

- 607号
- 13) 厚生省：薬務局安全課長通知，「医療用医薬品添付文書の記載要領について」，平成9年4月25日薬安第59号
  - 14) 厚生省：「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について（答申）」，平成10年12月16日厚科審第13号
  - 15) 厚生省：医薬安全局審査管理課長通知，「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて」，平成10年6月26日医薬審第496号
  - 16) FDA: Guidance for Industry: Drug Metabolism / Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies in Vitro (Apr 1997)
  - 17) FDA: Guidance for Industry: In Vivo Drug Metabolism/Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Dosing and Labeling (Nov 1999)
  - 18) EMEA: Note for Guidance on the Investigation of Drug Interactions (Dec 1997)
  - 19) Lin, J.H. and Yamazaki, M.: *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 59-98 (2003)
  - 20) Bussey, H.I.: *Am. Heart J.*, **104**, 289-302 (1982)
  - 21) Pedersen, K.E.: *Acta. Med. Scand. Suppl.*, **697**, 1-40 (1985)
  - 22) Mordel, A., Halkin, H., Zulty, L., Almog, S. and Ezra, D.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **53**, 457-462 (1993)
  - 23) Verschraegen, M., Koks, C.H., Schellens, J.H. and Beijnen, J.H.: *Pharmacol. Res.*, **40**, 301-306 (1999)
  - 24) Saito, M., Hirata-Koizumi, M., Urano, T., Miyake, S. and Hasegawa, R.: *J. Clin. Pharm. Therap.*, **30**, 21-37 (2005)
  - 25) Saito, M., Hirata-Koizumi, M., Miyake, S. and Hasegawa, R.: *Eur. J. Clin. Pharm.*, **61**, 531-536 (2005)

## シクロスポリンによるスタチン系薬剤の著しい血中濃度増加作用と その機序及び添付文書における情報の解析

平田睦子<sup>#</sup>, 齋藤充生, 三宅真二, 長谷川隆一

### The Incremental Effect and Mechanism of Cyclosporine on Blood Concentration of Statins and Statin Package Insert Information in Japan

Mutsuko Hirata-Koizumi<sup>#</sup>, Mitsuo Saito,  
Shinji Miyake, Ryuichi Hasegawa

Cyclosporine is an indispensable immunosuppressant used in organ transplant patients, who frequently manifest hyperlipidemia. Statins, which are cholesterol-lowering agents, are often combined with cyclosporine in the treatment of hyperlipidemia of organ transplant patients. Since cyclosporine is a substrate and inhibitor of CYP3A4, researchers suspect that the immunosuppressant inhibits CYP3A4-mediated metabolism of statins, leading to an increase in statin plasma concentration and infrequently resulting in rhabdomyolysis. However, a number of clinical trials have shown cyclosporine to increase the plasma concentration of all developed statins, including those not metabolized by CYP3A4. Furthermore, recent mechanistic studies have shown organic anion transporting peptides (OATP) C to mediate the uptake of some statins and cyclosporine has been shown to inhibit the uptake via OATP-C in cultured cells. Therefore, the inhibition of hepatic uptake of statins is considered to be one of the mechanisms by which cyclosporine incrementally increases statin blood concentration. However, most current Japanese package inserts of statins give no information on change in pharmacokinetic parameters such as AUC and C<sub>max</sub> in the combined medication with cyclosporine. Furthermore, in the Japanese package inserts, it is either stated that cyclosporine inhibits CYP3A4-mediated metabolism or no comment is made on the mechanism. The package insert should properly provide available quantitative information on the change of pharmacokinetic parameters and the probable mechanism of action.

Key Words: cyclosporine, statin, drug-drug interaction, CYP3A4, rhabdomyolysis

(Received May 31, 2005)

#### はじめに

Cyclosporineは臓器移植に不可欠な医薬品(免疫抑制剤)の一つであり,多くの臓器移植患者に使用されている。臓器移植により高脂血症が誘発されることが多いため, cyclosporineはスタチン系薬剤と併用して投与される場合が多い。スタチン系薬剤はコレステロール生合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素を特異的に阻害し,血中のコレステロール濃度を減少させる薬剤であるが,その重篤な副作用としてまれに横紋筋融解症が発現し,時として死に至る。一方, cyclosporineとスタチン系薬剤の併用投与が原因と推定される横紋筋融解症の症例報告が多数あり<sup>1-5)</sup>,これは cyclosporineがCYP3A4

の基質であり,かつCYP3A4阻害作用を持つため,CYP3A4で代謝を受けるスタチン系薬剤の代謝が阻害されたことによると考えられていた。しかし,CYP3A4による代謝を受けないスタチン系薬剤についても cyclosporineの併用により血中濃度の増加することが報告され,CYP3A4を介さない相互作用機序の存在が示唆されている。

Cyclosporineによるスタチン系薬剤の血中濃度増加の程度やその機序に関する情報を適切に提供することは,スタチン系薬剤の副作用を回避する上で非常に重要であると考えられる。そこで,本稿では cyclosporineとスタチン系薬剤との臨床薬物動態学的相互作用並びにその作用機序に関する文献情報を収集・解析するとともに,日本で市販されているスタチン系薬剤の医薬品添付文書を点検し,添付文書による情報提供の現状を把握することとした。

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Mutsuko Hirata-Koizumi, Kamiyoga-1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.561; Fax: 03-3700-9788; E-mail: mkoizumi@nihs.go.jp

## 調査方法

Medlineを用いて、現在までに開発されたすべてのスタチン系薬剤と cyclosporine との臨床薬物動態学的相互作用並びにそれらの作用機序に関する文献を検索し、総合的に解析した。また、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のホームページ<sup>6)</sup>から、現在日本において市販されているスタチン系薬剤の添付文書(先発企業作成分)を入手し、cyclosporine との相互作用の機序等についての情報提供の現状を調査した。

## 調査結果及び考察

現在までに開発されたスタチン系薬剤には atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, cerivastatin, pravastatin, pitavastatin, rosuvastatin がある。これら8種類のスタチン系薬剤のうち、日本では lovastatin は承認されており、cerivastatin は1999年に承認されたものの、2001年には企業による自主的な市場撤退に至っている。

### 1. スタチン系薬剤の代謝及び cyclosporine の併用投与による血中濃度の増加

スタチン系薬剤の代謝に関わる酵素を Table.1 に示した。Atorvastatin, simvastatin 及び lovastatin は CYP3A4 により代謝される。一方、fluvastatin は CYP2C9 により、cerivastatin は CYP3A4 と CYP2C8 の両酵素により代謝され、pravastatin, pitavastatin 及び rosuvastatin は CYP によってはほとんど代謝されない。

すべてのスタチン系薬剤について、cyclosporine の併用投与による血中濃度の変動に関する文献が報告されていた (Table.1)。これらは全て移植患者から得られたデータであるが、cyclosporine 併用時のスタチン系薬剤の AUC はいずれも単独投与に比べて3倍以上に増加していた。Cyclosporine には CYP3A4 阻害作用があるが、CYP3A4 で代謝される atorvastatin, simvastatin や lovastatin に対する特異性は全く見られていない。なお、

Table.1 Major metabolic enzymes, CYPs of statins and increase in AUC of statins in combination with cyclosporine in organ transplant patients

Name of statins	Metabolic enzymes <sup>7-9)</sup>	Increase of AUC
Atorvastatin	CYP3A4	6 <sup>9)</sup> - 9 fold <sup>10,11)</sup>
Simvastatin	CYP3A4	3 - 8 fold <sup>12-14)</sup>
Lovastatin	CYP3A4	5 - 20 fold <sup>15,16)</sup>
Fluvastatin	CYP2C9	3 fold <sup>17,18)</sup>
Cerivastatin	CYP3A4 & CYP2C8	3 - 5 fold <sup>19)</sup>
Pravastatin	[Not metabolized by CYPs]	5 - 12 fold <sup>15,20)</sup>
Pitavastatin	CYP2C9 (slightly)	5 fold <sup>21)</sup>
Rosuvastatin	[Not metabolized by CYPs]	7 fold <sup>22)</sup>

a) HMG-CoA reductase activity was measured.

Table1に含まれないデータとして、cyclosporine との併用により pravastatin の AUC が23倍に増加した報告があったが<sup>23)</sup>、これは学会要旨としての報告であり、その後も、投与や分析方法を含めた詳細な試験条件及び結果の報告が無い場合、数値の信頼性は低いと考えられる。

### 2. Cyclosporine によるスタチン系薬剤の血中濃度増加機序に関する研究

Smithら<sup>24)</sup>は、雌のSDラットに simvastatin, lovastatin 及び pravastatin を投与すると用量依存的に筋症が発現し、さらに、cyclosporine の併用によりこの筋毒性が強く増強されることを示した。そこで、cyclosporine (10 mg/kg/day) とこれらのスタチン系薬剤を4週間併用投与し、筋組織中の HMG-CoA 還元酵素阻害活性を測定した結果、cyclosporine 併用により simvastatin (50 mg/kg/day) で1.5倍、lovastatin (100 mg/kg/day) で約13倍、pravastatin (100 mg/kg/day) で約3倍に増加した。しかし、ラット肝ミクロソームを用いて、lovastatin 100  $\mu$ M の代謝速度を測定した結果、cyclosporine 10-200  $\mu$ M 存在下で代謝抑制は認められなかった。なお、臨床(安定した腎移植患者)において通常用量下での cyclosporine の平均最高血中濃度は、724-979 ng/mL (0.60-0.81  $\mu$ M) であったことが報告されている<sup>25,26)</sup>。これらの結果から、cyclosporine によるスタチン系薬剤の血中濃度増加は代謝阻害ではなく、スタチン系薬剤の血中からの排泄阻害により起きると推測された。

その後、Hsiangら<sup>27)</sup>はヒト OATP-C (Organic Anion Transporting Peptides-C: 主に肝細胞の血液側膜に存在して、血液からの取り込みに関与する有機アニオントランスポーター) を組み込んだ 293c18 細胞を用いて、pravastatin (0.5  $\mu$ M) の取り込みに対するスタチン系薬剤 (50  $\mu$ M) による阻害率を測定した結果、atorvastatin, simvastatin, lovastatin 及び atorvastatin の2つの代謝物はほぼ100%、pravastatin は30%の抑制率を示した。さらに、Shitaraら<sup>28)</sup>はヒト肝培養細胞および OATP-C を発現させた MDCKII 細胞において、cyclosporine が cerivastatin の取り込みを抑制すること (Ki: 0.2-0.7  $\mu$ M) を示した。なお、cerivastatin の代謝に対する cyclosporine の IC<sub>50</sub> は30  $\mu$ M 以上であった。最近行われた OATP-C を発現させた卵母細胞を用いた研究においても、cyclosporine が rosuvastatin の取り込みを抑制すること (IC<sub>50</sub>: 2.2  $\mu$ M) が示されている<sup>22)</sup>。これらの結果から、cyclosporine によるスタチン系薬剤の血中濃度の増加には、OATP-C によるスタチン系薬剤の肝細胞への取り込みが寄与していると考えられた。

### 3. スタチン系薬剤の添付文書における cyclosporine との相互作用に関する情報提供の現状

現在日本で市販されている6種すべてのスタチン系薬剤の添付文書で、cyclosporineとの相互作用についての注意喚起がされている。Table.2には、相互作用一覧表における血中濃度の変化及び機序に関する記載状況のみを抽出して示した。

Atorvastatin及びsimvastatinの添付文書では、cyclosporineとの相互作用の機序が本剤の(CYP3A4を介する)代謝阻害であるとされているが、これはCYP3A4で代謝を受けないスタチン系薬剤についてもCYP3A4で代謝を受けるスタチン系薬剤と同様にcyclosporine併用によるAUCの著しい増加が認められたこと、及び上述のラット肝ミクロソームを用いた研究においてcyclosporineによりlovastatinの代謝阻害が認められなかったこととは矛盾する内容である。また、cyclosporine併用によりどの程度血中濃度(AUCなど)に影響があるかについての記載はなかった。Fluvastatin及びpravastatinの添付文書では、cyclosporineの併用により横紋筋融解症があらわれるおそれがある、またはあられやすいとの記載のみで、発現機序や血中濃度(AUCなど)への影響に全く言及していない。これら4種のスタチン系薬剤の添付文書については、発売時または発売後極初期の情報に基づいた記載が残っており、その後の新しい情報が組み入れられていないと考えられる。それに対し、最近(2003~2005年)承認・発売されたpitavastatin及びrosuvastatinの添付文書にはAUC及びCmaxの増加率の情報提供がなされている。さらに、薬物動態の項には詳細な試験条件や文献も引用されており、十分な情報提供と考えられる。薬物動態学的相互作用

用に関しては、AUC及びCmaxを含む薬物動態学的指標の変化に関する情報が重要と考えられることから、他のスタチン系薬剤の添付文書においてもpitavastatinやrosuvastatinと同様にこれらの情報が適切に提供されることが望まれる。一方、相互作用の機序については、pitavastatinの添付文書には記載されていなかったものの、rosuvastatinの添付文書にはOATP-Cを介した取り込み阻害を示した最近の研究成果を反映した記載が認められた。Rosuvastatin及びcerivastatin以外のスタチン系薬剤については直接的な証拠はないものの、cyclosporineによるOATP-Cを介した肝細胞取り込み阻害は、少なくとも現在までに開発されたスタチン系薬剤には共通した作用である可能性が示唆される。従って、添付文書においても、cyclosporineによる肝への取り込み阻害が示唆される旨情報提供することが望ましいと考えられる。

最後に、cyclosporineは、移植領域のみではなく、皮膚科領域を含む自己免疫疾患にも使用されるようになってきているので、スタチン系薬剤との相互作用には十分に注意を払うべきであると考えられる。臓器移植及び自己免疫疾患等に使用される免疫抑制剤には、cyclosporineの他にtacrolimusがある。Tacrolimusとスタチン系薬剤の臨床薬物動態学的相互作用については2つの報告があり、臓器移植患者においてsimvastatinの血中濃度に全く影響が認められなかったこと<sup>14)</sup>、また、cerivastatinのAUCが35%増加したこと<sup>29)</sup>が示されている。従って、tacrolimusのスタチン系薬剤への影響はcyclosporineより明らかに少ないと推定されることから、スタチン系薬剤との相互作用に関しては、tacrolimus併用時の方がcyclosporine併用時よりも問題が少ないと考

Table.2 日本のスタチン系薬剤の添付文書におけるシクロスポリンとの相互作用に関する記載状況

薬剤名	相互作用一覧表における記載	
	血中濃度の変化	機序
アトルバスタチン	[記載なし]	シクロスポリンによるHMG-CoA還元酵素阻害剤の代謝、胆汁中排泄に対する競合阻害に基づく相互作用が示唆されている。
シンバスタチン	[記載なし]	CYP3A4を阻害し、併用により本剤の代謝が抑制されるおそれがある。
フルバスタチン	[記載なし]	[記載なし]
プラバスタチン	[記載なし]	[記載なし]
ピタバスタチン	シクロスポリンにより本剤の血漿中濃度が上昇(Cmax 6.6倍, AUC 4.6倍)する。	[記載なし]
ロスバスタチン	シクロスポリンを投与されている心臓移植患者に併用したとき、シクロスポリンの血中濃度に影響はなかったが、本剤のAUC <sub>0-24h</sub> が健康成人に単独で反復投与したときに比べて約7倍上昇したとの報告がある。	シクロスポリンにより本剤の肝への取り込みが阻害されるためと考えられる。

えられる。

文 献

- 1) Maltz, H.C., Balog, D.L. and Cheigh, J.S.: *Ann. Pharmacother.*, **33**, 1176-1179 (1999)
- 2) Weise, W.J. and Possidente, C.J.: *Am. J. Med.*, **108**, 351-352 (2000)
- 3) Mora, C., Rodriguez, M.L. and Navarro, J.F.: *Transplantation.*, **72**, 551 (2001)
- 4) Nicolas De Prado, I., Miras Lopez, M., Moran Sanchez, S. and Mercader Martinez, J.: *Med. Clin. (Barc.)*, **118**, 716-717 (2002)
- 5) Gumprecht, J., Zychma, M., Grzeszczak, W., Kuzniewicz, R., Burak, W., Zywiec, J., Karasek, D., Otulski, I. and Mösür, M.: *Med. Sci. Monit.*, **9**, CS89-91 (2003)
- 6) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構：医薬品医療機器情報提供ホームページ，<http://www.info.pmda.go.jp/>.
- 7) Williams, D. and Feely, J.: *Clin. Pharmacokinet.*, **41**, 343-370 (2002)
- 8) Fujinò, H., Yamada, I., Shimada, S., Nagao, T. and Yoneda, M.: *Arzneimittelforschung.*, **52**, 745-753 (2002)
- 9) White, C.M.: *J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 963-970 (2002)
- 10) Asberg, A., Hartmann, A., Fjeldsa, E., Bergan, S. and Holdaas, H.: *Am. J. Transplant.*, **1**, 382-386 (2001)
- 11) Hermann, M., Asberg, A., Christensen, H., Holdaas, H., Hartmann, A. and Reubsæet, J.L.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **76**, 388-391 (2004)
- 12) Arnadottir, M., Eriksson, L.O., Thysell, H. and Karkas, J.D.: *Nephron.*, **65**, 410-413 (1993)
- 13) Campana, C., Iacona, I., Regazzi, M.B., Gavazzi, A., Perani, G., Raddato, V., Montemartini, C. and Viganò, M.: *Ann. Pharmacother.*, **29**, 235-239 (1995)
- 14) Ichimaru, N., Takahara, S., Kokado, Y., Wang, J.D., Hatori, M., Kameoka, H., Inoue, T. and Okuyama, A.: *Atherosclerosis.*, **158**, 417-423 (2001)
- 15) Olbricht, C., Wanner, C., Eisenhauer, T., Kliem, V., Doll, R., Boddaert, M., O'Grady, P., Krekler, M., Mangold, B. and Christians, U.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **62**, 311-321 (1997)
- 16) Gullestad, L., Nordal, K.P., Berg, K.J., Cheng, H., Schwartz, M.S. and Simonsen, S.: *Transplant. Proc.*, **31**, 2163-2165 (1999)
- 17) Goldberg, R. and Roth, D.: *Transplantation.*, **62**, 1559-1564 (1996)
- 18) Park, J.W., Siekmeier, R., Lattke, P., Merz, M., Mix, C., Schuler, S. and Jaross, W.: *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **6**, 351-361 (2001)
- 19) Muck, W., Mai, I., Fritsche, L., Ochmann, K., Rohde, G., Unger, S., Johné, A., Bauer, S., Budde, K., Roots, I., Neumayer, H.H. and Kuhlmann, J.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**, 251-261 (1999)
- 20) Park, J.W., Siekmeier, R., Merz, M., Krell, B., Harder, S., Marz, W., Seidel, D., Schuler, S. and Gross, W.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **40**, 439-450 (2002)
- 21) Hasunuma, T., Nakamura, M., Yachi, T., Arisawa, N., Fukushima, K., Iijima, H. and Saito, Y.: *Rinsho. Iyaku.*, **19**, 381-389 (2003)
- 22) Simonson, S.G., Raza, A., Martin, P.D., Mitchell, P.D., Jarcho, J.A., Brown, C.D., Windass, A.S. and Schneck, D.W.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **76**, 167-177 (2004)
- 23) Regazzi, M.B., Iacona, I., Campana, C., Gavazzi, A., Viganò, M. and Perani, G.: *Transplant. Proc.*, **26**, 2644-2645 (1994)
- 24) Smith, P.F., Eydeloth, R.S., Grossman, S.J., Stubbs, R.J., Schwartz, M.S., Germershausen, J.I., Vyas, K.P., Kari, P.H. and MacDonald, J.S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 1225-1235 (1991)
- 25) ノバルティス ファーマ株式会社：サンディミュン内用液，カプセル 25 mg，カプセル 50 mg，医薬品インタビューフォーム (2005)
- 26) ノバルティス ファーマ株式会社：ネオラール内用液，10 mgカプセル，25 mgカプセル，50 mgカプセル，医薬品インタビューフォーム (2005)
- 27) Hsiang, B., Zhu, Y., Wang, Z., Wu, Y., Sasseville, V., Yang, W.P. and Kirchgessner, T.G.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 37161-37168 (1999)
- 28) Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P. and Sugiyama, Y.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 610-616 (2003)
- 29) Renders, L., Haas, C.S., Liebelt, J., Oberbarnscheidt, M., Schocklmann, H.O. and Kunzendorf, U.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **56**, 214-219 (2003)

## 安全性の問題で市場撤退となったセリバスタチンの最新情報と 米国の市販後安全性監視システムの解析

齋藤充生<sup>\*</sup>, 平田睦子, 三宅真二, 長谷川隆一

### Withdrawal of Cerivastatin Revealed a Flaw of Post-marketing Surveillance System in the United States

Mitsuo Saito<sup>\*</sup>, Mutsuko Hirata-Koizumi,  
Shinji Miyake, Ryuichi Hasegawa

Cerivastatin, a lipid-lowering agent, was voluntarily withdrawn from the market because of high risk of rhabdomyolysis when used as monotherapy and as comedication with fibrates, especially gemfibrozil. Thereafter, investigators found a five-fold increase in the area under the curve (AUC) when cerivastatin was used as comedication with gemfibrozil and theorized that the increase was associated with inhibition of the hepatic uptake and metabolism. By contrast, a number of pharmacoepidemiological investigations - one of which involved evaluation of the Food and Drug Administration (FDA) database for suspected adverse drug reactions and 11 cohort studies of statin and fibrate users in United States - showed the risk of rhabdomyolysis to be greater in cerivastatin than in other statins used in either monotherapy or in comedication with fibrates, especially gemfibrozil.

This incident regarding risk of rhabdomyolysis in cerivastatin monotherapy was taken to court in the United States and unpublished company (manufacturer of cerivastatin) documents were opened. The incident was then analyzed and discussed in the *Journal of American Medical Association (JAMA)* as a concern of the current US post-marketing surveillance system. The company's action and timing were judged and found to be inappropriate (although companies of this sort generally have insurmountable conflicts of interest), and the work of the US regulatory system and funding for post-marketing safety management were found to be insufficient. On the basis of the current situation, the authors and editors recommend further improvement of post-marketing regulations including the establishment of an independent drug safety board to oversee post-marketing surveillance.

Among the opened, unpublished data, was the finding that cerivastatin obviously induced myopathy in a dose-dependent manner when administered as monotherapy. As for other statins, only limited data was available for the relationship between the dosage and the rate of myopathy. For the safety use of statins, this should be clarified by proper surveillance system.

Key Words: cerivastatin, gemfibrozil, rhabdomyolysis, withdrawal, post-marketing safety management

(Received May 31, 2005)

#### はじめに

StatinはHMG-CoA還元酵素を特異的に阻害することによって、血中のコレステロール濃度を減少させ、狭心症や心筋梗塞などの心血管系疾患を予防するための薬剤である。Statinは一般には安全性が高く、非常に多くの患者に投与されているが、まれに横紋筋融解症を誘発することが問題となっている。一方、主なstatinはCYP3A4によって代謝され、CYP3A4阻害作用を有する薬剤との

併用により、それらのstatinの血中濃度が著しく増加することから、特異的なCYP阻害剤の影響を受けにくいstatinとして、CYP3A4とCYP2C8の両方により代謝されるcerivastatinが開発された。実際、cerivastatinの血中濃度はCYP3A4の強力な阻害剤のitraconazoleと併用しても殆ど増加が認められない。しかし、米国において、cerivastatinの単独投与で横紋筋融解症が多発し、死亡が出たばかりか、gemfibrozilとの併用でさらに高頻度で横紋筋融解症が誘発され、多くの死亡が出たため、自主的に市場撤退した<sup>1)</sup>。また、日本では、gemfibrozilは販売されていないものの、cerivastatin単独投与によるリスク等を考慮して市場撤退した。最近、cerivastatin単独及び

<sup>\*</sup>To whom correspondence should be addressed: Mitsuo Saito, Kamiyoga-1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.563; Fax: 03-3700-9788; E-mail: m-saito@nihs.go.jp

gemfibrozilとの併用による横紋筋融解症の発現頻度の解析, 薬物動態相互作用機序の研究, また, cerivastatinをモデルに米国における市販後安全性管理の状況が解析されたので, 本項ではそれらを総合的にまとめる.

### 1. Cerivastatinの臨床薬物動態特性

CerivastatinはCYP3A4とCYP2C8の両酵素によって代謝されることから, 単独のCYP3A4阻害剤との併用ではcerivastatinの代謝はほとんど阻害されないと考えられる. 実際, itraconazole, erythromycin, cimetidineとの併用投与でcerivastatinのAUCは最大でも30%程度の増加<sup>2-4)</sup>で, atorvastatin, simvastatin, lovastatinのような数倍の増加に比べて著しく影響が少ない. 一方, gemfibrozilとの併用では, simvastatin<sup>5)</sup>及びlovastatin<sup>6)</sup>のAUCがそれぞれ2及び3倍の増加に対して, cerivastatin<sup>7)</sup>のAUCは5倍と, 2倍程度強く影響が現れることが示されているが, 他のstatinに対する各種CYP阻害剤の影響が一般に数倍以上であることを考えると, 必ずしも特別にリスクが高いことを示唆するわけではない.

### 2. 相互作用の機序に関する研究

Cerivastatinは発売初期にgemfibrozilとの相互作用に基づく横紋筋融解症の発現が認められ, 2年半後にこの相互作用によるリスクを主な原因として市場撤退した. その後, gemfibrozilがcerivastatinの薬物動態に影響を及ぼすことが発表され<sup>7)</sup>, その機序に関する研究が行われた. Prueksaritanontらはヒト肝ミクロソームを用いた実験でatorvastatin及びsimvastatinの酸化はgemfibrozilにより軽微に抑制されるが, cerivastatinのM1及びM2代謝物への酸化は中等度に抑制されること, 一方, atorvastatin及びsimvastatinのグルクロン酸抱合化は

gemfibrozilにより軽度に抑制されるが, cerivastatinのグルクロン酸抱合化は中等度に抑制されることを示した<sup>8)</sup>. このように, gemfibrozilはcerivastatinの代謝をより強く抑制することから, これがcerivastatinの血中濃度の増加を引き起こし, 副作用発現頻度の増加の原因の一つであると推定された.

一方, Shitaraらは肝におけるcerivastatinの代謝にはCYP2C8の方が重要であり, 相互作用の機序として, gemfibrozil及びその代謝物(グルクロン酸抱合体)がCYP2C8を強く阻害するとともに, cerivastatinの肝への取り込みに関与するOATP-Cも阻害することを示した<sup>9)</sup>. CYP2C8により代謝を受けないpravastatin<sup>10)</sup>やrosuvastatin<sup>11)</sup>のAUCもgemfibrozilとの併用で2倍程度増加することから, gemfibrozilあるいはそのグルクロン酸抱合体によるOATP-C阻害の重要性が示唆されたと考えられる.

以上の様に, 2つの研究で異なる機序が示されたが, 少なくともcerivastatinは他のstatinよりも代謝面でgemfibrozilの影響を受け易く, 結果として血中濃度がより顕著に増加したものと考えられる.

### 3. 米国におけるstatinによる横紋筋融解症の発症解析

Statinによる横紋筋融解症の発症解析研究は数多く行われ, それらの結果からcerivastatinの単独服用で横紋筋融解症のリスクが明らかに高く, さらにfibrate, 特にgemfibrozilとの併用でリスクがさらに増加することが明らかとなった. 以下にそのいくつかを紹介する.

Thompsonらは, 1990年1月から2002年3月までのstatinによる横紋筋融解症の症例報告3,339件中, cerivastatinによるものが1,899件(57%)を占めていること<sup>12)</sup>, また, Staffaらは同時期の処方基準とすると, 全statin約4億7千4百万処方中cerivastatinの処方が約

Table.1 Reported Cases of Fatal Rhabdomyolysis by Statin, Numbers of Prescriptions, Reporting Rate per Million Prescriptions, and Relative Reporting Rate for Cerivastatin vs Each of the Other Statins \*

	Atorvastatin Calcium	Fluvastatin Sodium	Lovastatin	Pravastatin Sodium	Simvastatin	Subtotal of All Statins†	Cerivastatin Sodium
Date approved	12/17/96	12/31/93	8/31/87	10/31/91	12/23/91		6/26/97
Prescriptions, No	140,360,000	37,392,000	99,197,000	81,364,000	116,145,000	474,458,000	9,815,000
No. of cases	6	0	19	3	14	42	31
Rate per million Prescriptions	0.04	0	0.19	0.04	0.12	0.09	3.16
RRR(95% CI)	74(30-217)	..(≥30)	16(9-31)	86(27-438)	26(14-53)	36(22-58)	

Abbreviations: CI, confidence interval; RRR, relative reporting rate for cerivastatin compared with each of the other statins or all other statins combined. Ellipses indicate that 0 events for fluvastatin means that 1 dividing by 0 results in an undefined number; thus, 30 represents the lower 95% CI.

\* : Includes US cases reported to the Food and Drug Administration before June 26, 2001. Data are from Staffa et al<sup>13)</sup>.

† : Subtotal data do not include cerivastatin.

980万件で僅か2.0%であることを示した<sup>13)</sup>。従って、relative reporting rate (RRR) は他の statin の65倍となる。さらに Staffaらは横紋筋融解症による死亡報告を解析した結果、cerivastatinが他の statin の16-86倍多いことを示した (Table.1 : Psatyら<sup>14)</sup>のTable.3を引用)。また、gemfibrozilとの併用患者を除いた場合でも cerivastatinでの死亡報告は10-50倍であった。

さらに、1997年から2000年までのFDA副作用症例データの解析では、statinの単独服用により発症した全横紋筋融解症のうち35.7%がcerivastatinによるもので、fibrateとの併用の場合は80.6%がcerivastatinとの併用であった (Table.2 : Psatyら<sup>14)</sup>のTable.4を引用)。

一方、米国で11の管理された医療計画による1998年1月1日から2001年6月30日までのコホート研究が行われ、その解析結果が報告された (Table.3 : Grahamら<sup>16)</sup>のTable.1の一部を引用)。脂質低下薬服用者152,460人のうち、24件の入院を要する横紋筋融解症が発生した。10,000人/年当たりの単独服用 (atorvastatin, pravastatin及びsimvastatin) の平均発症率は0.44, cerivastatinで5.34, fibratesで2.82であった。また、atorvastatin, pravastatin及びsimvastatinとfibratesとの併用で5.98に、cerivastatinとfibratesとの併用で1,035に増加した。この結果から、治療年当たり横紋筋融解症を

1件発症するに要する患者数は statin 単独服用で22,727人、cerivastatinとfibratesの併用では9.7-12.7人となる。

#### 4. 米国における cerivastatin の市販後安全対策

Cerivastatinが安全性の問題で訴訟に至った結果、本来公表されない社内資料が公開され、詳細な状況が把握できたため、cerivastatinをモデルとして現在の米国における新医薬品の市販後安全性監視状況の解析・評価が *JAMA (Journal of American Medical Association)* に掲載され、さらにそれに対する反論や編集者の意見も同時に掲載されたので、それらの要点をまとめた。

Psatyらは未公表資料に基づいて、社内での対応状況や時期、並びに規制当局の体制等を次のように解析・評価した<sup>14)</sup>。Cerivastatinは1998年2月に市販されたが、企業はその後100日以内に横紋筋融解症またはクレアチンキナーゼの顕著な増加例を7件把握しており、そのうちの5件はgemfibrozilとの併用で、この時点でcerivastatinとgemfibrozilとの相互作用が強く疑われていた。その後もgemfibrozilとの併用による横紋筋融解症が高率に発症していたが、1999年12月に至って併用禁忌となり、緊急安全情報 (Doctor letter) を出した。しかし、この緊急安全情報はあまり効果がなかったようで、gemfibrozilとの併用は続き、1999年5月から8月ま

Table.2 Cases of Statin-Associated Rhabdomyolysis by Drug Reported to the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (October 1997 to December 2000)\*

	No. (%) of Cases†						
	Atorvastatin Calcium	Fluvastatin Sodium	Lovastatin	Pravastatin Sodium	Simvastatin	Cerivastatin Sodium	Total
<b>Fibrate coprescription</b>							
With	13(5.2)	2(0.8)	2(0.8)	8(3.2)	23(9.3)	200(80.6)	248(100)
Without	73(13.9)	8(1.5)	30(5.7)	62(11.8)	164(31.3)	187(35.7)	524(100)
<b>Total</b>	<b>86(11.1)</b>	<b>10(1.3)</b>	<b>32(4.1)</b>	<b>79(9.1)</b>	<b>187(24.2)</b>	<b>387(50.1)</b>	<b>772(100)</b>

\* : Data are from Fisher et al<sup>15)</sup>.

† : Percentages may not sum to 100 due to rounding.

Table.3 Description of Inception Cohorts for Patients Using Statin and Fibrate Drug Therapy

	Statins						Fibrates	
	Atorvastatin N = 130,865	Cerivastatin N = 12,695	Fluvastatin N = 4,706	Lovastatin N = 1,207	Pravastatin N = 35,713	Simvastatin N = 46,799	Gemfibrozil N = 14,677	Fenofibrate N = 5,808
<b>Person-years, No</b>								
Monotherapy	129,367	7,486	3,292	775	33,149	40,940	8,102	2,529
Co-medication	2,664	89	25	10	543	552	2,512	905
<b>Rhabdomyolysis cases, No</b>								
Monotherapy	7	4	0	0	0	2	3	0
Co-medication	1*	6†	0	0	0	1‡	4††	1*

\* : One patient was included in both the atorvastatin and fenofibrate combination therapy inception cohorts.

† : Three patients were included in both the cerivastatin and gemfibrozil combination therapy inception cohorts.

‡ : One patient was included in both the simvastatin and gemfibrozil combination therapy inception cohorts.



での横紋筋融解症32例中の併用例が20例(63%)に対して、1999年9月から2000年2月が130症例中91例(70%)、2000年3月から7月が55症例中34例(62%)と殆ど減少しなかった。また、cerivastatin単独服用でも横紋筋融解症の発症率が高かった。企業はこれらの情報及び社内研究資料の公表並びに対応を実施する多くの機会を逃した。一方、規制当局の市販後安全性管理は組織としての体制も整っておらず、予算面も不十分で機能しているとはいえない。企業にはリスク・ベネフィットに基づいた安全対策を講じる上で、経済面も含めた利害の対立があり、企業だけの適切な対応は難しい。今後は、独立した評価機構等を作り、添付文書の改訂から市場撤退までの市販後安全性管理の意志決定をすべきであるとしている。

これに対し、企業としては症例報告等の報告事項をしっかり遂行しており、FDAも提出した資料を適切に評価してきたと反論があった<sup>17)</sup>。なお、対策の実施や評価結果の公表に当たって、FDAは症例報告からでは正確な副作用発現率が求められないこと、他剤とのリスクの違いを比較するために、対象とする薬剤を用いて良く管理された2剤比較試験を行わないで結論を出すことは出来ないとしている。したがって、企業の対応は患者の安全性と福祉を考え、責任を持った、適切で一貫したものであったと見解を述べた。

なお、JAMAでの掲載は市販後医薬品の安全性監視活動の将来像を模索するために、cerivastatinをモデルに討議されたものであり、JAMAの編集者も参加して、最終的な結論として独立した市販後安全監視機構等を設立すべきであると勧告している<sup>18~20)</sup>。

## 5. 未公開情報から見えた新事実

Psatyらが紹介した社内資料の中に、1999年7月に得られた臨床試験結果としてcerivastatinを1.6 mg服用することによって、重篤なクレアチンキナーゼの上昇(正常最大値の10倍以上)が12%のヒトに、軽度のクレアチンキナーゼの上昇(正常最大値の3倍以上)が50%のヒトに見られ、さらに0.8 mgを服用した場合に比べて1.6 mgの服用では副作用が指数的に増加したことが述べられている<sup>14)</sup>。1999年8月2日の会議メモでは社内の専門家はこの用量を一般に拡大すべきではないと勧告している。この結果は、cerivastatinについては、狭い用量範囲内で用量依存的に横紋筋融解症を発現する可能性が高いこと、cerivastatinの血中濃度を増加させる様な薬剤相互作用は横紋筋融解症のリスクを明確に上げるであろうことを示唆している。他のstatinでは、臨床的に横紋筋融解症の発現が用量依存的であることを示唆する資料は殆どないが、Smithら<sup>21)</sup>は雌のSDラットにsimvastatin, lovastatin及びpravastatinを投与すると用量依存的に筋

症が発現すること、これらのstatinとcyclosporineとの併用によりこの筋毒性発現が強く増強されることを報告している。また、rosuvastatinでは、臨床試験中に、用量依存的なタンパク尿及び血尿の発生が報告され、また、高用量(80 mg群)で横紋筋融解症の発生が複数報告されたこと<sup>22,23)</sup>から、米国での承認用量は他のstatin類と安全性が変わらない40 mgまでとされている。これらのことから、cerivastatin以外のstatinについても血中濃度と横紋筋融解症に相関性があることが示唆される。なお、rosuvastatinについては、主なCYPによる代謝は受けないとされているが、一方ではアジア系の被験者で血中濃度が他人種の2倍となることが開発中及び市販後の試験で報告され<sup>24,25)</sup>、人種差が考えられている。現時点ではrosuvastatinの日本の承認審査資料等は公開されておらず、詳細は不明であるが、開発企業のwebsiteでは、日本の承認用量を欧米の半量とすること、また、適切な市販後調査を行うことが承認条件とされたとしている<sup>26)</sup>。しかしながら、市販後調査の方法、規模によっては、安全性情報の収集に適切ではない可能性が指摘されていること<sup>27)</sup>、cyclosporineは、本剤を含め、全てのstatinの血中濃度を数倍以上に増加させることが知られており、また、cyclosporineは、移植領域だけでなく、皮膚科領域を含む自己免疫疾患へも効能が拡大されていることから、今後、十分な注意が必要と考えられる。従って、statinを服用するには薬物動態相互作用を示す薬剤との併用<sup>28,29)</sup>や食品<sup>30)</sup>の摂取には充分注意すべきであると考えられる。

## 謝 辞

本稿のTable.1, 2, 3はJournal of American Medical Associationに掲載されたTableの一部をそのまま掲載したもので、本掲載に限り許可する旨の文書を受け取っている。著者らは、American Medical Association事務局の配慮に感謝する。

## 文 献

- 1) FDA talk paper (2001) Bayer voluntarily withdraws Baycol on August 2001.
- 2) Mazzu, A.L., Lasseter, K.C., Shamblen, E.C., Agarwal, V., Lettieri, J. and Sundaresen, P.: *Clin Pharmacol Ther*, **68**, 391-400 (2000)
- 3) Kantola, T., Kivisto, K.T. and Neuvonen, P.J.: *Eur J Clin Pharmacol*, **54**, 851-855 (1999)
- 4) Muck, W.: *Drugs*, **56 Suppl 1**: 15-23; discussion 33 (1998)
- 5) Backman, J.T., Kyrklund, C., Kivisto, K.T., Wang, J.S. and Neuvonen, P.J.: *Clin Pharmacol Ther*, **68**, 122-129 (2000)

- 6) Kyrklund, C., Backman, J.T. and Kivisto, K.T.: *Clin Pharmacol Ther*, **69**, 340-345 (2001)
- 7) Backman, J.T., Kyrklund, C., Neuvonen, M. and Neuvonen, P.J.: *Clin Pharmacol Ther*, **72**, 685-691 (2002)
- 8) Prueksaritanont, T., Zhao, J.J., Ma, B., Roadcap, B.A., Tang, C., Qiu, Y., Liu, L., Lin, J.H., Pearson, P.G. and Baillie, T.A.: *J Pharmacol Exp Ther*, **301**, 1042-1051 (2002)
- 9) Shitara, Y., Hirano, M., Sato, H. and Sugiyama, Y.: *J Pharmacol Exp Ther*, **311**, 228-236 (2004)
- 10) Kyrklund, C., Backman, J.T., Neuvonen, M. and Neuvonen, P.J.: *Clin Pharmacol Ther*, **73**, 538-544 (2003)
- 11) Schneck, D.W., Birmingham, B.K., Zalikowski, J.A., Mitchell, P.D., Wang, Y., Martin, P.D., Lasseter, K.C., Brown, C.D., Windass, A.S., and Raza, A.: *Clin Pharmacol Ther*, **75**, 455-463 (2004)
- 12) Thompson, P.D., Clarkson, P. and Karas, R.H.: *JAMA*, **289**, 1681-1690 (2003)
- 13) Staffa, J.A., Chang, J. and Green, L.: *N Engl J Med*, **346**, 539-540 (2002)
- 14) Psaty, B.M., Furberg, C.D., Ray, W.A. and Weiss, N.S.: *JAMA*, **292**, 2622-2631 (2004)
- 15) Fisher, C., Wolfe, S.M., Sasich, L. and Lurie, P.: Letter to Janet Woodcock, MD, August 20, 2001 from Public Citizen's Health Research Group. Available at: <http://www.citizen.org/publications/release.cfm?ID=7051>. Accessed November 4, 2004.
- 16) Graham, D.J., Staffa, J.A., Shatin, D., Andrade, S.E., Schech, S.D., La Grenade, L., Gurwitz, J.H., Arnold Chan, K., Goodman, M.J. and Platt, R.: *JAMA*, **292**, 2585-2590 (2004)
- 17) Piorkowski, J.D.: *JAMA*, **292**, 2655-2657 (2004)
- 18) Strom, B.L.: *JAMA*, **292**, 2643-2646 (2004)
- 19) Fontanarosa, P.B., Rennie, D. and DeAngelis, C.D.: *JAMA*, **292**, 2647-2650 (2004)
- 20) Psaty, B.M., Furberg, C.D., Ray, W.A. and Weiss, N.S.: *JAMA*, **292**, 2659 (2004)
- 21) Smith, P.F., Eydeloth, R.S., Grossman, S.J., Stubbs, R.J., Schwartz, M.S., Germershausen, J.I., Vyas, K.P., Kari, P.H. and MacDonald, J.S.: *J Pharmacol Exp Ther*, **257**, 1225-1235 (1991)
- 22) Davidson, M.H.: *Expert Opin Drug Saf*, **3**, 547-557 (2004)
- 23) Wolfe, S.M.: *Lancet*, **363**, 2189-2190 (2004)
- 24) Wooltorton, E.: *CMAJ*, **171**, 129 (2004)
- 25) FDA Public Health Advisory on Crestor (rosuvastatin), from FDA. Available at: [http://www.fda.gov/cder/drug/advisory/crestor\\_3\\_2005.htm](http://www.fda.gov/cder/drug/advisory/crestor_3_2005.htm)
- 26) Council recommends approval of Crestor in Japan., from Astrazeneca. Available at: <http://www.astrazeneca.com/pressrelease/4325.aspx>
- 27) Meyboom, R.H. and Edwards, I.R.: *Lancet*, **364**, 1997-1999 (2004)
- 28) Saito, M., Hirata-Koizumi, M., Miyake, S. and Hasegawa, R.: *Eur J Clin Pharmacol*, **61**, 531-536 (2005)
- 29) Saito, M., Hirata-Koizumi, M., Urano, T., Miyake, S. and Hasegawa, R.: *J Clin Pharm Ther*, **30**, 21-37 (2005)
- 30) Saito, M., Hirata-Koizumi, M., Matsumoto, M., Urano, T. and Hasegawa, R.: *Drug Saf*, **28**, 677-694 (2005)

# 有害事象に関する薬物動態相互作用

Pharmacokinetic interaction involved in drug adverse events

長谷川 隆一 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部長

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 Tel: 03-3700-9528 Fax: 03-3700-9788 E-mail: hasegawa@nihs.go.jp

## 1 はじめに

医薬品は疾病の治療に有用である一方で、有害影響すなわち副作用を引き起こす性質を有する。副作用は期待される薬理効果の延長線上の場合もあるが、期待されない毒性が発現する場合もある。通常、薬物はその有効血中濃度の範囲内で適切に薬効を発現し、有効血中濃度を超えると生体にとって不具合が生じることになる。その原因の一つとして、肝障害や腎障害などの疾病、あるいは個人差の原因と考えられている特定の遺伝子の一塩基置換などの生体側の原因で薬物代謝や輸送、排泄が低下し、その結果、薬物の血中濃度が異常に増加する場合がある。一方、同時に投与された他の薬物によって薬物代謝、輸送あるいは排泄が阻害され、同様に薬物の異常な血中濃度の増加が生じることもある。本稿では、後者の薬物動態相互作用により有害事象が生じたいくつかの事例およびその機構について紹介する。

## 2 日本における薬物動態相互作用による死亡例

1993年に日本で起こったソリブジン事件は、薬物動態相互作用による有害事象の最大のものである。带状疱疹の治療薬として開発されたソリブジンは、市販後40日以内に15人の死亡者を出し、いずれも抗がん剤の5-フルオロウラシル(5-FU)との併用投与によるものであった。その後、渡部らの詳細な研究により、その原因が薬物動態相互作用によるものであることが明らかとされている<sup>1)</sup>。ソリブジンと5-FUの併用による死亡はラットでも生じ、それが5-FUの高用量投与による中毒死と酷似し、また5-FUの血中濃度が5倍以上に増加したため、

この5-FUの血中濃度増加が死亡の原因であると結論づけられた。ソリブジンは腸内細菌によって一部が分解されて(B)-5-(2-プロモビニル)ウラシル(BVU)となり、これは吸収されたのち肝でジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼ(DPD)によりさらに代謝されるが、その代謝産物がDPDに結合することにより不可逆的にDPDを失活させる(mechanism-based inhibition)。DPDは5-FUを分解する律速酵素であることから、BVUによるDPDの不可逆的阻害が5-FUの血中濃度増加の原因であると考えられた。当初から、この薬物動態相互作用の発現機構を解明することは容易ではないと考えられるが、ラットでの併用投与で死亡の生じることが市販以前に明らかとなっており、注意深い対応の欠如が悔やまれる。

## 3 米国における主に薬物動態相互作用が関与した有害事象に基づく市場撤退例

1990年後半、米国では薬物による心毒性が大きな問題となった。心毒性とは心室頻拍、心室細動、トルサドポアンテおよびQT延長を含む重篤な不整脈、心停止および突然死である。鎮静作用のない長時間作用型ヒスタミンH1受容体拮抗薬であるテルフェナジンおよびアステミゾールは、アゾール系抗菌剤やマクロライド系抗生物質との併用、またはグレープフルーツジュース摂取により、QT延長の生じることが臨床研究で観察された。また、心毒性のリスクがCYP3A4阻害剤との併用で増加することが疫学調査で示された。消化管運動賦活調整剤シナプリドについても同様の心毒性を引き起こすことが分かっており、1993年以来FDAに対して心室性不整脈が340症例、またそのうち80例の死亡が報告されている。これら3種の薬剤はいずれもCYP3A4で代

謝されることから、CYP3A4 阻害剤との併用投与で心毒性発現率が増加すると考えられている。シサプリドの添付文書では、併用禁忌としてイトラコナゾール、フルコナゾール、ミコナゾール、エリスロマイシン、クラリスロマイシンが挙げられている。しかしながら、CYP3A4 で代謝される薬剤は非常に広範で、併用禁忌の警告を発しても心毒性リスクの低下が見られなかったことから、1998 年から 2000 年にかけて、3 薬剤ともに市場撤退となった。一方、カルシウム拮抗薬であるミベフラジールは、逆に強い CYP3A4 阻害剤であるため、併用投与した CYP3A4 で代謝される薬剤の血中濃度を上昇させ、併用薬の毒性が強く発現する状況にあることが判明した。そこで、ミベフラジールも 1998 年に市場撤退となった。これら 4 種の薬剤は、有害事象が CYP3A4 を介した薬物代謝相互作用による血中濃度の増加が原因で引き起こされる例である。日本ではミベフラジールは市販されていないが、他の 3 剤は同時期に市場撤退となった。

スタチン系薬剤のセラバスタチンは、米国での市販後直ぐにゲムフィプロジルとの併用投与で横紋筋融解症による死亡が起こり、併用禁忌の警告が発せられたにも関わらず、その効果が見られなかったことから、市場撤退となった。他のスタチン系薬剤については次の項で詳しく述べるが、セラバスタチンは他のスタチンに比べて横紋筋融解症を引き起こしやすい特性に加えて、市場撤退後に明らかとなった複雑なゲムフィプロジルとの相互作用がある。Shitara らの研究<sup>2)</sup>によれば、セラバスタチンは CYP3A4 と CYP2C8 の 2 種の酵素により代謝されるが、肝におけるセラバスタチンの代謝には CYP2C8 の方が重要で、相互作用の機序としては、ゲムフィプロジル及びそのグルクロン酸抱合体が CYP2C8 を強く阻害するとともに、セラバスタチンの肝への取り込みに関与する OATP-C も阻害する。臨床研究ではセラバスタチンの血中濃度は、ゲムフィプロジルとの併用で約 5 倍に増加することが報告されており、この増加が横紋筋融解症発症の原因と考えられた。日本でゲムフィプロジルは市販されていないが、セラバスタチンは同時期に市場撤退となった。

#### 4 市販スタチン系薬剤の薬物動態相互作用と横紋筋融解症

スタチンは高脂血症の治療薬として広く使用されているが、時として横紋筋融解症を引き起こし、死に至る例がある。横紋筋融解症はスタチン単独でも起こるが、併用時に多く起こることが報告され、他剤との併用による血中濃度増加がその一因と考えられる。スタチン系薬剤は、国内外で様々な成分が使用されているが、代謝の面からは、主に CYP3A4 により代謝をうけるもの（アトルバスタチン、シンバスタチン及びロバスタチン）、主に CYP2C9 により代謝されるもの（フルバスタチン）、薬物代謝を受けにくいもの（プラバスタチン、ピタバスタチン及びロスバスタチン）がある。スタチンと他剤との薬物動態学的相互作用に関する臨床研究では、AUC の変化率は最大で約 30 倍と極めて影響の大きい場合があった（表 1）<sup>3)</sup>。

Medline でスタチンと他剤との併用によって横紋筋融解症が発症したとする症例報告を表 2 にまとめた。その結果、シンバスタチンが最も多く、セラバスタチンに次いでアトルバスタチン、ロバスタチンの順で、他はそれぞれ 1 症例のみであった。併用薬としては表 1 にリストされた薬剤が多く、臨床薬物動態試験の結果と相関しているように考えられ、多くの場合、スタチンの血中濃度増加が原因と推定される。なお、フェノフィブラートとの併用の場合は、スタチンの血中濃度は増加しないことが知られていることから、薬物動態相互作用の結果ではないと考えられる。

Medline 検索では日本からの症例が 1 件（プラバスタチンとミアンセリン）だけであったため、医学中央雑誌で検索したところ、12 件の日本語による症例報告（表 3）があったが、必ずしも表 1 の相互作用の強さを反映しているとは判断できなかった。しかし、米国の副作用報告におけるスタチンによる横紋筋融解症例報告数<sup>4)</sup>と日本での同時期の同症例報告数（医薬品医療機器情報提供ホームページより）を、総人口ベースで概略値を算出比較すると、大きな違いがなかったこと（表 4）から、日本においても表 1 の併用薬との相互作用強度に依存した横紋筋融解症が発症している可能性があると考えられる。

表1 スタチンのCYP代謝酵素と併用薬による臨床AUCへの影響

スタチン名	代謝 CYP 種	アゾール マクロライド	AIDS 治療薬	GFJ	シクロス ポリン	ゲムフィ プロジル
アトルバスタチン	CYP3A4	1.3-4 倍	1.8-4.5 倍	1.4-3.3 倍	8.7 倍	-
シンバスタチン	CYP3A4	6-20 倍	6-32 倍	3.3-16 倍	3-8 倍	1.4-2.9 倍
ロバスタチン	CYP3A4	15-20 倍	-	5-15 倍	20 倍	2.8 倍
フルバスタチン	CYP2C9	影響なし	影響なし	-	3.1-3.5 倍	影響なし
プラバスタチン	なし	1-2 倍	0.5-1 倍	影響なし	5-12 倍	2 倍
ピタバスタチン	なし	-	-	1.2 倍	4.5 倍	1.4 倍
ロスバスタチン	なし	0.8-1.4 倍	-	-	7.1 倍	1.9 倍

アゾール：イトラコナゾール、マクロライド：クラリスロマイシン、エリスロマイシン

AIDS 治療薬：リトナビル、サキナビル、ネルフィナビル、インジナビル

GFJ：グレープフルーツジュース、-：臨床試験情報なし

表2 スタチンと他剤併用による横紋筋融解症例報告 (PubMed：1999-2005)

スタチン	症例報告数(2例以上の数)
アトルバスタチン [9例]	シクロスポリン(2)、クラリスロマイシン&ロピナビル/リトナビル、デラビルジン、ジルチアゼム、クラリスロマイシン&エソメプラゾール、フルコナゾール、フシジン酸、ゲムフィプロジル
シンバスタチン [46例]	アドナゾール、アミオダロン(2)、アモキシシリン、クロルゾキサゾン、クラリスロマイシン(4)、コルヒチン、シクロスポリン(4)、シクロスポリン&クラリスロマイシン、シクロスポリン&イトラコナゾール、シクロスポリン&ジルチアゼム、シクロスポリン&ミベフラジル、シクロスポリン&ベラパミル、シクロスポリン&ゲムフィプロジル&イトラコナゾール、ダナゾール、ジゴキシン&ベラパミル、ジルチアゼム(2)、フェノフィブラート、フルコナゾール(2)、フシジン酸、ゲムフィプロジル(4)、イトラコナゾール、ケトコナゾール(2)、ネファゾドン(4)、ネルフィナビル、リスベリドン、リトナビル、ロキシスロマイシン&ゲムフィプロジル、シルデナフィル、タクロリムス&フシジル酸、ワルファリン、グレープフルーツジュース
ロバスタチン [5例]	シクロスポリン&ニコチン酸、ゲムフィプロジル、ゲムフィプロジル&クラリスロマイシン、ナイアシン、ニコチン酸
フルバスタチン	コルヒチン
プラバスタチン	ミアンセリン
ピタバスタチン	なし
ロスバスタチン	フェノフィブラート
セリバスタチン [25例]	ベザフィブラート、クラリスロマイシン、シクロスポリン(2)、ゲムフィプロジル(19)、リスベリドン(2)

薬物動態学的相互作用は、肝臓における一部のスタチンのCYP3A4等による代謝抑制、並びに全てのスタチンに共通した肝への取り込みに関与するOATP-Cのシクロスポリンによる抑制であると考えられる。一方、グレープフルーツジュースは上述したDPDの場合と同様に、mechanism-based inhibitionの機構で小腸のCYP3A4を

不可逆的に失活させることが知られているが、症例報告としてはシンバスタチンの場合の1例だけであった。

表3 スタチンと他剤併用による横紋筋融解症例報告（邦文誌：1995-2005）

スタチン	症例報告数(2例以上の数)
アトルバスタチン [2例]	ニフェジピン、フェノフィブラート
シンバスタチン [5例]	ベザフィブラート(2)、クロフィブラート、ネルフィナビル、クラリスロマイシン
フルバスタチン	なし
プラバスタチン [4例]	アルファカルシドール、ジルチアゼム&ザルトプロフェン、ベザフィブラート、クラリスロマイシン
ピタバスタチン	なし
ロスバスタチン	なし
セリバスタチン [1例]	アルファカルシドール&エストリオール

表4 米国および日本における人口1000万/年当たりの横紋筋融解症の症例報告数概算値

	米国		日本			
	期間 I	期間 II	1999年	2000年	2001年	2002年
アトルバスタチン	1.17	1.29	—	0.95	3.46	1.33
シンバスタチン	3.47	1.91	1.42	1.18	1.96	0.16
ロバスタチン	0.66	0.47	—	—	—	—
フルバスタチン	0.19	0.16	0.39	0.39	1.02	1.26
プラバスタチン	1.17	0.74	1.34	1.89	1.81	2.43
セリバスタチン	3.08	6.04	1.18	3.86	3.30	—
合計	9.74	10.61	4.34	8.27	11.55	5.18

米国の期間 I は 1997 年 11 月から 2000 年 3 月、期間 II は 1990 年 1 月から 2002 年 3 月  
 数値は米国および日本の対応する年の総人口に基づく計算値  
 セリバスタチンは日米共に 2001 年に市場撤退

## 5 カルシウム拮抗剤と他剤との相互作用

降圧剤、狭心症治療薬等として用いられるカルシウム拮抗剤は、主に CYP3A4 により代謝を受け、また、薬物トランスポータの P 糖タンパクの基質となる。特に、ジヒドロピリジン系のカルシウム拮抗剤は、生体内半減期や組織分布の違いにより、多種類の成分が開発され、使い分けられている。日本で市販されているカルシウム拮抗剤は 16 種あるが、そのうち 7 種は米国および EU でも市販されている。表 5 には代表的な CYP3A4 阻害剤 3 種（エリスロマイシン、イトラコナゾール、シメチジン）およびグレープフルーツジュースとの薬物動態相互作用についての臨床研究の結果を示す<sup>5)</sup>。特徴としては、同じカルシウム拮抗剤でも、殆ど CYP3A4 阻害剤による影響を受けないアムロジピンやベラパミルカ

ら、明確に AUC の増加するフェロジピンやニフェジピンのように、影響の程度にはかなりの差があった。カルシウム拮抗剤の相互作用に起因する有害事象としては、主に紅潮、立ちくらみや起立性低血圧等の過度の降圧によるものが知られているが、臨床研究下でのこれらの副作用はフェロジピンとエリスロマイシン、イトラコナゾールまたはグレープフルーツジュース、ニフェジピンとイトラコナゾールまたはシメチジンの組合せで認められていることから、AUC の 1.5 倍付近が副作用発現の閾値のようである。しかし、血中濃度の増加による過度の低血圧は直接的な薬理作用のため一過性であることから、実際には有害事象として報告されることは少ないと考えられる。

表5 CYP3A4阻害剤による主要カルシウム拮抗剤のAUCへの影響

	エリスロマイシン	イトラコナゾール	シメチジン	グレープフルーツジュース
アムロジピン	—	—	影響なし	1.2倍
フェロジピン	2.5倍	6.3倍	1.6倍	1.7-2.9倍
ニカルジピン	—	—	—	1.6倍
ニフェジピン	—	4.4倍 (トラフ値)	1.8倍	2.0倍
ニソルジピン	—	—	1.3倍	2.0-4.1倍
ベラパミル	—	—	1-1.4倍	1-1.5倍
ジルチアゼム	—	—	1.5倍	1-1.2倍

—：臨床試験情報なし

## 6 果物ジュースと薬剤との相互作用

グレープフルーツジュースと薬物との相互作用の一部についてはすでに上述したが、他の果物ジュースを含め、それ以外の薬剤の血中濃度 (AUC/Cmax) への顕著な影響が報告されている例を表6に示す<sup>6)</sup>。特にテルフェナジンとシサプリドについては、グレープフルーツジュース摂取により心毒性リスクの増加することが予想される。一方、全く逆にフェキソフェナジンおよびセリプロロールについてはグレープフルーツジュースのみならずオレンジジュースやリンゴジュースにより著しいAUC/Cmaxの減少が認められている。これは薬剤の有効性が殆ど期待できないことを意味している。これら

表6 果物ジュース摂取による薬剤のAUC/Cmaxへの影響

薬物名	AUC	Cmax
<u>グレープフルーツジュース</u>		
ブスピロン	9.2倍	4.2倍
ミダゾラム	6.0倍	2.7倍
テルフェナジン	2.5倍	3.4倍
シサプリド	2.6倍	1.8倍
フェキソフェナジン	0.33倍	0.38倍
セリプロロール	0.15倍	0.05倍
<u>オレンジジュース</u>		
フェキソフェナジン	0.31倍	0.33倍
セリプロロール	0.07倍	0.11倍
<u>リンゴジュース</u>		
フェキソフェナジン	0.27倍	0.28倍

の組合せによる有害事象の発生についての症例報告はないが、特に我が国のグレープフルーツジュースの現在の消費量は1980年の10倍以上に増加していることから、注意深い対応が必要であると考えられる。果物ジュースの作用機構は、腸管のCYP3A4阻害による血中濃度の上昇だけでなく、同じく腸管のOATPの阻害による血中濃度低下など、様々な作用点が存在するためである(図1)。その他にもセイヨウオトギリソウは薬物代謝酵素を強く誘導することが知られており、食品と薬剤との相互作用による有害事象発現にも幅広く注意する必要があると考えられる。

## 7 終わりに

薬剤服用による有害事象の発現の多くが併用薬との相互作用によるものであることが明らかとなり、実際に米国での救急患者の約半数は薬剤の相互作用によるものであるといわれている。また、この有害事象発現の原因のひとつとして、薬物動態相互作用による薬物血中濃度の異常な増加であることが、臨床研究で裏付けられた。ただ、臨床現場では重篤な有害事象が発現した際には緊急対応処置が優先されなければならないため、被疑薬の血中濃度が測定された報告はなく、直接的に関連性が証明されたことはない。しかし、臨床研究で得られた相互作用の強度、すなわち血中濃度の増加の程度は有害事象の発現頻度と強い関連性があると考えられる。一方、薬物動態相互作用に関する臨床研究結果が日本の添付文書にどの程度反映されているかを調査したところ、定量的な

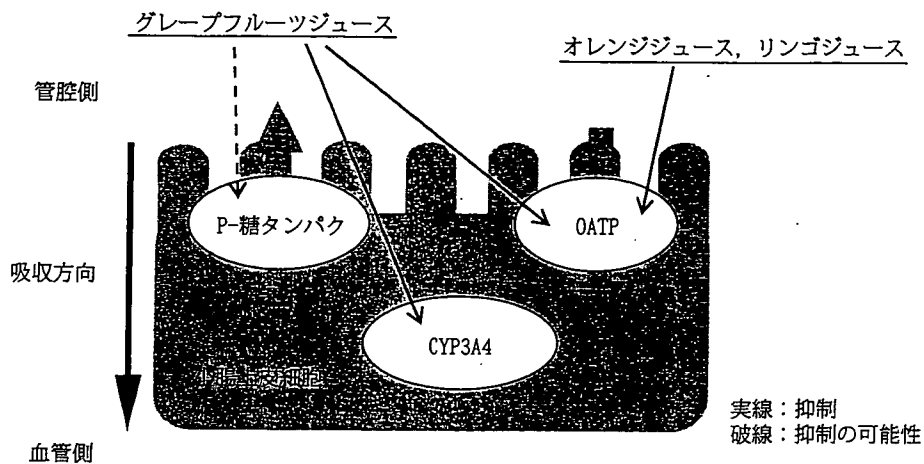


図1 小腸における果物ジュースと薬物の相互作用の推定作用点

数値は殆ど記載されておらず、作用機序についても承認後の最新情報が反映されていなかった<sup>3,5)</sup>。そこで、薬物動態相互作用による有害事象の発現を出来る限り回避のためには、医薬品の添付文書に併用薬や食品によってAUC/Cmaxがどの程度影響を受けるかなどの定量的な情報を記載することが必要で、それが臨床現場への注意喚起や併用薬の選択の際の活用になると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 渡部 烈, 小倉健一郎, 西山貞仁: ソリブジン薬害発生の分子毒性学的メカニズムとジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼの遺伝的欠損。薬学雑誌, 122, 527-535 (2002)
- 2) 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, 311, 228-236 (2004)
- 3) Saito M, Hirata-Koizumi M, Urano T, Miyake S, Hasegawa R: A literature search on pharmacokinetic drug interactions of statins and analysis of how this is reflected in package inserts of Japan. J Clin Pharm Ther, 30, 21-37 (2005)
- 4) Thompson PD, Clarkson P, Karas RH: Statin-associated myopathy. JAMA, 289, 1681-1690 (2003)
- 5) Saito M, Hirata-Koizumi M, Miyake S, Hasegawa R: Comparison of information on the pharmacokinetic interactions of Ca antagonists in the package inserts from three countries (Japan, USA and UK). Eur J Clin Pharmacol, 61, 531-536 (2005)
- 6) Saito M, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Urano T, Hasegawa R: Undesirable effects of citrus juice on pharmacokinetics of drugs - Focus on recent studies. Drug Saf, 28, 677-694 (2005)



# Is the Monkey an Appropriate Animal Model to Examine Drug-Drug Interactions Involving Renal Clearance? Effect of Probenecid on the Renal Elimination of H<sub>2</sub> Receptor Antagonists

Harunobu Tahara, Hiroyuki Kusuhara, Michihiro Chida, Eiichi Fuse, and Yuichi Sugiyama

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan (H.T., H.K., Y.S.); and Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Drug Development Research Laboratories Pharmaceutical Research Institute, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka, Japan (H.T., M.C., E.F.)

Received August 9, 2005; accepted November 14, 2005

## ABSTRACT

The renal drug-drug interaction between famotidine (an H<sub>2</sub> receptor antagonist) and probenecid has not been reproduced in rats. We have proposed that this is caused by a species difference in the transport activity by human/rat organic anion transporter (OAT) 3 and the expression of organic cation transporter (OCT) 1 in the rodent kidney. Since monkey OATs (mkOATs) exhibit similar transport activities to human orthologs, it is hypothesized that *in vivo* studies in monkeys will allow a more precise prediction of renal drug-drug interactions in humans. Famotidine and cimetidine were efficiently taken up by mkOAT3-expressing human embryonic kidney cells ( $K_m$ , 154 and 71  $\mu$ M, respectively), and their uptake was strongly inhibited by probenecid ( $K_i$ , 3.0–5.7  $\mu$ M). Quantification of mkOAT1 and mkOAT2 mRNAs in the monkey kidney using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction re-

vealed their predominant expression in the liver and kidney, respectively. Crossover studies were conducted in cynomolgus monkeys. Famotidine was given by *i.v.* administration, with or without probenecid. Probenecid treatment caused a 65% reduction in the renal clearance ( $0.426 \pm 0.079$  versus  $0.165 \pm 0.027$  l/h/kg) and a 90% reduction in the tubular secretion clearance ( $0.275 \pm 0.075$  versus  $0.0230 \pm 0.0217$  l/h/kg), whereas it had no effect on the renal clearance of cimetidine. In contrast to the species-dependent effect of probenecid, allometric scaling using animal data (rat, dog, and monkey) successfully predicted the renal and tubular secretion clearance of famotidine in humans. These results suggest that monkeys are more appropriate animal species for predicting the renal drug-drug interactions in humans.

The kidney plays an important role in the detoxification of xenobiotics and endogenous waste as well as maintaining the balance of ions and nutrients in the body. Urinary excretion is the major detoxification mechanism of the kidney, and this is governed by glomerular filtration, tubular secretion across the proximal tubules, and reabsorption. Transporters play important roles in the tubular secretion of drugs. Many studies have described the role of multispecific organic anion and cation transporters [organic anion transporter (OAT)/*SLC22* and organic cation transporter (OCT)/*SLC22*] in the renal uptake of drugs (Lee and Kim, 2004; Wright and Dantzer,

2004; Shitara et al., 2005). Both Oct1 (*Slc22a1*) and Oct2 (*Slc22a2*) are involved in the renal uptake of organic cations on the basolateral membrane of the proximal tubules in rodents, whereas OCT2 plays a predominant role in human kidney (Lee and Kim, 2004; Wright and Dantzer, 2004). As renal organic anion transporters, two isoforms (*Oat1/Slc22a6* and *Oat3/Slc22a8*) in rodents and three isoforms (OAT1, OAT2/*SLC22A7* and OAT3) in humans, have been identified on the basolateral membrane of the proximal tubules (Lee and Kim, 2004; Miyazaki et al., 2004; Wright and Dantzer, 2004).

Probenecid, an antipodagric drug, is a well known inhibitor of organic anion transporters. Drug interactions with probenecid have been reported involving renal excretion in humans resulting in a prolongation of the plasma elimination half-life (Cunningham et al., 1981). For famotidine, an H<sub>2</sub> receptor antagonist, its effect has been reported to be

This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare for the Research on Advanced Medical Technology and on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.  
doi:10.1124/jpet.105.094052.

**ABBREVIATIONS:** OAT, organic anion transporter; OCT, organic cation transporter; h/mk/rOAT, human/monkey/rat OAT; h/mk/rOCT, human/monkey/rat OCT; HEK, human embryonic kidney; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; CMD, cimetidine; FMD, famotidine.

species-dependent. The renal secretion clearance of famotidine in humans was significantly reduced by oral coadministration of probenecid (Inotsume et al., 1990), whereas this interaction has not been reproduced in rats, although the plasma concentration of probenecid achieved a similar level to that in clinical studies (Lin et al., 1988). In contrast to famotidine, the renal secretion clearance of cimetidine, another  $H_2$  receptor antagonist, in both humans and rats was only slightly (ca. 20%) reduced by coadministration with probenecid (Lin et al., 1988; Gisclon et al., 1989). These results suggest that the contribution of transporters involved in the tubular secretion of famotidine is different between rodents and humans, and the organic anion transporter plays a more important role in humans. We found that the transport activity of famotidine by hOAT3 is greater than that by rOat3 and that the unbound plasma concentration of probenecid is sufficiently higher than its  $K_i$  values for rat and human OAT3 (Tahara et al., 2005a). Therefore, we hypothesized that this increases contribution of OAT3, a probenecid-inhibiting fraction, to the renal uptake of famotidine in humans together with the fact that hOCT1 is not present in the kidney.

To predict the possibility of drug-drug interactions in humans, such species differences have to be overcome. The monkey has been used in pharmacological, toxicological, and pharmacokinetic studies by many pharmaceutical companies, and it is recognized as a suitable animal model for the validation of in vitro scaling methods since it is the second nearest species to humans in the evolutionary tree. Ward and Smith (2004a,b) have reported that the monkey provides the most qualitatively and quantitatively accurate predictions of human pharmacokinetics by retrospectively analyzing the pharmacokinetic parameters of 103 nonpeptide xenobiotics in monkeys and humans. In addition, we have demonstrated that there is a good correlation of the transport activities with respect to that of reference compounds between mk- and hOAT3, whereas the correlation was poor between rat and human OAT3 (Tahara et al., 2005b). According to our mRNA quantification, mkOCT1 and mkOCT2 are predominantly expressed in the liver and kidney, respectively. Therefore, we consider that monkeys will be a better animal model for predicting drug-drug interactions involving multiple transporters.

In the present study, we examined the effect of probenecid on the pharmacokinetics of famotidine and cimetidine in cynomolgus monkeys to investigate whether the drug-drug interaction between probenecid and famotidine can be reproduced in monkeys. In addition, the uptake of  $H_2$  receptor antagonists (cimetidine, famotidine, and ranitidine) by HEK293 cells expressing mkOAT1 and mkOAT3 and the inhibitory effect of probenecid on the uptake of the  $H_2$  receptor antagonists were also examined.

## Materials and Methods

**Materials.** Famotidine and probenecid were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), and cimetidine and ranitidine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade and commercially available.

**Cells and Reagents for in Vitro Studies.** In vitro experiments were carried out using HEK293 cells stably transfected to express functional mkOAT1 or mkOAT3 and corresponding control cells transfected with the pcDNA3.2 expression vector. Generation of both

cell lines and their characterization are described elsewhere (Tahara et al., 2005b). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 400  $\mu$ g/ml G418 (Invitrogen) at 37°C with 5%  $CO_2$  and 95% humidity on the bottom of a dish. mkOAT1- and mkOAT3-expressing cells were seeded in polylysine-coated 12-well plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) at a density of  $1.2 \times 10^5$  cells/well. Cell culture medium was replaced with culture medium supplemented with 5 mM sodium-butyrate 24 h before transport studies to induce the expression of those proteins.

**Transport Assay.** Transport studies were carried out as described previously (Tahara et al., 2005a). Uptake was initiated by adding medium containing 10  $\mu$ M of compounds, in the presence or absence of inhibitor, after cells had been washed twice and preincubated with Krebs-Henseleit buffer at 37°C for 15 min. The Krebs-Henseleit buffer consists of 118 mM NaCl, 23.8 mM  $NaHCO_3$ , 4.83 mM KCl, 0.96 mM  $KH_2PO_4$ , 1.20 mM  $MgSO_4$ , 12.5 mM HEPES, 5 mM glucose, and 1.53 mM  $CaCl_2$  adjusted to pH 7.4. The uptake was terminated at designed times by adding ice-cold Krebs-Henseleit buffer after removal of the incubation buffer. Then, cells were washed twice with 1 ml of ice-cold Krebs-Henseleit buffer. For the determination of the uptake of cimetidine, ranitidine, and famotidine, cells were dissolved in 300  $\mu$ l of 0.2 N NaOH and kept overnight. Aliquots (150  $\mu$ l) were transferred to vials after adding 30  $\mu$ l of 1 N HCl. Aliquots (100  $\mu$ l) were used for LC-MS quantification as described below. The remaining 10  $\mu$ l of the aliquots of cell lysate was used to determine the protein concentration by the method of Lowry with bovine serum albumin as a standard. Ligand uptake was given as the cell/medium concentration ratio determined as the amount of ligand associated with cells divided by the medium concentration.

**Kinetic Analyses of the Transport Study.** Kinetic parameters were obtained using the Michaelis-Menten equation:

$$v = V_{max} \times S / (K_m + S) \quad (1)$$

where  $v$  is the uptake rate of the substrate (picomoles per minute per milligram of protein),  $S$  is the substrate concentration in the medium (micromolar),  $K_m$  is the Michaelis-Menten constant (micromolar), and  $V_{max}$  is the maximum uptake rate (picomoles per minute per milligram of protein). To obtain the kinetic parameters, the equation was fitted to the uptake velocity using a MULTI program (Yamaoka et al., 1981). The input data were weighted as the reciprocals of the observed values, and the Damping Gauss Newton Method algorithm was used for fitting. Inhibition constants ( $K_i$ ) of several compounds were calculated assuming competitive inhibition using the following equation since the substrate concentration was sufficiently low compared with the  $K_m$  values.

$$CL_{+inh} = CL / (1 + I/K_i) \quad (2)$$

where  $CL$  represents the uptake clearance, and the subscript (+inh) represents the value in the presence of inhibitor.  $I$  represents the concentration of inhibitor (micromolar). Fitting was performed by an iterative nonlinear least-square method using a MULTI program, and the Damping Gauss Newton Method algorithm was used for fitting (Yamaoka et al., 1981).

**Real-Time RT-PCR Analysis.** Male cynomolgus monkey liver and kidney was purchased from BOZO Research (Shizuoka, Japan). Total RNA was extracted using the extraction solution of ISOGEN (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol. The total RNA was reverse-transcribed using SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen) with an oligo(dT)<sub>12-18</sub> as primer. Fifty nanograms of the RT reaction mixture was taken for a real-time PCR (SYBR, Green I chemistry) (94°C for 5 min, 94°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 30 s, for 45 cycles; Applied Biosystems ABI PRISM 7700 Sequence Detector system; Applied

Biosystems, Foster City, CA) using Ex Taq polymerase (Takara Bio, Kyoto, Japan) with specific primers based on human OCTs (hOCT1 sense primer, 5'-TAAAGATAATGGACCACATCGC-3'; antisense primer, 5'-TATGATGTTTAAACAGTGCAGG-3', accession no. NM\_003057-809; hOCT2 sense primer, 5'-AGTTGCCTATACAGTTGGGCTC-3'; antisense primer, 5'-CAGGGCAGAGTAGAAGAAATCC-3', accession no. NM\_003058-77; hOCT3 sense primer, 5'-GACCAAGGATTTGAGAAAGTTG-3'; antisense primer, 5'-AGGGAATCTGTGGCTCTAGG-3', accession no. NM\_021977-172). All values are expressed as relative luminescence units per 50 ng of total RNA normalized with that of  $\beta$ -actin.

**In Vivo Study in Monkeys.** Four male cynomolgus monkeys were obtained from Siconbrec Inc. (Manila, Philippines). The mean body weight of the monkeys was 5.7 kg, ranging from 4.7 to 6.5 kg. The four cynomolgus monkeys received a single i.v. dose of famotidine and cimetidine, at a dose of 0.3 and 4 mg/kg, after an oral dose of 10 ml of vehicle as a control phase. Thereafter, a study with a randomized crossover design was conducted at intervals of 1 month. The monkeys received the same amount of famotidine, cimetidine, and 22.5 mg/kg probenecid, that is, 15 mg/kg probenecid 2 h before and 7.5 mg/kg simultaneously with an i.v. dose of famotidine and cimetidine. The study protocol for the animal experiment was approved by Animal Care Committee of Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd (Shizuoka, Japan).

**Sample Collection.** Blood samples (0.5 ml each) for the determination of famotidine and cimetidine were taken with heparinized syringe at 5, 10, and 15 min and 0.5, 1, 2, 4, and 8 h after the administration of famotidine and cimetidine. Urine samples were collected from 0 to 4, 4 to 8, and 8 to 24 h after dosing. Plasma was separated immediately and kept at  $-40^{\circ}\text{C}$  until analysis. A part of the urine sample was stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  until analysis. The remaining urine samples were discarded after the urine volume had been recorded.

**Determination of Protein Binding in Plasma.** Plasma (150  $\mu\text{l}$ ) obtained at 30 min during the i.v. administration was directly applied to an MPS micropartition device (Millipore Corporation, Bedford, MA). The micropartition device was then centrifuged at 1500g for 15 min, and the unbound cimetidine, famotidine, and probenecid concentration in the filtrate was determined by LC-MS. The free fraction in plasma ( $f_p$ ) was determined as the ratio of the unbound concentration in the filtrate to the total concentration.

**Determination of Plasma and Cell Lysate Concentrations.** The quantification of cimetidine, famotidine, ranitidine, and probenecid was performed by high-performance liquid chromatography (Alliance 2690; Waters, Milford, MA) connected to a mass spectrometer (ZQ; Micromass, Manchester, UK) (Nagata et al., 2004). Aliquots (100  $\mu\text{l}$ ) of plasma and urine containing famotidine, cimetidine, and probenecid were precipitated with 200  $\mu\text{l}$  of methanol containing an internal standard (ranitidine), mixed, then centrifuged, and 25  $\mu\text{l}$  of the supernatants was injected into the LC-MS. High-performance liquid chromatography analysis was performed on a Capcell Pak C<sub>18</sub> MG column (3  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm i.d., 75 mm; Shiseido, Tokyo, Japan) at room temperature. Elution was performed with a 0 to 90% linear gradient of 10 mM ammonium acetate-acetonitrile over 4 min at 0.8 ml/min. A portion of eluent (split ratio, 1:3) was introduced to the MS via an electrospray interface. Detection was performed by selected ionization monitoring in positive ion mode ( $m/z$ , 253;  $m/z$ , 315;  $m/z$ , 338; and  $m/z$ , 286 for cimetidine, ranitidine, famotidine, and probenecid).

The lower limit of quantitation for famotidine and cimetidine was 5 ng/ml in plasma and 10 ng/ml in urine, respectively. The standard concentration of both drugs ranged from 5 to 1000 ng/ml in plasma and 10 to 1000 ng/ml in urine, respectively. The within-day coefficient of variation of both drugs for plasma and urine determinations was less than 10%. Creatinine concentrations in plasma and urine were determined by an enzymatic method (creatinase/sarcosine oxidase/peroxidase) using an AutoAnalyzer 7070 (Hitachi Instruments

Service, Tokyo, Japan). Probenecid and H<sub>2</sub> receptor antagonists did not interfere with the quantification of creatinine.

**Pharmacokinetic Analysis.** Plasma concentration time data ( $C_p$ ) of famotidine and cimetidine were fitted to a two-compartment model using a MULTI program (Yamaoka et al., 1981).

$$C_p = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t} \quad (\alpha > \beta) \quad (3)$$

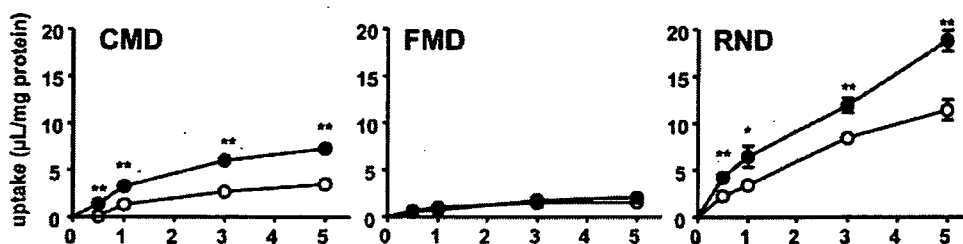
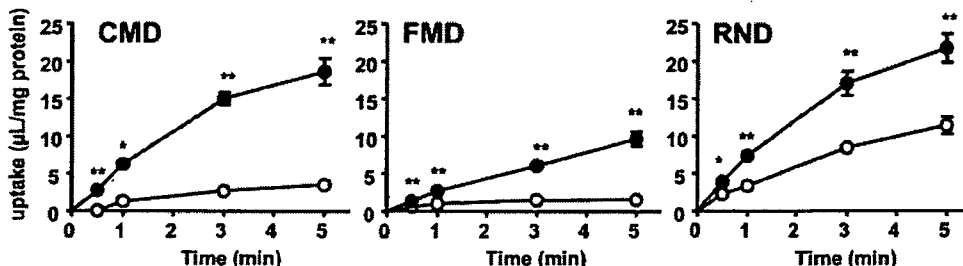
The following parameters were calculated whenever appropriate:  $t_{1/2\alpha}$  (the distribution half-life, calculated as  $0.693/\alpha$ ),  $t_{1/2\beta}$  (the elimination half-life, calculated as  $0.693/\beta$ );  $AUC_{0-\infty}$  (the total area under the plasma concentration time curve extrapolated to infinity, calculated as  $A/\alpha + B/\beta$ );  $CL_p$  (the plasma clearance, calculated as  $\text{dose}/AUC_{0-\infty}$ );  $MRT$  [the mean residence time, calculated as  $(A/\alpha^2 + B/\beta^2)/AUC_{0-\infty}$ ];  $V_{d,ss}$  (the steady-state distribution volume, calculated as  $MRT \times CL_p$ );  $V_c$  [the distribution volume of the central compartment, calculated as  $\text{dose}/(A + B)$ ]; and  $CL_{dis}$  (the distribution clearance, calculated as  $K_{12} \times V_c$ ). The renal clearance ( $CL_{renal}$ ) of famotidine and cimetidine was calculated as  $CL_{renal} = Ae/AUC_{0-\infty}$ , where  $Ae$  is the amount of famotidine and cimetidine excreted in the urine within 24 h. The tubular secretion clearance ( $CL_{sec}$ ) was calculated as  $CL_{sec} = CL_{renal} - f_p \times GFR$ , where  $f_p$  is the unbound fraction of famotidine and cimetidine in plasma, and  $GFR$  is the glomerular filtration rate. The percentage of drug excreted in the urine ( $fe$ ) was calculated as  $fe = Ae/\text{dose}$ . The creatinine clearance values were used for the values of  $GFR$  in this study. The creatinine clearances in cynomolgus monkeys treated with or without probenecid were determined as  $0.241 \pm 0.021$  (0.217–0.252) and  $0.189 \pm 0.025$  (0.169–0.217) l/h/kg, respectively (mean  $\pm$  S.D., not significant,  $p > 0.05$ ). The two-tailed paired Student's  $t$  test was used for a statistical analysis, and value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

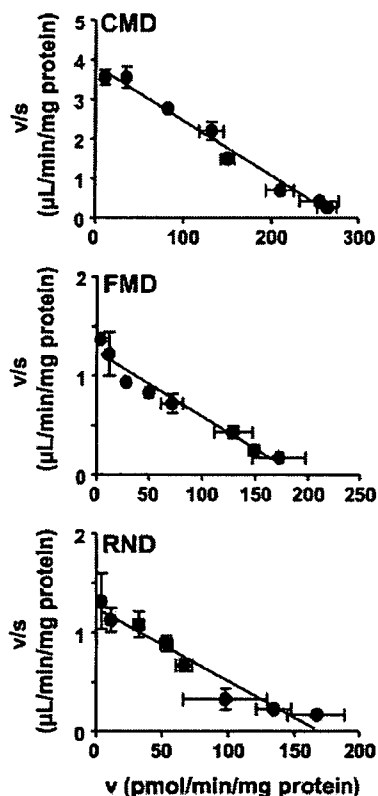
**Uptake of H<sub>2</sub> Receptor Antagonists by mkOAT1 and OAT3.** Figure 1 shows the time profiles and concentration dependence of the uptake of the H<sub>2</sub> receptor antagonists by mkOAT1, mkOAT-3, and vector-HEK, respectively. As reported previously in hOAT1-HEK (Tahara et al., 2005a), the uptake of cimetidine by mkOAT1-HEK was slightly greater than that by mock cells ( $7.27 \pm 0.20$  versus  $3.48 \pm 0.04$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  protein at 5 min). A slight increase was also observed in the uptake of ranitidine by mkOAT1-HEK ( $18.8 \pm 2.27$  versus  $11.4 \pm 1.11$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  protein at 5 min), but no specific uptake was observed for famotidine. The uptake of cimetidine, famotidine, and ranitidine by mkOAT3-HEK was significantly greater than in vector-HEK (Fig. 1). Since the uptake of cimetidine, ranitidine, and famotidine by mkOAT3-HEK increased linearly up to 3 and 5 min of incubation, the uptake of cimetidine, famotidine, and ranitidine by mkOAT3 at 3 min was used for further characterization.

The concentration dependence of the uptake of the H<sub>2</sub> receptor antagonists by mkOAT3-HEK was examined (Fig. 2). Their specific uptake by mkOAT3 consisted of one saturable component. The kinetic parameters are summarized in Table 1. The  $K_m$  values of the H<sub>2</sub> receptor antagonists for mkOAT3 were almost identical; however, the intrinsic transport activity ( $V_{max}/K_m$ ) of cimetidine was greater than that of famotidine and ranitidine.

**Effect of Probenecid on mkOAT3-Mediated Transport of Famotidine and Cimetidine.** The inhibitory effect of probenecid on the mkOAT3-mediated transport of cimetidine and famotidine was examined (Fig. 3). Probenecid strongly inhibited the mkOAT3-mediated transport of cimetidine and famotidine in a concentration-dependent manner.

**A** mkOAT1**B** mkOAT3

**Fig. 1.** Time profile of the uptake of H<sub>2</sub>-receptor antagonists by mkOAT1- and mkOAT3-HEK. The time-dependent uptake of cimetidine (CMD), famotidine (FMD), and ranitidine (RND) (10  $\mu$ M) by mkOAT1- and mkOAT3-HEK was examined at 37°C. Closed and open circles represent the uptake by mkOATs-HEK and vector-HEK, respectively. Statistical differences in the uptake of mkOATs-HEK were compared with vector-HEK by a two-tailed unpaired Student's *t* test with  $p < 0.05$  as the limit of significance (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ). Each data point was connected with the rigid line and represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).



**Fig. 2.** Concentration dependence of the uptake of H<sub>2</sub>-receptor antagonists by mkOAT3-HEK. The concentration dependence of mkOAT3-mediated CMD, FMD, and ranitidine (RND) uptake is shown as Eadie-Hofstee plots. The mkOAT3-mediated uptake of cimetidine, famotidine, and ranitidine for 3 min was determined at different concentrations (3–1000  $\mu$ M, range of concentration used). The mkOAT3-mediated transport was obtained by subtracting the transport velocity in vector-HEK from that in mkOAT3-HEK. The rigid line represents the fitted line obtained by nonlinear regression analysis as described under *Materials and Methods*. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

The  $K_i$  values of probenecid for cimetidine and famotidine uptake by mkOAT3-HEK were determined to be  $5.68 \pm 0.78$  and  $2.97 \pm 1.53$   $\mu$ M.

**Semiquantitative Real-Time RT-PCR Analysis of Organic Cation Transporters.** A method for the detection of monkey OCTs that combines reverse transcription with real-time RT-PCR was developed using specific primers designed from a nucleotide sequence of hOCT1, hOCT2, and hOCT3. The mRNA expression levels of putative mkOCT1, mkOCT2, and mkOCT3 in the liver were 121, 0.0640, and 0.0846, and those in the kidney were 0.0110, 1400, and 0.0879 (relative luminescence units per 50 ng of total RNA). The relative expression level of putative mkOCT1 was more than 10,000-fold higher in the liver than in the kidney, whereas that of putative mkOCT2 was more than 20,000-fold higher in the kidney than in the liver. In contrast, the expression level of putative mkOCT3 mRNA was comparable in the liver and kidney. Using these primer sets, electrophoretic analysis showed a single band of OCT1 [404 base pairs (bp)], OCT2 (430 bp), and OCT3 (419 bp) in monkey liver and kidney as well as human mixed cDNA (data not shown).

**Effect of Probenecid on Pharmacokinetics of Famotidine in the Monkeys.** The mean plasma concentration time profile of famotidine in cynomolgus monkeys is shown in Fig. 4A. The mean plasma pharmacokinetic parameters are summarized in Table 2. The urinary recovery over the 0- to 24-h collection period and the renal and tubular secretion clearances are included in Table 2. There was a significant difference between the probenecid-treated and untreated groups with regard to the pharmacokinetic parameters of famotidine, such as  $AUC_{0-\infty}$ ,  $V_{d,ss}$ ,  $CL_p$ ,  $CL_{renal}$ , and  $CL_{sec}$ , but no significant difference in the  $t_{1/2,\alpha}$ ,  $t_{1/2,\beta}$ ,  $fp$ , and  $fe$  compared with the controls. The  $fp$  and  $fe$  in cynomolgus monkeys with or without probenecid treatment were determined as  $74.4 \pm 9.7$  versus  $70.3 \pm 6.0\%$  and  $49.3 \pm 13.4$  versus  $38.5 \pm 10.9\%$ . The plasma and renal clearances of famotidine was reduced to 50 and 65% of the control values, and the steady-state distribution volume was also reduced by probenecid. Probenecid completely blocked the renal tubular secretion of famotidine reducing it from  $0.275 \pm 0.075$  to  $0.0230 \pm 0.0217$  l/h/kg and concomitantly increased the total exposure (AUC) of famotidine by approximately 2-fold. The