創薬
シリーズ(4)

化合物を医薬品にするために必要な薬物動態試験 (その 1) 吸収③

創薬段階での In vivo 吸収性評価

中井 康博

要約：薬物の吸収には複数の機構があるため、創薬段階においてもそれらを含む高次評価としてモデル動物を用いた in vivo 評価を実施することが望ましい。しかし、in vivo の評価系では代謝なども寄与する生物学的利用率 (Bioavailability : BA) と吸収率を切り分けることは煩雑な手技が必要となる。適切な仮定をおくことによって、限られた情報の中から BA と吸収率を算出すること、適切なモデル動物の選択をすることによりヒトにおける吸収性を予測することが創薬段階における吸収性の評価には重要である。また、吸収性の評価において、溶解性と投与量の関係を考慮することは不可欠である。本稿では物性の評価、in vitro での吸収性評価を終えた段階で in vivo の吸収性評価を実施する際に筆者がどのような手法を用いているかを述べる。

1. はじめに

医薬品の投与法には大きく分けて脈管内に直接投与する方法と吸収過程を伴う方法がある。吸収過程を伴い生体内に投与される場合は消化管における吸収を伴う経口、皮膚における吸収を伴う経皮、口腔粘膜における吸収を伴う舌下などいくつかの投与経路があるが、最も多い想定臨床経路は経口投与と考えられるため、経口投与の場合を説明する。経口投与後の薬物は溶解後、消化管壁を経細胞、細胞間隙の経路を通る受動輸送や輸送担体を利用した能動輸送などの機構にて透過し血中へと吸収される。吸収性スクリーニングとして常用される in vitro 評価系は処理能力が大きく簡便であるが、溶解した状態での評価であり、受動輸送と能動輸送、受動輸送中の経細胞、細胞間隙経路などの吸収機構のバランスが生体と同一では無いなどの短所も存在する。モデル動物を用いた in vivo での吸収性評

価は開発候補化合物が絞られた開発研究の段階では汎用されているが、スクリーニングとして創薬段階に適用するには処理能力などで難しい点がある。ここでは、in vivo での吸収性の評価に関する方法などを簡単に説明した後、ある程度の仮定を置いて、モデル動物での Pharmacokinetics (PK) データから吸収性の評価を行う方法に関し説明する。

2. In vivo 吸収評価法の概略

In vivo モデル全般にあてはまる長所は、ヒトを含めた動物の消化管は形態学的にほぼ同じで、細胞膜を形成する脂質成分もほぼ等しいことである。すなわち、ヒトでの吸収を精度良く予測できることが期待できる点である。

In vivo モデルでの吸収性を評価するには大きく分けて2つの方法が存在する。経口投与後の血中濃度を測定し、未変化体の暴露を評価する方法と、消化管内の薬物濃度または量を測定し、消化管内から消失した薬物量を吸収量として評価する方法である。

前者は比較的手軽に行える評価法であるが、吸収と代謝を経た循環血中の濃度を測定するため、種によって大きな差が存在する代謝も含めた評価にならざるを得ないという短所を含んでいる。放射性同位元素 (Radio Isotope : RI) にて標識した薬物を用いれば未変化体および代謝物の総量を測定できるためこの短所を補完して吸収の評価が簡単にできる。また、未変化体を測定する場合でも、開発研究の段階では代謝安定性の問題は改善されている薬物が多いため、薬理効果の検証、安全性評価の確認、製剤設計など、薬物を固定して、投与量や製剤成分などを変更する事が目的の場合に汎用されている。これは相対的な利用率の改善を目的とするからである。また、溶解していない状態すな

キーワード：in vivo 評価、生物学的利用率、吸収率

大正製薬(株) 安全性・動態研究所 薬物動態研究室 (〒331-9530 さいたま市北区吉野町 1-403)

E-mail: yasuhiko.nakai@po.rd.taisho.co.jp 原稿受領日：2009年2月9日、依頼原稿

Title: In vivo evaluation of drug absorption in the discovery stage. Author: Yasuhiko Nakai

図1 灌流法によるラットとヒト膜透過係数の比較
(2000年薬物動態学会発表ポスターを改変)

わち臨床における状況と同様な形態にて評価することが可能な事、イヌなどの大動物を用いれば、ヒトと全く同じ剤型を投与することが出来る事は大きな利点である。

後者は消化管からの薬物の減少を測定するため吸収を評価している。正しくは *in vivo* と呼ぶよりは *in situ* と呼ぶべきモデルである。血管系、神経系の制御が保持されているが、麻酔下での評価となるため、蠕動運動などが抑制される場合もあり、全くの正常な状態では無い。また、溶解している状態での評価法である。

両端を縛った消化管のループを腹腔内に作成し、ループ中に薬液を注入した後、一定時間後の薬剤の減少を評価するループ法は、手技が比較的簡便なため吸収部位の特定などの目的でよく行われている。しかし、減少を評価すること、評価前後に液量が変わることなどから正確な回収率が必要であり、RIにて標識した薬物を用いる事が通常行われている。消化管の灌流法は一定の長さの消化管両端に灌流装置を設置し、消化管移動速度にあわせた流速にて溶解した薬物を灌流し、消化管入り口と出口の薬物濃度差を測定して減少分を吸収量として評価する方法である(図1)。この方法も液量の変化があるが灌流液は回収可能であり、重量測定などで簡単に補正が可能である。しかし、手技に習熟が必要かつ煩雑である事が大きな欠点となっている。この方法は装置を工夫することによってヒトでも手術をせずに適用可能であり、吸収に関してヒトと動物の比較も可能である(1)。

3. 溶解性と吸収性

吸収を評価する際には前述のように消化管壁の透過の前に薬物の溶解という過程が存在する。臨床での使用形態である固形製剤や投与薬液が懸濁状態の場合は当然であるが、投与薬液が溶解している場合でも、薬液が投与された後、消化管内では上部の低 pH にさらされた後、胆汁酸が加わり、pH が上昇していくといった環境にさらされるため、投与量および薬物の物性によっては固体を経て溶解過程を経る可能性がある。消化管壁の透過はごく少ない例を除いては溶解していることが必要であるため、対象薬物が *in vivo* の評価をする際に消化管内の吸収部位において溶解しているか否かは大変重要である。吸収性は投与量、透過速度および溶解性の関係でなりたち、定性的には投与量は低い方、透過速度は早い方、溶解性は高い方が有利である。

前号の「創薬初期での物性評価」および今号の「創薬から開発までを見通した BCS 戦略」でも紹介があるように、Amidon らが提唱する、吸収量を定量的に推測する理論がある。すでに紹介済みであるため、詳細はここでは述べないが、市販のソフトウェア GastroPlusTM を用いれば対象の薬物がその理論にて説明できるかどうか簡単に評価できる。

4. ヒト吸収性の予測に適した動物種

吸収性の評価は当然、ヒトの吸収性を反映する物でなければならないが、動物種によって吸収性は異なるのであろうか？

さまざまな医薬品を用いてラット(64種)、イヌ(43種)、サル(43種)の吸収率をヒトの吸収率と比較した例がある(2-4)。

その結果を概略するとラット、サルの吸収率はヒトとほとんど変わらず、 r^2 が 0.971, 0.974 と良く線形相関し、イヌではヒトよりも高めの吸収を示し、 r^2 が 0.5123 と相関が悪い。サルに関しては 35 種類の医薬品を用いて BA の比較も行っているが、 r^2 が 0.502 と相関が悪い。これらは筆者の実感とも合致する。

すなわち、吸収性の評価にはラット、サルが適していると考えられる。

そこで、簡易的ではあるが、筆者らが日常的に行っている RI にて標識していない薬物の動物による PK 試験から吸収率を評価する方法を紹介したい。

5. 生物学的利用率と吸収性

生物学的利用率 BA は経口投与後の暴露と静脈内投

与後の暴露の比から算出されるが、吸収率 Fa と肝利用率 Fh の積となる。正確には、消化管利用率 Fg も加え、肝利用率との積 $Fa \cdot Fg \cdot Fh$ が BA であるとするのが正しいが、ここでは消化管利用率は特に考慮に入れずに考えるようにする。その理由は実験動物とヒトで消化管利用率に違いがあり、ヒトでの消化管利用率予測を簡単な検討で実施することは困難である事、初期評価にて代謝安定性、膜透過が担保されている場合ヒトでの消化管利用率が良好であることが予想されるからである。

肝利用率は肝臓での代謝に大きく依存しており、代謝速度が速い場合小さくなる。肝臓での代謝は肝クリアランスで表され、たとえばラットにおいて肝クリアランスが 35 mL/min/kg であれば肝利用率は 0.5 すなわち半分しか肝臓を通過できなくなる、この時吸収率が 100% でも BA は 50% となる。すなわち、吸収率が良好でも肝利用率が小さい場合、BA は小さくなってしまう。逆に考えればたとえ BA が悪くとも、吸収率は良い場合がある事を示している。

肝クリアランス CLh と肝利用率 Fh の関係は

$$Fh = 1 - \frac{CLh}{Qh}$$

となる、ここで Qh は肝血流量である。

肝血流量は動物種によって一定の値であるため、肝クリアランスが小さければ肝利用率は大きくなる。肝クリアランスが肝血流量と同じ値になれば肝利用率は理論上 0 となり、どれだけ吸収率が大きくとも BA は 0 となる。

表 1 動物種と肝血流量

動物種	肝血流量 mL/min/kg
ラット	70
イヌ	40
サル	44
ヒト	20

(2007 年国際薬物動態学会発表ポスターを改変)

表 2 化合物 A の PK パラメータ

動物種	投与量 (mg/kg)	投与経路	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC (ng.h/mL)	クリアランス (mL/min/kg)	Vd (L/kg)	T _{1/2} (h)	BA (%)
Rat	2.0 (n=1)	i.v.	—	—	654	51	2.7	1.8	—
Rat	2.0 (n=2)	p.o.	97	0.8	194	—	—	1.8	30
Dog	0.1 (n=2)	i.v.	—	—	138	12	1.5	1.4	—
Dog	0.1 (n=2)	p.o.	23	0.3	73	—	—	1.4	53

Cmax：最大血漿中濃度，Tmax：最大血漿中濃度到達時間，AUC：血漿中濃度曲線下面積，Vd：分布容積，T_{1/2}：消失半減期，BA：生物学的利用率

従って BA から吸収率を算出するには肝クリアランスの値とその動物種における肝血流量が必要になる。

表 1 は筆者が常用している肝血流量である、動物種による肝血流量は測定法によって異なり、研究者によって微妙に違う値を報告しているので、読者の方々は適切な値を選択して頂きたいと考える。

6. 実際の例

表 2 に示すのは、筆者が以前にスクリーニング PK 試験を実施したときのデータである。この化合物 A は脂溶性が高く、ミクロソームの安定性がヒト、ラット、イヌにおいて安定であり、Caco2 細胞を用いた in vitro の吸収性評価も極めて良好であったため高次評価へと進んだものである。

In vivo の PK 試験の結果からは BA が期待したほどでは無いため、吸収に問題があるのか、代謝に問題があるのかが議論になった化合物である。静脈内投与後 24 時間までの尿を集めて、尿中の化合物排泄率を算出したが、両動物種ともに 1% 以下であった。

このデータからそれぞれの動物の吸収性を評価してみる。

吸収率は必ず BA の値よりは高くなるため、両動物種において 30% 以上である。上に示した式から、肝利用率を計算すると、ラットでは $1 - (51/70)$ で 27%、イヌでは $1 - (12/40)$ で 70% となる。BA は吸収率と肝利用率の積であるため、BA の 30% を肝利用率で割ると 111% という吸収率となる、100% を超えてしまう例はこの方法ではある程度の頻度で発生するが、そのような場合筆者は 100% と評価している。同様にイヌでは 75% という吸収率となる。

これらの結果から、ラットにおいてはほぼ完全に吸収され、イヌにおいても吸収率は良好であるが、ミクロソームでは進行しない代謝反応が化合物 A では進行しているであろうと結論付け、実際に凍結肝細胞を用いた代謝安定性試験では安定性が不良であったため、さらなる創薬合成を進めることとなった。

上記評価法によって PK データから吸収性を評価す

る際に留意しなければならないのは、この方法は

1. 全身クリアランスが肝クリアランスである
2. 血漿中濃度と血液中濃度が同じである

と仮定している点にある。

1つ目の仮定はクリアランスという PK パラメータは肝クリアランス以外の臓器クリアランス、例えば腎などから薬物が排除される腎クリアランスなども含んでいるためである。すなわち、肝以外で薬物が排除される場合は吸収性を高く評価してしまう。静脈内投与をした際に尿中排泄率を観察するなどといった実際のデータを収集する事が最も良い対応策であるが、簡便に物性を調べておき、脂溶性が高い事を確認しておくのも現実的な方法である。LogP などの脂溶性パラメータが 1 未満の化合物は尿中に排泄されやすいので配慮が必要になる。脂溶性の高い薬物は尿には排泄されにくいいため、クリアランスがほぼ肝クリアランスであるという仮定は比較的成り立ちやすい。

2つ目の仮定は肝血流量が血液の流量を意味しているためである、多くの PK 試験は血液ではなく、血漿の濃度を測定している。この場合、薬物が血漿と血球成分に均等に分配していれば仮定は成り立つが、血球に多く存在する場合、クリアランス値は大きくなり、吸収を高めめに推定してしまう。逆に、ほとんど血球に存在しない場合、クリアランス値は小さくなり、吸収

を低く推定してしまう。薬物の血液分配率を評価すれば真の PK パラメータを得ることが可能である。

化合物 B は現在開発段階に進んでいる薬物であり、臨床評価のステージに進んだ自社内の開発候補品のバックアップである。創薬段階の後期に得たデータにて簡易的にイヌ、ラットの吸収率を算出したところ、両動物ともに 100% であった。そこで、物性値と静脈内投与後の PK パラメータなどを GastroPlus™ に入力し、Amidon らの理論にてよく説明できるかを評価した。図 2 はイヌにおける化合物 B の経口投与後の血漿中濃度実測値とシミュレーション曲線でありよく一致している。理論的に説明可能と評価し、ヒトでは 13 mg までの投与においては BCS Class 1 であると評価し、GastroPlus™ のヒト予測計算結果から 300 mg 程度までは吸収が飽和しないと予測し、開発段階へと進んだ。

7. おわりに

薬物の吸収はその機構自体が複数ある。in vivo にて評価をする際に溶解、吸収と代謝が複合されたデータを使用する事が多いため解釈にも注意が必要である。創薬段階の初期には in vitro の評価では良好なのに in vivo では薬物の血中濃度が上がらない、原因がどこにあるのか、どのような方針で創薬活動を進めていけばよいのか途方にふれてしまうことにしばしば直面する。初期の物性評価、in vitro 吸収性評価、in vivo 吸収性の評価結果を総合的に吟味し、問題点がどこに存在するかを判断すること、ならびに問題点の優先順位を決定することが重要である。問題点の切り分け、優先順位の決定に、筆者が用いている基準を紹介した。この基準は各研究者によって異なって当然と考えるが、基本的な考え方は同様なのではないかと考える。読者の今後の創薬活動の一助になれば幸いである。

文 献

- 1) Lennernäs H, et al. Pharm Res. 1992;9:1243-1251.
- 2) Chiou WL, et al. Pharm Res. 1998;15:1792-1795.
- 3) Chiou WL, et al. Pharm Res. 2000;17:135-140.
- 4) Chiou WL, et al. Pharm Res. 2002;19:868-874.

図2 化合物 B のイヌにおける血漿中濃度シミュレーション