

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460204

研究課題名(和文) 経口バイオアベイラビリティと薬物相互作用の定量的予測

研究課題名(英文) Quantitative prediction of bioavailability and drug-drug interactions of orally administered drugs

研究代表者

伊藤 智夫 (ITO, Tomoo)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30223168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： CYP3A基質の経口バイオアベイラビリティと、CYP3A阻害薬を併用したときの相互作用を定量的に予測するモデルを確立することを目的とし、CYP3Aの基質としてアルプラゾラム(ALP)、トリアゾラム(TRZ)、ミダゾラム(MDZ)を用い、CYP3A阻害薬としてリトナビル(RIT)およびエリスロマイシン(ERY)を用いた。各薬物の代謝パラメータ、代謝阻害パラメータ、小腸上皮細胞内移行パラメータを *in vitro* 実験から見積り、ITAM-PKモデルに組み込むことで、各薬物を経口投与後のバイオアベイラビリティ、ならびに阻害薬併用時の薬物相互作用を定量的に予測するモデルの改良を行った。

研究成果の概要(英文)： The present study aimed to improve a model to quantitatively predict the bioavailability and drug-drug interactions for orally administered CYP3A substrates. Alprazolam (ALP), midazolam (MDZ) and triazolam (TRZ) were used as CYP3A substrates, and ritonavir (RIT) and erythromycin (ERY) were used as CYP3A inhibitors. Metabolic and inhibition parameters of those drugs were obtained in *in vitro* studies. Transfer parameters in the intestinal epithelial cells were also estimated *in vitro* using Caco-2 cells. The obtained parameters were incorporated into an ITAM-PK model to predict the oral bioavailability of ALP, MDZ and TRZ, and also interactions between CYP3A substrates and CYP3A inhibitors.

研究分野：薬物動態学

キーワード：経口投与 バイオアベイラビリティ 薬物相互作用 定量的予測

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、ヒト小腸マイクロソームを用いた代謝実験と Caco-2 細胞を用いた薬物輸送実験を組み合わせることにより、CYP3A4 の基質となる薬物の小腸初回通過効果を *in vitro* データから定量的に予測するモデルを提唱してきた。また、ヒト小腸を7つのコンパートメントに分割して小腸内の薬物の移動と吸収を考慮したモデル (CAT (Compartmental absorption and transit)モデルに基づき、小腸の各コンパートメントに CYP3A4 発現量を割り振り、各コンパートメントにおいて、基質の消化管内移動、上皮細胞への移行、上皮細胞内での代謝、そして上皮細胞から血液側への移行を組み込んだ微分方程式を立て、得られた微分方程式を数値的に解くことによって、CYP3A4 基質の小腸アベイラビリティ (Fg) を予測する手法についても報告してきた。また、この ITAM (Intestinal transit, absorption and metabolism)モデルを用いて小腸初回通過代謝における薬物相互作用を定量的に予測することも試みてきた。

さらに我々は、肝灌流モデルに従って肝初回通過代謝における薬物相互作用 (代謝阻害) を *in vitro* で半定量的に予測するモデルを提示していたが、この肝灌流モデルと ITAM モデルを連結した ITAM-PK (ITAM based pharmacokinetic)モデルを構築して、経口投与後のバイオアベイラビリティと薬物相互作用が、ある程度定量的に予測可能であることを示してきた。

本研究では、我々が構築してきた ITAM-PK モデルを改良することで、経口バイオアベイラビリティおよび薬物相互作用の定量的予測の向上を試みた。

## 2. 研究の目的

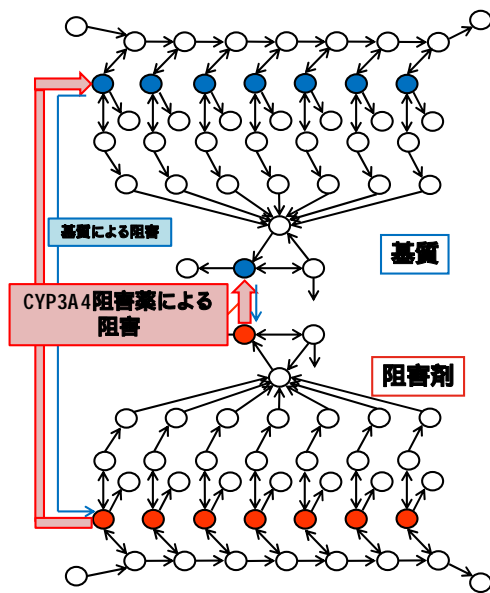
CYP3A 基質の経口バイオアベイラビリティと、CYP3A 阻害薬を併用したときの相互作用を定量的に予測するモデルを確

立することを目的とする。CYP3A の基質としては、アルプラゾラム (ALP)、ミダゾラム (MDZ) およびトリアゾラム (TRZ) を用いた。CYP3A 阻害薬としては、HIV プロテアーゼ阻害薬であるリトナビル (RIT) およびマクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン (ERY) を用いた。RIT および ERY とともに mechanism-based inhibitor であり、自身が CYP3A で代謝されて生成した代謝物が、CYP3A に強固に結合して代謝活性を阻害する。これらの阻害薬は、相互作用が临床上問題となっている薬物であり、本研究では、これら2つの阻害薬による薬物相互作用の定量的予測を目指した。

## 3. 研究の方法

ヒト肝および小腸マイクロソームを用いた代謝実験、代謝阻害実験より、基質および阻害薬の代謝パラメータや代謝阻害パラメータを *in vitro* で算出した。また、Caco-2 細胞を用いた透過実験、蓄積実験より、基質および阻害薬の小腸上皮細胞内の移行パラメータを *in vitro* で見積もった。これらの *in vitro* で算出されたパラメータ値を、下記の ITAM-PK (Intestinal Transit, Absorption, Metabolism -based Pharmacokinetic) モデルに組み込むことで、CYP3A4 基質のバイオアベイラビリティ、阻害薬併用時の薬物相互作用を定量的に予測した。薬物相互作用の予測においては、CYP3A4 阻害薬による小腸および肝における競阻害のみならず MBI (mechanism-based inhibition) を組み込んだ阻害を予測した。また、阻害薬の代謝に対する CYP3A4 基質による阻害も考慮した。CYP3A4 基質として alprazolam (ALP)、midazolam (MDZ) および triazolam (TRZ) を、CYP3A4 阻害薬として ritonavir (RIT) および erythromycin (ERY) を用いた。

Fig.1 ITAM-PK model for drug-drug interaction (次ページ)



#### 4. 研究成果

以前の報告では、小腸マイクロソームを用いた代謝実験から得られた  $K_m$  および  $V_{max}$  を使って小腸アベイラビリティ ( $F_g$ ) の予測を行い、肝マイクロソームにおける代謝パラメータ値は文献値を用いて予測を行っていた。今回、ALP および TRZ について、酵素活性が既知の肝マイクロソームを用いて代謝パラメータ値を得た。その結果、ALP の 1-hydroxylation においては  $K_m = 732 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 0.153 \text{ nmol/min/mg protein}$  となり、4-hydroxylation においては  $K_m = 2000 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 1.76 \text{ nmol/min/mg protein}$  となった。一方、TRZ の 1-hydroxylation においては  $K_m = 192 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 0.327 \text{ nmol/min/mg protein}$  となり、4-hydroxylation においては  $K_m = 1930 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 3.06 \text{ nmol/min/mg protein}$  となった。これらのパラメータ値を用いて ITAM-PK モデルに従って経口投与後のバイオアベイラビリティ ( $F$ ) を算出したところ、ALP で 0.82 となり、ヒトでの報告値 (0.87) に近い値となった。TRZ の  $F$  は 0.67 と計算され、ヒトでの報告値 (0.73) に比べてやや低い値となった。以前の報告で、肝マイクロソームの代謝パラメータとして文献値を使ったところ、TRZ の  $F$  は

0.44 とかなり低い値となったが、今回酵素活性が既知の肝マイクロソームを用いて代謝パラメータ値を求めて予測した結果、TRZ のバイオアベイラビリティの予測が大幅に改善した。尚、ITAM-PK モデルで算出された消化管吸収率 ( $F_a$ )、小腸アベイラビリティ ( $F_g$ )、肝アベイラビリティ ( $F_h$ ) の値は、ALP で  $F_a = 1.0$ ,  $F_g = 0.89$ ,  $F_h = 0.93$  となり、小腸よりも肝臓における初回通過効果が大きいと予測された。対照的に、TRZ では  $F_a = 1.0$ ,  $F_g = 0.75$ ,  $F_h = 0.90$  となり、肝臓よりも小腸における初回通過効果が大きいと予測された。

ALP および TRZ と同じベンゾジアゼピン薬である MDZ を阻害薬として用い、ヒト肝および小腸マイクロソームにおける CYP3A4 によるテストステロン 6 $\beta$ -水酸化代謝に対する阻害効果を調べた。その結果、MDZ は競合的な阻害のみならず、MDZ 濃度と CYP3A4 との接触時間依存的な阻害を示した。その阻害は、NADPH 依存的であり、さらに不可逆的であったことから、MDZ は mechanism-based inhibitor であることが明らかとなり、阻害パラメータを求めたところ  $K'_{app}$  が約  $30 \mu\text{M}$ 、 $kinact$  が約  $0.8 \text{ min}^{-1}$  であった。尚、ALP と TRZ では MBI 効果は認められなかった。RIT、ERY、MDZ の MBI 効果を比較したところ、 $kinact/K'_{app}$  の値は RIT で約  $30 \text{ min}^{-1}/\mu\text{M}$ 、ERY で約  $0.003 \text{ min}^{-1}/\mu\text{M}$ 、MDZ で約  $0.009 \text{ min}^{-1}/\mu\text{M}$  となり、MBI 能力は RIT > MDZ > ERY の順となった。

次に、肝臓における MBI 効果について検討した。RIT (600 mg) を経口投与後の最高血中濃度は約  $14 \mu\text{M}$ 、血液中の非結合率は 0.015 と報告されているので、*in vitro* 代謝阻害実験で得られた RIT の  $K'_{app}$  と  $kinact$  の値から、RIT を経口投与後の肝臓における CYP3A4 不活性化速度定数 ( $k_{obs}$ ) の最大値は  $1.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  と計算された。ERY では、250 mg を経口投与後の最高血中濃度が約  $1.4 \mu\text{M}$ 、血液中の非結合率が 0.33 と報告されているので、ERY の  $K'_{app}$  と  $kinact$  から、ERY 経口投与後の肝臓における CYP3A4 の

kobs の最大値は  $8.7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  と計算された。MDZ では、10 mg を経口投与後の最高血中濃度が約 0.03  $\mu\text{M}$ 、血液中の非結合率が 0.02 と報告されているので、MDZ の  $K'_{app}$  と  $k_{inact}$  から、MDZ 経口投与後の肝臓における CYP3A4 の kobs の最大値は  $6.5 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  と計算された。従って、各薬物を経口投与後の肝臓における MBI 効果は、RIT > ERY > MDZ の順となり、RIT は ERY の約 20 倍、ERY は MDZ の約 100 倍であると推定された。

小腸上皮細胞における MBI 効果の予測に際しては、小腸管腔内容積を 1.92 L と仮定した。RIT (600 mg) を経口投与後の消化管内最高濃度は 430  $\mu\text{M}$ 、Caco-2 細胞を用いた RIT の in vitro 薬物透過実験から小腸上皮細胞内の非結合型率は 0.03 と推定され、RIT を経口投与後の小腸上皮細胞における CYP3A4 の kobs の最大値は約  $0.7 \text{ min}^{-1}$  と計算された。ERY では、250 mg を経口投与後の消化管内最高濃度は 180  $\mu\text{M}$ 、Caco-2 細胞を用いた実験から小腸上皮細胞内の非結合型率は 0.46 と推定され、ERY を経口投与後の小腸上皮細胞における CYP3A4 の kobs の最大値は約  $0.06 \text{ min}^{-1}$  と計算された。MDZ では、10 mg を経口投与後の消化管内最高濃度は 16  $\mu\text{M}$ 、Caco-2 細胞を用いた実験から小腸上皮細胞内の非結合型率は 0.01 と推定され、MDZ を経口投与後の小腸上皮細胞における CYP3A4 の kobs の最大値は約  $0.002 \text{ min}^{-1}$  と計算された。従って、RIT、ERY または MDZ を経口投与した時の小腸上皮細胞における MBI 効果は、RIT > ERY > MDZ の順となり、RIT は ERY の約 10 倍、ERY は MDZ の約 30 倍であると推定された。

以上のように、in vitro 代謝阻害実験で得られた阻害パラメータの値から判断すると、MBI 効果の大きさは RIT > MDZ > ERY となるが、実際にヒトの投与した状況では、肝臓においても小腸においても MBI 効果の大きさは RIT > ERY > MDZ となることが示された。このことは、RIT が極めて強力な CYP3A4 阻害薬として多くの薬物との相互作用が問題となり、その次に ERY の CYP3A4 阻害能

が臨床上問題となり、MDZ の CYP3A4 阻害能は臨床上問題とならないことの裏付けとなる結果と思われる。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 15 件 )

Asakura M, Fukami T, Nakajima M, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, Fujiwara R. Hepatic Dipeptidyl Peptidase-4 Controls Pharmacokinetics of Vildagliptin In Vivo. *Drug Metab Dispos.* 2017;45(2):237-245.

Asakura M, Karaki F, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, Fujiwara R. Vildagliptin and its metabolite M20.7 induce the expression of S100A8 and S100A9 in human hepatoma HepG2 and leukemia HL-60 cells. *Sci Rep.* 2016 9;6:35633.

Mitsugi R, Sumida K, Fujie Y, Tukey RH, Itoh T, Fujiwara R. Acyl-glucuronide as a Possible Cause of Trovafloxacin-Induced Liver Toxicity: Induction of Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2 by Trovafloxacin Acyl-glucuronide. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(10):1604-1610.

Mitsugi R, Itoh T, Fujiwara R. MicroRNA-877-5p is involved in the trovafloxacin-induced liver injury. *Toxicol Lett.* 2016 Oct 3. pii: S0378-4274(16)33266-0.

Hirashima R, Michimae H, Takemoto H, Sasaki A, Kobayashi Y, Itoh T, Tukey RH, Fujiwara R. Induction of the UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 during the Perinatal Period Can Cause Neurodevelopmental Toxicity. *Mol Pharmacol.* 2016 Sep;90(3):265-74.

Yamashita Y, Asakura M, Mitsugi R, Fujii H, Nagai K, Atsuda K, Itoh T, Fujiwara R. MicroRNA expression in the vildagliptin-treated two- and three-dimensional HepG2 cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2016 Jun;31(3):201-9.

Sakamoto M, Itoh T, Tukey RH, Fujiwara R. Nicotine regulates the expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in

humanized UGT1 mouse brain. Drug Metab Pharmacokinet. 2015 Aug;30(4):269-75.

Takagi M, Sakamoto M, Itoh T, Fujiwara R. Underlying mechanism of drug-drug interaction between pioglitazone and gemfibrozil: Gemfibrozil acyl-glucuronide is a mechanism-based inhibitor of CYP2C8. Drug Metab Pharmacokinet. 2015 Aug;30(4):288-94.

Mitsugi R, Itoh T, Fujiwara R. Expression of Human DNAJ (Heat Shock Protein-40) B3 in Humanized UDP-glucuronosyltransferase 1 Mice. Int J Mol Sci. 2015 Jul 2;16(7):14997-5008.

Li G, Nakagome I, Hirono S, Itoh T, Fujiwara R. Inhibition of adenosine deaminase (ADA)-mediated metabolism of cordycepin by natural substances. Pharmacol Res Perspect. 2015 Mar;3(2):e00121.

Kutsuno Y, Hirashima R, Sakamoto M, Ushikubo H, Michimae H, Itoh T, Tukey RH, Fujiwara R. Expression of UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1) and Glucuronidation Activity toward Endogenous Substances in Humanized UGT1 Mouse Brain. Drug Metab Dispos. 2015 Jul;43(7):1071-6.

Oda S, Fujiwara R, Kutsuno Y, Fukami T, Itoh T, Yokoi T, Nakajima M. Targeted screen for human UDP-glucuronosyltransferases inhibitors and the evaluation of potential drug-drug interactions with zafirlukast. Drug Metab Dispos. 2015 Jun;43(6):812-8.

Fujiwara R, Sumida K, Kutsuno Y, Sakamoto M, Itoh T. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 mainly contributes to the glucuronidation of trovafloxacin. Drug Metab Pharmacokinet. 2015 Feb;30(1):82-8.

Asakura M, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, Fujiwara R. Dipeptidyl peptidase-4 greatly contributes to the hydrolysis of vildagliptin in human liver. Drug Metab Dispos. 2015 Apr;43(4):477-84.

Narawa T, Yano T, Itoh T. Stereoselective recognition of amethopterin enantiomers by the rat proton-coupled folate transporter. Biol Pharm Bull. 38(4):545-51, 2015.

〔学会発表〕(計 21 件)

平島梨夏, 田中優史, 藤原亮一, 伊藤智夫 免疫抑制剤による皮膚発がん誘導メカニズムの解明 日本薬学会第 137 年会(仙台) 2017.03.27

植村明日香, 三ツ木諒, 藤原亮一, 伊藤智夫 ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 阻害剤を用いた Crigler-Najjar 症候群 型の致死性回避 日本薬学会第 137 年会(仙台) 2017.03.27

高野修平, 阿部紘美, 濱田祥之, 伊藤智夫 OATP2B1 を介した Estrone-3-sulfate の輸送におけるコーヒー抽出物の影響 日本薬学会第 137 年会(仙台) 2017.03.27

小池美和, 奈良輪知也, 伊藤智夫 PCFT を介した葉酸輸送に対するルイボステイヤーの影響 日本薬学会第 137 年会(仙台) 2017.03.27

田中雛乃, 奈良輪知也, 伊藤智夫 フラボノイド類による PCFT を介した葉酸吸収阻害とその種差 第 60 回日本薬学会関東支部大会 2016.09.17

平島梨夏, 藤原亮一, 伊藤智夫 ケラチノサイトを介した個人レベルでの薬物性肝障害の予測を目指した検討 第 43 回日本毒性学会学術年会 2016.06.29

奈良輪知也, 古田彩香, 伊藤智夫 PCFT を介した葉酸の輸送における緑茶の影響 日本薬剤学会第 31 年会 2016.05.19

久津野友貴, 藤原亮一, 伊藤智夫 UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 の誘導が周産期の神経発達に及ぼす影響 本薬学会第 136 年会 2016.03.29

山下康也, 朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫 肝細胞の三次元培養技術を応用したビルダグリプチン誘導性マイクロ RNA 発現変動解析 日本薬学会第 136 年会 2016.03.27

三ツ木諒, 藤原亮一, 伊藤智夫 HepG2 細胞における miR-877 の機能解析 日本薬学会第 136 年会 2016.03.27

朝倉充俊, 藤原亮一, 藤井秀明, 厚田幸一郎, 伊藤智夫 2 型糖尿病治療薬ビルダグリプチンによる S100A8/A9 の発現誘導 日本薬学会第 136 年会 2016.03.27

奈良輪知也, 遠藤ゆかり, 小玉智香, 伊藤智夫 PCFT を介した輸送における飲料成分による影響について 日本薬学会第 135 年会

(神戸) 2015.03.26

Fujiwara R, Hirashima R, Itoh T. Induction of Drug-Induced Liver Injury (DILI)-Associated Genes by Hepatotoxic Drugs in Keratinocytes. SOT's 55th Annual Meeting 2016.03.15

Asakura M, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, Fujiwara R. Effects of Vildagliptin and Its Metabolite on Inflammation-Associated Genes in Human Hepatoma HepG2 and Monocytic HL-60 Cells. SOT's 55th Annual Meeting 2016.03.14

藤原亮一, 久津野友貴, 伊藤智夫 UDP-グルクロン酸転移酵素1A1の誘導によるチロキシン代謝の亢進および神経発達障害 日本薬物動態学会第30回年会 2015.11.13

平島梨夏, 藤原亮一, 伊藤智夫 ケラチノサイトにおける肝毒性系薬物による薬物性肝障害関連遺伝子の誘導 第9回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2015.11.07

久津野友貴, 藤原亮一, 伊藤智夫 周産期におけるUDP-グルクロン酸転移酵素の誘導が神経発達に及ぼす影響 第9回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2015.11.07

Fujiwara R, Fujie Y, Itoh T. Liver-specific induction of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 by phenethyl isothiocyanate. 7th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference 2015.10.31

久津野友貴, 藤原亮一, 伊藤智夫 UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の誘導が新生児期甲状腺ホルモン機能に及ぼす影響 第28回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2015.08.06

澄田恭平, 久津野友貴, 坂本聖弥, 藤原亮一, 伊藤智夫 トロバフロキサシンのグルクロン酸抱合に關与するUGT分子種の同定 日本薬剤学会第30年会 2015.05.23

藤江佳子, 坂本聖弥, 藤原亮一, 伊藤智夫 Phenethyl isothiocyanate (PEITC) による

UGT1A1 発現量の調節 日本薬剤学会第30年会 2015.05.21

高木基, 坂本聖弥, 藤原亮一, 伊藤智夫 Gemfibrozilアシルグルクロニドによるピオグリタゾン代謝阻害 日本薬剤学会第30年会 2015.05.21

〔図書〕(計3件)

伊藤智夫(分担執筆) 第6章(P.148-152) スタンダード薬学シリーズ -1 薬学総論 . 薬剤師としての基本事項 日本薬学会編 東京化学同人 2015.04.01

伊藤智夫(分担執筆・編集) 第2章(P.43-45, 68-70, 99-104, 121-124, 159-161) スタンダード薬学シリーズ -6 医療薬学 . 薬の生体内運命 日本薬学会編 東京化学同人 2016.12.01

伊藤智夫(分担執筆・編集) 第1章(P.7-26) パートナー 薬剤学 改訂第3版 2017.03.30

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北里大学・薬学部・教授

伊藤 智夫 (ITOHI TOMOO)

研究者番号: 30223168

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし