

氏 名 (生年月日) まつ だ よし き
松 田 良 樹 (1981 年 5 月 13 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 論博 第 197 号

学位授与の日付 2015 年 9 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 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

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 栄 田 敏 之

(副査) 教 授 安 井 裕 之

(副査) 教 授 矢 野 義 孝

論 文 内 容 の 要 旨

製薬会社における経口剤開発の初期段階では、*in vitro* での一次スクリーニングによって良好な物性、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実験動物を用いた *in vivo* 経口投与試験が実施される。このとき、*in vivo* における体内暴露が *in vitro* からの予測と比較して有意に低くなった化合物については、その要因を明らかにすると共に、ヒトにおける暴露量の正確な予測が求められる。経口投与された薬物の生物学的利用率 (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) の積として表わされる。したがって、経口投与によって十分な体内暴露が得られなかった場合、どの過程に問題があったかを明らかにすることで、ヒトへの外挿やその後の合成展開に有用な情報を得ることができる。一方、低暴露の要因解析が不十分なままでは、その回避策を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。

本研究では、低暴露を示した化合物の *in vivo* における要因解析を可能とするために、第 1 章において、門脈カニューレラットを用いた *in vivo* での消化管吸収率 (Fa・Fg) の評価法を構築し、第 2 章において、Fa・Fg に対する消化管トランスポーター輸送及び消化管代謝の寄与率を評価することを目的とした。

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、AUC から薬物の Fa・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

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 $Fa \cdot Fg$ 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 Fg 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 $Fa \cdot Fg$ 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 ($Fg = 0.21$) 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 ($Fa \cdot Fg$) の評価法を構築し、さらには $Fa \cdot Fg$ 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、Fa 及び Fg 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。

論文審査の結果の要旨

製薬会社における経口剤開発の初期段階では、一次スクリーニングによって良好な物性、*in vitro* 動態プロファイルを有する化合物が選別され、続いて、二次スクリーニングとしてラット等の実験動物を用いた経口投与試験が実施される。二次スクリーニングにおいて、暴露量が予測外に低くなった化合物については、その要因を明らかにすると共に、ヒトにおける暴露量の正確な予測が求められる。ところで、経口投与された薬物の生物学的利用率は、消化管内から消化管組織への移行率 (F_a)、消化管組織から門脈への移行率 (F_g) 及び門脈から全身循環系への移行率 (F_h) の積として表わされる。これらのことを踏まえ、申請者は、二次スクリーニングにおいて低暴露を示した化合物の要因解析を目的として、新たに門脈カニューレラットを用いた消化管吸収率 (F_a と F_g の積) の評価法を構築し、続いて、消化管吸収率に対する消化管トランスポーター輸送及び消化管代謝の寄与率の分離評価を行い、その成果を二章にわたり記述した。

第1章では、日本チャールス・リバー株式会社との共同開発により、無麻酔下で経時的な門脈及び全身血の同時採血が可能な新規術式による門脈カニューレラットを作製し、1) 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いこと、2) 肝血流量依存型薬物である lidocaine、肝代謝能依存型薬物である antipyrine を静脈内投与した後の血中濃度推移において、無処置のラットとの間に有意な違いは認められないこと、すなわち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ことを明らかにした。続いて、indomethacin、midazolam、felodipine 等の薬物動態関連情報が十分ある既存の薬物を経口投与して消化管吸収率を求め、得られた結果の検証を介して、本法の妥当性を示した。

第2章では、消化管吸収率に対する消化管トランスポーター輸送及び消化管代謝の寄与率の分離評価を試みた。消化管トランスポーター輸送の寄与率の分離評価では、P-gp 及び Bcrp に着目し、fexofenadine、sulfasalazine 等の薬物を用いて検討を行い、各々の選択的阻害剤の前投与により分離評価が可能であることを明らかにした。一方、消化管代謝の寄与率の分離評価においては、CYP 代謝のように阻害剤が利用できる場合には、midazolam 等の薬物を用いてトランスポーター輸送と同様の検討を行い、また、グルクロン酸抱合代謝のように阻害剤が存在しない場合には、raloxifene を用いて、*in situ* single-pass perfusion 試験と組み合わせることで、分離評価が可能であることを明らかにした。従来の方法では、消化管トランスポーター輸送及び消化管代謝の寄与率の分離評価は困難であり、本法の有用性が示された。

以上、2章にわたる研究の成果は、製薬会社における経口剤開発において有用な情報を提供するものである。学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士(薬学)の学位論文としての価値を有するものと判断する。