12S3-06 創薬初期段階における in vivo ヒト肝クリアランスの予測○ 成富 洋一¹⁾, 寺下 茂之¹⁾, 木村 在久¹⁾, 加賀山 彰¹⁾, 杉山 雄一²⁾

1) 藤沢薬品・薬物動態研 2) 東大・薬・製剤設計

PREDICTION OF IN VIVO HUMAN HEPATIC CLEARANCE IN DRUG DISCOVERYYoichi NARITOMI¹⁾, Shigeyuki TERASHITA¹⁾, Sumihisa KIMURA¹⁾,Akira KAGAYAMA¹⁾ and Yuichi SUGIYAMA²⁾

1) Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Research Laboratories,

Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, 532-8514, 2) Graduate

School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, 113-0033

【目的】 創薬初期段階でヒトの体内動態を予測することは極めて重要である。肝クリアランスについては主にラットなどの実験動物において、肝ミクロゾーム、遊離肝細胞等を用いた in vitro 試験管レベルから in vivo 肝代謝クリアランスを定量的に予測する生理学的モデル、クリアランスコンセプトに基づく方法が確立されてきた。近年ヒトにおける肝試料の使用が可能となってきた現状を考えると、このような in vitro から in vivo を予測する方法はヒトにおいても極めて有用であろう。しかしながら、ヒトへの適用は限られており、予測が困難な場合も多い。そこで今回、P450 で代謝される化合物について、実験動物およびヒト肝ミクロゾームを用いた in vitro 代謝実験による in vivo 肝クリアランス予測法について検討した。さらに P450 のみならず抱合系酵素、エステラーゼで代謝される化合物について、ラット遊離肝細胞及びヒト凍結肝細胞を用いた in vitro 代謝実験による in vivo 肝クリアランス予測の有用性を評価した。

【方法】 肝ミクロゾームは実験動物（ラット、イヌ）、ヒトのプールしたものをを用いた。肝細胞については、ラット遊離肝細胞および In Vitro Technologies 社から入手したラットおよびヒト凍結肝細胞を用いた。肝ミクロゾームを用いた検討では P450 により代謝される 8

種類のモデル化合物を、肝細胞を用いた検討では P450、グルクロン酸転移酵素、硫酸転移酵素、エステラーゼで代謝される 9 種類のモデル化合物を用いた。In vitro 肝固有クリアランス ($CL_{int, in vitro}$) は $1 \mu M$ における未変化体の肝試料による代謝を一次消失によると仮定し、消失定数から算出した。In vivo 肝固有クリアランス ($CL_{int, in vivo}$) は in vivo データより数学モデル (well-stirred, parallel-tube, dispersion model) を用いて算出した。さらに各化合物について $CL_{int, in vitro}$ と $CL_{int, in vivo}$ を比較, scaling factor ($CL_{int, in vivo} / CL_{int, in vitro}$) を算出した。

【結果・考察】 肝ミクロゾームを用いた検討 : Scaling factor は各化合物間で異なるものの、同一化合物においては実験動物とヒト間ではほとんどが 2 倍以内とほぼ同じ値を示した (Fig.1)。そこで、

Predicted human $CL_{int, in vivo}$

= human $CL_{int, in vitro} \times$ animal scaling factor

により、ヒト $CL_{int, in vitro}$ を実験動物から求めた scaling factor で補正し、ヒト $CL_{int, in vivo}$ を予測したところ、補正しない場合よりも実測値との間に良好な相関が得られた。さらに動物の scaling factor で補正した $CL_{int, in vitro}$ による CL_{oral} , 肝抽出率 (E_H) の予測値も実測値と良く一致した。Scaling factor の要因として、in vitro における肝ミクロゾーム中蛋白結合が考

Fig. 1 Differences in scaling factor between animals and human calculated using liver microsomes. ○ ;well-stirred model, △ ; parallel-tube model, □ ;dispersion model. Closed symbols represent the fold differences of scaling factor between rat and human. Open symbols represent the fold differences of scaling factor between dog and human.

えられた。そこで、各化合物におけるヒト肝ミクロゾーム中蛋白結合率を平衡透析法により測定、free fraction による $CL_{int,in vitro}$ の補正を行った。しかし、ほとんどの化合物で $CL_{int,in vivo}$ と $CL_{int,in vitro}$ は一致せず、肝ミクロゾーム中蛋白結合以外の要因が考えられた。

肝細胞を用いた検討： ラットにおいて遊離肝細胞と凍結肝細胞の $CL_{int,in vitro}$ を比較したところ、良好な相関が認められ、遊離肝細胞と凍結肝細胞間で代謝活性は維持されていることが示唆された。Scaling factor は肝細胞を用いた場合においても各化合物間で異なった値を示し、また、いくつかの化合物では $CL_{int,in vivo}$

と $CL_{int,in vitro}$ 間に 10~200 倍の大きな乖離が認められた。ここでヒト $CL_{int,in vitro}$ をラット遊離肝細胞の $CL_{int,in vitro}$ より得られたラット scaling factor で補正し、ヒト $CL_{int,in vivo}$ を予測したところ、その予測値と実測値はほとんどが数倍の範囲内で一致し(Fig. 2), ヒト肝クリアランスの良好な予測性が示唆された。

今回の実験結果より、ヒト肝ミクロゾーム、凍結肝細胞による $CL_{int,in vitro}$ を実験動物から求めた scaling factor で補正する方法は in vitro 代謝実験によるヒト肝クリアランスの予測をより正確なものにし、創薬初期段階において非常に有用であると考えられた。

Fig. 2 Differences between human actual and predicted $CL_{int,in vivo}$ calculated using human cryopreserved hepatocytes. ○ ;well-stirred model, □ ;dispersion model. Open symbols represent the fold differences calculated using human $CL_{int,in vitro}$ not corrected with rat scaling factor. Closed symbols represent the fold differences calculated using human $CL_{int,in vitro}$ corrected with rat scaling factor.

【Abstract】 We have investigated a quantitative prediction of in vivo human hepatic clearance from in vitro experiments. In vivo intrinsic clearance ($CL_{int,in vivo}$) were compared with in vitro intrinsic clearance ($CL_{int,in vitro}$) from in vitro metabolism data obtained by using liver microsomes focusing on P450 metabolism in rats, dogs and humans. The scaling factor ($CL_{int,in vivo}/CL_{int,in vitro}$) were different among the model compounds, while most of the animal scaling factors were within 2-fold of the values in humans. When human $CL_{int,in vitro}$ values were compared with the actual $CL_{int,in vivo}$, correlations were not necessarily good. By contrast, using human $CL_{int,in vitro}$ corrected with the animal scaling factor yielded better predictions of $CL_{int,in vivo}$ that were mostly within 2-fold of actual values. Further, $CL_{int,in vivo}$ were compared with $CL_{int,in vitro}$ from in vitro metabolism data obtained by using rat fresh and human cryopreserved hepatocytes. Human $CL_{int,in vitro}$ corrected with the rat scaling factor yielded good predictions of $CL_{int,in vivo}$ that were mostly less than several-fold of actual values. This method thus provides a more reliable prediction of human hepatic clearance and will be useful in drug discovery.