

平成 22 年 3 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19590157  
 研究課題名（和文）小腸初回通過代謝における薬物相互作用の in vitro 実験からの定量的予測

研究課題名（英文）Quantitative prediction of drug-drug interactions in the intestinal first pass metabolism

研究代表者 伊藤 智夫（Itoh Tomoo）  
 北里大学・薬学部・教授  
 研究者番号：30223168

## 研究成果の概要：

当研究室で提唱してきた ITAM（intestinal transit, absorption and metabolism）model を用いて、ヒトに経口投与された薬物の小腸初回通過効果における薬物相互作用を、in vitro 実験から定量的に予測する道筋が示された。今後、本手法が改良されることにより、重篤な薬物相互作用を未然に回避できることが期待される。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬学、小腸、初回通過効果、薬物相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

臨床で使用される薬物の約半数が薬物代謝酵素であるシトクロム P450（CYP）3A4 で代謝され、小腸における CYP3A4 含量は、全 CYP 含量の 80% にも達すると報告されている。そのため、CYP3A4 の基質となる薬物を経口投与したとき、肝臓だけでなく小腸においても初回通過代謝を受けることが指摘されている。実際、薬物によっては、小腸初回通過効果が肝初回通過効果に匹敵

するか、それ以上であると報告されている。

一方、併用薬との薬物相互作用は、吸収過程および代謝過程において起こりえるが、临床上重篤な有害作用を惹起するのは代謝過程における相互作用であり、その中でも CYP3A4 による代謝を阻害する例が多い。上述のように、経口投与された薬物は小腸および肝臓において初回通過代謝を受けるが、従来、代謝過程における相互作用においては、肝初

回通過代謝における代謝阻害が重要であると考えられてきた。そのため、我々の研究室では肝初回通過代謝における代謝阻害を *in vitro* で半定量的に予測するモデルを提示してきた (K. Ito et al., *Drug Metab. Dispos.* 31(7): 945-954 2003)。しかしながら、近年、小腸初回通過代謝の重要性が認識されるようになって以来、経口投与された薬物の相互作用においても、小腸初回通過代謝における代謝阻害が重要であると考えられるようになってきた。しかしながら我々の知る限りにおいて、小腸初回通過代謝における薬物相互作用を *in vitro* 実験から定量的に予測するモデルは報告されていない。その大きな原因は、そもそも小腸初回通過効果を定量的に予測できるモデルが存在しなかったことにある。

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定量的に予測するモデルを提唱してきた (伊藤 小腸初回通過効果の定量的予測 *薬剤学* 64:342-345 2004)。本研究では、このモデルを使うことにより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を目的とする。

## 2. 研究の目的

臨床上重篤な有害作用を惹起するのは代謝過程における相互作用であり、特に CYP3A4 の代謝阻害が問題となる。近年、小腸初回通過代謝の重要性が認識されるようになって以来、経口投与された薬物の相互作用においても、小腸初回通過代謝における代謝阻害が重要であると考えられるようになってきた。しかしながら、小腸初回通過代謝における薬物相互作用を *in vitro* 実験から定量的に予測する手法は報告されていない。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 基質の小腸初回通過効果を定量的に予測するモデルを提唱してきた。本研究では、このモデルを使うことにより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を目的とする。

## 3. 研究の方法 後述

## 4. 研究成果 後述

## 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 2 件)

Shimizu R, Sukegawa T, Tsuda Y, Itoh T Quantitative Prediction of Oral Absorption of PEPT1 Substrates Based on *in vitro* Uptake into Caco-2 Cells. *Int J Pharmaceut* 354: 104-110 2008.

Narawa T and Itoh T Stereoselective transport of amethopterin enantiomers by the proton-coupled folate transporter. *Drug Metab. Pharmacokin.* (in press) 2010.

[学会発表] (計 14 件)

Narawa T, Yanagisawa H, Tsuda Y, Itoh T Stereoselective transport system of amethopterin enantiomers 4<sup>th</sup> World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (Kanazawa) 2007.6.20 [Final Program and Abstracts p.112 2007.6]

Iwase Y, Ishiji M, Tsuda Y, Itoh T Prediction of human intestinal availability of CYP3A4 substrates based on *in vitro* studies 4<sup>th</sup> World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (Kanazawa) 2007.6.21 [Final Program and Abstracts p.93 2007.6]

内田めぐみ, 高野修平, 加納和彦, 竹田-志鷹真由子, 梅山秀明, 伊藤智夫 ホモロジーモデリングによるOATP2B1の基質結合部位の推定 第2回トランスポーター研究会 (東京) [講演要旨集 p.13 2007.6]

Narawa T, Yanagisawa H, Tsuda Y, Itoh T Stereoselectivity of the proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 (PCFT/HCP1) 8<sup>th</sup> International ISSX Meeting (Sendai) 2007.10.11 [*Drug Metab Rev* 39(1) p.164 2007.10]

Yanagisawa H, Narawa T, Itoh T  
Stereoselective transport of amethopterin enantiomers by reduced folate carrier 1  
8<sup>th</sup> International ISSX Meeting (Senadai)  
2007.10.11 [Drug Metab Rev 39(1) p.175  
2007.10]

Noguchi N, Tsuda Y, Itoh T Prediction of  
intestinal availability of alprazolam in rats  
8<sup>th</sup> International ISSX Meeting (Senadai)  
2007.10.12 [Drug Metab Rev 39(1) p.357  
2007.10]

柳沢秀明, 奈良輪知也, 伊藤智夫 Reduced  
Folate Carrier (RFC)の基質認識における立  
体選択性の解明 日本薬学会第128年会(横  
浜) 2008. 3. 28 [日本薬学会第128年会要  
旨集4 p.123 2008. 3]

奈良輪知也, 田中裕子, 柳沢秀明, 伊藤智夫  
Proton-coupled folate transporter /Heme  
carrier protein 1の立体選択的輸送 日本薬  
学会第128年会(横浜) 2008. 3. 28 [日本  
薬学会第128年会要旨集4 p.123 2008. 3]

野口直子, 津田泰之, 伊藤智夫 ラットにお  
けるCYP3A基質の小腸アベイラビリティの検  
討 日本薬学会第128年会(横浜)  
2008. 3. 28 [日本薬学会第128年会要旨集4  
p.143 2008. 3]

岩瀬由未子, 津田泰之, 伊藤智夫  
MidazolamによるヒトCYP3Aの不可逆的阻害  
日本薬学会第128年会(横浜) 2008. 3. 28  
[日本薬学会第128年会要旨集4 p.146 2008.  
3]

宮崎 智, 伊藤智夫, 伊藤 喬, 山元 弘、  
入江徹美 シンポジウム: 薬学教育改革最  
前線 「共用試験トライアルの状況」 日本  
薬学会第128年会(横浜) 2008. 3. 28

奈良輪知也, 伊藤智夫 ヒトPCFT/HCP1の立  
体選択性 日本薬剤学会第23年会(札幌)  
2008. 5. 22 [日本薬剤学会第23年会講演要旨  
集 p.266 2008. 5]

Takano S., Uchida M., Kanou K.,  
Takeda-Shitaka M., Umeyama H. and Itoh T.  
CONSTRUCTION OF A THREE-DIMENTIONAL MODEL  
AND PREDICTION OF THE SUBSTRATE-BINDING  
SITES OF OATP2B1. 第23回日本薬物動態学  
会年会 [講演要旨集 p.337 2008.10]

[招待講演]

奈良輪知也, 柳沢秀明, 高野修平, 津田泰之,

伊藤智夫 薬物輸送担体の立体選択性 シン  
ポジウム モレキュラー・キラリティ 2008  
(岡山) 2008. 5. 23 [講演要旨集 p.14-16  
2008. 6]

[図書] (計3件)

伊藤智夫 (分担執筆・編集) 第4章: 経口  
投与 (P.55-69) 第7章: 腎クリアランス  
(P.105-116) 第8章: 初回通過効果の計  
算とその他の解析法 (P.117-128) 伊賀勝  
美・伊藤智夫・堀江利治(編) 対話と演習  
で学ぶ 薬物速度論 東京 廣川書店  
2008. 2

伊藤智夫 (分担執筆) 第4章: 共用試験シ  
ステムの構築 (P.15-27) 第5章: 第1回  
トライアル (P.28-58) 薬学実務実習開始  
前の共用試験(平成18年度) 東京 NPO 法  
人 薬学共用試験センター 2007. 5

伊藤智夫 (分担執筆) 第2章: 第2回 CBT  
トライアル (P.21-30) 薬学実務実習開始  
前の共用試験(平成19年度) 東京 NPO 法  
人 薬学共用試験センター 2008. 6. 10

[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

伊藤智夫 北里大学薬学部 教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

## 1. 序論

近年の製薬企業では、薬物動態分野における早期スクリーニングのために *in vitro* モデルを適用する事例が増加している (Roberts S.A., 2003)。その主な理由のひとつは、新規化合物の医薬品開発において臨床試験段階で失敗に終わる原因の 40% が薬物動態学的性質 (ADME property) によるものであるという事実である (Roberts S.A., 2003; Prentis R.A. et al., 1988)。それゆえ、ADME property に起因した問題が医薬品開発の後半の段階で発生することを回避する目的で、初期段階から新規化合物の ADME property をスクリーニングすることは非常に重要である。経口投与製剤のスクリーニングにおいて最も期待される ADME property は、吸収と初回通過代謝の結果決定される経口バイオアベイラビリティ ( $F_{oral}$ ) が容認できるレベルであるということである (Cai H. et al., 2006)。

初回通過代謝に関わる代表的な薬物代謝酵素としてシトクロム P450 (CYP) が挙げられ、現在ではさまざまな分子種の存在が解明、同定されている。その中でも CYP3A4 は基質特異性が低くヒト肝臓での発現比率も高いことから、臨床現場で用いられている医薬品の約半数が CYP3A4 によって代謝されることが示されている (Guengerich F.P., 1999)。

肝臓に比べればその量はわずかではあるが、小腸にも CYP3A4 などの薬物代謝酵素が存在していることが確認されている。しかし、小腸における薬物代謝酵素の発現量が肝臓に比べてわずかであることから、循環血中の薬物の代謝消失はほぼすべてが肝代謝によるものであるという考えは、現在でも一般的なものである。ただし、経口投与時の初回通過効果を考えた場合、肝臓での代謝は、肝臓へと流入する門脈血液中の非結合型薬物のみがその影響を受ける。一方、小腸では上皮細胞を透過する際にはほぼすべての薬物が代謝酵素へ暴露されるため、代謝酵素の絶対量以上にその寄与は大きいと考えられる (Agoram B. et al., 2001)。

ヒト小腸においては、CYP3A4 は総 CYP 含量の約 7 割を占め (Watkins P.B. et al., 1987)、さらに CYP3A 群の発現量は、十二指腸・空腸・回腸でそれぞれ 102, 74, 47 pmol/g wet weight と、小腸上部に高く発現している (Paine M.F. et al., 1997)。よってヒトの消化管での代謝は小腸上部で多く起こると考えられている。

経口バイオアベイラビリティ ( $F_{oral}$ ) は、消化管上皮細胞の apical 膜を透過し、細胞内へと吸収された割合 ( $F_a$ )、消化管壁での代謝を免れる割合 ( $F_g$ )、そして肝臓での代謝を免れる割合 ( $F_h$ ) を用いて表すことができる (Fig. 1-1)。主に受動拡散で吸収される薬物の  $F_a$  を

予測する方法としては、*in vitro* (Chong S. et al., 1996) または *in silico* (Paine M.F. et al., 1996) の手法がそれぞれ報告されている。 $F_h$  に関しては、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験結果を生理学的モデルに組み込むことにより、ある程度予測可能であることが報告されている (Iwatsubo T. et al., 1997)。しかしながら、 $F_g$  を *in vitro* または *in silico* で予測する手法は確立されていない。

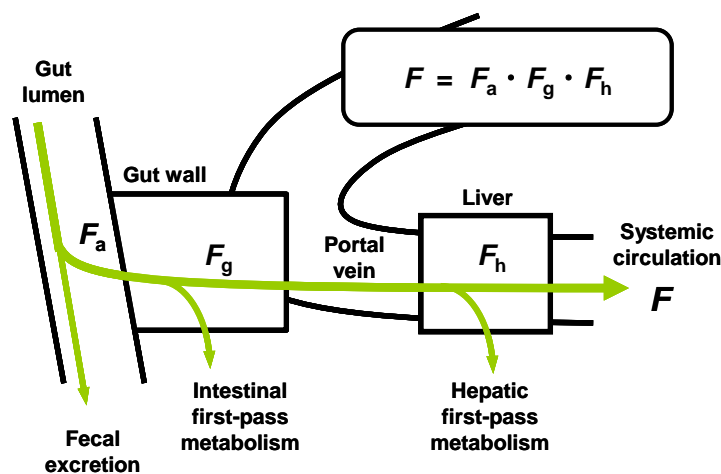
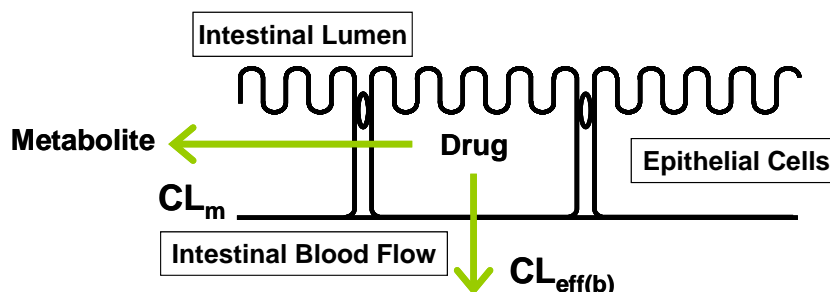


Fig. 1-1 Intestinal and hepatic first-pass effect.

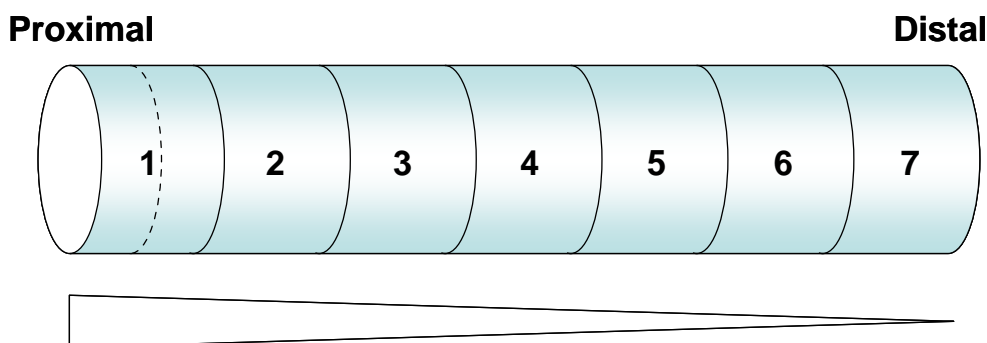
当研究室では、ヒト小腸マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験、Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送実験および Accumulation, Efflux 実験を行い、その結果得られたパラメータを用いることで、下記の Efflux model (Fig. 1-2) のような簡便な計算モデルに当てはめることで、CYP3A4 基質の小腸アベイラビリティ ( $F_g$ ) の定量的予測を試みてきた。



$$F_g = \frac{CL_{\text{eff}(b)}}{CL_{\text{eff}(b)} + CL_m} \dots\dots\dots \text{Eq. 1-1}$$

**Fig. 1-2 Efflux model.**

しかし、前述のとおり、消化管には上部から下部にかけて薬物代謝酵素の発現量などの部位差が確認されており(Fig. 1-3)、さらには MBI (mechanism-based inhibition) などの複雑な解析を要する薬物の存在も明らかとなっていることから、上記のような簡便なモデルを用いて検討するには限界がある。これらのことから、汎用的に  $F_g$  を予測評価する計算モデルは薬物投与後の消化管内動態をより詳細に再現できる必要があり、CAT (compartmental absorption and transit) model (Yu L.X. et al., 1999; Fig. 1-4) を基本とした multi-compartment model が適当であると考えられる。本研究では、 $F_g$  予測評価のための計算モデルとして、我々が提唱してきた ITAM (intestinal transit, absorption and metabolism) model を用いて、経口投与された薬物の小腸初回通過効果における薬物相互作用を定量的に予測することを試みた。



**Fig. 1-3 The model of small intestine and drug-metabolizing enzyme content.**

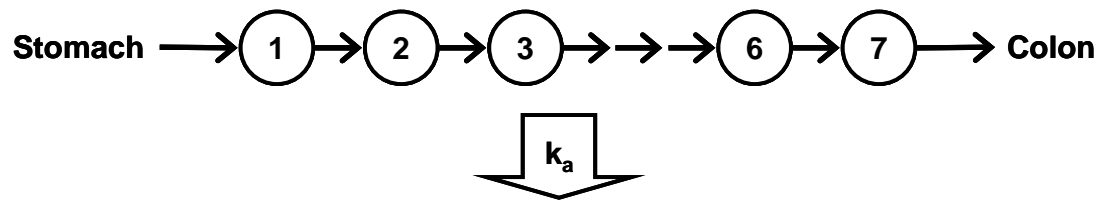


Fig. 1-4 A typical CAT model structure. ( $k_a$  : absorption kinetic constant)

## 2 実験方法

### 2-1 代謝実験

#### ヒト小腸マイクロソームによる代謝試験

1.0 mg protein/mL HIM 20  $\mu$ L、0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 140  $\mu$ L、NADPH-generating system (3.3 mM NADP, 80 mM glucose-6-phosphate, 1 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 60 mM MgCl<sub>2</sub> 水溶液) 20  $\mu$ L をエッペンドルフチューブ内で混合し、37°C で 5 分間 preincubate した。その後、各薬物 20  $\mu$ L を添加し、37°C で incubate して反応させた。一定時間後、氷冷した methanol 200  $\mu$ L を添加し、vortex することにより、反応を停止させた。得られた溶液を 10,000 g で 10 分間遠心後、上清 50  $\mu$ L を直接 HPLC へ inject することにより、各代謝物を定量した。MDZ では、得られた溶液を 10,000 g で 10 分間遠心後、上清 350  $\mu$ L を 15 時間濃縮乾固 (VC-960 Centrifugal concentrator, TAITEC Co. Ltd., Saitama prefecture, Japan) し、175  $\mu$ L の移動相 (後述) に溶解して、そのうち 50  $\mu$ L を HPLC に inject することにより、MDZ の代謝物を定量した。

代謝試験で添加した各薬液の反応液中濃度は、時間依存性実験では MDZ: 200  $\mu$ M、ALP: 100  $\mu$ M、TRZ: 100  $\mu$ M、PRG: 20  $\mu$ M、TST: 50  $\mu$ M、CBZ: 500  $\mu$ M、EM: 50  $\mu$ M、濃度依存性実験では ALP: 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500  $\mu$ M、TRZ: 0, 50, 100, 200, 500, 1000  $\mu$ M、MDZ: 0, 25, 100, 500, 1000, 2000  $\mu$ M、PRG: 0, 20, 50, 100, 200 および 400  $\mu$ M、TST: 0, 20, 50, 100, 200, 300 および 500  $\mu$ M、EM: 0.5~500 $\mu$ M であった。時間依存性実験での反応時間は、MDZ は 0, 2.5, 5, 10 および 20 min、ALP は 5, 10, 20, 30, 45 および 60 min、TRZ は 10, 20 および 30 min、PRG は 1, 2, 3 および 5 min、CBZ は 30, 60 および 60 min、EM は 15~60 分であった。濃度依存性実験での反応時間は、時間依存性実験から直線性の認められた時間を選択し、ALP および TRZ は 20 min、MDZ および PRG は 3 min、TST は 15 min、EM は 10 min とした。

#### 代謝データの解析

各薬物の代謝初速度 ( $v$ ) を各薬物濃度 ( $[C]$ ) に対してプロットし、非線形最小二乗法プログラム MULTI を用いて式 (2) に当てはめることにより、 $K_m$  値および  $V_{max}$  値を求めた。また、*in vitro* 代謝固有クリアランス ( $CL_{int,in vitro}$ ) を式 (3) または (4) に従って求めた。

$$v = \frac{V_{max} \cdot [C]}{K_m + [C]} \quad \text{式 (2)}$$

$$CL_{int,in vitro} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad \text{式 (3)}$$

$$CL_{int,in vitro} = \frac{v}{[C_0]} \quad \text{式 (4)}$$

ここで  $V_{max}$  は最大代謝速度、 $K_m$  は Michaelis 定数、 $v$  は代謝初速度、 $C_0$  は基質の初濃度である。

## マイクロソームへの結合試験と非結合型分率 (unbound fraction, $f_u$ ) の算出

反応液中における薬物の HIM (Lot. No. 045301500011) への結合率を、限外濾過法により測定した。0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 640  $\mu\text{L}$  中に、1.0 mg protein/mL HIM (Lot. No.045301500011) 80  $\mu\text{L}$ 、各薬物溶液 80  $\mu\text{L}$  を加え、37°C で 5 分間 incubate した。添加した薬物溶液は、TST (250, 1,000, 2,000  $\mu\text{M}$ )、CBZ (5 mM) であった。Incubate 後、反応液全量 800  $\mu\text{L}$  を molecular weight cut-off 30,000 の限外濾過膜を装着する Amicon Centrifree® (Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.) に移し、37°C、1,000 g で 5 分間遠心した (Himac CR 15D, rotor: RT 15A4, Hitachi Koki Co. Ltd., Tokyo, Japan)。残存溶液と濾液をそれぞれ 50  $\mu\text{L}$  ずつ HPLC に inject し、各薬物を測定した。反応液中における薬物の濃度は MDZ: 1~200  $\mu\text{M}$ 、ALP: 1~1,500  $\mu\text{M}$ 、TRZ: 1~1,000  $\mu\text{M}$ 、TST: 25~200  $\mu\text{M}$ 、CBZ: 500  $\mu\text{M}$ 、EM: 5~500  $\mu\text{M}$  に設定した。

PRG は超遠心を用いて反応液中における薬物の HIM (Lot. No. 045301500011) への結合率を測定した。0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 640  $\mu\text{L}$  中に、1.0 mg protein/mL HIM (Lot. No.045301500011) 80  $\mu\text{L}$ 、各薬物溶液 80  $\mu\text{L}$  を加え、37°C で 5 分間 incubate した。添加した薬物溶液は、PRG (200, 500, 1,000  $\mu\text{M}$ )、CBZ (5 mM) であった。Incubate 後、反応液全量 800  $\mu\text{L}$  を超遠心用の遠沈管に移し、4°C、100,000 g で 60 分間超遠心した。上清を HPLC に inject し測定した。反応液中における PRG 濃度は 20, 50, 100  $\mu\text{M}$ 、CBZ 濃度は 500  $\mu\text{M}$  に設定した。KET (0.02  $\mu\text{M}$ ) は限外濾過法および超遠心法で検討した。

限外ろ過後の残存溶液中の薬物濃度 (マイクロソームに結合している薬物濃度 [ $C_b$ ] と非結合型薬物濃度 [ $C_f$ ] の和)、および限外濾液中の薬物濃度 ( $[C_f]$ ) より、マイクロソーム存在下における薬物の非結合型分率 ( $f_u$ ) を式 (5) に従って求めた。

$$f_u = \frac{[\text{濾液中濃度}]}{[\text{残存液中濃度}]} \quad \text{式 (5)}$$



## CYP3A4 の不活性化実験

1.0 mg protein/mL HIM、NADPH-generating system (3.3 mM NADP, 80 mM glucose-phosphate, 1 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 60 mM MgCl<sub>2</sub> 水溶液)、0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) をエッペンドルフチューブ内 (1.5 mL, polypropylene 製) で混合し、37°Cで 5 分間 preincubate した。その後、0 および 100 μM ALP または TRZ、0, 5, 10, 20, 40, 60 および 80 μM MDZ、あるいは 0 および 50 μM PRG となるように各薬液を添加し、37°Cで 0、2.5、5、10 または 20 分間 incubate して阻害剤とミクロソームを反応させた。コントロールには、薬物溶液に代えて methanol と 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) の混液を添加した。阻害剤との反応後、50 μM となるよう TST 溶液を添加し、37°Cで 5 分間 incubate して反応させた。Incubate 後、氷冷した methanol を反応液に添加し vortex することにより、反応を停止させた。得られた溶液を 10,000 g で 10 分間遠心後、上清を直接 HPLC へ inject して 6β-OH TST を定量した。

## Erythromycin (EM) による midazolam の代謝に対する阻害試験

0.1 mM EDTA を含む 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 120 μL、1 mg/mL ヒト小腸ミクロソーム (第一化学薬品 (株), Lot No. 045301500011) 20 μL、NADPH generating system (3.3 mM NADP, 80 mM glucose-6-phosphate, 1 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 60 mM MgCl<sub>2</sub> 水溶液) 20 μL をエッペンドルフチューブ内で混合し、37°Cで 5 分間 preincubation した。その後、0~6,000 μM の EM 溶液 (acetone : 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA = 1 : 9) または AZM 溶液 (acetone : 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA = 1 : 4) を 20 μL 添加し、37°Cで 0~20 分間 incubation して反応させた。コントロールには、EM の場合は、薬物溶液に代えて acetone : 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA = 1 : 9 溶液を添加して、阻害剤を反応させた。さらに、2 mM MDZ 溶液 (acetone : 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA = 1 : 4) を添加し、37°Cで 3 分間 incubation して反応させた。Incubation 後、氷冷した 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 μL を反応液へ添加して vortex することにより、反応を停止させた。得られた溶液をガラス遠心管に移し、酢酸エチル 1 mL、内部標準として 2 μg/mL etizolam 20 μL を加え、vortex 後、1,500 g で 10 分間遠心した。酢酸エチル層を丸底ガラス試験管に移し、N<sub>2</sub> ガスで乾固させた後、200 μL の移動相に溶かし、そのうち 50 μL を HPLC に inject することにより α-OH MDZ と etizolam のピーク面積比を算出した。反応液中の MDZ 濃度は 200 μM、EM および AZM 濃度は 0~600 μM に設定した。

## CYP3A4 不活性化の速度論的解析

CYP3A4 活性 ( $6\beta$ -OH TST formation rate) を MDZ との反応時間に対して片対数プロットし、阻害の初速度が見られている領域の傾きから、みかけの酵素 (CYP3A4) 不活性化速度定数 ( $k_{obs}$ ) を求めた。得られた  $k_{obs}$  の値を MDZ 濃度 ( $[I]$ ) に対してプロットし、非線形最小二乗法プログラム MULTI (Yamaoka et al., 1981) を用いて式 (6) に当てはめることにより、MDZ の CYP3A4 活性に対する阻害パラメータ ( $K'_{app}$ ,  $k_{inact}$ ) を求めた。

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} \cdot [I]}{K'_{app} + [I]} \quad \text{式 (6)}$$

ここで  $k_{obs}$  はみかけの酵素 (CYP3A4) 不活性化速度定数、 $k_{inact}$  は最大不活性化速度定数、 $K'_{app}$  は酵素と MDZ のみかけの解離定数 (Waley, 1985; Silverman, 1988) を表す。

## KET による代謝阻害実験

1.0 mg protein/mL HIM、NADPH-generating system 20  $\mu$ L をエッペンドルフチューブ内で混合し、37°C で 5 分間 preincubate した。その後、0, 0.2 および 0.4  $\mu$ M の KET と 200, 400 および 2000  $\mu$ M の TST の 1:1 混合液を 20  $\mu$ L 添加し、37°C で 10 分 incubate した。コントロールには、TST のみを 20  $\mu$ L 添加した。Incubate 後、氷冷した methanol を添加 vortex することにより、反応を停止させた。得られた溶液を 10,000 g で 10 分間遠心後、上清を直接 HPLC へ inject して  $6\beta$ -OH TST を定量した。反応液中の KET 濃度を 0, 0.01, 0.02  $\mu$ M、TST 濃度を 10, 20 および 100  $\mu$ M に設定した。実験結果を Dixon plot 解析することにより、阻害様式を判定し、阻害定数を算出した。

## 2-2 Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送実験

### Apical 側から basal 側への経細胞輸送

Transwell® のポリカーボネートフィルター上に Caco-2 細胞を単層培養し、カップ内の培地を除いた後、HBSS (pH 7.4, 37°C) を apical 側に 1.0 mL、basal 側に 2.0 mL 加えて細胞表面を 2 回 wash し、同様に HBSS (pH 7.4, 37°C) を添加して 50 strokes/min で 10 分間 preincubate (Personal-11, TAITEC Co. Ltd., Saitama prefecture, Japan) した。HBSS を除いた後、薬液を apical 側に 1.0 mL、新たな HBSS (pH 7.4, 37°C) を basal 側に 2.5 mL 添加し、50 strokes/min で incubate した。薬液は、100 μM CBZ または TST、10 μM PRG または KET、50 μM EM を 5% DMSO 液を含む HBSS 溶液 (pH 6.0, 37°C) となるよう調整して用いた。一定時間後 basal 側の HBSS を 1.0 mL 採取し、新たに HBSS (pH 7.4, 37°C) 1.0 mL を basal 側に加えた。採取した試料のうち 50 μL を HPLC へ inject し、各薬物を定量した。ただし、PRG および EM についてはアイソトープラベル体を用いた。

Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送実験から式 (7) に従って、apical 側から basal 側へのみかけの透過係数 ( $P_{app}$ ) を算出した。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{C_0 \cdot A} \quad \text{式 (7)}$$

ここで  $dQ/dt$  は各薬物の透過初速度、 $A$  は Caco-2 細胞が培養された Transwell® の表面積 (4.71 cm<sup>2</sup>)、 $C_0$  は donor 側 (apical 側) の薬物の初濃度である。

### Basal 側から apical 側への経細胞輸送

Transwell® のポリカーボネートフィルター上に Caco-2 細胞を単層培養し、カップ内の培地を除いた後、HBSS (pH 7.4, 37°C) を apical 側に 1.0 mL、basal 側に 2.0 mL 加えて細胞表面を 2 回 wash し、HBSS (pH 7.4, 37°C) を添加して、50 strokes/min で 10 分間 preincubate した。HBSS を除いた後、薬液を basal 側に 2.5 mL、新たな HBSS (pH 6.0, 37°C) を apical 側に 1.0 mL 添加し、50 strokes/min で incubate した。薬液としては、100 μM CBZ または TST、10 μM PRG または KET、50 μM EM を 5% DMSO 液を含む HBSS 溶液 (pH 7.4, 37°C) となるよう調整して用いた。一定時間後に apical 側の HBSS を 0.5 mL 採取し、新たに HBSS 0.5 mL (pH 6.0, 37°C) を apical 側に加えた。採取した試料のうち 50 μL を HPLC へ inject した。ただし、PRG および EM についてはアイソトープラベル体を用いた。

経細胞輸送実験から上記の式 (7) に従って、basal 側から apical 側へのみかけの透過係数 ( $P_{app}$ ) を算出した。ただし、 $C_0$  は donor 側 (basal 側) の薬物初濃度とした。

### Caco-2 細胞を用いた accumulation 実験と非結合型分率の算出

Transwell® のポリカーボネートフィルター上に Caco-2 細胞を単層培養し、カップ内の培地を除いた後、HBSS (pH 7.4, 37°C) を apical 側に 1.0 mL、basal 側に 2.0 mL 加えて細胞表面 2 回 wash した後、HBSS (pH 7.4, 37°C) を添加して 50 strokes/min で 10 分間 preincubate した。HBSS を除いた後、薬液 (pH 6.0, 37°C) を apical 側に 1.0 mL、薬液 (pH 7.4, 37°C) を basal 側に 2.5 mL 加え、50 strokes/min で 1 時間 incubate することにより、薬物を細胞内

に accumulate させた。薬液として、100  $\mu\text{M}$  CBZ または TST、10  $\mu\text{M}$  PRG または KET、50  $\mu\text{M}$  EM の 5 % DMSO 液を含む HBSS 溶液 (pH 6.0 or 7.4, 37°C) を用いた。

2 時間の accumulation 終了後、apical 側から 0.5 mL、basal 側から 1.0 mL を採取した後、両サイドの HBSS を除いた。細胞表面の付着水中に含まれる薬物を除くため ice-cold HBSS (pH 7.4) を apical 側に 1.0 mL、basal 側に 2.0 mL 添加して、細胞表面を 2 回 wash した後、Caco-2 細胞をフィルターと共に手術用のメスでカットし、エッペンドルフチューブへ移した。細胞の付着したフィルターに、各薬物の HPLC 移動相 (後述) 1 mL を加えて vortex した後、1 分間の超音波処理を行い、この懸濁溶液を 10,000 g で 15 分間遠心した。得られた上清のうち 50  $\mu\text{L}$  を HPLC に inject した。ただし、PRG および EM についてはアイソトープラベル体を用いた。

細胞内へ薬物を 2 時間 accumulate させた後、得られた apical 側、basal 側、および細胞内濃度を用いて、以下の式 (8) に従って Caco-2 細胞における非結合型分率 ( $f_{u,Caco-2}$ ) 算出した。ここで、 $C_a$  は accumulation 終了時の apical 溶液中薬物濃度、 $C_b$  は accumulation 終了時の basal 溶液中薬物濃度、 $C_{cell}$  は accumulation 終了時の Caco-2 細胞内薬物濃度を表す。2 時間の accumulation で、細胞内非結合型薬物は細胞外液中薬物と平衡状態にあり、細胞内非結合型薬物濃度は、apical および basal 溶液中の薬物濃度の平均値に等しいと仮定した。

$$f_{u,Caco-2} = \frac{C_a + C_b}{2} \cdot \frac{1}{C_{cell}} \quad \text{式 (8)}$$

### 2-3 Reported $F_g$ の算出

健常人男性より提供された血液に、CYP3A4 基質 (ALP (0, 0.1, 0.2 および 0.4  $\mu\text{M}$ )、TRZ (0, 0.1, 0.2, 0.25 および 0.5  $\mu\text{M}$ )、MDZ (0, 0.5, 1, 1.5, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) CBZ (0, 10, 15, 30  $\mu\text{M}$ ) TST (0, 0.1, 0.3 および 1  $\mu\text{M}$ ) または PRG (0, 0.1, 0.5 および 1  $\mu\text{M}$ ) となるよう薬液を添加し、良く混和した後、10000 g で 5 min 間遠心分離し、除タンパクのため ice-cold methanol を添加した。再度 10000 g で 10 min 間遠心分離し、血漿成分を分離した。血漿中濃度に対する血液中濃度の比 ( $R_B$  値) は以下の式を用いて算出した。

$$R_B = \frac{C_0}{C_P} \quad \text{式 (9)}$$

ここで、 $C_0$  は実験に用いた初濃度、 $C_P$  は血漿中薬物濃度を示している。

薬物の経口投与後のバイオアベイラビリティ ( $F$ ) は、式 (10) を用いて計算できる。 $F$ 、吸収率 ( $F_a$ )、肝バイオアベイラビリティ ( $F_h$ ) の値がわかれば、式 (10) に従って  $F_g$  が算出できる。まず  $F_a$  については、ヒトにおける報告値のある薬物については、 $F_a$  の報告値を用いた。脂溶性が高く受動拡散による生体膜透過性が良い ALP および TRZ の  $F_a$  は 0.92、0.82 と報告されている (Smith et al., 1984, Eberts., et al., 1981)。一方、 $F_a$  の報告値の無い薬物については、薬物の脂溶性と Caco-2 細胞透過性から、本研究で用いた薬物は受動拡散による生体膜透過性が良いと判断されたため、 $F_a = 1$  と仮定した。

一般に文献で報告されている AUC は血漿中薬物濃度を示しているため、 $R_B$  値を用いて全血中薬物濃度に補正した (式 (11))。  $F_h$  の算出にあたっては、まず静注後の血漿中薬物濃度推移

から式 (12) に従って肝クリアランスを算出し、さらに式 (12) に従って肝アベイラビリティ ( $F_h$ ) を算出した。で肝抽出率を算出した。肝血流量 ( $Q_h$ ) の値として、 $F_h$  算出に妥当とされている文献値 (1800 mL/min) を用いた (Kato et al., 2003)。そこで、ヒトに各薬物を静注および経口投与後の結果 (文献値) から  $F$  および  $F_h$  の値を算出し、上記の  $F_a$  を式 (10) に代入することにより  $F_g$  を算出した。算出された  $F_g$  を Reported  $F_g$  とした。

$$F = F_a \times F_g \times F_h = \frac{AUC_{p.o.}/D_{p.o.}}{AUC_{i.v.}/D_{i.v.}} \quad \text{式 (10)}$$

$$AUC_{i.v.}^{blood} = AUC_{i.v.}^{plasma} \times R_B \quad \text{式 (11)}$$

$$CL_h^{blood} = \frac{D_{i.v.}}{AUC_{i.v.}^{blood}} \quad \text{式 (12)}$$

$$F_h = 1 - \frac{CL_h^{blood}}{Q_h} \quad \text{式 (13)}$$

## 2-4 定量法

### 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による各薬物および代謝物の定量

HPLC 装置として LC-10AD pump (Shimadzu Ltd., Kyoto, Japan)、SIL-10A sample injector (Shimadzu)、SPD-10A UV absorbance detector (Shimadzu) を用いた。カラムは Mightysil RP-18 reversed-phase column (5  $\mu$ m, 4.6  $\phi$   $\times$  150 mm, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan) を使用した。

### 液体シンチレーションカウンターを用いた progesterone (PRG) および erythromycin (EM) の測定

Apical 側 (500  $\mu$ L) および basal 側 (1 mL) から sampling した各溶液をバイアルに移し、液体シンチレーションカクテル (Aquasol™-2) 10 mL を加え、液体シンチレーションカウンター (LS 6000IC : Beckman Coulter Co., Brea, CA, U.S.A.) により放射活性を測定した。

### 高速液体クロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (LC-MS/MS) による erythromycin (EM) の定量

LC-MS/MS の装置として LC には Alliance [2695 Separations Module] (日本ウォーターズ (株), Tokyo, Japan)、MS には Quattro micro™ (日本ウォーターズ (株)) を用いた。カラムは Capcell Pak MF (C8) reversed-phase column (5  $\mu$ m,  $\phi$  2.0 mm  $\times$  150 mm, Shiseido Fine Chemicals. Inc., Tokyo, Japan) を使用した。1 ppm (1.36  $\mu$ M) の EM 溶液を調製し、チューニング用の試薬とした (136  $\mu$ M の EM (acetone : potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA = 1 : 9) を調製し、H<sub>2</sub>O : methanol = 1 : 1 を用いて 100 倍希釈)。全てのマススペクトルは MassLynx™ Version 4.0 (日本ウォーターズ (株)) を用いて解析した。

## 2-5 小腸アベイラビリティ ( $F_g$ ) の算出

消化管には上部から下部にかけて薬物代謝酵素の発現量などの部位差が確認されており、さらには MBI (mechanism-based inhibition) などの複雑な解析を要する薬物の存在も明らかとなっていることから、これまでに報告されてきた簡便な Efflux モデルを用いて検討するには限界がある。汎用的に  $F_g$  を予測評価する計算モデルは薬物投与後の消化管内動態をより詳細に再現できる必要があり、CAT (compartmental absorption and transit) model (Yu L.X. et al., 1999; Fig. 1-4) を基本とした multi-compartment model が適当であると考えられた。そこで我々が構築した、 $F_g$  予測評価のための計算モデルである ITAM (intestinal transit, absorption and metabolism) model を用いて、併用薬による  $F_g$  の変化を定量的に予測した。なお、本研究におけるすべてのシミュレーション計算は薬物動態解析ソフトウェア SAAM2 (SAAM Institute, Inc., Seattle USA) を用いて行なった。

### Amount of drug-metabolizing enzyme in a small intestinal epithelia

ITAM model における薬物代謝酵素の量は microsomal protein 量として表現した。小腸（全長 280 cm）の上部から下部にかけて、十二指腸、空腸、回腸（それぞれ 20, 100, 160 cm）に存在している microsomal protein 量（それぞれ 375, 1584, 1019 mg）を、論文報告を参考に設定し（Paine et al., 1997）、小腸全長を7等分した各セグメントに振り分けた。その際の模式図を Fig. 2-1 に示し、数値を一覧にまとめた。

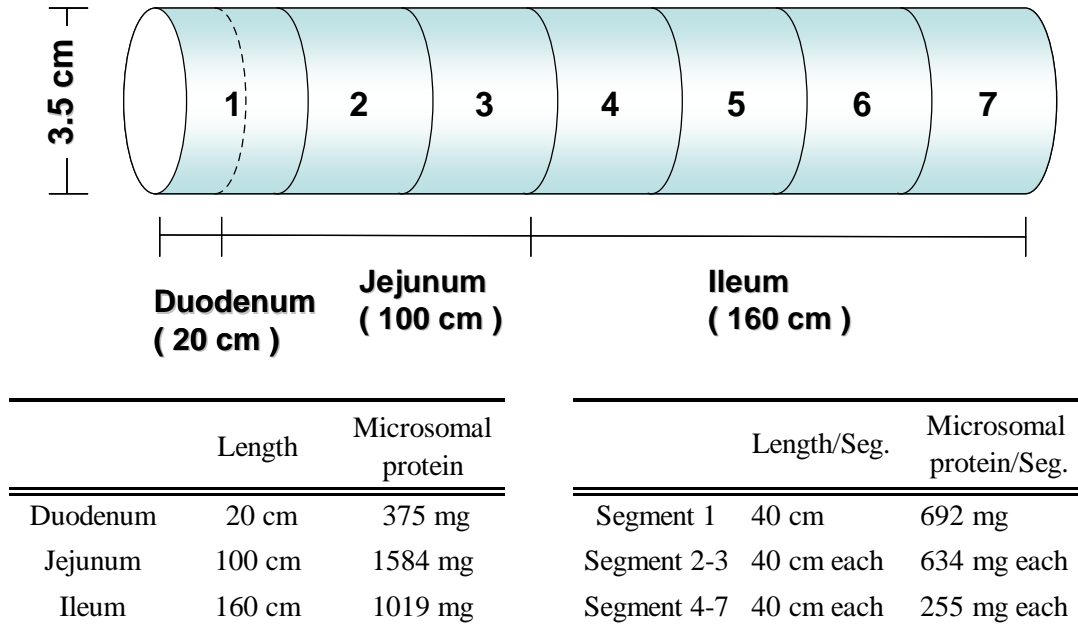


Fig. 2-2 Microsomal protein contents in each segment.

## Metabolism process in ITAM model

Metabolism の過程は、上皮細胞もしくは metabolic zone コンパートメントから代謝物プールのコンパートメントへと不可逆的に移行するものとして表現した。代謝物プールへの移行速度（= 代謝速度）は、Michaelis-Menten 式を用いて、Eq. 14（代謝経路が複数存在する場合は Eq. 15）のように記述し、上皮細胞もしくは metabolic zone コンパートメントに存在している薬物のうち、非結合型の薬物のみが代謝反応を受けるものとして記述した。また、Michaelis-Menten パラメータである  $V_{\max}$  は、*in vitro* 実験の結果である  $V_{\max \text{ in vitro}}$  を小腸の各セグメントに存在している microsomal protein 量 (MSp) で補正した値として用いた。

$$\frac{dM}{dt} = \frac{f_u \cdot C_{\text{epi}} \cdot V_{\max}}{f_u \cdot C_{\text{epi}} + K_m} \quad \text{or} \quad \frac{dM}{dt} = \frac{f_u \cdot C_{\text{met}} \cdot V_{\max}}{f_u \cdot C_{\text{met}} + K_m} \quad \dots\dots\dots \text{Eq. 14a, -b}$$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{f_u \cdot C_{\text{epi}} \cdot V_{\max,1}}{f_u \cdot C_{\text{epi}} + K_{m,1}} + \frac{f_u \cdot C_{\text{epi}} \cdot V_{\max,2}}{f_u \cdot C_{\text{epi}} + K_{m,2}} \quad \text{or}$$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{f_u \cdot C_{\text{met}} \cdot V_{\max,1}}{f_u \cdot C_{\text{met}} + K_{m,1}} + \frac{f_u \cdot C_{\text{met}} \cdot V_{\max,2}}{f_u \cdot C_{\text{met}} + K_{m,2}} \quad \dots\dots\dots \text{Eq. 15a, -b}$$

$$\left( \begin{array}{l} f_u = f_{u, \text{Caco-2}} \\ V_{\max} \text{ (nmol/min)} = V_{\max, \text{in vitro}} \text{ (nmol/min/mg protein)} \cdot \text{MSp (mg protein)} \end{array} \right)$$

$M$  : 代謝物量、 $f_u$  : 非結合型分率、 $f_u \cdot C$  : 非結合型薬物濃度

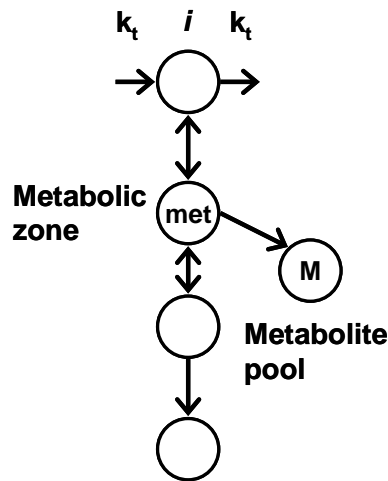


Fig. 2-2 Metabolism models with metabolic zone and non-metabolic zone compartments.



## Incorporation of mechanism-based inhibition (MBI) in ITAM model

MDZ に関しては mechanism-based inhibition (MBI) を引き起こす可能性があるとの報告がなされている (Khan K.K. et al., 2002)。また当研究室では、HIM を用いた検討において、MBI パラメータである  $k_{inact}$ 、 $K'_{app}$  値の見積りに成功している。このことから、本研究における MDZ の  $F_g$  予測計算の過程には MBI の寄与を加味した。

MBI は、みかけの阻害速度定数  $k_{obs}$  に従って不可逆的に酵素を失活させる阻害様式であるため、各セグメントの薬物代謝酵素量 (MSP) をそれぞれ1つのコンパートメントとして表現し、下記の計算式に従って酵素が減少していくように記述した。

$$-\frac{dMSP}{dt} = k_{obs} \cdot MSP \dots\dots\dots \text{Eq. 16}$$

$$k_{obs} = \frac{f_u \cdot C_{epi} \cdot k_{inact}}{f_u \cdot C_{epi} + K'_{app}} \quad \text{or} \quad k_{obs} = \frac{f_u \cdot C_{met} \cdot k_{inact}}{f_u \cdot C_{met} + K'_{app}} \dots\dots\dots \text{Eq. 17a, -b}$$

$MSP$  : ミクロソームタンパク量として示した薬物代謝酵素量、 $k_{obs}$  : みかけの阻害速度定数、

$k_{inact}$  : 最大阻害速度定数、 $K'_{app}$  : 阻害速度定数に対する Michaelis-Menten 定数

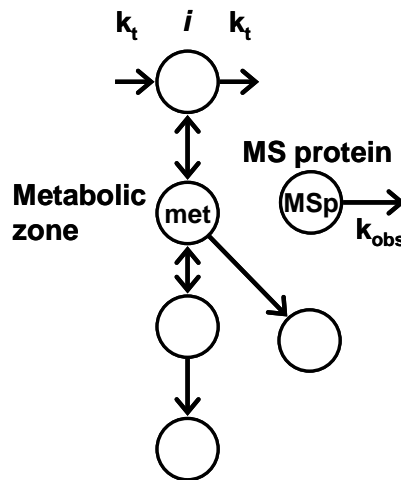


Fig. 2-3 MBI models with an epithelia compartment (left) and with metabolic zone and non-metabolic zone compartments (right).

### Definition of $F_g$ in ITAM model

上皮細胞を2つのコンパートメントに分割し、metabolic zone を設定したモデルでは、消化管吸収率 ( $F_a$ ) と小腸アベイラビリティ ( $F_g$ ) を次のように定義した。

$$F_a = \frac{\sum X_{met} + \sum X_{non} + \sum X_{abs} + \sum M}{X_{dose}} \dots\dots\dots \text{Eq. 18}$$

$$F_g = \frac{\sum X_{abs}}{\sum X_{met} + \sum X_{non} + \sum X_{abs} + \sum M} \dots\dots\dots \text{Eq. 19}$$

$$F_a \cdot F_g = \frac{\sum X_{abs}}{X_{dose}} \dots\dots\dots \text{Eq. 20}$$

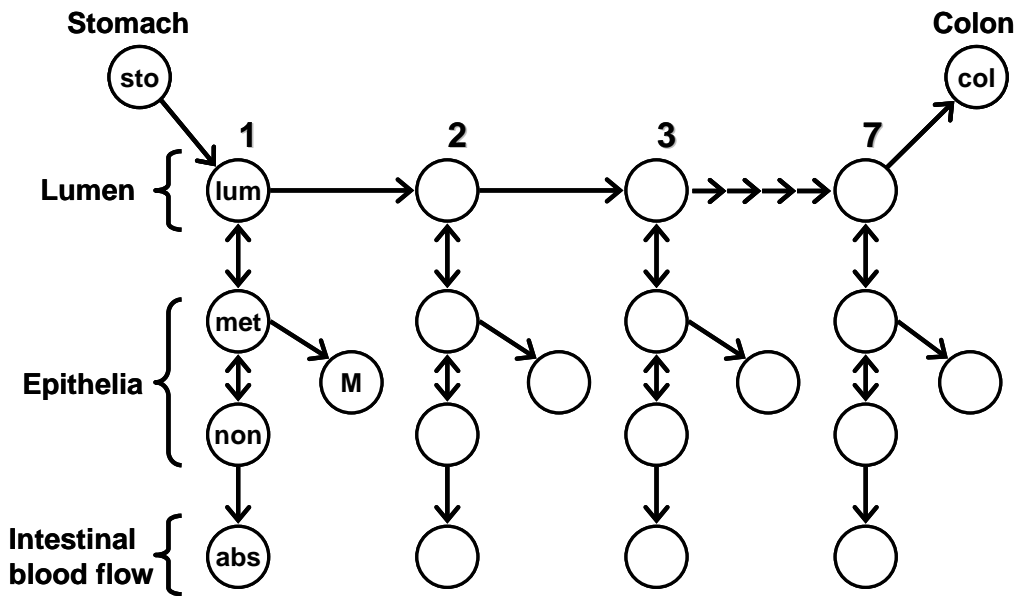


Fig. 2-4 ITAM model with divided epithelia compartments.

$F_a$  と  $F_g$  はともに最終的なバイオアベイラビリティに対応する値であることから、シミュレーション時間を十分に経過 (600 min) させた時点での値を計算結果として扱った。

### 3 結果

#### 3-1 代謝実験

##### MDZ の代謝試験

ヒト小腸マイクロソームによる MDZ の $\alpha$ 位および 4 位水酸化代謝における基質濃度依存性を検討した結果を Fig. 3-1-1 に示した。得られた結果を式 (2) にあてはめて算出したパラメータ値および得られた  $K_m$  値、 $V_{max}$  値から式 (3) にしたがって算出された  $CL_{int, in vitro}$  の値を Table 3-1-1 に示した。

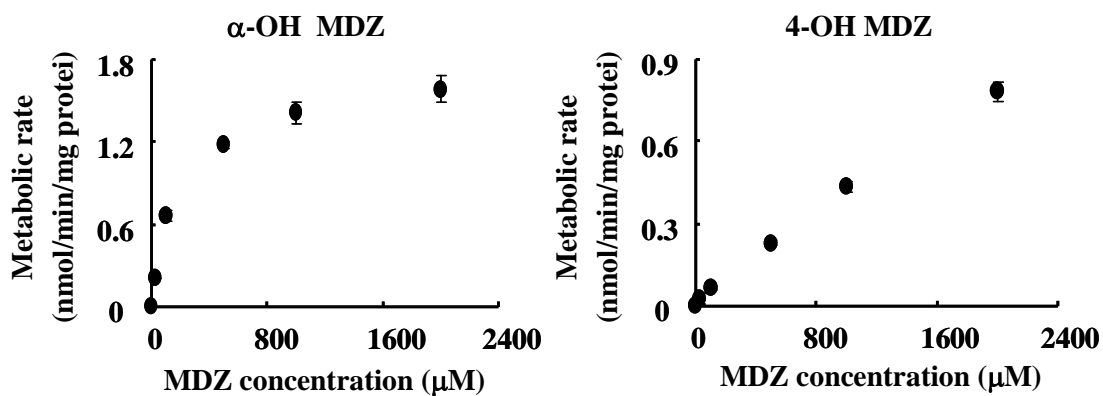


Fig. 3-1-1 Time course of MDZ hydroxylation by HIM (mean  $\pm$  S.D.).

Table 3-1-1 Kinetic parameters for MDZ

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nmol/min/mg protein)	$CL_{int, in vitro}$ (mL/min/mg protein)
$\alpha$ -hydroxylation	$17.1 \pm 2.5$	$1.67 \pm 0.11$	$98.6 \pm 8.1$
4-hydroxylation	$985 \pm 576$	$4.30 \pm 2.42$	$4.97 \pm 0.44$

(mean  $\pm$  S.D., n=3)

## ALP の代謝試験

ヒト小腸マイクロソームによる ALP の  $\alpha$  位および 4 位水酸化代謝における基質濃度依存性を検討した結果を Fig. 3-1-2 に示した。得られた結果を式 (2) にあてはめて算出したパラメータ値および得られた  $K_m$  値、 $V_{max}$  値から式 (3) にしたがって算出された  $CL_{int, in vitro}$  の値を Table 3-1-2 に示した。

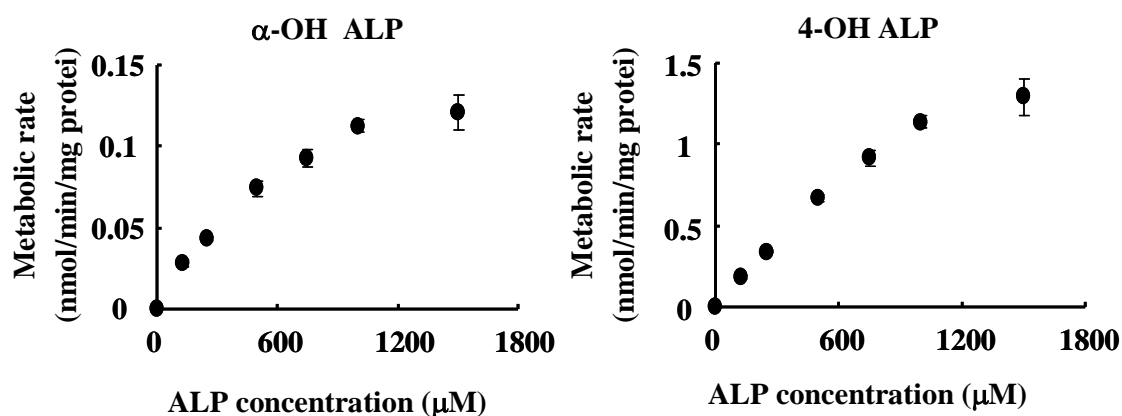


Fig. 3-1-2 Time course of ALP hydroxylation by HIM (mean  $\pm$  S.D.).

	Kinetic parameters for ALP		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nmol/min/mg protein)	$CL_{int, in vitro}$ (mL/min/mg protein)
$\alpha$ -hydroxylation	$762 \pm 70$	$0.188 \pm 0.018$	$0.246 \pm 0.009$
4-hydroxylation	$1500 \pm 310$	$2.65 \pm 0.44$	$1.78 \pm 0.01$

(mean  $\pm$  S.D., n=3)

### TRZ の代謝試験

ヒト小腸マイクロソームによる TRZ の $\alpha$ 位および4位水酸化代謝における基質濃度依存性を検討した結果を Fig. 3-1-3 に示した。得られた結果を式 (2) にあてはめて算出したパラメータ値および得られた  $K_m$  値、 $V_{max}$  値から式 (3) にしたがって算出された  $CL_{int, in vitro}$  の値を Table 3-1-3 に示した。

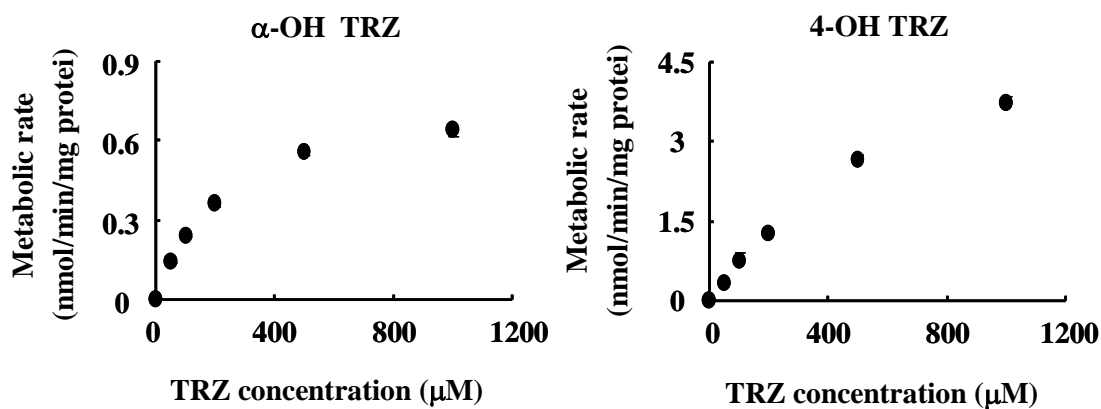


Fig. 3-1-3 Time course of TRZ hydroxylation by HIM (mean  $\pm$  S.D.).

Table 3-1-3 Kinetic parameters for MDZ

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nmol/min/mg protein)	$CL_{int, in vitro}$ (mL/min/mg protein)
$\alpha$ -hydroxylation	$236 \pm 13$	$0.800 \pm 0.022$	$3.39 \pm 0.10$
4-hydroxylation	$980 \pm 140$	$2.99 \pm 0.25$	$3.07 \pm 0.21$

(mean  $\pm$  S.D., n=3)

## TST の代謝試験

ヒト小腸マイクロソームを用いて 6 $\beta$ -OH TST の生成量を経時的に測定した結果を Fig. 3-1-4 に示した。代謝物生成に直線性が認められた 15 分までの代謝速度から代謝初速度を見積もった。

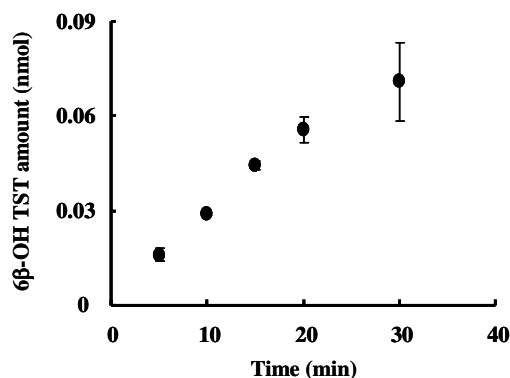


Fig. 3-1-4 Time course of TST hydroxylation by HIM (mean $\pm$ S.D., n=3)

ヒト小腸マイクロソームによる TST の 6 $\beta$ 水酸化代謝の基質濃度依存実験を行った結果を Fig. 3-1-5 に示した。時間依存実験の結果より、反応時間を 15 分とした。得られた結果を式 (2) にあてはめて算出したパラメータ値および得られた  $K_m$  値、 $V_{max}$  値から式 (3) にしたがって算出された  $CL_{int, in vitro}$  の値を Table 3-1-5 に示した。

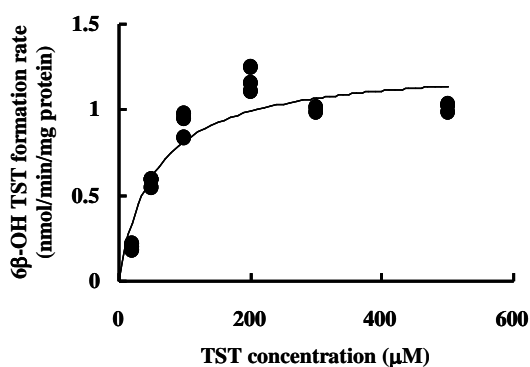


Fig. 3-1-5 Concentration dependent 6 $\beta$ -OH TST formation by HIM (mean $\pm$ S.D., n=3).  
Solid line is a fitting curve.

Table 3-1-5 Kinetic parameters for MDZ

	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/min/mg protein)	$CL_{int, in vitro}$ (mL/min/mg protein)
6 $\beta$ -OH TST	54.5 $\pm$ 13.6	1.26 $\pm$ 0.09	0.0231

(mean $\pm$ S.D., n=3)

## PRG の代謝試験

ヒト小腸マイクロソームを用いて 6 $\beta$ -OH PRG 生成量を経時的に測定した結果を Fig. 3-1-6 に示した。代謝物生成に直線性が認められた 3 分までの代謝速度から代謝初速度を見積もった。

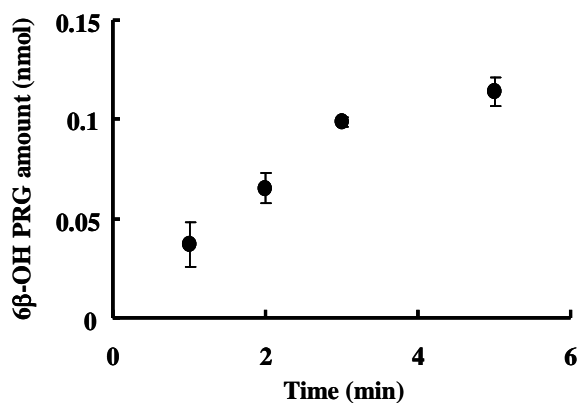


Fig. 3-1-6 Time course of PRG hydroxylation by HIM (mean  $\pm$  S.D.,

ヒト小腸マイクロソームによる PRG の 6 $\beta$ 水酸化代謝の基質濃度依存実験を行った結果を Fig. 3-1-7 に示した。時間依存実験の結果より、反応時間を 3 分とした。得られた結果を式 (2) にあてはめて算出したパラメータ値および得られた  $K_m$  値、 $V_{max}$  値から式 (3) にしたがって算出された  $CL_{int, in vitro}$  の値を Table 3-1-7 に示した。

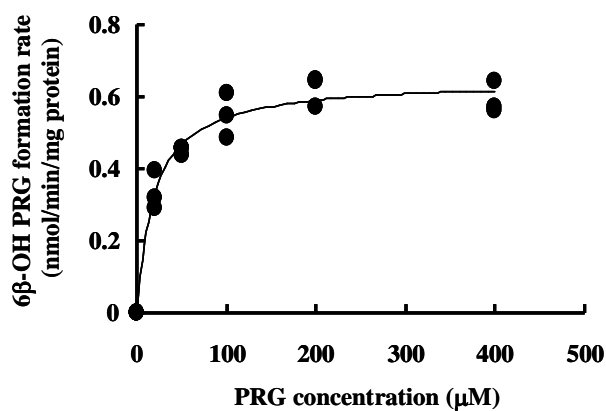


Fig. 3-1-7 Concentration dependent 6 $\beta$ -OH PRG formation by HIM (mean  $\pm$  S.D.,

Table 3-1-7 Kinetic parameters for 6 $\beta$ -OH PRG

	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/min/mg protein)	$CL_{int, in vitro}$ (mL/min/mg protein)
6 $\beta$ -OH PRG	19.3 $\pm$ 3.2	0.646 $\pm$ 0.021	0.034

(mean  $\pm$  S.D., n=3)

## CBZ の代謝試験

ヒト小腸マイクロソームを用いて、CBZE の生成量を経時的に測定した結果 Fig. 3-1-8 に示した。反応 90 分間まで代謝物量は直線的に増加していたので、90 分間の代謝速度から代謝初速度を見積もった。式 (4) に従って代謝固有クリアランス ( $CL_{int, in vitro}$ ) を算出したところ、 $CL_{int, in vitro} = 6.32 \times 10^{-4}$  mL/min/mg protein となった。

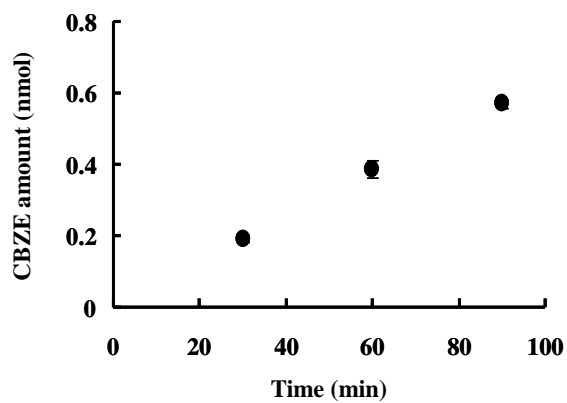


Fig. 3-1-8 Time course of CBZE formation by HIM (mean $\pm$ S.D.,



### 3-2 ミクロソームへの結合試験

*In vitro* 代謝試験の反応液中における 500  $\mu\text{M}$  CBZ の  $f_u$  を、式 (5) にしたがって算出したところ、 $0.918 \pm 0.010$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ) であった。*In vitro* 代謝試験の反応液中における MDZ、ALP および TRZ の  $f_u$  は、それぞれ  $0.757 \sim 0.828$ 、 $0.834 \sim 0.869$ 、 $0.750 \sim 0.981$  であった。すべての濃度における  $f_u$  を平均すると、MDZ では  $0.786 \pm 0.031$ 、ALP では  $0.852 \pm 0.015$ 、TRZ では  $0.802 \pm 0.045$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 9-12$ ) となった。

*In vitro* 代謝試験の反応液中における種々の濃度での TST および PRG の  $f_u$  を式 (6) に従って算出した結果を、それぞれ Fig. 19 および 20 に示した。TST の  $f_u$  は  $0.787 \sim 0.949$  となり、検討した TST の濃度範囲において、 $f_u$  の値はほぼ一定と考えられた。ヒト小腸ミクロソームへの結合実験を行った 3 濃度 (25、100、200  $\mu\text{M}$ ) での  $f_u$  値を平均すると、 $0.880 \pm 0.084$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 9$ ) となった。一方、PRG の  $f_u$  は  $0.725 \sim 0.777$  となり、検討した PRG の濃度範囲において、 $f_u$  の値はほぼ一定と考えられた。ヒト小腸ミクロソームへの結合実験を行った 3 濃度 (20、50、100  $\mu\text{M}$ ) での  $f_u$  値を平均すると、 $0.750 \pm 0.034$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 9$ ) となった。

EM の  $f_u$  値も測定された濃度範囲 (5~500  $\mu\text{M}$ ) で濃度依存性は見られず、 $f_u$  の平均値は  $0.500 \pm 0.016$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ) となった。

### 3-3 CYP3A4 の不活性化実験

MDZ、ALP、TRZ および PRG を阻害剤として使用し、ヒト小腸マイクロソームによる TST の 6β 水酸化代謝を指標として、CYP3A4 活性の阻害をみた結果を Fig. 3-3-1~ 3 に示した。MDZ を阻害剤として使用した際のみ、阻害剤濃度と酵素との接触時間の両者に依存して、6β-OH TST 生成速度の低下が認められた。この結果より、MDZ が代謝反応を受けた結果 CYP3A4 の代謝能を失活させる、mechanism-based inhibitor となる可能性が示された。

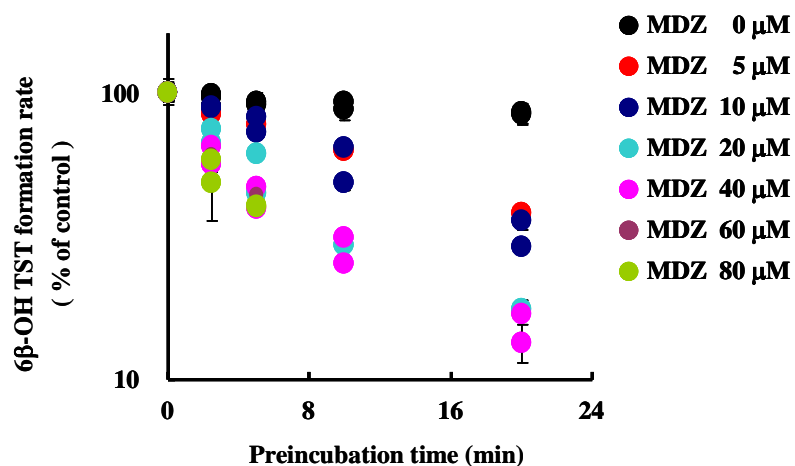


Fig. 3-3-1 Inhibitory effect of MDZ on 6β-OH TST formation by HIM (mean ± S.D.,

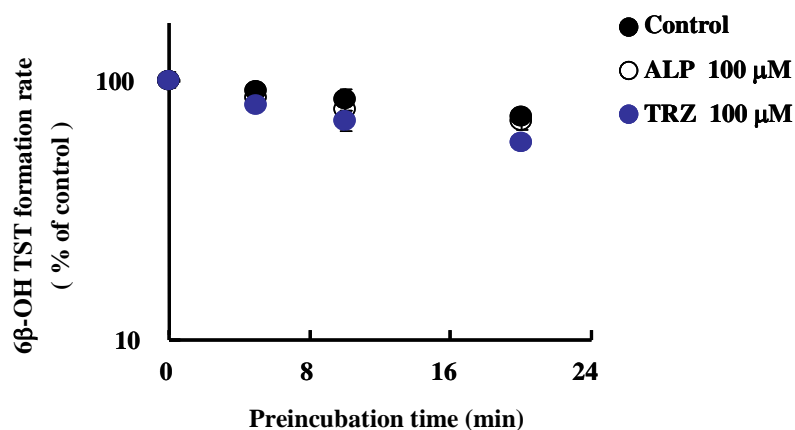


Fig. 3-3-2 Inhibitory effects of ALP and TRZ on 6β-OH TST formation by HIM (mean ± S.D., n=3).

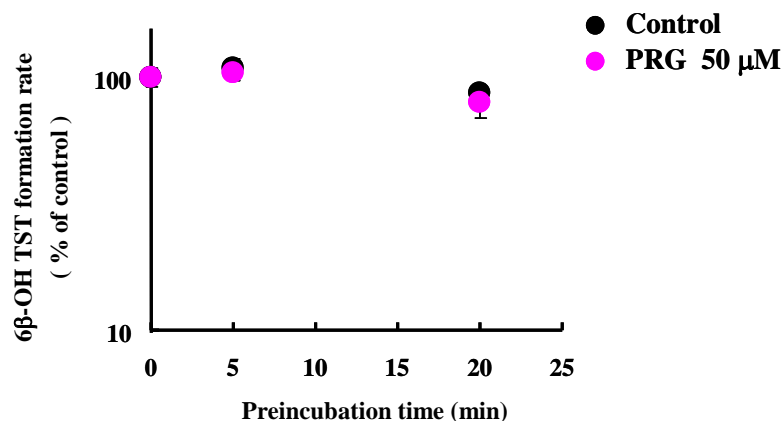


Fig. 3-3-3 Inhibitory effect of PRG on 6β-OH TST formation by HIM (mean±S.D.,

MDZ による代謝阻害実験結果 (Figs. 3-3-1) より、CYP3A4 活性の失活する初速度 ( $k_{obs}$ ) を、阻害剤 (MDZ) 濃度に対してプロットした結果を Fig. 3-3-4 に示した。得られた結果を式 (6) にあてはめて最大不活性化速度定数 ( $k_{inact}$ )、および酵素と基質の見かけの解離定数 ( $K'_{app}$ ) を算出したところ  $0.279 \text{ min}^{-1}$  および  $30.8 \text{ μM}$  となった。

一方、CYP3A4 活性の失活する初速度 ( $k_{obs}$ ) を、阻害剤 (MDZ) の非結合形濃度に対してプロットした結果を Fig. 3-3-5 に示した。得られた結果を式 (6) にあてはめて算出された  $k_{inact}$  および  $K'_{app}$  は  $0.279 \text{ min}^{-1}$  および  $24.2 \text{ μM}$  であった。

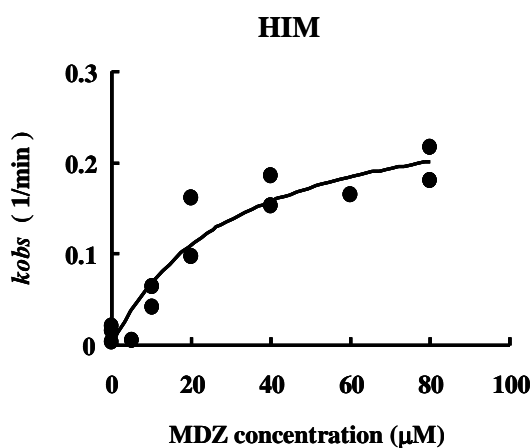


Fig. 3-3-4  $k_{obs}$  vs total MDZ concentration. Solid lines are the fitting curves.

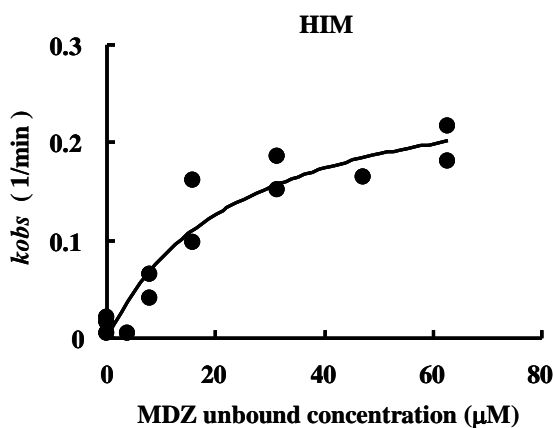


Fig. 3-3-5  $k_{obs}$  vs unbound MDZ concentration. Solidlines are the fitting curves.

### 3-4 ヒト小腸マイクロソームによる erythromycin (EM) の代謝

ヒト小腸マイクロソームにおける EM 代謝試験を行い、時間依存性を見た結果を Fig. 3-4-1(A) に示した。Fig. 3-4(A) から、反応開始後 45 分程度は直線性があるとみなし、濃度依存性実験を行う際に代謝初速度を得るための反応時間は 10 分とした。Fig. 3-4-1(B) には、代謝初速度の基質濃度依存性をみた結果を示した。得られた結果を Eadie-Hofstee plot した結果 (Fig. 3-4-1(C))、代謝に二相性が認められた。各代謝経路の代謝パラメータを見積もるために、2 コンポーネントから成る Michaelis-Menten 式を用いて  $K_m$ 、 $V_{max}$  を算出した。得られたパラメータ値を Table 3-4-1 に示した。

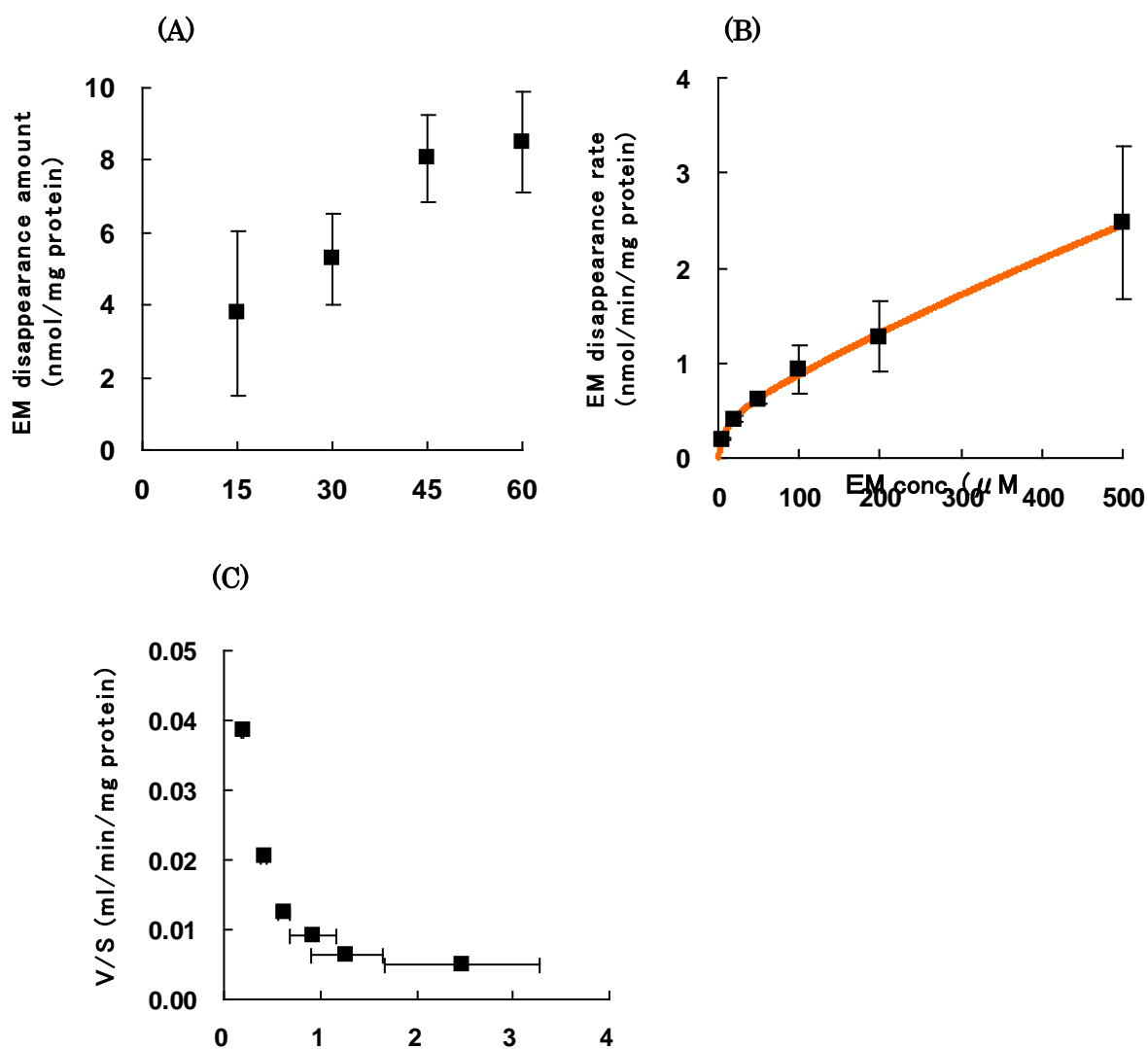


Fig. 3-4 EM metabolism by human intestinal microsomes (mean  $\pm$  S.D., n=3).

(B): A solid line is the fitting curve.

Table 3-4 Kinetic parameters for EM metabolism.

$K_{m1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}1}$ (nmol/min/mg protein)	$K_{m2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}2}$ (nmol/min/mg protein)
$9.11 \pm 2.21$	$0.478 \pm 0.008$	$3580 \pm 5263$	$16.2 \pm 21.0$

(mean  $\pm$  S.D., n=3)

Fig. 3-4-1(B) の横軸に示された EM 濃度に  $f_u$  を乗ずることで求めた非結合型濃度に対して、EM の代謝速度をプロットした結果を Fig. 3-4-2 に、非結合型濃度を用いて得られたパラメータ値を Table 3-4-2 に示した。

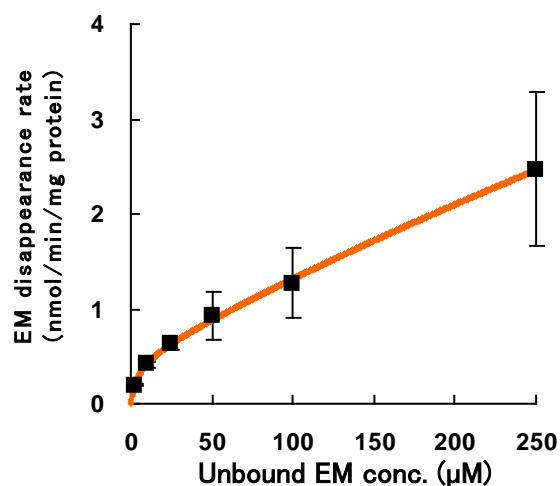


Fig. 3-4-2 EM metabolism by human intestinal microsomes : analysis based on unbound concentration (mean  $\pm$  S.D., n=3). A solid line is the fitting curve to Eq. 4.

Table 3-4-2 Kinetic parameters for EM metabolism based on the unbound concentration.

$K_{m1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}1}$ (nmol/min/mg protein)	$K_{m2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}2}$ (nmol/min/mg protein)
$4.61 \pm 1.06$	$0.481 \pm 0.069$	$1887 \pm 2635$	$17.0 \pm 21.1$

(mean  $\pm$  S.D., n=3)

### 3-5 Erythromycin (EM) による midazolam (MDZ) の代謝に対する阻害試験

EM による MDZ 代謝に対する阻害試験では、EM 濃度およびマイクロソームと EM との接触時間 (preincubation time) に依存する阻害が観察された (Fig. 3-5(A))。Preincubation time 5 分までを代謝酵素 (CYP3A4) 不活性化の初速度がみられている領域とみなし、Fig. 3-5(A) の片対数プロットの傾きから CYP3A4 のみかけの不活化速度定数 ( $k_{obs}$ ) を求めた。得られた  $k_{obs}$  を EM 濃度に対してプロットし (Fig. 3-5(B))、さらに Eq. 6 に当てはめることにより、阻害パラメータを算出した。得られた  $K'_{app}$ 、 $k_{inact}$ 、 $k_d$  の値を、肝マイクロソームにおいて報告されているパラメータ値と共に Table 3-5 に示した。

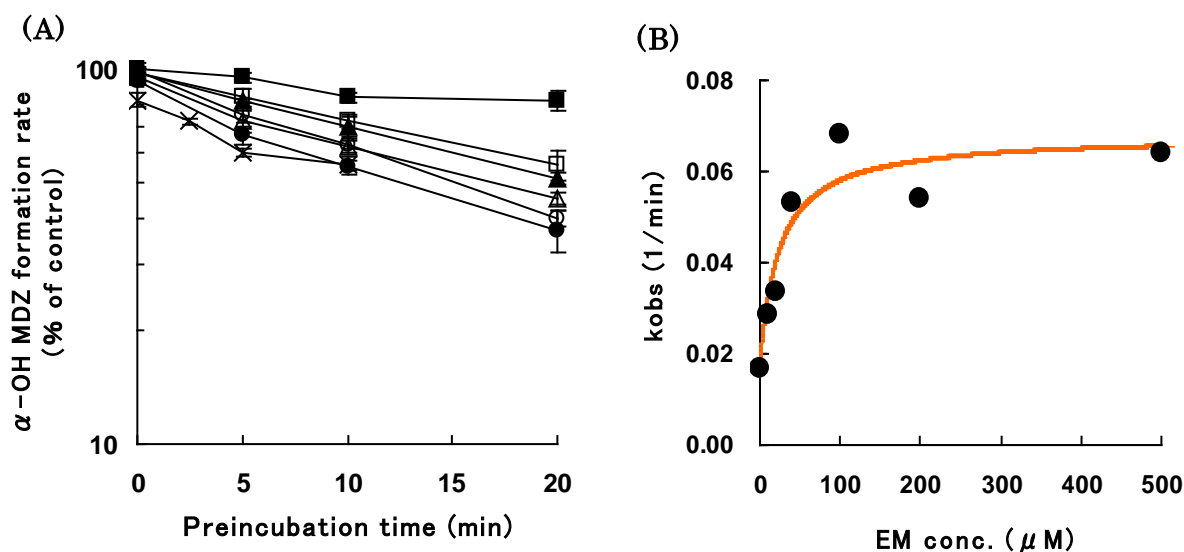


Fig. 3-5 Inhibitory effect of EM on MDZ metabolism by human intestinal microsomes (mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).

(A): EM 0  $\mu$ M (■), 10  $\mu$ M (□), 20  $\mu$ M (▲), 40  $\mu$ M (△), 100  $\mu$ M (●), 200  $\mu$ M (○), 500  $\mu$ M (×)

(B): A solid line is the fitting to Eq. 9.

Table 3-5 Parameters for mechanism-based inhibition of EM.

	$K'_{app}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{inact} / K'_{app}$ ( $\text{nL}/\text{min}/\text{pmol}$ )
Human intestinal microsomes <sup>1)</sup>	$22.9 \pm 14.0$	$0.0528 \pm 0.0090$	$0.0148 \pm 0.0074$	$2.31 \pm 1.46$
Human liver <sup>2)</sup> microsomes	12.6	0.0240	0.0030	1.91

1) mean  $\pm$  S.D.

2) Ito et al (2003) Drug Metab. Dispos. 31:945-954.



### 3-6 KETによる代謝阻害

CYP3A4の阻害剤であるKETを使用し、ヒト小腸マイクロソームによるTSTの6 $\beta$ 水酸化代謝を指標として、各阻害剤の阻害様式および阻害定数を調べた結果をFig. 3-6に示した。Dixon plot解析より、KETは競合的にCYP3A4を阻害することが示され、得られた阻害定数(K<sub>i</sub>値)は2.95 nMとなった。

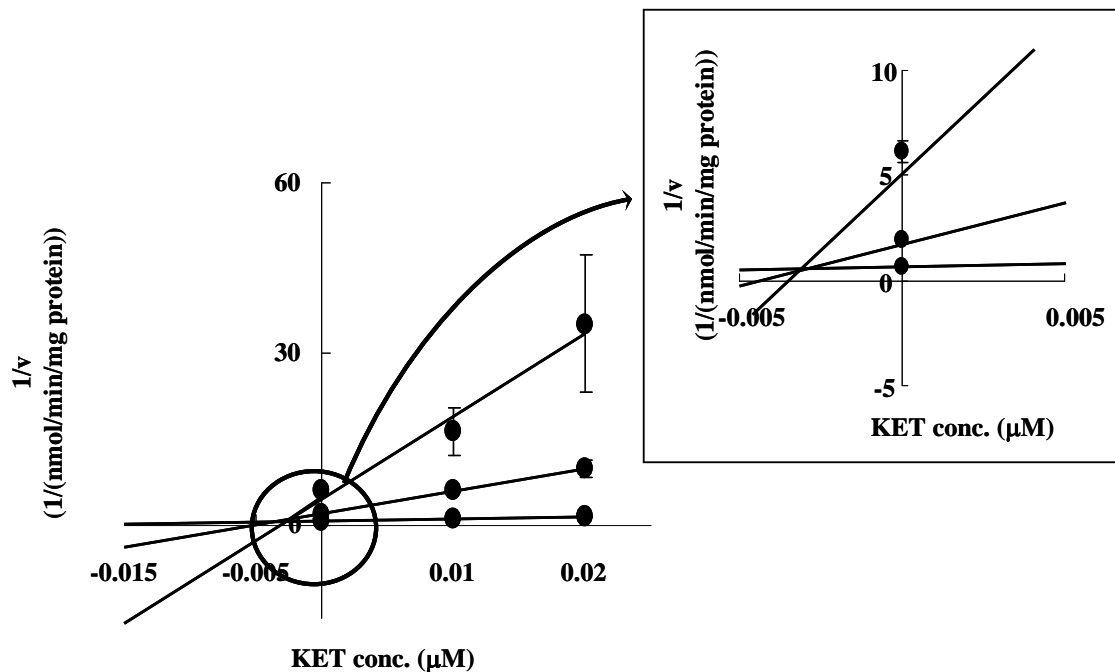


Fig. 3-6 Dixon plots for the inhibition of CYP3A4 by KET.

### 3-7 Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送実験

#### CBZ の経細胞輸送

Transwell®上に培養した Caco-2 単層膜を用いて、CBZ の apical から basal 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 28-A に示した。透過量が直線的に増加している部分 (5, 10, 15 min) の傾きから式 (7) に従って apical から basal 側へのみかけの透過係数  $P_{app(a \rightarrow b)}$  を算出した。得られた値を Table 10 に示した。

CBZ の basal から apical 側への経細胞輸送のタイムコースを、Fig. 3-7-1(B) に示した。透過量が直線的に増加している部分 (5, 10, 15 min) の傾きから式 (7) に従って basal から apical 側へのみかけの透過係数  $P_{app(b \rightarrow a)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

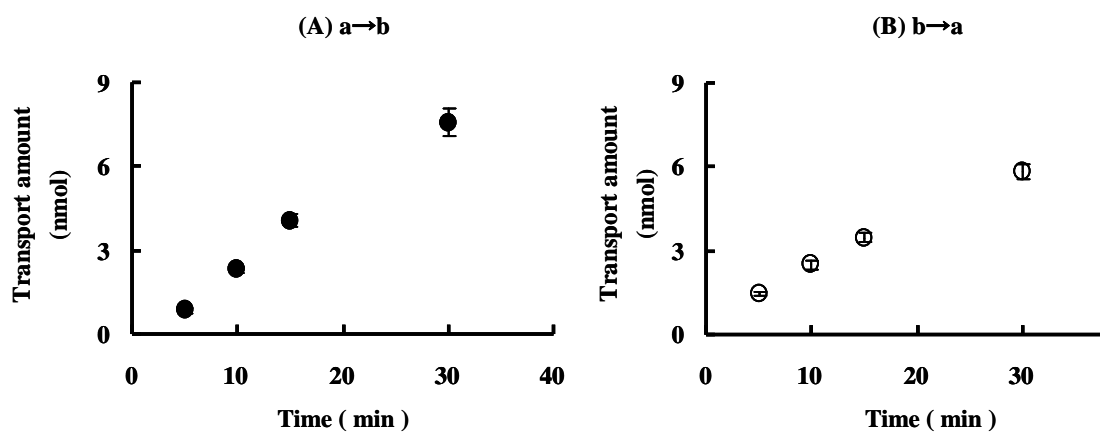


Fig. 3-7-1 Time course of the a→b (A) and the b→a (B) transport of CBZ through Caco-2 cell monolayer (mean±S.D., n=6).

## TST の経細胞輸送

Transwell®上に培養した Caco-2 単層膜を用いて、TST の apical 側から basal 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 3-7-2(A) に示した。透過量が直線的に増加している部分 (5, 10, 15 min) の傾きから式 (7) に従って apical から basal 側への見かけの透過係数  $P_{app(a \rightarrow b)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

TST の basal から apical 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 3-7-2(B) に示した。透過量が直線的に増加している部分 (5, 10, 15 min) の傾きから、式 (7) に従って basal から apical 側への見かけの透過係数  $P_{app(b \rightarrow a)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

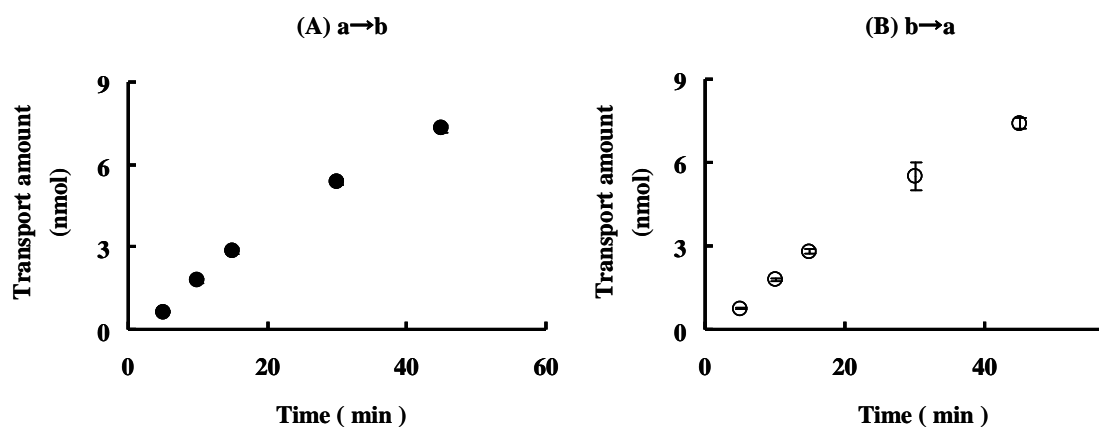


Fig. 3-7-2 Time course of the a→b (A) and the b→a (B) transport of TST through Caco-2 cell monolayer (mean±S.D., n=6).

## PRG の経細胞輸送

Transwell®上に培養した Caco-2 単層膜を用いて、PRG の apical 側から basal 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 3-7-3(A) に示した。透過量は時間と共に増加し、透過量が直線的に増加している部分 (10, 15, 30 min) の傾きから式 (7) に従って、apical から basal 側へのみかけの透過係数  $P_{app(a \rightarrow b)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

PRG の basal から apical 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 3-7-3(B) に示した。透過量が直線的に増加している部分 (10, 15, 30 min) の傾きから式 (7) に従って basal から apical 側へのみかけの透過係数  $P_{app(b \rightarrow a)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

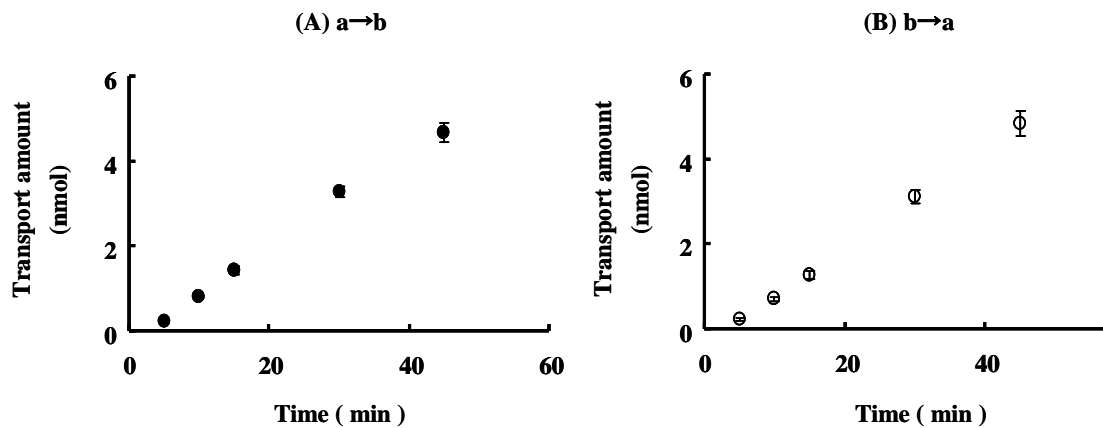


Fig. 3-7-3 Time course of the a→b (A) and the b→a (B) transport of PRG through Caco-2 cell monolayer (mean±S.D., n=6).

## KET の経細胞輸送

Transwell®上に培養した Caco-2 単層膜を用いて、KET の apical 側から basal 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 3-7-4(A) に示した。透過量が直線的に増加している部分 (10 ~ 60 min) の傾きから式 (7) に従って apical から basal 側への見かけの透過係数  $P_{app(a \rightarrow b)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

KET の basal から apical 側への経細胞輸送のタイムコースを Fig. 3-7-4(B) に示した。透過量が直線的に増加している部分 (10 ~ 60 min) の傾きから、式 (7) に従って basal から apical 側への見かけの透過係数  $P_{app(b \rightarrow a)}$  を算出した。得られた値を Table 3-7 に示した。

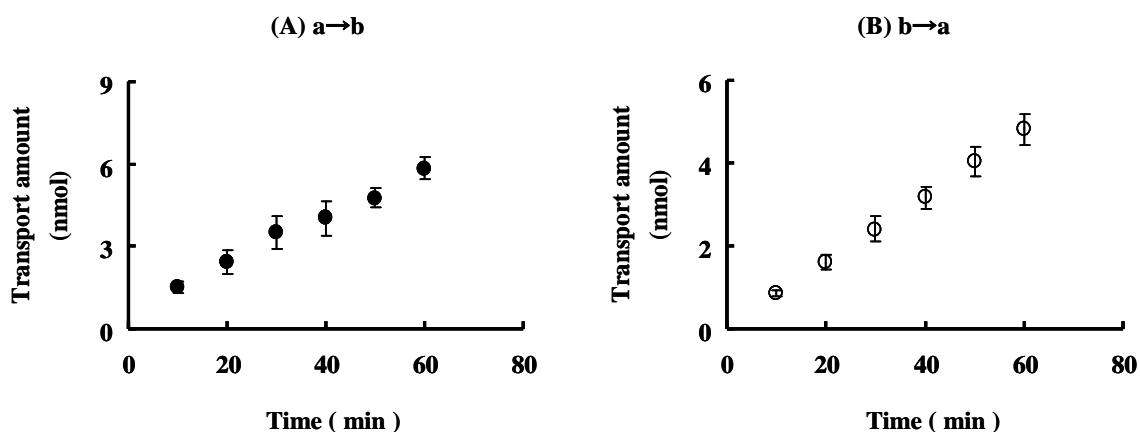


Fig. 3-7-4 Time course of the a→b (A) and the b→a (B) transport of KET through Caco-2 cell monolayer (mean±S.D., n=6).

## EM の経細胞輸送

Transwell® 上に単層培養した Caco-2 細胞を用いて、1 mM verapamil 非存在下および存在下における EM の経細胞輸送のタイムコースを測定した結果を、それぞれ Fig. 3-7-5-A, B に示した。EM の透過量は時間と共に増加し、15~45 分の直線部分の透過速度から、apical から basal 側への透過係数  $P_{app}$  (a→b) および basal から apical 側への透過係数  $P_{app}$  (b→a) を算出した。

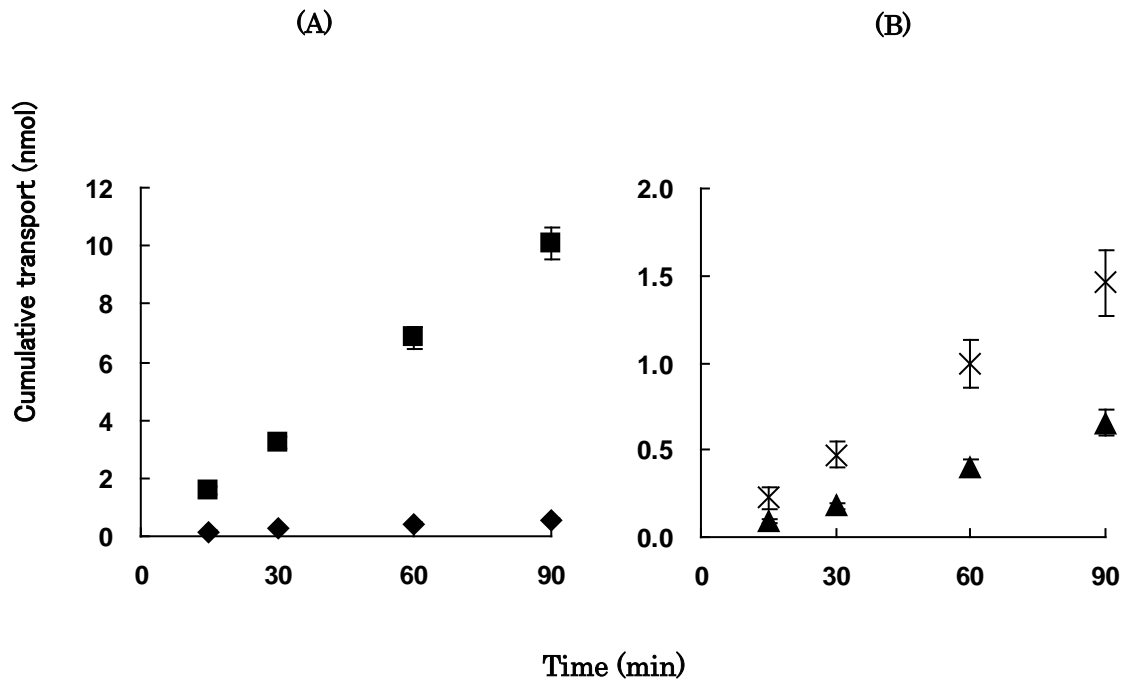


Fig. 3-7-5 EM transport through Caco-2 cell monolayer in the absence (A) or presence (B) of 1 mM verapamil (mean  $\pm$  S.D., n=6). ◆, ▲: a→b, ■, ×: b→a

Table 3-7 Apparent permeability coefficients of ALP, TRZ, MDZ, CBZ, TST, PRG, KET and EM through Caco-2 monolayer (mean±S.D., n = 6).

Substrate	$P_{app(a \rightarrow b)}$ ( $10^{-5}$ cm/sec)	$P_{app(b \rightarrow a)}$ ( $10^{-5}$ cm/sec)
ALP *)	5.98±0.48	5.13±0.2
TRZ *)	5.5±0.72	6.86±0.2
MDZ *)	3.15±0.19	5.43±0.23
CBZ	11.4±0.6	7.10±0.72
TST	8.14±0.59	7.34±0.44
PRG	5.79±0.37	4.40±0.11
KET	5.56±0.19	4.48±0.14
EM	0.0423±0.0030	0.831±0.048

\*) : previously reported

### 3-8 Caco-2 細胞を用いた accumulation 実験

Transwell®上に培養した Caco-2 単層膜を用い、apica 側 (pH 6.0) および basal 側 (pH 7.4) に CBZ (100 µM)、TST (100 µM)、PRG (10 µM)、KET (10 µM) または EM (50 µM) を添加して各薬物を 2 時間細胞内へ accumulation させたときの細胞内薬物量を、Transwell®上に培養された Caco-2 細胞の細胞内容積 (5.64 µL/well : Anne et al., 1987) で除すことにより細胞内薬物濃度を算出した。各薬物を accumulation させた後の apical 側 basal 側の濃度の比 ( $CR_{apical/basal}$ )、細胞内と apical 側の濃度の比 ( $CR_{cell/apical}$ )、細胞内と basal 側の濃度の比 ( $CR_{cell/basal}$ ) を Table 11 に示した。また、 $f_{u,Caco-2}$  は、式 (8) にしたがって算出した。結果を Table 3-8 にまとめた。

Table 3-8 Concentration ratios of ALP, TRZ, MDZ, CBZ, TST, PRG, KET and EM after 2 hr accumulation in Caco-2 cells.

(mean±S.D., n = 6).

Substrate	$CR_{apical/basal}$	$CR_{cell/apical}$	$CR_{cell/basal}$	$f_{u,Caco-2}$
ALP *)	1.14±0.14	12.8±1.3	14.4±1.5	0.0720
TRZ *)	1.07±0.03	16.1±0.4	17.3±0.6	0.0587
MDZ *)	1.52±0.02	73.0±4.1	111±5	0.0114
CBZ	1.03±0.02	25.2±1.6	25.8±1.4	0.0399
TST	0.923±0.022	196±18	181±14	0.00534
PRG	0.916±0.036	192±6	176±9	0.00545
KET	2.04±0.10	0.447±0.022	0.911±0.040	0.0129
EM	1.56±0.02	1.79±0.19	2.81±0.32	0.457

### 3-9 ヒトにおける Reported $F_g$ の算出

In vitro 実験より式(9)に従って算出された各薬物の血漿中濃度に対する血液中濃度の比( $R_B$  値)は、ALP:  $0.834 \pm 0.256$ 、TRZ:  $1.51 \pm 0.274$ 、MDZ:  $0.945 \pm 0.242$ 、CBZ:  $0.886 \pm 0.100$ 、TST:  $0.772 \pm 0.203$ 、PRG:  $0.781 \pm 0.248$  ( $n=3$ ,  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ ) となった。以下の  $F_g$  の算出においては、得られた  $R_B$  値を用いて血液中薬物濃度基準で解析を行った。

ALP および TRZ の  $F_a$  は、それぞれ 0.92、0.82 と報告値されている (Smith et al., 1984, Eberts., et al., 1981)。CBZ については、バイオアベイラビリティ ( $F$ ) 1 と報告されていることより、 $F_a$  も 1 と仮定した。MDZ および TST については、それぞれの薬物の脂溶性が高いこと、Caco-2 単層膜の透過性が高いことから  $F_a=1$  と仮定した。

$F_h$  の算出にあたっては、静注後の血中薬物濃度推移から式(12)に従って肝クリアランスを、さらに式(12)に従って肝アベイラビリティを ( $F_h$ ) を算出した。一般に文献で報告されている AUC は血漿中薬物濃度基準の値であるので、 $R_B$  値を用いて全血中薬物濃度基準の値に補正した(式(11))。また、肝血流量 ( $Q_h$ ) の値としては、1800 min/mL を用いた (Kato et al., 2003)。従って、ヒトに各薬物を静注および経口投与後の結果から  $F$  および  $F_h$  を算出し、上記の  $F_a$  を式(10)に代入することにより  $F_g$  を算出した。算出された  $F_g$  を Reported  $F_g$  とした。ヒト投与試験で報告されている  $F_a$  および  $F$ 、上記のように算出された  $F_h$  および  $F_g$  の値を Table 3-9 にまとめた。

Table 3-9 Calculation of the reported  $F_g$

	$F$	$F_a$	$F_h$	Reported $F_g$
ALP <sup>1)</sup>	0.92	0.92	0.96	0.99
TRZ <sup>2)</sup>	0.44	0.92	0.81	0.62
MDZ <sup>3)</sup>	0.31	1(assumed)	0.73	0.43
CBZ <sup>4)</sup>	1	1	1	1
TST <sup>5)</sup>	0.04	1(assumed)	0.07	0.56

<sup>1)</sup> Smith R.B. et al., 1984

<sup>2)</sup> Kroboth P. D. Et al., 1995; Boxenbaum H. Et al., 1999; Masica et al., 2004

<sup>3)</sup> Thummel K.E. et al., 1996; Gorski J. C. Et al., 1998

<sup>4)</sup> A. Gerardin et al., 1990

<sup>5)</sup> Tauber et al., 1986

式(12)、(16)で明らかのように、 $F_h$  の値は肝血流量の値に影響され、従って  $F_g$  の値も肝血流量の値の影響を受ける。そこで肝血流量の値を変化させたときに  $F_g$  の値がどの程度変化するかを検討した。本検討で用いた肝血流量の値 (1800 min/mL) は、 $F_h$  の見積もりには妥当とされているが、一般的な値である 1500 min/mL に比べて大きな値である。そこで、肝血流量の値を 1200 mL/min まで低下させて  $F_h$  を算出したところ、ALP、TRZ、および MDZ の  $F_h$



値は、肝血流量を 1800 min/mL として算出した値とほぼ同じであった。したがって、 $F_g$  の値も肝血流量の影響をほとんど受けないことが示された。しかしながら、TST の  $F_g$  値は肝血流量の影響を大きく受け、肝血流量の値を 1200 mL/min まで低下させると、 $F_g$  値は 0 と見積もられた。

### 3-10 小腸アベイラビリティ ( $F_g$ ) の予測

ITAM model を用いた  $F_g$  予測計算の結果を Table 3-10 に示した。ALP, CBZ および TRZ に関しては、 $F_g$  の予測値が報告値 (Smith R.B. et al., 1984; Tsunoda S.M. et al., 1999; Masica A.L. et al., 2004; Gerardin A. et al., 1990; Tauber U. et al., 1986) と近い値となり、予測が良好であることが示された。一方、MDZ に関しては、MBI の寄与を考慮せずに予測すると、予測値 ( $F_g = 0.199$ ) が実測値 ( $F_g = 0.40$ ) の約半分となった。しかしながら、MBI の寄与を考慮して予測すると、予測値 ( $F_g = 0.386$ ) が実測値 ( $F_g = 0.40$ ) とほぼ同じ値となった。従って、本手法により MBI 効果を定量的に予測できたと考えられる。

**Table 3-10 Results of  $F_g$  prediction by an ITAM model**

	Reported $F_g$	Predicted $F_g$	Fold error
ALP	0.96	0.920	0.96
MDZ with MBI	0.40	0.386	0.97
MDZ without MBI	0.40	0.199	0.50
TRZ	0.64	0.769	1.20
CBZ	1.00	0.976	0.98
TST	0.12-0.61	0.459	0.75-3.8

Fold error: Predicted  $F_g$  / Reported  $F_g$

一方、KET による小腸初回通過代謝の阻害効果は、臨床試験の報告がある MDZ との併用結果 (Tsunoda S.M. et al., 1999) と ITAM model を用いた計算結果を比較することで検討した。その結果、reported  $F_g$  が 0.878 であったのに対し、predicted  $F_g$  が 0.997 であった。これは明らかに KET による代謝阻害効果を過大評価している結果であり、その理由として以下の3つが挙げられた。

一つ目は、今回の計算モデルには KET 自身の代謝消失過程が組み込まれていない点である。この代謝消失過程を加えることで、上皮細胞内の KETZ 濃度が減少し、その結果 MDZ の代謝を阻害する程度が減少すると考えられる。しかしながら、KET は CYP の強力な競合的阻害剤として知られているが、それ自身が代謝反応の基質になるかどうかに関して信頼できる報告がなされていないため、今後、小腸マイクロソームを用いて KET 自身の代謝を検討する必要がある。

二つ目は、KET の消化管吸収過程において排出トランスポーターが関与している可能性である。

KET は P-gp の基質となるという報告がないものの、その阻害剤となるという報告は数多くなされていることから (Taub M.E. et al., 2005)、P-gp の基質である可能性が示唆される。よって、このことから実際の上皮細胞内の KET 濃度は、今回のシミュレーション結果ほど高くならないものと考えられる。

三つ目は、消化管管腔内の液量である。我々のモデルでは、解剖学および生理学的な情報に基づいて、各コンパートメントの液量を 80 mL としている。一方、最近の報告では、各コンパートメントの液量を 1.92 L とすると相互作用のデータが説明できることが示されている (Tachibana et al., 2009)。コンパートメントの液量が増えることで、阻害薬の濃度が低下して、阻害の程度が低く見積もられることになる。ITAM モデルにおいても、各コンパートメントの液量を 1.92 L とすると、KET 併用時の MDZ の Fg 値が 0.989 となった。従って、今後、ITAM モデルにおけるコンパートメント内の液量についても検討が必要である。

#### 4 考察

本研究では、我々が提唱してきた ITAM モデルを使用することで、MBI の特徴を有する薬物も含めて、CYP3A4 の基質となる薬物の小腸初回効果を予測可能であることが示された。従って、MBI に起因する薬物相互作用については予測可能であると考えられる。

競合阻害薬である KET による相互作用については、現時点の予測では代謝阻害効果を過大評価しており、今後 KET 自身の代謝消失、P-gp の影響、消化管管腔内液量など検討して、予測精度を向上させる必要がある。また、EM による阻害効果については、MDZ および EM の両者による MBI 効果を組み込んだモデルを構築中である。このモデルを完成させて予測値を算出し、ヒトにおける相互作用の報告値と比較することで、我々のモデルの有用性を検証したい。