

個別化医療を目的とした **5-fluorouracil** の
定量的治療効果予測システム構築に関する基礎的研究

2013 年

河 渕 真 治

目次

略語一覧.....	1
要約.....	3
本論	
第一章 1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸癌モデルラットにおける 5-FU 体内動態及び肝臓中 dihydropyrimidine dehydrogenase 活性に関する検討	
1-1. 緒言.....	6
1-2. 材料および方法.....	8
1-3. 結果.....	13
1-4. 考察.....	20
1-5. 小括.....	23
第二章 大腸癌化学療法における血漿中 dihydrouracil/uracil 比のバイオマーカーとしての有用性	
2-1. 緒言.....	24
2-2. 材料および方法.....	25
2-3. 結果.....	28
2-4. 考察.....	39
2-5. 小括.....	42
第三章 バイオマーカーを用いた PK-PD モデリングによる 5-FU 抗腫瘍効果予測システム	
3-1. 緒言.....	43
3-2. 材料および方法.....	44
3-3. 結果.....	48
3-4. 考察.....	55
3-5. 小括.....	57
総括.....	58
謝辞.....	60
業績目録.....	61
引用文献.....	64

略語一覧

5-BU	5-bromouracil
5-FU	5-fluorouracil
A ₁	5-FU amounts in the central compartment
A ₂	5-FU amounts in the peripheral compartment
ACF	Aberrant crypt foci
AIC	Akaike's Information Criteria
ALT	alanine aminotransferase
ANOVA	analysis of variance
AST	aspartate aminotransferase
AUC	area under the concentration vs. time curve
AUMC	area under the first-moment curve to the last measured plasma concentration
BSA	bovine serum albumin
C ₁	5-FU concentration in the central compartment
C ₂	5-FU concentration in the peripheral compartment
CL _{int}	intrinsic clearance
CL _{tot}	total body clearance
CRC	colorectal cancer
DHFU	5-fluoro-dihydrouracil
DMH	1,2-dimethylhydrazine
DPD	dihydropyrimidine dehydrogenase
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
F _h	hepatic availability
FP	5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy
i.v.	intravenous
k ₁	first-order rate constant of transit
k ₁₂	rate constant of central compartment to peripheral compartment
k ₂	measure of drug potency
k ₂₁	rate constant of peripheral compartment to central compartment
k _e	elimination rate constant
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LV	leucovorin
MRT	mean resident time
NADPH	reduced form nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NLR	neutrophil to lymphocyte ratio
PBPK model	physiologically based pharmacokinetic model
PD	pharmacodynamics

PK	pharmacokinetics
PK-PD	pharmacokinetics-pharmacodynamics
r^2	coefficient of determination
R_b	ratio of whole blood to plasma concentration
$t_{1/2}$	elimination half-life
TDM	therapeutic drug monitoring
TS	thymidylate synthase
TV	tumor volume
UFT	tegafur-uracil
UH2	dihydrouracil
UH2/Ura	ratio of dihydrouracil to uracil
Ura	uracil
V_1	central volume of distribution
V_2	peripheral volume of distribution
λ_z	first-order elimination rate constant at terminal phase
γ -GTP	γ -glutamyl transpeptidase
λ_0	rate of exponential tumor growth

要約

2012 年の日本における死亡原因の第一位は癌であり、死亡者数は 360,963 人と総死亡数の 28.7% を占める。このうち、大腸癌による死亡者数は 47,276 人であり、肺癌、胃癌に続き三番目に死亡者数の多い癌である。また、フランスの国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) の調査によると、世界での癌患者数は 2030 年に 2220 万人と、2008 年の 1270 万人に比べ約 75% の増加が推測されており、今後、大腸癌患者数は益々増加するものと見込まれている。大腸癌の治療法として、従来では手術療法が主流であったが、外科的処置だけでは限界があることから、現在では、進行性癌や転移性癌の治療に効果を発揮する癌化学療法的重要性が高まっている。しかし、抗癌剤の薬効及び副作用発現には著しい個体差が認められる。そのため、投与スケジュールや投与量は治療成績の向上を期待して繰り返し修正されるが、その修正は合理的な投与設計に基づくものではなく、多くは副作用回避を目的とした過度の減量が施され、完全奏功の妨げにつながっている。

5-fluorouracil (5-FU) はピリミジン系代謝拮抗剤に分類される抗癌剤であり、古くから大腸癌をはじめとした消化器癌に対する化学療法の key drug として汎用されている。近年、5-FU の 90% 以上を代謝するジヒドロピリミジン脱水素酵素 (dihydropyrimidine dehydrogenase: DPD) が治療効果及び副作用の予測可能なバイオマーカーとして注目されている。しかし、臨床の現場では、肝臓中 DPD の活性を直接測定し、治療に反映させることは困難である。一方で、生体内核酸塩基の一種であるウラシル (uracil: Ura) が 5-FU と同様 DPD によりジヒドロウラシル (dihydrouracil: UH2) に代謝されることから、血漿中ジヒドロウラシル/ウラシル (UH2/Ura) 比は DPD 活性を示す間接的なバイオマーカーとして注目されている。しかし、血漿中薬物濃度、バイオマーカー、抗腫瘍効果といった関係因子は定量的に関連付けられておらず、個別化医療への実用的な利用には至っていない。そこで、本研究では、個別化医療への実用的かつ合理的投与設計を目的とし、バイオマーカーを用いて、薬物動態学-薬力学 (Pharmacokinetics-Pharmacodynamics: PK-PD) 理論に基づいた 5-FU の定量的治療効果予測システムの構築に関する基礎的研究を行った。

1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸癌モデルラットにおける 5-FU 体内動態及び肝臓中 dihydropyrimidine dehydrogenase 活性に関する検討

1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸癌モデルラット (CRC ラット) を作成し、CRC ラットにおける 5-FU の体内動態について、正常ラットとの比較から癌病態時の体内動態変動とその要因について検討した。CRC ラットにおいて、5-FU 静脈内投与後の血中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び半減期 $t_{1/2}$ はそれぞれ約 25% 及び約 42% の減少が認められ、全身クリアランス CL_{tot} は約 1.3 倍増加していた。また、5-FU 門脈内投与後の血中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ は約 39% 減少しており、肝初回通過効果の回避率 F_h は約 20% の減少が認められた。さらに、肝臓中 DPD 活性は約 1.6 倍の増加が認められたことから、CRC ラットにおける薬物動態学的パラメータ変動原因は、癌病態下での肝臓中 DPD の活性化に伴う 5-FU の肝固有クリアランス CL_{int} の増加によるものと推察された。したがって、5-FU 暴露量と治療効果との間に相関性があることを考慮に入れると、5-FU 化学療法において、体表面積に基づく投与設計では期待すべき血漿中 5-FU 濃度や血中濃度-時間曲線下面積 AUC が維持できず、5-FU 抗腫瘍効果の減弱を招くおそれがあることが示唆された。大腸癌

患者に対する個別化療法に関して、体表面積に基づく投与設計ではなく、肝臓中 DPD 活性を考慮にいたした投与設計が必要であることが示された。

大腸癌化学療法における血漿中 dihydrouracil/uracil 比のバイオマーカーとしての有用性

5-FU 化学療法に関して、肝臓中 DPD 活性に基づく投与設計の必要性が示唆されるものの、臨床の現場において治療への応用は難しい。そこで、血漿中 UH2/Ura 比の測定意義を確かめるため、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 体内動態及び治療効果との関係について、CRC モデルラットを用いて検討を行った。肝臓中 DPD 活性及び血漿中 UH2/Ura 比に関して日内変動が確認され、両者の間には高い相関関係 ($r^2 = 0.934$) が認められた。また、5-FU 静脈内投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ にも、肝臓中 DPD 活性同様、日内変動が認められ、血漿中 UH2/Ura 比と全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ との間にはそれぞれ相関性が確認された (CL_{tot} : $r^2 = 0.905$, $AUC_{0-\infty}$: $r^2 = 0.843$)。これらの結果から、血漿中 UH2/Ura 比は肝臓中 DPD 活性だけではなく、5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ を予測することが出来る有用な間接的バイオマーカーであることが明らかとなった。さらに、5-FU を 20 mg/kg の用量で 7 日間連続静脈内投与した結果、5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び肝臓中 DPD 活性はそれぞれ最大で約 45 及び 90% 低下し、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ は 1.8 倍の増加が認められ、5-FU 投与開始 1 日目に観測されたこれらの日内変動は消失していた。臨床において、5-FU は繰り返し投与されている現状を鑑みると、5-FU 連続投与による代謝能低下及び血中濃度－時間曲線下面積 AUC の増加は、大腸癌患者に対する投与設計の際に考慮されるべき要因の一つであると考えられた。一方、5-FU の治療効果に関して、大腸腫瘍体積は肝臓中 DPD 活性変動に応じて変化しており、5-FU 投与開始前に採取した血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 投与開始 10 日目の大腸腫瘍体積との間に強い相関関係が認められた ($r^2 = 0.988$)。したがって、5-FU による化学療法を施行する前の血漿中 UH2/Ura 比は、肝臓中 DPD 活性及び 5-FU 薬物動態学的パラメータのみならず、5-FU の抗腫瘍効果をも予測し得るバイオマーカーであることが示唆された。大腸癌患者に対する 5-FU の適正使用に関して、5-FU による化学療法を施行する前の血漿中 UH2/Ura 比の測定は、期待すべき血漿中 5-FU 濃度及び抗腫瘍効果に対応した投与設計に応用可能であり、個別化医療に向けた有用なバイオマーカーとなし得ることが示された。

バイオマーカーを用いた PK-PD モデリングによる 5-FU 抗腫瘍効果予測システム

肝臓中 DPD 活性レベルに応じた 5-FU の抗腫瘍効果の定量的予測を目的として、血漿中 UH2/Ura 比をモデルに組み込んだ PK-PD モデルを構築した。5-FU 投与前に採取した血漿中 UH2/Ura 比は 5-FU の体内からの消失速度定数 k_e と相関性を示したことから、5-FU 投与前に得られた血漿中 UH2/Ura 比から単回帰直線式を用いて消失速度定数 k_e を予測することで、PK-PD モデル解析を行った。PK-PD モデルの妥当性は、第二章で得られた CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比、血漿中 5-FU 濃度及び大腸腫瘍体積の実測値との乖離の有無と得られた PD パラメータの変動係数 (coefficient of variation: CV%) より判断した。PK-PD モデル解析から得られた 5-FU 投与後の腫瘍体積の予測値は実測値にほぼ一致し ($r^2 > 0.99$)、良好な PD パラメータ値 (CV% < 8.3) を予測することができたことから、5-FU 投与前の血漿中 UH2/Ura 比を組み込んだ PK-PD モデルを用いることで、5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の経時的変化を定量的に予測し得ることが示唆された。した

がって、大腸癌患者への 5-FU による化学療法を施行する前に血漿中 UH2/Ura 比を測定し、その値を用いた PK-PD 理論を導入することにより、個別化医療への実用的かつ合理的投与設計が可能になるものと考えられた。

以上、本論文は、5-FU 化学療法における個別化医療を実現すべく、PK-PD 理論を駆使することにより血漿中薬物濃度、バイオマーカー及び薬効の定量的関係について基礎的検討を行った。バイオマーカーを組み込んだ PK-PD モデルは、医療現場における TDM 用の解析ツールとして有用であり、無駄な投薬と過度の投薬量の減量を理論的根拠に基づいて回避することが可能となり得ることから、大腸癌化学療法を施行される患者の身体的、経済的負担軽減につながるものと考えられる。これらの研究成果は、個別化医療への合理的投与設計に向けた基礎的情報となり、5-FU の適正使用に大きく貢献できよう。

第一章 1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸癌モデルラットにおける 5-FU 体内動態及び肝臓中 dihydropyrimidine dehydrogenase 活性に関する検討

1-1. 緒言

大腸癌 (Colorectal cancer: CRC) は、欧米諸国を初め先進国において、癌罹患率及び死亡率の上位を占める癌である¹⁾。生活習慣、食事及び体重を含む様々な環境因子が CRC の発症及び進行に起因していると報告されている²⁾。早期 stage の患者 (stage I または II) の治療は腫瘍の外科的切除が一般的であり、比較的良好な予後を得られているが、進行癌の患者 (stage III) の治療に関しては、腫瘍切除後およそ 50% の確率でリンパ節転移による再発が報告されており、外科的切除だけでは不十分である^{3,4)}。そのため、リンパ節転移による術後再発を防ぐために、抗癌剤を用いた補助的化学療法が施行されている。

ピリミジン系代謝拮抗剤に分類される 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU) は消化器癌をはじめ、肺癌及び頭頸部癌の化学療法に広く用いられている⁵⁻⁸⁾。近年、camptotecin や oxaliplatin などの新規抗癌剤や bevacizumab、cetuximab、及び panitumumab などのモノクローナル抗体が大腸癌の治療に用いられているが⁹⁾、5-FU は CRC の治療に最も有効な key drug と考えられており、5-FU との併用療法が標準的な大腸癌化学療法とされている^{9,10)}。しかし、5-FU の適正使用に関してはいまだ議論の余地がある。5-FU/ロイコボリン (Leucovorin: LV) 療法を施された 974 人の大腸癌患者における臨床成績の結果によると、Grade III または IV の好中球減少症、口内炎または下痢の発現はそれぞれ 26%、14% 及び 13% の患者に認められている¹¹⁾。一般的に、重篤な副作用が発現した場合には投薬量の減量が行われるが、副作用回避を目的としているため過度の減量になることが多く、治療の最終段階で治療強度を下げることは完全奏功の妨げにつながる。現在、5-FU の抗腫瘍効果の改善及び重篤な副作用を回避するために、効果予測バイオマーカーの同定が腫瘍学の分野において盛んに研究されている¹²⁾。

ジヒドロピリジミン脱水素酵素 (dihydropyrimidine dehydrogenase: DPD) は生体内ピリミジン類の異化代謝のみならず、5-FU 不活性化反応経路の第一段階目となる律速反応を触媒しており¹³⁾、生体内に投与された 5-FU の約 90% は肝臓において本経路により代謝分解される¹⁴⁾。そのため、5-FU の体内動態は肝臓中 DPD 活性の変動により大きく影響を受ける。臨床において、消化管毒性、末梢神経障害、血液毒性さらには死亡などの 5-FU に関連するとみられる毒性は、部分的または完全 DPD 欠損の患者に多く認められ、5-FU 投与量の増加に伴いそれらの毒性は深刻なものとなっている¹⁵⁻¹⁸⁾。したがって、肝臓中 DPD 活性は 5-FU 治療効果及び副作用の予測可能なバイオマーカーとなり得ると考えられ、5-FU 治療開始前の肝臓中 DPD 活性の測定は、個々の患者の投与量を決定するために有益な情報をもたらす、5-FU 関連毒性の緩和を可能とするものと推察される。

担癌状態は組織中の DPD 活性に影響を及ぼす可能性を秘めており、癌化した組織中の DPD 活性変動が報告されている^{19,20)}。胃癌、肺癌及び非小細胞肺癌に関して、癌組織中の DPD 活性は正常組織中のそれと比べて有意に増加しているが¹⁹⁾、CRC に関しては DPD 活性の低下が認められている²⁰⁾。このように、癌組織中の DPD 活性に関する報告はあるものの、5-FU 投与設計の際に非常に重要と考えられる担癌状態下での肝臓中 DPD 活性の変動に関する報告はされていない。担癌状態が肝臓中 DPD 活性に与える影響について検討することは、5-FU の適正使用を行う上で非

常に有益な情報をもたらすと考えられる。そこで第一章では、1,2-ジメチルヒドラジン (1,2-dimethylhydrazine: DMH) 誘発性 CRC モデルラット (CRC ラット) を作製し、担癌状態における肝臓中 DPD 活性及び 5-FU の体内動態変動について正常ラットと比較検討を行った。

1-2. 材料および方法

1-2-1. 試薬

5-FU、ウラシル (uracil: Ura)、ジヒドロウラシル (dihydrouracil: UH2)、牛血漿アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、メチレンブルー、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (reduced form nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADPH) 及びエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA) は和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography–mass spectrometry: LC–MS) の際に内標準物質として用いる 5-ブロモウラシル (5-bromouracil: 5-BU) は Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany) より購入した。DMH 及び S-(2-アミノエチル) イソチオウロニウム臭化水素酸塩は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。リン酸カリウム、塩化マグネシウム、ベンズアミジン及びスクロースはナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した。その他の試薬類はすべて市販特級品を用いた。

1-2-2. 動物

すべての動物実験は京都薬科大学動物実験倫理規定に準じて行った。実験動物は、約 10 週齢の Wistar Hannover 系雄性ラット (体重約 310 ± 14 g) を Nippon SLC Co. Ltd. (Hamamatsu, Japan) より購入したものをを用いた。ラットは恒温恒湿、照明サイクル 12 時間 (午前 8 時から午後 8 時まで点灯、午後 8 時から翌日午前 8 時まで消灯) の条件下で固形飼料および水を自由摂取させ、予備飼育後、健康状態の良好なラットを実験に使用した。CRC ラットは、ラット投与直前に 10% w/v の濃度で調整した DMH 生理食塩水溶液を 40 mg/kg の用量で週 1 回、連続 10 週、ラット背部皮下に投与することで作製した²¹⁾。また、正常ラットとして、同量の生理食塩水を同期間投与したものをを用いた。後述する薬物動態学実験は、DMH 最終投与 1 週間後に行った。同様に *in vitro* 実験で用いた血液及び血漿も DMH 最終投与 1 週間後に採取したものをを用いた。正常および CRC ラットの白血球、好中球及びリンパ球数と血漿中生化学的検査値は Kyoto BIKEN (Kyoto, Japan) に測定依頼した。また、血漿中 Ura 及び UH2 濃度は後述する液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析 (liquid chromatography–tandem mass spectrometry: LC–MS/MS) を用いて測定した。

1-2-3. 形態学的観察

大腸異常腺窩 (Aberrant crypt foci: ACF) は大腸発癌に影響を及ぼす因子であると共に、大腸癌の早期発見に利用されている^{22,23)}。Li らの方法に準じ、以下の方法を用いて CRC ラットにおける ACF 及び大腸腫瘍を形態学的に観察した²¹⁾。正常および CRC ラットを一晩絶食後、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した。麻酔下にて放血致死させて得られた血液をヘパリンで処理した試験管内に移し、白血球、好中球及びリンパ球数を測定した。また、得られた血液を遠心分離 ($2500 \times g$ 、10 分間、 25°C) にて血漿成分を分離回収し、血漿中 Ura、UH2 及び血漿中生化学的検査値を測定した。ラット肛門に 30 mL Terumo シリンジ® (Terumo Co., Tokyo, Japan) を挿管後、10% 中性緩衝ホルマリン液を肛門側から大腸に投与し、大腸を膨張、固定した。盲腸近接端部から直腸部位を摘出し、排泄物を生理食塩水で洗浄後、取り出した大腸を直腸側から盲腸側へと縦方向に切開し、10% 中性緩衝ホルマリン液にて 24 時間固定した。次いで、固定した大腸組織切片を 0.2% メチレンブルー水溶液にて 10 分間染色し、実体顕微鏡 (XF-PH-21, Nikon Co., Tokyo, Japan; SKM-Z100A-PC, Saitoh Kougaku Co., Yokohama, Japan) を用いて観察した。

1-2-4. DPD 活性測定

健康成人およびがん患者同様、ラットおよびマウスにおいても肝臓中 DPD 活性には日内変動が報告されている²⁴⁻²⁹⁾ため、正常および CRC ラットの肝臓中 DPD 活性測定は同時刻に行い、Tateishi らの方法³⁰⁾に準じて以下のように測定した。正常および CRC ラットを一晩絶食後、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与し、麻酔下にて放血致死させた。直ちに、氷冷リン酸緩衝液にて肝脱血を行い、肝臓を単離後その湿重量を測定した。単離した肝臓に 1 g / 3 mL の割合で 35 mmol/L リン酸カリウム (pH 7.4)、2.5 mmol/L 塩化マグネシウム、10 mmol/L 2-メルカプトエタノール、0.25 mol/L スクロース、1.0 mmol/L ベンズアミジン、1.0 mmol/L S-(2-アミノエチル)イソチオウロニウム臭化水素酸塩、及び 5.0 mmol/L EDTA を加え、氷冷下にてホモジナイズした。肝ホモジネートを遠心分離 (9000×g、20 分間、4℃) して得られた上清を、さらに遠心分離後 (100000×g、60 分間、4℃)、その上清を細胞質画分とした。Lowry らの方法³¹⁾に準じ細胞質タンパク質濃度を測定した。細胞質タンパク質濃度が 500 µg/mL になるよう 35 mmol/L リン酸カリウム (pH 7.4)、2.5 mmol/L 塩化マグネシウム、10 mmol/L 2-メルカプトエタノール及び 200 µmol/L NADPH を加えることで調整し、20 分間、37℃でプレインキュベートした。その後、5-FU の最終濃度が 40 µmol/L になるように 5-FU 水溶液を添加することで、反応を開始した。Tateishi らの過去の報告によると、細胞質タンパク質 500 µg を用いて 5-FU 水溶液とインキュベートした場合、5-FU 代謝物の生成速度は 5-FU 濃度が最大 40 µmol/L までの範囲内では線形性が認められている³⁰⁾。反応開始 20 分後、500 µL 氷冷メタノールを加えることで反応を停止させた。DPD 活性は残存 5-FU 量を測定することで算出した。

1-2-5. *In vitro* 血漿タンパク結合及び血球移行性 (ratio of whole blood to plasma concentration: R_b)

5-FU の血漿タンパク非結合率は限外ろ過法にて測定した。正常および CRC ラットから麻酔下にて放血致死させて得られた血液を遠心分離 (2500×g、10 分間、25℃) して血漿成分を分離回収した。最終濃度が 0.1、1.0、10 および 50 µg/mL となるように 5-FU 水溶液を血漿試料に添加した後、37℃で 1 時間インキュベートし、混合液中 5-FU 濃度を測定して全血漿中 5-FU 濃度とした。混合液を限外ろ過デバイス (Nanosep 30 K Omega, Pall Co., New York, USA) に移し、遠心分離 (9000×g、10 分間、25℃) した後、得られたろ液中 5-FU 濃度を測定して血漿中遊離型 5-FU 濃度とした。血漿中遊離型及び全血漿中 5-FU 濃度から血漿タンパク非結合率を得た。

5-FU の R_b 測定は下記の方法で行った。正常および CRC ラットから麻酔下にて放血致死させて得られた血液に、最終濃度が 0.1、1.0、10 および 50 µg/mL となるように 5-FU 水溶液を血液試料に添加した後、37℃で 20 分間インキュベートし、混合液中 5-FU 濃度を測定して全血液中 5-FU 濃度とした。混合液を遠心分離 (9000×g、10 分間、25℃) した後、得られた上清中 5-FU 濃度を測定して血漿中 5-FU 濃度とした。全血液中及び血漿中 5-FU 濃度から R_b を得た。

1-2-6. *In vivo* 薬物動態

正常および CRC ラットに一晩絶食を施した後、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与し、麻酔下にて固定台で背位固定した状態で実験を行った。麻酔下では外科手術用ランプを用いて体温を一定に保った。正常および CRC ラットをそれぞれ薬物の投与経路に基づき、静脈内投与 (i.v.) 及び門脈内投与の 2 つのグループに分類した。5-FU 投与薬液は 5-FU を

生理食塩水に溶解させて調製した (10 mg/mL)。門脈内投与は定速持続注入で 1 時間行い、流速は 2 mL/kg/hr とした。すべての投与経路において 20 mg/kg の用量で 5-FU を投与した後、経時的に左頸静脈から 0.25 mL の血液を採取し、遠心分離 (9000×g、10 分間、4℃) した後、血漿を分取した。分取した血漿は測定まで -80℃ にて凍結保存した。

1-2-7. 試料中 Ura 及び UH2 濃度測定 (LC-MS/MS 法)

血漿試料中における Ura 及び UH2 濃度測定は César らの方法³²⁾に準じて LC-MS/MS 法にて行った。検量線の作成に際し、3%BSA 水溶液と Ura 及び UH2 標準水溶液を用いて標準試料を作成した。血漿及び標準試料 200 µL に対し、除タンパク剤として 2%硫酸亜鉛含有 50%メタノール水溶液の 150 µL を加え、攪拌した後、遠心分離 (12000×g、5 分間、4℃) した。上清を試験管に移し、イソプロパノール/酢酸エチル混合液 (15:85, v/v) の 5 mL を加え激しく攪拌した後、再び遠心分離した。有機溶媒相をスピッツ管に移し、窒素ガスを吹き付けながら湯浴上 (60℃) で蒸発乾固した後、15%メタノール 150 µL にて再溶解し、その 100 µL を LC-MS/MS システム (API3200, Applied Biosystems, CA, USA) に注入して測定した。Ura および UH2 の検出質量荷電比 (m/z) は、113.1→55.0 m/z および 115.1→73.0 m/z にて行った。血漿及び標準試料 200 µL からの Ura 及び UH2 の定量及び検出限界はそれぞれ 5 ng/mL 以下であった。LC-MS/MS 法の測定条件を Table 1-1 に示す。

Table 1-1. LC-MS/MS condition for Ura and UH2 in samples

Items	Condition
Pump	LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Automatic sample injector	AS8020 (Toso, Tokyo, Japan)
Column	Quicksorb 5-ODS (2.1 mm i.d. × 150 mm、5 µm size) (Chemco Science Co. Ltd., Osaka, Japan)
Column temperature	25℃
Mobile phase	acetonitrile: 0.1% formic acid = 20 : 80, v/v
Flow rate	0.2 mL/min
Ionization	ESI-positive ion mode
Ion spray voltage	5500 V
Ion spray temperature	500℃
Nebulizer gas flow	8.0 L/min
Curtain gas flow	2.0 L/min
Collision gas flow	4.0 L/min
Declustering potential	46 V (Ura), 36 V (UH2)
Entrance potential	10.5 V (Ura), 12.0 V (UH2)
Collision energy	21 V (Ura), 27 V (UH2)
Collision cell exit potential	4.0 V (Ura), 4.0 V (UH2)

1-2-8. 試料中 5-FU 濃度測定 (LC-MS 法)

血漿、全血液及び DPD 活性測定試料中における 5-FU 濃度測定は Svobaiter³³⁾と Nakata³⁴⁾の方法に準じて LC-MS 法にて行った。いずれの試料の 100 μ L に対し、10 μ L の 5-BU 50%メタノール水溶液（内部標準物質、250 μ g/mL）を加えた。除タンパク剤として 2%硫酸亜鉛含有 50%メタノール水溶液を 150 μ L 加え、攪拌した後、遠心分離（12000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C）した。上清を 1.5 mL ポリエチレン製マイクロチューブに移し、ジエチルエーテル 1 mL を加え激しく攪拌した後、再び遠心分離した。水層を -10 $^{\circ}$ C で凍結させエーテル層を回収し、湯浴上（60 $^{\circ}$ C）で蒸発乾固した後、移動相（5.0 mM ギ酸アンモニウム：アセトニトリル=10：90, v/v）100 μ L にて再溶解し、その 60 μ L を LC-MS システム（LC-MS-QP8000a、Shimadzu、Kyoto、Japan）に注入して測定した。5-FU および 5-BU の検出質量荷電比（ m/z ）は、129.0 m/z および 189.0 m/z にて行った。また、5-FU の定量は 5-BU への面積比にて算出した。血漿及び全血液試料 100 μ L からの 5-FU の定量及び検出限界はそれぞれ 0.05 μ g/mL 以下であった。LC-MS 法の測定条件を Table 1-2 に示す。

Table 1-2. LC-MS condition for 5-FU and 5-BU in samples

Items	Condition
Pump	LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japan)
System controller	SIL-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
UV detector	SPD-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Automatic sample injector	SIL-10ADvp (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column oven	CTO-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column	Quicksorb 5-ODS (2.1 mm i.d. \times 150 mm、5 μ m size) (Chemco Science Co. Ltd., Osaka, Japan)
Column temperature	60 $^{\circ}$ C
Mobile phase	5 mM ammonium formate : acetonitrile = 10: 90, v/v
Flow rate	0.2 mL/min
Probe voltage	-3.0 kV (APCI-negative mode)
Probe temperature	400 $^{\circ}$ C
Nebulize gas flow	2.5 L/min
CDL voltage	45 V
CDL temperature	200 $^{\circ}$ C
Deflector voltage	-35 V

1-2-9. 薬物動態解析

5-FU の薬物動態学的パラメータは解析ソフト WinNonlin[®] Version 6.1 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA) を用いてノンコンパートメント解析法にて行った。消失速度定数 (λ_z) は終末相の直線部分の勾配から線形最小二乗法を用いて算出した。終末相消失半減期 ($t_{1/2}$) は $t_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$ により求めた。血漿中薬物濃度－時間曲線下面積 AUC および血中濃度 1 次モーメント－時間曲線

下面積 (AUMC) は最終実測値までの値を線形台形公式により求め (AUC_{last} および $AUMC_{last}$)、それ以降の値は無限時間まで外挿し、それぞれ補正項として $C_{p(last)}/\lambda_z$ または $t_{(last)} \times C_{p(last)}/\lambda_z + C_{p(last)}/\lambda_z^2$ を加えて算出した ($AUC_{0-\infty}$ および $AUMC_{0-\infty}$)。平均滞留時間 (MRT)、全身クリアランス (CL_{tot}) および定常状態の分布容積 (Vd_{ss}) は、それぞれ $AUMC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty}$ 、 $Dose/AUC_{0-\infty}$ 、および CL_{tot}/MRT により算出した。肝初回通過効果の回避率 F_h は門脈内投与時の血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ ($AUC_{intraportal}$) を静脈内投与時の血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ ($AUC_{i.v.}$) で除することにより算出した。

1-2-10. 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。薬物動態学的パラメータは対応のない二群間の検定 (Student's unpaired *t*-test) を行い、危険率 0.05 以下を有意差ありと判断した。

1-3. 結果

1-3-1. 正常およびCRC ラットの体重及び血清検査値

Figure 1-1 は正常及びCRC ラットの体重変化を示す。生理食塩水またはDMHを繰り返し皮下投与している間、両群のラットの体重は投与開始10週目まで増加し続けたが、DMHを投与した群のラットの体重は生理食塩水を投与した群に比べ、DMH投与開始3週間後から有意に減少した。

Table 1-3 は正常及びCRC ラットの血液中白血球数、好中球数、リンパ球数、好中球数とリンパ球数の比 (neutrophil to lymphocyte ratio: NLR)、血漿中アルブミン、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate aminotransferase: AST)、アラニンアミノ基転移酵素 (alanine aminotransferase: ALT) 及び γ グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -glutamyl transpeptidase: γ -GTP) を示す。両群間において、白血球数及びリンパ球数に有意差は認められなかったが、CRC ラットにおける好中球数及びNLRは正常ラットに比べ約2倍増加していた。また、両群間において血漿中アルブミン、AST、ALT及び γ -GTPに有意差は認められなかった。

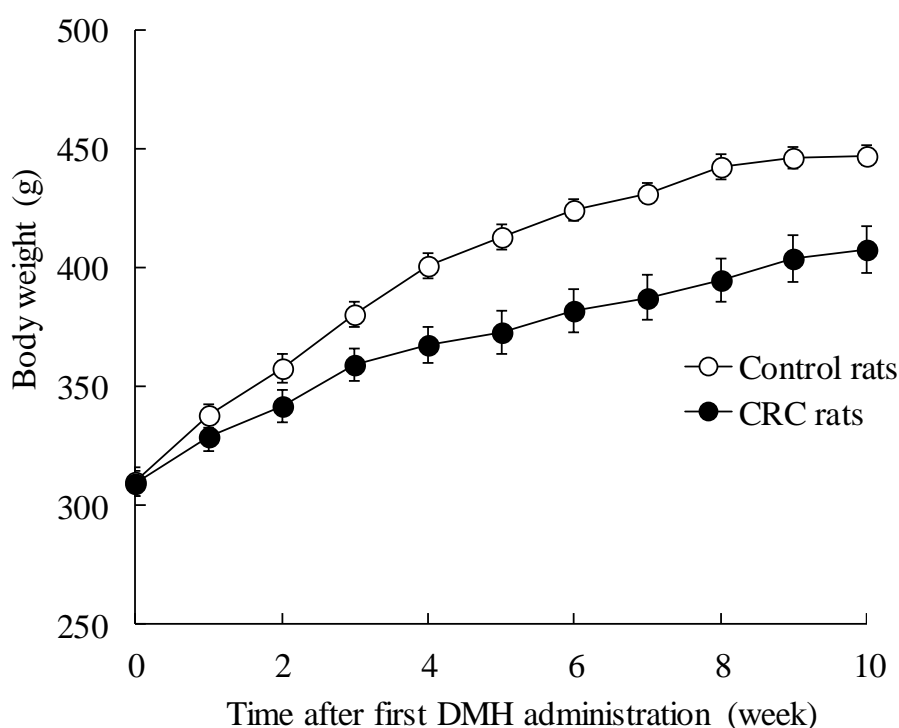


Figure 1-1. Time courses of body weight in control and DMH-treated rats

The rats were treated with DMH solution (10 % w/v) in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks (CRC rats) or the same volume of vehicle (saline) without DMH at the same time for the same duration (control rats). *Open circle* control rats; *filled circle* CRC rats. Results are presented as the mean \pm S.E. of 5 rats.

Table 1-3. Biochemical parameters in blood in control and CRC rats

Biochemical parameters	Control rats	CRC rats
Leukocyte ($10^2/\mu\text{L}$)	78.3 \pm 9.9	94.5 \pm 10.3
Neutrophil ($10^2/\mu\text{L}$)	8.8 \pm 1.9	16.2 \pm 2.3*
Lymphocyte ($10^2/\mu\text{L}$)	67.9 \pm 7.7	76.1 \pm 10.6
NLR	0.12 \pm 0.02	0.24 \pm 0.05*
Alb (g/dL)	4.1 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1
AST (IU/L)	69.3 \pm 2.9	74.2 \pm 4.3
ALT (IU/L)	41.0 \pm 5.4	56.8 \pm 3.2
γ -GTP (IU/L)	<1.0	<1.0

NLR: neutrophil to lymphocyte ratio, Alb: albumin, AST: aspartate aminotransferase,

ALT: alanine aminotransferase, γ -GTP: γ -glutamyl transpeptidase

Each value represents the mean \pm S.E. of 5 rats.

** p <0.01, * p <0.05 statistically significant difference against control.

1-3-2. 形態学的観察

Figure 1-2 は正常及び CRC ラットの大腸における形態学的観察を示す。CRC ラットでは大腸微小前癌病変である ACF 及び大腸腫瘍が観測されたが、正常ラットでは ACF または大腸腫瘍は観測されなかった。

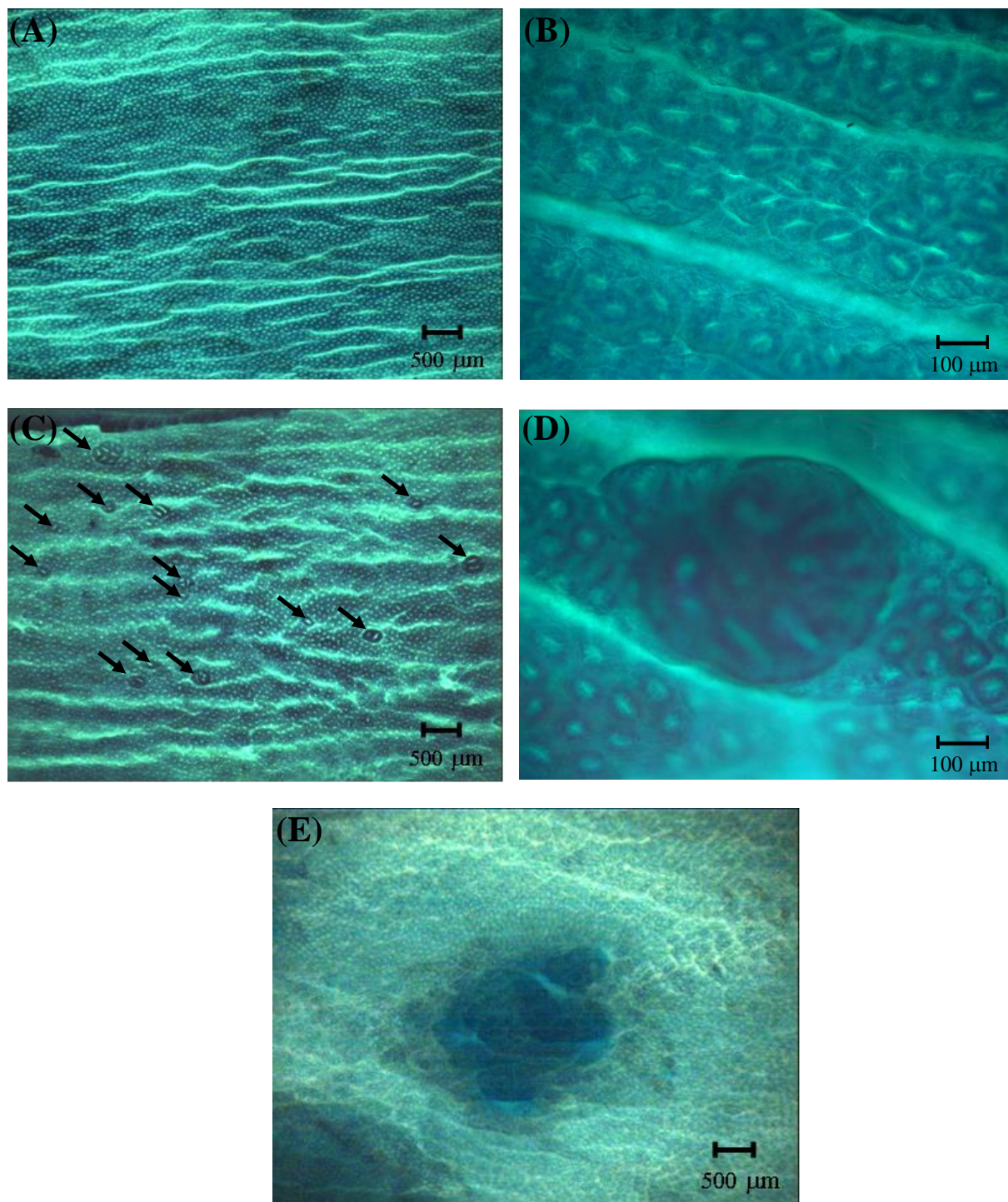


Figure 1-2. Mucosal surface view of fixed colon stained with methylene blue visualized under a light microscope

(A), (B) Topographical view of normal crypts from rats treated with vehicle without DMH once a week for 10 weeks. The colon of rats was obtained one week after the last administration of saline. (C), (D) Topographical view of ACF from CRC rats treated with DMH solution (10% w/v) in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks. (E) Topographical view of tumors from CRC rats treated with DMH solution (10% w/v) in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks. The colon of CRC rats was obtained one week after the last administration of DMH.

1-3-3. DPD 活性測定

Figure 1-3 は正常ラット及びCRC ラットにおける肝臓中 DPD 活性及び血漿中ジヒドロウラシル/ウラシル (UH2/Ura) 比を示す。CRC ラットの肝臓中 DPD 活性及び血漿中 UH2/Ura 比は、正常ラットに比べてそれぞれ約 1.6 及び 1.4 倍の有意な増加が認められた。

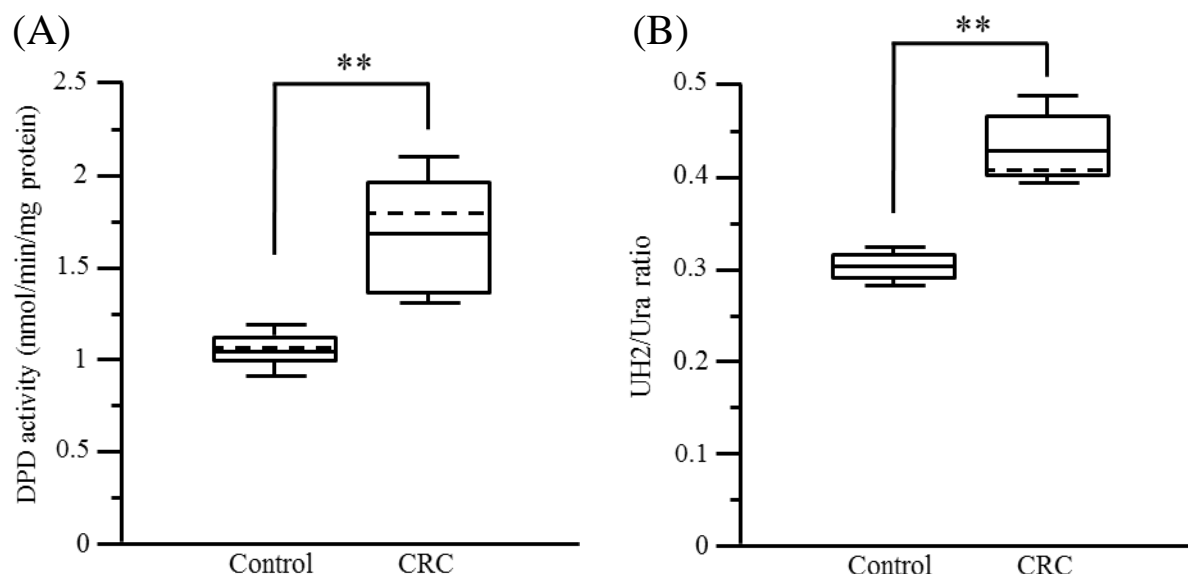


Figure 1-3. Hepatic DPD activity levels (A) and UH2/Ura ratio in plasma (B) of control and CRC rats

CRC rats were prepared by subcutaneous administration of DMH solution in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks. Control rats received the same volume of vehicle without DMH at the same time for the same duration. Experiments were performed 1 week after the last administration of DMH. The bottom and top of each box represent the 25th and 75th percentile of the group ($n = 5$ rats), and the solid and dash line near the middle of each box represent the mean and median values, respectively.

1-3-4. *In vitro* 血漿タンパク結合及び R_b

正常ラット及びCRC ラットにおける 5-FU 血漿タンパク非結合率の 0.1, 1.0, 10 及び 50 $\mu\text{g/mL}$ 間における測定結果及び R_b を Table 1-4 に示す。本検討における 5-FU 濃度範囲については *In vivo* 薬物動態試験にて観測された血漿中 5-FU 濃度に基づいて決定した。0.1 から 50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において、正常及びCRC ラットにおける 5-FU 血漿タンパク非結合率および R_b にはそれぞれ有意な変化は認められず、この濃度範囲において 5-FU 血漿タンパク非結合率および R_b は一定であった。また、各濃度での 5-FU 添加試料における血漿タンパク非結合率および R_b に関して、両群間においても有意差は認められなかった。

Table 1-4. Plasma unbound fraction and whole blood to plasma concentration ratio (R_b) of 5-FU in control and CRC rats

5-FU concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma unbound fraction (%)		R_b	
	Control rats	CRC rats	Control rats	CRC rats
0.1	101.6 \pm 4.9	102.3 \pm 6.9	0.91 \pm 0.08	0.94 \pm 0.05
1.0	100.6 \pm 1.8	101.1 \pm 7.3	0.96 \pm 0.03	0.95 \pm 0.04
10	100.3 \pm 0.9	99.5 \pm 1.8	0.90 \pm 0.04	0.88 \pm 0.01
50	100.7 \pm 3.4	101.5 \pm 0.5	0.92 \pm 0.01	0.90 \pm 0.02

The rat blood or plasmas used for the protein binding and distribution study to erythrocytes fractions were obtained at 1 week after the last DMH administration (CRC rats) or saline (control rats). Each value represents the mean \pm S.E. of 5 rats.

1-3-5. *In vivo* 薬物動態

Figure 1-4 及び Figure 1-5 は、5-FU (20 mg/kg) をそれぞれ静脈内または門脈内投与した際の血中 5-FU 濃度推移を示し、得られた薬物動態学的パラメータを Table 1-5 に示した。

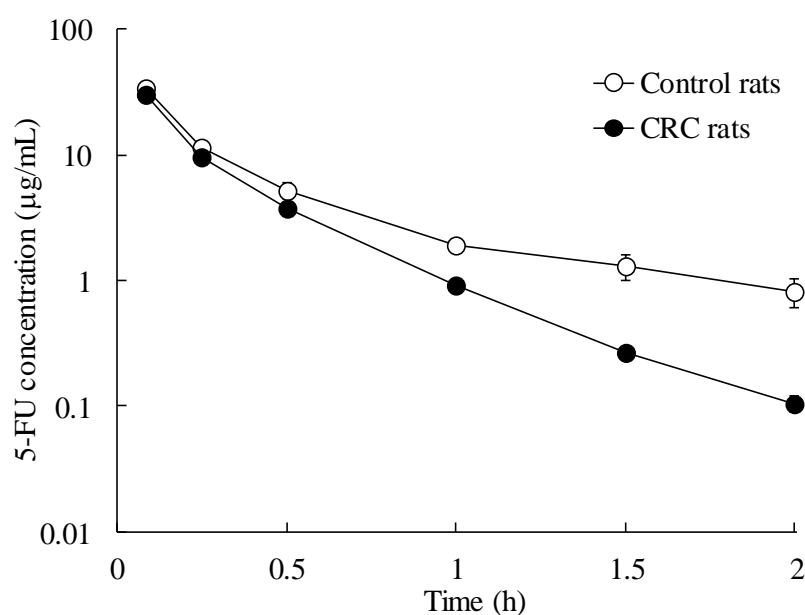


Figure 1-4. Mean plasma concentration profiles of 5-FU after i.v. administration of 20 mg/kg 5-FU to control and CRC rats

CRC rats were prepared by subcutaneous administration of DMH solution in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks. Control rats received the same volume of vehicle without DMH at the same time for the same duration. The PK studies of 5-FU in both groups were performed 1 week after the last administration of DMH. *Open circle* control rats; *filled circle* CRC rats. Results are presented as the mean \pm S.E. of 5 rats.

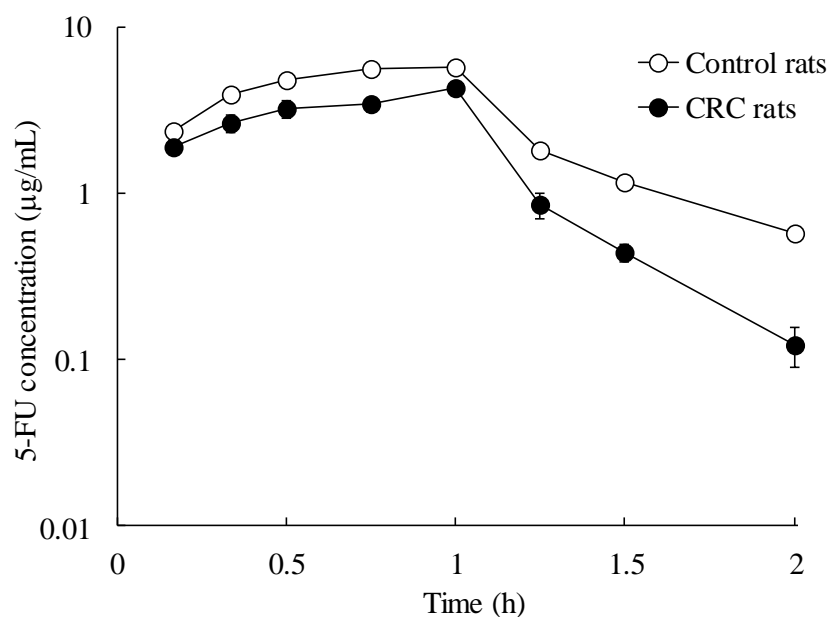


Figure 1-5. Mean plasma concentration profiles of 5-FU after intraportal administration of 20 mg/kg 5-FU to control and CRC rats

The infusion time and rate were 1 h and 2.0 mL/kg/h, respectively. CRC rats were prepared by subcutaneous administration of DMH solution in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks. Control rats received the same volume of vehicle without DMH at the same time for the same duration. The PK studies of 5-FU for both groups were performed 1 week after the last administration of DMH. *Open circle* control rats; *filled circle* CRC rats. Results are presented as the mean \pm S.E. of 5 rats

Table 1-5. Pharmacokinetic parameters of 5-FU after i.v. or intraportal administration to control and CRC rats, 20 mg/kg

Pharmacokinetic parameters	Control rats	CRC rats
i.v. administration		
$t_{1/2}$ (h)	0.52 \pm 0.05	0.30 \pm 0.02**
CL_{tot} (L/h/kg)	1.54 \pm 0.14	2.01 \pm 0.07*
Vd_{ss} (L/kg)	0.63 \pm 0.06	0.47 \pm 0.03*
$AUC_{0-\infty}$ (μ g·h/mL)	13.46 \pm 1.20	10.02 \pm 0.37*
intraportal administration		
$t_{1/2}$ (h)	0.47 \pm 0.04	0.27 \pm 0.03**
$AUC_{0-\infty}$ (μ g·h/mL)	6.31 \pm 0.28	3.85 \pm 0.38**
F_h (%) ^(a)	47.77 \pm 0.02	38.08 \pm 0.02*

^(a) F_h (%): hepatic availability was calculated by $AUC_{intraportal}/AUC_{i.v.}$, where $AUC_{intraportal}$ and $AUC_{i.v.}$ are AUC of 5-FU after intraportal and i.v. administration, respectively.

Each value represents the mean \pm S.E. of 5 rats.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ statistically significant difference against control.

静脈内投与後、CRC ラットにおける血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び半減期 $t_{1/2}$ はそれぞれ約 25 及び 42% の減少が認められ、全身クリアランス CL_{tot} は約 1.3 倍増加していた。また、5-FU 門脈内投与後の血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び半減期 $t_{1/2}$ はそれぞれ約 39 及び 43% 減少しており、肝初回通過効果の回避率 F_h は約 20% の減少が認められた。

1-4. 考察

DMH は CRC 作成に汎用される特異的発癌性物質であり、DMH によって誘導される CRC の発生及び病理学的所見はヒト CRC のそれと類似している^{35,36)}。DMH 誘導 CRC モデルラットは大腸発癌に関する研究分野において広く認識されているとともに汎用されるモデル動物である^{35,36)}。実際、Rahman らは、大腸への特異的送達を目的とした 5-FU 含有マイクロスフェアを作製し、その有用性を検討するために、CRC ラットを用いて 5-FU の薬物動態実験及び薬力学実験を行っている³⁷⁾。一方、Karthik らは、DMH を投与されたラットの体重増加及び成長率は正常ラットと比べて有意に低下したと報告している³⁸⁾。また、Hung らは、大腸癌患者において、炎症性マーカーである NLR の増加は潜在的な腫瘍の存在を示唆するものであると報告している³⁹⁾。今回の検討において、我々が作製した CRC ラットにおいても、過去の報告と同様に、体重増加率の減少、NLR の増加、大腸 ACF 及び腫瘍の存在が確認された (Figure 1-1, Table 1-3)。一般的に、DMH 誘導 CRC ラット作製の成否は大腸発癌のバイオマーカーである ACF や腫瘍の有無を用いて評価される^{22,23)}。本検討においても大腸 ACF 及び腫瘍の存在が確認された (Figure 1-2) ことから、大腸内の担癌状態が肝臓中 DPD 活性及び 5-FU 体内動態に与える影響について検討するために、DMH 誘導 CRC ラットを用いた。

CRC ラットの肝臓中 DPD 活性について検討を行った。興味深いことに、CRC ラットの肝臓中 DPD 活性は正常ラットのそれと比べ、約 1.6 倍の増加が認められた (Figure 1-3A)。この結果は、DPD が 5-FU 不活性化反応経路における第一段階の律速反応を触媒することを考慮に入れると、CRC ラットにおける 5-FU 肝固有クリアランス (CL_{int}) は正常ラットのそれと比べ、約 1.6 倍の増加を示唆するものである。さらに、代替法を用いて CRC ラットにおける肝臓中 DPD 活性増加を明確にするため、肝臓中 DPD 活性を反映し得る間接的バイオマーカーである血漿中 UH2/Ura 比^{32,40)}を測定した。Ura は 5-FU と同様、DPD により UH2 に異化されることから、血漿中 UH2/Ura 比を測定することで肝臓中 DPD 活性及び 5-FU 代謝能を予測し得ることが知られている⁴⁰⁾。検討の結果、CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比は、正常ラットのそれと比べ、有意な増加が認められた (Figure 1-3B)。これらのことから、CRC ラットにおける肝臓中 DPD 活性の増加は明らかである。ラットにおける肝臓中 DPD 活性の増加に関しては、いくつかの報告がある。Tateishi らは、DPD 活性増加の詳しいメカニズムはわからないものの、肝障害モデルラットにおける肝臓中 DPD 活性及び DPD タンパク量は、正常ラットのそれらに比べて高値を示したと報告している⁴¹⁾。また、高用量の DMH (100 mg/kg) をラットの腹腔内に投与すると肝臓癌が誘発され⁴²⁾、ヒト肝臓癌細胞においては、ヒト正常肝細胞に比べ DPD 活性の増加が報告されている⁴³⁾。これらの知見から、少なくとも以下の 2 つの可能性が挙げられる。第一に、40 mg/kg DMH の 10 週間皮下投与により、肝障害が誘発された可能性が考えられる。しかし、慢性肝障害時に減少が認められる血漿中総アルブミン量⁴⁴⁾、急性肝障害時には増加が認められる血漿中 AST、ALT 及び γ -GTP 量⁴⁵⁾に関して、本検討では CRC ラットと正常ラットとの間に有意な変化は認められなかった (Table 1-3)。したがって、本検討では DMH の肝障害または肝発癌に及ぼす影響について病理組織学的な検討を行っていないものの、CRC ラットにおいて肝障害が誘発された可能性は低いと考えられる。第二に、DMH が肝臓中 DPD 活性の増加を誘発した可能性が考えられる。しかし、ラットに投与された DMH は、投与後 24 時間で完全に代謝されることが報告されており⁴⁶⁾、本検討では DMH 最終投与 1 週間後に CRC ラットから肝臓を摘出しているため摘出肝臓中には DMH は存在してい

ないものと推察される。したがって、CRC ラットにおける肝臓中 DPD 活性化に関するメカニズムについてはさらなる検討が必要であるものの、大腸内の担癌状態により肝臓中 DPD 活性の増大が誘発され、この増大は血漿中 UH2/Ura 比を測定することで評価し得ることが示唆された。

臨床において明らかな薬物体内動態変動をもたらす要因の一つに、血漿タンパク結合率の変化が挙げられる。病態下における生理学的な変化が原因で薬物と血漿タンパクとの結合率が変化し、薬効及び副作用発現に影響を及ぼす場合があるため、薬物と血漿タンパクとの結合について適切かつ個別的な評価を行うことが求められている⁴⁷⁾。Matsushita らは過去に、担癌モデルラットの血液構成成分が、血液内薬物分布も含め、質的及び量的に変化していることを報告している⁴⁸⁾。彼らは、ラット骨肉腫により誘発された酸化ストレスが原因で血漿タンパクであるアルブミンの立体構造が変化し、その結果、抗生物質 cefazolin や非ステロイド性抗炎症薬 ibuprofen の血漿タンパク結合率が変化したと報告している^{48,49)}。さらに、我々は過去に、赤血球表膜が酸化ストレス障害を受けた結果、抗うつ薬 clomipramine 及び fluvoxamine の赤血球表膜への親和性が変化し、血球移行率 R_b が増加したことを報告した^{50,51)}。加えて、Khan らは、ラットへの DMH の投与は、抗酸化能を有する酵素量を減少させ、酸化ストレスを誘発させると報告している⁵²⁾。これらの知見を踏まえると、CRC ラットにおいて、5-FU と血漿タンパク及び赤血球との結合は、正常ラットに比べ変化しているものと予想される。しかし、本検討の結果、CRC ラット血漿における 5-FU 血漿タンパク非結合率及び R_b は正常ラットのそれらと比べ、有意な変化が認められなかった。ヒト血漿タンパク非結合率と同様、正常ラット血漿における 5-FU 血漿タンパク非結合率が約 100% である⁵³⁾ことからわかるように、5-FU は、血漿タンパク結合能の高い cefazolin (ヒト血漿タンパク結合率: 約 80%)⁵⁴⁾、ibuprofen (同: 約 99%)^{55,56)}、clomipramine (同: 約 96%)⁵⁷⁾及び fluvoxamine (同: 約 81%)⁵⁸⁾に比べ、血漿タンパクに対する結合能は低い。したがって、5-FU は血漿タンパク結合能が低いために、CRC ラットにおける 5-FU の血漿タンパク結合能は影響を受けないものと考えられた。本検討では結論付けることはできないが、CRC ラットにおいて R_b に変化が認められなかったのは、酸化ストレスに対する赤血球表膜の感受性の個体差が可能性として挙げられる。

CRC ラットを用いて、5-FU 薬物動態実験を行った。過去の報告によると、5-FU 静脈内投与量が 10 から 50 mg/kg の間では、5-FU 静脈内投与後の体内動態は線形性を示すが、100 mg/kg 以上では全身クリアランス CL_{tot} が減少することが知られている⁵⁹⁾。さらに、血漿中 5-FU 濃度が 15 $\mu\text{g/mL}$ 以下の場合には 5-FU 肝抽出率はほぼ一定であるのに対し、40 $\mu\text{g/mL}$ を超えると飽和することが報告されている⁶⁰⁾。したがって、本検討では、5-FU 投与量を 20 mg/kg に設定し、ラット群及び投与経路に関わらず血漿中 5-FU 濃度は 40 $\mu\text{g/mL}$ 以下であることを確認した (Figure 1-4 及び 1-5)。CRC ラットに 5-FU を静脈内に投与したところ、正常ラットに比べ、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 、分布容積 V_{dss} 及び半減期 $t_{1/2}$ はそれぞれ約 25、25 及び 42% 減少し、全身クリアランス CL_{tot} は約 1.3 倍増大した。同様に、CRC ラットにおいて、5-FU 門脈内投与後の血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び半減期 $t_{1/2}$ はそれぞれ約 39 及び 43% 減少し、肝初回通過効果の回避率 F_h は約 20% の減少が認められた (Table 1-4)。 F_h は次式で表すことができる⁶¹⁾。

$$F_h = \frac{Q}{Q + f_u \cdot CL_{int}}$$

上式中において、 Q は肝血流量、 f_u は血漿中タンパク非結合率、 CL_{int} は肝固有クリアランスをそれぞれ表す。一般的に、 F_h の減少が観測されるのは、 f_u または CL_{int} のどちらか一方、もしくはそ

の両方が増加する場合、または、 Q が減少するときである。本検討の結果によると、 f_u に関して、上記のように、CRC ラットと正常ラットとの間に有意な差は認められなかった。加えて、CRC ラット肝臓中における DPD 活性が正常ラットのそれに比べ約 1.6 倍の増加が認められたことから、CRC ラットにおける 5-FU の肝固有クリアランス CL_{int} は正常ラットのそれに比べ約 1.6 倍増大している (Figure 1-3)。以上より、肝血流量の変化が 5-FU 肝代謝に影響を及ぼしている可能性は否定できないものの、CRC ラットにおける肝初回通過効果の回避率 F_h の減少は、肝臓中 DPD の活性化に伴う肝固有クリアランス CL_{int} の増加によりもたらされたものであることが示唆され、その結果、正常ラットに比べ、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び半減期 $t_{1/2}$ の減少と全身クリアランス CL_{tot} の増加に繋がったものと推測される。血漿中 5-FU 濃度と治療効果及び毒性との関係について検討した臨床試験によると、5-FU 治療効果及びその毒性は、血漿中 5-FU 濃度に基づく薬物動態学的な投与量調節を行うことで改善すると報告されている^{62,63)}。また、5-FU 投与後の血中濃度－時間曲線下面積 AUC が高値であった患者では、低値であった患者に比べ奏効率が上昇したと報告されている^{62,63)}。これらの結果に基づくと、大腸癌患者に対する 5-FU 癌化学療法に関して、体表面積に基づく投与設計では肝臓中 DPD の活性化に伴う肝固有クリアランス CL_{int} の増加により期待すべき血中濃度－時間曲線下面積 AUC が得られず、5-FU 抗腫瘍効果の減弱を招くおそれがあることが示唆される。したがって、個々の大腸癌患者ごとに、血漿中 UH2/Ura 比測定などによる肝臓中 DPD 活性モニタリングを用いた投与設計が必要であると考えられる。

1-5. 小括

大腸内の担癌状態は肝臓中 DPD の活性化を誘発し、それは血漿中 UH2/Ura 比を測定することで評価し得ることが示唆された。本検討において、CRC ラット血液内の 5-FU 分布に変化は認められなかったが、CRC ラットに 5-FU を静脈内及び門脈内に投与したところ、正常ラットに比べ、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 、分布容積 Vd_{ss} 及び半減期 $t_{1/2}$ は減少し、全身クリアランス CL_{tot} は増大した。さらに、CRC ラットにおいて、肝初回通過効果の回避率 F_h の減少が認められた。CRC ラットにおける肝初回通過効果の回避率 F_h の減少は、肝臓中 DPD の活性化に伴う肝固有クリアランス CL_{int} の増加によりもたらされたものであることが示唆され、その結果、正常ラットに比べ、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 、分布容積 Vd_{ss} 及び半減期 $t_{1/2}$ の減少及び全身クリアランス CL_{tot} の増加に繋がったものと考えられた。これらの結果から、大腸癌患者に対する 5-FU 癌化学療法に関して、体表面積に基づく投与設計では肝臓中 DPD の活性化に伴う肝固有クリアランス CL_{int} の増加により、高い血漿中 5-FU 濃度及び血中濃度－時間曲線下面積 AUC が維持できず、5-FU 抗腫瘍効果の減弱を招く可能性が示唆された。したがって、大腸癌患者に対する個別化療法に関して、血漿中 UH2/Ura 比測定などを用いた、肝臓中 DPD 活性を考慮した投与設計が求められる。

第二章 大腸癌化学療法における血漿中 dihydrouracil/uracil 比のバイオマーカーとしての有用性

2-1. 緒言

5-FU は進行又は再発消化器癌をはじめとした種々の固形癌化学療法の key drug として広く用いられている。しかし、5-FU の治療効果及び毒性発現は個体差が著しく、適正使用に関して議論の余地が残っている。Gamelin らは、転移性大腸癌患者 208 名を対象にした Phase III 多施設臨床試験において、5-FU の 8 時間持続点滴を施す際に、体表面積を基に 5-FU 投与量の設計 ($1500 \text{ mg/m}^2/\text{week}$) を行った群と、血漿中 5-FU 濃度を測定しながらあらかじめ設定した至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC 域 ($20\text{--}25 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$) に収まるように投与量を調整した群とを比較した⁶³⁾。その結果、至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC を得るために必要な投与量は $765\text{--}3300 \text{ mg/m}^2/\text{week}$ と大きな患者間変動が認められ、体表面積に基づいて投与量決定を行った患者のうち約 68% が過少投与であることがわかった。さらに、至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC 域に収まるように投与量を調整した群の生存期間の中央値は、体表面積に基づいて投与量の決定を行った群に比べ、有意差は認められなかったものの 6 ヶ月の延長が認められた ($p = 0.08$)。また、5-FU 投与後における毒性発現に関して、WHO で定められた Grade III または IV の下痢が発現した患者は、体表面積に基づいて投与量の決定を行った群では 18% であったのに対し、至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC 域に収まるように投与量調整した群では 4% と有意な減少が認められた。以上の結果から、体表面積に基づいて投与量を決定する方法は、5-FU の体内動態の個人差が考慮できていないため、同一の投与量を受けた場合でも血漿中 5-FU 濃度に個人差が生じ、期待する治療効果が得られない上、重篤な副作用が発現する可能性が考えられる。Gamelin らは、5-FU を用いた癌化学療法では体表面積に基づいた投与設計ではなく、治療薬物モニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) を実施することで、毒性を最小限にし、かつ最大の効果を得るための投与設計を個々の患者ごとに行うことが治療成績の向上につながると結論付けている⁶³⁾。これらの知見から、5-FU 治療効果及び毒性発現を予測するマーカーの同定が今後の研究課題であると考えられる。

5-FU の治療効果及び毒性発現の個体差が著しい理由の一つとして、5-FU 代謝酵素活性の個体差が大きいことが挙げられる。生体内に投与された 5-FU の約 90% は肝臓において DPD により代謝分解される。5-FU の体内動態は肝臓中 DPD の活性による影響を受けることから、肝臓中 DPD 活性は 5-FU の治療効果及び毒性発現を決定づける因子の一つであると推察される。したがって、5-FU を用いた癌化学療法施行前に肝臓中 DPD 活性を測定することは、個々の患者に応じた投与量を決定する際に有用な情報をもたらすものと考えられる。しかしながら、臨床では、肝臓中 DPD 活性を直接測定し、治療に反映させることは困難である。この解決策として、肝臓中 DPD 活性を反映し得る間接的バイオマーカーである血漿中 UH2/Ura 比の測定が挙げられる。第二章では、血漿中 UH2/Ura 比の測定意義を確かめるため、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 体内動態及び治療効果の関係について、CRC モデルラットを用いて検討を行った。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 試薬

5-FU、Ura、UH2、BSA、メチレンブルー、NADPH 及び EDTA は和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。LC-MS 法の際に内標準物質として用いる 5-BU は Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany) より購入した。DMH 及び S-(2-アミノエチル)イソチオウロニウム臭化水素酸塩は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。リン酸カリウム、塩化マグネシウム、ベンズアミジン及びスクロースはナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した。その他の試薬類はすべて市販特級品を用いた。

2-2-2. 動物

すべての動物実験は京都薬科大学動物実験倫理規定に準じて行った。実験動物は、約 10 週齢の Wistar Hannover 系雄性ラット (体重約 315 ± 17 g) を Nippon SLC Co. Ltd. (Hamamatsu, Japan) より購入したものをを用いた。実験動物の飼育及び CRC ラットの作製に関しては、第一章 1-2-2 に準じて実施した。後述する薬物動態学実験及び薬力学実験は、DMH による影響を避けるため DMH 最終投与 1 週間後に行った。

2-2-3. 血漿中 UH2/Ura 比及び DPD 活性の測定

Jang ら⁴⁰⁾及び Tateishi らの方法³⁰⁾に準じ、CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比及び肝臓中 DPD 活性の日内変動を測定した。CRC ラットはそれぞれ実験開始時間に基づき午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時の 3 群に分類した。各群のラットを半日絶食後、決められた時間にペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与し、麻酔下にて放血致死させた。得られた血液をヘパリンで処理した試験管内に移し、遠心分離 ($2500 \times g$ 、10 分間、 25°C) にて血漿成分を分離回収し、血漿中 Ura 及び UH2 濃度を第一章 1-2-7 と同様の方法で LC-MS/MS 法にて測定した。一方、CRC ラットを放血致死させた後直ちに氷冷リン酸緩衝液にて肝脱血を行い、肝臓を単離した後その湿重量を測定し、細胞質画分の調整に用いた。細胞質画分の調整及び DPD 活性の測定は第一章 1-2-4 と同様の方法で実施した。

2-2-4. In vivo 薬物動態

CRC ラットは半日絶食後、ペントバルビタール生理食塩水を 50 mg/kg の用量で腹腔内投与し、麻酔下にて固定台で背位固定した状態で実験に供した。麻酔下では外科手術用ランプを用いて体温を一定に保った。

CRC ラットをそれぞれ 5-FU 投与時間と薬力学試験に基づいて 12 群に分類した。Figure 2-1 は各ラット群の実験プロトコルを示す。5-FU 投与薬液は生理食塩水に溶解させて調製した (10 mg/mL)。各群のラットに対して、午前 7 時 (1, 4, 7, 10 群)、午後 1 時 (2, 5, 8, 11 群) または午後 7 時 (3, 6, 9, 12 群) にそれぞれ 5-FU を 20 mg/kg の用量で単回投与 (1-3 群)、または 1 日 1 回、3 日 (4-6 群) 及び 7 日間 (7-12 群) 反復静脈内投与した。薬物動態試験は 5-FU 投与開始 1 日目 (1-3 群)、3 日目 (4-6 群) または 7 日目 (7-9 群) に行った。5-FU 投与後の薬物動態学的パラメータと血漿中 UH2/Ura 比との関係を明らかにするため、薬物動態試験時において、5-FU 投与直前に左頸静脈から 0.50 mL の血液を採取した後、得られた血液をヘパリンで処理した試験管に移し、遠

心分離（ $2500\times g$ 、10 分間、 25°C ）にて血漿成分を分離回収した。5-FU を右頸静脈内に投与した後、経時的に左頸静脈から 0.25 mL の血液を採取し、遠心分離（ $9000\times g$ 、10 分間、 4°C ）した後、血漿を分取した。分取した血漿は測定まで -80°C にて凍結保存した。肝臓中 DPD 活性を測定するため、最終に血液試料を回収した 2 時間後に CRC ラットを開腹し、肝脱血及び肝臓摘出を行った。DPD 活性の測定は第一章 1-2-4 と同様の方法で実施した。なお、DPD 活性測定に用いた肝臓細胞質画分試料中の 5-FU 濃度が定量限界以下であることを確認した上で、測定用試料として用いた。

Preparation of CRC rats

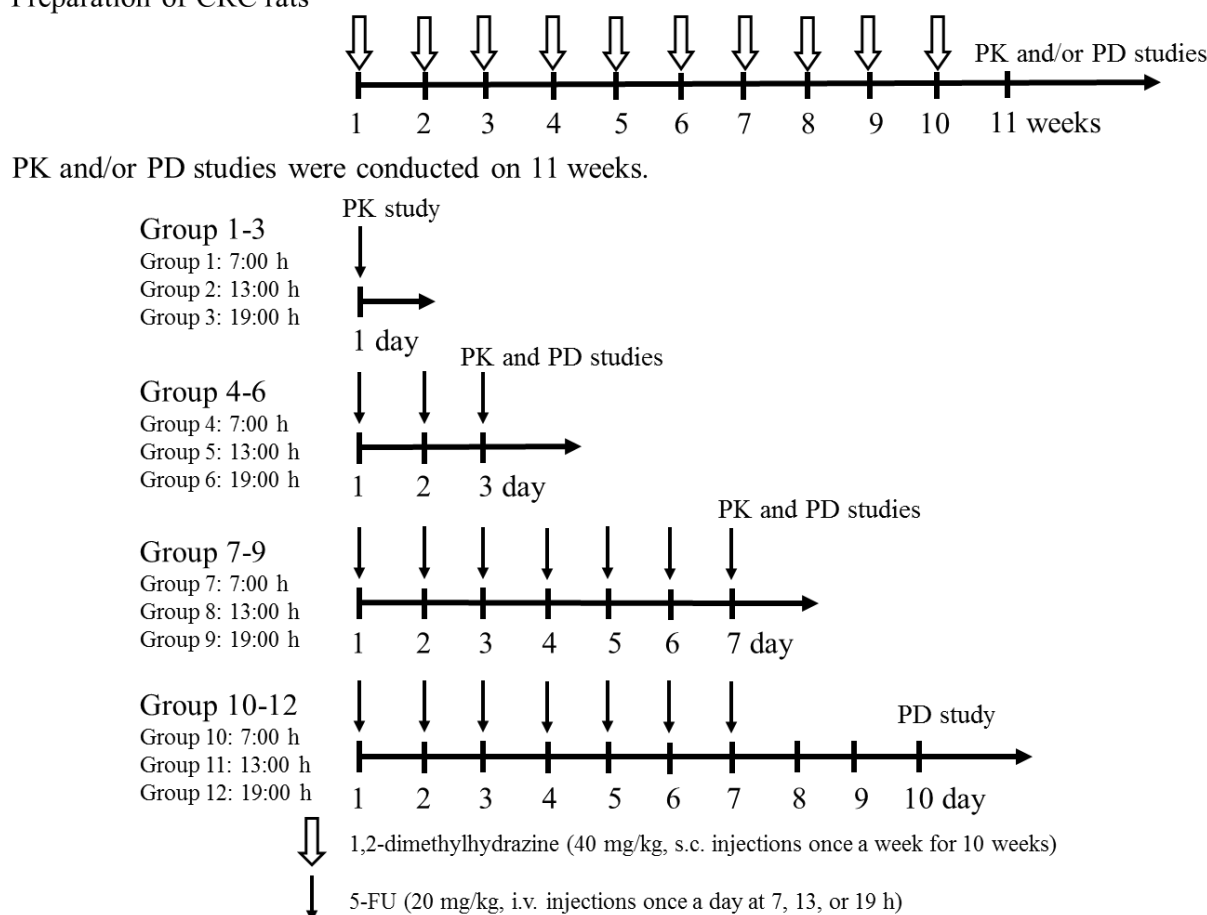


Figure 2-1. Experimental protocols used for preparation of CRC rats and PK and PD of 5-FU

CRC rats were prepared by subcutaneous administration of DMH solution in the groin region at a dosage of 40 mg/kg once a week for 10 weeks. The PK and/or PD studies of 5-FU in both groups were performed 1 week after the last administration of DMH.

2-2-5. In vivo 薬力学実験

DMH 投与にて誘導される ACF 数及び大腸腫瘍体積の測定は、Bird ら²²⁾と Silva らの方法²³⁾に準じて行った。5-FU 投与開始 3 日目 (4-6 群) または 7 日目 (7-9 群) の薬物動態実験終了後、各群のそれぞれのラットに対し薬力学実験を行った。また、5-FU 投与開始 10 日目に、10-12 群のそれぞれのラットに対し薬力学実験を行った (Figure 2-1)。対照群として、5-FU 投与薬液の溶媒である生理食塩水のみを午後 1 時に CRC ラットに投与し、5-FU 投与群と同様に薬力学実験を行った。CRC ラットにおける ACF 及び大腸腫瘍の形態学的観察は、第一章 1-2-3 と同様の方法で行った。ACF 数の測定は、実体顕微鏡 (XF-PH-21, Nikon Co., Tokyo, Japan; SKM-Z100A-PC, Saitoh Kougaku Co., Yokohama, Japan) を用いて計測し、異常な陰窩数 1 個 (ACF-1)、2 個 (ACF-2)、3 個 (ACF-3) または 4 個以上 (ACF-4⁺) で分類した。また、大腸腫瘍の寸法は実体顕微鏡 (SKM-Z100A-PC, Saitoh Kougaku Co., Yokohama, Japan) にて計測し、腫瘍体積 (tumor volume: TV) は Yoon らの報告⁶⁴⁾に準じ、腫瘍長径×(腫瘍短径)²にて算出した。

2-2-6. 試料中 Ura 及び UH2 濃度測定 (LC-MS/MS 法)

血漿試料中における Ura 及び UH2 濃度測定は、第一章 1-2-7 と同様に LC-MS/MS 法を用いて実施した。

2-2-7. 試料中 5-FU 濃度測定 (LC-MS 法)

血漿及び DPD 活性測定試料中における 5-FU 濃度測定は、第一章 1-2-8 と同様に LC-MS 法を用いて実施した。

2-2-8. 薬物動態解析

5-FU の薬物動態学的パラメータは、第一章 1-2-9 と同様に、解析ソフト WinNonlin[®] Version 6.1 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA) を用いてノンコンパートメント解析法により行った。

2-2-9. 統計解析

データはすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。血漿中 UH2/Ura 比と肝臓中 DPD 活性値、5-FU 投与後の CL_{tot}、血中濃度-時間曲線下面積 AUC_{0-∞} または 5-FU 投与開始 10 日目の大腸腫瘍体積との相関関係は、それぞれ回帰分析を行うことで評価し、回帰モデルは決定係数 (coefficient of determination: r^2) により判断した。検定は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) を行ったあと Bonferroni test による多重比較を行った。いずれも、危険率 0.05 以下を有意差ありと判断した。

2-3. 結果

2-3-1. 血漿中 UH2/Ura 比及び DPD 活性の日内変動

Figure 2-2 は CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比及び肝臓中 DPD 活性の日内変動を示す。CRC ラットにおける肝臓中 DPD 活性は午後 1 時に 1.77 ± 0.12 nmol/min/mg protein と最大値を示し、午後 7 時に 0.26 ± 0.05 nmol/min/mg protein と最小となり、その差は約 6 倍であった (Figure 2-2A)。一方、血漿中 UH2/Ura 比も DPD 同様に午後 1 時に最大値 (0.43 ± 0.02) を示し、午後 7 時に最小値 (0.24 ± 0.01) となり、その差は約 2 倍であった (Figure 2-2B)。血漿中 UH2/Ura 比と肝臓中 DPD 活性との間には強い相関関係が認められた ($r^2 = 0.934$, Figure 2-2C)。

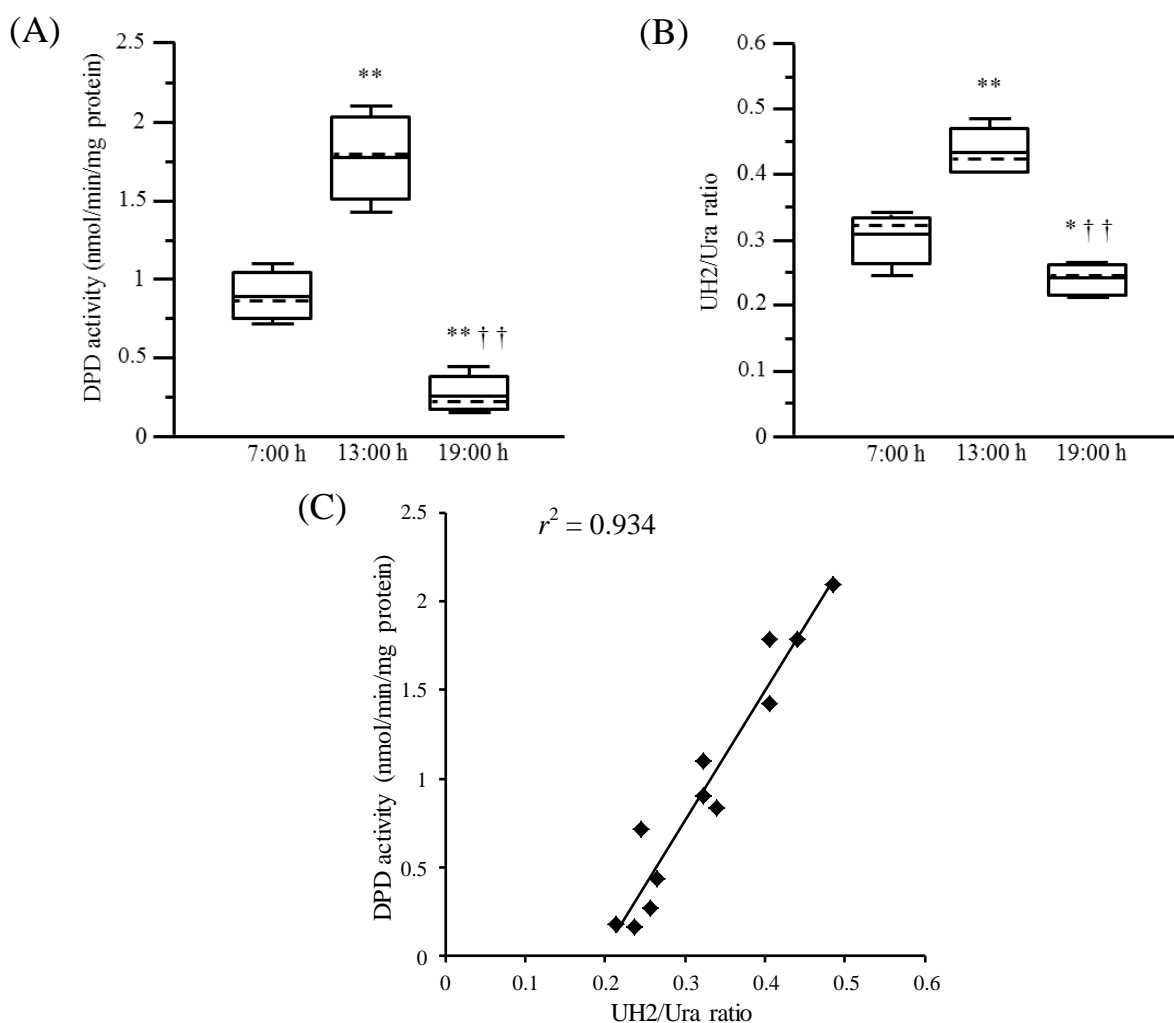


Figure 2-2. Circadian variation of DPD activity levels in the liver (A) and the plasma UH2/Ura ratio (B) and linear correlation with DPD activity levels in the liver for the plasma UH2/Ura ratio (C)

Data were obtained from the study in CRC rats under the following conditions: lights on from 8:00 to 20:00 h, and light off from 20:00 to 8:00 h. The bottom and top of each box represent the 25th and 75th percentile of the group ($n = 4$ rats), and the solid and dash line near the middle of each box represent the mean and median values, respectively (A, B). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at 7:00 h on the same day. †† $p < 0.01$ statistically significant difference against rats treated at 13:00 h on the same day. $n = 12$ (C).

2-3-2. 5-FU 体内動態の日内変動及び血漿中 UH2/Ura 比と薬物動態学的パラメータとの関係

Figure 2-3A は CRC ラットに対して、午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時に 5-FU を 20 mg/kg の用量で単回静脈内投与した後の平均血漿中 5-FU 濃度の推移を示す。さらに、5-FU をそれぞれ同時刻に 1 日 1 回、連日静脈内投与を行い、5-FU 連日投与開始 3 または 7 日目の平均血漿中 5-FU 濃度推移をそれぞれ Figure 2-3B 及び C に示す。Table 2-1 は得られた各群の血漿中 UH2/Ura 比及び薬物動態パラメータ値を示す。5-FU 投与開始前に採取した血漿中 UH2/Ura 比及び 5-FU 単回静脈内投与後の半減期 $t_{1/2}$ 、全身クリアランス CL_{tot} 、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ に関して、日内変動が認められた。一方、5-FU 反復投与後の血漿中 UH2/Ura 比及び薬物動態学的パラメータ値に日内変動は認められず、5-FU 投与開始 7 日目に観測された血漿中 UH2/Ura 比及び全身クリアランス CL_{tot} は、5-FU 投与開始 1 日目に比べ、それぞれ最大で約 56 及び 45% 有意に減少し、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ に関しては最大 1.8 倍の有意な増大が認められた。薬物動態実験開始前に採取した血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} または血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ との間にはそれぞれ正または負の相関関係が認められた (Figure 2-4, CL_{tot} : $r^2 = 0.905$, $AUC_{0-\infty}$: $r^2 = 0.843$)。

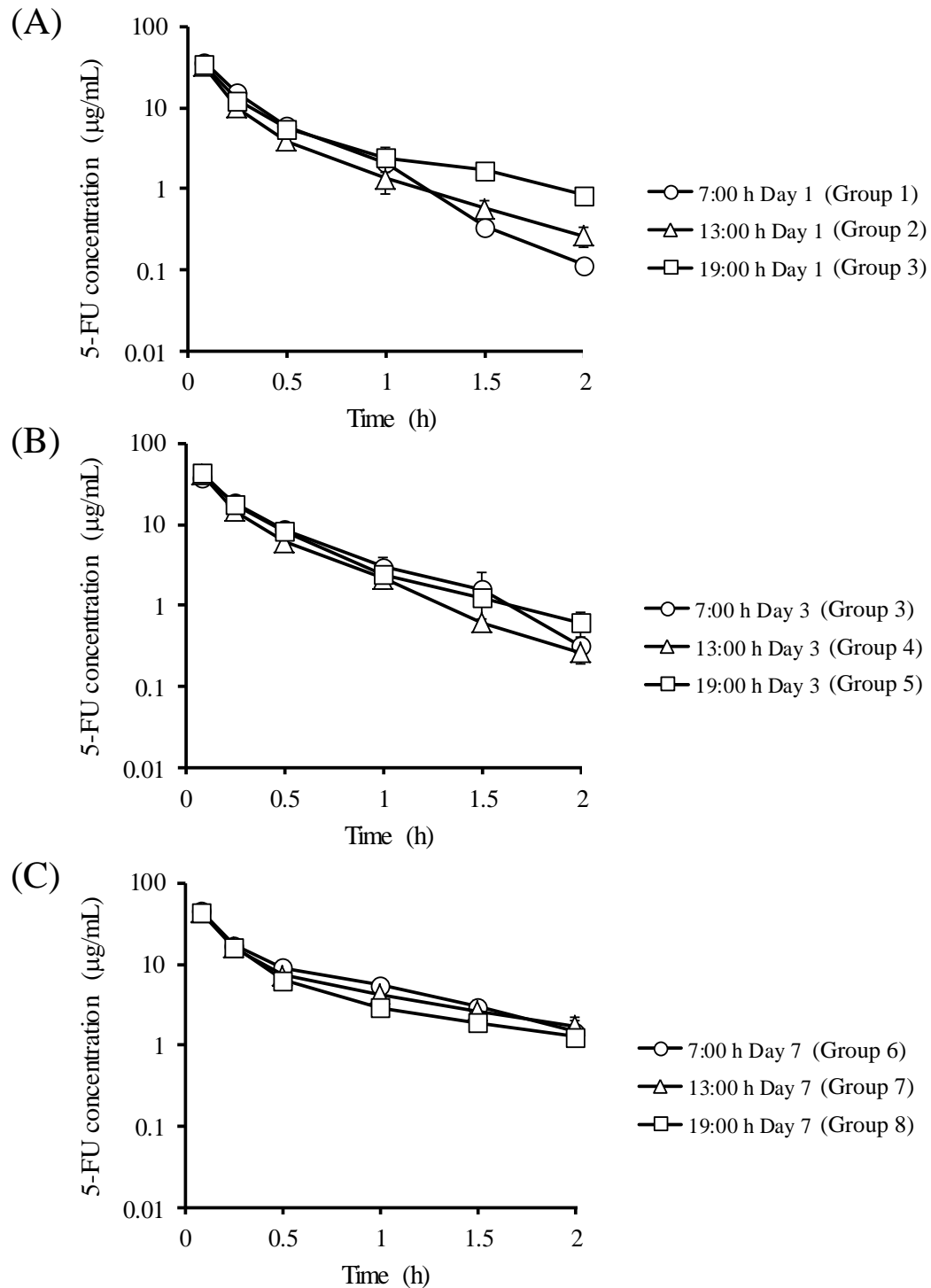


Figure 2-3. Mean plasma concentration profiles of 5-FU after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, to CRC rats at different times of the day for 1, 3 or 7 days

(A) Mean plasma concentration profiles of 5-FU after i.v. administration of 20 mg/kg 5-FU at 7:00, 13:00, or 19:00 h on Day 1. (B) Mean plasma concentration profiles of 5-FU after i.v. administration of 20 mg/kg 5-FU at 7:00, 13:00, or 19:00 h for 3 days on Day 3. (C) Mean plasma concentration profiles of 5-FU after i.v. administration of 20 mg/kg 5-FU at 7:00, 13:00, or 19:00 h for 7 days on Day 7. (○) 7:00 h; (△) 13:00 h; (□) 19:00 h. Results are presented as the mean \pm S.E. of 4 rats.

Table 2-1. Biomarker that was determined before the PK experiments and PK parameters after i.v. administration of 5-FU (20 mg/kg) to CRC rats at 7:00, 13:00, or 19:00 h

Biomarker and PK parameters	Day 1			Day 3			Day 7		
	7:00 h	13:00 h	19:00 h	7:00 h	13:00 h	19:00 h	7:00 h	13:00 h	19:00 h
	(Group 1)	(Group 2)	(Group 3)	(Group 4)	(Group 5)	(Group 6)	(Group 7)	(Group 8)	(Group 9)
<i>Biomarker</i>									
UH2/Ura	0.30±0.01	0.39±0.03 ^{**}	0.25±0.01 ^{**††}	0.20±0.04	0.30±0.06	0.19±0.01	0.14±0.03 ^{aa}	0.17±0.03 ^{aab}	0.19±0.03
<i>PK parameters</i>									
t _{1/2} (h)	0.25±0.02	0.37±0.03 [*]	0.56±0.04 ^{**††}	0.30±0.02	0.34±0.07	0.53±0.14	0.50±0.09 ^a	0.81±0.24 ^b	0.76±0.08
CL _{tot} (L/h/kg)	1.51±0.11	1.81±0.09 [*]	1.42±0.09 ^{††}	1.16±0.13	1.43±0.20	1.15±0.04 ^a	0.96±0.11 ^a	0.99±0.09 ^{aab}	1.10±0.06 ^a
Vd _{ss} (L/kg)	0.39±0.02	0.52±0.07	0.67±0.03 ^{**}	0.44±0.03	0.41±0.05	0.47±0.07 ^a	0.52±0.07	0.71±0.18	0.61±0.06
AUC _{0-∞} (μg·h/mL)	13.5±1.1	11.2±0.6 [*]	14.2±0.9 [†]	17.9±2.1	14.8±2.1	17.5±0.6 ^a	21.5±2.1 ^a	20.6±1.8 ^{aab}	18.4±1.1 ^a

^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at 7:00 h on the same day.

^{††} $p < 0.01$, [†] $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at 13:00 h on the same day.

^{aa} $p < 0.01$, ^a $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at the same time on Day 1.

^b $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at the same time on Day 3.

Each value represents the mean ± S.E. of 4 rats.

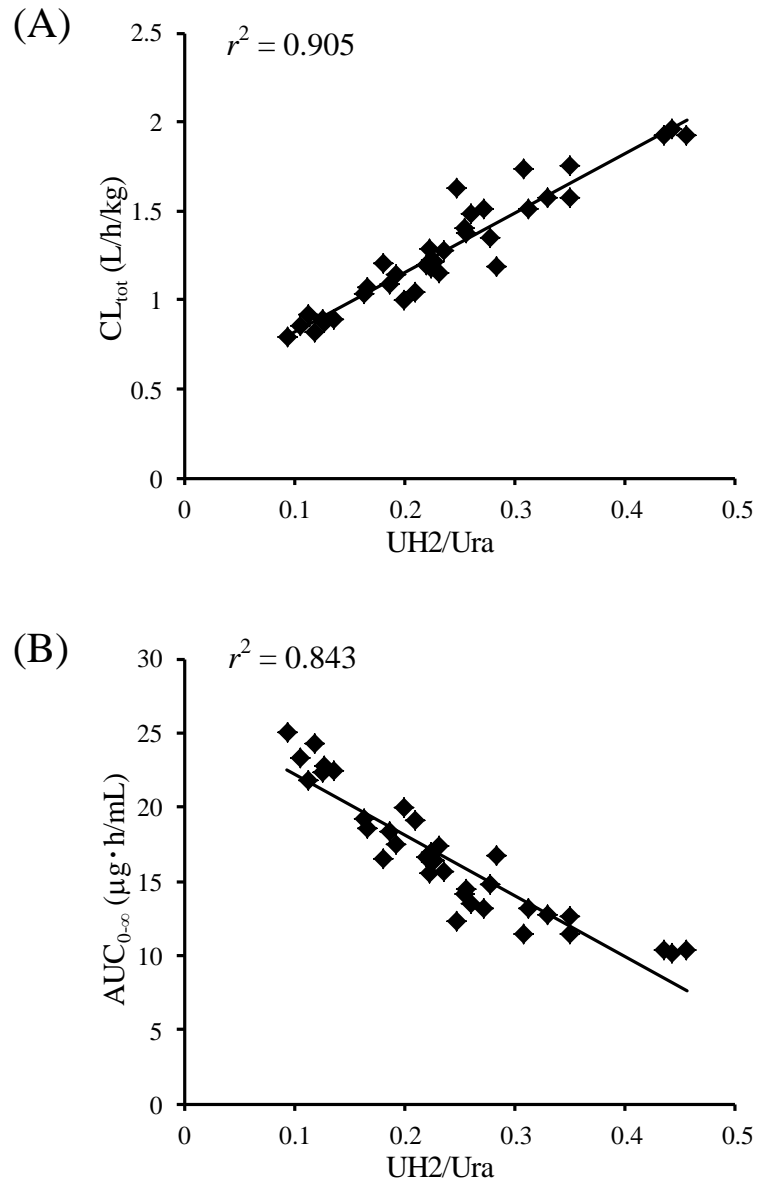


Figure 2-4. Linear correlations with the plasma UH2/Ura ratio for CL_{tot} (L/h/kg) (A) and $AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) (B) after i.v. administration of 5-FU administration, 20 mg/kg

The plasma ratio of UH2/Ura was determined before the PK experiments. CL_{tot} and $AUC_{0-\infty}$ obtained from the plasma concentration–time curve of 5-FU in Figure 2-2 were calculated using non-compartmental PK analysis using a computer program, WinNonlin[®] Version 6.1 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA), $n = 36$.

2-3-3. 5-FU 連続投与後における肝臓中 DPD 活性と血漿中 UH2/Ura 比との関係

Figure 2-5 は CRC ラットに対して、午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時に 5-FU を 20 mg/kg の用量で、それぞれ同時刻に 1 日 1 回、連日 7 日間静脈内投与を行った際の肝臓中 DPD 活性及び血漿中 UH2/Ura 比を示す。対照群ラット及び 5-FU 投与開始 1 日目において、血漿中 UH2/Ura 比及び肝臓中 DPD 活性は午後 1 時に最大となり午後 7 時に最低となる日内変動が認められたが、

5-FU 投与開始 3 及び 7 日目においては日内変動が認められず、いずれの投与時間においても対照群ラットに比べ、それぞれ有意に減少していた。Figure 2-6 は、5-FU 投与直前に得られた血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 投与後に得られた肝臓中 DPD 活性との関係を示す。回帰分析の結果、血漿中 UH2/Ura 比の値が 0.09–0.49 の範囲において、両者の間には二次曲線の関係が認められた。

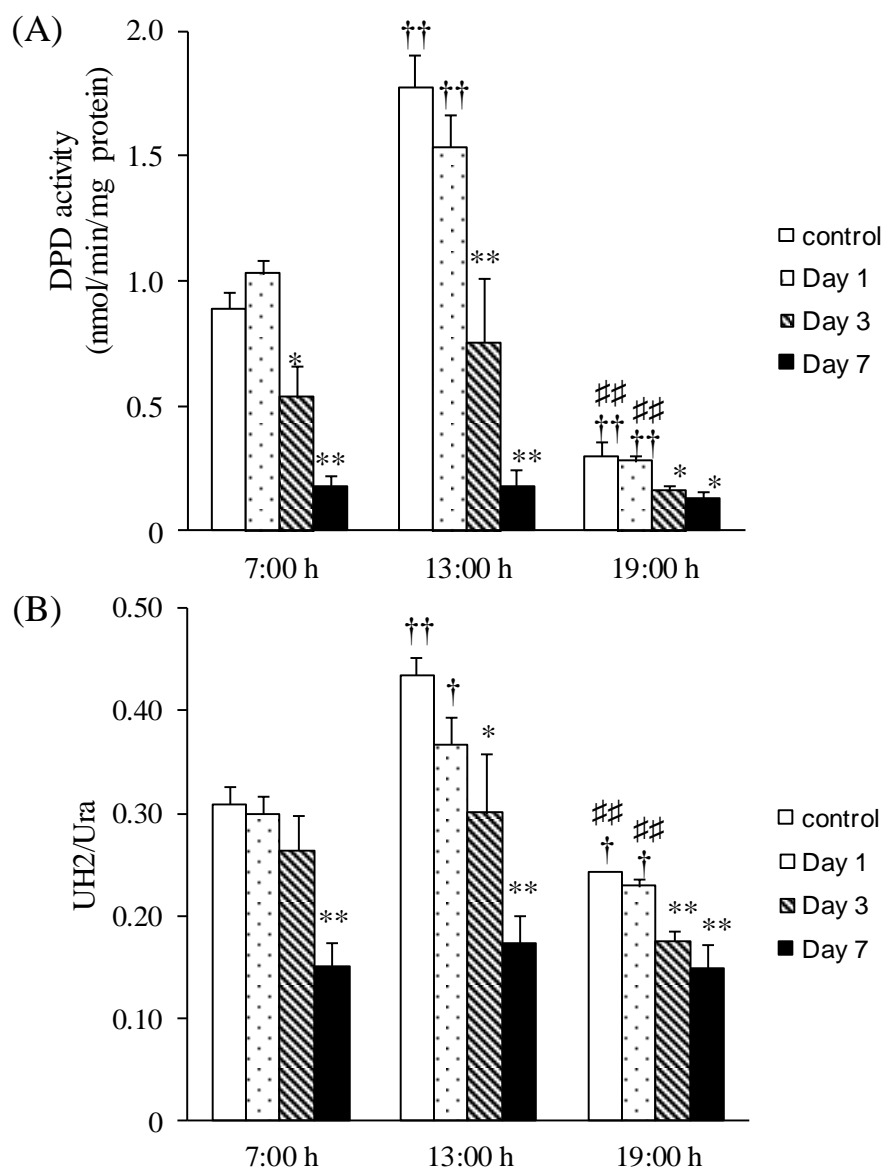


Figure 2-5. DPD activity (A) and plasma ratio of UH2/Ura (B) in untreated rats with CRC obtained at 7:00 h, 13:00 h, or 19:00 h (control) or after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, to rats with CRC at 7:00 h, 13:00 h, or 19:00 h for 1 day, 3 days, or 7 days

†† $p < 0.01$, † $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at 7:00 h on the same day, which was evaluated by one-way ANOVA. ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at 13:00 h on the same day, which was evaluated by one-way ANOVA. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ statistically significant difference against control, which was evaluated by Student's unpaired t -test. The plasma ratio of UH2/Ura was determined before the PK experiments. The hepatic DPD level was determined 2 h after PK experiments. Results are presented as the mean \pm S.E. of 4 rats.

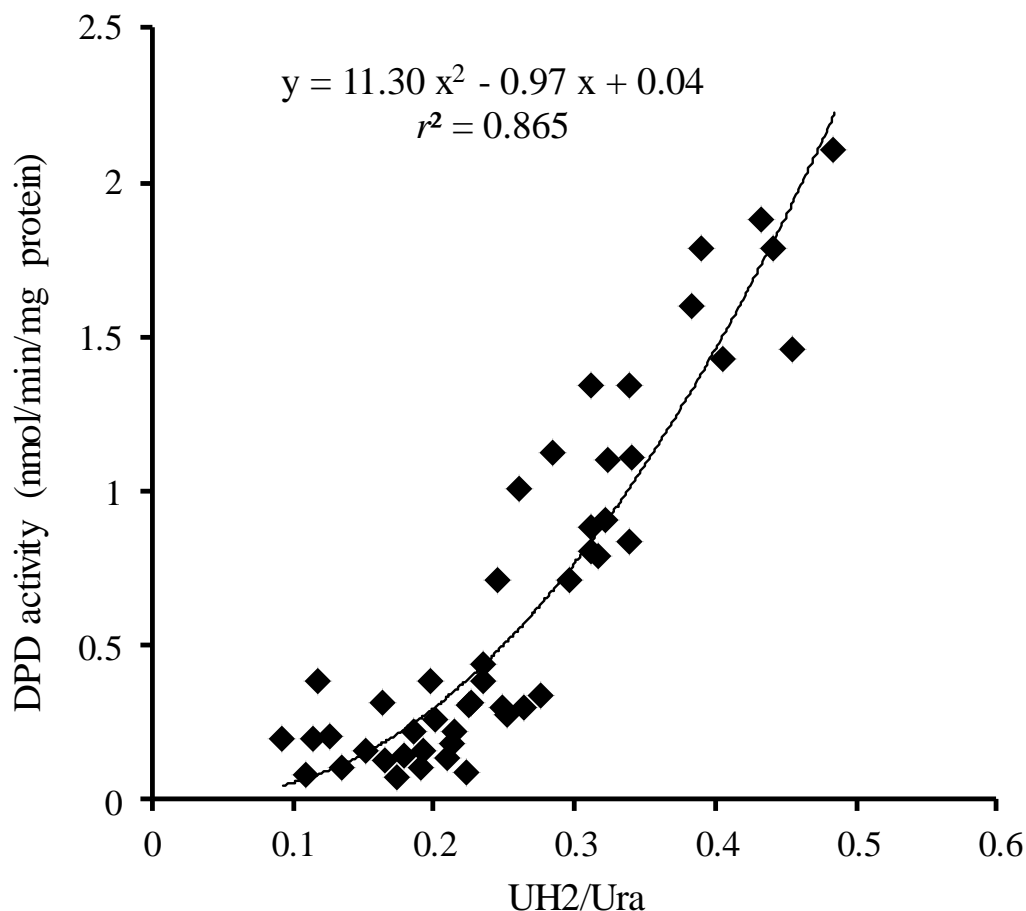


Figure 2-6. Correlation between the plasma ratio of UH2/Ura that was measured prior to 5-FU treatment, and the hepatic DPD activity after i.v. administration of placebo or 5-FU, 20 mg/kg, to rats with CRC at 7:00 h, 13:00 h, or 19:00 h for 1 day, 3 days or 7 days (n = 48)

The hepatic DPD level was determined 2 h after PK experiments. All data points generated at any time point were included in this analysis.

2-3-4.血漿中 UH2/Ura 比から予測される肝臓中 DPD 活性と 5-FU 薬物動態学パラメータとの関係

Figure 2-7 は、5-FU 投与開始 1、3 及び 7 日目において、5-FU 投与直前に採取した血漿中 UH2/Ura 比から二次回帰曲線を用いて予測した肝臓中 DPD 活性値と、5-FU 投与後に得られた薬物動態パラメータとの関係を示す。肝臓中 DPD 活性の予測値と血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ との間には対数曲線の関係にあり、全身クリアランス CL_{tot} 及び半減期 $t_{1/2}$ との間には指数曲線の関係が認められた。一方、肝臓中 DPD 活性予測値と分布容積 V_{dss} との間には、有意な相関関係は認められなかった。

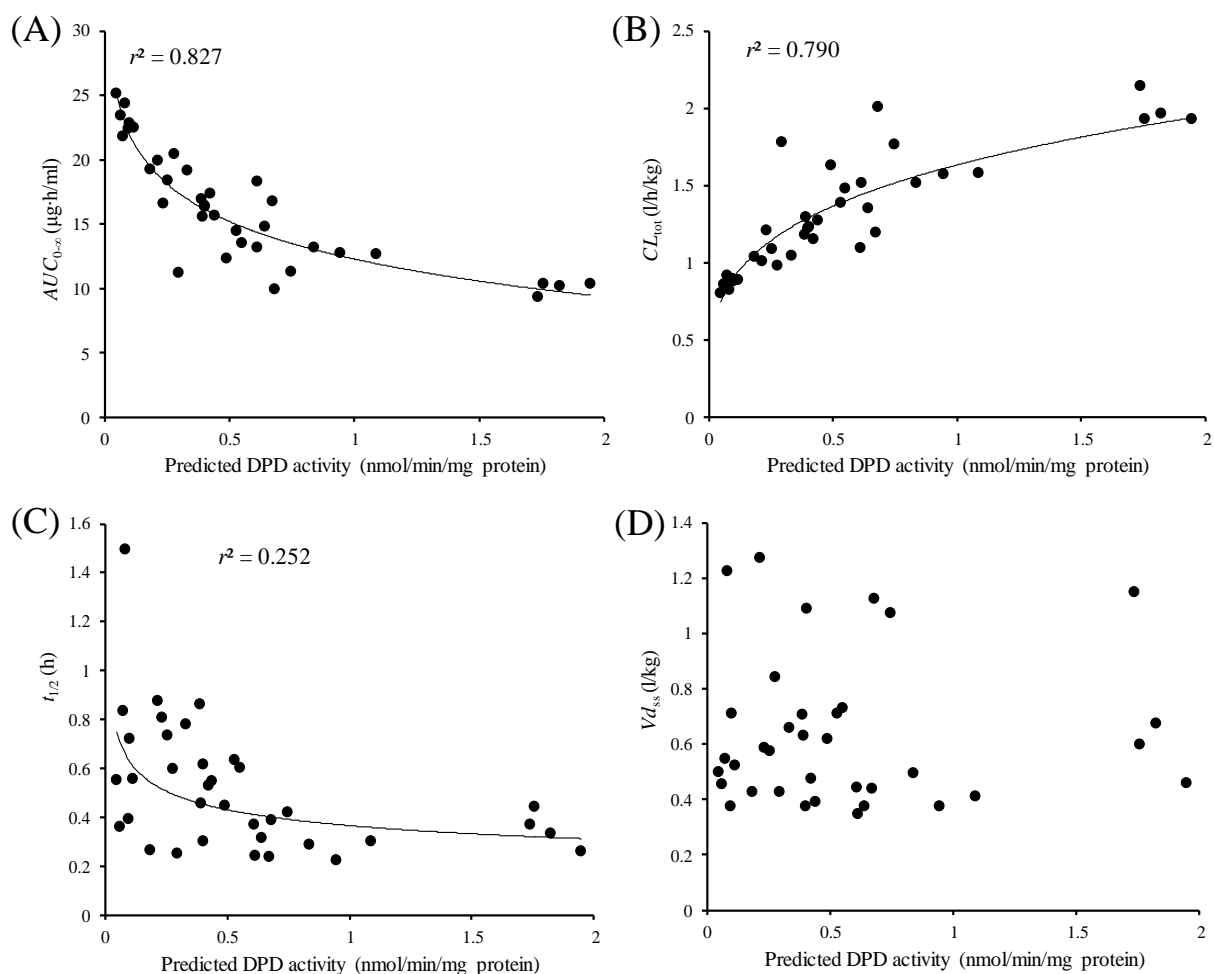


Figure 2-7. Correlation between hepatic DPD activity predicted by the observed plasma UH2/Ura ratio that was measured prior to 5-FU treatment, and pharmacokinetic parameters of 5-FU, (A) $AUC_{0-\infty}$, (B) CL_{tot} , (C) $t_{1/2}$, and (D) Vd_{ss} (n = 36)

To predict DPD activity from the observed plasma UH2/Ura ratio, the regression model was selected on the basis of coefficient of determination (r^2) and our results showed that quadratic regression curve ($DPD \text{ activity} = 11.3 \cdot (UH2/Ura)^2 - 0.97 \cdot (UH2/Ura) + 0.04$, $r^2 = 0.865$) was applied (Figure 2-6). Pharmacokinetic parameters were obtained from the plasma concentration–time curve of 5-FU after i.v. administration of 5-FU (20 mg/kg) to rats with CRC at 7:00 h, 13:00 h, or 19:00 h for 1, 3, or 7 days.

2-3-5. 5-FU 薬力学的効果の日内変動及び血漿中 UH2/Ura 比と大腸腫瘍体積との関係

Figure 2-8 は CRC ラットに対して、午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時に 5-FU を 20 mg/kg の用量で、それぞれ同時刻に 1 日 1 回、連日 7 日間静脈内投与を行った際の ACF 数の時間的推移を陰窩数別に示す。なお、対照群として、午後 1 時に生理食塩水を 1 日 1 回、連日 7 日間静脈内投与を行った際の ACF 数の推移も併せて示す。対照群の ACF 数は投与開始 10 日目まで不変もしくは増加傾向が認められたが、5-FU 投与群はいずれの時間に投与した場合でも、ACF 数は減少した。5-FU を午後 1 時に投与した群（肝臓中 DPD 活性高値群）の総 ACF 数は、5-FU を午前 7 時または午後 7 時に投与した群（肝臓中 DPD 活性中等度または低値群）のそれと比べて、わずかな増加傾向が認められた。

Figure 2-9A はCRC ラットに対して、午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時に 5-FU を 20 mg/kg の用量で、それぞれ同時刻に 1 日 1 回、連日 7 日間静脈内投与を行った際の大腸腫瘍体積の経日推移を示す。なお、対照群として、午後 1 時に生理食塩水を 1 日 1 回、連日 7 日間静脈内投与を行った際の大腸腫瘍体積の経日推移も併せて示す。ACF 数の経日推移と同様、対照群の大腸腫瘍体積は投与開始 10 日目まで増加傾向を認めたが、5-FU 投与群はいずれの時間に投与した場合でも、大腸腫瘍体積は減少した。興味深いことに、5-FU 投与開始 10 日目の大腸腫瘍体積に関して、5-FU 投与群間で有意な差が認められた。すなわち、5-FU を午後 1 時に投与した群（肝臓中 DPD 活性高値群）の大腸腫瘍体積は $1.56 \pm 0.40 \text{ mm}^3$ であったのに対し、5-FU を午後 7 時に投与した群（肝臓中 DPD 活性低値群）の大腸腫瘍体積は $0.57 \pm 0.21 \text{ mm}^3$ であり、その差は約 3 倍であった（Figure 2-9B）。Figure 2-10 は 5-FU 投与開始 10 日目の大腸腫瘍体積と 5-FU 投与開始直前に採取した血漿中 UH2/Ura 比と相関関係を示しており、両者の間には強い相関関係が認められた。

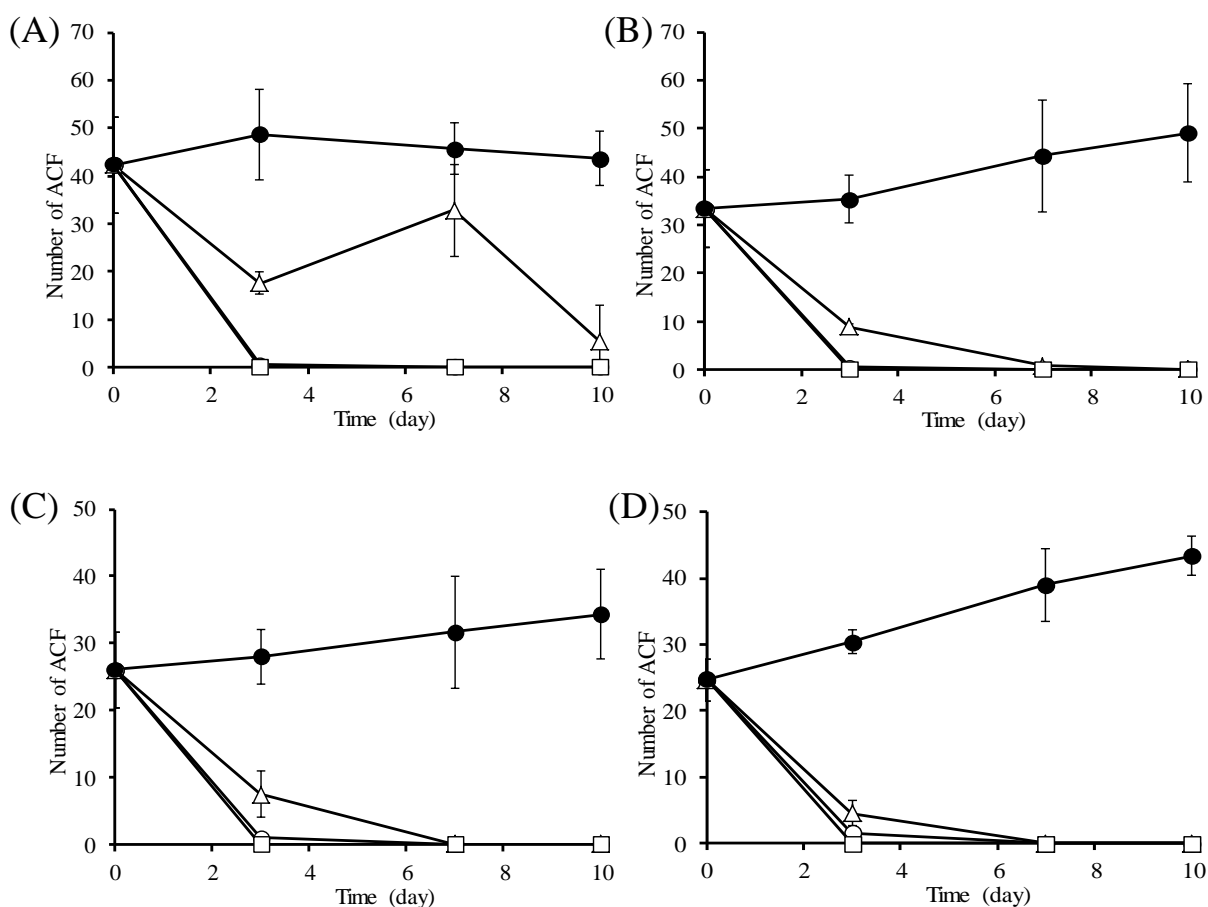


Figure 2-8. Mean number profiles of ACF in CRC rats given i.v. either placebo or 5-FU, 20 mg/kg, at different times of the day for seven days

Crypt multiplicity was determined as the number of crypts in each focus, and was categorized as containing 1 (ACF-1), 2 (ACF-2), 3 (ACF-3), 4 or more aberrant crypts/focus (ACF-4⁺). Mean number profiles of ACF-1 (A), ACF-2 (B), ACF-3 (C), and ACF-4⁺ (D) in CRC rats given i.v. either vehicle or 20 mg/kg 5-FU at 7:00 h, 13:00 h, or 19:00 h for 7 days. (●) vehicle; (○) 7:00 h; (Δ) 13:00 h; (□) 19:00 h. Results are presented as the mean ± S.E. of 3-4 rats.

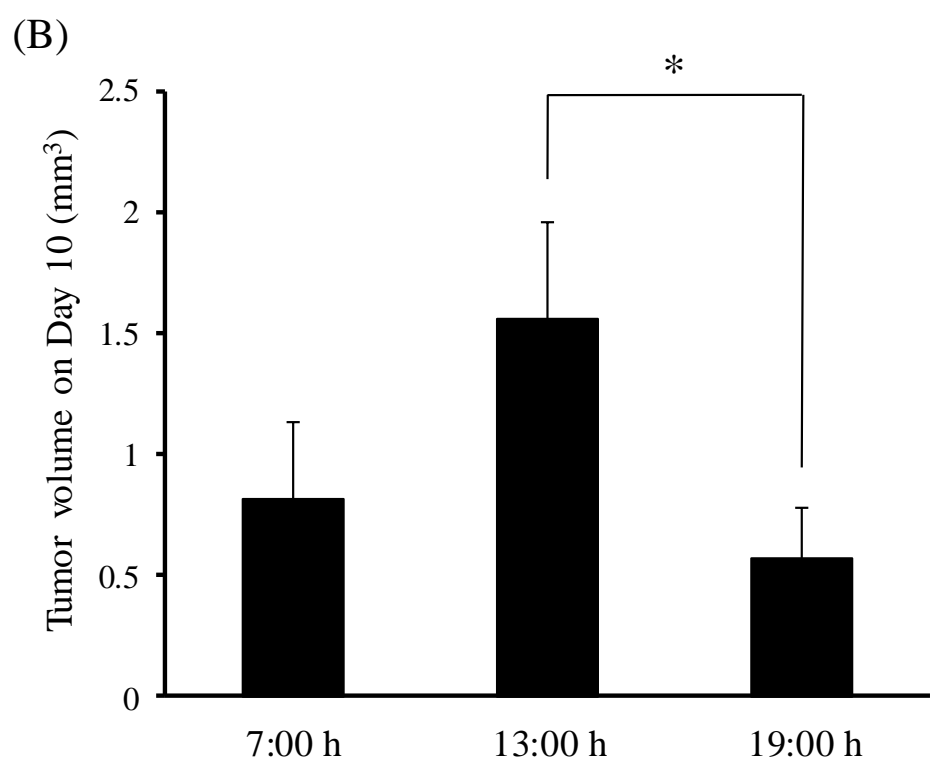
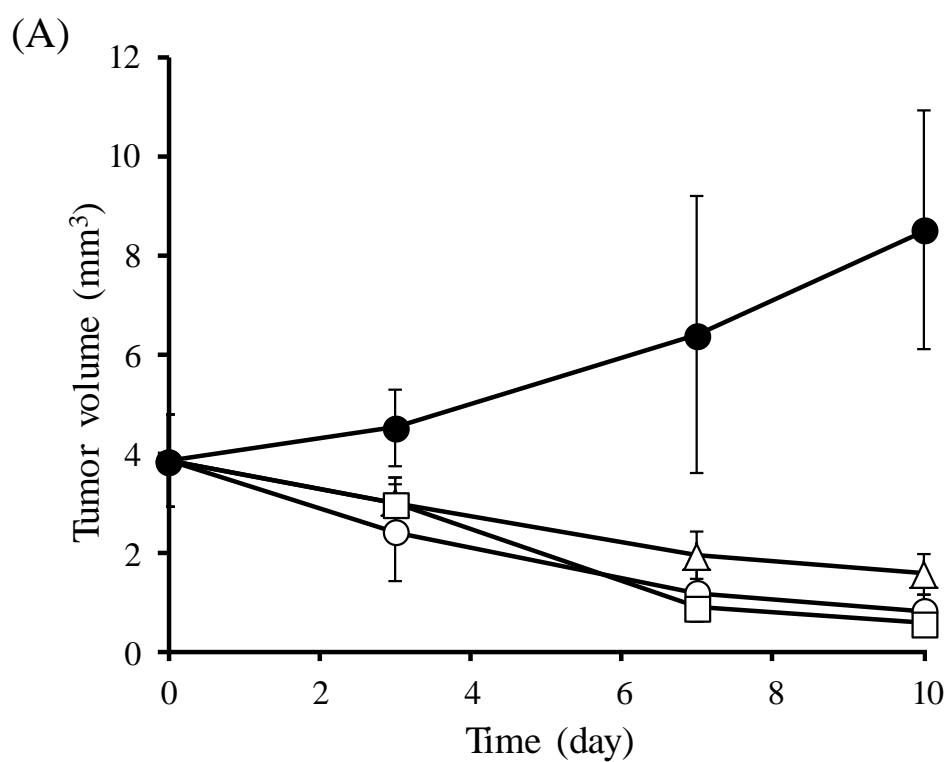


Figure 2-9. Tumor growth curves observed in CRC rats administered either placebo or 5-FU, 20 mg/kg, at 7:00, 13:00, or 19:00 h for seven days (A) and tumor volume on Day 10 (B)

(●) vehicle; (○) 7 h; (△) 13 h; (□) 19 h. Results are presented as the mean \pm S.E. of 3-4 rats.

* $p < 0.05$ statistically significant difference against rats treated at 13:00 h on the same day.

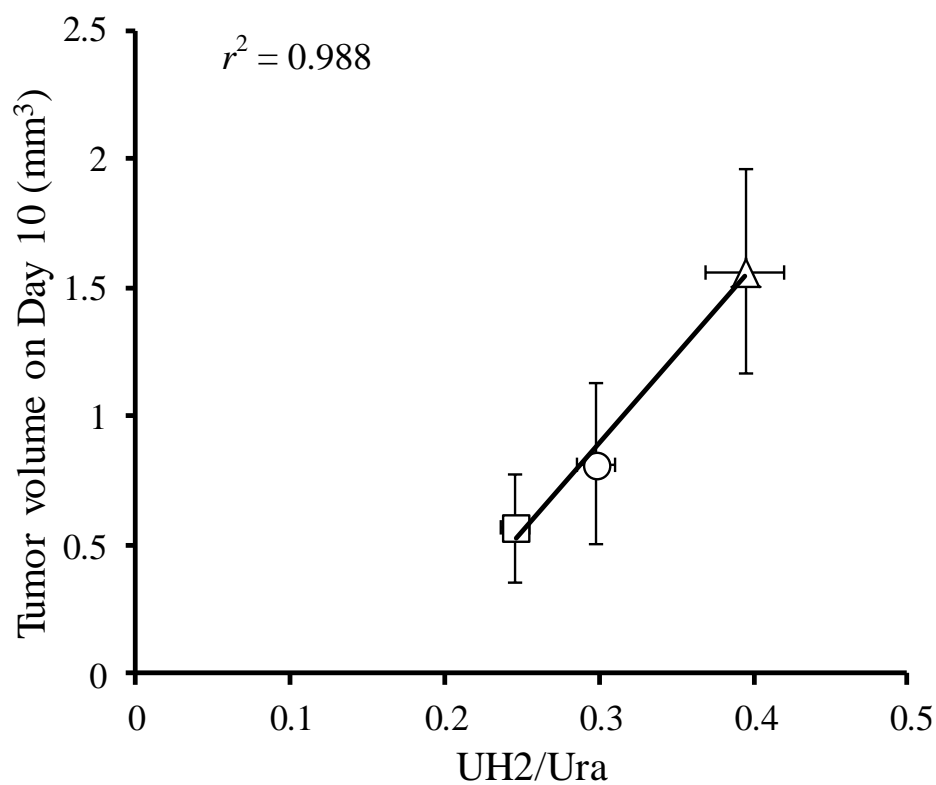


Figure 2-10. Linear correlations with the mean plasma UH2/Ura ratio that was measured prior to 5-FU treatment for the mean tumor volume on Day 10 after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, at different times of the day for seven days

(○) 7:00 h; (△) 13:00 h; (□) 19:00 h. Results are presented as the mean \pm S.E. of 3-4 rats.

2-4. 考察

臨床において、5-FU の投与量を体表面積に基づいて決定した場合、投与後の血漿中 5-FU 濃度には約 100 倍もの変動が確認されており、この個体間及び個体内の薬物動態の変動が治療成績不良の原因の一つとして考えられている⁶⁵⁻⁶⁸⁾。5-FU の体内動態の変動因子の一つに、5-FU の代謝酵素である DPD が挙げられる。したがって、5-FU 投与前に DPD 活性レベルもしくはそれを反映し得るバイオマーカーを測定することにより、個々の患者に応じた投与設計及び治療選択が可能となり得ると考えられる。そこで我々は、肝臓中 DPD 活性の間接的バイオマーカーとして知られる血漿中 UH2/Ura 比の測定意義を確かめるため、CRC ラットにおける 5-FU 治療下での血漿中 UH2/Ura 比と抗腫瘍効果との関係について検討し、バイオマーカーとしての有用性を評価した。

肝臓中 DPD 活性及び血漿中 UH2/Ura 比には、日内変動の存在が確認され、両者の間には強い相関関係が認められた (Figure 2-2)。Jiang らは、ラット肝臓中 DPD の活性は、ラット休息時間にあたる正午辺りに最大となり、ラット活動時間である深夜に最低となると報告している⁴⁰⁾。これは、本検討で得られた結果と一致する。また、Boisdrion-Celle らは、臨床における DPD 欠乏患者のスクリーニングや DPD 活性を評価する際に、血漿中 UH2/Ura 比を測定することは最適かつ有効な方法の一つであると報告している⁶⁹⁾。以上のことから、CRC ラットにおいて、血漿中 UH2/Ura 比は肝臓中 DPD 活性の日内変動を反映する間接的バイオマーカーとなることが示唆された。

本検討において、5-FU を午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時に静脈内単回投与を行った結果、全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ に関して日内変動が確認された (Table 2-1)。さらに、5-FU 投与直前に採取した血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} または血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ との間には、それぞれ強い相関関係が認められた (Figure 2-4)。臨床において、5-FU 持続点滴後に得られた血漿中 5-FU 濃度に関して日内変動の存在が知られており⁷⁰⁾、血漿中 5-FU 濃度と血漿単核球内 DPD 活性との間には逆相関の関係にあることが報告されている⁷¹⁾。したがって、投与された 5-FU の約 90% は肝臓内の DPD によって代謝されることを考慮すると、CRC ラットにおいて、5-FU の代謝は肝臓中 DPD 活性の日内変動に伴って変化し、血漿中 UH2/Ura 比は 5-FU 静脈内投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ を予測し得る有用なバイオマーカーであることが明確となった。

CRC ラットに対して 5-FU を午前 7 時、午後 1 時または午後 7 時にそれぞれ 1 日 1 回、連続 7 日間静脈内投与を行った結果、5-FU 単回投与時に比べ、いずれの投与時刻においても全身クリアランス CL_{tot} は減少し、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ は増加していた (Table 2-1)。また、5-FU 連続投与後の肝臓中 DPD 活性及び血漿中 UH2/Ura 比は、5-FU 無処置ラットに比べ有意に減少しており、日内変動が認められなかった (Figure 2-5)。Kuwahara らは、stage III/IVa 食道扁平上皮癌に罹患した 35 名の日本人患者を対象に、5-FU 及びシスプラチン併用 (FP) 療法を施行する上で、5-FU 高投与量 (500–550 mg/m²/day) 施行群の患者と標準投与量 (400 mg/m²/day) 施行群の患者を比較し、5-FU 体内動態及び治療効果について検討を行った⁷²⁾。その結果、両群とも、FP 療法 2 サイクル目に測定した血漿中 5-FU 濃度は、1 サイクル目の同時刻に測定した血漿中 5-FU 濃度に比べ、有意に増加した。さらに、1 サイクル目に認められた血漿中 5-FU 濃度の日内変動は、2 サイクル目ではその存在が認められなかった。また、Hishinuma らは、ラットを用いて 5-FU の体内

動態に及ぼす先行静脈内投与の影響について検討するため、ラットに 5-FU あるいは placebo を先行静脈内投与し、その 48 時間後に 5-FU の静脈内投与を行った⁷³⁾。その結果、5-FU 先行投与群では、placebo 先行投与群と比較して、5-FU の代謝物である 5-fluoro-dihydrouracil (DHFU) の AUC が有意に減少し、その影響は先行投与量に依存する傾向が認められた。一方、5-FU 先行静脈内投与による DPD mRNA およびタンパク発現量の変動は確認されなかった。彼らは、5-FU 先行静脈内投与は DPD 発現量には影響を与えずに DPD 活性を阻害し、その結果、5-FU の体内動態が変化した可能性が考えられると結論付けている。以上のことから、CRC ラットに対する 5-FU の連続投与は肝臓中 DPD 活性の低下を惹起し、その結果、5-FU の代謝能が低下することで 5-FU の体内動態の日内変動が消失したものと示唆された。5-FU 連続投与がもたらすこれらの変動は、予期せぬ血漿中 5-FU 濃度の上昇を招き、重篤な毒性の発現を誘発する可能性があることから、大腸癌患者に対して繰り返し 5-FU を投与する際には DPD 活性低下に伴う 5-FU 代謝能の低下を考慮すべきであると考えられた。

血漿中 UH2/Ura 比と肝臓中 DPD 活性との関係を表した回帰曲線を用いて、血漿中 UH2/Ura 比実測値から肝臓中 DPD 活性値を予測し、その予測値と 5-FU の薬物動態学的パラメータとの関係について検討した。臨床において直接ヒト肝臓中 DPD 活性を測定することは困難を極めるため、今回の検討結果は臨床応用する際に非常に有用となり得ると考えられる。血漿中 UH2/Ura 比の実測値から肝臓中 DPD 活性値を予測する際の回帰式は、決定係数に基づいて、以下の二次曲線式を用いた (Figure 2-6)。

$$DPDactivity=11.23 \cdot (UH2/Ura)^2 - 0.97 \cdot (UH2/Ura) + 0.04$$

当初、単回帰直線式 ($DPD \text{ activity} = 5.34 \cdot (UH2/Ura) - 0.73, r^2 = 0.8196$) を用いて予測を試みたが、この回帰式では、血漿中 UH2/Ura 比の実測値が 0.09 から 0.14 の範囲において予測される肝臓中 DPD 活性値が負の値となってしまう、正確に予測することが困難であった。この理由としては、少なくとも以下の 2 つの可能性が考えられる。第一に、血漿中 UH2/Ura 比と肝臓中 DPD 活性値の間には、シグモイド関数の関係にある可能性が挙げられる。第二に、血漿中 UH2/Ura 比と肝臓中 DPD 活性値との間の線形性を示すために、サンプル数が少なすぎた可能性が考えられる。本検討では、これらの可能性について詳しく検討はしていないものの、血漿中 UH2/Ura 比の実測値が 0.09 から 0.46 の範囲内における肝臓中 DPD 活性値を予測するために、上記の二次曲線式を用いた。5-FU の薬物動態学的パラメータの実測値を血漿中 UH2/Ura 比から予測した肝臓中 DPD 活性の予測値に対してプロットしたところ、血中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び全身クリアランス CL_{tot} と強い相関関係を示し、半減期 $t_{1/2}$ とは弱い相関性を示した (Figure 2-7)。このことは、Tukamoto らが報告している内容⁷⁴⁾と一致している。彼らは、5-FU のプロドラッグである capecitabine に関して生理学的薬物動態モデル (physiologically based pharmacokinetic model: PBPK model) を構築し、capecitabine 服用後の 5-FU の血中濃度-時間曲線下面積 AUC は肝臓中 DPD 活性の増加に伴って対数関数的に減少することをシュミレーションしている⁷⁴⁾。これらの結果より、肝臓中 DPD 活性は 5-FU 単回及び連続投与後の血中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 、全身クリアランス CL_{tot} 及び半減期 $t_{1/2}$ に影響を及ぼす重要な因子であり、血漿中 UH2/Ura 比から導き出した肝臓中 DPD 活性予測値によって、5-FU 連続投与後の薬物動態学パラメータの変動が予測できることが明らかとなった。

5-FU 投与後の抗腫瘍効果を検討するため、CRC ラットの大腸における ACF 数及び腫瘍体積に

について検討した。5-FU 無処置ラットでは ACF 数及び大腸腫瘍体積の増加傾向が認められたが、5-FU 投与群ラットでは ACF 数及び大腸腫瘍体積の減少が認められた (Figure 2-8, 2-9A)。興味深いことに、5-FU 投与開始 10 日目の大腸腫瘍体積に関して、5-FU を午後 7 時に投与した群 (肝臓中 DPD 活性低値群) の大腸腫瘍体積は、5-FU を午後 1 時に投与した群 (肝臓中 DPD 活性高値群) の腫瘍体積の約 1/3 にまで減少していた (Figure 2-9B)。また、肝臓中 DPD 活性高値群において、5-FU 投与開始 3 日目の ACF 数は、その他の 5-FU 投与群と比べ、増加傾向が認められた (Figure 2-8)。腫瘍細胞に対する 5-FU の殺細胞メカニズムは様々な因子に基づくことが知られている。腫瘍細胞内に取り込まれた 5-FU は Ura と同じ経路でフルオロヌクレオチドに転換され、DNA 及び RNA の合成を阻害する⁵³⁾。また、フルオロヌクレオチドはチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase : TS) を不活性化し、その結果 DNA 合成を阻害する⁵³⁾。これらの殺細胞メカニズムは、腫瘍細胞における 5-FU 濃度に依存する⁷⁵⁾。さらに、腫瘍細胞の薬剤感受性に関して、ヒト及びラット消化管粘膜細胞における DNA 合成及び細胞分裂は、DPD 活性が高値を示す時間帯に比べ、DPD 活性が低値を示す時間帯に盛んに行われるという日内変動の存在が認められている^{25,76)}ことから、5-FU の薬理機序が核酸合成阻害であることを考慮すると、5-FU の薬効は DNA 合成が盛んな時間帯に強く発現するものと考えられる。これらのことから、①DPD 活性の日内変動により誘発された血漿中及び腫瘍細胞内 5-FU 濃度の変動、②腫瘍細胞の薬物に対する感受性の日内変動という 2 つの因子が原因で、5-FU 投与後の ACF 数及び腫瘍細胞体積の減少度が変化したものと考えられた。すなわち、DPD 活性に基づいて 5-FU の投与時刻を調整することで、5-FU の治療効果を最大限引き出せる可能性が示唆された。さらに、本検討において、5-FU 連続投与開始前に採取した血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 投与開始 10 日目の大腸腫瘍体積との間には強い相関関係が認められた (Figure 2-10)。以上の結果より、5-FU による化学療法を施行する前の血漿中 UH2/Ura 比は、肝臓中 DPD 活性及び 5-FU の薬物動態学的パラメータのみならず、5-FU の抗腫瘍効果をも予測し得る間接的バイオマーカーになると考えられる。したがって、大腸癌患者から得られた血漿中 UH2/Ura 比は、5-FU の抗腫瘍効果の予測を可能とし、5-FU の最適な投与時刻及び投与量を決定する重要な情報となり、治療成績の向上及び癌化学療法における高い費用対効果をもたらすものと考えられる。

本章において、CRCラットにおける5-FU治療下での血漿中UH2/Ura比と抗腫瘍効果との関係について検討し、バイオマーカーとしての有用性を示唆することができたが、得られた基礎的研究結果に関してラットからヒトへと外挿する場合、注意する点がある。ヒト及びラットの両方において、DPD活性及び血漿中UH2/Ura比は休息期に最大となることが報告されている^{25,40)}。しかし、ラットは夜間に活動し、昼間に休息期を迎えるという、ヒトの日常生活リズムと逆の行動をする。したがって、DPD活性及び血漿中UH2/Ura比変動をラットからヒトへと外挿する場合、両者の生活サイクルの違いを考慮に入れる必要がある。

2-5. 小括

本検討において我々は、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU の体内動態及び治療効果との関係について、DMH 誘導 CRC モデルラットを用いて検討を行った。肝臓中 DPD 活性と血漿中 UH2/Ura 比には日内変動が確認され、両者の間には高い相関関係が認められたことから、血漿中 UH2/Ura 比は肝臓中 DPD 活性を反映する有用な間接的バイオマーカーであることが明確となった。また、5-FU の代謝は肝臓中 DPD 活性の日内変動と伴に変化し、血漿中 UH2/Ura 比は 5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ を予測することが出来るバイオマーカーであることも明らかとなった。さらに、5-FU の連続投与は肝臓中 DPD 活性の低下を惹起し、その結果、5-FU の代謝能が低下することで 5-FU 体内動態の日内変動消失へと繋がることが示唆された。5-FU の連続投与がもたらすこれらの変動は、大腸癌患者に対して投与設計を行う際に考慮されるべき要因であると考えられる。さらに、肝臓中 DPD 活性の変動に応じて大腸腫瘍体積の変化が認められたことから、5-FU による化学療法を施行する前の血漿中 UH2/Ura 比は、肝臓中 DPD 活性及び 5-FU の薬物動態学的パラメータのみならず、5-FU の抗腫瘍効果をも予測し得る間接的バイオマーカーとなるものと考えられる。したがって、大腸癌患者に対する 5-FU の適正使用に関して、5-FU による化学療法を施行する前の血漿中 UH2/Ura 比の測定は、期待すべき抗腫瘍効果に対応した 5-FU の投与設計にも応用でき、個別化医療に向けた有用なバイオマーカーとなし得ることが示された。

第三章 バイオマーカーを用いた PK-PD モデリングによる 5-FU 抗腫瘍効果予測システム

3-1. 緒言

5-FU は消化器癌化学療法の key drug とされ、肝臓中での DPD 活性がバイオマーカーとして知られているが、その測定は困難である。DPD 活性の間接的バイオマーカーとして、血漿中 UH2/Ura 比が個別化医療への有効なバイオマーカーとして注目されている。前章では、血漿中 UH2/Ura 比の測定意義を確かめるため、CRC ラットにおける 5-FU 治療下での血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU の薬物動態学的パラメータ及び抗腫瘍効果との関係について検討し、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

薬物動態学と薬力学とを統合して解析する PK-PD モデル解析は、薬物投与後における薬効の時間的推移を把握することが可能となる⁷⁷⁾。したがって、PK-PD モデル解析を用いることで期待すべき薬効に対応した最適な投与量及び投与間隔を明確にすることができる^{77,78)}。さらに、薬物代謝能や薬物に対する感受性の個体差を反映するバイオマーカーを PK-PD モデルに導入することで、血漿中薬物濃度、バイオマーカー、薬効といった関係因子を定量的に関連付けることが可能となり、個別化医療に応用することができると考えられる。本章では、5-FU の抗腫瘍効果予測システムの構築を目的として、CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比をモデルに組み込んだ PK-PD モデルを構築し、第二章で得られた血漿中 5-FU 濃度及び大腸腫瘍体積の経日推移の結果を用いて、その有用性について検討した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. *In vivo* 薬物動態及び *In vivo* 薬力学実験

PK-PD モデル解析の際に用いる CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比、血漿中 5-FU 濃度及び大腸腫瘍体積の実測値は、第二章 2-2-3 から 2-2-5 の方法にて得られたデータを用いた。

3-2-2. PK-PD モデルの構築

PK モデル

PK モデルは赤池の情報量基準 (Akaike's Information Criteria; AIC)^{79,80)}に基づき、2-コンパートメントモデルを採用し、以下の式 (1) 及び式 (2) を用いて各ラット群の平均血漿中 5-FU 濃度から薬物動態速度論的解析を行った。

$$\frac{dA_1(t)}{dt} = -k_e \cdot A_1(t) - k_{12} \cdot A_1(t) + k_{21} \cdot A_2(t) \quad (1)$$

$$\frac{dA_2(t)}{dt} = k_{12} \cdot A_1(t) - k_{21} \cdot A_2(t) \quad (2)$$

A_1 及び A_2 はそれぞれ体循環コンパートメント及び末梢コンパートメント中の 5-FU 量を表し、 k_e 、 k_{12} 、及び k_{21} はそれぞれ 5-FU の消失速度定数、体循環コンパートメントから末梢コンパートメントへの 5-FU の移行を表す速度定数及び末梢コンパートメントから体循環コンパートメントへの 5-FU 移行を表す速度定数を表す。薬物動態学的パラメータの算出は解析ソフト WinNonlin[®] Version 6.3 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA) を用いて薬力学的パラメータ算出とは独立して実施した。

PD モデル

大腸腫瘍体積を PD パラメータとした PD モデルの構築は、Simeoni らの報告⁷⁷⁾に準じ、Unperturbed and Perturbed growth model を用いて行った。

Unperturbed growth model (対照群)

担癌モデル動物における腫瘍体積は、少なくとも腫瘍増殖初期においては、指数関数的に増殖する⁸¹⁾。DMH によって誘導されるラット大腸腫瘍は大腸初期癌である⁸²⁾ことに加え、今回の *in vivo* 薬力学実験において、対照群の大腸腫瘍体積の増加に停滞状態が認められなかったことから、大腸腫瘍体積の増殖は以下の式で表した。

$$\frac{dv(t)}{dt} = \lambda_0 \cdot v(t), \quad v(0) = v_0 \quad (3)$$

v 及び v_0 は、それぞれ CRC ラットにおける大腸腫瘍体積及び DMH 最終投与 1 週間後 (5-FU 投与開始直前) の大腸腫瘍体積を表し、 λ_0 は指数関数的に増殖する大腸腫瘍体積を表す一次速度定数 (day^{-1}) である。

Perturbed growth model (5-FU 処置群)

上記の Unperturbed growth model は、全腫瘍細胞が増殖を繰り返すことで腫瘍体積が増加していると仮定しているが、Perturbed growth model は、抗癌剤に暴露されたいくらかの腫瘍細胞は腫瘍

増殖を止め、最終的に細胞死に至ることを仮定している。Figure 3-1 は Perturbed growth model を取り入れた PK-PD モデルの模式図である。Perturbed growth model における腫瘍細胞の増殖速度は、Unperturbed growth model における大腸腫瘍体積 $v(t)$ の一部を表す $x_1(t)$ を用いて、式 (3) の $v(t)$ を $x_1(t)$ に置き換えた式で表す。本 PK-PD モデルでは、5-FU はその濃度に応じて腫瘍増殖速度の減少をもたらすと仮定し、末梢コンパートメント中における 5-FU の濃度 $C_2(t)$ と 5-FU の薬理効果の指数を表す定数 k_2 を用いて 5-FU の抗腫瘍効果を表している。一方、他の抗癌剤同様、5-FU の腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果発現には時間的乖離が存在する。この時間的乖離を説明するために、本 PK-PD モデルは transit compartment model を取り入れている。transit compartment model は、生体内物質の時間依存的な伝達を経て薬効を発揮する場合や、最終的な生体反応を得るまでに時間的乖離がある場合によく用いられるモデルである⁸³⁾。5-FU による影響を受けた腫瘍細胞は増殖を止め、細胞損傷の進行度に応じた様々な段階を経て、最終的には細胞死に至ると考えられる。これらの細胞動態、いわゆる細胞死速度論は、一次速度定数 k_1 (day^{-1}) を用いて表現する。本 PK-PD モデルにおいては、残差分析と各パラメータ推定値の変動係数に基づき、4 つのコンパートメントから構成される transit compartment model を用いた。以下にモデル式を示す。

$$\frac{dx_1(t)}{dt} = \lambda_0 \cdot x_1(t) - k_2 \cdot C_2(t) \cdot x_1(t) \quad (4)$$

$$\frac{dx_2(t)}{dt} = k_2 \cdot C_2(t) \cdot x_1(t) - k_1 \cdot x_2(t) \quad (5)$$

$$\frac{dx_3(t)}{dt} = k_1 \cdot [x_2(t) - x_3(t)] \quad (6)$$

$$\frac{dx_4(t)}{dt} = k_1 \cdot [x_3(t) - x_4(t)] \quad (7)$$

$$\frac{dx_5(t)}{dt} = k_1 \cdot [x_4(t) - x_5(t)] \quad (8)$$

$$v(t) = x_1(t) + x_2(t) + x_3(t) + x_4(t) + x_5(t) \quad (9)$$

$$x_1(0) = v_0, x_2(0) = x_3(0) = x_4(0) = x_5(0) = 0 \quad (10)$$

血漿中 UH2/Ura 比を用いて腫瘍増殖を予測するため、本 PK-PD モデルにおける末梢コンパートメント中 5-FU 濃度 $C_2(t)$ は式 (1) 及び式 (2) と以下の式 (11) を用いて算出した。

$$C_2(t) = A_2(t) / V_2 \quad (11)$$

V_2 は末梢コンパートメントにおける 5-FU の分布容積を示す。Gamelin ら⁸⁴⁾と Ben らの報告⁸⁵⁾によると、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU の血漿クリアランスまたは半減期との間には相関関係が認められている。さらに、CRC ラットを用いた本検討において、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU の消失速度定数 k_e との間には相関関係が認められている (Figure 3-4: $r^2 = 0.743$, $y = 9.19x + 2.51$)。したがって、Equation 1 における 5-FU 消失速度定数 k_e 値については、血漿中 UH2/Ura 比を用いて以下の式 (12) から予測した。

$$k_e = 9.19 \cdot \text{UH2/Ura} + 2.51 \quad (12)$$

式 (12) における血漿中 UH2/Ura 比は、第二章における *in vivo* ラット実験において 5-FU の投与開始直前に得られた実験開始時間別の各群における平均値（午前 7 時, 0.30; 午後 1 時, 0.39; 午後 7 時, 0.25）を用いた（Table 3-1）。また、CRC ラットを用いた本検討において、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 消失速度定数 k_e を除く他の薬物動態学的パラメータとの間には相関関係が認められなかったことから、式 (1)、式 (2) 及び式 (11) における各速度定数 k_{12} 、 k_{21} 及び V_2 は *in vivo* ラット実験での全てのラット群における平均値を用いた（ k_{12} : 2.783, k_{21} : 2.808, V_2 : 0.310）。5-FU 投与後の腫瘍増殖に及ぼす血漿中 UH2/Ura 比の影響について評価するため、血漿中 UH2/Ura 比を変化させた場合における 5-FU 投与後の腫瘍体積の推移をシミュレーションし、時間軸に対してプロットしたものを Figure 3-2 に示す。

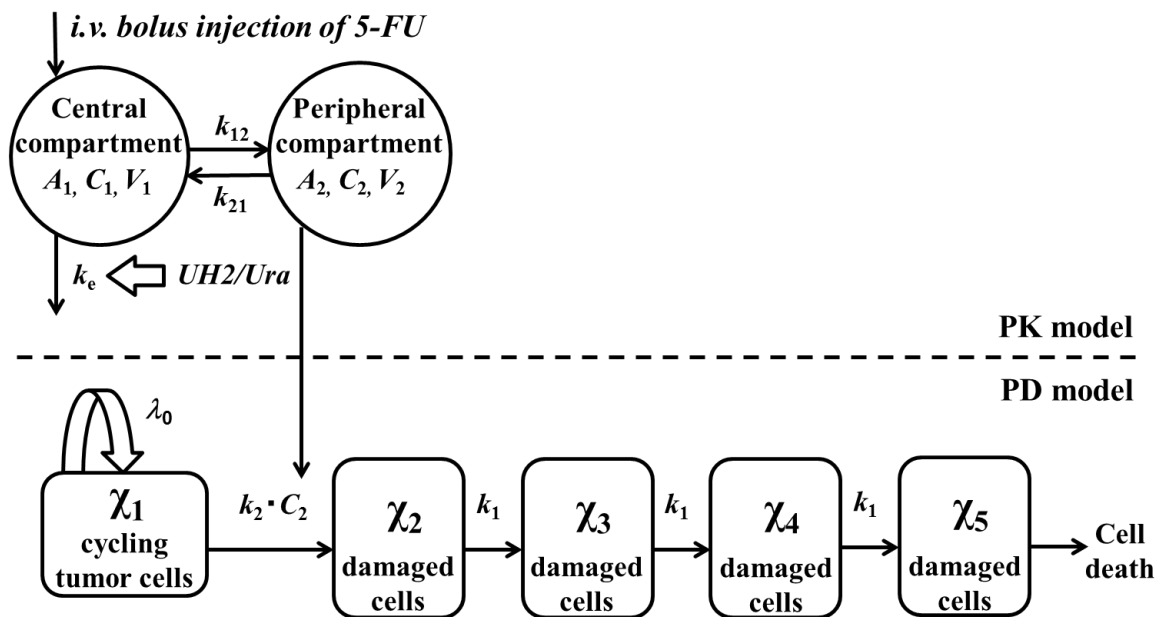


Figure 3-1. Scheme of the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model

λ_0 , the rate of exponential tumor growth; k_1 , first-order rate constant of transit; k_2 , measure of drug potency; A_1 , 5-FU amounts in the central compartment; A_2 , 5-FU amounts in the peripheral compartment; C_1 , 5-FU concentration in the central compartment; C_2 , 5-FU concentration in the peripheral compartment; V_1 , central volume of distribution; V_2 , peripheral volume of distribution; k_e , elimination rate constant; k_{12} , rate constant of central compartment to peripheral compartment; k_{21} , rate constant of peripheral compartment to central compartment.

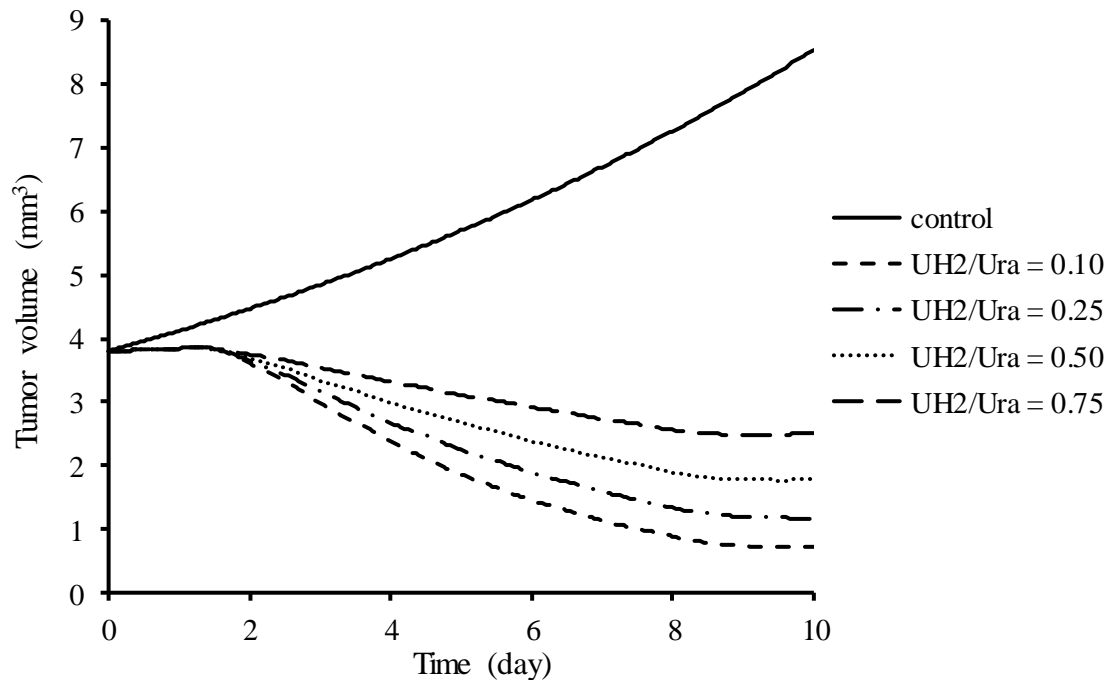


Figure 3-2. Effect of plasma UH2/Ura ratio on simulated tumor growth curves

The simulations were performed assuming i.v. bolus injection of 20 mg/kg of 5-FU for 7 days. $k_{12} = 2.783 \text{ h}^{-1}$, $k_{21} = 2.808 \text{ h}^{-1}$, $V_2 = 0.310 \text{ L kg}^{-1}$, $\lambda_0 = 0.081$ (control), 0.011 (5-FU treatment) day^{-1} , $k_1 = 6.63 \text{ day}^{-1}$, $k_2 = 0.014 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, $v_0 = 3.8 \text{ mm}^3$. k_{12} , rate constant of the central compartment to the peripheral compartment; k_{21} , rate constant of peripheral compartment to central compartment; V_2 , peripheral volume of distribution; λ_0 , the rate of exponential tumor growth; k_1 , first-order rate constant of transit; k_2 , measure of potency of 5-FU; v_0 , tumor volume measured before 5-FU treatment ($t = 0$).

3-2-3. データ解析

PK-PD モデル解析は解析ソフト WinNonlin® Version 6.3 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA) を用いて実施した。PK 及び PD パラメータはそれぞれ重み付き非線形最小二乗法を用いて推定した。重み (uniform、 $1/y$ または $1/y^2$) は、残差分析と各パラメータの推定値の変動係数に基づき選択した。PD モデルにおいて末梢コンパートメント中 5-FU 濃度 C_2 の値は、PK パラメータに基づき推定した。また、PK-PD モデル解析に用いた 5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の経時的変化は、同一ラット個体によるものではなく、各ラット群における平均腫瘍体積の経時的変化である。そのため、PK-PD モデルにおけるパラメータ値は、各ラット群の血漿中 5-FU 濃度及び大腸腫瘍体積の平均値を用いて推定した。検定は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) を行ったあと Bonferroni test による多重比較を行った。いずれも、危険率 0.05 以下を有意差ありと判断した。PK-PD モデル解析により得られた各パラメータの推定精度は、変動係数 (coefficient of variation: CV%) を用いて表した。

3-3. 結果

3-3-1. CRC ラットにおける 5-FU の PK 解析及び血漿中 UH2/Ura 比

Figure 3-3 は、CRC ラットに対して、それぞれ異なる時刻に 5-FU を 20 mg/kg の用量で単回、3 日間または 7 日間静脈内投与した後の平均血漿中 5-FU 濃度の推移に対する PK モデルを用いたフィッティング結果を示す。本モデルによる血漿中 5-FU 濃度の予測値と実測値はほぼ同じであった ($r^2 > 0.99$, Figure 3-3)。Table 3-1 は得られた各群の PK パラメータの推定値及び血漿中 UH2/Ura 比の実測値を示す。薬物動態実験の開始前に採取した血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 投与後の消失速度定数 k_e ($r^2 = 0.743$)、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ ($r^2 = 0.865$) または全身クリアランス CL_{tot} ($r^2 = 0.936$) との間には相関関係が認められた (Figure 2-4)。一方、その他の PK パラメータ、すなわち k_{12} 、 k_{21} 、 V_1 及び V_2 と血漿中 UH2/Ura 比との間に相関関係は認められなかった。

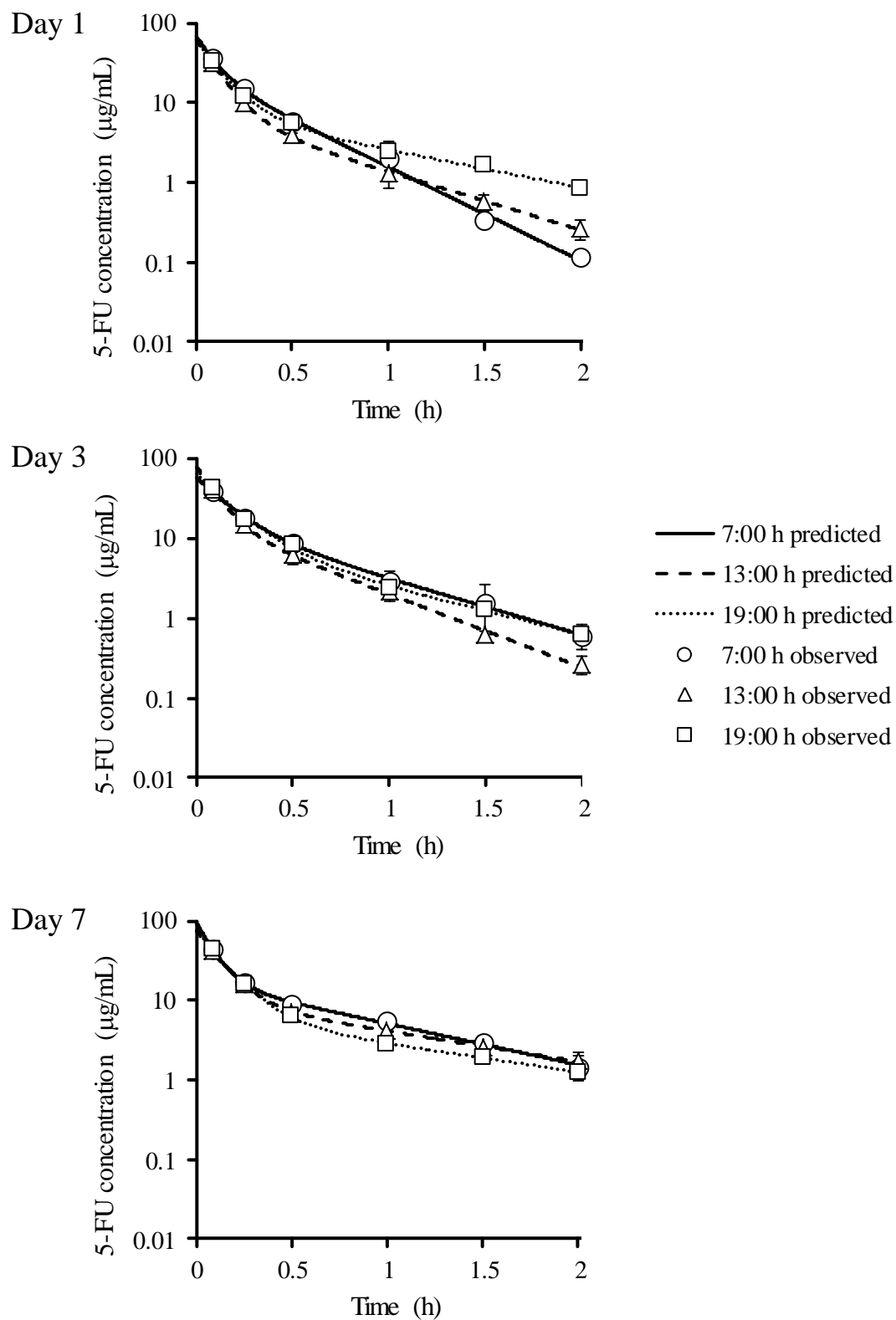


Figure 3-3. Model fitting of the plasma 5-FU concentration profiles using 2-compartment model analysis after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, to rats with colorectal cancer at different times of the day for 1, 3, or 7 days

Each point represents the mean plasma 5-FU concentration \pm S.E. obtained from 4 rats.

Table 3-1. Biomarker obtained before the PK experiments and PK parameter estimates obtained by fitting the model to the plasma concentration data after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, to CRC rats at 7:00, 13:00, or 19:00 h calculated using 2-compartment model analysis

Biomarker and PK parameter estimates	Day 1			Day 3			Day 7		
	7:00 h	13:00 h	19:00 h	7:00 h	13:00 h	19:00 h	7:00 h	13:00 h	19:00 h
<i>Biomarker[#]</i>									
UH2/Ura	0.30±0.01	0.39±0.03 ^{**}	0.25±0.01 ^{*††}	0.20±0.04	0.30±0.06	0.19±0.01	0.14±0.03 ^{aa}	0.17±0.03 ^{aab}	0.19±0.03
<i>PK parameter estimates (CV%)</i>									
k_e (h ⁻¹)	5.13 (15.0)	6.11 (7.8)	4.49 (15.6)	3.61 (15.4)	5.68 (20.3)	3.94 (11.0)	4.58 (19.4)	4.05 (2.7)	4.31 (3.5)
k_{12} (h ⁻¹)	2.33 (71.2)	2.35 (16.0)	2.80 (27.9)	1.65 (52.4)	2.83 (50.6)	1.28 (30.6)	5.29 (32.2)	3.54 (4.2)	2.36 (5.3)
k_{21} (h ⁻¹)	4.89 (38.1)	2.59 (7.6)	1.99 (19.0)	2.94 (26.0)	3.79 (19.1)	2.02 (19.3)	3.07 (14.5)	1.86 (3.3)	1.38 (5.8)
AUC _{0-∞} (μg·h·mL ⁻¹)	12.7 (4.4)	10.3 (3.9)	13.5 (5.9)	16.0 (5.5)	13.9 (7.6)	15.9 (5.1)	20.9 (4.7)	19.3 (0.9)	17.4 (1.5)
CL _{tot} (L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹)	1.57 (4.4)	1.94 (3.9)	1.49 (5.9)	1.24 (5.5)	1.44 (7.7)	1.25 (5.1)	0.96 (4.7)	1.04 (0.9)	1.15 (1.5)
V ₁ (L·kg ⁻¹)	0.31 (17.4)	0.31 (10.7)	0.33 (19.4)	0.35 (18.4)	0.25 (25.8)	0.31 (14.0)	0.21 (22.7)	0.26 (3.1)	0.27 (4.3)
V ₂ (L·kg ⁻¹)	0.15 (26.1)	0.29 (6.9)	0.46 (13.2)	0.19 (19.8)	0.19 (17.9)	0.20 (12.6)	0.36 (8.5)	0.49 (2.3)	0.46 (5.0)

CV, coefficient of variation; UH2/Ura, plasma dihydrouracil/uracil ratio; k_e , elimination rate constant; k_{12} , rate constant of central compartment to peripheral compartment; k_{21} , rate constant of peripheral compartment to central compartment; AUC_{0-∞}, area under the plasma concentration time curve from 0 to ∞; CL_{tot}, total clearance; V₁, central volume of distribution; V₂, peripheral volume of distribution.

^{**} $p<0.01$, ^{*} $p<0.05$ statistically significant difference against rats treated at 7:00 h on the same day.

^{††} $p<0.01$, [†] $p<0.05$ statistically significant difference against rats treated at 13:00 h on the same day.

^{aa} $p<0.01$, ^a $p<0.05$ statistically significant difference against rats treated at the same time on Day 1.

^{bb} $p<0.01$, ^b $p<0.05$ statistically significant difference against rats treated at the same time on Day 3.

Each value of biomarker represents the mean ± S.E. of 4 rats. Each value of PK parameters was estimated from the mean of 4 rats. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Bonferroni test. [#]We have reported in detail in our previous studies (chapter II).

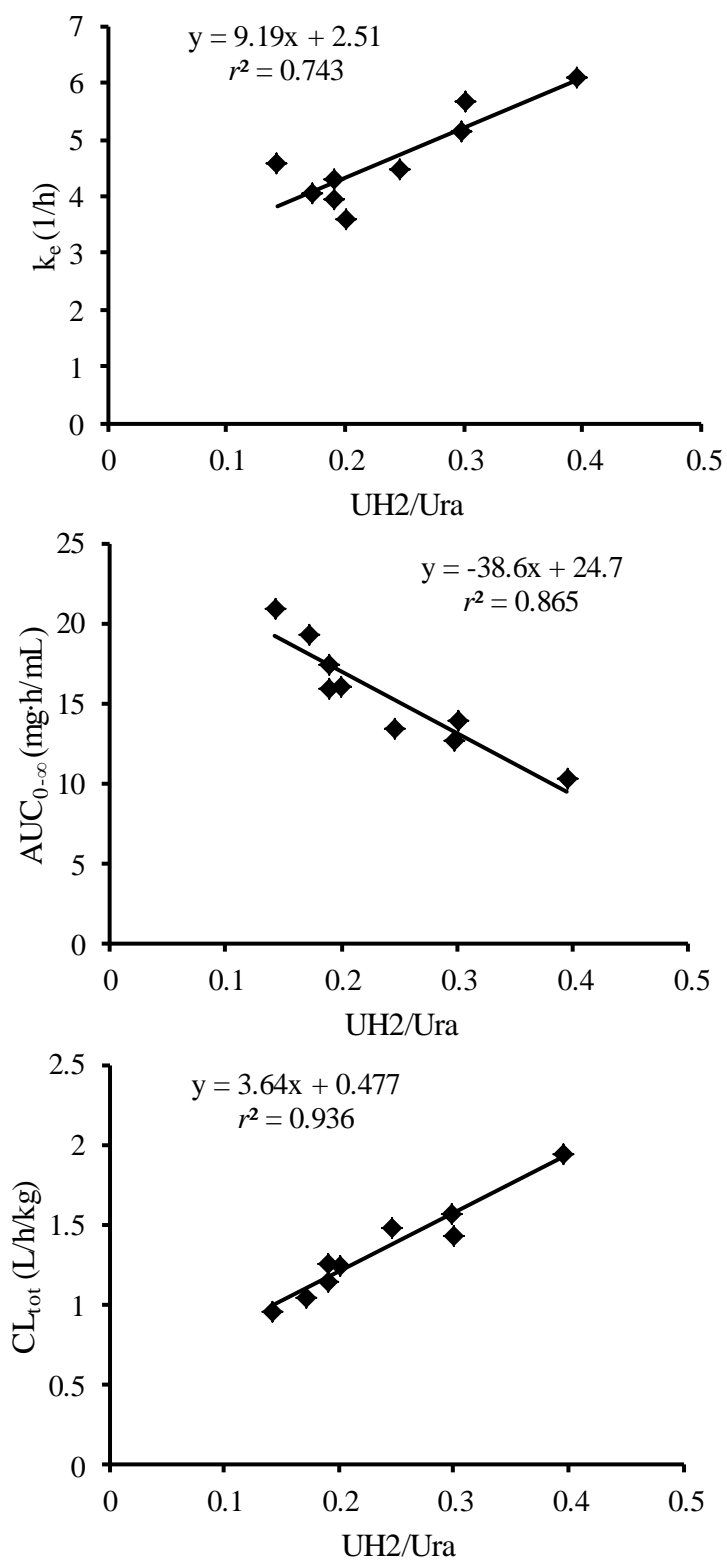


Figure 3-4. Linear correlations were observed between the plasma UH2/Ura ratio and k_e , $AUC_{0-\infty}$, and CL_{tot} after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, to CRC rats

Each point represents the estimated value of PK parameters obtained from the mean of 4 rats.

3-3-2. CRC ラットにおける PK-PD 解析

Figure 3-5 は、CRC ラットにそれぞれ異なる時刻に 5-FU を 20 mg/kg の用量で 7 日間静脈内投与した際の大腸腫瘍体積の経時的変化を、血漿中 UH2/Ura 比を取り入れた PK-PD モデルを用いて導いたシミュレーション曲線を示す。本モデルによる 5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の経時的変化の予測値と実測値はほぼ同じであった ($r^2 > 0.99$, Fig. 3-5)。Table 3-2 は、各ラット群の平均大腸腫瘍体積値を本 PK-PD モデルに当てはめた際に得られた各群の PD パラメータの予測値を示す。得られた予測値の変動係数から、良好な PD パラメータ値を予測することができた ($CV\% < 8.3$)。5-FU の薬理効果の指数を表す k_2 及び指数関数的に増殖する大腸腫瘍体積を表す一次速度定数 λ_0 に関して、それぞれ日内変動が認められた。 k_2 及び λ_0 の日内変動リズムは、血漿中 UH2/Ura 比のそれと比べて、逆の挙動を示した。

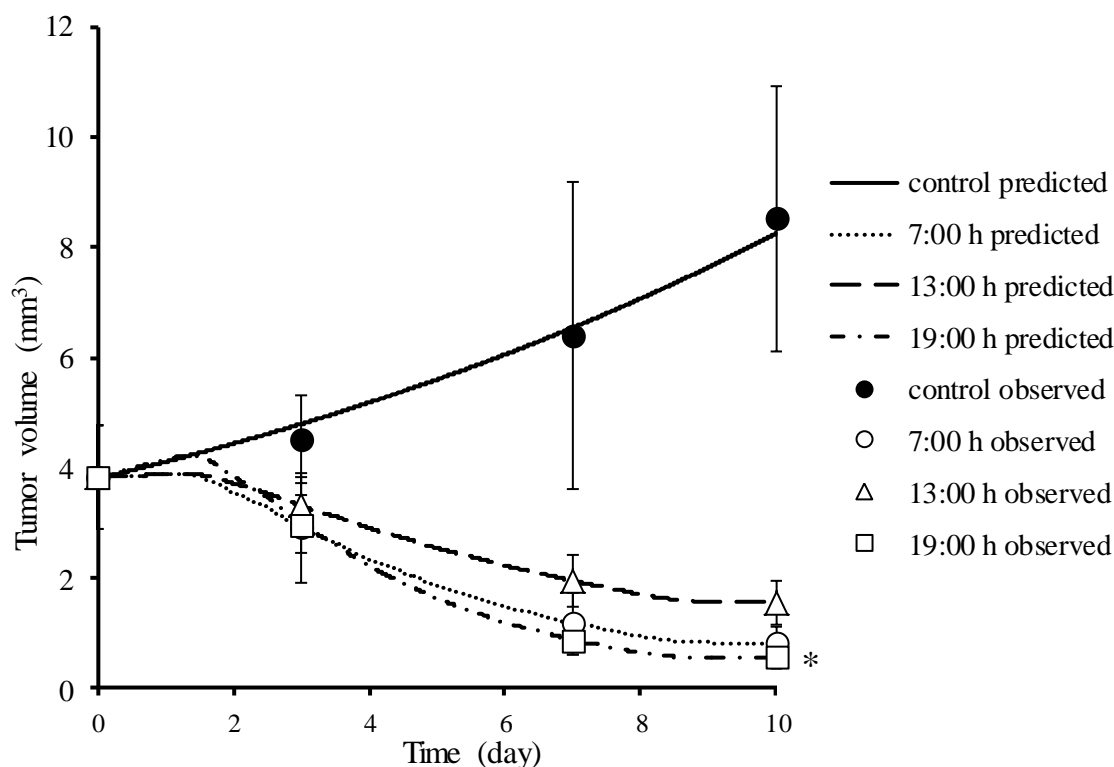


Figure 3-5. Simulated time-course profile obtained using the PK-PD model with biomarker, dihydrouracil/uracil (UH2/Ura), and observed data for tumor growth after i.v. administration of 5-FU, 20 mg/kg, to CRC rats

Rat experiments showed linear correlations between the dihydrouracil/uracil (UH2/Ura) ratio and the elimination rate constant, k_e ($r^2 = 0.743$, $y = 9.19x + 2.51$). The value of k_e in the PK-PD model was estimated using the mean value of the UH2/Ura ratio (7:00 h, 0.30; 13:00 h, 0.39; and 19:00 h, 0.25) obtained from the animal studies before 5-FU treatments and by using the following equation: $k_e = 9.19 \cdot \text{UH2/Ura} + 2.51$. Because we did not observe linear correlations between the plasma UH2/Ura ratio and other PK parameters, the mean values obtained in the rat experiments were used for calculating the values of k_{12} (2.783), k_{21} (2.808), and V_2 (0.310) in the PK-PD model.

Each point represents the mean tumor volume \pm S.E. obtained from 3–4 rats.

* $p < 0.05$ significant differences in tumor volume (TV) were observed between the rats that were administered 5-FU at 13:00 h and that received 5-FU at 19:00 h on Day 10. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Bonferroni test.

Table 3-2. PD parameters obtained by fitting simultaneously the model to the tumor volume data in CRC rats

PD parameters (CV%)	Control	7:00 h	13:00 h	19:00 h
k_1 (day ⁻¹)	————	7.83 (0.8)	6.63 (1.2)	7.68 (0.5)
k_2 (mL·μg ⁻¹ ·day ⁻¹)	————	0.020 (0.5)	0.014 (0.9)	0.029 (0.3)
λ_0 (day ⁻¹)	0.081 (5.2)	0.012 (8.1)	0.011 (8.3)	0.079 (1.2)
v_0 (mm ³)	3.70 (2.6)	3.83 (0.1)	3.83 (0.1)	3.83 (0.1)

CV, coefficient of variation; k_1 , first-order rate constant of transit; k_2 , measure of potency of 5-FU; λ_0 , the rate of exponential tumor growth; v_0 , tumor volume measured before 5-FU treatment ($t = 0$).

Each value of PD parameters was estimated from the mean of 3-4 rats.

3-4. 考察

臨床における 5-FU の投与設計に関して、TDM を実施することで至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC 域 (20–25 mg·h/L) に収まるよう投与量を調節した場合、体表面積を基に 5-FU の投与量設計を行った場合と比べ、生存期間の中央値の延長傾向及び毒性発現の有意な減少が認められている⁶³⁾。しかし、TDM を行う場合であっても、5-FU による化学療法の開始時には体表面積に基づいた投与量設計となる上、5-FU/LV 併用療法においては至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC 域に収まるためには平均 4 週間 (1–10 週間) が必要となる⁶³⁾。そこで、治療開始前に、5-FU の薬効発現を反映し得るバイオマーカーの測定と PK-PD 解析を組み合わせることで、個々の患者ごとに速やかに期待すべき至適血中濃度－時間曲線下面積 AUC 域及び抗腫瘍効果を得るための投与設計が可能となるものと考えられる。本検討では、CRC ラットにおける 5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の経時的变化を予測するために、5-FU 投与前に得られた血漿中 UH2/Ura 比をモデルに組み込んだ PK-PD モデルを構築した。

CRC ラットに対して、午前7時、午後1時または午後7時に5-FUを20 mg/kgの用量で、それぞれ同時刻に1日1回、連日7日間静脈内投与を行い、5-FU投与開始1、3及び7日目に得られた血漿中5-FU濃度から2-コンパートメントモデルを用いて解析を行った。その結果、5-FUの消失速度定数 k_e 、全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ において日内変動が確認され、5-FU投与開始前に得られた血漿中UH2/Ura比とそれぞれ強い相関関係が認められた (Figure 3-4)。この結果は、第2章で得られたノンコンパートメント解析の結果と対応している。したがって、血漿中UH2/Ura比は5-FU投与後の消失速度定数 k_e 、全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ を予測し得る有用なバイオマーカーであることが示唆された。

CRC ラットにおける5-FU投与後の大腸腫瘍体積の時間的推移を予測するために、PK-PDモデルを構築した。本モデルのうち、PDモデルには、抗腫瘍効果を有する化学物質に暴露した後の腫瘍細胞の増殖を説明する際に用いられているUnperturbed and Perturbed growth modelを採用した。担癌ラットにおける腫瘍は、少なくともその増殖初期段階において、指数関数的に増殖することが知られており⁸¹⁾、Unperturbed and Perturbed growth modelはこの過程を説明するのに繁用されている⁷⁷⁾。一般的に、抗癌剤は生体内に投与されてからその薬効発現までにある程度の時間的乖離が認められ、この乖離は抗癌剤による暴露濃度及び時間に依存する^{83,86,87)}。これらの現象を説明するために、抗癌剤のPK-PDモデルには、多くのシグナル伝達物質を介して薬効を発現する場合と同様、Transit compartment modelが広く用いられ^{86,87)}、Unperturbed and Perturbed growth modelにはTransit compartment modelが組み込まれている。Simeoniらは、Unperturbed and Perturbed growth modelを取り入れたPK-PDモデルを構築し、担癌ラットに抗癌剤を投与して得られた腫瘍体積の時間的推移の結果からPK-PDモデル解析を行うことで、抗癌剤投与スケジュールと腫瘍増殖の推移との関係について検討を行った⁷⁷⁾。その結果、PK-PDモデル解析より得られた抗癌剤投与後の腫瘍体積の時間的推移の予測値と実測値はほぼ一致した ($r^2 > 0.98$) ことから、PK-PDモデルを用いることで、抗癌剤の種々の投与量または投与スケジュールに応じた腫瘍体積の変化を予測することが可能であると報告している⁷⁷⁾。Sungらは、Uraと5-FUのプロドラッグであるTegafurの合剤であるUFTに関して、PBPKモデルとUnperturbed and Perturbed growth modelとを組み合わせたPBPK-PDモデルを構築し、担癌ラットにおけるUFT投与後の腫瘍体積の時間的推移を予測した⁷⁸⁾。その結果、UFT抗腫瘍効果に及ぼす薬物代謝酵素活性の個体間変動の影響について予測することに成功し、投与設計

の個別化に関して、PBPK-PDモデルの利用が有効であると報告している⁷⁸⁾。以上のことから、5-FU投与後のCRCラットにおける大腸腫瘍体積の時間的推移を予測するために、Unperturbed and Perturbed growth modelを利用したPK-PDモデルの構築が有用であると考えられた。

PK-PDモデルを用いることにより、5-FU投与後のCRCラットにおける大腸腫瘍体積の経時的変化を捉えることが可能であった (Figure 3-5)。5-FU投与開始前に採取した血漿中UH2/Ura比を用いて大腸腫瘍体積の経時的変化を予測するにあたり、5-FUの体内からの消失速度定数 k_e を血漿中UH2/Ura比から予測した。5-FU全身クリアランス CL_{tot} は、消失速度定数 k_e に比べ、血漿中UH2/Ura比と高い相関関係を示していたので (Figure 3-4)、我々は最初に血漿中UH2/Ura比から予測した全身クリアランス CL_{tot} の値を用いてPK-PDモデル解析を行った。しかし、全身クリアランス CL_{tot} の予測値を用いたPK-PDモデル解析では、消失速度定数 k_e の予測値を用いた場合に比べ、十分に5-FU投与後の大腸腫瘍体積の経時的変化を予測することができなかった。血漿中UH2/Ura比からの消失速度定数 k_e 予測値を用いて、血漿中UH2/Ura比が5-FU投与後の大腸腫瘍体積の経時的変化に及ぼす影響をシミュレーションした結果からもわかるように (Figure 3-2)、血漿中UH2/Ura比及び消失速度定数 k_e は5-FUの抗腫瘍効果を決定づける重要な因子であることは明らかである。5-FUの抗腫瘍効果の発現には様々な因子が複雑に関与する⁸⁸⁾が、血漿中UH2/Ura比からの消失速度定数 k_e の予測値を用いたPK-PDモデルによって、5-FUの治療効果を予測することが可能であった。以上の結果より、血漿中UH2/Ura比を組み込んだPK-PDモデルは、5-FU投与後の治療効果の経時的変化を予測するために有用であることが示唆された。大腸癌患者への5-FUの適正使用に関して、5-FUによる化学療法を施行する前の血漿中UH2/Ura比の測定及びPK-PDモデル解析は5-FUの個別化療法を実現することができる有効な治療戦略であり、5-FU化学療法の臨床効果を改善するものと期待される。

PK-PD モデル解析により得られた PD モデルパラメータのうち、5-FU 薬理効果指数を表す k_2 及び指数関数的に増殖する大腸腫瘍体積を表す速度定数 λ_0 に関して、日内変動が認められ、血漿中 UH2/Ura 比の日内変動リズムと逆の挙動を示した。PD モデルパラメータはそれぞれ腫瘍増殖、薬物反応及び腫瘍細胞死滅速度を表す。したがって、これらの PD モデルパラメータを用いることで、抗腫瘍効果を持つ薬物候補化合物を薬効強度に基づいてランキングすることが可能であり、腫瘍細胞の死滅過程の違いをも評価することが出来る。Simeoni らは、Unperturbed and Perturbed growth model において、腫瘍増殖と独立したパラメータである k_2 は、薬物固有の効力を表し、抗腫瘍効果を評価するために重要なパラメータであると述べている⁷⁷⁾。第二章で述べたように、DPD 活性の日内変動により誘発された血漿中及び腫瘍細胞内の 5-FU 濃度の変動と腫瘍細胞の薬剤感受性の日内変動により、5-FU 投与後の腫瘍細胞体積の減少度が変化したものと示唆されることから、薬効を表す k_2 及び腫瘍増殖速度を表す λ_0 にも日内変動が認められ、その変動リズムは DPD 活性の日内変動リズムと逆の挙動であったと考えられる。このように、PK-PD モデル解析より得られた PD パラメータを用いることで、薬力学的作用及び生理学的作用を速度論で評価することが可能となることから、PK-PD モデル解析は個別化医療実現へ向けた有効な治療戦略であるだけでなく、薬物候補化合物の薬物開発段階にも応用可能であるものと期待される。

3-5. 小括

CRC ラットにおける 5-FU 投与前の血漿中 UH2/Ura 比から 5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の時間的推移を予測するために、血漿中 UH2/Ura 比をモデルに組み込んだ PK-PD モデルを構築した。血漿中 UH2/Ura 比は肝臓中 DPD 活性を示す間接的バイオマーカーであり、5-FU の体内からの消失速度定数 k_e を反映することから、5-FU 投与前に得られた血漿中 UH2/Ura 比から消失速度定数 k_e を予測し、PK-PD モデル解析を行った。その結果、PK-PD モデル解析より得られた 5-FU 投与後の腫瘍体積の予測値と実測値はほぼ一致し、変動係数の小さい良好な PD パラメータ値を予測することができた。したがって、5-FU 投与前の血漿中 UH2/Ura 比及び PK-PD モデルを用いることで、5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の経時的な変化を定量的に予測し得ることが示唆された。大腸癌患者への 5-FU 適正使用に関して、血漿中 UH2/Ura 比をモデルに組み込んだ PK-PD モデルは医療現場における TDM 用の解析ツールとして有用であり、無駄な投薬と過度の投薬量の減量を理論的根拠に基づいて回避することが可能となるものと考えられる。このことは、患者の治療成績向上に寄与するだけでなく、患者の身体的・経済的負担軽減をも実現するものと期待される。

総括

臨床における個別化医療を目的として、フッ化ピリミジン系抗癌剤である 5-fluorouracil の定量的治療効果予測システムの構築に関する基礎的研究を第一章から第三章に渡って論述し、以下の結論を得た。

第一章 1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸癌モデルラットにおける 5-FU 体内動態及び肝臓中 dihydropyrimidine dehydrogenase 活性に関する検討

1,2-dimethylhydrazine (DMH) 誘発性大腸癌モデルラット (CRC ラット) における 5-FU の体内動態について、正常ラットとの比較から癌病態時の体内動態変動とその要因について検討した。CRC ラットにおいて、5-FU 静脈内及び門脈内投与後の血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ 及び半減期 $t_{1/2}$ は減少しており、全身クリアランス CL_{tot} の有意な増大が確認された。さらに、肝初回通過効果の回避率 F_h の有意な減少が認められ、これらの原因は、癌病態下での肝臓中 DPD の活性化に伴う 5-FU 肝固有クリアランス CL_{int} の増加によりもたらされたものと推察された。したがって、臨床の現場での 5-FU 化学療法において、体表面積に基づく投与設計では期待すべき血漿中 5-FU 濃度や血中濃度－時間曲線下面積 AUC が維持できず、5-FU 抗腫瘍効果の減弱を招くおそれがあることが示唆された。大腸癌患者に対する個別化療法に関して、体表面積に基づく投与設計ではなく、肝臓中 DPD 活性を考慮した投与設計が求められるものと考えられた。

第二章 大腸癌化学療法における血漿中 dihydrouracil/uracil 比のバイオマーカーとしての有用性

血漿中 UH2/Ura 比の測定意義について確かめるべく、血漿中 UH2/Ura 比と 5-FU 体内動態及び治療効果の関係について、CRC モデルラットを用いて検討を行った。肝臓中 DPD 活性と血漿中 UH2/Ura 比には日内変動が確認され、両者の間には高い相関関係が認められた。さらに、5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ は肝臓中 DPD 活性の日内変動と伴に変化した。これらのことから、血漿中 UH2/Ura 比は肝臓中 DPD 活性だけではなく、5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ を予測することが出来る有用な間接的バイオマーカーであることが明確となった。さらに、5-FU 連続投与により 5-FU 投与後の全身クリアランス CL_{tot} 及び肝臓中 DPD 活性は低下し、血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ は有意に増加した。加えて、5-FU 単回投与時に認められた肝臓中 DPD 活性、全身クリアランス CL_{tot} 及び血中濃度－時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$ の日内変動はそれぞれ消失した。臨床において 5-FU は繰り返し投与されている現状を鑑みると、5-FU 連続投与がもたらすこれらの変動は、大腸癌患者に対して投与設計を行う際に考慮されるべきであり、血漿中 UH2/Ura 比からの肝臓中 DPD 活性の評価を行うことで理論的な投与設計を実現し得るものと考えられた。一方、5-FU の治療効果に関して、肝臓中 DPD 活性変動に応じた大腸腫瘍体積の変化が認められた。したがって、5-FU 化学療法を施行する前の血漿中 UH2/Ura 比は、肝臓中 DPD 活性及び 5-FU の薬物動態学的パラメータのみならず、5-FU の抗腫瘍効果をも予測し得る間接的バイオマーカーであることが示唆された。大腸癌患者に対する 5-FU の適正使用に関して、5-FU 化学療法の施行前における血漿中 UH2/Ura 比の測定は、期待すべき血漿中 5-FU 濃度及び抗腫瘍効果に対応した投与設計に応用可能であり、個別化医療に向けた有用なバイオマーカーとなし得ることが示された。

第三章 バイオマーカーを用いた PK-PD モデリングによる 5-FU 抗腫瘍効果予測システム

肝臓中 DPD 活性レベルに応じた 5-FU 抗腫瘍効果の定量的予測を目的とした PK-PD モデルを構築した。モデル構築に関して、血漿中 UH2/Ura 比は 5-FU の体内からの消失速度定数 k_e を反映したことから、5-FU 投与前に得られた血漿中 UH2/Ura 比から単回帰直線式を用いて消失速度定数 k_e を予測することで、血漿中 UH2/Ura 比を PK-PD モデルに組み込んだ。構築した PK-PD モデルの妥当性は、第二章で得られた CRC ラットにおける血漿中 UH2/Ura 比、血漿中 5-FU 濃度及び大腸腫瘍体積の実測値との乖離の有無及び得られた PK-PD パラメータの変動係数より判断した。PK-PD モデル解析から得られた 5-FU 投与後の腫瘍体積の予測値は実測値とほぼ一致し、良好な PK-PD パラメータ値を予測することができたことから、5-FU 投与前の血漿中 UH2/Ura 比を組み込んだ PK-PD モデルを用いることで、5-FU 投与後の大腸腫瘍体積の経時的変化を定量的に予測し得ることが示唆された。したがって、大腸癌患者への 5-FU 化学療法施行前に血漿中 UH2/Ura 比を測定し、その値を用いた PK-PD 理論を導入することにより、個別化医療への実用的かつ合理的投与設計が可能になるものと考えられた。

本論文では、5-FU 化学療法における個別化医療を実現すべく、PK-PD 理論を駆使することにより血漿中薬物濃度、バイオマーカー及び薬効の定量的関係を明らかにした。バイオマーカーをモデルに組み込んだ PK-PD モデルは、医療現場における TDM 用の解析ツールとして有用であり、無駄な投薬と過度の投薬量の減量を理論的根拠に基づいて回避することが可能となり得ることから、大腸癌化学療法を施行される患者の身体的、経済的負担軽減につながるものと考えられた。これらの研究成果は、個別化医療への合理的投与設計に向けた基礎的情報となり、5-FU の適正使用に大きく貢献できるものとする。

謝辞

本研究の実施に当たり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学薬物動態学分野 高田寛治教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に適切な御教示を賜り、さらに本論文の作成に際し、御懇切なる御指導と御校正を賜りました京都薬科大学薬物動態学分野 伊藤由佳子講師に謹んで感謝の意を表します。

さらに、種々の有益な御助言と御指導を戴いた同志社女子大学薬学部医療薬学科生物薬剤学研究室 芝田信人教授、西村亜佐子助教、神戸学院大学薬学部臨床薬学部門臨床薬物動態学研究室 杉岡信幸教授、福島恵造助教、並びに大津市民病院薬剤部 早川太朗博士に深く感謝いたします。

最後に、実験の一部に御協力して戴いた服部圭子君、井本一樹君、岡田賀衣君、桑野翔太君、馬場明子君、篠原康太君、宇野智哉君、佐藤孝和君をはじめ京都薬科大学薬物動態学分野員一同に深謝いたします。

業績目録

本研究の主要部分は、以下の学術雑誌に公表した。

第一章 1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸癌モデルラットにおける 5-FU 体内動態及び肝臓中 dihydropyrimidine dehydrogenase 活性に関する検討

Shinji Kobuchi, Yukako Ito, Kae Okada, Kazuki Imoto, and Kanji Takada: Pharmacokinetics of 5-fluorouracil and increased hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity levels in 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal cancer model rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **38**(3), 171–181 (2013).

第二章 大腸癌化学療法における血漿中 dihydrouracil/uracil 比のバイオマーカーとしての有用性

Shinji Kobuchi, Yukako Ito, Kae Okada, Kazuki Imoto, Kuwano Shota, and Kanji Takada: Pre-therapeutic assessment of plasma dihydrouracil/uracil ratio for predicting the pharmacokinetic parameters of 5-fluorouracil and tumor growth in a rat model of colorectal cancer. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**(6), 907–916 (2013).

Shinji Kobuchi, Shota Kuwano, Kazuki Imoto, Kae Okada, Asako Nishimura, Yukako Ito, Nobuhito Shibata, and Kanji Takada: A predictive biomarker for altered 5-fluorouracil pharmacokinetics following repeated administration in a rat model of colorectal cancer. *Biopharm. Drug Dispos.*, **34**(7), 365–376 (2013).

第三章 バイオマーカーを用いた PK-PD モデリングによる 5-FU 抗腫瘍効果予測システム

Shinji Kobuchi, Yukako Ito, Kae Okada, Kazuki Imoto, Kuwano Shota, and Kanji Takada: Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of 5-fluorouracil by using a biomarker to predict tumor growth in a rat model of colorectal cancer. *J. Pharm. Sci.*, **102**(6), 2056–2067 (2013).

1. Keizo Fukushima, Masakazu Shibata, Kazunori Mizuhara, Hiroaki Aoyama, Rie Uchisako, Shinji Kobuchi, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Effect of serum lipids on the pharmacokinetics of atazanavir in hyperlipidemic rats. *Biomed. Pharmacother.*, **63(9)**, 635–642 (2009).
2. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Masakazu Shibata, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Pharmacokinetics of clomipramine, an antidepressant, in poloxamer 407-induced hyperlipidemic model rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **63(4)**, 515–523 (2011).
3. Keizo Fukushima, Shinji Kobuchi, Masakazu Shibata, Kanji Takada, and Nobuyuki Sugioka: Decrease in brain distribution of fluvoxamine in experimental hyperlipidemic rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **14(3)**, 414–424 (2011).
4. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Hiroaki Aoyama, Tatsuma Matsuda, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Effect of oxidative stress on the pharmacokinetics of clomipramine in rats treated with ferric-nitritotriacetate. *Drug Metab. Lett.*, **5**, 243–252 (2011).
5. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Pharmacokinetics and distribution of fluvoxamine to the brain in rats under oxidative stress. *Free Radic. Res.*, **46(7)**, 831–841 (2012).
6. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Hiroaki Aoyama, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Effects of oxidative stress on the pharmacokinetics and hepatic metabolism of atazanavir in rats. *Free Radic. Res.*, **47(4)**, 291–300 (2013).
7. Keizo Fukushima, Shinji Kobuchi, Kazunori Mizuhara, Hiroaki Aoyama, Kanji Takada, and Nobuyuki Sugioka: Time-dependent interaction of ritonavir in chronic use: the power balance between inhibition and induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A. *J. Pharm. Sci.*, **102(6)**, 2044–2055 (2013).
8. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Yuta Maeda, Takatoshi Kokuhu, Hidetaka Ushigome, Norio Yoshimura, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Effects of bile duct stricture on the pharmacokinetics of the immunosuppressant tacrolimus in rats. *Interact. Med. Chem.*, **1(1)**, 1–9 (2013).
9. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Yuta Maeda, Takatoshi Kokuhu, Hidetaka Ushigome, Norio Yoshimura, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Effects of cholestasis on whole blood concentration of tacrolimus, an immunosuppressant, in living-related liver transplant recipients. *Int. J. Clin. Med.*, **4**, 432–439 (2013).

10. Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Hiroaki Aoyama, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, and Kanji Takada: Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of atazanavir in rats. *Drug Metab. Lett.*, **7**, 39–46 (2013).

引用文献

- 1) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, **61**, 69-90 (2011).
- 2) Sreedharan V, Venkatachalam KK, Namasivayam N. Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Invest. New Drugs*, **27**, 21-30 (2009).
- 3) Ishikawa T, Utoh M, Sawada N, Nishida M, Fukase Y, Sekiguchi F, Ishitsuka H. Tumor selective delivery of 5-fluorouracil by capecitabine, a new oral fluoropyrimidine carbamate, in human cancer xenografts. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1091-1097 (1998).
- 4) Meropol NJ. Oral fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, **34**, 1509-1513 (1998).
- 5) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Multiagent chemotherapy for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **8(4)**, CD000487 (2002).
- 6) Harari PM. Why has induction chemotherapy for advanced head and neck cancer become a United States community standard of practice? *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2050-2055 (1997).
- 7) Macdonald JS, Astrow AB. Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin. Oncol.*, **28**, 30-40 (2001).
- 8) Filgueiras Mde C, Morrot A, Soares PM, Costa ML, Mermelstein C. Effects of 5-fluorouracil in nuclear and cellular morphology, proliferation, cell cycle, apoptosis, cytoskeletal and caveolar distribution in primary cultures of smooth muscle cells. *PLoS One*, **8**, e63177 (2013).
- 9) Nukatsuka M, Saito H, Sakamoto K, Nakagawa F, Uchida J, Kobunai T, Shiraishi K, Takechi T. Efficacy of combination chemotherapy using oral fluoropyrimidine S-1 with oxaliplatin (SOX) against colorectal cancer in vivo. *Anticancer Res.*, **32**, 2807-2812 (2012).
- 10) Labianca RF, Beretta GD, Pessi MA. Disease management considerations: disease management considerations. *Drugs*, **61**, 1751-1764 (2001).
- 11) Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H 3rd, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kröning H, Maroun J, Marschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schüller J, Seitz JF, Stabuc B, Tujakowski J, Van Hazel G, Zaluski J, Scheithauer W. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, **352(26)**, 2696-2704 (2005).
- 12) van Kuilenburg AB, Häusler P, Schalhorn A, Tanck MW, Proost JH, Terborg C, Behnke D, Schwabe W, Jabschinsky K, Maring JG. Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetics in cancer patients with a c.1905+1G>A mutation in DPYD by means of a Bayesian limited sampling strategy. *Clin. Pharmacokinet.*, **51(3)**, 163-174 (2012).
- 13) Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 1653-1664 (1988).
- 14) Naguib FN, el Kouni MH, Cha S. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res.*, **45**, 5405-5412 (1985).

- 15) Beuzeboc P, Pierga JY, Lyonnet DS, Couturier J, Pouillart P. Toxicite severe au 5-fluorouracile chez une femme traitee pour un cancer du sein, presentant une osteogenese imparfaite et un deficit en dihydropyrimidine dehydrogenase. *Bull. Cancer (Paris)*, **83**, 324-327 (1996).
- 16) Delval L, Klastersky J. Optic neuropathy in cancer patients. Report of a case possibly related to 5 fluorouracil toxicity and review of the literature. *J. Neurooncol.*, **60**, 165-169 (2002).
- 17) Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renee N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br. J. Cancer*, **79**, 627-630 (1999).
- 18) van Kuilenburg AB, De Abreu RA, van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann. Clin. Biochem.*, **40**, 41-45 (2003).
- 19) Fukushima M, Morita M, Ikeda K, Nagayama S. Population study of expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in patients with solid tumors. *Int. J. Mol. Med.*, **12(6)**, 839-844 (2003).
- 20) Otsuka S, Tanabe S, Tsunemitsu Y, Ariki N, Miyoshi K, Inagaki M, Takahashi M, Oosaki T, Fuchimoto S, Yumura M. Clinicopathological significance of pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in advanced colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, **32(11)**, 1679-1681 (2005).
- 21) Li W, Li CB. Lack of inhibitory effects of lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 2469-2473 (2003).
- 22) Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer. Letter*, **37**, 147-151 (1987).
- 23) Silva MF, Sivieri K, Rossi EA. Effects of a probiotic soy product and physical exercise on formation of pre-neoplastic lesions in rat colons in a short-term model of carcinogenic. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, **6**, 17 (2009).
- 24) Harris BE, Song RL, He YJ, Soong SJ, Diasio RB. Circadian rhythm of rat liver dihydropyrimidine dehydrogenase. Possible relevance to fluoropyrimidine chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 4759-4762 (1988).
- 25) Zhang R, Lu Z, Liu T, Soong SJ, Diasio RB. Relationship between circadian-dependent toxicity of 5-fluorodeoxyuridine and circadian rhythms of pyrimidine enzymes: possible relevance to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Res.*, **53**, 2816-2822 (1993).
- 26) Porsin B, Formento JL, Filipski E, Etienne MC, Francoual M, Renee N, Magne N, Levi F, Milano G. Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *Eur. J. Cancer*, **39**, 822-828 (2003).
- 27) Milano G, McLeod HL. Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil-based treatment? *Eur. J. Cancer*, **36**, 37-42 (2000).
- 28) Barrat MA, Renee N, Mormont MC, Milano G, Levi F. Etude des variations circadiennes de l'activite de la dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) dans la muqueuse buccale chez des sujets volontaires sains. *Pathol. Biol.*, **51**, 191-193 (2003).

- 29) Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res.*, **50**, 197-201 (1990).
- 30) Tateishi T, Nakura H, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Kobayashi S. Preliminary examination of the influence of incubation time or cytosolic protein concentration on dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Clin. Chim. Acta*, **252**, 1-9 (1996).
- 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 32) César IC, Cunha-Júnior GF, Duarte Byrro RM, Vaz Coelho LG, Pianetti GA. A rapid HPLC-ESI-MS/MS method for determination of dihydrouracil/uracil ratio in plasma: evaluation of toxicity to 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer. *Ther. Drug Monit.*, **34**(1), 59-66 (2012).
- 33) Svobaite R, Solassol I, Pinguet F, Ivanauskas L, Bres J, Bressolle FM. HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma. *Clin. Chem.*, **54**, 1463-1472 (2008).
- 34) Nakata B, Amano R, Nakao S, Tamura T, Shinto O, Hirakawa T, Okita Y, Yamada N, Hirakawa K. Plasma pharmacokinetics after combined therapy of gemcitabine and oral S-1 for unresectable pancreatic cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **29**, 15 (2010).
- 35) LaMont JT, O'Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology*, **75**, 1157-1169 (1978).
- 36) PeršeM, CerarA. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.*, DOI: 10.1155/2011/473964 (2011).
- 37) Rahman Z, Kohli K, Zhang SQ, Khar RK, Ali M, Charoo NA, Tauseef M, Shamsher AA, Mohammed NN, Repka MA. In vivo evaluation in rats of colon-specific microspheres containing 5-fluorouracil. *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**(5), 615-623 (2008).
- 38) Karthik Kumar V, Vennila S, Nalini N. Modifying effects of morin on the development of aberrant crypt foci and bacterial enzymes in experimental colon cancer. *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 309-315 (2009).
- 39) Hung HY, Chen JS, Yeh CY, Changchien CR, Tang R, Hsieh PS, Tasi WS, You JF, You YT, Fan CW, Wang JY, Chiang JM. Effect of preoperative neutrophil-lymphocyte ratio on the surgical outcomes of stage II colon cancer patients who do not receive adjuvant chemotherapy. *Int. J. Colorectal Dis.*, **26**, 1059-1065 (2011).
- 40) Jiang H, Lu J, Ji J. Circadian rhythm of dihydrouracil/uracil ratios in biological fluids: a potential biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase levels. *Br. J. Pharmacol.*, **141**, 616-623 (2004).
- 41) Tateishi T, Watanabe M, Nakura H, Tanaka M, Kumai T, Sakata SF, Tamaki N, Ogura K, Nishiyama T, Watabe T, Kobayashi S. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil pharmacokinetics with liver damage induced by bile duct ligation in rats. *Drug*

- Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, **27**, 651-654 (1999).
- 42) Kankesan J, Yusuf A, Laconi E, Vanama R, Bradley G, Thiessen JJ, Ling V, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DS. Effect of PSC 833, an inhibitor of P-glycoprotein, on 1,2-dimethylhydrazine-induced liver carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **24**, 1977-1984 (2003).
 - 43) Miyazaki K, Shibahara T, Sato D, Uchida K, Suzuki H, Matsui H, Yanaka A, Nakahara A, Matsuzaki Y. Influence of chemotherapeutic agents and cytokines on the expression of 5-fluorouracil-associated enzymes in human colon cancer cell lines. *J. Gastroenterol.*, **41**, 140-150 (2006).
 - 44) Murray JF, Dawson AM, Sherlock S. Circulatory changes in chronic liver disease. *Am. J. Med.*, **24**, 358-367 (1958).
 - 45) Nagai Y, Yoshida M. Studies on serum immunoreactive prolyl 4-hydroxylase in liver diseases--its elevation both in hepatocellular damage and cholestatic diseases. *Clin. Chim. Acta*, **175**, 27-36 (1988).
 - 46) Pegg AE. Inhibition of the alkylation of nucleic acids and of the metabolism of 1,2-dimethylhydrazine by aminoacetonitrile. *Chem. Biol. Interact.*, **23(2)**, 273-279 (1978).
 - 47) Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.*, **99**, 1107-1122 (2010).
 - 48) Matsushita R, Kondo Y, Yada S, Miyamoto K. Proceedings of the 18th meeting of Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences. Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences; 2008 September 20 - 21; Sapporo. Japan: *Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, p.358 (2008).
 - 49) Kondo Y, Matsushita R, Yada S, Miyamoto K. Proceedings of the 25th Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring; 2008 June 21--22; Kobe. Japan: *The Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring*, ps.167 (2008).
 - 50) Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Hiroaki Aoyama, Tatsuma Matsuda, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, Kanji Takada: Effect of oxidative stress on the pharmacokinetics of clomipramine in rats treated with ferric-nitritotriacetate. *Drug Metab. Lett.*, **5**, 243-252 (2011).
 - 51) Shinji Kobuchi, Keizo Fukushima, Yukako Ito, Nobuyuki Sugioka, Kanji Takada: Pharmacokinetics and distribution of fluvoxamine to the brain in rats under oxidative stress. *Free Radic. Res.*, **46(7)**, 831-841 (2012).
 - 52) Khan R, Sultana S. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.*, **192**, 193-200 (2011).
 - 53) Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. 5-Fluorouracil (5-FU injection). [Drug Information] (2011).
 - 54) Vella-Brincat JW, Begg EJ, Kirkpatrick CM, Zhang M, Chambers ST, Gallagher K. Protein binding of cefazolin is saturable in vivo both between and within patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **63**, 753-757 (2007).

- 55) Cheng H, Rogers JD, Demetriades JL, Holland SD, Seibold JR, Depuy E. Pharmacokinetics and bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans. *Pharm. Res.*, **11**, 824-830 (1994).
- 56) Evans AM, Nation RL, Sansom LN, Bochner F, Somogyi AA. Stereoselective plasma protein binding of ibuprofen enantiomers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 283-290 (1989).
- 57) Balant-Gorgia AE, Gex-Fabry M, Balant LP. Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clin. Pharmacokinet.*, **20**, 447-462 (1991).
- 58) Astellas Pharma Inc. Fluvoxamine (Luvox[®]) [Drug Information] (2011).
- 59) Jarugula VR, Lam SS, Boudinot FD. Nonlinear pharmacokinetics of 5-fluorouracil in rats. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 756-758 (1997).
- 60) Fuse E, Takai K, Okuno K, Kobayashi S. Hepatic extraction ratio of 5-fluorouracil in rats. Dose dependence and effect of uracil and interleukin-2. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 561-568 (1996).
- 61) Nagata M, Hidaka Y, Hidaka M, Kawano Y, Iwakiri T, Okumura M, Arimori K. Effect of acute hepatic failure on the hepatic first-pass effect of 5-fluorouracil in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **62**, 598-603 (2010).
- 62) Milano G, Etienne MC, Renee N, Thyss A, Schneider M, Ramaioli A, Demard F. Relationship between fluorouracil systemic exposure and tumor response and patient survival. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 1291-1295 (1994).
- 63) Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul JL, Pezet D, Dorval E, Piot G, Morel A, Boisdron-Celle M. Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, **26**, 2099-2105 (2008).
- 64) Oravcova J, Sojkova D, Fetkovska N, Trnovec T. Factors influencing isradipine and amlodipine binding to human plasma lipoproteins. *Blood Press. Suppl.*, **1**, 61-64 (1994).
- 65) Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J. Natl. Cancer Inst.*, **101**, 1543-1552 (2009).
- 66) Fety R, Rolland F, Barberi-Heyob M, Hardouin A, Champion L, Conroy T, Merlin JL, Riviere A, Perrocheau G, Etienne MC, Milano G. Clinical impact of pharmacokinetically-guided dose adaptation of 5-fluorouracil: results from a multicentric randomized trial in patients with locally advanced head and neck carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **4**, 2039-2045 (1998).
- 67) Baker SD, Verweij J, Rowinsky EK, Donehower RC, Schellens JH, Grochow LB, Sparreboom A. Role of body surface area in dosing of investigational anticancer agents in adults, 1991-2001. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 1883-1888 (2002).
- 68) Undevia SD, Gomez-Abuin G, Ratain MJ. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 447-458 (2005).
- 69) Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, Gamelin E. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Letter*, **249**, 271-282 (2007).

- 70) Miki I, Tamura T, Nakamura T, Makimoto H, Hamana N, Uchiyama H, Shirasaka D, Morita Y, Yamada H, Aoyama N, Sakaeda T, Okumura K, Kasuga M. Circadian variability of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and CLOCK T3111C genetic polymorphism in patients with esophageal carcinoma. *Ther. Drug Monit.*, **27**, 369-374 (2005).
- 71) Milano G, Chamorey AL. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol. Int.*, **19**, 177-189 (2002).
- 72) Kuwahara A, Yamamori M, Nishiguchi K, Okuno T, Chayahara N, Miki I, Tamura T, Kadoyama K, Inokuma T, Takemoto Y, Nakamura T, Kataoka K, Sakaeda T. Effect of dose-escalation of 5-fluorouracil on circadian variability of its pharmacokinetics in Japanese patients with Stage III/IVa esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Med. Sci.*, **7**, 48-54 (2010).
- 73) Hishinuma E, Sawada K, Takasu R, et al. Proceedings of the 131th meeting of Pharmaceutical Society of Japan; 2011 March 28–31; Shizuoka. Japan: *The Pharm. Soc. Jpn.*, **4**, ps. 217 (2011).
- 74) Tsukamoto Y, Kato Y, Ura M, Horii I, Ishitsuka H, Kusuhara H, Sugiyama Y. A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans: the mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharm. Res.*, **18(8)**, 1190-1202 (2001).
- 75) Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res.*, **61**, 1029-1037 (2001).
- 76) Buchi KN, Moore JG, Hrushesky WJ, Sothorn RB, Rubin NH. Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology*, **101**, 410-415 (1991).
- 77) Simeoni M, Magni P, Cammia C, De Nicolao G, Croci V, Pesenti E, Germani M, Poggesi I, Rocchetti M. Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res.*, **64**, 1094-1101 (2004).
- 78) Sung JH, Dhiman A, Shuler ML. A combined pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model for tumor growth in the rat with UFT administration. *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1885-1904 (2009).
- 79) Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.*, **19**, 716-723 (1974).
- 80) Katsube T, Yamano Y, Yano Y. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling and simulation for in vivo bactericidal effect in murine infection model. *J. Pharm. Sci.*, **97(4)**, 1606-1614 (2008).
- 81) Bissery MC, Vrignaud P, Lavelle F, Chabot GG. Experimental antitumor activity and pharmacokinetics of camptothecin analog irinotecan (CPT-11) in mice. *Anticancer Drugs*, **7**, 437-460 (1996).
- 82) Per'se M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.*, Article ID 473964 (2011).

- 83) Sun YN, Jusko WJ. Transit compartments versus gamma distribution function to model signal transduction processes in pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 732-737 (1998).
- 84) Gamelin E, Boisdron-Celle M, Gu´erin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J. Clin. Oncol.*, **17(4)**, 1105-1110 (1999).
- 85) Ben Fredj R, Gross E, Ben Ahmed S, Hassine H, Saguem S. The dihydrouracil/uracil ratio in plasma, clinical and genetic analysis for screening of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Pathol. Biol.*, **57(6)**, 470-476 (2009).
- 86) Mager DE, Jusko WJ. Pharmacodynamic modeling of time-dependent transduction systems. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **70(3)**, 210-216 (2001).
- 87) Perlstein I, Stepensky D, Krzyzanski W, Hoffman A. A signal transduction pharmacodynamic model of the kinetics of the parasympathomimetic activity of low-dose scopolamine and atropine in rats. *J. Pharm. Sci.*, **91(12)**, 2500-2510 (2002).
- 88) Amstutz U, Froehlich TK, Largiad`er CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*, **12(9)**, 1321-1336 (2011).