

図 2-4 ラット，イヌ，ヒトにおける YM796 の *in vitro* 代謝実験データからの AUC_{oral} およびバイオアベイラビリティの予測

プロットは，*in vivo* において得られた実測値，線は，*in vitro* 実験の結果から，代謝飽和を考慮した dispersion model に従い予測された値を示す。

(文献 9) より改変して引用)

競合阻害

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{I_u}{K_i}\right) + S}$$

非競合阻害

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{\left(1 + \frac{I_u}{K_i}\right) (K_m + S)}$$

$$R \equiv \frac{AUC(\text{inhibitor})}{AUC(\text{control})} = 1 + \frac{I_u}{K_i}$$

K_i : 阻害定数

I_u : 酵素近傍の阻害剤の非結合同型濃度

平成 13 年 6 月 4 日医薬審発第 813 号
薬物相互作用の検討法について

$$I_{in, max, u} = I_{max, u} + \frac{f_u \cdot F_a \cdot k_a \cdot Dose}{Q_h}$$

$I_{max, u}$: 非結合同型循環血中最高濃度

$I_{in, max, u}$: 非結合同型肝臓入り口の血中最高濃度

図 2-5 薬物間相互作用の予測法

の見積もり法について提唱しており，その計算法は厚生労働省のガイドラインにも採用されている^{10, 11)} (図 2-5)。また，薬害事件として社会問題にまでなったソリブジンと 5-fluorouracil (5-FU) との相互作用は，ソリブジンの代謝物である (E)-5-(2-bromovinyl) uracil (BVU) が，5-FU の代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) で代謝された後に，不可

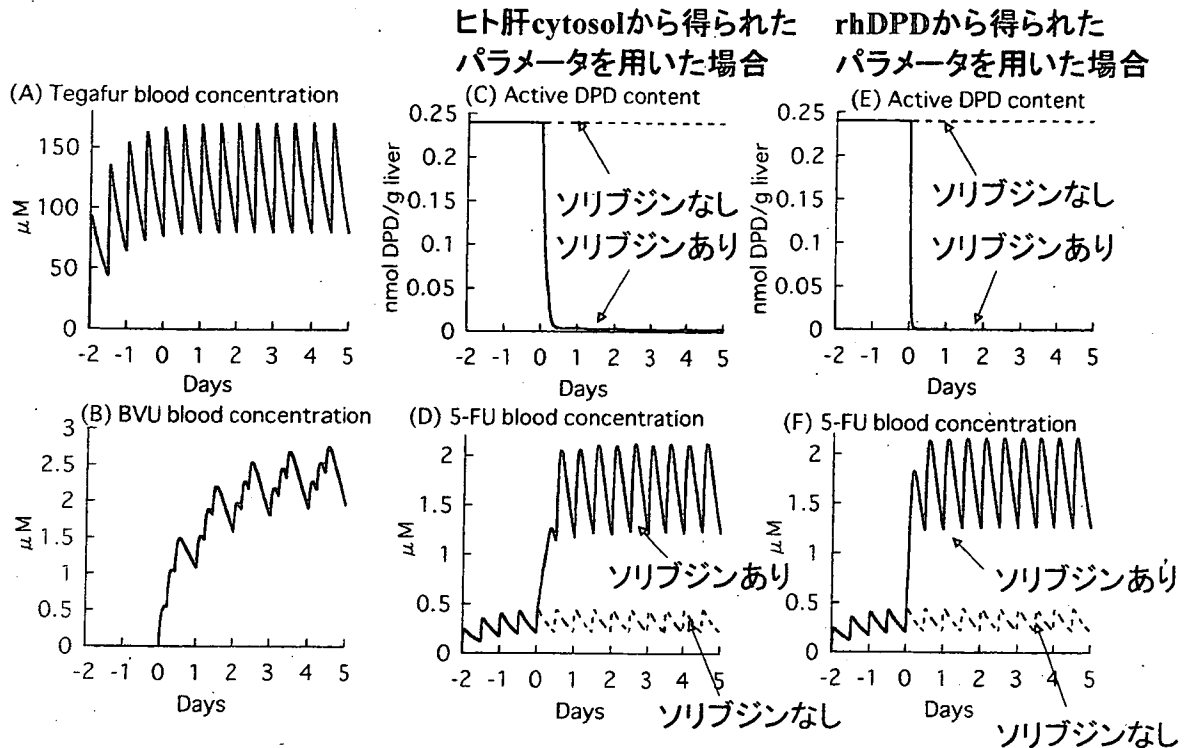


図 2-6 Mechanism-based inhibition のシミュレーション—5-FU vs ソリブジン—

(A) は、テガフルの血中濃度、(B) は、BVU の血中濃度の予測値を示す。

(C, E) は、肝臓内での活性を有する DPD 酵素量を、(D, F) は、5-FU の血中濃度推移を、day 0 でソリブジン投与の有無について示す。(C, D) は、*in vitro* 実験にヒト肝 cytosol を用いた時のパラメータからの予測値、(E, F) は、リコンビナントヒト DPD を用いた時の予測値を示す。
(文献 12) より改変して引用)

逆的に DPD に共有結合して不活化する、いわゆる mechanism-based inhibition によるものであることがわかっている。そこで、5-FU、BVU の体内動態を記述する数学モデルを構築し、DPD の発現系を用いた *in vitro* 代謝試験の結果から酵素の分解を考慮したシミュレーションを行い、ソリブジンの併用で DPD が失活し、それに伴って 5-FU の血中濃度が大きく上昇することを予測することに成功した¹²⁾ (図 2-6)。

一方、個々のトランスポーターについて、ヒト *in vivo* での輸送能力を評価する方法は、現時点では確立されていない。例えば、肝におけるトランスポーター能力の評価のためには、まずは適切な probe drug、すなわち、あるトランスポーターにより特異的に輸送され、それが血中動態に影響を与えるような薬物の探索が必須である。後述するように、血中から肝臓へのアニオン性薬物の取り込みに関わるトランスポーター organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 (OATP-C/OATP2) の輸送能力がその血中濃度に反映される probe drug として、プラバスタチンを挙げるができる。しかし、容積の小さい標的臓器に存在する脳でのトランスポーターのように血中動態への影響が小さいもの場合には、その薬効を測定するか、あるいは positron emission tomography (PET) などの手法を用いて脳移行を評価するなど、さらなる工夫が必要となる。国外では、既に PET を用いた創薬がスタートしており、今後、国内においても医薬品開発の過程に PET などのイメージング手法をより多く取り入れるべきである。

2-1-2 *in vitro/in vivo* 動物実験を併用した、より精度の高いヒト *in vivo* 動態予測

代謝酵素・トランスポーターには、その種類や発現量において大きな種差がみられるケースがある。その際に、*in vivo* 動物実験の結果から直接ヒト *in vivo* の薬物動態へ外挿することには無理がある。一方で、上記で議論したように、ヒト *in vivo* における予測結果の validation は、得られるパラメータに限界があり、特にトランスポーターについては未だ困難な現状がある。これらの問題を克服する手段として最適な方法は、単なる動物からヒトへの外挿、*in vitro* から *in vivo* への外挿ではなく、その両者を組み合わせることにより、ヒト *in vivo* への外挿効率を上昇させることである (図 2-7)。すなわち、複数の実験動物 (例えば、ラットとサル) を用い、*in vitro*, *in vivo* の動態試験を行い、両者を適切な数学モデルで連結する。このことで、それぞれの動物種におけるモデルの妥当性を検証したあとに、同一 (同系列) の化合物を用いて、ヒト組織、発現系などを用いた *in vitro* 試験を行い、同様の数学モデルによりヒト *in vivo* での薬物動態を予測するというアプローチである (図 2-7)。この場合、既に同系列のもので、ヒトでの *in vivo* データのあるものをコントロール化合物として入れておけば、予測精度がさらに上昇することが期待される。この考え方は対象が代謝酵素であれ、トランスポーターであれ、同一である。

ここで一例を挙げる。H₂-blocker であるファモチジンはプロベネシドとの併用により血中濃度の上昇が臨床で観察されており、そのメカニズムは腎分泌過程の阻害であることが知られている。しかしながら、この相互作用はラットでは再現することができない (図 2-8)。また、ヒトにおけるこの相互作用は、同系統薬であるシメチジンではほとんど生じない。この相互作用のメカニズムを解明するために、ヒト・ラット・サルの各種トランスポーターの発現系での輸送実験、*in vivo* 動物実験を行い、ファモチジンは、ヒト腎臓では organic anion transporter (OAT) 3 により認識されて尿細管分泌を受け、その輸送をプロベネシドが阻害すること、一方、シメチジンにおいては、主に organic cation transporter (OCT) 2 により認識され分泌されるために、プロ

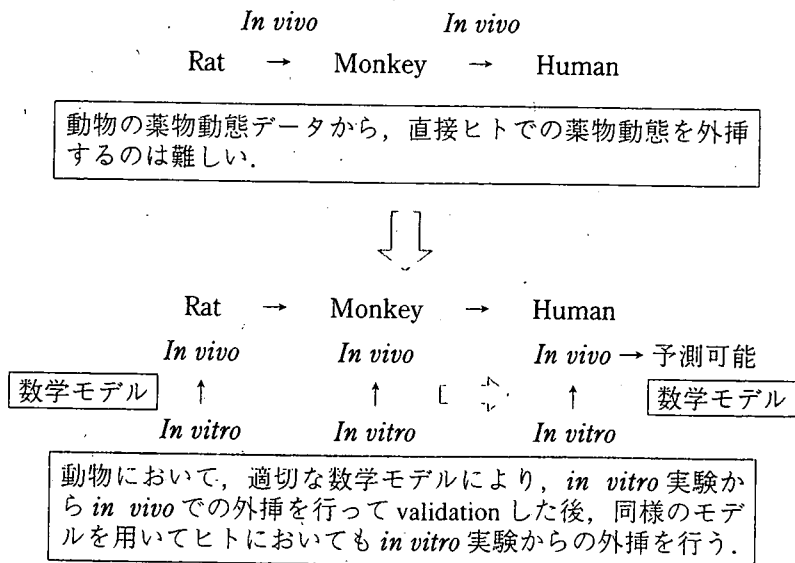
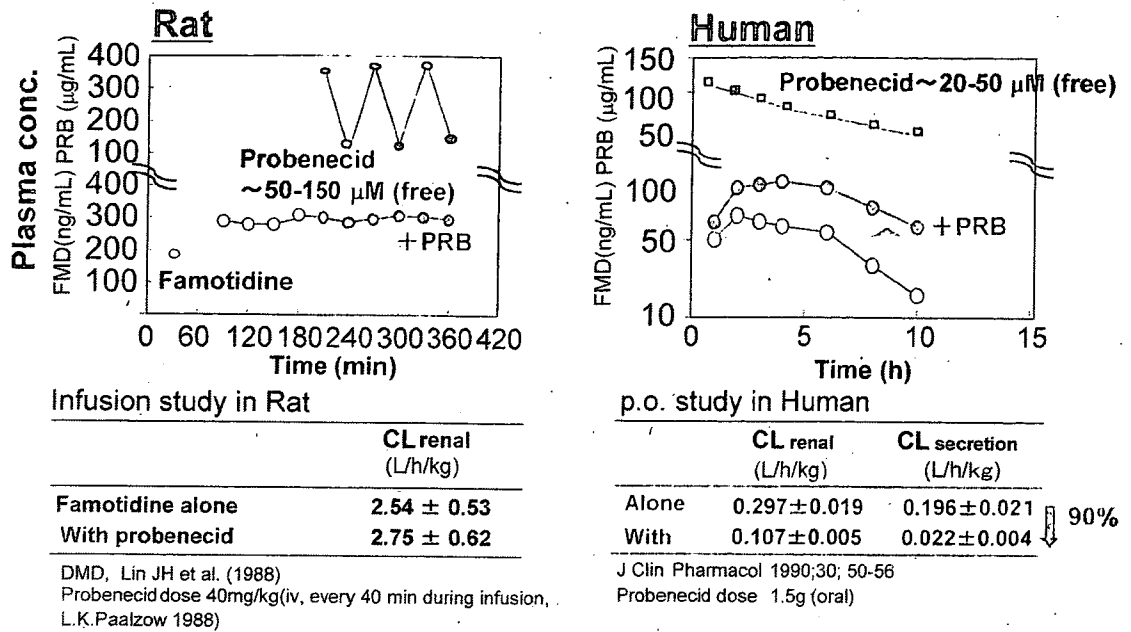


図 2-7 動物実験、*in vitro* 実験の結果をヒト *in vivo* での予測につなげる戦略



ファモチジンとプロベネシドの相互作用に顕著な種差
 ・ヒトでは腎クリアランスが低下したが、ラットでは変化なし

図 2-8 薬物間相互作用の種差：ファモチジン vs プロベネシド

プロベネシドの血漿中濃度は、ラットでの実験の方が高いにも関わらず、ヒトではプロベネシドによりファモチジンの血漿中濃度の上昇が見られるが、ラットではまったく見られていない。

ベネシドによる阻害がほとんど生じないことが明らかにされた¹³⁾ (図 2-9)。これら H₂-blocker は、中性の pH では正の電荷をもっているが、*in silico* による分子軌道計算の結果、分子内に負に偏った電荷の局在もみられるため、有機アニオントランスポーターに認識されたものと推測される¹⁴⁾。ラットでは、ファモチジン、シメチジンともに腎排泄に関わる主要なトランスポーターは Oct2 であるため、プロベネシドによる阻害をあまり受けないことが示された¹³⁾ (図 2-9)。また、サルのトランスポーターは、ヒトと同様の特性をもっており、この相互作用をサルでは *in vivo* で再現することができたのみならず、*in vitro* でトランスポーター発現系を用いて得られた阻害定数 (K_i 値) より *in vitro* データを定量的にも予測することができた¹⁵⁾。したがって、この相互作用解析は、サルを用いた *in vitro*, *in vivo* データ、そしてヒトでの *in vitro* データがあれば、ヒト臨床での相互作用を定量的に予測できることが示された良い例である。

2-1-3 肝腎振り分けの制御による薬物動態の最適化

薬物の副作用回避の戦略の一つとして、肝腎振り分けの制御が挙げられる。肝腎に発現するトランスポーターによる薬物の肝臓・腎臓への移行性および肝臓の酵素による代謝は、薬物の全身血中からの消失経路を規定する主要因となる。したがって、ある薬剤が投与される患者群に腎疾患患者の多いことが明らかな場合、腎消失型の薬物を設計することは、患者の病態の程度による体内動態の個人差を生む結果となり、副作用発現の面から使いにくい医薬品となる。トランスポーターをうまく利用することにより、肝臓による代謝・排泄と腎排泄とをほぼ同等に受

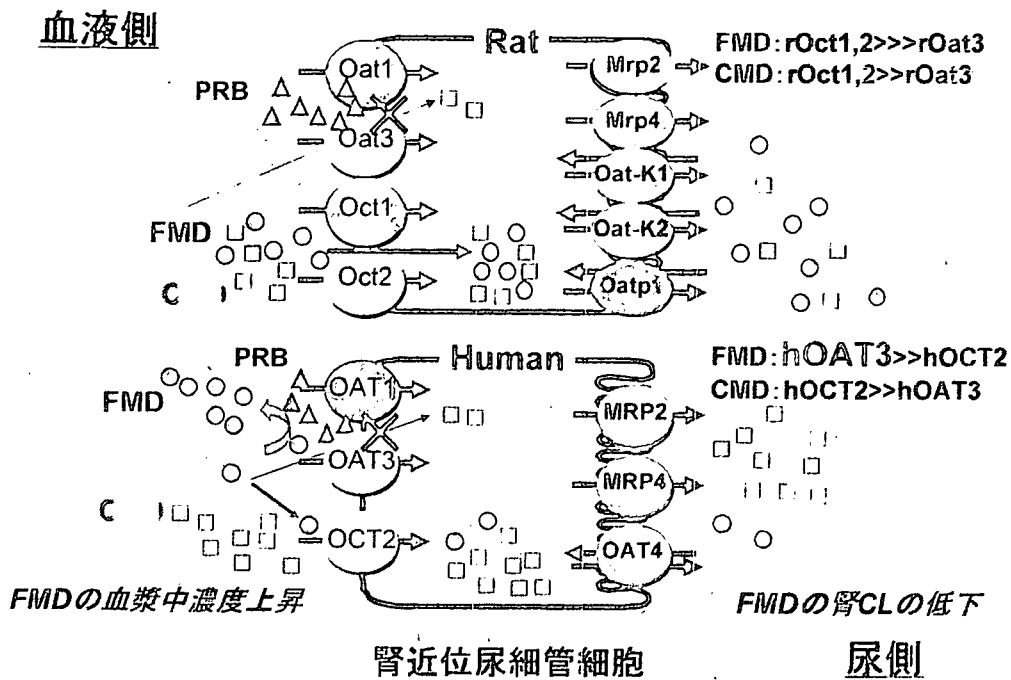


図 2-9 薬物間相互作用の種差を生み出すメカニズム：ファモチジン vs プロベネシド
 CMD：シメチジン，FMD：ファモチジン，PRB：プロベネシド
 PRBは、ヒト OAT3/ラット Oat3 の機能を阻害する。ラットの場合、FMD，CMD はともに Oct2 により腎取り込みされることから、Oat3 の阻害の影響を受けず、相互作用は起こりにくい。一方で、ヒトの場合、CMD の腎取り込みには OCT2 の寄与が大きい、FMD は OAT3 の寄与が大きいことから、FMD は PRB による輸送阻害の影響を大きく受け、相互作用が起こると考えられる。

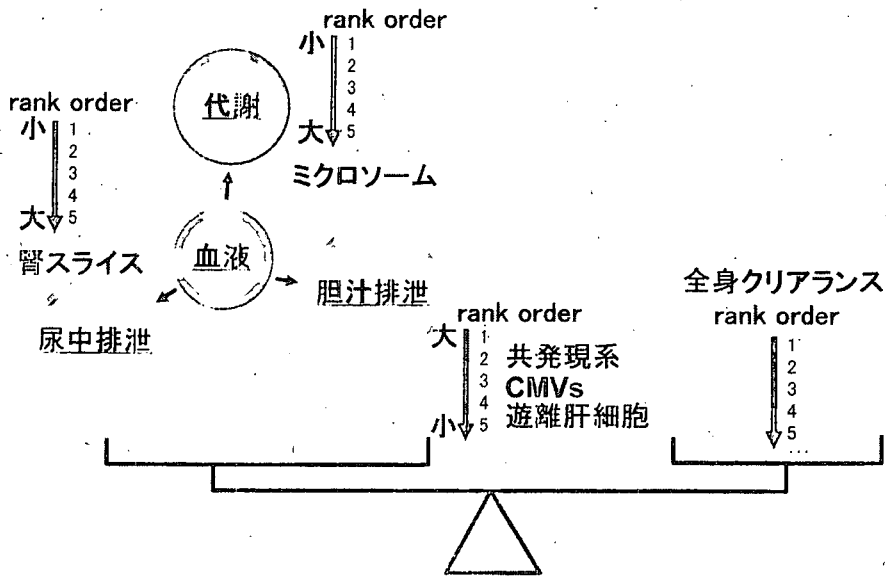


図 2-10 多クリアランス型医薬品の開発のための考え方

ける薬剤を開発することができれば、そのような個体差による変動は比較的小さなものになる (図 2-10)。肝臓や腎臓には、多様なトランスポーターが血管側、管腔側の双方の細胞膜に局在し、薬剤の排泄に働いている^{16, 17)}。このうち肝臓、腎臓どちらかに選択的に高く発現している

トランスポーターをターゲットとすれば、肝腎振り分けの制御が可能と考えられる (図 2-11)。例えば、血管側に面した (basolateral 側の) 有機アニオンを運ぶ OAT ファミリーのうち OAT1, OAT3 は腎臓に高い発現が認められる。また、OATP ファミリーは主に肝臓に発現している (ヒトでは、OATP1B1/OATP1B3)。一方、有機カチオンを運ぶ OCT ファミリーでは、OCT1 は肝臓に、OCT2 は腎臓に高い発現が認められる (図 2-11)。このようにヒトでの各トランスポーターの個々の臓器における発現レベル、基質認識性が明らかになれば、個々のトランスポーターに特異的に認識される分子をデザインすることにより肝腎の選択性を制御することが可能になるであろう。肝腎選択的な排泄は血管側膜を介した取り込みのみでなく、管腔側膜を介した排泄トランスポーターによっても支配される。この典型的な例が、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬テモカプリルである。多くの ACE 阻害薬は主に尿中へ排泄されるが、テモカプリルは、他の ACE 阻害薬と異なり、その活性体であるテモカプリラートが胆汁排泄を介して糞中にも尿中と同程度に排泄される。このため腎障害患者に投与したときの体内動態の変動が他剤と比較して少なく、臨床において使いやすい薬となっている (図 2-12)。胆汁排泄が良好に起こる原因と

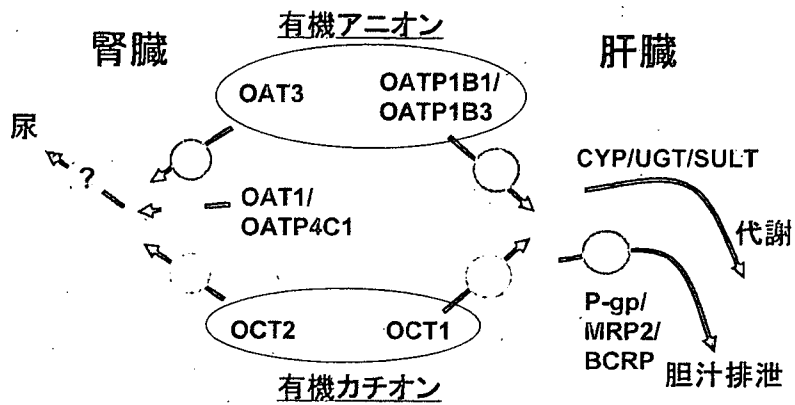


図 2-11 トランスポーターをターゲットとした肝腎振り分けの制御

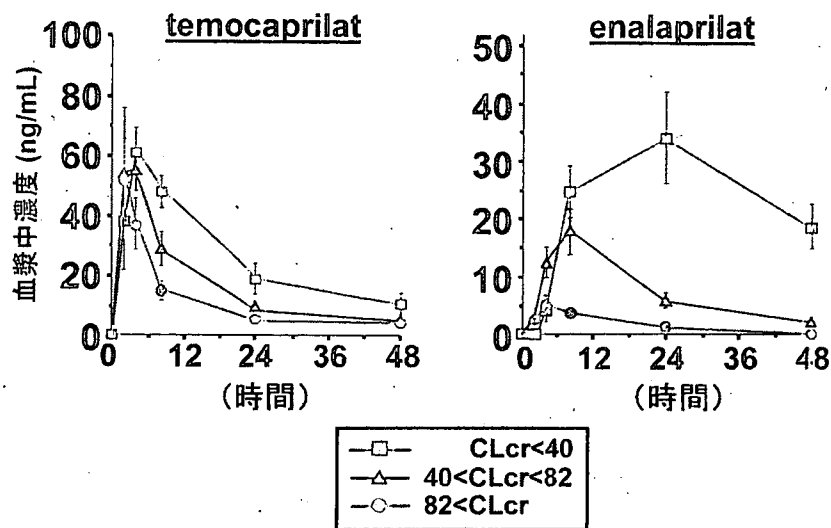


図 2-12 腎機能低下時における 2 種の ACE 阻害薬の活性代謝物 (enalaprilat, temocaprilat) の血中濃度推移の違い

CLcr : クレアチニンクリアランス——腎分泌機能の指標となり、腎機能のマーカーとして汎用されている。

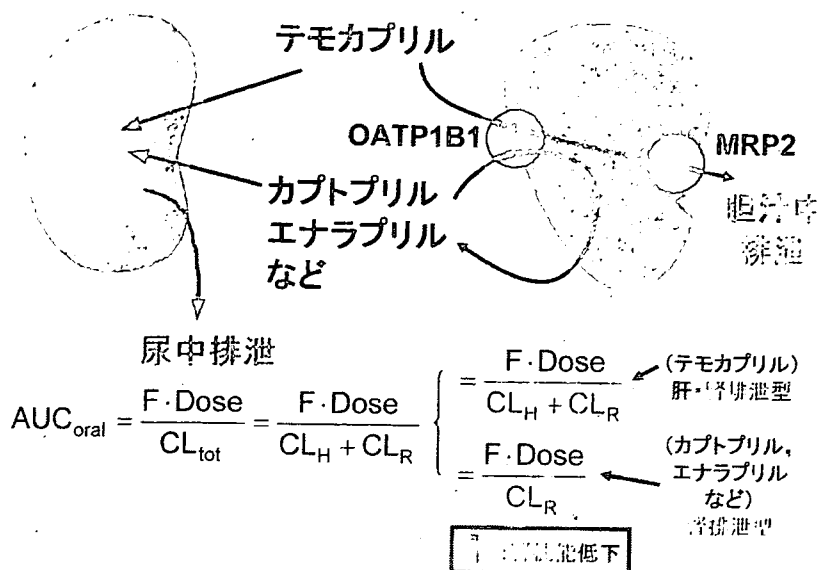


図 2-13 ACE 阻害薬の体内動態の違いを決めるメカニズム

テモカプリルは、肝臓の排泄側トランスポーターである MRP2 に認識されることから胆汁排泄されるが、他の ACE 阻害薬（カプトプリル、エナラプリルなど）は、MRP2 に認識されず、胆汁排泄されにくいことから、主に腎排泄されると考えられる。

して、multidrug resistance associated protein (MRP) 2 の関与が明らかになっている。MRP2 は胆管側膜において種々有機アニオンを肝臓中から胆汁中へ排泄する¹⁷⁾。他の ACE 阻害薬は MRP2 の基質にならないのに対し、テモカプリルの活性代謝物テモカプリラートは MRP2 の基質になるため、排泄経路が異なると考えられる¹⁸⁾ (図 2-13)。今後、トランスポーターが動態を支配する薬物の実例が増えるにつれて、このような消失経路のバランスに着目する必要性が生じる例も増えてくるものと思われる。

2-1-4 トランスポーターによる経細胞輸送を評価するための新規 *in vitro* 実験系 —ダブルトランスフェクタント—

現在、私の研究室で取り組んでいる課題の一つに、MDCK II 細胞などのような極性を有する細胞株を用いて、血管側からの取り込みに関与するトランスポーター、細胞内からの排泄に関与するトランスポーターをそれぞれ basal 側（生理的には血管側に相当する）、apical 側（管腔側に相当する）の形質膜上に共発現させた細胞（ダブルトランスフェクタント）を多種類作製することがあげられる。こうした細胞を transwell のような多孔性フィルターでできた培養器材にコンフルエントの状態培養することで、apical から basal 側、basal から apical 側へのそれぞれの経細胞輸送を測定することができる。この輸送は、生理的には血中空間から胆汁中、尿中への排泄に相当すると考えられる。この目的を進めていくための第 1 ステップとして、最近、有機アニオン性化合物の胆汁排泄能力を評価するために、MDCK II 細胞の basal 側に OATP1B1、apical 側に MRP2 を同時に発現させた、いわゆるダブルトランスフェクタントを作製した¹⁹⁾ (図 2-14)。ラットに対応する Oatp4/Mrp2 ダブルトランスフェクタントも作製しており、ダブルトランスフ

エクタントにおける *in vitro* 経細胞輸送クリアランスと *in vivo* 胆汁排泄クリアランスの間には、良好な相関が成り立つことを実証している²⁰⁾。これらの細胞系を用いて *in vitro* で経細胞輸送を評価することにより、ヒトにおける血中から胆汁中への薬物移行の評価をすることが可能であると考えている。さらに現在では、OATP1B1/multidrug resistance (MDR)1, OATP1B1/breast cancer resistance protein (BCRP) ダブルトランスフェクタントも作製し、ヒト肝臓胆管側膜における排出トランスポーターの寄与率を評価するための方法論の構築へ向けて検討を進めている²¹⁾ (図2-14)。図2-15にはHMG-CoA還元酵素阻害薬 pitavastatin の経細胞輸送を観察した実験例を示すが、本薬剤はヒトMRP2, MDR1, BCRPのすべてに認識される。一方で、Bcrpノックアウトマウスにおいて、pitavastatinの胆汁排泄はほぼ完全に消失することから、マウスでは、Bcrpが最も重要な胆汁排泄トランスポーターであり、寄与には種差があることが示唆される²²⁾。より定量的な評価をするためには、ヒト肝臓におけるOATP1B1, MDR1/MRP2/BCRPの各発現量と、ダブルトランスフェクタントの相対的な発現量の違いを、数学モデルに基づいて補正することが必要になる (図2-14)。

今後、創薬におけるトランスポーターのスクリーニング系としては、2ステップの方法を提唱している^{1,2)}。第1ステップ (未だ候補化合物の数の多い段階) としては、単一遺伝子の発現系を用いて、通常CYPで行われているのと同様の方法で、基質のなりやすさ、薬物間相互作用の程度を評価する。対象のトランスポーターとしては、20種類程度を考えている。この第1ステ

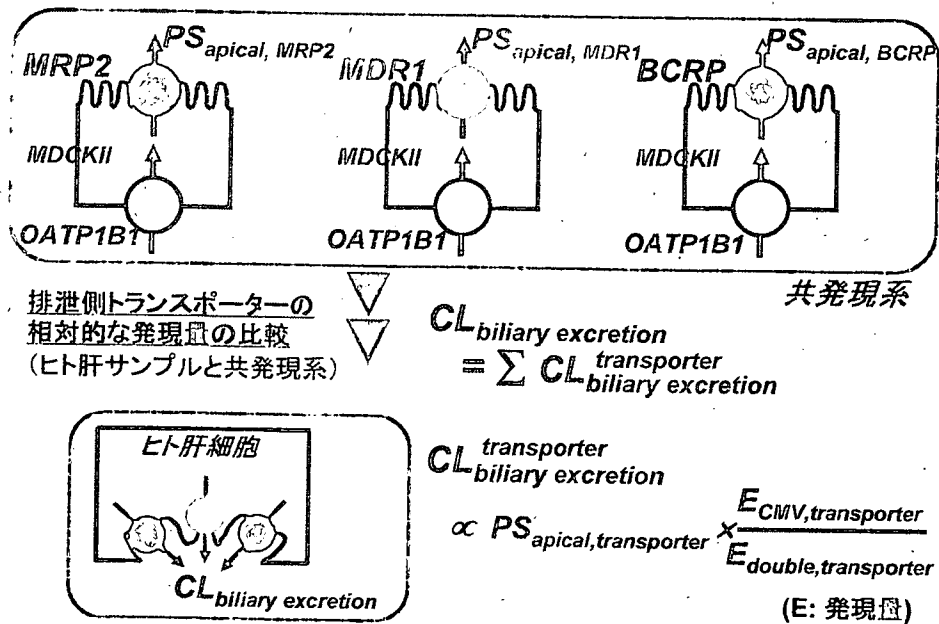


図2-14 ダブルトランスフェクタントを用いた胆汁排泄に関するトランスポーターの寄与の定量的な解析

ダブルトランスフェクタントにおける細胞内濃度基準の排出クリアランスと、ダブルトランスフェクタントとヒト肝サンプルとの間の相対的な発現量比を乗じることで、ヒト肝臓における胆汁排泄に関わる各トランスポーターの定量的な寄与を見積もることができると考えられる。

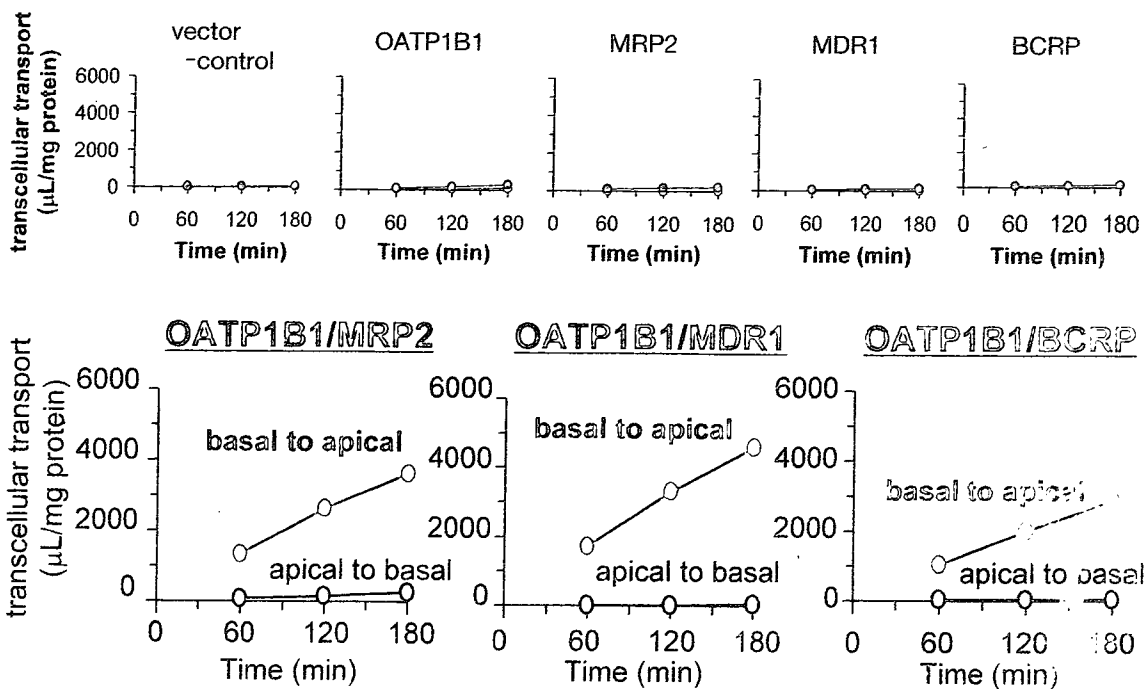


図 2-15 pitavastatin の各種ダブルトランスフェクターにおける経細胞輸送

ップにおいて、薬物の輸送に関与するトランスポーター個々の寄与率を推定することが必要になるが、そのためにはそれぞれの特異的阻害剤を発見することが必要となる。化合物の数がある程度絞られてきて、数十程度になった段階で、第2ステップとしてダブルトランスフェクターの利用が有効であろう。今後、15種類程度の組み合わせのダブルトランスフェクターを作製することにより、肝臓・腎臓・小腸・血液脳関門・血液脳脊髄液関門における有機アニオンおよび有機カチオンの経細胞輸送を評価できる系が確立されるようになることが望まれ、我々の研究室ではこの目的に向けた研究を展開している。

2-2

トランスポーターの関わる薬物間相互作用，遺伝子多型

トランスポーターを介した薬物間相互作用，遺伝子多型の影響は，代謝酵素の場合ほど臨床問題となっている例が今のところ少ないが，今後ますます増加してくる可能性がある。例えば，P-糖タンパク（消化管吸収（排出），中枢移行，胆汁・尿中排泄），OATP1B1（肝取り込み），MRP2（胆汁排泄），OAT1・OAT3（腎取り込み），OCT1（肝取り込み），OCT2（腎取り込み），PEPT1（消化管吸収），BCRP（消化管吸収（排出），胆汁排泄，中枢移行）などが挙げられる。トランスポーターを介した相互作用は，しばしば血管側膜と管腔側膜の両膜透過過程に関わる2種の異なったトランスポーター上（例えば OATP1B1/MRP2）で同時に生じることがあり解析を複雑にしている。しかし，このような複雑な場合についても，*in vitro* 試験の阻害の程度から，*in vivo* での薬物動態変動を定量的に予測することが可能であることを示している²³⁾。

セリバスタチン（CER）と gemfibrozil および cyclosporin A との相互作用により米国で 10 名

以上の死亡者が出たことが報告された。現に、CERは相互作用による致命的な副作用のため、市場より撤退を余儀なくされた。いずれの場合においても、併用投与時にCERの血中濃度が大きく上昇することが示されている(図2-16)。この機構について、*in vitro*発現系を中心にした解析より以下の結果を得ている。すなわち、CERとcyclosporin Aとの相互作用は、OATP1B1を介したCERの肝取り込み過程の阻害であること²⁴⁾(図2-17)、また、gemfibrozilとの相互作

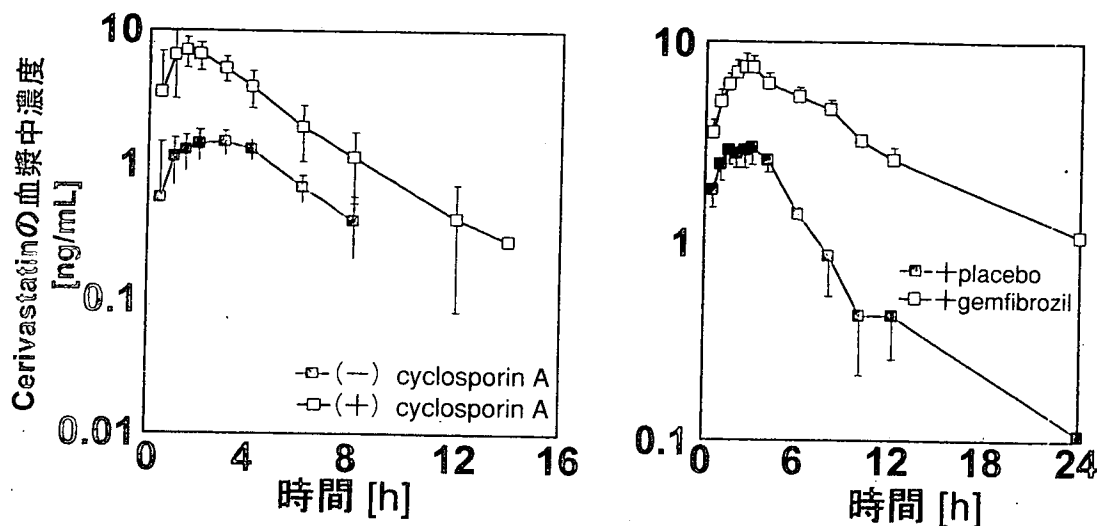


図2-16 cyclosporin A および gemfibrozil と併用投与した時のセリバスタチンの血漿中濃度の変化

Mück W et al. (1999) *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 251-61

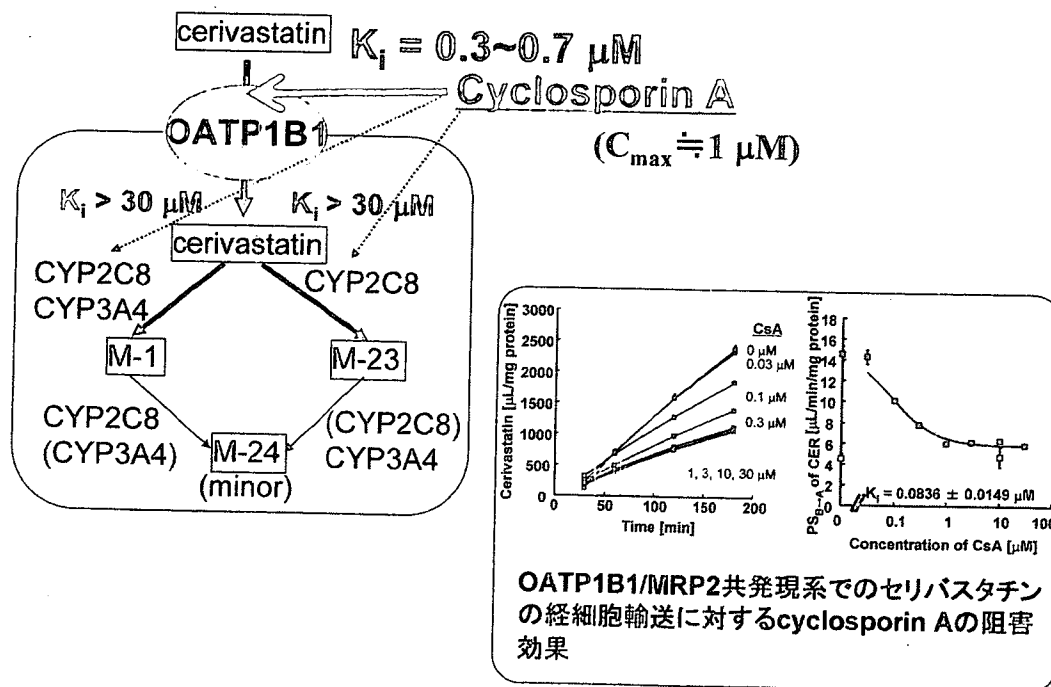


図2-17 cyclosporin A を併用投与した時のセリバスタチンの血漿中濃度上昇のメカニズム
左：cyclosporin A は OATP1B1 を介した CER の輸送を低濃度で強力に阻害する一方、CYP2C8 に対する阻害は弱いことから、OATP1B1 による CER の取り込み阻害が主要な相互作用メカニズムと考えられる。

右：OATP1B1/MRP2 ダブルトランスフェクタントを用いた CER の経細胞輸送に対して、cyclosporin A は濃度依存的に阻害をかける。

用は、そのグルクロン酸抱合体が肝内で濃縮的に存在し、それが CYP2C8 による CER の代謝を阻害することが主要機構であり、肝取り込み過程の阻害も一部関与することを明らかにした²⁵⁾ (図 2-18)。この *in vitro* 発現系を用いて得られた結果は、種々の臨床データを支持するものである。

トランスポーターの遺伝子多型解析も非常に急ピッチで進められている。我々の研究室では、

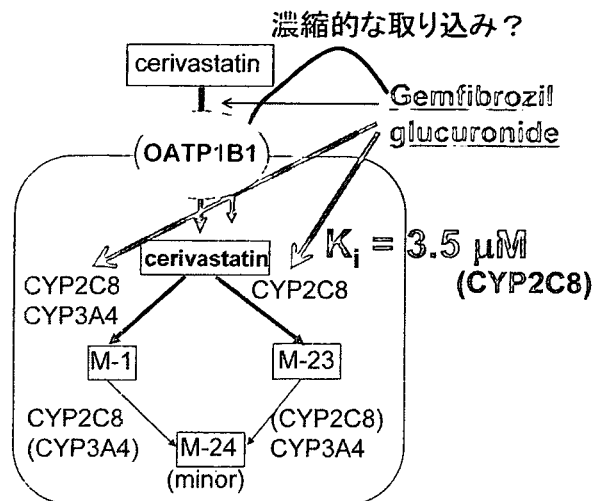
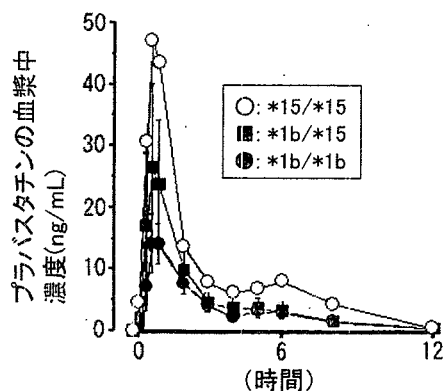


図 2-18 gemfibrozil を併用投与した時のセリバスタチンの血漿中濃度上昇のメカニズム gemfibrozil のグルクロン酸抱合体が、肝臓内で濃縮されることで、CYP2C8 を介した CER の代謝を阻害することが主なメカニズムであり、さらに OATP1B1 を介した取り込みにも一部影響を与えるものと考えられている。

OATP1B1 SNPsのハプロタイプ

	130	174	アレル頻度 (日本人)
OATP1B1 *1a	N	V	(32.5%)
OATP1B1 *1b	D	V	(45.8%)
OATP1B1 *5	N	A	(0.0%)
OATP1B1 *15	D	A	(15.0%)

プラバスタチン(10 mg)経口投与後の
血中濃度に与えるOATP1B1*15の影響



プラバスタチンの薬物速度論パラメータ

OATP1B1の ディプロタイプ	N	腎外クリアランス (L/kg/hr)	AUC (ng*hr/ml)
*1a/*1a	2	2.22	60.5
*1a/*1b	4	1.45 ± 0.72	47.2 ± 27.4
*1b/*1b	4	2.01 ± 0.42	44.2 ± 6.38
*1b/*15	9	1.11 ± 0.34	62.1 ± 21.8
*15/*15	1	0.28	111.8

図 2-19 OATP1B1 の遺伝子多型のハプロタイプとプラバスタチンの血中濃度との関連 OATP1B1 の遺伝子には、主に 2 か所の高頻度の多型が知られており、日本人の場合、特に両方を併せ持つ *15 アレルが存在する。プラバスタチン経口投与後の血中濃度において、*15 アレル保有者は、*1b 保有者と比較して有意に血中濃度が高い。(文献 26) より改変して引用)

ヒト臨床試験において、プラバスタチンの血中濃度がOATP1B1の遺伝子多型により影響を受けることを実証した²⁶⁾ (図2-19)。現在では、他の薬剤の血中濃度についてもOATP1B1の多型により影響を受けうることが報告されている^{27~30)}。最終的には、酵素やトランスポーター発現系を用いる *in vitro* 試験 (薬物間相互作用の解析、遺伝子多型に基づく機能変化の解析) の結果を基に、数学モデルを用いて、細胞レベル・器官レベル・個体レベルへ段階を追って、定量的に予測を進めるための解析手法の確立が必要となる (図2-20)。これらの手法についても、理論面はほぼ確立しており、今後の事例の集積が望まれる。

現在、多数の製薬企業の協力を得て、薬物間相互作用の予測を定量的に行うことのできるシミュレーター機能をもった薬物間相互作用データベースを開発中である (図2-21)。この相互作用は、代謝酵素レベルのもの (競合, 非競合, mechanism-based inhibition を含む) のみならず、薬物トランスポーターレベルで生じるものも含む。また、代謝酵素、トランスポーターの両方が薬物動態に関わるより複雑なケースにおいても、血中濃度、標的臓器、副作用関連臓器における薬物濃度の時間推移の予測、さらには薬物間相互作用、遺伝子多型による薬物動態の個人差の予測を可能にする生理学的薬物速度論モデル (PBPK model) の開発にも着手している。さらには、近年、文献報告が急増してきた薬物トランスポーターに関するあらゆる情報を整理した統合データベース “TP-search” を Web 上に公開している (URL : <http://www.TP-Search.jp/>)³¹⁾ (図2-22)。ここには、基質・阻害剤・臓器分布・薬物間相互作用・遺伝子多型・発現変動などあらゆる側面からのトランスポーターの文献情報を整理し、ユーザーが必要な情報だけをあらゆる角度から抽出可能な検索モードを用意している。また詳細な情報を容易に手に入れられるよう、個々のレコードはすべてPubMedの背誌情報にリンクしている。将来、このようなデータベースをシミュレーターと連結させることで、トランスポーターに関しても様々な薬物動態の予測が可能になるものと考えている。

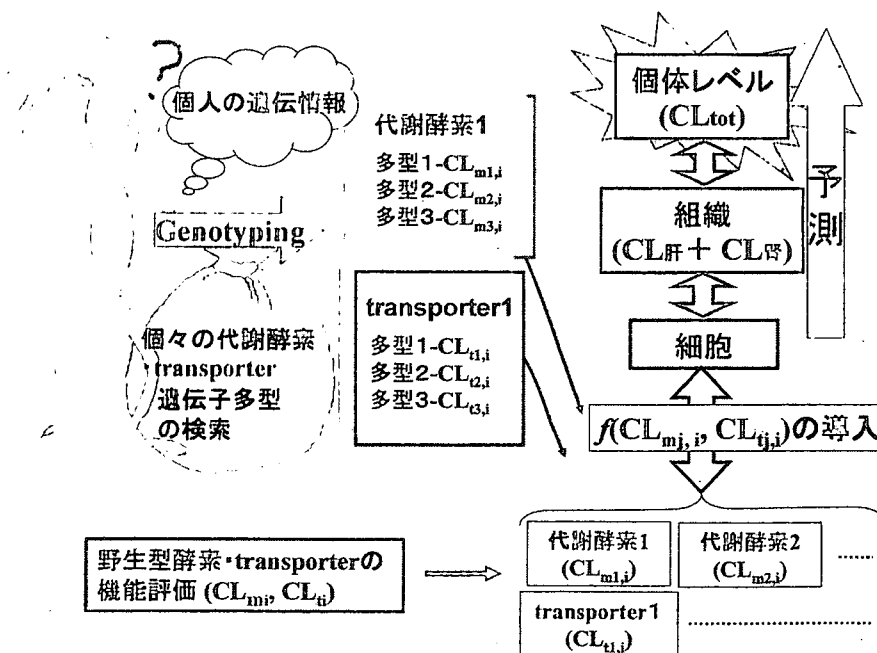


図 2-20 薬物動態関連遺伝子の遺伝子多型による *in vivo* 薬物動態の変化の *in vitro* 実験からの予測法

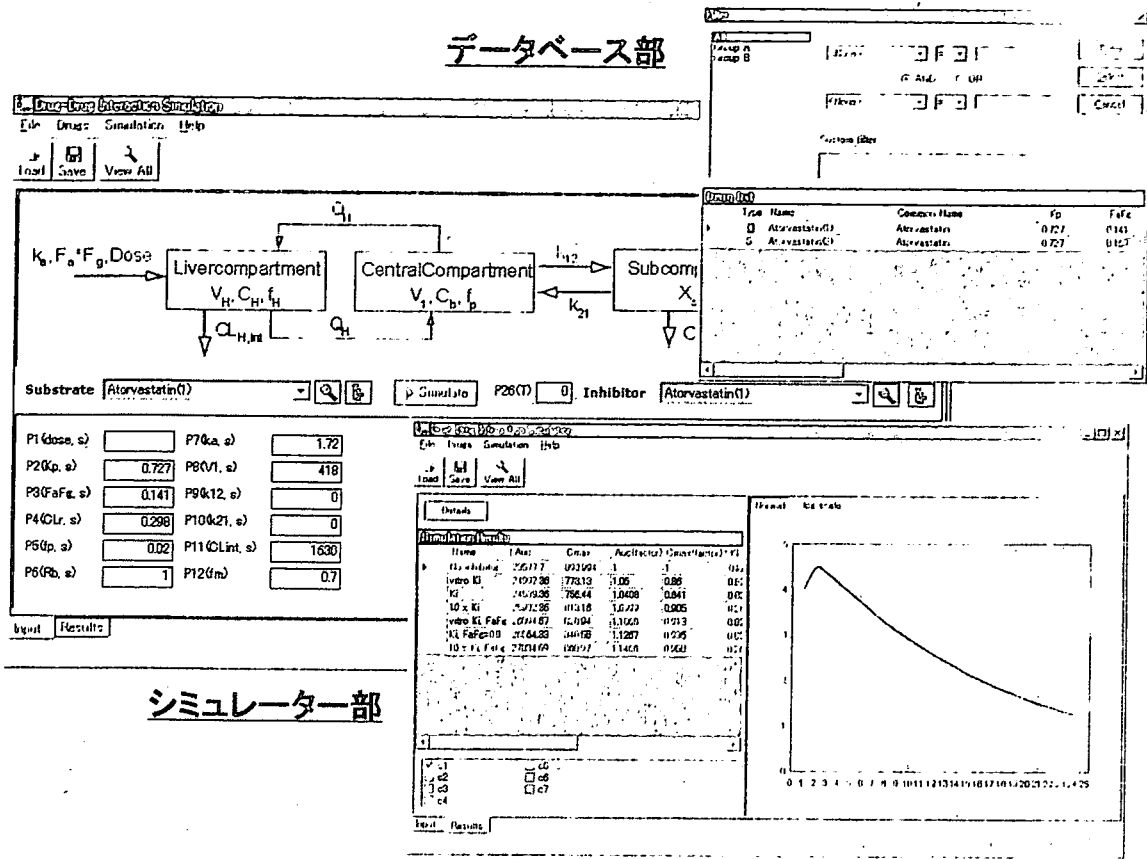


図 2-21 データベースをもつ薬物間相互作用シミュレーターの開発

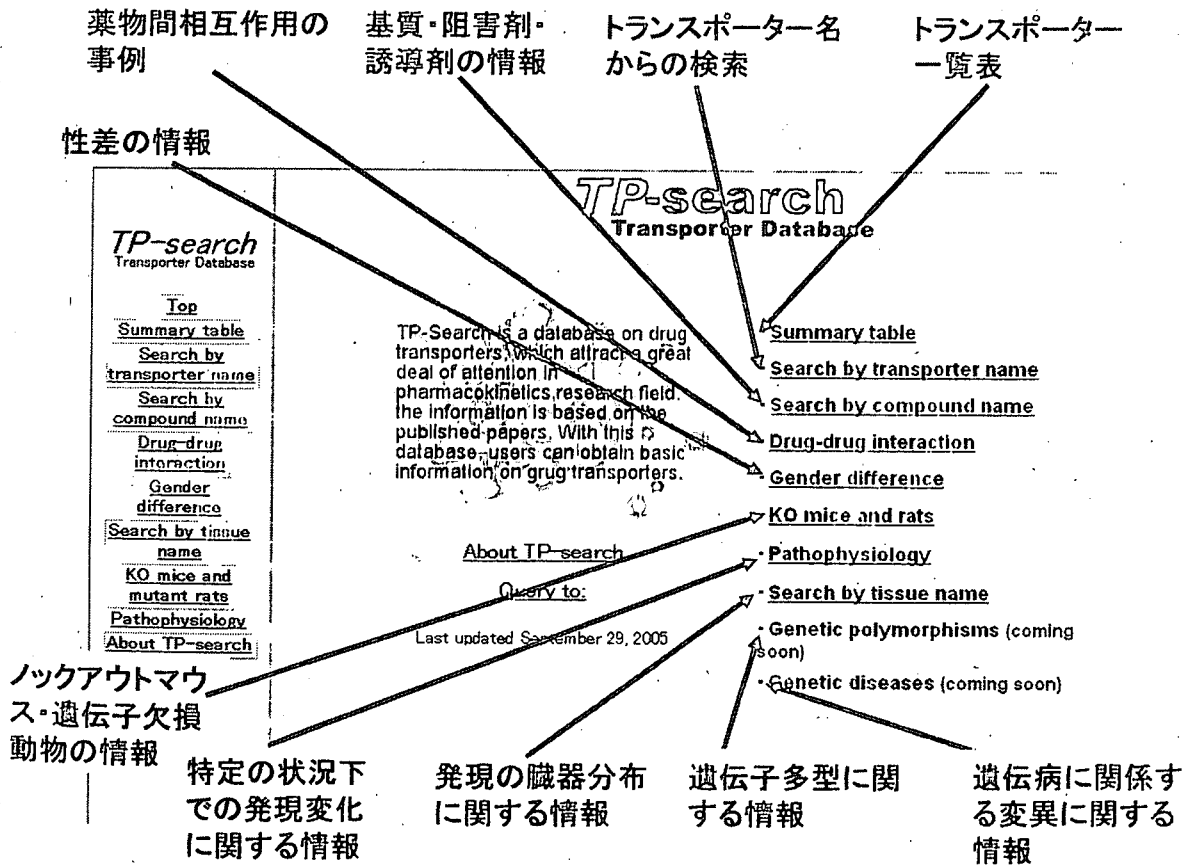


図 2-22 薬物トランスポーター情報統合データベース“TP-Search”の開発

2-3

臨床から臨床への橋渡し— Virtual Clinical Trials —

健常人を対象にした第1相試験は被験者の数も比較的少なく、開発上、それほど大きな負担になっていないことが多い。経済的にも時間的にも critical な過程は、第2相以後の臨床試験である。このような過程を経て市場に出た医薬品が、薬物動態特性の悪さのために市場から撤退せざるを得なくなることは絶対に避けるべきである。動態特性の悪さとは、多くの場合、個々人の遺伝的背景や薬物・食物などとの相互作用に起因する、血中濃度や薬効・副作用に関わる標的組織中の薬物濃度の個人間変動の大きさや、頻度の多さによるところが大きいと考えられる。このような背景のもと、遺伝子多型の診断に基づく層別化臨床試験の考え方が生まれてきている。確かに、層別化臨床試験が実施され、市場に出た後も遺伝子多型に基づく投薬が行われるならば、個人間変動を大きく低下させることにつながるであろう。しかしながら、動態の個人間変動が必ずしも、酵素、トランスポーターの遺伝子多型によるものだけでなく、その発現を制御している転写因子、核内レセプター側の遺伝子変異、環境要因によるものなどがあり、すべての個人間変動の機構が解析されているわけではないことに注意する必要がある。私は、最近 Virtual Clinical Trials の可能性について考えている (図 2-23)^{1,2)}。この実現のためには、薬物動態を支配する個々の要因 (血中タンパク結合性、消化管吸収性、組織分布特性、代謝輸送特性 (各酵素、トランスポーター別に)) について平均値のみでなく、その変動幅を過去のポピュレーションファーマコキネティクス (PPK) を扱った論文を基に整理しデータベースを作成し、これらの個々のパラメータ値と、年齢、体重、性、腎機能、肝機能と薬物動態との関係についても、データベース

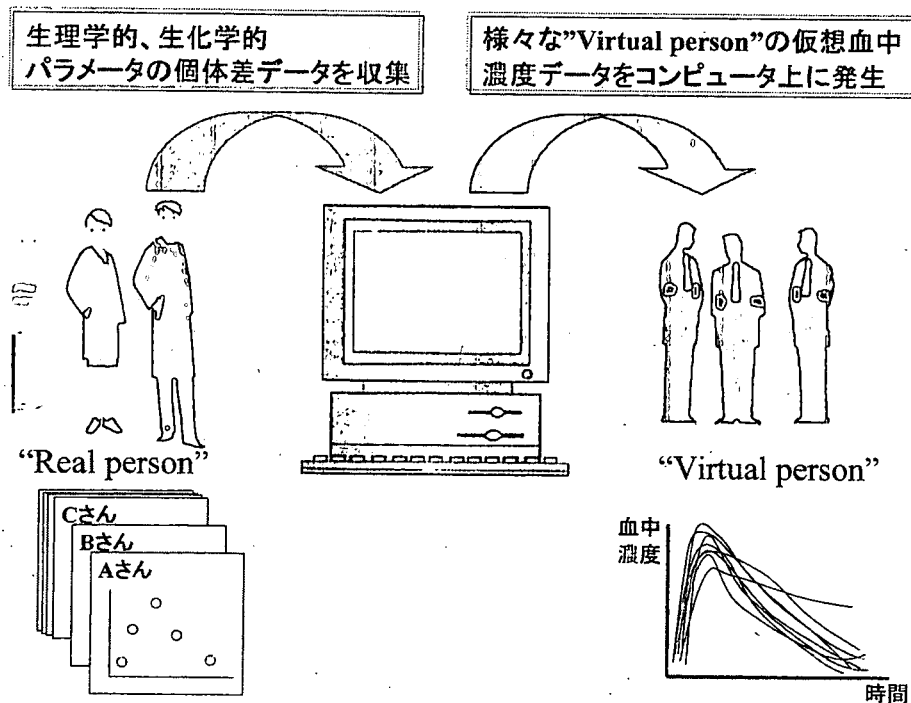


図 2-23 Virtual Clinical Trials の概念

として整理することが必要である。これらのデータベースが充実すれば、新規薬剤について第1相の臨床試験が終了した段階で、その薬物動態的特性（どの代謝酵素、トランスポーターの性質になり、それぞれの寄与率がどの程度であるかなどの情報）を考慮して、データベース情報とあわせて、臨床第2相・第3相試験、市場に出た後の薬物の血中濃度、標的組織中の薬物濃度推移について、モンテカルロシミュレーションによりコンピュータを用いて、多くの患者群のデータを仮想的に計算することができる。理想的には、このような計算により、短期間に多数の患者（年齢、体重、性、腎・肝機能の異なる種々の背景をもった）を対象にした臨床試験をコンピュータ上で実施することができることになる。その結果、例えば、血中濃度、標的組織中濃度などの程度の個人間変動が生じるのかについて、定量的に予測することが可能となる。また、幾つかの遺伝子診断の結果と組み合わせると、その個人間変動がどの程度減少するのか、という情報が得られることになり、薬効、副作用などに関する他の情報と統合することにより、どの程度の割合の患者が薬物動態の個人差のために副作用を生じ、また、薬効が期待できないのか、という予測が可能になるであろう。このようなシミュレーションは、前臨床から臨床にあげる化合物を絞り込む時にも有効であろうと考えている。

まとめおよび今後の展開

今後、必要とされるのは、「はじめに」にも述べたように、複数の動態特性から薬効・副作用組織における薬物暴露を予測する方法論、さらには、これら情報を、薬効、副作用のスクリーニング情報と統合するための方法論の開発である。私は、本方法論を QIDSM (Quantitative Integrated Drug Selection Method) と呼び、すでにその具体的な方法論についても提案している^{1,2)} (図 2-2)。

最終的には、科学的根拠に基づき、動態的特性を optimize し、個人間変動が少なく、相互作用を受けづらく、かつ薬効標的への選択的デリバリーにより、治療域の広い薬剤を開発することができれば、薬効メカニズムが同じ薬剤でも、再度、大きな市場を占有する化合物を開発することが可能であると考えている。そのためには、メディシナルケミスト、薬理学/薬物毒性学、薬物動態の研究者の間での継続したコミュニケーションとフィードバックが必須であり、単なる協力関係だけでは十分でないと感じている。互いの領域にさらに数歩踏み込んで理解できる総合科学の力を、それぞれの領域の研究者が強化することにより、相互の理解が深まるものと信じている。

最後に、私の研究室の HP にも是非とも訪問いただきたい。

(URL : <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~sugiyama/>)

参考文献

- 1) 杉山雄一. 21世紀の薬物動態研究はどこまで進むか. 月刊薬事 2002; 44(臨時増刊号): 721-9.
- 2) 杉山雄一, 設楽悦久, 加藤基浩, 水野尚美. 薬物動態特性の最適化戦略. In: 日本薬学会編, 編集代表 杉山雄一. 次世代ゲノム創薬. 東京: 中山書店, 2003; 173-205
- 3) Sugiyama Y. Druggability: selecting optimized drug candidates. *Drug Discov Today* 2005; 10(23-24):

- 1577-9.
- 4) Chiba M, Shibata Y, Takahashi H, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in humans from experimental animals and in vitro data. In: Fisher MB, Obach RS, Lee JS, editors. Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development: Fontis Media and Marcel Dekker. 2003; 453-81.
 - 5) Giacomini KM, Sugiyama Y. Membrane transporters and drug response. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th edition. New York: McGraw-Hill. 2005; 41-70.
 - 6) Tanaka E, Kurata N, Yasuhara H. How useful is the "cocktail approach" for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo? *J Clin Pharm Ther* 2003; **28**(3): 157-65.
 - 7) Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin Pharmacol Ther* 2003; **74**(5): 437-47.
 - 8) Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **62**(4): 365-76.
 - 9) Iwatsubo T, Hisaka A, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of in vivo nonlinear first-pass hepatic metabolism of YM796 from in vitro metabolic data. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **286**(1): 122-7.
 - 10) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 1998; **50**(3): 387-412.
 - 11) 杉山雄一, 山下伸二, 加藤基浩編集. ファーマコキネティクス -演習による理解-. 東京: 南山堂, 2003.
 - 12) Kanamitsu SI, Ito K, Okuda H, Ogura K, Watabe T, Muro K, et al. Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from in vitro data: inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl) uracil. *Drug Metab Dispos* 2000; **28**(4): 467-74.
 - 13) Tahara H, Kusuhara H, Endou H, Koepsell H, Imaoka T, Fuse E, et al. A species difference in the transport activities of H2 receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **315**(1): 337-45.
 - 14) Nagata Y, Kusuhara H, Hirono S, Endou H, Sugiyama Y. Carrier-mediated uptake of H2-receptor antagonists by the rat choroid plexus: involvement of rat organic anion transporter 3. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**(9): 1040-7.
 - 15) Tahara H, Kusuhara H, Chida M, Fuse E, Sugiyama Y. Is the monkey an appropriate animal model to examine drug-drug interactions involving renal clearance? Effect of probenecid on the renal elimination of H2 receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, in press.
 - 16) Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 2002; **78**(1-3):

43-54.

- 17) Suzuki H, Sugiyama Y. Hepatic drug transport. In: van de Waterbeemd H, Artursson P, Lennernas H, editors. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability and bioavailability: Wiley; 2003; 288-310.
- 18) Ishizuka H, Konno K, Naganuma H, Sasahara K, Kawahara Y, Niinuma K, et al. Temocaprilat, a novel angiotensin-converting enzyme inhibitor, is excreted in bile via an ATP-dependent active transporter (cMOAT) that is deficient in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats (EHBR). *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**(3): 1304-11.
- 19) Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem* 2002; **277**(8): 6497-503.
- 20) Sasaki M, Suzuki H, Aoki J, Ito K, Meier PJ, Sugiyama Y. Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2. *Mol Pharmacol* 2004; **66**(3): 450-9.
- 21) Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, et al. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **314**(3): 1059-67.
- 22) Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* 2005; **68**(3): 800-7.
- 23) Shitara Y, Sato H, Sugiyama Y. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 689-723.
- 24) Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **304**(2): 610-6.
- 25) Shitara Y, Hirano M, Sato H, Sugiyama Y. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**(1): 228-36.
- 26) Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**(6): 554-65.
- 27) Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, Fujino A, Fujiwara H, Otsubo K, et al. Effects of OATP1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan and temocapril. *Clin Pharmacol Ther*, in press.
- 28) Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, et al. Polymorphic organic

- anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77** (6): 468-78.
- 29) Niemi M, Kivisto KT, Hofmann U, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* 2005; **59** (5): 602-4.
- 30) Chung JY, Cho JY, Yu KS, Kim JR, Oh DS, Jung HR, et al. Effect of OATP1B1 (SLCO1B1) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78** (4): 342-50.
- 31) Ozawa N, Shimizu T, Morita R, Yokono Y, Ochiai T, Munesada K, et al. Transporter database, TP-Search: a web-accessible comprehensive database for research in pharmacokinetics of drugs. *Pharm Res* 2004; **21** (11): 2133-4.

ヒトゲノムに見られる代表的な多型はマイクロサテライト多型と単一塩基多型 (SNP) である。マイクロサテライト多型は疾患遺伝子探索研究における連鎖解析に頻用されるとともに、個体識別などのDNA鑑定にも有用である。その解析には、ゲル電気泳動と銀染色を組み合わせるか、蛍光標識プライマーを用いたPCR産物を自動シーケンサーで解析する場合が多い。一方、SNPは疾患遺伝子の候補領域から疾患遺伝子を絞り込む段階で有用な多型である。対立遺伝子の判別原理はハイブリダイゼーション、特異的プライマー伸長、一本鎖あるいは二本鎖の構造差の検出など限られているが、検出方法等にさまざまな工夫がなされ多様な技術が開発されている。最近、微量のゲノムDNAから全ゲノムを増幅する技術やゲノム全域に分布する数十万種ものSNPsを一挙に解析する技術も実用化されている。

1.1 遺伝子・ゲノムの多型

ヒトゲノムに見られる代表的な多型として、マイクロサテライト多型と単一塩基多型 (SNP) がある。前者は短い塩基配列の繰り返し回数に見られる多型である。疾患遺伝子探索研究における連鎖解析に頻用される。後者は塩基1個の差異からなる。ヒトゲノム中には500万から1,000万種類も存在すると推定され、最も高密度に存在する多型である。疾患遺伝子の候補領域から疾患遺伝子を絞り込む段階で有用な多型である。

1) 代表的な遺伝子・ゲノム多型

ヒトゲノムが生物種としてのヒト (Homo Sapiens) に必要な遺伝情報のすべてを担っていることは言うまでもない。一方で、ヒトゲノム中には数多くの多型 (polymorphism) ・変異 (variation) が存在する³⁾。このような多型・変異は、それ自体が何らかの機能上の意義を持つのかどうかにかかわらず、ヒトのさまざまな疾患や特徴にかかわる遺伝子を探索したり、人類集団の遺伝的近縁性や起源・形成過程を推定する上で有用な標識 (マーカー) として用いられる。表1-1は、ヒトの疾患関連遺伝子の探索において用いられる主な多型マーカーを示す。まず、反復配列 (repetitive sequence) と総称されるグループの中によく用いられる2種のマーカーがある。

ミニサテライト (minisatellite) あるいはVNTR (variable number of tandem repeat) と呼ばれる配列は、10~100bp程度の配列が繰り返しの単位となり、通常20~50回程度の繰り返しが見られるが、この繰り返しの回数に多型が見られる。ミニサテライトは数年前まで疾患遺伝子の連鎖解析にもよく用いられてきた。また法医学において、個人識別や親子鑑定に広く用いられてきたフィンガープリント法はミニサテライトの多型を利用する方法である。

ミニサテライトに代わって、近年より頻繁に用いられるようになった反復配列多型がマイクロサテライト (microsatellite) あるいはSTR (short tandem repeat) の多型である。1~数bpの繰り返し単位で通常5~60回程度の繰り返しが見られ、この繰り返し回数に多型が存在する (図1-1)。ヒトゲノム中に広範に分布するマイクロサテライトのうち、多型を示すものがどの程度あるのか詳細は明らかになっていないが、数十万種類程度は存在すると推定される。マイクロサテライト多型が最もよく用いられているのは、各種の疾患や形質にかかわる遺伝子を同定するための連鎖解析や関連解析においてである。

SNP (single nucleotide polymorphism : 単一塩基多型) は、反復配列以外の多型の中で、



表1-1 ヒトゲノム中の主な多型マーカー

<p>反復配列 (repetitive sequence) の多型</p> <p>ミニサテライト (minisatellite) ・ VNTR (variable number of tandem repeat)</p> <p>10-100 bp × 20-50 repeats</p> <p>マイクロサテライト (microsatellite) ・ STR (short tandem repeat)</p> <p>1-9 bp × 5-60 repeats</p> <p>数十万カ所, 高度な多型性 → マッピング</p> <p>SNP (single nucleotide polymorphism : 単一塩基多型)</p> <p>約1,000万カ所, 二対立遺伝子</p> <p>SNPハプロタイプは高度な多型性 → 遺伝子特定</p>

図1-1 マイクロサテライト多型の例

(TA)₅アレル TCCAGCCTCGGAG TATATATATAGTCCTTTCTCCAGA

(TA)₆アレル TCCAGCCTCGGAG TATATATATATAGTCCTTTCTCCAGA

(TA)₇アレル TCCAGCCTCGGAG TATATATATATATAGTCCTTTCTCCAGA

⋮

⋮

⋮

図1-2 単一塩基多型 (SNP) の例

---AGACTGTCCGAA T TGACCATGGTTCA---

⋮ (一方の鎖のみ表示)

⋮

---AGACTGTCCGAA C TGACCATGGTTCA---

個人の遺伝子型はTT, TCまたはCC型となる

疾患遺伝子の探索研究に最も汎用される遺伝マーカーである (図1-2)。ゲノム中の総数が500~1,000万種類, すなわち平均して約300~600bpごとに1個のSNPが存在すると推定され, ヒトゲノム中で最も高密度な分布を示す多型である。SNPの一部は, さまざまな多因子疾患の感受性あるいは抵抗性に直接関与すると考えられることから, 各種の疾患遺伝子 (多型) を特定するために必ず解析するマーカーである。

このほかに, ヒトゲノム中にはより大規模な多型も存在する。最近特に注目されているのが, 数kbから数百kbの規模で遺伝子あるいはゲノム断片のコピー数に多型・変異が認められる現象であり, CNV (copy number variation) と呼ばれる。現在その全体像を明らかにする研究が進んでおり, また疾患との関連研究が端緒についたばかりである。

注
 多型と変異: 頻度にかかわらず, また規模の大小にかかわらず, ゲノムに見られる差異はすべて変異と呼ばれる。一方, 多型は変異のうち, 頻度の低い対立遺伝子 (世帯でもよい) の合計が1%以上, 言い換えれば対立の高い対立遺伝子が99%以下の状態にあるものをいう。