.753	0.852	0.794	0.800	0.050
Midazolam	0.838	0.0361	0.0311	0.0444	0.0372	0.0067	0.0291	0.0345	0.0349	0.0328	0.0033

R_b , blood to plasma ratio ($n=3$); $f_{u,p}$, free fraction in plasma; $f_{u,mic}$, free fraction in microsomal incubation ($n=2$). There were no significant differences

between young and aged groups in terms of $f_{u,p}$ (t -test).

Table III-3. CL_{int} of caffeine, *R*- and *S*-warfarin, omeprazole, metoprolol and midazolam in the liver microsomes prepared from young and aged monkeys used in *in vivo* pharmacokinetics study.

Compound	$CL_{int,vitro}$ (mL/min/mg protein)									
	Young					Aged				
	1	2	3	Mean	SD	4	5	6	Mean	SD
Caffeine	0.000288	0.000216	0.000442	0.000315	0.000116	0.000424	0.000261	0.000310	0.000332	0.000084
<i>R</i> -Warfarin	0.00248	0.0104	0.00761	0.00684	0.00403	0.00536	0.000814	0.00350	0.00323	0.00229
<i>S</i> -Warfarin	0.00172	0.00314	0.00302	0.00263	0.00079	0.00393	0.00176	0.00406	0.00325	0.00129
Omeprazole	0.0918	0.0989	0.100	0.0970	0.0046	0.104	0.0848	0.0834	0.0907	0.0113
Metoprolol	0.0571	0.0453	0.0642	0.0555	0.0095	0.0587	0.0384	0.0401	0.0457	0.0112
Midazolam	2.60	1.53	1.77	1.97	0.56	2.11	1.70	2.34	2.05	0.32

There were no significant differences between young and aged groups (*t*-test).

次に、 $CL_{B,predicted}$ と $CL_{B,observed}$ の相関図を Figure III-2 に示した。 $CL_{B,observed}$ は静脈内投与時の血漿CLを R_b で割ることで算出した。*R-warfarin*の相関係数は、 $CL_{B,predicted}$ の算出に若齢サルの血漿蛋白結合率平均値を用いた時に比べ、若齢および老齢サル個別別の血漿蛋白結合率を用いることでより高値を示した (Figure 2B, $r=0.94$, $p=0.0051$, $n=6$)。また、midazolamの相関係数は老齢サルの肝血流量を代入することで改善した (Figure 2F, $r=0.89$, $p=0.018$, $n=6$)。若齢および老齢サル個別別の血漿蛋白結合率や老齢および若齢それぞれの肝血流量を用いて算出したmidazolamもしくは*R-warfarin*の $CL_{B,predicted}$ は、若齢サルに比べ老齢サルで小さかった。

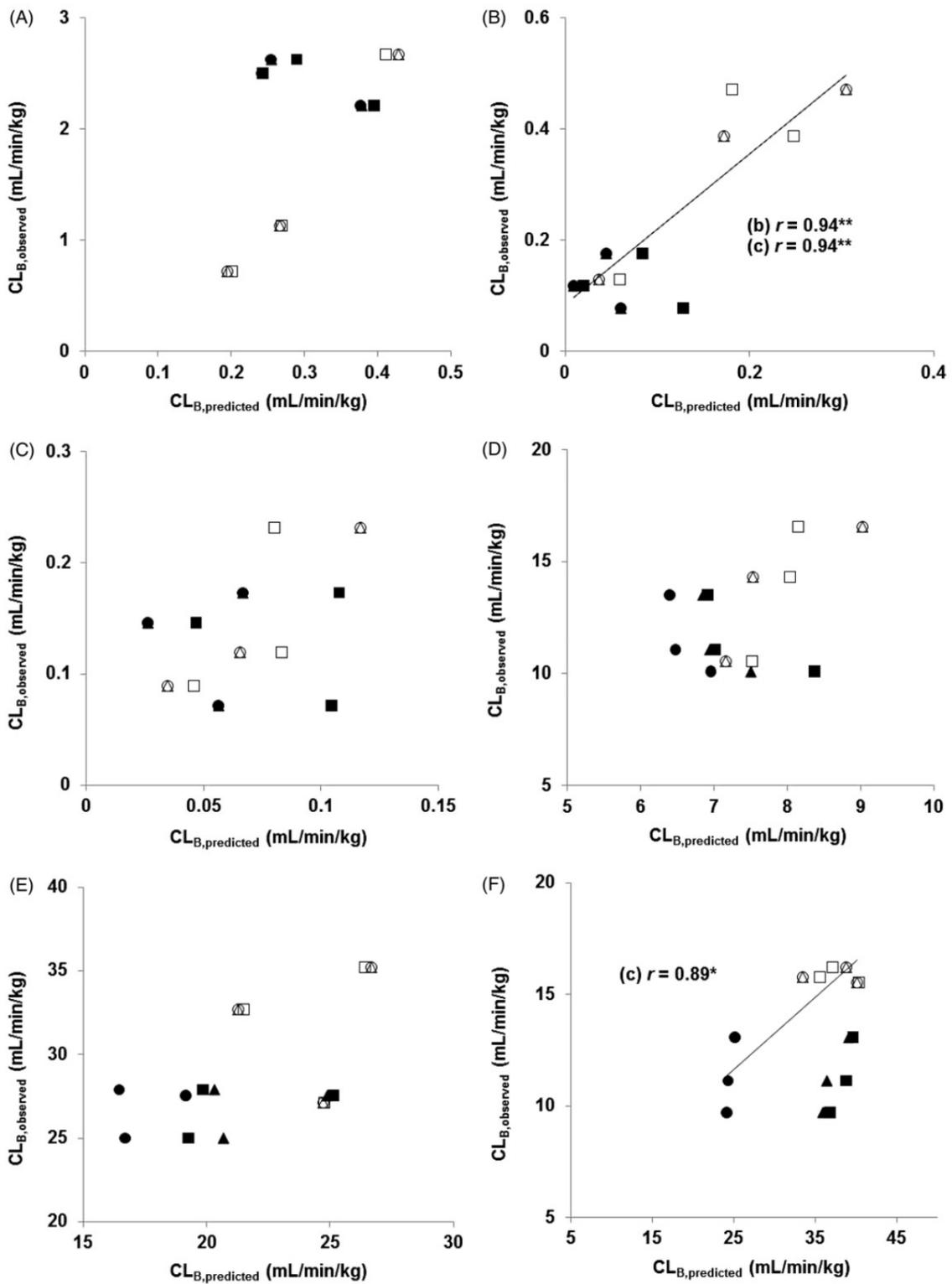


Figure III-2. Comparison plot of caffeine (A), *R*-warfarin (B), *S*-warfarin (C), omeprazole (D), metoprolol (E) and midazolam (F) between blood CL predicted using microsomal stability

($CL_{B,predicted}$) and observed *in vivo* blood CL ($CL_{B,observed}$) of young (open) and aged (closed) monkeys. $CL_{B,predicted}$ was calculated by dispersion model using individual CL_{int} estimated by microsomal stability. (a) Squares, average plasma protein binding of young monkeys and the same hepatic blood (43.6 mL/min/kg) flow both in young and aged monkeys were used for calculation. (b) Triangle, individual plasma protein binding and the same hepatic blood (43.6 mL/min/kg) flow both in young and aged monkeys were used for calculation. (c) Circle, individual plasma protein binding and as the hepatic blood flow (43.6 mL/min/kg in young monkeys and 26.0 mL/min/kg in aged monkeys) were used. Dashed and solid lines represent regression lines of (b) and (c), respectively. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, statistically significant.

III-3-iii) 加齢による $CL_{int,vitro}$ の変動

55 頭のサルより調製した個体別の肝ミクロソームを用いて caffeine, R-warfarin, S-warfarin, omeprazole, metoprolol および midazolam の $CL_{int,vitro}$ を評価し、年齢との相関性を確認した (Figure III-3). その結果、omeprazole の $CL_{int,vitro}$ ($r=0.29$, $p=0.034$, Figure III-3D) および metoprolol ($r=0.30$, $p=0.026$, Figure III-3E) の $CL_{int,vitro}$ は年齢との間に有意な逆相関が認められた. 他の薬物の $CL_{int,vitro}$ については、今回の試験条件においては年齢との有意な相関性が認められなかった.

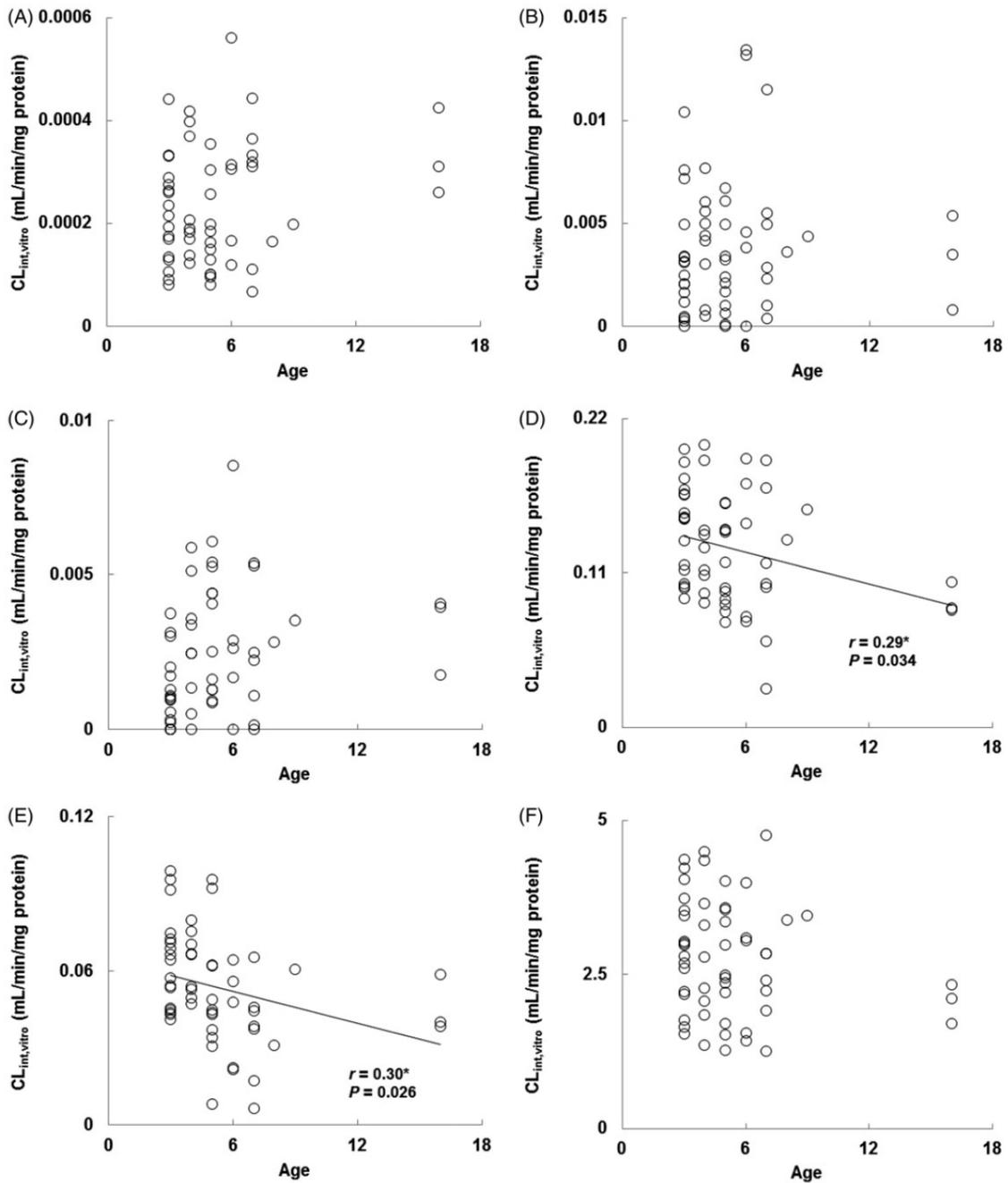


Figure III-3. Relationship between hepatic $CL_{int,vitro}$ values [of caffeine (A), *R*-warfarin (B), *S*-warfarin (C), omeprazole (D), metoprolol (E) and midazolam (F)] and their age in monkeys.

Solid line represents linear regression. * $p < 0.05$, statistically significant.

III-3-iv) Metoprolol *O*-demethylation 代謝活性の種差の検討

ヒト CYP2D6 の典型的基質である metoprolol について，酸化代謝についての評価を実施した結果を Table III-4 に示した．Metoprolol *O*-demethylation 活性速度パラメータは，ヒトとサル（*Macaca fascicularis*）の肝ミクロソーム，また，組換えヒト CYP2D6 とサル CYP2D17 および 3D44 で類似していた．一方，ヒト CYP3A4 および 3A5 と異なり，サル CYP3A4 および 3A5 は CYP2D17 および 2D44 と同様の metoprolol *O*-demethylation 代謝能を示したが，CYP3A4 および 3A5 の K_m 値は CYP2D17 および CYP2D44 に比べ高い値であった．

Table III-4. Kinetic parameters for metoprolol *O*-demethylation by liver microsomes and recombinant CYP2D and 3A enzymes.

Human	K_m , μM	V_{\max} , min^{-1}	Monkey	K_m , μM	V_{\max} , min^{-1}
Liver	49 ± 15	0.8 ± 0.1	Liver	59 ± 28	1.2 ± 0.2
2D6	11 ± 6	1.0 ± 0.1	2D17	6 ± 3	1.5 ± 0.1
			2D44	12 ± 7	1.3 ± 0.2
3A4	–	<0.01	3A4	223 ± 53	0.7 ± 0.1
3A5	–	<0.01	3A5	303 ± 115	0.9 ± 0.2

第4節 考察

本研究では，ヒト P450 の指標薬物(Turpault et al., 2009)を若齢および老齢サルにカセット投与したときの血中動態を評価した．サルにおいて caffeine, *R*-warfarin および *S*-warfarin の緩やかな血漿中からの消失，omeprazole, metoprolol および midazolam の速やかな消失が認められたが (Figure III-1)，これはヒトにおける報告と一致していた(Obach et al., 2008)．したがって，これら P450 指標薬物のサルにおける加齢による血中薬物動態の変動はヒトと比較できると考えられた．

ヒトにおいて，高齢者における midazolam の CL は若者に比べ 43%減少することが報告されている(Greenblatt et al., 1984)．今回，midazolam の老齢サルにおける CL は若齢サルよりも有意に低い値を示した (Table III-1) ことから，サルはヒトと同様，CYP3A による midazolam

の CL が加齢により減少していることが示された。

Metoprolol の代謝分子種の検討の結果、ヒトでは CYP2D6 により代謝されるが、サルにおいては、CYP2D に加え、CYP3A によっても代謝された (Table III-4)。CYP3A はサルの肝臓に最も豊富に存在する代謝酵素(Uehara et al., 2011)であることから、metoprolol はサルにおいて CYP2D 活性の指標とはならないが、midazolam 同様 CYP3A 活性の指標となると考えられた。55 頭のサル肝マイクロソームを用いて算出した metoprolol の $CL_{int,vitro}$ は年齢との有意な逆相関を示した (Figure III-3E)。midazolam の CL が加齢により低下したことと合わせ考察すると、ヒトと同様にサル CYP3A で代謝される薬物の CL は 加齢により減少することが示唆された。

R-warfarin はサル CYP2C19 により代謝を受けることが報告されている(Hosoi et al., 2012)。今回の試験において、R-warfarin の老齢における CL は若齢の 38%の値であった。この加齢による CL の変動傾向は、R-warfarin を経口投与後の老齢サルにおける C_{max} が若齢サルに比べて有意に高いことと一致していた (Table III-1)。ヒト CYP2C19 の典型的基質(Klotz et al., 2004)である omeprazole の CL は加齢により有意に減少 (homozygous extensive metabolizer の若齢者および高齢者でそれぞれ 20.6 および 5.4 L/h) することが報告されている(Ishizawa et al., 2005)。Omeprazole はサルにおいても CYP2C19 によって代謝されるが(Uno et al., 2014b)、55 頭の個別サルの肝マイクロソームを用いて算出した omeprazole の $CL_{int,vitro}$ は年齢との有意な逆相関を示した (Figure III-3D)。以上のことから、サル CYP3A と同様、CYP2C19 で代謝される薬物の CL は加齢により減少することが示唆された。

一方、サル肝 CYP2C9 の基質である caffeine (Utoh et al., 2013)のサルにおける CL は加齢による影響を受けなかった。ヒトで主に CYP2C9 により代謝を受ける S-warfarin (Takahashi et al., 1998)は、ヒトにおいて加齢により CL が有意に減少 (1 年あたり 0.3%減少) することが報告されているが(Jensen et al., 2012)、今回の試験条件下では、サル CYP2C9 による CL の加齢による低下は認められなかった。その原因としてサルにおける CYP2C9 の遺伝子多型(Uno

et al., 2014a)の影響である可能性が示唆された。

我々は以前に、サルにおいて、血漿アルブミン濃度は変化しなかったが、ヒトと同様に加齢により肝血流量が低下することを報告した(Koyanagi et al., 2014)。Acetaminophen (胃排出速度のマーカー)、antipyrene (肝代謝活性および体水分率のマーカー)、diazepam (高脂溶性であり分布容積が高い薬物)、diphenhydramine (代謝が肝血流律速。主結合蛋白が $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質) および ofloxacin (腎排泄型薬物) の体内動態に加齢による生理学的な変動がカニクイザルにおいて認められ、それは $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質および体脂肪率の増加、肝血流量、肝 CL、腎 CL および体水分率の低下、によるものと推察された(Koyanagi et al., 2014)。今回の試験において、我々は血中動態試験に用いた若齢および老齢サルについて、個体別に $CL_{int,vitro}$ および $f_{u,p}$ を評価した。ヒトにおいてアルブミンの血漿中濃度は加齢により減少するが(Viani et al., 1992)、*R-warfarin* および *S-warfarin* については加齢による $f_{u,p}$ の有意な変動が認められないことが報告されている(Jensen et al., 2012)。今回用いた P450 指標薬物については、*R-warfarin* および *S-warfarin* については若齢サルに比べ老齢サルで小さい $f_{u,p}$ を示したが有意ではなく、他の薬物についてもサルにおける加齢による $f_{u,p}$ の変動は認められなかった。

In vivo CL の加齢による変動にどの要因が影響を与えたのかを評価するため、3 頭ずつの若齢および老齢サルにおける P450 指標薬物の血中動態試験を実施し、 $CL_{B,predicted}$ および $CL_{B,observed}$ を比較した (Figure III-2)。肝 CL が低い (代謝固有 CL 律速薬物) 薬物の肝 CL は $CL=f_{u,p} \times CL_{int}$ により算出され、 $f_{u,p}$ および CL_{int} の変化により CL が影響されるが、肝血流量の影響は受けない。一方、肝 CL が高い (肝血流律速) 薬物の CL は $CL=Q_h$ となり、CL は肝血流量の変動の影響を受けるが、 $f_{u,p}$ および CL_{int} の変化の影響を受けない。中程度の肝 CL の薬物の場合、CL は $f_{u,p}$ 、 CL_{int} および肝血流量の影響を受ける。今回の試験において、caffeine、*R-warfarin*、*S-warfarin*、omeprazole、metoprolol および midazolam の若齢サルにおける血液 CL はそれぞれ 1.52、0.329、0.147、13.8、31.7 および 15.8 mL/min/kg であった。

このことから、サルにおいて、caffeine、*R*-warfarin および *S*-warfarin は固有 CL 律速薬物、metoprolol は肝血流量律速薬物、そして omeprazole および midazolam は中程度の CL の薬物であると考えられた。*R*-warfarin、*S*-warfarin および omeprazole の $CL_{B,predicted}$ および $CL_{B,observed}$ の相関性は肝血流量ではなく $f_{u,p}$ により改善し、metoprolol の相関性は $f_{u,p}$ ではなく肝血流量により改善した (Figure III-2E)。Midazolam の相関性は主に肝血流量により、また一部 $f_{u,p}$ により改善した (Figure III-2F)。Caffeine については個別別 $f_{u,p}$ および老齢における肝血流量を反映させても $CL_{B,predicted}$ および $CL_{B,observed}$ の相関性は認められなかったが、*in vivo* CL が小さく肝血流量の影響を受けないことおよび血漿蛋白結合率が低いため血漿蛋白濃度の変動の影響を受けないことを考慮すると合理的である。これらの結果から、サルにおける *in vivo* CL の加齢による変動を議論する上で、 CL_{int} だけでなく $f_{u,p}$ および肝血流量の個体ごとの値もしくは加齢による変動を考慮することが重要であると考えられた。ただし、midazolam については若齢サルにおける $CL_{B,observed}$ が 15.8 mL/min/kg であるのに対し、 $CL_{B,predicted}$ が 37.5 mL/min/kg と高く、若齢サルの肝血流量である 43.6 mL/min/kg に近い。Midazolam の $CL_{B,predicted}$ が老齢サルの肝血流量を反映させることで $CL_{B,observed}$ との相関性が改善したのは、若齢サルの $CL_{B,predicted}$ が肝血流律速状態となっていることによる影響が大きいと考えられる。一方で若齢サルの $CL_{B,observed}$ は 15.8 mL/min/kg であり、若齢サルの肝血流量の 1/3 程度であるため、肝血流律速状態ではない。今回、血中動態試験における midazolam の老齢サルの CL は若齢サルに比べ約 29% 低下した。55 頭のサル肝マイクロソームを用いた代謝試験において、加齢による有意な CL_{int} の低下は認められなかったが、ヒトにおいても同様に加齢による有意な低下は認められておらず、ヒトにおける CL 低下は肝血流量に加え肝重量の低下によることが示唆されている (Marchesini et al., 1988; Parkinson et al., 2004; Wynne et al., 1989)。老齢サルにおける肝血流量は若齢サルに比べ約 40% 低下しており、老齢サルにおける midazolam の CL 低下の一部を肝血流量の低下により説明できるが、それ以外にも、肝重量低下などの影響を与える要因が考えられ、ヒトと同様に、それらが複合的に影響した結

果 CL が低下したと推察された。

第 5 節 小括

薬物代謝への寄与率が高い CYP2C19 および CYP3A について，これらにより代謝される薬物の CL はヒトと同様に加齢により減少することが示された．これらの結果から，CYP2C19 および CYP3A で代謝される開発候補化合物のヒトにおける加齢による血中動態の変動を予測する上で，サルは有用な動物種であると考えられた．

総括

開発候補化合物の臨床試験において、予想より血漿中濃度が低いと有効性を示せず、高すぎると副作用を生じてしまうため、ヒト血漿中濃度の予測精度を向上することは、臨床試験を安全に進めかつ成功確率を高める上で極めて重要である。特に、薬剤を最も多く服用するのは高齢者であるため、医薬品開発においては高齢者の血漿中濃度予測が重要である。ヒト血漿中濃度を予測する際には、開発候補化合物の薬物動態、すなわち吸収、分布、代謝および排泄に関わる種々生理学的パラメータを加味する必要があるが、高齢者ではこれらのパラメータが変動する。そのため、高齢者血漿中濃度を予測するためには、加齢による種々生理学的パラメータの変動を加味した予測が必要となる。肝細胞を用いた代謝安定性試験や肝細胞を用いた肝取り込み試験などによる肝 CL 予測や、サルおよびイヌなどを用いた血中動態試験によりヒト血漿中濃度予測を行うが、高齢者血漿中濃度予測を行う上では二つの大きな課題がある。一つは、肝取り込み CL に及ぼす加齢の影響についてはこれまでに報告がなく、その影響を予測する上で高齢者の肝細胞を用いた肝取り込み評価を実施する必要があるが、*In vitro* 肝取り込み評価系において、高脂溶性および高蛋白結合率の化合物は、容器および肝細胞への吸着等により、精度の高い肝取り込み速度の評価および血漿蛋白結合率測定が困難であるという課題である。もう一つは、老齢動物がヒトにおける加齢による種々生理学的パラメータの変動を反映しているかについて詳細な検討が行われていないため、*in vivo* 血中動態試験による高齢者血漿中濃度予測への活用が難しいという課題である。そこで本研究では、化合物の肝取り込みに及ぼす加齢の影響を評価するための基盤を構築すべく、高脂溶性・高蛋白結合率化合物についても精度の高いヒト肝取り込み速度評価が可能となる新規 *in vitro* 肝取り込み評価系を構築すること、また、高齢者血漿中濃度予測モデル動物としての老齢カニクイザルおよびビーグル犬の有用性を検証すべく、加齢による種々生理学的パラメータの変動を確認することを研究目的とし検討を行った。

第 I 章では、高脂溶性・高蛋白結合率化合物の肝取り込み評価が可能となる新規 *in vitro*

評価系の構築を目指し検討を行った。通常の肝取り込み評価においては、緩衝液に懸濁した肝細胞を用いて化合物の肝細胞への取り込み速度を評価するが、高脂溶性・高蛋白結合率化合物は肝細胞表面や容器への非特異的吸着により肝取り込み速度の評価が困難である。また、肝 CL 予測のためには別途血漿蛋白結合率を測定する必要があるが、容器等への吸着や測定感度の問題により測定できないことがある。さらに、容器等への吸着により緩衝液中フリー化合物濃度が大きく低下するため、正確な肝取り込み速度算出のために緩衝液中フリー化合物濃度の測定も必要であり、肝取り込み評価および血漿蛋白結合率測定と合わせ合計 3 種類もの評価を必要とするため、スループットが低い。今回提唱した血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価においては、化合物の容器等への非特異的吸着を防ぐことができ、懸濁液中の血清中濃度は高蛋白結合率の化合物についてはほとんど変化がないため、測定が不要であり、さらにすでに蛋白結合が加味された状態での肝取り込み速度が算出されるため、別途血漿蛋白結合率を測定する必要がなく、スループットが高いと考えられた。そこで様々な脂溶性 (pH 7.4 における計算 LogD 値 0.071~3.5) で 99% 以上の高い蛋白結合率であり、肝取り込み過程が肝消失の律速過程であると考えられている市販化合物の肝取り込みについて血清懸濁細胞系を用いて検証したところ、緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み評価に比べ、脂溶性の高い Montelukast および Telmisartan について予測 CL と実測 CL の相関性が向上した。このことから、血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価法は、高脂溶性・高蛋白結合率化合物に関しても適用可能であり、簡便かつ予測精度の高い新規 *in vitro* 肝取り込み評価系であると考えられた。そこで、高脂溶性化合物で蛋白結合率 99.97% 以上であり、高い吸着性により蛋白結合率を測定できずヒト CL 予測困難であった自社化合物について血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価を実施した。これら自社化合物はいずれもカルボン酸を有し、肝取り込みトランスポーターの基質であり肝取り込み過程が肝消失の律速段階である可能性が考えられた化合物である。血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価により *in vivo* CL を予測し得るかを検証するため、ラット、モルモットおよびサルの

血清および肝細胞を用いて肝取り込み評価を行ったところ、予測 CL と実測 CL は良好な相関性を示した。高脂溶性・高蛋白結合率であるこれらの化合物のヒト CL は血清懸濁肝細胞を用いた肝取り込み評価により予測が可能となり、ヒトで高い血漿中濃度を示すと期待される化合物を選択することができた。

第 II 章では、カニクイザルおよびビーグル犬がヒトにおける生理学的パラメータに及ぼす加齢の影響を反映するかを明らかにするため、若齢および老齢のサルおよびイヌを用いて検討を行った。老齢のサルおよびイヌの胃内 pH は、ヒトと同様に、若齢に比べ高い値を示す個体があった。ヒトと異なり血漿中のアルブミン濃度はサルおよびイヌともに加齢により変動しなかった。α1 酸性糖蛋白質濃度はヒトで加齢により上昇するが、サルではヒトと異なり上昇は認められなかったが、イヌでは有意差はないものの上昇している可能性が示唆された。サルおよびイヌの胃排出速度の加齢による低下は、ヒトと同様に認められなかった。ヒトでは加齢により体水分率が低下するが、サルおよびイヌともに加齢による体水分率の有意な低下はなかった。ヒトで加齢により増加する体脂肪率については、サルおよびイヌともに有意ではないものの増加する傾向が認められた。サルおよびイヌにおいて加齢による肝血流量の低下が認められたが、加齢による有意な肝 CL の低下はサルにおいてのみ認められた。サルにおいては腎 CL の有意な低下が認められ、イヌにおいては有意ではないものの低下傾向を示した。以上より、サルおよびイヌは、ヒトにおける加齢による複数の生理学的パラメータの変動を反映することが示されたが、中でも、サルは薬物動態に極めて重要な肝代謝能に及ぼす加齢の影響がヒトと類似しており、ヒトにおける薬物動態に及ぼす加齢の影響を予測する上で有用な老齢動物モデルである可能性が高いと考えられた。

第 III 章では、サルの肝代謝能に及ぼす加齢の影響をより詳細に調べた。ヒトにおいて医薬品の代謝における寄与度の高い CYP3A、2C19、2C9 および 2D6 について指標薬物をサルおよびイヌに静脈内および経口投与し、サルの各 P450 代謝分子種の触媒活性に及ぼす加齢

の影響を検討した。ヒトで酸化代謝される医薬品の約半数の代謝に関与する CYP3A で代謝される midazolam のサルにおける静脈内投与時の CL は、ヒトと同様に、有意に低下した。ヒトで CYP2D6 により代謝される metoprolol は、今回の検討によってサルにおいては CYP2D に加え肝臓において最も豊富に CYP3A でも代謝されることが明らかとなり、midazolam 同様 CYP3A 活性の指標となると考えられた。55 頭の個別サル肝ミクロソームを用いて算出した metoprolol の $CL_{int,vitro}$ は年齢との有意な逆相関を示した。midazolam の CL が加齢により低下したことと合わせ考察すると、ヒトと同様にサル CYP3A で代謝される薬物の CL は加齢により低下すると考えられた。ヒトにおいて CYP2C19 の基質である omeprazole の CL は加齢により有意に低下するが、サルにおいて CYP2C19 活性の指標である R-warfarin の静脈内投与時の CL は有意ではないものの低下し、経口投与時の C_{max} は有意に低下した。

R-warfarin 同様サル CYP2C19 の基質である omeprazole の $CL_{int,vitro}$ は年齢との有意な逆相関を示したことから、CYP3A と同様、CYP2C19 で代謝される薬物の CL はサルにおいて加齢により減少することが示唆された。以上より、ヒトで薬物代謝への寄与率が高い CYP3A および 2C19 の加齢による代謝活性への影響を予測する上で、サルは有用であることが明らかとなった

以上、本研究により、高脂溶性・高蛋白結合率化合物についても簡便に精度良くヒト肝取り込み CL を予測できる血清懸濁肝細胞取り込み評価系を構築することで、肝取り込みに及ぼす加齢の影響を評価するための基盤を構築することができた。また、カニクイザルにおける加齢による種々生理学的パラメータの変動がヒトにおけるそれと類似することを確認し、高齢者血漿中濃度予測モデル動物としての老齢カニクイザルの有用性を明らかにした。今後多くの化合物について本動物モデルを用いた高齢者血漿中濃度予測が可能となる。このように、医薬品開発において極めて重要である高齢者血漿中濃度予測に関して、予測精度向上につながる新たな手法および知見を見出したことから、本研究の成果は今後の医薬品開発の成功確率向上に大きく寄与するものと期待される。

本研究の誌上発表

本論文の内容は以下原著に発表した。

Koyanagi T, Yamaura Y, Yano K, Kim S, Yamazaki H. (2014) Age-related pharmacokinetic changes of acetaminophen, antipyrine, diazepam, diphenhydramine, and ofloxacin in male cynomolgus monkeys and beagle dogs. *Xenobiotica* **44**(10):893-901.

Koyanagi T, Nakanishi Y, Murayama N, Yamaura Y, Ikeda K, Yano K, Uehara S, Utoh M, Kim S, Uno Y, Yamazaki H. (2015) Age-related changes of hepatic clearances of cytochrome P450 probes, midazolam and R-/S-warfarin in combination with caffeine, omeprazole and metoprolol in cynomolgus monkeys using *in vitro-in vivo* correlation. *Xenobiotica* **45**(4):312-21.

Koyanagi T, Yano K, Kim S, Murayama N, Yamazaki H, and Tamai I. (2018) *In vivo* hepatic clearance of lipophilic drugs predicted by *in vitro* uptake data into cryopreserved hepatocytes suspended in sera of rats, guinea pigs, monkeys, and humans. *Xenobiotica*, in press.

謝辞

本論文は筆者が小野薬品工業株式会社 薬物動態研究部門において血清懸濁ヒト肝細胞と老齢動物モデルを活用した高齢者における薬物体内動態予測に関する研究の成果をまとめたものです。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 水谷顕洋先生に謹んで深謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました薬理学研究室教授 渡邊泰男先生および衛生化学研究室教授 石井功先生に深謝の意を表します。

昭和薬科大学 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益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、多くのご指導とご助言を賜りました昭和薬科大学薬物動態学研究室准教授 清水万紀子先生に厚く御礼申し上げます。

金沢大学薬学部薬物動態学研究室教授 玉井郁巳先生には、血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価研究において終始多大なるご指導をいただきました。謹んで深謝の意を表します。

研究の機会を与えて頂くと共に、多大なる御支援と御助言を頂きました小野薬品工業株式会社 CMC・生産本部 金淳二博士，研究開発提携部 矢野浩志博士，薬物動態研究部 山浦由之博士に心から感謝の意を表します。そして、あらゆる面で多大なる御支援を頂きました小野薬品工業株式会社薬物動態研究部 布谷憲一博士に深く感謝の意を表します。

最後に、本研究に理解を示し、遂行を支えてくれた家族に心より感謝します。

参考文献

- Addison RS, Parker-Scott SL, Eadie MJ, Hooper WD, Dickinson RG. (2000). Steady-state dispositions of valproate and diflunisal alone and coadministered to healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 56, 715-21.
- Akutsu T, Kobayashi K, Sakurada K, Ikegaya H, Furihata T, Chiba K, (2007). Identification of human cytochrome p450 isozymes involved in diphenhydramine N-demethylation. *Drug Metab. Dispos. United States.* 72-8.
- Badee J, Achour B, Rostami-Hodjegan A, Galetin A. (2015). Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue. *Drug Metab. Dispos.*, 43, 424-32.
- Baker M, Parton T. (2007). Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake. *Xenobiotica*, 37, 1110-34.
- Balani SK, Xu X, Pratha V, Koss MA, Amin RD, Dufresne C, Miller RR, Arison BH, Doss GA, Chiba M and others. (1997). Metabolic profiles of montelukast sodium (Singulair), a potent cysteinyl leukotriene1 receptor antagonist, in human plasma and bile. *Drug Metab. Dispos.*, 25, 1282-7.
- Balani SK, Zhu T, Yang TJ, Liu Z, He B, Lee FW. (2002). Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 1059-62.
- Branch RA, Shand DG, Wilkinson GR, Nies AS. (1974). Increased clearance of antipyrine and d-propranolol after phenobarbital treatment in the monkey. Relative contributions of enzyme induction and increased hepatic blood flow. *J. Clin. Invest.*, 53, 1101-7.
- Brunelle FM, Verbeeck RK. (1996). Glucuronidation of diflunisal in liver and kidney microsomes of rat and man. *Xenobiotica*, 26, 123-31.

- Burczynski FJ, Wang GQ, Elmadhoun B, She YM, Roberts MS, Standing KG. (2001). Hepatocyte [3H]-palmitate uptake: effect of albumin surface charge modification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 79, 868-75.
- Cappiello M, Giuliani L, Pacifici GM. (1991). Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 41, 345-50.
- Chang T, Okerholm RA, Glazko AJ. (1974). Identification of diphenhydramine (Benadryl) metabolites in human subjects. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 9, 391-404.
- Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. (2009). Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *The AAPS journal*, 11, 262-76.
- Colussi D, Parisot C, Lefevre G. (1999). Binding of iralukast to serum proteins and erythrocytes: measurements using ultrafiltration and an erythrocyte partitioning method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 7, 167-73.
- Corsonello A, Pedone C, Incalzi RA. (2010). Age-related pharmacokinetic and pharmacodynamic changes and related risk of adverse drug reactions. *Curr. Med. Chem.*, 17, 571-84.
- Curry SH, Whelpton R, Nicholson AN, Wright CM. (1977). Behavioural and pharmacokinetic studies in the monkey (*Macaca mulatta*) with diazepam, nordiazepam and related 1,4-benzodiazepines. *Br. J. Pharmacol.*, 61, 325-30.
- Davies B, Morris T. (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.*, 10, 1093-5.
- de Bruyn T, Ufuk A, Cantrill C, Kosa RE, Bi YA, Niosi M, Modi S, Rodrigues AD, Tremaine LM, Varma MV and others. (2018). Predicting Human Clearance of OATP substrates using *Cynomolgus* monkey: In vitro-in vivo scaling of hepatic uptake clearance. *Drug Metab. Dispos.*

- De Silva JA, Koechlin BA, Bader G. (1966). Blood level distribution patterns of diazepam and its major metabolite in man. *J. Pharm. Sci.*, 55, 692-702.
- Divoll M, Ameer B, Abernethy DR, Greenblatt DJ. (1982). Age does not alter acetaminophen absorption. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 30, 240-4.
- Drach JC, Howell JP, (1968). Identification of diphenhydramine urinary metabolites in the rhesus monkey. *Biochem. Pharmacol. United States.* 2125-36.
- Drach JC, Howell JP, Borondy PE, Glazko AJ. (1970). Species differences in the metabolism of diphenhydramine (Benadryl). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 135, 849-53.
- Elseviers MM, Verpooten GA, De Broe ME, De Backer GG. (1987). Interpretation of creatinine clearance. *Lancet*, 1, 457.
- Engel G, Hofmann U, Heidemann H, Cosme J, Eichelbaum M. (1996). Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 59, 613-23.
- Gainsborough N, Maskrey VL, Nelson ML, Keating J, Sherwood RA, Jackson SH, Swift CG. (1993). The association of age with gastric emptying. *Age Ageing*, 22, 37-40.
- Greenblatt DJ, Abernethy DR, Locniskar A, Harmatz JS, Limjuco RA, Shader RI. (1984). Effect of age, gender, and obesity on midazolam kinetics. *Anesthesiology*, 61, 27-35.
- Greenblatt DJ, Divoll M, Abernethy DR, Harmatz JS, Shader RI. (1982). Antipyrine kinetics in the elderly: prediction of age-related changes in benzodiazepine oxidizing capacity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220, 120-6.
- Heading RC, Nimmo J, Prescott LF, Tothill P. (1973). The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br. J. Pharmacol.*, 47, 415-21.
- Hood RD, (2006). *Developmental and reproductive toxicology : a practical approach*. Boca Raton:

CRC Press.

- Horiuchi S. (2003). Interspecies differences in the life span distribution: Humans versus invertebrates. *Population and Development Review*, 29, 127-51.
- Hosoi Y, Uno Y, Murayama N, Fujino H, Shukuya M, Iwasaki K, Shimizu M, Utoh M, Yamazaki H. (2012). Monkey liver cytochrome P450 2C19 is involved in R- and S-warfarin 7-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, 84, 1691-5.
- Houston JB. (1994). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1469-79.
- Ikegami K, Tagawa K, Narisawa S, Osawa T. (2003). Suitability of the cynomolgus monkey as an animal model for drug absorption studies of oral dosage forms from the viewpoint of gastrointestinal physiology. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1442-7.
- Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Saito A, Harada A, Ebner T, Roth W, Igarashi T, Sugiyama Y. (2006). Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab. Dispos.*, 34, 1109-15.
- Ishizawa Y, Yasui-Furukori N, Takahata T, Sasaki M, Tateishi T. (2005). The effect of aging on the relationship between the cytochrome P450 2C19 genotype and omeprazole pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.*, 44, 1179-89.
- Iwasaki K, Murayama N, Koizumi R, Uno Y, Yamazaki H. (2010). Comparison of cytochrome P450 3A enzymes in cynomolgus monkeys and humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25, 388-91.
- Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA, Sugiyama Y. (1997). Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol. Ther.*, 73, 147-71.
- Izumi S, Nozaki Y, Kusuhara H, Hotta K, Mochizuki T, Komori T, Maeda K, Sugiyama Y. (2018).

- Relative Activity Factor (RAF)-Based Scaling of Uptake Clearance Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 in Human Hepatocytes. *Mol. Pharm.*, 15, 2277-88.
- Jensen BP, Chin PK, Roberts RL, Begg EJ. (2012). Influence of adult age on the total and free clearance and protein binding of (R)- and (S)-warfarin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 74, 797-805.
- Johnson JA, Burlew BS. (1996). Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. *Drug Metab. Dispos.*, 24, 350-5.
- Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K. (2005). Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 513-22.
- Kanazu T, Yamaguchi Y, Okamura N, Baba T, Koike M. (2004). Model for the drug-drug interaction responsible for CYP3A enzyme inhibition. I: evaluation of cynomolgus monkeys as surrogates for humans. *Xenobiotica*, 34, 391-402.
- Klotz U. (2009). Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab. Rev.*, 41, 67-76.
- Klotz U, Antonin KH, Bieck PR. (1976). Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 199, 67-73.
- Klotz U, Avant GR, Hoyumpa A, Schenker S, Wilkinson GR. (1975). The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *J. Clin. Invest.*, 55, 347-59.
- Klotz U, Schwab M, Treiber G. (2004). CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 95, 2-8.
- Kopplow K, Letschert K, Konig J, Walter B, Keppler D. (2005). Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol. Pharmacol.*, 68, 1031-8.

- Koyanagi T, Yamaura Y, Yano K, Kim S, Yamazaki H. (2014). Age-related pharmacokinetic changes of acetaminophen, antipyrine, diazepam, diphenhydramine, and ofloxacin in male cynomolgus monkeys and beagle dogs. *Xenobiotica*, 44, 893-901.
- Kumana CR, Lauder IJ, Chan M, Ko W, Lin HJ. (1987). Differences in diazepam pharmacokinetics in Chinese and white Caucasians--relation to body lipid stores. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 32, 211-5.
- Lin JH, Hooke KF, Yeh KC, Duggan DE. (1985). Dose-dependent pharmacokinetics of diflunisal in rats: dual effects of protein binding and metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 235, 402-6.
- Lode H, Hoffken G, Olschewski P, Sievers B, Kirch A, Borner K, Koeppe P. (1987). Pharmacokinetics of ofloxacin after parenteral and oral administration. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 1338-42.
- Marchesini G, Bua V, Brunori A, Bianchi G, Pisi P, Fabbri A, Zoli M, Pisi E. (1988). Galactose elimination capacity and liver volume in aging man. *Hepatology*, 8, 1079-83.
- Marcucci F, Fanelli R, Mussini E, Garattini S. (1970). Further studies on species difference in diazepam metabolism. *Eur. J. Pharmacol. Netherlands*. 253-6.
- Marcucci F, Guaitani A, Kvetina J, Mussini E, Garattini S. (1968). Species difference in diazepam metabolism and anticonvulsant effect. *Eur. J. Pharmacol.*, 4, 467-70.
- Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. (2005). 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.*, 314, 1059-67.
- McLachlan AJ, Pont LG. (2012). Drug metabolism in older people--a key consideration in achieving

- optimal outcomes with medicines. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 67, 175-80.
- Miyauchi S, Masuda M, Kim SJ, Tanaka Y, Lee KR, Iwakado S, Nemoto M, Sasaki S, Shimono K, Tanaka Y and others. (2018). The Phenomenon of Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Organic Anion Transport Polypeptide Substrates: Prediction of the In Vivo Uptake Clearance from the In Vitro Uptake by Isolated Hepatocytes Using a Facilitated-Dissociation Model. *Drug Metab. Dispos.*, 46, 259-67.
- Mizuta H, Kawazoe Y, Haga K, Ogawa K. (1990a). Effects of meals on gastric emptying and small intestinal transit times of a suspension in the beagle dog assessed using acetaminophen and salicylazosulfapyridine as markers. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 38, 2224-7.
- Mizuta H, Kawazoe Y, Ogawa K. (1990b). Gastrointestinal absorption of chlorothiazide: evaluation of a method using salicylazosulfapyridine and acetaminophen as the marker compounds for determination of the gastrointestinal transit time in the dog. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 38, 2810-3.
- Mogi M, Toda A, Iwasaki K, Kusumoto S, Takehara H, Shimizu M, Murayama N, Izumi H, Utoh M, Yamazaki H. (2012). Simultaneous pharmacokinetics assessment of caffeine, warfarin, omeprazole, metoprolol, and midazolam intravenously or orally administered to Microminipigs. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1157-64.
- Molinaro M, Villani P, Regazzi MB, Rondanelli R, Doveri G. (1992). Pharmacokinetics of ofloxacin in elderly patients and in healthy young subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 43, 105-7.
- Morihara M, Aoyagi N, Kaniwa N, Kojima S, Ogata H. (2001). Assessment of gastric acidity of Japanese subjects over the last 15 years. *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 313-5.
- Muck W. (2000). Clinical pharmacokinetics of cerivastatin. *Clin. Pharmacokinet.*, 39, 99-116.
- Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y. (2001). 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.*, 29, 1316-24.
- Noe J, Portmann R, Brun ME, Funk C. (2007). Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab. Dispos.*, 35, 1308-14.
- Obach RS, Lombardo F, Waters NJ. (2008). Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds. *Drug Metab. Dispos.*, 36, 1385-405.
- Okazaki O. (1984). Metabolic disposition of DL-8280. The second report: Absorption, distribution and excretion of ¹⁴C-DL-8280 in various animal species. *Chemotherapy (Tokyo)*, 32, 1185-202.
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. (2004). The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 199, 193-209.
- Paxton JW, Briant RH. (1984). Alpha 1-acid glycoprotein concentrations and propranolol binding in elderly patients with acute illness. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 18, 806-10.
- Petring OU, Flachs H. (1990). Inter- and intrasubject variability of gastric emptying in healthy volunteers measured by scintigraphy and paracetamol absorption. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 29, 703-8.
- Rademaker CM, Jones RW, Notarianni LJ, van Dijk A, Glerum JH, Verhoef J. (1989). Pharmacokinetics of a single dose of ofloxacin in healthy elderly subjects using noncompartmental and compartmental models. *Pharm. Weekbl. Sci.*, 11, 224-8.
- Ring BJ, Chien JY, Adkison KK, Jones HM, Rowland M, Jones RD, Yates JW, Ku MS, Gibson CR, He H and others. (2011). PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human

- pharmacokinetics, part 3: comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J. Pharm. Sci.*, 100, 4090-110.
- Russell TL, Berardi RR, Barnett JL, Dermentzoglou LC, Jarvenpaa KM, Schmaltz SP, Dressman JB. (1993). Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharm. Res.*, 10, 187-96.
- Schwartz MA, Koechlin BA, Postma E, Palmer S, Krol G. (1965). Metabolism of diazepam in rat, dog, and man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 149, 423-35.
- Schwartz MA, Postma E. (1968). Metabolism of diazepam in vitro. *Biochem. Pharmacol. United States*. 2443-9.
- Seddon T, Michelle I, Chenery RJ. (1989). Comparative drug metabolism of diazepam in hepatocytes isolated from man, rat, monkey and dog. *Biochem. Pharmacol. England*. 1657-65.
- Shimizu K, Takashima T, Yamane T, Sasaki M, Kageyama H, Hashizume Y, Maeda K, Sugiyama Y, Watanabe Y, Senda M. (2012). Whole-body distribution and radiation dosimetry of [¹¹C]telmisartan as a biomarker for hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3. *Nucl. Med. Biol.*, 39, 847-53.
- Soberman R, Brodie BB, et al. (1949). The use of antipyrine in the measurement of total body water in man. *J. Biol. Chem.*, 179, 31-42.
- Soberman RJ. (1950). Use of antipyrine in measurement of total body water in animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 74, 789-92.
- Sotaniemi EA, Arranto AJ, Pelkonen O, Pasanen M. (1997). Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 61, 331-9.
- Sudo K, Hashimoto K, Kurata T, Okazaki O, Tsumura M, Tachizawa H. (1984). Metabolic

- disposition of DL-8280. The third report: metabolism of ¹⁴C-DL-8280 in various animal species. . *Chemotherapy (Tokyo)*, 32, 1203-10.
- Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. (1998). Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics*, 8, 365-73.
- Tse FL, Jaffe JM, Troendle A. (1992). Pharmacokinetics of fluvastatin after single and multiple doses in normal volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, 32, 630-8.
- Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y, Boulenc X. (2009). Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 68, 928-35.
- Uehara S, Murayama N, Nakanishi Y, Zeldin DC, Yamazaki H, Uno Y. (2011). Immunochemical detection of cytochrome P450 enzymes in liver microsomes of 27 cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 339, 654-61.
- Uno Y, Matsushita A, Murayama N, Yamazaki H. (2014a). Genetic polymorphism of cynomolgus and rhesus macaque CYP2C9. *Drug Metab. Pharmacokinet.*
- Uno Y, Matsushita A, Shukuya M, Matsumoto Y, Murayama N, Yamazaki H. (2014b). CYP2C19 polymorphisms account for inter-individual variability of drug metabolism in cynomolgus macaques. *Biochem. Pharmacol.*, 91, 242-8.
- Uno Y, Uehara S, Kohara S, Murayama N, Yamazaki H. (2010). Cynomolgus monkey CYP2D44 newly identified in liver, metabolizes bufuralol, and dextromethorphan. *Drug Metab. Dispos.*, 38, 1486-92.
- Utoh M, Murayama N, Uno Y, Onose Y, Hosaka S, Fujino H, Shimizu M, Iwasaki K, Yamazaki H.

- (2013). Monkey liver cytochrome P450 2C9 is involved in caffeine 7-N-demethylation to form theophylline. *Xenobiotica*, 43, 1037-42.
- Varma MV, Kimoto E, Scialis R, Bi Y, Lin J, Eng H, Kalgutkar AS, El-Kattan AF, Rodrigues AD, Tremaine LM. (2017). Transporter-Mediated Hepatic Uptake Plays an Important Role in the Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Montelukast. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 101, 406-15.
- Viani A, Rizzo G, Carrai M, Pacifici GM. (1992). The effect of ageing on plasma albumin and plasma protein binding of diazepam, salicylic acid and digitoxin in healthy subjects and patients with renal impairment. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 33, 299-304.
- Vickers FF, Bowman TA, Dvorchik BH, Passananti GT, Hughes DM, Vesell ES. (1989). On the antipyrine test in laboratory animals. Studies in the dog and monkey. *Drug Metab. Dispos.*, 17, 160-5.
- Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Kanamaru H, Saito Y, Hu Z, Sugiyama Y. (2010). Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab. Dispos.*, 38, 215-22.
- Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. (2009a). Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 328, 652-62.
- Watanabe T, Kusuhara H, Watanabe T, Debori Y, Maeda K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Ogilvie BW, Parkinson A and others. (2011). Prediction of the overall renal tubular secretion and hepatic clearance of anionic drugs and a renal drug-drug interaction involving organic anion transporter 3 in humans by in vitro uptake experiments. *Drug Metab. Dispos.*, 39, 1031-8.
- Watanabe T, Maeda K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Kusuhara H, Sugiyama Y. (2009b).

- Prediction of the hepatic and renal clearance of transporter substrates in rats using in vitro uptake experiments. *Drug Metab. Dispos.*, 37, 1471-9.
- Wienkers LC, Heath TG. (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 825-33.
- Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW, James OF. (1989). The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology*, 9, 297-301.
- Wynne HA, Goudevenos J, Rawlins MD, James OF, Adams PC, Woodhouse KW. (1990). Hepatic drug clearance: the effect of age using indocyanine green as a model compound. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 30, 634-7.
- Zhou HH, Adedoyin A, Wilkinson GR, (1990). Differences in plasma binding of drugs between Caucasians and Chinese subjects. *Clin. Pharmacol. Ther. United States*. 10-7.