

大腸癌に対する XELIRI 療法の最適化に関する基礎的検討

2021 年度

京都薬科大学 博士学位論文

【薬学】薬物動態学分野

栄井 修平



本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社より許可を得ている。

1. Shuhei Sakai, Shinji Kobuchi, Yukako Ito, Toshiyuki Sakaeda. Assessment of pharmacokinetic variations of capecitabine after multiple administration in rats: a physiologically based pharmacokinetic model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880. [第 1 章]
2. Shuhei Sakai, Shinji Kobuchi, Yukako Ito, Toshiyuki Sakaeda. Assessment of drug-drug interaction and optimization in capecitabine and irinotecan combination regimen using a physiologically based pharmacokinetic model. *J. Pharm. Sci.* in press [第 2 章]
3. Shuhei Sakai, Shinji Kobuchi, Yukako Ito, Toshiyuki Sakaeda. A physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model for capecitabine in colorectal cancer rats: simulation of antitumor efficacy at various administration schedules. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2021**, 46(2), 301-315. [第 3 章]

## 略語一覽

5-BU	5-Bromouracil
5-FU	5-Fluorouracil
5'-DFCR	5'-Deoxy-5-fluorocytidine
5'-DFUR	5'-Deoxy-5-fluorouridine
APC	7-Ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	Area under the plasma concentration-time curve from 0 h to infinity
$AUMC_{0 \rightarrow \infty}$	Area under the first moment curve from 0 h to infinity
CDA	Cytidine deaminase
CES	Carboxylesterase
CL/F	Appearance total plasma clearance
$CL_{int}$	Intrinsic clearance
$C_{max}$	Maximum concentration
CPT-11	Irinotecan
CRC	Colorectal cancer
CV%	Coefficient of variation
DMH	1,2-Dimethyl-hydrazine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
$f_p$	Unbound form ratio
$k_a$	Absorption rate constant
$k_e$	Elimination rate constant
$K_i$	Inhibition constant
$K_m$	Michaelis constant
$K_p$	Tissue to blood concentration ratio
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
M&S	Modeling and simulation
MRT	Mean resident time
NET	Non-eliminating tissue
NPC	7-Ethyl-10-[4-amino-1-piperidino] carbonyloxycamptotecin
PBPK model	Physiologically based pharmacokinetic model
PBPK-PD model	Physiologically based pharmacokinetics-pharmacodynamic model
PBS	Phosphate-buffered saline
S.D.	Standard deviation
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin
$t_{1/2}$	Elimination half-life

TDM	Therapeutic drug monitoring
THU	Tetrahydrouridine
$T_{\max}$	Time to reach the maximum concentration
TP	Thymidine phosphorylase
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
Vd/F	Appearance distribution volume
$V_{\max}$	Maximum velocity

## 要旨

### 序論

切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌については、5-fluorouracil (5-FU) の40時間以上に及ぶ持続点滴を基本とするレジメン、例えば、irinotecan (CPT-11) と組み合わせる FOLFIRI 療法の繰り返しが標準治療として施行されているが、患者に対する身体的、精神的負担が少なくなく、これに代わる治療法が望まれてきた。2000年代になり、5-FUの経口プロドラッグである capecitabine が開発され、5-FUの持続点滴は capecitabine の14日間反復経口投与に置き換わり、FOLFIRI療法の2nd lineとして XELIRI療法が主流となりつつある。ただし、XELIRI療法のレジメンは十分な検討を経て決定されたものではなく、capecitabine や CPT-11の用量の妥当性を指摘する声も少なくない。また、XELIRI療法の第1コース終了後に急性毒性等が発症し、次回の XELIRI療法までの休薬期間の延期、次回の XELIRI療法における減量を行うことがあるが、休薬期間や減量の基準は未確立である。これらの検討を患者で行うことは実質的に不可能であり、XELIRI療法の有効性を確保しつつ、より安全に施行するため情報が皆無に等しく、FOLFIRI療法に代わって1st lineにならないのが現状である。

そこで本研究では、XELIRI療法の最適化を目的として、正常ラット、大腸癌モデルラットを用いて基礎的な検討を行い、さらに生理学的薬物速度論モデル (PBPK model) を用いた数理的な解析を行った。

### 第1章 正常ラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と代謝酵素の関係

Wistar系雄性ラットに対して、capecitabine、1日1回、180 mg/kgの14日間反復経口投与を行い、Day 1、7、14に、投与開始8時間後まで採血を行った。Capecitabineはcarboxylesterase (CES)により5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR)に、続いて、cytidine deaminase (CDA)により5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR)に、最終的に、thymidine phosphorylase (TP)により5-FUに変換されることから、これら4種類の薬物/代謝物の血漿中濃度を測定した。また、肝臓、小腸を採取し、3種類の酵素の活性を測定した。その結果、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FUの血漿中濃度推移は経日的に大きく変化することが明らかとなった。例えば、day 14におけるcapecitabineの曝露量 ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ )はDay 1の約23%に過ぎなかった。5-FUの  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ も約68%に低下した。CES、CDA、TPの活性を加味してPBPK modelを構築したところ、実測値と推定値は近似しており、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FUの血漿中濃度推移の経日的な変化がCES、CDA、TPの活性の変動で説明できることが示唆された。すなわち、capecitabineの反復経口投与により、代謝酵素の活性が変動した結果、血漿中濃度推移が変化するものと推察できた。

### 第2章 XELIRI療法における capecitabine の至適投与量の推定

正常ラットにて、PBPKモデルの有用性が確認できたので、XELIRI療法におけるcapecitabineの至適投与量の推定を行った。Wistar系雄性ラットを、capecitabine 180 mg/kg投与群、CPT-11

180 mg/m<sup>2</sup> BSA 投与群、併用群に分け、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU、さらに CPT-11 と CPT-11 の活性代謝物である 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) の血漿中濃度推移を評価した。その結果、CPT-11 の併用により、capecitabine の血漿中濃度は上昇したが、一方で、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度は低下することが明らかとなった。また、capecitabine の併用により、CPT-11 の血漿中濃度は低下したものの、SN-38 の血漿中濃度には変化は認められなかった。ところで、CPT-11 は CES により活性化される。すなわち、capecitabine と代謝酵素を共有していることに起因してこれらの変化が起こったものと仮定し、肝臓を採取して *in vitro* で阻害実験を行った結果、capecitabine から 5'-DFCR への代謝は CPT-11 の濃度依存的に阻害されること、その阻害係数は 42.54 nM であることが明らかとなった。PBPK model に組み入れてシミュレーションを行った結果、XELIRI 療法における capecitabine の投与量を約 1.7 倍に増量する必要があることが示唆された。

### 第 3 章 大腸癌モデルラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と抗腫瘍効果

Wistar 系雄性ラットを用いて、1,2-dimethylhydrazine の皮下投与と dextran sodium sulfate の飲水投与により、大腸癌モデルを作製した。また、大腸癌の体積を測定し、抗腫瘍効果の指標とした。その結果、正常ラットと同様に、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR の血漿中濃度推移は経日的に大きく変化することが明らかとなった。ただし、5-FU の変化はわずかであった。肝臓、小腸における CES、CDA、TP の活性の変動でこれらの血漿中濃度推移の説明を試みたが、実測値と推定値は一部で乖離しており、肝臓血流量等の生理学的因子の変動の寄与が示唆された。なお、PBPK model に腫瘍部位と抗腫瘍効果にかかるモデルを組み入れることで、抗腫瘍効果を精度よく推定できた。PBPK model を用いてシミュレーションを行った結果、次回の XELIRI 療法における 80% への減量と比較して、次回の XELIRI 療法までの休薬期間の 1 週間の延長が、抗腫瘍効果に優れることが推測できた。

### 結論

XELIRI 療法に関して、各種ラットを用いて基礎的な検討を行い、さらに PBPK model 解析を行った。その結果、1) より高い抗腫瘍効果を得るためには、XELIRI 療法における capecitabine の増量を行う必要があること、2) 急性毒性等により XELIRI 療法の繰り返しが困難になった場合、次回の XELIRI 療法における減量と比較して、次回の XELIRI 療法までの休薬期間の延期を行うことで抗腫瘍効果が確保できること、が示唆された。





## 目次

序論	1
本論	
第1章 正常ラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と代謝酵素の関係	
1-1. 緒言	5
1-2. 実験材料	6
1-3. 実験方法	6
1-4. 結果	13
1-5. 考察	19
第2章 XELIRI 療法における capecitabine の至適投与量の推定	
2-1. 緒言	21
2-2. 実験材料	22
2-3. 実験方法	22
2-4. 結果	29
2-5. 考察	35
第3章 大腸癌モデルラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と抗腫瘍効果	
3-1. 緒言	37
3-2. 実験材料	38
3-3. 実験方法	38
3-4. 結果	45
3-5. 考察	53
結論	55
謝辞	57
引用文献	58



## 序論

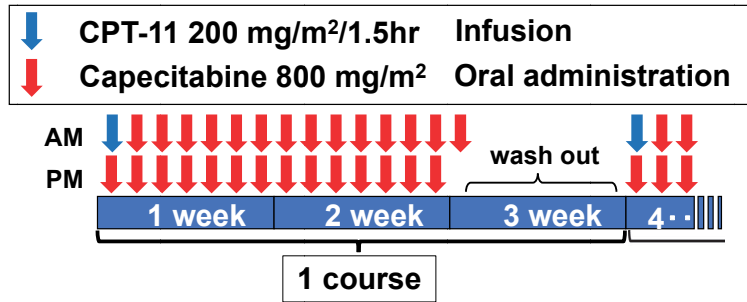
治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に 1st-line で用いられる化学療法として、フッ化ピリミジン系代謝拮抗薬である 5-fluorouracil (5-FU)、活性型葉酸製剤であるレボホリナートを基本とし、白金系抗がん薬であるオキサリプラチン、もしくはトポイソメラーゼ I 阻害剤である irinotecan (CPT-11) を併用する FOLFOX 療法、もしくは FOLFIRI 療法が汎用されている<sup>1</sup>。しかしながら、5-FU の投与にあたっては 46 時間に及ぶ持続点滴静注が必須となっており、これらの治療法は患者に対して多大な身体的、精神的負担がかかるとされている<sup>2</sup>。具体的には、治療開始前に中心静脈ポート留置術が必要であること、治療中の中心静脈ポートを介した長時間に及ぶ点滴のため日常生活に制限がかかること、治療終了後に投与ルートの抜針のための来院が必要なこと、などである。

このような中、経口投与可能なフッ化ピリミジン系代謝拮抗薬である capecitabine が開発された<sup>3,4</sup>。Capecitabine は 5-FU のプロドラッグであり、FOLFOX 療法や FOLFIRI 療法における 5-FU との置き換えが検討された。実際に、FOLFOX 療法は capecitabine とオキサリプラチンの併用療法である XELOX 療法に置き換わり、患者の負担は大きく軽減した。また、FOLFIRI 療法は capecitabine と CPT-11 の併用療法である XELIRI 療法に置き換わり 2nd-line として使用されている<sup>5,6</sup>。

これまでに、XELIRI 療法に関して検討された臨床試験として BICC-C study と AXEPT study が挙げられる。BICC-C study は治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対する化学療法において、CPT-11 と併用するフッ化ピリミジン系代謝拮抗薬について検討された phase 3 ランダム化比較試験であり、FOLFIRI 療法、5-FU の急速静脈投与を行う治療法 (mIFL 療法)、XELIRI 療法について比較検討がなされている<sup>7</sup>。この試験において XELIRI 療法は他の治療法と比較して有害事象の発現頻度が高く、試験途中で症例集積が中止されている。

一方、AXEPT study はアジア共同の phase 3 ランダム化比較試験であり、FOLFIRI ± bevacizumab と XELIRI ± bevacizumab の有効性と安全性について検討されている<sup>8</sup>。この試験では BICC-C study の結果を受け、XELIRI 療法における capecitabine と CPT-11 の投与量を 80% dose に減量している。その結果、AXEPT study において FOLFIRI 療法に対する XELIRI 療法の非劣性が示されている。

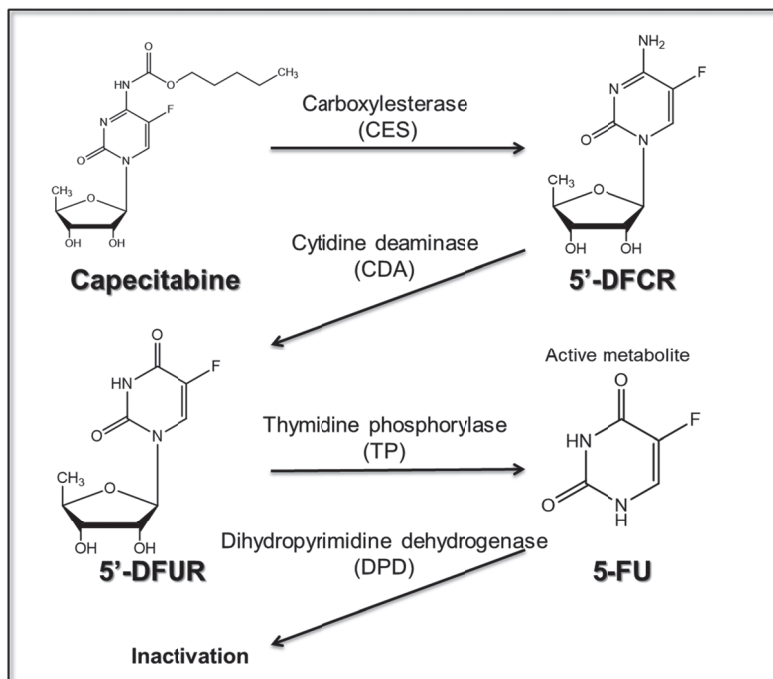
現在の XELIRI 療法の標準的なスケジュールを Fig. 1 に示した。AXEPT study を根拠として設定されており、Day 1 に 200 mg/m<sup>2</sup> の CPT-11 の点滴静脈内投与を行い、capecitabine を 1 回 800 mg/m<sup>2</sup> で 1 日 2 回 14 日間経口投与する。その後 7 日間の休薬期間を置き、これを 1 コースとして繰り返す。ただし、現在の XELIRI 療法に関して検討された臨床試験は少なく、BICC-C study において有害事象発現頻度が高かったことから新たな臨床試験を行うことは難しいため、用法・用量の妥当性に関する十分な検討がなされていないのが現状である。このように、XELIRI 療法に関してのエビデンスが不足しているために、現時点では 1st-line の治療として患者への負担が大きい FOLFIRI 療法が用いられており、経口で治療可能な XELIRI 療法に完全に置き換えられていない。



**Fig. 1 The standard schedule for XELIRI therapy**

また、XELIRI 療法では手足症候群や下痢などの有害事象が多く報告されており、これらの有害事象の発現が次コース以降の抗がん剤の減量や投与の延期の原因になることも少なくない<sup>9</sup>。しかしながら、有害事象発現後の投与量の減量や投与の延期について有効な方法は確立されておらず、臨床経験に基づいて抗がん剤の減量や投与の延期が行われている。そのため、治療強度減弱後に期待される治療効果が得られない、といった問題点がある。しかしながら、前述の通り XELIRI 療法は BICC-C study で有害事象発現頻度が高かった等の理由により新たな臨床試験での用法・用量の検討が難しく、非臨床での基礎的検討が必要と考えられる<sup>7</sup>。

ところで、capecitabine は薬物動態学的に非常に興味深い代謝経路を有しており、生体内で3段階の代謝を経て活性代謝物である 5-FU に変換される (Fig. 2)<sup>10,11</sup>。



**Fig. 2 The chemical structures and metabolic pathway of capecitabine to 5-fluorouracil (5-FU)**  
(*Cancer Chemother. Pharmacol.* 2020, 85(5), 869-880; Fig. 1)

第1段階では capecitabine は主に肝臓や小腸において carboxylesterase (CES) によって加水分解され 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR) が生成する。第2段階では 5'-DFCR は主に肝臓、小腸、腫瘍組織において cytidine deaminase (CDA) によって酸化され 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) に変換される。第3段階では肝臓、小腸、腫瘍組織において 5'-DFUR は thymidine phosphorylase (TP) によって 5-FU に変換され、抗腫瘍効果を示す。その後、5-FU は dehydropyrimidine dehydrogenase (DPD) によって代謝され不活化される。Capecitabine の代謝活性化に関与するこれらの酵素は capecitabine とその代謝物の血漿中濃度に大きく影響を与えることが予想され、それぞれの代謝酵素の活性と血漿中濃度を定量的に関連付けることは capecitabine を用いるレジメンの治療最適化に非常に重要である<sup>12</sup>。

代謝酵素の活性と血漿中薬物濃度の関係を定量的に評価する手法として、生理学的薬物速度論モデル (physiologically based pharmacokinetic model: PBPK model) を用いた modeling & simulation (M&S) が行われている。M&S では、解析の目的に応じて適したモデルを構築し、構築したモデルを用いたシミュレーションを行うことで、多様な条件における結果予測が可能となる。そのうちでも従来からよく用いられていたコンパートメントモデルは、生体内での薬物動態の速度論的過程を抽象化したコンパートメントから構成されるモデルで、一般的にモデルの構造が簡単で扱いやすいという利点があるものの、それぞれのコンパートメントの容積や速度定数といったモデルパラメータの生理学的な意味が明確でなく、得られたパラメータについて生理学的な解釈が難しいといった欠点がある。

一方で、PBPK model では生体の生理学的機構や薬物の生化学的機構を組み込んだモデル構築が可能である。すなわち、対象とする動物の組織体積や血流速度などの生理学的パラメータに加えて、薬物代謝酵素活性、腎排泄、タンパク結合率等の薬物ごとの生化学的パラメータをモデルに組み込むことが可能であり、生理学的な意味を持った解析が可能となる<sup>13</sup>。また、PBPK model は医薬品開発や臨床試験において、非臨床試験の結果に基づく未知の薬物間相互作用の推定に実用化されており、その重要性が高まっている<sup>14</sup>。

本研究では、capecitabine の活性化に関わる CES、CDA、TP の活性を測定し、それらの代謝酵素の活性と capecitabine 及びそれぞれの代謝物の血漿中薬物濃度推移の関係について検討を行った。さらに M&S の手法を用いて、*in vitro* で求めた代謝酵素の活性から capecitabine 及びその代謝物の血漿中薬物濃度を推定するための PBPK model を構築し、モデルによるパラメータの推定及び種々の条件における薬物濃度のシミュレーションを行なった。

第1章ではまず、capecitabine の14日間反復投与による血漿中濃度の変化について検討を行なった。正常ラットに対して capecitabine を14日間反復経口投与し、反復投与後の capecitabine とその代謝物の血漿中薬物濃度の経時的な変化について *in vivo* で検討を行った。さらに、ラットの肝臓と小腸を用いて、capecitabine 反復投与後の capecitabine の活性化に関わる酵素の活性について *in vitro* で検討した。その後、*in vitro* の実験から得られたパラメータを用いて PBPK model を構築し、capecitabine 反復投与後の capecitabine とその代謝物の血漿中薬物濃度推移を推定した。

第2章では、XELIRI 療法における capecitabine の至適投与量について検討した。XELIRI 療法で使用される CPT-11 は capecitabine と同様に生体内で代謝活性化を受ける薬物であり、

CES によって 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) に変換され、抗腫瘍効果を示す<sup>15</sup>。前述の通り capecitabine も CES によって代謝されており、capecitabine と CPT-11 の代謝過程において CES を共有している。すなわち、両薬剤を併用した場合、CES を介した薬物間相互作用の可能性が考えられる。そこで、capecitabine と CPT-11 の併用療法における単独投与との血漿中薬物濃度推移の変化について比較した。さらに、*in vitro* の代謝実験によって CES による capecitabine の代謝に対する CPT-11 の阻害活性について検討した。その後、薬物間相互作用を考慮した PBPK model を構築し、XELIRI 療法時の capecitabine の最適な投与量についてシミュレーションによる検討を行った。

第 3 章では、capecitabine の減量や休薬を行った場合の抗腫瘍効果について検討を行った。まず、大腸癌モデルラットを作製し capecitabine の反復投与を行うことで、capecitabine と代謝物の血中濃度推移について検討を行った。さらに、大腸癌モデルラットにおける肝臓及び小腸での capecitabine の代謝に関わる酵素の活性を測定した。最後に、第 1 章で構築した PBPK model を発展させ、capecitabine の抗腫瘍効果を予測するための physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model (PBPK-PD model) を構築した。構築した PBPK-PD model を用いた解析を行うことで、capecitabine の減量や休薬を行った場合の抗腫瘍効果について検討を行った。

## 第1章 正常ラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と代謝酵素の関係

### 1-1. 緒言

薬物の治療効果の指標として薬物の血漿中濃度が挙げられる。抗がん剤においては、治療効果を最大限に発揮し、有害事象の発現を可能な限り抑制する目的で、目標とする血漿中濃度の曲線下面積（AUC）に基づいた投与設計や薬物治療中の血中濃度モニタリング（Therapeutic drug monitoring: TDM）を用いた投与設計が行われている<sup>16,17</sup>。すなわち、がん化学療法において薬物の血漿中濃度を考慮した投与設計を行うことで、がん化学療法の最適化に寄与することが期待される。

前述の通り、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌の治療で用いられる XELIRI 療法では14日間の capecitabine 反復経口投与が行われる。しかしながら、capecitabine 反復投与後の capecitabine やその代謝物である 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中薬物濃度推移の変動については十分に検討されておらず、14日間の反復投与の必然性は不明である。特に、活性代謝物である 5-FU の血漿中濃度は capecitabine の抗腫瘍効果に重大な影響があると考えられるため、十分な検討が必要である。

さらに、capecitabine は生体内で連続的に3段階の代謝を受け活性化する薬物であり、代謝酵素の活性が代謝物の血漿中濃度を規定する因子として重要であると考えられる。すなわち、capecitabine 反復投与後の capecitabine やその代謝物の血漿中薬物濃度推移を予測するためには、代謝酵素の活性を考慮することが重要である。代謝酵素の活性を考慮した投与設計を構築することにより、XELIRI 療法における capecitabine の有効性や安全性の向上が期待される。

そこで本章では、capecitabine の14日間反復投与後の capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中薬物濃度推移の変化についてラットを用いた *in vivo* での検討を行った。さらに、*in vitro* 代謝実験において、ラットの肝臓と小腸を用いて capecitabine の活性化に関与する酵素である CES、CDA、TP の活性を測定した。最後に、*in vitro* 代謝実験で得られた酵素の活性に関するパラメータを用いて、血漿中濃度推移を推定するための PBPK model を構築した。

## 1-2. 実験材料

### 1-2-1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット（10 週齢）は Nippon SLC Co., Ltd. (Hamamatsu, Japan) から購入した。全ての実験に用いたラットは恒温・恒湿で 12 時間の明暗サイクル（点灯時間 8:00~20:00）条件下で最低 5 日間飼育した。固形飼料及び水は自由摂取可能としたが、実験前 12 時間は絶食を行った。全ての動物実験は京都薬科大学動物倫理委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに従って実施した。

### 1-2-2. 試薬

Capecitabine は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) から入手した。5'-DFCR と 5'-DFUR は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) から購入した。5-FU は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より入手した。5-Bromouracil (5-BU) は Sigma-Aldrich Co. (Steinheim Germany) より購入した。その他の試薬類は、全て市販特級品を用いた。

## 1-3. 実験方法

### 1-3-1. Capecitabine 反復投与条件における薬物動態実験

Capecitabine を 1% carboxyl methylcellulose sodium 溶液に溶解し、22.5 mg/mL に調製した。全てのラットを投与回数に応じて、単回投与群、7 日間反復投与群、14 日間反復投与群の 3 群に分け、180 mg/kg の用量で capecitabine を 1 日 1 回経口投与した。Capecitabine の投与量は先行の動物実験を参考に設定した<sup>18</sup>。それぞれの群で、Day 1、Day 7、Day 14 の capecitabine 投与前及び、投与 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8 時間後に頸静脈より 250  $\mu$ L の血液を採取した。採取した血液試料を 12,000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、血漿成分を分離した。その後、上清 100  $\mu$ L を分取し、血漿試料とした。

最終の血液試料採取後に、ラットの肝臓と小腸を phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) で灌流した。灌流後、代謝実験に使用する組織試料として肝臓と小腸を採取した。それぞれの血漿試料と組織試料は -80  $^{\circ}$ C で凍結保存した。

### 1-3-2. Capecitabine 及びその代謝物の血漿中濃度測定

血漿試料に、内標準物質として 25  $\mu$ g/mL の 5-BU を 10  $\mu$ L 添加した。さらに、タンパク成分を除去するため、100  $\mu$ L の飽和硫酸アンモニウム水溶液を加えた。タンパク成分分析出後、capecitabine 及びその代謝物を血漿試料から抽出するため、ethyl acetate/2-propanol (10:1, v/v) を 1 mL 加え、混合後上層を採取した。N<sub>2</sub> 気流下で溶液を蒸発させ、100  $\mu$ L の 0.1% formic acid で再溶解した。再溶解した溶液を 10  $\mu$ L 分取し、90  $\mu$ L の 0.1% formic acid を加えた。これを 5'-DFCR と 5'-DFUR の測定用試料とした。残った 90  $\mu$ L を capecitabine 及び 5-FU の測定用試料として用いた。



薬物の血漿中濃度測定には、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS; API3200, Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。LC-MS/MS は LC-10AD マイクロポンプ (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) と AS8030 自動試料インジェクター (Tosoh, Tokyo, Japan) で構成されており、エレクトロスプレーイオン化法にてイオン化を行った。移動相として、5'-DFCR と 5'-DFUR の測定には 10 mM ammonium acetate/acetonitrile (1:1, v/v) を、capecitabine と 5-FU の測定には 0.1% formic acid/acetonitrile (4:1, v/v) を用いた。流速は 0.2 mL/min とし、カラムには COSMOSIL® HILIC Packed column (2.0×150 mm, 5µm; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を使用した。また、測定時にはそれぞれの試料 30 µL を LC-MS/MS に注入した。測定条件に関しては Kobuchi らの方法を参照した<sup>19</sup>。

測定において、真度は 15%以内、精度は±15%以内と許容範囲内であった。全ての測定で定量下限は 0.01 µg/mL 未満であった。

### 1-3-3. 薬物速度論的解析

Capecitabine 及びその代謝物の薬物動態学的パラメータを算出するため、Phoenix WinNonlin® software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いてノンコンパートメントモデル解析を行った。

血中濃度-時間曲線より、最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) 及び最高血漿中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) を決定した。消失速度定数 ( $k_e$ ) は消失相における測定点を 3 点以上用いた線形回帰によって決定した。無限時間へ外挿した血漿中濃度時間曲線下面積 ( $AUC_{0\rightarrow\infty}$ ) 及び 1 次モーメント曲線下面積 ( $AUMC_{0\rightarrow\infty}$ ) は台形公式によって算出した。なお、最終血漿中濃度測定時間である投与後 8 時間の時点で薬物が検出された場合は、以後の各薬物の血漿中濃度推移は  $k_e$  より推定し、次回投与時まで  $capecitabine$  及び代謝物は検出限界以下であることを確認した。投与後 8 時間の時点で薬物が検出されなかった場合は、 $AUC_{0\rightarrow 8}$  を  $AUC_{0\rightarrow\infty}$  とみなし、解析を行なった。消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は以下の式より求めた。

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

平均滞留時間 (MRT) は以下の式に基づき算出した。

$$MRT = \frac{AUMC_{0\rightarrow\infty}}{AUC_{0\rightarrow\infty}}$$

見かけの全身クリアランス ( $CL_{tot}/F$ ) は以下の式より求めた。

$$CL_{tot}/F = \frac{D}{AUC_{0\rightarrow\infty}}$$

ここで D は capecitabine の投与量を表し、F はバイオアベイラビリティを表す。見かけの分布容積 ( $Vd/F$ ) は以下の式を用いて算出した。

$$Vd/F = CL_{tot}/F \times MRT$$

#### 1-3-4. 代謝実験

薬物動態実験の際に採取した肝臓は細かく切断した。小腸は縦断し、粘膜を採取した。その後、それぞれの組織試料に 3 倍量の 0.15 M KCl、100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、100  $\mu$ M dithiothreitol、3 unit/L heparin を含む Tris-HCl buffer (pH 7.4) で希釈し、冷却条件下でホモジナイズを行った。その後、ホモジネートは超遠心機を用いて 4°C、9,000 rpm で 20 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を分取し 4°C、28,000 rpm で 1 時間、再度遠心分離を行った。上澄み液をサイトゾルとし、沈殿物を 250 mM の sucrose で溶解したものをミクロゾームとした。サイトゾル、ミクロゾームそれぞれのタンパク質濃度は WAKO protein assay BCA kit (Osaka, Japan) を用いて測定した。

続けて、capecitabine 及びその代謝物の代謝に関わる酵素の活性を測定するため、代謝実験を行なった。CES 活性を測定するため、50 mM phosphate buffer (pH 7.4) に 1 mM EDTA、100  $\mu$ M tetrahydrouridine (THU)、及び 1.0 mg protein/mL ミクロゾームを添加し反応溶液とした。Capecitabine は 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し 2.5、5、10、20、40、80、160 mM の capecitabine 溶液をそれぞれ調製した。反応溶液 225  $\mu$ L を 37°C でインキュベートした後、調製した capecitabine 溶液を 25  $\mu$ L 添加し 30 分間反応させた。反応停止液として 500  $\mu$ L の acetonitrile を用いた。反応終了後、反応溶液を 12,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を  $N_2$  気流下で蒸発させ、10 mM ammonium acetate/acetonitrile (1:1, v/v) で再溶解した。再溶解した試料 30  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、5'-DFCR 濃度を測定した。

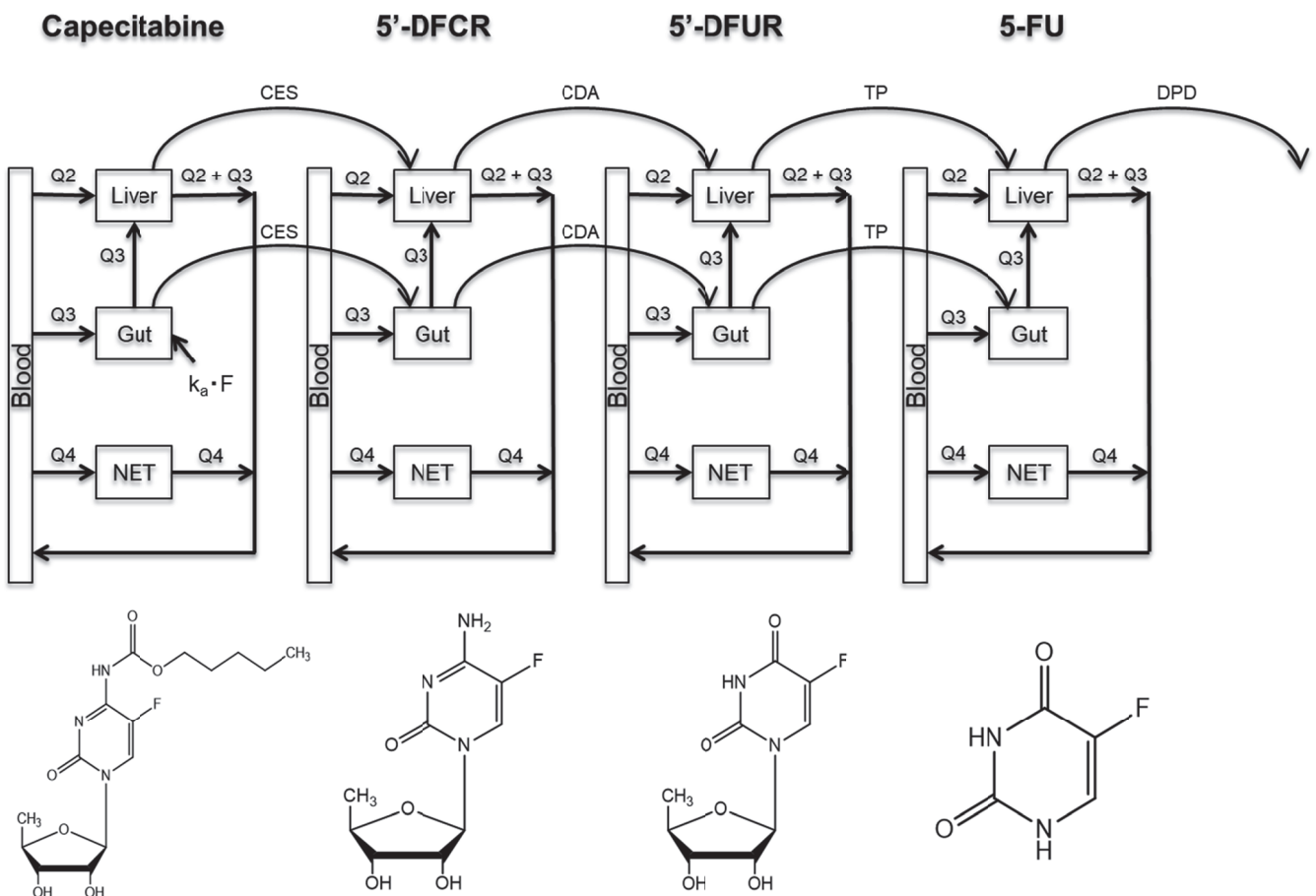
さらに、CDA 及び TP 活性を測定するため、1.0 mg protein/mL サイトゾルを 50 mM HCl buffer (pH 7.4) に添加し反応溶液とした。5'-DFCR を蒸留水に溶解し、1.25、2.5、5、10、20、40、80 mM の 5'-DFCR 溶液を調製した。同様に 5'-DFUR を蒸留水に溶解し、2.5、5、10、20、40、80、160 mM の 5'-DFUR 溶液を調製した。反応溶液を 180  $\mu$ L を 37°C でインキュベート後、調製した 5'-DFCR 溶液及び 5'-DFUR 溶液を 20  $\mu$ L ずつそれぞれ添加し 30 分間反応させた。反応停止液として 1.0 mL の ethyl acetate を用いた。反応停止後、反応溶液に 200  $\mu$ L の 0.05 M HCl と、内標準物質として 10  $\mu$ L の 5-BU を添加した。混合液を 12,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った。上清に対して同じ手順でさらに 2 度抽出した後、 $N_2$  気流下で蒸発させ 100  $\mu$ L の移動相で再溶解した。5'-DFUR 濃度測定の移動相として 10 mM ammonium acetate/acetonitrile (1:1, v/v) を、5-FU 濃度測定の移動相として 0.1% formic acid/acetonitrile (4:1, v/v) をそれぞれ用いた。それぞれの試料 30  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、5'-DFUR 及び 5-FU 濃度を測定した。LC-MS/MS の測定条件は 1-3-2. と同一とした。これらの実験は Miwa、Shindoh らの報告に準拠し実施した<sup>10,20</sup>。

実験で得られた酵素の活性から、Lineweaver-Burk プロットにより CES、CDA、TP の最大反応速度 ( $V_{max}$ ) 及びミカエリス定数 ( $K_m$ ) を求めた。さらに求めた  $V_{max}$  と  $K_m$  から以下の式に基づき、それぞれの代謝酵素の固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を算出した。

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

### 1-3-5. PBPK model 構築

Capecitabine 反復投与後の capecitabine とその代謝物の血漿中濃度について推定するため、PBPK model を構築した。PBPK モデルは Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いて記述した。構築した PBPK model の模式図を Fig. 3 に示す。



**Fig. 3 Physiologically based pharmacokinetic model scheme of capecitabine to 5-fluorouracil (5-FU)**

Straight-line represents blood circulation and curved line represents metabolism.

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Fig. 2)

このモデルではモデル全体を血液、肝臓、消化管、代謝に関与しない組織 (Non-eliminating tissue: NET) の4つのコンパートメントで記述しており、capecitabine やその代謝物は瞬時にそれぞれのコンパートメント全体に均一に拡散する。また、それぞれの薬物はミカエリスメンテン式に従って代謝される。それぞれの組織ごとの血流速度、組織容積、DPD の代謝活性、薬物のタンパク非結合率 ( $f_p$ )、血液-組織間の分配係数 ( $K_p$ ) については既知のパラメータを用いた (Table 1, 2) <sup>13,21-23</sup>。CES、CDA、TP の  $V_{max}$  及び  $K_m$  は 1-3-4. の代謝実験の結果を用いた。組織中のミクロゾームタンパク質濃度は肝臓では 44.8 mg/g tissue とし、小腸では 2.3 mg/g tissue とした <sup>24,25</sup>。

**Table 1. Physiological values for physiologically based pharmacokinetic model development and kinetic parameters of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in liver**

Tissue	Blood flow rate <sup>21</sup> (mL/min/kg)	Tissue volume <sup>21</sup> (mL/kg)	$V_{max, DPD}$ <sup>22</sup> (nmol/min/g tissue)	$K_m, DPD$ <sup>22</sup> ( $\mu$ mol/L)
Blood	215.9	60		
Liver	86.4	40	250.7	40
Gut	77.7	36		
NET	51.8	750		

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Table 1)

**Table 2. Kinetic parameters of protein binding and tissue distribution for physiologically based pharmacokinetics model development**

Compound	$f_p$ <sup>13</sup>	$K_{p_{liver}}$ <sup>13</sup>	$K_{p_{Gut}}$ <sup>13</sup>	$K_{p_{NET}}$ <sup>23</sup>
Capecitabine	0.55	1.73	0.96	0.56
5'-DFCR	0.95	1.46	2.61	0.90
5'-DFUR	0.79	1.79	3.11	0.46
5-FU	1.00	2.78	1.71	0.56

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Table 2)

構築した PBPK model のモデル式を以下に示す。

$$\frac{dC_{11}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{11}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{21}}{Kp_{21}} - (Q_3 \times C_{11}) - (Q_4 \times C_{11}) + \frac{Q_4 \times C_{41}}{Kp_{41}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{21}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{11}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{21}}{Kp_{21}} + \frac{Q_3 \times C_{31}}{Kp_{31}} - \frac{\alpha \times V_{max21} \times f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})}{K_{m21} + f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{31}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{11}) - \frac{Q_3 \times C_{31}}{Kp_{31}} + (k_a \times F \times X) - \frac{\alpha \times V_{max31} \times f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})}{K_{m31} + f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{41}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{11}) - \frac{Q_4 \times C_{41}}{Kp_{41}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{12}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{12}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{22}}{Kp_{22}} - (Q_3 \times C_{12}) - (Q_4 \times C_{12}) + \frac{Q_4 \times C_{42}}{Kp_{42}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{22}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{12}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{22}}{Kp_{22}} + \frac{Q_3 \times C_{32}}{Kp_{32}} + \frac{\alpha \times V_{max21} \times f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})}{K_{m21} + f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})} - \frac{\beta \times V_{max22} \times f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})}{K_{m22} + f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{32}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{12}) - \frac{Q_3 \times C_{32}}{Kp_{32}} + \frac{\alpha \times V_{max31} \times f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})}{K_{m31} + f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})} - \frac{\beta \times V_{max32} \times f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})}{K_{m32} + f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{42}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{12}) - \frac{Q_4 \times C_{42}}{Kp_{42}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{13}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{13}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{23}}{Kp_{23}} - (Q_3 \times C_{13}) - (Q_4 \times C_{13}) + \frac{Q_4 \times C_{43}}{Kp_{43}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{23}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{13}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{23}}{Kp_{23}} + \frac{Q_3 \times C_{33}}{Kp_{33}} + \frac{\beta \times V_{max22} \times f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})}{K_{m22} + f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})} - \frac{\gamma \times V_{max23} \times f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})}{K_{m23} + f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{33}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{13}) - \frac{Q_3 \times C_{33}}{Kp_{33}} + \frac{\beta \times V_{max32} \times f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})}{K_{m32} + f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})} - \frac{\gamma \times V_{max33} \times f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})}{K_{m33} + f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{43}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{13}) - \frac{Q_4 \times C_{43}}{Kp_{43}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{14}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{14}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{24}}{Kp_{24}} - (Q_3 \times C_{14}) - (Q_4 \times C_{14}) + \frac{Q_4 \times C_{44}}{Kp_{44}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{24}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{14}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{24}}{Kp_{24}} + \frac{Q_3 \times C_{34}}{Kp_{34}} + \frac{\gamma \times V_{max23} \times f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})}{K_{m23} + f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})} - \frac{\delta \times V_{max24} \times f_{p4} \times (C_{24}/Kp_{24})}{K_{m24} + f_{p4} \times (C_{24}/Kp_{24})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{34}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{14}) - \frac{Q_3 \times C_{34}}{Kp_{34}} + \frac{\gamma \times V_{max33} \times f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})}{K_{m33} + f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{44}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{14}) - \frac{Q_4 \times C_{44}}{Kp_{44}} \right\} / V_4$$

ここで、Q は各組織への血流速度、C は各薬物の薬物濃度、V は組織容積、 $k_a$  は吸収速度定数、F はバイオアベイラビリティ、X は capecitabine の投与量を表す。また、式中で C、Kp、 $V_{max}$ 、 $K_m$  に後述の 1 つ目の番号 (1-4) は、順に血液、肝臓、消化管、NET の各コンパートメ

ントを表す。Q と V に後述の番号も同様に各コンパートメントを表す。さらに、C、K<sub>p</sub>、V<sub>max</sub>、K<sub>m</sub> に後述の 2 つ目の番号 (1-4) は、順に capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU を示す。f<sub>p</sub> に後述の番号も同様に各薬物を示す。α、β、γ、δ は *in vitro* のデータを *in vivo* にスケールアップする係数である *in vitro-in vivo* scaling factor を示す。F は Blesch らの報告を参考に 100% に設定した<sup>12</sup>。推定するパラメータは k<sub>a</sub>、α、β、γ、δ とした。PBPK model を用いたパラメータの推定は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を使い、最尤推定法によってパラメータを推定した。

#### 1-3-6. 統計学的処理

全てのデータは、平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で表記した。有意差検定は一元配置分散分析の後、Bonferroni 法により多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

## 1-4. 結果

### 1-4-1. Capecitabine 反復投与後の capecitabine とその代謝物の血漿中濃度

Fig. 4 に capecitabine 反復投与後の Day 1、7、14 における capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移を示した。ノンコンパートメントモデル解析により算出した薬物動態学的パラメータは Table 3 に示した。Table 3 より、Day 7 と Day 14 における capecitabine の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  ( $1.07 \pm 0.25$ ,  $4.36 \pm 4.35 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) は Day 1 ( $19.26 \pm 6.20 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して低下した。また、Day 7 と Day 14 における 5-FU の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  ( $411.32 \pm 136.47$ ,  $453.23 \pm 9.63 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) は Day 1 ( $664.68 \pm 83.65 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して低下した。さらに、5'-DFCR では Day 7 と Day 14 での  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は、有意な差は認められなかったが、Day 1 と比較して低下する傾向にあった。一方で、5'-DFUR の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は 3 群間で同程度の結果であった。

Capecitabine の  $C_{\text{max}}$  は  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  と同様に Day 7 ( $0.48 \pm 0.15 \mu\text{mol/L}$ ) と Day 14 ( $2.47 \pm 2.07 \mu\text{mol/L}$ ) で Day 1 ( $17.56 \pm 8.64 \mu\text{mol/L}$ ) と比較して低下した。5-FU の  $C_{\text{max}}$  は  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  と同様に Day 7 ( $147.32 \pm 67.48 \mu\text{mol/L}$ ) と Day 14 ( $97.56 \pm 45.54 \mu\text{mol/L}$ ) で Day 1 ( $229.07 \pm 35.75 \mu\text{mol/L}$ ) と比較して低下した。また、Day 14 ( $130.59 \pm 37.44 \mu\text{mol/L}$ ) において、5'-DFCR の  $C_{\text{max}}$  は Day 1 ( $484.46 \pm 142.21 \mu\text{mol/L}$ ) と比較して低下した。5'-DFUR の  $C_{\text{max}}$  には有意な差は認められなかった。

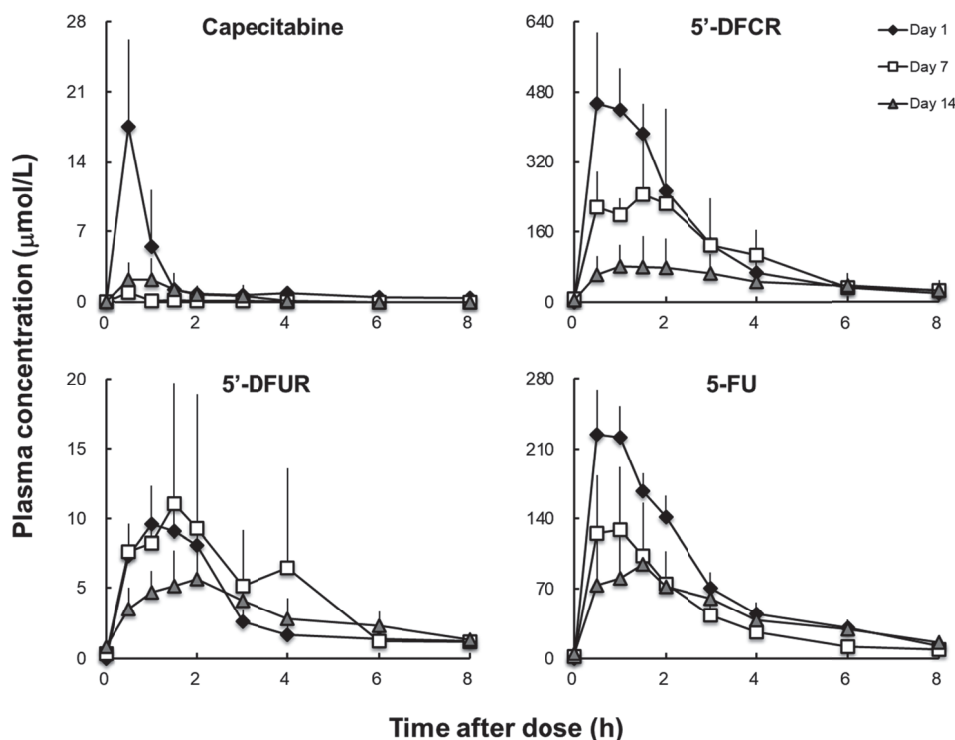


Fig. 4 Mean plasma concentration profile of capecitabine, 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR), 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR), and 5-fluorouracil (5-FU) after capecitabine oral administration for 14 days ( $n=5$ )

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* 2020, 85(5), 869-880; Fig. 3)

**Table 3. Pharmacokinetic parameters of capecitabine and its metabolites following multiple capecitabine administration in rats using non-compartment model analysis**

Pharmacokinetic parameters	Unit	Day 1	Day 7	Day 14
<b>Capecitabine</b>				
$t_{1/2}$	h	4.27 ± 3.73	1.00 ± 0.04	1.02 ± 0.99
$C_{max}$	μmol/L	17.56 ± 8.64	0.48 ± 0.15 <sup>*</sup>	2.47 ± 2.07 <sup>*</sup>
$T_{max}$	h	0.50 ± 0.00	1.00 ± 0.71	0.67 ± 0.29
$CL_{tot}/F$	L/h/kg	28.57 ± 10.08	479.53 ± 113.68 <sup>*</sup>	223.33 ± 186.12
Vd/F	L/kg	157.12 ± 95.49	697.78 ± 192.89	471.12 ± 713.26
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	19.26 ± 6.20	1.07 ± 0.25 <sup>*</sup>	4.36 ± 4.35 <sup>*</sup>
<b>5'-DFCR</b>				
$t_{1/2}$	h	1.56 ± 0.11	1.93 ± 0.36	3.38 ± 1.27 <sup>*#</sup>
$C_{max}$	μmol/L	484.46 ± 142.21	315.96 ± 160.81	130.59 ± 37.44 <sup>*</sup>
$T_{max}$	h	0.90 ± 0.42	1.13 ± 0.63	1.00 ± 0.71
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	1180.13 ± 211.08	936.07 ± 455.01	692.24 ± 504.77
<b>5'-DFUR</b>				
$t_{1/2}$	h	3.63 ± 0.96	2.13 ± 0.64	3.92 ± 1.10
$C_{max}$	μmol/L	11.28 ± 3.39	13.63 ± 8.41	6.06 ± 1.77
$T_{max}$	h	1.50 ± 0.50	1.17 ± 0.76	1.67 ± 0.58
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	33.86 ± 11.89	33.43 ± 19.16	33.24 ± 8.82
<b>5-FU</b>				
$t_{1/2}$	h	2.06 ± 0.39	3.91 ± 5.08	2.90 ± 1.37
$C_{max}$	μmol/L	229.07 ± 35.75	147.32 ± 67.48 <sup>*</sup>	97.56 ± 45.54 <sup>*</sup>
$T_{max}$	h	0.60 ± 0.22	0.67 ± 0.26	1.33 ± 0.76 <sup>*</sup>
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	664.68 ± 83.65	411.32 ± 136.47 <sup>*</sup>	453.23 ± 9.63 <sup>*</sup>

\* p < 0.05 statistically significant difference against Day 1.

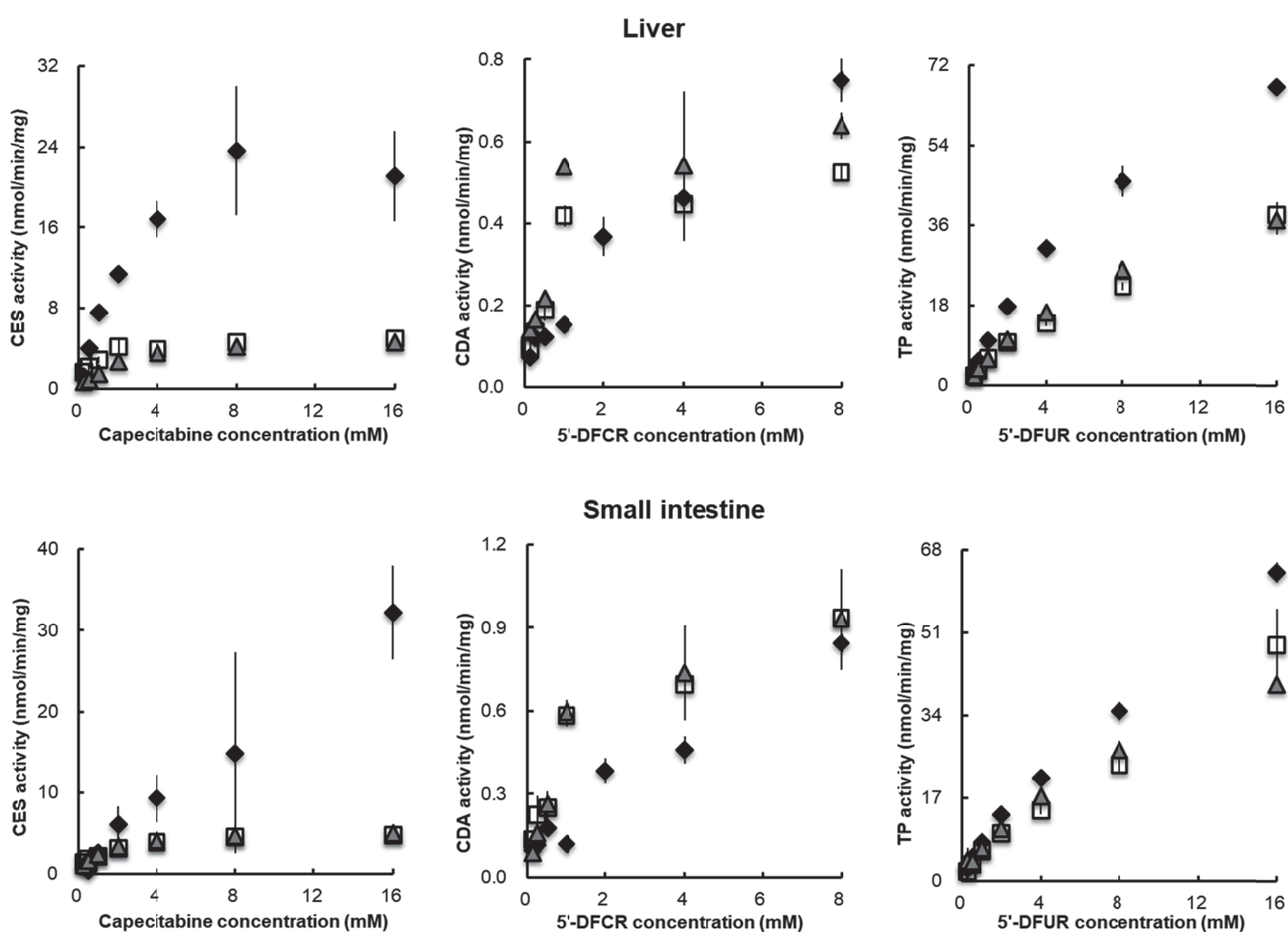
# p < 0.05 statistically significant difference against Day 7.

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Table 3)



### 1-4-2. Capecitabine 反復投与後の代謝酵素 CES、CDA、TP の活性

Fig. 5 に capecitabine 反復投与後の、capecitabine 代謝に関与する酵素である CES、CDA、TP の *in vitro* 代謝実験での活性の変化について示した。Table 4 には Lineweaver-Burk プロットにより求めた各代謝酵素の活性を記した。肝臓中 CES の  $CL_{int}$  は Day 14 ( $3.17 \pm 0.19 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) において Day 1 ( $9.51 \pm 1.39 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と比較して約 0.33 倍まで低下した。さらに、肝臓中 TP の  $CL_{int}$  は Day 7 ( $8.63 \pm 0.82 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と Day 14 ( $9.33 \pm 0.82 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) で Day 1 ( $12.16 \pm 0.38 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と比較して、それぞれ約 0.71 倍、約 0.77 倍まで低下した。小腸中 CES の  $CL_{int}$  は Day 7 ( $7.97 \pm 0.87 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と Day 14 ( $5.42 \pm 0.41 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) において Day 1 ( $3.57 \pm 0.51 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と比較して、それぞれ約 2.23 倍、約 1.52 倍に増加した。



**Fig. 5** Michaelis-Menten plot of carboxylesterase (CES), cytidine deaminase (CDA), and thymidine phosphorylase (TP) in the liver and small intestine on Day 1, 7, and 14 after capecitabine oral administration for 14 days ( $n=3$ )

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* 2020, 85(5), 869-880; Fig. 4)

**Table 4. Kinetic parameters of carboxylesterase (CES), cytidine deaminase (CDA), and thymidine phosphorylase (TP) following multiple administration *in vitro***

Tissue	Kinetic parameters	Unit	Day 1	Day 7	Day 14
Liver	CES				
	$V_{max}$	nmol/min/mg	29.72 ± 4.44	4.66 ± 0.27 <sup>*</sup>	3.86 ± 0.78 <sup>*</sup>
	$K_m$	mM	3.21 ± 0.86	0.50 ± 0.03 <sup>*</sup>	1.23 ± 0.33 <sup>*</sup>
	$CL_{int}$	μL/min/mg	9.51 ± 1.39	9.34 ± 0.34	3.17 ± 0.19 <sup>*#</sup>
	CDA				
	$V_{max}$	nmol/min/mg	0.36 ± 0.06	0.48 ± 0.06	0.51 ± 0.06 <sup>*</sup>
	$K_m$	mM	0.55 ± 0.24	0.56 ± 0.18	0.38 ± 0.09
	$CL_{int}$	μL/min/mg	0.72 ± 0.25	0.90 ± 0.20	1.36 ± 0.19 <sup>*</sup>
	TP				
	$V_{max}$	nmol/min/mg	74.29 ± 12.51	26.84 ± 7.47 <sup>*</sup>	27.27 ± 3.74 <sup>*</sup>
	$K_m$	mM	6.11 ± 1.06	3.19 ± 1.24 <sup>*</sup>	2.96 ± 0.63 <sup>*</sup>
	$CL_{int}$	μL/min/mg	12.16 ± 0.38	8.63 ± 0.82 <sup>*</sup>	9.33 ± 0.82 <sup>*</sup>
Small intestine	CES				
	$V_{max}$	nmol/min/mg	21.47 ± 9.30	4.11 ± 0.08 <sup>*</sup>	4.90 ± 0.21 <sup>*</sup>
	$K_m$	mM	6.01 ± 2.45	0.52 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.91 ± 0.11 <sup>*</sup>
	$CL_{int}$	μL/min/mg	3.57 ± 0.51	7.97 ± 0.87 <sup>*</sup>	5.42 ± 0.41 <sup>*#</sup>
	CDA				
	$V_{max}$	nmol/min/mg	0.44 ± 0.02	0.72 ± 0.03 <sup>*</sup>	1.11 ± 0.15 <sup>*#</sup>
	$K_m$	mM	0.51 ± 0.03	0.56 ± 0.04	1.47 ± 0.34 <sup>*#</sup>
	$CL_{int}$	μL/min/mg	0.87 ± 0.03	1.28 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.77 ± 0.08 <sup>#</sup>
	TP				
	$V_{max}$	nmol/min/mg	47.64 ± 9.04	29.44 ± 6.58	30.08 ± 8.82
	$K_m$	mM	4.46 ± 1.09	3.52 ± 1.23	3.12 ± 1.60
	$CL_{int}$	μL/min/mg	10.76 ± 0.55	8.57 ± 0.98	10.38 ± 2.16

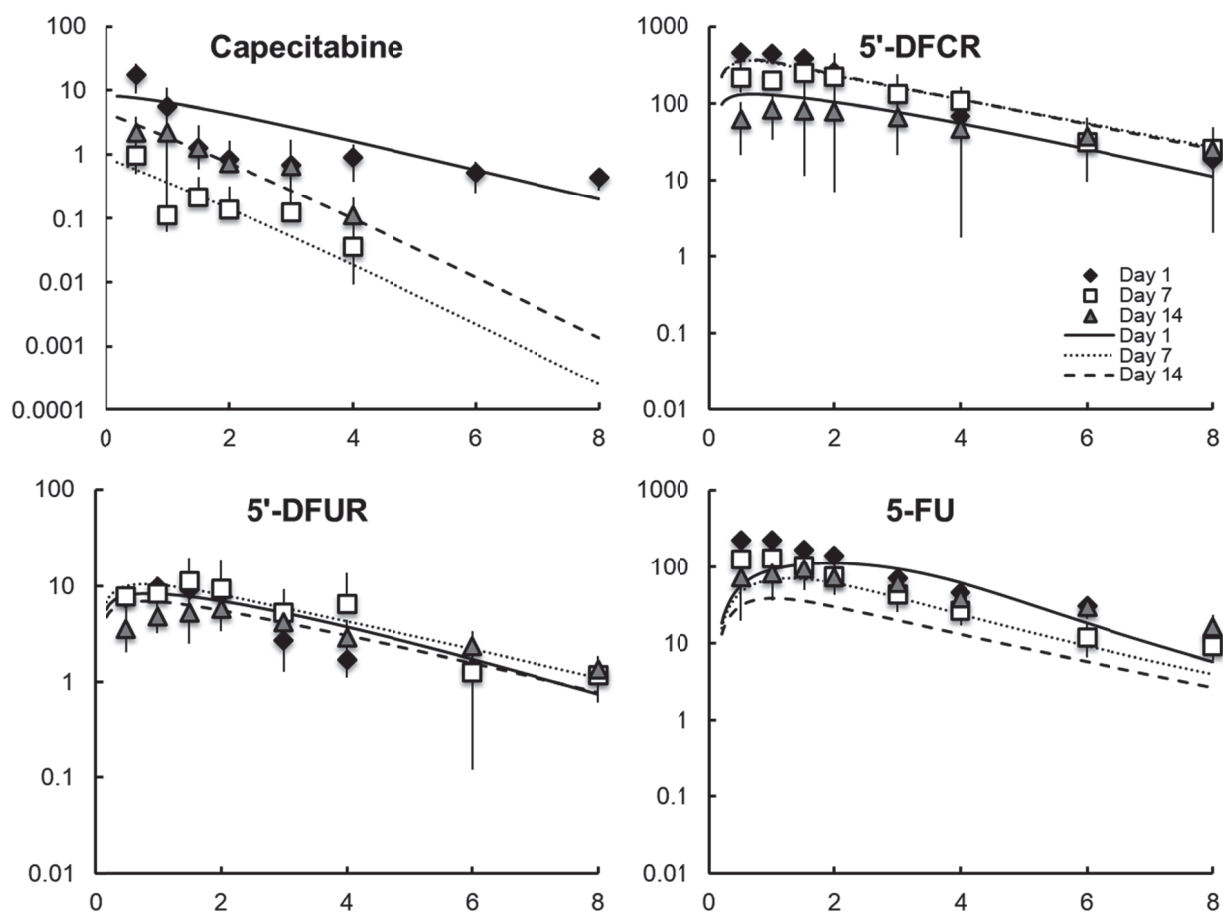
<sup>\*</sup> p < 0.05 statistically significant difference against Day 1.

<sup>#</sup> p < 0.05 statistically significant difference against Day 7.

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Table 4)

### 1-4-3. PBPK model による capecitabine 及びその代謝物の血漿中濃度推移推定

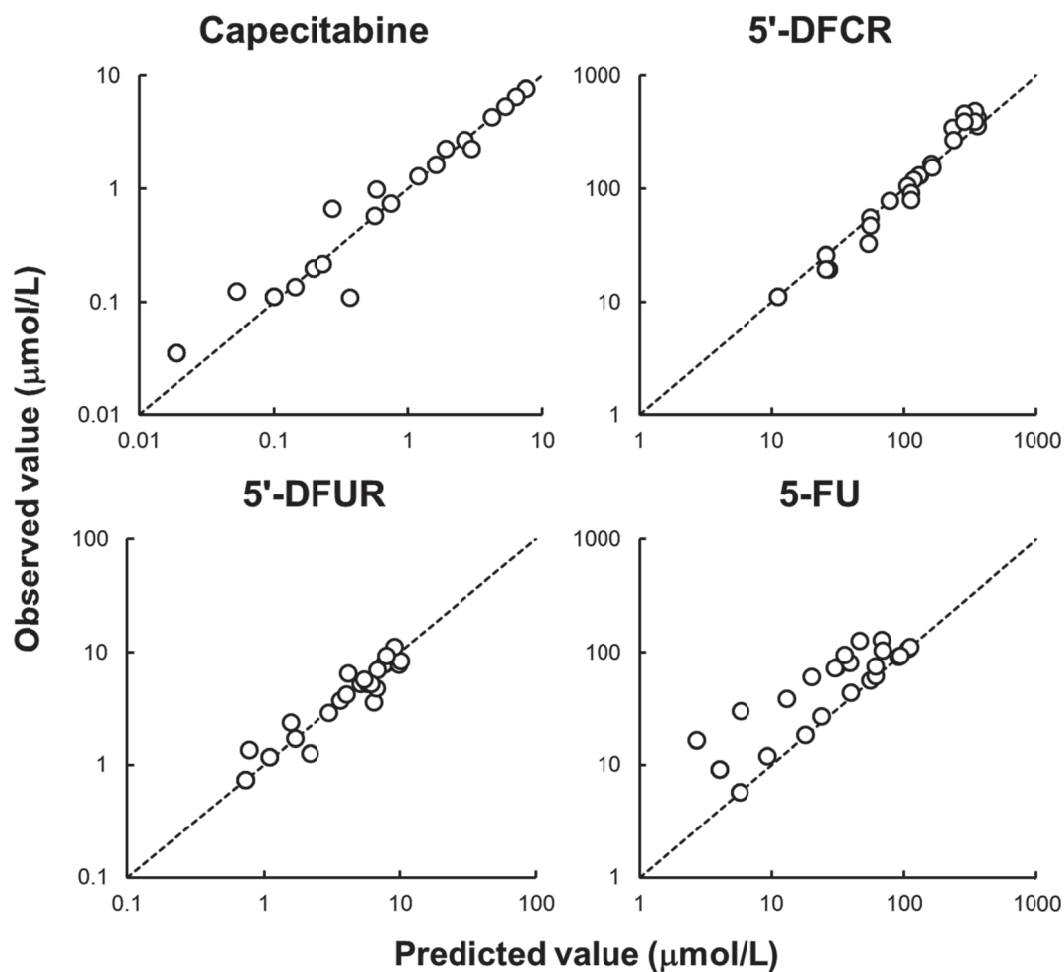
Fig. 6 と Fig. 7 に capecitabine 反復投与後の capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移について、*in vivo* での実測データと構築した PBPK model により示された推定値との関係を示した。Fig. 6 より、PBPK model に基づく capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移は、*in vivo* での capecitabine 反復投与後の血漿中濃度推移と近似していた。また、Fig. 7 より PBPK model により推定された各測定点での血漿中濃度は、実測の血漿中濃度と相関し、近似した値を示した。Table 5 には PBPK model を用いて推定したパラメータとそれぞれのパラメータの変動係数 (CV%) を示した。CV%は全てのパラメータで 30%未満であった。



**Fig. 6 Physiologically based pharmacokinetic model-based simulation for plasma concentration-time profile of capecitabine and its metabolites**

Each point is the observed value. The line is the plasma concentration profiles that were obtained by simulation using the physiologically based pharmacokinetic model.

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Fig. 5)



**Fig. 7 Pharmacokinetic model diagnostic plots of the observed versus predicted plasma concentration**

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Fig. s1)

**Table 5. Estimated parameters from a physiologically based pharmacokinetic model**

Estimated parameters	Day 1	Day 7	Day 14
$k_a$ ( $h^{-1}$ )	0.53 (11.3)	1.18 (11.2)	1.18 (8.1)
$\alpha$	322.7 (22.3)	1854.9 (24.8)	1585.8 (6.2)
$\beta$	56.7 (29.1)	20.1 (7.5)	17.5 (5.2)
$\gamma$	50.6 (12.0)	55.5 (9.6)	83.5 (7.3)
$\delta$	0.21 (19.8)	0.28 (16.3)	0.39 (4.9)

The values in parentheses are coefficient of variation (CV%).

(*Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(5), 869-880; Table 5)

## 1-5. 考察

本章では、capecitabine の 14 日間反復投与による血漿中濃度の変化について検討を行った。まず、capecitabine 反復投与が capecitabine やその代謝物の血漿中濃度推移に与える影響、及び capecitabine の活性化に関わる酵素である CES、CDA、TP の活性に与える影響、について検討を行った。さらに、capecitabine 反復投与後の血漿中濃度推移を推定するための PBPK model を構築した。これまでに、capecitabine やその代謝物の血漿中濃度と、代謝酵素の活性の関係について検討した研究は行われていたが、いずれも単回投与での検討であり、本研究は capecitabine 反復投与後の血漿中濃度についてラットを用いて測定・評価する初めてのものである<sup>12</sup>。臨床において、capecitabine は通常 14 日間反復投与される薬剤であり、反復投与後の血漿中濃度推移の予測は XELIRI 療法の治療成績向上に寄与するものであると考える。

*in vivo* でラットにおいて capecitabine の 14 日間反復投与を行った結果、代謝物である 5'-DFCR や 5-FU の血漿中濃度が低下した。さらに、*in vitro* の代謝実験において capecitabine 反復投与後に代謝酵素である CES と TP の肝臓での活性の低下が明らかとなった。これらの結果から、CES と TP の活性低下が代謝物である 5'-DFCR と 5-FU の血漿中濃度に影響を与えていることが示唆された。特に、5-FU は capecitabine の活性代謝物であり反復投与後の血漿中濃度の変化が治療に与える影響が大きい。すなわち、capecitabine 反復投与が 5-FU の血漿中濃度に与える影響は、XELIRI 療法における重要な課題であると言える。本章の研究結果より、capecitabine の反復投与により、5-FU の血漿中濃度は経日的に低下することが明らかとなったことから、capecitabine の反復投与において、Day 1 と同等の有効性を示さない可能性が示唆された。また、capecitabine 反復投与後の代謝酵素の活性低下を考慮した投与計画の構築が、XELIRI 療法における有効性や安全性の向上に寄与することが示唆された。

代謝酵素の活性を考慮した投与計画の構築には、酵素の活性から capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移を予測することが必要である。酵素の活性から薬物の血漿中濃度を推定する方法として、PBPK model の利用が挙げられる。PBPK model は生体の生理学的パラメータや薬物の生化学的パラメータを組み込んだモデルであり、血漿中薬物濃度推移の予測に有効である<sup>13</sup>。ラットを用いた検討から、capecitabine とその代謝物の血漿中濃度は代謝酵素の活性に影響を受けることが示されており、*in vitro* における酵素反応の速度論的パラメータを PBPK model に組み込むことで生理学的な意味を持った血漿中濃度の推定が期待できる。本章で構築した PBPK model は、capecitabine 反復投与後の capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度を精度良く推定しており、capecitabine 反復投与後における代謝酵素の活性を考慮した血漿中濃度推移の予測が有用であることが示された。今後、PBPK model を用いた最適な capecitabine 投与日数の探索が XELIRI 療法の最適化に必要であると考えられる。

一方で、本研究で得られた知見を臨床に還元するためには、ヒトにおける capecitabine の代謝について考慮しなければならない。本研究ではラットを使用しており、ヒトとラットには代謝における種差が報告されている<sup>26</sup>。特に、CDA はラットにおいてヒトよりも発現量が低いことが知られている。また、ヒトには存在しないラット特有の代謝経路として、5'-DFCR のグルクロン酸抱合による不活化が報告されている。さらに、ヒトと異なりラット等の齧歯

類では CES が肝臓中だけでなく、血液中にも高発現していることが知られている<sup>27</sup>。これらの代謝過程におけるヒトとラットの種差は capecitabine やその代謝物の血漿中濃度推移に影響を与える可能性があり、今後ヒトの代謝酵素を用いた酵素活性の測定、及び PBPK model のヒトへの適用に関する検討が求められる。

本章では、capecitabine に着目して代謝酵素の活性を考慮した PBPK model の構築を行なった。前述の通り、XELIRI 療法においては capecitabine と CPT-11 が併用される。そこで、CPT-11 併用時の capecitabine 投与の最適化を目指して第 2 章で更なる検討を行なった。

## 第2章 XELIRI療法における capecitabine の至適投与量の推定

### 2-1. 緒言

第1章において、capecitabine 投与によって capecitabine とその代謝物である 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度推移と、代謝酵素である CES、CDA、TP の活性が変化することが明らかとなり、capecitabine 反復投与後の代謝酵素の活性を考慮した投与計画の構築が XELIRI 療法の有効性や安全性の向上に寄与することが示唆された。また、代謝酵素の活性を組み込んだ PBPK model が capecitabine の血漿中濃度推定に有効であることが示された。

本章では更なる検討として CPT-11 との併用条件下での capecitabine 至適投与量の探索を行った。Capecitabine と CPT-11 は代謝に関与する酵素を共有しており、薬物間相互作用の可能性が考えられる。Capecitabine は前述の通り、CES、CDA、TP による3段階の代謝を受け、5-FU に変換されて抗腫瘍効果を示す<sup>10,11</sup>。一方、CPT-11 は CES によって代謝され、SN-38 に変換されて抗腫瘍効果を示す<sup>15</sup>。このように、XELIRI 療法において CES が capecitabine と CPT-11 両方の活性化に関与している。従って、capecitabine の至適投与量の探索には、CPT-11 との薬物間相互作用を考慮した検討が必要であると考えられる。

また、XELIRI 療法による有害事象として手足症候群、下痢、好中球減少などが知られており、臨床試験において FOLFIRI 療法と比較して有害事象の発現頻度が高いことが示されている<sup>7</sup>。Capecitabine と CPT-11 の薬物間相互作用がこれらの有害事象リスクの増大や、抗腫瘍効果の減弱の原因となることが予想される<sup>28,29</sup>。すなわち、capecitabine と CPT-11 併用時の薬物間相互作用について検討することで大腸癌治療の治療成績向上に寄与することが期待される。

そこで本章では、まず capecitabine と CPT-11 の薬物間相互作用の可能性について検討するため、capecitabine 及び CPT-11 をラットに投与し、それぞれを単独投与した場合と併用した場合の血漿中濃度推移を測定した。また、代謝実験を行い capecitabine と CPT-11 併用による CES の活性について検討を行った。さらに、阻害定数 ( $K_i$ ) を前章で構築した PBPK model に組み込み、capecitabine と CPT-11 の薬物間相互作用を考慮した PBPK model を構築した。PBPK model は未知の薬物間相互作用の検討に広く用いられており、PBPK model の活用は XELIRI 療法における血漿中濃度の推定に有用であると考えられる<sup>14,30</sup>。最後に、XELIRI 療法における capecitabine の至適投与量を推定するため、構築した PBPK model を用いて血漿中濃度推移のシミュレーションを行った。

## 2-2. 実験材料

### 2-2-1. 実験動物

Wistar 系雄性ラットは Nippon SLC Co., Ltd. (Hamamatsu, Japan) から購入した。ラットの飼育条件は 1-2-2. に準じた。全ての動物実験は京都薬科大学動物倫理委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに従って実施した。

### 2-2-2. 試薬

Capecitabine は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) から入手した。5'-DFCR と 5'-DFUR は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) から購入した。5-FU は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より入手した。5-BU は Sigma-Aldrich Co. (Steinheim Germany) より購入した。CPT-11 は Carbosynth Ltd. (Berkshire, United Kingdom) から入手した。SN-38 は ChemiTek (Indianapolis, IN, USA) から購入した。その他の試薬類は、全て市販特級品を用いた。

## 2-3. 実験方法

### 2-3-1. Capecitabine と CPT-11 の単独投与及び併用療法における血漿中濃度

Capecitabine を 1% carboxymethyl cellulose sodium 溶液に溶解し 22.5 mg/mL に調製した。CPT-11 は 10% DMSO に溶解し 8 mg/mL に調製した。全てのラットを capecitabine 投与群、CPT-11 投与群、併用群に分け、capecitabine と CPT-11 の投与を行った。Capecitabine は 180 mg/kg の用量で経口投与、CPT-11 は 180 mg/m<sup>2</sup> の用量で頸静脈から投与を行った。ラットの体表面積は以下の式から算出した<sup>31</sup>。

$$\text{Body surface area (m}^2\text{)} = \frac{9.5 \times \text{Body weight (g)}^2}{10000}$$

ここで body weight はラットの体重を表す。Capecitabine の投与量は Shindoh らの報告を参照して設定した<sup>18</sup>。CPT-11 の投与量は臨床投与量を基に設定した。Capecitabine と CPT-11 の投与前及び投与 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 時間後に頸静脈より 250 μL 採血を行った。採取した血液試料を 12,000 rpm で 15 分間遠心分離し、分取した上清 100 μL を血漿試料とした。血漿試料は -80°C で凍結保存した。

血漿試料に内標準物質として、25 μg/mL の 5-BU を 10 μL 添加し、さらにタンパク除去のため飽和硫酸アンモニウム水溶液 150 μL を添加した。タンパク除去後、capecitabine、CPT-11 及びそれぞれの代謝物を抽出するため 1 mL の ethyl acetate/2-propanol (10:1, v/v) を加えた。上層を採取後 N<sub>2</sub> 気流下で蒸発させ、0.1% formic acid を 100 μL 加え再溶解した。再溶解した試料 10 μL を移動相で 10 倍に希釈し、5'-DFCR と 5'-DFUR の濃度測定用試料とした。さら



に、別の試料 10  $\mu\text{L}$  を移動相で 10 倍希釈し、CPT-11 と SN-38 の濃度測定用試料とした。残った 80  $\mu\text{L}$  を capecitabine と 5-FU の濃度測定に用いた。

1-3-2. と同一の LC-MS/MS を用い、同様の測定条件で薬物濃度測定を行った。移動相として、5'-DFCR と 5'-DFUR の濃度測定には 10 mM ammonium acetate/acetonitrile (1:1, v/v) を、capecitabine と 5-FU の濃度測定には 0.1 % formic acid/acetonitrile (4:1, v/v) を、CPT-11 と SN-38 の濃度測定には 0.1 % formic acid/acetonitrile (1:1, v/v) を用いた。分離用カラムとして、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の測定に COSMOSIL<sup>®</sup> HILIC packed column (2.0 $\times$ 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を、CPT-11 と SN-38 の測定には Quicksorb ODS column (2.1 $\times$ 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; Chemco Scientific Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた<sup>19,32</sup>。

得られた各薬物の血漿中濃度推移から、ノンコンパートメントモデル解析により 1-3-3. と同様の方法で薬物動態学的パラメータを算出した。ノンコンパートメントモデル解析には Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 8.2, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いた。

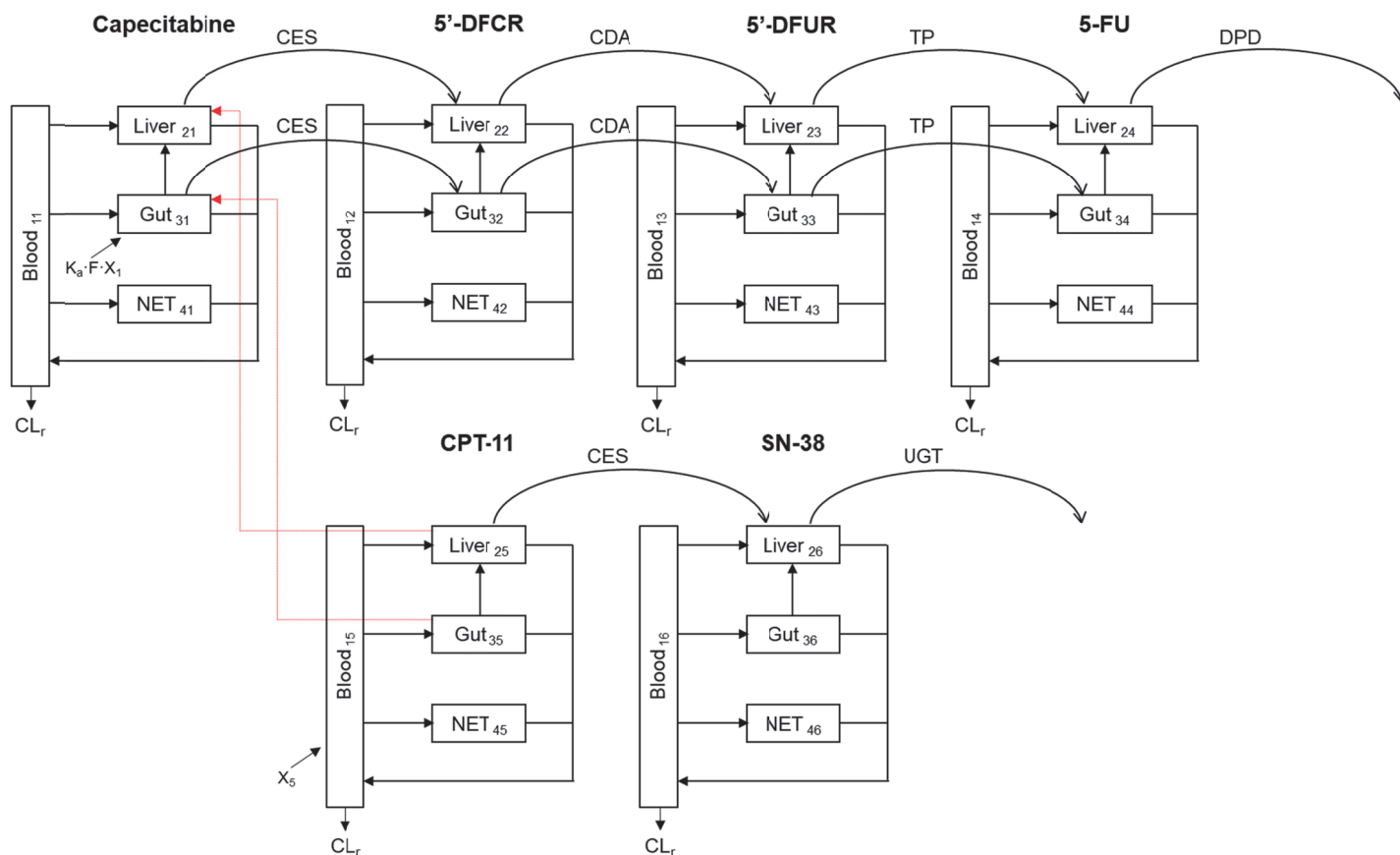
### 2-3-2. Capecitabine と CPT-11 共存条件下での CES 活性測定

ラットから肝臓を摘出し、1-3-4. と同様の方法で肝臓マイクロゾームを調製した。マイクロゾームのタンパク質濃度は WAKO protein BCA kit (WAKO, Osaka, Japan) を用いて測定した。

Capecitabine と CPT-11 共存条件下で CES 活性を測定するため、50 mM phosphate buffer (pH 7.4) に 1 mM EDTA、100  $\mu\text{M}$  THU、1.0 mg protein/mL のマイクロゾームを添加し、反応溶液を調製した。Capecitabine は 10% DMSO に溶解し、2.5、5、10、20、40、80、160 mM の薬液をそれぞれ調製した。CPT-11 は 50 mM phosphate buffer (pH7.4) に溶解し、5、50、500 nM の薬液をそれぞれ調製した。反応溶液 200  $\mu\text{L}$  を 37°C でインキュベートした後、capecitabine、CPT-11 をそれぞれ 25  $\mu\text{L}$  ずつ添加し 30 分間反応させた。反応後、acetonitrile を 500  $\mu\text{L}$  添加し、反応を停止させた。反応後の溶液を 12,000 rpm で 15 分間遠心分離し、分取した上層を  $\text{N}_2$  気流下で蒸発させた。その後、10 mM の ammonium acetate/acetonitrile (1:1, v/v) を加え再溶解した。LC-MS/MS を用いて、1-3-2. と同様の方法で 5'-DFCR 濃度を測定し、Lineweaver-Burk プロットから  $V_{\text{max}}$  及び  $K_m$  を求め、 $CL_{\text{int}}$  を算出した。Dixon プロットから CES による capecitabine 代謝に対する CPT-11 の阻害様式を判定した。さらに x 軸に阻害剤の濃度を、y 軸に  $K_m/V_{\text{max}}$  をプロットし secondary プロットを作成することで得られた x 切片から、CES による capecitabine 代謝に対する CPT-11 の  $K_i$  を求めた<sup>33</sup>。

### 2-3-3. Capecitabine 及び CPT-11 共存条件下での PBPK model 構築

Capecitabine と CPT-11 の薬物間相互作用を考慮した PBPK model を構築した。PBPK model は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 8.2, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いて記述した。Fig. 8 に構築した PBPK model の模式図を示す。



**Fig. 8 Scheme of the physiologically based pharmacokinetic model for capecitabine and irinotecan combination therapy**

(*J. Pharm. Sci.* in press; Fig. 1)

ここで用いた PBPK model は血液、肝臓、消化管、NET の 4 つのコンパートメントにより構築されている。薬物の代謝はミカエリスメンテン式に従い、CES による capecitabine 代謝に対する CPT-11 の阻害様式には競合阻害を採用した。阻害に関して、以下の式に基づいてモデル式を構築した。

$$V_{CES} = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

代謝実験より求めた最大反応速度  $V_{max}$  とミカエリス定数  $K_m$  を式に組み込んだ。[S] は

capecitabine 濃度、[I] は CPT-11 濃度を表す。Vces は capecitabine 濃度が [S]、CPT-11 濃度が [I] の時点での CES による capecitabine から 5'-DFCR への代謝速度を示す。PBPK model に組み込む生理学的パラメータ及び薬物動態学的パラメータは第 1 章で測定した代謝酵素の  $V_{max}$ 、 $K_m$  と、既知のパラメータに基づいて設定した (Table 6-9)<sup>13,21,23,34-38</sup>。組織中のマイクロゾームタンパク質濃度は、肝臓では 44.8 mg/g tissue とし、小腸では 2.3 mg/g tissue とした<sup>24,25</sup>。

**Table 6 Physiological parameters for physiologically based pharmacokinetic model development**

	Blood flow rate <sup>21</sup> (mL/min/kg)	Tissue volume <sup>21</sup> (mL/kg)
Blood	215.9	60
Liver	86.4	40
Gut	77.7	36
NET	51.8	750

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table s1)

**Table 7 Kinetic parameters of capecitabine, irinotecan (CPT-11), and their metabolites for physiologically based pharmacokinetic model development**

	$f_p$ <sup>13,34</sup>	$K_{pLiver}$ <sup>13,35</sup>	$K_{pGut}$ <sup>13,35</sup>	$K_{pNET}$ <sup>23,35</sup>	$CL_r$ <sup>13,36</sup> (mL/min/kg)
Capecitabine	0.55	1.73	0.96	0.56	4.72
5'-DFCR	0.95	1.46	2.61	0.90	3.99
5'-DFUR	0.79	1.79	3.11	0.46	3.03
5-FU	1.00	2.78	1.71	0.56	2.38
CPT-11	0.65	0.53	1.60	1.00	30.90
SN-38	0.0089	0.72	0.58	0.46	56.12

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table s2)

**Table 8 Metabolic enzyme activities of capecitabine and its metabolites in physiologically based pharmacokinetic model development**

Tissue	Enzyme	$V_{\max}$ (nmol/min/mg)	$K_m$ (mM)
Liver	CES	1450.3	3.21
	CDA	0.36	0.55
	TP	74.29	12.16
Gut	CES	21.47	6.01
	CDA	0.44	0.51
	TP	47.64	4.46

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table s3)

**Table 9 Metabolic enzyme activities of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) toward 5-fluorouracil (5-FU), carboxylesterase (CES) for irinotecan (CPT-11) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) for 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in the liver for physiologically based pharmacokinetic model development**

Enzyme	$V_{\max}^{37,38}$ (nmol/min/g tissue)	$K_m^{37,38}$ (mM)
DPD	250.7	40.0
CES	8.3	53.4
UGT	4.0	2.0

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table s4)

構築した PBPK model のモデル式を以下に示す。

$$\frac{dC_{11}}{dt} = \left\{ \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{21}}{Kp_{21}} + \frac{Q_4 \times C_{41}}{Kp_{41}} - (Q_2 + Q_3 + Q_4) \times C_{11} - (f_{p1} \times C_{11} \times CL_1) \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{21}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{11}) + \frac{Q_3 \times C_{31}}{Kp_{31}} - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{21}}{Kp_{21}} - \frac{\alpha \times V_{\max 21} \times f_{p1} \times C_{21} / Kp_{21}}{K_{m21} \times \left(1 + \frac{f_{p5} \times C_{25}}{Kp_{25} \times K_i}\right) + f_{p1} \times C_{21} / Kp_{21}} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{31}}{dt} = \left\{ (k_a \times F \times X_1) + (Q_3 \times C_{11}) - \frac{Q_3 \times C_{31}}{Kp_{31}} - \frac{\alpha \times V_{\max 31} \times f_{p1} \times C_{31} / Kp_{31}}{K_{m31} \times \left(1 + \frac{f_{p5} \times C_{35}}{Kp_{35} \times K_i}\right) + f_{p1} \times C_{31} / Kp_{31}} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{41}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{11}) - \frac{Q_4 \times C_{41}}{Kp_{41}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{12}}{dt} = \left\{ \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{22}}{Kp_{22}} + \frac{Q_4 \times C_{42}}{Kp_{42}} - (Q_2 + Q_3 + Q_4) \times C_{12} - (f_{p2} \times C_{12} \times CL_2) \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{22}}{dt} =$$

$$\left\{ (Q_2 \times C_{12}) + \frac{Q_3 \times C_{32}}{Kp_{32}} + \frac{\alpha \times V_{max21} \times f_{p1} \times C_{21} / Kp_{21}}{K_{m21} \times \left(1 + \frac{f_{p5} \times C_{25}}{Kp_{25} \times K_i}\right) + f_{p1} \times C_{21} / Kp_{21}} - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{22}}{Kp_{22}} - \frac{\beta \times V_{max22} \times f_{p2} \times C_{22} / Kp_{22}}{K_{m22} + f_{p2} \times C_{22} / Kp_{22}} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{32}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{12}) + \frac{\alpha \times V_{max31} \times f_{p1} \times C_{31} / Kp_{31}}{K_{m31} \times \left(1 + \frac{f_{p5} \times C_{35}}{Kp_{35} \times K_i}\right) + f_{p1} \times C_{31} / Kp_{31}} - \frac{Q_3 \times C_{32}}{Kp_{32}} - \frac{\beta \times V_{max32} \times f_{p2} \times C_{32} / Kp_{32}}{K_{m32} + f_{p2} \times C_{32} / Kp_{32}} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{42}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{12}) - \frac{Q_4 \times C_{42}}{Kp_{42}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{13}}{dt} = \left\{ \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{23}}{Kp_{23}} + \frac{Q_4 \times C_{43}}{Kp_{43}} - (Q_2 + Q_3 + Q_4) \times C_{13} - (f_{p3} \times C_{13} \times CL_3) \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{23}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{13}) + \frac{Q_3 \times C_{33}}{Kp_{33}} + \frac{\beta \times V_{max22} \times f_{p2} \times C_{22} / Kp_{22}}{K_{m22} + f_{p2} \times C_{22} / Kp_{22}} - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{23}}{Kp_{23}} - \frac{\gamma \times V_{max23} \times f_{p3} \times C_{23} / Kp_{23}}{K_{m23} + f_{p3} \times C_{23} / Kp_{23}} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{33}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{13}) + \frac{\beta \times V_{max32} \times f_{p2} \times C_{32} / Kp_{32}}{K_{m32} + f_{p2} \times C_{32} / Kp_{32}} - \frac{Q_3 \times C_{33}}{Kp_{33}} - \frac{\gamma \times V_{max33} \times f_{p3} \times C_{33} / Kp_{33}}{K_{m33} + f_{p3} \times C_{33} / Kp_{33}} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{43}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{13}) - \frac{Q_4 \times C_{43}}{Kp_{43}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{14}}{dt} = \left\{ \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{24}}{Kp_{24}} + \frac{Q_4 \times C_{44}}{Kp_{44}} - (Q_2 + Q_3 + Q_4) \times C_{14} - (f_{p4} \times C_{14} \times CL_4) \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{24}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{14}) + \frac{Q_3 \times C_{34}}{Kp_{34}} + \frac{\gamma \times V_{max23} \times f_{p3} \times C_{23} / Kp_{23}}{K_{m23} + f_{p3} \times C_{23} / Kp_{23}} - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{24}}{Kp_{24}} - \frac{\delta \times V_{max24} \times f_{p4} \times C_{24} / Kp_{24}}{K_{m24} + f_{p4} \times C_{24} / Kp_{24}} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{34}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{14}) + \frac{\gamma \times V_{max33} \times f_{p3} \times C_{33} / Kp_{33}}{K_{m33} + f_{p3} \times C_{33} / Kp_{33}} - \frac{Q_3 \times C_{34}}{Kp_{34}} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{44}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{14}) - \frac{Q_4 \times C_{44}}{Kp_{44}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{15}}{dt} = \left\{ (X_5) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{25}}{Kp_{25}} + \frac{Q_4 \times C_{45}}{Kp_{45}} - (Q_2 + Q_3 + Q_4) \times C_{15} - (f_{p5} \times C_{15} \times CL_5) \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{25}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{15}) + \frac{Q_3 \times C_{35}}{Kp_{35}} - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{25}}{Kp_{25}} - \frac{\varepsilon \times V_{max25} \times f_{p5} \times C_{25} / Kp_{25}}{K_{m25} + f_{p5} \times C_{25} / Kp_{25}} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{35}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{15}) - \frac{Q_3 \times C_{35}}{Kp_{35}} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{45}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{15}) - \frac{Q_4 \times C_{45}}{Kp_{45}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{16}}{dt} = \left\{ \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{26}}{Kp_{26}} + \frac{Q_4 \times C_{46}}{Kp_{46}} - (Q_2 + Q_3 + Q_4) \times C_{16} - (f_{p6} \times C_{16} \times CL_6) \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{26}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{16}) + \frac{Q_3 \times C_{36}}{Kp_{36}} + \frac{\varepsilon \times V_{max25} \times f_{p5} \times C_{25} / Kp_{25}}{K_{m25} + f_{p5} \times C_{25} / Kp_{25}} - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{26}}{Kp_{26}} - \frac{\zeta \times V_{max26} \times f_{p6} \times C_{26} / Kp_{26}}{K_{m26} + f_{p6} \times C_{26} / Kp_{26}} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{36}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{16}) - \frac{Q_3 \times C_{36}}{Kp_{36}} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{46}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{16}) - \frac{Q_4 \times C_{46}}{Kp_{46}} \right\} / V_4$$

ここで、Q は各組織への血流速度、C は各薬物の薬物濃度、V はそれぞれの組織容積、CL は腎クリアランス、 $k_a$  は吸収速度定数、F はバイオアベイラビリティ、X は capecitabine の投与量を表す。また、式中で C、Kp、 $V_{max}$ 、 $K_m$  に後述の 1 つ目の番号 (1-4) は、順に血液、肝臓、消化管、NET の各コンパートメントを表す。Q と V に後述の番号も同様に各コンパートメントを表す。さらに、C、Kp、 $V_{max}$ 、 $K_m$  に後述の 2 つ目の番号 (1-6) は、順に capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU、CPT-11、SN-38 を示す。 $f_p$ 、CL、X に後述の番号も同様に各薬物を示す。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\lambda$ 、 $\zeta$  は *in vitro* のデータを *in vivo* にスケールアップするための係数である *in vitro-in vivo scaling factor* を示す。F は Blesch らの報告を参考に 100% に設定した<sup>12</sup>。モデルにおいて推定するパラメータは  $k_a$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\lambda$ 、 $\zeta$  とした。PBPK model を用いたパラメータの推定は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 8.2, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用い、最尤推定法によって行なった。得られたパラメータ値を用いて 2-3-4. の条件における 5-FU の血漿中濃度推移をシミュレートした。

#### 2-3-4. Capecitabine、CPT-11 併用時の 5-FU 血漿中濃度シミュレーション

構築した PBPK model を用いて capecitabine、CPT-11 併用時に capecitabine 単独投与と同等の 5-FU 曝露量を得るために必要な capecitabine 投与量について検討した。まず、capecitabine 投与量を 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  から 1000  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  に変化させた際の 5-FU 血漿中濃度推移の変化についてシミュレーションを行った。続けて、capecitabine の投与量変更後の 5-FU 曝露量について  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  を指標としてシミュレーションを行った。

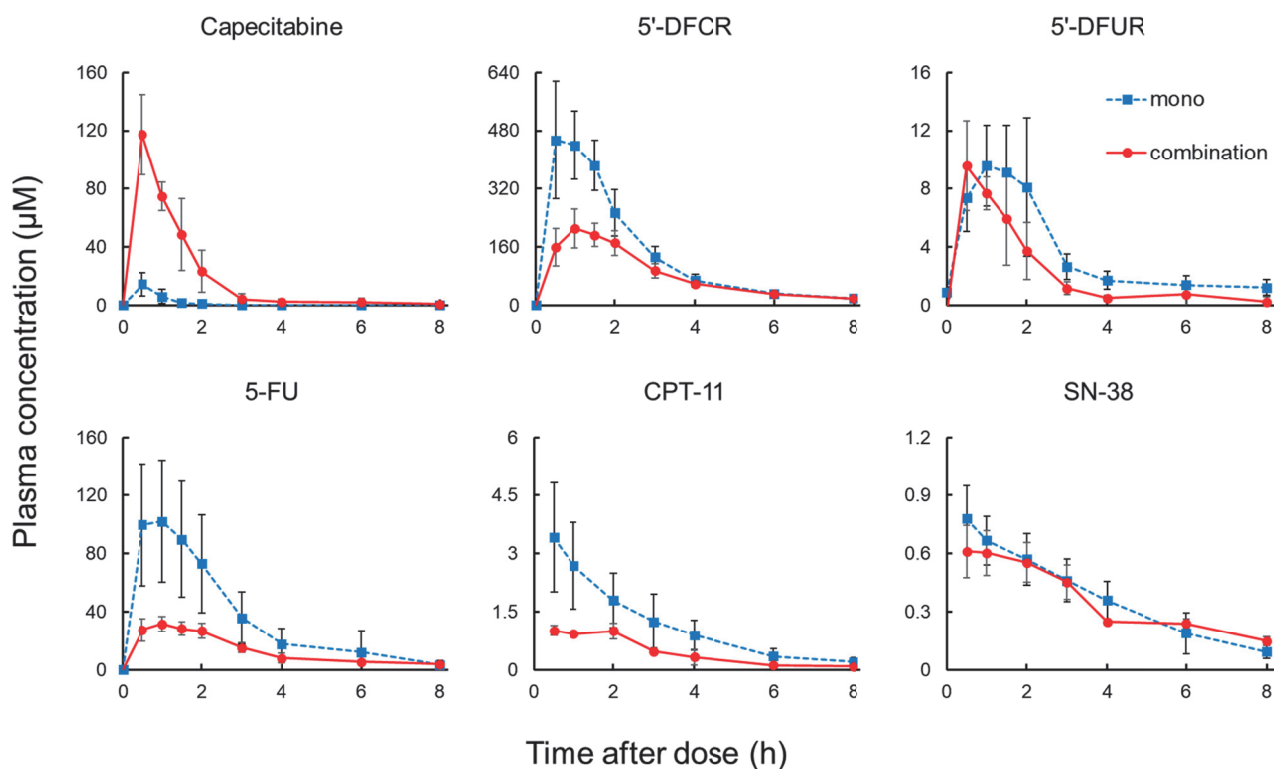
#### 2-3-5. 統計学的処理

全てのデータは、平均値  $\pm$  標準偏差 (S.D.) で表記した。血漿中濃度推移については t 検定により有意差検定を行った。代謝実験の結果に対する有意差検定は一元配置分散分析の後、Bonferroni 法により多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

## 2-4. 結果

### 2-4-1. Capecitabine、CPT-11 併用時の血漿中濃度推移

Capecitabine 投与群、CPT-11 投与群、併用群それぞれの capecitabine と CPT-11 及びその代謝物の血漿中濃度推移について Fig. 9 に示した。Capecitabine の血漿中濃度は併用群で、capecitabine 投与群と比較して血漿中濃度が上昇し、代謝物である 5'-DFCR や 5-FU では血漿中濃度が低下した。また、CPT-11 の血漿中濃度は併用群で CPT-11 投与群と比較して血漿中濃度の低下が認められたものの、活性代謝物である SN-38 の血漿中濃度には変化が認められなかった。Capecitabine 投与群、CPT-11 投与群、併用群それぞれの薬物動態学的パラメータについては Table 10 に示した。Capecitabine の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は capecitabine 投与群 ( $12.04 \pm 6.52 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して、併用群 ( $152.14 \pm 14.39 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) では 12.6 倍に上昇した。一方で、代謝物である 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は capecitabine 投与群 ( $1180.13 \pm 211.08$ 、 $31.89 \pm 11.72$ 、 $286.41 \pm 136.10 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して、併用群 ( $736.70 \pm 52.44$ 、 $16.13 \pm 3.74$ 、 $121.73 \pm 6.04 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) ではそれぞれ 0.62、0.51、0.43 倍に低下した。CPT-11 の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は CPT-11 投与群 ( $10.76 \pm 4.27 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して、併用群 ( $3.59 \pm 0.23 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) では 0.33 倍まで低下したが、SN-38 の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  には有意な差は認められなかった。



**Fig. 9 Mean plasma concentration profile of capecitabine, 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR), 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFUR), 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan (CPT-11), and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in monotherapy and combination therapy ( $n=5$ )**  
(*J. Pharm. Sci.* in press; Fig. 2)

**Table 10 Pharmacokinetic parameters of capecitabine, irinotecan (CPT-11), and their metabolites in monotherapy and combination therapy**

	Parameters	Unit	Monotherapy	Combination therapy
Capecitabine	$t_{1/2}$	h	$0.59 \pm 0.38$	$1.53 \pm 0.52^*$
	$C_{max}$	$\mu\text{M}$	$14.52 \pm 7.96$	$117.39 \pm 27.34^*$
	$T_{max}$	h	$0.50 \pm 0.00$	$0.63 \pm 0.25$
	$CL_{tot}/F$	L/h/kg	$54.94 \pm 34.91$	$3.30 \pm 0.27^*$
	$Vd/F$	L/kg	$35.83 \pm 22.82$	$7.37 \pm 2.82^*$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h}/\text{L}$	$12.04 \pm 6.52$	$152.14 \pm 14.39^*$
5'-DFCR	$t_{1/2}$	h	$1.56 \pm 0.11$	$2.27 \pm 0.69$
	$C_{max}$	$\mu\text{M}$	$484.46 \pm 142.21$	$223.04 \pm 46.71^*$
	$T_{max}$	h	$0.90 \pm 0.42$	$1.13 \pm 0.25$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h}/\text{L}$	$1180.13 \pm 211.08$	$736.70 \pm 52.44^*$
5'-DFUR	$t_{1/2}$	h	$3.30 \pm 1.18$	$0.62 \pm 0.17^*$
	$C_{max}$	$\mu\text{M}$	$11.28 \pm 2.29$	$10.39 \pm 2.66$
	$T_{max}$	h	$1.50 \pm 0.50$	$0.75 \pm 0.50$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h}/\text{L}$	$31.89 \pm 11.72$	$16.13 \pm 3.74^*$
5-FU	$t_{1/2}$	h	$1.25 \pm 0.41$	$2.31 \pm 0.73^*$
	$C_{max}$	$\mu\text{M}$	$108.30 \pm 45.53$	$32.67 \pm 4.96^*$
	$T_{max}$	h	$0.92 \pm 0.20$	$1.13 \pm 0.63$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h}/\text{L}$	$286.41 \pm 136.10$	$121.73 \pm 6.04^*$
CPT-11	$t_{1/2}$	h	$2.01 \pm 0.73$	$1.50 \pm 0.34$
	$C_{max}$	$\mu\text{M}$	$3.41 \pm 1.41$	$1.12 \pm 0.09^*$
	$T_{max}$	h	$0.50 \pm 0.00$	$1.13 \pm 0.75$
	$CL_{tot}$	L/h/kg	$2.77 \pm 1.50$	$6.99 \pm 0.45^*$
	$Vd$	L/kg	$7.69 \pm 3.50$	$15.04 \pm 3.41^*$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h}/\text{L}$	$10.76 \pm 4.27$	$3.59 \pm 0.23^*$
SN-38	$t_{1/2}$	h	$2.20 \pm 0.68$	$4.53 \pm 0.22^*$
	$C_{max}$	$\mu\text{M}$	$0.78 \pm 0.17$	$0.63 \pm 0.11$
	$T_{max}$	h	$0.50 \pm 0.00$	$0.75 \pm 0.29$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h}/\text{L}$	$3.50 \pm 0.91$	$4.27 \pm 0.16$

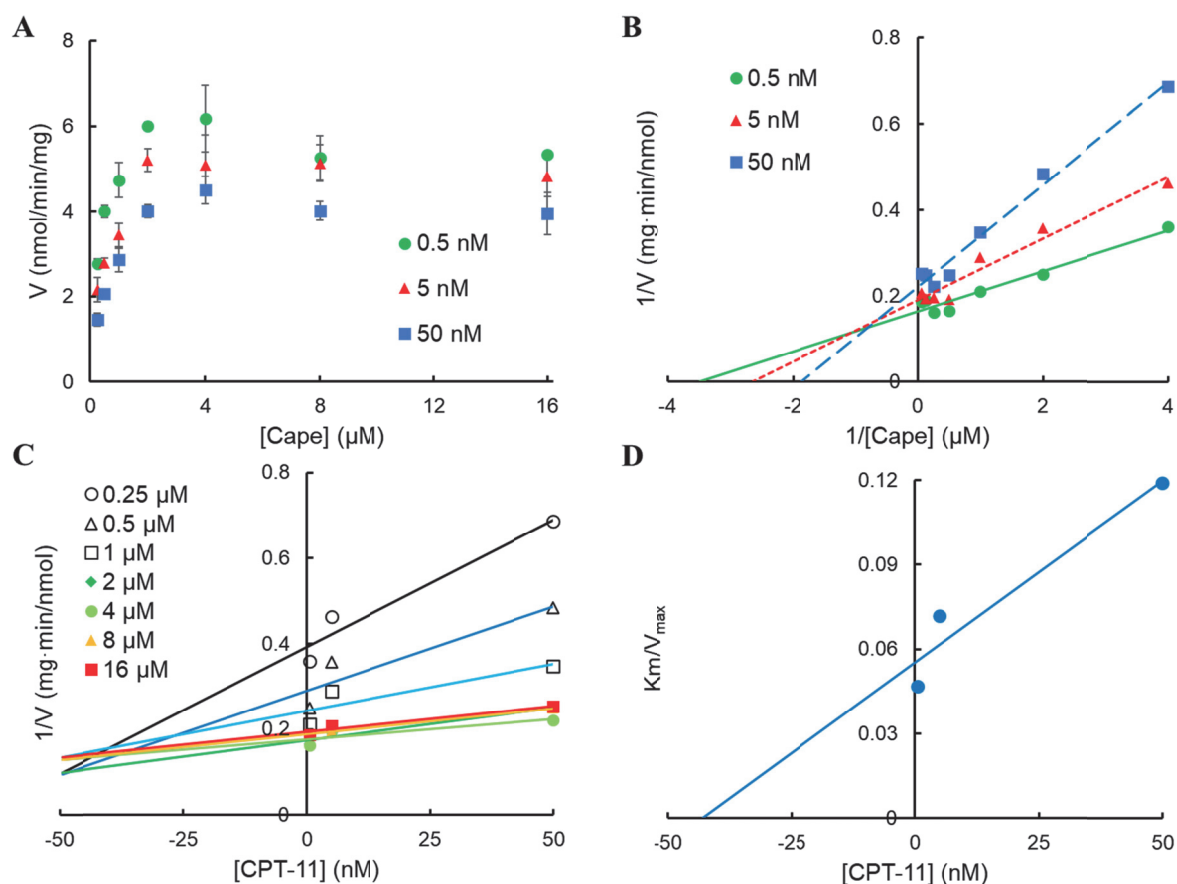
\*  $p < 0.05$ , statistically significant difference compared with monotherapy.

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table 1)



## 2-4-2. CES による capecitabine 代謝に対する CPT-11 の影響

代謝実験における、CPT-11 存在下での CES の活性を Fig. 10 に示した。CES による capecitabine の 5'-DFCR への代謝過程において、CPT-11 添加によって  $CL_{int}$  が低下し、CPT-11 によって阻害されていることが示された (Fig. 10A)。Fig. 10B より算出した肝臓における CES 活性のパラメータを Table 11 に示した。CES の  $CL_{int}$  は CPT-11 は濃度依存的に低下した。Dixon プロットの形状から、CES による capecitabine の 5'-DFCR への代謝は、CPT-11 によって競合的に阻害されていることが示唆された (Fig. 10C)。また、CPT-11 による CES の capecitabine 代謝に対する阻害係数  $K_i$  は Fig. 10D より 42.54 nM と算出された。



**Fig. 10 Inhibitory effect of irinotecan (CPT-11) against the metabolism of capecitabine by carboxylesterase (CES) in the liver**

- A. Michaelis-Menten plot of the effect of CPT-11 on capecitabine metabolism by CES.
- B. Lineweaver-Burk plot of the effect of CPT-11 on capecitabine metabolism by CES.
- C. Dixon plot of the effect of CPT-11 on capecitabine metabolism by CES.
- D. Secondary plot for  $K_i$  of the effect of CPT-11 on capecitabine metabolism by CES ( $n=3$ ).  
(*J. Pharm. Sci.* in press; Fig. 3)

**Table 11 Kinetic parameters of carboxylesterase (CES) during metabolism of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR) in the presence of irinotecan (CPT-11) in the liver**

Concentration of CPT-11	0.5 nM	5 nM	50 nM
$V_{\max}$ (nmol/min/mg)	$6.06 \pm 0.37$	$5.25 \pm 0.06^*$	$4.52 \pm 0.27^{*\#}$
$K_m$ (mM)	$0.28 \pm 0.03$	$0.38 \pm 0.08$	$0.54 \pm 0.11^*$
$CL_{\text{int}}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ )	$21.46 \pm 1.06$	$14.04 \pm 2.39^*$	$8.51 \pm 1.36^{*\#}$

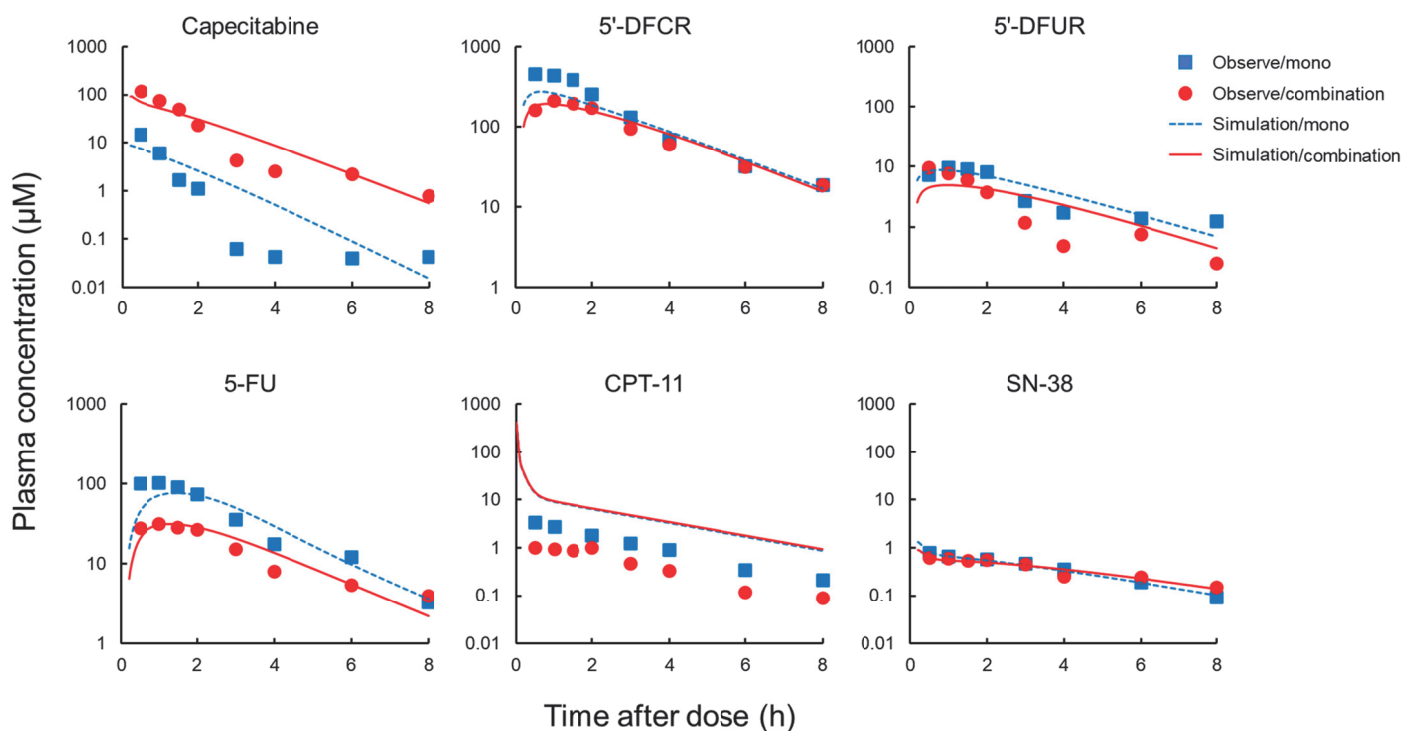
\*  $p < 0.05$ , statistically significant difference against in the presence of 0.5 nM CPT-11.

#  $p < 0.05$ , statistically significant difference against in the presence of 5 nM CPT-11.

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table 2)

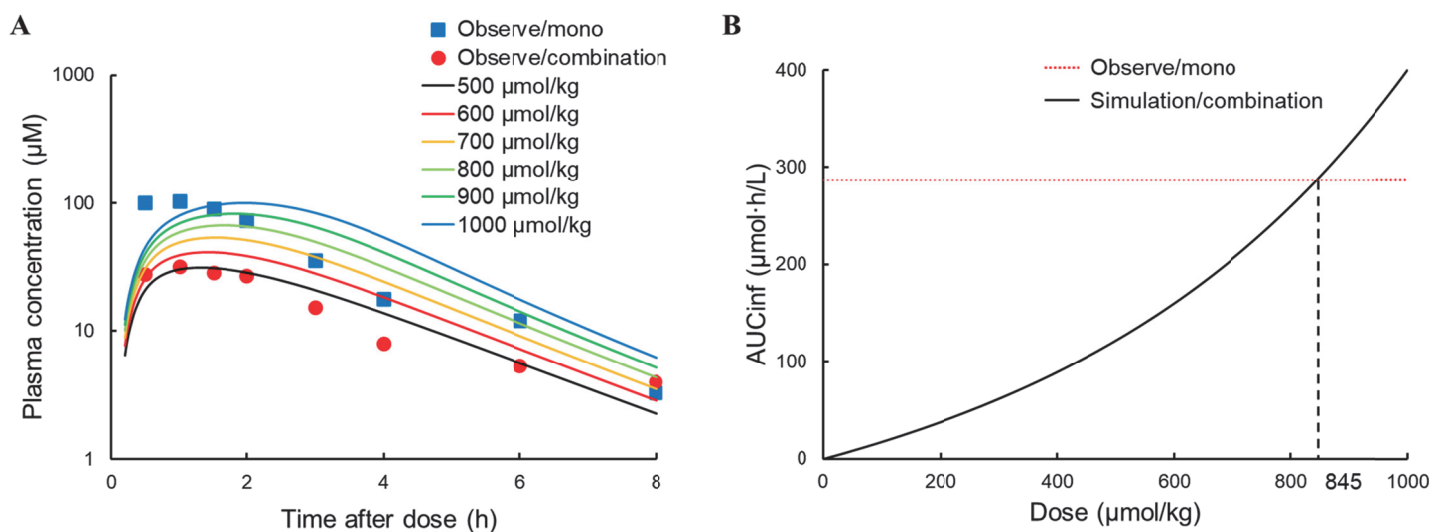
### 2-4-3. PBPK model 構築と 5-FU の血漿中濃度推移シミュレーション

PBPK model による capecitabine と CPT-11 及びそれぞれの代謝物の血漿中濃度推移の推定値と実測値との比較を Fig. 11 に示した。PBPK model による血漿中濃度推移の推定値は併用時、単独投与時両方で、CPT-11 以外の各薬物では実測値と近似した結果を示した。一方で、CPT-11 ではモデルによる推定値が実測値よりも高い傾向を示した。PBPK model を用いて推定した  $k_a$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\lambda$ 、 $\zeta$  とそれぞれの CV% を Table 12 に示した。全ての推定パラメータにおいて CV% は 30% 未満であった。Fig. 12 には PBPK model によって予測した capecitabine 投与量と 5-FU の血漿中濃度推移、及びモデルによる推定値から求めた  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  との関係を示した。Capecitabine 投与量の 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  から 1000  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  までの増量に伴い、5-FU の血漿中濃度は増加した (Fig. 12A)。Capecitabine、CPT-11 併用時の 5-FU の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は 121.73  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}/\text{L}$  と、capecitabine 単独投与時の 286.41  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}/\text{L}$  より低下した。さらに、PBPK model を用いたシミュレーションにより、CPT-11 併用時に単独投与と同等の 5-FU 曝露量を得るためには 845  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  の capecitabine 投与が必要であることが示された (Fig. 12B)。



**Fig. 11 Physiologically based pharmacokinetic model simulation for plasma concentration profile of capecitabine, 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR), 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFUR), 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan (CPT-11), and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in monotherapy and combination therapy**

(*J. Pharm. Sci.* in press; Fig. 4)



**Fig. 12 Physiologically based pharmacokinetic model simulation by altering the dosage of capecitabine in combination therapy**

A. Simulated plasma concentration profile of 5-fluorouracil (5-FU).

B. Simulated  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  of 5-FU.

(*J. Pharm. Sci.* in press; Fig. 5)

**Table 12 Estimated parameters from the physiologically based pharmacokinetic model**

Estimated parameters	Monotherapy	Combination therapy
$k_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.91 (14.18)	0.70 (6.55)
$\alpha$	439.56 (27.82)	67.08 (16.18)
$\beta$	31.79 (10.17)	38.65 (4.83)
$\gamma$	45.00 (12.23)	76.64 (19.60)
$\delta$	0.23 (9.35)	0.37 (8.40)
$\varepsilon$	111.67 (7.49)	65.21 (10.72)
$\zeta$	40.32 (6.47)	23.84 (10.89)

The values in parentheses are coefficient of variation (CV%).

(*J. Pharm. Sci.* in press; Table 3)

## 2-5. 考察

第1章の研究から、capecitabine やその代謝物の血漿中濃度推移は代謝酵素活性の変動による影響を受けて変化することが明らかとなった。すなわち、capecitabine の代謝活性化に関与する酵素の活性が capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移を予測する上で重要であることが示唆された。しかし、第1章の結果は capecitabine 単剤での検討によるものであり、他剤との併用時の血漿中濃度推移の変化は明らかではなかった。そこで本章では、XELIRI 療法において、代謝活性化の過程で CES を共有している抗がん剤である CPT-11 との併用に着目し、capecitabine 至適投与量の推定を目指して薬物動態学的検討を行った。

Capecitabine の血漿中濃度は CPT-11 との併用で単独投与した場合と比較して上昇し、代謝物である 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度は低下した。さらに、*in vitro* 代謝実験では、CPT-11 の濃度依存的に CES による capecitabine から 5'-DFCR への代謝が競合的に阻害されることが示された。すなわち、CPT-11 との併用で代謝物である 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度が CPT-11 の濃度依存的に低下することが示唆された。特に、5-FU では  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  が capecitabine 単独投与と比較して、capecitabine と CPT-11 との併用では 57%低下しており、XELIRI 療法施行時には capecitabine を単独投与する場合と比較して capecitabine の抗腫瘍効果が低下している可能性が示唆された (Fig. 9)。すなわち、capecitabine と CPT-11 は XELIRI 療法において併用されているが<sup>28,29</sup>、期待される capecitabine の抗腫瘍効果が得られていない可能性が示唆された。

一方で、CPT-11 の活性代謝物である SN-38 の血漿中濃度には単独投与と capecitabine との併用との間で差は認められなかったことから、CPT-11 の代謝は変化しないことが示唆された。CPT-11 には、CES による SN-38 への変換の他、CYP3A4 や CYP3A5 による 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin (APC) や、7-ethyl-10-[4-amino-1-piperidino] carbonyloxycamptotecin (NPC) への代謝が知られており、さらに NPC は SN-38 に変換される<sup>39</sup>。このように CPT-11 は複数の代謝経路を持つことから、酵素反応における capecitabine 併用による競合の影響を受け難く、単独投与と capecitabine との併用で血漿中濃度に差がなかったと考えられる。

これらの *in vivo* 及び *in vitro* での検討から、CPT-11 による capecitabine の代謝阻害が血漿中濃度推移の変化に寄与していることが示唆されたことに基づいて、CPT-11 併用時の血漿中濃度推移を推定するための PBPK model を構築した。PBPK model では、capecitabine と CPT-11 の活性代謝物である 5-FU と SN-38 それぞれの血漿中濃度推移を精度良く推定することが可能であった。また、PBPK model を用いたシミュレーションでは、CPT-11 併用時において capecitabine 投与量に依存して 5-FU の血漿中濃度が上昇することが示され、構築した PBPK model による capecitabine の投与量依存的な血漿中濃度の変化が認められた。

さらに、CPT-11 併用時における 5-FU の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  を、阻害の影響を受けていない単独投与と同等にするためには、約 1.7 倍の capecitabine 投与が必要であることが示された。Capecitabine 単独投与時の 5-FU の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は CPT-11 併用時の約 2.4 倍であることから (Table 10)、CPT-11 併用時において capecitabine の増量に対して非線形に 5-FU の  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  増加が認められ、

capecitabine の増量に伴い CPT-11 による競合的な代謝阻害の影響が軽減していることが示唆された。

XELIRI 療法では、通常 capecitabine を  $800 \text{ mg/m}^2$  で 14 日間、1 日 2 回の経口投与を行い、Day 1 に CPT-11 を  $200 \text{ mg/m}^2$  で点滴静注する<sup>29</sup>。本研究は、Day 1 における capecitabine と CPT-11 の薬物間相互作用に着目して検討を行っており、Day の CPT-11 投与による Day 2 以降の capecitabine 代謝への影響については明らかではない。Day 1 において capecitabine の増量を検討する際は、投与量に対して非線形に増加を示す 5-FU の  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  に注意が必要であると考えられるが、Day 2 以降の投与量最適化のために CPT-11 の CES に対する阻害活性が継続する期間についての検討が今後必要である。

また、SN-38 の代謝酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 には遺伝子多型が知られており、変異型である UGT1A1\*6 や UGT1A1\*28 では SN-38 の不活化が遅延するため、臨床において CPT-11 を減量して投与することがある<sup>40</sup>。CPT-11 の  $K_i$  値は  $42.54 \text{ nM}$  と投与後の血漿中濃度と比較して十分低いため影響は少ないと予想されるが、CPT-11 減量後の代謝阻害に与える影響についても今後検討が必要である。

さらに、本研究では毒性については検討していないが、capecitabine において有害事象として下痢が発現することが知られている<sup>7</sup>。また、CPT-11 では深刻な遅発性の下痢が報告されており、用量制限毒性に設定されている。そこで、今後の XELIRI 療法の投与量の最適化に向けて capecitabine や CPT-11 の毒性の発現について加味したモデルの構築による、抗腫瘍効果と毒性の発現の両方を考慮した検討が必要であると考えられる。

本章の研究は、capecitabine と CPT-11 の薬物間相互作用について検討した初めての研究であり、CPT-11 による capecitabine の代謝阻害が明らかとなった。さらに、PBPK model によるシミュレーションから capecitabine と CPT-11 併用時における capecitabine 増量の必要性が示唆された。

本章では、capecitabine の投与量増量後の 5-FU の血漿中濃度の変化について PBPK model を用いて検討を行なった。しかしながら、5-FU の血漿中濃度が capecitabine の抗腫瘍効果に与える影響については明らかではない。そこで、capecitabine 投与量と抗腫瘍効果について定量的な関係を示すため第 3 章で更なる検討を行なった。

### 第3章 大腸癌モデルラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と抗腫瘍効果

#### 3-1. 緒言

第1章において、capecitabine とその代謝物である 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度推移は、capecitabine の反復投与に影響を受けることが明らかとなった。さらに、capecitabine の代謝酵素の活性が、capecitabine とその代謝物の血漿中濃度に影響を及ぼしていることが示唆された。しかしながら、capecitabine やその代謝物の血漿中濃度が capecitabine の抗腫瘍効果にどの程度寄与しているのかは明らかではない。

Capecitabine の代謝物である 5'-DFCR や 5'-DFUR は、腫瘍組織中でも CDA や TP により代謝を受けることが知られている。特に TP が腫瘍中では正常組織と比較して活性が高いことにより、5'-DFUR が腫瘍組織で優先的に 5-FU に代謝されることで capecitabine は副作用のリスクを低下させていると言われている<sup>12,41</sup>。しかしながら、多くの患者が capecitabine 投与により手足症候群や下痢などの有害事象を経験しており、これらの有害事象は化学療法の減量や延期・中止の原因となっている<sup>2,28</sup>。さらに、有害事象発現後の化学療法継続のための投与量の減量や、投与間隔の延長に関して十分な検討はされておらず、臨床経験に基づいて決定されているのが現状である。すなわち、腫瘍組織での代謝が capecitabine やその代謝物の血漿中濃度推移に与える影響については明らかになっておらず、腫瘍組織での代謝を考慮した血漿中濃度推移の検討は、capecitabine の有効性や安全性の向上に寄与することが期待される。

そこで本章では、capecitabine の有害事象発現後の最適な投与方法の確立を目指して、大腸癌病態下における capecitabine やその代謝物の血漿中濃度推移や代謝酵素活性について大腸癌モデルラットを用いた実験を行った。まず、大腸癌モデルラットを作製し capecitabine を 14 日間投与することで、大腸癌モデルラットにおける capecitabine の血漿中濃度推移について検討を行った。さらに、*in vitro* 代謝実験で capecitabine の代謝酵素である CES、CDA、TP の大腸癌モデルラットにおける肝臓及び小腸での活性を測定した。測定した  $V_{max}$  と  $K_m$  を基に PBPK model を構築し、血漿中濃度推移の推定を行った。さらに、capecitabine の抗腫瘍効果を予測するための PBPK-PD model を構築した。最後に、有害事象発現時に治療強度減弱の必要がある場合の最適な投与計画について検討するため、構築した PBPK-PD model を用いて capecitabine の抗腫瘍効果についてシミュレーションを行った。

## 3-2. 実験材料

### 3-2-1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット（10 週齢）は Nippon SLC Co., Ltd. (Hamamatsu, Japan) から購入した。ラットの飼育条件は 1-2-1. に準じた。全ての動物実験は京都薬科大学動物倫理委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに従って実施した。

### 3-2-2. 試薬

Capecitabine は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) から入手した。5'-DFCR と 5'-DFUR は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) から購入した。5-FU は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より入手した。5-BU は Sigma-Aldrich Co. (Steinheim Germany) より購入した。その他の試薬類は、全て市販特級品を用いた。

## 3-3. 実験方法

### 3-3-1. 大腸癌モデルラットの作製

1,2-Dimethyl-hydrazine (DMH; 10mg/mL) を生理食塩水で溶解し、ラットに対して 40 mg/kg の用量で Day 1、Day 3、Day 5 の 3 回、皮下注射で投与した。さらに、1.0% dextran sodium sulfate をラットの飲用水として、Day 8 から Day 15 に与えた。DMH 投与開始から 28 週間後に大腸内視鏡にて大腸癌が発現していることを確認した。大腸癌モデルラットの作製は、Onose らの報告を参照した<sup>42</sup>。

### 3-3-2. 大腸癌モデルラットにおける capecitabine 薬物動態実験

Capecitabine を 1% carboxyl methylcellulose sodium 溶液に溶解し、22.5 mg/mL に調製した。全ての大腸癌モデルラットを投与回数に応じて単回投与群、7 日間反復投与群、14 日間反復投与群の 3 群に分け、180 mg/kg の用量で capecitabine を 1 日 1 回経口投与した。capecitabine の投与スケジュールは Shindoh らの報告を参考に設定した<sup>18</sup>。それぞれの群で最終の capecitabine 投与前及び、投与 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8 時間後に頸静脈より 250 µL の血液試料を採取した。血液試料を 12,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を 100 µL を血漿試料として分取した。最終採血後、ラットから肝臓と小腸を摘出した。摘出した肝臓と小腸は *in vitro* 代謝実験で用いる組織試料とした。血漿試料と組織試料は -80°C で凍結保存した。さらに腫瘍を摘出し、以下の式に基づいて腫瘍体積を計算した<sup>43</sup>。

$$Tumor\ volume\ (mm^3) = \frac{Length\ (mm) \times Width^2\ (mm^2)}{2}$$

ここで length は腫瘍の長径を、width は腫瘍の短径を表す。



### 3-3-3. Capecitabine 及びその代謝物の血漿中薬物濃度測定

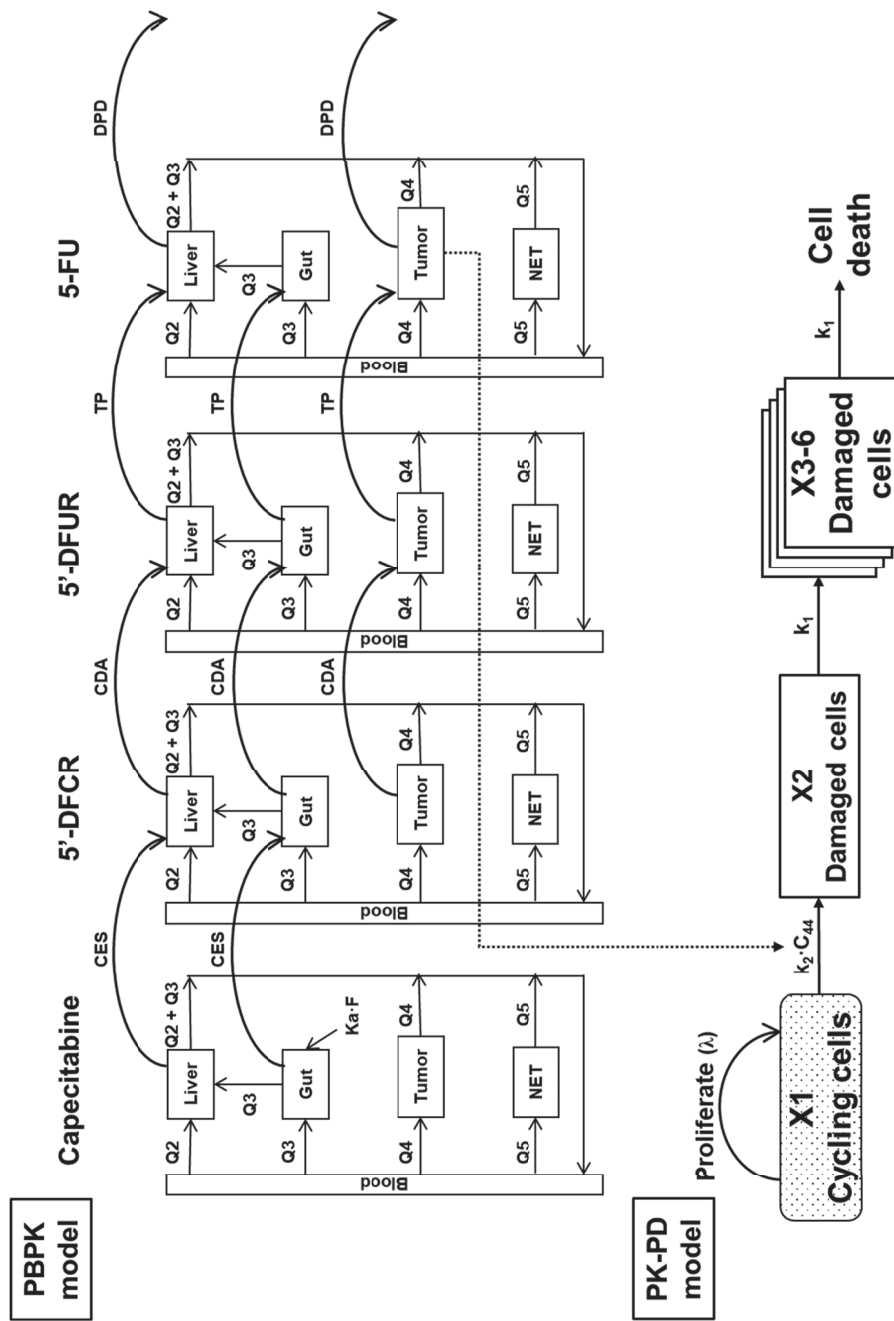
血漿試料に内標準物質として 5-BU (25 µg/mL) を 10 µL 添加した。さらに、タンパク除去のため 150 µL の飽和硫酸アンモニウム水溶液を加えた。タンパク除去後の上清に ethyl acetate/2-propanol (10:1, v/v) を 1 mL 加え、capecitabine とその代謝物を抽出した。抽出後の上層を N<sub>2</sub> 気流下で蒸発させ、0.1% formic acid で再溶解した。再溶解した溶液 10 µL を分取し、さらに 90 µL の 0.1% formic acid を加えたものを 5'-DFCR 及び 5'-DFUR の濃度測定用試料とした。残った 90 µL を capecitabine 及び 5-FU の濃度測定用試料とした。それぞれの試料 30 µL を LC-MS/MS に注入し、薬物濃度を測定した。LC-MS/MS は 1-3-2. と同一のものを使用した。流速は 0.2 mL/min とし、カラムには COSMOSIL<sup>®</sup> HILIC column (2.0 × 150 mm, 5µm; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を使用した。測定条件は Kobuchi、Ito らの報告を参照した<sup>19,44</sup>。測定した capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移から、ノンコンパートメントモデル解析により 1-3-3. と同様の方法で薬物動態学的パラメータを算出した。ノンコンパートメントモデル解析は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いて行なった。

### 3-3-4. 大腸癌モデルラットにおける CES、CDA、TP の活性測定

大腸癌モデルラットから摘出した肝臓と小腸を 1-3-4. と同一の方法で処理し、サイトゾルとミクロゾームを得た。サイトゾルとミクロゾームのタンパク質濃度は WAKO protein assay BCA kit (Osaka, Japan) により測定した。CES、CDA、TP の酵素活性を 1-3-4. と同様の方法で測定し、Lineweaver-Burk プロットによりそれぞれの酵素の肝臓と小腸における V<sub>max</sub> と K<sub>m</sub> を求め、CL<sub>int</sub> を算出した。

### 3-3-5. PBPK model 構築

大腸癌モデルラットにおける capecitabine とその代謝物の血漿中濃度推移を推定するため、PBPK model を構築した。PBPK model は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いて記述した。Fig. 13 に構築した PBPK model の模式図を示す。モデルは血液、肝臓、消化管、腫瘍、NET の 5 つのコンパートメントにより構築されており、薬物は瞬時にそれぞれのコンパートメント内で均一に拡散すると仮定している。Capecitabine とその代謝物はミカエリスメンテン式に従い代謝される。腎排泄が消失に寄与する割合は、capecitabine とその代謝物では無視できるほど小さいことが知られており、このモデルでは腎排泄については記述しなかった<sup>45</sup>。Capecitabine のバイオアベイラビリティは Blesch らの報告に基づき 100% に設定した<sup>12</sup>。肝臓と消化管コンパートメントにおける CES、CDA、TP の V<sub>max</sub> と K<sub>m</sub> のパラメータは、3.3-4. で行なった代謝実験により得られた結果を用いた。その他の生理学的パラメータ及び薬物動態学的パラメータは既知のパラメータに基づいて設定した (Table 13,14)<sup>13,21-23</sup>。組織中のミクロゾームタンパク質濃度は肝臓では 44.8 mg/g tissue とし、小腸では 2.3 mg/g tissue とした<sup>24,25</sup>。



**Fig. 13** Scheme of the physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model described for tumor growth kinetics after capecitabine treatment

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Fig. 1)

**Table 13 Blood flow rate and tissue volume for physiologically based pharmacokinetic model and kinetic parameters of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in liver and tumor tissue**

Tissue	Blood flow rate <sup>21</sup> (mL/min/kg)	Tissue volume <sup>21</sup> (mL/kg)	$V_{\max, \text{CDA}}^{13}$ (nmol/min/g tissue)	$K_{\text{m}, \text{CDA}}^{13}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\max, \text{TP}}^{13}$ (nmol/min/g tissue)	$K_{\text{m}, \text{TP}}^{13}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{\max, \text{DPD}}^{22}$ (nmol/min/g tissue)	$K_{\text{m}, \text{DPD}}^{22}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
Blood	217.0	60						
Liver	86.4	40					250.7	40
Gut	77.7	36						
Tumor	1.1	5	192	6810	474	667	16.2	2
NET	51.8	750						

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2021**, 46(2), 301-315; Table 1)

**Table 14 Unbound form ratio and tissue to blood concentration ratio in the liver, gut, tumor, and non-eliminating tissue of capecitabine and its metabolites for physiologically based pharmacokinetic model**

Compound	$f_p^{13}$	$Kp_{\text{Liver}}^{13}$	$Kp_{\text{Gut}}^{13}$	$Kp_{\text{Tumor}}^{13}$	$Kp_{\text{NET}}^{23}$
Capecitabine	0.55	1.73	0.96	1.00	0.56
5'-DFCR	0.95	1.46	2.61	1.00	0.90
5'-DFUR	0.79	1.79	3.11	1.00	0.46
5-FU	1.00	2.78	1.71	2.00	0.56

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2021**, 46(2), 301-315; Table 2)

構築した PBPK model のモデル式を以下に示す。

$$\frac{dC_{11}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{11}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{21}}{Kp_{21}} - (Q_3 \times C_{11}) - (Q_4 \times C_{11}) + \frac{Q_4 \times C_{41}}{Kp_{41}} - (Q_5 \times C_{11}) + \frac{Q_5 \times C_{51}}{Kp_{51}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{21}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{11}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{21}}{Kp_{21}} + \frac{Q_3 \times C_{31}}{Kp_{31}} - \frac{\alpha \times V_{max21} \times f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})}{K_{m21} + f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{31}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{11}) - \frac{Q_3 \times C_{31}}{Kp_{31}} + (k_a \times F \times X) - \frac{\alpha \times V_{max31} \times f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})}{K_{m31} + f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{41}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{11}) - \frac{Q_4 \times C_{41}}{Kp_{41}} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{51}}{dt} = \left\{ (Q_5 \times C_{11}) - \frac{Q_5 \times C_{51}}{Kp_{51}} \right\} / V_5$$

$$\frac{dC_{12}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{12}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{22}}{Kp_{22}} - (Q_3 \times C_{12}) - (Q_4 \times C_{12}) + \frac{Q_4 \times C_{42}}{Kp_{42}} - (Q_5 \times C_{12}) + \frac{Q_5 \times C_{52}}{Kp_{52}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{22}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{12}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{22}}{Kp_{22}} + \frac{Q_3 \times C_{32}}{Kp_{32}} + \frac{\alpha \times V_{max21} \times f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})}{K_{m21} + f_{p1} \times (C_{21}/Kp_{21})} - \frac{\beta \times V_{max22} \times f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})}{K_{m22} + f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{32}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{12}) - \frac{Q_3 \times C_{32}}{Kp_{32}} + \frac{\alpha \times V_{max31} \times f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})}{K_{m31} + f_{p1} \times (C_{31}/Kp_{31})} - \frac{\beta \times V_{max32} \times f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})}{K_{m32} + f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{42}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{12}) - \frac{Q_4 \times C_{42}}{Kp_{42}} - \frac{\beta \times V_{max42} \times f_{p2} \times (C_{42}/Kp_{42})}{K_{m42} + f_{p2} \times (C_{42}/Kp_{42})} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{52}}{dt} = \left\{ (Q_5 \times C_{12}) - \frac{Q_5 \times C_{52}}{Kp_{52}} \right\} / V_5$$

$$\frac{dC_{13}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{13}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{23}}{Kp_{23}} - (Q_3 \times C_{13}) - (Q_4 \times C_{13}) + \frac{Q_4 \times C_{43}}{Kp_{43}} - (Q_5 \times C_{13}) + \frac{Q_5 \times C_{53}}{Kp_{53}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{23}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{13}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{23}}{Kp_{23}} + \frac{Q_3 \times C_{33}}{Kp_{33}} + \frac{\beta \times V_{max22} \times f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})}{K_{m22} + f_{p2} \times (C_{22}/Kp_{22})} - \frac{\gamma \times V_{max23} \times f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})}{K_{m23} + f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{33}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{13}) - \frac{Q_3 \times C_{33}}{Kp_{33}} + \frac{\beta \times V_{max32} \times f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})}{K_{m32} + f_{p2} \times (C_{32}/Kp_{32})} - \frac{\gamma \times V_{max33} \times f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})}{K_{m33} + f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{43}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{13}) - \frac{Q_4 \times C_{43}}{Kp_{43}} + \frac{\beta \times V_{max42} \times f_{p2} \times (C_{42}/Kp_{42})}{K_{m32} + f_{p2} \times (C_{42}/Kp_{42})} - \frac{\gamma \times V_{max43} \times f_{p3} \times (C_{43}/Kp_{43})}{K_{m43} + f_{p3} \times (C_{43}/Kp_{43})} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{53}}{dt} = \left\{ (Q_5 \times C_{13}) - \frac{Q_5 \times C_{53}}{Kp_{53}} \right\} / V_5$$

$$\frac{dC_{14}}{dt} = \left\{ -(Q_2 \times C_{14}) + \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{24}}{Kp_{24}} - (Q_3 \times C_{14}) - (Q_4 \times C_{14}) + \frac{Q_4 \times C_{44}}{Kp_{44}} - (Q_5 \times C_{14}) + \frac{Q_5 \times C_{54}}{Kp_{54}} \right\} / V_1$$

$$\frac{dC_{24}}{dt} = \left\{ (Q_2 \times C_{14}) - \frac{(Q_2+Q_3) \times C_{24}}{Kp_{24}} + \frac{Q_3 \times C_{34}}{Kp_{34}} + \frac{\gamma \times V_{max23} \times f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})}{K_{m23} + f_{p3} \times (C_{23}/Kp_{23})} - \frac{\delta \times V_{max24} \times f_{p4} \times (C_{24}/Kp_{24})}{K_{m24} + f_{p4} \times (C_{24}/Kp_{24})} \right\} / V_2$$

$$\frac{dC_{34}}{dt} = \left\{ (Q_3 \times C_{14}) - \frac{Q_3 \times C_{34}}{Kp_{34}} + \frac{\gamma \times V_{max33} \times f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})}{K_{m33} + f_{p3} \times (C_{33}/Kp_{33})} \right\} / V_3$$

$$\frac{dC_{44}}{dt} = \left\{ (Q_4 \times C_{44}) - \frac{Q_4 \times C_{44}}{Kp_{44}} + \frac{\gamma \times V_{max43} \times f_{p3} \times (C_{43}/Kp_{43})}{K_{m43} + f_{p3} \times (C_{43}/Kp_{43})} - \frac{\delta \times V_{max44} \times f_{p4} \times (C_{44}/Kp_{44})}{K_{m44} + f_{p4} \times (C_{44}/Kp_{44})} \right\} / V_4$$

$$\frac{dC_{54}}{dt} = \left\{ (Q_5 \times C_{54}) - \frac{Q_5 \times C_{54}}{Kp_{54}} \right\} / V_5$$

ここで、Q は各組織への血流速度、C は各薬物の薬物濃度、V はそれぞれの組織の組織容積、 $k_a$  は吸収速度定数、F はバイオアベイラビリティ、X は capecitabine の投与量を示す。C、Kp、 $V_{max}$ 、 $K_m$  の後ろに記載している 1 番目の数字 (1-5) は、順に血液、肝臓、消化管、腫瘍、NET コンパートメントを示す。Q と V の後ろの数字も同様である。C、Kp、 $V_{max}$ 、 $K_m$  の後ろに記載している 2 番目の数字 (1-4) は薬物を表しており、それぞれ順に capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU である。 $f_p$  の後ろの数字も同様である。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  は *in vitro* のデータを *in vivo* にスケールアップする係数である *in vitro-in vivo* scaling factor を示す。PBPK model において推定するパラメータは  $k_a$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  とした。モデルを用いたパラメータの推定は 1-3-5. と同一の方法で行なった。

### 3-3-6. PBPK-PD model 構築

Capecitabine 投与後の腫瘍体積の変化を推定するため、PBPK-PD model を構築した (Fig. 13)。PD model に関しては、Simeoni らの報告に準じて構築した<sup>43</sup>。治療開始前では、腫瘍細胞が指数関数的な増殖を示すと仮定し、5-FU の曝露によって腫瘍細胞が攻撃され、最終的に腫瘍細胞死を引き起こす過程を記述した。薬物の曝露から細胞死までの時間的乖離を transit compartment model によって記述した。PBPK-PD model で使用する 5-FU の腫瘍中濃度は、構築した PBPK model より推定した。PBPK-PD model は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用いて記述した。

構築した PBPK-PD モデルのモデル式を以下に示す。

$$\frac{dX_1(t)}{dt} = \lambda \times X_1(t) - k_2 \times C_{44}(t) \times X_1(t)$$

$$\frac{dX_2(t)}{dt} = k_2 \times C_{14}(t) \times X_1(t) - k_1 \times X_2(t)$$

$$\frac{dX_3(t)}{dt} = k_1 \times [X_2(t) - X_3(t)]$$

$$\frac{dX_4(t)}{dt} = k_1 \times [X_3(t) - X_4(t)]$$

$$\frac{dX_5(t)}{dt} = k_1 \times [X_4(t) - X_5(t)]$$

$$\frac{dX_6(t)}{dt} = k_1 \times [X_5(t) - X_6(t)]$$

$$W(t) = X_1(t) + X_2(t) + X_3(t) + X_4(t) + X_5(t) + X_6(t)$$

$$X_1(0) = W_0$$

$$X_2(0) = X_3(0) = X_4(0) = X_5(0) = X_6(0) = 0$$

ここで、 $X_1(t)$  は増殖段階の腫瘍細胞を表し、 $X_2(t)$  から  $X_6(t)$  は増殖停止段階の腫瘍細胞を示す。 $C_{44}(t)$  は PBPK model により推定した腫瘍中 5-FU 濃度を示す。 $W(t)$  は全ての腫瘍細胞を合わせた合計重量を表す。指数関数的な腫瘍の増殖係数を  $\lambda$  とし、Kobuchi らの報告に基づき設定した<sup>46</sup>。 $k_1$  は増殖停止段階における腫瘍の移行定数であり、 $k_2$  は 5-FU による腫瘍細胞の増殖段階から増殖停止段階への移行定数である。腫瘍組織の初期重量である  $W_0$  は、*in vivo* 動物実験より 18 mg とした。腫瘍組織の密度は  $1 \text{ mg/mm}^3$  と仮定した<sup>43</sup>。PBPK-PD model において推定するパラメータは  $k_1$  及び  $k_2$  とした。パラメータの推定は Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> software (version 6.4, Certara USA, Inc., Princeton, NJ, USA) を用い、最尤推定法によって行なった。さらに、得られたパラメータの推定値を用いて CES、CDA、TP、DPD の  $V_{\max}$  を 0.1 倍から 10 倍まで変化させた際の、腫瘍コンパートメントでの 5-FU 薬物濃度と腫瘍体積の変化についてシミュレーションを行った。さらに、3-3-7.の条件における腫瘍体積の変化をシミュレートした。

### 3-3-7. PBPK-PD model を用いた capecitabine 投与後の腫瘍体積シミュレーション

Capecitabine 投与スケジュール変更後の抗腫瘍効果について検討するため、PBPK-PD model を用いて様々な capecitabine 投与設計下での腫瘍体積変化のシミュレーションを行った。初めに、capecitabine 用量変更による抗腫瘍効果の変化について検討した。Capecitabine を 300、400、500、600、700  $\mu\text{mol/kg}$  の投与量で 1 日 1 回 14 日間反復投与した際の腫瘍体積の変化についてシミュレーションを行った。次に、capecitabine の投与間隔が延期になった場合の抗腫瘍効果の変化について 24 週間の腫瘍体積の変化についてシミュレーションを行った。この検討では capecitabine の投与量を 500  $\mu\text{mol/kg}$  とし、14 日間投与し 7 日間休薬した場合 (2W1R) と、14 日間投与した後 14 日間休薬した場合 (2W2R) で腫瘍体積を比較した。最後に 2W2R のスケジュールで capecitabine を 500  $\mu\text{mol/kg}$  投与した場合と、2W1R のスケジュールで capecitabine を 400  $\mu\text{mol/kg}$  投与した場合とで 12 週間のシミュレーションを行い、腫瘍体積の比較を行った。

### 3-3-8. 統計学的処理

全てのデータは、平均値  $\pm$  標準偏差 (S.D.) で表記した。有意差検定は一元配置分散分析の後、Bonferroni 法により多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

### 3-4. 結果

#### 3-4-1. Capecitabine 反復投与後の血漿中濃度推移

大腸癌モデルラットに capecitabine を反復投与した際の Day 1、Day 7、Day 14 における capecitabine 及びその代謝物の血漿中濃度推移を Fig. 14 に示した。さらにノンコンパートメントモデル解析により算出した capecitabine とその代謝物の薬物動態学的パラメータを Table 15 に示した。Capecitabine の  $C_{max}$  と  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は Day 7 ( $27.86 \pm 12.45 \mu\text{mol/L}$ ,  $11.16 \pm 3.02 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と Day 14 ( $11.80 \pm 14.97 \mu\text{mol/L}$ ,  $7.59 \pm 5.24 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) において、Day 1 ( $160.31 \pm 53.27 \mu\text{mol/L}$ ,  $77.80 \pm 39.71 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して低下した。一方で、5'-DFUR の  $C_{max}$  と  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  は Day 7 ( $15.30 \pm 2.83 \mu\text{mol/L}$ ,  $76.15 \pm 17.08 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と Day 14 ( $19.19 \pm 5.97 \mu\text{mol/L}$ ,  $57.37 \pm 15.66 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) において、Day 1 ( $1.56 \pm 1.34 \mu\text{mol/L}$ ,  $3.04 \pm 1.09 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) と比較して上昇した。5'-DFUR に関して有意な差は認められなかったものの、反復投与後に  $C_{max}$  や  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  が上昇する傾向にあった。5-FU では3群間で  $C_{max}$  と  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  に差は認められなかった。

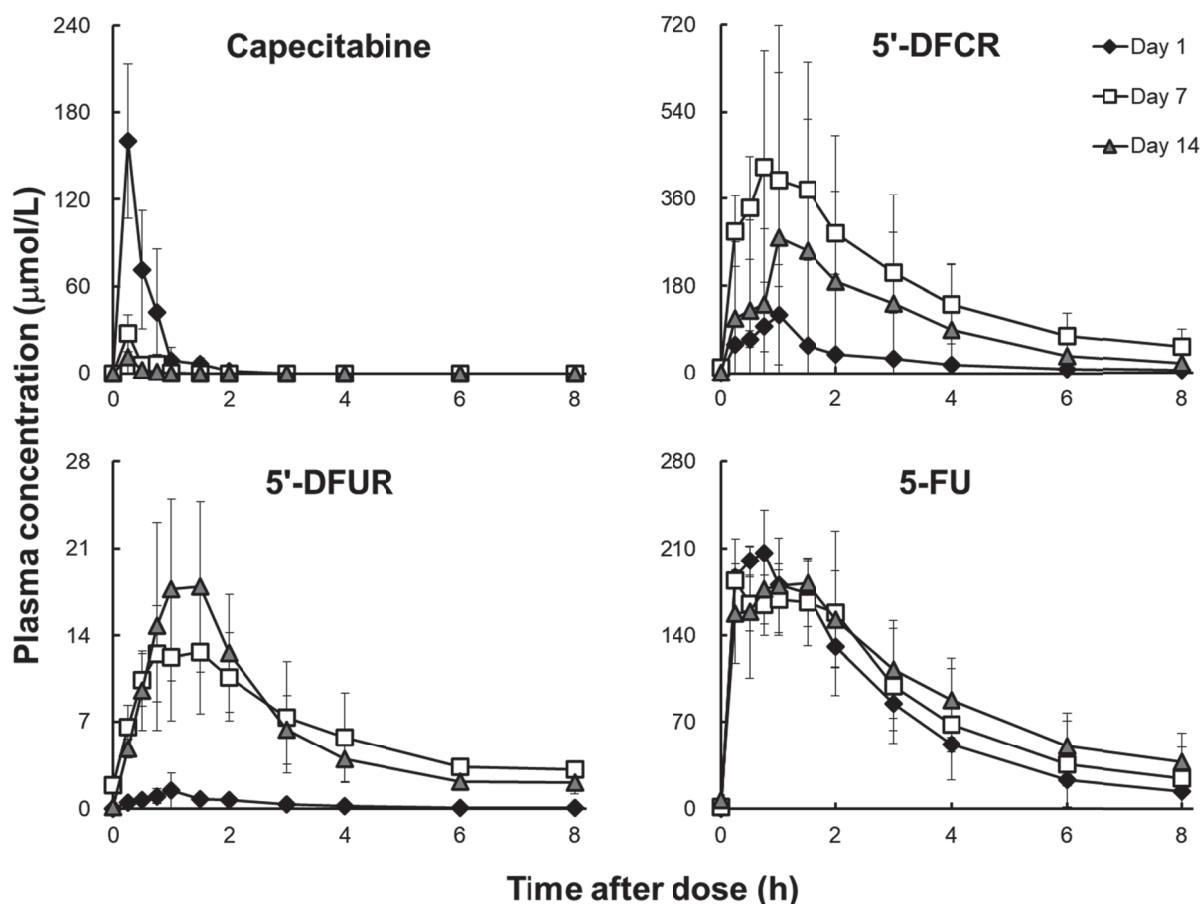


Fig. 14 Mean plasma concentration profiles of capecitabine, 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFUR), 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR), and 5-fluorouracil (5-FU) after oral capecitabine administration for 14 days ( $n=5$ )

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Fig. 2)

**Table 15 Pharmacokinetic parameters of capecitabine and its metabolites on Day 1, 7, and 14 after multiple capecitabine administrations**

Pharmacokinetic parameters	Unit	Day 1	Day 7	Day 14
<b>Capecitabine</b>				
$t_{1/2}$	h	0.66 ± 0.08	0.30 ± 0.19	8.11 ± 13.19
$C_{max}$	μmol/L	160.31 ± 53.27	27.86 ± 12.45*	11.80 ± 14.97*
$T_{max}$	h	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00
$CL_{tot}/F$	L/h/kg	7.44 ± 2.93	47.33 ± 11.37	112.76 ± 107.72
$Vd/F$	L/kg	7.24 ± 3.25	21.98 ± 17.33	767.95 ± 1143.57
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	77.80 ± 39.71	11.16 ± 3.02*	7.59 ± 5.24*
<b>5'-DFCR</b>				
$t_{1/2}$	h	2.09 ± 0.29	2.27 ± 0.75	2.31 ± 0.85
$C_{max}$	μmol/L	125.85 ± 97.30	483.46 ± 209.03	284.98 ± 434.41
$T_{max}$	h	0.75 ± 0.25	0.90 ± 0.63	1.13 ± 0.60
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	251.39 ± 54.55	1631.46 ± 613.73	882.39 ± 1282.16
<b>5'-DFUR</b>				
$t_{1/2}$	h	1.94 ± 0.23	6.08 ± 4.91	2.52 ± 0.55
$C_{max}$	μmol/L	1.56 ± 1.34	15.30 ± 2.83*	19.19 ± 5.97*
$T_{max}$	h	1.17 ± 0.29	1.90 ± 0.74	1.38 ± 0.48
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	3.04 ± 1.09	76.15 ± 17.08*	57.37 ± 15.66*
<b>5-FU</b>				
$t_{1/2}$	h	1.88 ± 0.18	2.21 ± 0.94	3.27 ± 0.97
$C_{max}$	μmol/L	212.90 ± 30.45	210.26 ± 24.64	194.10 ± 22.44
$T_{max}$	h	0.58 ± 0.14	0.85 ± 0.72	1.31 ± 0.38
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	μmol·h/L	657.32 ± 81.34	790.96 ± 405.68	963.09 ± 338.38

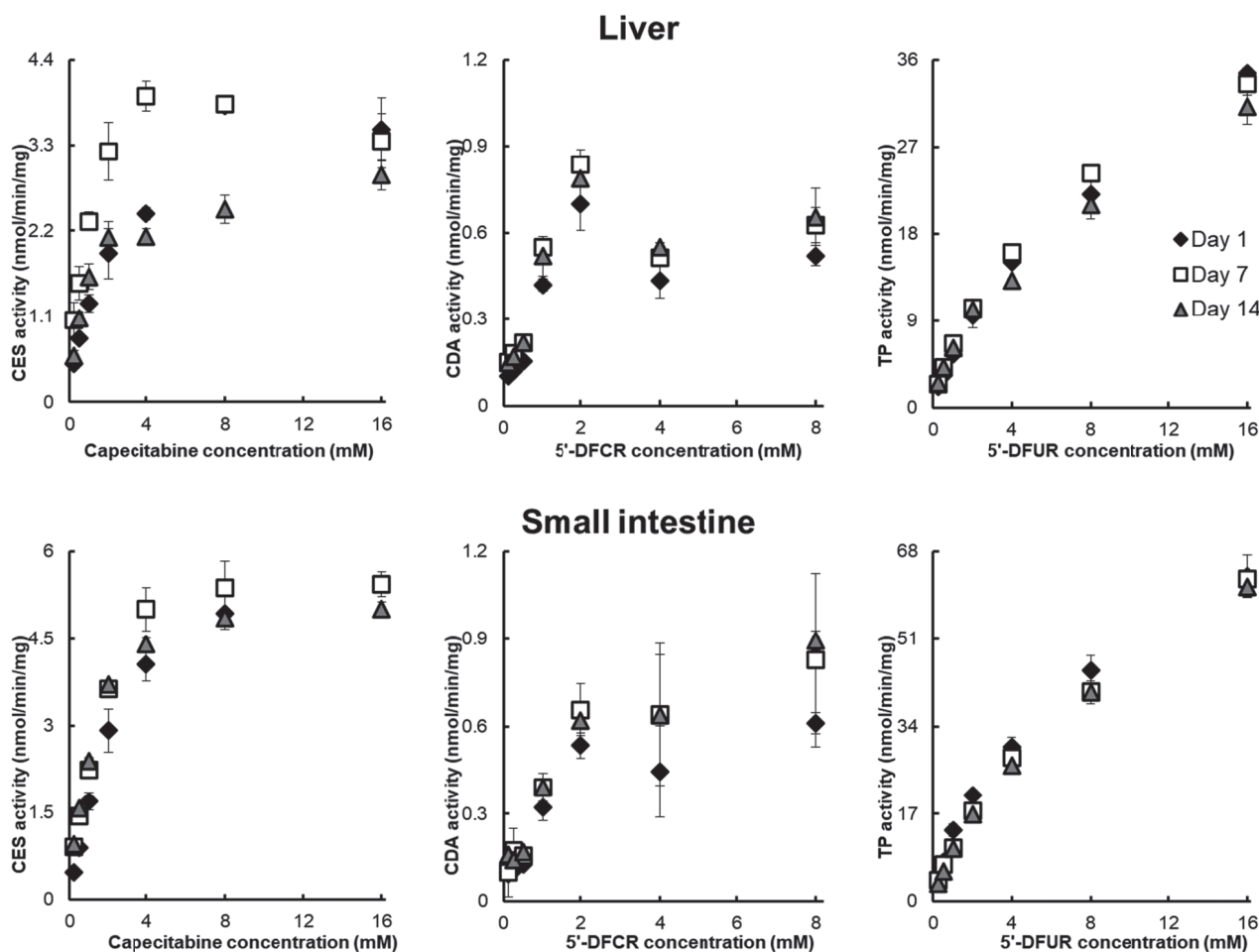
\*  $p < 0.05$ , statistically significant difference against Day 1

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2021**, 46(2), 301-315; Table 3)



### 3-4-2. Capecitabine 反復投与後の代謝酵素 CES、CDA、TP の活性

Capecitabine の代謝活性化に關与する酵素である CES、CDA、TP の活性について、capecitabine 反復投与後 Day 1、Day 7、Day 14 での代謝実験の結果を Fig. 15 に示した。さらに、Lineweaver-Burk プロットから算出した  $V_{max}$ 、 $K_m$ 、 $CL_{int}$  について Table 16 に示した。肝臓において、CES の  $CL_{int}$  は Day 7 ( $5.59 \pm 1.27 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) では Day 1 ( $2.23 \pm 0.17 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と比較して上昇した。さらに、CDA、TP は Day 7 と Day 14 において Day 1 と比較して  $CL_{int}$  が上昇する傾向にあった。小腸では、Day 7 ( $4.17 \pm 0.36 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と Day 14 ( $4.52 \pm 0.29 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) で Day 1 ( $2.01 \pm 0.26 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と比較して CES の  $CL_{int}$  が上昇した。さらに、CDA では Day 7 ( $0.86 \pm 0.12 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) において Day 1 ( $0.47 \pm 0.10 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) と比較して  $CL_{int}$  が上昇した。



**Fig. 15** Michaelis-Menten plot of carboxylesterase (CES), cytidine deaminase (CDA), and thymidine phosphorylase (TP) in the liver and small intestine on Day 1, 7, 14 after capecitabine oral administration for 14 days ( $n=3$ )

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Fig. 3)

**Table 16 Kinetic parameters of three metabolic enzymes of capecitabine: carboxylesterase (CES), cytidine deaminase (CDA), and thymidine phosphorylase (TP) after multiple capecitabine administrations**

Tissue	Kinetic parameters	Unit	Day 1	Day 7	Day 14
Liver	CES				
	$V_{\max}$	nmol/min/mg	$3.52 \pm 0.30$	$4.10 \pm 0.42$	$3.03 \pm 0.26^{\#}$
	$K_m$	mM	$1.58 \pm 0.22$	$0.77 \pm 0.25^*$	$1.01 \pm 0.20^*$
	$CL_{\text{int}}$	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$	$2.23 \pm 0.17$	$5.59 \pm 1.27^*$	$3.05 \pm 0.37^{\#}$
	CDA				
	$V_{\max}$	nmol/min/mg	$0.47 \pm 0.04$	$0.59 \pm 0.07^*$	$0.58 \pm 0.04$
	$K_m$	mM	$0.52 \pm 0.07$	$0.44 \pm 0.14$	$0.43 \pm 0.10$
	$CL_{\text{int}}$	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$	$0.91 \pm 0.07$	$1.43 \pm 0.39$	$1.38 \pm 0.31$
	TP				
	$V_{\max}$	nmol/min/mg	$22.63 \pm 0.27$	$25.68 \pm 2.66$	$21.02 \pm 0.90^{\#}$
	$K_m$	mM	$2.53 \pm 0.15$	$2.49 \pm 0.52$	$1.94 \pm 0.21$
	$CL_{\text{int}}$	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$	$8.97 \pm 0.52$	$10.49 \pm 1.27$	$10.91 \pm 0.69$
Small intestine	CES				
	$V_{\max}$	nmol/min/mg	$8.55 \pm 2.00$	$5.95 \pm 0.55$	$5.58 \pm 0.31^*$
	$K_m$	mM	$4.36 \pm 1.37$	$1.44 \pm 0.27^*$	$1.24 \pm 0.15^*$
	$CL_{\text{int}}$	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$	$2.01 \pm 0.26$	$4.17 \pm 0.36^*$	$4.52 \pm 0.29^*$
	CDA				
	$V_{\max}$	nmol/min/mg	$0.68 \pm 0.20$	$0.57 \pm 0.07$	$0.83 \pm 0.05$
	$K_m$	mM	$1.55 \pm 0.77$	$0.68 \pm 0.19$	$1.35 \pm 0.11$
	$CL_{\text{int}}$	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$	$0.47 \pm 0.10$	$0.86 \pm 0.12^*$	$0.62 \pm 0.02^{\#}$
	TP				
	$V_{\max}$	nmol/min/mg	$76.63 \pm 24.12$	$43.90 \pm 6.43$	$49.81 \pm 5.85$
	$K_m$	mM	$4.82 \pm 1.90$	$2.51 \pm 0.49$	$3.56 \pm 0.54$
	$CL_{\text{int}}$	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$	$16.24 \pm 1.36$	$17.57 \pm 0.91$	$14.04 \pm 0.48^{\#}$

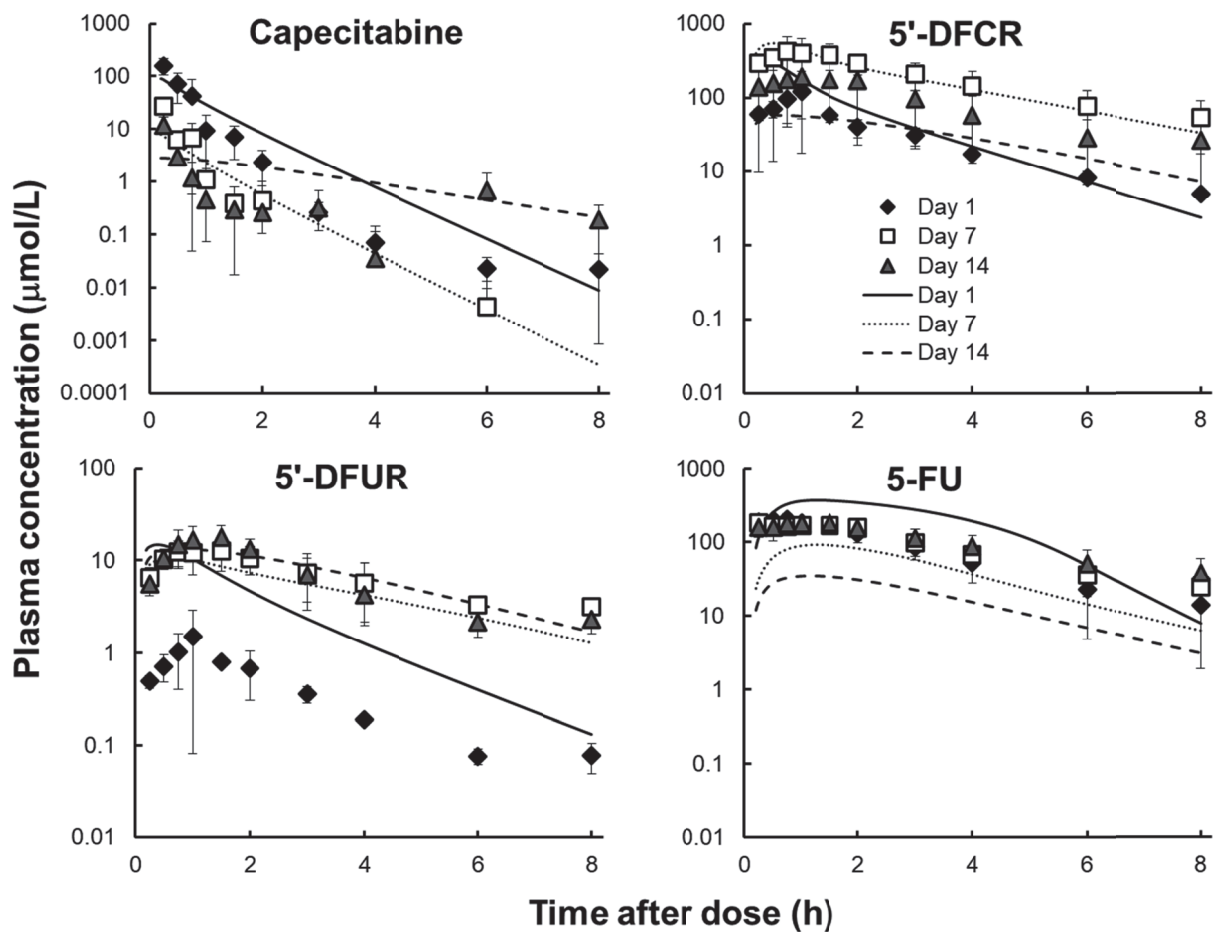
\*  $p < 0.05$ , statistically significant difference against Day 1

<sup>#</sup>  $p < 0.05$ , statistically significant difference against Day 7

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2021**, 46(2), 301-315; Table 4)

### 3-4-3. PBPK model を用いた capecitabine 及びその代謝物の血漿中濃度推移予測

Fig. 16 に大腸癌モデルラットにおける capecitabine 反復投与後の capecitabine とその代謝物の、PBPK model に基づき推定された血漿中濃度推移を示した。PBPK model を用いて推定した capecitabine とその代謝物の血漿中濃度は、*in vivo* での実測値と近似していた。Table 17 には PBPK model を用いて推定した  $k_a$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の値とそれぞれの CV% を示した。CV% は 30% 前後であった。



**Fig. 16 Physiologically based pharmacokinetic model-based simulation for plasma concentration profiles of capecitabine and its metabolites**

Each point is the observed value. The line represents plasma concentration profile obtained by simulation using the physiologically based pharmacokinetic model.

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Fig. 4)

**Table 17 Estimated parameters calculated from the physiologically based pharmacokinetic model**

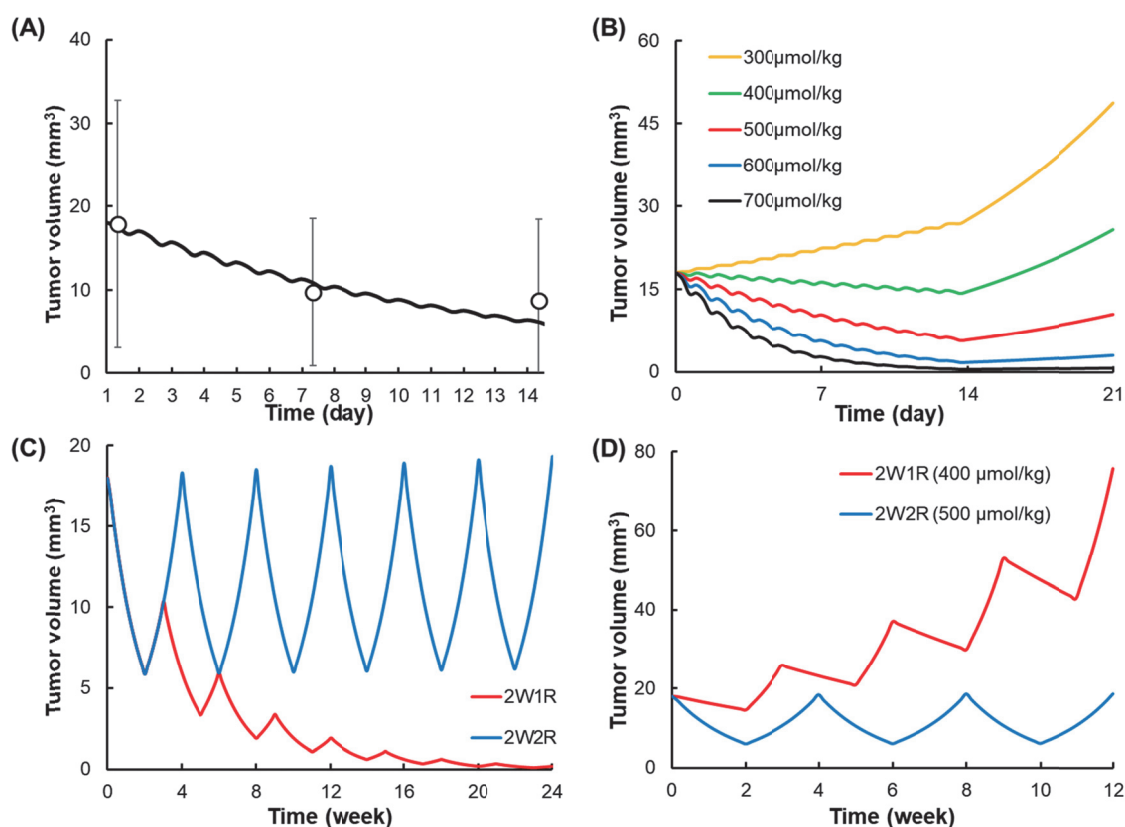
Estimated parameters	Day 1	Day 7	Day 14
$k_a$ ( $h^{-1}$ )	2.00 (27.1)	2.00 (42.8)	0.37 (11.0)
$\alpha$	704.6 (21.7)	1907.9 (30.4)	1998.0 (22.5)
$\beta$	105.1 (10.9)	24.5 (27.7)	96.4 (31.0)
$\gamma$	160.0 (26.5)	79.9 (26.2)	55.1 (10.1)
$\delta$	0.15 (6.7)	0.22 (37.0)	0.36 (40.3)

The values in parentheses are coefficient of variation (CV%).

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2021**, 46(2), 301-315; Table 5)

### 3-4-4. PBPK-PD model による capecitabine 抗腫瘍効果の予測

Fig. 17A に capecitabine 反復投与後の腫瘍体積の実測値と PBPK-PD model に基づき推定した腫瘍体積変化を示した。Capecitabine 反復投与によって腫瘍体積が減少することが明らかになり、PBPK-PD model に基づく推定値は実測の腫瘍体積と近い値を示した。Fig. 17B-D には、capecitabine 投与後の腫瘍体積シミュレーションを行った際の腫瘍体積変化について示した。Fig. 17B より capecitabine の用量依存的に抗腫瘍効果が上昇することが示され、腫瘍の増殖抑制には 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  以上の capecitabine 投与が必要であることが示された。Fig. 17C より、2W1R の capecitabine 投与によって腫瘍が縮小することが示された。さらに、2W2R の投与では腫瘍体積は縮小しないものの、腫瘍の増殖が抑制された。最後に、Fig 17D より、capecitabine の減量と比較して投与延期が抗腫瘍効果に優れることが示された。PBPK-PD model に基づき推定した  $k_1$  及び  $k_2$  のパラメータと CV% については Table 18 に示した。Fig. 18 に capecitabine の代謝酵素である CES、CDA、TP、DPD の活性を 0.1 倍から 10 倍まで変化させた際の腫瘍中 5-FU 濃度の変化 (Fig. 18A) と腫瘍体積の変化 (Fig. 18B) について示した。その結果、CDA と DPD の活性変化によって、5-FU の腫瘍中濃度と腫瘍体積が変化した。



**Fig. 17 Observed and simulated tumor volume using the physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model following 14 days of capecitabine administration (A) Alteration of simulated tumor volume after capecitabine treatment using the physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model (B-D)**

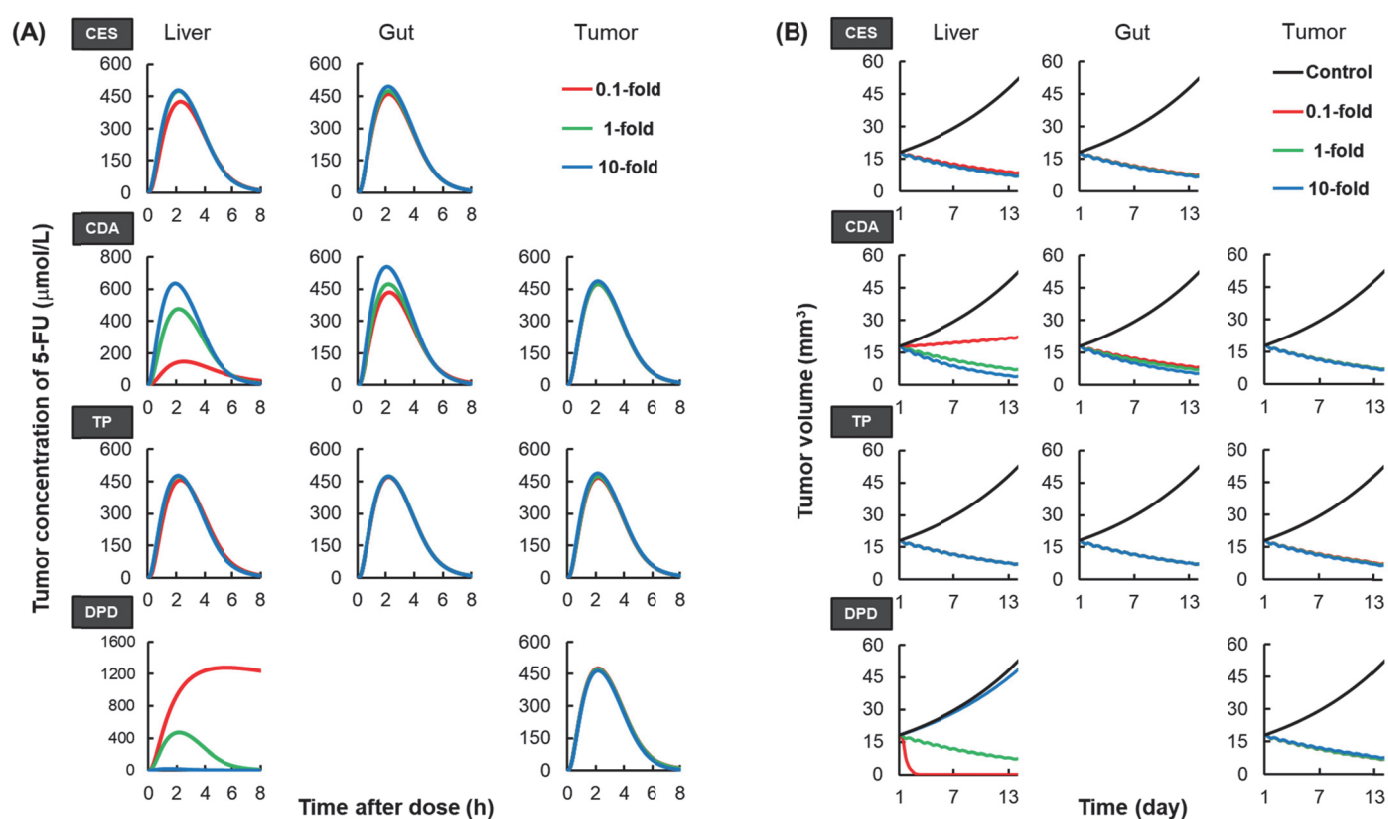
(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Fig. 6)

**Table 18** Estimated parameters calculated from the physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model

Estimated parameters	Value (CV%)
$k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	1.2 (49.7)
$k_2$ ( $\text{L}/\mu\text{mol}/\text{hr}$ )	0.00018 (7.8)

The values in parentheses are coefficient of variation (CV%).

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Table 6)



**Fig. 18** Simulations of tumor concentration of 5-fluorouracil (5-FU) (A) and tumor volume (B) after varying the  $V_{\text{max}}$  of carboxylesterase (CES), cytidine deaminase (CDA), thymidine phosphorylase (TP), and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) from 0.1-fold to 10-fold in the liver, gut, and tumor using the physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic model

The control is tumor growth simulation with no therapy.

(*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2021, 46(2), 301-315; Fig. 5)

### 3-5. 考察

正常ラットにおいて capecitabine 反復投与により代謝酵素の活性が変化し、capecitabine 及びその代謝物の濃度が変化することが明らかになった。しかしながら、活性代謝物である 5-FU の血漿中濃度が抗腫瘍効果に与える影響については明らかでなかった。そこで本章では、有害事象発現後の capecitabine の最適な方法の確立を目指して、大腸癌モデルラットを用いた基礎的検討を行った。まず、capecitabine 反復投与後の capecitabine 及びその代謝物の血漿中濃度推移の変化について検討を行った。さらに、大腸癌モデルラットから摘出した肝臓と小腸から、capecitabine 反復投与による CES、CDA、TP の活性の変化についても検討を行った。その後、血漿中薬物濃度を推定するための PBPK model から、capecitabine 反復投与後の血漿中薬物濃度推移と大腸癌腫瘍体積の変化を定量的に関連付けて予測するため PBPK-PD model を構築した。

本章の研究より大腸癌モデルラットにおいては、capecitabine 反復投与後に 5'-DFUR の血漿中濃度は有意に増加した。しかしながら、正常ラットと異なり 5-FU の血漿中濃度推移はほとんど変化がなかった。5'-DFUR や 5'-DFUR は腫瘍組織中での代謝が知られており<sup>12</sup>、capecitabine の抗腫瘍効果による腫瘍組織の縮小の影響など、腫瘍組織での代謝について更なる検討が必要であると考えられる。また、5'-DFUR が capecitabine 反復投与によって血漿中濃度が増大した理由として、腫瘍細胞から血漿中への薬物の漏出が考えられた。すなわち、5-FU の抗腫瘍効果により腫瘍細胞死が引き起こされ腫瘍組織中の薬物が漏出した結果、他の代謝物より相対的に血漿中薬物濃度の低い 5'-DFUR において、Day 7 や Day 14 で Day 1 より大きく血漿中濃度が上昇したと考えられた。また、PBPK-PD model によって腫瘍体積の変化が推定可能であったことから、capecitabine 代謝酵素の活性を測定し、モデルに組み込むことで capecitabine の抗腫瘍効果を予測することが可能であると示唆された。

大腸癌患者において、capecitabine による手足症候群や下痢などの消化器症状により、減量や投与の延期が行われる場合がある<sup>5,28</sup>。しかしながら、減量や延期が行われる際の用法・用量は明確な基準が無く、経験的な判断に基づいて決定されていることが現状である。本研究では、capecitabine の減量や延期が行われた際の抗腫瘍効果の変化を PBPK-PD model に基づいたシミュレーションによって予測した。シミュレーションの結果から、標準的な用法である 2W1R において、capecitabine の投与量依存的な抗腫瘍効果の変化が認められた。さらに、500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  以上の capecitabine を投与した場合、投与開始後 21 日目において腫瘍体積の縮小が可能であることが示唆された。

また、500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  の capecitabine 投与では、投与延期を行った 2W2R の用法でも腫瘍体積の増大抑制効果が認められた。しかしながら、投与延期を行わない 2W1R の用法で capecitabine を 400  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  で投与した場合、腫瘍体積の増大は抑制できず、腫瘍が増大していく結果となり、腫瘍の増殖抑制には 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  以上の capecitabine 投与が必要であることが示された。2W2R で 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  で capecitabine 投与を行う方法では、標準的な用法である 2W1R で 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  投与する場合と比較して 75%の総投与量となる。一方で、2W1R で 400  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  の capecitabine 投与を行う場合、標準スケジュールと比較して 80%の総投与量となる。すなわち、

2W2R で 500  $\mu\text{mol/kg}$  の capecitabine 投与を行う方法では、2W1R で 400  $\mu\text{mol/kg}$  の capecitabine 投与を行う方法と比較して capecitabine の総投与量が少ないにもかかわらず、より優れた抗腫瘍効果を発揮する結果となった。これらのシミュレーションから、大腸癌の治療において capecitabine の延期や減量が必要な場合、1 回の投与量を減量するのではなく、次コースの投与延期を行うことが有効であることが示唆された。

さらに、PBPK-PD model により肝臓中の CDA や DPD の活性が 5-FU の腫瘍中濃度や抗腫瘍効果に大きな影響を与える可能性が示唆された。CDA の活性は他の代謝酵素と比較して低く、5'-DFUR の血漿中濃度も他の代謝物と比較して低いことから、capecitabine の活性化において 5'-DFUR から 5'-DFUR に変換される過程が律速過程であることが示唆された。一方で、本研究では反復投与後の DPD 活性の変化は検討しておらず、DPD 活性の変化についても今後検討が必要であることが示唆された。さらに、ヒトにおいて DPD の遺伝子多型が知られており、これらを考慮した臨床的検討が今後必要であると考えられる<sup>47</sup>。

本章の研究結果より、大腸癌モデルラットにおいて capecitabine 反復投与後に capecitabine の代謝物の血漿中濃度が変化し、血漿中濃度変化に代謝酵素の活性が関与していることが示唆された。さらに、PBPK-PD model によって代謝酵素の活性から capecitabine 投与後の抗腫瘍効果を定量的に予測することが可能であった。PBPK-PD model を用いたシミュレーションは、有害事象発現後の capecitabine の用法・用量を最適化し、大腸癌の治療効果向上に貢献できることが示唆された。



## 結論

XELIRI 療法の最適化を目的として、正常ラット、大腸癌モデルラットを用いた基礎実験を行い、さらに PBPK model を用いた数理的な解析を行った。

### 第 1 章 正常ラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と代謝酵素の関係

臨床で使用されている用法である capecitabine の 14 日間反復投与における血漿中濃度変化について検討を行った。Wistar 系雄性ラットに対して 180 mg/kg の capecitabine を 1 日 1 回、14 日間反復経口投与を行い Day 1、7、14 に投与開始 8 時間後まで採血を行った。Capecitabine は CES により 5'-DFCR に、続いて CDA により 5'-DFUR に、最終的に TP により 5-FU に変換されることから、これら 4 種類の薬物/代謝物の血漿中濃度を測定した。また、肝臓、小腸を採取し、3 種類の酵素の活性を測定した。その結果、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度推移は経日的に大きく変化することが明らかとなった。特に 5-FU の血漿中濃度は大きく低下しており、capecitabine の 14 日間反復投与は Day 1 における capecitabine と同等の抗腫瘍効果が期待できない可能性が示唆された。また、酵素活性に基づいて PBPK model を構築したところ実測値と推定値は近似しており、capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度推移の経日的な変化が CES、CDA、TP の活性の変動で説明できることが示唆された。すなわち、酵素活性の測定が血漿中濃度の予測に有用であり、代謝酵素の活性を考慮した投与計画の構築が有効であることが示唆された。

### 第 2 章 XELIRI 療法における capecitabine の至適投与量の推定

第 1 章で、正常ラットにおいて PBPK model の有用性が確認できたので、XELIRI 療法における capecitabine の至適投与量の推定を行った。Wistar 系雄性ラットを capecitabine 180 mg/kg 投与群、CPT-11 180 mg/m<sup>2</sup> 投与群、併用群に分け capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU、さらに CPT-11 と CPT-11 の活性代謝物である SN-38 の血漿中濃度推移を評価した。その結果、CPT-11 の併用により capecitabine の血漿中濃度は上昇したが、一方で 5'-DFCR、5'-DFUR、5-FU の血漿中濃度は低下することが明らかとなった。また、capecitabine の併用により CPT-11 の血漿中濃度は低下したものの、SN-38 の血漿中濃度には変化は認められなかった。CPT-11 は CES により活性化され、capecitabine と代謝酵素を共有していることから、肝臓を採取して *in vitro* で阻害実験を行った結果、capecitabine から 5'-DFCR への代謝は CPT-11 の濃度依存的に阻害されること、その阻害係数は 42.54 nM であること、が明らかとなった。PBPK model に組み入れてシミュレーションを行った結果、XELIRI 療法における capecitabine の投与量を約 1.7 倍に増量する必要があることが示唆された。

### 第 3 章 大腸癌モデルラットにおける capecitabine 反復経口投与後の血漿中濃度推移と抗腫瘍効果

有害事象発現後の capecitabine の最適な用法・用量について検討を行った。Wistar 系雄性ラ

ットを用いて、1,2-dimethylhydrazine の皮下投与と dextran sodium sulfate の経口摂取により大腸癌モデルを作製した。また、大腸癌の体積を測定し抗腫瘍効果の指標とした。その結果、正常ラットと同様に capecitabine、5'-DFCR、5'-DFUR の血漿中濃度推移は経日的に大きく変化することが明らかとなった。ただし、5-FU の変化はわずかであった。また、PBPK model に腫瘍部位と抗腫瘍効果にかかるモデルを組み入れ PBPK-PD model を構築することで、抗腫瘍効果を精度よく推定可能であった。PBPK-PD model を用いてシミュレーションを行った結果、有害事象発現後の治療強度減弱が必要な場合の用法・用量について、80%への減量と比較して、次回の XELIRI 療法までの休薬期間の 1 週間の延長が抗腫瘍効果に優れることが示された。

本研究では、XELIRI 療法の最適化を目指して、ラットを用いた基礎実験及び、PBPK model を用いた解析を行なった。その結果、1) より高い抗腫瘍効果を得るためには、XELIRI 療法における capecitabine の増量を行う必要性があること、2) 有害事象の発現等により XELIRI 療法の繰り返しが困難になった場合、次コース以降における capecitabine の減量よりも次コースまでの休薬期間の延期を行うことが抗腫瘍効果に優れること、を明らかにした。

本研究で構築した PBPK model は XELIRI 療法の最適化に有用であり、代謝酵素活性、血漿中濃度、抗腫瘍効果の定量的な予測が可能となり得ることから、大腸癌化学療法を施行される患者の治療成績向上に寄与するものであると考えられる。経口投与可能な XELIRI 療法を最適化することで大腸癌患者の QOL 向上も期待できる。これらの研究成果は、XELIRI 療法の最適化に向けた重要な基礎的情報であり、大腸癌治療に大きく貢献するものである。

## 謝辞

本研究の実施にあたり終始、御懇切なる御指導と御鞭撻賜りました、京都薬科大学 薬物動態学分野 柴田 敏之 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本論文の査読ならびに御指導賜りました、京都薬科大学 臨床薬学教育研究センター 矢野 義孝 教授ならびに臨床薬剤疫学分野 村木 優一 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行するにあたり、適切な御教示を賜りました京都薬科大学 薬物動態学分野 伊藤 由佳子 講師、河渕 真治 助教に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり多大なるご協力を頂きました、京都薬科大学 薬物動態学分野 員一同に感謝の意を表するとともに益々のご活躍を祈念いたします。

最後に、社会人大学院生としての日々の生活を理解し、終始支えてくれた家族に心より感謝いたします。

## 引用文献

1. Ducreux M, Malka D, Mendiboure J, Etienne PL, Texereau P, Auby D, Rougier P, Gasmi M, Castaing M, Abbas M, Michel P, Gargot D, Azzedine A, Lombard-Bohas C, Geoffroy P, Denis B, Pignon JP, Bedenne L, Bouché O. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2011**, 12(11), 1032-1044.
2. Guo Y, Xiong BH, Zhang T, Cheng Y, Ma L. XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis. *Cancer. Invest.* 2016, 34(2), 94-104.
3. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Saltz L. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26(12), 2006-2012.
4. Pilanci KN, Saglam S, Okyar A, Yucel S, Pala-Kara Z, Ordu C, Namal E, Ciftci R, Iner-Koksal U, Kaytan-Saglam E Chronomodulated oxaliplatin plus Capecitabine (XELOX) as a first line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: a Phase II Brunch regimen study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, 78(1), 143–150.
5. 大腸癌研究会 大腸癌治療ガイドライン医師用 2019 年版  
[http://www.jscocr.jp/guideline/2019/index\\_guide.html](http://www.jscocr.jp/guideline/2019/index_guide.html)
6. Meropol NJ. Oral fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer.* **1998**, 34(10), 1509–1513.
7. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25(30), 4779-4786.
8. Xu RH, Muro K, Morita S, Iwasa S, Han SW, Wang W, Kotaka M, Nakamura M, Ahn JB, Deng YH, Kato T, Cho SH, Ba Y, Matsuoka H, Lee KW, Zhang T, YamaDay, Sakamoto J, Park YS, Kim TW. Modified XELIRI (capecitabine plus irinotecan) versus FOLFIRI (leucovorin, fluorouracil, and irinotecan), both either with or without bevacizumab, as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (AXEPT): a multicentre, open-label, randomised, non-inferiority, phase 3 trial *Lancet Oncol.* **2018**, 19(5), 660-671.
9. Huang XZ, Chen Y, Chen WJ, Zhang X, Wu CC, Wang ZN, Wu J. Clinical evidence of prevention strategies for capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Int. J. Cancer.* **2018**, 142(12), 2567-2577.
10. Miwa M, Ura M, Nishisa M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectivity in tumors by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur. J. Cancer.* **1998**, 34(8), 1274-1281.
11. Shimma N, Umeda I, Arasaki M, Murasaki C, Masubuchi K, Kohchi Y, Miwa M, Ura M, Sawada

- N, Tahara H, Kuruma I, Horii I, Ishitsuka H. The design and synthesis of a new tumor-selective fluoropyrimidine carbamate, capecitabine. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8(7), 1697-1706.
12. Blesch KS, Gieschke R, Tsukamoto Y, Reigner BG, Burger HU, Steimer JL. Clinical pharmacokinetic modeling in new drug development: The capecitabine experience. *Invest. New Drugs.* **2003**, 21(2), 195-223.
  13. Tsukamoto Y, Kato Y, Ura M, Horii I, Ishitsuka H, Kusuhara H, Sugiyama Y. A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans: The mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharm. Res.* **2001**, 18(8), 1190-1202.
  14. Marshall FS, Burghaus R, Cosson V, Cheung AYS, Chenel M, DellaPasqua O, Frey N, Hamren B, Harnisch L, Ivanow F, Kerbusch T, Lippert J, Milligan AP, Rohou S, Staab A, Steimer LJ, Tornøe C, Visser GAS. Good Practices in Model-Informed Drug Discovery and Development: Practice, Application, and Documentation. *CPT. Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **2016**, 5(3), 93-122.
  15. Karas S, Etheridge AS, Tsakalozou E, Ramírez J, Cecchin E, van Schaik RHN, Toffoli G, Ratain MJ, Mathijssen RHJ, Forrest A, Bies RR, Innocenti F. Optimal Sampling Strategies for Irinotecan (CPT-11) and its Active Metabolite (SN-38) in Cancer Patients. *AAPS. J.* **2020**, 22(3), 59.
  16. Guddati AK, Joy PS, Marak CO. Dose adjustment of carboplatin in patients on hemodialysis. *Med. Oncol.* **2014**, 31(3), 848.
  17. Ferrer MG, Wojnicz A, Mejia G, Koller D, Zubiaur P, Santos FA. Utility of Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib in Chronic Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Ther.* **2019**, 41(12), 2558-2570.
  18. Shindoh H, Kawashima A, Shishido N, Nakano K, Kobayashi K, Horii I. Relationship between AUC of 5'-DFUR and toxicity of capecitabine, fluoropyrimidine carbamate analogs, and 5'-DFUR in monkeys, mice, and rats. *J. Toxicol. Sci.* **2006**, 31(3), 265-285.
  19. Kobuchi S, Yazaki Y, Ito Y, Sakaeda T. Circadian variations in the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites in rat. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, 112, 152-158.
  20. Shindoh H, Nakano K, Yoshida T, Ishigai M. Comparison of in vitro metabolic conversion of capecitabine to 5-FU in rats, mice, monkeys and humans--toxicological implications. *J. Toxicol. Sci.* **2011**, 36(4), 411-422.
  21. Quick DJ, Shuler ML. Use of in vitro data for construction of a physiologically based pharmacokinetic model for naphthalene in rats and mice to probe species differences. *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15(3), 540-555.
  22. Ikenaka K, Shirasaka T, Kitano S, Fujii S. Effect of uracil on metabolism of 5-fluorouracil in vitro. *Gan.* **1979**, 70(3), 353-359.
  23. Judson IR, Beale PJ, Trigo JM, Aherene W, Crompton T, Jones D, Bush E, Reigner B. A human capecitabine excretion balance and pharmacokinetic study after administration of a single oral dose of <sup>14</sup>C-labelled drug. *Invest. New Drugs.* **1999**, 17(1), 49-56.
  24. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* **1993**, 10(7), 1093-1095.

25. Iwatsubo T, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the in vivo metabolic clearance of YM796 by the liver from in vitro data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 283(2), 462–469.
26. Desmoulin F, Gilard V, Malet-Martino M, Martino R. Metabolism of capecitabine, an oral fluorouracil prodrug: <sup>19</sup>F NMR studies in animal models and human urine. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, 30(11), 1221–1229.
27. Bahar FG, Ohura K, Ogihara T, Imai T. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. *J. Pharm. Sci.* **2012**, 101(10), 3979-3988.
28. Cutsem EV, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegel WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J. Clin. Oncol.* **2001**, 19(21), 4097–4106.
29. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, Mezi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, Tonini G, Carlomagno C, Allegrini G, Chiara S, D'Amico M, Granetto C, Cazzaniga M, Boni L, Fontanini G, Falcone A. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol.* **2015**, 16(13), 1306- 1315.
30. Wu F, Krishna G, Surapaneni S. Physiologically based pharmacokinetic modeling to assess metabolic drug-drug interaction risks and inform the drug label for fedratinib. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 86(4), 461-473.
31. Noguchi C, Miyata H, Sato Y, Iwaki Y, Okuyama S. Evaluation of bone toxicity in various bones of aged rats. *J. Toxicol. Pathol.* **2011**, 24(1), 41-48.
32. Atasilp C, Chansriwong P, Sirachainan E, Reungwetwattana T, Puangpetch A, Prommas S, Sirilerttrakul S, Rerkarmnuaychoke B, Wongwaisayawan S, Sukasem C. Determination of irinotecan, SN-38 and SN-38 glucuronide using HPLC/MS/MS: Application in a clinical pharmacokinetic and personalized medicine in colorectal cancer patients. *J. Clin. Lab. Anal.* **2018**, 32(1), e22217.
33. Jiang L, Wang L, Zhang Z, Wang Z, Wang X, Wang S, Luan X, Xia Y, Liu Y. The pharmacokinetic interaction between irinotecan and sunitinib. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, 85(2), 443-448.
34. Fujita K, Masuo Y, Okumura H, Watanabe Y, Suzuki H, Sunakawa Y, Shimada K, Kawara K, Akiyama Y, Kitamura M, Kunishima M, Sasaki Y, Kato Y. Increased Plasma Concentrations of Unbound SN-38, the Active Metabolite of Irinotecan, in Cancer Patients with Severe Renal Failure. *Pharm. Res.* **2016**, 33(2), 269-282.
35. Asami S, Kiga D, Konagaya A. Constraint-based perturbation analysis with cluster Newton method: a case study of personalized parameter estimations with irinotecan whole-body

- physiologically based pharmacokinetic model. *BMC Syst. Biol.* **2017**, 11(7), 129.
36. Ahn BJ, Choi MK, Park YS, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, Ko JW, Yim DS. Population pharmacokinetics of CPT-11 (irinotecan) in gastric cancer patients with peritoneal seeding after its intraperitoneal administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2010**, 66(12), 1235-1245.
  37. Sung JH, Dhiman A, Shuler ML. A combined pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model for tumor growth in the rat with UFT administration. *J. Pharm. Sci.* **2009**, 98(5), 1885-1904.
  38. Iwase M, Fujita KI, Nishimura Y, Seba N, Masuo Y, Ishida H, Kato Y, Kiuchi Y. Pazopanib interacts with irinotecan by inhibiting UGT1A1-mediated glucuronidation, but not OATP1B1-mediated hepatic uptake, of an active metabolite SN-38. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2019**, 83(5), 993-998.
  39. Rivory LP, Bowles MR, Robert J, Pond SM. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52(7), 1103-1111.
  40. Zhang XX, Cao YF, Wang LX, Yuan XL, Fang ZZ. Inhibitory effects of tanshinones towards the catalytic activity of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). *Pharm. Biol.* **2017**, 55(1), 1703-1709.
  41. Schuller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, 45(4), 291-297.
  42. Onose J, Imai T, Hasumura M, Ueda M, Hirose M. Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment. *Cancer Lett.* **2003**, 198(2), 145-152.
  43. Simeoni M, Magni P, Cammia C, De Nicolao G, Croci V, Pesenti E, Germani M, Poggesi I, Rocchetti M. Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res.* **2004**, 64(3), 1094-1101.
  44. Ito Y, Kobuchi S, Takesada W, Takahashi C. Assessment of oxaliplatin-induced chronic neuropathy and anticancer efficacy through pharmacokinetic and toxicodynamic evaluation of a rat model of colorectal cancer. *Anticancer Res.* **2019**, 39(8), 4207-4213.
  45. Hyodo I, Shirao K, Doi T, Hatake K, Arai Y, Yamaguchi K, Tamura T, Takemiya S, Takiuchi H, Nakagawa K, Mishima H. A phase II Study of the global dose and schedule of capecitabine in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2006**, 36(7), 410-417.
  46. Kobuchi S, Ito Y, Imoto K, Kuwano S, Takada K. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of 5-fluorouracil by using a biomarker to predict tumor growth in a rat model of colorectal cancer. *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102(6), 2056-2067.
  47. Hishinuma E, Narita Y, Saito S, Maekawa M, Akai F, Nakanishi Y, Yasuda J, Nagasaki M, Yamamoto M, Yamaguchi H, Mano N, Hirasawa N, Hiratsuka M. Functional characterization of allelic variants of dihydropyrimidine dehydrogenase identified in 1,070 Japanese individuals. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, 46(8), 1083-1090.