動物のデータはヒトにどこまで迫れるか？

特集 日本のトランスレーショナルリサーチをどう進めるか

辻 彰*

Can we predict pharmacokinetic profiles of drugs in humans from data of experimental animals?

Understanding of the relationship of oral absorption and oral bioavailability (BA) of potential drug candidates between animals and humans is important in drug discovery and development. Despite the similarities in monkeys and humans, marked differences have been found in oral BA for many drugs. Because BA values determine the therapeutic potential of a drug, caution should be exercised in extrapolating data obtained in animals, especially in monkeys as it may not predict that in humans. There have been many improvements in predicting human pharmacokinetics, which are determined by functions of metabolic enzymes and transporters, based on a combination of animal, *in vitro*, and *in silico* (e.g., physiologically-based pharmacokinetic) models, but failures still occur.

Microdosing studies in humans potentially have an important place in the drug development process inasmuch as they can offer an early determination of the pharmacokinetic properties of a compound and thus assist in the selection of those drug candidates that possess optimal disposition properties for further evaluation in the clinic. This strategy allows early evaluation of systemic clearance, oral bioavailability, and excretion ratio into urine as well as sources of intersubject variability and questions of specific metabolite formation.

候補薬を経口投与後の消化管吸収性と動物とヒトにおけるバイオアベイラビリティ (BA) の関係の理解は、医薬品の発見・開発にとってきわめて重要である。ヒトとサルとの間の類似性にかかわらず、多くの薬物において両者における BA に大きな相違が認められている。低分子医薬品にあっては実験動物とヒトとの間の動態・薬効・毒性特性において乗り越えることのできない種差がある。創薬候補薬投与後の BA、組織移行、代謝・排泄など、代謝酵素やトランスポーターの機能によって制御されているヒト体内動態を予測するためにヒト組織、ヒト由来細胞、ヒト肝臓、または小腸マイクロゾームやヒト遺伝子発現系を用いた *in vitro* モデルや、生理学的薬物速度論を用いた *in silico* モデルのようなヒト動態評価システムが医薬品開発研究に積極的に取り入れられるようになったが、予測性は必ずしもよくない。

したがって、疾病治療上ヒトで有用な候補物質を適切に選択し、効率的に医薬品開発を進めるためには、マイクロドーズ試験を実施し、ヒトでの動態を医薬品開発の早い段階で明らかにすることがきわめて重要である。

Akira Tsuji*

key words : bioavailability, first-pass effect, transporters, physiological pharmacokinetics, microdosing

従来のセレンディピティー的な新薬の開発に加えて、ポストゲノム時代といわれる昨今、ゲノム情報に基づいた論理的な創薬へのシフトが可能となった。ジェノミクス、プロテオミクスなど、いわゆる omics 革命が、創薬ターゲットとなる酵素、受容体などの蛋白質群数の増加をもたらし、新薬の誕生に多大な関心が寄せられている。

しかし、残念なことであるが、わが国の製薬企業において創薬ターゲットとしてのレセプターなど、標的分子に対し薬効を示すリード化合物の探索からリード最適化に至るプロセスにおいて、非臨床試験まで到達した化合物はきわめて少なく、さらに臨床試験にまで進んだものは 0.4% にすぎないとの報告がある。この成績から推測すると、大学などの研究機関で発見された新規創薬ターゲットを利用したトランスレーショナルリサーチから画期的な医薬品の実用化は難しいことになる。

* Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University 金沢大学大学院自然科学研究科薬学系

図1 トランスポーターの基質輸送

トランスポーターは、ABC タイプと SLC タイプに分類される。これらは、小腸や腎臓、肝臓、脳、胎盤、肺、腫瘍などに発現し、ATP 加水分解エネルギーや膜電位、イオン勾配を駆動力として薬物や栄養物質などを輸送する。

非臨床試験段階と臨床試験段階での開発候補薬の有効性・安全性・物性など、さまざまなボトルネックが存在するなかで、ヒトにおける体内動態が動物実験では予測できないことが最も決定的な要素であると広く認識され、創薬候補薬投与後のヒト体内動態を予測する研究が精力的に進められてきた。その結果、薬物動態影響因子の解明と方法論が進歩し、具体的な成果も上がりつつある。

しかし、低分子医薬品にあっては実験動物とヒトとの間の動態・薬効・毒性特性において乗り越えることのできない種差がある。日本薬物動態学会に設置された薬物動態試験推進委員会は「最新の薬物動態学的見地から検証しても、依然として動物実験からは、たとえヒトに近いサルを利用したとしても、特に経口投与後のヒト体内動態の予測は極めて困難であり、ヒトの体内動態はヒトに適用しない限り予測できない。したがって、疾病治療上ヒトで有用な候補物質を適切に選択し、効率的に医薬品開発を進めるためには、ヒトでの作用を医薬品開発の早い段階で明らかにすることが極めて重要である」と述べた“早期臨床試験による医薬品開発促進に関する意見書”を2006年にまとめて公表した¹⁾。

薬物動態研究の最高峰にある同学会の公式見解は、現在の薬物動態学の知識と技術を最大限に駆使したとしても、動物実験データからの外挿では、患者のQOLの観点から開発の主流となる経口剤のヒ

ト投与後における動態の予測は充分にできないということを示した点で意義深い。実験動物を用いた非臨床試験において有効性と安全性が認められた候補薬物が臨床試験段階で臨床の有用性が認められず、高い確率で drop out してきたことはよく知られている。

このような背景から、ヒト組織、ヒト由来細胞、ヒト肝臓または小腸マイクロゾームや、ヒト遺伝子発現系を用いた *in vitro* モデルや *in silico* モデルなど、ヒト動態評価システムが医薬品開発研究に積極的に取り入れられるようになった。

薬物の組織細胞内動態と 薬物トランスポーターの種差

生体には、環境物質や医薬品などの異物を巧妙に体外に排除する解毒機構が備わっている。哺乳動物の異物解毒機構は、肝臓や腎臓など代謝・排泄を担う主要臓器のほか、小腸、血液脳関門、血液胎盤関門にも備わっている。

組織を構成する細胞における薬物の動態と薬効・毒性の発現を模式的に図1に示した。生体異物としての薬物の細胞膜透過は、分子の脂溶性、分子サイズ、電荷に依存した受動拡散機構に従うと広く信じられてきた。

しかし、トランスポーター遺伝子欠損動物や遺伝子発現細胞系を用いた最近の生物薬剤学的研究によって、肝臓、腎臓、小腸、脳などの組織細胞内外への薬物移行にトランスポーターが介在する能動的輸送機構が働いていることが報告され、薬物の体内動態は従来考えられていた以上に複雑であることが理解されるようになった。比較的低分子の薬物に対する細胞内の解毒は、拡散によりあるいはトランスポーターを介して細胞内に取り込まれた薬物の酸化・還元的代謝による phase I 解毒や、抱合化による phase II 解毒によって生成した代謝物や代謝されなかった薬物を、排出トランスポーターによって細胞外に排出して生体外異物から細胞を守る phase III 解毒のプロセスによって達成される。

ヒトに存在するトランスポーターは、ABC (ATP binding cassette) トランスポーター・ファミリーと

図2 組織細胞内における薬物動態と薬効・毒性

SLC(solute carrier)トランスポーター・ファミリーに大別される。ABCトランスポーターは、細胞内ATPの加水分解により生じるエネルギーを駆動力として細胞内の物質(薬物、毒物、内因性物質)を細胞外に排出する役割を担う蛋白質であり、今日までそれらをコードする49遺伝子(ABCA~G)が同定されている。SLCトランスポーターは、 H^+ や Na^+ などのイオン勾配あるいは膜内外の電位差を駆動力として、栄養素、内因性物質のみならず薬物など生体異物を細胞内外に輸送する膜蛋白質であり、それらをコードする319遺伝子(SLC1~43)が同定されている²⁾。図2には、各組織に発現があって薬物の輸送に関わっていることが明らかにされたトランスポーター群を示した。

Phase I と phase II に関与する代謝酵素において従来より認められてきたように、最近になってトランスポーターの組織発現と相同性に明らかな種差があることが報告された。たとえば、① ヒト腎臓に発現のない有機カチオントランスポーターOCT1や異物排出ポンプBCRP(breast cancer resistant

protein)がげっ歯類の腎に発現していること、② 有機アニオントランスポーターOATPファミリーにおいてアミノ酸の相同性から推測されるオルソログの発現組織と基質選択性に種差があること、③ 300種に近い化合物について、ヒトとマウスの異物排出ポンプP-糖蛋白質(P-glycoprotein)発現細胞の側底膜側(B)から頂側膜側(A)側への輸送(B→A)に対するAからBへの輸送(A→B)の比において化合物によっては種差が認められる³⁾ことなど、トランスポーターの発現・輸送機能に種差があることが、しだいに明らかになってきた。

上記の理由のために、実験動物の代謝酵素、トランスポーター、レセプターなどの標的蛋白質をノックアウト・ダウンすることによって変動が見いだされたものから、ヒトで機能することが推測されるヒト分子種を特定する方法、動物が有する標的蛋白質をヒト型に置換したあとに候補薬を投与して、ヒトにおける体内動態・薬効・毒性を予測するヒト型実験動物を用いる方法が開発されつつある。

図3 ヒトとサルにおける薬物のバイオアベイラビリティ相関

経口投与後の生物学的利用率の種差

経口投与された薬物動態は小腸と肝臓の両組織細胞における解毒システムに依存する。薬物が胃から小腸に移動して吸収される過程においては、投与剤形からの薬物放出と溶解課程が吸収の前段階として重要であるが、溶解した薬物は小腸上皮細胞を介して門脈に吸収され、ついで肝実質細胞を透過して循環系に吸収される。投与量に対する循環系への取込量の割合は生物学的利用率(または利用能) bioavailability (BA) とよばれ、このBAは静脈内投与(iv)後の薬物血中濃度時間下面積(area under blood concentration curve: AUC)を同量経口投与(po)後のAUCの比で評価できる。

経口投与後の消化管腔における薬物の溶解プロセスに加えて、上皮細胞と肝実質細胞の内外では、まさしく図1に示した細胞動態が進行するので、BAを決定する要因が複雑に関与していることが理解される。

経口投与後のBAは次式で示される。

$$BA = F_{\text{abs}} \times F_G \times F_H$$

ここで、 F_{abs} は腸管腔から上皮細胞への吸収率、 F_G は腸管上皮細胞における代謝または腸管腔への排出輸送からの回避率、 F_H は肝臓でのアベイラビ

リティーである。経口投与後のBAが小さい薬物は、薬物が循環系に吸収されるまでの間に、腸管上皮細胞や肝臓において代謝・排出輸送により除去される初回通過効果(first-pass effect)を受けるからである。

医薬品の開発においては、薬効が経口で期待できる候補薬を動物にivとpoの投与をしてBAを評価する手法が採用される。わが国の現状においては、開発候補薬を健常人に投与してBAを求めることができないので、多くの製薬企業ではラットとイヌを用いて、しばしばヒトに類似するとの理由でサルを用いてBAが測定される。サルとヒトにおけるBAの相関(図3)からわかるように、同じ程度のBAを示す薬物もあるが、その多くはサルのBAがヒトのBAよりかなり小さい⁴⁾。

各種動物におけるBAに与える影響因子として、

- ① 各動物種の消化管の解剖学的・生理学的特徴
- ② 各動物種の消化管上皮細胞と肝実質細胞に発現している代謝酵素とトランスポーターの発現量と基質認識特性

があげられるが、これらの消化管生理と薬物動態に関するデータが整理または解明されていないために、 F_H の予測が肝マイクロゾームなどの利用によって可能であったとしてもBAを決定する $F_{\text{abs}} \cdot F_G$ を予測することが困難であるために、各動物種の実測BAデータをもとにヒトでのBAを予測できないのが実状である。

したがって、ヒトBAを予測するための動物実験を繰り返すよりも、被験者のリスクがきわめて小さいと思われる $100\mu\text{g}$ 以下の低用量を経口投与するマイクロドーズ試験によって得られるヒト体内動態情報は、たとえ臨床用量でのデータが得られなくても開発候補薬を臨床試験に持ち込むべきかどうかの意思決定に欠かすことができないものであり、その後の医薬品開発戦略を有効にするものと考えられる。薬物濃度が代謝酵素、トランスポーターなどへの親和定数 K_m にくらべて十分に低いところでは、線形性が保たれること、今日治療に用いられている医薬品の多くにおいて、臨床投与量では溶解度が原因であることを除けば薬物動態が原因で非線形性を

生じる例が少ないこと、また、第1相試験の前に候補薬を絞り込むことが効率的なトランスレーショナルリサーチの推進と医薬品開発に必要であること、などを考慮すれば、薬物動態面でヒトと動物を用いる非臨床試験との間の乖離を補う早期臨床試験としてのマイクロドース試験を実施することが望ましい。しかしながら、早期臨床試験を行えないわが国の製薬企業では、この試験の実施が可能な欧米に試験を委託しなければならない状況となっている。

ヒト組織分布の予測

マイクロドース試験によるヒト動態を測定し、候補薬を絞り込むことができたとしても、薬物濃度に関する情報は、血中や尿中薬物濃度に限定される。しかし、トランスレーショナルリサーチが対象とする医薬品では組織分布、ひいては組織特異的なメカニズムによって標的組織に選択的に送達されるようにデザインされたものが多いと思われるが、このような薬物では標的組織における薬物動態と薬効と副作用発現部位における時間推移を単純に予測することはできない。受動拡散による組織移行性を仮定できないので、血中濃度推移から標的部位の薬物濃度を単純に予測できない。この場合、標的組織の局所的な特徴を組み込んだ生理学的薬物速度論 (physiologically based pharmacokinetics, PB-PK) モデルを構築することによって、非臨床試験成績からヒトに投与後の予測が可能である。

PB-PK モデルは、概念的なコンパートメントモデルを仮定せず、薬物が経口あるいは非経口で投与されたあとに起こる吸収・分布・代謝および排泄を、実験動物種と予測すべきヒトにおける薬物の分子特性(蛋白結合、膜透過性、代謝酵素親和性など)と生理学的・解剖学的パラメーター(組織体積、血流速度など)により表現した薬物動態モデルである。このモデルでは薬力学的作用点(レセプター、

酵素など)を導入可能であり、そこに運ばれる薬物量または濃度が定量的に表現できるので、*in vitro* の薬理試験成績からヒト固体での薬理効果を予測することができる。また、毒性試験や薬理モデル動物で測定された投与量-体内薬物濃度-反応性(薬理効果・毒性)を本モデルで検証したのち、ヒトへと外挿することが可能である⁵⁾。

おわりに

膨大な数の開発候補薬のなかから、数々の非臨床評価・臨床開発の障害を乗り越えて、開発薬が目指す有効性と安全性が保障された医薬品を市場に出すためには、およそ15年の開発期間と巨額の開発費が必要といわれている。

大学など研究機関から生まれたアイデアに基づいて発案された画期的な医薬品の実用化に向けたトランスレーショナルリサーチを完成させるためには、実験動物から得られる情報の限界を理解し、得られるデータがヒトへの予測に連動するかどうかを科学的に検証し、その医薬品としての実現を確実に達成する手段としてヒトを対象としたマイクロドース試験を取り入れることが重要である。

文 献

- 1) 日本薬物動態学会：早期臨床試験による医薬品開発促進に関する意見。Drug Metabolism and Pharmacokinetics 21：ニュースレター，2006，p10-11.
- 2) URL：http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html
http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/slc.php
- 3) Yamazaki M, Neway WE, Ohe T, Chen L, Rowe JE et al. : *In vitro* substrate identification studies for p-glycoprotein-mediated transport : species difference and predictability of *in vivo* results. J Pharmacol Exp Ther 296 : 723-735, 2001.
- 4) Chiou WI, Bucher FW : Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human. Pharm Res 19 : 868- 874, 2002.
- 5) Tanaka C, Kawai, Rowland M : Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A : reevaluation of dose-nonlinear kinetics in rats. J Pharmacokinetic Biopharm 27 : 597-623, 1999.