

博士論文

門脈カニューレラットを用いた
消化管吸収性評価法の構築に関する研究

2015年

科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部

松田 良樹

略号

ABT : 1-aminobenzotriazole
AGP : acid glycoprotein
ANT : antipyrine
BA : bioavailability
BCRP : breast cancer resistance protein
BUS : buspirone
CYP : cytochrome P450
D-FEL : dehydrofelodipine
FEX : fexofenadine
FEL : felodipine
MDZ : midazolam
OATP : organic anion transporting polypeptide
6-OH-BUS : 6-hydroxybuspirone
1-OH-MDZ : 1-hydroxy-midazolam
4-OH-MDZ : 4-hydroxy-midazolam
P-gp : P-glycoprotein
RLX : raloxifene
R4'G : raloxifene-4'-glucuronide
R6G : raloxifene-6-glucuronide
SASP : sulfasalazine
TPT : topotecan
UGT : UDP-glucuronosyltransferase
ZSQ : zosuquidar

AUC : 血中濃度-時間曲線下面積 (ng·h/mL)

CL_{tot} : 全身クリアランス (mL/min/kg)

D : 投与量 (mg/kg)

k_a : 吸収速度定数 (/min)

k_e : 消失速度定数 (/min)

Q_h : 肝血流量 (mL/min/kg wt)

Q_{pv} : 門脈血流量 (mL/min/kg wt)

t_{1/2} : 生物学的半減期 (h)

Vd_{ss} : 分布容積 (L/kg)

目次

| | |
|--|----|
| 総論の部 | 1 |
| 緒言 | 2 |
| 第1章 門脈カニューレラットを用いた消化管吸収率評価法の構築 | 5 |
| 1.1 新規術式による門脈カニューレラットの作成 | 6 |
| 1.1.1 生化学パラメーターの変動 | 6 |
| 1.1.2 肝機能の評価 | 8 |
| 1.2 薬物の消化管吸収率評価法の構築及び検証 | 10 |
| 1.2.1 理論：従来法（iv/po法）との比較 | 10 |
| 1.2.2 門脈血流量の算出 | 12 |
| 1.2.3 各種市販薬物を用いた消化管吸収率の評価 | 14 |
| 1.2.4 PBPKモデル解析を用いた血漿中濃度推移に関する考察 | 17 |
| 1.3 考察 | 19 |
| 第2章 消化管吸収率に対する消化管トランスポーター及び消化管代謝の寄与率評価 | 21 |
| 2.1 消化管トランスポーターの寄与率評価 | 21 |
| 2.1.1 阻害剤経口投与による消化管トランスポーター阻害の検証 | 22 |
| 2.1.2 選択的阻害剤の前処理用量の検討 | 24 |
| 2.1.3 モデル薬物の吸収における消化管トランスポーターの寄与率評価 | 27 |
| 2.2 消化管代謝の寄与率評価 | 33 |
| 2.2.1 消化管CYP代謝の寄与率評価法の検討: Enzyme-inhibition method | 34 |
| 2.2.2 消化管UGT代謝の寄与率評価法の検討: Metabolite-distribution method | 41 |
| 2.3 考察 | 48 |
| 結論 | 51 |
| 謝辞 | 53 |
| 実験の部 | 54 |
| 第1章 実験の部 | 55 |
| 第2章 実験の部 | 60 |
| 引用文献 | 65 |

総論の部

緒言

製薬会社における新規医薬品の探索過程では、ターゲット分子に対する高い親和性及び選択性を有する化合物が求められるため、結果的に大きな分子量を有する疎水性の高い化合物が多く選択されることになる。しかしながら、こうした化合物では、溶解性及び膜透過性などの問題で経口投与によって十分な体内暴露を得られないことが多く、患者にとって最も利便性の高い経口投与剤としての開発は困難となる。さらに、経口投与後の体内暴露が上がらない一因として、疎水性の高い化合物は、生体の防御機構として働く薬物代謝酵素や排泄型トランスポーターの基質として認識されやすくなることも考えられる。実際、1991年に製薬会社が実施した臨床試験で開発を中止した理由として、経口投与後の体内暴露が上がらないことが約40%を占めていた[1]。このような問題に対して、1990年代半ばから2000年代初頭にかけて製薬会社を中心として、*in vitro* 動態スクリーニングが導入された。*In vitro* 動態スクリーニングでは、経口投与後の化合物の体内挙動を素過程に分割し、*in vitro* において再現することで化合物の溶解性、膜透過性及び代謝安定性を評価することができる。その結果、体内暴露の問題によって医薬品開発が中止される頻度は明らかに減少した。しかしながら、良好な *in vitro* 動態プロファイルを有する化合物において、実験動物等を用いた *in vivo* 試験では十分な暴露が得られないというケースも多く、*in vitro* スクリーニングのみですべての問題を解決することは難しいのが現状である。

製薬会社における経口剤開発の早期段階では、*in vitro* での一次スクリーニングにおいて良好な物性、動態プロファイルを有する化合物が選別され、二次スクリーニングとして、ラット等の小動物に経口投与した際の体内暴露が評価される。このとき、もし *in vivo* における体内暴露が *in vitro* からの予想に比べて有意に低くなった場合には、その要因を明らかにするとともに、ヒトにおける最大暴露量をできるだけ正確に予測することが求められる。例えば、薬物によっては非臨床動物とヒトの薬物代謝能に大きな違いが報告されており[2-4]、こうした種差を考慮した上でヒトにおける十分な体内暴露を担保できなければ、以降の開発を継続することは難しい。さらに、*in vivo* において体内暴露が低くなった要因が明らかにされなければ、その回避策を合成展開へとフィードバックすることができないため、プロジェクト自体の遅延あるいは中止にも繋がる。

Figure 1 に示すように、経口投与された薬物は、消化管内で溶解したのち、脂質二重膜で構成される消化管上皮細胞膜を透過して細胞内へと取り込まれる。その後、消化管の上皮細胞において、薬物代謝酵素による代謝や消化管排泄型トランスポーターによる管腔側への汲み出しを受け、それらを免れた薬物が門脈を経て肝臓へと流入する。さらに肝臓では、多種多様な薬物代謝酵素による代謝や胆汁排泄を受け、肝臓での抽出を免れた薬物のみが最終的に全身循環血へと到達する。通常、これら消化管吸収の各プロセスは、Fa（消化管内から消化管組織への移行率）、Fg（消化管組織から門脈への移行率）及びFh（門脈から全身循環系への移行率）の3つのパラメーターによって定量的に評価される。また、経口投与された薬物の最終的な生物学的利用率（bioavailability, BA）は、それらパラメーターの積として表される。したがって、経口投与後に十分な体内暴露が得られな

った場合、いずれの過程に問題があったかを明らかにすることができれば、ヒトへの外挿性やその後の合成展開を考える上で有用な情報となる。

近年、遊離肝細胞の調製技術や保存技術が進歩し、肝細胞を用いた代謝安定性スクリーニングが創薬の初期段階より導入されている。肝細胞を用いることにより、取込みトランスポーターと受動拡散による肝取込みクリアランス[5, 6]、酸化、還元、抱合反応を加味した肝代謝クリアランス[7, 8]、排泄トランスポーターと受動拡散による胆汁排泄クリアランスの評価が可能となり[9, 10]、*in vitro* 試験の結果より精度よく F_h を推測することができるようになった。しかしながら、*in vitro* 試験の結果から、消化管吸収率 ($F_a \cdot F_g$) を精度よく評価できる方法は十分には確立されていない。Amidon らは、薬物の溶解性と膜透過性を基に、薬物を4つのクラスに分類した Biopharmaceutics Classification System (BCS) を提唱することで、薬物の *in vivo* における消化管吸収性を特徴付けた[11]。しかし、BCS では膜透過メカニズムが受動拡散に限定されているため、P 糖タンパク (P-gp) などの排泄型トランスポーターの寄与がある薬物の場合は適用できない。そこで、吸収過程に影響を及ぼす複数の因子を組み合わせる *in vitro* で消化管吸収性を評価する方法が報告されてきた。Kataoka らは、経口投与された化合物が崩壊し溶解した後、消化管上皮細胞を透過する過程を再現するために、Caco-2 単層膜を装着した side-by-side 型の chamber システム (dissolution/permeation システム) を用いた F_a の評価法を考案した[12, 13]。Nishimuta らは、単純拡散のモデルとして parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA) による膜透過クリアランスと小腸マイクロソーム画分による代謝クリアランスを用いた $F_a \cdot F_g$ の評価法を考案した[14, 15]。しかし、いずれの評価法にも素過程を組み合わせることによるメリットはあるものの、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現レベル、あるいは消化管内での薬物濃度に関して *in vivo* での吸収を再現することは難しく、定量的な評価までには至っていない。

一方、薬物間相互作用の観点から、薬物の吸収過程における消化管トランスポーターや薬物代謝酵素の寄与を定量的に評価する必要性が高まっている。経口投与後の消化管内での薬物濃度は非常に高くなるため、消化管トランスポーターあるいは代謝酵素の寄与が大きい薬物は、併用薬との間で薬物間相互作用を引き起こす可能性が高い。例として、グレープフルーツジュースに含まれる成分は、消化管で高濃度に暴露されることにより消化管の薬物代謝酵素を阻害し、nifedipine や nisoldipine といった薬物代謝酵素の基質薬物の体内暴露を増加させることが知られている[16, 17]。また、米国の Food and Drug Administration (FDA) より提示された薬物間相互作用ガイドラインでは、消化管排泄型トランスポーターとして P-glycoprotein (P-gp) 及び breast cancer resistance protein (Bcrp) に関する評価の必要性が明記されている。

従来、*in vivo* において化合物の $F_a \cdot F_g$ を評価する場合、ラットやマウスなどの小動物を用い、化合物を経口及び静脈内投与し、得られたパラメーターより間接的に算出する方法が用いられてきた (iv/po 法) [18]。しかし、この iv/po 法では、算出される $F_a \cdot F_g$ が血流量の変化に影響を受け易く、また肝外クリアランスの評価が必要であることから、得られた結果は大きな誤差を含む可能性がある。特に、肝外クリアランスの評価は創薬の初期段階では無視されることも多く、 $F_a \cdot F_g$ を正確に求めることは困難である。さらに、通常、静注および経口投与のデータは別の個体から得ることか

ら、多くの動物が必要となる。したがって、簡便かつ正確に $F_a \cdot F_g$ を評価できる手法の構築は動物愛護の観点からも重要な課題である。

Hoffman らは、ラットに薬物を経口投与した後の門脈及び全身血漿中濃度を経時的にモニターすることにより、各時間毎に消化管より吸収された薬物量を算出し、薬物の $F_a \cdot F_g$ を評価する方法を報告した[19]。この方法では、肝外クリアランスの評価が不要であり、経口投与のみのデータから $F_a \cdot F_g$ を評価することができる。そこで本研究では日本チャールス・リバー（株）と共同開発により、門脈血の長時間安定な採血を可能とする新規術式を用いて門脈カニューレラットを作製し、*in vivo* における種々薬物の消化管吸収性の評価を行った。第1章では、門脈カニューレラットの各種生理学的パラメーターを無処置のラットと比較することで、体内動態評価に及ぼす手術の影響について検証した。また、特徴的な体内動態を有するモデル薬物を門脈カニューレラットに経口投与し、 $F_a \cdot F_g$ を算出することで評価の妥当性及びそのメリットに関する考察を行った。第2章では、門脈カニューレラットを用いて、薬物の吸収過程における消化管の排泄型トランスポーターによる輸送及び消化管代謝の寄与率を評価できる手法を構築した。以下、得られた結果を2章にわたり論述する。

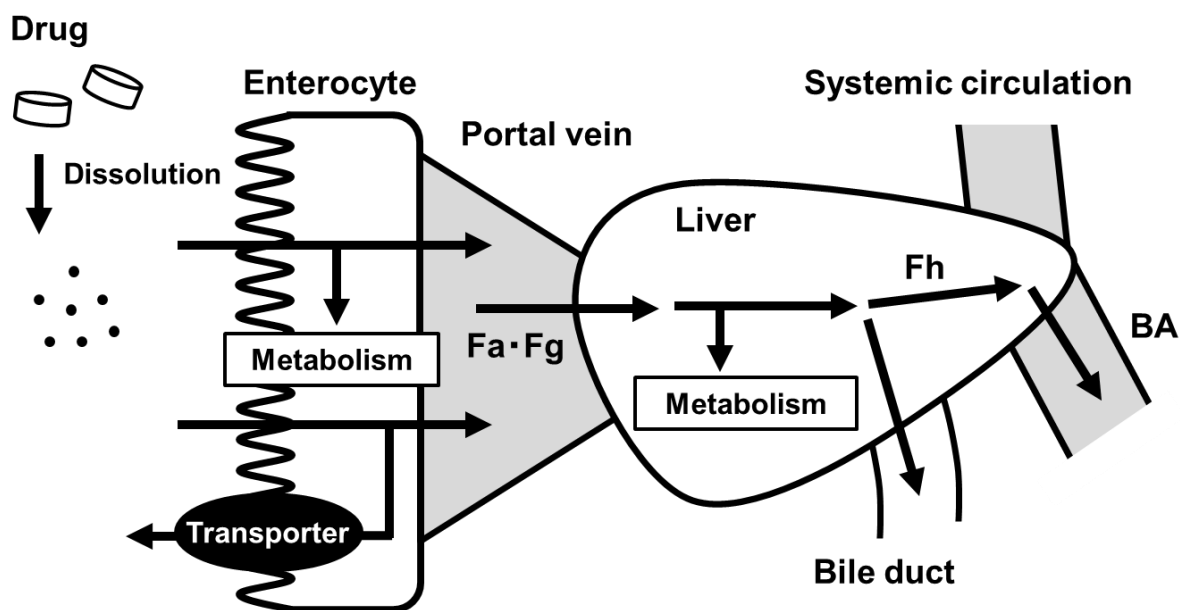


Figure 1. Schematic diagram of the first-pass effect in intestine and liver after oral administration with drug.

第1章 門脈カニューレラットを用いた消化管吸収率評価法の構築

門脈からの採血方法には、麻酔下で1匹ずつ開腹し採血する方法と門脈カニューレラットを用いる方法がある。前者は、目視により門脈から直接採血することができるが、同一個体からの経時的な採血は不可能であるためバラツキが大きくなり易い。Kosaka らや Furukawa らは、この採血方法による市販薬物の Fa・Fg の評価を報告しているが[20, 21]、この採血方法では多数のラット及び大量の薬物を使用することになるため、創薬の初期段階での適用は現実的ではない。一方、後者では、同一個体より経時的な採血が可能であるが、従来の術式では、門脈近辺の血管より門脈に向けてカテーテルが血管内を走行するため、血流変動やカテーテル内での血栓形成による採血不良が問題であった。そこで、本研究では日本チャールス・リバー（株）と共同開発により、新規術式による門脈カニューレラットを作製した。

新規術式では、肝臓直下の門脈に対してカテーテルの先端のみを垂直に挿入するため、血管の結紮やカテーテルの血管内走行を回避することができる。さらにカテーテルの先端を、ラップ状にすることによって血栓形成による採血不良及びカテーテルの血管からの脱落を回避できるように工夫を加えた (Figure 2)。この門脈カニューレラットを使用することにより、薬物経口投与後、無麻酔下及び無拘束の条件下において、経時的に全身血と門脈血の同時採血が可能となった。しかし、新規術式ではカテーテルを挿入する際に約 40 秒程度、門脈血流を遮断する必要があるため、生体への影響が懸念された。Murakami らは、旧術式による生体への影響に関して、門脈にカニューレーションすることにより、無処置のラットと比較して、血漿中グルコース濃度、アルブミン濃度及び血液中の血小板数が有意に減少したことを報告している[22]。

本章では、門脈カニューレラットの各種パラメーター（体重推移、血液生化学パラメーター、血液学的検査、肝血流量及び肝代謝能）を無処置のラットと比較することで、体内動態評価に及ぼす手術の影響について検証した。次に、特徴的な体内動態を有する種々のモデル薬物を門脈カニューレラットに経口投与し、Fa・Fg を算出することで、その評価の妥当性について検証を行った。

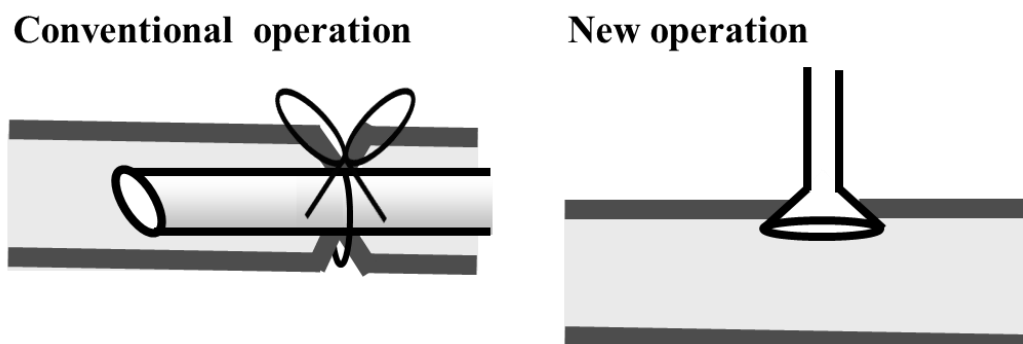


Figure 2. Schematic diagram of the conventional operation and new operation.

1.1 新規術式による門脈カニューレラットの作成

1.1.1 生化学パラメーターの変動

本研究で使用した門脈カニューレラットは、日本チャールス・リバー(株)において、新規術式による門脈カニューレション手術が施され、術後2日目に出荷され、術後3日目に科研製薬株式会社に入荷し飼育した。術後2日間における体重増加率は、門脈カニューレラットでは $1.8 \pm 2.5\%$ (以下、平均値 \pm 標準偏差として示す)であったのに対して、無処置のラットでは $8.9 \pm 1.5\%$ であり、手術による体重増加の抑制が認められた。術後3日目における体重の減少は、輸送のストレスが原因と考えられる。入荷以降、術後16日目までは、門脈カニューレラットの体重増加率は無処置のラットと同程度であった (Figure 3)。

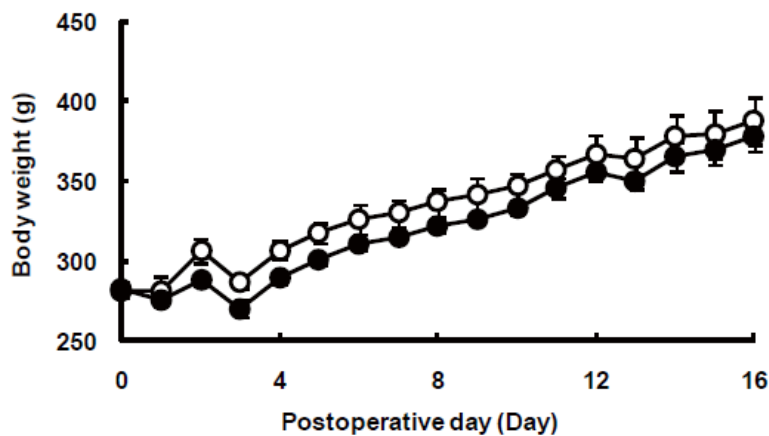


Figure 3. Effects of the surgical procedure on body weight in cannulated and untreated rats.

●, cannulated rats; ○, untreated rats. The rats were shipped to our lab on 2 days after the operation and arrived next day. Each symbol represents mean \pm S.D. for 4 rats.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Fig. 1

Table 1 に術後1日目と9日目に測定した門脈カニューレラットの血液生化学パラメーターを、それぞれ無処置ラットと比較した結果を示した。各パラメーターのうち、術後1日目の門脈カニューレラットの血漿中 α 1-AGP濃度 ($136.5 \pm 13.0 \mu\text{g/mL}$) のみに、無処置のラット ($45.7 \pm 4.8 \mu\text{g/mL}$) と比較して有意な増加が認められた。血漿中 α 1-AGP濃度の増加は、頸静脈にカニューレション手術を施したラットにおいても報告されており[23, 24]、lidocaine や propranolol のような塩基性薬物の血漿中タンパク結合率を増加させ、体内動態を変化させることが知られている。しかし、Yasuharaらの報告によると、手術による α 1-AGP産生の増加は一過性であり、開腹手術をした場合、血漿中 α 1-AGP濃度は術後2日目が最も高く、術後7日目において回復が認められている[24]。今回作成した門脈カニューレラットにおいても、彼らの報告と同様に、術後9日目の血漿中 α 1-AGP濃度は低下しており、それ以外のパラメーターも含めて、術後9日目には無処置のラットと比較して血液生化学パラメーターに有意な差は認められなかった。

Bachir-Cherif らは、ラットに対してカニューレーション手術を施すことで、肝臓における CYP 代謝の活性が低下することを報告している[25]。Murakami らも、従来の術式で門脈へカニューレーションを施した場合、術部への凝固因子の遊走により術後 3 日目の血小板数が有意に減少したことを報告しており[22]、手術の影響を避けるためにも十分な回復期間の設定が必要であると考えられた。そこで次に、術後 9 日目の門脈カニューレラットの肝ミクロソーム画分を調製し、*in vitro* における代謝活性および肝臓の総重量を無処置のラットと比較したところ、各種 CYP 基質に対する代謝活性に差は認められなかった (Table 2)。またこの時、血小板数を含む血液学的検査値についても、門脈カニューレラットに有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、門脈カニューレラットを用いて薬物の体内動態を評価するためには、術後 9 日間以上の回復期間を設定することが妥当であると考えられた。従来の術式では、長期の回復期間を設けることにより、ラットが成長し採血部位が肝臓直下の門脈から離れてしまう可能性や採血不良が生じる可能性が指摘されていた。しかしながら、新規術式では血管を結紮しないため、カテーテルの血管内走行は起こらず、門脈血の長期安定な採血が可能である。よって、以下の検討では、術後 9 日間の回復期間を設けた門脈カニューレラットを使用することとした。

Table 1. Blood biochemical tests and α 1-acid glycoprotein (AGP) levels in plasma of cannulated and untreated rats on 1 and 9 days after surgery.

| | | 1 day after the operation | | 9 days after the operation | |
|----------------|------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------|
| | | Untreated rats | Cannulated rats | Untreated rats | Cannulated rats |
| AST | U/L | 76 \pm 14 | 89 \pm 13 | 91 \pm 11 | 99 \pm 2 |
| ALT | U/L | 30 \pm 5 | 38 \pm 6 | 26 \pm 3 | 30 \pm 3 |
| TP | g/dL | 5.5 \pm 0.1 | 5.2 \pm 0.2 | 5.7 \pm 0.6 | 5.8 \pm 0.3 |
| TBIL | mg/dL | 0.1 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.1 |
| ALB | g/dL | 4.1 \pm 0.3 | 3.7 \pm 0.2 | 4.1 \pm 0.2 | 4.0 \pm 0.2 |
| TCHO | mg/dL | 86 \pm 7 | 92 \pm 13 | 54 \pm 6 | 56 \pm 13 |
| TG | mg/dL | 54 \pm 14 | 61 \pm 9 | 60 \pm 6 | 51 \pm 9 |
| GLU | mg/dL | 101 \pm 8 | 129 \pm 15 | 112 \pm 13 | 108 \pm 19 |
| α 1-AGP | μ g/mL | 45.7 \pm 4.8 | 136.5* \pm 13.0 | 54.6 \pm 7.2 | 66.3 \pm 17.0 |

Values represent mean \pm S.D. for 4 rats.

AST, aspartate aminotransferase activity; ALT, alanine aminotransferase activity; TP, total protein concentration; TBIL, total bilirubin concentration; ALB, albumin concentration; TCHO, total cholesterol concentration; TG, triglyceride concentration; GLU, glucose concentration; α 1-AGP; α 1-acid glycoprotein concentration. *, $p < 0.01$, significantly different from the untreated rats by student's t-test.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Table 1

Table 2. Hematological test, hepatic metabolic activity and liver weight in cannulated and untreated rats 9 days after surgery.

| | | Untreated rats | Cannulated rats |
|--------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| RBC | $\times 10^4/\mu\text{L}$ | 689 \pm 15 | 682 \pm 37 |
| WBC | $\times 10^2/\mu\text{L}$ | 70.8 \pm 16.3 | 78.3 \pm 25.2 |
| HCT | % | 43.5 \pm 0.8 | 43.6 \pm 2.2 |
| PLT | $\times 10^4/\mu\text{L}$ | 110 \pm 6 | 122 \pm 11 |
| 1-hydroxylation of midazolam | pmol/mg/min | 106 \pm 30 | 130 \pm 20 |
| 4-hydroxylation of tolbutamide | pmol/mg/min | 10.4 \pm 2.9 | 7.6 \pm 2.5 |
| 4-hydroxylation of mephentyoin | pmol/mg/min | 0.8 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.2 |
| Liver weight | g liver/kg | 28.1 \pm 0.9 | 28.4 \pm 1.6 |

RBC, red blood cells; WBC, white blood cells; HCT, hematocrit; PLT, platelets.

Values represent mean \pm S.D. for 4 rats.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Table 2

1.1.2 肝機能の評価

門脈カニューレラットでは、血液が肝臓へ流入する部分にカテーテルが挿入されているため、肝血流量及び肝代謝能への影響が懸念される。しかし、無麻酔下においてラットの肝血流量を正確に測定することは技術的に困難であるため、薬物 (lidocaine 及び antipyrine) を静脈内投与した際の全身クリアランス (CL_{tot}) より、間接的に肝血流量及び肝代謝能を評価した。なお、 CL_{tot} は eq. (1) で表すことができる。

$$CL_{tot} = \frac{Q_h \times f_b CL_{int}}{Q_h + f_b CL_{int}} \quad \text{eq. (1)}$$

ここで、 Q_h 、 f_b 及び CL_{int} は、それぞれ肝血流量、血液中タンパク非結合率及び肝固有クリアランスを示す。Lidocaine は肝臓での代謝が非常に速く ($Q_h \ll f_b CL_{int}$)、体内消失が肝血流量依存型であり、 CL_{tot} は肝血流量に相当する[26]。一方、antipyrine は肝臓での代謝が遅く ($Q_h \gg f_b CL_{int}$)、体内消失が肝代謝能依存型であり、 CL_{tot} は肝代謝能を反映する[27]。両薬物とも、門脈カニューレラットに静脈内投与した後の血漿中濃度推移は、無処置のラットの血漿中濃度推移と一致した (Figure 4)。この時、Lidocaine の CL_{tot} は、門脈カニューレラット及び無処置ラットにおいて、それぞれ 67.5 ± 7.9 及び 69.3 ± 1.1 mL/min/kg であり、肝血流量に関する過去の報告とも概ね一致する値が得られた。一方、antipyrine の門脈カニューレラット及び無処置のラットにおける CL_{tot} は、それぞれ 4.4 ± 0.1 及

び 4.9 ± 1.2 mL/min/kg であり、有意な差は認められなかった (Table 3)。以上の結果より、新規術式による門脈カニューレション手術が、肝血流量及び肝代謝能に与える影響は無視できるものと考えられた。

Chindavijak らは、ラットの頸静脈にカニューレションすることにより、術後 2 日後において $\alpha 1$ -AGP が増加した結果、塩基性薬物である propranolol を経口投与した場合、AUC は約 4 倍増加することを報告した[27]。本研究で使用した lidocaine も塩基性薬物であるが、無処置ラットと比較して体内動態に変化は認められなかった。したがって、術後に増加した $\alpha 1$ -AGP は、前項の結果と同様に、術後 9 日目では正常レベルに回復していると考えられた。

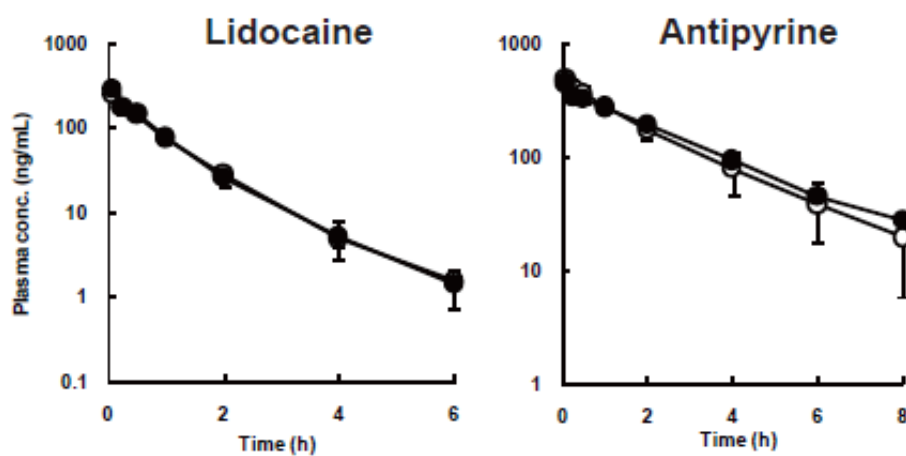


Figure 4. Systemic plasma concentration-time profile in cannulated and untreated rats.

Left figure, lidocaine intravenous administration (1 mg/mL/kg); Right figure, antipyrine intravenous administration (0.3 mg/mL/kg). ●, cannulated rats; ○, untreated rats.

Each symbol represents mean \pm S.D. for 3 rats.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Fig. 2

Table 3. Pharmacokinetic parameters after administration of lidocaine and antipyrine in cannulated and untreated rats.

| | | Lidocaine | | Antipyrine | |
|----------------------------|-----------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | Untreated rats | Cannulated rats | Untreated rats | Cannulated rats |
| Intravenous administration | | | | | |
| AUC | ng·h/mL | 240 ± 4 | 249 ± 28 | 1068 ± 236 | 1144 ± 36 |
| T _{1/2} | h | 0.9 ± 0.0 | 0.9 ± 0.1 | 1.9 ± 0.4 | 2.3 ± 0.2 |
| CL _{tot} | mL/min/kg | 69.3 ± 1.1 | 67.5 ± 7.9 | 4.9 ± 1.2 | 4.4 ± 0.1 |
| Vd _{ss} | L/kg | 4.2 ± 0.4 | 3.8 ± 0.6 | 0.7 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 |
| Oral administration | | | | | |
| Q _{pv} | mL/min/kg | NT | NT | NC | 32.9 ± 3.1 |
| F | mL/min/kg | NT | NT | 0.89 ± 0.20 | 0.76 ± 0.05 |

Values represent mean ± S.D. for 3 rats. NT, Not tested; NC, Not calculated.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Table 3

1.2 薬物の消化管吸収率評価法の構築及び検証

1.2.1 理論：従来法（iv/po 法）との比較

薬物の経口投与後の生物学的利用率（bioavailability, BA）は、Fa（消化管内から消化管組織への移行率）、Fg（消化管組織から門脈への移行率）及び Fh（門脈から全身循環系への移行率）の積として、**eq. (2)** によって表わされる。

$$BA = Fa \cdot Fg \cdot Fh \quad \text{eq. (2)}$$

従来、*in vivo* における薬物の消化管からの吸収率（Fa・Fg）を評価する場合、無処置のラットに被験薬物を経口及び静脈内投与し、得られたパラメーターを用いて **eq. (3)** 及び **(4)** から BA 及び Fh を算出し、それらを **eq. (2)** に代入して Fa・Fg を平均値として算出する方法（iv/po 法）が用いられてきた。

$$BA = \frac{AUC_{po} \times D_{iv}}{AUC_{iv} \times D_{po}} \quad \text{eq. (3)}$$

$$Fh = 1 - \frac{CL_{tot} - CL_{NH}}{Q_h} \quad \text{eq. (4)}$$

ここで、AUC_{po}、AUC_{iv}、D_{po}、D_{iv}、CL_{tot}、CL_{NH} 及び Q_h は、経口投与時の全身血漿中濃度 AUC、静脈内投与時の全身血漿中濃度 AUC、経口投与時の投与量、静脈内投与時の投与量、全身クリアラ

ンス、肝外クリアランス及び肝血流量を示す。これらの式より F_h を算出するためには、 CL_{NH} を別試験より算出する必要があるが、創薬初期の段階では肝外クリアランスは測定されないことが多く、その場合には $F_a \cdot F_g$ を過小評価する可能性がある。

一方、門脈カニューレラットを用いた評価（門脈カニューレ法）では、Figure 5 に示すように、門脈血中に存在する薬物量 (M_{pv}) は消化管より吸収された薬物量 (M_a) と全身循環血より流入した薬物量 (M_{sys}) の和であり、eq. (5) が成り立つ。

$$M_{pv} = M_a + M_{sys} \quad \text{eq. (5)}$$

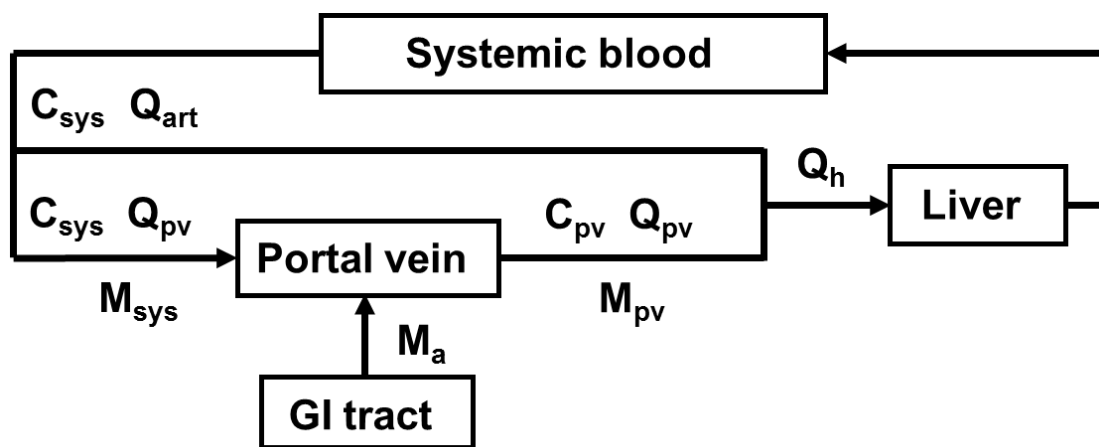


Figure 5. Schematic diagram of pharmacokinetic model in the cannulated rats.

M_{pv} , mass of drug measured in portal blood; M_{sys} , mass of drug measured in systemic circulation; M_a , mass of drug absorbed from GI tract. Q_a , Q_{pv} and $Q_h (= Q_a + Q_{pv})$ were blood flow rates at the hepatic artery, portal vein and hepatic vein. C_{pv} and C_{sys} were plasma concentrations at portal and systemic circulation.

Figure 5 において、 M_{pv} 及び M_{sys} はそれぞれ eq. (6) 及び (7) として表わすことができる。

$$M_{pv} = Q_{pv} \times R_b \times AUC_{pv} \quad \text{eq. (6)}$$

$$M_{sys} = Q_{pv} \times R_b \times AUC_{sys} \quad \text{eq. (7)}$$

ここで、 Q_{pv} 、 R_b 、 AUC_{pv} 及び AUC_{sys} は、門脈血流量、血液血漿濃度比、門脈血漿中濃度 AUC 及び全身血漿中濃度 AUC を示す。したがって、 M_a は eq. (8) として表わすことができる。

$$M_a = M_{pv} - M_{sys} = Q_{pv} \times R_b \times (AUC_{pv} - AUC_{sys}) \quad \text{eq. (8)}$$

最終的に、門脈カニューレラットを用いた場合には、**eq. (9)**より $F_a \cdot F_g$ を算出することが可能である。

$$F_a \cdot F_g = \frac{M_a}{D_{po}} = \frac{Q_{pv} \times R_b \times (AUC_{pv} - AUC_{sys})}{D_{po}} \quad \text{eq. (9)}$$

1.2.2 門脈血流量の算出

Iv/po 法及び門脈カニューレ法の両方法において、 $F_a \cdot F_g$ を算出するためには、ラットの Q_h あるいは Q_{pv} 値が必要となる。しかしながら、無麻酔下で直接的にこれらの血流量を測定することは困難である。Iv/po 法では、 Q_h として文献値を引用することが多いが、複数の異なる値が報告されている[28-30]。また、Table 4 に示すように、 Q_h を超音波トランジットタイム式血流測定機により麻酔下で実測した結果、個体間で約 2 倍のばらつきが認められた。そこで、 Q_h あるいは Q_{pv} の血流量を 1.3 倍変化させた場合に iv/po 法と門脈カニューレ法で算出される $F_a \cdot F_g$ がどの程度変動するかをシミュレートした (Figure 6)。モデル薬物として felodipine を用いた場合、iv/po 法では Q_h の 1.3 倍の変化により $F_a \cdot F_g$ が 2.7 倍変化するのに対し、門脈カニューレ法では $F_a \cdot F_g$ の変化は 1.3 倍のみであった。本結果より、門脈カニューレ法では、iv/po 法と比較して算出される $F_a \cdot F_g$ が血流量の変動に影響を受けにくいことが明らかとなった。

門脈カニューレ法に用いる門脈血流量値として、 $F_a \cdot F_g$ が 1 と見なすことができる antipyrine を門脈カニューレラットに経口投与し[31]、**eq. (9)**から Q_{pv} を算出した。Figure 7 に示したように、antipyrine を経口投与した際の門脈血漿中濃度は投与後 3 分で最大値を示し、門脈及び全身血漿中濃度は投与後 1 時間以内に一致したことから、antipyrine の吸収は非常に速やかであると考えられた。この時算出された、門脈カニューレラットの Q_{pv} は、 32.9 ± 3.1 mL/min/kg であった (Table 3)。Figure 6 に示すように、門脈カニューレ法では iv/po 法と比較して、血流の変化の影響を受けにくいことから、以後の検討における Q_{pv} として本結果を用いることとした。

Table 4. Hepatic blood flow rates in anesthetized rats measured by ultrasonic transit-time technology.

| Hepatic blood flow rate | | | | | | |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| mL/min/kg | | | | | | |
| No.1 | No.2 | No.3 | No.4 | No.5 | No.6 | No.7 |
| 46.1 | 41.9 | 50.3 | 61.1 | 57.0 | 82.3 | 55.4 |

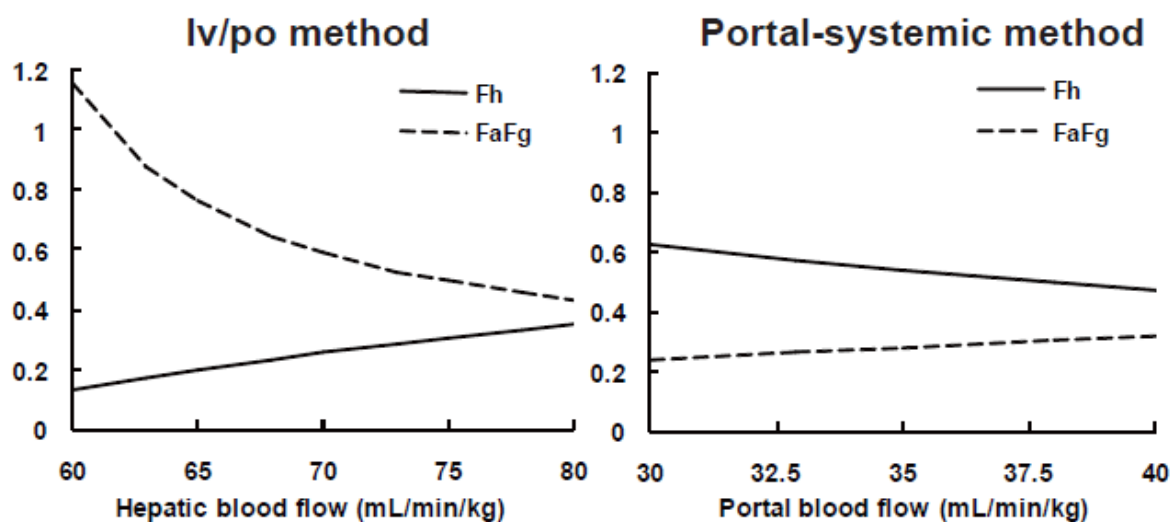


Figure 6. Relation of hepatic and portal blood flow to estimated Fa·Fg and Fh after oral administration of felodipine in rats.

Left figure, Fa·Fg and Fh were calculated using equations (2), (3) and (4), $F = 0.16$ and $CL_h = 52.2$ mL/min/kg; Right figure, Fa·Fg and Fh were calculated using equations (2) and (9), $F = 0.16$.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Fig. 6

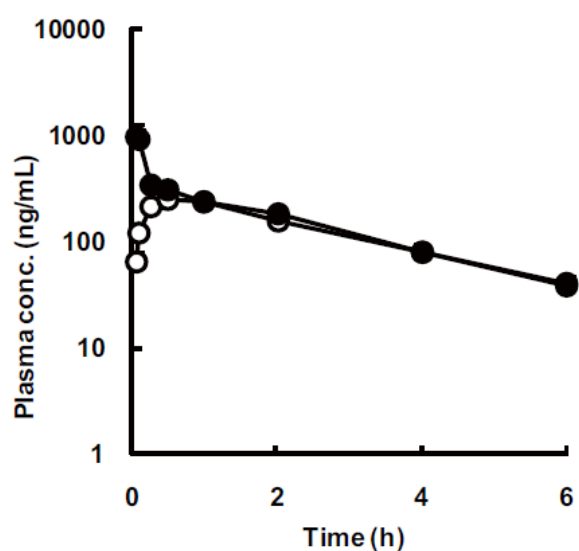


Figure 7. Systemic and portal plasma concentration-time profiles of antipyrine (0.3 mg/kg) following oral administration in cannulated rats.

●, portal plasma concentration; ○, systemic plasma concentration.

Each symbol represents mean \pm S.D. for 3 rats.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Fig. 3

1.2.3 各種市販薬物を用いた消化管吸収率の評価

門脈カニューレ法によって得られた Fa・Fg の妥当性について検証するため、異なる動態特性を有する 7 つのモデル薬物 (indomethacin、midazolam、felodipine、famotidine、raloxifene、sulpiride 及び fexofenadine) を門脈カニューレラットに経口投与し Fa・Fg を評価した。Figure 8 に、各モデル薬物を経口投与した際の門脈及び全身血漿中濃度推移を、Table 5 に各薬物の門脈及び全身血漿中濃度の AUC 値より求めた Fa・Fg を示した。また、別にラットに各薬物を静脈内投与し、Fh および経口投与後の BA を算出した結果を Table 5 に併せて記した。7 つのモデル薬物の Fa・Fg は 0.06 から 1.00 まで幅広い数値を示し、いずれの薬物についても、本評価法によって算出された Fa・Fg は、これまで報告された値と概ね一致する結果であった。以下に、各モデル薬物の結果に関する考察を論述する。

Indomethacin : 膜透過性が良好であり、血漿中タンパク結合率が高いため肝臓において代謝の影響を受けにくい薬物である。本評価法で算出された indomethacin の Fa・Fg (=0.90) 及び Fh (=1.09) はいずれも高値であり、その動態特性を反映した結果であると考えられた。

Midazolam : 高い膜透過性を持つ一方で、薬物代謝酵素である CYP3A の良好な基質である。したがって、本評価法における midazolam の Fa・Fg (=0.71) は高値を示したが、Fh (=0.05) は極めて低い値であった。Kuze らは、従来の術式による門脈カニューレラットを用いて midazolam の Fa・Fg を算出した結果、ラットにおける Fa・Fg は 0.72 であることを報告している[32]。また、Nishikawa らは iv/po 法によりラットの Fa・Fg が 0.77 であることを報告しており[33]、いずれも今回得られた結果とほぼ一致するものと考えられた。

Felodipine : 膜透過性が低く CYP3A の基質であることにより、消化管で代謝を受けやすくなると考えることができる。Wang らは、[H³]felodipine を用いた検討により、ラットにおける felodipine の Fa・Fg は 0.09 から 0.15 であることを報告している[34]。本評価法によって算出された Fa・Fg (=0.26) は、彼らの結果と比較的近い値を示した。

Sulpiride : P-gp の基質であり、膜透過性も良くないことから Fa・Fg は低いことが推測される[35]。Mizuno らは、ラットに sulpiride を 200 mg/kg で経口投与した際の BA は 15.6%と低い値であり、消化管からの吸収性が低いことが要因であると報告している[36]。本評価法によって算出された Fa・Fg (=0.26) は低値を示しており、これらの報告と一致する結果と考えることができる。また、本試験の BA (6%) と Mizuno らの報告との間に差が生じた要因としては投与量が異なることが考えられる。

Raloxifene : ヒトに経口投与した場合、小腸において大部分がグルクロン酸抱合代謝を受けるため Fa・Fg が非常に小さくなることが分かっている[37]。また、ラットにおいても、小腸マイクロソーム画分を用いた評価によってグルクロン酸抱合代謝を受けることが分かっており、Fa・Fg は 0.16 と低値を示すことが報告されている[21]。本評価によって得られた Fa・Fg (=0.22) はこれらの報告と一致した結果であった。

Famotidine : 非常に水溶性が高い薬物であり、Caco-2 細胞の透過は細胞間輸送によって透過することが報告されている[38]。細胞間輸送は、消化管表面に対して細胞間隙が占める表面積が非常に小さいため経細胞輸送と比較して吸収量が小さい。このため、famotidine の Fa・Fg (=0.19) は低値を示したと考えられた。

Fexofenadine : Sulpiride と同様に P-gp の基質であり[39]、Ujie らによる報告では、小腸ループ法による fexofenadine の吸収は P-gp 阻害剤である cyclosporine の併用によって 3.83 倍に増加しており、消化管吸収過程に及ぼす P-gp の寄与率が高いことが考えられる[40]。また fexofenadine は、代謝に対しては安定であるが、分子量が大きく胆汁排泄率が高いことが分かっている[41]。このため、本評価における Fa・Fg (=0.11) 及び Fh (=0.14) が共に低かったと考えられた。

以上、今回、門脈カニューレ法によって得られた Fa・Fg は、他の方法を用いてこれまで報告されている文献値とほぼ一致する値であり、本手法の妥当性を示すことができた。さらに、門脈カニューレ法では、①経口投与試験のみから個体ごとの Fa・Fg を算出することができる、②肝外クリアランスの評価が不要である、③算出される Fa・Fg は門脈血流量の変動に影響を受けにくい、など、従来の手法に比べて優れた点を有しており、様々な薬物の Fa・Fg を簡便かつ正確に評価できる有用な手法であると考えられた。

Table 5. Estimated organ bioavailability of each drug after intravenous and oral administration in cannulated rats.

| Drugs | BA | Fh | Fa・Fg | Reported Fa・Fg |
|--------------|------|------|-------|---------------------------------------|
| Indomethacin | 0.98 | 1.09 | 0.90 | 1.00 |
| Midazolam | 0.03 | 0.05 | 0.71 | 0.72 ^a , 0.77 ^a |
| Felodipine | 0.16 | 0.62 | 0.26 | 0.09 to 0.15 ^b |
| Sulpiride | 0.06 | 0.21 | 0.26 | 0.23 ^c |
| Raloxifene | 0.15 | 0.69 | 0.22 | 0.16 ^d |
| Famotidine | 0.12 | 0.62 | 0.19 | - |
| Fexofenadine | 0.02 | 0.14 | 0.11 | 0.06 ^e |

Values represent mean for 3 to 4 rats.

^a The data was obtained from a report by Kuze et al. and Nishikawa et al. [32, 33]

^b The data was obtained from a report by Wang et al. [34]

^c The data was obtained from a report by Mizuno et al. [36]

^d The data was obtained from a report by Kosaka et al. [21]

^e The data was obtained from a report by Qiang et al. [42]

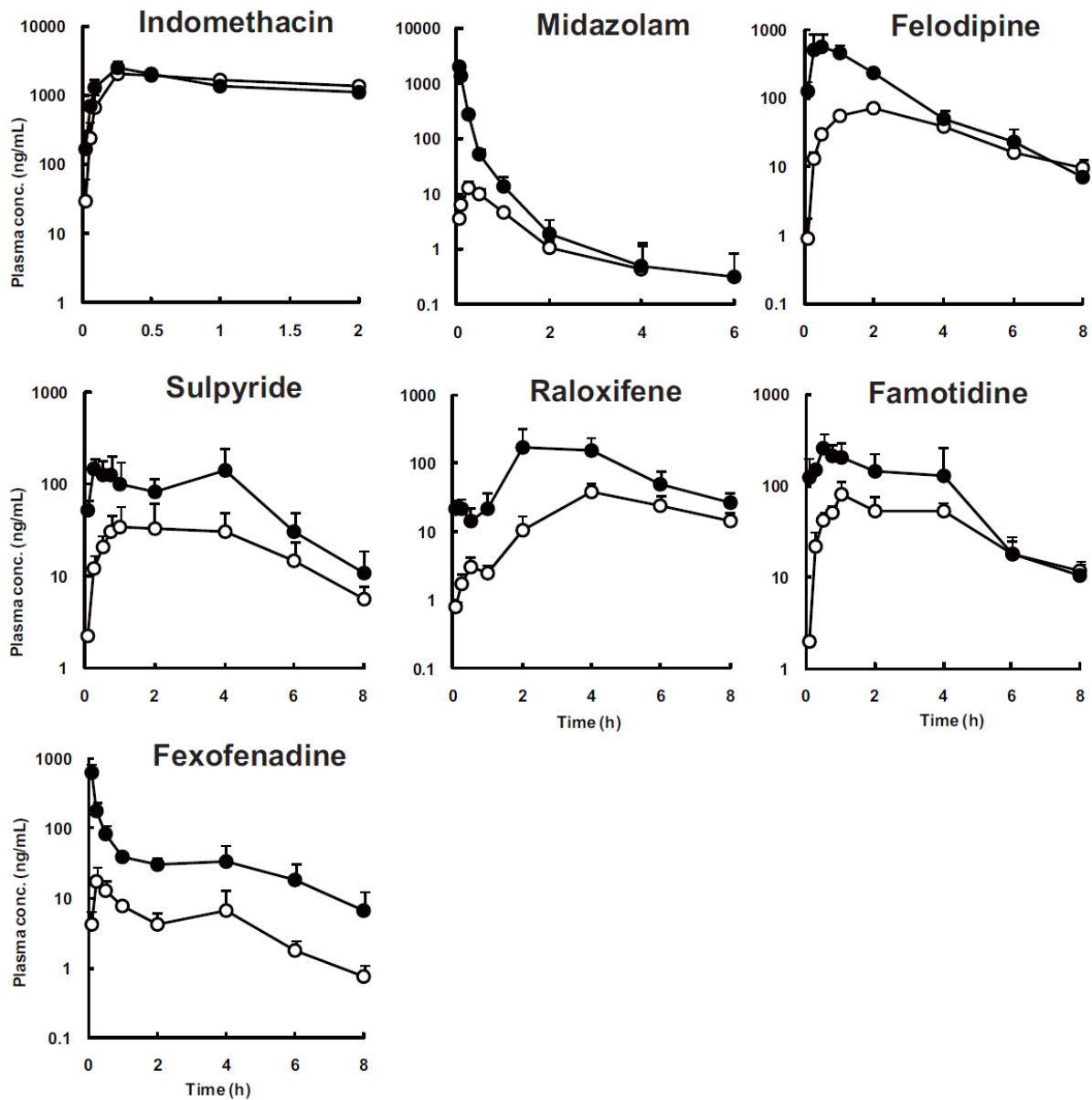


Figure 8. Systemic and portal plasma concentration-time profiles of several drugs following oral administration in cannulated rats.

Dose: antipyrine (0.3 mg/kg); indomethacin (0.3 mg/kg); midazolam (1 mg/kg); felodipine (5 mg/kg); famotidine (5 mg/kg); raloxifene (5 mg/kg); sulpyride (5 mg/kg); fexofenadine (5 mg/kg).

○, systemic plasma concentration; ●, portal plasma concentration.

Each symbol represents mean ± S.D. for 3 to 4 rats.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Fig. 3

1.2.4 PBPK モデル解析を用いた血漿中濃度推移に関する考察

Figure 8 において、Indomethacin、midazolam、felodipine、famotidine では、経口投与した後の門脈及び全身血漿中濃度推移は、投与後 8 時間までにはほぼ完全に一致した。一方、raloxifene、sulpiride、fexofenadine の場合、投与後 8 時間においても門脈血漿中濃度は全身血漿中濃度より有意に高い値を示した。本項では、このような門脈及び全身血漿中濃度推移のパターンの違いについて、physiologically based pharmacokinetics (PBPK) モデルを用いた考察を試みた。

PBPK モデルとは、薬物の体内での動きを微分方程式として書き表したモデルであり、近年、非臨床での体内動態解析やヒトにおける体内動態を予測する手段として繁用されている[43, 44]。門脈カニューレラットの体内動態は、門脈、肝臓及び全身循環の 3 つのコンパートメントを設定することで簡便に書き表すことができる (Figure 5)。またこれらの 3 つのコンパートメントにおける物質収支式は、eq. (10) - (12) として書き表すことができる。

$$V_{liver} \cdot dC_{liver} / dt = Q_a \cdot C_{sys} + Q_{pv} \cdot C_{pv} - Q_h \cdot C_{liver} / K_p - CL_h \cdot C_{liver} / K_p \quad \text{eq. (10)}$$

$$V_{pv} \cdot dC_{pv} / dt = Q_{pv} \cdot C_{sys} + D \cdot k_a \cdot F_a \cdot F_g \cdot \exp(-k_a \cdot t) - Q_{pv} \cdot C_{pv} \quad \text{eq. (11)}$$

$$V_{sys} \cdot dC_{sys} / dt = Q_h \cdot C_{liver} / K_p - Q_h \cdot C_{sys} - CL_{NH} \cdot C_{sys} \quad \text{eq. (12)}$$

ここで、 V_{liver} 、 V_{pv} 、 V_{sys} 、 C_{liver} 、 C_{pv} 及び C_{sys} は、各コンパートメントにおける容積及び濃度を示す。 Q_a 、 Q_{pv} 、 Q_h は、肝動脈、門脈、肝臓の血流量を示しており、 Q_a と Q_{pv} の和が Q_h の関係である。 D 、 k_a 、 CL_h 、 CL_{NH} 及び K_p は、投与量、吸収速度係数、肝クリアランス、肝外クリアランス及び肝-血漿濃度比を示す。また吸収速度定数 (k_e) は、eq. (13) として表わすことができる。

$$k_e = (CL_h + CL_{NH}) / (V_{liver} + V_{sys}) \quad \text{eq. (13)}$$

Eq. (9) - (11) を Runge-Kutta-Gill 法で解くことにより、肝臓、門脈、全身循環における薬物濃度をシミュレーションすることができる。本モデルを用いて、個々のパラメーターを変化させ、各パラメーターと血漿中濃度推移の関連性について検討した。その結果、門脈及び全身血漿中濃度推移の形状は、吸収速度定数 (k_a) 及び排泄速度定数 (k_e) の大小関係によって変化した。Figure 9 に示すように、 $k_a > k_e$ の関係を有する薬物を経口投与した場合、門脈及び全身血漿中濃度は速やかに一致するのに対して、 $k_a < k_e$ の関係を有する薬物を経口投与した場合、片対数グラフ上では門脈及び全身血漿中濃度が平行に推移した。一般的に、多くの薬物は $k_a > k_e$ の関係が成立すると考えられるが、溶解性や膜透過性が非常に低い薬物や徐放化された薬物については flip-flop と呼ばれる $k_a < k_e$ の関係となることが知られている。Figure 8 に示すように、indomethacin、midazolam、felodipine、famotidine は、経口投与後 8 時間までに、門脈及び全身血漿中濃度が一致あるいは概ね一致したため、 $k_a > k_e$ の関係が成立していると考えられる。一方、raloxifene、sulpiride、fexofenadine では投与後 8 時間において門脈血漿中濃度が全身血漿中濃度よりも高い値を示しており、 $k_a < k_e$ の関係が

成立すると考えられる。このように、門脈及び全身血濃度推移の形状より、評価薬物の k_a 及び k_e の大小関係を簡単に確認することが可能である。

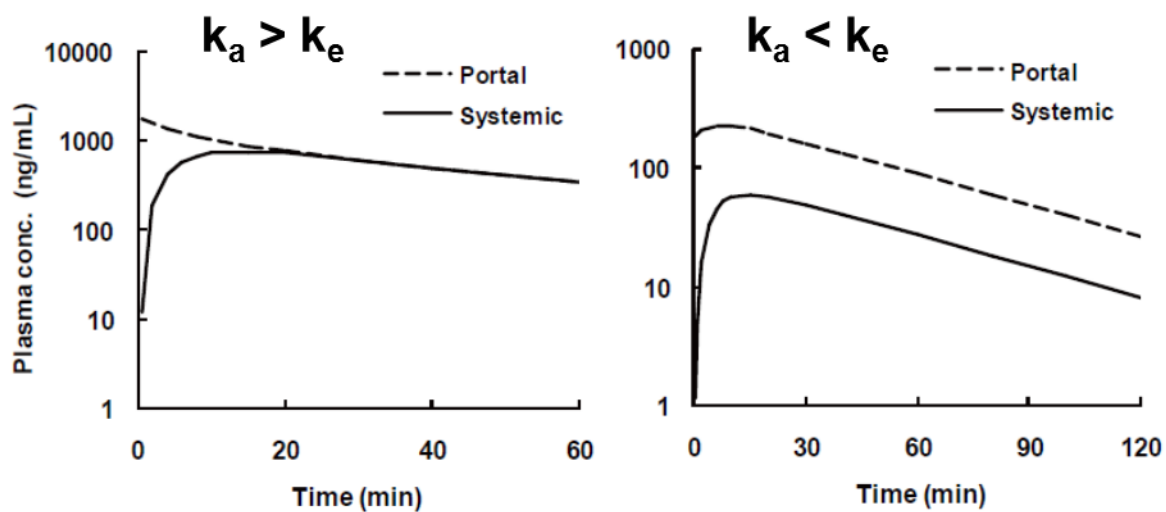


Figure 9. Simulated portal and systemic plasma concentration-time profiles after oral administration in a physiological model.

Left figure, $k_a = 0.20 \text{ min}^{-1}$ and $k_e = 0.02 \text{ min}^{-1}$; Right figure, $k_a = 0.02 \text{ min}^{-1}$ and $k_e = 0.20 \text{ min}^{-1}$.

Drug Metab Dispos., 40, 2231-2238 (2012), Fig. 5

1.3 考察

本章では、新規術式を用いた門脈カニューレラットを作成し、薬物経口投与後の消化管からの吸収率 ($Fa \cdot Fg$) を正確に評価する手法 (門脈カニューレ法) を構築した。従来の iv/po 法では、経口投与試験と静脈内投与試験を別個体のラットに対して実施し、その平均値として $Fa \cdot Fg$ を算出するため、計算に用いた肝血流量値によって $Fa \cdot Fg$ が大きく変動する可能性が指摘されてきた。また、iv/po 法による評価では、個体間のバラツキに加えて投与経路の違いによるバラツキも含まれることになる。Iv/po 法を用いた検討において異なる結果が算出された例として midazolam に関する報告がある。Strelevitz らの報告では、midazolam の $Fa \cdot Fg$ が 0.03 (CLtot=22.8 mL/min/kg、Qh=70 mL/min/kg) であったのに対して[45]、Kotegawa らの報告では 0.4-0.9 (CLtot=79 mL/min/kg、Qh=90-110 mL/min/kg) であり[46]、両者の結果が異なる理由として全身クリアランスとともに用いた肝血流量値が大きく異なっていることが挙げられる。この様に、肝血流量の値は、薬物の動態解析に極めて重要な値であるにも関わらず、個体間差も大きく文献的にも複数の数値が報告されている[28-30]。またラットの肝血流量値を無麻酔下で非侵襲的に評価することは困難であり、特に高クリアランスの化合物については、どの数値を使うかによって結果が大きく異なる。

一方、今回構築した門脈カニューレ法では、経口投与試験のみから個体ごとの $Fa \cdot Fg$ を算出することができる上、肝外クリアランスの評価が不要であるため、試験が簡便で誤差が小さくなると期待される。さらに Figure 6 に示すように、算出される $Fa \cdot Fg$ は門脈血流量の変動に影響を受けにくいことが明らかとなった。これは、iv/po 法による $Fa \cdot Fg$ の計算の過程では、肝クリアランスを肝血流量で除するのに対し、門脈カニューレ法では AUC に門脈血流量を乗じることに起因した結果と考えられる。また、門脈カニューレ法で測定された門脈及び全身血漿中濃度の差と門脈血流量値の積は、消化管から門脈血中に吸収された薬物量を示すため、薬物の経時的な吸収プロファイルを算出することができる。例えば、Figure 8 における midazolam の場合、投与後 3 分において門脈血漿中濃度は全身血漿中濃度より 100 倍以上高くなり、その後 4 時間で両血漿中濃度が一致することから、midazolam の消化管吸収は投与後非常に速い速度で進行し、約 2~4 時間でほぼ完了すると考えられる。

創薬初期段階での化合物の *in vivo* 評価において、溶解性や膜透過性が低いために吸収速度定数 (k_a) が消失速度定数 (k_e) より低くなり、経口投与後の血漿中濃度が長時間持続する flip-flop と呼ばれる現象が認められることがある。このような化合物では、消化管内での溶解性が吸収の律速となっている場合が多く、種差が生じやすいためにラットの結果からヒトでの吸収プロファイルを予測することは困難となる。また、flip-flop を示す化合物の吸収性は、消化管内の物理化学的因子にも影響を受けやすいため、バラツキが生じやすい。このため、経口剤開発では、溶解性及び膜透過性が良好な化合物を選択することが望まれており、flip-flop を示すような化合物の多くは経口剤として不適と見なされることが多い。従来、化合物を経口投与した後の血漿中濃度が持続した場合、全身血漿中濃度推移のみからでは、体内からの消失が遅いことが原因なのか、あるいは消化管からの吸収が遅いことが原因なのかを判断することが困難であった。しかし、Figure 9 に示したように、

門脈カニューレラットを用いることにより、経口投与後の門脈及び全身血漿中濃度推移の形状から、化合物の k_a 及び k_e の大小関係が簡便に判断できることが示された。これは、経口投与試験のみから、化合物の吸収特性を把握し、良好な吸収プロファイルを示す化合物の選別を可能とするものであり、創薬初期段階での門脈カニューレ法の有用性の一つと考えられる。

門脈カニューレ法を用いた $Fa \cdot Fg$ の算出結果は、これまでに複数の文献によって報告されている。Kuze らは、門脈カニューレションを施したマウス及びラットに、薬物を経口投与し $Fa \cdot Fg$ 及び Fh を分離評価することにより、初回通過効果に及ぼす種差の評価について報告している[32]。Kanazu らは、CYP3A の誘導剤である dexamethasone を前処理した雌性ラットに門脈カニューレションを施すことによって、消化管及び肝臓における CYP3A に対する相互作用評価モデルを構築した[47]。また Ueda らは、pentobarbital によって麻酔したラットと無処置のラットに門脈カニューレションを施し、モデル薬物を経口投与することにより、麻酔薬が消化管及び肝臓に及ぼす影響を評価した[48]。これらの報告は、すべて従来の術式によって作成した門脈カニューレションラットを用いた結果であるが、いずれも有用な利用法であると考えられる。一方、本研究では、門脈血流量値を一定の値として $Fa \cdot Fg$ の算出を行ったが、Hoffman らは、消化管から完全に吸収される theophylline ($Fa \cdot Fg=1$) をプローブ薬として、評価薬物と共に門脈カニューレラットに経口投与することによって、門脈血流量を使用しない $Fa \cdot Fg$ の算出方法を考案している[19]。しかし、吸収速度の速い antipyrine や theophylline の消化管吸収率を正確に算出するためには、投与直後からの採血が必要であり（本論文では3分後）、採血操作に要する時間等のバラツキによる個体間差を生じる可能性が考えられる。

門脈カニューレ法を創薬研究に活用することは、化合物の *in vivo* での吸収プロファイル、また初回通過効果の評価に有用と考えられるものの、腸肝循環を生じる化合物の評価には注意が必要である。化合物が腸肝循環する場合には、eq. (9)を用いて $Fa \cdot Fg$ を算出すると、分子は腸肝循環による再吸収を反映した吸収量が算出されるのに対して、分母は投与量のままであるため、 $Fa \cdot Fg$ を過大評価する可能性が指摘されている。Tabata らは、腸肝循環する化合物の $Fa \cdot Fg$ を評価するためには、門脈カニューレラットの胆管にカニューレションを施し、胆汁を体外にて回収した状態で化合物を経口投与し、門脈及び全身血漿中濃度をモニターする評価方法を考案している[49]。今後、様々な動態特性を示す薬物の吸収評価を行い、情報を集積・検証していくことによって、より有用な手法の構築が可能になると期待される。

第2章 消化管吸収率に対する消化管トランスポーター及び消化管代謝の寄与率評価

第1章では、新規術式を用いて経時的に安定した門脈血の採血が可能な門脈カニューレラットを作製し、様々な薬物の消化管からの吸収率 ($F_a \cdot F_g$) を *in vivo* において精度よく算出する手法を構築した。経口投与後の $F_a \cdot F_g$ は、薬物の物理化学的性質である水溶性や脂質膜透過性の他、消化管に発現するトランスポーターや代謝酵素によって大きく影響を受ける。創薬の探索段階において、候補化合物が消化管トランスポーターの基質に成り得るかを判断するためには、通常、ヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞や各トランスポーターを強制発現させた Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いた *in vitro* 膜透過試験が実施される[50]。また、消化管における代謝の程度を推定するため、小腸マイクロソーム画分を用いた代謝安定性試験が実施される。しかしながら、*in vivo* での吸収率に消化管トランスポーターや代謝酵素がどの程度寄与するのかを正確に評価するためには、それら機能性蛋白への親和性だけでなく、受動的な膜透過性や溶解性などを含めた吸収過程の総合的な判断が必要となる。

本章では、門脈カニューレラットに排泄型トランスポーター (P-glycoprotein (P-gp) 及び breast cancer resistance protein (Bcrp)) あるいは薬物代謝酵素 (CYP) の選択的阻害剤を前処理することにより、薬物の吸収過程におけるそれらの寄与を定量的に評価するための方法について詳細な検討を行った。また、選択的阻害剤が存在しない薬物代謝酵素 (UGT) についても、経口投与試験と *in situ* single-pass perfusion 試験を組み合わせることにより、消化管上皮細胞内で生成した代謝物量を算出し、消化管代謝の寄与率の評価を試みた。

2.1 消化管トランスポーターの寄与率評価

小腸の排泄型トランスポーターは上皮細胞の管腔側に発現しており、その基質となる薬物が上皮細胞内に取り込まれた場合、基底膜側 (門脈側) に移行する前に管腔側へと汲み出されるため、低 BA の要因となる[51, 52]。また、排泄型トランスポーターの阻害剤となる薬物との併用によって、薬物間相互作用を生じ基質薬物の血中濃度が上昇する可能性がある。近年、FDA より提示された薬物相互作用ガイドラインの中では、消化管排泄型トランスポーターとして P-gp 及び Bcrp についての評価の必要性が明記されている。

In vivo において、経口投与後の消化管吸収率に及ぼす排泄型トランスポーターの寄与を定量的に評価するための手法として、トランスポーターをノックアウトさせた動物の利用[53, 54]、あるいは選択的阻害剤と対象薬物の併用投与が可能である[55, 56]。しかし、ノックアウト動物を使用する場合には、常に代償経路の有無を考慮しておく必要がある。例として、P-gp あるいは Bcrp をノックアウトしたマウス及びラットでは、その他のトランスポーターや代謝酵素の mRNA レベルが有意に増加していることが報告されている[57, 58]。一方、阻害剤を用いる方法では、経口投与した阻害剤

が、消化管トランスポーターだけでなく、全身に発現するトランスポーターも同時に阻害した結果、対象薬物の体内分布や血中からの消失速度が変化し、全身クリアランスが変動する可能性がある。そのような場合には、別個体での静脈内投与試験を行い、阻害剤併用時の対象薬物の全身クリアランスを評価しておく必要がある。

門脈カニューレ法による $Fa \cdot Fg$ の算出では、**eq. (9)**で示すように全身クリアランスの評価を必要としないため、全身クリアランスの変化に関係なく、経口投与試験のみから $Fa \cdot Fg$ を求めることが可能と考えられる。そこで本節では、P-gp 及び Bcrp の選択的阻害剤を前処理した門脈カニューレラットに、P-gp、Bcrp 及び P-gp/Bcrp の基質薬物を経口投与し、 $Fa \cdot Fg$ の変化より吸収過程における消化管排泄型トランスポーターの寄与率を評価した。本節では、P-gp、Bcrp 及び P-gp/Bcrp の基質薬物として fexofenadine (FEX) [39]、sulfasalazine (SASP) [59, 60]及び topotecan (TPT) [61, 62]を、P-gp 及び Bcrp の阻害剤として zosuquidar (ZSQ) [63]及び Ko143 [64]を使用した。

2.1.1 阻害剤経口投与による消化管トランスポーター阻害の検証

門脈カニューレ法によって、全身クリアランスの変化に関係なく $Fa \cdot Fg$ の評価が可能かどうかを検証するため、P-gp の阻害剤である ZSQ を経口及び静脈内投与で前処理したラットに、P-gp の基質である FEX を経口及び静脈内投与する試験を実施した。ZSQ を経口及び静脈内投与によって前処理したラットに、FEX を静脈内投与してその全身クリアランスを評価した結果、ZSQ の投与経路にかかわらず、FEX の全身クリアランスは約 3 割程度有意に低下した (Table 6)。次に、ZSQ を経口及び静脈内投与によって前処理したラットに、FEX を経口投与して $Fa \cdot Fg$ を評価した結果、FEX の $Fa \cdot Fg$ は、ZSQ を経口投与で前処理したラットにおいて約 4 倍増加したのに対して、ZSQ を静脈内投与したラットでは変化が認められなかった (Figure 10)。以上の結果より、①ZSQ の静脈内投与による前処理では、全身に発現している P-gp が阻害された結果、FEX の全身クリアランスが低下するものの、消化管の P-gp は阻害されないため $Fa \cdot Fg$ は変化しなかった、②ZSQ の経口投与による前処理では、ZSQ が吸収されて全身に分布するため、消化管も含めて全身に発現する P-gp が阻害された結果、FEX の $Fa \cdot Fg$ が上昇するとともに全身クリアランスが低下した、と推察された。Strelevitz らも同様に、代謝酵素の阻害剤を経口投与した場合、消化管と肝臓における酵素が阻害されるのに対し、阻害剤の静脈内投与では肝臓における酵素のみが阻害されたことを報告している [45]。門脈カニューレ法では、全身クリアランスの変化に関係なく $Fa \cdot Fg$ を評価できることから、本結果より、トランスポーターの選択的阻害剤を経口投与によって前処理することにより、消化管吸収過程でのトランスポーターの寄与を評価することができるものと判断された。

Table 6. Pharmacokinetic parameters of FEX (1 mg/kg) after oral (30 mg/kg) and intravenous (2 mg/kg) administration of ZSQ.

| | AUC | $t_{1/2}$ | CL_{tot} | Vd_{ss} |
|----------|------------|--------------|--------------|-------------|
| | ng·h/mL | h | mL/min/kg | L/kg |
| Control | 428 ± 41 | 2.1 ± 0.2 | 39.3 ± 4.0 | 1.9 ± 0.3 |
| ZSQ p.o. | 587 ± 58** | 1.4 ± 0.1*** | 28.6 ± 3.0** | 1.4 ± 0.2* |
| ZSQ i.v. | 570 ± 34** | 1.4 ± 0.1*** | 29.3 ± 1.9** | 1.1 ± 0.2** |

ZSQ p.o., ZSQ was orally treated 40 min before FEX was intravenously administered; ZSQ i.v., ZSQ and FEX were intravenously coadministered. Values represent mean ± S.D. for 3 to 4 rats. Statistically significant difference: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, control versus ZSQ p.o. or ZSQ i.v.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Table 1

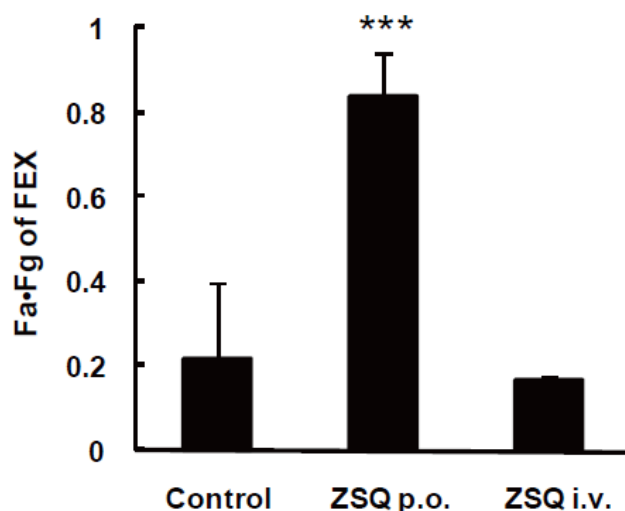


Figure 10. Fa·Fg of FEX at 5 mg/kg after oral (30 mg/kg) and intravenous (2 mg/kg) administration with ZSQ.

FEX was orally administered 40 min after ZSQ p.o. or 5 min after ZSQ i.v. Each bar represents mean ± S.D. for 3 to 5 rats. Statistically significant difference: ***, $P < 0.001$, control versus ZSQ p.o. or ZSQ i.v.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Fig. 1

2.1.2 選択的阻害剤の前処理用量の検討

消化管トランスポーターの基質薬物を経口投与した場合、一定以上の投与量では消化管トランスポーターが飽和することによって吸収に非線形が生じ、その寄与率を過小評価する可能性がある。そこで、P-gp/Bcrp の基質薬物である TPT について用量相関性を検討した。その結果、TPT を 0.1 から 3 mg/kg で経口投与した場合、AUC_{sys} 及び AUC_{pv} は、投与量に応じて増加し、Fa・Fg に変化は認められなかったことから、これらの投与量範囲での体内動態は線形であり、消化管トランスポーターの飽和は起こっていないと考えられた (Table 7)。また、いずれの投与量においても、TPT の門脈血漿中濃度は経口投与後速やかに上昇し、投与後 8 時間において門脈及び全身血漿中濃度は概ね一致する濃度推移を示した (Figure 11)。したがって、投与量の増加に伴う吸収プロファイルの変動は少ないと考えられた。TPT のヒトにおける臨床用量は、1 日あたり 2.3 mg/m² であり、このときの胃内における TPT 濃度は約 0.02 mg/mL (= dose / 250 mL) と算出される。ラットに 0.3 mg/kg で経口投与した際の投与液濃度は 0.06 mg/kg であり、臨床用量に近い濃度と考えられることから、線形領域内の 0.3 mg/kg を TPT の投与量として設定した。

次に、選択的阻害剤の前処理用量を設定するために、ZSQ 及び Ko143 の前処理用量を、各々 1、3、10、30 mg/kg 及び 1、3、10 mg/kg と変化させ、TPT の Fa・Fg の変動について評価した。その結果、ZSQ を 10 から 30 mg/kg、Ko143 を 3 から 10 mg/kg で前処理することによって、TPT の Fa・Fg に頭打ちが認められた (Figure 12)。これは、消化管排泄型トランスポーターが阻害剤によってほぼ完全に阻害され、トランスポーターによる排泄率がほぼゼロになったためと考えられる。Poller らは、double-transfected MDCKII-ABCB1/ABCG2 cell を用いた TPT の双方向の輸送試験を実施し、阻害剤無しの条件では apical to basal に対する basal to apical の輸送比 (R) が 7.9 であったのに対して、5 µmol/L ZSQ 及び 1 µmol/L Ko143 を処理することによって R 値は 0.9 に低下することを報告している [65]。この結果は、ZSQ 及び Ko143 が P-gp 及び Bcrp をほぼ完全に阻害することによって、両方向の輸送が受動拡散のみとなったことを示唆している。本試験においても、ZSQ を 30 mg/kg 及び Ko143 を 10 mg/kg で前処理することによって、P-gp 及び Bcrp がほぼ完全に阻害されたと考えられたため、以下の検討における ZSQ 及び Ko143 の前処理用量は、それぞれ 30 及び 10 mg/kg に設定した。

Table 7. The systemic AUCs, portal AUCs and Fa·Fg of TPT following oral administration of increasing doses in the portal vein cannulated rats.

| TPT dose <i>mg/kg</i> | AUC _{sys} <i>ng·h/mL</i> | AUC _{pv} <i>ng·h/mL</i> | Rb | Fa·Fg |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------|-------------|
| 0.1 | 6.0 ± 0.9 | 11.2 ± 2.1 | 1.26 | 0.13 ± 0.03 |
| 0.3 | 14.1 ± 0.3 | 25.8 ± 2.2 | | 0.10 ± 0.02 |
| 1 | 50.1 ± 7.4 | 102 ± 12 | | 0.13 ± 0.02 |
| 3 | 172 ± 2 | 313 ± 22 | | 0.12 ± 0.02 |

Values represent mean ± S.D. for 3 rats.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Table. 2

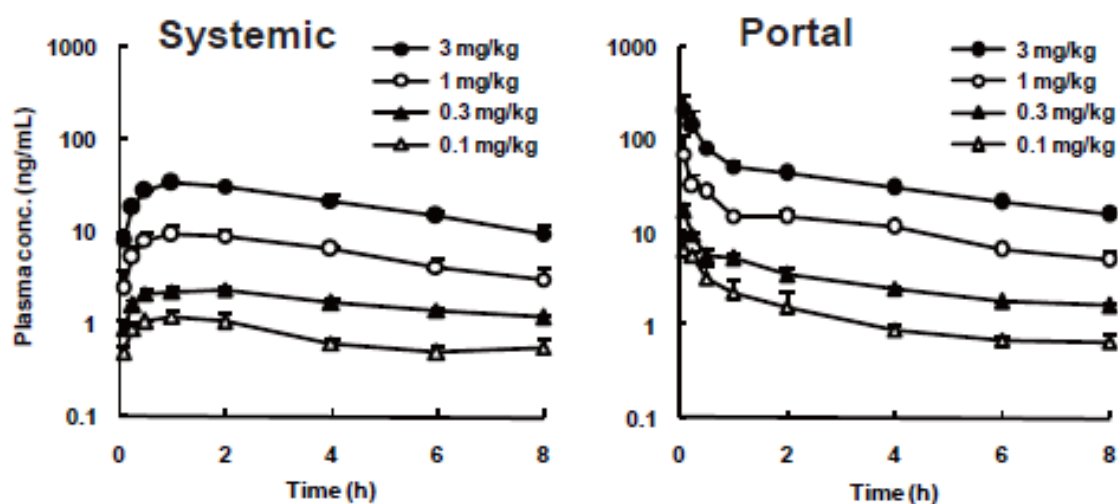


Figure 11. Assessment of dose-dependence of systemic (left figure) and portal (right figure) plasma concentrations following oral administration of increasing doses of TPT (0.1 to 3 mg/kg) in the portal vein cannulated rats.

Values represent mean ± S.D. for 3 rats.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Fig. 2

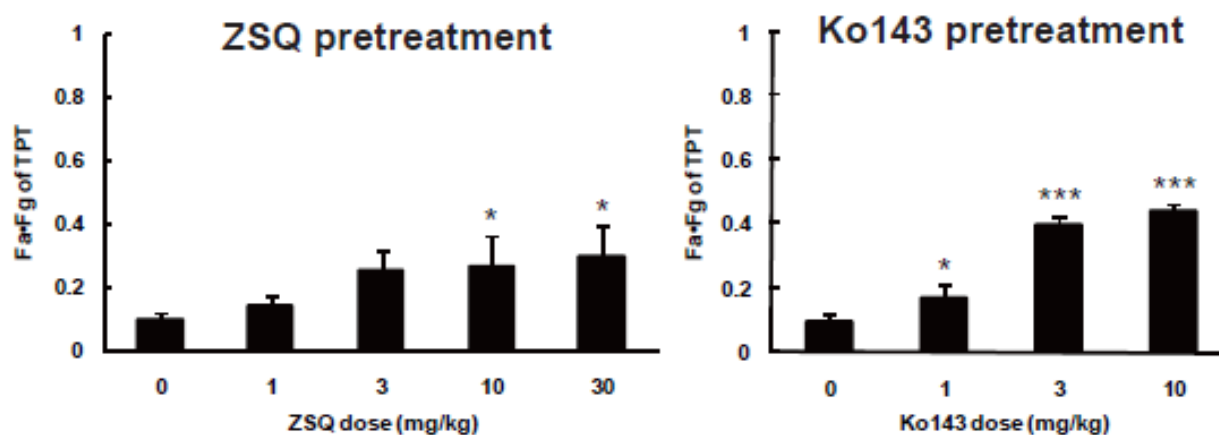


Figure 12. The effects of ZSQ or Ko143 pretreatment on Fa·Fg following the oral administration of TPT (0.3 mg/kg) in the portal vein cannulated rats.

Left figure, Fa·Fg of TPT 40 min after oral administration of ZSQ (1 to 30 mg/kg); and right figure, Fa·Fg of TPT 40 min after oral administration of Ko143 (1 to 10 mg/kg). Each bar represents mean \pm S.D. for 3 to 5 rats. Statistically significant difference: *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, without inhibitors versus with inhibitors.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Fig. 3

2.1.3 モデル薬物の吸収における消化管トランスポーターの寄与率評価

阻害剤 (ZSQ 及び Ko143) の P-gp 及び Bcrp に対する選択性を評価するために、各阻害剤を前処理した門脈カニューレラットに基質薬物 (FEX、SASP 及び TPT) を経口投与した。その結果、Figure 13 に示すように、FEX 経口投与後の血漿中濃度は、ZSQ 群及び ZSQ+Ko143 群で同程度に増加し、Ko143 群で変化が認められなかった。SASP についても同様に、Ko143 群及び ZSQ+Ko143 群で増加し、ZSQ 群で変化が認められなかった。一方、P-gp 及び Bcrp の両方の基質である TPT は ZSQ 群、Ko143 群、ZSQ+Ko143 群のいずれの群でも、異なる比率で血漿中濃度の増加が認められた。Figure 14 には各モデル薬物の各群における Fa・Fg を示しており、血漿中濃度と同様の変化が認められた。以上の結果より、30 mg/kg ZSQ 及び 10 mg/kg Ko143 による前処理は、消化管における P-gp 及び Bcrp を選択的に阻害したものと考えられた。

次に、各モデル薬物について、それぞれの吸収における消化管 P-gp 及び Bcrp の寄与率の評価を行った。

- ① FEX の場合、Control 群、ZSQ 群、Ko143 群及び ZSQ+Ko143 群における Fa・Fg はそれぞれ 0.22 ± 0.18 、 0.84 ± 0.10 、 0.20 ± 0.05 及び 0.77 ± 0.13 であった (Table 8)。ZSQ+Ko143 群の Fa・Fg は、消化管上皮細胞内へ取り込まれた FEX の割合を示すことから、Control 群 (=0.22) と ZSQ+Ko143 群 (=0.77) の Fa・Fg の差 (=0.55) は、消化管上皮細胞内において P-gp によって汲み出された FEX の割合に相当すると考えることができる。したがって、Figure 15 に示すように、消化管上皮細胞内に取り込まれた FEX の 71% が P-gp によって管腔側へと汲み出され、29% が基底膜方向へ移行したものと考えられた。Petri らは、Caco-2 細胞を用いた輸送試験において、FEX の 70% が P-gp によって汲み出されていることを報告しており [66]、本試験の結果と一致している。しかし、FEX は極性表面積が大きく、高分子量であるにも関わらず、投与された 77% が小腸上皮細胞内に取り込まれる結果であった。この要因として、FEX が消化管に発現している Oatp の基質であるためと考えられた。Qiang らは、FEX と Oatp 基質である fluvastatin を併用投与することにより、Oatp の一部が fluvastatin によって阻害されるため、FEX の消化管からの吸収量が約 0.45 倍に低下することを報告している [42]。
- ② SASP の場合、Control 群、ZSQ 群、Ko143 群及び ZSQ+Ko143 群における Fa・Fg はそれぞれ 0.03 ± 0.01 、 0.02 ± 0.01 、 0.14 ± 0.07 及び 0.14 ± 0.04 であった (Table 8)。FEX と同様に寄与率を算出すると、消化管上皮細胞内に取り込まれた SASP の 79% が Bcrp によって管腔側へと汲み出され、29% が基底膜方向へ移行したと考えられた (Figure 15)。経口投与された SASP の 14% しか消化管上皮細胞内へと取り込まれなかったのは、SASP の溶解度が非常に低い ($0.0024 \mu\text{g/mL}$) ことにより [67]、投与された SASP の大部分が消化管内で溶け残っているためかもしれないと考えられた。

- ③ TPT の場合、Control 群、ZSQ 群、Ko143 群及び ZSQ + Ko143 群における Fa・Fg はそれぞれ 0.11 ± 0.03 、 0.23 ± 0.07 、 0.42 ± 0.10 及び 0.64 ± 0.20 であった (Table 8)。消化管上皮細胞内に取り込まれた TPT は FEX や SASP と異なり、P-gp と Bcrp による管腔側への汲み出しと基底側への吸収の 3 方向に分配される。したがって、ZSQ 群では上皮細胞内に取り込まれた TPT は eq. (14) に示すように、Bcrp による管腔側への汲み出しと門脈側への吸収に分配される。

$$\text{Fa} \cdot \text{Fg} : \text{Bcrp efflux} = 0.23 : 0.41 (= 0.64 - 0.23) \quad \text{eq. (14)}$$

同様に Ko143 群では eq. (15) に示すように、P-gp による管腔側への汲み出しと門脈側への吸収に分配される。

$$\text{Fa} \cdot \text{Fg} : \text{P-gp efflux} = 0.42 : 0.22 (= 0.64 - 0.42) \quad \text{eq. (15)}$$

以上の結果をまとめると eq. (16) に示すように、上皮細胞内に取り込まれた TPT の 3 方向への分配比を算出することができる。

$$\text{Fa} \cdot \text{Fg} : \text{P-gp efflux} : \text{Bcrp efflux} = 30 : 16 : 54 \quad \text{eq. (16)}$$

以上の結果より、Figure 15 に示すように、経口投与後、小腸上皮細胞内へと取り込まれた TPT は、16% が P-gp、54% が Bcrp によって管腔側へと汲み出され、30% が門脈側へと吸収されと考えられた。したがって、TPT の消化管トランスポーターによる管腔側への汲み出しは、Bcrp によって優先的に汲み出されと考えられた。Li らは、P-gp あるいは Bcrp を強制発現した MDCK 細胞を用いて輸送試験を行うことで、TPT の吸収過程では P-gp より Bcrp の寄与率が大きいことを報告しており [68]、本試験の結果と一致している。

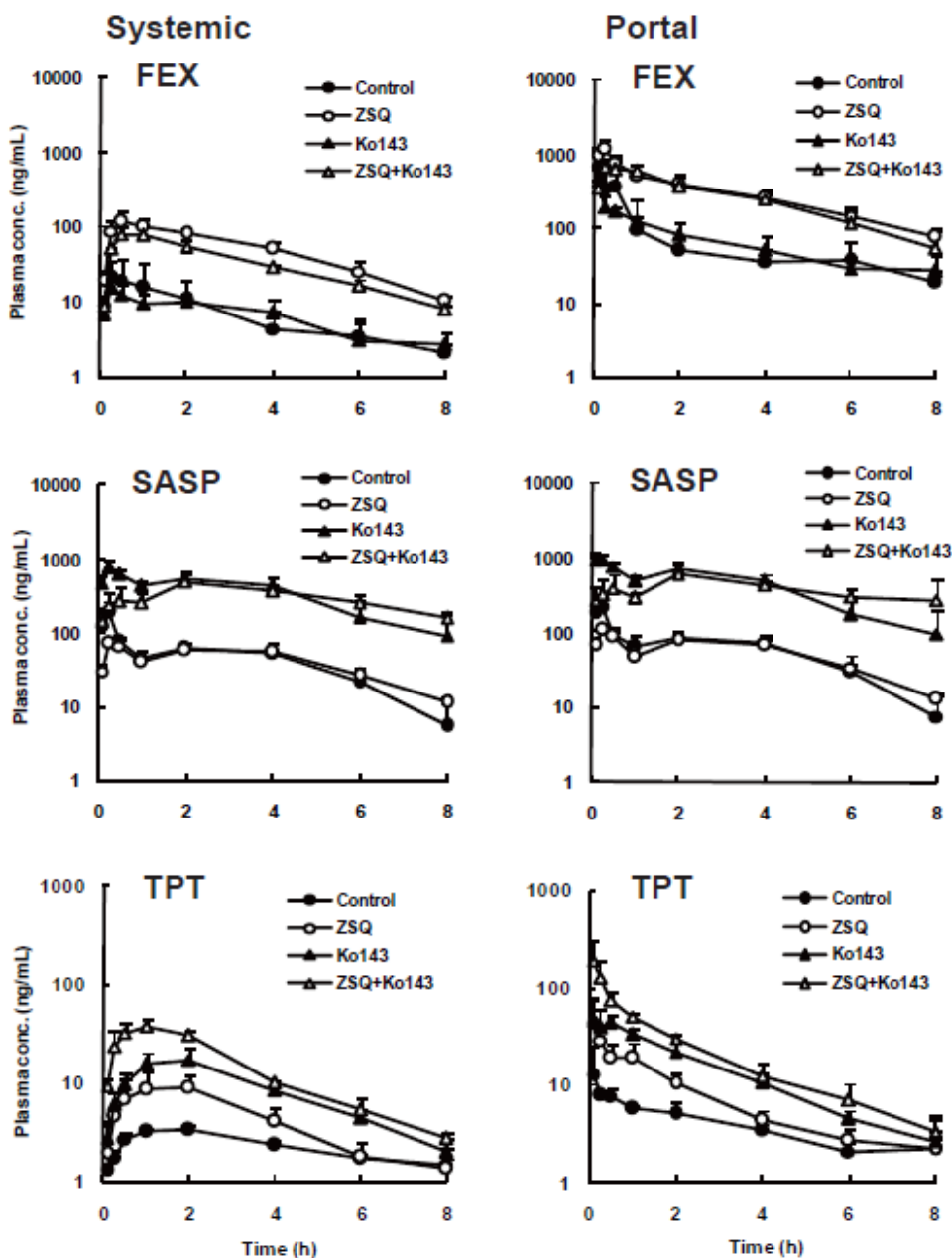


Figure 13. Systemic and portal plasma concentration-time profile of FEX (5 mg/kg), SASP (5 mg/kg) and TPT (0.3 mg/kg) after pretreatment with ZSQ (30 mg/kg) and/or Ko143 (10 mg/kg) in the portal vein cannulated rats.

The systemic plasma concentration-time profile of FEX (upper), SASP (middle) and TPT (lower) after pretreatment with ZSQ and/or Ko143. The portal plasma concentration-time profile of FEX, SASP and TPT after pretreatment with ZSQ and/or Ko143. Each symbol represents mean \pm S.D. for 3 to 5 rats.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Fig. 4

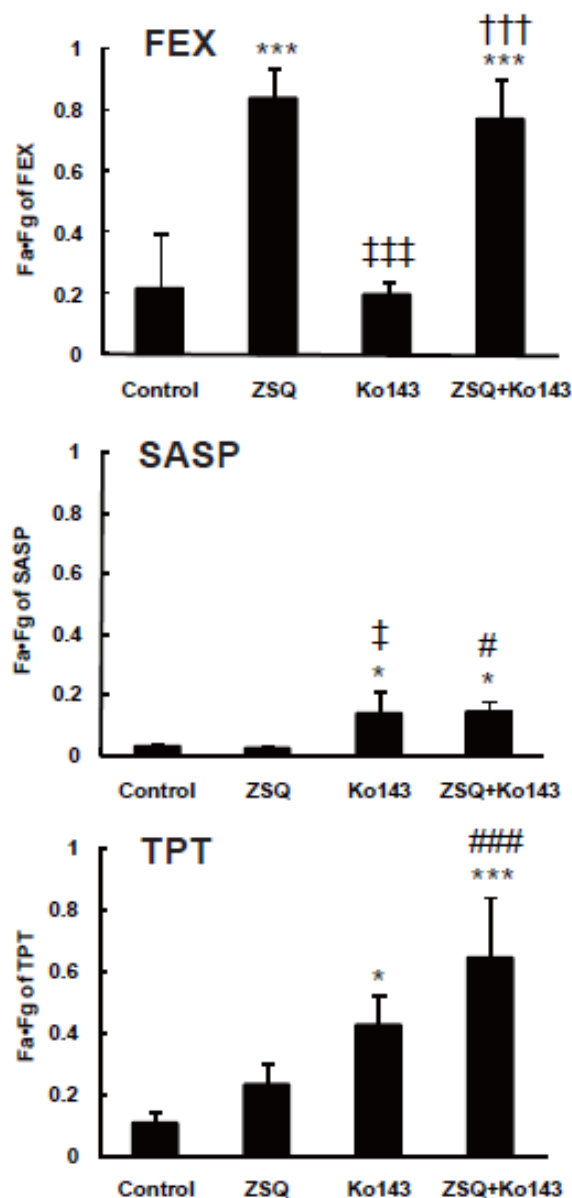


Figure 14. Comparison of Fa·Fg in FEX (5 mg/kg), SASP (5 mg/kg) and TPT (0.3 mg/kg) among vehicle, ZSQ (30 mg/kg), Ko143 (10 mg/kg) and ZSQ+Ko143 pretreated rats.

Upper, Fa·Fg of FEX 40 min after oral administration of ZSQ and/or Ko143; middle, Fa·Fg of SASP 40 min after oral administration of ZSQ and/or Ko143; lower, Fa·Fg of TPT 40 min after oral administration of ZSQ and/or Ko143. Each bar represents mean \pm S.D. for 3 to 5 rats. Statistically significant difference: *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, control versus ZSQ, Ko143 or ZSQ+Ko143; ‡, $P < 0.05$, ‡‡‡, $P < 0.001$, ZSQ versus Ko143; #, $P < 0.05$, ###, $P < 0.001$, ZSQ versus ZSQ+Ko143; †††, $P < 0.001$, Ko143 versus ZSQ+Ko143.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Fig. 5

Table 8. The systemic AUCs, portal AUCs and Fa·Fg of FEX (5 mg/kg), SASP (5 mg/kg) and TPT (0.3 mg/kg) after pretreatment with ZSQ (30 mg/kg) and/or Ko143 (10 mg/kg) in the portal vein cannulated rats.

| Substrate | Pretreatment | AUC _{sys} | AUC _{pv} | Rb | Fa·Fg |
|-----------|--------------|--------------------|-------------------|------|-------------------|
| | | <i>ng·h/mL</i> | <i>ng·h/mL</i> | | |
| FEX | Control | 59.9 ± 40.9 | 617 ± 490 | 0.99 | 0.22 ± 0.18 |
| | ZSQ | 431 ± 63*** | 2563 ± 286*** | | 0.84 ± 0.10*** |
| | Ko143 | 55.0 ± 19.7‡‡‡ | 565 ± 118‡‡‡ | | 0.20 ± 0.05‡‡‡ |
| | ZSQ + Ko143 | 284 ± 39***##††† | 2243 ± 330***††† | | 0.77 ± 0.13***††† |
| SASP | Control | 366 ± 37 | 499 ± 42 | 0.58 | 0.03 ± 0.01 |
| | ZSQ | 339 ± 29 | 443 ± 32 | | 0.02 ± 0.01 |
| | Ko143 | 2881 ± 646***‡‡‡ | 3492 ± 716***‡‡‡ | | 0.14 ± 0.07*‡ |
| | ZSQ + Ko143 | 2529 ± 549***### | 3146 ± 411***### | | 0.14 ± 0.04*# |
| TPT | Control | 18.3 ± 1.6 | 30.9 ± 1.5 | 1.26 | 0.11 ± 0.03 |
| | ZSQ | 36.2 ± 13.7 | 63.8 ± 19.4 | | 0.23 ± 0.07 |
| | Ko143 | 69.0 ± 17.5**‡ | 119 ± 18***‡‡ | | 0.42 ± 0.10* |
| | ZSQ + Ko143 | 122 ± 15***###††† | 200 ± 35***###††† | | 0.64 ± 0.20***### |

Values represent mean ± S.D. for 3 to 5 rats.

Statistically significant difference: *, P < 0.05, **, P < 0.01, ***, P < 0.001, control versus ZSQ, Ko143 or ZSQ+Ko143; ‡, P < 0.05, ‡‡, P < 0.01, ‡‡‡, P < 0.001, ZSQ versus Ko143; #, P < 0.05, ##, P < 0.01, ###, P < 0.001, ZSQ versus ZSQ+Ko143; †††, P < 0.001, Ko143 versus ZSQ+Ko143.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Table. 3

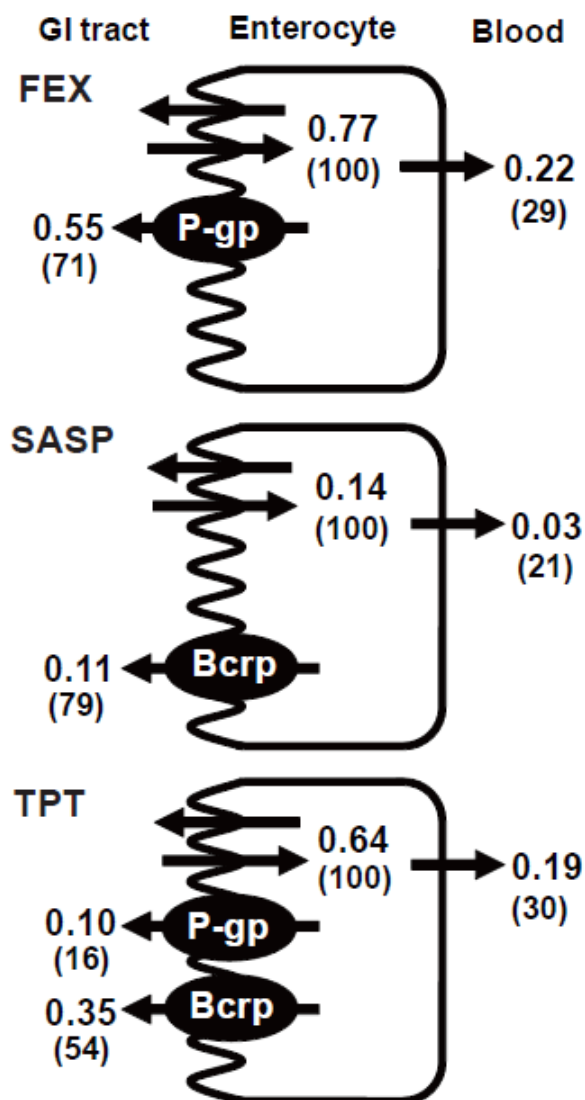


Figure 15. Schematic diagram of the impact of P-gp and Bcrp on intestinal absorption of FEX (upper), SASP (middle) and TPT (lower).

Values represent the fractions of influx, efflux and $F_a \cdot F_g$ when orally administered amount was regarded as 1, and values given in the parentheses represent the each fraction when influx into enterocytes was regarded as 100.

Drug Metab Dispos., 41, 1514-1521 (2013), Fig. 6

2.2 消化管代謝の寄与率評価

CYP3A は、ヒトの消化管に発現する CYP の約 80% を占め、多くの薬物の代謝反応に寄与していることが報告されている[69, 70]。ラットの消化管においても、CYP3A62、3A9 及び 3A18 が多く発現していることが明らかにされている[71]。ヒトの小腸に発現する CYP3A 含量は、肝臓と比較すると約 1% 程度であるが[72]、消化管における代謝は経口投与された薬物の初回通過効果に大きく寄与することが知られている[73, 74]。例えば、Ogasawara らは、サルに CYP3A の基質である midazolam を経口投与した場合、その大部分が消化管によって代謝されることを報告している[75]。発現レベルが低いにも関わらず、初回通過効果における消化管での寄与率が大きくなる要因としては、吸収されたほぼすべての薬物が消化管上皮細胞内に取り込まれてから血中に移行すること、および消化管表面積が非常に大きいことが考えられる。一方、UGT も重要な代謝酵素のひとつであり、医薬品の排泄過程の約 10% を占めている[76]。Mizuma らは、ヒトにおける raloxifene (RLX) の低 BA は、消化管に発現する UGT によるグルクロン酸抱合代謝が原因であることを報告している[37]。

消化管代謝の寄与率が大きい薬物は、低 BA となるだけでなく、薬物間相互作用によって、急激な血漿中濃度の増加を引き起こし重篤な副作用を引き起こす可能性がある。臨床的にも問題となるケースとして、グレープフルーツジュースに含まれる bergamottin や dihydrobergamottin といったフラノクマリン類が、消化管内を高濃度に暴露した場合、消化管の CYP3A を効率的に阻害するため、nifedipine や felodipine といった CYP3A の基質薬物の体内暴露を増加させることが明らかにされている[16, 77]。そのため、創薬の初期段階において消化管代謝の寄与率を評価することは、その後の医薬品開発において有用な情報となる。

本節では、まず、阻害剤を前処理した門脈カニューレラットに CYP 基質を経口投与し、門脈及び全身血漿中の未変化体及び代謝物濃度を測定することによって、消化管における CYP 代謝の寄与率を評価する方法 (Enzyme-inhibition method) に関する検討を行った。一方、UGT には強力な阻害剤が存在しないため、Enzyme-inhibition method を用いた寄与率の評価は困難である。そこで、門脈カニューレラットを用いた経口投与試験と *in situ* single-pass perfusion 試験を組み合わせることによって、消化管上皮細胞内で生成した代謝物量を間接的に算出し、消化管における UGT 代謝の寄与率を評価する手法 (Metabolite-distribution method) を新たに考案し、その妥当性を検討した (Figure 16)。本節では、CYP の阻害剤として 1-aminobenzotriazole (ABT) [78]、CYP 基質の薬物として midazolam (MDZ)、felodipine (FEL)、buspirone (BUS)、非代謝薬物として fexofenadine (FEX)、UGT 基質の薬物として raloxifene (RLX) をモデル薬物として使用した。

a) Enzyme-inhibition method b) Metabolite-distribution method

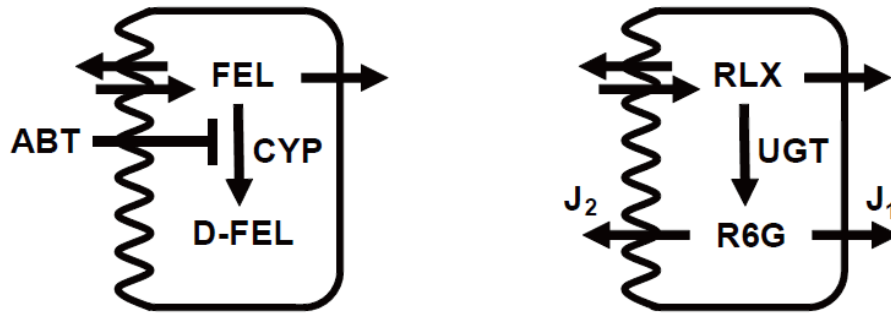


Figure 16 Schematic diagram of mechanism in enterocytes for **Enzyme-inhibition method (a)** and **Metabolite-distribution method (b)**. ABT, 1-aminobenzotriazole; FEL, felodipine; D-FEL, dehydrofelodipine; RLX, raloxifene; R6G, raloxifene-6-glucuronide; J₁, absorption rate of R6G; and J₂, secretion rate of R6G.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 1

2.2.1 消化管 CYP 代謝の寄与率評価法の検討: Enzyme-inhibition method

CYP3A と P-gp の基質認識性は類似しているため、CYP3A による代謝の寄与率の評価に用いる阻害剤は CYP3A の選択的な阻害剤であることが望ましい。そこで、門脈カニューレラットを ABT によって前処理した場合、CYP 代謝阻害以外の要因で薬物の吸収性が変化しないことを確認するために、P-gp の基質となるものの CYP 代謝を受けないことが知られている FEX を用いた検討を行った。その結果、Figure 17 に示すように、control 群及び ABT で前処理した門脈カニューレラットに FEX を経口投与した後の門脈及び全身血漿中濃度には、変化は認められなかった。また、血漿中濃度から算出した FEX の Fa・Fg は、control 群では 0.14 ± 0.01 、ABT 前処理群では 0.11 ± 0.04 と有意な差が認められなかったことから、ABT は CYP 代謝の選択的阻害剤として作用しており、P-gp 活性には影響を及ぼさないことが示された。

Sun らや Strelevitz らは、ABT の阻害作用が CYP 分子種に対しては非選択的であるものの、UGT 及び SULT といった抱合酵素や Oatp 及び P-gp といったトランスポーターに対して弱いことを報告しており[45, 78]、ABT の前処理は、薬物の能動輸送及び受動拡散に与える影響が少ないと考えられる。ABT は mechanism based inhibition (MBI) によって不可逆的に CYP を阻害し、ラットに 200 mg/kg 経口投与した場合、ABT の血漿中濃度は投与後 48 時間まで 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度が持続することが報告されている[79]。一方 Meschter らは、ラットを 100 mg/kg の ABT で前処理することによる副作用は認められないことを報告している[80]。そこで、本試験では、Strelevitz らと同様に、試験開始 18 時間前に ABT を 100 mg/kg で前処理することとした[45]。

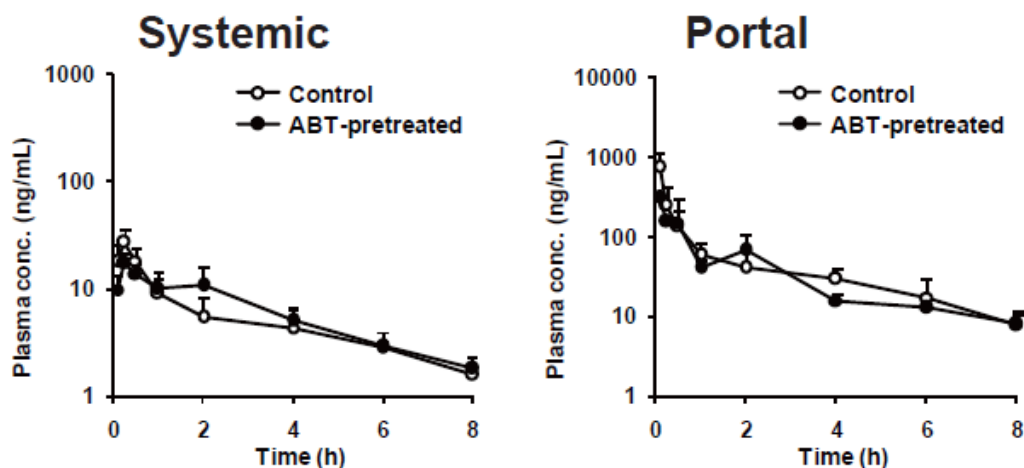


Figure 17. Systemic (left figure) and portal (right figure) plasma concentration-time profiles after oral administration of FEX (5 mg/kg) in control (○) and ABT- (●) pretreated rats.

Each value represents mean \pm S.D. for 3 to 4 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 2

Figure 18 に、control 群及び ABT を前処理した門脈カニューレラットに、CYP3A 基質のモデル薬物 (MDZ、FEL 及び BUS) を経口投与した際の門脈および全身血漿中濃度推移を示した。いずれの薬物も投与後、門脈血漿中濃度は速やかに上昇し、また、ABT 前処理群では control 群と比較して血漿中濃度の上昇、及び消失の明らかな遅延が認められた。Table 9 には、ABT 前処理群における $Fa \cdot Fg_{ABT}$ と control 群における $Fa \cdot Fg$ を示した。ABT 前処理によって CYP3A 基質薬物の $Fa \cdot Fg$ の増加が認められ、ABT が消化管での初回通過代謝を阻害したことが示唆された。しかし、未変化体濃度の変化だけでは、ABT が消化管代謝をどの程度阻害したのかを判断できないため、MDZ、FEL 及び BUS の主代謝物である 1-OH-MDZ、D-FEL 及び 6-OH-BUS の血漿中濃度を測定し、ABT 前処理による消化管代謝の阻害の程度を評価した。その結果、Figure 19 に示すように、control 群においては、投与直後より全身血に比べて門脈血中の代謝物濃度が高くなったのに対して、ABT 前処理群においては、門脈血と全身血の代謝物濃度はほぼ一致した。またこの時、ABT 前処理群では、代謝物の AUC にも門脈血 (AUC_{pv}) と全身血 (AUC_{sys}) の間の有意な差は認められなかった (Table 10)。代謝物の AUC_{pv} と AUC_{sys} の差は、消化管で生成された後、門脈へと到達した代謝物量に比例するため、いずれの薬物についても ABT 前処理は消化管代謝をほぼ完全に阻害したと考えられた。同様に、Takahashi らは、サルに ABT を処理することによって CYP3A 基質である verapamil や midazolam の消化管代謝がほぼ完全に阻害されることを報告している [81]。

以上の結果より、ABT を前処理した際の Fg_{ABT} は 1 と考えることができる。一方、FEX の結果より control 群と ABT 群の Fa には変化がないと仮定できるため、control 群における Fa 及び Fg は **eq. (17)**及び**(18)**によって算出される。

$$Fa = (Fa \cdot Fg_{ABT}) \quad \text{eq. (17)}$$

$$Fg = \frac{(Fa \cdot Fg)}{(Fa \cdot Fg_{ABT})} \quad \text{eq. (18)}$$

本手法を用いて算出した MDZ の Fg は 0.71 であった。Higashikawa らは、*in situ* mesenteric blood-correcting method で評価した場合、ラットにおける MDZ の Fg は 0.75 であることを報告している[82]。また、Hirunpanich らは、perfused everted intestinal segment study で評価した場合の MDZ の Fg は 0.57 であることを報告しており[83]、本試験の結果と一致している。さらに、**eq. (17)**より算出された FEX、MDZ、FEL 及び BUS の Fa 値は、Caco-2 細胞単層膜を用いて測定した薬物の膜透過性を反映した値と考えられた (Table 11)。

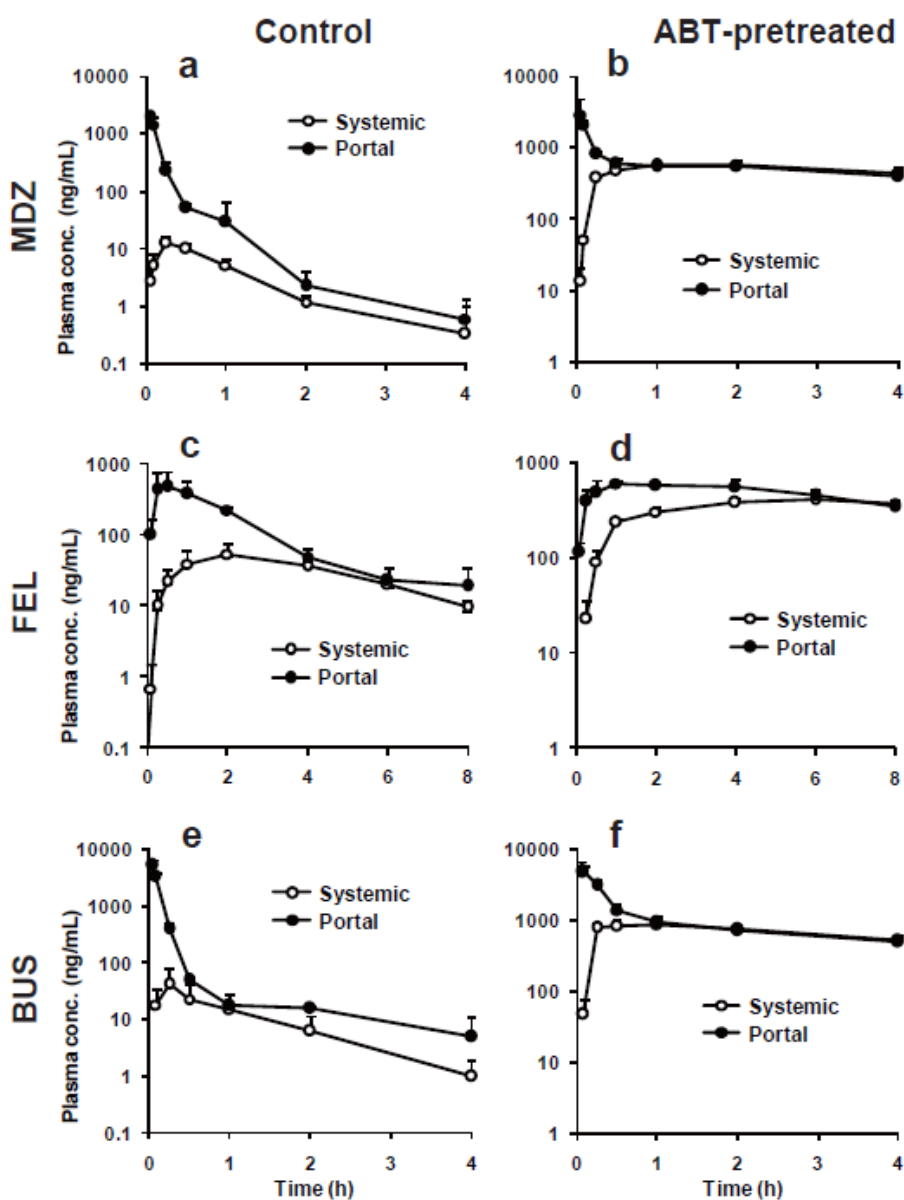


Figure 18 Systemic (○) and portal (●) plasma concentration-time profiles of MDZ, FEL and BUS after oral administration of MDZ (1 mg/kg), FEL (5 mg/kg), and BUS (3 mg/kg) in control and ABT-pretreated rats.

The plasma concentration-time profiles of MDZ (a), FEL (c) and BUS (e) in control rats. The plasma concentration-time profiles of MDZ (b), FEL (d) and BUS (f) in ABT-pretreated rats. Each value represents mean \pm S.D. for 3 to 4 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 3

Table 9. The systemic and portal AUCs and Fa·Fg of MDZ, FEL and BUS after oral administration of MDZ (1 mg/kg), FEL (5 mg/kg), and BUS (3 mg/kg) in control and ABT-pretreated rats.

| Compound | Control | | Fa·Fg | ABT-pretreated | | Fa·Fg _{ABT} |
|----------|------------------------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | AUC _{sys} (ng·h/mL) | AUC _{pv} (ng·h/mL) | | AUC _{sys} (ng·h/mL) | AUC _{pv} (ng·h/mL) | |
| MDZ | 12.8 ± 2.4 | 322 ± 84 | 0.74 ± 0.17 | 980 ± 109** | 1415 ± 67** | 1.05 ± 0.15 |
| FEL | 244 ± 63 | 1069 ± 316 | 0.24 ± 0.08 | 2613 ± 254** | 3968 ± 239** | 0.39 ± 0.03 |
| BUS | 41.0 ± 36.7 | 562 ± 61 | 0.30 ± 0.05 | 2826 ± 580** | 4134 ± 722** | 0.74 ± 0.09 |

Values represent mean ± S.D. for 3 to 4 rats.

**P < 0.01, as compared to control rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Table 1

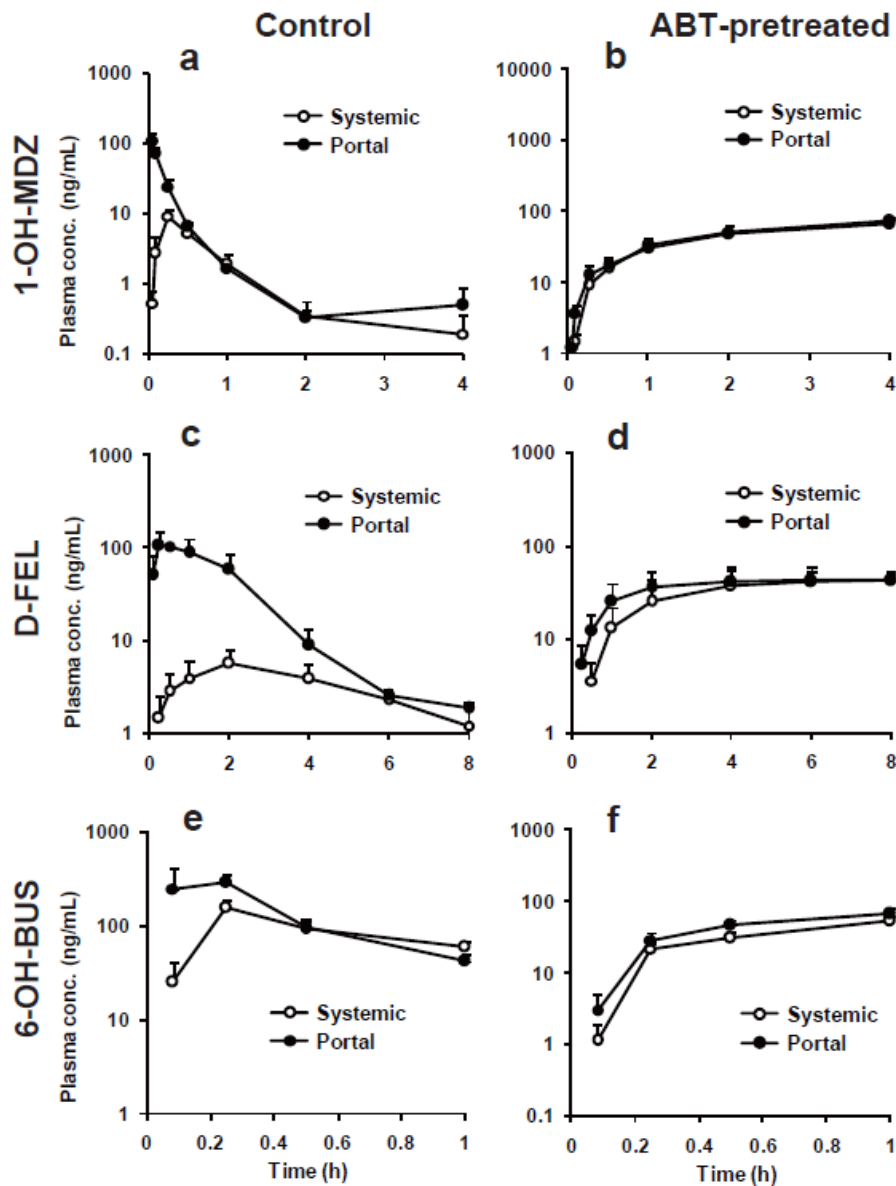


Figure 19 Systemic (○) and portal (●) plasma concentration-time profiles of 1-OH-MDZ, D-FEL and 6-OH-BUS after oral administration of MDZ (1 mg/kg), FEL (5 mg/kg), and BUS (3 mg/kg) in control and ABT-pretreated rats.

The plasma concentration-time profiles of 1-OH-MDZ (a), D-FEL (c) and 6-OH-BUS (e) in control rats. The plasma concentration-time profile of 1-OH-MDZ (b), D-FEL (d) and 6-OH-BUS (f) in ABT-pretreated rats. Each value represents mean \pm S.D. for 3 to 4 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 4

Table 10. The systemic and portal AUCs of 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ, D-FEL and 6-OH-BUS after oral administration of MDZ (1 mg/kg), FEL (5 mg/kg), and BUS (3 mg/kg) in control and ABT-pretreated rats.

| Metabolite Parameter | Interval (h) | Control | ABT-pretreated |
|------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| 1-OH-MDZ | | | |
| AUC _{sys} (ng·h/mL) | 0-4 | 6.34 ± 1.56 | 184 ± 33 |
| AUC _{pv} (ng·h/mL) | | 21.3 ± 3.0** | 172 ± 16 |
| D-FEL | | | |
| AUC _{sys} (ng·h/mL) | 0-8 | 26.1 ± 13.8 | 251 ± 118 |
| AUC _{pv} (ng·h/mL) | | 245 ± 60** | 289 ± 106 |
| 6-OH-BUS | | | |
| AUC _{sys} (ng·h/mL) | 0-0.5 | 46.9 ± 10.9 | 8.48 ± 1.67 |
| AUC _{pv} (ng·h/mL) | | 103 ± 33 | 12.1 ± 2.8 |

Values represent mean ± S.D. for 3 to 4 rats.

**P < 0.01, as compared to AUC_{sys}.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Table 2

Table 11 Fa·Fg, Fa and Fg of MDZ, FEL and BUS after oral administration of FEX (5 mg/kg), MDZ (1 mg/kg), FEL (5 mg/kg), and BUS (3 mg/kg) in the PV rats.

| Compound | Dose (mg/kg) | Fa·Fg | Fa | Fg | P _{app, caco-2} (10 ⁻⁶ cm/s) |
|----------|-----------------|-------------|-------------|------|---|
| FEX | 5 | 0.14 ± 0.01 | 0.11 ± 0.04 | 1.00 | 0.17 ^a |
| MDZ | 1 | 0.74 ± 0.17 | 1.05 ± 0.15 | 0.71 | 32.4 ^b |
| FEL | 5 | 0.24 ± 0.08 | 0.39 ± 0.03 | 0.61 | 4.2 ^b |
| BUS | 3 | 0.30 ± 0.05 | 0.74 ± 0.09 | 0.40 | 25.4 ^b |

Fg of FEX was assumed to be 1.

Values represent mean ± S.D. for 3 to 4 rats.

^a The data was obtained from a report by Petri N et al. [66]

^b The data was obtained from a report by Gertz M et al. [84]

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Table 3

2.2.2 消化管 UGT 代謝の寄与率評価法の検討: Metabolite-distribution method

UGT に対する強力かつ選択的な阻害剤はほとんど報告されていないため、CYP のように阻害剤を用いた Enzyme-inhibition method を UGT 基質の評価に適用することは困難である。そこで、消化管上皮細胞内で生成した代謝物量を算出することによって、消化管における UGT 代謝の寄与率を評価する手法 (Metabolite-distribution method) を考案した。Metabolite-distribution method では、まず門脈カニューレラットに基質薬物を経口投与し、小腸上皮細胞内で生成した代謝物のうち、門脈側へ移行した代謝物量を算出する。次に、*in situ* single-pass perfusion 法を用いて、小腸上皮細胞内で生成した代謝物が、門脈側と管腔側へ移行する割合を算出する。これらの試験結果より門脈側及び管腔側へ移行した総代謝物量を算出し、上皮細胞内で生成した代謝物量に等しいと仮定することで消化管での UGT 代謝の寄与率の評価を試みた。

本節で UGT 基質のモデル薬物として用いた RLX は、ラットの小腸ミクロソーム画分中の UGT のみで代謝され、4 あるいは 6 位の水酸基がグルクロン酸抱合された raloxifene-4'-glucuronide (R4'G) あるいは raloxifene-6-glucuronide (R6G) が生成する[20]。そこで、RLX 経口投与後に、小腸上皮細胞内で生成した R4'G 及び R6G のうち、門脈側へと移行した量を評価するために、門脈カニューレラットに RLX を経口投与し、R4'G、R6G 及び RLX の血漿中濃度を測定した。Figure 20 に示すように、門脈及び全身血漿中 R6G 濃度は RLX 濃度より高く、R4'G 濃度は R6G 及び RLX 濃度と比較して顕著に低い値であった。次に eq. (19) を用いて、小腸上皮細胞内から門脈側へと移行した R4'G 及び R6G の量を算出した。

$$(\text{代謝物の門脈側への移行量}) = Q_{pv} \times R_{b,met} \times (AUC_{pv,met} - AUC_{sys,met}) \quad \text{eq. (19)}$$

ここで、 $R_{b,met}$ 、 $AUC_{pv,met}$ 及び $AUC_{sys,met}$ はそれぞれ、代謝物 (R4'G または R6G) の血液/血漿中濃度比、経口投与後 8 時間までの門脈血漿中の代謝物 AUC、経口投与後 8 時間までの全身血漿中の代謝物 AUC を示す。その結果、消化管上皮細胞内で生成した R4'G 及び R6G のうち、門脈側へと移行した R4'G 及び R6G の量はそれぞれ 0.11 及び 1.43 $\mu\text{mol/kg}$ であった。本結果より、R4'G 量は R6G 量と比較して明らかに低くなり、また、ラットにおいて R4'G はマイナーな代謝物であることが報告されていることから[85]、以下の検討では R4'G への代謝の寄与を無視することとした。また、RLX を 0.98 $\mu\text{mol/kg}$ および 9.8 $\mu\text{mol/kg}$ の投与量で経口投与した場合の $F_a \cdot F_g$ は、それぞれ 0.15 ± 0.12 、 0.18 ± 0.03 であった (Table 12)。

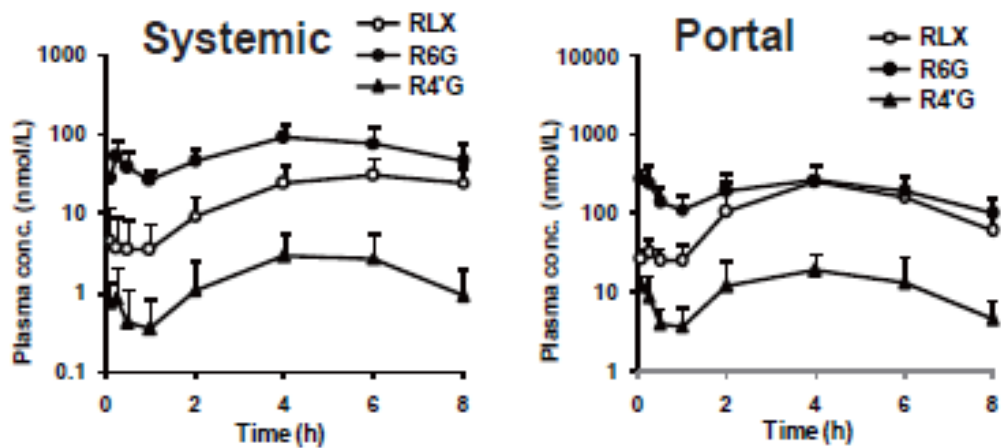


Figure 20. Systemic (left figure) and portal (right figure) plasma concentration-time profile of RLX (○), R6G (●), and R4'G (▲) after oral administration of RLX (9.8 μmol/kg) in the PV rats.

Each value represents mean ± S.D. for 5 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 5

Table 12. Systemic and portal AUCs and Fa·Fg of RLX after oral administration of RLX (0.98 and 9.8 µmol/kg) in the PV rats.

| Species | Compound / Metabolite | Dose (µmol/kg) | Dose Number | R _b | AUC _{sys} (nmol·h/L) | AUC _{pv} (nmol·h/L) | Absorbed metabolite (µmol/kg) | Fa·Fg |
|---------|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Rat | RLX | 0.98 | 8 | 0.96 | 8.27 ± 2.99 | 87.8 ± 63.3 | - | 0.15 ± 0.12 |
| | R6G | | | 0.70 | 47.6 ± 8.7 | 216 ± 80 | 0.23 ± 0.10 | - |
| | RLX | 9.8 | 80 | 0.96 | 153 ± 72 | 1089 ± 220 | - | 0.18 ± 0.03 |
| | R6G | | | 0.70 | 496 ± 137 | 1532 ± 193 | 1.43 ± 0.26 | - |
| | R4'G | | | 0.70 | 14.6 ± 6.8 | 95.9 ± 13.7 | 0.11 ± 0.01 | - |
| Human | RLX | 1.96 | 18 ^a | - | - | - | - | 0.034 ^b |

Values represent mean ± S.D. for 5 rats.

^a The data was obtained from a report by Benet LZ et al. [67]

^b The data was obtained from a report by Mizuma et al. [37]

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 5

消化管の上皮細胞内で生成された R6G のうち、管腔側への移行量は eq. (20)を用いて算出することができる。

$$(\text{R6Gの管腔側への移行量}) = (\text{R6Gの門脈側への移行量}) \times \frac{J_2}{J_1} \quad \text{eq. (20)}$$

ここで J_1 は R6G の門脈側への移行速度及び J_2 は R6G の管腔側への移行速度を示す。したがって、消化管上皮細胞内における R6G の生成量は eq. (21)として表わすことができ、RLX の Fg は eq. (22)を用いて算出することができる。

$$(\text{R6Gの生成量}) = (\text{R6Gの管腔側への移行量}) + (\text{R6Gの門脈側への移行量}) \quad \text{eq. (21)}$$

$$Fg = 1 - \frac{(\text{R6Gの生成量})}{(\text{経口投与したRaloxifeneの量})} \quad \text{eq. (22)}$$

次に、小腸上皮細胞内における R6G の門脈側と管腔側への分配比率 (J_2/J_1) を算出するために、*in situ* single-pass perfusion 試験を実施した。本試験において、 J_1 及び J_2 は、eq. (23)及び eq. (24)より算出することができる。ただし、eq. (23)では麻酔下開腹時における個体ごとの門脈血流量が必要となる。そこで、*in situ* single-pass perfusion 試験で用いた灌流液中に ANT を添加することにより、eq. (25)を用いて個体ごとの門脈血流量を算出した。その結果、門脈血流速度は、灌流開始 10 - 60 分において 17.1 - 22.4 mL/min/kg でありほぼ一定値を示した (Table 13)。

$$J_1 = Q_{pv,ANT} \times R_{b,R6G} \times (C_{pv,R6G} - C_{s,yR6G}) \quad \text{eq. (23)}$$

$$J_2 = Q_{lumen} \times C_{out,R6G} \quad \text{eq. (24)}$$

$$Q_{pv,ANT} \times R_{b,ANT} \times (C_{pv,ANT} - C_{sys,ANT}) = Q_{lumen} \times (C_{in,ANT} - C_{out,ANT}) \quad \text{eq. (25)}$$

ここで $Q_{pv,ANT}$ は eq. (25)より算出された門脈血流量、 Q_{lumen} は灌流速度、 $R_{b,R6G}$ は R6G の血液/血漿中濃度比、 $C_{pv,R6G}$ は門脈血漿中 R6G 濃度、 $C_{sys,R6G}$ は全身血漿中 R6G 濃度、 $C_{out,R6G}$ は回収した灌流液中 R6G 濃度、 $R_{b,ANT}$ は ANT の Rb 値、 $C_{pv,ANT}$ は門脈血漿中 ANT 濃度、 $C_{sys,ANT}$ は全身血漿中 ANT 濃度、 $C_{in,ANT}$ は灌流液中 ANT 濃度及び $C_{out,ANT}$ は回収した灌流液中 ANT 濃度を示す。

In situ single-pass perfusion 試験において、ANT を灌流することにより門脈及び全身血漿中の ANT 濃度はいずれも時間と共に増加したが、両濃度の差は一定値を示した。門脈及び全身血漿中濃度の差は消化管より吸収された薬物量に依存するため、ANT の消化管からの吸収は速やかに定常状態に達していると考えられた (Figure 21)。R6G の場合も、RLX を灌流することによって R6G の両濃度の差はほぼ一定値を示したため、小腸における RLX から R6G への代謝は速やかに定常状態に達していると考えられた (Figure 22)。

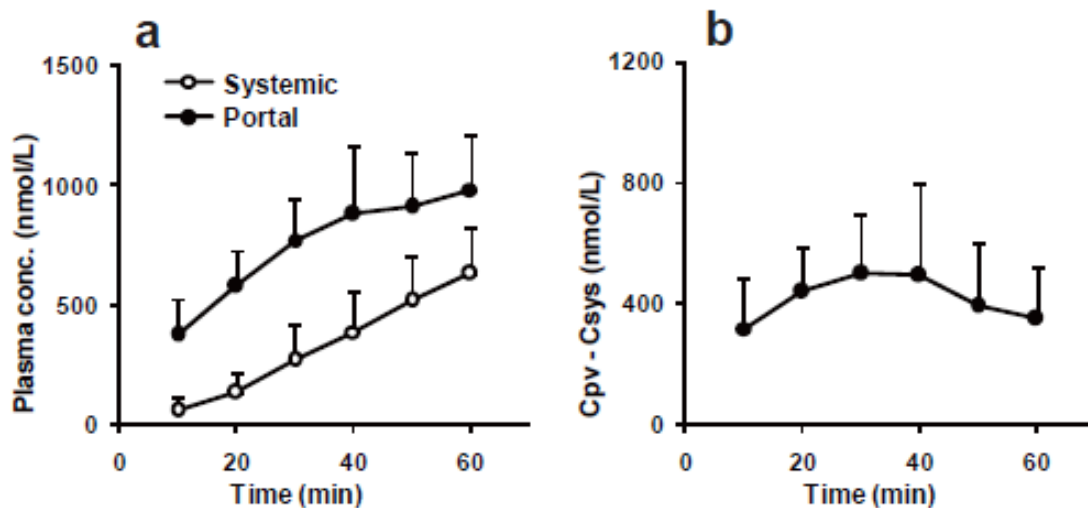


Figure 21. Systemic (○) and portal (●) plasma concentration-time profiles of ANT (a), and difference between systemic and portal plasma concentration of ANT (b) in a rat jejunal single-pass perfusion experiment.

Each value represents mean \pm S.D. for 7 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 6

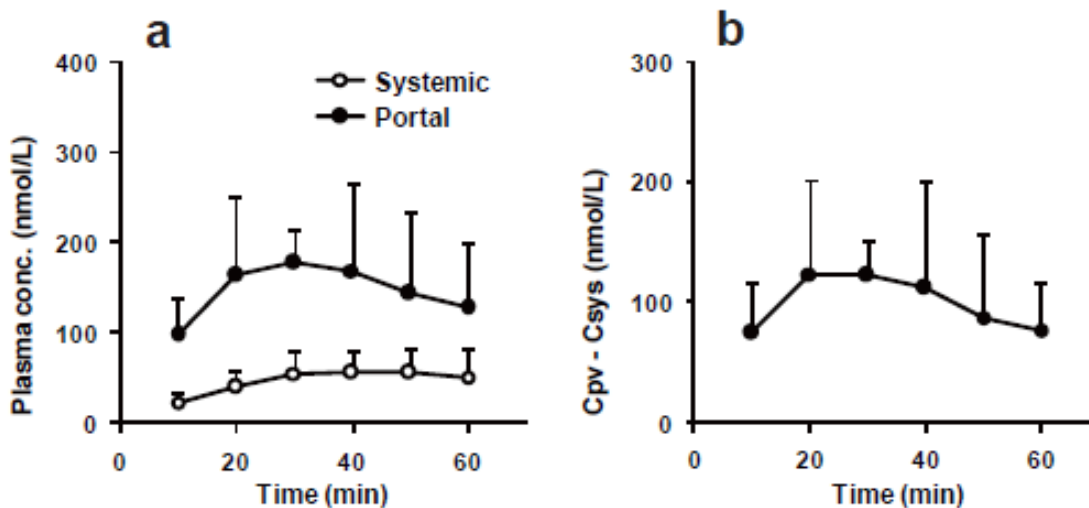


Figure 22. Systemic (○) and portal (●) plasma concentration-time profiles of R6G (a), and difference between systemic and portal plasma concentration of R6G (b) in a rat jejunal single-pass perfusion experiment.

Each value represents mean \pm S.D. for 7 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 7

Table 13. Calculated portal blood flow rates from perfusate and plasma concentrations of ANT in a rat jejunal single-pass perfusion experiment.

| Time | $C_{in, ANT} - C_{out, ANT}$ | $C_{pv, ANT} - C_{sys, ANT}$ | $Q_{pv, ANT}$ |
|------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| min | $\mu\text{mol/L}$ | nmol/L | mL/min/kg |
| 10 | 9.79 \pm 4.11 | 367 \pm 118 | 22.1 \pm 14.6 |
| 20 | 14.4 \pm 6.1 | 501 \pm 211 | 22.4 \pm 13.4 |
| 30 | 12.0 \pm 5.3 | 453 \pm 126 | 18.5 \pm 8.6 |
| 40 | 11.4 \pm 4.3 | 520 \pm 266 | 19.6 \pm 12.1 |
| 50 | 10.1 \pm 3.5 | 390 \pm 153 | 20.3 \pm 9.5 |
| 60 | 8.04 \pm 3.55 | 398 \pm 203 | 17.1 \pm 12.7 |

Values represent mean \pm S.D. for 7 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Table 5

Figure 22 に *in situ* single-pass perfusion 試験の結果より算出した小腸上皮細胞内での R6G の分配比率 (J_2/J_1) を示した。分配比は実験中ほぼ一定となり、R6G の管腔側への移行速度 (J_2) は門脈側への移行速度 (J_1) と比較して 2.33 倍速いことが明らかとなった。Nozawa らは、プロドラッグである temocapril を用いて、小腸上皮細胞内で加水分解により生成した temocaprilate が、門脈側よりも管腔側へ約 2 倍速い速度で移行することを報告している[86]。この要因として、絨毛構造の存在によって、管腔側の表面積が門脈側よりも大きくなっていることが挙げられる。一方、Ohura らは、同様の手法を用いて ethyl-fexofenadine を灌流した際、小腸上皮細胞内において加水分解によって生成した FEX は、門脈側よりも管腔側へ 4.6 倍速い速度で移行することを報告している[87]。これは、表面積の違いに加え、fexofenadine が P-gp によって能動的に管腔側に排出されたためと考えられる。R6G は Mrp2 の基質であることから管腔側への能動的な輸送の関与も考えられるものの[21]、その分配比が temocaprilate とほぼ同程度であったことから、トランスポーターの寄与は小さく、表面積の違いによって受動的に移行したものと推察された。

Table 14 に、今回考案した Metabolite-distribution method によって算出した RLX の Fa 及び Fg をまとめて示した。RLX を 0.98 及び 9.8 $\mu\text{mol/kg}$ の投与量でラットに経口投与した際の Fa・Fg には、変化が認められなかったものの、0.98 $\mu\text{mol/kg}$ 投与後の Fa 及び Fg はそれぞれ 0.74 及び 0.21 であったのに対し、9.8 $\mu\text{mol/kg}$ では 0.35 及び 0.51 であり、Fa 及び Fg それぞれの値は投与量によって有意に変化するという結果が得られた。この理由に関する考察を行うため、消化管内での薬物の溶解性の指標である dose number (RLX の溶解度は 0.013 mg/mL) を算出した[67]。RLX のヒトの臨床投与量 (1.96 $\mu\text{mol/kg}$) 及び今回用いた低投与量の 0.98 $\mu\text{mol/kg}$ における dose number はそれぞれ 18 及び 8 となりほぼ近い値であった。したがって、0.98 $\mu\text{mol/kg}$ における Fa (=0.74) は、ヒトにおける Fa (=0.63) [37]と近い値を示したと判断された。さらに Kosaka らは、UGT1a を欠損した Gunn rat を

用いた検討において、1.96 $\mu\text{mol/kg}$ で RLX を経口投与した際の Fa·Fg が 0.631 であることを報告している[21]。一方、9.8 $\mu\text{mol/kg}$ の場合の dose number は 80 と高値であったことから、高投与量で RLX を投与した場合、投与液濃度が溶解度より高くなるため、消化管内で速やかに析出が生じ、その結果 Fa が低下した可能性が考えられた。またこの時、消化管内での濃度が飽和溶解度近くまで高くなったために小腸上皮細胞内での UGT 代謝が飽和し、Fg が上昇したものと推察された。

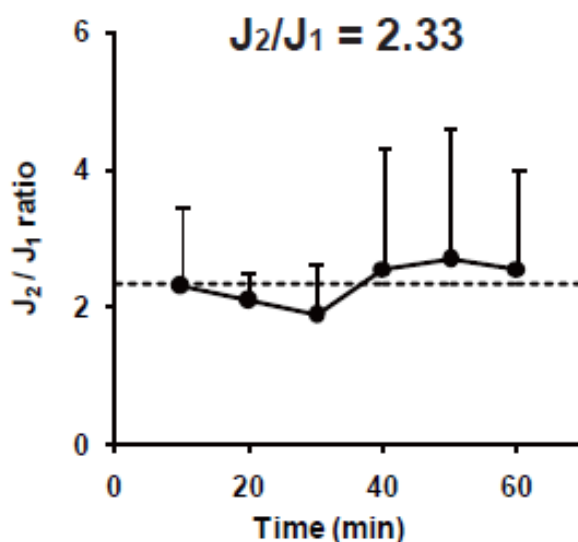


Figure 22. Proportion of absorption rate (J_1) to secretion rate (J_2) of R6G from enterocytes in a rat jejunal single-pass perfusion experiment.

Dotted line represented average value of J_2 / J_1 . The average J_2 / J_1 from 10 to 60 min was 2.33. Each value represents mean \pm S.D. for 7 rats.

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Fig. 8

Table 14. Fa·Fg, Fa, and Fg of RLX after oral administration of RLX in PV rats and human.

| Species | Dose ($\mu\text{mol/kg}$) | Fa·Fg | Fa | Fg |
|---------|--------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Rat | 0.98 | 0.15 \pm 0.12 | 0.74 | 0.21 |
| | 9.8 | 0.18 \pm 0.03 | 0.35 | 0.51 |
| Human | 1.96 | 0.034 ^a | 0.63 ^a | 0.054 ^a |

Values represent mean \pm S.D. for 5 rats.

^a The data was obtained from a report by Mizuma et al. [37]

Pharm Res., 32, 604-616 (2015), Table. 6

2.3 考察

本章では門脈カニューレ法を用いることで、薬物の消化管吸収における排泄型トランスポーターを介した輸送、及び小腸代謝の寄与率を定量的に評価する手法を構築した。これまで blood-brain barrier (BBB) を介した薬物の脳内移行における排泄型トランスポーターの寄与率を評価した報告は複数あるのに対して[53, 88]、消化管吸収における寄与率を評価した報告は少ない。その理由の一つとして、BBB の評価では脳内濃度から膜透過量を評価できるのに対して、消化管の評価では、全身血漿中濃度から吸収量を簡便に算出することが困難であることが挙げられる。Adane らは、ZSQ 及び Elacridar (P-gp 及び Bcrp 阻害剤) を用いて、カンプトテシン誘導体 (AR-67) の吸収に及ぼす消化管排泄型トランスポーターの寄与率を全身血中濃度から評価している[89]。しかしながら、全身血中濃度を用いた評価では、阻害剤併用時に全身クリアランスの変化を評価しなければならず、阻害剤の用量に応じて、評価薬物の静脈内投与試験を別個体ラットで実施する必要がある。阻害剤併用時の全身クリアランスは、それぞれのラットにおける阻害剤自体の体内動態や阻害剤に対する感受性等の違いによる影響を受けることから、別個体ラットで求めた全身クリアランスを用いた解析では、トランスポーターの寄与率に大きな誤差を生じる可能性がある。これに対し、本研究で用いた門脈カニューレ法では、阻害剤併用時の経口投与試験のみから消化管トランスポーターの寄与率を評価することができるため、全身クリアランスの個体間変動の影響受けない、という点で効率的かつ精度の高い手法と考えられる。

今回用いた各トランスポーターの基質薬物のうち、FEX のように P-gp のみによって汲み出される薬物の場合には ZSQ の前処理で増加した消化管吸収率が P-gp の寄与率に相当する。しかし、TPT のように P-gp と Bcrp の共通基質となる薬物では、一方のトランスポーターのみを阻害した場合には、もう一方のトランスポーターの寄与が相対的に大きくなるため、それぞれのトランスポーターの寄与率を正確に算出することが困難となる。De Vries ら及び Tang らは、P-gp 及び Bcrp の両方の基質である erlotinib 及び sunitinib を、P-gp あるいは Bcrp のいずれか一方のノックアウトマウスに投与した場合、野生型マウスと比較して脳内濃度に差が認められなかったのに対し、両トランスポーターをノックアウトしたマウスでは、脳内濃度の顕著な増加が認められたことを報告している[88, 90]。また Kodaira らは、片方のトランスポーターの機能が低下しても、共通基質の脳内暴露が急増しない仕組みを速度論的解析によって明らかとした[91]。したがって、複数のトランスポーターの基質となる薬物を用いる場合には、1 つのトランスポーターだけでなく、すべてのトランスポーターを阻害した際の吸収率の増加を評価する必要がある。

また、多くの阻害剤は、1 つのトランスポーターや代謝酵素のみでなく、複数の機能性蛋白質に対して阻害作用を示すことが報告されている。例えば、P-gp の阻害剤となる薬物として、ketoconazole、cyclosporin A、nelfinavir、itraconazole 及び clarithromycin などの報告があるが[92]、これら薬物は CYP あるいは BCRP などに対しても阻害活性を有することが知られている[93, 94]。したがって、薬物の吸収や体内動態に対する特定のトランスポーターや代謝酵素の寄与を定量的に評価する場合には、できる限り選択性の高い阻害剤を用いることが重要となる。本研究で用いた P-gp 阻害剤の ZSQ は

MRP、BCRP 及び CYP3A に対してほとんど阻害作用を示さないことが報告されている[63, 95]。また、BCRP の阻害剤として用いた Ko143 については、BCRP 阻害の IC₅₀ 値が、P-gp に対する IC₅₀ 値と比較して 10 倍以上低くなることが報告されている[96]。今後、薬物の吸収や体内動態における様々なトランスポーターや代謝酵素の影響を定量的に評価していくためには、それらに対して強力かつ選択的な阻害活性を有する一方、血流などの生理学的要因に対する影響の少ない阻害剤の開発が必須と考えられる。

肝臓での薬物代謝については、*in vitro* から *in vivo* を予測する様々な手法が構築され、PBPK モデルに基づく定量的な評価が可能となっている。一方、小腸における薬物代謝の解析を目的として、Yang らによって提案された Qgut model を始め、これまで様々な速度論的モデルが提案されている[97]。Qgut model は膜透過性及び代謝安定性の両方を考慮したモデルであるのに対し、Kadono らは小腸での代謝クリアランスのみから Fg を算出する手法として simplified intestinal availability (SIA) model を構築した[98]。しかし、SIA model は膜透過性の高い化合物のみ適用することができるモデルであり、溶解度の低い化合物の Fg を過大評価する可能性が考えられる。このように消化管内での代謝は、対象薬物の代謝安定性だけでなく、溶解性及び膜透過性、さらには消化管内での代謝酵素の発現の部位差など、多くの要因に影響を受けることから、動態的特性の異なる多くの薬物の *in vivo* での代謝率を定量的に評価できる方法論は未だ確立されていないのが現状である。

一方、本章で構築した Enzyme-inhibition method 及び Metabolite-distribution method では、それぞれ、門脈カニューレ法に選択的阻害剤による前処理、及び *in situ* single-pass perfusion 試験を組み合わせることによって、*in vivo* での小腸代謝率の定量的評価を可能とした。特に、小腸内で生成した代謝物の管腔側と門脈側への分配率から総代謝物量を算出する Metabolite-distribution method は、有効な阻害剤が報告されていない抱合代謝等の新たな評価法として、今後多くの薬物への適用が期待される。

従来、*in situ* single-pass perfusion 試験では、灌流部位の入口と出口の濃度差より吸収クリアランスが評価されてきた。しかし、灌流部位での濃度差は、小腸代謝あるいは小腸組織への吸着や蓄積で生じる可能性も考えられるため、吸収クリアランスを過大評価してしまう可能性がある。また、低吸収性の化合物については、灌流部位での濃度差を定量的に評価することが困難でありバラツキが生じやすい。本研究で構築した Metabolite-distribution method は、門脈カニューレラットを用いて *in situ* single-pass perfusion 試験を行うことで、門脈及び全身血漿中濃度の差から、灌流部位での吸収クリアランスを正確に算出することが可能である。また、吸収クリアランスを算出するためには、麻酔下開腹状態における門脈血流量が必要となるため、今回、ANT を評価薬物と共に灌流して個体ごとの門脈血流量を算出する手法を考案した。本手法を用いることで、血流速度の個体間差の影響を受けることなく、精度の高い評価が可能と考えられる。実際、ANT より算出した門脈血流量の平均値 (17.1 - 22.4 mL/min/kg) は、第 1 章で算出した無麻酔下における門脈血流量 (32.9 mL/min/kg) と比較して低い値であり、麻酔及び開腹によって血流量が有意に低下していることが示された。

創薬研究に門脈カニューレラットを活用し、候補化合物の吸収におけるトランスポーター輸送や小腸代謝の寄与率を評価できることは、低 BA の要因解析だけでなく、吸収メカニズムを把握する

上で有用な情報となる。ただし、消化管トランスポーター及び代謝に関して、ラットとヒトで種差があることは注意する必要がある。Nishimutaらは、ラットの小腸マイクロソーム画分が、ヒトに比べて酸化代謝の活性が低いことを報告している[99]。また、消化管に発現する P-gp は、ヒトとラットにおいて基質認識性が異なることも報告されている[100]。したがって、ヒトにおける吸収性をできるだけ早い段階で予測するためには、まず、ラットを用いて候補化合物の吸収メカニズムを明らかとした後、種差に関する情報を十分に収集、蓄積することが重要と考えられる。

結論

以上 2 章にわたり、門脈カニューレラットを用いた *in vivo* における消化管吸収率の評価法を構築し、消化管トランスポーター及び消化管代謝の寄与率評価を可能にすることで、以下の結論を得た。

第 1 章 門脈カニューレラットを用いた消化管吸収率評価法の構築

日本チャールス・リバー株式会社との共同開発により、新規術式による門脈カニューレラットを作製し、無麻酔下で経時的な門脈及び全身血の同時採血が可能となった。新規術式で作成した門脈カニューレラットにおいて、十分な回復期間（術後 9 日間）後の各種生理的、生化学的パラメーター（体重推移、血液学的パラメーター等）に異常値は認められなかった。また、肝血流量依存型薬物（lidocaine）及び肝代謝能依存型薬物（antipyrine）を静脈内投与した際の体内動態に、無処置のラットと有意な違いは認められず、肝血流量及び肝代謝能に及ぼす手術の影響は極めて小さいと考えられた。

門脈カニューレラットを用いることで、門脈及び全身血漿中の薬物濃度を測定し、薬物の $Fa \cdot Fg$ を算出することができる。また、門脈及び全身血漿中濃度の差は吸収量に依存するため、薬物の吸収量を経時的に把握することができる。そこで、様々な市販薬物を門脈カニューレラットに経口投与して $Fa \cdot Fg$ を評価した結果、それぞれの物理化学的性質や動態特性に従った血漿中濃度推移と $Fa \cdot Fg$ を得ることができた。また、本手法を用いることにより、従来の評価法では必要であった静脈内投与のデータを必要とせず、経口投与のデータのみから $Fa \cdot Fg$ の算出が可能となった。また、従来の評価法では、使用する血流量値の違いによって算出された $Fa \cdot Fg$ が大きく異なっていたのに対して、門脈カニューレ法では、血流量値の違いに起因した $Fa \cdot Fg$ のばらつきは小さくなることが示された。以上の結果より、本手法は経口投与された薬物の $Fa \cdot Fg$ を簡便かつ正確に算出するための *in vivo* 評価法として有用であると考えられた。

第 2 章 消化管トランスポーター及び消化管代謝の寄与率評価法の構築

薬物経口投与後の BA に及ぼす消化管代謝やトランスポーターの影響を調べる方法の一つとして、特異的な阻害剤の併用投与法が用いられる。しかし、阻害剤を経口投与した場合、阻害剤自体が消化管から吸収され、基質薬物の全身からの消失クリアランスにも影響を及ぼす可能性がある。従来、その様な場合には、基質薬物の全身血漿中濃度の変化のみから、BA に及ぼす消化管代謝やトランスポーターの寄与率を評価することが困難とされてきた。一方、門脈カニューレ法では、全身クリアランスに関係なく、 $Fa \cdot Fg$ を算出できることから、阻害剤併用投与法の有効な利用が可能と考えられた。そこで、小腸に発現する排泄型トランスポーターである P-gp 及び Bcrp の選択的阻害剤を門脈カニューレラットに経口的に前投与し、基質薬物の吸収に及ぼす消化管 P-gp 及び Bcrp の寄与率を算出した。その結果、消化管上皮細胞内に取り込まれた薬物のうち、P-gp 基質の

fexofenadine では約 55%が、Bcrp 基質の sulfasalazine では約 79%が、それぞれトランスポーターによって管腔側へと汲み出されるため、経口投与後の $F_a \cdot F_g$ が低くなることが示された。また、それぞれの阻害剤を組み合わせることにより、topotecan (P-gp/Bcrp 基質) の吸収を評価したところ、消化管上皮細胞内に取り込まれた topotecan のうち、16%が P-gp によって、54%が Bcrp によって汲み出されていることが明らかとなった。

消化管代謝の評価において、CYP の様に選択的阻害剤が利用できる場合には、阻害剤と基質薬物を門脈カニューレラットに併用投与することにより、消化管代謝率の算出が可能であった (Enzyme-inhibition method)。一方、UGT の様に強力な阻害剤が存在しない酵素による代謝率を評価する手法として、新たに Metabolite-distribution method を考案した。本手法では、門脈カニューレラットを用いた経口投与試験と *in situ* single-pass perfusion 試験を組み合わせ、消化管上皮細胞内で生成した代謝物量を間接的に見積もることにより F_g を算出することが可能である。本手法を用いて UGT 基質である raloxifene を評価したところ、経口投与 (0.98 $\mu\text{mol/kg}$) 後の $F_a \cdot F_g$ が 0.15 と低値を示した理由として、消化管における UGT 代謝の寄与率 ($F_g = 0.21$) が高いことを明らかとした。

以上、門脈カニューレラットを用いた消化管吸収率 ($F_a \cdot F_g$) の評価法を構築し、さらには $F_a \cdot F_g$ に対する消化管トランスポーターと消化管代謝の寄与率を評価することで、 F_a 及び F_g の分離評価を可能とした。これにより、創薬初期段階において課題とされてきた *in vivo* における低 BA の要因解析ができるようになり、創薬研究の迅速化への貢献が期待できると考えられた。さらに、本研究によって得られた成果は、医薬品候補化合物のヒトにおける体内動態を予測し、薬物間相互作用の可能性を早期に検証する上で、極めて有用な知見であると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部薬剤学教室 山下伸二 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文を作成するにあたり、親身なるご指導を賜りました京都薬科大学 薬物動態学分野 栄田敏之 教授に心より感謝致します。

本研究を始めるにあたり、有益なご指導とご助言をいただきました田辺三菱製薬株式会社 久米俊行 博士、大鵬薬品工業株式会社 久世治朗 博士、日本チャールス・リバー株式会社 森崎邦彦 氏に絶大なる感謝の意を表します。

本研究遂行の機会を与えて戴き、著者の研究活動にあらゆる面でのご支援をいただきました科研製薬株式会社 新薬創生センター長 島野正直 博士、科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部 部長 箕輪賢治 氏、科研製薬株式会社 経営企画部 薩川正広 博士に多大なる感謝の意を表します。

本研究の実施に際し、学術的、技術的なご指導を終始戴きました科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部 今野芳浩 博士に深く感謝致します。本研究に関し、ご協力を戴きました科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部 探索グループの皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究の期間中、精神面や健康面などすべての面において、著者を支えてくれた妻と子供達に親愛と感謝の意を表します。

実験の部

第1章 実験の部

[1] 試験材料

Indomethacin、midazolam、antipyrine、lidocaine 及び famotidine は和光純薬工業(株)から、felodipine、sulpiride、raloxifene 及び fexofenadine は Sidma-Aldrich 社から、1-hydroxylation of midazolam 及び 4-hydroxylation of tolbutamide は Toronto Research Chemicals 社から、4-hydroxylation of mephentoin は Ultrafine Chemicals 社から購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

[2] 門脈カニューレーション手術

Ketamine (42.9 mg/kg) 及び xylazine (8.2 mg/kg) の混合麻酔液を腹腔内に投与し、麻酔下で腹部及び頸背部を剃毛し、イソジン液及び70%エタノール液を用いて術野を消毒した。腹部及び頸部皮膚を切開後、脾静脈と門脈の合流を目視で確認し、門脈を剥離露出させた。肝臓側に7-0プロリオン縫合糸で巾着縫合をかけ、その上流に4-0シルクブレードを1本かけ、シルクブレードの両端を交差して血流を遮断した。巾着縫合の中央をマイクロ剪刀にて切開し、速やかにラップ状にしたカテーテルを挿入し、巾着縫合の両端を縛ってカテーテルを固定した。血流を再開して吻合部から出血がないことを確認後、腹側の皮下から頸背部皮下へカテーテルを誘導し腹部筋層とカテーテル体外露出部分を4-0シルクブレードで縫合した。腹部皮膚とカテーテル体外露出部分をクリップにて縫合した。

[3] 血液 / 血漿 濃度比の測定

4匹の門脈カニューレラットの腹部大動脈より採血した血液をプールし、1 mLずつ分注したのち、37°Cに加温した。血液1 mLに対して100 µg/mL被験物質メタノール溶液(最終濃度100 ng/mL)を1 µL添加し転倒混和したのち、15分間37°Cにてインキュベートした。インキュベート後、速やかに4°C、14000×g、15分間の条件で遠心分離し血漿を得た。血漿中被験物質濃度はLC-MS/MSを用いて定量した。

[4] 血液生化学パラメーターの測定

-30°Cに凍結保存した門脈カニューレーションラット(術後1及び9日目)及び無処置のラットの血漿を室温で融解させ、生化学自動分析装置を用いて、血漿中AST (aspartate aminotransferase activity)、ALT (alanine aminotransferase activity)、TP (total protein concentration)、TBIL (total bilirubin concentration)、ALB (albumin concentration)、TCHO (total cholesterol concentration)、TG (triglyceride concentration) 及びGLU (glucose concentration) を測定した。

[5] 血液学的検査

門脈カニューレラット（術後 9 日目）及び正常ラットの腹部大動脈より採血した血液を約 1 時間、室温で放置したのち、自動血球計数装置を用いて、血液中 RBC（赤血球数）、WBC（白血球数）、HCT（ヘマトクリット値）及び PLT（血小板数）を測定した。

[6] 血漿中 α 1-AGP 濃度の測定

-30°C に凍結保存した門脈カニューレラット（術後 1 及び 9 日目）及び無処置のラットの血漿を室温で融解させ、Rat AGP ELISA kit を用いて、血漿中 α 1-AGP 濃度を測定した。Rat AGP ELISA kit は、Rat α 1-AGP 抗体をコーティングしたプレートを用いて、horseradish peroxidase を利用した α 1-AGP のタンパク定量用キットである。

[7-1] 肝ミクロソーム画分の調製

門脈カニューレラット及び無処置のラットより摘出した肝臓を用いて、肝ミクロソーム画分を調製した。摘出した肝臓に 5 倍量の氷冷した 1.15% 塩化カリウム溶液を加え、氷上にてポッター型テフロンガラスホモジナイザーを用いてすり潰し、冷却遠心機で遠心（4°C、9000×g、20 分間）後、さらに上清を分離用超遠心機で遠心（4°C、101000×g、60 分間）した。得られた沈殿物をガラスホモジナイザーで 0.1 mol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）と共に再懸濁させ肝ミクロソーム画分とした。

[7-2] 肝ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 代謝試験

シリコンコート済チューブに 0.25 mmol/L EDTA/0.25 mol/L リン酸カリウム緩衝液（pH7.4）20 μ L、蒸留水 19.5 μ L、基質溶液 0.5 μ L、調製したラット肝ミクロソーム溶液（反応系での終濃度: 1.0 mg 蛋白質/mL）5 μ L を添加し、設定温度 37°C の恒温槽で 5 分間のプレインキュベーションをした。なお、基質終濃度は 10 μ mol/L（tolbutamide 及び mephenytoin）及び 10 μ g/mL（midazolam）と設定した。

プレインキュベーション後、NADPH 再生成系（反応系での終濃度: NADP 2.5 mmol/L、G6P 25 mmol/L、G6PDH 2 units/mL、塩化マグネシウム 10 mmol/L）5 μ L を添加し、反応を開始した。20 分（midazolam）及び 60 分（tolbutamide 及び mephenytoin）後に内標準物質を含むメタノール溶液を 200 μ L 添加して反応を停止した。なお、コントロール群は NADPH 生成系を添加せずに、20 分（midazolam）及び 60 分（tolbutamide 及び mephenytoin）後に内標準物質を含むメタノール溶液を 200 μ L 添加した後、NADPH 生成系 5 μ L を添加した。

反応を停止した溶液を遠心分離（25°C、14000×g、10 min）して上清を PP 製バイアルに移し、代謝物である 1-OH-midazolam、4-OH-tolbutamide 及び 4-OH-mephenytoin を LC-MS/MS 測定実測試料とした（各群 N=4）。

[8] 肝血流量の測定

摂食条件下、無処置のラットを2-3%のイソフルランで麻酔する。麻酔下で開腹し、transit-time式超音波血流測定装置の専用プローブを門脈及び肝動脈にあて、肝臓に流入する肝血流量をモニターした。肝血流量をモニターしている間は、腹部にラップを巻き白熱球を用いて体温を維持した。ラットの直腸に体温計をあて、試験中に体温の低下がなかったことを確認した。

[9-1] 静脈内投与液の調製 (1 mg/mL/kg 用投与液)

100 mg/mLの各被験物質を含むジメチルスルホキシド溶液 100 μ Lに、Cremophor EL/ エタノール (1:1) 混液を500 μ L加え、振盪攪拌した。さらに9400 μ Lの生理食塩液を加えて振盪攪拌し、超音波処理により溶解し、1 mg/mL溶液とした。投与液は用時調製し、調製後に目視により溶解したことを確認した。0.1及び0.3 mg/mL/kg用投与液についても、同様に調製した。

[9-2] 経口投与液の調製 (5 mg/5 mL/kg 用投与液)

被験物質10 mgを秤量し、メノウ乳鉢に移した。0.5 w/v%メチルセルロース溶液を徐々に加え、メノウ乳棒で磨り潰した。0.5 w/v% MC溶液で共洗いをを行い10 mLにメスアップした後、超音波処理し懸濁液を調製した(1 mg/mL)。投与液は用時調製し、調製後に目視により均一に懸濁したことを確認した。0.3及び1 mg/5mL/kg用投与液についても同様に調製した。

[10] 投与及び採血

静脈内投与は、2-3%イソフルラン麻酔下で実施した。一晚(約18時間)絶食したラットの左後肢の皮膚をハサミで切り大腿静脈を露出させ、1 mLシリンジ及び27 Gの注射針を用いて投与した。静脈内投与後、尾静脈を片刃カミソリで切り、マイクロピペットを用いて尾静脈から採血した。静脈内投与後の採血時点は、投与後5、15、30分、1、2、4、6、8時間とした。採血量は各時点100 μ Lとした。

経口投与は無麻酔下で実施した。一晚(約18時間)絶食したラットを片手で保定し、2.5 mLシリンジ及び経口ゾンデを使用し、胃内へ強制投与した。経口投与後、無麻酔下でラットの頸背部より出たカテーテルに22 Gの注射針を繋ぎ1 mLシリンジで引くことにより門脈血を採血した。カテーテル内の容量が約80 μ Lであるため、採血した最初の100 μ Lを廃棄し、1 mLシリンジを繋ぎ変えて採血した100 μ Lを濃度測定用の血液とした。採血後、ヘパリンナトリウム含有生理食塩液(10 unit/mL)でカテーテル内をフラッシングしたのち、ただちに尾静脈を片刃カミソリで切り、マイクロピペットを用いて尾静脈から採血した。経口投与後の採血時点は、投与後5、15、30分、1、2、4、6、8時間とした。Indomethacinは投与後1及び3分、antipyrene、midazolamは投与後3分の採血を追加した。採血量は門脈血及び尾静脈血共に各時点100 μ Lとした。

採取した血液はヘパリンナトリウム注射液(1000単位/mL) 5 μ Lを添加したチューブに移し、遠心分離(4 $^{\circ}$ C、14000 \times g、10 min)して血漿を得た。血漿は設定温度-30 $^{\circ}$ Cのフリーザーで凍結保存した。

[11] 薬物濃度測定

薬物を含む測定試料 20 μL 、内標準溶液（100 ng/mL verapamil のメタノール溶液） 20 μL 、メタノール 60 μL を 1.5 mL 容 PP 製微小遠心管中に混合し、十分攪拌した後に遠心分離（20 $^{\circ}\text{C}$ 、14000 $\times\text{g}$ 、10 min）した。その上清 50 μL を 300 μL 容サンプルバイアルに移し、LC-MS/MS 測定実測試料とした。

ラットブランクプール血漿 20 μL 、内標準溶液 20 μL 、各濃度の被験物質メタノール溶液（濃度 0 はメタノールのみ） 20 μL 及びメタノール 40 μL をチューブに入れ、測定試料と同様に処理した試料を検量試料とした。なお、定量範囲を超える試料は適宜ラットブランクプール血漿を用いて希釈し測定に用いた。

[12] LC-MS/MS 測定条件

・ HPLC 条件

| | |
|----------|--|
| 分析カラム: | Capcellpak C18 ACR （1.5 mm I.D. \times 35 mm、粒子径 3 μm ） YMC-Tiart C18 （2.0 mm I.D. \times 30 mm、粒子径 3 μm ） （Antipyrine 及び lidocaine の測定には YMC-Tiart C18 を使用） |
| 移動相 A: | 0.1 vol% ギ酸水溶液 |
| 移動相 B: | メタノール |
| カラム温度設定: | 40 $^{\circ}\text{C}$ |
| 注入量: | 15 μL |

・MS 条件

| Compound | Precursor Ion (m/z) | Product Ion (m/z) | Collision Energy (V) | Ion Charge |
|------------------|---------------------|-------------------|----------------------|------------|
| Indomethacin | 360.4 | 141.0 | 22 | Positive |
| Midazolam | 326.1 | 291.1 | 25 | Positive |
| Felodipine | 384.1 | 338.0 | 13 | Positive |
| Sulpiride | 342.2 | 112.2 | 27 | Positive |
| Raloxifene | 474.2 | 112.1 | 27 | Positive |
| Famotidine | 403.1 | 165.0 | 20 | Positive |
| Fexofenadine | 502.3 | 466.3 | 25 | Positive |
| Lidocaine | 235.2 | 86.1 | 17 | Positive |
| Antipyrine | 189.1 | 77.1 | 35 | Positive |
| 1-OH-midazolam | 342.1 | 203.1 | 40 | Positive |
| 4-OH-tolbutamide | 287.1 | 88.9 | 40 | Positive |
| 4-OH-mephenytoin | 235.0 | 150.0 | 25 | Positive |
| Verapamil (IS) | 455.2 | 165.1 | 29 | Positive |

[13] 定量値の算出

LC-MS/MS 測定濃度計算には「LCquan」 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。検量試料のピークエリア比 (測定対象化合物/内標準物質) を直線回帰することにより検量線を作成し ($y = ax + b$, 重み付け $1/y$)、得られた検量線から濃度を算出した。

第2章 実験の部

[1] 試験材料

Midazolam 及び antipyrine は和光純薬工業 (株) から、buspirone、felodipine、sulfasalazine、raloxifene fexofenadine 及び ketoconazole は Sidma-Aldrich 社から、topotecan は LTK Laboratories 社から、zosuquidar は Diverchim 社から、Ko143 は Enzo Life Sciences 社から、1-aminobenzotriazole は東京化成工業 (株) から、1-hydroxylation of midazolam、dehydrofelodipine、6-OH-buspirone、raloxifene-4'-glucuronide、及び raloxifene-6-glucuronide は Toronto Research Chemicals 社から購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

[2] 門脈カニューレーション手術

Ketamine (42.9 mg/kg) 及び xylazine (8.2 mg/kg) の混合麻酔液を腹腔内に投与し、麻酔下で腹部及び頸背部を剃毛し、イソジン液及び 70%エタノール液を用いて術野を消毒した。腹部及び頸部皮膚を切開後、脾静脈と門脈の合流を目視で確認し、門脈を剥離露出させた。肝臓側に 7-0 プロリオン縫合糸で巾着縫合をかけ、その上流に 4-0 シルクブレードを 1 本かけ、シルクブレードの両端を交差して血流を遮断した。巾着縫合の中央をマイクロ剪刀にて切開し、速やかにラッパ状にしたカテーテルを挿入し、巾着縫合の両端を縛ってカテーテルを固定した。血流を再開して吻合部から出血がないことを確認後、腹側の皮下から頸背部皮下へカテーテルを誘導し腹部筋層とカテーテル体外露出部分を 4-0 シルクブレードで縫合した。腹部皮膚とカテーテル体外露出部分をクリップにて縫合した。

[3] 血液 / 血漿 濃度比の測定

4 匹の門脈カニューレラットの腹部大動脈より採血した血液をプールし、1 mL ずつ分注したのち、37°C に加温した。血液 1 mL に対して 100 µg/mL 被験物質メタノール溶液 (最終濃度 100 ng/mL) を 1 µL 添加し転倒混和したのち、15 分間 37°C にてインキュベートした。インキュベート後、速やかに 4°C、14000×g、15 分間の条件で遠心分離し血漿を得た。血漿中被験物質濃度は LC-MS/MS を用いて定量した。

[4-1] 静脈内投与液の調製 (Fexofenadine 1 mg/2 mL/kg 及び zosuquidar 2 mg/2 mL/kg 用投与液)

100 mg/mL の fexofenadine を含むジメチルスルホキシド溶液 100 µL に、Cremophor EL/ エタノール (1:1) 混液を 500 µL 加え、振盪攪拌した。さらに 9400 µL の生理食塩液を加えて振盪攪拌し、超音波処理により溶解し fexofenadine 1 mg/mL 溶液とした。投与直前に、同様に調製した zosuquidar 2 mg/mL 溶液あるいは vehicle と等量混合した。調製後に目視により溶解したことを確認した。

[4-2] 経口投与液の調製 (5 mg/5 mL/kg 用投与液)

被験物質 10 mg を秤量し、メノウ乳鉢に移した。0.5 w/v% MC 溶液を徐々に加え、メノウ乳棒で磨り潰した。0.5 w/v% MC 溶液で共洗いを行い 10 mL にメスアップした後、超音波処理し懸濁液を調製した (1 mg/mL)。投与液は用時調製し、調製後に目視により均一に懸濁したことを確認した。

[5] 被験物質及び阻害剤の共投与

被験物質及び阻害剤 (zosuquidar) を静脈内投与する群では、同時に投与した。

被験物質を静脈内投与及び阻害剤 (zosuquidar) を経口投与する群では、被験物質を静脈内投与する 40 分前に阻害剤を経口投与した。

被験物質を経口投与及び阻害剤 (zosuquidar) を静脈内投与する群では、被験物質を経口投与する 5 分前に阻害剤を静脈内投与した。

被験物質及び阻害剤 (zosuquidar 及び Ko143) を経口投与する群では、被験物質を経口投与する 40 分前に阻害剤を経口投与した。

被験物質及び阻害剤 (1-aminobenzotriazole) を経口投与する群では、被験物質を経口投与する 15 時間前に阻害剤を経口投与した。

[6] 投与及び採血

静脈内投与は、2-3%イソフルラン麻酔下で実施した。一晚 (約 18 時間) 絶食したラットの左後肢の皮膚をハサミで切り大腿静脈を露出させ、1 mL シリンジ及び 27 G の注射針を用いて投与した。静脈内投与後、尾静脈を片刃カミソリで切り、マイクロピペットを用いて尾静脈から採血した。静脈内投与後の採血時点は、投与後 5、15、30 分、1、2、4、6、8 時間とした。採血量は各時点 100 μ L とした。

経口投与は無麻酔下で実施した。一晚 (約 18 時間) 絶食したラットを片手で保定し、2.5 mL シリンジ及び経口ゾンデを使用し、胃内へ強制投与した。経口投与後、無麻酔下でラットの頸背部より出たカテーテルに 22 G の注射針を繋ぎ 1 mL シリンジで引くことにより門脈血を採血した。カテーテル内の容量が約 80 μ L であるため、採血した最初の 100 μ L を廃棄し、1 mL シリンジを繋ぎ変えて採血した 100 μ L を濃度測定用の血液とした。採血後、ヘパリンナトリウム含有生理食塩液 (10 unit/mL) でカテーテル内をフラッシングしたのち、ただちに尾静脈を片刃カミソリで切り、マイクロピペットを用いて尾静脈から採血した。経口投与後の採血時点は、投与後 5、15、30 分、1、2、4、6、8 時間とした。Midazolam は投与後 3 分の採血を追加した。採血量は門脈血及び尾静脈血共に各時点 100 μ L とした。

採取した血液はヘパリンナトリウム注射液 (1000 単位/mL) 5 μ L を添加したチューブに移し、遠心分離 (4°C、14000 \times g、10 min) して血漿を得た。血漿は設定温度 -30°C のフリーザーで凍結保存した。

[7] 灌流液の調製 (40 mL)

リン酸水素二ナトリウム 12 水和物、リン酸二水素ナトリウム 2 水和物及び塩化ナトリウムを用いて、0.1 mol/L 等張リン酸緩衝液 (pH 6.5) を調製した。0.1 mol/L 等張リン酸緩衝液 396 mL 及び 1 mg/mL antipyrine 生理食塩液溶液 4 mL を混合しプレ灌流液とした。10 mg/mL raloxifene DMSO 溶液 200 μ L、Cremophor EL 100 μ L 及びエタノール 100 μ L を混合した後、プレ灌流液 39.6 mL を加えて再度よく混合し灌流液とした。(最終濃度: 50 μ g/mL raloxifene、10 μ g/mL antipyrine) antipyrine は、門脈血流量を算出する目的で添加した。

[8] *In situ* single-pass perfusion 試験

一晩 (約 18 時間) 絶食した門脈カニューレラットを 2-3% イソフルラン麻酔下で開腹し、空腸上部約 10 cm の上下に切り込みを入れ、十二指腸側より 37°C に温めた生理食塩液を流入させることにより腸内容物を流出させた。次に、十二指腸側より空気を送入して、残存液を追い出した後に両端末にチューブ (Tygon[®] flexible plastic tubing (3 mm I.D., 4 mm O.D.)) を挿入し、上部側のチューブを低流速型ポンプと接続した。その後、低流速型ポンプを用いて上部側より被験物質を含む灌流液を送液し、下部側から出てきた灌流液を 10 分間隔で回収し重量を測定した。灌流速度は、灌流開始 5 分間は腸管中の空気を除去するために 0.4 mL/min とし、その後 0.2 mL/min とした。灌流開始後 10 分間隔で 60 分間、門脈血及び全身血を同時に採血した。試験終了後、灌流部位を摘出し腸管の長さを測定した。

[9] 薬物濃度測定

薬物を含む測定試料 20 μ L、内標準溶液 (500 ng/mL ketoconazole のメタノール溶液) 20 μ L、メタノール 60 μ L を 1.5 mL 容 PP 製微小遠心管中に混合し、十分攪拌した後遠心分離 (20°C、14000 \times g、10 min) した。その上清 50 μ L を 300 μ L 容サンプルバイアルに移し、LC-MS/MS 測定実測試料とした。

ラットブランクプール血漿 20 μ L、内標準溶液 20 μ L、各濃度の被験物質メタノール溶液 (濃度 0 はメタノールのみ) 20 μ L 及びメタノール 40 μ L をチューブに入れ、測定試料と同様に処理した試料を検量試料とした。なお、定量範囲を超える試料は適宜ラットブランクプール血漿を用いて希釈し測定に用いた。

[10] LC-MS/MS 測定条件

・ HPLC 条件

分析カラム: Capcellpak C18 ACR (1.5 mm I.D.×35 mm、粒子径 3 μm)
 YMC-Tiart C18 (2.0 mm I.D.×30 mm、粒子径 3 μm)
 (Sulfasalazine の測定には YMC-Tiart C18 を使用)

移動相 A: 0.1 vol% ギ酸水溶液あるいは 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
 (Sulfasalazine の測定のみ 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液を使用)

移動相 B: メタノール

カラム温度設定: 40°C

注入量: 15 μL

・ MS 条件

| Compound | Precursor Ion (m/z) | Product Ion (m/z) | Collision Energy (V) | Ion Charge |
|---------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|------------|
| Fexofenadine | 502.3 | 466.3 | 25 | Positive |
| Sulfasalazine | 397.1 | 197.1 | 28 | Negative |
| Topotecan | 422.2 | 377.2 | 20 | Positive |
| Midazolam | 326.1 | 291.1 | 25 | Positive |
| 1-OH-midazolam | 342.1 | 203.1 | 40 | Positive |
| Felodipine | 384.1 | 338.0 | 13 | Positive |
| Dehydrofelodipine | 382.1 | 354.1 | 23 | Positive |
| Buspirone | 386.3 | 122.2 | 31 | Positive |
| 6-OH-buspirone | 402.3 | 139.0 | 39 | Positive |
| Raloxifene | 474.2 | 112.1 | 27 | Positive |
| Raloxifene-4'-glucuronide | 650.2 | 474.3 | 25 | Positive |
| Raloxifene-6-glucuronide | 650.2 | 474.3 | 25 | Positive |
| Antipyrine | 189.1 | 77.1 | 35 | Positive |
| Ketoconazole (IS) | 531.3 | 243.9 | 32 | Positive |

[11] 定量値の算出

LC-MS/MS 測定の濃度計算には「LCquan」 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。検量試料のピークエリア比 (測定対象化合物/内標準物質) を直線回帰することにより検量線を作成し ($y = ax + b$ 、重み付け $1/y$)、得られた検量線から濃度を算出した。

[12] 有意差検定

2 群間の比較には Student's t 検定、control に対する多群比較には Dunnett's 検定、多群間における多重比較には Tukey-Kramer 検定を使用し、 $p < 0.05$ で有意と判定した。

[13] Dose number の算出

消化管内での投与薬物の溶解性の指標として dose number を用いた。ラットにおける dose number は eq. (29)、ヒトにおける dose number は eq. (30) を用いて算出した。

$$\text{Dose number (rat)} = \frac{\text{Concentration of drug solution (mg/mL)}}{\text{Solubility (mg/mL)}} \quad \text{eq. (29)}$$

$$\text{Dose number (human)} = \frac{\text{Dose (mg)} / 250 \text{ mL}}{\text{Solubility (mg/mL)}} \quad \text{eq. (30)}$$

引用文献

1. Frank, R. and R. Hargreaves, Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(7): p. 566-80.
2. Komura, H. and M. Iwaki, In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metab Rev*, 2011. **43**(4): p. 476-98.
3. Martignoni, M., G.M. Groothuis, and R. de Kanter, Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006. **2**(6): p. 875-94.
4. Xie, G., et al., Comparative in vitro metabolism of phospho-tyrosol-indomethacin by mice, rats and humans. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(8): p. 1195-202.
5. Shitara, Y., et al., Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol 17beta-D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2003. **18**(1): p. 33-41.
6. Umehara, K. and G. Camenisch, Novel in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE) method to predict hepatic organ clearance in rat. *Pharm Res*, 2012. **29**(2): p. 603-17.
7. Ito, K., et al., Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. **38**: p. 461-99.
8. Iwatsubo, T., et al., Prediction of in vivo drug disposition from in vitro data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos*, 1996. **17**(4): p. 273-310.
9. Liu, X., et al., Correlation of biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes and in vivo in rats. *Drug Metab Dispos*, 1999. **27**(6): p. 637-44.
10. Nakakariya, M., et al., In vivo biliary clearance should be predicted by intrinsic biliary clearance in sandwich-cultured hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2012. **40**(3): p. 602-9.
11. Amidon, G.L., et al., A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 1995. **12**(3): p. 413-20.
12. Kataoka, M., et al., Effect of food intake on the oral absorption of poorly water-soluble drugs: in vitro assessment of drug dissolution and permeation assay system. *J Pharm Sci*, 2006. **95**(9): p. 2051-61.
13. Kataoka, M., et al., In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharm Res*, 2003. **20**(10): p. 1674-80.

14. Nishimuta, H., et al., Significance of reductive metabolism in human intestine and quantitative prediction of intestinal first-pass metabolism by cytosolic reductive enzymes. *Drug Metab Dispos*, 2013. **41**(5): p. 1104-11.
15. Nishimuta, H., et al., Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A and UGT substrates in humans from in vitro data. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011. **26**(6): p. 592-601.
16. 大谷道輝ら, グレープフルーツ果肉摂取時によるジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬 ニフェジピン及びニソルジピンの薬物動態への影響. *薬学雑誌*, 2002. **122**(5): p. 323-9.
17. Takanaga, H., et al., Relationship between time after intake of grapefruit juice and the effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of nisoldipine in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **67**(3): p. 201-14.
18. Kato, M., et al., The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2003. **18**(6): p. 365-72.
19. Hoffman, D.J., et al., Method to estimate the rate and extent of intestinal absorption in conscious rats using an absorption probe and portal blood sampling. *Pharm Res*, 1995. **12**(6): p. 889-94.
20. Furukawa, T., et al., Quantitative prediction of intestinal glucuronidation of drugs in rats using in vitro metabolic clearance data. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012. **27**(2): p. 171-80.
21. Kosaka, K., et al., Impact of intestinal glucuronidation on the pharmacokinetics of raloxifene. *Drug Metab Dispos*, 2011. **39**(9): p. 1495-502.
22. Murakami, T., et al., Separate assessment of intestinal and hepatic first-pass effects using a rat model with double cannulation of the portal and jugular veins. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2003. **18**(4): p. 252-60.
23. Terao, N. and D.D. Shen, Alterations in serum protein binding and pharmacokinetics of l-propranolol in the rat elicited by the presence of an indwelling venous catheter. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983. **227**(2): p. 369-75.
24. Yasuhara, M., et al., Effect of altered plasma protein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in rats after surgery: role of alpha-1-acid glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985. **235**(2): p. 513-20.
25. Bachir-Cherif, D., et al., Characterization of post-surgical alterations in the bile duct-cannulated rat. *Xenobiotica*, 2011. **41**(8): p. 701-11.
26. Wilkinson, G.R. and D.G. Shand, Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther*, 1975. **18**(4): p. 377-90.

27. Chindavijak, B., et al., Alteration of the pharmacokinetics and metabolism of propranolol and antipyrine elicited by indwelling catheters in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988. **246**(3): p. 1075-9.
28. Davies, B. and T. Morris, Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, 1993. **10**(7): p. 1093-5.
29. Ito, K. and J.B. Houston, Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm Res*, 2004. **21**(5): p. 785-92.
30. Shibata, Y., H. Takahashi, and Y. Ishii, A convenient in vitro screening method for predicting in vivo drug metabolic clearance using isolated hepatocytes suspended in serum. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(12): p. 1518-23.
31. Yamashita, S., et al., Kinetic analysis of the drug permeation process across the intestinal epithelium. *Pharm Res*, 1994. **11**(11): p. 1646-51.
32. Kuze, J., et al., Separate evaluation of intestinal and hepatic metabolism of three benzodiazepines in rats with cannulated portal and jugular veins: comparison with the profile in non-cannulated mice. *Xenobiotica*, 2009. **39**(11): p. 871-80.
33. Nishikawa, M., et al., Effects of continuous ingestion of green tea or grape seed extracts on the pharmacokinetics of midazolam. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004. **19**(4): p. 280-9.
34. Wang, S.X., et al., Contribution of the intestine to the first-pass metabolism of felodipine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989. **250**(2): p. 632-6.
35. Watanabe, K., et al., Studies on intestinal absorption of sulpiride (3): intestinal absorption of sulpiride in rats. *Biol Pharm Bull*, 2004. **27**(1): p. 77-81.
36. Mizuno, N., et al., Gastrointestinal absorption of sulpiride in rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1986. **283**(1): p. 30-8.
37. Mizuma, T., Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *Int J Pharm*, 2009. **378**(1-2): p. 140-1.
38. Lee, K. and D.R. Thakker, Saturable transport of H₂-antagonists ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci*, 1999. **88**(7): p. 680-7.
39. Cvetkovic, M., et al., OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos*, 1999. **27**(8): p. 866-71.
40. Ujie, K., et al., Relative contribution of absorptive and secretory transporters to the intestinal absorption of fexofenadine in rats. *Int J Pharm*, 2008. **361**(1-2): p. 7-11.

41. Tahara, H., et al., P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role in its biliary excretion. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(7): p. 963-8.
42. Qiang, F., et al., Pharmacokinetic drug interaction between fexofenadine and fluvastatin mediated by organic anion-transporting polypeptides in rats. *Eur J Pharm Sci*, 2009. **37**(3-4): p. 413-7.
43. Nasu, R., et al., Physiologically based pharmacokinetic model for pralmorelin hydrochloride in rats. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(10): p. 1488-94.
44. Watanabe, T., et al., Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **328**(2): p. 652-62.
45. Strelevitz, T.J., R.S. Foti, and M.B. Fisher, In vivo use of the P450 inactivator 1-aminobenzotriazole in the rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance. *J Pharm Sci*, 2006. **95**(6): p. 1334-41.
46. Kotegawa, T., et al., In vitro, pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of ketoconazole and midazolam in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **302**(3): p. 1228-37.
47. Kanazu, T., et al., Assessment of the hepatic and intestinal first-pass metabolism of midazolam in a CYP3A drug-drug interaction model rats. *Xenobiotica*, 2005. **35**(4): p. 305-17.
48. Ueda, S., K. Yamaoka, and T. Nakagawa, Effect of pentobarbital anaesthesia on intestinal absorption and hepatic first-pass metabolism of oxacillin in rats, evaluated by portal-systemic concentration difference. *J Pharm Pharmacol*, 1999. **51**(5): p. 585-9.
49. Tabata, K., et al., Evaluation of intestinal absorption into the portal system in enterohepatic circulation by measuring the difference in portal-venous blood concentrations of diclofenac. *Pharm Res*, 1995. **12**(6): p. 880-3.
50. Troutman, M.D. and D.R. Thakker, Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. *Pharm Res*, 2003. **20**(8): p. 1210-24.
51. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(1): p. 3-29.
52. Thiebaut, F., et al., Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
53. Chen, Y., et al., P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **330**(3): p. 956-63.

54. Zamek-Gliszczyński, M.J., et al., Characterization of SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats using loperamide, paclitaxel, sulfasalazine, and carboxydichlorofluorescein pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos*, 2012. **40**(9): p. 1825-33.
55. Bardelmeijer, H.A., et al., Efficacy of novel P-glycoprotein inhibitors to increase the oral uptake of paclitaxel in mice. *Invest New Drugs*, 2004. **22**(3): p. 219-29.
56. Takeuchi, T., et al., Marked impact of P-glycoprotein on the absorption of TAK-427 in rats. *Biopharm Drug Dispos*, 2008. **29**(6): p. 311-23.
57. Chu, X., et al., Characterization of multidrug resistance 1a/P-glycoprotein knockout rats generated by zinc finger nucleases. *Mol Pharmacol*, 2012. **81**(2): p. 220-7.
58. Cisternino, S., et al., Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3296-301.
59. Huang, L., et al., Deletion of Abcg2 has differential effects on excretion and pharmacokinetics of probe substrates in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. **343**(2): p. 316-24.
60. Zaher, H., et al., Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Mol Pharm*, 2006. **3**(1): p. 55-61.
61. Hendricks, C.B., et al., Effect of P-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res*, 1992. **52**(8): p. 2268-78.
62. Maliepaard, M., et al., Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res*, 1999. **59**(18): p. 4559-63.
63. Shepard, R.L., et al., Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int J Cancer*, 2003. **103**(1): p. 121-5.
64. Allen, J.D., et al., Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(6): p. 417-25.
65. Poller, B., et al., Double-transduced MDCKII cells to study human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) interplay in drug transport across the blood-brain barrier. *Mol Pharm*, 2011. **8**(2): p. 571-82.
66. Petri, N., et al., Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model. *Pharm Res*, 2004. **21**(8): p. 1398-404.
67. Benet, L.Z., F. Broccatelli, and T.I. Oprea, BDDCS applied to over 900 drugs. *Aaps j*, 2011. **13**(4): p. 519-47.

68. Li, H., et al., Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. *Pharm Res*, 2008. **25**(11): p. 2601-12.
69. Lin, J.H., M. Chiba, and T.A. Baillie, Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev*, 1999. **51**(2): p. 135-58.
70. Paine, M.F., et al., The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(5): p. 880-6.
71. Matsubara, T., et al., Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **309**(3): p. 1282-90.
72. Paine, M.F., et al., Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. **283**(3): p. 1552-62.
73. Gertz, M., et al., Grapefruit juice-drug interaction studies as a method to assess the extent of intestinal availability: utility and limitations. *Curr Drug Metab*, 2008. **9**(8): p. 785-95.
74. Paine, M.F., et al., First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther*, 1996. **60**(1): p. 14-24.
75. Ogasawara, A., T. Kume, and E. Kazama, Effect of oral ketoconazole on intestinal first-pass effect of midazolam and fexofenadine in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos*, 2007. **35**(3): p. 410-8.
76. Williams, J.A., et al., Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, 2004. **32**(11): p. 1201-8.
77. Dresser, G.K., D.G. Bailey, and S.G. Carruthers, Grapefruit juice--felodipine interaction in the elderly. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **68**(1): p. 28-34.
78. Sun, Q., et al., 1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase. *Drug Metab Dispos*, 2011. **39**(9): p. 1674-9.
79. Balani, S.K., et al., Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. *Drug Metab Dispos*, 2002. **30**(10): p. 1059-62.
80. Meschter, C.L., et al., A 13-week toxicologic and pathologic evaluation of prolonged cytochromes P450 inhibition by 1-aminobenzotriazole in male rats. *Fundam Appl Toxicol*, 1994. **22**(3): p. 369-81.

81. Takahashi, M., et al., Investigation of the intestinal permeability and first-pass metabolism of drugs in cynomolgus monkeys using single-pass intestinal perfusion. *Biol Pharm Bull*, 2010. **33**(1): p. 111-6.
82. Higashikawa, F., et al., Dose-dependent intestinal and hepatic first-pass metabolism of midazolam, a cytochrome P450 3A substrate with differently modulated enzyme activity in rats. *J Pharm Pharmacol*, 1999. **51**(1): p. 67-72.
83. Hirunpanich, V., K. Murakoso, and H. Sato, Inhibitory effect of docosahexaenoic acid (DHA) on the intestinal metabolism of midazolam: in vitro and in vivo studies in rats. *Int J Pharm*, 2008. **351**(1-2): p. 133-43.
84. Gertz, M., et al., Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos*, 2010. **38**(7): p. 1147-58.
85. Jeong, E.J., et al., Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(6): p. 785-94.
86. Nozawa, T. and T. Imai, Prediction of human intestinal absorption of the prodrug temocapril by in situ single-pass perfusion using rat intestine with modified hydrolase activity. *Drug Metab Dispos*, 2011. **39**(7): p. 1263-9.
87. Ohura, K., et al., Effect of intestinal first-pass hydrolysis on the oral bioavailability of an ester prodrug of fexofenadine. *J Pharm Sci*, 2012. **101**(9): p. 3264-74.
88. Tang, S.C., et al., Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int J Cancer*, 2012. **130**(1): p. 223-33.
89. Adane, E.D., et al., Pharmacokinetic modeling to assess factors affecting the oral bioavailability of the lactone and carboxylate forms of the lipophilic camptothecin analogue AR-67 in rats. *Pharm Res*, 2012. **29**(7): p. 1722-36.
90. de Vries, N.A., et al., Restricted brain penetration of the tyrosine kinase inhibitor erlotinib due to the drug transporters P-gp and BCRP. *Invest New Drugs*, 2012. **30**(2): p. 443-9.
91. Kodaira, H., et al., Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. **333**(3): p. 788-96.
92. Kishimoto, W., et al., In vitro predictability of drug-drug interaction likelihood of P-glycoprotein-mediated efflux of dabigatran etexilate based on $[I]_2/IC_{50}$ threshold. *Drug Metab Dispos*, 2014. **42**(2): p. 257-63.

93. Englund, G., et al., Cytochrome p450 inhibitory properties of common efflux transporter inhibitors. *Drug Metab Dispos*, 2014. **42**(3): p. 441-7.
94. Rioux, N., et al., Assessment of CYP3A-mediated drug-drug interaction potential for victim drugs using an in vivo rat model. *Biopharm Drug Dispos*, 2013. **34**(7): p. 396-401.
95. Dantzig, A.H., et al., Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **290**(2): p. 854-62.
96. Matsson, P., et al., Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res*, 2009. **26**(8): p. 1816-31.
97. Yang, J., et al., Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr Drug Metab*, 2007. **8**(7): p. 676-84.
98. Kadono, K., et al., Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor. *Drug Metab Dispos*, 2010. **38**(7): p. 1230-7.
99. Nishimuta, H., et al., Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs. *Xenobiotica*, 2013. **43**(11): p. 948-55.
100. Nishimura, T., et al., Species difference in intestinal absorption mechanism of etoposide and digoxin between cynomolgus monkey and rat. *Pharm Res*, 2008. **25**(11): p. 2467-76.