

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

小柳 孝史

緒言

医薬品開発において、動物およびヒト組織を用いた *in vitro* および動物の *in vivo* 試験データに基づきヒト PK 予測を実施するが、その予測結果は臨床試験に進むか否かの意思決定および臨床試験計画に多大な影響を与える。臨床試験においては、予想よりヒト血中濃度が高くなると副作用の発現リスクが高まり、逆にヒト血中濃度が低い場合には有効性を示すことができず、試験中止となる可能性がある。したがって、開発化合物のヒト PK 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。ところで、医薬品を最も多く服用するのは高齢者である。高齢者は複数の薬剤を同時に服用することも多く、臨床試験において高齢者で開発化合物の血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、高齢者における開発化合物の PK 予測は、医薬品開発において特に重要である。ヒト PK を予測する上では、開発化合物の消化管内動態、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（クリアランス、以降、CL と略す）についての予測が必要である。しかしながら、高齢者におけるこれらの要因を精度良く予測するための方法がない。特に、薬理作用を高めるために化合物の脂溶性を高めた結果、容器への吸着等により *in vitro* 試験が実施困難および得られるデータの信頼性が低いこと、高齢者の PK を精度良く予測するための老齢動物モデルが存在しないことが重大な課題である。そこで本研究では、精度の高い高齢者 PK 予測方法論の構築を目指し、特に精度向上が求められている開発化合物の肝臓への取り込み過程を評価するため、血清懸濁肝細胞を用いた新規 *in vitro* 評価系を構築するとともに、これまで研究されていない老齢のカニクイザル（サル）およびビーグル犬（イヌ）を用い、生理学的パラメータおよび薬物代謝酵素の各種指標薬物の薬物動態試験を実施することで、加齢による開発化合物のヒト PK の変動を予測する上での老齢動物の有用性を確認した。

1. 血清懸濁肝細胞を用いた取り込み試験による肝 CL の予測

ヒトにおいて、蛋白結合率が高く、肝取り込みトランスポーターの基質と考えられる酸性薬物（cerivastatin, telmisartan 等）を選択し、血清懸濁肝細胞取り込み試験を実施した。取り込み試験結果から予測されたヒト肝 CL は、従来法である緩衝液懸濁肝細胞を用いた取り込み試験より算出された肝 CL に比べ、特に高脂溶性化合物で予測精度が高かった。社内プロジェクトにおいて、高脂溶性であり蛋白結合率が極めて高い(>99.97%)ため正確な結合率を算出できず、ヒト肝 CL 予測が困難であった 6 化合物について、ラット、モルモットおよびサル血清懸濁肝細胞を用いた取り込み試験を実施した。その結果、予測肝 CL と実測値との間には良好な相関性が認められた (Figure 1)。以上より、血清懸濁肝細胞取り込み試験は、*in vitro* 試験時の容器や細胞への非特異的吸着等の問題を解決し、別途蛋白結合率を測定する必要もないことから、従来法と比較し、高蛋白結合率および高脂溶性化合物の肝 CL を精度良く簡便に予測できる新規評価系であると考えられた。

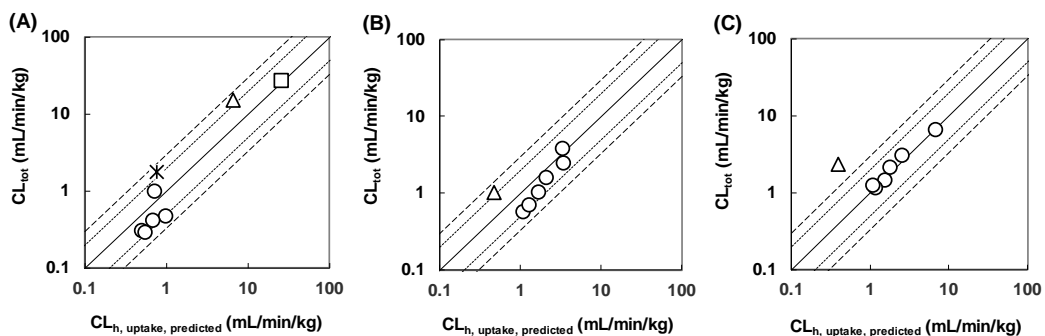


Figure 1. 血清懸濁肝細胞を用いた取り込み試験による予測肝 CL と実測 CL_{tot} との相関（左：ラット，中央：モルモット，右：サル。○：社内化合物，△：対象医薬品）

2. 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

ヒト PK に及ぼす加齢の影響を予測する上での動物モデルとしての老齢サルおよびイヌの有用性を検討するため、雄性カニクイザル（3 歳齢 6 頭および 14 - 18 歳齢 6 頭、それぞれヒトの 12~16 歳および 56~76 歳に相当）および雄性ビーグル犬（2 歳齢 3 頭および 11 歳齢 3 頭、それぞれヒトの 13~19 歳および 69~75 歳に相当）を用いて各種検討を実施した。それらの一部を Table 1 に示す。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、血漿中アルブミン濃度の加齢による変化はヒトと異なっていた。Diphenhydramine の蛋白結合率はイヌで加齢により増加傾向を示したことから、ヒトと同様に α -1 酸性糖蛋白質が増加したことが示唆されたが、サルではその変動は認められなかった。胃内容排泄速度のマーカーである acetaminophen の最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は、ヒトと同様に、サルおよびイヌにおいても加齢により変化しなかった。肝血流流速化合物と考えられ

る diphenhydramine および diazepam の CL は有意に低下したことから、ヒト同様、加齢により肝血流量が低下したことが示唆された。脂溶性が高く分布容積が大きい薬物である diazepam の分布容積 (V_{ss}) は、サルおよびイヌにおいて有意ではないもののヒトと同様に増加した。体水分率のマーカーである antipyrine の分布容積はヒトと異なり加齢による減少は認められなかった。Antipyrine は肝代謝活性のマーカーでもあり、サルにおいてはヒトと同様に加齢により CL が減少したが、イヌにおいてはその減少は認められなかった。腎機能のマーカーである ofloxacin の CL は、イヌにおいては有意ではないものの、サルおよびイヌ両種ともに加齢によりヒトと同様に減少した。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。

Table 1. Pharmacokinetic parameters of antipyrine (AP) and diphenhydramine (DPH) in young and aged monkeys after single simultaneous administration intravenously or orally.

	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 (%)
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

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus young group.

3. サルにおける加齢による各種 CYP 代謝活性の変動

サルにおけるチトクロム P450 (CYP) 活性の加齢による変動を確認することを目的に、各 P450 活性の指標薬物を用いて、若齢 (3 歳齢、ヒトの 12~16 歳に相当) および老齢 (16 歳齢、ヒトの 64~68 歳に相当) サルを用いた PK 試験、およびそれらのサルを含む 55 頭 (3~16 歳齢) から調製した肝ミクロソームによる *in vitro* 代謝安定性試験を実施した。ヒトでは現在使用される医薬品の半数以上の代謝に関与し最も重要な CYP3A について、その基質である midazolam の老齢サルにおける *in vivo* CL は若齢サルよりも有意に低い値を示した。組換え蛋白を用いた検討により、metoprolol はサルにおいて主に CYP3A によって代謝されることが示唆され、55 頭のサル肝ミクロソームによる代謝固有 CL は年齢と逆相関性を示した。これらの結果より、サルはヒトと同様、CYP3A による CL が加齢により減少していると考えられた。サルの CYP2C19 により代謝を受ける *R-warfarin* の老齢サルの *in vivo* CL は有意ではないものの若齢サルより 1/2.7 で、経口投与時の老齢サルの血漿中最大濃度 (C_{max}) は若齢サルに比べて有意に高かった。*R-warfarin* 同様 CYP2C19 により代謝を受ける omeprazole の 55 頭のサル肝ミクロソームによる代謝固有 CL が年齢と逆相関性を示したことから、サルはヒトと同様、CYP2C19 による CL が加齢により低下していることが示唆された。以上のことから、ヒト P450 の中でも薬物代謝への寄与が大きい CYP3A4 および CYP2C19 では、代謝される薬物のヒト CL に及ぼす加齢の影響を予測する上で、サルは有用な動物種であることが明らかとなった。

結論

脂溶性が高く蛋白結合率が高いために、従来法では *in vitro* 試験からのヒト肝 CL 予測が困難な化合物について、簡便に精度良くヒト肝 CL を予測できる血清懸濁肝細胞を用いた取り込み評価系を構築した。老齢動物を用いた検討により、ヒトの生理学的パラメータ、および薬物代謝において重要である CYP3A4 および CYP2C19 による薬物代謝の加齢による変化を、特に老齢サルを用いることで予測し得ることを明らかにした。以上、本研究を通して、医薬品開発において極めて重要である高齢者の PK 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。これらは第一相臨床試験のステップ数を最小限にすることで医薬品上市までの期間を短縮し、臨床試験を安全に実施し、かつ有効性を示す確率を上げることで成功確率を高め、病気で苦しむ世界の高齢患者に新規薬剤を速やかに届けることに貢献するものと強く期待される。

本研究の誌上発表

- [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. *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](#)