薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (4) 199-231 (1989)

生理学的薬物速度論モデルに基づく *in Vitro* レベルから *in Vivo* レベルでの
薬物体内動態の構築: 低分子医薬品からポリペプチド性化合物まで

杉山雄一

東京大学薬学部, 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

Reconstruction of Drug Dispositions *in Vivo* from *in Vitro* Studies Based
on Physiological Pharmacokinetic Modeling: From Low-molecular
Weight Drugs to Polypeptide Compounds

Yuichi SUGIYAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113, Japan

I initially reviewed successful attempts of us and others to reconstruct *in vivo* drug dispositions from *in vitro* biochemical parameters (representing the plasma binding and hepatic metabolism). Despite these successes, however, recent evidence suggests that several factors, which have been overlooked so far, should be also taken into consideration to facilitate more reliable predictions. Those include; (i) possible existence of diffusional barrier (membrane limited tissue distribution), (ii) uneven distribution of metabolizing enzymes along the blood flow path in the liver, and (iii) the so called protein-mediated transport mechanism. The details of each factor have been discussed mainly based on our recent observations. The studies have been also extended to the analysis of pharmacokinetics of polypeptide hormones. The kinetic analysis of receptor-mediated endocytosis (RME) of polypeptides has been focused on, on the basis of the observations of the kinetics of epidermal growth factor (EGF) in the liver. The experimental systems include the *in vitro* isolated hepatocytes, perfused rat liver, and *in vivo* system, and the kinetic parameters representing the interaction of EGF with the cell surface receptors have been compared among the experimental systems.

Keywords—physiological pharmacokinetic model; clearance; intrinsic clearance; plasma protein binding; multiple indicator dilution method; protein-mediated transport; *in vitro/in vivo* correlation; animal scale-up; epidermal growth factor; receptor-mediated endocytosis; down-regulation

はじめに

グルコース, 脂肪酸等の生体必須物質の生体内での代謝マップが明らかにされてきた過程を振りかえると, *in vitro* 試験管レベルでの実験的支持が必ずあった. しかしながら, これら *in vitro* 実験の主目的は, 代謝経路及び, 関与する酵素の種類を明らかにすることであり, 必ずしも定量性を目指したものではなかった. 医薬品の体内動態を調べる際には, その動態, 代謝マップを明らかにすることの重要性は言うまでもないが, さらに生体内での代謝速度, 体内からの消失速度を定量的に予測することも不可欠である. ヒトにおける *in vivo* での実験には制限のあること, 特に新薬の開発過程においては, 膨大な動物実験データを得た後に, 始めてヒトでの投薬が可能になることを考えると, *in vitro* 実験データから, *in vivo* 個体レベルでの薬物体内動態を定量的に予測することは, 新薬開発に携わるものにとって 1 つの夢であろう. 近年の生理学的薬物速度論の発展によって, このことを単なる夢物語ではなく, ある程度実現性のある話として取り扱うことが可能となった. 我々は, ここ約 10 年間, この問題にチャレンジを試み, 充分に実現可能であるという実感を得たと同時に, これから解決すべき幾つかの問題点にも直面した. また, 低分子医薬品のみでなく, これからの医薬品のソースとして期待されている生理活性ペプチドの体内動態についても, 同様にアプローチを開始した. そこで, 本稿においては, 我々の研究結果を

中心に、薬物動態に関する *in vitro/in vivo* scalings の可能性について考えてみたい。

1. 低分子医薬品の体内動態の *in Vitro* から *in Vivo* の予測

1-1. 生理学的薬物速度論の考え方¹⁻⁴⁾ 従来からのコンパートメントモデルは速度定数、分布容積などのパラメータの持つ意味が曖昧であったため、薬物動態を支配する機構の解明には無力であった。この反省のもとに発展してきたモデルが生理学的モデル (physiological pharmacokinetic model) である。Fig. 1 に示すように、本モデルにおいては、実存する種々の生化学的機構 (薬物代謝、排泄 (腎排泄、胆汁排泄)、蛋白結合) や、生理解剖学的機構 (組織体積、血流速度) を組み込み、これらの各機構がどの程度、個体での薬物動態に寄与するかを評価することができる。図中の薬物動態の構築過程に示されるように、生化学的パラメータが、適切な *in vitro* 実験により測定可能であれば、このプロセスに従って、*in vivo* での薬物動態を予測することも可能となる。更には、個々のパラメータの変動を何らかの方法により推定することができれば、生理的、病態的な変動、動物実験の結果からヒトにおける体内動態の予測 (アニマルスケールアップ)、構造活性相関論的手法による類似化合物の体内動態の予測を可能にする道が開けることになる。

生理学的モデルは、その後、Rowland ら^{5,6)}、Wilkinson ら^{7,8)}により、“clearance concept” に基づいた pharmacokinetics へと発展していった。この発展により、従来のコンパートメントモデルにおける速度定数、分布容積などのパラメータと、生理学的モデルにおける生化学的、生理解剖学的パラメータとの対応が明確になったという意味で、その貢献は大きい。

薬物の肝臓での代謝を *in vitro* から *in vivo* へ構築するプロセスは、大きく 2 つよりなり、*in vitro* 試験管レベルから、還流組織レベルへの構築過程と、さらに組織レベルから *in vivo* 個体レベルへの構築過程である。後者の過程は比較的容易であり問題点は少ないのに対して、前者の過程には、考慮すべきいくつかの重要な点がある。ひとつは、*in vivo* に近い *in vitro* の実験条件を設定することであり、第 2 は、当該の薬物代謝に関する組織 architecture 情報 (組織細胞への透過性、薬物代謝酵素の局在性など) であり、第 3 は、組織分布、代謝を記述す

Fig. 1. Methods to Reconstruct *in Vivo* Drug Dispositions from *in Vitro* Data

る数学モデルの選択である。以下、これら各プロセスについて記述する。

1-2. *In Vitro* 肝代謝能の組織レベルへのスケールアップ⁸⁻¹¹⁾ *In vitro* 代謝実験より得たパラメータを 1 g 肝あたりのパラメータに変換することが必要である。この際、代謝の飽和しない線系領域を取り扱う時は、1 g 組織あたりの肝代謝固有クリアランス (CL_{int}) へと変換し、代謝飽和を考慮する必要がある場合には、最大反応速度 (V_{max})、Michaelis-Menten 定数 (K_m) を分離して求めることが重要である。両パラメータの間には、

$$CL_{int} = V_{max}/K_m \quad (1)$$

の関係が成立する。P-450 による代謝を受ける薬物の場合について述べると、分離ミクロソーム、9000 g 上清、分離肝細胞などを用いて代謝反応初速度が測定される。この時、pH、金属イオン濃度、補酵素 (NADPH) 濃度、酸素分圧などについて、できるだけ生理的な環境を保つことが重要である。薬物の初濃度を種々変化させて、反応初速度を測定して得られるデータを処理することにより、 K_m (μM)、及び V_{max} (nmol/min/mg·protein) を得る。しかるのちに、当該標品 (例えば、ミクロソーム) における酵素 (この場合、P-450) の回収率を考慮することにより、 V_{max} を 1 g 肝臓あたりのパラメータに変換する。ラットの場合、1 g 肝あたり 33.8 nmol P-450 が存在するとして処理される。分離肝細胞を用いる場合には、1 g 肝の持っている細胞数 (ラットの場合、 1.25×10^8) を考慮して変換する。これらの実例、及び詳細については、原報¹²⁻¹⁵⁾ 他の解説書^{3,16)}を参照されたい。

1-3. *In Vitro* 系から還流肝の系へ、代謝クリアランスの橋渡しをするためのモデル^{2,8,17-19)} 肝還流系で直接得られる情報は、例えば single-pass の定常状態の実験系を考えると、臓器へ流入する薬物濃度 (C_{in}) と、臓器から流出する薬物濃度 (C_{out}) の差であり、この情報より肝での availability (F_h)、extraction ratio (E_h)、肝クリアランス (CL_h) という一次パラメータが次の関係より得られる。

$$F_h = C_{out}/C_{in} \quad (2)$$

$$E_h = 1 - F_h = 1 - C_{out}/C_{in} \quad (3)$$

$$CL_h = Q_h \cdot E_h \quad (4)$$

ここで、 Q_h は肝血流速度 (還流速度) を表す。これら一次パラメータと肝代謝固有クリアランス (CL_{int}) の間を連結するためには、数学的モデルを用いることが必要である。今、薬物の肝細胞への分布速度が肝血流速度に比べはるかに速く (瞬時平衡の仮定)、蛋白と結合していない薬物のみが、細胞膜透過、及び代謝に関与するものと仮定すると、一次パラメータは、 Q_h 、 CL_{int} 及び血中 (還流液中) の非結合型分率 (f_B) の関数として以下のように表現されることが明らかにされている。この関係は、用いる数学モデルにより異なり、Fig. 2 に示す各モデルに基づいて順次、解説する。

(A) Well-Stirred Model (Venous Equilibration Model)⁵⁻⁷⁾——門脈、肝動脈より流入した薬物は、sinusoid 中で流れ方向 (門脈側→肝静脈) に瞬時の攪拌が生じるため、その方向の薬物濃度勾配は存在しないと考えるモデルである。 CL_h 及び F_h は、Table I 中に示される式 (Eq. (6), (5)) で表される。したがって、肝血流速度に較べて、薬物代謝能力 (CL_{int}) が非常に大きい時、小さい時には、Eq. (6) はそれぞれ、次ぎに示す Eq. (15), (16) のように表現できる。 $Q_h \ll f_B CL_{int}$ (肝血流速度の時):

$$CL_h = Q_h \quad (15)$$

$Q_h \gg f_B CL_{int}$ (固有クリアランス律速の時):

$$CL_h = f_B \cdot CL_{int} \quad (16)$$

(B) Parallel-Tube Model (Sinusoidal Perfusion Model)^{6,22)}——1 本の sinusoid を円筒とみなし、肝は同一の肝代謝能を持った同一血流、同一サイズの円筒が平行に連結したものと考えるモデルである。Sinusoid 中で、流れ方向には全く混合、攪拌が生じないことを仮定しているため、門脈側から、肝静脈側にむけて、薬物濃度勾配が必然的に生じることになる。 CL_h 及び F_h は、Eqs. (8), (7) で表される (Table I)。この場合も極限をとると、well-stirred model 同様 Eq. (8) はそれぞれ、Eqs. (15), (16) へと変形できる。固有クリアランスの概念、定義は、いずれのモデルを用いても、

Fig. 2. Organ Perfusion Models Used for the *in Vitro/in Vivo* Scaling²⁰⁾

Column A shows the concentration/length profiles along the hepatic sinusoid, and column B is the output concentration/time profile.

TABLE I. Equations Describing the Relationship between the Hepatic Clearance (CL_h) or Hepatic Availability (F_h), and the Intrinsic Clearance (CL_{int}), Blood Unbound Fraction (f_B), and Hepatic Blood Flow (Q)

Model ^{a)}	F_h (Availability)	CL_h (Clearance)
Well-stirred model (Venous equilibrium)	$= \frac{Q}{Q + f_B \cdot CL_{int}}$ Eq. (5)	$= \frac{Q \cdot f_B \cdot CL_{int}}{Q + f_B \cdot CL_{int}}$ Eq. (6)
Parallel-tube model (Sinusoidal perfusion)	$= \exp \{-f_B \cdot CL_{int}/Q\}$ Eq. (7)	$= Q \cdot [1 - \exp \{-f_B \cdot CL_{int}/Q\}]$ Eq. (8)
Distributed model ^{b)}	$= \exp \left\{ -\frac{f_B \cdot CL_{int}}{Q} + \frac{1}{2} \varepsilon^2 \left(\frac{f_B \cdot CL_{int}}{Q} \right)^2 \right\}$ Eq. (9)	$= Q \left[1 - \exp \left\{ -\frac{f_B \cdot CL_{int}}{Q} + \frac{1}{2} \varepsilon^2 \left(\frac{f_B \cdot CL_{int}}{Q} \right)^2 \right\} \right]$ Eq. (10)
Dispersion model ^{c)}	$= \frac{4a}{(1+a)^2 \cdot \exp [(a-1)/2 \cdot D_N] - (1-a)^2 \cdot \exp [-(a+1)/2 \cdot D_N]}$ Eq. (11)	$= Q \left[1 - \frac{4a}{(1+a)^2 \cdot \exp [(a-1)/2 \cdot D_N] - (1-a)^2 \cdot \exp [-(a+1)/2 \cdot D_N]} \right]$ Eq. (12)

a) Schematic descriptions are shown in Fig. 2. b) Bass *et al.*¹⁹⁾ The definition of ε is described in the text. c) Roberts and Rowland.²⁰⁾ In these equations, $a = (1 + 4R_N \cdot D_N)^{1/2}$ Eq. (13), where R_N (efficiency number) $= f_B \cdot CL_{int}/Q$ Eq. (14).

CL_{int} = 代謝速度 (あるいは, removal rate)/代謝の生じる部位での肝臓中非結合形薬物濃度 ($C_{L,u}$) (17)

であるが, その絶対値は用いるモデルにより違って来る. これは, 組織への入口, 出口中の薬物濃度が決っていても, モデルに依存して, 入口から出口への薬物濃度勾配が異なり, したがって, $C_{L,u}$ が異なることに由来する. **Well-stirred model** においては, 代謝の駆動力である $C_{L,u}$ は, C_{out} に f_B を乗じたものであり, **parallel-tube model** では, 入口, 出口の対数平均濃度 ($\bar{C}$) に f_B を乗じたものである.

$$\bar{C} = (C_{in} - C_{out}) / \ln(C_{in}/C_{out}) \quad (18)$$

$\bar{C} > C_{out}$ であることを考えると, ある値の肝クリアランス (CL_h) が与えられた時, **well-stirred model** より計算されてくる CL_{int} は, **parallel-tube model** より計算される CL_{int} よりも, 大きいことになる. また, この違いは, CL_h が大きいほど顕著になることが理解される. 逆に言えば, *in vitro* 実験から得られた CL_{int} より Eqs. (6), (8) に基づいて, CL_h を計算すると, **parallel-tube model** より計算される CL_h が **well-stirred model** より計算される CL_h よりも必然的に大きいことになる. したがって, CL_h の大きい薬物 (E_h が 0.5 を越える薬物) について, *in vitro* から *in vivo* への scaling を行う場合には, モデルの選択が重要となる. この後に述べる 2 つのモデルでは, *in vitro* の CL_{int} より計算される CL_h は, 上述の両モデルで予測される値の中間値をとることが理論的に証明され, 実際, 後に実例 (Table II, Fig. 3) を用いても示される.

(C) **Distributed Sinusoidal Perfusion Model**^{19, 22-24)}——1 本 1 本の sinusoid の持つ血流速度 (q), 固有クリアランス (CL_{int}) には分布があると考えて, sinusoidal perfusion model を拡張させたものであり, 現実の生理解剖の実体に近いモデルといえる. 今, 肝全体の sinusoid が n 個のグループに分類され, 1 つ 1 つのグループは, 同一の CL_{int}/q 値を持つ sinusoid 群から成ると考え, 1 つのグループでの全血流速度, 全固有クリアランスを, それぞれ, $Q^{(n)}$, $CL_{int}^{(n)}$ とする. したがって, 肝全体での血流速度 (Q), 固有クリアランス (CL_{int}) は,

$$Q = \sum Q^{(n)} \quad (19)$$

$$CL_{int} = \sum CL_{int}^{(n)} \quad (20)$$

と表される. 1 本 1 本の sinusoid の持つ CL_{int}/q の肝全体における分布性に関する分散 ϵ^2 は次式で示される.

$$\epsilon^2 = \sum_n \frac{(CL_{int}^{(n)}/CL_{int})^2}{Q^{(n)}/Q} - 1 \quad (21)$$

Eq. (21) より, ϵ^2 はすべての sub-organ が同一の $CL_{int}^{(n)}/Q^{(n)}$ を持つ時にゼロとなることがわかり, 肝消失に関する組織の heterogeneity の指標として用いられる. 組織 heterogeneity の小さい時 ($\epsilon^2 \ll 1$) には, CL_h 及び F_h は, Eqs. (10), (9) で表される (Table I). 上記の理論は, Bass ら^{19, 22)}により展開され, ϵ^2 の値として, 0.12—0.14 が報告されている.

別のアプローチとしては, sinusoid の分布を種々の関数で近似する方法があり, 正規分布, 対数正規分布, ガンマ分布などを仮定して, 理論展開がなされている.^{18, 23, 24)} このように, distributed model は, 生理的実体をかなり反映したモデルであるが, 数学的取り扱いが複雑であるため, これまで, その応用が後述の multiple indicator dilution (MID) データの解析などの場合に限られていた.²⁵⁾

(D) **Dispersion Model**^{18, 20)}——最近, Robert, Rowland^{18, 20)} により pharmacokinetics の分野に導入されたモデルであり, 肝の血管系を 1 本の管とみなし, 流れ方向の混合拡散 (dispersion) が或程度生じると考え, その程度を表すパラメータとして dispersion number, D_N を導入する. 本モデルに基づく, CL_h , F_h は Eqs. (12), (11) のように表される (Table I). Eq. (12) において, D_N を ∞ , 及びゼロに近付けると, CL_h は, それぞれ, Eqs. (6), (8) に近似されることから, このモデルが **well-stirred model** と **parallel-tube model** の両方を包含するモデルであることが理解される. 更には, D_N 値が比較的小さい時には, 混合拡散は, 正規分布のパターンに近似され, Eq. (12) は, Eq. (22) へと単純化され, Bass のいう distributed model と同一形式の式 (Eq. (10)) へと変形される.

$$CL_h = Q[1 - e^{-(R_N + R_N^2 \cdot D_N)}] \quad (22)$$

モデル間の優劣に関する議論が, 繰り返しなされている.²⁶⁾ 肝の生理解剖を考える時, たとえ distributed

model を用いても、完全に実体に対応しているとは言い難い。重要なことは、“何をどこまで明らかにしたいか”ということによって、モデルは異なることがあることを認識することである。例えば、肝抽出率が小さい薬物 ($E_h < 0.5$) においては、どのモデルを用いても予測性に大差は無いが、肝内の濃度勾配 (門脈側から肝静脈側への) を問題にする時には、well-stirred model は適していない。後に示す実例を用いて、*in vitro* から *in vivo* への scaling を行う時には、どのモデルが適切かを考えてみたい。

1-4. 還流組織の系から、*in Vivo* の系へのクリアランスの橋渡し^{1-4,27)} *In vivo* の系で評価できるクリアランスは全身クリアランス (CL_{tot}) であり、静脈内に薬物を 1 回投与、あるいは定速注入を行い、循環血を採血することにより、次式により求めることができる。

1 回 bolus 投与の場合 (投与量, Dose):

$$CL_{tot} = \text{Dose} / AUC \quad (23)$$

Infusion の場合 (Infusion 速度, I):

$$CL_{tot} = I / C_{ss} \quad (24)$$

ここで、 AUC , C_{ss} はそれぞれ、血中濃度下面積、定常状態血中濃度を示している。今、多くの薬物で見られるように、薬物は肝と腎でのみ代謝、排泄を受けるものと仮定すると、 CL_{tot} は肝クリアランス (CL_h) と腎クリアランス (CL_r) の和として表される。

$$CL_{tot} = CL_h + CL_r \quad (25)$$

CL_r は、尿管腔での代謝、分解を無視できれば、尿排泄、血中濃度のデータを用いて見積ることができるので、1 回 bolus 投与のデータを用いて、Eq. (26) より腎外クリアランスとしての CL_h を計算できる。

$$CL_h = (\text{Dose} - \text{尿排泄量}) / AUC \quad (26)$$

もしも、臓器還流の実験より肝、腎でのクリアランス (CL_h , CL_r) が得られれば、Eq. (25) より *in vivo* でのクリアランスに変換が可能となる。また、*in vitro* のデータより CL_{int} が得られれば、前述の方法により CL_h , CL_r を各モデルに対応して計算できるので、*in vivo* でのクリアランスを構築できることになる。

1-5. *In Vitro* 系から還流系、あるいは *in Vivo* 系での肝代謝クリアランスを予測した実例^{2,3,8,10,11)} 我々のデータを含め、現在まで、肝で P-450 により代謝される薬物で *in vitro*, 還流, *in vivo* 系でのデータが報告されているものについて、上述 (1-1—1-4) の方法論に従い、*in vitro* からの scaling を試みた結果を Table II, Fig. 3 にまとめた。血中及び還流液中の蛋白結合に関する非結合形分率は、*in vitro* での結合実験より見積もられた。Table II に示されるように、肝抽出率 (E_h) は、広い範囲 (0.01—0.99) で、比較的良好な予測が可能であることがわかった。各モデルによる予測性の違いは、高クリアランス薬物の F_h において最も大きく現れるはずである (1-4 を参照されたい)。したがって、Fig. 3 には各モデルに基づいて *in vitro* データから見積もられた F_h と、還流系, *in vivo* 系で実測された F_h との対応も図示した。高クリアランス薬物 (すなわち、 F_h の小さい薬物) においては、実際の代謝速度は、*in vitro* データを基に、well-stirred model により予測されるよりも、大きい値 (F_h は小) が、また、parallel-tube model により予測されるよりも小さい値 (F_h は大) が得られた。一方、dispersion model あるいは、distributed model は、ほぼ同程度の予測値を与え、それは実測値にも近いものであった。この事実より、少なくとも P-450 代謝については、これら両モデルにより、*in vitro* からの予測がかなりの確率で可能になることが示された。予測性の良くなかった薬物については、*in vitro* 系での実験条件が *in vivo* 条件を反映していなかったか、あるいは、後述する (第 2 項) いくつかの要因が考慮されていなかったなどの原因が考えられ、今後の解明が待たれる。

杉田^{13,33,34)} は、同様のアプローチを、体内動態における薬物間相互作用の定量的解析に応用し、成功を収めているので紹介しよう。糖尿病薬トルブタマイド (TB) とサルファ剤 (SA) の薬物間相互作用は、古くからヒトにおいて副作用を生じさせる例として、また、動物実験ではその相互作用に種差が顕著に現れる例として知られていた。ラットではヒトと同様に、スルファフェナゾール (SP) により、TB の血中半減期 ($t_{1/2}$) は延長し、全身クリアランス (CL_{tot}) は大きく低下する。一方、ラビットでは TB の CL_{tot} はむしろ若干 (15—30%) 増加し、 $t_{1/2}$

TABLE II. Comparison of Hepatic Extraction Ratios (E_h) for Various Drugs Determined from Perfusions of Isolated Rat Livers or from *in Vivo* Experiments, and Those Predicted from *in Vitro* Studies with Rat Liver Subcellular Fractions¹¹⁾

Drugs	Observed E_h		Observed <i>in vitro</i> $f_B \cdot CL_{int}/Q$	E_h predicted from <i>in vitro</i> data ^{a)}			
	Perfused liver	<i>In vivo</i>		I	II	III	IV
Alprenolol	0.98		11.75	0.95	1.00	0.97	0.998
Antipyrine	0.01		0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Carbamazepine	0.04		0.055	0.05	0.05	0.05	0.04
Diazepam ^{b)}		0.65	1.63	0.62	0.80	0.77	0.74
Ethoxybenzamide ^{c)}		0.12	0.10	0.09	0.095	0.095	0.094
		0.51 (rabbit)	1.50	0.61	0.78	0.76	0.73
Hexobarbitone ^{d)}	0.33		0.80	0.44	0.55	0.53	0.52
5-Hydroxytryptamine	0.59		1.41	0.59	0.76	0.72	0.70
Lignocaine	0.995		8.20	0.89	1.00	0.985	0.992
Pethidine	0.976		4.25	0.81	0.986	0.958	0.949
Phenacetin	0.91		1.89	0.65	0.85	0.81	0.79
Phenytoin	0.33		1.00	0.50	0.63	0.61	0.59
Propranolol	0.98		5.00	0.83	0.993	0.970	0.965
Thiopental		0.14	0.19	0.16	0.17	0.17	0.17
Tolbutamide ^{e)}		0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

a) I, Venous equilibrium model; II, sinusoidal perfusion model; III, distributed model and IV, dispersion model.

The tables reported by Rane *et al.*²⁸⁾ and Roberts and Rowland²⁹⁾ were modified with some additional data. Other data sources are as follows:

b) Igari *et al.*,³⁰⁾ c) Lin *et al.*,³¹⁾ d) Igari *et al.*,³²⁾ e) Sugita *et al.*³³⁾

In the analysis by the dispersion model, the dispersion number (D_N) of 0.17 was used²⁹⁾ and in the analysis by the distributed model, the value (ε^2) of 0.12 was used as the square of the coefficient of variation of the distribution of V_{max}/Q (Q : blood flow) over all the sub-organs¹⁹⁾.

Fig. 3. Correlations between the Hepatic Extraction Ratio (A) or Availabilities (B) Observed in a Perfused Rat Liver (or *in Vivo*) and Those Predicted from *in Vitro* Experiments

Drugs used are shown in Table II, and each point in the figure corresponds to each drug. (●), venous equilibrium model; (○), sinusoidal perfusion model; (■), distributed model; (□), dispersion model.

はほとんど変化しなかった。TB のような低クリアランス薬物では、 CL_{tot} は Eq. (16) のように、 f_B と CL_{int} の積で表される。したがって、限外ろ過法及び肝ミクロソームを用いた無細胞系結合実験、代謝実験により、それぞれ f_B と CL_{int} を分離して評価し、それを基に、*in vivo* での CL_{tot} の再構築を試みた。結果を Fig. 4 に

Fig. 4. Prediction of the Change in Total Body Clearance (CL_{tot}) of Tolbutamide (TB) Induced by Sulfonamides (SA)⁸⁴⁾

The prediction was made based on *in vitro* experiments measuring the blood unbound fraction (f_B) and the metabolic intrinsic clearance ($CL_{int}^{in vitro}$).

(A) Ratios of f_B (panel a), $CL_{int}^{in vitro}$ (panel b), and the predicted total body clearance ($CL_{tot,pred}^{in vitro}$) (panel c) in the presence of SA to those in the absence of SA. SP, sulfaphenazole, SDM, sulfadimethoxine. (B) Relationship between the ratios of CL_{tot} (CL_{tot} in the presence of SA/ CL_{tot} in the absence of SA) obtained from *in vivo* and *in vitro* experiments.

示すが、次のことが結論された。いずれの動物種においても、SA により TB の血中蛋白結合の阻害 (f_B の上昇)、肝 P-450 による代謝の阻害 (CL_{int} の減少) が生じるが、ラットでは CL_{int} の減少のほうが顕著であり、net 効果として CL_{tot} は減少し、一方、家兎では f_B の上昇と CL_{int} の低下がお互いの変動を相殺しあうため、net の CL_{tot} の変化はほとんど生じなかった。

同様のアプローチは、最近、医薬品の開発において問題になっている薬物動態における立体異性体効果の解明にも適用可能であり、実際、幾つかの研究発表もなされはじめている。⁸⁵⁾ また、医薬品開発の過程で、一連のアナログ類の体内動態を評価する必要性は多々遭遇すると思われる。この際も、本アプローチは有効であり、必ずしも *in vivo* 実験を実施することなく、*in vitro* 実験データのみから動態予測が可能になることを示唆する。基本化合物の体内動態が実際に測定されている場合には、この方法論の信頼性は更に増加するものと考えられる。

更に、このアプローチを発展させてゆくと、個々の生化学的パラメータ (f_B , CL_{int} など) を実測しなくても、定量的構造活性相関論 (QSAR) の手法により予測することで代用が可能なかもしれない。実際、Rowland ら⁸⁶⁾ 及び渉ら⁸⁷⁾ は、バルビタール類を用いて、個々の生化学的パラメータを QSAR により求めることにより、 CL_{tot} 、分布容積 (V_d)、血中半減期 ($t_{1/2}$)、肝初回通過率 (F_b) の予測を試み、ある程度の成功を収めている (Fig. 5)。従来からも、QSAR の手法により、薬物体内動態を予測する試みは行われてきたが、その多くは、最高血中濃度、消失速度定数などのように種々の機構の混成されたいわば hybrid parameter のままで相関がとられていたという欠点を有する。言い換えれば、動態を支配している素反応過程 (血中蛋白結合、組織結合、肝代謝固有クリアランスなど) を表すパラメータの段階で QSAR 解析を行い、後に再構築することが重要であろう。血中濃度を決めるこれらパラメータが本手法により求まり、更に、作用組織 (相) への透過速度 (例えば、脳血液関門の透過性) 及び、薬物受容体への結合性に関する QSAR 解析結果と統合されるならば、薬の物理化学的特性を知るのみで、体内に投与された薬物の体内動態、薬理効果の時間推移を予測できるという夢の実現につながることになる。個々の事柄については、QSAR 解析に多くの成功例が報告されており、^{88,89)} 必ずしも夢物語とは呼べない段階にあると思われ、今後の総合的研究が待たれる。

Fig. 5. Relationships between the Available Fraction of Barbiturates in Relation to Hepatic First-pass Metabolism Observed *in Vivo* and That Predicted from Lipophilicity ($\log P$)³⁷⁾

The solid and dotted lines represent values predicted from the well-stirred model (F_h) and the parallel-tube model (F_{h*}). See the bottom table for key to compounds.

Physicochemical properties of the barbiturates

Key	Common name	Substituents	pK_a	Lipophilicity	
				$\log P_{app}$	$\log P$
1	hexobarbital	5-cyclohexenyl-1,5-dimethyl	8.34	2.140	2.189
2	pentobarbital	5-ethyl-5-(1-methylbutyl)	8.11	1.519	1.600
3	cyclobarbital	5-ethyl-5-cyclohexenyl	7.50	0.702	0.965
4	amobarbital	5-ethyl-5-(3-methylbutyl)	7.94	1.522	1.636
5	allobarbital	5,5-diallyl	7.79	0.310	0.464
6	phenobarbital	5-ethyl-5-phenyl	7.41	0.334	0.629
7	barbital	5,5-diethyl	7.91	-0.229	-0.102

1-6. *In Vitro* 結合実験から *in Vivo* での分布容積の予測^{2,3,16)} 薬物の血中及び組織中濃度の時間推移を予測するためには、クリアランスのみでなく、主な分布組織への分布性を表すパラメータの予測が必要である。薬物消失の生じない一組織での分布モデルを基に *well-stirred model* に従って、物質収支式を書く。 C_{in} , C_{out} を組織への流入血液中薬物濃度、及び組織からの流出血液中薬物濃度、また、 V_T を組織体積、 C_T を組織中平均薬物濃度と定義すると、

$$V_T \cdot \frac{dC_T}{dt} = Q \cdot C_{in} - Q \cdot C_{out} \quad (27)$$

更に、 C_{in} は、循環血液中薬物濃度 (C_P) に等しく、 C_{out} を C_T/K_P におきかえると、

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{Q \cdot C_P}{V_T} - \frac{Q \cdot C_T}{V_T \cdot K_P} \equiv \frac{Q}{V_T} \cdot C_P - k_T \cdot C_T \quad (28)$$

ここで、 K_P 値は定常状態での組織 (C_T) 対 組織静脈血液中 (C_{out}) 薬物濃度比を示す。組織への透過速度は血流に比べて十分に速く、いわゆる分布に関する瞬時平衡の仮定が成立している場合を取り扱っている。Eq. (28) よりわかるように、瞬時平衡の仮定の成立する場合でも、循環血と組織中薬物が分布平衡に到達する時間は、速度定数 k_T の関数となり、 k_T は K_P 値に反比例し、組織還流速度 (Q/V_T) に比例する。寺崎⁴⁰⁾により、分布に関しても *well-stirred model* と *parallel-tube model* の比較がなされ、現実の薬物においては用いるモデルによる予測性の違いはほとんど無いことが示されている。

K_P 値を決める主要因として、血液、組織中高分子成分への結合性の他に、能動輸送性などがあり、次式により表される。

$$K_P = q \cdot \frac{f_B}{f_T} \quad (29)$$

ここで、 f_B, f_T はそれぞれ、血液中、組織中の非結合形分率を表し、*in vitro* 結合実験より測定可能である。また、 q は、細胞内外の非結合形薬物濃度比を表し、能動輸送性及び、イオン性化合物、弱酸、弱塩基性薬物の場合は、それぞれ膜電位、細胞内外 pH 差により支配されるパラメータである。

循環血液中薬物濃度を基準に身体全体での分布性を示すパラメータが、分布容積である。

薬物血中濃度推移の解析より得られる定常状態分布容積 (V_{ss}) は、次式により、実体と連結される。

$$\begin{aligned} V_{ss} &= V_B + \sum_{i=1}^n K_{P,i} \cdot V_{T,i} \\ &= V_B + f_B \cdot \sum_{i=1}^n \frac{V_{T,i}}{f_{T,i}} \\ &= V_B + f_B \cdot \frac{V_T}{f_{UT}} \end{aligned} \quad (30)$$

ここで、 V_B は血液体積、 $V_{T,i}, K_{P,i}, f_{T,i}$ は、それぞれ、組織 i における実質体積、 K_P 値、組織中非結合形分率を示す。また、 V_T は身体全体をまとめた時の血管外体積、 f_{UT} は全組織をまとめた平均非結合型分率を示す。

K_P 値を、*in vitro* 結合実験より推定した実例を幾つか示す。Lin⁽⁴¹⁾ は、ethoxybenzamide (EB) の血中及び組織中蛋白結合を平衡透析法により測定し、Eq. (29) に従い、各臓器での K_P 値を計算した。組織結合は希釈ホモジネートを用いて測定し、後に希釈率を補正し、intact 組織に対する結合率に変換した。また、EB は受動輸送を受け、中性物質であることから、 $q=1$ とおいた。こうして得られた *in vitro* K_P 値を *in vivo* で測定した K_P 値と比較したところ、Fig. 6 に示されるように、良好な予測性を与えることがわかった。

寺崎⁽⁴²⁾により、抗癌剤である doxorubicin (DOX) の各組織への分布機構が、Eq. (29) の考え方に従って、調べられた。まず、赤血球をモデル細胞としてその分布速度の pH-profile を調べ、非イオン型分子のみが細胞透過に関与していること、すなわち、pH-partition の仮説の成立することが示された。そこで、塩基性薬物である DOX の pK_a 値 8.15 を考慮し、 q 値として 2.3 を用いた。また、DOX が細胞内でほとんどが核分画に分布することから、各臓器中の DNA 濃度を測定したところ、*in vivo* の K_P 値と良好な相関関係が得られた。そこで、肝及び腎から分離した核への DOX 結合を測定し得られた結合解離定数 (K_d)、及び各臓器中の DNA 濃度をもとに K_P 値を再構築した。Fig. 7 に示されるように、

in vitro データより計算した K_P 値は、いずれの動物種においても良好な予測値を与えた。以上の事実は、DOX の組織分布においては、動物種、組織の違いによらず、組織中 DNA 濃度が主な支配因子であることを示唆している。また、矢田らの研究グループ⁽⁴³⁾は、同様のアプローチを脂溶性の高い塩基性薬物 (quinidine, など) の分布機構に対しても応用し、酸性のリン脂質が主な結合体であることを明らかにしている。

以上の手法を用いて、ヒトにおける身体全体の分布容積を予測することは、得られる組織に限界があるため困難である。そこで、沢田⁽⁴⁴⁾は、文献データをもとに、ラットを用いた実験データからヒトにおける分布容積の予測の可能性を調べた。この際、単純にラットとヒトの分布容積を 15 種の薬物で相関をとる場合と、Eq. (30) に基づいて、非結合形薬物の分布容積 (V_T/f_{UT}) に変換して相関をとる場合と比較したところ (Fig. 8)、明らかに、後者のほうが良い相関を示すこと、すなわち、種差の小さいことがわかった。この事実は、動物での V_T/f_{UT} 値と、

Fig. 6. Relationship between the Tissue-to-Plasma Concentration Ratios (K_P values) of Ethoxybenzamide Obtained from *In Vivo* Constant Infusion Study (Steady-State Measurements) and Those from *In Vitro* Binding Studies⁽⁴¹⁾

A solid line represents a 1 : 1 relationship.

Fig. 7. Comparison between *in Vivo* and *in Vitro* Tissue-to-plasma Concentration Ratios (K_p values) of Doxorubicin in Rats (A) Rabbits (B) and Guinea Pigs (C)⁴²⁾

Solid lines represent a 1 : 1 relationship.

Fig. 8. Correlation between the Distribution Volumes for Various Drugs between Rats and Human⁴⁴⁾

(A) The distribution volume for total drug (V) (hybridized parameter), $r=0.846$, $p<0.001$, and (B) that for unbound drug (V_T/fu_T) calculated by correcting for plasma protein binding (intrinsic parameter), $r=0.958$, $p<0.001$.

The numbering of the drugs is, (1) phenytoin, (2) hexobarbital, (3) pentobarbital, (4) phenylbutazone, (5) warfarin, (6) tolbutamide, (7) valproate, (8) phenobarbital, (9) amobarbital, (10) quinidine, (11) chlorpromazine, (12) propranolol, (13) pentazocin, (14) diazepam, (15) antipyrine.

ヒト血液を用いて *in vitro* で測定できる血中非結合形分率 (f_B) より, Eq. (30) を用いてヒトにおける分布容積が予測できることを示唆する.

1-7. *In Vitro* 生化学的パラメータから, *in Vivo* 血中, 組織中濃度推移の構築^{2,3,9-11)} Lin³¹⁾ は, EB について種々の生化学的パラメータ (血液中, 組織中成分への結合, 肝臓での代謝) を *in vitro* 実験より測定し (Table III), 生理解剖学的パラメータとともに生理学的モデルに組み込むことにより, 血中, 組織中の薬物濃度推移をシミュレートした (Fig. 9). ラットと家兎では, その血中濃度推移パターン及び投与量依存性の様相が大きく異なっているが, その推移をよく再現するシミュレーション結果が得られた. また, 組織中薬物濃度推移も実測値をよく反映する計算結果が得られた. 両動物種において, *in vitro* 測定結果に現れた最も顕著な違いは, 肝 P-450 による代謝パラメータに見られる. すなわち, ラット ($K_m=0.38$ mM) に比べて, 家兎でははるかに低い K_m 値 ($K_m=0.02$ mM) であり, この違いが家兎の血中濃度推移に顕著な非線形性 (投与量依存性) を生じさせた原因であることがわかった. Fitting という手法を用いず, *in vitro* 実験データのみを用いて計算したことを考えると,

TABLE III. Physiological and Biochemical Parameters Used in the Simulation

	Rat (body weight=250 g)			Rabbit (body weight=2.5 kg)	
	Volume (ml)	Blood flow (ml/min)	K_p	Volume (ml)	Blood flow (ml/min)
Venous blood	13.6	(total)		132.0	(total)
Arterial blood	6.8			66.0	
Lung	1.2	44.5	1.12	18.2	380.0
Liver	11.0	14.7	1.45	107.0	170.0
Kidney	2.0	11.4	1.48	16.1	56.2
Heart	1.0	4.2	1.12	6.4	13.6
Small intestine	11.1	12.0	0.68	128.8	88.6
Muscle	125.0	6.8	0.95	1200.0	86.9
Skin	43.7	4.5	1.15	250.0	16.0
Brain	1.2	1.1	1.06	6.6	6.78
Adipose tissue	10.0	1.8	0.87	128.8	30.5
V_{max1} ($\mu\text{mol/min/g}$ of liver)		0.124		0.0875	
V_{max2} ($\mu\text{mol/min/g}$ of liver)				0.1377	
K_{m1} (mM)		0.378		0.0186	
K_{m2} (mM)				1.060	
fu (unbound fraction in plasma)		0.67		0.5

Fig. 9. Simulated Curves and Observed Plasma Concentrations of Ethoxybenzamide after Bolus i.v. Administration in Rats (A) and in Rabbits (B)³¹⁾

The simulations were performed based on physiological pharmacokinetic modeling, and the parameters used for the simulations are shown in Table III. All the biochemical parameters representing hepatic metabolism and plasma and tissue bindings were obtained from *in vitro* studies.

驚くほど良い予測を与えることが示された (Fig. 9). しかし、家兎への高投与量 (80 mg/kg) 時の消失相においてシミュレーション曲線の実測値からの若干の隔たりが観察された. その原因として、種々の可能性を検討した結果、代謝における product-inhibition を疑い、実際に検討した.⁴⁵⁾ すなわち、代謝物であるサリシルアミド (SAM) をラビットに投与したところ、親化合物、EB の血中消失を遅延させることが明らかになった. SAM が EB 代謝を競合阻害すると仮定すれば、このデータより、その阻害定数 (K_i) は、0.14 mM と推定され、実際にこの機構を組み入れて再シミュレーションしたところ、Fig. 10 中の点線に示されるように、高投与量においても実

測値との良好な一致を示した。また、この product-inhibition は、ラビット肝 microsome を用いた *in vitro* 代謝実験によっても定量的に確認された。⁴⁶⁾ Lin により実施された本研究は、*in vitro* から *in vivo* への scaling を行うことにより、それまで隠されていた product-inhibition 機構が明らかにされた例として興味深い。

1-8. アニマルスケールアップ^{17,46,47)} 動物実験データからヒトにおける薬物動態が精度よく予測できれば、医薬品開発において強力な武器になることは言うまでもない。Dedrick ら⁴⁸⁾の先駆的な仕事に端を発して、Boxenbaum,⁴⁹⁾ 沢田ら^{44,50)}の研究により、体重との間のべき乗則 (allometric relationship) をもとに、この夢に対してのチャレンジがされた。その詳細については、他の解説書^{17,46,47)}を参照して頂くとして、結果を次ぎのようにまとめることができる。(1) Fig. 8 に 1 例を示したように、クリアランス、分布容積、半減期などの一次パラメータに対して allometric 式

$$Y=a(BW)^x \quad (31)$$

を適用するよりも、固有クリアランス (CL_{int})、非結合型薬物に対する分布容積 (V_T/fu_T) という固有パラメータに対して allometric 式を適用するほうが良い。(2) 腎クリアランスについては、その排泄機構 (濾過、分泌、再吸収) のいかによらず、allometric 式による予測性は良好であり、得られる指数項 (Eq. (31) 中の x) は、0.7—0.8 の範囲の値をとる。(3) 肝代謝に関する固有クリアランス (CL_{int}) は、少なくとも P-450 代謝をうける薬物についてはヒトを除いて良好な allometric 式に従い、ヒトにおいては、allometric 式による補外値の約 11% の値をとる。(4) P-450 以外の酵素による代謝、肝外代謝についての整理は未だ行われていない。

べき乗則に基づいたアニマルスケールアップの方法論は、確かに魅力的であり、これまで多くの成功例を収めてきた。しかしながら、べき乗則そのものが、経験則 (補外法) であり、例外の危険性がつきまとうことも事実である。消失機構が代謝である場合は特にこの可能性が大きい。例えば、ある医薬品が、ヒトを含めた動物種によって全く異なる代謝様式 (例えば、ある動物種では P-450 による代謝が主であるが、別の種では抱合代謝が主になるという場合) を示すケースも多々見られる。その意味で、この方法論は絶対的なものではなく、予測の確率を高めるものと考えるべきである。これに対して、今回示した *in vitro* から *in vivo* への scaling による方法論は、実際ヒトの組織を用いた代謝、結合実験に基づいた scaling が可能であり、より科学的に信頼度の高い方法論となる可能性が大きい。特に最近では、ヒトの肝を用いることのできる機会が増加していることを考えると、最も魅力的な方法論であると、筆者は考えている。

我々の教室では、ここに紹介した以外にも、生理学的モデル、及び “clearance concept” に基づいて、*in vitro* と *in vivo* の対応、アニマルスケールアップ、その他、薬物動態の解析を扱った多くの研究⁵¹⁾を行ってきた。その詳細は原報を参照されたい。

2. 薬物体内動態の再構築過程において組み入れる必要のある他の要因

ここまで述べてきた *in vitro/in vivo* scaling の実例は、次ぎに示す 3 つの仮定のもとで実施されてきた。すなわち、(i) 分布に関する瞬時平衡の仮定：(ii) 非結合形薬物のみが、細胞膜透過、代謝に関与するという仮定：(iii) 代謝に関与する酵素が、組織内で血流の方向に均一に分布しているという仮定である。最近、これら仮定が必ず

Fig. 10. Time Courses of Ethoxybenzamide (EB) and Its Metabolite, Salicylamide (SAM) in Plasma after the i.v. Injection of EB to Rabbits⁴⁵⁾

Broken and solid lines represent the theoretical curves calculated based on the physiological pharmacokinetic model with and without considering the product inhibition, respectively. Inhibition constant (K_i) of 0.14 mM was used for the simulation.

●, plasma concentration of EB after the i.v. injection of EB (80 mg/kg); ○, plasma concentration of SAM after the i.v. injection of EB (80 mg/kg); ■, plasma concentration of EB after the i.v. injection of EB (20 mg/kg); □, plasma concentration of SAM after the i.v. injection of EB (20 mg/kg).

しも成立しないケースが見だされており、今後これらの要因をモデルに組み込むことにより、予測性の向上することが期待される。以下、個々の要因について、最近の知見をもとに記述する。

2-1. 細胞膜透過プロセスが遅い場合^{2,11,47,52)} 瞬時平衡の仮定が成立しない場合でも、各モデル (1-3 を参照) に基づき、同じ形のクリアランス式が誘導される (Eqs. (5)–(12))。しかしながら、これら式中に用いられる固有クリアランスは、肝代謝過程のみを表すわけではなく、次式で表現されるように、膜透過性 (PA)、代謝能力の大きさ (CL_{int}) の両方を含む混成 (hybrid) パラメータとなり、いわばみかけの固有クリアランス (CL_{int}^{app}) と呼ぶことができる。

$$CL_{int}^{app} = \frac{PA_{influx} \cdot CL_{int}}{PA_{efflux} + CL_{int}} \quad (32)$$

ここで、PA_{influx}, PA_{efflux} はそれぞれ、取り込み過程、及び組織内から血液側への排出過程に関する膜透過クリアランスを示し、非結合形薬物に対して定義されたパラメータである。したがって、PA_{efflux} と CL_{int} の大きさを比較することにより、みかけの固有クリアランスは次ぎの 2 つの limiting case に分けられる。⁵²⁾

(i) CL_{int}^{app} の律速過程が代謝、排泄過程にある時 (PA_{efflux} ≫ CL_{int} の場合): Eq. (32) は、

$$CL_{int}^{app} = q CL_{int} \quad (33)$$

のように、変形される。ここで、 q は PA_{influx}/PA_{efflux} を表し、細胞膜透過の非対称性を示す。したがって、 $q=1$ の場合は、瞬時平衡の仮定のもとに誘導された全く同一の式へと単純化される。

(ii) CL_{int}^{app} の律速過程が取り込み過程にある時 (PA_{efflux} ≪ CL_{int} の場合): Eq. (32) は、

$$CL_{int}^{app} = PA_{influx} \quad (34)$$

と変形される。したがって、この場合は、*in vitro* の代謝データより得られる CL_{int} をそのまま、従来の式 (例えば、Eq. (6)) に代入して CL_h を求めると、真の CL_h を過大評価することになり、注意が必要である。直感的には、“細胞内に代謝酵素がどれほど大量に存在しても、細胞膜透過が遅ければ、効率良い代謝が進行しない”と理解できる。したがって、比較的小さい細胞膜透過クリアランスを示す薬物の *in vivo* 代謝活性を再構築するためには、代謝固有クリアランスを *in vitro* 実験より見積もるのみではなく、細胞膜透過性を定量的に評価することが必須となる。

Goresky ら^{25,53)}により、肝生理学の分野に導入された multiple indicator dilution 法 (MID 法) と命名される肝還流法は、CL_{int} のみならず、膜透過クリアランスを同時に評価できるという特徴を有し、*in vivo* と *in vitro* を橋渡しするための方法論として優れている。通常の肝還流法と同様の手術を施した後に、20% ウン赤血球を含む緩衝液を single-pass で還流する。目的化合物 (A) 及び、細胞外液 (Disse 腔と呼ばれる) への分布性が A と類似しており、かつ細胞内に分布しないと考えられる対照物質 (albumin, inulin, sucrose のラベル体がしばしば用いられる) の混液を門脈より瞬時投与 (約 0.2 ml) した後に、肝静脈よりの流出液を 0.5–1 s おきに採取し、両化合物の濃度の時間推移 (希釈曲線と呼ぶ) を測定する。得られたデータを distributed model に基づいて解析するが、その詳細は別記したので、^{16,17,54)} 参照されたい。直感的に考えれば、希釈曲線の形、大きさは、毛細血管の長さ、血流速度の分布性、及び取り込み (PA_{influx})、排出 (PA_{efflux})、細胞内 sequestration (CL_{int}) クリアランスの各大きさにより影響されるが、対照物質との比をとることにより、毛細血管の長さや血流の影響を消去することができ、次式のように表すことができる。

$$\frac{C_{ref}(t)}{C(t)} = \exp \left(\frac{PA_{influx}}{V_{ext}} \cdot t \right) + \text{returning material} \quad (35)$$

ここで、C(t), C_{ref}(t) はそれぞれ、目的化合物及び対照物質の流出 profile を示し、V_{ext} は細胞外液体積を示す。上式において、第一項は取り込まれないで流出した分子を、また第二項は一度細胞内に取り込まれた後に排出してきた分子を表す。第二項の形は複雑なためここでは省略したが、PA_{influx} のみならず、PA_{efflux} 及び CL_{int} の関数として表される。上式より理解できるように、対照物質と目的化合物の比の対数を時間に対してプロット (ln (C_{ref}/C) vs. time) すると、初期の傾きより PA_{influx} を計算することができ、このプロットは ratio plot と呼ばれる。

Fig. 11. Plot of the Natural Logarithm of the Ratio (^{125}I -HSA Outflow Fraction/4-MU Outflow Fraction) vs. Time (Designated as Ratio Plot) after the Bolus Injection of the Mixture (4-MU and ^{125}I -HSA) into the Portal Vein of Perfused Rat Liver⁵²⁾

Lines were calculated based on Eq. (35) by nonlinear least squares method, and the calculated parameters are listed in Table IV.

○, low dose of 4-MU (50 µg/rat); ●, high dose of 4-MU (3000 µg/rat).

TABLE IV. Rate-Determining Process of 4-MU Elimination in the Rat Liver

	Low dose (50 µg)	High dose (3000 µg)
Extraction ratio (E_h)	0.89	0.27 ^{a)}
$\text{CL}_{\text{int}}^{\text{app}}$ (ml/min/g)	6.24 (0.62)	2.08 ^{a)} (0.16)
P_{influx} (ml/min/g)	12.5 (1.3)	13.3 (2.1)
P_{efflux} (ml/min/g)	2.68 (0.48)	4.45 ^{a)} (0.63)
CL_{int} (ml/min/g)	2.68 (0.29)	0.89 ^{a)} (0.10)
$\frac{\text{CL}_{\text{int}}}{P_{\text{efflux}} + \text{CL}_{\text{int}}}$	0.52 (0.05)	0.18 ^{a)} (0.03)
Main rate-determining step of $\text{CL}_{\text{int}}^{\text{app}}$	Membrane transport and metabolism	Metabolism
Main rate-determining step of hepatic clearance (CL_h)	Hepatic blood flow	Metabolism

a) $p < 0.05$. The data in parenthesis show standard errors.

宮内⁵²⁾は、MID法を用いて、上記の“ $\text{CL}_{\text{int}}^{\text{app}}$ の律速過程”を解析することを試みたので、以下に紹介する。肝で抱合代謝されることの知られている化合物である、4-methylumbelliferone (4-MU)の投与量を変化させて得たratio plotをFig. 11に示した。両ratio plotの初期の傾きは、ほとんど変化していないのに対して、後半部は顕著な差異を示していることから、 $\text{PA}_{\text{efflux}}$ 、 CL_{int} が投与量依存的に変化することが示唆される。実際、希釈曲線をEq. (35)に非線形最小二乗法を用いてあてはめて得た結果(Table IV)もこの推察を支持するものであった。すなわち、4-MUの肝でのextraction ratio (E_h)は、投与量の増加に伴い、0.89から0.27へと大きく低下し、主な原因は、 CL_{int} の飽和によることが示された。さらには、得られた各クリアランス($\text{PA}_{\text{influx}}$ 、 $\text{PA}_{\text{efflux}}$ 、 CL_{int})を比較することにより、高投与量では、sequestration過程が律速過程となり、低投与量では、sequestration過程のみではなく、細胞膜透過過程も同程度に $\text{CL}_{\text{int}}^{\text{app}}$ を律速することが示された(Table IV)。一方、肝クリアランス(CL_h)から見れば、低投与量時には、肝血流速度が律速過程になると言える。更に、肝臓内の抱合代謝物の量を定量したデータに基づくその後の解析⁵³⁾により、MIDでとらえた4-MUのsequestration過程が抱合代謝に相当することも明らかになった。

しかしながら、MID法による測定時間が短いこと(数秒—数分)を考えれば、比較的遅い速度過程を捉えることは難しく、代謝過程の遅い化合物で得られるsequestrationクリアランス(CL_{int})が細胞内移行過程を表すこ

とも考えられ、注意が必要である。

その他、多くの化合物に対しての解析結果（文献情報も含む）を整理したところ、取り込み過程が CL_{int}^{app} の律速過程となっている化合物が以外に多いことがわかった。^{18,56)} 例えば、胆汁酸 (taurocholate), BSP, bilirubin, ouabain など¹⁶⁾ の他に、これまで、代謝過程が律速過程であると信じられてきた脂溶性化合物の propranolol においてさえも、低投与量においては取り込み過程の影響を無視できないことが示唆されている。⁵⁶⁾ このように MID 法は優れた評価法であるにもかかわらず、実験、解析ともにある程度の熟練性を要する。そこで、より簡便に実験、解析が行える遊離肝細胞の系で得られる取り込みクリアランスとの比較を、数多くの化合物を用いて行った (Fig. 12)。遊離肝細胞への取り込み初速度を測定した後、 1.25×10^8 cells/g liver を仮定し、1g 肝あたりの取り込みクリアランス (PA_{influx}) に変換し、MID による結果と比較した。¹¹⁾ Fig. 12 に示されるように、 PA_{influx} が小さい領域では、両者はほぼ同程度の値を示したが、大きい領域では、両者は解離を示し、MID 法により測定された値には、約 10–20 ml/min/g liver 程度の上限値の存在を示唆する結果が得られた。現在、宮内が、更に多くの化合物を用いて研究を続けており、上限値の存在を confirm する結果を得ている。⁵⁷⁾ この機構について、結論をだすには至っていないが、肝細胞外液 (Disse 腔) に存在するかもしれない非攪拌水相 (unstirred water layer) 中の拡散が全体の透過過程の律速段階になっている可能性が高い。遊離肝細胞の系においては、細胞の分散液を十分に攪拌した状態で、取り込み測定を行っているため、その影響は少ないものと思われる。In vivo 条件は、還流系により近いことが予想されるので、この結果は、in vitro/in vivo scaling を行う際の重要な情報になると考えられる。

2-2. 代謝酵素の肝 Lobular 内での不均一分布の影響^{2,11)} Gumucio⁵⁸⁾ や Pang⁵⁹⁾ らによる最近の生化学的、速度論的解析により、P-450 や種々の抱合酵素などの薬物代謝酵素が肝 lobule 内で、血流の方向に沿って (門脈側から肝静脈側に向かって) 不均一分布していることが明らかになってきた。そこで、酵素の不均一分布が、肝クリアランスにどのような影響を与えるかについて考えてみよう。⁶⁰⁾ 酵素不均一分布の影響が有るならば、血流の方向に沿っての混合拡散を全く考えない parallel-tube model に基づく理論解析により、その影響が明らかになるはずである。まず、瞬時平衡の仮定が成立する条件下で考察してみよう。肝全体の酵素量は一定とおけば、

$$\int_0^L V_{max}(x) \cdot dx = V_{max} \quad (36)$$

が成立する。ここで、 L は、sinusoid の長さ、 $V_{max}(x)$ は、距離 x における V_{max} 値を示す。一般性を持たせるために、非線形の系で、parallel-tube model に基づく物質収支式を、Eq. (36) の条件下で解くと、

$$(C_{in} - C_{out}) + \frac{K_m}{f_B} (\ln C_{in} - \ln C_{out}) = \frac{V_{max}}{Q} \quad (37)$$

が得られる。これは、酵素分布が均一と仮定し得られる結果と同一であることから、肝クリアランス、肝抽出比などは、酵素の不均一分布に影響されないという結論が得られる。^{19,60)} では、瞬時平衡の仮定が成立しない場合はどうであろうか？ 佐藤 (均)⁶¹⁾ は、細胞膜透過過程を考慮した parallel-tube model に基づいたシミュレーション

Fig. 12. Comparison of Permeability Clearance Determined by Perfused Rat Livers (MID Method) and by Using Isolated Rat Hepatocytes¹¹⁾

CA, cholic acid; DMO, dimethylloxalidinedione; TEA, tetraethyl ammonium; TC, taurocholate; TPP, tetraphenyl phosphonium; 4-MU, 4-methylumbelliferone; 4-MUG, 4-MU glucuronide; 4-MUS, 4-MU sulfate; BSP, sulfobromophthalein; RB, rose bengal; WARF, warfarin.

Fig. 13. Effects of Uneven Distribution of Enzyme on the Hepatic Extraction Ratio of Parent Drug in the Presence of Diffusional Barrier⁽¹⁾

(A) Distribution patterns of drug metabolizing uni-enzyme along the hepatic blood flow path in the liver, utilized in the present simulation study. The average intrinsic clearance (CL_{int}) is set equal to the hepatic blood flow rate (Q). (B) Relationship between the relative extraction ratio and the average diffusion clearance ($\bar{P}/Q$) (expressed as multiples of the hepatic blood flow, Q) in models I—IV for the average intrinsic clearances of 10 (a), 1 (b), and 0.1 (c) times the hepatic blood flow. For model V, the relative extraction ratio is defined as 1, as a reference (not shown).

ン研究を、種々のパターンの代謝酵素分布を発生させた条件下で行うことにより、“酵素が均一に分布している時に、最も効率良い代謝の起きる”ことを証明した (Fig. 13).

2-3. 代謝物の Kinetics^(2,50b,62) 代謝物が薬理活性や毒性を有するときには、その体内動態を把握することの重要性は言うまでもない。代謝物 kinetics については、これまで多くの研究が行われてき、その大部分は、代謝物そのものを静脈内投与して得られる情報をもとに、親化合物を投与した場合の代謝物の体内動態を、速度論的手法により予測するという手段が取られてきた。^{50b)} しかしながら、こうしたアプローチを困難にするケースが最近見いだされている。すなわち、(i) 肝の代謝により生じた代謝物が血流に乗って肝を出るまでに、次ぎの sequential な代謝によりいわゆる逐次初回通過効果を受ける。(ii) 肝内で、酵素 A により親化合物 (P) から代謝物 (M1) の生じる部位と、酵素 B により M1 が M2 へと逐次代謝 (あるいは、胆汁排泄) を受ける部位が、速度論的に同一コンパートメントに属さない場合である。この原因としては、Fig. 14 に示すように、2 種の酵素の肝内分布性が大きく異なることなどが考えられる。実際、P-450 は肝静脈側に多く分布しており、硫酸抱合酵素は門脈側に多いことが知られている。Pang ら⁵⁰⁾ は、肝還流系において還流の方向を逆にする retrograde perfusion の手法を巧みに用い、phenacetin (P) から P-450 により代謝されて生じる acetaminophen (M1) が更に硫酸抱合酵素により逐次代謝を受ける process を調べ、酵素不均一分布の与える影響についての定量的解析に成功している。(iii) 肝内で生じた代謝物の細胞膜透過性が低いため、外から与えられた代謝物よりも、肝内で生じた代謝物のほうが効率良い逐次代謝 (あるいは排泄) をうける。宮内⁶²⁾ は、4-MU をモデル化合物として選び、上記の現象 (ii), (iii) が同時に生じる場合に、外から与えた代謝物 (この場合、グルクロン酸抱合体である 4-MUG) と、肝

内で 4-MU から生じる 4-MUG が胆汁排泄される効率 (E) の違いについて、実験的、理論的考察を加えた (Fig. 15). この場合、代謝物 4-MUG の肝細胞膜透過性の低さは、MID 実験及び、遊離肝細胞を用いた輸送実験により、定量的に評価した.⁶³⁾ Fig. 15 に示されるように、4-MU を single-pass で一回還流した時の、肝内で生じた 4-MUG に対しての 4-MUG の排泄効率 (E_{p-m}) は、約 56% であった。それに対して、外から与えた 4-MUG の排泄効率 (E_m) は、約 2.8% と、はるかに低い値を示した。4-MUG の低い膜透過性を考慮して、代謝酵素、及び胆汁排泄のための carrier の肝内分布パターンを種々変化させて simulation を行ったところ、いずれ

Fig. 14. Schematic Understanding of the Influence of Unevenly-distributed Enzymes on Elimination Efficiencies for Preformed (E_m) and Generated Metabolites (E_{p-m})^{32a)}

In this schema, MI, which is generated by enzyme A (Δ), has few chance to be sequentially metabolized to MII by enzyme B ($\bullet$). Therefore, if there exists no diffusional barrier for MI, E_m should be larger than E_{p-m} .

Fig. 15. Time Profiles of the Rate Output of 4-MU and Its Conjugative Metabolites (4-MUG and 4-MUS) to the Effluent Perfusate (Top) and to the Bile (Bottom) in the Isolated Perfused Rat Liver^{62c)}

Elimination efficiencies (E_m and E_{p-m}) of 4-MUG were calculated according to Eq. (38), based on the data taken when livers are perfused with constant concentration of 4-MU (A) or 4-MUG (B), respectively.

$\bullet$, 4-MU; Δ , 4-MUS; $\blacksquare$, 4-MUG.
(elimination efficiency):

$$= \frac{(\text{rate out of 4-MUG in the bile})}{(\text{rate out of 4-MUG in the effluent perfusate}) + (\text{rate out of 4-MUG in the bile})} \quad \text{Eq. (38)}$$

の分布パターンの場合においても、 E_{p-m} に比べてはるかに低い E_m 値をほぼ再現する計算結果が得られた。以上より、主に 4-MUG の膜透過性の低さが、 E_m を小さくしている原因であることが証明された。

2-4. Protein-mediated な組織取り込みの生じる場合^{2,11,64)} (a) Albumin-mediated Uptake とは？——最近、脂肪酸、胆汁酸、有機アニオン類、warfarin などのように血中でアルブミンと 95—99.99% 結合型で存在する化合物の肝への取り込み速度が、必ずしも非結合型濃度に依存しないことを示す実験的根拠が累積している。^{2,11,64,65)} 肝還流法や遊離肝細胞を用いた実験系を用い、還流液中、あるいはインキュベーション溶液中のアルブミンなどの結合蛋白濃度を变化させることで非結合型薬物濃度を変え、それに伴う肝取り込み速度の変化を測定するという実験的アプローチが用いられてきた。この場合、非結合型濃度の見積もりは、*in vitro* での結合実験に基づいてなされる。Tsao⁶⁶⁾ は、Fig. 16 に示すように MID 法を用いて warfarin の、また遊離肝細胞を用いて rose bengal の肝取り込みを、種々のアルブミン濃度存在下で、測定した。図中の縦軸は、全薬物濃度に対する取り込みクリアランス (PA_{influx})、あるいは取り込み速度を示す。非結合型薬物濃度に依存する取り込みのみを考える従来の仮説に従えば、この値は、非結合型分率に比例し、図中の点線で示されるような理論値が得られるはずである。しかしながら、実験結果は、従来の理論で予想されるよりもはるかに大きい取り込みの存在を示しており、“albumin-mediated uptake” と呼ばれている。この現象は、最初、Weisiger ら⁶⁷⁾ によりオレイン酸の肝取り込みにおいて発見され、Science 誌上に発表された。この機構説明として、肝細胞表面上にアルブミンと特異的に結合する部位を考え、この部位に結合したリガンド-アルブミンの複合体はアルブミンの conformation 変化等の原因により細胞表面で解離し、リガンドが取り込まれるという機構が提出された。実際、遊離肝細胞に対する飽和性の結合部位の存在が実証され、アルブミンリセプター仮説と呼ばれた。⁶⁷⁾ しかしながら、後述する最近の種々の研究により、“アルブミンリセプター” と呼べるようなアルブミンに特異的な機構の存在については、現在否定的である。しかし、このことは、アルブミンと細胞表面との相互作用を否定するものではなく、今でもこの相互作用は本現象を説明できる有力な仮説の 1 つである。実際、warfarin の肝取り込みデータ (Fig. 16) が、この相互作用を考慮した Fig. 17 に示すモデルにより定量的に説明され、アルブミンの肝細胞表面への結合

Fig. 16. Plasma Protein-Mediated Hepatic Uptake of Drugs

Dotted lines are theoretical curves obtained assuming that the uptake are driven solely by the unbound drug in the perfusate or in the medium.

(A) Hepatic uptake of warfarin determined by the MID method in the presence of varied concentrations of albumin in the perfusate.^{66a)} (B) Uptake of rose bengal by the isolated rat hepatocytes in the presence of varied concentrations of albumin (a) or γ -globulin (b).^{66b)}

に関する解離定数として約 $200 \mu\text{M}$ という値が計算された。^{66a)} 更に、最近では、アルブミンが肝細胞表面と相互作用することにより、conformation 変化を起こすことを示唆する実験結果が、堀江ら⁶⁸⁾ により、ESR を用いて得られており、この仮説が支持された。

(b) アルブミンに対する特異性——遺伝的にアルブミンを欠損する長瀬無アルブミンラット (NAR) を用いた研究、更には、直接にアルブミン以外の蛋白質の取り込みに対する影響を調べた研究などにより、アルブミン特異性については、否定的な見解で一致している。NAR を用いた井上ら⁶⁹⁾ の先駆的な研究に引き続き、当教室でも Tsao により NAR を用いた解析が行われた。まず、NAR の肝を用いた warfarin の MID 実験より、いわゆる“albumin-mediated uptake”の現象が正常ラット同様に観察されたことから、アルブミンリセプターと呼べるような生理的合目性を持つ機構ではないことが示された。⁷⁰⁾ 更に、rose bengal の血中消失挙動が、正常ラット、NAR で同一であるにもかかわらず、その血中非結合型分率及び主要結合蛋白は、両ラット間で大きく異なることから、アルブミンに特異的な現象ではないことを確認した。^{66b)} その後、遊離肝細胞を用いて rose bengal 取り込み初速度に対するアルブミン、 γ -グロブリンの効果を比較したところ、見かけ上の影響は両蛋白で大きく異なったが、rose bengal に対して同じ非結合型分率を示す蛋白濃度においては、両蛋白ともに、同程度の protein-mediated uptake 効果を誘起することが明らかになった (Fig. 18).^{66b)} この実験事実、アルブミンの特異

Fig. 17. A Kinetic Model for Albumin-Mediated Uptake of Warfarin^{66a)}

W and Alb denote warfarin and albumin molecules, respectively. $P_{u, \text{influx}}$ and $P_{B, \text{influx}}$ are the permeability clearance for the uptake of the unbound and bound warfarin, respectively. The model equations are written down based on the following assumptions.

Assumptions:

- 1) Warfarin uptake is driven by the following two molecule species;
 - (i) unbound form (permeability clearance, $P_{u, \text{influx}}$)
 - (ii) bound form (permeability clearance, $P_{B, \text{influx}}$)
- 2) There exists putative albumin binding sites on the liver cell surface, which participate in the uptake of albumin-bound warfarin.
- 3) Affinity of albumin for its binding site on liver cell surface is not influenced by warfarin ($K_m = K'_m$).

Fig. 18. Relationship between the Apparent Permeability Clearance of the Unbound Rose Bengal ($P_{u, \text{influx}}$) and Protein Concentration (A) or Unbound Fraction (B)^{66b)}

The $P_{u, \text{influx}}$ values are obtained as follows:

$P_{u, \text{influx}} = \text{initial uptake rate } (v_0) / \text{unbound drug concentration in the medium } (C_u)$

●, albumin; ○, γ -globulin.

性を直接に否定するものである。

(c) その他の機構——この他にも、(1) アルブミンからのリガンド解離速度の遅さを組み込むモデル、⁷¹⁾ (2) 細胞外液中の非攪拌水相中の拡散を組み入れたモデル、⁷²⁾ (3) この両機構を組み込んだモデル^{19,78)}などが提出されている。また、脳へのリガンド取り込みについても類似の現象が古くから、Oldendorf の手法 (BUI 法) を用いることにより、Pardridge ら⁷⁴⁾により示されている。Lin⁷⁵⁾ もこの手法を用いて、幾つかのリガンドの脳取り込みにおいて、この現象の存在を明らかにした。Protein-mediated uptake の現象を言い換えれば、“*in vivo*”での蛋白-リガンドの結合性 (線形結合の条件下では、結合容量/結合解離定数で表される) が、*in vitro*での結合性よりも小さくなる”という事になる。そこで、Lin の結果を他の報告結果とあわせて、*in vitro* と *in vivo* の結合性を比較した結果を Fig. 19 に示した。リガンドの種類によらず、また、結合蛋白の種類によらず、広くこの現象の存在が示される。

BUI の手法では、注射液としてリガンドと種々の濃度の蛋白、及び適当な対照物質の混液 (ラットでは、約 0.2—0.3 ml) を用い、それを頸動脈より瞬時投与した後、脳に取り込まれたリガンドと対照物質の量を測定する。^{76,77)} 注射液中での蛋白結合率を基にして、protein-mediated brain uptake が生じたかどうかを判断するので、この実験条件下で、注射液 bolus が循環血液と混合されないことが必須となる。この仮定の妥当性について、厳密な意味では疑問が持たれているが、最近の Pardridge ら⁷⁴⁾の研究によるとその混合率は、10% 程度であることが明らかにされている。この程度の混合率が実験結果の解釈に影響を与えない現象の解析には用いることのできる簡便な方法論であるが、その限界を念頭において実験することが必要である。例えば、血中で 99.9% の結合性を有するリガンドについてこの方法論を用いた場合には、注射液中に蛋白を入れなくても、循環血との約 10% の混合率によって、取り込みの生じる毛細血管中で約 99% の結合が生じることになり、非結合型リガンドに対する透過クリアランスを過小評価するという間違いを犯すことにつながる。

以上示してきたように、protein-mediated な取り込みは、リガンドの種類、蛋白の種類、臓器の種類に特異性が存在せず、多くの研究者の興味を引きつけている。取り込み測定の方法論を含めて、これら機構解明のための議論が闘わされており、^{65,73,78)} 現在最も熱い研究分野の 1 つである。

3. ペプチド性医薬品における移行動態の解析——EGF を例にとって

遺伝子工学の発展に伴い、微量で顕著な薬効を示す種々のペプチドホルモン及びそのアナログがこれからの医薬品として期待されている。しかしながら、これまでのところ、その体内動態を系統的に解析した例は皆無といって良い。ペプチド類の組織への取り込み、代謝、排泄を低分子物質のそれと比較すると、ペプチドに固有な機構として細胞表面にリセプターや分解酵素が存在し取り込み、代謝に関与していることが挙げられる。⁷⁹⁻⁸²⁾ ペプチドホルモン類の血中からのクリアランスを担う器官として、肝臓は腎とともに重要である。なかでも、肝細胞膜表面に存在するリセプターを介したいわゆる “receptor-mediated endocytosis (RME)” の機構は、ペプチドホルモン類の血中レベルを決める重要な機構であり、“homeostatic regulator” として注目されている。^{79,83)} RME の過程を Fig. 20 にまとめたが、数多くの細胞内プロセッシング過程を有する複雑な transport 系を構築している。細胞膜表面上で、ペ

Fig. 19. Relationship between *in Vitro* and *in Vivo* Binding Activities (n/K_d) of Ligands for Binding Proteins in the Plasma^{75a)}

The *in vivo* n/K_d values were obtained from the data measuring the brain uptake of ligands in the presence and absence of proteins in the injectate. The brain uptake was determined by the Oldendorf method (BUI method). The solid line represents a 1:1 relationship. Abbreviations are as follows. PL, propranolol; T3, iodothyronine; IMP, imipramine.

Fig. 20. Schematic Diagrams for the Pathway of Receptor-Mediated Endocytosis (RME)⁹¹⁾

●, receptor; ○, ligand; ⊥, clathrin;
 ▨, coated pits;
 ○, coated vesicles.

Fig. 21. Time Course of the Binding and Internalization of ¹²⁵I-EGF by the Isolated Rat Hepatocytes in the Presence (A) and Absence (B) of Excess Concentration of Unlabeled EGF^{85a)}

¹²⁵I-EGF molecules bound to the cell-surface receptors and those internalized are separated by the “acid-washing” technique. The EGF amount bound or internalized relative to that in the medium is shown in the ordinate.

ペプチドとそのリセプターは結合解離の動的平衡状態を保ちながら、その複合体は“coated pit”と呼ばれる領域に集合するが、この過程は **clustering** と呼ばれる。ペプチドと結合したリセプターは、coated pits 領域より膜ベシクルを形成して細胞内に陥入するが、この過程は内在化 (**internalization**) と呼ばれる。肝細胞内に取り込まれた複合体は、リソゾームで分解を受ける経路 (**lysosomal pathway**) 以外に、直接 **intact** なペプチドとして胆汁中に排泄されるいわゆる “**shuttle pathway**” の存在も明らかにされている。また、後述のようにペプチドの体内動態を考察する上で最も重要な事実として、“細胞内に取り込まれたリセプターの一部 (あるいは、全部) が再び細胞表面に帰還して、ペプチドホルモン類の結合に再利用される” ということがある。このリセプターの **recycling** に通常、或程度の時間を要するために、過剰量のリガンド (ペプチドホルモン類) 存在時に、細胞表面リセプターが一時的に減少する事が生じ、リセプターの **down-regulation** と呼ばれる。

我々は、肝細胞膜表面にリセプターが存在し、⁸⁴⁾ **RME** 機構により肝に取り込まれる事の知られている上皮細胞増殖因子 (**EGF**) をモデルペプチドとして選べ、遊離肝細胞系、還流系、*in vivo* 系での取り込みを定量的に評

価し比較した。

3-1. 遊離肝細胞系での解析 柳井⁸⁵⁾は種々の濃度の非標識 EGF 濃度の存在下で, ^{125}I -EGF (標識 EGF) の肝細胞への結合又は取り込みの時間変化を測定した。更には, 細胞表面に結合している EGF と内在化をうけた EGF は, いわゆる “acid washing” の手法を用いて分離した。すなわち, EGF と リセプターの結合は顕著な pH 依存性を示すので, pH を低くし短時間洗うことにより, 細胞表面リセプターに結合した EGF のみが遊離するという原理を利用した。典型的な実験結果を Fig. 21 に示し, 図左は, tracer 量の標識 EGF のみ存在する場合を, 右は, 過剰量の非標識 EGF の存在下での結果を示した。0°C では, EGF の内在化の生じないこと, また, 37°C では, 時間とともに, 内在化した EGF の量が増加することが明確に示される。更には, 左右の図の縦軸スケールの違いを考えると, 細胞表面リセプターへの結合及び, 内在化量の EGF 濃度増加に伴う飽和が顕著に現れていることがわかる。EGF 濃度を種々変化させて細胞に結合した EGF 量を測定して得たデータ, 約 70 個を同時に, Fig. 22 に示すモデルにあてはめて得たパラメータを Table V に示した。以下の重要な結論を得た。(1) リセプター結合に関する解離定数 (K_d 値), 結合容量ともに大きな温度依存性を示さなかった。しかし, K_d 値の内容をみると, 37°C では, 結合速度定数 (k_{on}), 解離速度定数 (k_{off}) とともに, 0°C に比べ, 約 10 倍の値をとるため, その比で示される K_d 値は変動しない。(2) EGF が細胞膜表面リセプターに結合した後, 内在化を受けるまでに, 速度論的に区別される膜上の deep compartment への移行過程が存在する。この移行過程 (k_s) の半減期は, 約 0.5—1 min である。この deep compartment への移行の実体が何であるかは, 現在のところ不明であるが, clustering あるいは, リセプターの conformation 変化などの過程を表している可能性がある。(3) EGF-リセプター複合体の内在化に関する速度定数 (k_e) の値が, フリーのリセプターのそれ (k_i)

Fig. 22. Mathematical Model for Receptor-Mediated Endocytosis (RME) of EGF by the Hepatocytes^{85a)}

k_{on} , association rate constant for ligand-surface receptor interaction; k_{off} , dissociation rate constant for ligand-surface receptor interaction; k_s , conversion rate constant from shallow to deep compartment; k_e , endocytotic rate constant for ligand-receptor complex; k_h , intracellular ligand degradation rate constant; k_i , turnover rate constant for free receptor; P_T , initial surface receptor concentration; V_T , the rate of insertion of receptor into the cell surface ($=k_i \cdot P_T$).

TABLE V. Parameters for the Interaction of EGF with Isolated Rat Hepatocytes and Perfused Rat Liver

Parameter	Dimension	Isolated hepatocytes ^{b)}		Perfused liver ^{c)} 37°C
		0°C	37°C	
k_{on}	$\text{min}^{-1} \text{ nM}^{-1}$	0.07	0.7 — 1.1	0.12
k_{off}	min^{-1}	0.15	1.1 — 1.6	2.1
k_s	min^{-1}		0.5 — 1.3	4.1
k_e	min^{-1}		0.09—0.11	
k_h	min^{-1}		0.01	
k_i	min^{-1}		0.01—0.04	
P_T	$\text{pmol}/10^6 \text{ cells}$	0.13	0.06—0.1	0.21
K_d	nM	2.1	1.5	17

a) The definitions of parameters are shown in Fig. 22. b) Taken from Yanai *et al.*^{83a)} c) Taken from Sato *et al.*^{86a)}

の値の約 10 倍の値を示す。このことは、medium 中に過剰な EGF が存在することにより、リセプターの内在化が促進され、いわゆるリセプターの down-regulation 現象の速度論的裏付けと言える。

3-2. 肝還流系 (MID 法), での解析 佐藤(博)⁸⁶⁾ は、EGF と還流肝の相互作用を MID 法により解析し

Fig. 23. Dilution Curves of ^{125}I -EGF and ^{14}C -Inulin in the Presence of Varied Amounts of Unlabeled EGF in the Injectate⁸⁶⁾

Ordinates represent outflow fraction per ml (relative to the dose).
○, ^{14}C -inulin; ●, ^{125}I -EGF.

Fig. 24. Ratio Plots of EGF and Somatostatin after the Administration of Tracer Doses into the Portal Vein (MID Experiment)⁸⁶⁾

▲, EGF; ●, somatostatin.

た. Fig. 23 には, EGF の希釈曲線を細胞外液対照物質である inulin のそれとともに示した. 縦軸には, 流出液中の物質濃度を投与量に対して規格化した形で示した. EGF の投与量の上昇に伴って, EGF の希釈曲線は, inulin のそれに接近してゆき, 30 μg の非標識 EGF 投与時には, inulin の希釈曲線とほとんど重なりあった. このことは, EGF の肝抽出に飽和性の存在することを示している. 一方, 細胞表面リセプターの存在しない somatostatin (SRIF) においては, このような飽和性は観察されなかった. EGF の希釈曲線にみられる飽和性は, この曲線をモーメント解析し, 肝抽出比 (E_h), 分布容積 (V_d) を求め, その投与量依存性を見ることで, より明確になった. EGF と SRIF の希釈曲線 (tracer 量投与時) の違いは, Fig. 24 に示すいわゆる “ratio plot” を比較することにより, 更に明確となる. SRIF が, 単調に減少する plot を示すのとは対照的に EGF は上昇相を示している. このことは, Eq. (39) に示す ratio plot の初期部分の傾きが, 細胞外液空間からのペプチドの肝移行に関する速度定数を表すことを考えると, 次のように考察される. すなわち, EGF は肝細胞表面リセプターと飽和性の, かつ時間のかかる結合を示し, ratio plot の上昇部分の傾きは, 次式に示されるように, リセプターへの結合速度定数 (k_{on}) に細胞表面の有効リセプター密度 (P_{free}) を乗じたものに相当すると考えられる.

$$\text{ratio plot の傾き} = k_{on} \times P_{free} / V_{ext} \quad (39)$$

ここで, V_{ext} は細胞外液体積を示し, inulin の希釈曲線のモーメント解析より得られる. 一方, SRIF は肝細胞表面への結合が非特異的であり, かつ結合も瞬時に生じるため, ratio plot の上昇相が検出されないものと考えられる. この事は, 未知のペプチドを MID 解析し, その E_h , V_d の値, 飽和性, 及び ratio plot のパターンなどのデータを組み合わせることにより, そのペプチドが RME の機構により肝取り込みを受けるか, あるいは, 他の機構によるものかを, ある程度区別できる可能性を示しており興味深い. 実際, insulin や, glucagon のように, 肝にリセプターの存在することの示唆されているペプチド類の希釈曲線が, EGF 様の挙動をとることが明らかになり, 上記の考えが支持された.

Fig. 25. Ratio Plots of ^{125}I -EGF in the Presence of Varied Amounts of Unlabeled EGF in the Injectate (MID Experiment)⁽⁸⁰⁾

Lines were calculated by simultaneous fitting of the ratio plots to the mass-balance equations derived based on a model shown above.

$$V_E \cdot \frac{dC_1}{dt} = -k_{on} \cdot (P_T - X_2) \cdot C_1 - Q \cdot C_1 + k_{off} \cdot X_2$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{on} \cdot (P_T - X_2) \cdot C_1 - (k_{off} + k_{el}) \cdot X_2$$

$$\triangleright \text{Ratio}(t) = \frac{\text{inulin outflow fraction per ml}}{\text{EGF outflow fraction per ml}}$$

V_E , volume of extracellular space; C_1 , EGF concentration in extracellular space; X_2 , EGF amount bound to specific binding site on the cell surface.

次に、MID 実験のデータに基づき、RME に関する速度パラメータを求める事を試みた。Fig. 25 に示すモデルを用い、パラメータとして、 k_{on} (結合速度定数)、 k_{off} (解離速度定数)、 k_s (sequestration 速度定数) 及び、 P_T (リセプター密度) を設定した。Tracer 量の EGF 投与時は、線形 kinetics で解析する事ができ、低分子化合物の場合に Eq. (35) にあてはめて得られるパラメータと、上記パラメータの間には、次のような関係が推定される。

$$\begin{aligned} k_1 &= P_{influx}/V_{ext} = k_{on} \cdot P_T/V_{ext} \\ k_2 &= P_{efflux}/V_{cell} = k_{off} \\ k_3 &= CL_{int}/V_{cell} = k_s \end{aligned} \quad (40)$$

ここで、 k_1 , k_2 , k_3 は、それぞれ、みかけの influx, efflux, sequestration に関する速度定数を、また、 V_{ext} , V_{cell} はそれぞれ、細胞外液、細胞内液の体積を表す。したがって、tracer 量の EGF 投与時の MID データより、Eq. (40) の関係に基づき、 $k_{on} \cdot P_T$, k_{off} , k_s をそれぞれ算出することができる。しかしながら、 k_{on} , P_T を分離して求めるためには、投与量を変化させた実験データを用いることが必要となる。そこで、非標識体 EGF の 6 種の投与量に対応して得られたデータ (ratio plot) を、Fig. 25 に示すモデルに基づいて得られた連立微分方程式 6 組 (合計 12 個) にあてはめて、各パラメータを計算した。実測値とあてはめ曲線が比較的良く一致している事がわかる (Fig. 25)。得られたパラメータを、Table V に遊離肝細胞における結果とともに示した。MID 実験は比較的短い時間内 (ca. 1 min) に実施される為に、遅い速度過程が捉えられない事が考えられる。したがって、こうして得られた sequestration 速度定数は、内在化の過程 (k_e) ではなく、Fig. 22 に示したように、細胞膜上での deep compartment への移行過程 (k_s) を表していると考えらるべきであろう。事実、その値は遊離肝細胞で得られた k_s 値と近いものであった (Table V)。その他のパラメータについても、両実験系を比較すると (Table V), k_{on} を除けば、ほぼ同程度の値が得られ、 k_{on} 値の差異により平衡定数 (K_d) の違いが生じたと考えてよい。還流系において、より小さい k_{on} 値が得られた理由について決定的な事は不明であるが、おそらくは、Disse 腔中の非攪拌水相の為だろうと考えている。言い換えれば、EGF の肝表面リセプターへの結合速度はかなり速い (遊離肝細胞系での、結合クリアランスとして、約 10 ml/min/g liver) ため、還流系において、EGF の肝細胞表面へのみかけの結合速度 (結合クリアランスとして、約 2.5 ml/min/g liver) は、非攪拌水相中の拡散速度により律せられて

Fig. 26. Recovery of Available EGF Receptors on the Liver Cell Surface after Injection of an Excess Amount of Unlabeled EGF⁸⁶⁾

The MID experiment at a tracer dose of ^{125}I -EGF was done as a control. After 15-min perfusion, excess (20 μg) EGF was injected as a bolus into the portal vein; then the MID experiment at a tracer dose of ^{125}I -EGF followed at 1, 3, 10 and 30 min. All results are expressed in terms of the ratio plot.

TABLE VI. Apparent Tissue Distribution Volume (V_{dapp}) of ^{125}I -Labeled Human Epidermal Growth Factor for Various Rat Tissues^{88), a)}

Tissue	V_{dapp} ml/g of tissue	V_E ml/g of tissue ^{b)}
Kidney	9.53 ± 0.21	0.40
Liver	4.86 ± 0.26	0.29
Duodenum	1.35 ± 0.08	0.094
Jejunum	1.31 ± 0.07	0.094
Stomach	0.86 ± 0.19	0.094
Spleen	0.63 ± 0.03	0.30
Lung	0.32 ± 0.03	0.38
Heart	0.31 ± 0.01	0.30
Muscle	0.12 ± 0.03	0.13
Skin	0.13 ± 0.04	0.31
Brain	0.025	$0.015 - 0.035^c)$

a) Determined 3 min after i.v. administration of a tracer dose of ^{125}I -EGF; V_{dapp} was calculated by dividing the total cpm of ^{125}I per gram of tissue by the total cpm of ^{125}I per milliliter of plasma at 3 min after administration; b) extracellular volume, c) capillary volume.

Fig. 27. Eadie-Hofstee Type Plot Showing the *in Vivo* Uptake of EGF by Various Tissues in the Rat⁸⁸⁾

¹²⁵I-EGF was intravenously administered with varied amounts of unlabeled EGF, and the amounts taken up by tissues are determined 3 min after the injection.

A, liver; B, kidney; C, duodenum; D, jejunum; E, stomach; F, spleen. The abscissa is the tissue uptake velocity (J_{av} , pmol/min/g of tissue) and the ordinate is the tissue uptake clearance ($J_{av}/\bar{C}_p$, ml/min/g of tissue), where $\bar{C}_p$ is the averaged plasma concentration of EGF (0–3 min).

おり、一方、充分な攪拌がなされている遊離肝細胞の系では、結合過程そのものが律速となっていると考えられる。実際、結合クリアランス ($k_{on} \cdot P_T$) の値の両実験系での違いは、丁度 Fig. 12 に示した関係の上にあてはまることも、この考えを支持する。

更に、我々が MID で捉えたパラメータが、EGF とリセプターの相互作用を捉えている事を裏付けるために、以下の実験を行った。すなわち、大過剰の EGF を門脈内に 1 回投与する事により、肝細胞表面リセプターを EGF により占有させるか、内在化を起こさせた後に、肝表面の有効リセプターの回復過程を追跡することを試みた。Fig. 26 にその結果を示した。初めに、コントロール実験として tracer 量での MID 実験を行い、10 min 間の安定期間をおいた後に、過剰量の非標識 EGF (20 μ g) を投与した。この時点を経験 0 として、時間を追って、tracer 量の標識 EGF を pulse 投与し、MID 解析を行った。図中には、非標識体を投与、1, 3, 10, 30 min 後

での ratio plot を示した。投与 1 min 後には、ratio plot の初期傾きで示される $k_{on} \cdot P_{free}$ (Eq. (39)) が顕著に減少しており、時間経過とともに、コントロールのパターンに回復していく様子が示される (回復の半減期は、約 5–10 min)。この回復現象を説明するための機構として次ぎの 2 つの可能性が考えられる。1 つは、内在化を受けたリセプターが細胞表面に復帰してくる過程、すなわち down-regulation を捉えている可能性であり、2 つめは、表面リセプターに結合した EGF が buffer 還流により解離するため、表面リセプターの占有率が時間とともに

Fig. 28. Correlation between *in Vitro* Specific Binding Activity and *in Vivo* Receptor-Mediated (Saturable) Uptake Clearance of EGF among Various Tissues⁸⁹⁾

The *in vivo* uptake clearance was determined from the data shown in Fig. 27, and the *in vitro* specific binding activities were determined using tissue homogenates (3.2% (w/v)).

に減少する可能性である。そこで、別の実験系として過剰量の非標識 EGF を長時間 (20 min) 肝還流させることにより、大部分の表面リセプターを内在化させた後に、同様の方法で表面リセプターの回復現象を追跡した。⁸⁷⁾ その結果、ほぼ同じ回復パターンを得たことから、この現象は主にリセプターの **down-regulation** を反映しているものと考えられる。いずれの機構であれ、時間の経過とともに肝細胞表面の有効リセプター密度が回復していることは事実であり、MID 法によりこの過程を定量的に解析することができた。

3-3. In Vivo 系での解析 金⁸⁸⁾ は EGF の体内分布 kinetics を解析するために、tracer 量の標識体 EGF を種々の量の非標識体とともに静脈内投与した後 3 min までの初期血中濃度曲線を解析した。投与量が、2 nmol/rat をこえると血中からの初期分布クリアランスが顕著に低下することが示された。そこで、EGF の血中からの消失に対する各組織の寄与を知るために、投与 3 min 後に各組織を取り出し、分布量を測定した。Table VI に示すように、標識体 EGF の肝、腎、小腸、胃、脾臓への分布は、各組織の細胞外液のみへの分布で説明できる量をはるかに上回っていた。そこで、これら組織への取り込み飽和性を解析するために、種々の量の EGF を投与し、3 min 後の組織とりこみデータを、Eadie-Hofstee 様のプロットで解析した (Fig. 27)。取り込みに飽和性のあることが明確に示されており、解析して得られる Michaelis 定数 (K_m) は、ほとんどの組織で数 nM から 10 nM の範囲に入るが、最大取り込み速度 (V_{max}) には、大きな臓器差が見られた。こうした解析で得られた各組織での

Fig. 29. Recovery of Available EGF Receptors on the Surface of Various Tissues in Rats after i.v. Administration of an Excess Amount of Unlabeled EGF ($300 \mu\text{g/kg}$)^{88a)}

At certain times (0.5–24 h) after the administration, a tracer dose of ^{125}I -EGF was injected, and the early phase (0–3 min) plasma concentration-time profile and the tissue uptake of ^{125}I -EGF at 3 min were measured to determine the tissue uptake clearance (J_{av}/C_p). The tissue uptake clearance thus determined may be proportional to the density of available EGF receptors on the cell surface of the tissues.

飽和性取り込みクリアランス ($V_{\max}/K_m$) を、組織ホモジネートを用いて得た EGF の特異的結合率と対応させたところ、Fig. 28 に示すような良好な相関が得られたことから、EGF の飽和性の分布機構に特異的結合部位 (リセプター) の関与していることが示唆された。⁸⁹⁾ また、これら定量的解析により、EGF の血中よりの初期消失の約 60—70% が肝での RME により説明できることが明らかになった。更には、長時間でのデータをもとに、EGF の消失クリアランスに対する各組織の寄与も見積もった。⁹⁰⁾ EGF を血中に infusion し、定常状態時での循環血、肝静脈、腎静脈中の EGF 濃度を測定することにより、消失クリアランス (全身クリアランス) の約 80%, 15% がそれぞれ、肝、腎により説明されることが明らかとなった。

更に、柳井ら⁸⁵⁾は、*in vivo* においても各臓器での receptor がどの程度 down-regulate されるかについて、次のように調べた。すなわち、EGF をラットに大量 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与し、各臓器のリセプターを down-regulate させた状態にしたあと、Fig. 29 に示す各時間後に tracer 量の標識 EGF を i.v. 投与し、その初期血中濃度推移 (ca. 3 min) 及び、3 min 後の各臓器へのとりこみ量から前述の方法で臓器取り込みクリアランス (P_{influx}) を算出した。こうして得た P_{influx} は、各臓器表面の有効リセプター密度に比例するパラメータと考えられる。Fig. 29 に示すように、 P_{influx} の回復は、肝で速やかに生じるが (回復半減期 <0.5 h)、他の臓器では、回復半減期、2—5 h と大きく遅れることが示された。肝においてのみリセプターの recycling 速度が速いというこの事実は、肝でのリセプターの役割が、“血中からの EGF の除去”にあると考えれば、十分に生理的意義のあることと思われ興味深い。

最後に、これら実験において得たパラメータをもとに、生理学的モデルにより、EGF の血中濃度、肝表面リセプター密度の時間推移をシミュレーションした (Fig. 30)。パラメータ、計算法の詳細は、原報⁷⁹⁾を参照して頂き、ここでは結果のみを示す。Fig. 30 に示されるように、肝細胞表面のリセプター密度が、EGF の投与量に依存してまた時間とともに変化することが、明確にシミュレーションされている。この現象は、リセプターの down-

Fig. 30. Simulation of the Time Profiles of Plasma EGF Concentrations (A) and the Corresponding Densities of Liver Cell-surface Receptors (B) at Various i.v. Doses of EGF⁷⁹⁾

Simulations were performed based on a physiological pharmacokinetic model shown in (C). The bulk of the EGF clearance is assigned to the liver, and some is to the glomerular filtration in the kidney.

regulation に対応しており、モデル上では、“free リセプターよりも EGF と結合したリセプターの内在化速度が速い”と置くことにより産みだされる。これまで、低分子物質に対する pharmacokinetics の分野では、担体輸送 (carrier-mediated transport) は、細胞表面での担体数を一定とみなす通常の Michaelis-Menten kinetics で取り扱われてきた。低分子担体も細胞膜内を cycle するものの、ペプチドに対するリセプターと異なり、その cycle 速度は非常に速いため、down-regulation を考慮する必要はない。今回のシミュレーションにより示されるように、今後ペプチド性化合物の有効な投与計画を作成するにあたっては、リセプターの down-regulation を考慮した pharmacokinetic model に基づいて行うことが必要である。

最後に

ペプチド性化合物の体内動態については、現在やっと研究の緒についたところであり、*in vitro/in vivo scaling* を成功させるためには、今後多くの基礎研究の積み重ねが必要である。一方、低分子化合物については、*in vitro* から *in vivo* への直接の scaling を困難にする多くの要因が明らかにされ始めている。今後、ヒトの肝細胞、あるいは細胞分画を用い、生理的条件下での代謝活性、及び細胞膜透過活性の適切な測定条件が発展し、上記の要因が考慮されるならば、*in vitro/in vivo scaling* の技法により、ヒトでの体内動態を予測できる日も近いことを確信している。

謝辞 本稿の中で示した我々の研究成果は、東大薬学部製剤学教室、花野 学教授のもとで得られたものであり、栗津荘司博士、伊賀立二博士、沢田康文博士、原島秀吉博士、その他多くの方々 (Dr. J. H. Lin, 杉田 修博士、猪狩康孝博士、寺崎哲也博士、吉川剛兆博士、奥平和穂博士、佐藤 均修士, Dr. Konstanty Wierzbą, 宮内正二博士, Dr. S. C. Tsao, 新村木実学士, Dr. T. H. Lin, 佐藤博章修士, 金 東出修士, 柳井薫雄修士, 川崎誠治博士, 長瀬すみ博士, 不破 亨博士, 坂本俊治博士) との共同研究によるものです。ここに深く感謝いたします。特に、適切な御助言を下さるとともに、自由な研究雰囲気の中でのこの研究分野に導いて下さいました花野教授、研究結果のまとめを始終助けて下さいました伊賀先生、生理学的 pharmacokinetics の研究を始めるきっかけを与えて下さるとともに、その基礎を教えて下さいました栗津先生、研究の細部に渡り共同研究者として始終議論の相手になっていただくとともに、有益かつ的を得た助言を頂いた沢田博士、及び本研究の初期にあって苦勞を共にした J. H. Lin 博士に厚くお礼申し上げます。また、本研究費の一部は、文部省科学研究費補助金、薬学研究奨励財団研究助成金によるものであり、ここに感謝致します。

引用文献

- 1) 栗津荘司, “薬の体内動態,” 花野 学, 藤田 浩, 栗津荘司編, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1981, pp. 35—57.
- 2) 杉山雄一, 医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法, 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二編, ソフトサイエンス社, 東京, 1985, pp. 385—430.
- 3) 花野 学, 杉山雄一, 幸田幸直, 沢田康文, “ファーマコキネティクス; 一演習による理解—入門編,” 南山堂, 東京, 1987, pp. 73—112, 209—248
- 4) M. Gibaldi, D. Perrier, “Pharmacokinetics,” Marcel Dekker, New York, 1982, pp. 355—384.
- 5) M. Rowland, L. Z. Benet, G. Graham, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1**, 123 (1973).
- 6) K. S. Pang, M. Rowland, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 625 (1977).
- 7) G. R. Wilkinson, D. G. Shand. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **18**, 377 (1975).
- 8) G. R. Wilkinson, *Pharmacol. Rev.*, **39**, 1 (1987).
- 9) M. Hanano, J. H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu: Proceedings of the Kyoto International Conference against drug-induced sufferings; ed. by T. Soda, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1979, pp. 62—67.
- 10) M. Hanano, Y. Sawada, T. Iga, Y. Sugiyama, “Topics in Pharmaceutical Sciences 1987,” ed. by D. D. Breimer, P. Speiser. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 1987, pp. 63—77.
- 11) Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano: Reconstruction of *in vivo* metabolism from *in vitro* data. in Xenobiotic Metabolism & Disposition; Proceedings of the 2-nd International ISSX Meeting. ed. by R. Kato, R. W. Estabrook and M. N. Cayen. Taylor & Francis, 1989, pp. 225—235.
- 12) J. H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2825 (1980).
- 13) O. Sugita, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 3347 (1981).

- 14) Y. Igari, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**, 53 (1982).
- 15) Y. Igari, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 826 (1984).
- 16) 伊賀立二, 沢田康文, 杉山雄一, “医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法,” 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二編, ソフトサイエンス社, 東京, 1985, pp. 431—473.
- 17) 花野 学, 杉山雄一, 幸田幸直, 沢田康文, “ファーマコキネティクス: 演習による理解—応用編,” 南山堂.
- 18) M. S. Roberts, J. D. Donaldson, M. Rowland, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **16**, 41 (1988).
- 19) L. Bass, S. Keiding, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1425 (1988).
- 20) M. S. Roberts, M. Rowland, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **14**, 227 (1986).
- 21) K. Winkler, S. Keiding, N. Tygstrup, “The Liver. Quantitative Aspects of Structure and Function,” ed. by G. Paumgartner and R. Preisig, S. Karger, Basel, 1973, pp. 144—155.
- 22) a) L. Bass, *J. Theoret. Biol.*, **86**, 365 (1980); b) *Idem*, *Am. J. Physiol.*, **244**, G583 (1983).
- 23) a) E. L. Forker, B. A. Luxon, *Am. J. Physiol.*, **235**, E648 (1978); b) *Idem*, *ibid.*, **243**, G532 (1982).
- 24) M. Weiss, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **25**, 695 (1983).
- 25) C. A. Goresky, G. G. Bach, B. E. Nadeau, *J. Clin. Invest.*, **52**, 991 (1973).
- 26) a) K. S. Pang, M. Rowland, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 655 (1977); b) A. B. Ahmad, P. N. Bennett, M. Rowland, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 219 (1983); c) D. B. Jones, D. J. Morgan, G. W. Mihaly, L. K. Webster, R. A. Smallwood, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**, 522 (1984); d) L. Bass, *J. Theor. Biol.*, **86**, 365 (1980); e) E. L. Forker, B. A. Luxon, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1322 (1983); f) Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 319 (1985).
- 27) M. Gibaldi, D. Perrier, “Pharmacokinetics,” Marcel Dekker, New York, 1982, pp. 319—353.
- 28) A. Rane, G. R. Wilkinson, D. G. Shand, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **200**, 420 (1977).
- 29) M. S. Roberts, M. Rowland, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 177 (1986).
- 30) Y. Igari, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **11**, 577 (1983).
- 31) J. H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**, 649 (1982).
- 32) Y. Igari, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**, 53 (1982).
- 33) O. Sugita, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**, 297 (1982).
- 34) O. Sugita, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Drug Metab. Disp.*, **12**, 131 (1984).
- 35) a) T. Niwa, Y. Tokuma, K. Nakagawa, H. Noguchi, Y. Yamazoe, R. Kato, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **60**, 161 (1988); b) 木村寛三, 水野佳子, 第2回薬物動態学会年会, 講演要旨集, 1987, p. 34.
- 36) S. Toon, M. Rowland, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **225**, 752 (1983).
- 37) N. Watari, Y. Sugiyama, N. Kaneniwa, M. Hiura, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **16**, 279 (1988).
- 38) a) 薬物の構造活性相関—ドラッグデザインと作用機作研究への指針 (1979). 構造活性相関懇話会編集, 化学の領域増刊 122 号, 南江堂; b) 薬物の構造活性相関—ドラッグデザインと作用機作研究の実際 (1982). 構造活性相関懇話会編集, 化学の領域増刊 136 号, 南江堂.
- 39) 広橋敏之, 薬物動態, **2**, 291 (1987).
- 40) T. Terasaki, Y. Sugiyama, T. Iga, Y. Sawada, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**, 265 (1985).
- 41) J. H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**, 637 (1982).
- 42) a) T. Terasaki, T. Iga, Y. Sugiyama, M. Hanano, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 597 (1982); b) *Idem*, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 524 (1984); c) *Idem*, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 269 (1984); d) *Idem*, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1359 (1984).
- 43) a) A. Nishiura, J. Higashi, T. Murakami, Y. Higashi, N. Yata, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 819 (1986); b) A. Nishiura, T. Murakami, Y. Higashi, N. Yata, *ibid.*, **10**, 135 (1987); c) *Idem*, *Pharmaceu. Res.*, **5**, 209 (1988).
- 44) Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**, 477 (1985).
- 45) J. H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu, M. Hanano, *Drug Metabol. Disp.*, **12**, 253 (1984).
- 46) 沢田康文, “医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法”, 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二編,

- ソフトサイエンス社, 東京, 1985, pp. 474—514.
- 47) 杉山雄一, 花野 学 “医薬品開発要覧, 臨床編,” 伊藤隆太, 太田喜夫, 中島光好, 中村治雄, 府川和永編, R & Dプランニング社, 東京, 1986, pp. 136—180.
- 48) a) R. L. Dedrick, K. B. Bischoff, D. S. Zaharko, *Cancer Chemother. Part 1*, **52**, 95 (1970); b) R. L. Dedrick, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1**, 435 (1973).
- 49) a) H. Boxenbaum, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **8**, 165 (1980); b) H. Boxenbaum, *ibid.*, **10**, 201 (1982); c) H. Boxenbaum, *ibid.*, **10**, 411 (1982).
- 50) a) Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, T. Iga, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **12**, 241 (1984); b) *Idem*, *ibid.*, **13**, 477 (1985).
- 51) a) H. Harashima, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 340 (1984); b) H. Harashima, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**, 425 (1985); c) *Idem*, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 132 (1985); d) Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **12**, 587 (1984); e) Y. Sawada, H. Harashima, M. Hanano, Y. Sugiyama, T. Iga, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 757 (1985); f) T. Yoshikawa, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *Drug Metabol. Disposit.*, **12**, 500 (1984); g) *Idem*, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2733 (1985); h) S. Kawasaki, N. Umekita, T. Beppu, T. Wada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *ibid.*, **33**, 3219 (1984); i) S. Kawasaki, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, T. Beppu, M. Sugiura, K. Sanjo, Y. Idezuki, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **44**, 217 (1988); j) O. Sugita, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 631 (1984); k) K. Okudaira, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 137 (1986); l) H. Sato, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *Drug Metabol. Disposit.*, **15**, 540 (1987); m) K. Wierzbza, Y. Sugiyama, K. Okudaira, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 872 (1987).
- 52) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, Y. Sawada, K. Morita, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **15**, 25 (1987).
- 53) a) C. A. Goresky, *Am. J. Physiol.*, **207**, 13 (1964); b) *Idem*, *J. Clin. Invest.*, **53**, 634 (1974).
- 54) Y. Sawada, N. Itoh, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Comput. Method & Prog. Biomed.*, **20**, 51 (1985).
- 55) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4241 (1987).
- 56) 宮内正二, 杉山雄一, 沢田康文, 伊賀立二, 花野 学, 薬物動態学会, 第3年会講演要旨集, 1988, pp. 30—31.
- 57) 宮内正二, 第6回生物薬剤学研究会講演要旨集, 1988, p. 17.
- 58) J. J. Gumucio, D. L. Miller, *Gastroenterol.*, **80**, 393 (1980).
- 59) a) K. S. Pang, T. A. Terrel, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **216**, 339 (1982); b) K. S. Pang, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**, 633 (1985).
- 60) L. Bass, S. Keiding, K. Winkler, N. Tygstrup, *J. Theoret. Biol.*, **61**, 393 (1976).
- 61) H. Satoh, Y. Sugiyama, S. Miyauchi, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 3 (1986).
- 62) a) 宮内正二, 杉山雄一, 伊賀立二, 花野 学, 肝での薬物代謝効率を支配する要因の解析——肝内での酵素局在性および生体膜透過性の影響——第4回肝代謝研究会 報告集, アサヒメディカル社, 1987, p. 37—54; b) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Sato, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **15**, 399 (1987); c) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 475 (1989).
- 63) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 688 (1988).
- 64) 杉山雄一, 曹 賜卿, 沢田康文, 新村木実, 伊賀立二, 花野 学, 長瀬すみ, (1985): 薬物肝輸送における血清蛋白の影響; Multiple indicator dilution 法による解析を中心として; 第二回 肝代謝研究会報告集, 松山, 1985, pp. 33—61.
- 65) R. A. Weisiger, “Hoechst Symposia Medica,” vol. 20, Protein Binding and Drug Transport, ed. by J. P. Tillement, E. Lindenlaub, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1986, pp. 293—310.
- 66) a) S. C. Tsao, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **16**, 165 (1988); b) S. C. Tsao, Y. Sugiyama, Y. Sawada, S. Nagase, T. Iga, M. Hanano, *Drug Metabol. Disposit.*,

- 16, 482 (1988).
- 67) R. Weisiger, J. Gollan, R. Ockner, *Science*, **211**, 1048 (1981).
- 68) T. Horie, T. Mizuma, S. Kasai, S. Awazu, *Am. J. Physiol.*, **254**, G465 (1988).
- 69) a) M. Inoue, *Hepatology*, **5**, 892 (1985); b) M. Inoue, K. Okajima, S. Nagase, Y. Morino, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 7654 (1983).
- 70) S. C. Tsao, Y. Sugiyama, Y. Sawada, S. Nagase, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **14**, 51 (1986).
- 71) R. A. Weisiger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 1563 (1985).
- 72) E. L. Forker, B. A. Luxon, *Am. J. Physiol.*, **248**, G709 (1985).
- 73) L. Bass, S. M. Pond, "Pharmacokinetics: Mathematical and statistical approaches," ed. by A. Pecile, A. Rescigno, Plenum press, London, 1988, pp. 245—269.
- 74) a) W. M. Pardridge, E. M. Landaw, *J. Clin. Invest.*, **74**, 745 (1984); b) W. M. Pardridge, *Am. J. Physiol.*, **252**, E157 (1987); c) *Idem*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **28**, 25 (1988); d) W. M. Pardridge, E. M. Landaw, L. P. Miller, L. D. Braun, W. H. Oldendorf, *J. Cereb. Blood Flow & Metab.*, **5**, 576 (1985).
- 75) a) T. H. Lin, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, M. Hanano, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 294 (1987); b) *Idem*, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3425 (1987); c) T. H. Lin, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano, *Drug Metabol. Disposit.*, **16**, 290 (1988); d) *Idem*, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2957 (1988).
- 76) 杉山雄一, 薬物動態, **1**, 87 (1986).
- 77) 寺崎哲也, 薬物動態, **3**, 115 (1988).
- 78) a) D. J. Morgan, D. B. Jones, R. A. Smallwood, *Hepatology*, **5**, 1231 (1985); b) C. M. Mendel, R. R. Cavalieri, R. A. Weisiger, W. M. Pardridge, *Am. J. Physiol.*, **255**, E221 (1988); c) R. P. Ekins, P. R. Edwards, W. M. Pardridge, E. M. Landaw, *Am. J. Physiol.*, **255**, E403 (1988).
- 79) Y. Sugiyama, M. Hanano, *Pharmaceut. Res.* (Review), **6**, 194 (1989).
- 80) 佐藤博章, 杉山雄一, ファームテクジャパン, **5**, 127 (I), 259 (II) (1989).
- 81) H. P. J. Bennett, C. Mcmartin, *Pharmacol. Rev.*, **30**, 247 (1979).
- 82) T. Maack, M. Suzuki, F. A. Almeida, D. Nussenzweig, R. M. Scarborough, G. A. Mcenroe, J. A. Lewicki, *Science*, **238**, 675 (1987).
- 83) B. A. L. Jones, R. H. Renston, S. J. Burwen, "Progress in Liver Diseases," Vol. VII, H. Popper, F. Schaffner (eds.), Grune & Stratton, New York, 1982, pp. 51—69.
- 84) K. Yachi, Y. Sugiyama, H. Satoh, D. C. Kim, T. Fuwa, T. Iga, M. Hanano, *J. Biochem.*, **103**, 448 (1988).
- 85) a) 柳井薫雄, 杉山雄一, 金 東出, 伊賀立二, 花野 学, 坂本俊治, 不破 亨, 薬物代謝と薬効, 毒性シンポジウム, 講演要旨集, 1988, pp. 22—25; b) 柳井薫雄, 杉山雄一, 佐藤博章, 谷内清人, 伊賀立二, 花野学, 坂本俊治, 不破 亨, 薬物動態学会, 年会要旨集, 1987, pp. 52—53; c) S. Yanai, Y. Sugiyama, T. Fuwa, T. Iga, M. Hanano, *Am. J. Physiol.*, submitted.
- 86) a) H. Sato, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, S. Sakamoto, T. Fuwa, M. Hanano, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 8355 (1988); b) H. Sato, Y. Sugiyama, D. C. Kim, T. Iga, T. Fuwa, M. Hanano, *Biochem. Pharmacol.*, in press; c) 杉山雄一, 佐藤博章, 金 東出, 伊賀立二, 花野 学, 不破 亨, 坂本俊治, 第3回肝代謝研究会報告集, アサヒメディカル社, 1986, pp. 49—68.
- 87) 佐藤博章, 杉山雄一, 沢田康文, 伊賀立二, 坂本俊治, 不破 亨, 花野 学, 日本薬学会第109年会, 発表予定 (1989).
- 88) D. C. Kim, Y. Sugiyama, H. Satoh, T. Fuwa, T. Iga, M. Hanano, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 200 (1988).
- 89) S. Yanai, Y. Sugiyama, D. C. Kim, H. Sato, T. Fuwa, T. Iga, M. Hanano, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4891 (1987).
- 90) D. C. Kim, Y. Sugiyama, T. Fuwa, T. Iga, M. Hanano, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 241, 1989.
- 91) L. E. Limbird, In cell surface receptors: A short course on theory and methods, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster, 1986, pp. 159—194.