REVIEW

薬物動態研究・トランスポーター研究とドラッグデザイン

Role of Pharmacokinetic and Transporter
Studies in Drug Design杉山雄一^{*a)}・鈴木洋史^{a)}・伊藤清美^{b)}

Yuichi SUGIYAMA, Hiroshi SUZUKI, and Kiyomi ITO

(Received January 25, 1999; Accepted April 12, 1999)

Recently, attempts have been made to synthesize rapidly very large numbers of compounds and identify promising drug candidates in terms of both their pharmacological activity and pharmacokinetic features during the early stages of screening (high throughput screening). In drug development, therefore, the importance of the extrapolation and prediction of pharmacokinetics in humans has increased and physiologically-based pharmacokinetics has played an important role in this.

It has become possible to predict *in vivo* pharmacokinetics in humans if accurate data are available on *in vitro* drug metabolism, plasma membrane transport, and protein binding and if these data can be combined with physiological parameters such as hepatic blood flow *etc.* Recent findings are summarized for the quantitative prediction of the hepatic metabolic clearance from *in vitro* studies using human liver microsomes or P450 isozyme recombinant systems. Furthermore, a method is proposed to predict pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions based on *in vitro* metabolic inhibition studies using human liver microsomes or human enzyme expression systems.

Biliary or urinary excretion of drugs has been shown to be mediated by various transporters. Some transporters have been shown to be involved also in the efflux of various compounds through the blood-brain barrier (BBB). Examples of the recent studies showing the relevance of transporters in pharmacokinetics are given and the prediction of BBB permeability is also discussed. In future, these transport characteristics of the drug and the possibility of drug-drug interactions involving transport will also need to be taken into consideration for more strategic and efficient drug development.

1. はじめに

最近、リード化合物創製のための combinatorial chemistry, high throughput screening 手法の必要性が唱えられ、実践されている。一方で、これまで、国の内外を問わず、*in vitro* の薬効の強さ（例えば受容体、酵素に対する IC_{50} , K_i 値など）のみを指標に医薬品の開発を進めていった場合、それらの薬物動態的特性の悪さ（バイオアベイラビリティの低さ、薬物相互作用の受けやすさ、個人差の大きさ、病態の程度による変動の大きさなど）のために開発が中止になることが続出している。こうした経験を通して、また、以下に示すような近年のテクノロジーの発展とあいまって、開発の早い段階で薬物動態特性の至適化の必要性が唱えられ始めている。すなわち、(1) 分子生物学、細胞生物学の発展により、ヒト組織、オルガネラのみならず、ヒト型酵素、トランスポーターを発現させた細胞の利用性

が高まった、(2) LC/MS/MS などのように感度の高い、分離能の高い分析法が開発されたことにより低血中濃度の測定が可能となった、ことなどを挙げることができる。このような理由により、数多くの化合物を短時間で作り、薬理活性のみならず薬物動態学的特性の優れた化合物を開発初期のスクリーニング段階でピックアップしようという動きが欧米の製薬企業を中心に高まってきている。以上の背景のもとで、どのような動態スクリーニング系を確立すべきか、今後の医薬品開発のあり方について考えてみたい。筆者らの研究を中心に、ヒトにおける動態予測が重要と思われる対象の中から、特に肝臓における代謝排泄、脳への薬物輸送の予測について、焦点をあてたい。

2. *In vitro* (細胞, オルガネラ, 酵素発現系) での代謝, 結合, 生体膜透過データから *in vivo* での肝代謝クリアランス, 小腸代謝性の予測

薬効の強い化合物がスクリーニングで選択されても *in vivo* では十分な薬効が得られないことがしばしばある。この原因として最も多くみられることは、バイオアベイラビリティ (BA) が低くなることである。経口投与された薬物の BA を決定する要因としては、Fig. 1 に示すように、腸管腔から上皮細胞への吸収率 (F_{abs})、腸管上皮細胞におけ

*a) 東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

b) 北里大学薬学部 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1)
School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University
(5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan)

Fig. 1. Schematic diagram depicting the effects of absorption and gut and hepatic first-pass extraction on drug oral bioavailability.¹⁸ F_{abs} , fraction of the drug dose absorbed into and through the gastrointestinal membranes; F_G , fraction of the absorbed dose that passes through the gut into the hepatic portal blood unmetabolized; F_H , the hepatic first-pass availability; BA , oral bioavailability; E_G and E_H , gut and hepatic extraction ratio, respectively.

る代謝消失の回避率(F_G), および肝臓でのアベイラビリティ(F_H)が挙げられる。経口投与後の BA は、次式のようにこれらの値の積で表される。

$$BA = F_{abs} \cdot F_G \cdot F_H \quad (1)$$

経口用の医薬品の開発段階において、候補化合物の BA が低いことが明らかとなった場合に、それが薬物の吸収性の低さに起因するのか、あるいは初回通過効果に起因するのかを知ることは、非常に重要である。それによって、もし吸収性に問題があると判断された場合には、微粉化あるいは吸収促進剤の添加など、種々の製剤的工夫を施すことにより、 BA を上昇させることが可能であると考えられる。一方、 BA の低さが初回通過効果に起因すると判断された場合には、上記のような製剤的工夫による BA の上昇は期待できない。この場合、 BA を上昇させるためには、初回通過効果を回避するような投与経路で投与するように変更することが必要となるかもしれない。このような可能性を開発初期段階で、ヒト単離肝細胞、ヒト肝あるいは小腸マイクロソーム、ヒト酵素発現系などを用いてスクリーニングする必要性が認識され始めている。また、代謝酵素によっては、例えば、CYP2C19やCYP2D6などのように遺伝的多型(ポリモルフィズム)の見られるものも多く、薬物感受性の個人差を生じる原因であることが明らかにされている。その意味からは、主たる代謝経路にこれら遺伝的多型のある酵素が関与するような薬物は個人差が大きくなり避けることが望まれる。こうした観点からも、ヒト肝あるいは小腸組織を用いた初期スクリーニングの必要性が認識される。以下にヒト組織を用いた*in vitro*代謝データより*in vivo*での肝代謝クリアランス、肝および小腸での初回通過代謝率を予測する方法論について記述する^{1), 2)}。

2.1 肝クリアランス、肝初回通過代謝率の予測

*In vivo*の肝臓における本質的な薬物の代謝能力を表すパラメータ(肝固有クリアランス: CL_{int})を予測することを目的として*in vitro*での代謝反応速度を測定する場合、できるだけ生理的な条件に近い実験設定をすることが必要である。

肝臓での薬物除去が代謝反応によるものである場合、肝クリアランス(CL_H)は肝固有クリアランス(CL_{int})、肝血流量(Q_H)および血中蛋白非結合型分率(f_B)、生体膜透過性

Fig. 2. Prediction of E_H and F_H in rats from *in vitro* CL_{int} .³⁾ 1, alprenolol; 2, antipyrine; 3, carbamazepine; 4, diazepam; 5, ethoxybenzamide; 6, hexobarbital; 7, 5-hydroxytryptamine; 8, lignocaine; 9, pethidine; 10, phenacetin; 11, phenytoin; 12, propranolol; 13, thiopental; 14, tolbutamide.

などによって支配される。肝抽出率(E_H)、肝アベイラビリティ(F_H)を予測するためには適切な数学モデルを使うことが必要である。我々の最近のラット、ヒトにおける解析によると、dispersion modelを用いることにより以下の式に基づいて、*in vitro*系から*in vivo*での肝代謝クリアランスを予測できることが明らかにされている^{3), 4)}。

$$F_H =$$

$$\frac{4a}{(1+a)^2 \exp\{(a-1)/2D_N\} - (1-a)^2 \exp\{-(a+1)/2D_N\}} \quad (2)$$

$$a = (1 + 4f_B \cdot CL_{int} / Q_H \cdot D_N)^{1/2} \quad (3)$$

$$CL_H = Q_H(1 - F_H) \quad (4)$$

ここで、 D_N はdispersion numberを表す。P450により代謝されることが知られている14種類の薬物について、*in vitro*実験により得られた CL_{int} の値を用いて、well-stirred model, parallel-tube model, dispersion model, distributed modelの4種類のモデルに従ってラットにおける E_H および F_H を予測した。その結果、Fig. 2に示すように、 E_H が小さい場合にはモデルによる予測性の違いはほとんどみられないが、dispersion model, distributed modelといった高位のモデルを適用することにより、 E_H 、 F_H 値ともに広い範囲で灌流系、*in vivo*系での実測値とよく合う結果が得られた。

2.2 ヒトにおける肝代謝クリアランス予測の実例

我々はP450が関与する32種の代謝反応について、主にヒト肝マイクロソームを用いた代謝試験の文献情報をもとに、*in vitro*の CL_{int} を算出した。一方、当該薬物のヒトにおけるファーマコキネティクスに関する文献情報から、dispersion modelに従って*in vivo*の CL_{int} を算出した。*In vivo*の親化合物の血中消失、尿中排泄、代謝物の尿中recoveryより CL_{int} を算出するに当たっては、肝外での代謝は生じないという仮定および、肝臓への分布は瞬時平衡、受動輸送によるという仮定のもとに行った。得られた*in vitro*と*in vivo*の CL_{int} を比較すると、Fig. 3に示すように、両者の比が3倍以内のものが約50%、また5倍以内のものが約70%を示すという程度の一致性が得られた。*In vitro*と*in vivo*の CL_{int} の不一致の要因としては、

(1) 小腸など肝臓以外の臓器における代謝が寄与している可能性、(2) 膜透過性が低い薬物について、*in vivo* の CL_{int} を過小評価している可能性、(3) 肝細胞への influx あるいは肝細胞からの efflux に能動輸送が関与しており、*in vivo* の CL_{int} がそれぞれ過大評価あるいは過小評価されている可能性、および (4) *in vitro* データと *in vivo* データにおいて用いられた個体は異なるため、代謝の個体差が影響している可能性、などが考えられる^{4), 5)}。

また、痴呆症状改善薬として開発中の薬物である YM 796 について、ラット、イヌ、およびヒトの各動物種における *in vitro* から *in vivo* 代謝能の予測性について検討し

Fig. 3. Comparison of CL_{int} , *in vitro* with CL_{int} , *in vivo* in humans.²⁾ The solid line indicates a 1:1 correspondence. 1, alprazolam; 2, diazepam; 3, dofenitide; 4, imipramine; 5, lidocaine; 6, loxidine; 7, α -hydroxymetoprolol; 8, *O*-demethylmetoprolol; 9, hydroxymethylmexiletine; 10, *p*-hydroxymexiletine; 11, phenacetin; 12, quinidine; 13, 1,3-dimethyluric acid + 1-methylxanthine; 14, 3-methylxanthine; 15, tolbutamide; 16, norverapamil (R-form); 17, D-617 (R-form); 18, D-703 (R-form); 19, norverapamil (S-form); 20, D-617 (S-form); 21, D-703 (S-form); 22, 6-hydroxywarfarin (R-form); 23, 7-hydroxywarfarin (R-form); 24, 6-hydroxywarfarin (S-form); 25, 7-hydroxywarfarin (S-form); 26, torsemide; 27, S-mephentoin; 28, fentanyl; 29, triazolam; 30, lansoprazole; 31, ropivacaine; 32, chlorzoxazone.

た。Kinetics パターンが動物種によって著しく異なるにもかかわらず、*in vivo* において観察された顕著な代謝能の種差は *in vitro* 肝ミクロソーム系においても再現された。さらに、*in vitro* において得られた kinetic parameters を用いて、初回通過代謝の飽和性を仮定した非線形 dispersion model に基づくシミュレーションを行い、各動物種における経口投与後の AUC の予測を試みた結果、いずれの種においても AUC の予測性は良好であり、ラットにおいて観察された非線形性も再現することができた (Fig. 4)^{6), 7)}。

近年、ヒト肝ミクロソームに代わる *in vitro* 代謝試験系として、バクテリア、酵母、昆虫細胞、ヒトB-リンパ芽球様細胞などにヒト P450 isozyme を発現させた各種発現系が開発されている。当該薬物の代謝に主に関与する P450 分子種の発現系を用いて K_m , V_{max} などを求め、さらに発現系の mg protein 中の各 isozyme 含量をもとに、実際のヒト肝 1 g あたりの平均的な isozyme 含量 (CYP3A4: 5.0 nmol/g liver, 1A2: 2.2 nmol/g liver, 2C9: 3.2 nmol/g liver, 2D6: 0.26 nmol/g liver, 2E1: 1.2 nmol/g liver)^{4), 8)} を考慮して換算することにより、g liver あたりの代謝能を求めることができる。このような方法により発現系を用いた *in vitro* データから肝ミクロソームあるいは *in vivo* での代謝クリアランスを定量的に予測した例は少ないが、発現系からヒト肝ミクロソームへの予測にほぼ成功した例を Table 1 にまとめた。いずれの薬物についても、発現系とミクロソームにおける単位酵素量あたりの CL_{int} は 3 倍の範囲内で一致している。

Fig. 4. Comparison of the predicted and the observed values for AUC_{oral} and bioavailability of YM 796 in rats, dogs and humans⁷⁾. The solid lines represent the predicted curves based on the kinetic parameters obtained from the *in vitro* metabolism studies. ■, observed data for rats; ▲, observed data for dogs; ●, observed data for humans.

Table 1. Prediction of Metabolic Activity of Human Liver Microsomes (HLM) Based on *in vitro* Studies Using Human P450 Recombinant Systems (REC)

Drug	Metabolic pathway	P450 isozyme	Recombinant system	CL_{int} (μ L/min/nmol CYP)		Reference
				REC	HLM	
Tolbutamide	Methyl hydroxylation	2C9	Lymphoblastoid cell	27.6	79.2	
S-Mephentoin	4'-Hydroxylation	2C19	Lymphoblastoid cell	331	904	
Omeprazole	5-Hydroxylation	2C19 & 3A4	Baculosome	Eadie-Hofstee plot for HLM was reproduced with REC data.		9)
YM796		3A4	Lymphoblastoid cell	440	240	6)
Alprazolam	4-Hydroxylation	3A4	Lymphoblastoid cell	45.3	21.7	
	α -Hydroxylation	3A4	Lymphoblastoid cell	6.08	3.61	
Triazolam	4-Hydroxylation	3A4	Lymphoblastoid cell	31.1	12.3	
	α -Hydroxylation	3A4	Lymphoblastoid cell	21.8	11.5	

CYP3A4 などの発現系を用いて *in vitro* 代謝試験を行う場合には、cytochrome P450 reductase や cytochrome b5 などの酵素含量が human liver と異なり、多くの場合は少ないことに注意する必要がある。したがって、十分な代謝活性を引き出すためには外からこれらの酵素を添加することが必要となる。Reductase や b5 の影響の有無は化合物によって異なるが、多くの場合に、これらを外から添加することにより活性が大きく上昇することが知られている¹⁰⁾。このような添加実験あるいは P450 と同時に cytochrome P450 reductase および cytochrome b5 をも発現させた系を利用することにより、ヒト肝ミクロソームあるいは *in vivo* における薬物代謝クリアランスの予測精度の向上が期待される。

一方、グルクロン酸抱合反応に関する *in vitro* から *in vivo* へのスケーリングは、酵素量や酵素の存在状態などの反応条件に左右されるため、困難であることが報告されている^{11), 12)}。Izumi らは、抗糖尿病薬である troglitazone の主代謝反応である硫酸抱合反応およびグルクロン酸抱合反応について、各酵素が主に局在していると考えられる肝の各細胞分画成分（サイトゾルおよびミクロソーム）を用いた抱合代謝試験データから、*in vivo* 肝代謝クリアランスを予測することを試みた。*In vitro* 代謝試験においては、過剰量の補酵素 (UDPGA) を用い、界面活性剤 (Brij 58), Mg^{2+} による活性化、および β -glucuronidase 阻害剤 (1,4-saccharic acid lactone) の添加など、できるだけ高い抱合活性が得られる条件を設定した。また、troglitazone は脂溶性薬物であり、反応液中での結合性が高いため、高速先端分析法 (HPFA) を用いて非結合型分率を測定することにより補正を行った。グルクロン酸抱合が主であるマウスと、逆に硫酸抱合が主であるラットにおいて検討した結果、いずれの動物種でも *in vivo* における両抱合反応の大きな差が *in vitro* データからの予測値でもほぼ再現され、代謝クリアランスの予測値は *in vivo* での各抱合反応の実測値とほぼ一致した¹³⁾。この結果は、抱合代謝反応についても *in vitro* での代謝試験から *in vivo* 代謝クリアランスの予測が可能であることを示唆している。

2.3 小腸での初回通過代謝

Cyclosporine など多くの薬物の代謝を担う酵素である CYP3A4 は、肝臓だけでなく小腸上皮細胞にも存在し、経口投与時の初回通過効果に関与することが知られている¹⁴⁾。Cyclosporine の経口投与後の BA は、CYP3A4 の誘導剤である rifampicin の併用時には低下し、阻害剤である ketoconazole あるいは erythromycin の併用時には上昇することが報告されている^{15)~17)}。Wu らは、Fig. 1 のようなモデルを立て、rifampicin での代謝酵素誘導時および ketoconazole あるいは erythromycin での代謝酵素阻害時における BA の変動から、ヒトにおける cyclosporine の腸管および肝臓での抽出率を分離評価することにより、腸管では肝臓より抽出率が大きく、併用剤による影響も肝臓と同程度かそれ以上に受けやすいことを明らかにしている¹⁸⁾。したがって、特に CYP3A4 で代謝される薬物に関しては、肝臓だけでなく、経口投与後の小腸における初回通過代謝についても考慮することが必要である。

一方、小腸上皮細胞の管腔側膜には輸送蛋白である P-糖蛋白質が存在し、管腔側への薬物の汲み出しに関与していることが知られている。Table 2 に示すように、この P-糖蛋白質と CYP3A4 とは類似の基質特異性をもち、CYP3A4 の基質となる薬物の多くが、P-糖蛋白質の基質あるいは阻害剤となることが明らかとなっている¹⁹⁾。また、human colon adenocarcinoma 由来の cell line を用いた研究で、P-糖蛋白質を誘導する薬物の多くが CYP3A も誘導することが報告され、両蛋白質を発現する遺伝子の制御因子が共通である可能性が示唆されている²⁰⁾。さらに Benet は、Fig. 5 に示すように、小腸上皮細胞に存在する CYP3A4 による代謝と P-糖蛋白質による管腔側への汲み出しが協奏的に働くことにより、経口投与後の小腸での初回通過代謝が効率的に行われ、薬物の BA 低下の原因となっている可能性を指摘している^{21), 22)}。したがって、cyclosporine や verapamil など、CYP3A4 および P-糖蛋白質の両方の基質となる薬物では、薬物間相互作用によりこれらが阻害あるいは誘導された場合、小腸における初回通過効果が影響を受け、経口投与後の血中濃度が変化する可能性が考えら

Table 2. Substrates for and Inhibitors of both CYP3A and P-gp¹⁹⁾

CYP3A substrates	P-gp	CYP3A substrates	P-gp	CYP3A substrates	P-gp
Antiarrhythmics		Chemotherapeutic agents		Hormones	
Amiodarone	I	Etoposide	S	Dexamethasone	S
Lidocaine	I	Doxorubicin	S	Estradiol	S
Quinidine	I	Paclitaxel	S	Hydrocortisone	S, I
Antifungals		Vinblastine	S	Progesterone	I
Itraconazole	I	Vincristine	S	Testosterone	I
Ketoconazole	I	Vindesine	S	Others	
Flavonoids		Ca-channel blockers		Digitoxin	S
Kaempferol (I)	E	Diltiazem	S, I	Erythromycin	I
Quercetin (I)	E	Felodipine	I	RU486	I
Immunosuppressants		Nicardipine	S, I	Tamoxifen	I
Cyclosporine	S, I	Nitrendipine	I	Terfenadine	I
FK506	S, I	Nifedipine	I		
Rapamycin	S	Verapamil	S, I		

S, substrate; I, inhibitor; E, enhancer.

Fig. 5. The synergistic effect of intracellular metabolism and efflux into the lumen on the intestinal absorption of a substrate of both P-gp and CYP3A4.

れる。我々は、小腸上皮細胞内における薬物の吸収方向の拡散を考慮した速度論モデルを用いてシミュレーションを行うことにより、このようなCYP3A4あるいはP-糖蛋白質の阻害に基づく相互作用の程度は、薬物の細胞内における拡散性が低いほど顕著であることを示した²³⁾。

今後、ヒト小腸組織、CYP3A4を発現あるいは誘導させたCaco-2細胞などをスクリーニング系として用いることにより、小腸における初回通過代謝についても*in vitro*試験からの予測が可能になるものと期待される。

3. *In vitro* 代謝データをもとにした肝における薬物間相互作用の予測

目的とする薬物の肝代謝を阻害することが知られている他の薬物を併用した場合に、その薬物の血中濃度が変化し、その結果として薬効が変化したり、副作用を発現したりする可能性がある。したがって、併用薬により体内動態がどの程度変動するかについて定量的に予測することは、薬物間相互作用による毒性の発現を防ぐ上で、極めて重要な課題である。薬物代謝における薬物間相互作用についても、*in vitro*試験で得られるパラメータをもとに、生理学的薬物速度論モデルに基づいて*in vivo*での相互作用を定量的に予測することが可能である^{24), 25)}。

代謝酵素の競合阻害に基づく相互作用については、阻害を受ける薬物の濃度が十分に低い場合、阻害剤の肝臓中非結合型濃度(I_0)と*in vitro*代謝試験により得られる阻害定数(K_i)との比から、血中濃度変化を予測することができる。 K_i 値はヒト肝ミクロソームなどを用いた*in vitro*代謝試験により求められるが、 I_0 をヒトにおいて測定することは困難である。そこで、肝臓中と血漿中の非結合型阻害剤濃度は等しいと仮定し、さらに、false negativeな予測(相互作用は生じないと予測されたにも関わらず生じてしまうこと)をできる限り避けるために、肝臓の入口に当たる門脈中の非結合型濃度をFig. 6のモデルに従って算出し、その値を I_0 として用いることにより相互作用の予測を試みた。

一例として、睡眠導入剤である triazolam のヒトにおけ

Fig. 6. Model for estimating inflow concentration of the inhibitor into the liver after oral administration (I_{in}).²⁵⁾ I_{out} , I , and I_{max} represents the inhibitor concentration at the exit of liver (hepatic vein side), the inhibitor concentration at the liver capillary, and maximum inhibitor concentration in the systemic circulation, respectively, Q_h , Q_{pv} , and Q_a ($=Q_h + Q_{pv}$) represents blood flow at hepatic artery, portal vein, and hepatic vein, respectively, k_a , D , and F_a represents the absorption rate constant, dose, and the fraction absorbed from the gastrointestinal tract into the portal vein, respectively, of the inhibitor.

Fig. 7. Effect of ketoconazole (200 mg) co-administration on plasma concentration profile of triazolam after oral administration (0.125 mg) in humans.²⁶⁾

るAUCは、抗真菌剤 ketoconazole の併用により大きく上昇することが報告されている (Fig. 7)²⁶⁾。Triazolam は主にCYP3A4により α 位あるいは4位の水酸化体に代謝され、ketoconazoleはその代謝を強力に阻害する。ヒト肝ミクロソームを用いた*in vitro*代謝試験で得られた triazolam の各々の代謝経路に対する K_i 値と ketoconazole の体内動態に関する文献情報に基づいて、この相互作用を予測した結果をTable 3に示す。Ketoconazoleの併用により triazolam のAUCは約8倍に上昇することが予測され、臨床での実測値とよく一致した。

その他の組み合わせについても同様の検討を行った結果をTable 4に示す。Quinidine-sparteineの例のように、 I_0/K_i として大きな値が得られたにも関わらずAUCの予測上昇率が低いものについては、阻害を受ける代謝経路の割合が過小評価されている可能性がある。また、fluoxe-

Table 3. Prediction of Increase in Plasma Triazolam Concentration by Co-administration of Ketoconazole

I_u (μM)	K_i (μM)	I_u/K_i	$CL_{H,M}/CL_{tot}$	Predicted AUC ratio
0.080-0.091	0.006*	13-15*	0.525*	7.8
	0.023**	3.5-4.0**	0.475**	

* Triazolam α -hydroxylation. ** Triazolam 4-hydroxylation.Table 4. Summary of the Prediction of *in vivo* Drug-Drug Interaction from *in vitro* Data Based on Competitive or Non-competitive Inhibition Mechanism^{a)}

	Inhibitor-Inhibited drug (P450 isozyme)	Inhibition ratio AUC ratio ^{b)} (Predicted AUC ratio ^{c)}	I_u/K_i
(1) Successful cases:	(i) sulfaphenazole-tolbutamide (2C9)	$\times 5.3$ ($\times 5.0$)	200
	(ii) ketoconazole-triazolam (3A4)	$\times 8.3$ ($\times 7.8$)	15 (α -OH), 4 (4-OH)
(2) Successful for the metabolic pathway but unsuccessful for the total:	(iii) quinidine-sparteine (2D6)	$\times 2.9$ ($\times 1.3$)	60
	(iv) ketoconazole-terfenadine (3A4)	$\times 10$ ($\times 1.3$)	4
(3) Unsuccessful for the metabolic pathway:	(v) fluoxetine-imipramine (2D6)	$\times 1.9$ ($\times 1.0$)	0.07
	(vi) ciprofloxacin-cafeine (1A2)	$\times 1.6$ ($\times 1.1$)	0.15
	(vii) omeprazole-diazepam (2C19)	$\times 2.0$ ($\times 1.0$)	0.03
	(viii) erythromycin-triazolam (3A4)	$\times 2.1$ ($\times 1.0$)	0.017 (α -OH), 0.005 (4-OH)

^{a)} Predictions were based on the inhibition of the P450 isozyme which is mainly related to the metabolism of the corresponding drug.^{b)} Change in AUC induced by the drug-drug interaction (observed value).^{c)} Change in AUC induced by the drug-drug interaction (predicted value).Scheme 1. Proposals for the prediction of inhibitory effects of co-administered drugs on the metabolism of a novel drug *in vivo*.

- 1) Confirmation of the involvement of P-450 (*in vitro* metabolism studies using human hepatocytes and microsomes); Inhibition by SKF-525A and CO.
- 2) Identification of P-450 isozyme (*in vitro* metabolism studies); Inhibition studies using human P-450 expression systems, antibodies, or specific inhibitors.
- 3) Determination of the inhibition type (*in vitro* metabolism studies); Evaluation of preincubation time-dependency of the enzyme and the inhibitor. [Mechanism-based inhibition $\rightarrow$ Simulation studies using kinetic parameters]
- 4) Estimation of the maximum plasma unbound concentration of the co-administered inhibitor (I_u); Searching the *in vivo* pharmacokinetic data for the co-administered inhibitor.
- 5) Evaluation of the active transport into hepatocytes;
 - (i) Measurement using hepatocytes isolated from experimental animals (rats).
 - (ii) Measurement using human hepatocytes and human liver slices.
 - (iii) If no information available: 10-fold margin for the concentration ratio.
- 6) Measurement of K_i for the co-administered inhibitor (using human liver microsomes or human P-450 expression systems).
- 7) Judging the possibility of metabolic inhibition; Comparison of the values of I_u and K_i ($I_u/K_i > 0.2^*$)

* represents the smallest limit for the *in vivo* interaction. This value should depend on the pharmacodynamic and/or toxicodynamic features of the drug investigated.

tine-imipramine の例のように、得られた I_u/K_i の値が小さいにもかかわらず *in vivo* で相互作用が生じているケースでは、上述の I_u の見積もりにおいて誤差が生じている可能性が考えられる。実際、肝臓中へ能動的に取り込まれる

薬物については、肝臓中の非結合型薬物濃度は血漿中と比較して高くなるはずであり、本方法論では阻害剤の濃度が過小評価されている可能性がある。我々は、ラット遊離肝細胞を用いた取り込み実験において、rotenone, FCCP な

どの ATP 枯渇剤をメディウム中に添加することにより能動輸送を阻害した場合と能動輸送がある場合（生理的条件）における薬物の取り込み初速度の比から、P450 阻害剤として知られている cimetidine, quinidine, erythromycin, sulfaphenazole, desipramine, ketoconazole, および omeprazole の肝臓への濃縮率を評価した。その結果、cimetidine を除いて濃縮率は 1~2 倍程度であり、各々の薬物が関与する相互作用の予測性には大きな影響を及ぼさなかった。しかし、ラットとヒトで種差がある可能性もあるため、今後、ヒトの肝細胞あるいは肝スライスなどを用いた検討が必要であろう。

開発中の新規薬物について、代謝の競合阻害に基づく薬物間相互作用を *in vitro* 試験により予測する手順を Scheme 1 に示す。

一方、薬害事件として問題になった sorivudine と 5-fluorouracil (5-FU) との相互作用あるいは macrolide 系抗生物質による CYP3A4 の阻害などは、阻害剤の代謝物が酵素と共有結合する “mechanism-based inhibition” と呼ばれる機構に基づいており、相互作用の程度は、阻害剤の濃度および酵素との接触時間に依存する。この場合、阻害剤濃度および酵素とのプレインキュベーション時間を変化させた *in vitro* 試験を行い、Fig. 8 に示す方法に従って酵素の不活化に関する速度論パラメータ (k_{inact} および K'_{app}) を算出する^{27), 28)}。そして、代謝速度は残存している活性型酵素量に比例すると仮定し、さらに酵素の turnover も考慮した生理学的速度論モデルに基づいたシミュレー

Fig. 8. Method to obtain *in vitro* kinetic parameters (k_{inact} and K'_{app}) for mechanism-based inhibition. k_{obs} , apparent inactivation rate constant of the enzyme.

Fig. 9. Simulation of sorivudine effects on the hepatic DPD content and blood concentration of 5-FU in humans.

ションを行うことにより、*in vivo* での相互作用の程度を予測することができる。

我々は、この方法論を sorivudine と 5-FU との相互作用に適用することを試みた。5-FU の代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の発現系あるいはヒト肝サイトゾルを用いた *in vitro* 代謝試験により求めた酵素不活化に関する速度論パラメータと、文献から得られた sorivudine と 5-FU のヒトにおける体内動態パラメータを生理学的速度論モデルに代入した結果、sorivudine (50 mg 1 日 3 回、5 日間) の服用により肝臓中の DPD はほぼ完全に失活し、それに伴って 5-FU の血中濃度は単独投与時の 5 倍以上に上昇することが予測された (Fig. 9)。

多剤併用療法が一般的となっている現在、このような方法論によって医薬品開発の段階で薬物間相互作用の可能性を予測し、相互作用による毒性の発現を避けることが必要である。

4. 胆汁排泄、尿中排泄の予測：トランスポーターの関与

肝臓、腎臓は種々の内因性・外因性の物質を血液側から取り込み、胆汁中、尿中に排泄することにより解毒化する重要な臓器である。血液側から肝、腎細胞内への取り込みおよび細胞内からの管腔側細胞膜を介した排泄機構に関しては、種々の実験系を用いて多くの研究がなされた結果、多くの医薬品の肝胆系への移行および腎尿細管分泌が担体輸送によることが証明され、現在では輸送蛋白、遺伝子の同定を目指した多くの研究が世界中で展開されている^{29), 30)}。我々の研究グループでも、最近、胆管側の有機アニオン輸送担体、canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) のクローニングを行い、cMOAT の基質認識特異性を明らかにするとともに、一連の一次性能動輸送担体は、保存性の高い ATP binding cassette (ABC) 領域を有すること、類似のトランスポーターが複数存在することなどを明らかにしている^{31), 32)}。Table 5 には、これまで cMOAT の基質になることが明らかになっている化合物をまとめた³³⁾。

肝における輸送担体と医薬品動態の関わりが明らかになっている多くの実例がある。いくつかの例を挙げよう。(a) HMG CoA 還元酵素阻害剤であるプラバスタチン（有機アニオン性化合物）は、肝臓でのコレステロール合成阻害活性が薬効に関わっている。この薬が経口投与されると、消化管から門脈中への吸収、門脈から肝への取り込み、肝細胞内から胆汁中への排泄のいずれの過程にも能動輸送担体の関与することが明らかになっている。そのため、効率のよい腸肝循環が生じており、大部分の薬物分子を薬効の標的である肝臓に留め、循環血中への出現を最小化することにより副作用の軽減に役立っている (Fig. 10)³⁴⁾。(b) 肝、腎におけるトランスポーター研究が生かされる例として、肝、腎ふりわけの問題が挙げられる。例えば、ある種のキノロン系抗生物質、ACE 阻害剤などに見られるように、従来の腎排泄型の化合物を胆汁排泄型に変えることによっ

Table 5. Substrates for cMOAT

<i>Glutathione conjugates/cysteinyl leukotrienes</i>	<i>Bile salt conjugates</i>
Glutathione disulfide	Cholate 3-O-glucuronide
Leukotriene C ₄	Lithocholate 3-O-glucuronide
Leukotriene D ₄	Chenodeoxycholate 3-O-glucuronide
Leukotriene E ₄	Nordeoxycholate 3-O-glucuronide
N-Acetyl leukotriene E ₄	Nordeoxycholate 3-sulfate
2,4-Dinitrophenyl-S-glutathione	Lithocholate 3-sulfate
Bromosulphophthalein glutathione	Taurolithocholate 3-sulfate
Glutathionyl-bromoisovalerylurea	Glycolithocholate 3-sulfate
Glutathione-bimane	Taurochenodeoxycholate 3-sulfate
<i>Glutathione conjugates of heavy metals</i>	<i>Non-conjugated organic anions</i>
Antimony, Arsenite, Bismuth,	Bromosulphophthalein
Cadmium, Copper, Silver, Zinc	Dibromosulphophthalein
<i>Glucuronide conjugates</i>	Carboxyfluorescein
Bilirubin monoglucuronide	Reduced folates
Bilirubin diglucuronide	• 5-Methyltetrahydrofolate
E ₂ 17 β G	• Tetrahydrofolate
Triiodothyronine-glucuronide	• 5,10-Methylenetetrahydrofolate
p-Nitrophenyl glucuronide	L-Methotrexate
1-Naphthol-b-D-glucuronide	D-Methotrexate
E3040 glucuronide	CPT-11, carboxylate
SN-38 glucuronide, carboxylate	SN-38, carboxylate
SN-38 glucuronide, lactone	Ampicillin
R-Grepafloxacin-glucuronide	Ceftriaxone
S-Grepafloxacin-glucuronide	Cefodizime
Grepafloxacin-glucuronide (racemic)	R-Grepafloxacin
Glycyrrhizin	S-Grepafloxacin
Liquiritigenin glucuronides	Pravastatin
	Temocaprilat
	BQ-123

Fig. 10. Enterohepatic circulation of pravastatin.³⁴⁾ Enterohepatic circulation of pravastatin is mediated by three transporters at intestinal brush border membrane, hepatic sinusoidal membrane, and canalicular membrane.

て、使用される対象である患者の腎機能の個人間変動による薬効、副作用の個人間変動を最小限に抑える試みもなされている^{35)~37)}。(c)潰瘍性大腸炎の治療薬である E3040 は、その抱合代謝物 (glucuronide, sulfate) が主に肝で生じ、胆汁排泄を受ける。すでに我々は、E3040-glucuronide の胆汁排泄には cMOAT の関与することを明らかにしている。消化管内でこれら抱合体が脱抱合され、腸肝循環を繰り返すことにより、薬効の標的であると思われる消化管の管腔側における親化合物 (薬効の本体) の滞留時間が

Fig. 11. Chemical structure and pharmacokinetic features of BQ-123, an endothelin receptor antagonist.⁴⁰⁾

長くなると考えられる^{38), 39)}。(d) 低分子ペプチドの多くは、未変化体のまま胆汁中に排泄される。Endothelin receptor 拮抗薬である BQ-123 も環状の pentapeptide であるが、ラットで静注後その約 90% が未変化体として胆汁排泄を受け、その効率良い肝胆系への移行が知られている (Fig. 11)^{40), 41)}。その他、renin inhibitor や、somatostatin analogue などの小ペプチドで、大きな胆汁中排泄が報告されている。事実、低分子ペプチドの多くは、経口投与では必ずしも十分な効果を示さないことが多く、この原因として肝臓への効率的な取り込み、胆汁排泄による肝初回通過消失が極めて重要であると考えられている。我々は、これら小ペプチドの肝取り込み、胆汁排泄に担体輸送の関与することを明らかにしており、さらにその構造活性相関についての知見を得ている。(e) トポイソメラーゼ阻害剤である CPT-11 (塩酸イリノテカン) は切れ味の鋭い抗癌剤であるが、副作用として、重篤な下痢が知られている。し

Fig. 12. Hypothesis for the mechanism of toxicity caused by the intravenous administration of CPT-11, a topoisomerase inhibitor.^{42), 43)}

かも、この副作用には大きな個人差があることから、この個人差を予測する方法の確立が望まれている。下痢の機構としては、活性代謝物である SN-38 およびそのグルクロン酸抱合体が胆汁排泄を受け、消化管腔側から SN-38 が作用するものと考えられている。すでに我々は、SN-38 およびそのグルクロン酸抱合体の胆汁排泄に cMOAT の関与することを証明しており、cMOAT が下痢の個人差に関わっていることを示唆する知見を得ている^{42), 43)} (Fig. 12). 大きな胆汁排泄能力の個人差の存在は、最近のヒト肝胆管側膜ベシクルを用いた解析からも明らかになっており、今後、この個人差を予測する方法論の確立および、胆汁排泄の阻害剤を同時投与するなどの方法論により副作用を軽減する方法論の確立が強く望まれる。

今後はこうした輸送特性を開発段階で考慮し、より strategic な開発研究が望まれるところである。

5. 血液脳関門 (BBB) 透過性の予測

これまで血中濃度を基準にした AUC (曲線下面積), C_{max} (最高濃度), MRT (平均滞留時間) がファーマコキネティクスパラメータとして用いられてきた。これは、血中から組織への分布が比較的速やかに生じ、かつ組織への分布の程度が血中蛋白結合性と組織高分子への比較的非特異的結合により決定される場合には、血中結合性の種差を補正することにより、ヒトにおける組織分布性 (分布容積により反映される) を動物データから予測することが可能であるという経験に基づいている。しかしながら、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) に代表されるように、血中と組織中の分布平衡に時間がかかる場合には、血中濃度推移と標的組織中濃度推移が平行でないという問題点があり、関門透過性の推測が重要となる。また、最近多くの化合物で証明されているように、肝、腎、小腸、BBB などに存在する能動輸送系により薬物分布が支配される場合には、血中-臓器間をつなぐ伝達関数にどの程度の種差が存在するかについて、ほとんど情報がないため、ヒトにおける予測が困難であるという現状である。BBB における担体輸送についての種差は全くといってよいほど研究されていない分野であり、今後、多くの基礎研究が蓄積される

Fig. 13. Relationship between BBB permeability and (octanol-water partition coefficient)/(molecular weight)^{1/2}.⁴⁴⁾

ことが望まれる。

本項では特にこの BBB における透過能力の予測について述べたい。脳毛細血管内皮細胞間には、他の抹消組織における毛細血管とは異なり、tight junction により結合されている。脳毛細血管内皮細胞には fenestra, pinocytotic vesicle などほとんど観察されないことから、循環血中の化合物が脳内に移行するためには、この内皮細胞を介した経細胞輸送を経なければならない。その結果として、BBB を単純拡散により透過する化合物に対しては、BBB 透過性の定量的指標となる、Permeability-Surface area product (PS product) と、油水分分配係数×拡散定数 (あるいは油水分分配係数/分子量^{1/2}) の間に良好な関係が観察されてきた (Fig. 13)^{44), 45)}。一方、グルコースや一部の中性アミノ酸のように、中枢神経系にとって重要な化合物に対しては輸送担体が BBB に発現されており、促進拡散により脳内へと移行する⁴⁵⁾。

逆に、脳毛細血管内皮細胞の血液側膜上には、P-糖蛋白が発現され、その基質の脳内移行を制限している⁴⁶⁾。なお、P-糖蛋白質は従来多剤耐性獲得癌細胞膜上に高発現され、抗癌剤などの細胞外への輸送を担う排出輸送担体として同定されたものである。抗癌剤輸送を担う P-糖蛋白はヒトでは MDR1 と称され、マウスでは mdrla, 1b のホモログが存在するが、脳毛細血管細胞では主として mdrla が発現されている⁴⁶⁾。BBB における P-糖蛋白の輸送蛋白としての意義は、mdrla ノックアウトマウス (mdrla (-/-)) を用いることにより明らかとされた⁴⁷⁾。Fig. 14 には、筆者らのキニジンの脳移行に関する結果を示すが、キニジンを静脈内投与後の脳/血漿中濃度比は、正常マウスに比べて mdrla (-/-) では顕著に増大していること、P-糖蛋白阻害剤である PSC833 を同時投与した場合には、正常マウスにおいてのみ、キニジンの脳移行性が増大したことから、本化合物の脳内移行が P-糖蛋白により制限されていることが示された⁴⁸⁾。

正常マウスと mdrla (-/-) の脳移行性を比較検討することにより、多くの中枢作用を有する化合物も P-糖蛋白の基質となることが示されてきている。これらには、domeperidone, haloperidol, flunitrazepam, clozapine, pheny-

toin, ondansetron, loperamide などが含まれている⁴⁹⁾。P-糖蛋白質は、主として塩基性および中性の高脂溶性化合物を基質とするが、その基質認識機構についての詳細は不明であり、今後 X 線結晶解析を含めた構造科学分野からのアプローチが切望されている。

目的とする化合物が P-糖蛋白質の基質となるか否かに関しては、P-糖蛋白質 cDNA を遺伝子導入することにより得られた安定発現細胞を用いることにより、また正常マウスと *mdr1a*(-/-) における脳移行を比較することにより結論を得ることが可能である。しかしながら、P-糖蛋白質の基質となるがゆえに、ヒトにおいてどの程度脳移行性が制限されるのかという定量的な評価を行うことが必要である。ヒト MDR1 とマウス *mdr1a* の間では輸送特性の差が観察されていることから、マウスを用いた実験結果をそのままヒトに外挿することはできない⁵⁰⁾。これらの問題点を解決するためには、*in vitro* データと *in vivo* データを連結させる、以下のアプローチが必要となろう。

すなわち、*in vitro* において P-糖蛋白質機能を定量化する実験系としては、例えば LLC-PK1 細胞のような極性細胞 monolayer を用いる (実験例の一つを Fig. 15 に示した)⁵¹⁾、*mdr1a* を発現させた LLC-PK1 細胞および control の細胞を用い、一連の P-糖蛋白質基質の apical から

basal への、また basal から apical への経細胞輸送を測定し、passive diffusion による透過能力および P-糖蛋白質による排出輸送能力を定量的に評価する。次に *in vivo* においてこれらの化合物の PS product を *mdr1a*(-/-) マウス (passive diffusion のみを定量化)、正常マウスで比較する。さらに Western blot などの方法に従い、単位面積当たりに発現される *mdr1a* の量を定量化することにより *in vitro* データから *in vivo* 脳移行性を予測しうるか否かに関する結論が得られよう。マウスでこの方法論の妥当性が示されれば、ヒトにおいても適応が可能であろう。この場合には MDR1 を遺伝子導入した MDCK 細胞を用いた経細胞輸送測定が、ヒト脳移行性を予測する良好なスクリーニング系となりうる。

筆者らはさらに、P-糖蛋白質以外にも、排出輸送系が BBB に存在することを示唆する結果を得ている^{52), 53)}。すなわち、*in vivo* データを速度論解析することにより、 β -ラクタム抗生物質の cefodizime が BBB を介して脳から血液側へと汲み出されることを示すことができた⁵²⁾。さらに Leininger らは、naphthyl-glucuronide を脳内に直接投与し、脳内残存量を経時的に測定することにより、この化合物が飽和性を有する過程により inulin よりも極めて速やかに脳から消失することを示している⁵⁴⁾。ここで、cefodizime および naphthyl-glucuronide 共に、有機アニオン系化合物に対する一次性排出輸送担体 multidrug resistance associated protein (MRP) ファミリーの基質となることから⁵⁵⁾、この蛋白の脳毛細血管内皮細胞における発現が考えられた。筆者らはマウス脳毛細血管内皮細胞由来の培養細胞 MBEC4 細胞を単層培養することにより、有機アニオン性化合物の排出輸送の方向性について検討を加えた⁵⁶⁾。なお、MBEC4 細胞を単層培養すると、*mdr1b* P-糖蛋白質が血液側膜に発現されることが確認されている⁵⁷⁾。MBEC4 細胞に monochlorobimane を preload し、細胞内でそのグルタチオン体 glutathione-bimane (GS-B) を生成させ、GS-B の排出について検討を加えた結果を Fig. 16 に示す⁵⁶⁾。ここで、GS-B は蛍光を有する化合物であり、MRP ファミリーの良好な基質となる⁵⁸⁾。Fig. 16 に示すよ

Fig. 14. Comparison of the brain-to-plasma concentration ratio ($K_{p, \text{brain}}$) of quinidine in control (FVB) and *mdr1a* knock-out mice.⁴⁸⁾ The $K_{p, \text{brain}}$ values were determined 10 min after intravenous administration of quinidine in the presence and absence of PSC833, an inhibitor of P-glycoprotein.

Fig. 15. Function of P-glycoprotein transfected into LLC-PK1 cells.⁵¹⁾ Apical-to-basal ($\square$) and basal-to-apical ($\circ$) flux of daunorubicin was compared between MDR1-transfected and control cells.

Fig. 16. Detection of MRP activity in MBEC4 cells.⁵⁶⁾ MBEC4 cells were loaded with MCB and the flux of intracellularly produced GS-B to luminal ($\bullet$) and antiluminal ($\circ$) side was measured.

うに、GS-Bの排出は血液側優位であり、さらにMBEC4細胞膜を用いた実験により、ATP-依存性の輸送を受けることが明らかとなった⁵⁶⁾。また、Western blotの結果、MRP1がMBEC4細胞およびラット脳毛細血管内皮細胞においても発現されることが示された⁵⁸⁾。後者の結果はReginaらによっても確認されている⁵⁹⁾。筆者らは最近、MRP5がラット脳毛細血管内皮細胞に発現されることを見だし、cDNAクローニングに成功し、現在その機能解析を行っている⁶⁰⁾。これらMRPファミリーメンバーがBBBにおいて発現され、有機アニオン系化合物の脳内移行制御に関与しているものと考えている。

中枢性作用を有する医薬品を開発するにあたっては、BBB透過性を高めることは必須であるが、現在考えられるドラッグデザインの進め方としては、脂溶性を高め、かつ排出輸送系の良い基質とはならないような化合物を、トランスポーター発現系を用いた*in vitro*スクリーニング系で選択する方法論が最良であろう。また、今後、輸送担体の分子レベルでの解明により、排出輸送系阻害剤の検索が可能となれば、これらの阻害剤併用により、脳移行促進を図ることも可能となるものと考えられる。

文 献

- 1) 杉山雄一編, 「医薬品開発における薬物動態研究」, 薬業時報社(1998).
- 2) 杉山雄一編, 「ファーマコキネティクス研究の方法と技術—前臨床から臨床第1相へ—」, 日本薬物動態学会(1993), pp. 87-108.
- 3) T. Iwatsubo, N. Hirota, T. Ooie, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, Prediction of *in vivo* drug disposition from *in vitro* data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm. Drug Dispos.*, **17**, 273-310 (1996).
- 4) T. Iwatsubo, N. Hirota, T. Ooie, H. Suzuki, N. Shimada, K. Chiba, T. Ishizaki, C. E. Green, C. A. Tyson, and Y. Sugiyama, Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. *Pharmacol. Ther.*, **73**, 147-171 (1997).
- 5) K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, Y. Nakajima, and Y. Sugiyama, 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).
- 6) T. Iwatsubo, H. Suzuki, N. Shimada, K. Chiba, T. Ishizaki, C. E. Green, C. A. Tyson, T. Yokoi, T. Kamataki, and Y. Sugiyama, Prediction of *in vivo* hepatic metabolic clearance of YM796 from *in vitro* data by use of human liver microsomes and recombinant P-450 isozymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 909-919 (1997).
- 7) T. Iwatsubo, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the *in vivo* metabolic clearance of YM796 by the liver from *in vitro* data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 462-469 (1997).
- 8) T. Shimada, H. Yamazaki, M. Mimura, Y. Inui, and F. P. Guengerich, Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 414-422 (1994).
- 9) H. Yamazaki, K. Inoue, P. M. Shaw, W. J. Checovich, F. P. Guengerich, and T. Shimada, Different contributions of cytochrome P450 2C19 and 3A4 in the oxidation of omeprazole by human liver microsomes: Effects of contents of these two forms in individual human samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 434-442 (1997).
- 10) J.-P. Renaud, C. Cullin, D. Pompon, P. Beaune, and D. Mansuy, Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast: A functional model for the hepatic enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 889-896 (1990).
- 11) A. Rane, J. Sawe, B. Lindberg, J. O. Svensson, M. Garle, R. Erwald, and H. Jorulf, Morphine glucuronidation in the rhesus monkey: A comparative *in vivo* and *in vitro* study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**, 571-576 (1984).
- 12) M. Mistry and J. B. Houston, Glucuronidation *in vitro* and *in vivo*. Comparison of intestinal and hepatic conjugation of morphine, naloxone, and buprenorphine. *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 710-717 (1987).
- 13) T. Izumi, K. Hosiyama, S. Enomoto, K. Sasahara, and Y. Sugiyama, Pharmacokinetics of troglitazone, an anti-diabetic agent. Prediction of *in vivo* stereoselective sulfation and glucuronidation from *in vitro* data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 1392-1400 (1997).
- 14) I. De Waziers, P. H. Cugnenc, C. S. Yang, J.-P. Leroux, and P. H. Beaune, Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 387-394 (1990).
- 15) M. F. Hebert, J. P. Roberts, T. Prueksaritanont, and L. Z. Benet, Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 453-457 (1992).
- 16) D. Y. Gomez, V. J. Wachter, S. J. Tomlanovich, M. F. Hebert, and L. Z. Benet, The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 15-19 (1995).
- 17) S. K. Gupta, A. Bakran, R. W. G. Johnson, and M. Rowland, Cyclosporin-erythromycin interaction in renal transplant patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 475-481 (1989).
- 18) C.-Y. Wu, L. Z. Benet, M. F. Hebert, S. K. Gupta, M. Rowland, D. Y. Gomez, and V. J. Wachter, Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 492-497 (1995).
- 19) V. J. Wachter, C.-Y. Wu, and L. Z. Benet, Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol. Carcinogen.*, **13**, 129-134 (1995).
- 20) E. G. Schuetz, W. T. Beck, and J. D. Schuetz, Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.*, **49**, 311-318 (1996).
- 21) K. S. Lown, R. R. Mayo, A. B. Leichtman, H. L. Hsiao, D. K. Turgeon, P. Schmiedlin-Ren, M. B. Brown, W. Guo, S. J. Rossi, L. Z. Benet, and P. B. Watkins, Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **62**, 248-260 (1997).
- 22) Y. Zhang, X. Guo, E. T. Lin, and L. Z. Benet, Overlapping substrate specificities of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein for a novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 360-366 (1998).
- 23) K. Ito, H. Kusuhara, and Y. Sugiyama, Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption—Theoretical approach—. *Pharm. Res.*, **16**, 225-231 (1999).

- 24) 杉山雄一, 佐々木康綱編, 「抗癌剤の相互作用—これからの抗癌剤治療戦略—」, 医薬ジャーナル社 (1998).
- 25) K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, K. Ueda, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 387-411 (1998).
- 26) L. L. von Moltke, D. J. Greenblatt, J. S. Harmatz, S. X. Duan, L. M. Harrel, M. M. Cotreau-Bibbo, G. A. Pritchard, C. E. Wright, and R. I. Shader, Triazolam biotransformation by human liver microsomes *in vitro*: Effects of metabolic inhibitors and clinical confirmation of a predicted interaction with ketoconazole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 370-379 (1996).
- 27) R. B. Silverman, "Mechanism-Based Enzyme Inactivation: Chemistry and Enzymology," Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), pp. 3-30.
- 28) S. G. Waley, Kinetics of suicide substrates. Practical procedures for determining parameters. *Biochem. J.*, **227**, 843-849 (1985).
- 29) M. Yamazaki, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics (review). *Pharm. Res.*, **13**, 497-513 (1996).
- 30) 鈴木洋史, 杉山雄一, 異物排除におけるトランスポーターの役割: cMOAT および MRP superfamily member を中心として. 蛋白質核酸酵素, **42**, 1273-1284 (1997).
- 31) K. Ito, H. Suzuki, T. Hirohashi, K. Kume, T. Shimizu, and Y. Sugiyama, Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.*, **272**, G16-G22 (1997).
- 32) K. Ito, H. Suzuki, T. Hirohashi, K. Kume, T. Shimizu, and Y. Sugiyama, Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1684-1688 (1998).
- 33) H. Suzuki and Y. Sugiyama, Transporters for Bile Acids and Organic Anions, in "Membrane Transporters as Drug Targets," ed. by G. Amidon and W. Sadée, Plenum Publishing Corp., New York (1998), in press.
- 34) 渡部由香, 山崎雅代, 鈴木洋史, 杉山雄一, プラバスタチンの肝胆系移行機序; 担体輸送の重要性—特集: HMG-CoA還元酵素阻害剤の開発から最新知見まで— 基礎・治療 *Progress in Medicine*, **18**, 939-950 (1998).
- 35) H. Ishizuka, K. Konno, H. Naganuma, K. Sasahara, Y. Kawahara, K. Ninuma, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, Temocaprilat, a novel angiotensin converting enzyme inhibitor, is excreted into bile *via* an ATP-dependent active transporter (cMOAT) that is deficient in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats (EHBR). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 1304-1311 (1997).
- 36) H. Sasabe, A. Tsuji, and Y. Sugiyama, Carrier-mediated mechanism for the biliary excretion of the quinolone antibiotic, grepafloxacin and its glucuronide in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 1033-1039 (1998).
- 37) H. Sasabe, Y. Kato, A. Tsuji, and Y. Sugiyama, Stereoselective hepatobiliary transport of the quinolone antibiotic grepafloxacin and its glucuronide in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 661-668 (1998).
- 38) O. Takenaka, T. Horie, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, Different biliary excretion systems for glucuronide and sulfate of a model compound; Study using Eisai hyperbilirubinemic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, 1362-1369 (1995).
- 39) O. Takenaka, T. Horie, H. Suzuki, K. Kobayashi, and Y. Sugiyama, Kinetic analysis of hepatobiliary transport for conjugative metabolites in the perfused liver of mutant rats (EHBR) with hereditary conjugative hyperbilirubinemia. *Pharm. Res.*, **12**, 1746-1755 (1995).
- 40) T. Nakamura, A. Hisaka, Y. Sawasaki, Y. Suzuki, T. Fukami, K. Ishikawa, M. Yano, and Y. Sugiyama, Carrier-mediated active transport of BQ-123, a peptidic endothelin antagonist, into rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 564-572 (1996).
- 41) H. C. Shin, Y. Kato, T. Yamada, A. Hisaka, and Y. Sugiyama, Hepatobiliary transport mechanism for the cyclopentapeptide endothelin antagonist BQ-123. *Am. J. Physiol.*, **272**, G979-G986 (1997).
- 42) X.-Y. Chu, Y. Kato, K. Niinuma, K. Sudo, H. Hakusui, and Y. Sugiyama, Multispecific organic anion transporter (cMOAT) is responsible for the biliary excretion of the camptothecin derivative irinotecan, CPT-11, and its metabolites in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 304-314 (1997).
- 43) X.-Y. Chu, Y. Kato, and Y. Sugiyama, Multiplicity of biliary excretion mechanisms for the camptothecin derivative irinotecan, CPT-11, and its metabolites in rats. *Cancer Res.*, **57**, 1934-1938 (1997).
- 44) T. Terasaki, A. Tsuji, and Y. Sugiyama, Blood-brain barrier: From static wall to dynamic interface, Recent advances in drug delivery to the brain 1. *Pharm. Tech. Japan*, **10**, 375-387 (1994).
- 45) J. D. Fenstermacher, Pharmacology of the Blood-Brain Barrier, in "Implications of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation," Vol. 1, Basic Science Aspects, ed. by E. A. Neuwelt, Plenum Press, New York (1989), pp. 137-155.
- 46) A. Tsuji and I. Tamai, Blood-brain barrier function of P-glycoprotein. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, 287-298 (1997).
- 47) A. H. Schinkel, J. J. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. te Riele, and P. Borst, Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**, 491-502 (1994).
- 48) H. Kusuhara, H. Suzuki, T. Terasaki, A. Kakee, L. Lemaire, and Y. Sugiyama, P-glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 574-580 (1997).
- 49) A. H. Schinkel, E. Wagenaar, C. A. A. M. Mol, and L. van Deemter, P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2517-2524 (1996).
- 50) T. Shoshani, S. Zhang, S. Dey, I. Pastan, and M. M. Gottesman, Analysis of random recombination between human MDR1 and mouse Mdr1a cDNA in a pHaMDR-dihydrofolate reductase bicistronic expression system. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 623-630 (1998).
- 51) R. Evers, G. J. Zaman, L. van Deemter, H. Jansen, J. Calafat, L. C. Oomen, R. P. Oude Elferink, P. Borst, and A. H. Schinkel, Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J. Clin. Invest.*, **97**, 1211-1218 (1996).
- 52) H. Suzuki, T. Terasaki, and Y. Sugiyama, Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, 257-285 (1997).
- 53) Y. Sugiyama, H. Kusuhara, and H. Suzuki, Kinetic and biochemical analysis of carrier-mediated efflux of drugs through the blood-brain and blood-CSF barriers: Im-

- tance in the drug delivery to the brain. *J. Control. Rel.*, in press (1999).
- 54) B. Leininger, J. F. Ghersi-Egea, G. Siest, and A. Minn, *In vivo* study of the elimination from rat brain of an intracerebrally formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl-D-glucuronide. *J. Neurochem.*, **56**, 1163–1168 (1991).
 - 55) H. Suzuki and Y. Sugiyama, Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin. Liv. Dis.*, **18**, 359–376 (1998).
 - 56) M. Homma, H. Suzuki, H. Kusuhara, M. Naito, T. Tsuruo, and Y. Sugiyama, High affinity efflux transport for glutathione conjugates on the luminal membrane of a mouse brain capillary endothelial cell line (MBEC4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 198–203 (1999).
 - 57) T. Tatsuta, M. Naito, T. Oh-hara, I. Sugawara, and T. Tsuruo, Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20383–20391 (1992).
 - 58) H. Kusuhara, H. Suzuki, M. Naito, T. Tsuruo, and Y. Sugiyama, Characterization of efflux transport of organic anions in a mouse brain capillary endothelial cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 1260–1265 (1998).
 - 59) A. Regina, A. Koman, M. Piciotti, B. E. I. Hafny, M. S. Center, R. Bergmann, P. O. Couraud, and F. Roux, Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.*, **71**, 705–15 (1998).
 - 60) H. Suzuki, M. Homma, and Y. Sugiyama, Characterization of MRP family members expressed on the blood-brain barrier. Abstract of 2nd FEBS Advanced Lecture Course, ATP-binding Cassette (ABC) proteins: From multidrug resistance to genetic diseases, 1999.

Keywords: Pharmacokinetics, Drug design, Transporter, Drug interaction, Hepatic metabolism, Biliary excretion, Blood-brain barrier