肝臓での代謝および輸送における薬物間相互作用の定量的予測

Quantitative Prediction of Drug Interaction Involving Metabolism and Transport in the Liver

杉山 雄一, 加藤 将夫, 金光 真一, 伊藤 清美*

(東京大学大学院薬学系研究科 製剤設計教室)

Yuichi SUGIYAMA, Yukio KATO, Shin-ichi KANAMITSU and Kiyomi ITO*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo;

*School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo

Summary: When the metabolism of a drug is competitively or noncompetitively inhibited by another drug, the degree of *in vivo* interaction can be evaluated from the I_u/K_i ratio, where I_u is the unbound concentration around the enzyme and K_i is the *in vitro* inhibition constant of the inhibitor. In the case of tolbutamide/sulfaphenazole interaction, the increase in tolbutamide AUC predicted using an estimated maximum value of I_u was comparable with the predictions taking the concentration profile of the inhibitor into consideration and also with the *in vivo* observation.

We have also evaluated the metabolic inhibition potential of a number of drugs known to be inhibitors or substrates of cytochrome P450 (CYP) by estimating their I_u/K_i ratio using literature data. Using the maximum unbound concentration of the inhibitor at the inlet to the liver as I_u , the possibility of drugs causing *in vivo* drug-drug interactions could be predicted based on their I_u/K_i ratios.

On the other hand, in the case of interactions involving a mechanism-based inhibition, it is necessary to consider the exposure time of the enzyme to the inhibitor and enzyme turnover in predicting from *in vitro* data. A case of 5-fluorouracil/sorivudine interaction has been predicted based on a physiologically-based pharmacokinetic model.

Although it can be assumed for most inhibitors that the value of I_u is equal to the unbound concentration in the liver capillary, this assumption is not valid if the inhibitor is actively taken up by the liver. In the *in vitro* uptake studies using isolated rat hepatocytes and ATP depletors, none of the investigated inhibitors was found to be highly concentrated in the liver, and the predicted *in vivo* interaction was not greatly affected by taking account of active transport of the inhibitor.

We have also attempted to establish a rational methodology for predicting the drug interactions via hepatic transporters responsible for drug uptake and subsequent excretion. Both isolated hepatocytes and canalicular membrane vesicles were used to determine the intrinsic potential for the interaction via hepatic uptake and biliary excretion at the sinusoidal and canalicular membranes, respectively. We have demonstrated that the degree of inhibition of each membrane transport process can be accurately estimated also by considering the I_u/K_i ratios. We have also established a rational methodology to predict the degree of inhibition of net biliary excretion (from blood to bile) which can also be applied to clinical situations and prevent researchers from making false negative predictions.

Key words: Quantitative prediction, Metabolism, Active transport, Biliary excretion, Physiologically-based pharmacokinetics

1. はじめに

薬物間相互作用により体内動態が変動する主な原因として、以下のことをあげることができる。(1) 薬物吸収に関する相互作用, (2) 血漿蛋白結合に関する相互作

用, (3) 輸送担体による生体膜透過過程における相互作用(肝, 腎への取り込み, 胆汁, 尿中排泄過程を含む), (4) 代謝過程における相互作用. さらに, 薬物受容体における拮抗作用などのようなファーマコダイナミクスに関する相互作用によっても, 薬物の作用が増強あるいは

東京大学大学院薬学系研究科 製剤設計教室 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

* 北里大学薬学部 薬剤学教室 〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1

減弱される可能性がある。

本稿においては、臨床に特に問題となりうる(3)および(4)を中心に、ヒト組織を用いた *in vitro* 試験から *in vivo* での薬物間相互作用の定量的予測の可能性について議論したい。薬物代謝の障害に起因する体内動態変化を *in vitro* 試験から予測する手法として、一般的な競合阻害のケースのみでなく、より重篤な副作用につながる危険性のある mechanism-based inhibition のケースについても定量的な予測を試みた例を紹介する。

2. 薬物代謝の競合あるいは非競合阻害に基づく *In vivo* 薬物間相互作用の定量的予測

臨床における基質濃度は多くの場合、 K_m と比較して十分低く、代謝阻害の程度 ($R = AUC (+inhibitor) / AUC (control)$) は競合阻害と非競合阻害の場合、 $R = 1 + I_u / K_i$ とあらわされる。ここで、 I_u は酵素近傍

Fig. 1 Model for estimating the concentration of the inhibitor at the inlet to the liver after oral administration (I_{in}). I_{out} , I , and I_{max} represent the inhibitor concentration at the exit of the liver (hepatic vein side), the inhibitor concentration at the liver capillary, and maximum inhibitor concentration in the systemic circulation, respectively. Q_a , Q_{pv} and $Q_h (=Q_a + Q_{pv})$ represent the blood flow at the hepatic artery, portal vein, and hepatic vein, respectively.

Fig. 2 Prediction of the interaction between tolbutamide and sulfaphenazole.

Panel (A) represents the plasma concentration profiles of tolbutamide in humans reported by Veronese *et al.* (1990). Open circles: control, closed circles: co-administration of sulfaphenazole (500 mg, b.i.d.).

Panels (B), (C), (D), and (E) represent the simulated effect of co-administration of sulfaphenazole at a dose of 500, 50, 5, and 0.5 mg, respectively, on the plasma concentration profile of tolbutamide.

.....: control, ----: co-administration of sulfaphenazole, —: simulation using a fixed concentration of sulfaphenazole ($I_{in,u}$).

における阻害剤の非結合型濃度、 K_i は肝ミクロソーム等を用いた *in vitro* 代謝試験で得られる阻害定数を示す。ヒトにおいて I_u の正確な値を見積もることは困難であるので、我々は false negative な予測を避けるため、肝動脈血と門脈血が合流して肝臓へ流入する部分の血中最大非結合型濃度 ($I_{in,u}$) を I_u の最大値と考え、**Fig. 1** の生理学的モデルにしたがって以下の式により阻害剤経口投与時の $I_{in,u}$ を推定した。

$$I_{in,u} = \left(I_{max} + \frac{ka \cdot D \cdot Fa}{Qh} \right) \times fu \quad (1)$$

ここで、 I_{max} は阻害剤の循環血中最大濃度、 ka は消化管からの吸収速度定数、 D は投与量、 Fa は吸収率、 Qh は肝血流量、 fu は血中非結合型分率をあらわす。また、文献情報より得た K_i 値との比較から、*in vivo* での薬物間相互作用の程度を見積もった結果、tolbutamide/sulfaphenazole (CYP2C9 における相互作用)、triazolam/ketoconazole (CYP3A4 における相互作用) 等の組み合わせについて、ヒト *in vivo* での相互作用の定量的予測が可能であったことを報告した^{1,2)}。

一方、実際には阻害剤濃度は時々刻々と変化するものであることから、tolbutamide/sulfaphenazole の相互作用を例にあげて、阻害剤濃度推移を考量した予測を試みた。**Fig. 1** のモデルに基づいて物質収支式を立て、文献情報より得られた両薬物の体内動態パラメータを代入して数値的に解くことにより、tolbutamide の血中濃度推移をシミュレーションした。その結果、**Fig. 2** に示すように、 I_u を上記の $I_{in,u}$ に固定して予測した場合と comparable な結果が得られ、sulfaphenazole 非投与群と比較して sulfaphenazole (500 mg) の併用により tolbutamide の AUC が 4 倍に増加することが予測され、*in vivo* の実測値³⁾ とよく一致した⁴⁾。実際の肝臓中非結合型濃度を過大評価している $I_{in,u}$ を用いても良い予測が得られた理由として、sulfaphenazole の臨床投与量においては CYP2C9 関与の代謝は完全に阻害されているものと考えられた。シミュレーションの結果、投与量を 100 分の 1 (5 mg) に下げても tolbutamide の血中濃度上昇が予測され、注意が必要であることが示唆された。

3. 各種阻害剤の I_u/K_i 値に基づく *In vivo* 薬物代謝阻害能の評価

薬物代謝の競合あるいは非競合阻害に基づく *in vivo* 薬物間相互作用を、阻害剤の I_u/K_i 値に基づいて予測する方法論の妥当性を検討する目的で、各種 CYP isozyme の阻害剤あるいは基質となることが知られている多くの薬物(以下、阻害剤と略す)について、文献情報を用いて I_u/K_i 値を算出し、*in vivo* の相互作用の報告値と比較した。 K_i 値はヒト肝ミクロソームあるいはヒト CYP 発現系を用いた *in vitro* 試験により算出されてい

るものを文献検索により調査し、 K_i 値の報告がない薬物については代わりに K_m 値を用いた。式(1)の I_{max} としては、各阻害剤の血中濃度推移の報告値から線形体内動態を仮定して、常用量投与時の循環血中最大濃度を推定した。 ka , Fa , Qh はそれぞれ 0.1 min^{-1} , 1, 1610 mL/min と仮定し、 D には各阻害剤の常用量、 fu には文献情報より得た値を代入することにより、式(1)を用いて各阻害剤の $I_{in,u}$ を算出した。一方、各阻害剤が関与するヒト *in vivo* での相互作用について、該当する CYP isozyme の基質となる薬物の AUC 上昇率(単独投与時の AUC に対する割合)を文献調査により得た。

Table I に示すように、調査した阻害剤の約半数において、算出された $I_{in,u}/K_i$ 値は 0.2 より小さく、そのう

Table I Relationship between $I_{in,u}/K_i$ ratio and the degree of *in vivo* interaction

$I_{in,u}/K_i$	<i>in vivo</i> AUC %						Total
	100	<120	<150	<200	<500	≥500	No data
<0.1	5		3	2	2		30
<0.2	1		1	2	1		11
<0.5	2			1	3		2
<1.0	1		2	4	2		6
<2.0		1			3		7
<3.0					1	1	2
<5.0			1		2	2	1
<10.0							0
≥10.0					4	3	2
Total	9	1	7	9	18	6	59

Table II Relationship between $I_{max,u}/K_i$ ratio and the degree of *in vivo* interaction
～Using systemic concentration～

$I_{max,u}/K_i$	<i>in vivo</i> AUC %						Total
	100	<120	<150	<200	<500	≥500	No data
<0.1	8	1	6	8	10	2	52
<0.2	1			1	1	1	4
<0.5					1		1
<1.0			1		2		2
<2.0					1		1
<3.0							0
<5.0					1		1
<10.0						1	1
≥10.0					2	2	4
Total	9	1	7	9	18	6	59

ち約8割の阻害剤について *in vivo* での相互作用は報告されていないか、あるいは「相互作用なし」と報告されていた。一方、算出された $I_{in,u}/K_i$ 値が2より大きい阻害剤は全体の16%であり、そのうち約8割の阻害剤について、2倍以上のAUC上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されていた。また、5倍以上のAUC上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されている阻害剤について算出された $I_{in,u}/K_i$ 値は、すべて2より大きかった。

一方、 I_u として $I_{in,u}$ ではなく、循環血中最大非結合型濃度 ($I_{max,u} = I_{max} \times fu$) を用いた場合について、同様の解析をした結果を Table II に示す。 $I_{max,u}/K_i$ 値は約9割の阻害剤で0.2より小さく、そのうち約3割では1.2倍以上のAUC上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されていた。また、5倍以上のAUC上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されている阻害剤のうち、算出された $I_{max,u}/K_i$ 値が0.2より小さいものが半数を占めた。

以上の結果より、薬物代謝阻害に起因する *in vivo* 薬物間相互作用は、阻害剤の $I_{in,u}/K_i$ 値に基づいてある程度定量的に予測することが可能であり、循環血中濃度のみを用いた場合には大きく過小評価される可能性があることが示唆された。

4. 薬物代謝の Mechanism-based Inhibition に基づく *In vivo* 薬物間相互作用の定量的予測

抗ウイルス薬 sorivudine とフルオロウラシル系抗癌剤の併用による致死的相互作用の発現機構には、5-fluorouracil (5-FU) の代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) と sorivudine から腸内細菌によって生成された (E)-5-(2-bromovinyl)uracil (BVU) の活性代謝物が共有結合体を形成し、DPD を不可逆的に阻害する、いわゆる mechanism-based inhibition が関与することが明らかにされている⁵⁾。このような場合には、*in vitro* 試験により *in vivo* の相互作用を予測する際、酵素との接触時間や酵素の turnover を考慮した解析を行うことが必要である。我々は mechanism-based inhibition が関与する例として、ヒトにおける 5-FU/sorivudine の *in vivo* 相互作用を *in vitro* 試験データから定量的に予測することを試みた⁶⁾。

ヒト肝サイトゾルおよびヒト recombinant DPD (rhDPD) を用いて、5-FU 代謝に対する BVU の阻害試験を行った結果、いずれの酵素を用いても、NADPH 存在下で BVU と酵素を preincubation した時間と BVU 濃度に依存した阻害の増強が認められた。残存酵素活性と preincubation 時間を片対数プロットし (Fig. 3), 阻害の初速度がみられている領域の傾きからみかけの酵素不活化速度定数 (k_{obs}) を求めた。 k_{obs} と BVU 濃度 (I_0) との関係を以下の式に当てはめ、非線形

Fig. 3 Inhibitory effects of BVU on 5-FU metabolism in (A) rhDPD or (B) human hepatic cytosol.

The 5-FU metabolising activity was measured using [^{14}C]5-FU as a substrate after preincubation of the rhDPD or cytosol with varying concentrations of BVU. BVU concentrations were ● 0, ◇ 0.03, ▲ 0.1, □ 0.3, ○ 1, ◆ 5, and △ 20 μM for panel (A); ● 0, ○ 1, ▲ 3, △ 10, ■ 50, and □ 200 μM for panel (B).

最小二乗法により阻害に関するパラメータ (k_{inact} と K'_{app}) を求めた。

$$k_{obs} = k_{inact} \cdot I_0 / (K'_{app} + I_0) \quad (2)$$

ここで、 k_{inact} は不活化最大速度定数、 K'_{app} は酵素と BVU のみかけの解離定数である。 k_{inact} および K'_{app} はヒト肝サイトゾルを用いた場合、 $2.39 \pm 0.13 \text{ min}^{-1}$ および $48.6 \pm 11.8 \mu M$, rhDPD を用いた場合、 $0.574 \pm 0.121 \text{ min}^{-1}$ および $2.20 \pm 0.57 \mu M$ と算出された。

一方、肝臓内の活性型 DPD (E_{act}) および不活性 DPD (E_{inact}) については、次のような微分方程式を書くことができる。

$$\begin{aligned} dE_{act}/dt = & -(k_{inact} \cdot E_{act} \cdot fb \cdot Iliver / K_p) / \\ & (K'_{app} + fb \cdot Iliver / K_p) \\ & + k_{deg} (E_0 - E_{act}) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} dE_{inact}/dt = & (k_{inact} \cdot E_{act} \cdot fb \cdot Iliver / K_p) / \\ & (K'_{app} + fb \cdot Iliver / K_p) \\ & - k_{deg} \cdot E_{inact} \end{aligned} \quad (4)$$

ここで、 k_{deg} は DPD の分解速度定数、 K_p は BVU の肝臓中/血中濃度比、 fb は BVU の血中非結合型分率、 $Iliver$ は肝臓中 BVU 濃度、 E_0 は DPD の総濃度をあらわす。

5-FU のプロドラッグである tegafur, 5-FU および BVU について、Fig. 4 の生理学的モデルに基づいて以下の微分方程式を立てた。

Tegafur について

$$\begin{aligned} V_{liver} \cdot (dPliver/dt) = & Q_h \cdot P_{pv} - Q_h \cdot Pliver / K_p \\ & - fb \cdot (CL_{int,1} + CL_{int,2}) \\ & \cdot Pliver / K_p \end{aligned} \quad (5)$$

Fig. 4 Physiological model for the description of the time-profiles of tegafur, 5-FU and BVU concentrations in humans. Oral administration of tegafur (a prodrug of 5-FU) was assumed.

Fig. 5 Simulation of sorivudine effects on the hepatic DPD content and blood concentration of 5-FU in humans. Time-courses of tegafur blood concentration (A), BVU blood concentration (B), active DPD content in the liver (C and E), and 5-FU blood concentration (D and F) were simulated according to eq. (3)–(17). (C) and (D) represent simulations based on parameters obtained using human hepatic cytosol. (E) and (F) represent simulations based on parameters obtained using rhDPD. Broken lines; control; solid lines; co-administration of sorivudine.

$$V_{pv} \cdot (dP_{pv}/dt) = Q_h \cdot P_{sys} + V_{abs} - Q_h \cdot P_{pv} \quad (6)$$

$$V_{abs} = k_a \cdot D \cdot F_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (7)$$

$$V_{sys} \cdot (dP_{sys}/dt) = Q_h \cdot P_{liver}/K_p - Q_h \cdot P_{sys} \quad (8)$$

5-FU について

$$V_{liver} \cdot (dC_{liver}/dt) = Q_h \cdot C_{pv} - Q_h \cdot C_{liver}/K_p - fb \cdot CL_{int} \cdot C_{liver}/K_p + fb, p \cdot CL_{int, 2} \cdot P_{liver}/K_p, \text{ tegafur} \quad (9)$$

ここで

$$CL_{int} = V_{max}/(K_m + fb \cdot C_{liver}/K_p) \quad (10)$$

$$V_{max} = V_{max}(0) \cdot E_{act}/E_0 \quad (11)$$

$$V_{pv} \cdot (dC_{pv}/dt) = Q_h \cdot C_{sys} - Q_h \cdot C_{pv} \quad (12)$$

$$V_{sys} \cdot (dC_{sys}/dt) = Q_h \cdot C_{liver}/K_p - Q_h \cdot C_{sys} - CL_r \cdot C_{sys} \quad (13)$$

BVU について

$$V_{liver} \cdot (dI_{liver}/dt) = Q_h \cdot I_{pv} - Q_h \cdot I_{liver}/K_p - fb \cdot CL_{int} \cdot I_{liver}/K_p \quad (14)$$

$$V_{pv} \cdot (dI_{pv}/dt) = Q_h \cdot I_{sys} + V_{abs} - Q_h \cdot I_{pv} \quad (15)$$

$$V_{abs} = k_a \cdot D \cdot F_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (16)$$

$$V_{sys} \cdot (dI_{sys}/dt) = Q_h \cdot I_{liver}/K_p - Q_h \cdot I_{sys} \quad (17)$$

ここで V_{liver} , V_{pv} は肝臓および門脈内容積, V_{sys} は分布容積, $Pliver$, $Cliver$ は肝臓中濃度, Ppv , Cpv , I_{pv} は門脈血中濃度, $Psys$, $Csys$, I_{sys} は循環血中濃度, CL_{int} は代謝固有クリアランス, $CL_{int,1}$ は 5-FU 生成以外の CL_{int} , $CL_{int,2}$ は 5-FU 生成の CL_{int} , CL_r は腎クリアランス, V_{abs} は吸収速度をあらわす。

これらの式に文献情報より得た各薬物の体内動態パラメータおよび *in vitro* 試験により得られた阻害パラメータ (k_{inact} と K'_{app}) を代入し、数値的に解くことにより、tegafur (2500 μ mol, b.i.d) を経口投与したときの sorivudine (50 mg, t.i.d) の併用効果についてシミュレーションした。Fig. 5 に示すように、sorivudine の投与に伴い肝臓中活性型 DPD は急激に減少し、そのほとんどが不活化されることが予測された。5-FU の血中濃度は sorivudine 非投与時と比較して大きく上昇し、AUC 予測上昇率は 5.3 倍(ヒト肝サイトゾル), 5.4 倍(rhDPD) となった。

同様の方法論にしたがって我々は、CYP3A4 代謝における triazolam/erythromycin の相互作用についても定量的な予測に成功している⁷⁾。相互作用に mechanism-based inhibition が関与する場合、阻害剤が血中、組織中から消失した後でも阻害効果が残存し、重篤な副作用につながることを考えられる。今後、医薬品を開発する段階でこういった *in vitro* 試験を実施し、*in vivo* の相互作用を予測することを是非提唱したい。

5. 薬物代謝阻害剤の肝臓への能動輸送の評価

これまで述べてきたように、*in vivo* での薬物間相互作用を定量的に予測するためには、 I_u の正確な値を評価することが重要なポイントとなるが、これをヒトにおいて測定することは難しい。そのため多くの場合、阻害剤は受動拡散によって肝細胞内へ移行し、定常状態において肝臓中と肝毛細血管中の非結合型濃度は等しいとの

仮定のもとで解析が行われてきた。しかし、阻害剤が肝臓内に能動輸送により濃縮的に取り込まれる場合には上記の仮定は成立せず、血中濃度を基準にして阻害の程度を予測すると過小評価することになる可能性がある。そこで、ラット遊離肝細胞を用いた *in vitro* 試験により阻害剤の肝細胞内への能動輸送性を評価し、肝細胞への濃縮を考慮することにより予測性の改善を試みた⁸⁾。

種々の CYP isozyme に対して強い阻害活性を示す cimetidine, quinidine, sulfaphenazole, erythromycin, ketoconazole, omeprazole を被験物質とした。これらの阻害剤を添加したラット遊離肝細胞懸濁液を経時的にサンプリングし、細胞中とメディウム中それぞれの薬物濃度から取り込み速度を算出した。肝細胞への薬物の influx には能動輸送と受動拡散の両方が関与し、肝細胞からの efflux は受動拡散のみによって起きると仮定すると、FCCP あるいは rotenone などの ATP 枯渇剤は薬物の能動輸送を阻害することから、ATP 枯渇剤が存在するときの取り込み初速度は受動拡散による取り込みを表わすと考えられる。そこで、ATP 枯渇剤の存在下と非存在下における取り込み初速度の比から、定常状態における細胞中とメディウム中の非結合型薬物の濃度比 (C/M ratio) を求めた(式(18))。

$$\begin{aligned} C/M \text{ ratio} &= (PS_{active} + PS_{passive}) / PS_{passive} \\ &= V_o / V_{passive} \end{aligned} \quad (18)$$

ここで、 PS_{active} と $PS_{passive}$ はそれぞれ能動輸送と受動拡散による薬物の細胞膜透過クリアランス、 V_o は生理的条件下における取り込み初速度、 $V_{passive}$ は受動拡散による取り込み初速度を表わす。算出された C/M ratio を上記の $I_{in,u}$ にかけることにより肝臓中非結合型濃度を推定し、文献情報に基づく薬物間相互作用の予測を再検討した。

Quinidine および erythromycin のラット遊離肝細胞への取り込みの経時変化を Fig. 6 に示す。ATP 枯渇剤存在下では取り込み初速度の低下が認められ、肝細胞内

Fig. 6 Time courses of the uptake of (A) $[^3H]$ quinidine and (B) $[^{14}C]$ erythromycin into isolated rat hepatocytes. ○: Control (in the absence of FCCP), △: in the presence of FCCP (2 μ M).

Table III Prediction of *in vivo* drug-drug interactions

Inhibitor (Affected drug)	fh·fm	C/M ratio	- Active Transport ^{a)}		+ Active Transport ^{b)}		Observed AUC ratio
			Iu/Ki	Predicted AUC ratio	Iu/Ki	Predicted AUC ratio	
Cimetidine (Theophylline)	0.52	×4.3	0.05	×1.0	0.2	×1.1	×1.5
Quinidine (Sparteine)	0.25	×2.2	60	×1.3	132	×1.3	×2.9
Erythromycin (Cyclosporine)	0.76	×1.4	0.6	×1.3	0.8	×1.5	×1.6
Sulfaphenazole (Tolbutamide)	0.80	×1.2	200	×5.0	240	×5.0	×5.3
Ketoconazole (Terfenadine)	0.58	×1.2	4	×1.3	5	×1.3	> ×5.0
Omeprazole (Diazepam)	0.99	×1.0	0.03	×1.0	0.03	×1.0	×2.0

a) The $I_{in,u}$ calculated based on the model in Fig. 1 was used as Iu.

b) The product of the $I_{in,u}$ and the C/M ratio was used as Iu.

への濃縮率は、式(18)からそれぞれ2.2倍および1.4倍と計算された。今回用いたいずれの薬物についても大きな能動輸送性(ラット遊離肝細胞への濃縮率)は認められず、文献情報に基づく *in vivo* における AUC 上昇の推定値に大きく影響を与えるほどではなかった(**Table III**)。しかし、ラットとヒトの細胞で種差があることも考えられるので、今後、ヒト肝細胞あるいは肝スライスを用いて同様の検討をすることにより予測精度の向上が可能となるであろう。

6. 新規薬物の代謝阻害の予測

以上の検討結果をふまえて、開発中の新規薬物の *in vivo* において併用されることの予想される他剤による代謝阻害の可能性を予測する手順について propose すると、以下ようになる。

1) *In vitro* において、目的とする新規薬物の代謝が P450 によるものか否かを SKF-525A や CO による阻害試験等により確認する。

2) 目的化合物の代謝が P450 によることが確認されたら、各種ヒト P450 発現系ミクロソームを用いた代謝試験や、各種 P450 isozyme に対する抗体あるいは特異的な阻害剤を用いた阻害試験等により、関与する P450 isozyme を同定する。

3) 目的化合物の代謝に関与する P450 分子種を阻害する可能性のある併用他剤の *in vivo* における体内動態情報を調べ、最大血中非結合型濃度を算出する。

4) 阻害剤の肝臓における能動的な取り込みをヒト肝細胞あるいはそれが不可能であればラット遊離肝細胞を用いて測定し、肝臓への濃縮度を算出する。そのような試験が無理な場合は、約5~10倍のマージンをとって Iu とする。

5) *In vitro* 代謝試験により目的化合物の代謝に対す

る阻害剤の Ki 値を求める。ここで、阻害の程度が酵素と阻害剤との preincubation 時間に依存する場合は mechanism-based inhibition の関与が考えられ、上記 4. の方法論を適用する必要がある。

6) 4) で得られた Iu と 5) で求めた Ki を比較して、Iu/Ki が 0.3~1 を越える場合には、*in vivo* において目的化合物の代謝が阻害される危険性ありと判断する。

今後、種々の情報を得ることによって、本方法論をより予測性の良いものに改良していくことが必要であろう。

7. 胆汁排泄過程における相互作用の予測： Methotrexate (MTX) と Probenecid を例に

近年、肝臓や腎臓において各種トランスポーターにより取り込みや排泄を受ける薬物が数多く見いだされつつある。取り込みや排泄過程における相互作用は、臨床報告例としては少ないものの今後無視できない状況となるであろう。したがって、薬物代謝ばかりでなく排泄過程における相互作用の受けやすさについても、*in vitro* 試験からの定量的な評価が望まれる。我々は排泄過程における相互作用の例として、抗癌剤 methotrexate (MTX) に対する probenecid (PBD) の相互作用⁹⁾ を例にとり、*in vivo* で観察される胆汁排泄過程における薬物間相互作用を *in vitro* 試験から定量的に予測する方法論の確立を目的として、*in vitro/in vivo* の定量的比較が可能なラットを用い検討を行った。

薬物の排泄においては血管側膜、管腔側膜の2つの生体膜を透過する必要がある(**Fig. 7**)。したがって相互作用もこれら2つを同時に考慮しなければならない。肝臓においては血管側膜における取り込み(固有クリア

Fig. 7 Strategy for *in vitro/in vivo* extrapolation of drug interaction *via* hepatic transporters.

Table IV Prediction of drug interaction at hepatobiliary transport of MTX

	P1		P3		CL _{bile, int}		I _{u, plasma} ^{a)} μM	I _{u, liver} ^{b)} μM
	(observed) ml/min/kg (%)	(predicted) %	(observed) ml/min/kg (%)	(predicted) %	(observed) %	(predicted) %		
Control	24.3 (100)	100	20.0 (100)	100	100	100	0	0
+ Probenecid (2.2 μmol/min/kg)	16.4 (67.6)	55.4	12.2 (61.0)	45.0	51.5	24.9	145	63.2
+ Probenecid (4.4 μmol/min/kg)	10.3 (49.7)	41.9	10.5 (52.3)	28.4	25.7	11.9	250	130

a) Unbound probenecid concentration in the plasma.

b) Unbound probenecid concentration in the liver.

ランス P_1 で定義), 細胞内から血液側への排出(固有クリアランス P_2), 細胞内から胆汁側への排泄(固有クリアランス P_3)の3つの素過程での相互作用が考えられる。これら素過程を分離して評価し, 最終的に net の胆汁排泄(血液から胆汁までの輸送, 固有クリアランス $CL_{int, bile}$ で表す)の相互作用を予測する。このうち, P_1 と P_3 については遊離肝細胞ならびに胆管側膜ベシクルを用いた評価が可能である。実際, MTX は両実験系で能動輸送が証明されている^{10,11)}。ラットにおける解析から PBD はそれぞれの系における MTX の輸送に対して濃度依存的な阻害を示し, K_i はそれぞれ約 180 μM, 約 50 μM であった。したがって本質的な阻害効果は取り込み側よりも排泄側のほうが強いことが示唆された。

次に相互作用の *in vivo* 実験系の確立を行った。PBD と MTX の同時定速静脈内投与によって MTX の血漿中濃度は単独投与の際と比べて上昇し, 胆汁, 尿中排泄はともに阻害された。定常状態において肝臓中非結合型 MTX 濃度の測定を行い MTX の P_3 を実測したところ, PBD による低下が認められた (Table IV)。さらに定常

状態下 tracer [³H]MTX を単回静注することにより積分プロット解析から MTX の P_1 を測定したところ, これも PBD によって低下していた (Table IV)。したがって PBD は *in vivo* においても MTX の取り込み, 排泄ともに阻害することが示された。

Fig. 7 に予測の基本ストラテジーを示した。代謝のケースと同様, 阻害剤(非結合型濃度 I_u)存在下における MTX の輸送クリアランス (P_1, P_2, P_3) はコントロールに対する比として,

$$R_{uptake} \text{ or } R_{excretion} = 1 / (1 + (I_u / K_i)) \quad (19)$$

で表される。ここで R_{uptake} , $R_{excretion}$ はそれぞれ P_1 および P_3 の阻害剤存在下の値を非存在下の値で除した値を示す。 K_i は遊離肝細胞 ($K_{i, uptake}$), 胆管側膜ベシクル ($K_{i, excretion}$) から測定可能である。 I_u は阻害剤である PBD の非結合型薬物濃度であり, 取り込み側では肝細胞外液中, 排泄側では肝細胞内における濃度 ($I_{u, liver}$) を意味する。肝細胞外液中の非結合型薬物濃度は, PBD のようなクリアランスの低い化合物を静注したケースでは血漿中のそれ ($I_{u, plasma}$) で代用が可能である。クリア

文 献

ランスの高い化合物や不明な化合物の場合でも、肝細胞外液中の非結合型薬物濃度は $I_{u, plasma}$ を越えることはない。したがって false negative な予測を避けるという観点からは $I_{u, plasma}$ を用いるべきと考えられる。阻害剤を経口投与したケースでは、上述の代謝の場合と同様、肝臓に流入する血液中の非結合型濃度を用いるべきである。本試験はラットを用いているため $I_{u, plasma}$, $I_{u, liver}$ とも実測している。ここで肝臓中非結合型分率は肝ホモジネートを用いた結合実験から求めた。式(19)により MTX の P_1 ならびに P_3 を予測したところ実測値と近い値が得られ (Table IV), 血管側および胆管側の膜透過過程を個々に予測する限りにおいては、*in vitro* 試験で求めた K_i から相互作用の予測が可能であることが実証された。

次に $CL_{int, bile}$ の予測を考える。現在のところ P_2 の予測に用いるべき有効な *in vitro* 試験系が存在しないことから、false negative を避ける予測を考えた。すなわち、最も障害がかかるケースは障害を受ける薬物が固有クリアランス律速であり、かつ、 $P_2 \gg P_3$ のケースである。この場合、取り込み側の R_{uptake} と排泄側の $R_{excretion}$ の積が $CL_{int, bile}$ のコントロールに対する比 (R_{net}) に相当する。したがって R_{net} は R_{uptake} と $R_{excretion}$ の積と等しいかまたはそれより大きくなる。

$$R_{net} \geq R_{uptake} \times R_{excretion} \quad (20)$$

式(20)に基づいた予測結果は相互作用をやや過大に評価していたものの、過小評価とはならなかった (Table IV)。過大評価の原因として MTX の胆汁排泄はコントロール条件下では肝取り込み律速であるため、排泄側の障害も考慮した式(20)が障害の程度を過大に評価する結果につながったためと考えられる。但しここで $R_{excretion}$ の予測には、阻害剤の肝臓中非結合型濃度を用いる必要がある。これはヒトでの測定がきわめて困難であることから、上述の代謝過程における予測のケースと同様、能動輸送による濃縮率を考慮したうえ、血漿中非結合型濃度に適切な risk factor を掛けた値を用いるべきと考えられる。また、今回の解析では最も simple なケースとして PBD の静注を行ったが、阻害剤を経口投与するケースにおいては、式(1)に基づく阻害剤の門脈中非結合型濃度を用いるべきと考える。これらについても今後、動物実験を行い、予測の妥当性を検証する必要がある。

- 1) Ito K., Iwatsubo T., Kanamitsu S., Nakajima Y., Sugiyama Y.: Quantitative prediction of *in vivo* drug clearance and drug interactions from *in vitro* data on metabolism together with binding and transport. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 461-499 (1998).
- 2) Ito K., Iwatsubo T., Kanamitsu S., Ueda K., Suzuki H., Sugiyama Y.: Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* **50**: 387-411 (1998).
- 3) Veronese M. E., Miners J. O., Randles D., Gregov D., Birkett D. J.: Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **47**: 403-411 (1990).
- 4) Kanamitsu S., Ito K., Sugiyama Y.: Quantitative prediction of *in vivo* drug-drug interactions from *in vitro* data based on physiological pharmacokinetics: Use of maximum unbound concentration of inhibitor at the inlet to the liver. *Pharm. Res.*, **17**: 336-343 (2000).
- 5) Okuda H., Nishiyama T., Ogura K., Nagayama S., Ikeda K., Yamaguchi S., Nakamura Y., Kawaguchi Y., Watabe T.: Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *Drug Metab. Dispos.* **25**: 270-273 (1997).
- 6) Kanamitsu S., Ito K., Okuda H., Ogura K., Watabe T., Muro K., Sugiyama Y.: Prediction of *in vivo* drug-drug interaction based on mechanism-based inhibition from *in vitro* data: Inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-bromovinyl)uracil. *Drug Metab. Dispos.*, **28**: 467-474 (2000).
- 7) Kanamitsu S., Ito K., Green C. E., Tyson C. A., Shimada N., Sugiyama Y.: Prediction of *in vivo* interaction between triazolam and erythromycin based on *in vitro* studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4. *Pharm. Res.*, (in press).
- 8) Kanamitsu S., Shinozaki Y., Ito K., Iwatsubo T., Suzuki H., Sugiyama Y.: Quantitative prediction of *in vivo* drug-drug interactions from *in vitro* data: Effects of active transport of inhibitors into the liver. *AATEX*, (in press).
- 9) Aherne G. W., Pfall E., Marks V., Mould G., White W. H.: Prolongation and enhancement of serum methotrexate concentrations by probenecid. *Brit Med J* **1**: 1097-1099 (1978).
- 10) Gewirtz D., Randolph J. K., Goldman I. D.: Potent bile salt and organic anion inhibition of methotrexate uptake and accumulation in the freshly isolated rat hepatocyte. *Cancer Res* **40**: 1852-1857 (1990).
- 11) Masuda M., Iizuka Y., Yamazaki M., Nishigaki R., Kato Y., Ni'inuma K., Suzuki H., Sugiyama Y.: Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.* **57**: 3506-3510 (1997).