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5）その他②

In vitro 試験からのヒト体内動態予測

中川 俊人

要約：ヒトにおける薬物動態予測は医薬品開発にとって非常に重要である。種々の予測法がある中、in vitro 試験からの予測法は、動物種差を考慮せず、理論に基づく予測が可能であるため、様々な手法について、近年盛んに研究・報告されている。特に肝ミクロゾームや肝細胞などをもちいた代謝クリアランスの予測や薬物間相互作用の予測は、近年の低分子医薬品開発にとって非常に影響が大きい。それらを中心に、種々の in vitro 試験からのヒト体内動態予測法について概説する。

はじめに

医薬品開発の前臨床試験の最大の目的はヒト予測である。薬物動態研究におけるヒト予測で特徴的なのは、定量的に予測することである。In vitro 試験および実験動物を用いた in vivo 試験の結果を基に、単に生体のレスポンスを定性的に予測するのではなく、定量的に速度論パラメータを予測することにより、開発候補化合物の選択や臨床試験計画に活用する。

本シリーズにおいて、吸収、分布、代謝、排泄の各項について、その概要および一部詳細について述べられてきた。薬物動態研究におけるヒト予測は、それらで述べられた種々の試験結果を基に実施される。In vivo 試験からの予測と in vitro 試験からの予測に大きく分けられ、前者は経験的な予測であるのに対して、後者はメカニズムを考慮した予測である。実験動物とヒトとの間には代謝や排泄などに種差があり、動物実験の結果から単純にヒトの薬物動態を予測することはできない。In vitro 試験からのヒト予測では、主としてヒト由来の材料を用いる。1990年代から、日本においてもヒト肝臓由来の試料が供給されるようになったことから、近年ではほとんどの製薬企業においてヒト由来材料を用いた in vitro 試験からのヒト予測が試みられている。本稿では、in vitro 試験からのヒト体内動態予測について、最近の情報を交えながら概説する。

1. 消化管吸収の予測

経口剤として医薬品を開発する場合には、まず化合物が消化管を通じて循環血中に入る必要があるため、消化管吸収性の予測は重要な検討項目となる。消化管吸収性に関しては、人工膜（PAMPA）や Caco-2 などの cell line を用いた in vitro 膜透過試験から予測される(1, 2)。In vitro 試験で得られた膜透過係数と消化管吸収率の間には相関があるので、適当な関数を使って両者の関係を記述することにより定量的な予測が可能となる。PAMPA では受動拡散のみが評価できるのに対し、cell line を用いた試験ではトランスポーターの影響も見ることができる。膜透過性に加えて、化合物の溶解度や粒子系なども製剤の経口吸収性に影響を与える。このように、消化管吸収は単純な膜透過ではなく種々の過程が含まれるため、一般に PAMPA や Caco-2 を用いた in vitro 試験の結果のみから臨床を予測するのではなく、実験動物での in vivo 実験で確認しながら評価される。In vivo 試験では化合物の吸収と消化管での代謝を合わせた結果が出てくる。代謝クリアランスについては後述するが、それを考慮に入れた上で消化管吸収を評価する必要がある。ここで述べたパラメータを用いてヒトにおける吸収性を予測するソフトウェアも市販されている。

2. 代謝クリアランスの予測

特に近年開発される医薬品は分子量が大きく疎水性が高い化合物が多く、主として肝臓における代謝によって体内から消失するものがほとんどであるため、多くの製薬企業にとって、代謝クリアランスの予測は最も重要で関心の高い事項である。代謝クリアランスの予測系には、一般に、市販の肝ミクロゾーム、S9 といった細胞下画分、肝細胞、あるいは薬物代謝酵素発現系ミクロゾームを用いた in vitro 試験が使用されている。これらのマトリクスと被験化合物を任意時間インキュベートし、経時的に消失する親化合物あるいは生

キーワード：ヒト予測, in vitro 試験, クリアランス

中外製薬株式会社 前臨床研究部 (〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1-135)

E-mail: nakagawatst@chugai-pharm.co.jp 原稿受領日：2009年11月16日、依頼原稿

Title: Prediction of the pharmacokinetics of clinical candidates in humans from in vitro data. Author: Toshito Nakagawa

成する代謝物を定量することにより、被験化合物の肝固有クリアランスを算出し、血中非結合型分率および肝血流量より肝クリアランス (=代謝クリアランス) を求める。肝固有クリアランスと血中非結合型分率は実験値、肝血流量はほとんどの場合文献値を用いる。一般に、医薬品開発の創薬段階において、ルーチン試験として実施される代謝安定性試験から多くの新規化合物の固有代謝クリアランスが算出される。血中非結合型分率は、化合物の血清非結合型分率を血液/血漿中濃度比で除した値であり、血清タンパク質結合率が極めて高い場合には、正確な値を求めることは技術的に難しい。また、肝固有クリアランスについて、ミクロゾームタンパク質への非特異的結合率を測定して補正する必要性についても議論されている。このように、代謝クリアランス算出のための in vitro 試験において労力がかかりかつ誤差を生じやすい原因の一つはタンパク質結合率測定である。これら全てのタンパク質結合率を直接測定することなく、代謝クリアランスを予測する方法として、血清中に懸濁した肝細胞を用いる serum incubation 法(3)や、緩衝液中に懸濁する肝ミクロゾームタンパク質濃度と添加する血清濃度を変化させたときの化合物の代謝安定性から間接的にタンパク質結合率を算出する matrix inhibition 法(4)などが提唱されている。これらの利用は、試験系に血清共存下でも代謝が速い化合物に限られるが、タンパク質結合率が非常に高いためその算出に誤差が生じやすい化合物などには特に有用かもしれない。

細胞下画分・薬物代謝酵素発現系と肝細胞の違いは、前者がその画分に含まれる代謝酵素・遺伝子導入した代謝酵素のみの反応を見るのに対し、肝細胞では実質細胞に存在する全ての代謝酵素による反応を、補酵素の添加無しに見ることができることである。また、肝細胞で代謝されるには細胞膜を通過する必要があるため、肝細胞を用いた試験系では膜透過過程やトランスポーターの関与を含んだ形での評価になる点でも異なる(5)。日本国内での供給事情により、国内の多くの製薬企業はヒト凍結肝細胞を浮遊細胞として試験に用いることになる。凍結肝細胞は、新鮮細胞に比べ、任意のスケジュールで試験可能であること、同じドナーからの細胞を複数日にわたって使用できることなどの利点がある。凍結肝細胞を用いた場合においても、新鮮肝細胞と同様の予測性があることが報告されている(6)。

このように求められた in vitro 試験からの予測値は、in vivo のクリアランスを過小評価するケースが多くある。これを補正するためにスケールアップファクターの使用も提唱されている。Ito らの報告では、種々の補正法のうち、経験的に求めたスケールアップファクターを用いた場合と、被験化合物のラット in vitro 試験から得られた予測値と in vivo 試験の値の乖離をスケールアップファクターとしてヒト in vitro 試験からの予測に

用いた場合に、他法に比べて正確性が良好であったとされている(7)。

In vitro 試験に用いる肝ミクロゾームや肝細胞には、代謝活性の著しいロット間差があり、これにも注意する必要がある。ヒト由来材料では実験動物と異なり、いつでも実験に最適な条件で試料が採取されてくるわけではないので、ロット間差は個体間差の他に、採取された試料の状態にも大きく影響を受けていると考えられる。ロット間差の影響を防ぐため、複数ドナーのプール試料を用いることが多い。個体毎の試料を用いる場合でも、通常は複数ドナーからの試料を用いて検討する。

開発候補品が経口剤である場合には、小腸における代謝クリアランスも考慮に入れる必要がある。小腸ミクロゾームを用いる方法も報告されているが、代謝酵素が小腸で多く発現している CYP3A4 である場合には、肝ミクロゾームでのクリアランスから半定量的に予測する方法(8)は追加実験を必要としない簡便な方法であり、創薬初期段階では特に有用であろう。

3. 胆汁排泄の予測

肝臓で代謝を受けずに未変化体のまま胆汁に排泄される化合物もある。そのような化合物の胆汁排泄クリアランスを予測することは従来困難であったが、最近、肝細胞をコラーゲンサンドイッチ培養すると、数日後に胆管構造を形成して細胞極性が生じることが報告され、この系を用いた胆汁排泄クリアランスの予測が試みられている(9)。この予測法の鍵は、培養細胞におけるトランスポーターの発現プロフィールがどれだけ in vivo に近いかであろう。培養日数の変化に伴う幾つかのトランスポーターの発現量の変化について報告されているが、まだまだ情報は少ない(10)。In vivo 予測の報告例もまだ少なく、本稿で他に挙げた予測に比べて一般的に利用されている手法ではないが、トランスポーターが関与する胆汁排泄を定量的に予測できる可能性がある試験系であり、今後の研究の進展が注目される。

4. 薬物間相互作用 (Drug-Drug Interaction, DDI) の予測

これまでの項は被験化合物単独で投与時の体内動態の予測であったが、臨床においては他剤と併用されるケースが圧倒的に多い。その場合、被験化合物が併用薬の体内動態に影響を与えたり、また逆に併用薬による影響で被験化合物の体内動態が変化したり、ときに予期せぬ副作用や作用減弱が見られることがある。製薬企業は、そのようなマネジメント不可能な現象を避けるように医薬品開発研究を進めなければならない。テルフェナジンとケトコナゾール、フルオロウラシル系抗がん薬とソリブジンの事例など、薬物代謝に基づく DDI は近年大変注目され、多くの研究事例が報告さ

れてきた。薬物代謝酵素には著しい動物種差があるため、実験動物での *in vivo* DDI 試験結果をヒトにおける DDI の定量的な予測に用いるには問題があり、専ら *in vitro* 試験の予測結果よりそのリスクが判断される。

薬物代謝酵素に対する阻害の DDI 試験では、肝ミクロゾームあるいは薬物代謝酵素発現系ミクロゾームと特異的基質の反応に対する被験化合物の阻害作用を調べる。被験化合物が競合阻害を示す場合、被験化合物の阻害定数 (K_i) と臨床における血中濃度との関係に基づきリスクが判断される。すなわち、血中濃度が K_i よりも高ければ高いほど阻害作用が大きく、併用薬の AUC を増大させる程度が大きくなることになる。ここで、血中濃度としてどのような値を用いるかが議論になるが、最大のリスクを評価するために、肝臓入り口での最大濃度が用いられている。

代謝産物が酵素自身と共有結合するなどして酵素を不可逆的に阻害する Mechanism-based inhibition (MBI) は、阻害薬の血中薬物濃度が低くなった状態でも、活性型酵素量は新たな酵素が合成されてくるまで少ない状態にあるので、競合阻害のように血中濃度のみでリスク評価すると阻害の程度を過小評価することになる。MBI の評価には阻害薬と酵素両者の時間的な因子を考慮に入れる必要がある。MBI を起こす化合物では、*in vitro* 試験において酵素とプレインキュベーションすることにより、プレインキュベーションしない場合よりも阻害の程度が強まる。この試験系から見かけの阻害定数 ($K_{i,app}$) と最大不活性化定数 (k_{inact}) を求めリスク評価する。

上述の薬物代謝酵素阻害に比べると事例がはるかに少ないが、薬物代謝酵素の誘導による DDI にも注意を払う必要がある。代謝酵素誘導は、Pregnane X receptor (PXR) などの代謝酵素の発現を制御する核内受容体と化合物が結合することに起因する。代謝酵素誘導も阻害と同様、著しい動物種差があるために実験動物での *in vivo* 試験結果をヒトにおける DDI の予測に用いるには問題がある。代謝酵素誘導の評価系として、初代培養肝細胞や HepaRG などの cell line を用いた培養系、PXR などの核内受容体に対する reporter gene assay などがあり、これまで定性的な評価に用いられてきた。近年、最大効果モデル (11) やベースラインに対して 2 倍の誘導を引き起こす濃度 (12) で補正する方法、*in vitro* 試験で誘導が確認できる被験化合物と陽性対照化合物の最低濃度の比で予想臨床血中濃度を補正する方法 (13) などの定量的な予測法も提唱されている。この定量的な予測は、規制当局から必ずしも要求されている段階ではないが、製薬企業にとっては定量的な予測値から開発可否の判断をすることは非常に重要なことである。

おわりに

ヒトにおける体内動態の定量的な予測は、製薬企業

の医薬品開発研究において、開発候補品の開発可否判断に係る非常に重要で最も関心の高い項目の一つである。しかし、*in vitro* 試験からの予測の正確性は、臨床試験における平均値の 2 倍の範囲内に入る確率が何割かといった程度で、実験動物での *in vivo* 試験から予測する場合と大差なく、化合物によってどの予測手法が最も正確なのかといった場合分けも明らかでない。種々の方法で試験することにより幾つかの異なる予測値が出てくることが起こりうる。多くの場合には *in vitro* 試験からの理論に基づく予測と、*in vivo* 試験からの経験に基づく予測が併用されているのが実情ではないだろうか。いずれの方法にせよ、その予測の正確性は、医薬品開発研究を進める上で十分に満足のいくレベルに至っていない。また、代謝クリアランスや DDI 予測の事例の多くは主として CYP による第 I 相反応であり、抱合など第 II 相反応の予測は難しい。化合物の代謝安定性が創薬初期から評価されるようになったこともあり、バイオアベイラビリティの低さが原因で開発中止となるケースは近年減少したが (14)、*in vitro* 試験系において代謝的に非常に安定である化合物を選択したときには、従来の *in vitro* 試験では数時間程度までの短時間での評価が限界であるから、正確な代謝クリアランス算出等が難しい場合もあるだろう (15)。さらに、トランスポーターの関与やその DDI など近年のヒト予測における注目度の高い項目である。これらの課題を解決できる試験系の確立が望まれる。

科学が進歩して様々な現象が分子レベルで明らかにされていくにしたがって、ヒト予測において考慮していかなければならないことも増えて続けている。In vitro 試験はひとつひとつの現象をメカニズムに従って解析する方法であるが故、実験動物での *in vivo* 試験からの予測に比べて理論的に考えることができ、様々な変動要因に対応可能であり、条件の最適化によっては将来的に予測正確性が改善できる可能性がある。今後の研究の進展により、医薬品開発研究に効果的に利用され、画期的医薬品創製に貢献することを期待する。

文 献

- 1) Avdeef A, et al. J Pharm Sci. 2007;96:2893-2909.
- 2) Cheng KC, et al. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008;4:581-590.
- 3) Shibata Y, et al. Drug Metab Dispos. 2002;20:892-896.
- 4) Uchimura T, et al. Biopharm Drug Dispos. 2008;29:7-16.
- 5) Chiba K, et al. AAPS J. 2009;11:262-276.
- 6) Floby E, et al. Xenobiotica. 2009;39:656-662.
- 7) Ito K, et al. Pharm Res. 2005;22:103-112.
- 8) Kato M, et al. Drug Metab Pharmacokinet. 2003;18:365-372.
- 9) Bi YA, et al. Drug Metab Dispos. 2006;34:1658-1665.
- 10) Li N, et al. Mol Pharm. 2009;6:1180-1189.
- 11) Kato M, et al. Drug Metab Pharmacokinet. 2005;20:236-243.
- 12) Kanebratt KB, et al. Drug Metab Dispos. 2008;36:137-145.
- 13) Kaneko A, et al. Xenobiotica. 2009;39:803-810.
- 14) Kala I, et al. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:711-715.
- 15) Treijtel N, et al. Drug Metab Dispos. 2004;32:884-891.