

腸移行速度を変化させることにより消化管からの薬物の吸収速度を変動させる。また、摂食により胃内容物の排出速度が遅くなり、小腸からの吸収が遅くなることが多い。なお、併用薬により被験薬の胃内容物排出速度に遅延が生じたとしても、代謝過程に影響がなければ血中濃度推移に変化は認められるが、AUCに変化は認められないと考えられる。このため、もしもAUCの変化を伴う体内動態の変動が認められた場合には、併用薬による被験薬の代謝や吸収過程への影響にも注意する必要がある。

2.2. 2被験薬が相互作用薬となる場合

被験薬が胃排出または腸管運動に対して影響を及ぼすことが明らかな場合、他の薬物の吸収率および吸収量に影響を与える可能性がある。その場合には、臨床的に重要な薬物相互作用の起こる可能性について検討し、必要があれば適切なプローブ薬（胃排出に対する作用の場合のプローブ薬としてアセトアミノフェンなど）に対する作用を評価すべきである。このような作用は、多くの場合、非経口投与される薬物によっても生じる可能性のある全身性の作用であることに留意すべきである。また、他の薬物の吸収は、腸管内の輸送蛋白質の阻害による影響を受けることもあるが、被験薬が他の薬物の能動輸送に及ぼす作用の評価については、「輸送」の項で詳細を提示する。

2.3. トランスポーターにより吸収あるいは再排出される薬物

一部の薬物は、消化管上皮細胞の管腔側の細胞膜上に発現しているトランスポーターにより吸収されるので、同じトランスポーターにより吸収される薬物間または飲食物成分との間に吸収の阻害が起こることで、薬物の吸収量が減少することがある。また、小腸管腔側の細胞膜上には排出トランスポーターが発現していて、一部の薬物については、上皮細胞中に管腔側から取り込まれた後、基底膜側（門脈側）に移行する前に、排出トランスポーターによって小腸管腔側へ排出されることが知られている。薬物相互作用によるその排出過程の阻害により吸収量が増加する薬物相互作用も報告されている。

特に、消化管上皮細胞の管腔側に発現するP-糖蛋白質（P-gp）及びBreast Cancer Resistance Protein（BCRP）は、いずれも排出トランスポーターとして、基質となる薬物の消化管吸収を低下させる役割が示されている（表5-1参照）ことから被験薬の消化管吸収に対するP-gpまたはBCRPの寄与を*in vitro*試験により評価すべきである。*in vitro*試験方法は、Caco-2細胞またはトランスポーター発現細胞株を用いた双方向の経細胞輸送実験が推奨される。この試験結果が陽性の場合には、ヒトでの臨床試験における薬物相互作用試験の必要性を検討すべきである（詳細な検討手順については、5.3.2項および旧図T-2, 3 >図5-2, 3参照）。

さらに、消化管における吸収や排出過程にその他のトランスポーターが大きな影響を及ぼしていることが疑われた場合には、Caco-2細胞またはトランスポーター発現細胞株などを用いて、寄与するトランスポーターの特定やその寄与の程度を検討することは有用であり、必要に応じて、ヒトでの臨床試験の実施も考慮する。

一方で、薬物がP-gpおよびBCRPを阻害する場合、基質となる薬物との併用により、基質薬物の吸収量

を増大させる可能性があることから、被験薬のP-gpおよびBCRPに対する阻害作用についても *in vitro* 試験により評価すべきである。この試験結果に基づき、ヒトでの臨床試験における薬物相互作用試験の実施の必要性を検討する（詳細な検討手順については、5.3.2項および旧図T-2, 3>図5-2, 3参照）。また、その他のトランスポーターに対する阻害作用が併用薬の吸収に影響を及ぼすことが疑われる場合は、*in vitro* 試験によりその程度を評価することは有用であり、必要に応じて、ヒトでの臨床試験の実施も考慮する。

食品成分やサプリメントに関しては、セントジョーンズワートによるP-gpの誘導の他、グレープフルーツジュース、オレンジジュース、アップルジュース等による吸収方向に働く取り込みトランスポーターの阻害を介したと考える相互作用の報告もある (Dolton et al., Clin Pharmacol. Ther. 92: 622-630, 2012)。

2.4 消化管における薬物代謝酵素を介した薬物相互作用

消化管、特に小腸粘膜では、CYP3Aが多く発現している。小腸においてCYP3Aによる初回通過代謝を受け、バイオアベイラビリティが大きく低下するような被験薬では、CYP3Aを阻害する薬物の併用により、バイオアベイラビリティの増大をきたし、予期しない副作用の発生につながる可能性がある。一方、CYP3Aを誘導する薬物の併用により肝臓と同様に小腸においてCYP3Aが誘導されると、被験薬の血中濃度が治療域に到達せず、期待する効果が得られなくなる可能性がある。したがって、被験薬の代謝に対するCYP3Aの寄与、CYP3Aによる初回通過代謝に起因する被験薬のバイオアベイラビリティの低下の程度等を考慮し、小腸における薬物相互作用について検討することが有用である。一方で、被験薬がCYP3Aを阻害または誘導する場合においては、小腸における薬物相互作用の観点から *in vitro* 試験の検討を行い、*in vivo* 薬物相互作用試験の実施の必要性を検討すべきである（詳細な検討手順については「4. 薬物代謝における薬物相互作用」の項を参照）。

また、飲食物中に存在するCYP3A阻害を示す成分の影響も考慮する必要がある。例えば、グレープフルーツジュース中にはCYP3Aを強く阻害する物質が存在し、CYP3Aにより主として代謝される経口薬では、バイオアベイラビリティの上昇が報告されている例があるため、グレープフルーツジュースと一緒に服用することは避けるなど注意が必要である (Hanley et al., Expert Opin Drug Metab Toxicol 7: 267-286, 2011)。

なお、CYP3Aの基質薬はP-gpの基質薬であることが多く、それぞれの薬物相互作用への寄与を分離することは現状では容易ではない。したがって、その両方が阻害あるいは誘導された場合に、どの程度の薬物相互作用のリスクがあるかを考慮すべきである。

3. 組織移行および体内分布における薬物相互作用

薬物の多くは血漿中で血漿蛋白質と結合して存在し、また、組織内では蛋白質やある種の組織成分と結合している。血漿と組織の間の薬物の移行は非結合形（型）によってのみ行われるので、蛋白結合の

置換による非結合率の変動が薬物相互作用の原因となることがある。また、薬物によってはその組織分布にトランスポーターの関与が報告されている。

3.1. 血漿蛋白結合

被験薬の血漿蛋白結合率は、通常、第 I 相試験前に評価すべきである。薬物が血漿中において結合する蛋白質は主にアルブミンであるが、一部の薬物は α_1 -酸性糖蛋白質、リポ蛋白質、あるいはその他の蛋白質に結合するため、*in vitro*で血漿蛋白質との結合率が高い被験薬についてはその蛋白質の種類と結合の程度を明らかにしておくことが薬物相互作用の検討に必要である。

薬物相互作用により分布が変化する最も一般的な原因は、血漿蛋白質と結合した薬物の置換によるものである。血漿蛋白質と強く結合する併用薬により、蛋白と結合している被験薬の遊離が起き、その血漿中非結合形濃度が上昇する。しかし、ほとんどの場合、置換は临床上の重要な変化をもたらさない。但し、血漿蛋白質と強く結合する薬物との併用により重要な結果をもたらす可能性がある被験薬の事例は血漿蛋白結合率が約90%以上で、治療域が狭く、かつ、以下の条件のいずれかを満たす場合である。

- 1) 分布容積が小さい薬物。この場合は薬物のクリアランスの大きさおよび被験薬の投与経路の違いは問わない。
- 2) 主に肝における除去により体内から消失し、しかもその肝クリアランスが大きい被験薬を静脈内に投与する場合。
- 3) 主に腎からの除去により体内から消失し、しかもその腎クリアランスが大きい被験薬の場合。この場合は投与経路を問わない。

被験薬が以上の条件に当てはまる場合、臨床開発における適切な時点で、置換によって臨床的に重要な薬物相互作用を与えることが知られている他の薬物、あるいは併用する可能性があり高い蛋白結合率を示す薬物を用いて血漿蛋白質との結合における薬物相互作用を*in vitro*試験において検討する。また、被験薬の血漿蛋白結合率が約90%以上と高い場合には、蛋白結合の置換によって薬物相互作用を与える可能性について、治療上意味のある濃度域を用いて、*in vitro*試験で検討することが望ましい。これらの試験において、蛋白結合の著しい置換が認められた場合にはヒトにおける薬物相互作用を血漿蛋白結合または/および薬理効果の観点から*in vivo*で検討することが必要とされよう。その際、临床上問題となる副作用の発現や薬効の変化は非結合形の濃度に依存するので、非結合形の濃度を測定すべきである。

蛋白結合を介した薬物相互作用として報告されている事例には、蛋白結合のみならず薬物代謝への影響等、他のメカニズムも関係していることが知られているため、併用薬による薬物相互作用の多面的な評価が重要と考えられる。

なお、ヒトでの分布容積が大きく、かつ肝クリアランスが小さい被験薬においては、血漿蛋白結合の置換が血漿中の薬物総濃度を低下させるが、非結合形濃度にはほとんど影響を与えないので、临床上の重要な結果をもたらさない。この事例として、定常状態にあるフェニトインは、バルプロ酸を併用投与

したとき血漿中総濃度の低下が認められる一方、非結合形濃度には変化が認められないことが知られている (Mattson R.H. et al, *Ann. Neurol*, 1978, 3:20-25)。

3.2. 組織分布における薬物相互作用

組織分布に関わる以下の薬物相互作用については、組織中の特定の成分との結合の変動に加えて、各組織に発現する取り込み・排出トランスポーターの機能変動を伴う薬物相互作用による基質薬物の組織分布の変化に留意すべきである。ただ、ヒトへの予測を可能とする検討方法の妥当性評価は、ヒト組織中濃度を直接測定するのが困難であることから厳密な意味では難しく、各組織分布を直接推定する確立された実験系は明示できない。

3.2.1. 特定の組織成分との結合

薬物によっては組織の受容体、蛋白質、脂質などと特異的に結合し、結合における競合により組織内の非結合形の薬物濃度が変化し薬物相互作用が起こることがある。

3.2.2. 組織への取り込みおよび排出過程におけるトランスポーターの関与

肝、腎、また、脳、胎盤や網膜などに存在する血液と組織を隔てる関門組織などにトランスポーターが発現し、各組織への分布（取り込み/排泄）に関与している。特にトランスポーターを介した能動輸送過程に薬物相互作用が生じる場合には、当該組織中の非結合形薬物濃度に影響を与え（取り込みの阻害により減少、排泄の阻害により増加する）、その組織での作用や副作用発現に影響を与える可能性がある。現時点では分布におけるトランスポーターの相互作用を示した事例は限られているが、例として、血液脳関門においてP-gpが発現しており、P-gpの基質であるベラパミルの脳移行が、阻害薬であるシクロスポリンとの併用により上昇した報告 (Muzi M et al., *J Nucl Med*, 50, 1267-75 (2009)) などがある。

組織分布における薬物相互作用は、必ずしも血漿中の薬物濃度の変化に反映されるとは限らない。特に、全身の分布容積に比して分布容積が小さい組織のみにおいて能動輸送過程に相互作用の生じる場合は、当該組織中の薬物濃度が変動しても、血漿中の薬物濃度の変動に反映されないため、注意が必要である。一方で、肝臓、腎臓などの主要な分布、排泄臓器において薬物相互作用の生じる場合には、薬物の分布容積、全身クリアランスにも影響し、血漿中の薬物濃度が変動することもある。

4. 薬物代謝における薬物相互作用

薬物代謝が関与する薬物相互作用の多くは、酸化的代謝、特にシトクロムP450 (CYP) が関連するものである。一方で、UDPグルクロン酸転移酵素 (UGT) 等の非CYP酵素の関与する薬物相互作用の重要性も認識されている。しかし、薬物の代謝に関わる全ての酵素について記述することはできない。したがって、本項においては、主としてCYPの関与する薬物相互作用の可能性の検討について述べる。薬物代謝におけ

る薬物相互作用を検討する際には、「被験薬が薬物相互作用を受ける可能性」と「被験薬が薬物相互作用を与える可能性」とに分けて考える必要がある。「被験薬が薬物相互作用を受ける可能性」を検討するには、被験薬の主要消失経路を知ることが重要である。本項では最初に主要消失経路の特定について一般的な方法を述べ、その後CYPとその他の代謝酵素の場合に分けて、薬物相互作用の可能性を検討する具体的な方法について述べる。

4.1 被験薬の主要消失経路の特定

被験薬が薬物相互作用を受ける可能性を検討し、薬物相互作用の寄与の程度を定量的に考慮するためには、経口薬の場合は被験薬の経口クリアランス (CL_{oral}) に対する、薬物相互作用を生じる当該経路の *in vivo*における寄与率 (contribution ratio, CR) が重要である。その値によって、薬物相互作用が生じた場合の曝露量の変化が推定可能となるためである。被験薬の主要消失経路がCYPによる代謝である場合は、CRの大きい分子種を特定する必要がある。一般に *in vitro*試験からCRを推定する場合には、当該CYPで代謝される割合 *f_m* (fraction metabolized) を用いることが多い。ただし、これは肝臓における代謝の変化により相互作用を生じるが、小腸における輸送および代謝の変化は小さいために *F_a* および *F_g* には変化がなく、加えて腎排泄などの排泄CLやCYP以外の代謝CLが無視できる場合には正しいが、これらの寄与がある場合には影響を受ける。一方、注射薬の場合にはCL_{oral}ではなく全身クリアランス (CL_{tot}) へのCRを評価する必要があり、肝血流量を考慮して、攪拌モデルなどを用いて別途計算する必要がある。また、CRから薬物相互作用の程度が単純に計算できるのは、経路が並列となる一次代謝反応の場合である。トランスポーターの活性が影響する場合は、経路が直列を含む可能性があり、厳密な計算にはPBPKモデルなどのより高度な予測が必要となる。医薬品開発の初期にはこれらの高度な対応は難しい場合も考えられ、より単純な方法で臨床試験の必要性を判断しなければならない可能性がある。その場合には、臨床試験の結果によって解析法やモデルの見直しを考慮すべきである。

被験薬が活性代謝物を介して作用するプロドラッグである場合、あるいは薬理的活性を有する代謝物を生成し、その *in vitro*活性と非結合形薬物の全身曝露量に基づいて推定された *in vivo*における薬理学的作用が全体の50%以上を占めるものがある場合、さらに有害な作用を引き起こすと疑われる代謝物がある場合は、このような代謝物の主要生成経路および消失経路に寄与する酵素を特定すべきである。

4.1.1 *In vitro*代謝試験による主要消失経路に関与する酵素の特定

通常、第I相試験を開始する前に、*in vitro*代謝試験を実施して、*in vitro*で生成される主な代謝物を特定する。*In vitro*試験の実施においては、適切にバリデートされた実験方法、実験系の選択、および基質/相互作用薬とその濃度の適切な選択を考慮することが極めて重要である。通常、被験薬の代謝、臨床的に意味のある活性代謝物の生成および代謝は、評価する酵素の種類に応じて、ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、ヒト肝酵素を発現する組換え細胞、肝S9分画等を選択し、評価する。CYP酵素およびUGT酵素は、上述のすべての系に存在する(組換え細胞は通常、1種類の酵素しか発現していない)。硫

酸転移酵素、グルタチオン転移酵素、アルデヒド脱水素酵素、アルコール脱水素酵素等の可溶性分画に存在する酵素は、S9分画および肝細胞標本に含まれる。また、肝細胞にはトランスポーターも発現している。試験結果を解釈する際には、使用した *in vitro* 試験系の特徴を十分に考慮すべきである。

In vitro での代謝試験は通常、線形条件下で治療上意味のある濃度を用いて実施する。多酵素系では、酵素特異的な阻害薬(表 4-1 参照)を添加して、被験薬の代謝に対する各酵素の寄与を評価することが可能である。阻害薬の特異性が十分に高くない場合は、特定の代謝酵素分子種以外が発現していない *in vitro* 試験系を利用することが推奨される。特異性が十分に裏付けられている抗体があれば、阻害薬の代わりにそのような抗体を使用してもよい。また、試験では酵素活性に関する陽性対照(マーカー基質)を用いることが推奨される。複数の個体から調製した肝ミクロソームなどを用いて、特定の酵素活性(指標基質の代謝)と被験薬の代謝の相関を調べる相関試験は、各種酵素の活性強度が互いに相関する場合があるため有用でないことが多い。やむを得ず、相関試験を実施する際には、他の手法と組み合わせて判断する必要がある。

代謝は、被験薬の消失速度または代謝物の生成速度として調べることができる。特定の酵素により触媒される代謝経路の活性を評価する場合には、被験薬の減少よりも代謝物の生成を検討することが推奨される。一方で基質薬の CL を評価する場合には、特定の代謝物の生成速度による評価では不十分なことが多い。代謝に関与する主要な酵素を *In vitro* で特定するには、適切に選択された 1 種類の *in vitro* 評価系のみで良いと考えられるが、一般的には、他の *in vitro* 試験系でも評価を行い、結果を比較検証することが推奨される。*In vitro* では代謝が全く認められない、あるいはほとんど認められないことがある。このような場合でも *in vivo* で代謝物が認められる場合は、化学構造および既報のデータを利用して、関与する酵素を特定できるような *in vitro* 試験系を見出すよう試みるべきである。

4.1.2 *In vivo* 試験による主要消失経路の特定および定量的評価

4.1.2.1 マスバランス試験

放射標識した被験薬の投与後に未変化体および代謝物を追跡するマスバランス試験により、代謝物の薬物動態に関する情報、および主要消失経路の推定に有用な情報が得られる。これらの情報を *in vitro* 試験結果と統合することにより、被験薬の *in vivo* での主要な消失経路およびその経路に関与する酵素の寄与率を推定することが可能である。通常、マスバランス試験の結果は第 III 相試験の開始前に得られていることが望ましい。なお、未変化体および既知の代謝物の回収率が高く、未知の代謝物が少ないことが想定される被験薬の場合には、マスバランス試験を放射標識体で実施する必要がない場合も考えられる。

マスバランス試験では、構造上代謝的に安定な位置に放射標識した被験薬を投与し、放射活性物質の総曝露量と、未変化体および代謝物の全身曝露量、ならびに尿中および糞便中排泄量を測定する。この際、薬物関連物質はできるだけ多く特定することが望ましい。一般的に、薬物関連物質の AUC の合計に対する寄与率が 10% を超える代謝物については、その構造の特徴を明らかにすることが推奨される。

まず、被験薬の化学構造から、生じ得る代謝反応に関する予測および試験で観察された代謝物に基づき、考えられる代謝経路を推定し、次に、特定の経路において一次代謝物および二次代謝物として排泄される量に基づき、各代謝消失経路の定量的な寄与率を推定する。薬物の総消失量(初回通過分を含む)に対する主要経路の推定寄与率は、1つの主要経路に由来する全代謝物の排泄物中の総量を、投与量、または排泄物中に認められた薬物関連物質の総量で除した値である。なお、この時には主要薬効成分の代謝反応に注目することが重要である。相当量の未変化体が糞便中に認められ、これが胆汁(または消化管壁)分泌に由来することを検証できない場合、計算式の分母は、排泄物中で認められた薬物関連物質の量から糞便中で認められた未変化体の量を減じた値とする。このようにして得られる値は、各(主要)消失経路の寄与率という観点からは最大の推定値となる。

4.1.2.2 遺伝子多型による代謝活性低下の活用

ある薬物が遺伝子多型を有する酵素(CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19またはUGT1A1など)によって代謝される場合、遺伝的に活性を欠損する被験者(Poor metabolizer, PM)のCLの変化は、その酵素をほぼ完全に阻害する阻害薬を併用した場合と同等と考えられる。したがって、CLを野生型の被験者(Extensive metabolizer, EM)と比較することで、被験薬の消失全体における当該酵素の寄与率を推定することが可能である。この場合、活性欠損者の血中濃度は高値となることが予想されることから、臨床試験を実施する場合には安全性に十分配慮する。また、遺伝的に活性が低下している被験者(Intermediate metabolizer, IM)における血中濃度の上昇から、当該酵素の寄与率の程度を類推することが可能な場合もある。

4.2 *In vitro* 酵素阻害試験および誘導/ダウンレギュレーション試験

In vitro 酵素阻害試験は、ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、評価対象の酵素を発現する組換え細胞などを用いて実施することができる。被験薬が反応液中に存在する酵素により代謝される場合、被験薬の濃度低下が K_i (阻害定数、すなわち酵素-阻害薬複合体からの阻害薬の解離定数)の推定値に及ぼす影響を最小限に抑えるため、可能であれば、プローブ薬は被験薬の代謝速度よりも大幅に速い代謝速度を示すものを使用する。試験には、陽性対照として既知の強力な阻害薬も使用し、その K_i を推定して、文献等による基準値と比較する。

In vitro 酵素誘導/ダウンレギュレーション試験では、初代培養肝細胞(新鮮または凍結保存)を使用することが望ましい。現時点では、ヒト肝腫瘍由来細胞株(HepaRG等)、核内受容体結合アッセイ、リポーター遺伝子アッセイ等、他の*in vitro* 試験系から得られたデータは、培養肝細胞系から得られたデータの補足データとして位置づけられる。一般に、初代培養肝細胞の特性は個体間変動やロット差が大きいいため、3名以上のドナー由来の肝細胞を用いて、適切な陽性対照と共に試験を行う。被験薬が併せ持つ酵素阻害により酵素誘導作用がマスクされることの無いように、標的遺伝子のmRNA発現量の変化を評価項目として使用することが推奨される。但し、被験薬が酵素阻害を有していないことが明らかな場合や

蛋白質の安定化による誘導が疑われる場合には、酵素活性を評価項目として使用することが可能である。

代謝阻害や酵素誘導の程度は阻害薬および基質の濃度さらに投与量や投与間隔に強く依存している。動物実験では、一般に投与量が高く、明らかな阻害や誘導が起こりやすいが、動物に比べてヒトにおける薬効量が低い薬物では、明らかな薬物相互作用が起こらない場合がある。それゆえ、予想臨床用量投与時のヒト肝臓における非結合形薬物の濃度推移を常に考慮し、ヒトにおける薬物相互作用の発現の可能性および程度を予測することにより、不必要な動物実験および臨床試験を行わないように留意すべきである。

4.2.1 シトクロムP450 (CYP) を介した薬物相互作用に関する検討法

シトクロムP450 (CYP) には多くの分子種が知られているが、主要なCYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 および3A (CYP3A4 および CYP3A5を含む) について検討することが推奨される。被験薬がこれらの分子種による代謝を受ける場合は、その経口クリアランスへの寄与を *in vitro* 試験から推定しておくことが有用である。また *in vitro* 試験から阻害や誘導の可能性が考えられる場合には、基本的に臨床試験で検討する。ある被験薬が上述の主要なCYPによって代謝されない場合には、他のCYP酵素 (例：CYP2A6、2J2、4F2、2E1) あるいはCYP以外の第I相酵素の基質である可能性を検討すべきである。一般には薬物は複数のCYP分子種の代謝を受けることが多く、また1つの分子種が多くの薬物の代謝に関与する。したがって1つの分子種の活性を阻害することで、多くの薬物との間に薬物相互作用を生じる可能性がある。基質として代謝される分子種と阻害する分子種は必ずしも一致しない。例えば、キニジンは、主としてCYP3Aで代謝されるが、CYP2D6を強く阻害する。一方、CYP3Aの場合に良く知られるように、CYPは肝臓のみならず小腸においても発現して初回通過効果に関与しており、グレープフルーツジュースによる薬物相互作用のように、小腸における相互作用が重要な場合もある。

主要なCYPの阻害・誘導などの活性変動に伴う薬物相互作用は、関連する薬物が非常に多く、そのために個々の組合せの全てについて臨床試験を実施したり、精密なモデリングでその注意喚起の必要性を検討したりすることが難しい場合が多い。その場合には薬物相互作用に関わる薬をグループ分けし、グループとグループの間で静的モデルに基づき注意喚起を図る方法も考慮する。なお、抱合酵素およびトランスポーターに関わる薬物相互作用は、個々の組み合わせの検討が基本であるが、将来的にはグループ毎の対応についても考慮する。

4.2.1.1 被験薬が薬物相互作用を受ける可能性の検討

4.1.1 項に示した手法に基づき被験薬の主要消失経路を検討し、当該経路に関わる CYP の種類とその寄与の程度を明らかにする。この際、用いる *in vitro* 試験系が *in vivo* 代謝プロファイルを反映していることを動物実験などにおいて確認する必要がある。特に、ヒト特異的あるいはヒトにおいて顕著な代謝物が検出された場合には、想定される代謝反応について既報の文献などを十分に調査し、関与する酵素種を推定する。このことは、被験薬の代謝全体における CYP の寄与を検証する上で重要である。CYP

の寄与が被験薬の消失全体の25%以上を占める可能性がある場合には、表4-1に示す阻害薬などを用いて、その代謝経路に関与する分子種を同定する。なお、後述する特別な患者集団などにおいては、CYPの寄与率が高まる場合のあることにも留意する。

CYP分子種の寄与率の推定には、一般的にヒト肝ミクロソームを用いた試験系が汎用される。通常は、被験薬の消失速度よりも代謝物の生成速度を指標とし、その反応時間依存性およびミクロソーム蛋白量依存性などを評価することにより試験系の妥当性を確認する。この際、用いる被験薬の濃度や反応液組成などの試験条件によりCYP分子種の寄与率が異なる場合があるため、当該試験系が*in vivo*の生理的条件を反映していることが重要である。

表4-1 *In vitro*における特定の酵素活性に対する十分にバリデートされた阻害薬の例

酵素	阻害薬
CYP1A2	フラフィリン、 α -ナフトフラボン
CYP2B6*	チクロピジン、チオテパ、セルトラリン、フェンサイクリジン
CYP2C8	モンテルカスト、ケルセチン、トリメトプリム、フェネルジン
CYP2C9	スルファフェナゾール、チエニル酸
CYP2C19*	S-(+)-N-3-ベンジルニルバノール、ヌートカトン、チクロピジン、フルオキセチン
CYP2D6	キニジン、パロキセチン
CYP3A	ケトコナゾール、イトラコナゾール、トロレアンドマイシン、ベラパミル、アザムリン

* 現在のところ、*in vitro*で使用できる既知の選択的阻害薬はない。ここに挙げた阻害薬は選択的ではないが、他の情報と共に使用するか、単一酵素系で使用可能である。

4.2.1.2 臨床試験を実施する必要性の評価（被験薬が被相互作用薬となる場合）

*In vitro*代謝試験、*in vitro*薬物相互作用試験および他の適切な薬物動態データから、*in vivo*薬物相互作用試験の実施の必要性を評価するためのフローチャートを以下の図4-1に示す。

図4-1 被験薬が薬物相互作用を受ける可能性の検討ーフローチャート(Decision Tree) :

一般的に、酵素阻害薬/誘導薬を用いた*in vivo*薬物相互作用試験を実施する必要性は、4.1項に示す検討に基づき、基質である被験薬の経口または全身クリアランスに対する当該酵素の寄与の程度を定量的に評価して決定する。ある代謝経路が被験薬の消失全体の25%以上を占める場合には重要な消失経路であると考え。但し、代謝経路が遺伝子多型により活性を欠損する分子種を含む場合は(CYP2C19およびCYP2D6など)、欠損する可能性のある分子種を計算に入れずに、被験薬の消失の少なくとも50%以上を占める経路も重要と考える。これは活性を欠損する被験者で起こりうる薬物相互作用を考慮しての対処である。重要と思われる消失経路（寄与率が不明の経路も含む）に関しては、薬物相互作用の報告事例が多く臨床での併用可能性のある適切な阻害薬を用いて*in vivo*試験を実施する必要がある。この場合には、まず初めに強力な阻害薬を用いて*in vivo*薬物相互作用試験を実施し、被験薬の薬物動態の変化の

程度を評価することが推奨される。*In vivo*酵素阻害薬/誘導薬の選択については、表6-3, 6-4に記載している。その試験が適切にデザインされていれば、試験結果が陰性の場合、被験薬の消失全体における当該酵素の寄与は小さいと判断できる。この場合、弱い阻害薬を用いて *in vivo*試験をさらに実施する必要性は低いと考えられる。強力な阻害薬を用いた相互作用試験の結果から、用量調整の必要性を考慮すべきと考えられる薬物相互作用を受けることが示唆された場合は、臨床的に併用される可能性を考慮して、同じ経路の他の阻害薬の作用を臨床試験で評価すべきである。その他の弱い阻害薬を用いる評価は、必要に応じて臨床試験の中で実施する。あるいは代わりにPBPKモデルにより評価することも可能である。なお、誘導薬との薬物相互作用試験は、阻害薬との薬物相互作用試験の結果から、シミュレーション等により臨床的に問題となる薬物相互作用が生ずるリスクがあると判断された場合には必要となる。

4.2.1.3 被験薬が代謝酵素を阻害する可能性の検討

薬物代謝に関係する薬物相互作用に最も多く関与する酵素であるCYP1に対して、被験薬が阻害作用を及ぼすか否かについて、*in vitro*試験を実施して評価しなければならない。通常、CYP1に関しては、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6および3Aなどの主要な分子種に対する阻害作用を検討することが推奨される。CYP3Aの阻害は、基質としてミダゾラムとテストステロンの双方を用いて評価すべきである。表4-2に、CYP1について十分にバリデートされたマーカー反応/基質を示す。*in vitro*試験で使用するマーカー基質の濃度については、入手可能な文献を参照することが重要である。

表 4-2 十分にバリデートされた *in vitro*の酵素マーカー反応の例

酵素	マーカー反応
CYP1A2	フェナセチン 0-脱エチル化、7-エトキシレソルフィン 0-脱エチル化
CYP2B6	エファビレンツ水酸化、ブプロピオン水酸化
CYP2C8	パクリタキセル 6 α -水酸化、アモジアキン N-脱エチル化
CYP2C9	S-ワルファリン 7-水酸化、ジクロフェナク 4'-水酸化
CYP2C19	S-メフェニトイン 4'-水酸化
CYP2D6	ブフラロール 1'-水酸化、デキストロメトルファン 0-脱メチル化
CYP3A	ミダゾラム 1'-水酸化およびテストステロン 6 β -水酸化*

* CYP3A 阻害については、両方のマーカー反応を用いて評価すべきである。

一定範囲の濃度で被験薬の作用を調べ、表 4-2 に示された反応に対する阻害定数 (K_i) を推定する。被験薬の濃度範囲は、臨床で起こりうる阻害を見落とさないために十分に高濃度まで設定すべきであり、予想される酵素阻害部位、投与方法、剤形、全身曝露量に応じて変わる。通常は、 C_{max} (結合形+非結合形)の10倍以上を含む濃度設定にすることが推奨され、最高濃度において50%以上の阻害が認められた場合には、 K_i 値を算出する。*In vitro*試験系における K_i の算出の際には、反応系における被験薬の非結合型濃度が総濃度よりも顕著に低いと考える理由がある場合、反応液中の非結合型濃度の推定値または実測値を使用することが望ましい。特に、 K_i を算出した結果、*in vivo*試験を行わないと判断する場合、

正確な K_i 値算出に必要なマイクロソーム分画中の非結合率(fumic)等の値を実験的に求めることが推奨される。これは、被験薬が試験管壁に著しく吸着する可能性がある場合等にも当てはまる。

さらに、主要な代謝物による酵素阻害作用についても検討することが望ましい。実践的な判断基準としては、第I相代謝物のうち、AUCが未変化体の25%以上、かつ薬物関連物質の総AUCの10%以上を占める代謝物の酵素阻害作用は、*in vitro*でも調べることが推奨される。この基準に至らない代謝物においても、特に必要な場合は阻害作用を検討する。但し、カクテル基質試験などによって、すでに*in vivo*で相互作用のないことが示されている場合には、当該分子種については*in vitro*試験を省略することが可能である。一方で、*in vivo*で観察された薬物相互作用が特定の代謝物に起因することが示されている場合、当該代謝物に関して*in vitro*で酵素阻害試験を実施することにより、実施すべき*in vivo*試験のデザインおよび*in vivo*薬物相互作用試験の結果の解釈に有用な情報が得られると考えられる。また同様に、*in vivo*薬物相互作用試験では、このような代謝物の血中濃度を測定することが推奨される。

代謝物の阻害作用を検討する際の濃度設定には、被験薬と同様、マイクロソーム中などにおける結合率に関するデータが入手できる場合は、非結合形濃度を使用すべきであるが、得られない場合は、総濃度を用いてもよい。非結合形濃度を使用した場合にはそれを用いたことを明記する。

また、*in vitro*試験では、被験薬存在下でのプレインキュベーションの長さにより、薬物の阻害作用が変化するか否かを検討すべきである。プレインキュベーションにより阻害作用が増強する場合は、時間依存的阻害 (time-dependent inhibition, TDI) があると判断される。TDIが認められた場合は、後述するように、 k_{inact} (最大不活性化速度定数) および K_I (最大不活性化速度の50%の速度をもたらす阻害薬の濃度) を推定する。*In vitro*試験は慎重に実施し、結果に影響を及ぼす因子を十分に考慮する必要がある。例えば、蛋白質の濃度が高く、これへの結合により非結合形の濃度が顕著に低いことが想定される場合には、非特異的な結合を評価する必要があることに注意する。関連試験のプロトコールについては科学論文を参照することが望ましい。なお、TDIに関しても、*in vitro*試験の代替として、*in vivo*のカクテル基質試験を利用することが可能である。この場合、代謝物の定常状態濃度におけるTDIの可能性を観察できるように、可能な限り代謝物を含めて定常状態で試験を実施するようにデザインすることが重要である。

4.2.1.4 臨床試験を実施する必要性の評価 (被験薬が相互作用薬となる場合：酵素阻害)

ある酵素の阻害薬として被験薬を評価するための *in vivo* 薬物相互作用試験を実施するか否かは、*in vitro* データおよび臨床薬物動態データの定量的評価結果に基づいて決定すべきである。このような評価は、カットオフ基準、機構に基づく静的薬物速度論モデル (MSPK モデル)、より包括的で動的な生理学的薬物速度論 (PBPK) モデル等、様々なモデルを用いて実施することができる。これらの検討の結果、酵素阻害が *in vivo* で生じる可能性を否定できない場合は、*in vivo* 薬物相互作用試験の実施が推奨される。

以下に、被験薬が代謝酵素を阻害する可能性を検討するためのフローチャートを示す(図 4-2)。

図 4-2 被験薬が代謝酵素を阻害する可能性の検討—フローチャート (Decision Tree) :

1) カットオフ基準

被験薬の *in vitro* の薬物動態試験および薬物相互作用試験、ならびに *in vivo* の薬物動態試験の結果に基づき、*in vivo* での代謝阻害による薬物相互作用のリスクを評価するために最初に行う実践的なスクリーニング法としては、*in vitro* 薬物相互作用試験において算出されたパラメータに基づくカットオフ基準が有用である。カットオフ基準は通常、false-negative の判断を避けるために、保守的な厳しい評価を行うことで、臨床において薬物相互作用が生じる可能性を見落とすことがないことが期待されている。カットオフ基準により薬物相互作用が生じる可能性が否定された場合、必要に応じて、この検討内容を添付文書等に記載することができる。カットオフ基準は併用される基質薬には依存せず、阻害薬あるいは誘導薬の一般的な相互作用のリスクを表している。したがって、被験薬がこの基準を超える場合には、この後で述べるモデル解析により適切な基質薬を選択し、そのリスクを臨床試験で検討することが望ましい。一般的にカットオフ基準として、以下で述べる式に従い、被験薬の存在下と非存在下での酵素経路に対する指標基質の固有クリアランス値の比、すなわち、R 値¹を算出する。推定 R 値により、ある薬物が阻害薬か否かを評価するために *in vivo* 試験をさらに実施する必要があるかどうかを判断する。

1-1) 可逆的阻害

R 値は、*in vitro* 阻害定数 (K_i) と最大用量を投与したときに *in vivo* で達成される阻害薬の最高濃度 $[I]$ によって決定される。但し、この場合の阻害薬は代謝物である可能性も考えられる。 $[I]$ を算出する方法はいくつか提案されているが、様々な組織内の相互作用薬の最大曝露量を $[I]$ として選択するのが妥当と考えられる (図 4-2 の脚注 3))。 $[I]$ として、阻害薬の全身血中 C_{max} の総濃度 (結合形濃度 + 非結合形濃度) を用いた場合の R 値のカットオフ基準としては、1.1² を使用する。経口投与薬の場合は、消化管で高発現する CYP (例: CYP3A) を阻害する可能性に留意すべきである。このような状況下では、消化管内の最高濃度 $[I_{gut}]$ としてモル用量/250mL を用いる方が全身血中濃度よりも阻害薬の最高濃度を適切に反映する可能性がある。この場合、false-negative の判断を避けるための保守的な基準として、代替 R 値 ($R=1+I_{gut}/K_i$) には 11 を使用すべきである。R 値が基準値の 11 (CYP3A を阻害する経口投与薬の場合) または 1 を下回る場合は、臨床試験の実施は不必要と考えられる。この基準を満たさない場合は、最も R 値が大きい CYP を対象に、その感度の高い基質を用いる *in vivo* 試験を最初に実施することが多くの場合に適切である。ここで実施された *in vivo* 試験で相互作用が示されなかった場合には、R 値が

¹阻害薬または誘導薬の非存在下と存在下での推定固有クリアランス値の比。可逆的阻害薬である薬物では、 $R=1+[I]/K_i$ である。 K_i は *in vitro* で測定した非結合形の阻害定数。50%阻害濃度 (IC_{50}) を測定する場合もある。50%阻害濃度 (IC_{50}) は、 K_i の同定が不可能な場合にのみ使用することができ、 IC_{50} を使用する場合には、阻害について線形条件および時間依存性のないことを示す必要がある。

²可逆的阻害に関する論文に基づく (Huang et al. 2007)

より小さい他の CYP について *in vivo* 試験を実施する必要は基本的にないと考えられる。

1-2) 時間依存的阻害 (TDI)

CYP 酵素を阻害する薬物相互作用の多くは可逆的であるが、阻害作用が経時的に増加し、必ずしも完全に可逆的ではない場合、例えばプレインキュベーションにより阻害作用が増強する時間依存的阻害 (TDI) がみられることがある。この作用は、主として化学反応性の高い代謝中間体の形成を触媒する酵素に、この中間体が不可逆的に共有結合すること、または準不可逆的かつ強力に非共有結合することに起因すると考えられる。

CYP3A の TDI の例として、HIV プロテアーゼ阻害薬のリトナビルおよびサキナビル、マクロライド系抗生物質のエリスロマイシンおよびクラリスロマイシン、ならびにカルシウムチャネル遮断薬のベラパミルおよびジルチアゼム等が挙げられる。ジルチアゼムの場合は、未変化体のジルチアゼムおよびその主要代謝物である N-脱メチルジルチアゼムの両者が、CYP3A を時間依存的に阻害する。CYP2D6 の TDI の例としては、パロキセチンがある。阻害様式が可逆的阻害の場合と比べて、阻害様式が TDI の場合、酵素活性の阻害は阻害薬の反復投与により経時的に強まり、阻害薬の投与中止後も長期間持続することが多い。例えば、エリスロマイシン 1 日あたり 800mg を反復投与したときのヒトにおける CYP3A 活性の阻害は、投与 4 日後に最大に達した (CYP3A の指標基質であるミダゾラムの経口投与後 2 日目、4 日目および 7 日目の AUC 値はそれぞれ 2.3 倍、3.4 倍および 3.4 倍増加した) (Okudaira et al. 2007)。一般に TDI は、基質を添加する前に薬物 (潜在的阻害薬) を試験系でプレインキュベートするという標準的な *in vitro* スクリーニングのプロトコールで評価される。モデル基質の代謝物の生成率が時間依存的に低下する場合は、TDI が示唆されるため、*in vitro* 試験で TDI のパラメータ (すなわち、 k_{inact} および KI) を測定することが推奨される。このアプローチの詳細は、PhRMA Drug Metabolism Technical Group (Grimm et al. 2009) より提唱された。しかし、TDI は可逆的阻害よりもメカニズムが複雑なため、*in vitro* の不活性化パラメータから *in vivo* での TDI を予測するのは依然として困難な場合も少なくない。TDI は一般的に、阻害を受ける酵素の濃度が阻害薬の存在下で新たな定常状態に達し、阻害薬が酵素の新規合成に影響を与えないという前提で評価する。可逆的阻害とは異なり、TDI の R 値は、阻害薬の曝露量および TDI のパラメータ (k_{inact} および KI) に加えて、酵素分解の速度定数 (k_{deg}) にも左右される (式 1)。

式 1

$$R = (k_{obs} + k_{deg}) / k_{deg}, \text{ 但し、} k_{obs} = k_{inact} \times [I] / (KI + [I])$$

[I] = C_{max} (肝および腎)、あるいは、 $I_{gut} = \text{Dose} / 250 \text{ mL}$ 。

KI : 最大不活性化速度の 50% の速度をもたらす阻害薬の濃度

ここで、 k_{deg} は酵素の分解速度定数、 k_{inact} は最大不活性化速度定数、[I] は阻害薬の濃度である。それぞれの CYP の分解に関する動態は明確に決定されていないが (Yang et al. 2008)、分解速度定数とし

では *in vivo* のデータに基づいた科学論文の値を参照することができる。但し、CYP3Aのように腸管と肝臓の双方に存在する酵素は、各組織によって分解速度定数が異なることに注意する。

In vitro 試験の結果からTDIが生じる可能性が示唆される場合は(例：肝でR>1.1あるいは小腸でR>11)、*in vivo* 試験を実施することを推奨する。あるいは、次項に述べる機構に基づく静的薬物速度論モデル(MSPKモデル)を用いて薬物相互作用の程度を推定することも可能である。

2) 機構に基づく静的薬物速度論モデル (MSPK モデル)

MSPK モデルでは、可逆的酵素阻害とTDI、ならびに酵素誘導の作用が組み込まれている。そのため、いくつかの薬物相互作用プロセスによる正味の作用(例えば、可逆的阻害とTDIの正味の作用等)を推定する際の補助として使用することができる。但し、このモデルでの評価事例は限られているため、現在のところ、阻害と誘導双方の正味の作用を推定する際に式2を用いることは推奨できない。

このモデルは、経口薬の場合にカットオフ基準に続くアプローチとして用いることができ、薬物相互作用試験の併用薬の選択および試験計画のデザイン等に有用である。MSPK モデルで *in vivo* での阻害が示されなければ、*in vivo* 試験の実施は適切ではない可能性が考えられ、カットオフ基準と予測の結果が矛盾する原因を考察した上で、臨床試験の実施が不要になる場合が考えられる。

モデルによる推定で陽性結果が示された場合、すなわちAUCRが0.8~1.25の範囲外であった場合(酵素阻害のみの評価ならばAUCR>1.25の場合)、正味の作用の経時的変化の特徴を明らかにするため、*in vivo* 試験の実施が必要になる。

$$\text{式 2} \quad \text{AUCR} = \left(\frac{1}{[A_h \times B_h \times C_h] \times f_m + (1 - f_m)} \right) \times \left([A_g \times B_g \times C_g] \times (1 - F_g) + F_g \right)$$

式中のA、B、Cは、それぞれTDI、誘導、可逆的阻害を指し、下記の表4-3に記載のとおりである。 F_g は腸管内代謝後の利用率、 f_m は阻害/誘導を受けるCYP酵素を介した基質の代謝固有クリアランスの、肝臓すべての代謝固有クリアランスに対する割合である。特定の酵素により触媒される肝代謝に対する最大の作用を推定する場合は、 f_m を1に設定する。また、尿中排泄などの肝外クリアランスがある場合は、これを考慮してCRを算出すべきであるが、肝外クリアランスを推定することが難しい場合は、その寄与はないと仮定する。特特定の医薬品による作用を推定する場合、薬物毎に特有なパラメータは科学論文による裏付けが必要である。式中、誘導部分(B_h と B_g)は、この目的のために使用する肝細胞ロットの適格性を評価した後に初めて使用することができる。これについては4.3.2項の2)でさらに詳述する。入力パラメータにはすべて考察を加え、必要であれば、独自に得られたデータあるいは科学論文に基づきその妥当性を示さなければならない。パラメータは保守的に選択することが推奨される。

表 4-3

時間依存的阻害	$A_h = \frac{k_{deg,h}}{k_{deg,h} + \frac{[I]_h \times k_{inact}}{[I]_h + K_i}}$	$A_g = \frac{k_{deg,g}}{k_{deg,g} + \frac{[I]_g \times k_{inact}}{[I]_g + K_i}}$
誘導	$B_h = 1 + \frac{d \cdot E_{max} \cdot [I]_h}{[I]_h + EC_{50}}$	$B_g = 1 + \frac{d \cdot E_{max} \cdot [I]_g}{[I]_g + EC_{50}}$
可逆的阻害	$C_h = \frac{1}{1 + \frac{[I]_h}{K_i}}$	$C_g = \frac{1}{1 + \frac{[I]_g}{K_i}}$

下付き文字の「h」および「g」はそれぞれ肝臓および消化管を指す。

[I]h は非結合形阻害薬/誘導薬の門脈血中最高濃度 ([I]u, inlet, max) であり、 $f_{u,b} \times ([I]_{max,b} + F_a \times F_g \times ka \times Dose/Q_H)$ (Ito *et al*³) で表わされる。ここで F_a は投与量の吸収率、 F_g は吸収量の消化管代謝回避率、 ka は吸収速度定数、 Q_H は総肝血流量 (97L/時、Yang *et al*⁴)、 $f_{u,b}$ は血中非結合率、 $[I]_{max,b}$ は定常状態における阻害薬の最高血中総濃度 (非結合形+結合形) である。血中蛋白結合率が高く (99%以上)、測定困難な場合は $f_{u,b}=0.01$ とする。 ka は同定することが望ましいが、最大推定値として 0.1/分に設定してもよい。用いた ka の推定方法については、その妥当性を示さなければならない。 ka の推定に際して不確実性が存在する場合は、感度分析を実施する。

$[I]_g = F_a \times k_a \times Dose/Q_{en}$ (Rostami-Hodjegan and Tucker⁵)、但し Q_{en} は腸管細胞の血流量 (18L/時) d は、対照データセットの線形回帰で同定した換算係数である。

3) PBPK (動的) モデル

PBPK モデルにはヒトの生理機能に基づくパラメータと薬物毎に特有なパラメータを組み込む。適切に構築された PBPK モデルには、MSPK モデルに対して時間推移を考慮した薬物濃度の変化を考慮できる点が最大の利点である。そのため、相互作用薬が被相互作用薬の薬物動態プロファイル全体に及ぼす作用を評価できる。また、PBPK モデルでは、トランスポーターの寄与や代謝物の阻害作用等の複数の機序による薬物相互作用の評価が可能である。

PBPK モデルの使用は推奨されるべきであるが、その MSPK モデルに対する改善の程度は明確でない場合もあることに注意が必要である。PBPK モデルは複雑になるために、何が本質的な要因であるかを分かり難くする危険性も有している。特に代謝酵素の阻害による薬物相互作用の場合は、固有クリアランスの変化を *in vitro* の情報から正しく予測することが重要であり、その他の例えば蛋白結合や血流量の変化などの要因は薬物相互作用の程度に影響しないことが多い。また PBPK モデルにより特定の被験者集団の PK のばらつきを予測することは理論的には可能であるが、*in vitro* 実験データのばらつきは多くの要因で生じており、そのまま *in vivo* への外挿が可能かは慎重に検討すべきである。

In vivo 試験が必要かどうかを判断する際は、「生物学的同等性」の評価に使用する基準 (例: 集団ベースの PBPK モデルを用いて予測される AUC 比が 0.8~1.25) を、初期の基準として使用できる。被相互作用薬および相互作用薬 (阻害薬または誘導薬) の PBPK モデルは *in vitro* および *in vivo* 体内動態パラメータを用いて別々に構築し、その後、薬物相互作用の程度を予測する適切なメカニズムを介して関連付けるべきである。

³ Ito *et al* AAPS PharmSci 4 (3) article 20; 2002

⁴ Yang *et al* Drug Metabolism and Disposition 35:501-2, 2007

⁵ Rostami-Hodjegan A and Tucker GT, *Drug Discov. Today Technol.* 1:441-448; 2004

4. 2. 1. 5 被験薬が代謝酵素を誘導/ダウンレギュレーションする可能性の検討

被験薬が核内受容体、あるいはその他の薬物代謝酵素の発現制御経路の活性化を介して、代謝酵素を誘導あるいは生成抑制することにより、併用薬のクリアランスが大きく変化し薬物相互作用が生ずる可能性を検討する。一般的には、まず *in vitro* で検討し、*in vitro* の結果で必要性が示されれば *in vivo* 試験を行う。但し、最初から直接 *in vivo* で誘導を評価することも考えられる。近年、*in vitro* データを用いて酵素誘導を評価するアルゴリズムや定量化のアプローチがいくつか提案されている (Shou et al. 2008、Almond et al. 2009、Fahmi et al. 2009、Fahmi, Kish, et al. 2010、Fahmi and Ripp 2010)。初代培養ヒト肝細胞は現在も *in vitro* で酵素誘導を評価する際の最適な実験系である。生体から分離後あまり時間の経過していないヒト肝細胞を用いるのが標準的であるが、凍結保存技術の進歩により、凍結肝細胞を解凍して使用することもできるようになった。

核内受容体であるプレグナン X 受容体 (PXR) の活性化により、CYP3A および CYP2C が共誘導されることが複数の試験で示唆されている。したがって、CYP3A の誘導を評価する *in vitro* 試験の結果が陰性の場合、CYP3A および CYP2C 酵素の *in vitro* または *in vivo* での誘導試験をさらに行う必要性はない。CYP3A 誘導試験の結果が陽性の場合、CYP2C の誘導を *in vitro* または *in vivo* のいずれかで評価すべきである。CYP1A2 および CYP2B6 は PXR とは異なる核内受容体により誘導されるため (例: AhR または構成的アンドロスタン受容体 (CAR))、CYP3A とは共誘導されないと考えられる。このため、CYP3A の試験結果に関わらず、CYP1A2 および CYP2B6 を誘導する可能性について評価すべきである。すなわち、通常は最初に *in vitro* 試験で CYP1A2、2B6 および 3A について酵素誘導作用を検討することが推奨される。但し、現時点では未知の誘導メカニズムが他にも存在する可能性があることに留意する必要がある。科学の進歩に応じて、将来的に他の受容体/転写因子および酵素が誘導/ダウンレギュレーション作用の検討対象に加えられる可能性もある。

また、*in vitro* 酵素誘導試験では、酵素のダウンレギュレーションが検出されることもあるが、薬物により生じるダウンレギュレーション、およびその発現メカニズムについては、現在のところ非常に限られた経験しか得られていない。例えば、フツ化ピリミジン系の薬剤は CYP2C9 の活性を低下させ、フェニトインやワルファリンのクリアランスを減少させることが知られており (Gibar PJ et al. Ann Pharmacother. 2001;35:1367)、これは代謝酵素の発現量の変動を伴う薬物相互作用であると疑われているが、その詳細な機構は現在不明である。*in vitro* で濃度依存的なダウンレギュレーションが観察された場合、他の薬物代謝酵素に対する作用も追加の *in vitro* (または *in vivo*) 試験で検討し、このような影響を受ける酵素を特定することが推奨される (当該酵素が予測可能な場合は例外とする)。このように、*in vitro* でダウンレギュレーションが観察された酵素またはそのメカニズムに関する知見に基づいてダウンレギュレーションのリスクが予測される酵素については、被験薬または主要代謝物がこれらの酵素に及ぼす作用を *in vivo* で評価すべきである。

サプリメントであるセントジョーンズワート中には、CYP3A を強く誘導する物質が存在するので、

CYP3Aにより主として代謝される被験薬との併用については注意が必要である。

被験薬が酵素を誘導/ダウンレギュレーションする可能性を、培養ヒト肝細胞を使用して評価する際は、以下の点を考慮する。

- 実験には溶媒対照、陽性対照(通常は既知の強力な誘導薬)および必要に応じて陰性対照(通常は既知の非誘導薬)を含めることにより、試験に用いた肝細胞のロットおよび試験系の妥当性を担保する(陽性対照の誘導薬の推奨濃度は表 4-4 参照)。
- 個体間変動やロット差等の問題を考慮し、評価可能な 3 名以上のドナー由来の肝細胞を使用することが望ましい。この際、培養開始時の細胞生存率が 80%未満である場合、または培養終了時の細胞生存率が顕著に低下している場合は、新たなドナー由来の肝細胞で実施すべきである。また、誘導の有無を判断するために独自のカットオフの基準値を決定する際は、十分な数の臨床的エビデンスのある誘導薬および非誘導薬を使用した結果に基づき判断する必要がある(Fahmi, Kish et al, 2010)。1 名以上のドナー由来の肝細胞を用いて評価した結果が事前に定義した基準値を超えた場合は、当該薬物は誘導薬と考えられるため、追加評価が必要となる(後述の図 4-3 および 1)カットオフ基準の項参照)。
- 当該試験においては、通常、薬物を含む培地を一日一回交換することにより、被験薬を連続的に曝露させる。培養期間は一般的に 3 日であるが、文献報告等を参考に適切な期間を設定する。
- 試験系の検出感度を高め、かつ被験薬自身による酵素阻害の影響を受けないようにするため、標的遺伝子の mRNA 発現量の変化を評価項目として使用することが推奨される(Fahmi, Kish, et al. 2010)。但し、蛋白質の安定化による誘導が疑われる場合などには、酵素活性についても測定して誘導作用を評価する必要がある。被験薬自身による酵素阻害の無いことが明らかな場合には、酵素活性の変化を評価項目とすることが可能である。
- 培養前および培養期間終了時に、細胞形態や細胞生存率を適切に評価することにより、細胞毒性が誘導反応に影響を及ぼしていないことを確認する必要がある。毒性あるいは生存率の低下が観察された場合には、試験結果に対する影響を注意深く考察する。当該評価試験において、必要十分な濃度での検討ができず、結論を導けないと判断された場合は、*in vivo*で誘導/ダウンレギュレーションの有無を検討しなければならない。
- 評価が必要な被験薬の濃度範囲は、評価対象の酵素および被験薬の *in vivo* 薬物動態により異なる。評価対象の曝露量範囲は、*in vivo* の肝細胞で予測される最高濃度を包含するものでなければならない。現在のところ、肝酵素に影響を及ぼす薬物に関しては、最大治療用量を投与したときの定常状態で得られる C_{max} (結合形+非結合形)の 10 倍以上を含む濃度設定にすることが推奨される。腸管酵素(CYP3A)に関しては、最高濃度を $0.1 \times \text{用量}/250\text{mL}$ に設定することが推奨される。この際、少なくとも 3 濃度以上で評価する。*In vitro* から *in vivo* への外挿に当たり、 EC_{50} および E_{max} などの *in vitro* パラメータを算出する際には、*in vitro* 試験系における添加濃度が実際

の薬物濃度と大きく乖離していないことが重要である。培養条件下での代謝や分解などによる顕著な薬物濃度の低下が予想される場合には、培養最終日を含む複数時点で培地中の被験薬濃度を測定することにより実際の薬物濃度を把握することが推奨される。培地中の被験薬の非結合形濃度が添加濃度よりも明らかに低いと考える理由がある場合、培地中の蛋白結合率を測定し、非結合形の被験薬濃度を用いて評価する必要がある。

表 4-4. *In vitro* CYP 誘導薬

CYP	陽性対照としての <i>in vitro</i> 誘導薬*	陽性対照の推奨濃度(μM)	酵素活性に基づき報告されている誘導倍率
1A2	オメプラゾール	25~100	14~24
	ランソプラゾール	10	10
2B6	フェノバルビタール	500~1000	5~10
2C8	リファンピシン	10	2~4
2C9	リファンピシン	10	4
2C19	リファンピシン	10	20
2D6	特定されていない		
3A4	リファンピシン	10~50	4~31

*この表は例示であり、網羅的なリストではない点に注意すること。科学論文等により常に最新の情報を入手することが望ましい。

4.2.1.6 臨床試験を実施する必要性の評価（被験薬が相互作用薬となる場合：酵素誘導）

ある酵素に対する被験薬の誘導/ダウンレギュレーション作用を評価するための *in vivo* 薬物相互作用試験を実施するか否かは、酵素阻害作用の評価と同様に、カットオフ基準、MSPK モデル、PBPK モデル等、様々なアルゴリズムおよびモデルを用いて判断することができる。酵素誘導/ダウンレギュレーションが *in vivo* で生じる可能性を否定できない場合は、*in vivo* 薬物相互作用試験の実施が推奨される。

In vivo 薬物相互作用試験では、プローブ薬を単独で単回投与した時と比較して、被験薬の最大推奨用量の反復投与後に、プローブ薬（臨床の項、表6-4（旧Table 5）参照）の薬物動態を検討する。被験薬が薬物代謝酵素を阻害する可能性がある場合、被験薬投与期間の初期においてもプローブ薬の薬物動態を調べることが推奨される。可逆的阻害作用は投与開始時の方が大きい可能性があり、誘導作用は投与終了後に最も顕著となる可能性がある。誘導作用のスクリーニングを *in vitro* 試験の代わりに *in vivo* で行う場合、CYP3A、CYP2B6、CYP1A2に対する作用を対象に含めるべきである。*In vitro* 試験において、PXR/CARの活性化を介した誘導が示された場合、*in vivo* 誘導試験を実施してCYP3Aに対する作用を評価しなければならない。CYP3Aが被験薬による誘導を受ける場合は、CYP2C9やCYP2C19などの他の酵素についても誘導を評価する。CYP2B6が異常に高度に誘導される場合など、*in vitro* データで観察された誘導作用にCARが主要な役割を果たしていることが示唆される場合は、CYP2B6のプローブ薬を用いた *in vivo* 試験の実施を検討することが必要である。

in vivo 薬物相互作用試験において、明らかな誘導またはダウンレギュレーションが観察された場合、同じ制御経路を介して制御を受ける他の酵素またはトランスポーターも、被験薬の影響を受ける可能性

が高い。したがって、被験薬の *in vivo*での誘導作用が評価された場合、またはダウンレギュレーションが観察された場合は、必要に応じて共制御される酵素およびトランスポーターに対する作用を、*in vivo*で定量することが望ましい。以下に、被験薬が代謝酵素を誘導/ダウンレギュレーションする可能性を検討するためのフローチャートを示す(図4-3)。

図 4-3 被験薬が代謝酵素を誘導/ダウンレギュレーションする可能性の検討ーフローチャート (Decision Tree) :

1) カットオフ基準

1-1) mRNAの増加量(fold induction)に基づく評価

誘導/ダウンレギュレーションの結果は各ドナーについて別々に評価し、特定の酵素に対する作用が顕著であったドナーの細胞を、以降の評価において使用する。mRNA レベルを対照(溶媒添加)と比較し、上述した濃度の被験薬処理によりその増加が濃度依存的であり、100%を超える場合には、*in vitro*試験での酵素誘導は陽性であるとみなす。観察された濃度依存的な mRNA 増加が 100%未満の場合は、その mRNA の増加が陽性対照による反応の 20%未満である場合に限り、結果を陰性とみなすことができる。

一方、mRNAが50%以上減少し、それが細胞毒性に起因するものではないと考えられる場合、酵素のダウンレギュレーションを示唆している可能性があるため、この時間依存的現象を評価するための *in vivo* 試験の実施が推奨される。

1-2) EC50 および Emax の算出に基づく評価

In vitro 試験より得られた EC50 および Emax を用いて、以下に示す式 3 に基づいて R 値を算出する。

式 3

$$R=1/(1+d \cdot Emax \cdot [I]/(EC50+[I]))$$

ここで、EC50 は最大効果の 50%の効果をもたらす濃度、Emax は最大誘導作用である。[I]は被験薬の最高血中総濃度(非結合形+結合形)である。dは換算係数で、ここでは d=1 と仮定する。

R<0.9 の場合は、当該被験薬を酵素誘導薬とみなす。

2) MSPK モデル

*In vitro*での誘導データから *in vivo*での薬物の誘導作用を評価するのに、MSPKモデルを使用することができる(Fahmi and Ripp, 2010、ほかにもあり)。この方法を用いる際には、*in vitro*試験系(特定のロットの肝細胞)について適格性の評価が必要である。適格性評価は、異なる誘導能を示す複数の誘導薬のEC50およびEmaxを測定し、これら誘導薬で観察される作用をMSPKモデルからどの程度予測できるかを明らかにすることによって行う。4.2.1.4項のMSPKモデルで提示したアプローチで、対照誘導薬で観察された *in vitro*の誘導パラメータを用いて、特定のプローブ薬(ミダゾラムなど)に対するこれら誘導

薬の *in vivo* 作用を予測する。次に、予測された作用を、プローブ薬の実際の *in vivo* 作用と比較し、*d* 値を推定する。

この *d* 値を使用して、MSPKモデルおよび被験薬のEC50とEmaxの測定値を用いて、被験薬による *in vivo* 作用を推定することができる。

MSPKモデルにおいて、誘導作用の推定に用いる被験薬の濃度は、誘導される酵素が主に存在する部位の濃度でなければならない。すなわち、肝細胞や腸管細胞内の濃度が血中濃度よりも高くなる可能性を検討しなければならない。したがって、非結合形の門脈血中濃度と腸管細胞近傍の最高濃度を用いて、表4-3中の「誘導」項の式に基づいて酵素誘導作用を推定する。さらに、被験薬が肝細胞で高度に代謝されることが示されており、EmaxおよびEC50の測定に際して、肝細胞の適格性評価に使用した陽性対照の誘導薬よりも大きな影響を受ける可能性がある場合には、感度分析等により、この点を誘導作用の評価において反映させる必要がある。

誘導および阻害(可逆的またはTDI)によって生じるプローブ薬の曝露量の変化を推定する場合、薬物相互作用の定量的評価にMSPKモデルを使用した経験は限られていること、および薬物相互作用を考慮して用量を最適化するためには、正味の薬物相互作用の経時的变化を評価しなければならない可能性があることから、この段階をスキップし、直接 *in vivo* 試験の実施が推奨される。

また、被験薬によっては、その溶解性や細胞毒性等の原因により、*in vitro* 試験において被験薬濃度を十分に高く設定できず、EC50およびEmaxの測定が困難な場合も考えられる。その場合、前述のカットオフ基準による評価にしたがって陽性とみなされる被験薬については、同様に *in vivo* 試験の実施が推奨される。

3) PBPK (動的) モデル

酵素誘導に関して、PBPKモデルに基づいて薬物相互作用の程度を予測するための一般的スキームは酵素阻害作用の予測と同様、図4-3に示した通りである(4.2.1.4項参照)。

In vivo 試験が必要かどうかを判断する際は、「生物学的同等性」の評価に使用する基準の下限(例: 集団ベースのPBPKモデルを用いて予測されるAUC比<0.8)を、初期のカットオフ値として使用できる。

4.2.1.7薬物相互作用のモデリング解析において一般的に考慮すべき事項

薬物相互作用に関連する *in vitro* の観察を *in vivo* の事象に関連づけるためにはモデリングが必要であり、この目的のためには比較的単純なカットオフ基準とより精密な生理学的薬物速度論(PBPK)モデルなどの動的モデルが利用できる。現在のところ、モデリングとシミュレーションはCYPに関連する薬物相互作用の解析で報告された例が多い。モデリングとシミュレーションは、以下のように、検討を行う目的に応じて、使用するモデルや実施するシミュレーションの性質を十分理解するとともに得られた結果の信頼性の検証が必要である。