

博士論文

カニクイザル チトクロム P450 2C19  
分子種の遺伝子多型のワルファリン  
薬物動態に及ぼす影響に関する研究

平成 30 年度

鵜藤 雅裕

## 目次

序論.....	1
第 I 章 サル肝におけるワルファリンの <i>in vitro</i> 代謝の検討.....	4
第 1 節 緒言.....	4
第 2 節 実験材料および実験方法.....	6
I-2-i 実験材料および試薬.....	6
I-2-ii サル肝ミクロゾームの調製.....	6
I-2-iii サル P450 発現大腸菌膜画分の調製.....	7
I-2-iv R-および S-ワルファリン酸化酵素活性の測定.....	8
I-2-v 各 CYP 分子種指標基質に対する酸化酵素活性の測定.....	9
I-2-vi ドッキングシミュレーション.....	13
I-2-vii 統計学的解析.....	14
第 3 節 結果.....	14
I-3-i ヒトおよびサル肝のワルファリン酸化酵素活性の比較.....	14
I-3-ii サル肝ミクロゾームを用いたリアクションフェノタイピングの検討.....	15
I-3-iii P450 分子種阻害剤の影響.....	18
I-3-iv 組換えサル P450 分子種の R-および S-ワルファリン酸化酵素活性の検討.....	20
I-3-v R-および S-ワルファリン 7-水酸化酵素反応の速度論的解析.....	21
I-3-vi ドッキングシミュレーション.....	24
第 4 節 考察.....	25
第 5 節 小括.....	29
第 II 章 <i>mCYP2C19</i> 遺伝子型を判定したサルを用いたワルファリン薬物動態の検討.....	30
第 1 節 緒言.....	30
第 2 節 実験材料および実験方法.....	32
II-2-i 試薬.....	32
II-2-ii 動物.....	33
II-2-iii 動物実験.....	33
II-2-iv 血漿中ワルファリンおよび水酸化ワルファリン濃度測定.....	34
II-2-v データ解析.....	35
II-2-vi 統計学的解析.....	36
第 3 節 結果.....	36
II-3-i 静脈内投与後の R-および S-ワルファリンおよび代謝物の体内動態.....	36
II-3-ii 経口投与後の R-および S-ワルファリンおよび代謝物の体内動態.....	41
第 4 節 考察.....	44
第 5 節 小括.....	52

第 III 章 PBPK モデルによる R-ワルファリン薬物動態解析と予測 .....	54
第 1 節 緒言 .....	54
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	55
III-2-i 試薬 .....	55
III-2-ii <i>in vitro</i> 代謝速度の測定 .....	55
III-2-iii PBPK モデルによる解析とシミュレーション .....	56
III-2-iv 統計学的解析 .....	57
第 3 節 結果 .....	58
第 4 節 考察 .....	62
第 5 節 小括 .....	64
総括 .....	65
本論文内容の誌上発表 .....	68
謝辞 .....	69
参考文献 .....	70

## 略号

$AUC$	area under the drug concentration <i>versus</i> time curve
$AUC_{inf}$	area under the drug concentration <i>versus</i> time curve from time zero to infinity
$AUC_{last}$	area under the drug concentration <i>versus</i> time curve from time zero to the last sampling time
$AUC_{0-24}$	area under the drug concentration <i>versus</i> time curve from time zero to 24 hours
$BA$	bioavailability
$C_0$	concentration at time zero
$C_b$	blood concentration
$C_{last}$	concentration at the last sampling time point
$C_{max}$	the maximum concentration of the drug
$CL_{int}$	intrinsic clearance
$CL_h$	hepatic clearance
$CL_{h,int}$	hepatic intrinsic clearance
$CL_{h,int \text{ in vitro}}$	hepatic intrinsic clearance predicted using scaled <i>in vitro</i> intrinsic clearance
$CL_{h,int \text{ in vivo}}$	hepatic intrinsic clearance predicted by physiologically based pharmacokinetic modeling with <i>in vivo</i> data
$CL_{oral}$	oral clearance
$CL_r$	renal clearance
$CL_{total}$	total clearance
CYP	individual form of cytochrome P450
CR	contribution ratio
D	dose
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid

$E_h$	hepatic extraction ratio
Em	emission
Ex	excitation
$f_{uB}$	fraction unbound in blood
$f_{uh}$	hepatic unbound fraction
$f_{uP}$	fraction unbound in plasma
$f_m$	fraction metabolized
$F_a$	fraction absorbed
$F_g$	fraction escaping gut clearance
$F_h$	fraction escaping hepatic clearance
FI	fluorescence intensity
GFR	glomerular filtration rate
G-6-P	glucose 6 phosphate
G-6-P DH	glucose 6 phosphate dehydrogenase
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
IR	inhibition ratio
<i>i.v.</i>	intravenous
$k_a$	absorption rate constant
$k_{el}$	elimination rate constant
$K_m$	Michaelis constant
$K_{p,h}$	partition coefficient for hepatic tissue
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
M	mol/L
mRNA	messenger ribonucleic acid

<i>MRT</i>	mean residence time
MS	mass spectrometry
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotine adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
PBPK	physiologically based pharmacokinetic
P450	general term for cytochrome P450 (EC.1.14.14.1)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>p.o.</i>	oral
$Q_h$	hepatic blood flow rate
$R_b$	blood-to-plasma partition ratio
RR	reduction ratio
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SD	standard deviation
SE	standard error
SRM	selected reaction monitoring
$t_{1/2}$	elimination half life
$t_{max}$	time to peak concentration
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	unit
UV	ultraviolet
<i>U</i> value	total interaction energy
$V_{max}$	maximum velocity
$V_{ss}$	volume of distribution at steady state
$X_g$	amount in gastrointestinal tract

## 序論

近年、個別化医療進展に伴い、遺伝子変異などの薬理遺伝学情報が添付文書に記載される医薬品が増加している。とりわけ、がん治療領域では、がん細胞の遺伝子変異情報が薬剤選択に使われる一方、ヒト薬物代謝酵素の遺伝子多型情報を基に投与量が決定される治療薬も登場している（家入, 2014）。医療現場では、患者一人ひとりの薬物の血中濃度を適正な領域に保つために、薬物の動態特性、薬理遺伝学情報などを基盤とし、実地に治療薬物モニタリングを実施するなど、それぞれの患者に適した用法・用量が設定されている。このような薬物の生体内運命を規定する因子のひとつに、薬物代謝酵素チトクロム P450（総称を P450、個別分子種を CYP と記す）（Iwasaki and Uno, 2009）が挙げられる。中でも CYP3A および CYP2C 酵素群はヒトでの医薬品の代謝への関与が大きいことが指摘されている（Williams et al., 2004）。ヒトにおいては、CYP2C9 および CYP2C19 に多様な遺伝子多型があり、薬物の体内動態の個人差の主要な原因のひとつになることが知られている（家入, 2014）。ともに治療域の狭いワルファリンやフェニトインの体内動態に影響を及ぼす一因として、責任酵素である CYP2C9 の酵素機能の個人差が挙げられる。この CYP2C9 には、代謝酵素活性低下を伴う遺伝子多型 *CYP2C9\*2* および *2C9\*3* が知られている。米国のワルファリン添付文書には *CYP2C9\*2* および *2C9\*3* の診断情報をもとにワルファリンの個別化投与設計が推奨されている。同様に、CYP2C19 はプロトンポンプ阻害剤等多くの医薬品を代謝するが、日本人の約 5 人に一人が酵素活性をほとんど有しない活性欠損型の *CYP2C19\*2* および *2C19\*3* であり、これら遺伝子多型情報を基に薬物治療が考慮されている（前川ら, 2014）。さらに、薬物の適正使用のため、医薬品開発における被験薬の薬物動態に対する遺伝子多型の影響を定量的に評価するための検討方法を提示する「「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について」（薬生薬審発 0723 第 4 号 平成 30 年 7 月 23 日付 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知）が発出された（<https://www.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T180724I0150.pdf>）。この薬物相互作

用のガイドラインでは、近年のモデリング&シミュレーション技術の進展から、薬物血中濃度の予測式も幾つか採択されるようになってきた。特に動的な生理学的薬物動態 (PBPK) モデルの活用が推奨され、その予測結果を基にする使用上の注意が添付文書に記載される新薬も承認されている。このような状況下、個別化医療に役立てるための基礎研究の重要性は益々高まってきている。医薬品開発の非臨床試験では、医薬候補品の薬効を裏付ける薬効・薬理試験、一連の安全性試験が実施される。医薬候補品の薬効・毒性と薬物動態の関連付けや動態特性を明らかにするため、トキシコキネティクスや薬物動態試験が実施されるが、これらの非臨床試験の情報を臨床予測に役立てるためには、医薬候補品の *in vitro* および *in vivo* での薬物動態の特性を的確に把握し、両者の関係性を明確にすることは極めて重要である。非臨床試験では、ヒトとの類似性を考慮した実験動物の選択が推奨されている。

カニクイザル (*Macaca fascicularis*、サル) は、他の実験動物に比べて進化的にヒトに近く、解剖学的、生理学的にヒトとの類似性が高いことから重要な実験動物として、非臨床試験において広く使用されている (Uno et al., 2006)。ヒトおよびサルの CYP3A 酵素は、ともに基質認識性が類似し (Uehara et al., 2010)、脂溶性の高い薬物を代謝することから、創薬段階からサルを用いて CYP3A 基質薬物のヒトでの薬物動態の予測を試みる研究がなされている (Nishimuta et al., 2011; Mano et al., 2015)。近年では、サルを用いて医薬候補品の CYP3A 阻害および酵素誘導を評価する方法 (Ogasawara et al., 2009; Ohtsuka et al., 2010) や PBPK モデルを用いて、サルでの *in vivo* 体内動態情報を基にヒト体内動態を予測する方法 (Shida et al., 2015) など、医薬品開発の効率化に貢献する多くの基礎研究成果が報告されている。一方、CYP2C 酵素群については、ヒトとサルの基質認識性に若干の差があり、霊長類同士でありながら稀に薬物代謝の種差が認められる (Hosaka et al., 2015a, 2015b, and 2015c; Utoh et al.,). 近年、サル CYP2C8 (サル CYP は mCYP と記す)、mCYP2C9、mCYP2C19 および mCYP2C76 の各分子種の基質認識性の網羅的な解析がなされ、その全体像が明らかにされた。保坂ら (Hosaka et al., 2015b) は、89 種類のヒト CYP2C (ヒト CYP は hCYP

と記す)の基質薬物を用いて検討し、mCYP2C19とmCYP2C9のそれぞれの基質認識性はhCYP2C9あるいはhCYP2C19のそれらに概ね類似し、さらにmCYP2C8の基質認識性に関してもhCYP2C8のそれに類似していると報告している。一方で、ヒトに相同な遺伝子群のないサルmCYP2C76は多様な化合物を代謝し、ヒトで報告のない代謝物を生成することから、ヒトとサルの薬物代謝の種差の一因となる可能性がある旨が報告されている(Hosaka et al., 2015a)。近年、サルにおいても、mCYP2C9およびmCYP2C19の遺伝子多型に関する*in vitro*研究がなされ、薬物代謝酵素活性に個体差があることが報告されている(Uno et al., 2014a; Uno et al., 2015a)。このような状況下、サルでも、上述のヒトと同様に、薬物代謝酵素の遺伝子多型が各種医薬品の薬物動態に影響することが十分に推察されるが、*in vivo*での薬物動態の研究は全くなされていないのが現状である。

そこで本研究では、mCYP2C分子種のうち遺伝子多型の出現頻度が高く重要なmCYP2C19について、モデル薬物としてワルファリンを選択し、遺伝子多型のワルファリン薬物動態に及ぼす影響に関する検討を行い定量的な評価を行った。第I章では、ヒトおよびサル肝による*R/S*-ワルファリンの*in vitro*代謝の検討を行い、ヒトおよびサル肝による6-/7-水酸化代謝反応の立体選択性の相違およびサル肝による6-/7-水酸化代謝反応に関するP450酵素の同定と寄与の程度を明らかにした。第II章では、mCYP2C19の遺伝子多型[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]を持つサルを用いて*in vivo*薬物動態試験を行い、mCYP2C19遺伝子多型の*R/S*-ワルファリンの薬物動態に及ぼす影響を明らかにした。第III章では、*R*-ワルファリンの個別PBPKモデリングによる定量的評価系を構築し、mCYP2C19遺伝子変異により*R*-ワルファリンの肝クリアランスが有意に低下することを明らかにした。さらに同一個体肝の*in vitro*データと*in vivo*データの相関性を明らかにした。以上のことから、mCYP2C19分子種の遺伝子多型の非臨床研究における意義を明らかにし、加えて医薬開発候補品の動態特性、薬物代謝酵素遺伝子多型による代謝能の低下、代謝酵素の寄与率等の*in vitro*の情報を組み込んだPBPKモデルを用いた薬物体内動態の有用な解析手法の新知見を得たので、以下に詳述する。

## 第 I 章 サル肝におけるワルファリンの *in vitro* 代謝の検討

### 第 1 節 緒言

サルを用いた薬物動態試験結果をヒトの臨床薬物動態の予測に役立てるためには、サルとヒト間の薬物代謝の相違を理解する必要がある。P450 酵素はアミノ酸配列の相同性に基づいて分類される。サルおよびヒトの P450 酵素のアミノ酸配列の相同性は極めて高く、mCYP2C19 と hCYP2C9 は 93%、mCYP2C19 と hCYP2C9 は 92%、mCYP2C19 と mCYP2C9 は 94% のアミノ酸相同性を示す (Iwasaki and Uno, 2009; Hosaka et al., 2015b; Uno et al., 2016a)。mCYP2C19 は hCYP2C9 の典型的な代謝反応であるトルブタミド 4-水酸化反応を触媒し、ジクロフェナク、ワルファリンおよびフルルビプロフェン等の hCYP2C9 の指標薬を特異的に代謝することから、機能的には hCYP2C9 に類似していると報告 (Iwasaki and Uno, 2009; Hosaka et al., 2015b) されている。特にワルファリンのように代謝により消失する薬物に関しては、薬物代謝の種差を明確にすることは極めて重要である (Bullock et al., 1995; Emoto et al., 2011; Sakai et al., 2014)。mCYP2C19 の遺伝子多型の薬物動態に及ぼす影響を検討するには、薬物の吸収、分布、代謝、排泄の各プロセスのうち、多様な代謝酵素が関与する代謝プロセスが最も重要で、mCYP2C19 のワルファリン代謝への寄与の程度など *in vitro* 代謝を詳細に検討する必要がある (Hosaka et al., 2015b; Takahashi et al., 2001)。

保坂らは、ヒト同様に薬物代謝への寄与の大きい mCYP2C9 および mCYP2C19、並びにヒトにオーソログが存在しない mCYP2C76 の基質認識性を明らかにするため、ヒト P450 の代表的な基質または阻害剤、さらに、ヒト P450 2C 分子種の基質または阻害剤を加えた 89 化合物を用いて網羅的に解析し、89 化合物中 34 化合物、20 化合物および 19 化合物が、それぞれ mCYP2C19、mCYP2C9 および mCYP2C76 の基質であることを明らかにした (Hosaka et al., 2015a, 2015b, and 2015c)。mCYP2C9 は概ね hCYP2C9 および hCYP2C19 に類似した基質認識性を示し、エファビレンツが mCYP2C9 の指標基質となる可能性がある

と報告されている (Hosaka et al., 2015c; Iwasaki et al., 2016; Utoh et al., 2017)。また、保坂らは mCYP2C19 も hCYP2C9 および hCYP2C19 に概ね類似した基質認識性を示し、hCYP2C9 の指標基質として知られるジクロフェナク、フルルビプロフェンおよびワルファリンが mCYP2C19 の指標基質となる可能性があることを報告している (Hosaka et al., 2015b)。さらに、保坂らは、ジアゼパムおよびオメプラゾールは hCYP2C19 および mCYP2C19 の指標基質である可能性があることも明らかにしている (Hosaka et al., 2015b)。上記の mCYP2C19 基質化合物の中でワルファリンは、臨床での治療域が狭く、hCYP2C9 遺伝子多型情報に基づく薬物治療が考慮されている薬剤であることから、本研究の対象薬物とした。

ワルファリンは代表的な光学活性医薬品で、臨床では *S*-および *R*-ワルファリンのラセミ体として使用されている。光学活性医薬品は、分子内に光学活性中心を持ちキラル化合物の2種類の鏡像異性体 (*R* 体および *S* 体) が等モル量混合されたラセミ体の薬物で、その中には薬効発現に一方の光学活性体が他方より強く関与するもの (Villanueva et al., 1993)、あるいは、ヒトでの代謝消失において一方の代謝が優位に触媒されるものがある (Yasumori et al., 1993)。ワルファリンは、ヒトにおいては7位が優先的に水酸化されるが、*S*-ワルファリンは主に hCYP2C9 により代謝され、*R*-ワルファリンは hCYP1A2、hCYP2C19 および hCYP3A4 など複数のヒト P450 酵素により代謝される (Zhang et al., 1995, Yamazaki et al., 1997, Kaminsky et al., 1997, Yamazaki et al., 1998a, Rendic et al., 2010)。このように *R*-および *S*-ワルファリンは、ヒトにおいてはそれぞれ異なる P450 酵素により代謝され、*S*-ワルファリンの主たる代謝酵素は hCYP2C9 で、hCYP2C9 の遺伝子多型がワルファリンの体内動態に顕著な影響を及ぼすことが知られている (家入, 2014)。しかし、サルにおいては、ワルファリン代謝の立体選択性や関与する酵素などの十分な検討はなされていない。

以上の背景から、本章ではヒトおよびサル肝による *R*-/*S*-ワルファリンの *in vitro* 代謝の検討を行い、ヒトおよびサル肝によるワルファリン 6-/7-水酸化代謝反応の立体選択性の相違とこれらの代謝反応に関与するサル P450 酵素の同定と寄与の程度を明らかにした。

## 第2節 実験材料および実験方法

### I-2-i 実験材料および試薬

*R*-ワルファリン、*S*-ワルファリン、エトキシレゾルフィン、ペントキシレゾルフィン、ジクロフェナク、*S*-メフェニトイン、ブフラロール、デキストロメトर्फアンおよびクロルゾキサゾン は Sigma-Aldrich Japan より購入した。クマリン、フルルビプロフェン、ミダゾラム、 $\alpha$ -ナフトフラボン (7,8-ベンゾフラボン)、キニジンおよびケトコナゾールは和光純薬工業より購入した。その他の試薬は市販品の最高純度のものを使用した。

個別雌雄サル 20 検体 (4-9 歳) の肝は株式会社新日本科学において採取されたものを使用した。プールドヒト肝マイクロゾーム (H150 および H161) は BD Bioscience より購入した。動物肝の使用は、昭和薬科大学実験動物倫理委員会において承認された上で研究を実施した。

### I-2-ii サル肝マイクロゾームの調製

肝マイクロゾームは Inoue ら (Inoue et al., 1997) および Shimada ら (Shimada et al., 2001) の方法に従って、以下に示す手順で調製した。凍結した肝試料に肝重量あたり 3 倍容の 0.10 M Tris-塩酸 (pH 7.4) / 0.10 M 塩化カリウム / 1.0 mM EDTA (pH 7.4) ホモジネート緩衝液を添加し、肝組織をポリトロンホモジナイザーで粉砕した。テフロンホモジナイザーで懸濁し、ホモジネートを 9,000×g、4°C で 15 分間冷却遠心分離した。上清を回収し、105,000×g、4°C で 60 分間遠心分離した。上清を除き、肝重量あたり等容の 10 mM Tris-塩酸 (pH 7.4) / 1.0 mM EDTA / 20% (v/v) グリセロール緩衝液を加え、沈殿物をテフロンホモジナイザーで再懸濁した。調製した肝マイクロゾームは使用時まで -80°C で凍結保存した。

肝マイクロゾームのタンパク量は Smith ら (Smith et al., 1985) の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準タンパクとして BCA Protein Assay Kit を用いて Model 550 MICROPLATE READER (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ) を用いて測定した。肝ミ

クロゾーム中の総 P450 含量は、Omura と Sato (Omura and Sato, 1964) の方法に従い、CO 差スペクトル法により測定した。肝ミクロゾーム 100  $\mu\text{L}$  を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) / 20% (v/v) グリセロールに懸濁し、試料側のミクロゾーム懸濁液に CO を通気し、試料側および対照側にヒドロサルファイトナトリウムを少量添加し、分光光度計 U-3000 (日立製作所) により UV 500-400 nm 間のスペクトルを測定した。P450 含量の算出には分子吸光係数  $91 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  を用いた。チトクロム P450 レダクターゼ (CPR) 活性の測定は Phillips と Langdon (Phillips and Langdon, 1962) の方法に従って行い、分光光度計 U-2001 (日立製作所) により測定した。精製 CPR 1.0  $\mu\text{M}$  液 5  $\mu\text{L}$  での 1 分間あたりの吸光度変化値 0.3 を用いて CPR 発現量を算出した。基準となる精製 CPR 濃度は吸光係数  $21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  を用い算出した。サル肝ミクロゾーム中の P450 2C 酵素発現量は、抗 hCYP2C9 抗体を用いた Uehara らの方法 (Uehara et al., 2011a) により求めた。サル肝ミクロゾーム中の推定 mCYP2C19 酵素発現量は、Uno ら (Uno et al., 2011d; Uno et al., 2014a) のリアルタイム RT-PCR 法を用いて各肝試料中の mCYP2C9 および mCYP2C19 の mRNA 量比を求め、mCYP2C19 の含有比を前述の P450 2C 酵素発現量に乗じて推定した。

#### I-2-iii サル P450 発現大腸菌膜画分の調製

大腸菌発現用 pCW プラスミドベクターに mCYP1A1、1A2、2A23、2A24、2A26、2C8、2C9、2C19、2C76、2D17、2D44、2E1、3A4 および 3A5 と CPR を構築し、Guengerich ら (Guengerich et al., 1996) および Parikh ら (Parikh et al., 1997) の方法を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換した。その後、Lysogeny Broth (LB) 培地 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp Na) 3 mL で 37°C、180 rpm で 16 時間前培養後、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp Na、0.5 mM  $\delta$ -ALA および 1 mM 塩酸チアミンを加えた Terrific Broth (TB) 培地 100 mL 中に植え換え 37°C、180 rpm で 3 時間振盪培養した。3 時間後 1 mM IPTG を添加し、30°C、180 rpm でさらに 30 時間培養した。培養終了後、菌懸濁液を氷上で 1 時間放置した後、50 mL のコンカルチューブに移し、8,000 rpm (Sakuma, 50F8A-E24, SS-1500)、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を捨てて菌体を回収

し、菌 1 g あたり 15 mL の 0.2 M Tris-塩酸 (pH 7.5) / 1.0 mM EDTA / 1.0 M スクロース緩衝液、0.1 mg/mL lysozyme および 15 mL の冷却した超純水を加えた。これを氷上で 30 分間放置した後 8,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を捨て 1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 100 mL / glycerol 200 g / 酢酸マグネシウム 1.29 g / DTT 15.4 mg とした Sonication buffer を 5 mL 加え、1 mM PMSF を加えた。その後、懸濁液を氷上で冷却しながら 20 秒間、3 回超音波粉碎し、9,000 rpm、4°C で 15 分間冷却遠心後、上清を回収し 40,000 rpm、4°C で 1 時間超遠心分離した。沈殿は 1.5 mL の 10 mM Tris-塩酸 (pH 7.4) / 1.0 mM EDTA / 20% (v/v) グリセロール緩衝液で氷上にてホモジナイズし、各種 P450 / CPR 膜画分とした。P450 含量は Omura と Sato (Omura and Sato, 1964) の方法に従い、I-2-ii 項に述べた手順に準じて CO 差スペクトルを測定することにより定量した。CPR 活性の測定は Phillips と Langdon (Phillips and Langdon, 1962) の方法にしたがって行い、I-2-ii 項に準じて算出した。

#### I-2-iv R-および S-ワルファリン酸化酵素活性の測定

Lang と Böcker (Lang and Böcker, 1995) の方法を一部改変し、ヒトおよびサル肝ミクロゾームならびに大腸菌発現系サル P450 分子種による R-および S-ワルファリン酸化酵素活性は以下の方法により測定した。肝ミクロゾーム (0.1 mg protein) または大腸菌発現系サル P450 分子種 (5 pmol) をワルファリン (0-400  $\mu$ M)、NADPH 生成系 (0.5 mM NADP<sup>+</sup>、5 mM G-6-P、0.5 unit/mL G-6-P DH) および 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液に添加し、計 0.2 mL とした。水浴上 37°C で 15 分間反応させ、60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液は 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 100  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。

阻害実験の場合は、反応混液に各種阻害剤を共存させ同様の操作を行った。CYP1A 阻害剤として  $\alpha$ -ナフトフラボン、CYP2A 阻害剤としてクマリン、CYP2D 阻害剤としてキニジン、CYP2E 阻害剤としてクロルゾキサゾンおよび CYP3A 阻害剤としてケトコナゾール

を用いて、阻害剤濃度は終濃度が 1  $\mu\text{M}$  および 5  $\mu\text{M}$  となるように設定し、反応を行った。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP (150 $\times$ 4.6 mm、5  $\mu\text{m}$ 、関東化学)、移動相には 36% アセトニトリル / 0.04% リン酸を使用し、流速は 1.5 mL/min、測定波長は UV: 205 nm、Ex: 320 nm、Em: 415 nm とし、UV 波長で 6-水酸化体を、蛍光波長で 7-水酸化体を測定した。酸化酵素活性を算出するにあたり、ワルファリンの代謝物の標品である 6-水酸化ワルファリンを移動相に溶解させ、50 pmol 相当の溶液を HPLC に注入し、保持時間および基準面積を測定した。 $K_m$  および  $V_{\max}$  値は Kaleida Glaph 4.0 (Synergy Software, Reading, PA) を用いて算出した。

#### I-2-v 各 CYP 分子種指標基質に対する酸化酵素活性の測定

##### a) エトキシレゾルフィンおよびペントキシレゾルフィン O-脱アルキル化酵素活性の測定

Hanioka ら (Hanioka et al., 2000) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるエトキシレゾルフィンおよびペントキシレゾルフィン O-脱アルキル化酵素活性は以下の手順により測定した。肝マイクロゾーム (0.04 または 0.05 mg protein) をエトキシレゾルフィン (10  $\mu\text{M}$ ) またはペントキシレゾルフィン (50  $\mu\text{M}$ )、NADPH 生成系および 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応させ、メタノール (0.4 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液を 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 3% アセトニトリル / 45% メタノール / 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) を使用し、流速 0.8 mL/min、測定波長は Ex: 550 nm、Em: 585 nm とした。

##### b) クマリン 7-水酸化酵素活性の測定

Yamazaki ら (Yamazaki et al., 1994) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるクマリン 7-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝マイクロゾーム (0.05 mg protein)

をクマリン (50  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37°C で 10 分間反応させ、60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液を 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 25  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 45% アセトニトリル / 20 mM 過塩素酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) を使用し、流速 1.2 mL/min、測定波長は Ex: 338 nm、Em: 458 nm とした。

c) ジクロフェナク 4-水酸化酵素活性の測定

Yamazaki ら (Yamazaki et al., 1994) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるジクロフェナク 4-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝マイクロゾーム (0.05 mg protein) をジクロフェナク (50  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37°C で 15 分間反応させ、60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液を 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 100  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 45% アセトニトリル / 20 mM 過塩素酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) を使用し、流速 1.5 mL/min、測定波長は 280 nm とした。

d) フルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性の測定

Yamazaki ら (Yamazaki et al., 1998b) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるフルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝マイクロゾーム (0.04 mg protein) をフルルビプロフェン (100  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37°C で 15 分間反応させ、60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液を 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 25  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 45% アセトニトリル / 20mM 過塩素酸ナトリウ

ム緩衝液 (pH 2.5) を使用し、流速 1.5 mL/min、測定波長は Ex: 260 nm、Em: 320 nm とした。

e) *S*-メフェニトイン 4'-水酸化酵素活性の測定

Yamazaki ら (Yamazaki et al., 2002) の方法を一部改変し、サル肝ミクロゾームによる *S*-メフェニトイン 4'-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝ミクロゾーム (0.125 mg protein) を *S*-メフェニトイン (200  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.25 mL) とした。水浴上 37°C で 30 分間反応させ、1 M 塩酸 (0.025 mL) および酢酸エチル (1.5 mL) を添加し、反応を停止し 1 分間ボルテックスにより抽出操作を行った。2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上層の有機層 1 mL を採取し、遠心エバポレーターで乾固させた。残渣を移動相 200  $\mu$ L で再溶解し、そのうちの 100  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 25% アセトニトリル / 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を使用し、流速 1.0 mL/min、測定波長は 204 nm とした。

f) ブフラロール 1'-水酸化酵素活性の測定

Yamazaki ら (Yamazaki et al., 1994) の方法を一部改変し、サル肝ミクロゾームによるブフラロール 1'-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝ミクロゾーム (0.05 mg protein) をブフラロール (20  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37°C で 15 分間反応させ、60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液を 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清 25  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 33% アセトニトリル / 20 mM 過塩素酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) を使用し、流速 1.5 mL/min、測定波長は Ex: 252 nm、Em: 302 nm とした。

g) デキストロメトルファン O-および N-脱メチル化酵素活性の測定

Matsunaga ら (Matsunaga et al., 2009) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるデキストロメトルファン O-および N-脱メチル化酵素活性は、以下の手順により測定した。肝マイクロゾーム (0.04 mg protein) をデキストロメトルファン (400  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37°C で 15 分間反応させ、60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、反応を停止させた。反応混液を 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清 20  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 33% アセトニトリル / 20 mM 過塩素酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) を使用し、流速 1.2 mL/min、測定波長は Ex: 270 nm、Em: 370 nm とした。

h) クロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性の測定

Shimada ら (Shimada et al., 1999) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるクロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝マイクロゾーム (0.05 mg protein) をクロルゾキサゾン (50  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.2 mL) とした。水浴上 37°C で 10 分間反応させ、43% リン酸 (0.025 mL) および酢酸エチル (1.5 mL) を添加し、反応を停止させ 1 分間ボルテックスにより抽出操作を行った。反応混液を 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上層の有機層 1 mL を、遠心エバポレーターで乾固した。残渣を移動相 200  $\mu$ L で再溶解し、そのうちの 100  $\mu$ L を HPLC に注入した。HPLC の測定条件は、カラムに L-column C-8 (150 $\times$ 4.6 mm、5  $\mu$ m、化学物質評価研究機構)、移動相には 27% アセトニトリル / 0.5% リン酸を使用し、流速 1.5 mL/min、測定波長は 287 nm とした。

i) ミダゾラム 1'-および 4-水酸化酵素活性の測定

Kronbach ら (Kronbach et al., 1989) の方法を一部改変し、サル肝マイクロゾームによるミ

ダゾラム 1'-および 4-水酸化酵素活性は以下の手順により測定した。肝ミクロゾーム (0.125 mg protein) をミダゾラム (100  $\mu$ M)、NADPH 生成系および 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液 (計 0.25 mL) とした。水浴上 37°C で 15 分間反応させ、メタノール (0.25 mL) を添加し、反応を停止させた。反応後の溶液は 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 50  $\mu$ L を HPLC に注入し分析に用いた。HPLC の測定条件は、カラムに Mightysil RP-18 GP、移動相には 24% メタノール / 33% アセトニトリル / 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を使用し、流速 1.0 mL/min、測定波長は 220 nm とした。

#### I-2-vi ドッキングシミュレーション

mCYP2C19 三次元モデルの構築およびドッキングシミュレーションに関する一連の作業は、Molecular Operating Environment (MOE) ソフトウェア (ver. 2011.10, Chemical Computing Group, Montreal, Canada) を用いて行った。mCYP2C19 三次元立体構造のモデリングは hCYP 2C9 (Protein Data Bank ID:1R90) を基に行った。構造エネルギーの極小化計算は、分子力場として AMBER12EHT を用いて行った。MOE 上の Sitefinder 機能により酵素側のリガンド結合部位を探索した。選択したヘム周辺での結合部位でリガンドとのドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションの結果により得られる安定化エネルギー  $U_{dock}$  (kcal/mol) は、リガンドの歪みエネルギー ( $U_{strain}$ )、受容体とリガンドの静電相互作用エネルギー ( $U_{ele}$ )、および受容体とリガンド間のファンデルワールス相互作用エネルギー ( $U_{vdw}$ ) の総和により表される。ドッキングシミュレーションの分子力場としても AMBER12EHT を用いて行い、安定化エネルギー  $U_{dock}$  の最も小さいものをモデルとした。ドッキングシミュレーションに先立ち、モデリングした三次元構造のエネルギーは CHARMM22 force field により最小化した。ドッキングシミュレーションには ASE Dock software (Ryoka Systems) を使用し、U value およびヘムと代謝部位の距離を算出した。

## I-2-vii 統計学的解析

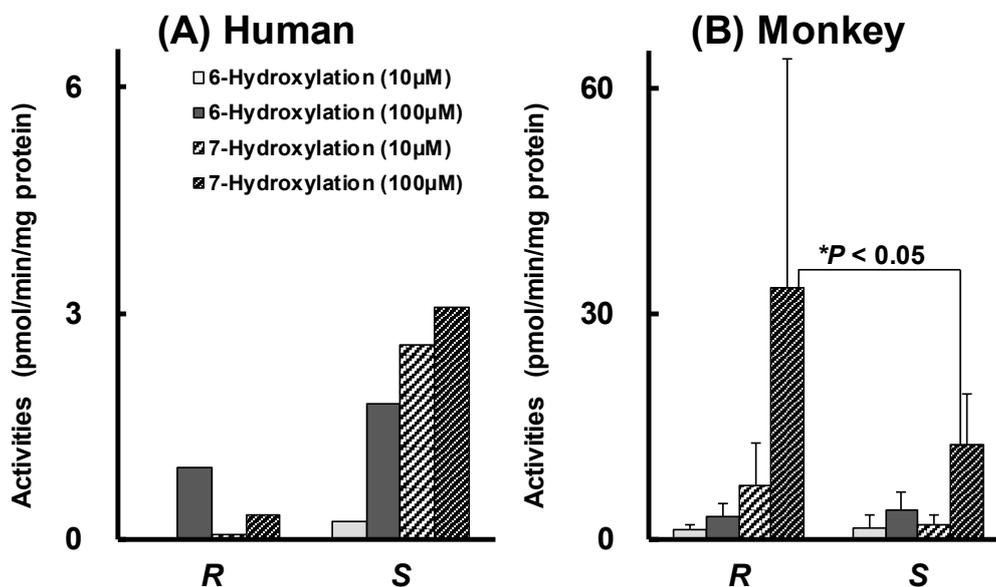
各種酸化酵素活性の統計学的解析は、InStat 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて、Linear regression analysis または Mann-Whitney U-test を行い算出した。

## 第3節 結果

### I-3-i ヒトおよびサル肝のワルファリン酸化酵素活性の比較

ワルファリン代謝について種差の検討を行うために、プールドヒトおよびサル肝マイクロゾームを用いたワルファリン酸化酵素活性(10 および 100  $\mu\text{M}$ )の測定を行った(Fig. 1-1)。ヒトおよびサル肝の主代謝物はそれぞれ *S*-7-水酸化体および *R*-7-水酸化体であり、ヒトおよびサル間の立体選択性に種差が認められた。ヒト肝の *S*-ワルファリン 6-/7-水酸化酵素活性は、*R*-ワルファリン 6-/7-水酸化酵素活性より高い酵素活性を示した。ヒト肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性 (2.6 pmol/min /mg protein) は、低濃度条件 (10  $\mu\text{M}$ ) において *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性 (0.06 pmol/min /mg protein) の 43 倍の酵素活性を示した (Fig. 1-1A)。ヒト肝の *S*-ワルファリン 6-水酸化酵素活性は高濃度条件 (100  $\mu\text{M}$ ) において *R*-ワルファリン 6-および 7-水酸化酵素活性よりも高値を示した。サル肝の *R*/*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は *R*/*S*-ワルファリン 6-水酸化酵素活性より高値を示した。サル肝の *R*-および *S*-ワルファリン 6-水酸化酵素活性は低濃度条件において類似した活性を示した。サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は、低および高濃度条件において、*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性よりも高値を示した。高濃度条件におけるサル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性 (12.6 $\pm$ 6.8 pmol/min /mg protein) は、ヒト (3.1 pmol/min /mg protein) よりも高値を示した。サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性 (33.4 $\pm$ 30.5 pmol/min /mg protein) は *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性よりも有意に高値 ( $p < 0.05$ ,  $n=20$ ) を示した。サル肝のワルファリン水酸化酵素活性値の個体間変動は大きく、低濃度および

高濃度条件における20個体のサル肝のR-ワルファリン 7-水酸化酵素活性値の変動係数は78~91%で、R-ワルファリン 6-水酸化酵素活性値の変動係数48~51%およびS-ワルファリン 7-水酸化酵素活性値の変動係数54~62%より高値を示した。



**Fig. 1-1. R- and S-warfarin 6- and 7-hydroxylation activities of liver microsomes from pooled humans (A) and individual monkeys (B).**

R- and S-warfarin 10 (□, ▨) μM and 100 (■, ▩) μM were incubated with liver microsomes from pooled humans (A) and individual monkeys (B). Rates of warfarin 6- (filled bars) and 7- (solid bars) hydroxylation are shown. Data are means (and SD in case of 20 individual monkeys of duplicate determinations). \* $p < 0.05$ , comparison of R- and S-warfarin hydroxylation activities in monkey livers was analyzed using the Mann-Whitney U test.

### I-3-ii サル肝ミクロゾームを用いたリアクションフェノタイピングの検討

サル肝のRおよびS-ワルファリン主要代謝反応を触媒するP450分子種について検討するために、個別サル肝 (n=20) のRおよびS-ワルファリン7-水酸化酵素活性と各P450分子種指標基質に対する酸化酵素活性または個別サル肝のP450 2Cおよび推定mCYP2C19発現量との相関関係について検討した (Table 1-1, Figs. 1-2 and 1-3)。サル肝のR-ワルファリン7-水酸化酵素活性はヒトP450 2B酵素の指標基質であるペントキシレゾルフィンO-脱エチル化酵素活性 ( $r=0.46, p < 0.05$ , Fig. 1-2C)、hCYP2C9の指標基質であるジクロフェナク4'-水酸化酵素活性 ( $r=0.44, p < 0.05$ , Table 1-1 and Fig. 1-2D) およびフルルビプロフェ

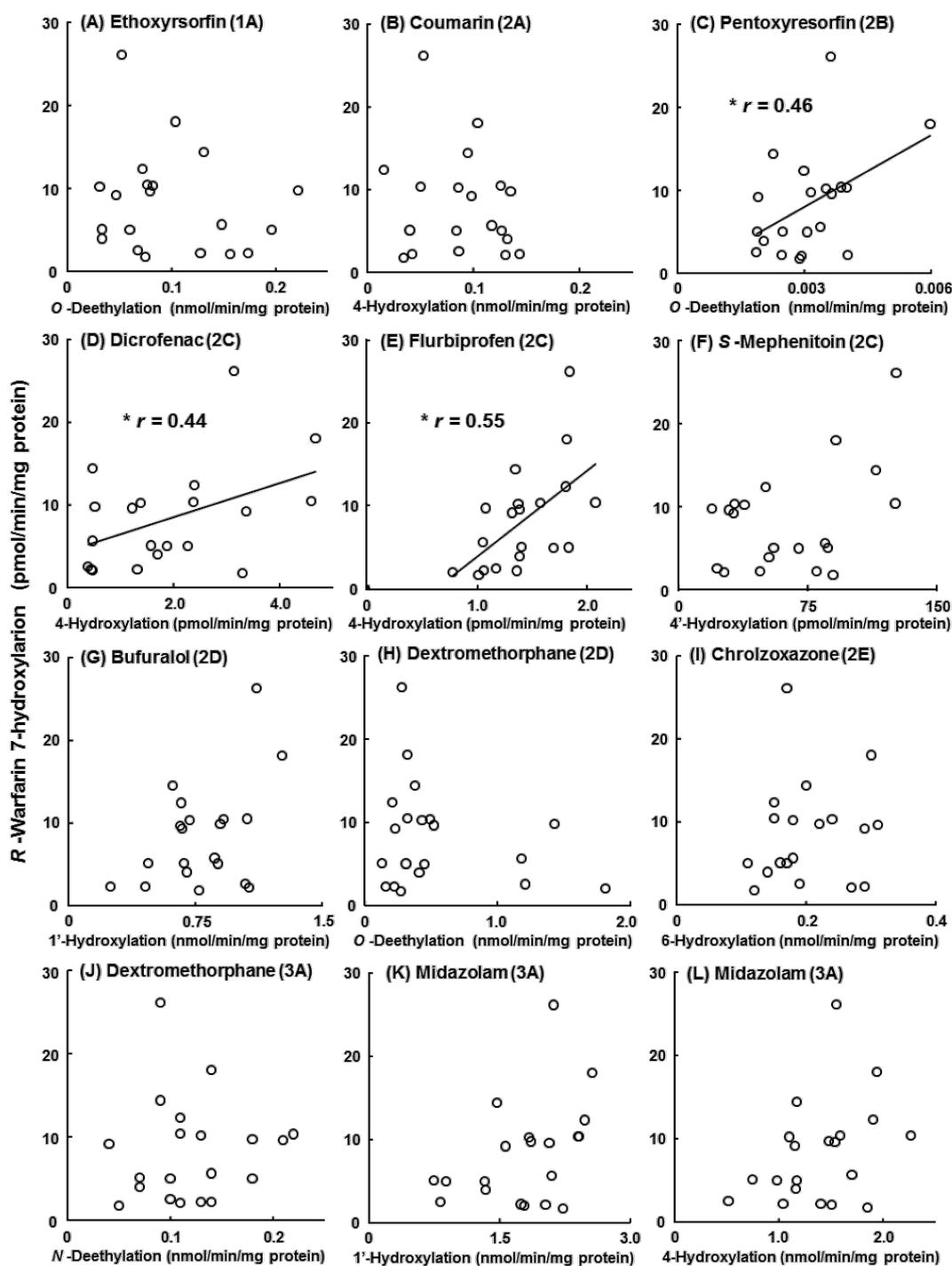
ン4-水酸化酵素活性 ( $r = 0.55, p < 0.05$ , Table 1-1 and Fig. 1-2E) との間に有意な相関が認められた。一方で、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は hCYP2C19 の指標基質である *S*-メフェニトイン 4'-水酸化酵素活性との間には有意な相関は認められなかった (Fig. 1-2F)。 *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性はヒト P450 1A、2A、2D、2E および 3A 酵素のいずれの指標基質との間にも有意な相関は認められなかった (Figs. 1-2A, 1-2B, 1-2G~1-2L)。 *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は個別サル肝ミクロゾームの総 P450 2C 発現量 (Uehara et al., 2011) との間に有意な相関は認められなかった (Table 1-1 and Fig. 1-3A)。しかしながら、 *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は推定 mCYP2C19 発現量 (Uno et al., 2011a) との間に有意な相関が認められた ( $r = 0.53, p < 0.05$ , Table 1-1 and Fig. 1-3B)。

*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性はエトキシレゾルフィン O-脱エチル化酵素活性、ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性、フルルビプロフェン 4-水酸化酵素活性、ミダゾラム 1'-水酸化酵素活性との間に有意な相関は認められなかった (Table 1-1)。以上の結果から、サルの *R*-ワルファリン 7-水酸化反応には mCYP2C19 が関与することが推察された。

**Table 1-1. Correlation between liver microsomal drug oxidation activities in 20 monkey samples and four marker drug oxidation activities or P450 2C/ 2C19 contents**

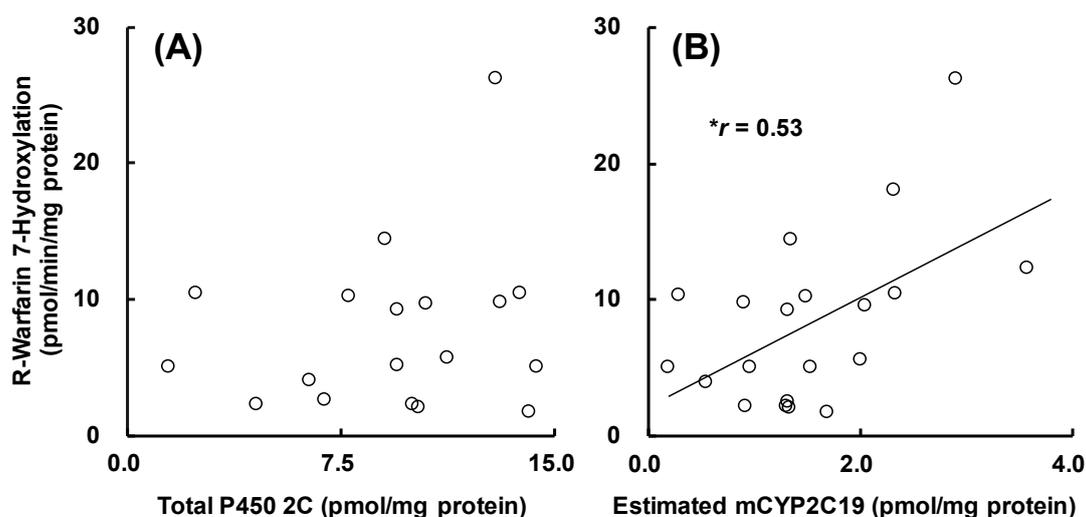
	Correlation coefficient, <i>r</i>	
	<i>R</i> -Warfarin 7-hydroxylation	<i>S</i> -Warfarin 7-hydroxylation
Ethoxyresorufin O-deethylation	0.20	0.27
Diclofenac 4'-hydroxylation	0.44*	0.02
Flurbiprofen 4-hydroxylation	0.55*	0.07
Midazolam 1'-hydroxylation	0.20	0.20
Total P450 2C content immunochemically determined	0.34	0.25
Estimated mCYP2C19 content	0.53*	0.35

\*Significant correlation coefficients ( $p < 0.05$ ). *R*- and *S*-warfarin (100  $\mu$ M) and four other typical substrates were incubated with liver microsomes from 20 individual monkeys. Estimated mCYP2C19 contents were determined based on the total immunochemically determined P450 2C contents (Uehara et al., 2011a) and the ratios of mCYP2C9 and 2C19 mRNA levels in individual monkey liver microsomes (Uno et al., 2011a).



**Fig. 1-2. Correlations between *R*-warfarin 7-hydroxylation activities and marker drug oxidation activities in 20 monkey liver microsomes.**

\*Significant correlation coefficients ( $p < 0.05$ ). *R*- and *S*-warfarin (100  $\mu$ M) and other typical substrates were incubated with liver microsomes from 20 individual monkeys.



**Fig. 1-3. Correlations between *R*-warfarin 7-hydroxylation activities and P450 2C and 2C19 contents in 20 monkey liver microsomes.**

\*Significant correlation coefficients ( $p < 0.05$ ). Estimated mCYP2C19 contents were determined based on the total immunochemically determined P450 2C contents (A) and the ratios of mRNA mCYP2C9 and 2C19 levels in individual monkey liver microsomes (B)

### I-3-iii P450 分子種阻害剤の影響

サル肝のワルファリン主要代謝反応を触媒する P450 分子種について検討するため、ヒトおよびサル肝ミクロゾームを用いてヒト P450 阻害剤添加による *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性への影響を調べた (Table 1-2)。ヒトでワルファリン代謝に関与することが明らかとなっている P450 1A および 3A の他、P450 2A、2D、2E 分子種についての阻害実験も行い、各分子種に対する阻害効果を検討した。基質として 100  $\mu$ M の *R*-および *S*-ワルファリンを用いて、それぞれの P450 分子種の阻害剤として  $\alpha$ -ナフトフラボン (ヒト P450 1A 阻害剤)、クマリン (ヒト P450 2A 基質化合物)、キニジン (ヒト P450 2D 阻害剤)、クロルゾキサゾン (ヒト P450 2E 基質化合物) およびケトコナゾール (ヒト P450 3A 阻害剤) を用いた。

ヒトの *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は、 $\alpha$ -ナフトフラボンにより 43%まで低下し、ヒトの *R*-ワルファリン 7-水酸化代謝にヒト P450 1A が関与していることが示唆された。ヒトおよびサル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は、 $\alpha$ -ナフトフラボンによりそれぞれ

れ 67%および 50%にまで低下し、ケトコナゾールによりそれぞれ 48%および 45%まで低下した。しかしながら、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は、 $\alpha$ -ナフトフラボンおよびケトコナゾールによる低下は認められなかった。クマリン、キニジンおよびクロルゾキサゾンを用いて阻害効果を検討した結果、サル肝の *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は上記阻害剤の影響を受けなかった (Table 1-2)。以上の結果から、ヒトにおける *R*-および *S*-ワルファリン代謝、およびサルにおける *S*-ワルファリン代謝に関与する P450 分子種には、共通性が認められたが、サルにおける *R*-ワルファリン代謝に関与する P450 分子種が異なる可能性が示唆された。

**Table 1-2. Effects of P450 inhibitors and substrates on the *R*- and *S*-warfarin hydroxylation activities of human and monkey liver microsomes.**

Inhibitor	$\mu$ M	Warfarin 7-hydroxylation activity (% of control)			
		Human		Monkey	
		<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
$\alpha$ -Naphthoflavone	1	45	65	95 $\pm$ 2	54 $\pm$ 5
	5	43	67	81 $\pm$ 6	50 $\pm$ 10
Coumarin	1	94	99	90	79
	5	98	98	84	74
Quinidine	1	110	89	81	101
	5	102	80	83	96
Chlorzoxazone	1	94	90	116	79
	5	79	91	91	79
Ketoconazole	1	94	69	90 $\pm$ 7	69 $\pm$ 9
	5	78	48	79 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3

*R*- and *S*-warfarin (100  $\mu$ M) were incubated with microsomes from pooled human livers and three individual monkey livers in the absence or presence of  $\alpha$ -naphthoflavone and ketoconazole. Data are means and SDs for the monkeys. The *R*- and *S*-warfarin 7-hydroxylation activities of human liver microsomes without inhibitors (controls) were 0.63 and 3.7 pmol/min/mg protein and the averages of those for microsomes from three monkey livers were 21 and 5.8 pmol/min/mg protein, respectively.

I-3-iv 組換えサル P450 分子種の *R*-および *S*-ワルファリン酸化酵素活性の検討

上述のサル肝での結果を踏まえ、さらに *R*-および *S*-ワルファリン酸化反応に関与する P450 分子種を特定するため、14 種の組換えサル P450 分子種を用いて *R*-および *S*-ワルファリン酸化酵素活性の測定を行った (Table 1-3)。低濃度条件 (10  $\mu$ M) において、mCYP2C19 は *R*-ワルファリン 6-,7-水酸化および *S*-ワルファリン 7-水酸化反応を効率よく触媒した。高濃度条件 (100  $\mu$ M) においても、mCYP2C19 は *R*-ワルファリン 6-,7-水酸化および *S*-ワルファリン 7-水酸化反応を効率よく触媒し、他の分子種と比較してそれぞれ約 40 倍、250 倍および 30 倍の活性を示し、*R*-7-水酸化反応を優先的に触媒した。その他、mCYP1A1、2A24、2C9、2C19、2C76、2D17、2D44、2E1、3A4 および 3A5 の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性も認められた。他の P450 分子種の活性は検出限界以下であった ( $< 0.01 \text{ min}^{-1}$ )。

Table 1-3. Hydroxylation of *R*- and *S*-warfarin by recombinant monkey P450s.

Monkey P450	Warfarin hydroxylation activity (pmol/min/nmol P450)							
	<i>R</i> -Warfarin				<i>S</i> -Warfarin			
	10 $\mu$ M		100 $\mu$ M		10 $\mu$ M		100 $\mu$ M	
	6-OH	7-OH	6-OH	7-OH	6-OH	7-OH	6-OH	7-OH
1A1	< 0.01	0.4	13	17	0.01	0.4	6	5.1
1A2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.8	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.3
2A23	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.9	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.1
2A24	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.2	< 0.01	0.3	< 0.01	2.7
2A26	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.4	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.7
2C8	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
2C9	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2.3	< 0.01	0.4	< 0.01	2.9
2C19	140	910	800	5,000	0.02	96	32	210
2C76	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2.4	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.2
2D17	< 0.01	< 0.01	< 0.01	4.9	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2.6
2D44	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.4	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.1
2E1	< 0.01	< 0.01	3.2	1.0	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.2
3A4	< 0.01	0.2	19	7.8	< 0.01	0.2	9.1	3.3
3A5	< 0.01	0.2	13	12	< 0.01	0.4	20	7.5

Data are the means of duplicate determinations.

サル P450 分子種酵素は、分子種ごとに異なる立体・位置選択性を示した。mCYP1A1 は R-および S-ワルファリン 6-水酸化および 7-水酸化反応を同程度触媒した。一方で、mCYP3A4 および 3A5 は主に R-および S-ワルファリン 6-水酸化反応を触媒した。R-および S-ワルファリン酸化酵素活性が確認できた組換えサル P450 分子種のうち、mCYP2A24 および 2C9 は S-ワルファリン酸化酵素活性が R-ワルファリン酸化酵素活性より高値を示したが、他の分子種では R-ワルファリン酸化酵素活性が高値を示した。これらのことからサル P450 分子種は全体として R-ワルファリン優先的に選択的に触媒することが推察された。以上の結果から、サルでは mCYP2C19 が主に R-および S-ワルファリンの代謝に関与しており、R-7-水酸化および S-7-水酸化反応が指標反応であることが示唆された。

#### I-3-v R-および S-ワルファリン 7-水酸化酵素反応の速度論的解析

上述の結果から、サルでは R-および S-ワルファリン 7-水酸化反応に mCYP2C19 が関与することが明らかとなった。一方で、ヒトでは S-ワルファリン 7-水酸化反応に hCYP2C9 が関与することが知られている (Kaminsky et al., 1997; Yamazaki et al., 1998a; Rendic et al., 2010)。すなわちサルとヒトにおいてワルファリン代謝に関与する P450 分子種に違いが認められた。そこでヒトおよびサル CYP2C 分子種の機能的な違いを明らかにするために、ヒトおよびサル遺伝子組換え CYP2C 分子種ならびにヒトおよびサル肝の R-および S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性についてミカエリス-メンテンプロットおよび速度論的パラメータを算出した (Fig. 1-4, Table 1-4)。組換え mCYP2C19 の R-および S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は基質濃度の上昇に伴い飽和した (Fig. 1-4A)。サル肝ミクロゾームを酵素源としても同様に飽和が認められた (Fig. 1-4B)。組換え mCYP2C19 の触媒する R-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値は  $7.0 \text{ min}^{-1}$  と顕著な高値を示し、 $K_m$  値は  $30 \mu\text{M}$  と低値を示した。S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値および  $K_m$  値はそれぞれ  $0.46 \text{ min}^{-1}$  および  $120 \mu\text{M}$  であった。R 体および S 体の  $V_{max}/K_m$  値はそれぞれ  $230 (\text{mM} \cdot \text{min})^{-1}$  および  $4 (\text{mM} \cdot \text{min})^{-1}$  を示し、R 体の値は S 体の値の 58 倍の高値を示した。サル肝の R-ワルファリ

ン7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値は  $0.024 \text{ min}^{-1}$  と高値を示し、 $K_m$  値は  $13 \mu\text{M}$  と低値を示した。  
*S*-ワルファリン7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値および  $K_m$  値はそれぞれ  $0.006 \text{ min}^{-1}$  および  $35 \mu\text{M}$  を示した。*R* 体および *S* 体の  $V_{max}/K_m$  値はそれぞれ  $2 \text{ (mM} \cdot \text{min)}^{-1}$  および  $0.2 \text{ (mM} \cdot \text{min)}^{-1}$  を

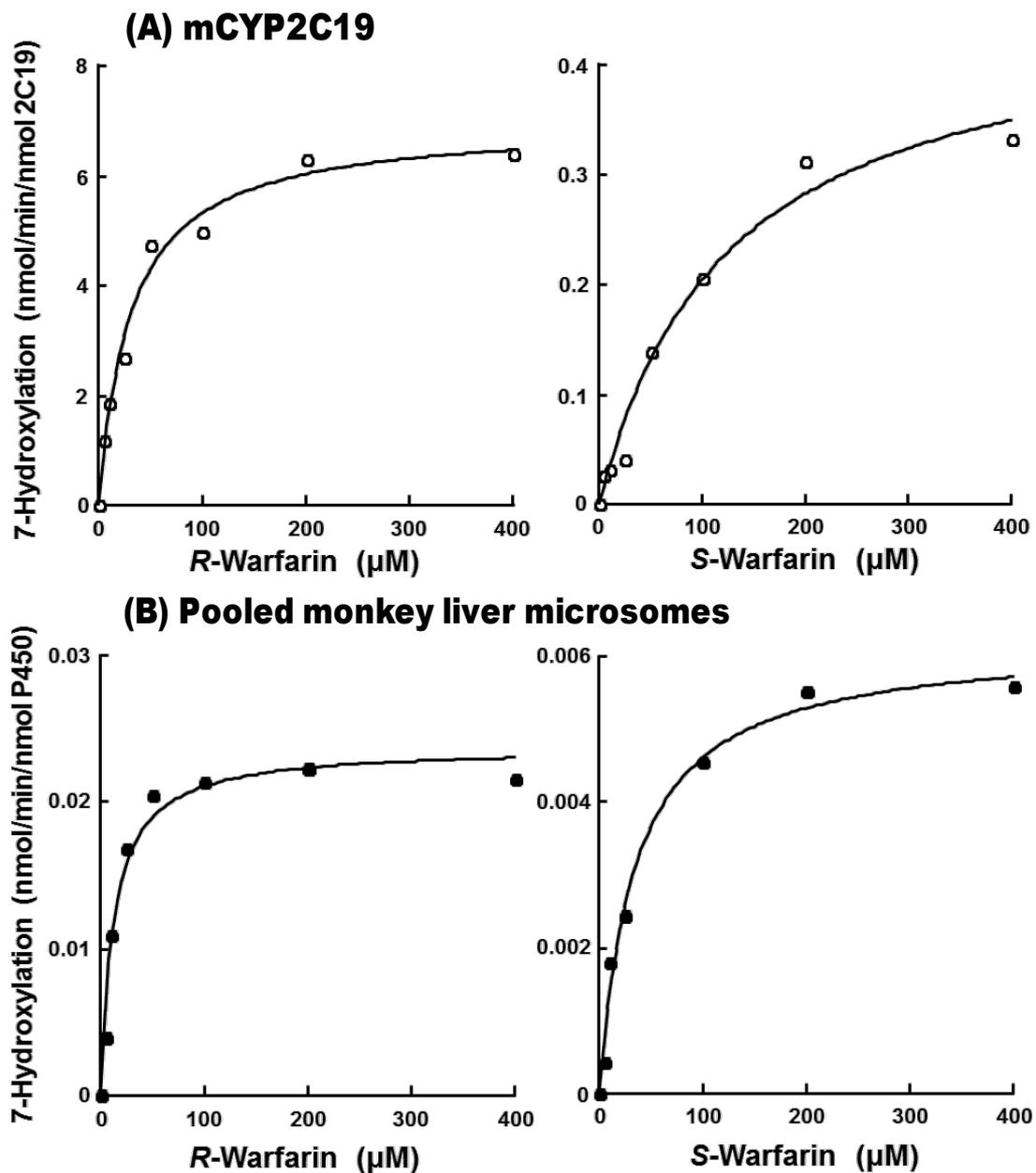


Fig. 1-4. Kinetic analyses for *R*- and *S*-warfarin 7-hydroxylation in recombinant mCYP2C19 (A) and pooled monkey liver microsomes (B).

*R*- and *S*-warfarin 7-hydroxylation activities of recombinant mCYP2C19 (○), and monkey liver microsomes (●) were determined.

示し、*R* 体の値は *S* 体の値の 10 倍の高値を示した。以上の結果から、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の速度論的パラメータは組換え mCYP2C19 と同様の傾向を示した。一方で、サル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $K_m$  値は組換え mCYP2C19 の  $K_m$  値と比較して約 1/3 の低値を示した。

組換え hCYP2C9 の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値は  $0.16 \text{ min}^{-1}$  と高値を示し、 $K_m$  値は  $10 \text{ }\mu\text{M}$  と低値を示した。*R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値および  $K_m$  値はそれぞれ  $0.008 \text{ min}^{-1}$  および  $16 \text{ }\mu\text{M}$  を示した。*R* 体および *S* 体の  $V_{max}/K_m$  値はそれぞれ  $0.5 \text{ (mM}\cdot\text{min)}^{-1}$  および  $16 \text{ (mM}\cdot\text{min)}^{-1}$  を示し、*S* 体の値は *R* 体の値の 32 倍の高値を示した。ヒト肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値は  $0.015 \text{ min}^{-1}$  と高値を示し、 $K_m$  値は  $27 \text{ }\mu\text{M}$  と低値を示した。*R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}$  値および  $K_m$  値はそれぞれ  $0.003 \text{ min}^{-1}$  および  $134 \text{ }\mu\text{M}$  を示した。*R* 体および *S* 体の  $V_{max}/K_m$  値はそれぞれ  $0.02 \text{ (mM}\cdot\text{min)}^{-1}$  および  $0.6 \text{ (mM}\cdot\text{min)}^{-1}$  を示し、*S* 体の値は *R* 体の値の 30 倍の高値を示した。以上の結果から、ヒト肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の速度論的パラメータは組換え hCYP2C9 と同様の傾向を示した。一方で、ヒト肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $K_m$  値は組換え hCYP2C9 の  $K_m$  値と比較して約 8 倍の高値を示した。

**Table 1-4. Kinetic parameters for 7-hydroxylation of *R*- and *S*-warfarin by recombinant hCYP2C9, hCYP2C19 and mCYP2C19, and by liver microsomes.**

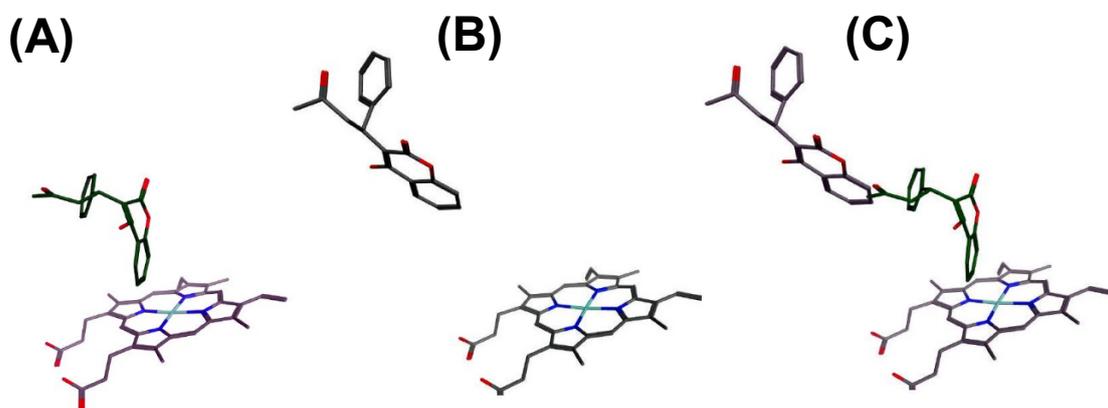
Enzymes	Warfarin 7-hydroxylation				Ratio <i>R</i> : <i>S</i>
	<i>R</i> -/ <i>S</i> -	$K_m, \mu\text{M}$	$V_{max}, \text{min}^{-1}$	$V_{max} / K_m, \text{(mM}\cdot\text{min)}^{-1}$	
hCYP2C9	<i>R</i>	$16 \pm 3$	$0.008 \pm 0.001$	0.5	1:32
	<i>S</i>	$10 \pm 1$	$0.16 \pm 0.01$	16	
hCYP2C19	<i>R</i>	$65 \pm 4$	$0.011 \pm 0.001$	0.2	5:1
	<i>S</i>	$180 \pm 29$	$0.007 \pm 0.001$	0.04	
mCYP2C19	<i>R</i>	$30 \pm 5$	$7.0 \pm 0.3$	230	58:1
	<i>S</i>	$120 \pm 30$	$0.46 \pm 0.05$	4	
Human liver microsomes	<i>R</i>	$134 \pm 27$	$0.003 \pm 0.001$	0.02	1:30
	<i>S</i>	$27 \pm 5$	$0.015 \pm 0.001$	0.6	
Monkey liver microsomes	<i>R</i>	$13 \pm 3$	$0.024 \pm 0.001$	2	10:1
	<i>S</i>	$35 \pm 6$	$0.006 \pm 0.001$	0.2	

Values of  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) and  $V_{max}$  (nmol/min/nmol CYP2C and nmol/min/nmol total P450 for CYP2Cs and liver microsomes, respectively) are shown.

Data present the mean $\pm$ SE.

### I-3-vi ドッキングシミュレーション

*R*-ワルファリンおよび*S*-ワルファリンと mCYP2C19 の *in silico* ドッキングシミュレーションを行った。シミュレーションの結果、*R*-ワルファリンは7位の炭素原子がヘムの中心を向き安定化しており、*U* value および炭素原子とヘムの距離はそれぞれ 51.47 kcal/mol および 3.88 Å であった (Fig. 1-5A)。*S*-ワルファリンは安定化エネルギーが 45.63 kcal/mol と *R*-ワルファリンと同等であったが、代謝部位とヘムの距離は 11.68 Å と *R*-ワルファリンに比較して長かった (Fig. 1-5B)。*R*-および *S*-ワルファリンの光学異性体 2 分子と mCYP2C19 のドッキングシミュレーションを行うと、Fig. 1-5C に示すように、ヘム上部に *R*-ワルファリンの7位の炭素をヘムに向けて配位し、その上部に *S*-ワルファリンが配位する構造となった。*R*-ワルファリンは *S*-ワルファリンに比べて、 $K_m$  値が 1/4 で親和性が高く、 $V_{max}/K_m$  値は約 60 倍で代謝活性が高いという速度論解析の結果 (Table 1-4) を支持する結果が得られた。



**Fig. 1-5. Docking simulation of the interaction of *R*-warfarin (A) and *S*-warfarin (B) with modeled mCYP2C19, and two enantiomers of warfarin fitted were superimposed (C).**

Oxygen, nitrogen, and iron atoms are colored with red, blue, and light blue, respectively. The ligand-P450 interaction energies (*U* value) of *R*-warfarin (A) and *S*-warfarin (B) with modeled mCYP2C19 enzyme were 51.47 kcal/mol and 45.63 kcal/mol, respectively. The distances between metabolism sites of *R*-warfarin (A) and *S*-warfarin (B) to heme iron were 3.88 Å and 11.68 Å, respectively.

#### 第4節 考察

ヒトおよびサル肝の肝ミクロゾームによる *R*-および *S*-ワルファリン酸化反応の主代謝物はともに 7-水酸化体であった。ヒト肝においては *S* 体選択的なワルファリン 7-水酸化酵素活性が認められた。これに対し、サル肝ではヒトと同程度の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性が認められたが、更に、有意に高い *R* 体選択的な 7-水酸化酵素活性が認められ ( $p < 0.05$ ,  $n=20$ )、ヒトとサル肝ではワルファリン代謝の立体選択性に種差が認められた (Fig. 1-1)。サル肝の主要代謝経路である *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性と hCYP2B の指標基質であるペントキシレゾルフィン O-脱エチル化酵素活性、hCYP2C9 の指標酵素活性であるジクロフェナク 4-水酸化酵素活性およびフルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性との間に有意な相関 ( $r = 0.46$ ,  $p < 0.05$ ,  $r = 0.44$ ,  $p < 0.05$  および  $r = 0.55$ ,  $p < 0.05$ ) が認められた (Fig. 1-2)。*R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は hCYP2C19 の指標基質である *S*-メフェニトイン 4'-水酸化酵素活性との間に相関は認められなかった。*S*-メフェニトイン 4'-水酸化酵素活性およびフルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性はそれぞれ mCYP2C9 および mCYP2C19 の指標酵素活性であることが報告されている (Uno et al., 2011a; Hosaka et al., 2015b)。*R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性とフルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性との相関係数は、ジクロフェナク 4-水酸化酵素活性との相関係数より高値を示した。さらに、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性と推定 mCYP2C19 発現量との間にも有意な相関 ( $r = 0.53$ ,  $p < 0.05$ ) が認められた。以上の結果より、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化反応には mCYP2B および mCYP2C19 が関与することが推察された。今回の *in vitro* 代謝の検討において、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性およびに大きな個体間差が認められた (Fig. 1-1B)。mCYP2C19 発現量が同程度であっても *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性に個体間差が認められた (Fig. 1-3B)。Uno らは mCYP2C19 には遺伝子多型があり、遺伝子変異により *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性が低下すると報告している (Uno et al., 2014a)。これらの結果は、サル肝で認められた *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の個体間

差の要因は、mCYP2C19 の発現量の個体間差のみならず遺伝子多型による mCYP2C19 酵素機能の個体間差も主要な要因のひとつである可能性が示唆される。サル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性と hCYP2D の指標基質であるブフラロール 1'-水酸化酵素活性との間に有意な相関 ( $r = 0.46, p < 0.05$ ) が認められた (data not shown)。しかしながら、同じ hCYP2D の指標基質であるデキストロメトर्फアン *O*-脱エチル化酵素活性との間に相関は認められなかった。ブフラロールは hCYP1A の基質であることが知られており (Yamazaki et al., 1994)、mCYP3A もブフラロールを代謝することが報告されている (Emoto et al., 2011)。したがって、サル肝においてブフラロールは mCYP2D ならびに mCYP1A および mCYP3A の指標基質である可能性が考えられる。*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性と hCYP1A、2A、2B、2C、2E および 3A のいずれの指標基質との間にも有意な相関は認められなかった。以上の結果から、サル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化反応には複数の P450 分子種が関与することが推察された。

ヒト肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は  $\alpha$ -ナフトフラボンにより 43%まで抑制されたのに対し、ケトコナゾールによる残存活性は 78%でありケトコナゾール添加による影響は  $\alpha$ -ナフトフラボンに比べて低かった (Table 1-2)。ヒト肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化反応には hCYP1A2 が関与することが知られており (Zhang et al., 1995; Yamazaki and Shimada, 1997)、今回の結果は報告と一致した。ヒト肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は  $\alpha$ -ナフトフラボンおよびケトコナゾールによってそれぞれ 65%、48%まで抑制された。ヒトの *S*-ワルファリン 7-水酸化反応には hCYP2C9 が関与することが知られており (Kaminsky and Zhang, 1997; Yamazaki et al., 1998a; Yamazaki et al., 1998b; Rendic and Guengerich, 2010)、本実験結果はその知見と一致しなかった。この原因として、hCYP2C9 による *S*-ワルファリン 7-水酸化反応の  $K_m$  値は非常に低く、阻害実験に用いた高濃度条件 (100  $\mu$ M) では hCYP2C9 による *S*-ワルファリン 7-水酸化反応は飽和状態にあり、他の P450 分子種が代謝に関与したと推察された。以上の結果から、高濃度条件における *S*-ワルファリン 7-水酸化反応には hCYP2C9 のみならず hCYP1A および hCYP3A 等の分子種が代謝に関

与すると推察された。サル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は、ヒトと同様に  $\alpha$ -ナフトフラボンおよびケトコナゾールによってそれぞれ 50%および 45%に抑制された (Table 1-1)。一方で、*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性はクマリン、キニジンおよびクロルゾキサゾンによる阻害の影響を受けなかった。以上の結果から、サルの *S*-ワルファリン 7-水酸化反応には mCYP1A および mCYP3A が関与する可能性が示唆された。サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は hCYP1A、hCYP2A、hCYP2B、hCYP2D および hCYP3A 阻害剤の影響を受けなかった。以上の結果から、上記分子種が *R*-ワルファリン 7-水酸化反応に関与する可能性は低いことが示唆された。

サル肝の *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化反応に関与する P450 分子種について、さらに詳しく検討するために 14 種の組換えサル P450 分子種を用いて *R*-および *S*-ワルファリン酸化酵素活性を測定した (Table 1-2)。組換え mCYP2C19 の単位酵素あたりの *R*-および *S*-ワルファリン水酸化酵素活性は他のいずれの分子種の活性と比較しても顕著に高いことから、mCYP2C19 がサル肝の *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化反応への寄与が大きいことが示唆された。組換え mCYP1A1、mCYP 3A4 および mCYP 3A5 は低濃度条件でも *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性が認められた。上述の阻害実験の結果を考え合わせると *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性に対する mCYP1A1、mCYP3A4 および mCYP3A5 の関与は低いと推察され、mCYP2C19 が *R*-ワルファリンの代謝に関与する主要 P450 分子種であることが強く示唆された。阻害実験の結果から mCYP1A1、mCYP 3A4 および mCYP3A5 は *S*-ワルファリン 7-水酸化反応に関与すると推察された。mCYP3A4 および mCYP3A5 は肝での存在比が高い (Uehara et al., 2011) ことから、*S*-ワルファリン 7-水酸化反応への寄与が大きいことが示唆された。以上、サル肝および組換えサル P450 分子種を用いた実験から、サルのワルファリン主要代謝経路である *R*-ワルファリン 7-水酸化反応には mCYP2C19 が主に関与することが明らかとなった。*S*-ワルファリン 7-水酸化反応には mCYP2C19 を含む複数の P450 分子種 (mCYP1A1、mCYP2C19、mCYP 3A4 および mCYP 3A5) が関与する可能性が示唆された。

組換え mCYP2C19 およびサル肝マイクロゾームを用いた *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素反応の速度論的解析より、組換え mCYP2C19 とサル肝マイクロゾームのミカエリス-メンテンプロット (Fig. 1-3) が同様の挙動を示したことから、サル肝での *R*-ワルファリン 7-水酸化反応の主要酵素が mCYP2C19 であることが明らかとなった。組換え mCYP2C19 の *R*-ワルファリン 7-水酸化反応の  $K_m$  値 (30  $\mu\text{M}$ ) はサル肝マイクロゾームの  $K_m$  値 (13  $\mu\text{M}$ ) よりも高くなったが、これは組換え mCYP2C19 の *R*-ワルファリン酸化機能が非常に高く、単一酵素の組換え酵素を用いた実験系では高濃度領域でも反応が  $V_{max}$  まで到達せず、 $K_m$  値が高くなったと推察された。サル肝マイクロゾームを用いた実験系では、単位タンパクあたりの mCYP2C19 酵素量に制限があり、より低濃度領域で反応速度が  $V_{max}$  に到達したと推察された。組換え mCYP2C19 が触媒する *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素反応の  $K_m$  値 (120  $\mu\text{M}$ ) はサル肝による代謝反応の  $K_m$  値 (35  $\mu\text{M}$ ) で大きく異なる結果となった。この原因として、サル肝の *S*-ワルファリン 7-水酸化反応には複数の分子種が関与する影響でサル肝での  $K_m$  値は組換え mCYP2C19 単独の  $K_m$  値よりも小さくなったと推察された。サル肝マイクロゾームの *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化反応にはいずれも主に mCYP2C19 が関与しており、*S*-ワルファリン 7-水酸化反応には mCYP2C19 以外にも mCYP3A 等の複数の P450 分子種が関与することが明らかとなった。サル肝マイクロゾームおよび組換え mCYP2C19 の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $V_{max}/K_m$  値は *S* 体の  $V_{max}/K_m$  値のそれぞれ 10 及び 58 倍で、組換え mCYP2C19 の  $V_{max}/K_m$  値はより高値を示した。このサル肝と組換え酵素による *R*-および *S*-ワルファリン代謝反応の立体選択性の違いは、サル肝および組換え酵素試料における mCYP2C19 の寄与の差に起因すると推察される。組換え hCYP2C9 およびヒト肝マイクロゾームを用いた *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素反応の速度論的解析より、ヒト肝での *S*-ワルファリン 7-水酸化反応の主要酵素が hCYP2C9 であることが本実験からも確認できた。組換え hCYP2C9 の *S*-ワルファリン 7-水酸化反応の  $K_m$  値 (10  $\mu\text{M}$ ) はヒト肝マイクロゾームの  $K_m$  値 (27  $\mu\text{M}$ ) よりも低値を示した。これはヒト肝の高濃度条件下での *S*-ワルファリン 7-水酸化反応には、hCYP2C9 のみならず複数の P450 分子種が関与するためだと考えられ

る。*R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性の  $K_m$  値は、組換え hCYP2C9 およびヒト肝ミクロゾーム、それぞれ 16 および 134  $\mu\text{M}$  と一致しなかった。しかし、ヒト肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化反応に関与する主要 P450 分子種は CYP1A2 であることが報告されており (Zhang et al., 1995; Yamazaki and Shimada, 1997)、hCYP2C9 の *R*-ワルファリン 7-水酸化反応への関与は低いと考えられた。以上、ヒトおよびサル肝はともに立体選択的にワルファリンを代謝するが、*R*-/*S*-立体選択性およびその代謝に関与する分子種に種差があることが明らかになり、肝ミクロゾームでみられた立体選択性の種差は代謝に関与する P450 分子種の酵素機能の差異に起因することが明らかとなった。*In silico* でドッキングシミュレーションした結果、2 分子のワルファリンの結合が予測された。Uno らは組換え mCYP2C19 を用いて詳細な検討を行い、mCYP2C19 の *R*-ワルファリン基質濃度-7-水酸化反応速度曲線はシグモイド型で、協同性の指標である Hill 係数 2.3 であり、*R*-ワルファリン自身により、代謝の活性化に寄与するホモトロピックな協同性を示すと報告している (Uno et al., 2014a)。これらの知見より、基質による酵素反応の促進と mCYP2C19 の *R*-ワルファリンに対する高親和性が相まった *R*-ワルファリン水酸化反応の高い効率性がヒトとサル間の *R*-ワルファリン代謝の顕著な種差の主要な要因のひとつになっていると推察された。

## 第 5 節 小括

ヒトおよびサル肝における *R*-および *S*-ワルファリンの *in vitro* 代謝の検討を行った。ヒトでは *S*-ワルファリンは hCYP2C9 により立体選択的に *S*-水酸化体に変換されるが、サルでの主要代謝経路は *R*-ワルファリン 7-水酸化反応で、ヒトとは異なる立体選択性を示した。サル肝 *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性はヒト肝のそれと概ね同程度であるが、*R*-7-水酸化反応は効率的であり、*S* 体に比べ有意に高い水酸化酵素活性を示した。サルにおいて *R*-ワルファリンは主に mCYP2C19 により立体選択的に *R*-7-水酸化体に変換されるが、*S*-ワルファリンは複数の P450 分子種により代謝されることが明らかとなった。

## 第II章 *mCYP2C19* 遺伝子型を判定したサルを用いたワルファリン薬物動態の検討

### 第1節 緒言

薬物の体内動態は、薬物の吸収、分布、代謝および排泄の変動要因により決定づけられる。臨床での薬物動態の個人差の主たる要因は、このうち代謝プロセスにあることが多く、遺伝、年齢、疾病などの内的要因や食事、併用薬、環境因子などの外的要因が挙げられる（横井、2001）。ヒトにおけるワルファリンの *in vivo* 体内動態は詳しく調べられ、その薬物動態（PK）パラメータなど体内動態特性が明らかにされている。ヒトにおいて、ワルファリンは消化管から速やかかつ良好に吸収され、最高血漿中濃度到達時間（ $t_{max}$ ）は0.5～1時間（土肥ら、2008）、生物学的利用率（BA）は100%であり、血中では99%以上が血漿アルブミンと結合して存在する（O'Reilly, 1969; Shetty et al., 1989）。分布容積は *R*-および *S*-ワルファリンともに0.14 L/kg（Banfield et al., 1983; Holford, 1986）、*R*-および *S*-ワルファリンの全身クリアランスは、それぞれ2.6 および4 mL/h/kg（Banfield et al., 1983）と報告されている。ワルファリンは肝で代謝され、尿中、あるいは胆汁を介して糞便中に排泄される。胆汁を介して排泄されたワルファリンの一部は再吸収され腸肝循環する。ワルファリン投与後144時間までの累積排泄率は99%に達し、尿中には投与量の約1/3が排泄される一方、未変化体はほとんど尿中には検出されない（O'Reilly, 1969）。ワルファリン単回経口投与後10日間の主要な尿中代謝物は、*R*体では6-水酸化体、7-水酸化体および *R*, *S*-ワルファリンアルコール体であり、それらの累積尿中排泄率は、それぞれ17.0%、3.4%および9.1%（合計29.5%）、一方、*S*体では6-水酸化体、7-水酸化体および *S*, *S*-ワルファリンアルコール体であり、それらの累積尿中排泄率はそれぞれ12.7%、40.0%および5.3%（合計58.0%）と報告されている（O'Reilly, 1969）。

ワルファリンは、血栓塞栓症の治療・予防薬として世界的にも古くから使用されてい

る経口抗凝固薬 (Clatanoff et al., 1954) で、ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1 (VKORC1) を阻害することにより血液凝固を抑制する。個人別の必要量が大きく異なることから、服用開始後に至適投与量を見つけるため、頻回に凝固時間を測定して、プロトロンビン時間-国際標準比 (PT-INR) を指標にして投与量の増減をはかる必要があり、患者個々に適切な投与量を決めるまで 30~60 日要する (南雲, 2013)。Sconce ら (Sconce et al., 2005) は、遺伝子多型および患者の背景因子とワルファリン用量の関係を検討し、年齢、CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型、身長が変動要因であったと報告している。これら 2 種類の遺伝子多型情報を用いて、ワルファリン初期投与量予測に関する大規模な国際共同研究が行われ (Klein et al., 2009)、米国においては添付文書に初期投与量を決める際に参考となる遺伝子型別の予想投与量域が記載され、日本においては CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型に関する情報とワルファリン療法への導入方法が一部の医薬品インタビューフォームに記載されている。

*In vivo* において、薬物代謝酵素の遺伝子変異が薬物の体内動態に影響を及ぼす場合、肝固有クリアランス ( $CL_{h,int}$ ) の程度 (肝抽出率:  $E_h$ )、代謝酵素の経口クリアランス ( $CL_{po}$ ) に対する寄与率 (CR)、遺伝子変異による  $CL_{h,int}$  の低下の程度 (RR) が重要な因子になると考えられる。例えば、ワルファリンなど hCYP2C9 の遺伝子変異により酵素活性が低下する場合、遺伝子変異の  $CL_{po}$  に及ぼす影響の程度は、hCYP2C9 の代謝寄与率が大きな薬物では、薬物の体内動態に大きな影響を及ぼす。ヒトにおいて S-ワルファリンは主に hCYP2C19 により代謝されるので、hCYP2C9\*3 変異により S-ワルファリンの  $V_{max}/K_m$  は野生型の 1/9 へ低下し、遊離型経口クリアランス ( $CL_{po,u}$ ) は約 1/10 へ低下するが、他方、ジクロフェナクでは hCYP2C9\*3 変異によりジクロフェナクの  $V_{max}/K_m$  は野生型の 1/3 への低下に留まり、CYP2C9 の代謝寄与率 ( $f_m$ ) が 30%程度と小さいため、 $CL_{po,u}$  に及ぼす CYP2C9\*3 変異の影響はほとんど認められないとの報告がある (Takahashi et al., 2000; Takahashi et al., 1998a; Takahashi et al., 1998b)。Takahashi ら (Takahashi et al., 2001) は、血漿中濃度に及ぼす遺伝子変異の影響を予測する場合には、薬物の  $f_m$ ,  $f_h$  (肝で代謝され

る割合) や  $E_h$  など、薬物ごとの動態情報を基にして genotype が phenotype に及ぼす影響を予測する必要があると報告している。

サルにおける P450 酵素群の遺伝子多型に関しては、これまでに *mCYP1B1*、*mCYP1D1*、*mCYP2C9*、*mCYP2C19*、*mCYP2C76*、*mCYP2D17*、*mCYP2D44*、*mCYP3A4* および *mCYP3A5* に関して報告 (Uno et al., 2009, 2010, 2011b, 2011c, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2016a, and 2016b) されている。この中で、*mCYP2C19* には発現頻度が 20/76 と高く基質ポケットを構成する 3 個のアミノ酸が置換した遺伝子多型[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]があると報告され、4 種類のアミノ酸置換を伴う遺伝子組換え *mCYP2C19* 酵素の機能解析がなされた (Uno et al., 2014a)。3 箇所すべてのアミノ酸が置換した *mCYP2C19* の遺伝子多型酵素の *R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリン酵素活性は、野生型に比べて、それぞれ 1/700 および 1/50 以下で、顕著に低下することが報告 (Uno et al., 2014a) されている。しかし、これら *in vitro* では顕著な酵素活性の低下がみられる *R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリンについて、*mCYP2C19* の遺伝子多型の *in vivo* 薬物動態に及ぼす影響は全く検討されていない。そこで、本章では *mCYP2C19* の遺伝子多型[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]を判定したサルを用いて *in vivo* 薬物動態試験を行い、*R*-および *S*-ワルファリンの薬物動態特性と薬物代謝酵素遺伝子多型との関係性を調べることを目的とした。

## 第 2 節 実験材料および実験方法

### II-2-i 試薬

ワルファリンナトリウム (生化学用: ラセミ体) は和光純薬工業から購入した。*R*-ワルファリン、*S*-ワルファリン、6-水酸化ワルファリン、7-水酸化ワルファリン、フェニル- $d_5$ -7-水酸化ワルファリンは、Sigma-Aldrich Co. LLC から購入した。(±)-ワルファリン- $d_5$  (フェニル- $d_5$ ) は CDN ISOTOPES から、6-水酸化ワルファリン- $d_5$  (フェニル- $d_5$ ) は TLC PharmaChem., Inc.からそれぞれ購入した。その他の試薬は購入可能な最高純度のものを購

入した。

## II-2-ii 動物

サルは、Guangxi Grandforest Scientific Primate Company (中国)、Guangdong Zhaoqing Laboratory Animals Research Center (中国)、Guangxi GuiDong Quadrumana Development & Laboratory (中国)、Nanning Fuze Animal Breeding (中国) および Angkor Primates Center (カンボジア) より入手し、株式会社新日本科学薬物代謝分析センターで馴化した。馴化期間中は毎日一般状態を観察し、少なくとも 1 週間以上異常のみられなかったサルのうち、*mCYP2C19* 遺伝子[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] (c.[(298TT>AA; 308C>T; 334ATC>CTT)]) が野生型 (4 頭)、変異型ヘテロ接合体 (4 頭) および変異型ホモ接合体 (3 頭) の雄性ザル (11 頭; 年齢 4~8 歳、体重 3.5~7.4 kg) を使用した。動物は 12 時間の明暗期サイクルで温湿度管理された室内で飼育し最終の試料採取が終了するまで毎日一般状態を観察した。薬物投与前日は 17 時前後に残った餌を除去し、動物を薬物投与前 16~20 時間絶食し、投与 4 時間後から再給餌した。薬物投与前の終夜絶食時を除いて、固型飼料 (HF Primate J 12G, Purina Mills, Llc) 約 108 g (約 12 g × 9 個) を 1 日 1 回 11 時前後に与え、翌日の一般状態観察を行う際に残った餌を除去した。薬物投与前から薬物投与後 1 時間までの間を除き、水道法水質基準に適合した水を給水ボトルに入れ自由に飲ませた。動物実験に関するすべての手続きおよび操作は、株式会社新日本科学薬物代謝分析センターの動物の管理と使用に関する所内動物実験委員会で承認されており、動物実験委員会が定める倫理基準に従って実施した。

## II-2-iii 動物実験

上記 11 頭のサルを使用し、2 期に分けて薬物動態実験を行った。第 1 期および第 2 期にそれぞれワルファリン (ラセミ体) の単回経口投与および単回静脈内投与試験を行った。第 1 期はワルファリンを経口投与し、第 2 期は第 1 期終了から 12 週間後に開始した。塩

酸ワルファリンを注射用水（経口投与用）あるいは生理食塩液（静脈内投与用）に溶解させて投与液を調製した。これを 1.0 mg/kg の用量（1 mL/kg）で、動物に胃内投与または前腕橈側皮静脈内より急速投与した。経口投与後 15、30 分、1、2、4、8、24、48、72、96、168、240 および 360 時間、および、静脈内投与後 5、15、30 分、1、2、4、8、24、48、72、96、168、240 および 336 時間に、大腿静脈よりヘパリン処理したシリンジを用いて採血した。採取した血液を遠心後、血漿をとり速やかに凍結保存した（設定温度：-70°C）。

#### II-2-iv 血漿中ワルファリンおよび水酸化ワルファリン濃度測定

血漿 50  $\mu$ L に内標準（ワルファリン-d<sub>5</sub>、7-水酸化ワルファリン-d<sub>5</sub>）溶液 10  $\mu$ L、超純水 200  $\mu$ L および 0.1 mol/L の塩酸溶液 10  $\mu$ L を加えよく攪拌し、前処理試料を調製した。あらかじめメタノール 200  $\mu$ L および超純水 200  $\mu$ L を用いてコンディショニングしておいた固相抽出プレート（Oasis MAX  $\mu$ Elution plate 30  $\mu$ m, Waters Corporation）の各ウェルに前処理試料を負荷した。その後、固相抽出プレートを 2%アンモニア水 200  $\mu$ L、超純水 200  $\mu$ L、メタノール 200  $\mu$ L で洗浄した。測定対象物質を 5%ギ酸含有のメタノール：アセトニトリル（1：1）溶液 50  $\mu$ L を用いて溶出させた。溶出液に超純水 50  $\mu$ L を加え攪拌し測定試料を調製した。なお、血漿中濃度の算出および測定の精度管理を行うため、既知量の測定対象物質をブランク血漿に添加して調製した試料（検量線試料および QC 試料）も同一バッチで実試料とともに前処理・LC-MS/MS 分析を行った。測定試料（5.0  $\mu$ L）中のワルファリン（*R/S*-ワルファリン）および水酸化ワルファリン（*R/S*-6-水酸化ワルファリンおよび *R/S*-7-水酸化ワルファリン）は LC30A システム（島津製作所）および TSQ Vantage 三連四重極質量分析計（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用い、各測定対象化合物を選択反応モニタリング（SRM）法により測定した。*R*-および *S*-ワルファリン測定（保持時間：7 分）に際しての HPLC の測定条件は、分析カラムとして CHIRALCEL OD-RH（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu$ m、株式会社ダイセル）、移動相には 6%（v/v）メタノール、54%（v/v）アセトニトリル、40%（v/v）0.1%ギ酸溶液を用いて、また、*R*-6-および *R*-7-水酸化

ワルファリン、S-6-およびS-7-水酸化体ワルファリン測定（45分）の場合は、分析カラムとしてCHIRALPACK IB-3（内径2.1 mm、長さ250 mm、粒子径3 μm、株式会社ダイセル）およびYMC-Triart C18（内径2.0 mm、長さ75 mm、粒子径3 μm、株式会社YMC）、移動相には13%（v/v）メタノール、26%（v/v）アセトニトリル、61%（v/v）0.1%ギ酸溶液を使用し、流速は0.25 mL/minとした。ワルファリンおよび内標準のSRM トランジション（*m/z*）は、それぞれ307→250 および312→255、6-および7-水酸化ワルファリンおよび内標準のSRM トランジション（*m/z*）は、それぞれ323→177 および328→270とした。ワルファリンおよび水酸化ワルファリンの定量限界は、それぞれ10および0.5 ng/mLであった。

## II-2-v データ解析

ノンコンパートメント解析によるPKパラメータはPhoenix WinNonlin version 6.1（Pharsight, Mountain View, CA）を用いて算出した。最高血漿中濃度（ $C_{max}$ ）およびそれに到達する時間（ $t_{max}$ ）は実測値を用いた。静脈内投与後初期値（ $C_0$ ）は投与後5および15分の血漿中濃度を用いて投与0時間の値を外挿することにより求めた。終末相の消失速度定数（ $k_{el}$ ）を最小二乗法によって算出し、消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は式2-1、無限時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積（ $AUC_{inf}$ ）は式2-2に従い台形法により算出した。

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}} \quad (2-1)$$

$$AUC_{inf} = AUC_{last} + \frac{C_{last}}{k_{el}} \quad (2-2)$$

全身クリアランス（ $CL_{total}$ ）は式2-3に示すとおり肝クリアランス（ $CL_h$ ）および腎クリアランス（ $CL_r$ ）の和で静脈内投与時の投与量（ $Dose_{iv}$ ）を静脈内投与時の $AUC_{inf}$ （ $AUC_{inf,iv}$ ）で除することにより求めた。

$$CL_{total} = CL_h + CL_r = \frac{Dose_{iv}}{AUC_{inf,iv}} \quad (2-3)$$

血漿中濃度推移の1次モーメントとして平均滞留時間（MRT）を定義し、静脈内投与時の

定常状態分布容積 ( $V_{ss}$ ) を以下の式 2-4 に従い算出した。

$$V_{ss} = MRT \cdot CL_{total} \quad (2-4)$$

ワルファリンは吸収が良好で尿中に未変化体はほとんど検出されない薬物である (O'Reilly, 1969) ことから、肝クリアランスは全身クリアランスに等しいものとして、肝抽出率 ( $E_h$ ) および肝通過率 ( $F_h$ ) は以下の式 2-5 および 2-6 より求めた。

$$E_h = \frac{CL_h}{Q_h} = \frac{CL_{total}}{Q_h} \quad (2-5)$$

$$F_h = 1 - E_h \quad (2-6)$$

ここで  $Q_h$  は肝血流量 (2.62 L/h/kg) を表す (Davies and Morris, 1993)。

生物学的利用率 ( $BA$ ) は経口および静脈内投与時の  $AUC_{inf}$  を用い以下の式に従い算出した。なお、経口投与時の  $BA$  は  $F_a$ 、 $F_g$  および  $F_h$  の関数として以下の式 2-7 で記述される。

$$BA = \frac{AUC_{inf,po}}{AUC_{inf,iv}} = F_a \cdot F_g \cdot F_h \quad (2-7)$$

## II-2-vi 統計学的解析

*R*-および *S*-ワルファリンの PK パラメータは、SAS (SAS Institute, Cary, NC) を用いて共分散分析を行った。

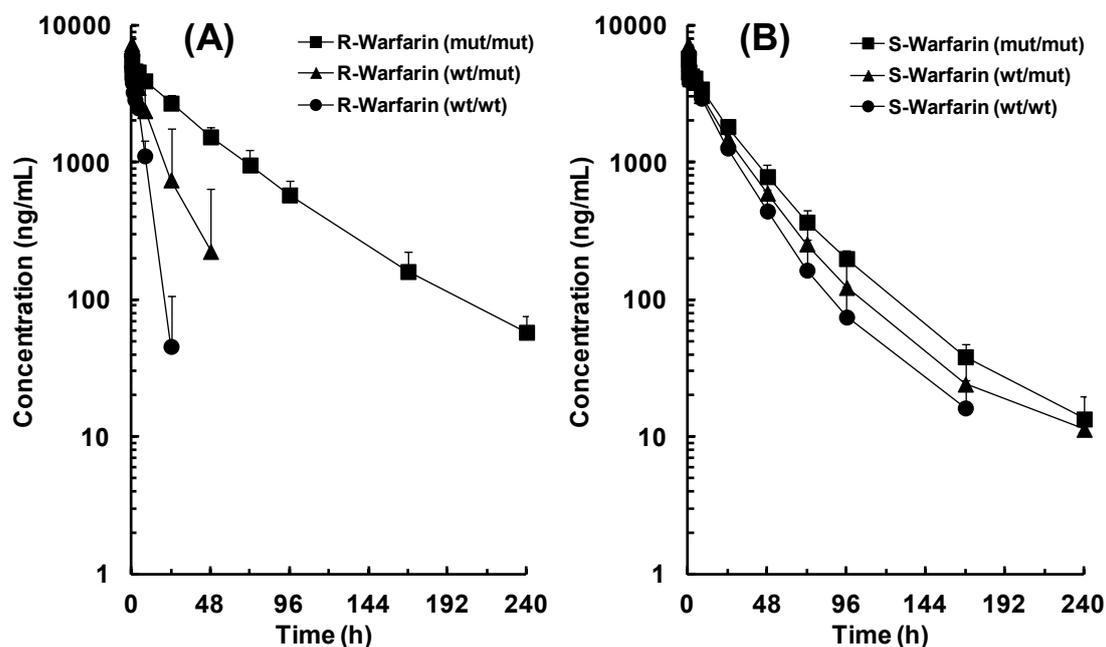
## 第 3 節 結果

### II-3-i 静脈内投与後の *R*-および *S*-ワルファリンおよび代謝物の体内動態

*mCYP2C19* [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] 遺伝子多型の *in vivo* ワルファリン薬物動態に及ぼす影響を検討するため、*mCYP2C19* の遺伝子多型判定を行った 11 頭のサル (野生型 : 4 頭、変異型ヘテロ接合体 : 4 頭および変異型ホモ接合体 : 3 頭) にワルフ

ァリンのラセミ体を静脈内投与し、投与後の血漿中の未変化体 (*R*-および *S*-ワルファリン) および水酸化代謝物 (*R*-および *S*-6-水酸化ワルファリン、*R*-および *S*-7-水酸化ワルファリン)濃度を測定し、各化合物のPKパラメータを求めた(Figs. 2-1 and 2-2, Tables 2-1 and 2-2)。静脈内投与後の血漿中 *R*-および *S*-ワルファリンの血漿中薬物濃度推移を Fig. 2-1 に示す。血漿中 *R*-および *S*-ワルファリンはともに投与後速やかに分布したが、*R*-および *S*-ワルファリンの血漿からの消失は異なる推移を示した。*R*-ワルファリンの血漿からの消失は遺伝子多型により異なり、野生型群の消失が最も速やかで、次いで変異型ヘテロ接合体群、変異型ホモ接合体群の順で消失は緩やかとなった。野生型群および変異型ヘテロ接合体群の血漿中 *R*-ワルファリン濃度は投与後それぞれ48および72時間では定量限界未満(< 10 ng/mL)となったが、変異型ホモ接合体群の *R*-ワルファリンは投与後 240 時間においても検出された (Fig. 2-1A)。これに対して、各群の *S*-ワルファリンの血漿からの消失は同様で、野生型、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体の各群の血漿中 *S*-ワルファリン濃度推移は、投与後 240 時間まではほぼ類似していた (Fig. 2-1B)。

ワルファリン (ラセミ体) 静脈内投与後の野生型、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体の各群における *R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリンの PK パラメータを Table 2-1 に示す。共分散分析を行った結果、*R*-ワルファリンについては  $t_{1/2}$ 、 $AUC_{inf}$  および  $CL_{total}$  に有意な差が認められた。野生型群、変異型ヘテロ接合体群および変異型ホモ接合体群の *R*-ワルファリンの  $t_{1/2}$  の平均値は、それぞれ、4.0、8.1 および 43.2 時間で、*R*-ワルファリンの血漿中からの消失は遺伝子変異により遅延した。変異型ホモ接合体群の *R*-ワルファリンの  $CL_{total}$  の平均値は野生型の値の 1/10 を下回る有意な低値を示し、 $t_{1/2}$  および  $AUC_{inf}$  の平均値はそれぞれ約 10 および 8 倍の値を示した (Table 2-1)。*R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリンの  $E_h$  は、それぞれ 0.09~0.7% および 0.15~0.2% と極めて低く、変異型ホモ接合体群の *R*-ワルファリンの  $E_h$  値 (0.09%) は野生型群に比べて有意に低値を示した。これに対し、*R*-および *S*-ワルファリンの  $C_0$  および  $V_{ss}$ 、*S*-ワルファリンの PK パラメータのいずれについても遺伝子多型による有意な差は認められなかった。



**Fig. 2-1. Plasma concentrations of *R*- (A) and *S*- (B) warfarin after intravenous administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.**

Cynomolgus monkeys genotyped as wild type (circles), heterozygous mutant (triangles), and homozygous mutant (squares) for *mCYP2C19* [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] were used. Symbols and bars show the mean  $\pm$  SD,  $n=3-4$  for each genotype group.

**Table 2-1. Pharmacokinetic parameters of *R*- and *S*-warfarin after intravenous administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.**

Compound	Genotype	$C_0$	$t_{1/2}$	$AUC_{inf}$	$CL_{total}$	$V_{ss}$	$E_h$
		ng/mL	h	ng·h/mL	mL/h/kg	mL/kg	%
<i>R</i> -Warfarin	<i>wt/wt</i>	6,870 $\pm$ 1300	4.0 $\pm$ 0.6	28,500 $\pm$ 7,400	18.4 $\pm$ 4.50	99.9 $\pm$ 27.3	0.70 $\pm$ 0.17
	<i>wt/mut</i>	8,670 $\pm$ 1080	8.1 $\pm$ 5.9	70,600 $\pm$ 52,200	10.4 $\pm$ 6.90	79.3 $\pm$ 13.3	0.40 $\pm$ 0.26
	<i>mut/mut</i>	6,110 $\pm$ 566	43.2 $\pm$ 1.7**	226,000 $\pm$ 39,700**	2.26 $\pm$ 0.36**	111 $\pm$ 11.5	0.09 $\pm$ 0.01**
<i>S</i> -Warfarin	<i>wt/wt</i>	6,800 $\pm$ 1220	29.4 $\pm$ 12.4	98,500 $\pm$ 21,900	5.28 $\pm$ 1.26	116 $\pm$ 12.5	0.20 $\pm$ 0.05
	<i>wt/mut</i>	8,370 $\pm$ 1080	33.6 $\pm$ 12.7	114,000 $\pm$ 39,000	4.82 $\pm$ 1.77	117 $\pm$ 25.5	0.18 $\pm$ 0.07
	<i>mut/mut</i>	6,460 $\pm$ 313	30.1 $\pm$ 10.9	137,000 $\pm$ 35,300	3.85 $\pm$ 1.17	110 $\pm$ 15.8	0.15 $\pm$ 0.04

Four wild-type monkeys, four heterozygotes, and three homozygotes for *mCYP2C19* [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] were used. Results are expressed as mean values ( $\pm$  SD) obtained with 11 monkeys (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , analysis of covariance was used to assess the statistical significance of mean differences among experimental groups, as compared with the *wt/wt* group).

ワルファリン（ラセミ体）静脈内投与後の *R* および *S* 体それぞれの 6-および 7-水酸化ワルファリンの血漿中薬物推移を Fig. 2-2 に示す。6-および 7-水酸化代謝は *R* 体優先で、野生型群および変異型ヘテロ接合体群の *R*-6-および *R*-7-水酸化ワルファリンは、それぞれの光学異性体である *S*-6-および *S*-7-水酸化ワルファリンより高い濃度推移を示した。*S*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  は 40 ng/mL 程度であったが、*R*-7-水酸化ワルファリンは 100 ng/mL を超える濃度推移を示し、ともに投与後 72 時間まで検出された。変異型ホモ接合体群の *R*-7-水酸化ワルファリンは 2 ng/mL 以下の濃度で推移し、投与後 72 時間では定量限界 (0.5 ng/mL) 未満となった (Fig. 2-2A)。野生型群および変異型ヘテロ接合体群では、*R* 体および *S* 体とも 7 位水酸化ワルファリンは、それぞれの構造 (位置) 異性体である 6 位水酸化ワルファリンより高い濃度推移を示した (Fig. 2-2)。これに対し、変異型ホモ接合体群の *R*-6-および *R*-7-水酸化体、*S*-6-および *S*-7-水酸化体の 4 種の水酸化ワルファリンは類似した血漿中濃度推移を示した (Fig. 2-2)。

*R*-水酸化ワルファリンおよび *S*-水酸化ワルファリンの PK パラメータを Table 2-2 に示す。共分散分析により遺伝子多型の影響を検討した結果、野生型群の *R*-6-および *R*-7-水酸化ワルファリンのみならず、*S*-6-および *S*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  についても変異型ホモ接合体より高い値を示し有意差が認められた。野生型群の *R*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  の平均値は変異型ホモ接合体群の値のそれぞれ約 130 および 24 倍の値を示し、*S*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  の平均値は変異型ホモ接合体群の値のそれぞれ約 12 および 7 倍の値を示した (Table 2-2)。野生型群および変異型ヘテロ接合体群、それぞれの群内では *R*-水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  は光学異性体である *S*-水酸化ワルファリンより高く、7 位の水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  は構造異性体である 6 位水酸化ワルファリンより高い値を示し有意差が認められた。変異型ホモ接合体群の *R*-7-水酸化ワルファリンの  $t_{\max}$  および  $t_{1/2}$  は、野生型および変異型ヘテロ接合体群に比べて有意に遅延した。変異型ホモ接合体群の *R*-6-水酸化ワルファリンの  $t_{1/2}$  は、野生型および変異型ヘテロ接合体群に比べて有意に遅延した。

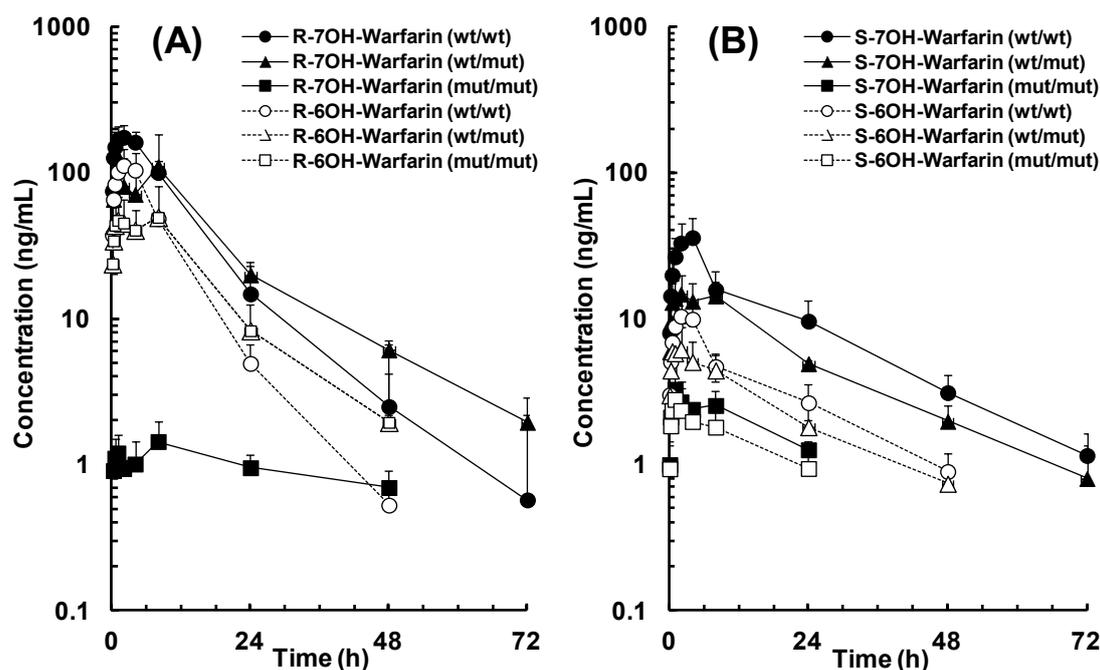


Fig. 2-2. Plasma concentrations of *R*- (A) and *S*- (B) 6-hydroxywarfarin (open) and 7-hydroxywarfarin (closed) after intravenous administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.

Detailed information is shown in the legend for Fig. 2-1.

Table 2-2. Pharmacokinetic parameters of *R*- and *S*-hydroxywarfarin after intravenous administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.

Compound	Genotype	$t_{\max}$	$C_{\max}$	$t_{1/2}$	$AUC_{\text{inf}}$
		h	ng/mL	h	ng·h/mL
<i>R</i> -7-Hydroxywarfarin	<i>wt/wt</i>	$1.8 \pm 0.5$	$187 \pm 32$	$8.1 \pm 1.4$	$2330 \pm 180$
	<i>wt/mut</i>	$2.9 \pm 3.5$	$121 \pm 77$	$10.9 \pm 4.7$	$2150 \pm 840$
	<i>mut/mut</i>	$8.0 \pm 0.0^{**}$	$1.4 \pm 0.6^{**}$	$44.8 \pm 5.7^{**}$	$96.2 \pm 37.5^{**}$
<i>R</i> -6-Hydroxywarfarin	<i>wt/wt</i>	$1.8 \pm 0.5$	$119 \pm 33$	$5.9 \pm 0.6$	$1190 \pm 180$
	<i>wt/mut</i>	$3.3 \pm 3.2$	$60.5 \pm 28.9^*$	$9.4 \pm 5.6$	$974 \pm 237$
	<i>mut/mut</i>	$1.3 \pm 0.6$	$1.5 \pm 0.4^{**}$	$50.9 \pm 12.2^{**}$	$99.1 \pm 14.3^{**}$
<i>S</i> -7-Hydroxywarfarin	<i>wt/wt</i>	$3.3 \pm 1.5$	$37.7 \pm 11.6$	$16.5 \pm 3.8$	$654 \pm 150$
	<i>wt/mut</i>	$3.5 \pm 3.0$	$18.3 \pm 4.2^*$	$18.6 \pm 7.1$	$402 \pm 87^*$
	<i>mut/mut</i>	$1.0 \pm 0.0$	$3.3 \pm 0.6^{**}$	$20.7 \pm 3.4$	$89.5 \pm 10.1^{**}$
<i>S</i> -6-Hydroxywarfarin	<i>wt/wt</i>	$2.3 \pm 1.3$	$11.2 \pm 3.3$	$17.4 \pm 3.6$	$191 \pm 46$
	<i>wt/mut</i>	$3.1 \pm 3.3$	$6.9 \pm 1.6$	$20.5 \pm 8.8$	$145 \pm 11$
	<i>mut/mut</i>	$1.0 \pm 0.0$	$2.8 \pm 1.6^{**}$	$17.7 \pm 2.6$	$62.4 \pm 14.9^{**}$

Detailed information is shown in the legend for Table 2-1.

### II-3-ii 経口投与後の *R*-および *S*-ワルファリンおよび代謝物の体内動態

同じ用量のワルファリンのラセミ体を同じ動物に経口投与し、投与後の血漿中のワルファリンおよび水酸化ワルファリンの血漿中薬物動態を検討した (Figs. 2-3 and 2-4, Tables 2-3 and 2-4)。ワルファリン経口投与後も、静脈内投与後と同様の血漿中ワルファリン濃度推移が観察された (Fig. 2-3)。経口投与後、ワルファリンは良好に吸収され、血漿中 *R*-および *S*-ワルファリンはともに速やかに  $C_{max}$  に達した。その後の *R*-および *S*-ワルファリンの血漿からの消失は異なる推移を示した。*R*-ワルファリンの血漿からの消失は遺伝子多型により異なり、野生型群での消失が最も速やかで、次いで変異型ヘテロ接合体群、変異型ホモ接合体群の順で消失は緩やかとなった。野生型群および変異型ヘテロ接合体群の血漿中 *R*-ワルファリン濃度は投与後それぞれ 48 および 72 時間では定量限界未満 (<10 ng/mL) となったが、変異型ホモ接合体群では、*R*-ワルファリンは投与後 240 時間でも検出された (Fig. 2-3A)。これに対して、各群の *S*-ワルファリンの血漿からの消失は同様で、野生型、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体の各群の血漿中 *S*-ワルファリン濃度推移は、投与後 240 時間までほぼ類似していた (Fig. 2-3B)。

ワルファリン経口投与後の *R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリンの PK パラメータを Table 2-3 に示す。共分散分析を行った結果、*R*-ワルファリンについては、 $C_{max}$ 、 $t_{1/2}$  および  $AUC_{inf}$  に有意な差が認められた。変異型ホモ接合体群の *R*-ワルファリンの  $C_{max}$ 、 $t_{1/2}$  および  $AUC_{inf}$  の平均値は野生型群の値のそれぞれ約 1.5、11 および 8 倍の値を示した (Table 2-3)。これに対し、*R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリンの *BA* は、それぞれ 88~91% および 89~92% で遺伝子多型による差は認められなかった。*S*-ワルファリンの PK パラメータのいずれについても遺伝子多型による有意な差は認められなかった。

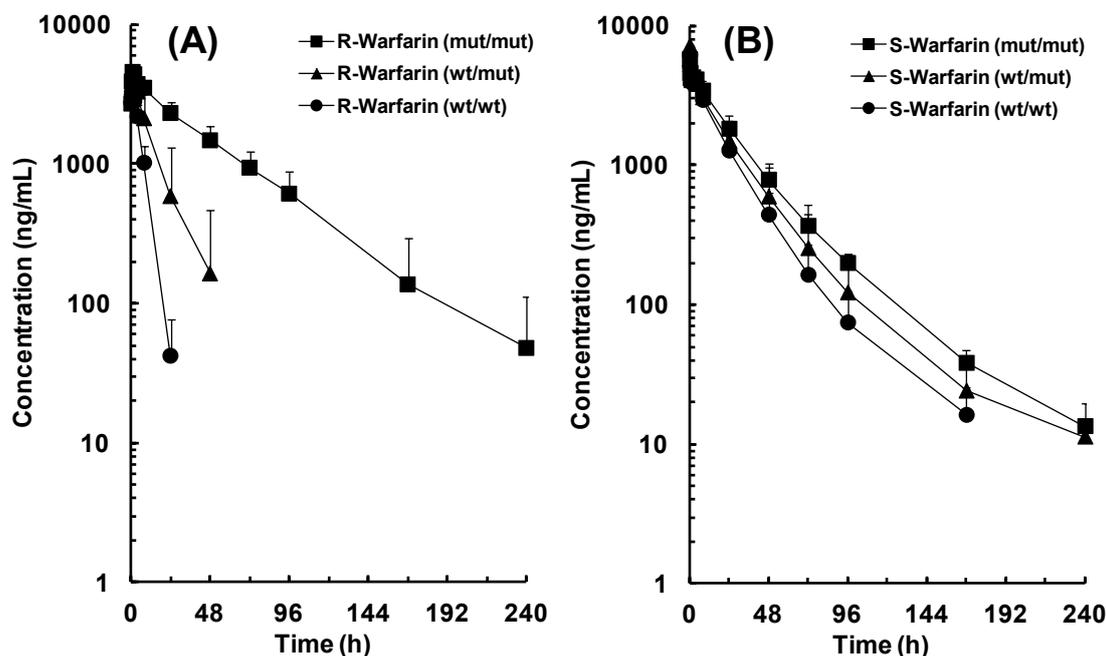


Fig. 2-3. Plasma concentrations of *R*- (A) and *S*- (B) warfarin after oral administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.

Detailed information is shown in the legend for Fig. 2-1.

Table 2-3. Pharmacokinetic parameters of *R*- and *S*-warfarin after oral administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.

Compound	Genotype	$t_{max}$	$C_{max}$	$t_{1/2}$	$AUC_{inf}$	$BA$
		h	ng/mL	h	ng•h/mL	%
<i>R</i> -Warfarin	<i>wt/wt</i>	0.6 ± 0.3	3,170 ± 709	3.6 ± 0.4	25,200 ± 7,340	88 ± 10
	<i>wt/mut</i>	1.3 ± 0.9	4,170 ± 681	8.3 ± 5.2	59,700 ± 39,800	91 ± 18
	<i>mut/mut</i>	1.3 ± 0.6	4,610 ± 484*	40.4 ± 5.8**	207,000 ± 51,500**	91 ± 10
<i>S</i> -Warfarin	<i>wt/wt</i>	1.5 ± 0.6	3,900 ± 410	31.1 ± 13.2	87,400 ± 17,300	89 ± 4
	<i>wt/mut</i>	1.1 ± 0.7	4,110 ± 450	26.4 ± 10.7	103,000 ± 29,000	92 ± 11
	<i>mut/mut</i>	1.0 ± 0.0	4,430 ± 257	24.9 ± 9.59	127,000 ± 42,000	92 ± 9

Detailed information is shown in the legend for Table 2-1.

ワルファリン経口投与後の *R* および *S* 体それぞれの 6-および 7-水酸化ワルファリンの血漿中薬物推移を Fig. 2-4 に示す。経口投与後の 6-および 7-水酸化ワルファリン濃度は、静脈内投与後と同様に、*R* 体優先の 6-および 7-水酸化代謝が観察された。野生型群および変異型ヘテロ接合体群の *R*-6-および *R*-7-水酸化ワルファリンはそれぞれの光学異性体であ

る *S*-6-および *S*-7-水酸化ワルファリンより高い濃度推移を示し、*R* 体および *S* 体とも 7 位水酸化ワルファリンはそれぞれの構造異性体である 6 位水酸化ワルファリンより高い濃度推移を示した (Fig. 2-4)。これに対し、変異型ホモ接合体群の 4 種の水酸化ワルファリンは類似した血漿中濃度推移を示した (Fig. 2-4)。

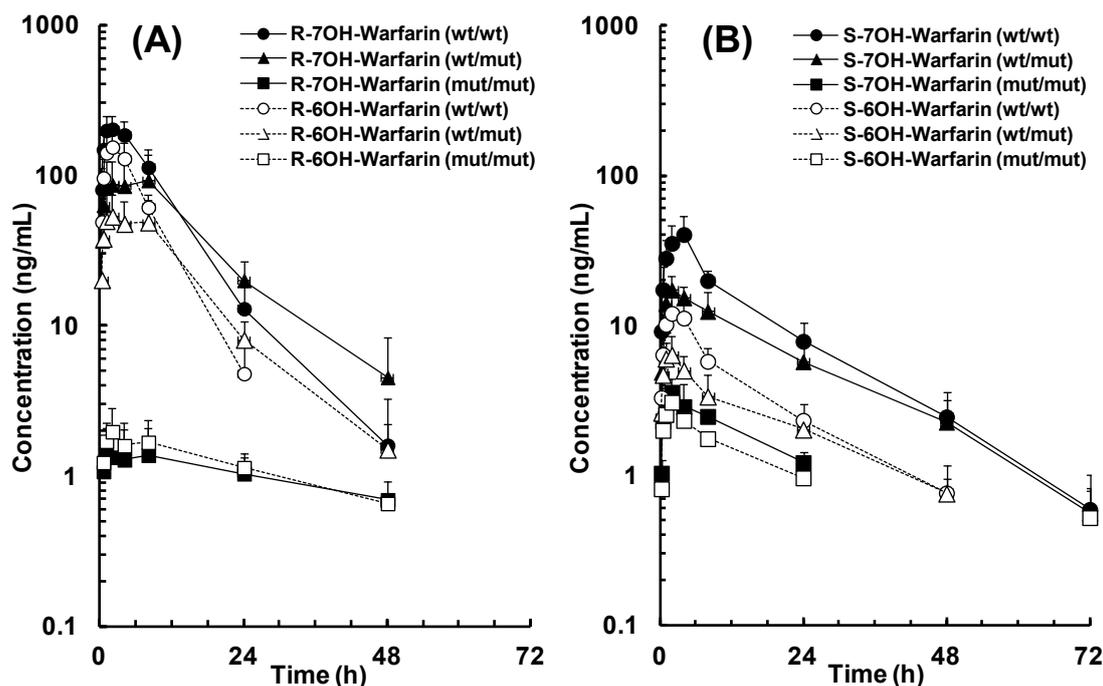


Fig. 2-4. Plasma concentrations of *R*- (A) and *S*- (B) 6-hydroxywarfarin (open) and 7-hydroxywarfarin (closed) after intravenous administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.

Detailed information is shown in the legend for Fig. 2-1.

*R*-水酸化ワルファリンおよび *S*-水酸化ワルファリンの PK パラメータを Table 2-4 に示す。共分散分析により遺伝子多型の影響を検討した結果、野生型群の *R*-6-および *R*-7-水酸化ワルファリンのみならず、*S*-6-および *S*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  についても変異型ホモ接合体より高い値を示し、有意差が認められた (Table 2-4)。野生型群の *R*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  の平均値は変異型ホモ接合体群の値のそれぞれ約 156 および 27 倍の値を示し、*S*-7-水酸化ワルファリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  の平均値は変異型ホモ接合体群の値のそれぞれ約 11 および 8 倍の値を示した (Table 2-4)。野生型

群および変異型ヘテロ接合体群、それぞれの群内では R-水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  は光学異性体である S-水酸化ワルファリンより高く、7 位の水酸化ワルファリンの  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  は構造異性体である 6 位水酸化ワルファリンより高い値を示し、有意差が認められた。変異型ホモ接合体群の R-6 および R-7-水酸化ワルファリンの  $t_{1/2}$  は、野生型および変異型ヘテロ接合体群に比べて有意に遅延した。

**Table 2-4. Pharmacokinetic parameters of R- and S-hydroxywarfarin after oral administration of racemic warfarin at a dose of 1.0 mg/kg body weight.**

	Genotype	$t_{\max}$ h	$C_{\max}$ ng/mL	$t_{1/2}$ h	$AUC_{\text{inf}}$ ng·h/mL
<b>R-7-Hydroxywarfarin</b>	<i>wt/wt</i>	1.4 ± 0.8	220 ± 34	6.3 ± 0.7	2510 ± 320
	<i>wt/mut</i>	3.3 ± 3.2	107 ± 52*	13.3 ± 11.1	1990 ± 620
	<i>mut/mut</i>	3.5 ± 4.0	1.4 ± 0.7**	45.3 ± 10.2**	93.7 ± 23.1**
<b>R-6-Hydroxywarfarin</b>	<i>wt/wt</i>	1.8 ± 0.5	163 ± 44	4.2 ± 1.0	1470 ± 120
	<i>wt/mut</i>	3.3 ± 3.2	61.0 ± 23.9**	8.9 ± 5.6	977 ± 230*
	<i>mut/mut</i>	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.8**	39.2 ± 6.7**	102 ± 23**
<b>S-7-Hydroxywarfarin</b>	<i>wt/wt</i>	3.3 ± 1.5	40.7 ± 13.4	13.3 ± 2.8	638 ± 84
	<i>wt/mut</i>	3.5 ± 3.0	18.7 ± 1.4*	15.5 ± 4.1	406 ± 104*
	<i>mut/mut</i>	1.7 ± 0.6	3.6 ± 0.8**	16.5 ± 3.9	83.1 ± 1.3**
<b>S-6-Hydroxywarfarin</b>	<i>wt/wt</i>	1.8 ± 0.5	12.5 ± 3.5	15.1 ± 0.7	196 ± 25
	<i>wt/mut</i>	3.3 ± 3.2	6.7 ± 1.7*	17.4 ± 4.0	170 ± 67
	<i>mut/mut</i>	2.0 ± 0.0	3.1 ± 0.9**	28.9 ± 15.8	86.0 ± 21.9**

Detailed information is shown in the legend for Table 2-1.

#### 第 4 節 考察

サルは非臨床試験で広く使われていたが、その試験結果の評価に影響を及ぼす個体差の要因は必ずしも明らかではなかった。本研究では予め Uno ら (Uno et al., 2014a) の方法により *mCYP2C19*[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] 遺伝子型を判定したサルを用

いた。*mCYP2C19* 野生型、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体の遺伝子型を有するサルにラセミ体ワルファリンを静脈内および経口投与し、*R/S*-ワルファリン、*R/S*-6-水酸化ワルファリンおよび *R/S*-7-水酸化ワルファリンの血漿中濃度を測定し、それらの *in vivo* PK パラメータを求めた。さらに、PK パラメータについて共分散分析を行い、*in vivo* における *R/S*-ワルファリン水酸化代謝の立体・構造選択性、ならびに *mCYP2C19* 遺伝子多型の *R/S*-ワルファリン、*R/S*-6-水酸化ワルファリンおよび *R/S*-7-水酸化ワルファリン薬物動態に及ぼす影響について検討した。

ラセミ体ワルファリン静脈内投与後の *R*-および *S*-ワルファリンは速やかに分布した。経口投与後 *R*-および *S*-ワルファリンは良好な吸収性を示し、血漿中濃度は速やかにピークに達した。吸収・分布過程に関連する PK パラメータ  $C_0$ 、 $V_{ss}$ 、 $t_{max}$ 、 $C_{max}$  はいずれも *R/S*-立体選択的な差のみならず、*mCYP2C19* の遺伝子多型による影響は認められなかった。各群の *R*-および *S*-ワルファリンの  $V_{ss}$  平均値は 80~120 mL/kg で、細胞外液量値 200 mL/kg (Davies and Morris, 1993) の半分前後で変動係数も 30%と個体差も小さく、組織分布は少なく体格差も小さいと推察された。経口投与後の各群の *R*-および *S*-ワルファリンの  $t_{max}$  平均値は 0.6~1.5 時間で *R*-および *S*-ワルファリンは速やかに吸収、分布した。*R*-および *S*-ワルファリンは分布容積が小さく、吸収・分布が速やかであるため、各群の  $C_0$  および  $C_{max}$  は同様の値を示した。*BA* は小腸および肝の初回通過効果の影響を受けるが、各群の *R*-および *S*-ワルファリンの *BA* 平均値は 88~92%で良好な吸収性を示し、遺伝子変異による差も認められなかったことから、小腸における代謝は僅かであったと推察される。経口投与 PK 試験の *R*-および *S*-ワルファリンの *BA*、 $t_{max}$  および  $V_{ss}$  はヒトの臨床試験で得られた結果 (O'Reilly, 1969; Shetty et al., 1989; 土肥ら, 2008; Holford, 1986) と類似していた。血漿中タンパク結合率はヒトおよびサルとも高く血漿中タンパク非結合形分率はそれぞれ 0.005%および 0.006%と類似し (Berry et al., 2011)、ヒトおよびサルの血球移行性も類似していると報告 (Berry et al., 2011; Shida et al., 2015) されている。以上のことから、*R*-および *S*-ワルファリンの吸収・分布過程に関連する PK パラメータは、*R/S*-立体異性構造、

遺伝子多型のみならずヒトとの種差がないことが明らかとなった。

ヒトとの差、あるいは、立体構造選択性、遺伝子多型による差が認められた代謝・消失過程に関する PK パラメータについて、以下、詳細に検討した。静脈内および経口投与後の R-および S-ワルファリンの 6-および 7-水酸化代謝物の *in vivo* PK パラメータの共分散分析を行った結果、*in vivo* における R-/S-ワルファリン水酸化代謝の立体・位置選択性は、第 I 章で述べた *in vitro* 代謝試験で観察されたサル肝による代謝と同様であった (Tables 2-2 and 2-4)。野生型および変異型ヘテロ接合体群では、静脈内および経口投与後の R-6-および R-7-水酸化ワルファリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  は、対応する S-6-および S-7-水酸化ワルファリンより有意に高く ( $p < 0.01$ )、ワルファリンは主に mCYP2C19 により R 体選択的に水酸化代謝されたと推察される (Tables 2-2 and 2-4)。野生型および変異型ヘテロ接合体群では、静脈内および経口投与後の R-7-水酸化ワルファリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  は、構造異性体である R-6-水酸化ワルファリンより有意に高く ( $p < 0.01$ )、R-ワルファリンは主に mCYP2C19 により 7 位選択的に水酸化代謝されたと推察される (Tables 2-2 and 2-4)。一方、静脈内および経口投与後の野生型群の S-7-水酸化ワルファリンの  $AUC_{inf}$  は、構造異性体である S-6-水酸化ワルファリンより有意に高く (静脈内投与後 :  $p < 0.05$ 、経口投与後 :  $p < 0.01$ )、S 体の 7 位選択的な水酸化代謝反応に対する mCYP2C19 の寄与は大きいと推察される (Tables 2-2 and 2-4)。第 I 章で述べた *in vitro* 代謝試験では、mCYP2C19 が R-ワルファリンの代謝に関与する主要 P450 分子種であることが示唆される結果が得られており、肝 mCYP2C19 のワルファリン水酸化代謝活性に応じて血漿中 R-および S-7-水酸化ワルファリン濃度が推移していると推察される。これらの結果から、*in vitro* 同様に、*in vivo* においても R-ワルファリンは主に mCYP2C19 により R 体・7 位選択的に水酸化代謝され、R-ワルファリン 7-水酸化反応は mCYP2C19 の *in vivo* 指標反応であることが示唆された。S-ワルファリンについては、*in vitro* 代謝試験で、mCYP3A4 および mCYP3A5 などが S-ワルファリン代謝に関与する結果が得られており、mCYP2C19 の寄与は R 体代謝に比べ小さいが、本研究において、mCYP2C19 により S-7-水酸化ワルファリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  の顕著

で有意な増加が認められたことから、*S*-ワルファリン 7-水酸化反応も *mCYP2C19* の *in vivo* 指標反応となる可能性が示唆された。

静脈内および経口投与後の変異型ホモ接合体群の 4 種の水酸化代謝物 (*R*-/*S*-6-および *R*-/*S*-7-水酸化ワルファリン)の  $C_{\max}$  および  $AUC_{\text{inf}}$  には有意な差は認められなかった (Tables 2-2 and 2-4)。Uno ら (Uno et al., 2014a) は、*mCYP2C19* の遺伝子多型の組換え *mCYP2C19* 酵素を作製し、遺伝子変異 [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] の *in vitro* 代謝活性を測定したが検出限界以下であったと報告している。これらの結果から、変異型ホモ接合体では *mCYP2C19* の活性は極めて僅かであるため、変異型ホモ接合体群では、ワルファリン *R* 体・7 位選択的な水酸化能を有するという特性は認められなかったものと推察される。静脈内および経口投与後の *R*-および *S*-水酸化ワルファリンの  $t_{1/2}$  は、遺伝子多型各群の未変化体の  $t_{1/2}$  と関連した (Tables 2-2 and 2-4)。Banfield ら (Banfield et al., 1983) はヒトにおけるワルファリンの血中動態と尿中排泄を調べ、*R*-および *S*-水酸化ワルファリンは主要代謝物として尿排泄されると報告している。サル糸球体ろ過量 (GFR) は 125 mL/h/kg (Davies B and Morris T, 1993) で、本研究で得られた *R*-および *S*-ワルファリンの  $CL_{\text{total}}$  平均値は 2.26~18.4 mL/h/kg は GFR より明らかに小さい。この結果から、遺伝子変異による水酸化ワルファリンの  $t_{1/2}$  の変動は、腎排泄機能等の代謝物の消失能の変動によるのではなく、遺伝子多型による代謝物の生成能の変動が  $t_{1/2}$  として観察されたフリップ・フロップ現象と推察される。以上のように、*R*-ワルファリンの 7 位水酸化反応は主に *mCYP 2C19* により触媒されるため、*mCYP 2C19* 遺伝子多型が様々な個体間差として観察される。今回の *in vivo* 結果を考え合わせると、*in vitro* および *in vivo* で見られるサルの *R*-ワルファリンのクリアランスの個体間差は主に *mCYP2C19* の発現量の個体間差のみならず遺伝子多型に起因していると推察される。

*mCYP2C19* 遺伝子多型のワルファリン薬物動態に及ぼす影響について、吸収・分布・代謝・排泄の各プロセスに関わる PK パラメータを比較し、どのような因子・要素が、どのように関与して体内動態に影響を及ぼしているのかについて要因分析した。要因分析に

際しては、クリアランス概念 (Gibaldi and Perrier, 1982; 栗津と渡邊, 1988) に基づき遺伝子変異と薬物動態の関係を捉え、因子・要素を整理した。ワルファリンのように未変化体としてほとんど尿中排泄されず (O'Reilly, 1969)、主に肝において代謝されて消失する薬物の肝固有クリアランス ( $CL_{h,int}$ ) と全身クリアランス ( $CL_{total}$ )、経口クリアランス ( $CL_{oral}$ ) および  $BA$  の関係は、以下の式 2-8 ~2-10) で記述される。

$$CL_{total} = CL_h + CL_r = \frac{Q_h \cdot CL_{h,int} \cdot f_{uB}}{Q_h + CL_{h,int} \cdot f_{uB}} \quad (2-8)$$

$$CL_{oral} = \frac{CL_{total}}{F_a \cdot F_g \cdot F_h} = \frac{CL_{h,int} \cdot f_{uB}}{F_a \cdot F_g} \quad (2-9)$$

$$BA = \frac{CL_{total}}{CL_{oral}} = \frac{Q_h \cdot F_a \cdot F_g}{Q_h + CL_{h,int} \cdot f_{uB}} \quad (2-10)$$

*mCYP2C19* 遺伝子変異により *mCYP2C19* 酵素活性が低下、すなわち  $CL_{h,int}$  が低下すると、 $CL_{total}$ 、 $CL_{oral}$  および  $BA$  が低下する。ワルファリンのように  $Q_h$  に対し  $CL_{h,int}$  と  $f_{uB}$  の積 ( $CL_{h,int} \cdot f_{uB}$ ) が顕著に小さい場合は、 $CL_{h,int}$  が低下すると  $CL_{h,int}$  の低下に比例して  $CL_{total}$  および  $CL_{oral}$  は低下するが  $BA$  は変化しない。これに対し、 $Q_h$  に対し  $CL_{h,int} \cdot f_{uB}$  が顕著に大きい場合は、 $CL_{h,int}$  が低下しても  $CL_{total}$  は変化せず、 $CL_{oral}$  は  $CL_{h,int}$  の低下に比例して低下し、 $BA$  は増大する。このように  $CL_{h,int}$  および  $CL_{h,int} \cdot f_{uB}$  は重要な要因となる。 $CL_{h,int}$  は様々な代謝酵素等の固有クリアランスの総和であるので、*mCYP2C19* の  $CL_{h,int}$  に対する比率 ( $f_m$ ) と *mCYP2C19* 酵素活性の低下率 (RR) は  $CL_{h,int}$  の低下の程度に影響する要素となる。*R*-ワルファリンは単代謝酵素薬物であり、*R*-ワルファリン水酸化酵素活性が高いため、寄与率および低下率はともに高く遺伝子変異による変動は大きい。一方、*S*-ワルファリンは多代謝酵素薬物であり、*S*-ワルファリン水酸化酵素活性は *R*-ワルファリン水酸化酵素活性に比べて低いので、寄与率および低下率は *R*-ワルファリン水酸化反応に比べて低く遺伝子変異の変動は *R*-ワルファリン水酸化反応に比べて小さい。代謝過程の要因分析では、単代謝

酵素薬物である *R*-ワルファリンと多代謝酵素薬物である *S*-ワルファリンについて、 $E_h$  との関係性、合わせて *in vitro* データと *in vivo* データの相関性についても検討した。*mCYP2C19* の寄与の大きい *R*-ワルファリンの代謝過程について、未変化体の消失および 6-/7-水酸化代謝物の生成に関わる PK パラメータを比較検討した。静脈内投与後の *mCYP2C19* 野生型群、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体各群の *R*-ワルファリンの  $CL_{total}$  値は、それぞれ、18.4、10.4 および 2.26 mL/h/kg で、*mCYP2C19* の酵素機能低下に応じて有意に低下した。変異型ホモ接合体群の  $CL_{total}$  値は野生型の 12%と算出され、*mCYP2C19* 遺伝子変異により  $CL_{total}$  が 1/8 以下に低下したことが明らかとなった。各群の  $E_h$  は、それぞれ 0.7、0.4 および 0.09%と極めて低く、遺伝子変異による差は小さく、*BA* は 88~91%であることから *R*-ワルファリンの消化管からの吸収は良好で、小腸における初回通過効果もほとんどないと推察された。これらの結果を総合し、*R*-ワルファリンがサルにおいて肝固有クリアランス律速型薬物であることが明らかとなった。静脈内投与後の野生型群、変異型ヘテロ接合体群、変異型ホモ接合体群各群の *R*-7-水酸化ワルファリンの  $AUC_{inf}$  値は、それぞれ、2,330、2,150 および 96 ng·h/mL で、*mCYP2C19* 遺伝子変異による酵素機能の低下に応じて有意に低値となった。変異型ホモ接合体群の  $AUC_{inf}$  値は野生型群の 4%で遺伝子多型により代謝能に 24 倍の差があることが明らかとなった。*mCYP2C19* の寄与が小さい *S*-ワルファリンでは、静脈内投与後の野生型群、変異型ヘテロ接合体、変異型ホモ接合体各群の *S*-ワルファリンの  $CL_{total}$  値は、それぞれ、5.28、4.82 および 3.85 mL/h/kg で、野生型 *mCYP2C19* の機能低下に従い低値となる傾向が見られたが、これらの間に有意差はなかった。変異型ホモ接合体群の  $CL_{total}$  値は野生型群のその 73%で遺伝子多型により代謝能に 1.4 倍の差が見られた。これらの結果を総合し、*S*-ワルファリンも血流律速度型薬物であることが明らかとなった。静脈内投与後の野生型群、変異型ヘテロ接合体群および変異型ホモ接合体群各群の *S*-7-水酸化ワルファリンの  $AUC_{inf}$  値は、それぞれ、654、402 および 89 ng·h/mL で、野生型 *mCYP2C19* の機能低下に従い有意に低値を示した。変異型ホモ接合体群の  $AUC_{inf}$  値は野生型の 14%で遺伝子多型により代謝能に 7 倍の差があ

ることが明らかとなった。宇野ら (Uno et al., 2014a) は、*mCYP2C19* [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] 遺伝子多型の *in vitro* 代謝に及ぼす影響の検討を行い、サル肝の *R*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は、野生型、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体で、それぞれ 11、3.4 および 0.2 pmol/min/mg protein、*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性についても、それぞれ 2.8、0.8 および 0.5 pmol/min/mg protein と *mCYP2C19* 遺伝子型に依存した酵素活性の差があることを報告している。野生型および *mCYP2C19* [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] 変異型の遺伝子組換え酵素を用いて *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性を測定したところ、野生型の *R*-および *S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性は変異型の酵素活性に比べて、それぞれ、少なくとも 700 倍および 50 倍の代謝能を有していることを報告している (Uno et al., 2014a)。以上の結果を考え合わせると、ワルファリンのような肝固有クリアランス律速型の薬物の場合、*mCYP2C19* 遺伝子変異の薬物動態に及ぼす影響の大きさは、*R*-あるいは *S*-ワルファリンの 1 次代謝反応に対する *mCYP2C19* の寄与の程度 (寄与率)、さらに、遺伝子変異にともなう肝固有クリアランスの低下の程度 (低下率) の二つの要素が相互に関与していると推察された。すなわち、*R*-ワルファリンでは、*mCYP2C19* の消失代謝に対する寄与率が高く、遺伝子変異による代謝能の低下率も大きく、血漿中 *R*-ワルファリンの消失が著しく遅延し、*R*-ワルファリンの血中曝露量は増大する。一方、*S*-ワルファリンでは、遺伝子変異による代謝能の低下率は大きい、この代謝消失に複数の P450 分子種が関与し、*mCYP2C19* の消失代謝に対する寄与率が小さいために、血漿中 *S*-ワルファリンの消失の遅延および曝露量の増加は僅かであったと推察された。このように *mCYP2C19* により代謝される薬物は、*mCYP2C19* 遺伝子多型による体内動態の個体差が生じる可能性があるが、遺伝子多型の影響の程度は *mCYP2C19* の寄与率の大きさによることが明らかとなり、寄与率が極めて重要な要素であることが示唆された。そこで、本研究では、さらに *in vivo* における *mCYP2C19* の *R*-ワルファリンおよび *S*-ワルファリン代謝に対する寄与率の概数を試算した。概数の算出は、臨床で使用されている薬物相互作用の *in vivo* 予測法 (Ohno et al., 2007) を参考に、未変化体

と代謝物の AUC の変化率 (AUCR) と mCYP2C19 の活性の低下率を用いて行った。Ohno ら (Ohno et al., 2007; Ohno et al., 2008; Hisaka et al., 2009; Hisaka et al., 2010) は、薬物相互作用の臨床試験における被相互作用薬 (基質薬) の AUCR は、相互作用に関与する薬物代謝酵素の寄与率 (CR) および相互作用薬 (阻害剤) の阻害率 (IR) の関係は以下の式 2-9 で記述することが可能であることを報告している。

$$AUCR = \frac{1}{1 - CR \cdot IR} \quad (2-9)$$

この知見を基に、本研究で得られた未変化体の AUC の比率と 7-水酸化代謝物の生成量の低下の情報に基づき mCYP2C19 の寄与率を算定した。野生型群と変異型ホモ接合体群の R-ワルファリンの平均  $AUC_{inf}$  値の比率を AUCR、野生型群の R-7-水酸化ワルファリンの平均  $AUC_{inf}$  値と変異型ホモ接合体群の R-水酸化ワルファリンの平均  $AUC_{inf}$  値から求めた比率を低下率 (RR) として用い、以下の式 2-10 に代入すると

$$CR = \frac{1}{RR} \cdot \left(1 - \frac{1}{AUCR}\right) \quad (2-10)$$

mCYP2C19 の R-ワルファリンおよび S-ワルファリン代謝に対する寄与率は、それぞれ概ね 0.9 および 0.3 と見積もられた。寄与率は薬物相互作用の評価や予測を行ううえで極めて重要な要素で、当該 P450 酵素の阻害処理を行った肝試料と非処理肝試料を用いた *in vitro* 実験で寄与率を推定する方法が報告 (Murayama et al., 2018; Parmentier et al., 2018) されている。薬物相互作用の予測手法を遺伝子多型研究に応用すると、寄与率や低下率 (遺伝子変異による変化率) は、上記の方法以外の当該代謝酵素の阻害実験、遺伝子多型組み換え P450 酵素や遺伝子多型個体 (野生型および変異型ホモ接合体) 由来試料を用いた基質消失実験、など  $f_m$  (fraction metabolized) を求める実験からも推定可能であると推察される。

本研究の結果、*in vivo* においてもヒトとサル間でワルファリン代謝に *in vitro* 同様の種差があることが明らかとなった。R-ワルファリンのヒトとサルとの種差は、サル肝で特徴的に観察された mCYP2C19 の高代謝活性によると推察された。ヒトにおいて S-ワルファ

リン 7-水酸化反応は *in vitro* および *in vivo* とともに主に hCYP2C9 により速やかに触媒される (Shimizu et al., 2003; Scordo et al., 2002)。サル肝 *in vitro* において、S-ワルファリン 7-水酸化反応は、ヒトとは異なり主に mCYP2C19、mCYP3A4 および mCYP3A5 など複数の代謝酵素により代謝されるが、その酵素活性はヒト肝と同様に速やかに代謝された (Fig. 1-1, Table 1-4)。注目すべき点として、ヒトの *in vivo* における R-ワルファリンの  $CL_{total}$  として報告 (Scordo et al., 2002) された値 1.8~2.4 mL/h/kg と今回のサル変異型ホモ接合体群の *in vivo* における R-ワルファリン  $CL_{total}$  値 (2.26 mL/h/kg, Table 2-1) が一致していることが挙げられる。サル *in vivo* における mCYP2C19 の R-ワルファリン 7-水酸化に関するヒトの報告値との比較では、サル野生型 mCYP2C19 の著しく高い触媒能が、サルとヒトとの種差の一要因となっていると推察される。したがって、サルを用いたデータからヒトの曝露量を外挿する際には、このような相違点を念頭に置き、非臨床試験の前段階にて薬物代謝酵素遺伝子多型の情報を参照して、サルの個体差に関する情報を適切に用いることは極めて有用である。本研究の結果は、サルの R-ワルファリン消失の遺伝子多型群間の変動は主に mCYP2C19 の遺伝子変異 [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] に起因することを示唆している。ヒトと同様に mCYP2C19 の遺伝子多型が原因のひとつとなって、サルの P450 2C による薬物代謝の個体間変動が生じている。サルを用いて P450 薬物代謝の検討や評価を行う前後に、薬物代謝酵素の遺伝子型を特定することは極めて有用で、臨床における薬物動態予測あるいは予期せぬサルでの薬物動態の個体差の解釈に重要な情報となると推察される。

## 第 5 節 小括

mCYP2C19 [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] 遺伝子多型を持つサルを用いて *in vivo* 薬物動態試験を行い、R-および S-ワルファリンの PK パラメータと遺伝子多型との関係性を明らかにした。すなわち、mCYP2C19 [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]

の遺伝子多型を持つサル 11 頭（野生型 4 頭、変異型ヘテロ接合体 4 頭、変異型ホモ接合体 3 頭）にワルファリンラセミ体を 1.0 mg/kg の用量で静脈内および経口投与し、投与後の血漿中未変化体および 6-および 7-水酸化ワルファリンの PK パラメータを算出し、*mCYP2C19* 遺伝子変異による影響を評価した。*mCYP2C19* 遺伝子変異は、*R/S*-ワルファリンの 11 個体別の PK パラメータのうち、吸収、分布または *BA* には影響を及ぼさなかった。*S*-ワルファリンの PK パラメータには変異型ホモ接合体群と野生型群間の有意な差は認められなかった。一方、経口投与後の変異型ホモ接合体群の血漿中 *R*-ワルファリンの消失半減期  $t_{1/2}$  は野生型群のそれに比べて約 11 倍、 $AUC_{inf}$  値は約 8 倍それぞれ高かった。*mCYP2C19* による代謝に依存して生成した *R*-7-水酸化ワルファリンの血中濃度一時間推移はきわめて遅く、その  $AUC_{inf}$  値は野生型群のその約 1/27 で、有意な差が認められた。以上の結果より、*mCYP2C19* 遺伝子多型はサル *in vivo* における *R*-ワルファリン薬物動態に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

### 第 III 章 PBPK モデルによる R-ワルファリン薬物動態解析と予測

#### 第 1 節 緒言

第 I 章および第 II 章の結果から、サルにおいてワルファリンは立体選択的に代謝されるが、R-ワルファリンは主に mCYP2C19 により立体選択的に R-7-水酸化ワルファリンに変換されること、mCYP2C19 遺伝子変異により mCYP2C19 の肝固有クリアランスが低下し、血中 R-ワルファリンの未変化体および代謝物の消失が遅延することが明らかとなった。遺伝子変異の影響の大きさは、遺伝子多変異型のヘテロ接合体群よりもホモ接合体群の影響が大きく、mCYP2C19 遺伝子変異に起因して mCYP2C19 酵素の機能変化が生じ、R-ワルファリンの動態特性に依存して血中濃度推移が変化すると推察されるが、その関係性・法則性をモデル化できれば創薬プロセスの改善に貢献すると推察された。非臨床試験における遺伝子多型に関わる知見を臨床での適正使用に役立てるためには、高次な予測手法が必要となる。その際に、遺伝子多型で変動する複合した要因を動態特性として統合的に組み込んだ解析・予測モデル、遺伝子多型個体由来の個別肝試料および *in vivo* 薬物動態試験系が活用できれば、医薬品開発の適切な計画立案や効率化が可能になると推察される。非臨床試験では、個別の *in vivo* 薬物動態の予測に役立つ、代謝酵素の発現量や発現調節、代謝寄与率の定量的評価、*in vitro* データから *in vivo* 薬物動態の予測など多くの研究 (Nakajima, 2017; Chiba et al., 2014 and 2017; Yoshikado et al., 2016 and 2017) がなされている。個別化医療を行っている臨床現場では、薬物の処方決定に必要な情報を整備するために個別の治療情報を集積し実務に役立てている (Hayashi, 2013; Yoshiozawa et al., 2009; 松田ら., 2011)。さらに PBPK モデルを用いて、薬物の体内濃度推移を生理学的特性により推定する手法が創薬段階、臨床薬物相互作用の予測や病態時の個別の薬物投与設計など臨床現場でも活用され始めている (Shida et al., 2015; Conner et al., 2018)。

PBPK モデルとは、薬物が血流によって組織に運び込まれ、組織中で一部が代謝・排

出されて組織から消失し、残った薬物が血流によって組織外に運び出されるという一連の過程を、各臓器における血流量や臓器容積等の生理・解剖学的な情報、ならびに、代謝・排泄クリアランス等の化合物固有の生化学的情報や組織移行性の情報に基づき、実態に即した形で記述する数理モデルである。PBPK モデルを用いた解析手法は汎用性が高いことから、医薬品開発の様々な用途に使われている。PBPK モデリング実施者は、*in vitro-in vivo* の相関性の検討、開発候補品の標的臓器への分布予測など、目的や評価化合物の動態特性に合わせて PBPK モデルの構成やコンパートメント数を増減させて、モデリングを行うことができる。医薬品開発の関係者は、構築された PBPK モデルを確認することで、モデリング結果を構造的に理解・評価することができ、PBPK モデリング結果を関係者間で情報共有し、課題解決に活用することが可能となる（高野および山崎, 2012）。そこで、本章では *mCYP2C19* の遺伝子多型の *R*-ワルファリンの薬物動態に及ぼす影響を構造的かつ定量的に評価するため、*R*-ワルファリンの個別 PBPK モデルを構築した。さらに、同一個体から採取した肝ミクロゾームを用いて、個体ごとの肝クリアランス ( $CL_{h,in vitro}$ ) を求め、PBPK モデル解析で得られた肝クリアランス ( $CL_{h,in vivo}$ ) との相関性を検討した。

## 第 2 節 実験材料および実験方法

### III-2-i 試薬

*R*-ワルファリンは Sigma-Aldrich Japan より購入した。個別サル肝ミクロゾームは、第 II 章の薬物動態試験で使用した同一のサルから採取された肝を用いて、I-2-ii 項に準じて調製されたものを使用した。その他の試薬は市販品の最高純度のものを使用した。

### III-2-ii *in vitro* 代謝速度の測定

代謝反応は個別サル肝ミクロゾームを用いて I-2-iv 項に準じて、インキュベーションを行った。肝ミクロゾーム (1.0 mg protein) を *R*-ワルファリン (1.0  $\mu$ M)、NADPH 生成系 (0.25

mM NADP<sup>+</sup>、2.5 mM G-6-P、0.25 unit/mL G-6-P DH) および 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む反応混液に添加し、計 0.2 mL とした。水浴上 37°C で 30 分間反応させ、60% 過塩素酸 (10 μL) を添加し、反応を停止させた。反応混液は 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 10 μL を HPLC に注入し分析に用いた。試料中での未変化体 (R-ワルファリン) の濃度を測定し、消失速度を求め、基質濃度で除して肝ミクロゾーム中でのクリアランス (肝固有クリアランス) を算出した。

### III-2-iii PBPK モデルによる解析とシミュレーション

第 II 章の薬物動態試験の経口投与後 24 時間までの血漿中 R-ワルファリン濃度を用いた。ノンコンパートメント解析による PK パラメータは Phoenix WinNonlin version 6.3 (Pharsight, Moubtain View, CA, USA) を用いて算出した。個体ごとの PBPK モデルは、消化管 (Gut) コンパートメント、肝 (Liver) コンパートメント、全身循環 (Central) コンパートメントから構成される簡素な構造の PBPK モデルを構築した (Shida et al., 2015)。R-ワルファリンの血漿中非結合同型分率 ( $f_{uP}$ , 0.005) (Berry et al., 2011)、オクタノール/水分配係数 (LogP, 2.90) は ChemBioDraw Ultra 11.0 (HULINKS Inc.) を用いて *in silico* より推定した。血液対血漿中濃度比 ( $R_b$ , 0.692) は式 3-1 を用いて算出し、肝の組織-血液分配係数 ( $K_{p,h}$ , 2.31) は、以下の式 3-1~3-3 に従い算出した (Gargas et al., 1995; Kato et al., 2008)。

$$K_{p,h} = \frac{P \times 0.02289 + 0.72621}{P \times 0.0396 + 0.960581} \times \frac{f_{uP}}{f_{uh}} R_b \quad (3-1)$$

$$P = 10^{\log P} \quad (3-2)$$

$$\frac{f_{uP}}{f_{uh}} = 0.5 \times (f_{uP} + 1) \quad (3-3)$$

なお、 $f_{uh}$  は肝組織中タンパク非結合形分率で、サルの肝容量 ( $V_h$ , 0.135 L) および肝血流量 ( $Q_h$ , 13.1 L/h) は Davies と Morris の報告 (Davies and Morris, 1933) に記載された値を

用いた。

吸収・消化管透過率 ( $F_a \cdot F_g$ )、吸収速度定数 ( $k_a$ )、全身循環コンパートメント容積 ( $V_1$ ) および肝固有クリアランス ( $CL_{h,int}$ ) は、残差法および 1-コンパートメントモデルを用いた最小二乗法により最適値を求めた。その後、前述の文献情報に基づき算出した各パラメータの推定値と最小二乗法により得られたパラメータ値を使い、簡素な PBPK モデルの連立微分方程式を数値解析することで、血漿中濃度のシミュレーションを行った (Shida et al., 2015; Utoh et al., 2016)。各コンパートメントにおける物質収支式 3-4~3-6 を以下に記載した。

$$\frac{dX_g(t)}{dt} = -k_a \cdot X_g(t) \quad \text{when at } t = 0, X_g(0) = \text{dose} \quad (3-4)$$

$$V_h \frac{dC_h}{dt} = Q_h \cdot C_b - \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} + k_a \cdot X_g - CL_{h,int} \cdot \frac{C_h}{K_{p,h}} \cdot f_{uP} \quad (3-5)$$

$$V_1 \frac{dC_b}{dt} = -Q_h \cdot C_b + \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - CL_r \cdot C_b \quad (3-6)$$

なお、 $X_g$  は消化管コンパートメント中の薬物量、 $k_a$  は吸収速度定数、 $C_h$  および  $C_b$  はそれぞれ肝および全身循環コンパートメントにおける薬物濃度、 $V_h$  および  $V_1$  はそれぞれ肝および全身循環コンパートメントの分布容積、 $Q_h$  は肝血流量、 $CL_{h,int}$  は肝固有クリアランス、 $CL_r$  は腎クリアランス、 $K_{p,h}$  は肝における組織対血漿中薬物濃度比、 $R_b$  は血液対血漿中薬物濃度比、 $f_{uP}$  は血漿中タンパク非結合形分率を示す。

#### III-2-iv 統計学的解析

R-ワルファリンの PK パラメータは、InStat 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて、一元配置分散分析を行った。

### 第3節 結果

第2章において、*mCYP2C19* の遺伝子変異[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]を有する野生型 (n=4)、変異型ヘテロ接合体 (n=4) および変異型ホモ接合体 (n=3) のサルにラセミ体ワルファリンを静脈内および経口投与した薬物動態試験を実施した。その投与後24時間までの血漿中R-ワルファリン濃度結果を用いてノンコンパートメント解析を行った。代表的なPKパラメータをTable 3-1に示す。各PKパラメータを用いて一元配置分散解析を行った結果、静脈内および経口投与後ともに、変異型ホモ接合体群の消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) の平均および投与後24時間までのAUC ( $AUC_{0-24}$ ) の平均は野生型群の平均に比べて有意に高値を示した (Table 3-1)。

*mCYP2C19* の遺伝子変異[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]の変異型が判明している11頭の各サルについて、Table 3-2に示すパラメータを用いた簡素なPBPKモデルにより、R-ワルファリン仮想投与後24時間までの血漿中R-ワルファリン濃度推移のシミュレーションを行った。個別の簡素なPBPKモデルを構築する連立微分方程式を数値解析することで、R-ワルファリンを仮想投与した後の血漿中R-ワルファリン濃度を推定した。野生型群、変異型ヘテロ接合体群および変異型ホモ接合体群の個体ごとの血漿中R-ワルファリン実測値および仮想投与後血漿中濃度-時間曲線をFig. 3-1に示す。仮想投与後の推定濃度は実測値に類似した推移を示した。R-ワルファリンを経口投与して得られた個別の  $AUC_{0-24, p.o.}$  値とコンピュータ上で同じ11個体のサルに仮想投与しPBPKモデルを用いて推定した *in silico*  $AUC_{0-24, p.o.}$  値との間に有意な相関関係が認められた (Fig. 3-2A)。野生型、変異型ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体の各群のR-ワルファリンの吸収・消化管透過率の (消化管吸収率と消化管透過率の積:  $F_a \cdot F_g$ )、吸収速度定数 ( $k_a$ )、全身循環容積 ( $V_1$ ) の値は類似していた (Table 3-2)。  $F_a \cdot F_g$ 、 $k_a$  および  $V_1$  の平均値は、それぞれ、0.857~1.0、3.12~3.58 ( $h^{-1}$ ) および0.252~0.324 (L) で、R-ワルファリンの吸収が良好かつ速やかに分布容積は細胞外液容量 (1.04 L, Davies and Morris, 1944) の1/3以下で小さかった。しか

しながら、*R*-ワルファリンの *in vivo* 肝固有クリアランス ( $CL_{h,int, in vivo}$ ) 値は *mCYP2C19* の遺伝子変異により低下し、変異型ホモ接合体群の  $CL_{h,int, in vivo}$  値は野生型群の値の約 1/12 で有意な低値を示した ( $p < 0.01$ , Table 3-2)。

同じ 11 個体から採取した肝ミクロゾームを用いて、*in vitro* での *R*-ワルファリンの消失速度を測定した。体重 5 kg のサル の 1 個体当りの肝重量は 150 g および肝 1 g 当りの肝ミクロゾーム蛋白量は 40 mg との値を用いて、*in vitro* での *R*-ワルファリンの消失速度から *in vitro* 肝クリアランス ( $CL_{h, in vitro}$ ) を算出した。変異型ホモ接合体群の  $CL_{h, in vitro}$  は有意に低値を示し、野生型群の  $CL_{h, in vitro}$  値の約 1/13 であった (Table 3-3)。*In silico* PBPK モデリングによって算出した *R*-ワルファリンの *in vivo* 肝クリアランス ( $CL_{h, in vivo}$ ) と *in vitro* で実際に測定した *in vitro* 肝クリアランスとの間に有意な相関関係が認められた (Fig. 3-2B)。*R*-ワルファリンの *in silico* 肝クリアランス ( $CL_{h, in vivo}$ ) および *in vitro* 肝クリアランス ( $CL_{h, in vitro}$ ) はともに *mCYP2C19* 遺伝子変異による有意な低下が認められた (Table 3-3)。

**Table 3-1. Observed pharmacokinetic parameters of *R*-warfarin in 11 cynomolgus monkeys after *i.v.* and *p.o.* administration.**

Cynomolgus monkey	<i>mCYP2C19</i> [ <i>p.Phe100Asn</i> , <i>p.Ala103Val</i> , and <i>p.Ile112Leu</i> ]	<i>i.v.</i>			<i>p.o.</i>			Bioavailability %
		Body kg	$t_{1/2}$ , h	$AUC_{0-24}$ , $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$	Body kg	$t_{1/2}$ , h	$AUC_{0-24}$ , $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$	
M1	Wild type	5.65	4.51	36.8	4.78	4.03	31.8	86
M2		4.7	3.66	17.1	3.96	3.58	12.7	94
M3		4.89	4.13	17.3	4	3.04	21.8	100
M4		4.75	3.26	31.1	3.87	3.69	29.8	100
Mean		5.00 ± 0.44	3.89 ± 0.55	25.6 ± 9.9	4.15 ± 0.42	3.59 ± 0.41	24.0 ± 8.7	95 ± 7
M5	Hetero-	7.9	6.5	58.2	6.23	6.08	47.1	80
M6	zygote	7.86	20.7	85.8	7.31	14.4	74.6	73
M7		4.88	4.62	44.7	3.98	5.07	37.3	86
M8		3.58	3.7	25.1	3.41	4.92	27.8	100
Mean		6.06 ± 2.17	8.88 ± 7.97	53.5 ± 25.5	5.23 ± 1.84	7.62 ± 4.55	46.7 ± 20.2	85 ± 12
M9	Homo-	5.95	27.4	86.9	5.59	20.5	73.8	71
M10	zygote	6.44	24.2	79.7	6.16	40.4	71.9	100
M11		6.31	30.5	98.5	5.41	30.2	85.5	73
Mean		6.23 ± 0.25	27.4 ± 3.2 *	88.4 ± 9.5 *	5.72 ± 0.39	30.4 ± 10.0 *	77.1 ± 7.4 *	81 ± 16

\*  $p < 0.01$  compared with wild type, one-way ANOVA with post tests.

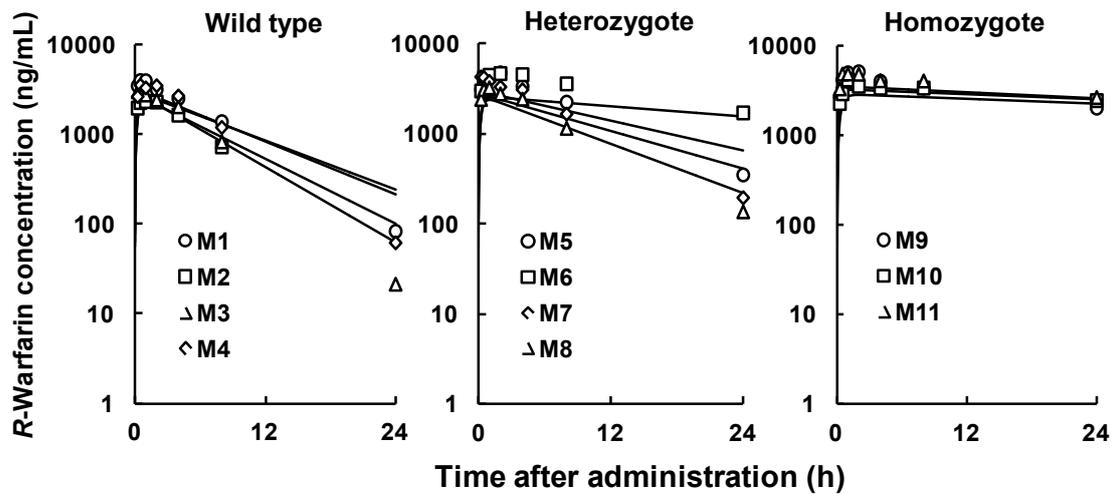


Fig. 3-1. Individual *R*-warfarin plasma concentrations observed and simulated (solid lines) using individual PBPK models after virtual *R*-warfarin administration in 11 cynomolgus monkeys (Wild type; n=4, Heterozygote; n=4, and Homozygote; n=3).

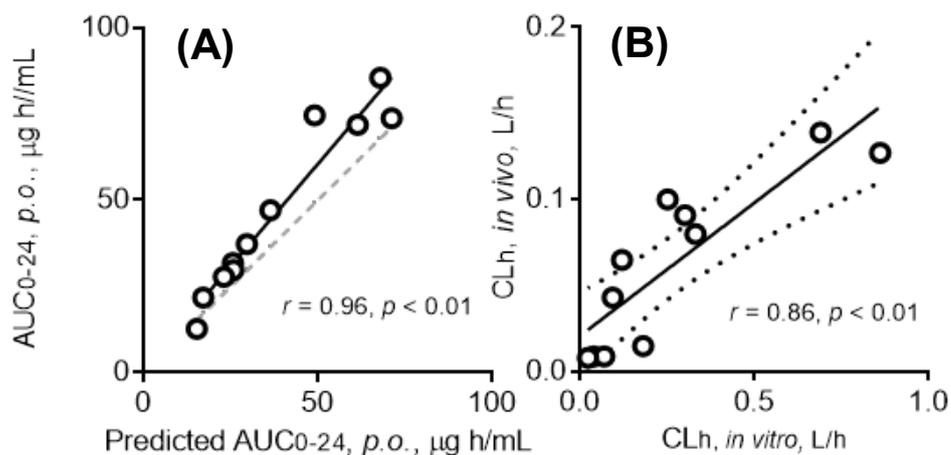
Table 3-2. Parameters for simplified individual monkey PBPK models for *R*-warfarin.

Cynomolgus monkey	<i>mCYP2C19</i> [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]	Fraction absorbed intestinal availability, $F_a \cdot F_g$	Absorption rate constant, $k_a$ (1/h)	Volume of systemic circulation for substrate, $V_1$ (L)	Hepatic intrinsic clearance for substrate, $CL_{h,int, in vivo}$ (L/h)	$AUC_{0-24, p.o.}$ after virtual administration, ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ )
M1	Wild type	0.883	$3.09 \pm 0.55^a$	$0.209 \pm 0.032^a$	$16.0 \pm 1.4^a$	25.6
M2		1	$3.12 \pm 0.22$	$0.368 \pm 0.020$	$28.1 \pm 0.8$	15.3
M3		1	$3.16 \pm 0.27$	$0.440 \pm 0.020$	$25.7 \pm 0.6$	17.1
M4		1	$3.10 \pm 0.31$	$0.278 \pm 0.026$	$18.2 \pm 1.0$	25.8
Mean		$0.971 \pm 0.059^b$	$3.12 \pm 0.03^b$	$0.324 \pm 0.101^b$	$22.0 \pm 5.8^b$	$21.0 \pm 5.5^b$
M5	Heterozygote	0.804	$3.02 \pm 0.13$	$0.101 \pm 0.009$	$8.89 \pm 0.20$	36.4
M6		0.732	$3.93 \pm 0.62$	$0.124 \pm 0.019$	$3.05 \pm 0.26$	49.0
M7		0.893	$3.74 \pm 0.40$	$0.277 \pm 0.019$	$13.0 \pm 0.6$	29.6
M8		1	$3.61 \pm 0.06$	$0.504 \pm 0.015$	$20.1 \pm 0.1$	23.0
Mean		$0.857 \pm 0.116^b$	$3.58 \pm 0.39^b$	$0.252 \pm 0.186^b$	$11.3 \pm 7.2^b$	$34.5 \pm 11.1^b$
M9	Homozygote	1	$2.76 \pm 0.55$	$0.157 \pm 0.037$	$1.88 \pm 1.05$	71.2
M10		1	$2.85 \pm 0.45$	$0.361 \pm 0.047$	$1.81 \pm 1.37$	61.4
M11		1	$4.05 \pm 0.36$	$0.249 \pm 0.014$	$1.69 \pm 0.20$	67.9
Mean		$1.0 \pm 0.0^b$	$3.22 \pm 0.72^b$	$0.256 \pm 0.102^b$	$1.79 \pm 0.09^{b,*}$	$66.8 \pm 5.0^{b,*}$

a: Mean and SD by fitting.

b: Mean and SD for the same group genotyped for *mCYP2C19* c.[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu].

\*:  $p < 0.01$  compared with wild type, one-way ANOVA with post tests.



**Fig. 3-2. Relationship between reported individual  $AUC_{0-24, p.o.}$  values and  $AUC_{0-24, p.o.}$  values estimated using individual PBPK models after virtual *R*-warfarin administration in 11 monkeys (A). Estimated  $CL_{h, in vivo}$  values and measured  $CL_{h, in vitro}$  values based on *R*-warfarin elimination mediated by liver microsomes from the same 11 cynomolgus monkeys (B).**

**Table 3-3. *R*-warfarin depletion rates in liver microsomes from 11 monkeys genotyped for *mCYP2C19* and  $CL_{h, in vivo}$  values estimated based on  $CL_{h, in vitro}$  values in the same 11 monkeys after oral administration of *racemic*-warfarin.**

Cynomolgus monkey	<i>mCYP 2C19</i> [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]	<i>In vitro R</i> -warfarin depletion determined from microsomes		Estimated <i>in vivo R</i> -warfarin clearance from PBPK models
		pmol/min/mg microsomal protein	$CL_{h, in vitro}$ , L/h	$CL_{h, in vivo}$ , L/h
M1	Wild type	$0.92 \pm 0.17^a$	$0.33 \pm 0.06^a$	0.080
M2		$1.92 \pm 0.13$	$0.69 \pm 0.05$	0.139
M3		$2.38 \pm 0.26$	$0.86 \pm 0.09$	0.127
M4		$0.84 \pm 0.20$	$0.30 \pm 0.07$	0.091
Mean		$1.52 \pm 0.76^b$	$0.55 \pm 0.27^b$	$0.109 \pm 0.029^b$
M5	Heterozygote	$0.26 \pm 0.04$	$0.093 \pm 0.016$	0.043
M6		$0.50 \pm 0.08$	$0.18 \pm 0.03$	0.015
M7		$0.34 \pm 0.07$	$0.12 \pm 0.07$	0.065
M8		$0.70 \pm 0.12$	$0.25 \pm 0.04$	0.100
Mean		$0.45 \pm 0.19^b$	$0.16 \pm 0.07^b$	$0.056 \pm 0.036^b$
M9	Homozygote	$0.11 \pm 0.02$	$0.039 \pm 0.005$	0.016
M10		$0.19 \pm 0.01$	$0.069 \pm 0.001$	0.013
M11		$0.060 \pm 0.009$	$0.022 \pm 0.003$	0.010
Mean		$0.12 \pm 0.07^{b,*}$	$0.043 \pm 0.024^{b,*}$	$0.013 \pm 0.003^{b,*}$

a Mean and SD from triplicate determinations.

b Mean and SD for the same group genotyped for *mCYP2C19* c. [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu].

\*  $p < 0.01$  compared with wild type, one-way ANOVA with post tests.

#### 第4節 考察

第II章に記述した薬物動態試験の遺伝子多型既知11頭のサルの血漿中R-ワルファリン濃度データを基に簡素なPBPKモデルを構築し、異なる肝クリアランスを有する個体のそれぞれの*in vivo*血漿中R-ワルファリン濃度推移を推定した (Fig. 3-1 and Table 3-2)。本研究では、経口投与後24時間までの個別の血漿中R-ワルファリン濃度推移に基づく結果 (Table 3-1) から、肝固有クリアランス依存の薬物動態を記述した簡素な個別PBPKモデルを構築した (Table 3-2)。さらに、そのモデルを用いて算出した*in vivo*肝クリアランス値は、同一個体から採取した肝を用いて取得した*in vitro*肝クリアランス値と有意に相関することを明らかにした (Fig. 3-1B and Table 3-3)。野生型群および変異型ホモ接合体群の結果から、*in vitro*代謝酵素活性および*in vivo*肝固有クリアランスが*mCYP2C19*遺伝子変異により1/12程度に低下することが示唆され、*mCYP2C19*のR-ワルファリン代謝に対する寄与率 ( $f_m$ ) が0.9程度であると推察される。本研究の結果から、*mCYP2C19*遺伝子変異によるR-ワルファリンのサル血中からの消失遅延と全身的曝露量の増大は、以下の機序により引き起こされると推察される (式 3-7)。*mCYP2C19*遺伝子変異[p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]により*mCYP2C19*酵素の基質ポケットの構成アミノ酸が置換され、基質ポケットの立体構造変化に伴い*mCYP2C19*酵素のR-ワルファリン代謝能 ( $CL_{h,int}$ ) が低下する。*mCYP2C19*遺伝子変異によりR-ワルファリンの消失クリアランスは低下するが、分布は遺伝子変異の影響を受けないので、R-ワルファリンのAUCは増大し $t_{1/2}$ も遅延すると推察される。R-ワルファリンは主に肝*mCYP2C19*による代謝で消失する固有クリアランス律速型薬物であるため、R-ワルファリンの全身クリアランス ( $CL_{total}$ ) は血流量 ( $Q_h$ )、腎クリアランス ( $CL_r$ ) などの変動の影響を受けず、経口クリアランス ( $CL_{oral}$ ) も $F_g$ および $F_h$ の影響を受けないと推察される。

$$CL_{total} = CL_h + CL_r = \frac{Q_h \cdot CL_{h,int} \cdot f_{uB}}{Q_h + CL_{h,int} \cdot f_{uB}} + CL_r \quad (3-7)$$

このように、PBPK モデリングは、遺伝子多型の薬物動態への影響の定量的評価を行うとともに遺伝子多型による薬物体内動態の個体差の生じる機序や他の生理学的要因との関係性を構造的に明確化するのに極めて有用である。

個体差の予測の視点からは、mCYP2C19 発現量の要因を考慮し遺伝子型既知の個体肝ミクロゾームを用いて R-ワルファリンの *in vitro* 肝固有クリアランス情報を取得すれば、簡素な個別 PBPK モデルにより R-ワルファリンの経口投与後の *in vivo* 薬物動態を推定することが可能と推察される。R-ワルファリンのように腎排泄がほとんどなく、分布容積が小さく肝固有クリアランス律速型薬物の場合は、サル肝ミクロゾームの *in vitro* 代謝データに基づき PBPK モデルを構築して、*in vivo* 体内動態を定量的に記述する、いわゆる、ボトムアップ PBPK アプローチが可能と推察される。Berry らは、ヒトおよびサルにおけるワルファリンの分布容積はともに 0.11 L/kg で、細胞外液量の半分程度と小さく、血漿タンパク非結合形分率もほぼ等しいと報告 (Berry et al., 2011) しており、ヒトおよびサルのワルファリンの腎排泄、体内分布に関わる要素は類似していることが示唆される。このことから、ヒトとサルのワルファリン代謝、とりわけ、主要代謝酵素機能の相違点を明確にすることで、ヒトにおいてもサル同様なワルファリンの PBPK モデリング&シミュレーションが可能と推察される。本研究結果は、R-ワルファリンなど mCYP2C19 遺伝子多型の影響を受ける医薬開発候補品や化学品の体内動態の個体差の解明・予測に役立つと推察される。さらに、得られた結果は、mCYP2C19 の肝クリアランスへの寄与率の推定に有用な情報になると推察される。個別の簡素な PBPK モデルは、サルの個体ごとの R-ワルファリンの予測のみならず、関連する医薬開発候補品や化学品の血漿中濃度の予測に役立つと推察される。加えて、サルを用いて医薬開発候補品の曝露量を測定し、サルでの血漿中濃度推移のシミュレーションが可能な PBPK モデルを構築しておけば、蓄積されたアニマルスケールアップのデータを適用し、信頼のおけるアロメトリック・スケーリング・ファクターを用いてのヒトの経口投与後の血漿中濃度推移の予測が可能となり、医薬品開発の効率化や創薬プロセスへのフィードバックにより開発品の最適化にも貢献すると推察される。

## 第5節 小括

*mCYP2C19* 遺伝子多型の *R*-ワルファリン薬物動態に及ぼす影響を定量的に評価するため、個体ごとに PBPK モデルを構築した。このモデルを用い、仮想投与後に得られる血漿中濃度値と実測値を比較したところ、両者それぞれから算出した  $AUC_{0-24}$  は良好な相関性を示した。個体ごとの PBPK モデル構築で得られた仮想投与曲線の指標を用いる一元配置分散分析の結果、変異型ホモ接合体、変異型ヘテロ接合体および野生型群間で、*R*-ワルファリンの  $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-24}$  および *in vivo* 肝クリアランス ( $CL_{h,in vivo}$ ) に *mCYP2C19* の遺伝子変異による有意な差が認められた。さらに同一個体から採取したサル肝を用いて個体ごとの *in vitro* 肝クリアランス ( $CL_{h,in vitro}$ ) を求めたところ、変異型ホモ接合体群の  $CL_{h,in vitro}$  は、有意に低値を示し、個体それぞれの  $CL_{h,in vitro}$  と  $CL_{h,in vivo}$  には有意な相関関係が認められた。以上、*R*-ワルファリンは分布容積が小さく、主に肝の *mCYP2C19* による代謝で消失する肝固有クリアランス律速型薬物であるため、*mCYP2C19* の遺伝子変異による *mCYP2C19* の代謝クリアランスの顕著な低下は、直接的に *R*-ワルファリンの全身クリアランスの低下につながり、ひいては *R*-ワルファリンの *in vivo* 薬物動態に大きな影響を及ぼしたものと判断された。本研究で構築した PBPK モデルを用いる手法は、*R*-ワルファリンに類似した動態特性を有する化合物にも適用可能で、非臨床試験の *in vivo* 薬物動態の予測や解釈に役立つものと推察される。

## 総括

薬物治療において、特に治療域が狭く血中濃度依存的に生じる副作用が重篤である薬物では、薬物動態の個体差は重大な課題となっている。薬物の体内動態の個体差は、薬物代謝酵素の発現量や代謝活性、肝・腎疾患等の病態、体格、加齢、他の薬物との相互作用などの影響により同じ用量を投与しても個体によって血中濃度が大きく異なる場合がある。医療現場でモニターできる病態時の薬物の血中濃度は、薬物の動態特性と生体の多様な因子により変動するので、個体差の大きな要因となっている薬物代謝酵素の遺伝子多型による影響を検討するのは容易ではない。従前の非臨床試験においては、均質化された実験動物を用いるため、薬物代謝の種差や個体差の検討についての課題は多いのが実状である。

近年、ヒトと同様に、サルにおいても *mCYP2C9* および *mCYP2C19* の遺伝子多型に関する *in vitro* 研究がなされ、*in vivo* においても、ヒト同様な P450 分子種の遺伝子多型の個体差が示唆された。そこで、本研究では *mCYP2C19* の遺伝子多型のワルファリン薬物動態に及ぼす影響を定量的に評価することを目的とした。

第 I 章では、ヒトおよびサル肝における *R-/S-*ワルファリンの *in vitro* 代謝の検討を行った。ヒトでは *S-*ワルファリンは主に *hCYP2C9* により立体選択的に *S-7-*水酸化体に変換されるが、サルでの主要代謝経路は *R-*ワルファリン 7-水酸化反応で、ヒトとは異なる立体選択性を示した。サル肝 *S-*ワルファリン 7-水酸化酵素活性はヒト肝のそれと概ね同程度であるが、*R-7-*水酸化反応は効率的であり、*S* 体に比べ有意に高い水酸化酵素活性を示した。サルにおいて *R-*ワルファリンは主に *mCYP2C19* により立体選択的に *R-7-*水酸化体に変換され、*S-*ワルファリンは *mCYP2C19* の他 *mCYP3A4/5* 等複数の P450 分子種により代謝されることを明らかにした。

第 II 章では、*mCYP2C19* の遺伝子多型 [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu] 既知のサルを用いて *in vivo* 薬物動態試験を行い、*R-/S-*ワルファリンの PK パラメータと遺伝子多

型との関係性を明らかにした。*mCYP2C19* [p.Phe100Asn, p.Ala103Val, and p.Ile112Leu]の遺伝子多型を持つサル 11 頭（野生型 4 頭、変異型ヘテロ接合体 4 頭、変異型ホモ接合体 3 頭）にワルファリンラセミ体を 1.0 mg/kg の用量で静脈内および経口投与し、投与後の血漿中未変化体および *R/S*-6-および *R/S*-7-水酸化ワルファリンの PK パラメータを算出し、*mCYP2C19* 遺伝子変異による影響を評価した。*mCYP2C19* 遺伝子変異は *R/S*-ワルファリンの 11 個体の PK パラメータのうち、吸収、分布または *BA* には影響を及ぼさなかった。*S*-ワルファリンの PK パラメータには変異型ホモ接合体群と野生型群間の有意な差は認められなかった。一方、経口投与後の変異型ホモ接合体群の血漿中 *R*-ワルファリンの  $t_{1/2}$  は野生型群のそれに比べて約 11 倍長く、 $AUC_{inf}$  値は約 8 倍高かった。*mCYP2C19* による代謝に依存して生成した *R*-7-水酸化ワルファリンの血中濃度推移はきわめて低く、その  $AUC_{inf}$  値は野生型群のその約 1/27 で、有意な差が認められた。以上の結果より、*mCYP2C19* 遺伝子多型はサル *in vivo* における *R*-ワルファリン薬物動態に影響を及ぼすことを明らかにした。

第三章では、*mCYP2C19* 遺伝子多型の *R*-ワルファリン薬物動態に及ぼす影響を定量的に評価するため、薬物動態試験の経口投与後 24 時間までの濃度結果を基に個体ごとに PBPK モデルを構築した。このモデルを用い、*in silico* 仮想投与後に得られる血漿中濃度値と実測値を比較したところ、両者それぞれから算出した  $AUC_{0-24}$  は良好な相関性を示した。個体ごとの PBPK モデル構築で得られた *in silico* 仮想投与曲線のパラメータを用いる一元配置分散分析の結果、変異型ホモ接合体、変異型ヘテロ接合体および野生型群間で、*R*-ワルファリンの  $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-24}$  および *in vivo* 肝クリアランス ( $CL_{h,in vivo}$ ) に *mCYP2C19* 遺伝子変異による有意な差が認められた。さらに同一個体から採取したサル肝を用いて個体ごとの *in vitro* 肝クリアランス ( $CL_{h,in vitro}$ ) を求めたところ、変異型ホモ接合体群の  $CL_{h,in vitro}$  は、有意に低値を示し、個体それぞれの  $CL_{h,in vitro}$  と  $CL_{h,in vivo}$  には有意な相関関係が認められた。以上の結果、*R*-ワルファリンは良好に吸収され、その分布容積は小さく、主に肝の *mCYP2C19* による代謝で消失する肝固有クリアランス律速型薬物であるため、*mCYP2C19*

の遺伝子変異による *mCYP2C19* の代謝クリアランスの顕著な低下は、直接的に *R*-ワルファリンのサル全身クリアランスの低下となり、ひいては *R*-ワルファリンの *in vivo* 薬物動態に大きな影響を及ぼしたものと判断された。本研究で構築した PBPK モデルを用いる手法は、*R*-ワルファリンに類似したサルでの動態特性を有する化合物にも適用可能で、非臨床試験の *in vivo* 薬物動態の予測や解釈に役立つものと推察される。

総括すると、*R*-ワルファリンはサルでは主に遺伝子多型性を示す *mCYP2C19* により立体選択的に *R*-7-水酸化体に変換されることを本研究にてはじめて明らかとした。サルでのワルファリン動物体内血中濃度データ、同一個体肝試料による試験管内代謝消失速度および実測値を再現する仮想動物 PBPK モデル用肝クリアランス (肝代謝消失) 値のいずれも、*mCYP2C19* 遺伝子多型に応じて変動することを明らかにした。この *mCYP2C19* 遺伝子多型の *R*-ワルファリンの薬物動態に及ぼす影響を定量的に評価する PBPK モデルは、*in vivo* 薬物動態をも予測し得る方法であることを示した。以上、ヒトと同様に、サルにおける薬物代謝酵素遺伝子多型の非臨床研究における意義を明らかにした。さらに医薬開発候補品の動態特性、薬物代謝酵素遺伝子多型による代謝能の低下、代謝酵素の寄与率等の *in vitro* の情報を組み込んだ PBPK モデルを活用しサル等の薬物体内動態を解析する本手法は、医薬開発候補品の薬物動態と薬効・毒性の明確化のみならず、非臨床試験の計画立案と開発の効率化、創薬プロセス最適化にも貢献し、臨床薬物動態予測、さらに医薬品の適正使用領域にも応用可能であると推察される。

## 本論文内容の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

1. Hosoi Y, Uno Y, Murayama N, Fujino H, Shukuya M, Iwasaki K, Shimizu M, Utoh M, and Yamazaki H (2012) Monkey liver cytochrome P450 2C19 is involved in *R*- and *S*-warfarin 7-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* **84**:1691-1695.
2. Utoh M, Yoshikawa T, Hayashi Y, Shimizu M, Iwasaki K, Uno Y, and Yamazaki H (2015) Slow *R*-warfarin 7-hydroxylation mediated by P450 2C19 genetic variants in cynomolgus monkeys *in vivo*. *Biochem Pharmacol* **95**:110-114.
3. Utoh M, Kusama T, Miura T, Mitsui M, Kawano M, Hirano T, Shimizu M, Uno Y, and Yamazaki H (2018) *R*-Warfarin clearances from plasma associated with polymorphic cytochrome P450 2C19 and simulated by individual physiologically based pharmacokinetic models for 11 cynomolgus monkeys. *Xenobiotica* **48**:206-210

## 謝辞

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 薬理学研究室教授 渡邊泰男博士に深甚なる謝意を表します。また、副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 水谷顕洋博士および衛生化学研究室教授 石井 功博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および本論文の作成に懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 薬物動態学研究室教授 山崎浩史博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数多くのご助言ならびにサポートを頂きました株式会社新日本科学 宇野泰広博士に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、数多くのご助言ならびに論文の校閲を賜りました株式会社新日本科学 岩崎一秀博士に厚く御礼申し上げます。

多くのご指導とご助言を賜り、さらに種々の便宜を図って下さいました昭和薬科大学 薬物動態学研究室准教授 清水万紀子博士、講師 村山典恵博士、前特任助教 上原正太郎博士および同研究員 岩野俊介博士、同研究生 保坂信哉博士、細井祥生氏、宿谷光則氏、河野未来氏、三井満里奈氏、草間崇史氏、三浦智徳氏の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました株式会社新日本科学 洲加本孝幸博士および多くのご指導とご助言を賜りました株式会社新日本科学 永田良一博士、福崎好一郎博士、鮫島秀暢博士をはじめ、株式会社新日本科学薬物代謝分析センターにて、動物実験および動態・統計解析の計画と遂行にご尽力いただき、有益な成果をもって本研究に貢献された吉川隆大氏、平野貴弘博士、古賀 正博士の皆様に深謝いたします。

最後に、本研究の遂行を支えてくれた妻の明子に心より感謝します。

## 参考文献

- 栗津荘司、渡邊 淳 (1988) "生理学的モデル" 薬物速度論の基礎 廣川書店 35-70.
- 家入一郎 (2014) 薬物の効果や体内動態の個人差と遺伝子多型 *Organ Biology* **21**:247-253.
- 本間真人 (2012) 薬物応答性に影響する遺伝子多型 医薬品添付文書にみられる情報  
*Organ Biology* **19**:91-97.
- 前川京子、佐井君江 (2014) 薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型とその人種差 ファ  
ルマシア **50**: 669-673.
- 松田公子、宮本 篤、伊藤善規、江口久恵、大蔵輝明、賀勢泰子、下村光一、白石 正、  
丹原敏男、仲村スイ子、早狩 誠、松原和夫、源川奈穂 (2011) 医療の質向上のため  
のチーム医療への薬剤師の関与とその成果に関する論文実例集(3)TDM 領域 日病薬  
誌 **47**:1373-1383.
- 南雲 明 (2013) 薬物治療における個別化医療の現状と展望 -基礎研究の進展が医薬品開  
発に与えるインパクト- 医薬産業政策研究所 リサーチペーパー・シリーズ No. 56
- 高野 良治、山崎 浩史 (2012) 化学物質のリスク評価におけるヒト生理学的薬物動態  
(PBPK)モデルの適用 日本化学会情報化学部会誌 **30**:46-49.
- 横井 毅 (2001) 薬物代謝酵素の遺伝的多型と個別薬物療法 化学と生物 **39**:368-375.
- Banfield C, O'Reilly R, Chan E, Rowland M (1983) Phenylbutazone-warfarin interaction in man:  
further stereochemical and metabolic considerations. *Br J Clin Pharmacol* **16**: 669-675.
- Berry LM, Li C and Zhao Z (2011) Species differences in distribution and prediction of human  $V_{ss}$   
from preclinical data. *Drug Metab Dispos* **39**:2103-2116.
- Bullock P, Pearce R, Draper A, Podval J, Bracken W, Veltman J, Thomas P and Parkinson A.  
(1995) Induction of liver microsomal cytochrome P450 in cynomolgus monkeys. *Drug Metab  
Dispos* **23**:736-748.
- Chiba K, Shimizu K, Kato M, Nishibayashi T, Terada K, Izumo N and Sugiyama Y (2014)

- Prediction of inter-individual variability in the pharmacokinetics of CYP2C19 substrates in humans. *Drug Metab Pharmacokinet* **29**:379-386.
- Chiba K, Shimizu K, Kato M, Miyazaki T, Nishibayashi T, Terada K and Sugiyama Y (2017) Estimation of inter individual variability of pharmacokinetics of CYP2C9 substrates in humans *J Pharm Sci* **106**:2695-2703.
- Clatanoff DV, Triggs PO and Meyer OO (1954) Clinical experience with coumarin anticoagulants warfarin and warfarin sodium. *AMA Arch Intern Med* **94**:213-220.
- Conner TM, Nikolian VC, Georgoff PE, Pai MP, Alam HB, Sun D, Reed RC and Zhang T (2018) Physiologically based pharmacokinetic modeling of disposition and drug-drug interactions for valproic acid and divalproex. *Eur J Pharm Sci* **111**:465-481.
- Davies B and Morris T (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Res* **10**: 1093-1095
- Emoto C, Iwasaki k, Koizumi R, Utoh M, Murayama N, Uno Y and Yamazaki H (2011) Species difference between cynomolgus monkeys and humans on cytochromes P450 2D and 3A-dependent drug oxidation activities in liver microsomes. *Journal of Health Science* **57**:164-70.
- Gargas ML, Andersen ME, Teo SK, Batra R, Fennell TR and Kedderis GL (1995) A physiologically based dosimetry description of acrylonitrile and cyanoethylene oxide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**:185-194.
- Gibaldi M and Perrier D (1982) "Clearance concept". *Pharmacokinetics 2nd ed., rev. & expanded*. New York: Marcel Dekker 319-354.
- Guengerich FP, Martin MV, Guo Z and Chun YJ (1996) Purification of functional recombinant P450s from bacteria. *Methods Enzymol* **272**, 35-44.
- Hanioka N, Tatarazako N, Jinno H, Arizono K and Ando M (2000) Determination of cytochrome P450 1A activities in mammalian liver microsomes by high-performance liquid

- chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* **744**:399-406.
- Hayashi H (2013) Personalized drug therapy-directed clinical pharmacology research based on genetic polymorphisms and pharmacokinetics analysis. *Yakugaku Zasshi* **133**:1079-1085.
- Hisaka A, Kusama M, Ohno Y, Sugiyama Y and Suzuki H (2009) A proposal for a pharmacokinetic interaction significance classification system (PISCS) based on predicted drug exposure changes and its potential application to alert classifications in product labelling. *Clin Pharmacokinet* **48**:653-666.
- Hisaka A, Ohno Y, Yamamoto T and Suzuki H (2010) Theoretical considerations on quantitative prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet* **25**:48-61.
- Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Shimizu M, Uehara S, Fujino H, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y and Yamazaki H (2015a) Evaluation of 89 compounds for identification of substrates for cynomolgus monkey CYP2C76, a new bupropion/nifedipine oxidase. *Drug Metab Dispos* **43**:27-33.
- Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y and Yamazaki H (2015b) Similar substrate specificity of cynomolgus monkey cytochrome P450 2C19 to reported human P450 2C counterpart enzymes by evaluation of 89 drug clearances. *Biopharm Drug Dispos* **36**:636-643.
- Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y and Yamazaki H (2015c) Comprehensive evaluation for substrate selectivity of cynomolgus monkey cytochrome P450 2C9, a new efavirenz oxidase. *Drug Metab Dispos* **43**:1119-1122.
- Inoue K, Yamazaki H, Imiya K, Akasaka S, Guengerich FP and Shimada T (1997) Relationship between CYP2C9 and 2C19 genotypes and tolbutamide methyl hydroxylation and S-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics* **7**:103-113.
- Iwasaki K, Kitsugi Y, Ikeda K, Yoshikawa T, Hosaka S, Uehara S, Uno Y, Utoh M, and Yamazaki

- H (2016) *In vivo* individual variations in pharmacokinetics of efavirenz in cynomolgus monkeys genotyped for cytochrome P450 2C9. *Biopharm Drug Dispos* **37**:379-383.
- Iwasaki K and Uno Y (2009) Cynomolgus monkey CYPs: a comparison with human CYPs. *Xenobiotica* **39**, 578-81, (2009)
- Kaminsky LS and Zhang ZY (1997) Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* **73**:67-74.
- Kato M, Shitara Y, Sato H, Yoshisue K, Hirano M, Ikeda T and Sugiyama Y (2008) The quantitative prediction of CYP-mediated drug interaction by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Pharmaceutical Research* **25**:1891–1901.
- Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD and Johnson JA (2009) Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* **360**:753-764.
- Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ and Meyer UA (1989) Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol* **36**:89-96.
- Lang D and Böcker R (1995) Highly sensitive and specific high-performance liquid chromatographic analysis of 7-hydroxywarfarin, a marker for human cytochrome P-4502C9 activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* **672**:305-309.
- Mano Y, Sugiyama Y and Ito K (2015) Use of a physiologically based pharmacokinetic model for quantitative prediction of drug-drug interactions via CYP3A4 and estimation of the intestinal availability of CYP3A4 substrates. *J Pharm Sci* **104**:3183-3193.
- Matsunaga M, Yamazaki H, Kiyotani K, Iwano S, Saruwatari J, Nakagawa K, Soyama A, Ozawa S, Sawada J, Kashiwama E, Kinoshita M and Kamataki T (2009) Two novel CYP2D6\*10 haplotypes as possible causes of a poor metabolic phenotype in Japanese. *Drug Metab Dispos* **37**:699-701.
- Murayama N, Yajima K, Hikawa M, Shimura K, Ishii Y, Takada M, Uno Y, Utoh M, Iwasaki K and

- Yamazaki H (2018) Assessment of multiple cytochrome P450 activities in metabolically inactivated human liver microsomes and roles of P450 2C isoforms in reaction phenotyping studies. *Biopharm Drug Dispos* **39**:116-121.
- Nakajima M (2017) From the viewpoint of drug metabolism research. *Yakugaku Zasshi* **137**:697-705.
- Nishimuta H, Sato K Mizuki Y, Yabuki M, Komuro S (2010) Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates in humans using cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **38**:1967-1975.
- Ogasawara A, Utoh M, Nii K, Ueda A, Yoshikawa T, Kume T and Fukuzaki K.(2009) Effect of oral ketoconazole on oral and intravenous pharmacokinetics of simvastatin and its acid in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **37**:122-128.
- Ogasawara A, Negishi I, Kozakai K and Kume T(2009) In vivo evaluation of drug-drug interaction via mechanism-based inhibition by macrolide antibiotics in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **37**:2127-2136.
- Ohtsuka T, Yoshikawa T, Kozakai K, Tsuneto Y, Uno Y, Utoh M, Yamazaki H and Kume T (2010) Alprazolam as an in vivo probe for studying induction of CYP3A in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **38**:1806-813.
- Ohno Y, Hisaka A and Suzuki H (2007) General framework for the quantitative prediction of CYP3A4-mediated oral drug interactions based on the AUC increase by coadministration of standard drugs. *Clin Pharmacokinet* **46**:681-696.
- Ohno Y, Hisaka A, Ueno M and Suzuki H (2008) General framework for the prediction of oral drug interactions caused by CYP3A4 induction from *in vivo* information. *Clin Pharmacokinet* **47**:669-680.
- Omura T and Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**:2370-2378.

- O'Reilly RA (1969) Interaction of the anticoagulant drug warfarin and its metabolites with human plasma albumin. *J Clin Invest* **48**:193–202.
- Parikh A, Gillam EM and Guengerich FP (1997) Drug metabolism by Escherichia coli expressing human cytochromes P450. *Nat Biotechnol* **15**:784-788.
- Parmentier Y, Pothier C, Hewitt N, Vincent L, Caradec F, Liu J, Lin F, Trancart MM, Guillet F, Bouaita B, Chesne C and Walther B (2018) Direct and quantitative evaluation of the major human CYP contribution (fmCYP) to drug clearance using the *in vitro* Silensomes™ model. *Xenobiotica* **10**:1-14.
- Phillips AH and Langdon RG (1962) Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J Biol Chem* **237**:2652-2660.
- Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* **34**:83-448
- Rendic S and Guengerich FP (2010) Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters. *Curr Drug Metab* **11**:4-84.
- Sakai C, Iwano S, Yamazaki Y, Ando Y, Nakane F, Kouno M, Yamazaki H and Miyamoto Y (2014) Species differences in the pharmacokinetic parameters of cytochrome P450 probe substrates between experimental animals, such as mice, rats, dogs, monkeys, and microminipigs, and humans. *J Drug Metab Toxicol* **5**:173.
- Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M and Padrini R (2002) Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther* **72**:702-710.
- Shetty HGM, Fennerty AG, and Routledge PA (1989) Clinical pharmacokinetic considerations in the control of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacokinet* **16**:238–253.
- Shida S, Utoh M, Murayama N, Shimizu M, Uno Y and Yamazaki H (2015) Human plasma

concentrations of cytochrome P450 probes extrapolated from pharmacokinetics in cynomolgus monkeys using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica* **45**:881-886.

Shimada T, Tsumura F and Yamazaki H (1999) Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-ethoxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **27**:1274-1280.

Shimada T, Tsumura F, Yamazaki H, Guengerich FP and Inoue K (2001) Characterization of (+/-)-bufuralol hydroxylation activities in liver microsomes of Japanese and Caucasian subjects genotyped for CYP2D6. *Pharmacogenetics* **11**:143-156.

Shimizu T, Ochiai H, Asell F, Yokono Y, Kikuchi Y, Nitta M, Hama Y, Yamaguchi S, Hashimoto M, Taki K, Nakata K, Aida Y, Ohashi A and Ozawa N. (2003) Bioinformatics research on inter-racial difference in drug metabolism II. Analysis on relationship between enzyme activities of CYP2D6 and CYP2C19 and their relevant genotypes. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**:71-78.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson B and J.,Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.

Takahashi H and Echizen H (2001) Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **40**:587-603.

Takahashi H, Kashima T, Nomizo Y, Muramoto N, Shimizu T, Nasu K, Kubota T, Kimura S and Echizen H (1998a) Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* **63**:519-528.

Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S and Echizen H (1998b) 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**:365-373.

Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M and Chiba K (2000) CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics* **10**:95-104.

Uehara S, Murayama N, Yamazaki H and Uno Y (2010) A novel CYP2A26 identified in cynomolgus monkey liver metabolizes coumarin. *Xenobiotica* **40**:621-9.

Uehara S, Murayama N, Nakanishi Y, Zeldin DC, Yamazaki H and Uno Y (2011a) Immunochemical detection of cytochrome P450 enzymes in liver microsomes of 27 cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **339**:654-661.

Uehara S, Murayama N, Nakanishi Y, Zeldin DC, Yamazaki H and Uno Y (2011b) Species difference between cynomolgus monkeys and humans on cytochromes P450 2D and 3A-dependent drug oxidation activities in liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **339**:654-61.

Uno Y, Fujino H, Kito G, Kamataki T and Nagata R (2006) CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C in liver, metabolizing tolbutamide and testosterone. *Mol Pharmacol* **70**:477-486.

Uno Y, Iwasaki K, Yamazaki H and Nelson DR (2011a) Macaque cytochromes P450: nomenclature, transcript, gene, genomic structure, and function. *Drug Metab Rev* **43**:346-361.

Uno Y, Matsushita A, and Yamazaki H (2011b) CYP1B1 is polymorphic in cynomolgus and rhesus macaques. *J Vet Med Sci* **73**:1229-1231.

Uno Y, Matsushita A, Murayama N and Yamazaki H (2015a) Genetic polymorphism of cynomolgus and rhesus macaque CYP2C9. *Drug Metab Pharmacokinet* **30**:130-132.

Uno Y, Matsushita A, Osada N, Uehara S, Kohara S, Nagata R, Fukuzaki K, Utoh M, Murayama N

- and Yamazaki H (2010a) Genetic variants of CYP3A4 and CYP3A5 in cynomolgus and rhesus macaques. *Drug Metab Dispos* **38**:209-214.
- Uno Y, Matsushita A, Shukuya M, Matsumoto Y, Murayama N and Yamazaki H (2014a) CYP2C19 polymorphisms account for inter-individual variability of drug metabolism in cynomolgus macaques. *Biochem Pharmacol* **91**:242-248.
- Uno Y, Sakuraba H, Uehara S, Kumano T, Matsuno K, Nakamura C, Kito G, Kamataki T, and Nagata R (2009) A null allele impairs function of CYP2C76 in cynomolgus monkeys: A possible genetic tool for generation of better animal model in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* **37**:14-17.
- Uno Y, Uehara S, and Yamazaki H (2011c) A discovery of genetic variants in CYP1D1: an implication for functional integrity of CYP1D1 in cynomolgus macaques and rhesus macaques. *Drug Metab Pharmacokinet* **26**:627-631.
- Uno Y, Uehara S, Kohara S, Iwasaki K, Nagata R, Fukuzaki K, Utoh M, Murayama N and Yamazaki H (2011d) Newly identified CYP2C93 is a functional enzyme in rhesus monkey, but not in cynomolgus monkey. *PLoS One* **6**:e16923.
- Uno Y, Uehara S, Kohara S, Murayama N, and Yamazaki H (2014b) Polymorphisms of CYP2D17 in cynomolgus and rhesus macaques: an evidence of the genetic basis for the variability of CYP2D-dependent drug metabolism. *Drug Metab Dispos* **42**:1407-1410.
- Uno Y, Uehara S, Kohara S, Osada N, Murayama N and Yamazaki H (2015) CYP2D44 polymorphisms in cynomolgus and rhesus macaques. *Mol Biol Rep* **42**:1149-1155.
- Uno Y, Uehara S, and Yamazaki H (2016a) Utility of non-human primates in drug development: Comparison of non-human primate and human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* **121**:1-7.
- Uno Y and Yamazaki H (2016b) Development of a genotyping tool for a functionally relevant CYP2C19 allele (Phe100Asn, Ala103Val, Ile112Leu) in cynomolgus macaques. *J Vet Med Sci*

78:147-148.

Utoh M, Miura T, Kusama T, Uehara S, Shimizu M, Uno Y and Yamazaki H (2017) Efavirenz clearances in vitro and in vivo in six cynomolgus monkeys associated with polymorphic cytochrome P450 2C9 and simulated by individual physiologically based pharmacokinetic models. *Biopharm Drug Dispos* **38**:439-442.

Utoh M, Murayama N, Uno Y, Onose Y, Hosaka S, Fujino H, Shimizu M, Iwasaki K and Yamazaki H (2013) Monkey liver cytochrome P450 2C9 is involved in caffeine 7-N-demethylation to form theophylline. *Xenobiotica* **43**:1037-1042.

Utoh M, Suemizu H, Mitsui M, Kawao M, Toda A, Uehara S, Uno Y, Shimizu M, Sasaki E and Yamazaki H (2016) Human plasma concentrations of cytochrome P450 probe cocktails extrapolated from pharmacokinetics in mice transplanted with human hepatocytes and from pharmacokinetics in common marmosets using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica* **46**:1049-1055.

Villanueva M, Heckenberger R, Strobach H, Palmér M, Schrör K (1993) Equipotent inhibition by R(-), S(+)- and racemic ibuprofen of human polymorphonuclear cell function *in vitro*. *Br J Clin Pharmacol* **35**:235-242.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR and Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **32**:1201-1208.

Yamazaki H and Shimada T (1997) Human liver cytochrome P450 enzymes involved in the 7-hydroxylation of R- and S-warfarin enantiomers. *Biochem Pharmacol* **54**:1195-1203.

Yamazaki H, Guo Z, Persmark M, Mimura M, Inoue K, Guengerich FP and Shimada T (1994) Bufuralol hydroxylation by cytochrome P450 2D6 and 1A2 enzymes in human liver microsomes. *Mol Pharmacol* **46**:568-577

- Yamazaki H, Inoue K and Shimada T (1998a) Roles of two allelic variants (Arg144Cys and Ile359Leu) of cytochrome P450 2C9 in the oxidation of tolbutamide and warfarin by human liver microsomes. *Xenobiotica* **28**:103-115.
- Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, Ozawa N, Kawai T, Suzuki Y, Goldstein JA, Guengerich FP and Shimada T (1998b) Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **56**:243-251.
- Yamazaki H, Mimura M, Sugahara C and Shimada T (1994) Catalytic roles of rat and human cytochrome P450 2A enzymes in testosterone 7 alpha- and coumarin 7-hydroxylations. *Biochem Pharmacol* **48**:1524-1527.
- Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, Shimada N, Guengerich FP, Shimada T, Nakajima M and Yokoi T (2002) Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of Escherichia coli. *Protein Expr Purif* **24**:329-37.
- Yasumori T, Chen L, Nagata K, Yamazoe Y and Kato R. (1993) Species differences in stereoselective metabolism of mephenytoin by cytochrome P450 (CYP2C and CYP3A). Species differences in stereoselective metabolism of mephenytoin by cytochrome P450 (CYP2C and CYP3A). *J Pharmacol Exp Ther* **264**:89-94.
- Yoshikado T, Yoshida K, Kotani N, Nakada T, Asaumi R, Toshimoto K, Maeda K, Kusuhara H and Sugiyama Y (2016) Quantitative analyses of hepatic OATP-mediated interactions between statins and inhibitors using PBPK modeling with a parameter optimization method. *Clin Pharmacol Ther* **100**:513-523.
- Yoshikado T, Maeda K, Kusuhara H, Furihata K and Sugiyama Y (2017) Quantitative analyses of the influence of parameters governing rate-determining process of hepatic elimination of

drugs on the magnitudes of drug-drug interactions via hepatic OATPs and CYP3A using physiologically based pharmacokinetic models. *J Pharm Sci* **106**:2739-2750.

Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, Doi O, Kimura M, Kawarasaki Y, Inoue K and Itoh K (2009) Effect of VKORC1-1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients. *Thromb. Res* **124**:161-166.

Zhang Z, Fasco MJ, Huang Z, Guengerich FP and Kaminsky LS (1995) Human cytochromes P4501A1 and P4501A2: *R*-warfarin metabolism as a probe. *Drug Metab Dispos* **23**:1339-1345.