ヒトにおける医薬品の肝毒性及び代謝物の *in vitro*, *in vivo* 予測評価系の構築に関する研究

佐能正剛

In Vitro and in Vivo Assessments of Drug-induced Hepatotoxicity and Drug Metabolism in Humans

Seigo Sanoh

*Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University;
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan.*

(Received June 23, 2015)

Drug-induced hepatotoxicity is of concern in drug discovery and development. Reactive metabolites generated by drug metabolizing enzymes in the liver contribute to the induction of hepatotoxicity. Therefore, drug-induced hepatotoxicity, drug metabolism, and pharmacokinetics were evaluated *in vitro* and *in vivo* in this pre-clinical study. First, hepatotoxicity was tested *in vitro* using three-dimensional hepatocyte cultures. Hepatocyte spheroids formed in the three-dimensional culture systems maintain various liver functions such as the expression of drug metabolizing enzymes. High dose exposure to acetaminophen (APAP) induces hepatotoxicity because of the formation of reactive metabolites by CYP. Using fluorescence imaging, we observed that cell viability and glutathione levels were reduced in hepatocyte spheroids exposed to APAP mediated by the metabolic activation of CYP. On the other hand, there are species differences in the expression of drug metabolizing enzymes and metabolite profiles between animals and humans. Therefore, chimeric mice transfected with human hepatocytes were used for the *in vivo* assessment of metabolic profiles in humans. We found that drug metabolism and pharmacokinetics mediated by CYP and non-CYP enzymes, such as UDP-glucuronosyltransferase and aldehyde oxidase, in chimeric mice with humanized liver were similar to those in humans. The combination of *in vitro* and *in vivo* assessments using spheroids and chimeric mice with humanized liver, respectively, during the screening of drug candidates may help to reveal hepatotoxicity induced by the formation of metabolites.

Key words—spheroid; hepatotoxicity; chimeric mice; hepatocytes; metabolite; pharmacokinetics**薬剤誘発性肝障害**

医薬品開発には莫大な開発費用と長い研究開発期間が必要である一方で、第 I 相、第 II 相、第 III 相試験と順調に開発が進み上市される成功確率は十分ではない。¹⁾ その中で、1991 年から 2000 年にかけて、ヒトにおける安全性が不十分であることが理由で開発が中止になるケースは多い。このことから医薬品開発の早期の段階で毒性を見極める必要があり、前臨床段階からヒトにおける医薬品候補化合物の安全性を予測するアプローチがなされてきた。

医薬品のヒトにおける毒性には、大きく 4 つのタイプに分類される。²⁾ 1 つ目は、薬効標的に係わる

タンパクなどとの相互作用により用量依存的に毒性が惹起されるケース、2 つ目は、反復投与後に惹起される特異体質性薬物毒性とよばれる免疫系を介した毒性であり、発現頻度が低く、用量依存性がないことから予測が難しいとされている毒性である。3 つ目として単回投与でも用量が上がると毒性が惹起されるケースで、この中には生成する反応性代謝物のタンパクへの結合や酸化ストレスなどが原因とされ、特に解熱鎮痛剤アセトアミノフェンがその代表医薬品となる。4 つ目は長期投与により、反応性代謝物が DNA と結合することにより惹起される発がん性や催奇形性などがあたる。

毒性の中でも多いのが薬剤誘発性の肝障害になる。抗腫瘍剤、解熱鎮痛剤、抗ウイルス剤、抗うつ剤、抗菌剤などで多くみられる。また臨床投与量もその肝毒性の頻度と関係することも分かっている。³⁾

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 (〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

e-mail: sanoh@hiroshima-u.ac.jp

本総説は、平成 26 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

薬剤誘発性肝障害には、薬物代謝酵素によって生成される代謝物が要因となるケースも多く知られる。このことから、ヒトにおいて生成する代謝物を予測するアプローチがなされてきた。ヒトの肝臓から調製した肝細胞、肝 9000×g 上清画分、肝ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 代謝試験系において生成される種々の医薬品代謝物を実際のヒトで検出される *in vivo* 代謝物プロファイルと比較し、プロファイルが一致した確率を示した Dalvie らの研究では、特に主代謝物の生成については 66–69% の予測精度を示し、更なる 2 次代謝物となると 12–56% までさらに精度は下がる。⁴⁾ 一般にヒト肝細胞、9000×g 上清画分、肝ミクロソーム画分は、調製時、凍結融解時や実験の段階において急激に薬物代謝酵素の活性が下がることが、*in vitro* 代謝プロファイルが *in vivo* を完全に反映していない原因と考えられ、薬物代謝酵素の発現、活性を維持させた新たな *in vitro* 評価系の構築が求められている。

In vivo に近い肝細胞の機能を恒常的に維持させる目的で様々な培養系や肝細胞の有用性が報告されている。マトリックスをコーティングさせ培養する単相培養やサンドイッチカルチャーなどの 2 次元培養系や、細胞塊を形成させたスフェロイド培養や足場細胞との共培養、培養液の流路系を組み合わせた培養や肝細胞実質細胞のみならず非実質細胞を共培養させた 3 次元培養系などがある。また使用する細胞も初代肝細胞だけでなく HepG2 などの種々の培養細胞を用いた報告もある。⁵⁾ この中で、肝細胞の 3 次元培養は、通常の 2 次元培養系と比較して、*in vivo* に近い環境を維持する培養系として注目されており、筆者の研究では、このうち初代肝細胞を用いたスフェロイド培養系に着目して研究を進めてきた。

肝細胞 3 次元培養系の構築

肝細胞の 3 次元培養系の構築にあたり micro-space cell culture plate (Elplasia[®], 株式会社クラレ) と呼ばれる 3 次元培養用プレートを用いた。このプレートの底面には、縦横 200 μm × 深さ 50 μm の格子状のコンパートメント敷き詰められており、そのコンパートメントに均一な大きさのスフェロイドを形成させることができるのが特徴である (Fig. 1)。

ラットの肝臓からコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離し、micro-space cell culture plate に播種し

Fig. 1. The Micro-space Cell Culture Plate (Elplasia, Kuraray Co., Ltd.) for Three-dimensional Culture

The plate contains regularly spaced square compartments (200 μm , length; 200 μm , width; 50 μm , depth) at the bottom of each well. Figure is adapted from Sanoh *et al.*, (2014).⁶⁾

たところ、播種後 3 日目から細胞が凝集し始め、播種後 5 日目には細胞塊 (スフェロイド) の形成が確認できた (Fig. 2)。肝臓から単離してすぐの肝細胞から、スフェロイドが形成されるまでの細胞内で発現する CYP や UDP-glucuronosyltransferase (UGT), sulfotransferase (SULT) などの薬物代謝酵素 (CYP1A2, CYP2B1/2, CYP3A1, CYP3A2, CYP2C6, CYP2E1, UGT1A1, UGT2B1, SULT1A1) mRNA の発現量を比較したところ、複数の CYP 分子種で mRNA 発現量が培養初期に一旦低下してしまうものの、スフェロイドを形成後は、どの薬物代謝酵素もその発現量は一定に維持することが分かった。⁶⁾

肝細胞 3 次元培養系を用いたアセトアミノフェンの肝毒性評価

次にスフェロイド培養系を用いて、薬物代謝酵素による代謝的活性化による肝毒性の評価系を構築することを目的に、アセトアミノフェン (acetaminophen; APAP) を検証化合物として用いた。APAP は、UGT や SULT によって抱合体が生成され解毒化され体外へ排泄されるが、CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 によって反応性代謝物 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) が生成する。これはグルタチオン-S-転移酵素によって、NAPQI グルタチオン抱合体 (acetaminophen-glutathione conjugate; APAP-GSH) が生成され解

佐能正剛

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・生体機能分子動態学研究室 助教 博士 (医薬学)。平成 14 年藤沢薬品工業 (株)、平成 17 年アステラス製薬 (株) 研究員。平成 21 年広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助手を経て平成 24 年より現職。

Fig. 2. Rat Hepatocyte Spheroids in the Micro-space Cell Culture Plate
1 day (A), 3 days (B), and 5 days (C). Figure is modified from Sanoh *et al.*, (2014).⁶⁾

Fig. 3 Representative Fluorescence Imaging of Live Cells in Spheroid after Exposure to APAP with or without 1-Aminobenzotriazole
Magnification objective lens 20 $\times$. Figure is modified from Sanoh *et al.*, (2014).⁶⁾

毒化されるが、臨床用量を超える高用量の APAP 曝露によって細胞内グルタチオンが減少してしまうことで NAPQI は生体内高分子と共有結合し、肝障害を引き起こすことが知られている。⁷⁾

本研究では、ラットの肝臓から単離した生存率が 90% 以上の肝細胞を用いた。肝細胞は 24 穴プレートの 3 次元培養用プレートに 1 ウェルあたり 2.5×10^5 cells の割合で播種し 5 日目でスフェロイドの生成を確認した。培養 7 日目に APAP を 24 時間曝露による細胞内 ATP 量の変動を調べたところ、APAP は 10–40 mM の間で濃度依存的に細胞内 ATP 濃度が減少することが分かった。また、10 mM APAP 曝露によってスフェロイド内 ATP 濃度は、コントロールの 75% まで減少したが、広範な CYP の阻害剤 1-aminobenzotriazole (ABT) 500 μ M 添加によって ATP 濃度はコントロールレベル程度まで増加した。⁶⁾

さらに、スフェロイドの内部での生細胞の指標となる蛍光プローブ Calcein-AM やグルタチオン濃度の指標となる monochlorobimane の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡によりスフェロイド内部を観察した。10 mM APAP 曝露によって、Calcein-AM の蛍光強度が減少しスフェロイドの形が崩れていくこと

も観察された (Fig. 3)。これら発光量を定量したところ、10 mM APAP 曝露においては、Calcein-AM の蛍光強度はコントロールの約 60% まで低下し、グルタチオンもコントロールの約 70% 程度まで減少したが、これらは、CYP の阻害剤 ABT 添加によってコントロールレベルまで増加した。⁶⁾

また、NAPQI の APAP-GSH の生成について質量分析装置を用いて調べたところ、スフェロイド内で APAP-GSH 体の生成がみられ、ABT 添加によって、その生成量は大きく減少したことから、スフェロイド内での CYP による NAPQI が生成されていたことが示唆された。⁶⁾

以上の結果から、3 次元肝細胞培養系を用いたイメージング評価において、APAP の CYP による NAPQI 生成と細胞内グルタチオンの減少に伴う細胞毒性は、スフェロイド内部で観察でき可視化定量が可能であることが分かった。今後は、アセトアミノフェンのような代謝物に毒性を有する医薬品評価化合物をさらに増やしながら、スフェロイド培養系で細胞毒性が発現する未変化体及び毒性発現の原因となる代謝物濃度が、ラット *in vivo* での毒性が発現する濃度 (肝臓中濃度) を反映しているかどうか検討をしていく必要もある。また、本研究では、

ラット肝細胞を用いた評価であるが、ヒトとの種差を考慮してヒト肝細胞を用いた評価も必要となるものの、APAPのように反応性代謝物の生成に伴い毒性を示す医薬品は多く報告されていることから、今後、創薬における代謝的活性化に伴う肝障害が懸念される医薬品の *in vitro* スクリーニング評価に有用となる可能性もあると考えている。

ヒト肝細胞移植キメラマウス

ヒトにおける医薬品の代謝物による毒性を見積もる場合、代謝物の生成の種差を考慮しなければならない。筆者は、ヒト肝細胞移植キメラマウス (PXB mice[®], 株式会社フェニックスバイオ) に着目し、ヒトにおける医薬品の薬物動態の予測評価を行った。

免疫不全と肝障害の性質を持ったキメラマウス (urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficiency mice; uPA/SCIDmice) にヒトの肝細胞を移植することにより作製された本マウスの肝臓は、約 80% がヒトの肝細胞に置換されており、ヒト型の薬物代謝酵素の発現が確認されている。⁸⁾ このことから、ヒト肝細胞移植キメラマウスは、種差の問題を克服したモデル動物になり得ると考え、研究では、本キメラマウスを用いた *in vivo* における医薬品の体内動態試験を行った。また、実験動物とヒトの種差を見積もるコントロールとして、同様に uPA/SCID マウスにラット肝細胞を移植し、マウスの肝臓がラットの肝細胞で構成されるラット肝細胞移植キメラマウスを用い同様の検討を行った。加えて、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓から新鮮な肝細胞を単離し、*in vitro* 代謝試験に用いた。

イブプロフェンのヒト肝細胞移植キメラマウスにおける薬物代謝プロファイル

ヒト肝細胞移植キメラマウスがヒトの体内動態を模倣したマウスであるかどうか確認するため、肝臓で発現する様々な薬物代謝酵素で代謝されることが知られる解熱鎮痛剤のイブプロフェンを用いた。イブプロフェンは CYP によってカルボキシイブプロフェンや 2-ヒドロキシイブプロフェン、さらに代謝が進んでそのグルクロン酸抱合体が、またイブプロフェンに直接カルボン酸にグルクロン酸抱合された代謝物やタウリン抱合をうけた代謝物も検出されることが報告されている。^{9,10)}

イブプロフェンのこれら代謝物の尿中排泄率をヒトとラットで比較したところ、良好な相関性はみられなかったことから ($r^2=0.471$)、ヒトとラットで排泄プロファイルに種差があることが分かった。ヒト肝細胞移植キメラマウスにイブプロフェンを投与し、同様に尿中に排泄される各代謝物排泄率をヒトで報告される排泄率と比較したところ、良好な相関が得られたことから ($r^2=0.863$)、尿中代謝プロファイルがヒトに反映していることが分かった。一方、ラットの肝細胞を移植したラット肝細胞移植キメラマウスと実際のラットについても比較したところ、こちらでも良好に相関していたことから ($r^2=0.928$)、イブプロフェンのラットとヒトにおける種差をそれぞれのキメラマウスが反映することが示唆された (Fig. 4)。¹¹⁾ 以上より CYP や non-CYP で代謝される医薬品の代謝物の定量予測に有用である可能性がある。

アルデヒドオキシダーゼで代謝される医薬品のヒト肝細胞移植キメラマウスの代謝物プロファイル

医薬品開発化合物 FK3453 (アステラス製薬株式会社) は、ラットでは比較的良好的なバイオアベイラビリティであったが、ヒトでは未変化体の曝露濃度はごくわずかであり、ヒトにおいて薬効が見込めないため開発が中止になった化合物である。一方、ヒト血中から FK3453 の部分構造であるアミノピリミジンが酸化反応をうける代謝物が多く検出されており、これは、ヒトにおいて高い活性を有する薬物代謝酵素 aldehyde oxidase (AO) によるものと考えられた。¹²⁾ FK3453 以外にも BIBX1382, Carbazepan, FK3453, RO-1 は、ヒトにおける AO の高い活性により未変化体血中曝露量、半減期が短くなり薬効が見込めず開発が中止になっている。また、SGX-523 は、AO で代謝される代謝物の生成に伴う腎毒性が惹起され開発が中止になった。¹³⁾ AO は、150 kDa の 2 量体のモリブデン含有酵素であり、酸化反応では、アルデヒド・含窒素複素環含有化合物を基質とし幅広い基質特異性がある。肝臓・肺・腎など幅広い組織分布がみられ、AO の内因性基質として、レチナールやピリドキサルが知られているが、詳細な生理学的意義は明確になっていない。哺乳類において、AOX1, AOX3, AOX3L1 及び AOX4 の分子種が同定され、特にヒト・サル肝臓では AOX1、マウス・ラット肝臓では AOX1,

Fig. 4 Comparison of the Amounts of Ibuprofen Metabolites (Ibuprofen Acyl Glucuronide, Ibuprofen Taurine Conjugate, Carboxy Ibuprofen, Carboxy Ibuprofen Glucuronide, 2-Hydroxy Ibuprofen, and 2-Hydroxy Ibuprofen Acyl Glucuronide) Excreted in Urine (percent of dose) after the Oral Administration of Ibuprofen in Chimeric Mice with Human Hepatocytes, Chimeric Mice with Rat Hepatocytes, Humans, and Rats

The comparisons are shown as follows: (A) humans versus rats, (B) humans versus chimeric mice with human hepatocytes, (C) rats versus chimeric mice with rat hepatocytes. (D) chimeric mice with human hepatocytes versus rat hepatocytes. Figure is modified from Sanoh *et al.* (2012).¹¹⁾

AOX3 が発現し、イヌ肝臓では発現していないといった種差が知られている。このことから、実験動物から直接ヒトの AO による体内動態を見積もることができないことから、AO が関連する医薬品のヒトにおける体内動態、毒性、薬効の予測評価系の構築が求められている。^{14,15)}

FK3453 をヒト、ラット肝細胞移植キメラマウスに投与したところ、尿・糞中から、AO、CYP や UGT によると考えられる 13 個の代謝物が検出された。このうち 4 個の代謝物は、ラット肝細胞キメラマウスで検出された。AO による代謝物の排泄量は、ラット肝細胞移植キメラマウスよりもヒト肝細胞移植キメラマウスの方が、やや大きい値を示した。また、肝細胞を移植したキメラマウスから単離したヒト及びラット肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験でもヒト肝細胞移植キメラマウス由来肝細胞の方が多く AO による代謝物が生成していた。このことから肝

細胞移植キメラマウスはラットとヒトにおける AO の種差を反映することが明らかとなった。¹⁶⁾

ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた医薬品の肝クリアランスの予測

CYP、UGT や AO などの薬物代謝酵素で代謝される医薬品 13 個 (dapsone, 6-deoxypenciclovir, diclofenac, fasudil, ibuprofen, ketoprofen, lamotrigine, mirtazapine, (S)-naproxen, salbutamol, sulindac, (S)-warfarin, zaleplon) をヒト肝細胞移植キメラマウスに投与し、そのクリアランスの予測性の評価を行った。これら医薬品 13 個をヒト肝細胞移植キメラマウスに投与後の血漿中濃度から算出される *in vivo* 肝固有クリアランスを実際のヒトの肝固有クリアランスと比較したところ、予測値と実測値は完全には一致しない化合物がみられたものの、概ね高い相関性がみられた ($r^2=0.754$) (Fig. 5).¹⁷⁾ 一方、ここに FK3453 のプロットを当てはめてみる

Fig. 5 Relationship of *in Vivo* Intrinsic Clearance ($CL_{int, in vivo}$) between Humans and Chimeric Mice with Human Hepatocytes after Administering 13 Test Compounds

Calculations were performed according to Sanoh *et al.* (2012).¹⁷⁾ Solid line shows the unity. Dotted line shows the 3-fold range of the unity. Figure is adapted from Sanoh *et al.* (2012).¹⁷⁾

と、高い肝固有クリアランス領域にプロットされることが分かり、ヒトでFK3453のバイオアベイラビリティが低いことを予測する結果を示すことが明らかとなった。¹⁸⁾

以上の結果より、マウスに肝細胞を移植したヒト肝細胞移植キメラマウスは、肝臓にヒトの薬物代謝酵素が発現されているため、ヒト型のCYP及びnon-CYPによる代謝物の定性的・定量的予測が可能であることが明らかとなった。またラット肝細胞移植キメラマウスも、ラットのプロファイルと比較し一致していれば、ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたヒトプロファイルの予測性もさらに高まると考えている。一方、代謝物の予測に留まらず、血中動態の指標となる肝クリアランスの予測も可能とであることが分かった。しかし、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓は、約20%程度マウスの肝細胞が残存しており、マウス肝細胞における代謝の寄与が大きい場合、予測を誤る可能性がある。このため、マウス肝細胞の寄与も十分考慮に入れて評価する必要もあると考えている。

総括

今回、*in vitro* 評価系において肝細胞スフェロイドを用いてAPAPを検証化合物に代謝とそれに基づく肝毒性を評価した。この結果から代謝物生成予測や肝毒性予測に有用な簡便な系として有効であることが期待される。また*in vivo*におけるヒト肝細

胞移植キメラマウスは種々の薬物代謝酵素で代謝される医薬品を検証化合物に用いた研究から、代謝物の生成予測ができる可能性が示された。また肝クリアランスの予測も概ね可能であることから、例えば血中濃度に依存した肝毒性における安全域算出にも有用である可能性もある。さらに、これらの成果は、臨床への橋渡し研究（トランスレーショナルリサーチ）の一環としても重要な知見となり得ると考えている。

謝辞 本研究は、広島大学大学院医歯薬保健学研究院の太田 茂教授の下で行われたものであり、太田先生を始め、同研究室の古武弥一郎准教授、また学生・卒業生みなさんに深く感謝御礼申し上げます。また、研究にご協力頂きました広島国際大学薬学部の杉原数美教授、田山剛崇講師、日本薬科大学の北村繁幸教授、株式会社クラレ、株式会社フェニックスバイオ、ディ・スリー研究所、アステラス製薬株式会社の皆様にも深く感謝申し上げます。

利益相反 佐能正剛（株式会社クラレ及び株式会社フェニックスバイオとそれぞれ共同研究の下、共同研究費を受領）。

REFERENCES

- 1) Kola I., Landis J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 711–716 (2004).
- 2) Smith D. A., Obach R. S., *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 267–279 (2009).
- 3) Chen M., Vijay V., Shi Q., Liu Z., Fang H., Tong W., *Drug Discov. Today*, **16**, 697–703 (2011).
- 4) Dalvie D., Obach R. S., Kang P., Prakash C., Loi C. M., Hurst S., Nedderman A., Goulet L., Smith E., Bu H. Z., Smith D. A., *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 357–368 (2009).
- 5) Gómez-Lechón M. J., Tolosa L., Conde I., Donato M. T., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **10**, 1553–1568 (2014).
- 6) Sanoh S., Santoh M., Takagi M., Kanayama T., Sugihara K., Kotake Y., Ejiri Y., Horie T., Kitamura S., Ohta S., *Toxicol. in Vitro*, **28**, 1176–1182 (2014).
- 7) James L. P., Mayeux P. R., Hinson J. A., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1499–1506 (2003).

- 8) Tateno C., Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki C., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K., *Am. J. Pathol.*, **165**, 901–912 (2004).
- 9) Shirley M. A., Guan X., Kaiser D. G., Halstead G. W., Baillie T. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**, 1166–1175 (1994).
- 10) Kepp D. R., Sidelmann U. G., Tjørnelund J., Hansen S. H., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **696**, 235–241 (1997).
- 11) Sanoh S., Horiguchi A., Sugihara K., Kotake Y., Tayama Y., Uramaru N., Ohshita H., Tateno C., Horie T., Kitamura S., Ohta S., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 2267–2272 (2012).
- 12) Akabane T., Tanaka K., Irie M., Terashita S., Teramura T., *Xenobiotica*, **41**, 372–384 (2011).
- 13) Hutzler J. M., Obach R. S., Dalvie D., Zientek M. A., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **9**, 153–168 (2013).
- 14) Garattini E., Terao M., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **8**, 487–503 (2012).
- 15) Sanoh S., Tayama Y., Sugihara K., Kitamura S., Ohta S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **30**, 52–63 (2015).
- 16) Sanoh S., Nozaki K., Murai H., Terashita S., Teramura T., Ohta S., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 76–82 (2012).
- 17) Sanoh S., Horiguchi A., Sugihara K., Kotake Y., Tayama Y., Ohshita H., Tateno C., Horie T., Kitamura S., Ohta S., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 322–328 (2012).
- 18) Sanoh S., Ohta S., *Biopharm. Drug Dispos.*, **35**, 71–86 (2014).