

(検討手順については4.1項, 4.2項及び図4-1, 図4-2を参照)。

また, CYP3A阻害を示す飲食物中の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するため, CYP3Aにより主として代謝される経口薬をグレープフルーツジュースと一緒に服用した場合にバイオアベイラビリティが上昇したとの報告がある⁷⁾。

CYP3Aの基質薬はP-gpの基質薬であることが多いが, 薬物相互作用へのCYP3A及びP-gpの寄与を分離して評価することは現状では容易ではなく, その両方が阻害あるいは誘導された場合の薬物相互作用のリスクを念頭に置いて評価する。

3. 組織移行及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)によることから, 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が関与する。

3.1 血漿蛋白結合

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。*In vitro*で血漿蛋白質との結合率が高い被験薬については, 結合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, 被験薬が結合蛋白質から遊離し, 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, 被験薬の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には, 血漿蛋白質と強く結合することが知られる薬物との併用により重要な相互作用を受ける可能性があることを考慮する必要がある。

- 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及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。

一方で, 血漿蛋白結合の置換を介して併用薬の体内動態に影響を及ぼす薬物は, 結合対象の蛋白質濃度と少なくとも同程度の血漿中濃度を示す薬物に限られることにも注意が必要である。なお, 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, 血漿蛋白結合率の変動が予想される臨床薬物相互作用試験では, 非結合形濃度の測定も考慮すべきである。実際に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、併用薬による血漿蛋白結合の置換は血漿中の被験薬の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は低下するが、非結合形濃度には変化が認められないことが報告されている⁸⁾。

3.2 組織移行及び体内分布

組織中の特定の成分との結合の変動による薬物相互作用に加えて、各組織に発現する取り込み・排出トランスポーターの阻害や誘導が生じることにより被験薬の組織分布が変化する可能性にも留意すべきである。

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生じることがある。

3.2.2 組織への取り込み及び排出におけるトランスポーターの関与

肝臓、腎臓、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にはトランスポーターが発現しており、各組織への薬物の分布（取り込み及び排出）に関与する。トランスポーターを介した能動輸送過程において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、排出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^{留意事項(1)}。

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が生じる場合は、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（5.1項、5.2項参照）。

4. 薬物代謝における薬物相互作用

薬物代謝が関連する相互作用試験では、相互作用が生じる代謝経路を特定し、被験薬が被相互作用薬である（薬物相互作用を受ける）場合は全体の消失経路の中でその経路が占める重要性を定量的に把握し、また相互作用薬である（薬物相互作用を与える）場合は、阻害、誘導などの機序によりその経路の活性に与える影響を評価することが重要である。薬物代謝においては1つの酵素が多数の薬物の消失に関与することが一般的であり、中でも最も重要な酵素であるCYP3Aは基質特異性が低く薬物相互作用に関係する薬物の数が非常に多い。そのために網羅的な臨床試験の実施は難しく、比較的少数の臨床薬物相互作用試験の結果から、モデリングとシミュレーションを利用して評価することが有用な場合も考えられる（4.3.3項参照）。

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 (P450) が関連する。また、UDPグルクロン酸転移酵素 (UGT) などの非P450酵素が薬物相互作用に関与することも知られている⁹⁾。本項では、主としてP450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。4.1項で主要消失経路の特定と薬物相互作用の寄与の程度の評価について、4.2項においてP450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 (図4-1~3)。また、*in vitro*における代表的なP450酵素反応、P450阻害薬及び誘導薬の例、*in vivo*における代表的なP450の阻害薬、誘導薬及び基質薬の例を示した (表4-1~3, 表7-1~3)。

4.1 被験薬の主要消失経路と *in vivo* 寄与率の評価

被験薬が被相互作用薬となる可能性を検討し、薬物相互作用の寄与の程度を定量的に評価するためには、経口薬の場合、被験薬の経口投与時のクリアランス (CL/F) に対する、薬物相互作用を生じる経路の *in vivo* における寄与率 (Contribution Ratio, CR) が重要である¹⁰⁾。被験薬の主要消失経路が代謝である場合は、4.1.1 及び 4.1.2 に示す検討手順に従って寄与率の大きい酵素分子種を特定し、その寄与の程度を可能な限り明らかにする必要がある (図 4-1 参照)。一般に、*in vitro* 代謝試験から CR を推定する場合には、ヒト肝ミクロソームなどにおいて当該酵素で代謝される割合 f_m (fraction metabolized) を代用する^{*留意事項 (2)}。 *In vitro* 代謝試験及び臨床薬物動態試験の結果から、特定の代謝酵素による消失が被験薬の消失全体の 25%以上で寄与すると推定される場合は、当該酵素の相互作用薬 (阻害薬、誘導薬：表 7-1, 表 7-2 参照) を用いて臨床薬物相互作用試験の実施を考慮する。なお、被験薬の臨床適応上の投与経路が経口投与であっても、必要に応じて静脈内投与試験を実施することで、被験薬の全身クリアランスにおける腎排泄の寄与を明らかにすることができる。

被験薬がプロドラッグで作用の本体が活性代謝物である場合、あるいは薬理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AUCに基づいて推定された *in vivo* における薬理作用が全体の作用の50%以上を占める場合、又は有害な作用を引き起こすと疑われる場合は、当該代謝物の主要生成経路及び消失経路に寄与する代謝酵素を特定し、未変化体と同様に相互作用を受ける可能性を検討する。

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同定

In vitro 試験の実施においては、*in vivo* における代謝プロファイルを反映する実験方法、試験系、適切な基質及び相互作用薬並びにその検討濃度を選択する。通常、酵素の種類に応じて、ヒト肝及び小腸ミクロソーム並びに S9 画分、ヒト肝細胞、ヒト酵素の発現系ミクロソームなどを選択する。P450 及び UGT は、発現系を除き、上述の全ての系に存在する (通常、発現系細胞は 1 種類の酵素しか高レベルに発現していない)。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などの可溶性画分に存在する酵素は、S9 画分及び肝細胞に含まれる。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 代謝試験は、通常、治療上意味のある被験薬濃度を用いて、可能ならば線形条件下において実

施する。多酵素系では、各酵素の選択的阻害薬（表 4-2 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、阻害薬の代用として使用可能である。代謝に関与する主要な酵素を *in vitro* で特定するためには、複数の *in vitro* 試験系で評価を行い、結果を比較することが推奨される*留意事項 (3)。

代謝は、被験薬の消失速度又は代謝物の生成速度として評価する。特定の代謝経路を触媒する酵素活性を評価する場合には、被験薬又は指標薬の減少よりも代謝物の生成速度として検討することが推奨される。一方で、被験薬の消失全体における当該代謝経路の寄与を把握する目的では、当該被験薬の消失速度として評価することが重要である。

4.1.2 マスバランス試験による主要消失経路の同定及び定量的評価

ヒトにおけるマスバランス試験は体内における薬物の物質収支を把握する試験であり、未変化体に加えて代謝物の薬物動態に関する情報、及び主要消失経路の同定に有用な情報が得られる。マスバランス試験で得られた情報を *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及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。ただし、マスバランス試験が主要消失経路の同定に特に有用なのは、その経路が単純な場合であり、多段階の代謝が複雑に絡み合っている場合には、その解釈に注意が必要である。なお、未変化体及び既知の代謝物の回収率が高く、未知の代謝物が少ない被験薬の場合には、必ずしもマスバランス試験を放射性標識体で実施する必要はない。

マスバランス試験では、通常代謝的に安定な位置に放射標識した被験薬を投与し、総放射能の AUC と、未変化体及び代謝物の AUC、並びに尿中及び糞便中排泄量を測定する。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、薬物関連物質の総 AUC（マスバランス試験の場合は総放射能の AUC）に対する割合が 10% を超える代謝物については、その化学構造を推定することが推奨される。この場合、通常は群平均 AUC、例えば、0 時間から無限大までの AUC (AUC_{inf}) に基づいて代謝物の割合を算出する。

マスバランス試験で得られた情報と *in vitro* 試験結果に基づき、*in vivo* での被験薬の主要な消失経路及びその経路に関与する酵素の寄与率の推定の際には、通常、以下の手順で行う。被験薬の化学構造から予想される代謝反応及びマスバランス試験などで測定された代謝物に基づき、代謝経路を推定し、次に、特定の経路において一次代謝物及び二次代謝物として排泄される薬物関連物質に基づき、各代謝経路による消失の定量的な寄与率を推定する。被験薬の総消失量（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、投与量又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。相当量の未変化体が糞便中に認められ、これが胆汁（又は消化管壁）分泌に由来することを確認できない場合、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を計算式の分母とする。以上の手順などにより、各（主要）消失経路の *in vivo* 寄与率（最大の推定値）を算出する。

4.2 *In vitro*試験による臨床試験を実施する必要性の評価

*In vitro*酵素阻害試験は、ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、評価対象の酵素の発現系ミクロソームなどを用いて実施する。反応液中での被験薬の代謝が速い場合には、被験薬の濃度低下を最小限に抑えるため、被験薬と比較して十分に代謝が速い指標薬を使用して K_i （阻害定数：酵素-阻害薬複合体からの阻害薬の解離定数）の評価を行う。選択的阻害薬（表4-2参照）を使用して陽性対照実験を行い、同様の方法で評価された K_i 値などの文献値と比較し、試験系の妥当性を確認する。

*In vitro*酵素誘導及びダウンレギュレーション試験では、初代培養肝細胞（新鮮又は凍結保存）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など）、核内受容体結合アッセイ、リポーター遺伝子アッセイなど、他の*in vitro*試験系から得られたデータは、初代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、初代培養肝細胞を用いて得られる結果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、適切な溶媒対照及び陽性対照を評価に含め、試験系の妥当性を担保する*留意事項⁽⁴⁾（表4-3参照）。評価項目としては、被験薬の酵素阻害作用により酵素誘導を見落とすことを避けるため、標的遺伝子のmRNA発現量の変化を用いることが推奨される。ただし、被験薬が酵素阻害作用（特に時間依存的阻害、4.2.1.3項参照）を有していないことが明らかな場合には、酵素活性を評価項目とすることも可能である。この際、濃度依存的な酵素活性の変動（誘導）が認められた場合には、mRNAを評価項目とする場合と同様の基準で臨床薬物相互作用試験の必要性を判断する（4.2.1.6項参照）。

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

P450には多くの分子種が知られているが、主要な分子種はCYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6及び3A（CYP3A4及びCYP3A5）である。被験薬がこれらの分子種による代謝を受ける場合は、*in vitro*代謝試験及び臨床薬物動態試験からその消失への寄与を推定する。また、*in vitro*試験からP450に対する阻害や誘導の可能性が考えられる場合には、臨床薬物相互作用試験を実施する（図4-1～3参照）。被験薬の代謝における主要なP450分子種の寄与が小さい場合には、他のP450分子種（例：CYP2A6, 2E1, 2J2, 4F2）あるいはP450以外の第I相酵素や第II相酵素の基質となる可能性を検討する。

4.2.1.1 被相互作用薬となる可能性を検討する*in vitro*試験系

P450分子種の寄与率の推定は、一般的にヒト肝ミクロソームを用いた試験系により検討する。試験系の妥当性は、通常、反応時間依存性及びミクロソーム蛋白量依存性などを、代謝物の生成速度を指標として評価することで確認する。用いる被験薬濃度などの試験条件によりP450分子種の寄与率が異なる場合には、*in vivo*の条件を考慮して評価する必要がある¹¹⁻¹³⁾。

4.2.1.2 被相互作用薬となる可能性を検討する臨床試験の必要性

*In vitro*代謝試験及びマスバランス試験などの結果から、特定のP450分子種による代謝が被験薬の消失

全体の25%以上に寄与する場合には*留意事項⁽⁵⁾、被験薬がそのP450分子種の関与する薬物相互作用の被相互作用薬になる可能性があることから、適切な代謝酵素阻害薬及び誘導薬（7.6項、7.7項、表7-1、表7-2参照）を用いての臨床薬物相互作用試験の実施を考慮する（図4-1参照）。当該試験においては、可能な限り最初に強い阻害薬（7.6項、表7-1参照）を用い、被験薬の薬物動態の変化の程度を評価する。試験結果により薬物相互作用がないと判断された場合（7.2項、図4-1参照）、あるいは相互作用が軽微である場合には、被験薬の消失全体における当該酵素の寄与は小さいことが多く、臨床薬物相互作用試験を追加して実施する必要性は低い。一方、強い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影響を臨床薬物相互作用試験で必要に応じて評価する。PBPKモデルの妥当性が確認され臨床試験の結果を矛盾なく説明できる場合は、モデルによる評価も可能である。それ以外の阻害薬との相互作用の評価は、通常の臨床試験の中での併用事例データに基づき検討することも可能である。誘導薬との臨床薬物相互作用試験は、阻害薬との臨床薬物相互作用試験の結果から、シミュレーションなどにより臨床的に問題となる薬物相互作用が生じるリスクがあると判断された場合には必要となる。なお、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。

4.2.1.3 相互作用薬（P450阻害）となる可能性を検討する *in vitro*試験系

被験薬がP450に対して阻害作用を及ぼすか否かについて、*in vitro*試験系により評価する（図4-2参照）。通常、主要な分子種であるCYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6及び3A1に対する阻害作用を検討する。表4-1に、*in vitro*におけるP450のマーカー反応を示す。*In vitro*試験で使用する基質の濃度は文献を参照し、通常、 K_m 値付近かそれ以下とする。CYP3Aの阻害作用は、ミダゾラムとテストステロンなどの基質結合部位の異なる複数の基質を用いて評価する¹⁴⁾。

一定範囲の濃度で被験薬の阻害作用を評価し、当該P450のマーカー反応に対する K_i 値を算出する。被験薬の濃度範囲は、臨床で起こりうる阻害が適切に評価可能となるよう十分に高濃度まで設定する。設定する被験薬の濃度範囲は、予想される酵素阻害部位（肝臓、小腸）、投与方法、剤形、薬物動態パラメータ（ C_{max} 又はAUC）に応じて変わるが、通常は、 C_{max} （結合形＋非結合形）の10倍以上を含む濃度設定とし、濃度依存的な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 値の算出の際には、反応系における被験薬の非結合形濃度が総濃度よりも顕著に低いと予想される場合、反応液中の非結合形濃度の推定値又は実測値を使用する¹⁵⁾。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などにも当てはまる。

未変化体に加えて、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。評価対象とすべき判断基準としては、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とする。その他の代謝物においても、強い酵素阻害が疑われる理由がある場合には阻害作用を検討する。*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、

*in vitro*での代謝物による酵素阻害試験の実施は、臨床薬物相互作用試験のデザイン及び試験結果の解釈に有用である。また臨床薬物相互作用試験では、薬物相互作用に関連する可能性のある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においても、未変化体と同様、代謝物の C_{max} （結合形＋非結合形）の10倍以上を含む濃度設定とし、 K_i 値の算出を行う場合には、必要に応じて、ミクロソームなどへの結合率を推定あるいは実測するなどして非結合形濃度に補正する。

*In vitro*試験において、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）があると判断する。TDIが認められた場合は、 k_{inact} 値（最大不活性化速度定数）及び K_i 値（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¹⁶⁾。*In vitro*試験の条件（例えば、蛋白質の濃度が高く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、ミクロソーム蛋白への非特異的な結合を評価する必要があるなど）が結果に影響を及ぼす場合があることを十分に考慮してTDIを評価する必要がある。

4.2.1.4 相互作用薬（P450阻害）となる可能性を検討する臨床試験の必要性

被験薬が阻害薬となる可能性を評価するための臨床薬物相互作用試験を実施するか否かは、*in vitro*データなどに基づく、以下に述べるカットオフ基準による評価を行う（図4-2参照）。カットオフ基準に加えて、静的薬物速度論（MSPK）モデル、生理学的薬物速度論（PBPK）モデルなどを用いた検討が可能である（4.3項参照）。カットオフ基準は、以下で述べる式に従い、特定の酵素反応に対する被験薬の存在下と非存在下における基質の固有クリアランス値の比（R値）を算出する。算出したR値に基づき、臨床薬物相互作用試験を実施する必要性の有無を判断する。被験薬に関する評価においてこの基準を超える場合には、薬物動態学的相互作用を受けやすい基質薬（7.8項及び表7-3参照）を用いて、そのリスクを臨床試験で検討する。

モデルを用いた検討においては、生物学的同等性の評価に使用するAUC比（AUCR）の90%信頼区間が0.8～1.25を、判断基準として使用できる。すなわちモデルにより推定されるAUCRが0.8～1.25の範囲外であった場合には、原則として臨床薬物相互作用試験が必要になる。なお、阻害（可逆的又はTDI）及び誘導の双方向の作用によって生じる薬物相互作用の定量的評価にモデルを適用した経験は限られていることから、臨床薬物相互作用試験を実施する必要性の有無を判断する際には、現状では阻害と誘導は別個に評価した上で保守的な判断をすべきである¹⁷⁾。

1-1) 可逆的阻害

R値は、*in vitro*阻害定数（ K_i ）及び臨床最大用量を投与したときに*in vivo*で達成される阻害薬（被験薬又は代謝物）の最高濃度[I]により以下の式に従って決定される。

式1

$$R=1+[I]/K_i$$

[I] : C_{max} (結合形濃度+非結合形濃度), あるいは, $[I]_g$: 投与量/250 mL

K_i : *in vitro* 試験で測定した阻害定数

K_i 値の代わりに 50%阻害濃度 (IC_{50}) を用いる場合もある。ただし, IC_{50} 値を使用する場合は, 基質濃度が K_m 値付近の場合は競合阻害を仮定して $K_i = IC_{50}/2$, あるいは基質濃度が K_m より明らかに小さい線形条件下では $K_i = IC_{50}$ とするなど, 科学的な根拠を示す必要がある。

通常は, 保守的な [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, R 値のカットオフ基準は, 1.1 を使用する^{17,18)}。経口投与薬の場合は, 消化管で高発現する P450 (例: CYP3A) を阻害する可能性に留意すべきであり, 消化管内の最高濃度 $[I]_g$ として投与量/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 (但し, 低溶解性化合物には当てはまらない場合がある)。 $[I]_g$ を用いる場合, 代替 R 値 ($R=1+[I]_g / K_i$) のカットオフ基準は 11 を使用する。 R 値が 1.1 又は 11 (代替 R 値) を下回る場合は, 臨床薬物相互作用試験の実施は不要である。この基準を上回る場合は, 4.3 項に示すモデルを用いた検討結果も考慮した上で, 最も R 値が大きい P450 を対象に, 薬物動態学的相互作用を受けやすい基質薬 (7.8 項, 表 7-3) を用いる臨床薬物相互作用試験を実施する。当該臨床薬物相互作用試験において薬物相互作用がないと判断された場合 (7.2 項, 図 4-2 参照) には, 他の P450 に関する臨床薬物相互作用試験の実施は不要である。

1-2) 時間依存的阻害 (TDI) *留意事項 (6)

P450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, 必ずしも完全には可逆的でない場合, TDIがみられることがある。TDI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, 生成した中間体が不可逆的に共有結合又は強力かつ準不可逆的に非共有結合することに起因すると考えられる。

*In vitro*での標準的なTDI評価方法では, 基質を添加する前に被験薬を試験系でプレインキュベートする。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, *in vitro*試験でTDIのパラメータ (k_{inact} 及び K_i) を算出する¹⁶⁾。一般に, 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ており, 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, 阻害薬の濃度及びTDIのパラメータ (k_{inact} 及び K_i) に加えて, 酵素分解の速度定数 (k_{deg}) にも左右される (式2)。

式2

$$R = (k_{obs} + k_{deg}) / k_{deg}, \text{ ただし, } k_{obs} = k_{inact} \times [I] / (K_i + [I])$$

[I] : C_{max} (結合形濃度+非結合形濃度), あるいは, $[I]_g$: 投与量/250 mL

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

k_{deg} : 酵素の分解速度定数, k_{inact} : 最大不活性化速度定数, k_{obs} : 見かけの不活性化速度定数

*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（肝でR>1.1あるいは小腸でR>11）は、可逆的阻害の場合と同様に、4.3項に示すモデルを用いた検討結果も考慮した上で、薬物動態学的相互作用を受けやすい基質薬（7.8項、表7-3）を用いる臨床薬物相互作用試験を実施する。

4.2.1.5 相互作用薬（P450 誘導及びダウンレギュレーション）となる可能性を検討する *in vitro* 試験系
被験薬により、核内受容体又はその他のP450の発現制御経路への影響を介した代謝酵素の誘導又はダウンレギュレーション*留意事項⁽⁷⁾ が起こりうるため、薬物相互作用が生じる可能性を検討する（図4-3参照）。一般に、*in vitro*での検討に基づき、臨床薬物相互作用試験の必要性を検討するが、直接、臨床薬物相互作用試験で誘導を評価する場合もある。

通常、*in vitro* 試験で CYP1A2, 2B6 及び 3A（通常は CYP3A4）について酵素誘導作用を検討する。核内受容体である pregnane X receptor (PXR)の活性化により、CYP3A 及び CYP2C（CYP2C9 や CYP2C19 など）が共誘導されることから、CYP3A の誘導を評価する *in vitro* 試験の結果により誘導作用がないと判断された場合は、CYP3A の臨床薬物相互作用試験及び CYP2C の *in vitro* 又は臨床における誘導試験を更に行う必要はない。CYP3A 誘導試験の結果により誘導作用があると判断された場合は、CYP2C の誘導を *in vitro* 又は臨床試験のいずれかで検討する。CYP1A2 及び CYP2B6 は PXR とは異なる核内受容体（aryl hydrocarbon receptor (AhR) 及び constitutive androstane receptor (CAR)により誘導されるため、被験薬が CYP1A2 及び CYP2B6 を誘導する可能性は、CYP3A の試験結果に関わらず検討する。

検討対象の濃度範囲は、被験薬の薬物動態により異なり、*in vivo* の肝細胞で予測される最高濃度を含む3濃度以上で評価し誘導パラメータ（EC₅₀ 及び E_{max}）を算出する。一般に、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とする。通常は、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、増加率が100%を超える場合には、*in vitro* 試験での酵素誘導作用があるとみなす。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、*in vitro* 試験での酵素誘導作用がないとみなすことができる。

4.2.1.6 相互作用薬（P450 誘導及びダウンレギュレーション）となる可能性を検討する臨床試験の必要性

In vitro 試験より得られた EC₅₀ 及び E_{max} を用いて、以下の式3に基づきカットオフ基準として R 値を算出する*留意事項⁽⁸⁾。カットオフ基準に加えて、MSPK モデル、PBPK モデルなどを用いて検討することができる（4.3項参照）。

式3

$$R=1/(1+d \times E_{max} \times [I]/(EC_{50}+[I]))$$

[I] : C_{max}（結合形濃度＋非結合形濃度）

EC₅₀ : 最大効果の50%の効果をもたらす濃度、E_{max} : 最大誘導作用、d : 換算係数

カットオフ基準に基づく評価では d=1 を用いる。R<0.9 の場合は、当該被験薬を酵素誘導薬と判断する。

4.2.2 その他の薬物代謝酵素を介した薬物相互作用に関する検討方法^{*留意事項 (9)}

薬物の代謝に関与しているP450以外の第I相酵素（酸化，還元，加水分解，閉環及び開環反応に関与している酵素）として，モノアミン酸化酵素，フラビンモノオキシゲナーゼ，キサンチンオキシダーゼ，アルデヒドオキシダーゼ及びアルコール脱水素酵素，アルデヒド脱水素酵素などがある。これらP450以外の第I相酵素の基質である場合についても，被験薬の消失への寄与が大きい場合は，関与する分子種の同定及び寄与の程度を検討することが推奨される。被験薬がこれらの酵素の基質となる可能性については，同種同効薬や構造類縁化合物などの知見を踏まえて評価可能な場合もある。

第II相酵素のうち，被験薬が主にUGTで代謝される場合には，その消失におけるUGT1A1，1A3，1A4，1A6，1A9，2B7及び2B15などの寄与の程度について検討する（図4-1参照）。この場合には，主要な代謝酵素であった分子種に加えて，比較的多くの医薬品の代謝に関与することが知られているUGT（UGT1A1，UGT2B7など）に対する阻害作用を検討することが推奨される（図4-2参照）。

被験薬あるいは併用薬が上記以外の酵素により主に代謝される場合においても，その酵素に対する阻害作用を評価することが望ましい。すなわち，ソリブジンと5-フルオロウラシルの併用における有害作用発現事例のように，被験薬との併用が想定される薬物の主要な代謝経路に，P450やUGT以外の酵素の寄与が大きい場合には，被験薬及びその代謝物の当該酵素に対する阻害作用を検討すべきである。これらの試験で得られた結果を基に，臨床試験を実施する必要性を評価する際の考え方は，P450の場合に準ずる。

4.3 薬物代謝の関与する相互作用のカットオフ基準とモデルによる評価

臨床薬物相互作用試験の必要性を判断する目的には，基本的にカットオフ基準を用いる。しかし，カットオフ基準では併用薬の性質は考慮されないため，臨床試験を計画する場合には，モデルを用いた検討が有用な場合がある^{*留意事項 (10)}（図4-2，図4-3参照）。これらの検討の目的には，MSPKモデル，又はPBPKモデルなどが使用できる。

4.3.1 カットオフ基準に基づく評価

カットオフ基準は，被験薬の臨床における薬物相互作用のリスクを判断するための，*in vitro*データなどの閾値である。偽陰性（false-negative）の判断を避け，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ように，カットオフ基準は保守的な設定を用いる。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す。

4.3.2 静的薬物速度論（MSPK）モデル^{*留意事項 (11)}

MSPKモデルは，代謝経路の寄与率を考慮し，相互作用が生ずる部位を小腸と肝臓に区別するなどの点で，相互作用の機序を組み込んでいる（式4）。また，薬物濃度の時間による変化を考慮しないなどの単純化を行うことで，PBPKモデルと比較した場合に解析が容易であることは1つの利点と考えられる。誘導につい

ても、MSPK モデルを使用した相互作用の解析例が報告されている¹⁹⁾。

一方で MSPK モデルを用いた解析では、濃度の時間変化を考慮しないことから、通常、その影響を過大評価する傾向がある。また、可逆的酵素阻害と TDI、並びに酵素誘導の作用が組み込まれており、双方向の作用を有する被験薬に関して臨床薬物相互作用試験を実施する必要性の有無を判断する際には、その使用に注意が必要である（4.2.1.4 項参照）。

式 4

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

式中の A, B, C は、それぞれ TDI, 誘導, 可逆的阻害を指し、下記の補足表に記載のとおりである。F_g は薬物が消化管上皮細胞に吸収後、門脈血に到達する割合で、消化管上皮細胞内で代謝を受ける場合に小さくなる。f_m は阻害（誘導）を受ける P450 を介した基質の代謝固有クリアランスの、肝臓全ての代謝固有クリアランスに対する割合である。

式 4（補足表）

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」及び「g」はそれぞれ肝臓及び消化管を指し、[I]_h 及び [I]_g はそれぞれ肝細胞中及び消化管上皮細胞中の被験薬濃度を示す。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。

4.3.3 生理学的薬物速度論（PBPK）モデル^{*留意事項（12）}

PBPK モデルでは、時間推移を考慮した薬物濃度の変化が記述でき、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の評価に加え、トランスポーターや代謝物の寄与など、複雑な相互作用の評価が理論的に可能とされる（図 4-2、図 4-3 参照）。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。

PBPK モデルを相互作用の予測に用いる際には、被験薬（特に相互作用薬として）の血中濃度推移がモデルのパラメータに基づき適切に記述されることが必要である。一般に、*in vitro* の情報のみから血中濃度推移を正確に予測することは困難であり、したがって PBPK モデルによる相互作用の解析は、被験薬の薬物動態の情報が臨床試験において得られる前に行っても、正確な予測結果が得られないことに注意すべきである。

PBPKモデルに基づいた予測は、臨床薬物相互作用試験の実施後にその正確さを確認すべきである。予測と試験の結果が著しく異なった場合は、それまでの情報を精査した上で、必要に応じて、以降に実施する *in vitro* 及び臨床薬物相互作用試験の計画に反映させる。PBPKモデルの妥当性が確認され、臨床試験の結果を矛盾なく説明できる場合は、同一の機序が関与する他薬物との相互作用についても、臨床上の注意喚起のためにモデリングとシミュレーションによる検討を活用できる場合もある。

4.4 生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品、生物起源由来医薬品）との相互作用*留意事項⁽¹³⁾

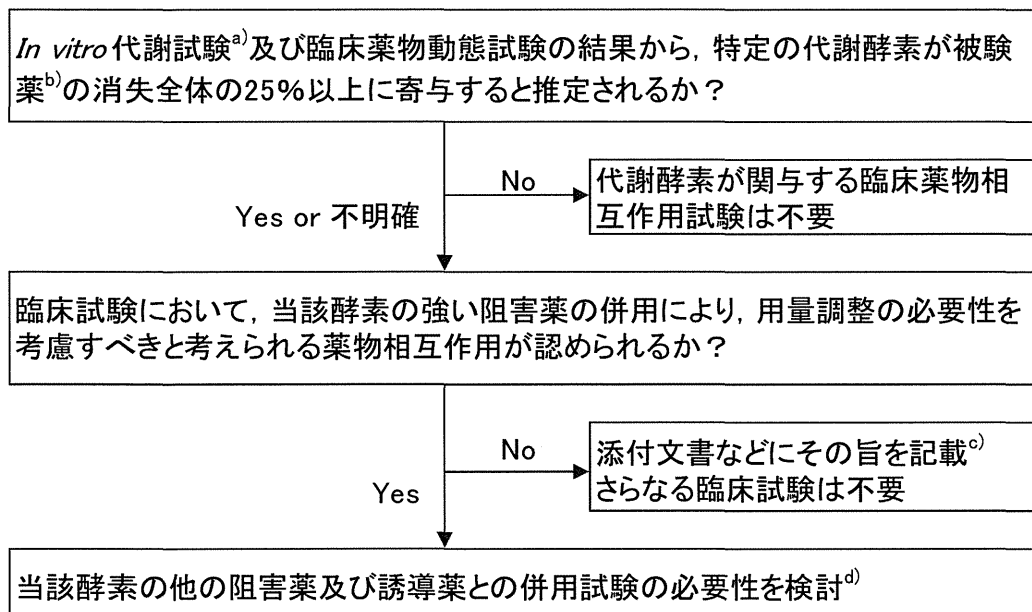
一般に、生物薬品は細胞表面の受容体との特異的な相互作用に続く標的細胞内への内在化とリソソームによる分解を介して消失する。P450などによる代謝又は薬物トランスポーターによる輸送を受けないため、生物薬品と併用薬との薬物動態学的相互作用の可能性は限定的と考えられる。

被験薬がサイトカイン又はサイトカイン修飾因子である場合、被験薬及び併用薬の有効性及び安全性の観点から、必要に応じてP450又はトランスポーターに対する被験薬の影響を評価するための臨床薬物相互作用試験を実施することを検討すべきである。

同種同効薬で薬物動態学的相互作用又は薬力学的相互作用の機序が判明しており、これに基づく臨床薬物相互作用の報告がある場合、当該薬物相互作用が生じる可能性を検討するための *in vitro* 試験又は臨床薬物相互作用試験を実施すべきである。

さらに用法・用量などで規定される併用療法として、他の薬物（低分子医薬品又は生物薬品）と併用投与される予定の生物薬品については、必要に応じて、併用される薬物同士の相互作用の可能性を臨床試験で評価し、その際には薬物動態に対する作用に加えて薬力学的作用も評価することを検討すべきである。

図 4-1 被験薬が相互作用を受ける可能性の検討（被験薬の代謝に関与する酵素の同定）



a) 対象とする酵素：CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A;
UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7, 2B15; その他

*P450 以外の代謝酵素が主に寄与する場合には、既知の阻害薬及び誘導薬の有無から臨床薬物相互作用試験の実施可能性を判断する。

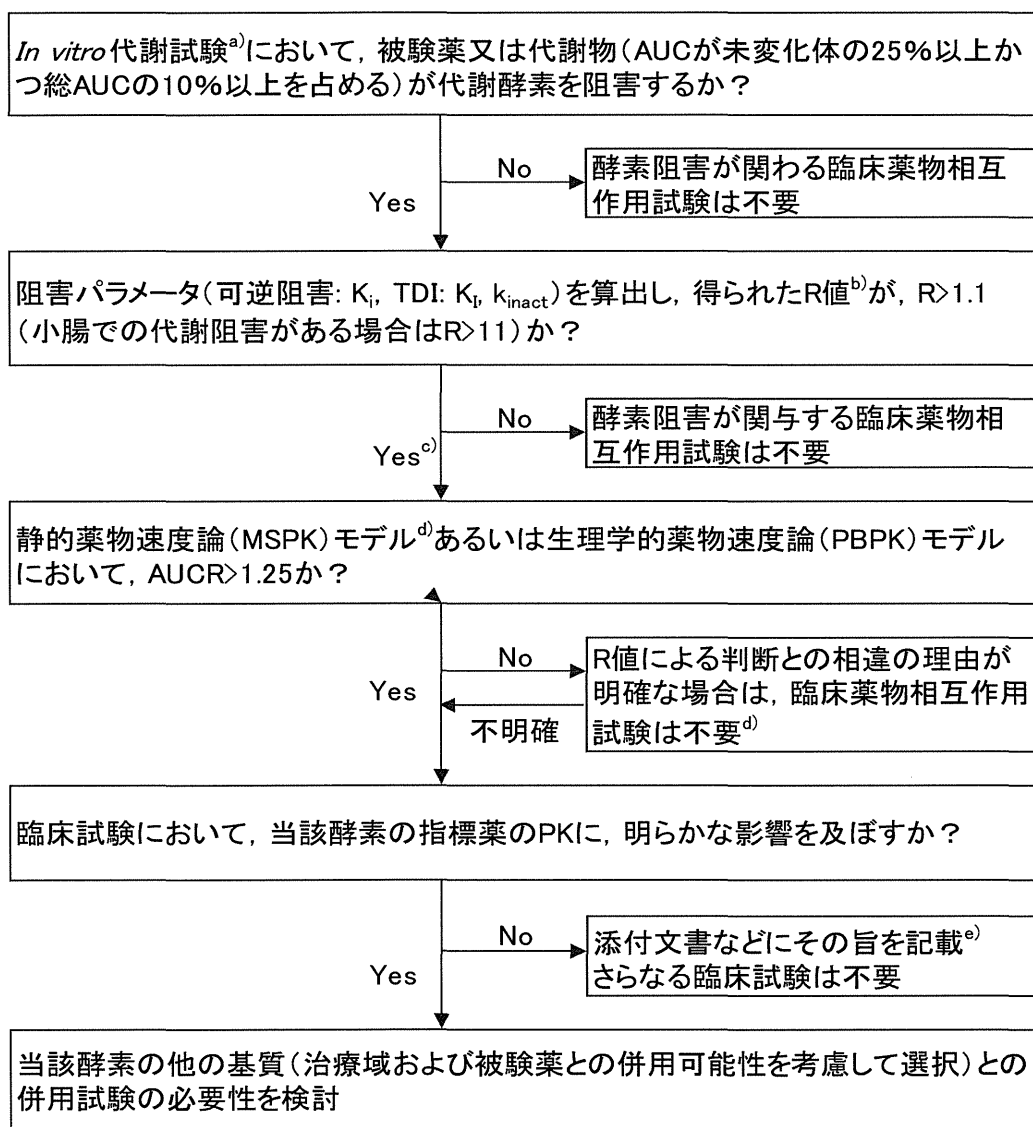
b) 被験薬の主要な活性代謝物についても同様に検討する。

*活性代謝物：被験薬がプロドラッグの場合、あるいは *in vivo*における薬理学的作用が全体の 50%以上を占める場合、又は有害な作用を引き起こすと疑われる場合。

c) 実施した臨床薬物相互作用試験は、相互作用の有無に関わらず臨床的に有用と考えられる情報を添付文書などに適切に記載する。

d) 被験薬との併用可能性を考慮して選択する。誘導薬との臨床薬物相互作用試験は、阻害薬との臨床薬物相互作用試験の結果から、シミュレーションなどにより臨床的に問題となる薬物相互作用が生じるリスクがあると判断された場合には必要となる。その場合は、原則として強い誘導薬を用いて試験を行う。

図 4-2 被験薬が代謝酵素を阻害する可能性の検討



a) 対象とする酵素：CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A; UGT1A1, 2B7; その他

*P450 以外は被験薬及び主たる併用薬の主要消失経路に關与する酵素が対象

* C_{max} (結合形+非結合形) の 10 倍以上を含む濃度設定とする

*時間依存的阻害の有無についても検討する

b) 可逆的阻害: $R=1+[I]/K_i$

TDI: $R=(k_{obs}+k_{deg})/k_{deg}$, $k_{obs}=k_{inact} \times [I]/(K_i+[I])$

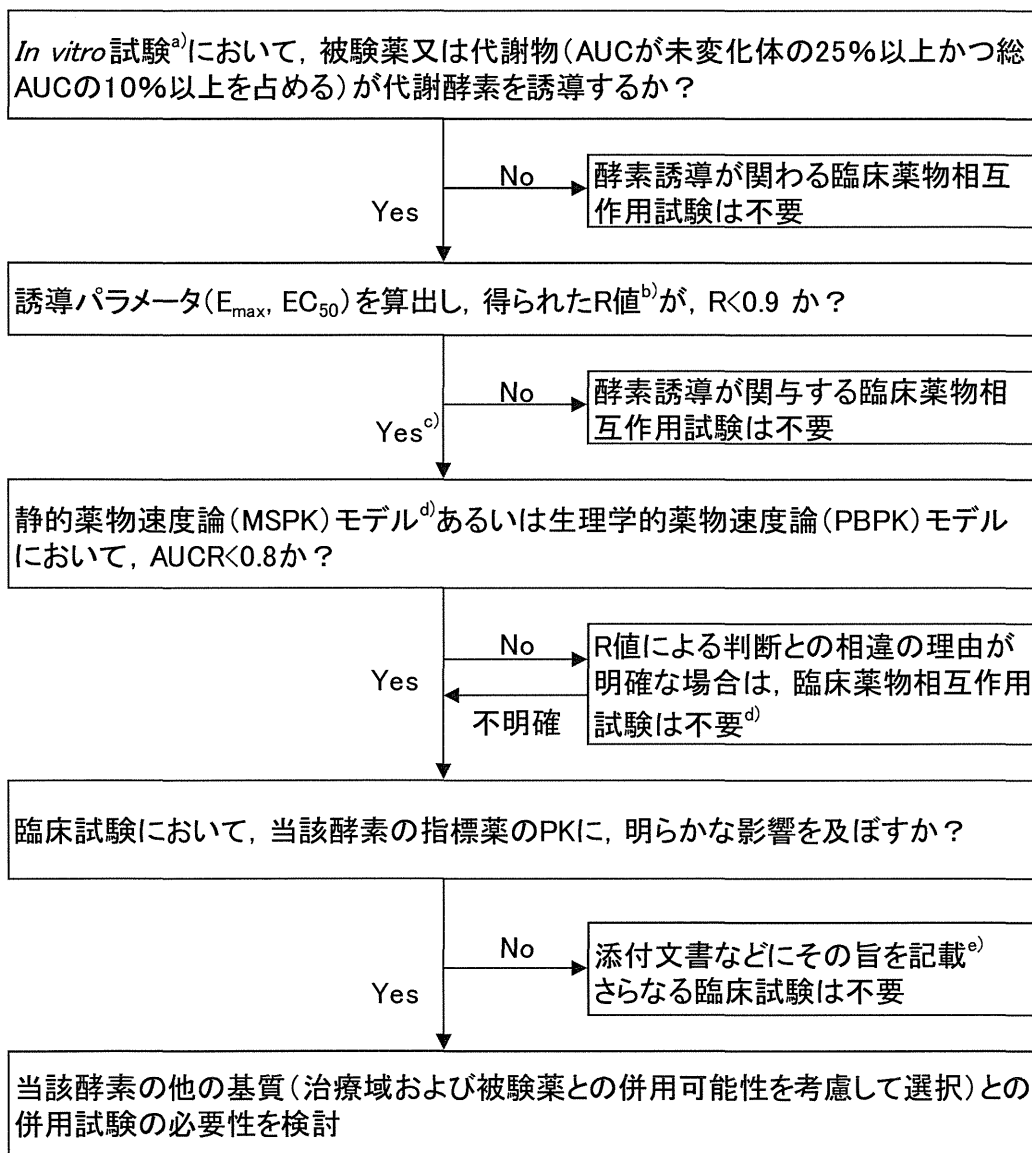
[I]: C_{max} (結合形+非結合形), 小腸の場合: 投与量/250 mL

c) PK モデルによる予測の精度が十分でないと考えられる場合には、直接、臨床薬物相互作用試験による評価に進んでもよい

d) 式 4 を参照 (4.3.2 項). 阻害と誘導の双方向の作用がある場合には、阻害と誘導を別個に評価する

e) 実施した臨床薬物相互作用試験は、相互作用の有無に関わらず臨床的に有用と考えられる情報を添付文書などに適切に記載する

図 4-3 被験薬が代謝酵素を誘導する可能性の検討



a) 対象とする酵素：CYP1A2, 2B6, 3A4

*必要に応じて、CYP2C9 分子種などを追加

* C_{max} (結合形+非結合形) の 10 倍以上を含む濃度で mRNA が 100%以上増加あるいは陽性対照の 20%以上増加

b) $R=1/(1+d \times E_{max} \times [I]/(EC_{50}+[I]))$, $d=1$ と仮定

[I] : C_{max} (結合形+非結合形)

c) PK モデルによる予測の精度が十分でないと考えられる場合には、直接、臨床薬物相互作用試験による評価に進んでもよい

d) 式 4 を参照 (4.3.2 項)。阻害と誘導の双方向の作用がある場合には、阻害と誘導を別個に評価する

e) 実施した臨床薬物相互作用試験は、相互作用の有無に関わらず

臨床的に有用と考えられる成績を添付文書などに適切に記載する

表 4-1 P450 の *in vitro* 酵素反応の代表例 ^{14, 20-22)}

酵素	マーカー反応
CYP1A2	Phenacetin 0-deethylation, 7-Ethoxyresorufin-0-deethylation
CYP2B6	Efavirenz hydroxylation, Bupropion hydroxylation
CYP2C8	Paclitaxel 6 α -hydroxylation, Amodiaquine N-deethylation
CYP2C9	S-Warfarin 7-hydroxylation, Diclofenac 4'-hydroxylation
CYP2C19	S-Mephenytoin 4'-hydroxylation
CYP2D6	Bufuralol 1'-hydroxylation, Dextromethorphan 0-demethylation
CYP3A*	Midazolam 1'-hydroxylation, Testosterone 6 β -hydroxylation

*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。

表 4-2 P450 の *in vitro* 阻害薬の代表例 ^{16, 20, 21, 23-25)}

酵素	阻害薬
CYP1A2	α -Naphthoflavone, Furafylline*
CYP2B6**	Sertraline, Phencyclidine*, Thiotepa*, Ticlopidine*
CYP2C8	Montelukast, Quercetin, Phenelzine*
CYP2C9	Sulfaphenazole, Tienilic acid*
CYP2C19**	S-(+)-N-3-benzyl-nirvanol, Nootkatone, Ticlopidine*
CYP2D6	Quinidine, Paroxetine*
CYP3A	Itraconazole, Ketoconazole, Azamulin*, Troleandomycin*, Verapamil*

*時間依存的阻害作用を有する。

**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。

表 4-3 P450 の *in vitro* の誘導薬の代表例 ²⁶⁻²⁹⁾

酵素	誘導薬*
CYP1A2	Omeprazole, Lansoprazole
CYP2B6	Phenobarbital
CYP2C8	Rifampicin
CYP2C9	Rifampicin
CYP2C19	Rifampicin
CYP3A	Rifampicin

*この表は例示であり、網羅的なリストでない。

5. 排泄における薬物相互作用

5.1 尿中排泄における薬物相互作用

薬物の多くは腎系球体で濾過され、尿細管で受動的に再吸収されるが、極性の高い薬物は一般に再吸収されずに尿中へ排泄される傾向がみられる。再吸収率の高い薬物（弱酸性、弱塩基性薬物）は、尿のpHを変化させる薬物を併用すると尿中排泄の変動による薬物相互作用が生じることがある。極性の高い薬物にはトランスポーターを介して尿細管中に能動的に分泌されるものが多く、また、尿細管から能動的に再吸収されるものもあり、その過程で薬物相互作用を起こすことがあるので十分な注意が必要である。腎疾患や加齢により薬物の尿中排泄機能が低下している患者では、腎クリアランス依存型の薬物が高い血中濃度を示すことが多いので、特に尿中排泄における相互作用によるさらなる血中濃度の上昇に伴う、薬効の増強及び副作用の発現に注意が必要である。

近位尿細管上皮細胞の血管側に発現し、薬物を血中から近位尿細管上皮細胞へ取り込むトランスポーターであるorganic anion transporter (OAT) 1及びOAT3や、尿管側に発現し、近位尿細管上皮細胞から尿中へ排出するトランスポーターであるP-gp, multidrug and toxin extrusion (MATE) 1, MATE2-K及びBCRPが阻害されるとこれらの基質の血中濃度が上昇する可能性がある(表6-1参照)。また、P-gp, MATE類及びBCRPが阻害されると血中濃度には変化を及ぼさず近位尿細管上皮細胞中の薬物濃度が増加する場合もある。血中から近位尿細管上皮細胞へ薬物を取り込むorganic cation transporter (OCT)2が阻害された場合、併用薬の血中濃度が増加する可能性がある。被験薬がこれらのトランスポーターの基質薬あるいは阻害薬となるかを検討し、臨床薬物相互作用試験を実施すべきかを判断する(図6-6, 図6-7参照)。薬物を輸送することが知られているトランスポーターとしては、他にも、近位尿細管上皮細胞の尿管側に発現し、近位尿細管上皮細胞から尿中へ薬物を排出するmultidrug resistance-associated protein (MRP)2やMRP4などがある。さらに、MATE類のように内因性物質の尿中排泄に関わるトランスポーターの場合、薬物による阻害により、クレアチニンなどの内因性物質の血中・組織中濃度の上昇が生じる可能性がある*留意事項⁽¹⁴⁾。このような尿中排泄に寄与しうるトランスポーターや、5.2項に示す肝取り込み及び胆汁中排泄に働くトランスポーターが関わる薬物相互作用の評価にあたっては、被験薬と類似した構造を有する薬物から得られた知見が役立つ場合がある。

代謝物の中にも併用薬との間で薬物相互作用を起こす場合があるため、4.1及び4.2項の記載を参照のうえ、代謝物についてもこれらのトランスポーターとの薬物相互作用を検討することを考慮する。

5.2 胆汁中排泄における薬物相互作用

多くの薬物は抱合体として、また、一部の薬物は未変化体のまま胆汁中へ排泄される。胆汁中への排泄はトランスポーターによることが多いので、薬物の併用により薬物相互作用が生じる可能性がある。肝細胞の血管側に発現し、血中から肝細胞中へ薬物を取り込むトランスポーターであるorganic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1及びOATP1B3が阻害されると、血中濃度が上昇することが知られている(表6-1参照)。被験薬がこれらのトランスポーターの基質薬又は阻害薬となるかを検討し、臨床薬物相

相互作用試験を実施すべきかを判断する（図6-4，図6-5参照）。薬物を輸送することが知られているトランスポーターとしては，他にも，肝細胞の血管側に発現し，血中から肝細胞中へ薬物を取り込むトランスポーターであるOCT1，肝細胞の胆管側に発現し，肝細胞から胆汁中へ薬物を排出するMRP2などがある。さらに，OATP類，MRP2やbile salt export pump（BSEP）のように胆汁酸やビリルビンなどの内因性物質の胆汁中排泄に関わるトランスポーターの場合，薬物による阻害により，内因性物質の血中・組織中濃度の上昇が生じる可能性がある*留意事項⁽¹⁴⁾。グルクロン酸抱合体などの抱合体は胆汁中に排泄され消化管内で腸内細菌により脱抱合され，再吸収されることが多い（腸肝循環）。抱合体の胆汁中排泄における薬物相互作用が生じると血漿中での未変化体の滞留時間やAUCに影響を与える可能性がある。

6. トランスポーターを介した薬物相互作用に関する検討方法

6.1 *In vitro* 評価において考慮すべき一般事項

トランスポーターの *in vitro* 試験系を用いた輸送評価を行う場合には，典型基質，典型阻害薬（表 6-5）を用いた検討もあわせて実施し，対象とするトランスポーターの機能が十分に観察できることを確認した試験系で，被験薬の試験を実施する。

被験薬が特定のトランスポーターの基質となる可能性を検討する試験の場合，被験薬の濃度は想定される K_m 値と比較して十分に低い濃度を用い，トランスポーターが飽和していない条件で試験を実施する必要がある。 K_m 値が正確にわからない場合などにおいては， K_m 値よりも十分に低いことが想定される濃度 2 点以上を用いて，被験薬の濃度と輸送速度との間に比例関係が確認できれば，その試験濃度範囲でのトランスポーターの飽和は否定できる。

一方，被験薬が特定のトランスポーターの阻害薬となる可能性を検討する試験の場合，異なる濃度の被験薬が典型基質の輸送に対して及ぼす作用を評価し，原則として K_i 値を算出する。基質として K_m 値が既知の薬物を用いる場合， K_m 値より十分に低い基質濃度を用いれば $IC_{50}=K_i$ とすることができる。 K_m 値が明らかでない薬物を基質として使用せざるを得ない場合には，十分に低い基質濃度 2 点以上を用いて，基質濃度と輸送速度との間に比例関係が確認できたとき，その基質濃度を用いた場合には $IC_{50}=K_i$ とすることができる。P-gp，BCRP，MATE1 及び MATE2-K のような排出トランスポーターにおいて，細胞系を用いた試験の場合には，medium 中濃度を基準とした見かけの IC_{50} 値により評価する。この場合においても，基質濃度が K_m 値と比較して十分に低い濃度を用いる必要がある。

6.2 吸収に関わるトランスポーターを介した薬物相互作用の *in vitro* 試験系

P-gp 及び BCRP はいずれも消化管に発現し，経口バイオアベイラビリティの変動に影響を及ぼしうる重要なトランスポーターである。このため，全ての被験薬について P-gp 及び BCRP の基質となる可能性を *in vitro* 試験で検討する（図 6-1，図 6-2 参照）。なお，これらのトランスポーターは，肝臓，腎臓及び脳にも発現しているため，薬物の消失及び中枢移行性にも影響を及ぼしうることから，経口以外の投与経路の

場合も検討が必要な場合がある。

In vitro 評価法としては、Caco-2 細胞又は特定のトランスポーターの過剰発現細胞株を用いる双方向性の経細胞輸送試験が望ましい。Caco-2 細胞には P-gp, BCRP, MRP2 などの数種類のトランスポーターが発現しているが、個々のトランスポーターに対する典型阻害薬を用いることができれば、それぞれのトランスポーターの関与を検討することができる。典型阻害薬を用いることができない場合は特定のトランスポーター遺伝子を過剰発現する細胞株を用いた試験が有用である。

P-gp や BCRP のような排出トランスポーターの関与について検討する際は、薬物の頂端膜側 (A) から基底膜側 (B) への透過性を、反対方向 (B から A) の透過性と比較する。B から A への透過性と A から B への透過性の比から Flux ratio (=B to A/A to B ratio) を算出する。発現細胞株を用いる場合は原則として、非発現細胞の Flux ratio を用いて補正し、Net flux ratio (= (発現細胞の Flux ratio) / (非発現細胞の Flux ratio)) を算出する。Net flux ratio (以後、Caco-2 細胞の場合は、Flux ratio と読み替える) が 2 を超える場合、あわせて対象となる排出トランスポーターの典型阻害薬を併用し、Net flux ratio が 1 付近になる、又は明らかに低下することを確認する。

また、被験薬の P-gp 及び BCRP に対する阻害を評価する場合、被験薬の消化管上皮細胞の頂端膜側における管腔内での予測最高濃度 (1 回に投与される最大用量/250mL, または溶解度が低い場合は、達成可能な最高濃度) を基に、検討濃度の設定を行う。IC₅₀ 値が 0.1 × 予測最高濃度よりも大きい場合、すなわち予測最高濃度/IC₅₀ < 10 となる場合、消化管におけるトランスポーターの *in vivo* での阻害を否定できる。IC₅₀ 値が 10 × 臨床最大用量を投与後の定常状態での総 C_{max} (非結合形薬物と結合形薬物濃度の総和) よりも大きい場合、すなわち臨床最大用量を投与後の定常状態での総 C_{max} / IC₅₀ < 0.1 となる場合、腎臓におけるトランスポーターの *in vivo* での阻害を否定できる (図 6-3)。なお、IC₅₀ 値の算出においては Net flux ratio を指標にする。発現細胞を用いた評価において、内因性トランスポーターの影響等により、非発現細胞での補正が行えない場合には、発現細胞のみの flux ratio による算出が許容できる場合もある。

被験薬が P-gp 及び BCRP の基質になる可能性を検討する場合、濃度が高すぎると、高親和性のトランスポーターを飽和させてしまう可能性があるため、用いる濃度の設定が重要である。従って、被験薬の濃度は、K_m 値より十分に低いと考えられる基質濃度を用いる。

双方向性の経細胞輸送試験を実施する際には、アクセプター側とドナー側の両方の溶液の pH を 7.4 とすることが推奨される。また、アクセプター側及びドナー側における添加薬物の回収率を求めておくことが望ましい。

このような双方向性の経細胞輸送試験により、P-gp 及び BCRP の評価を行う場合には、典型基質 (表 6-5 参照) を用いて、P-gp 及び BCRP の機能が十分に観察できる試験系であることを確認する。典型基質については、Net flux ratio が 2 を超え、かつ典型阻害薬の添加により、Net flux ratio が、典型阻害薬の添加濃度と IC₅₀ 値より理論的に見積もられる程度に低下することを確認する。典型阻害薬については、用いた阻害薬の濃度と阻害薬の IC₅₀ 値より理論的に見積もられる程度、Net flux ratio が低下することを確認する。

6.3 肝臓におけるトランスポーターを介した薬物相互作用の *in vitro* 試験系

肝代謝又は胆汁中排泄が主要消失経路（肝代謝又は胆汁中排泄クリアランスが全身クリアランスの 25% 以上を占める）の被験薬については、肝取り込みトランスポーター OATP1B1 及び OATP1B3 の基質となる可能性を検討する（図 6-1）。ただし、動物における組織分布実験の結果などによる肝臓への分布を検討し、*in vitro* 試験実施の必要性を判断できる場合がある（図 6-4）。

被験薬が OATP1B1 及び OATP1B3 の基質若しくは阻害薬となる可能性を検討する場合、OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞株又はヒト肝細胞を用いた試験系を用いることができる。OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞株又はヒト肝細胞を用いて試験を行う場合、典型基質（表 6-5 参照）を用いた検討もあわせて実施し、OATP1B1 及び OATP1B3 の機能が十分に観察できる試験系であることを確認する。許容可能な OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞株は、典型基質の細胞内への取り込み比（トランスポーター発現細胞と非発現細胞における取り込みの比）が通常 2 以上となる。また、典型阻害薬により、阻害薬の添加濃度と K_i 値より理論的に見積もられる程度に減少することを確認する。ヒト肝細胞を用いて試験を行う場合、典型基質の単純拡散に対するトランスポーターの取り込み比が発現系での基準と同等に認められ、かつ典型阻害薬により、阻害薬の添加濃度と K_i 値より理論的に見積もられる程度に減少することを確認する。

被験薬が OATP1B1 及び OATP1B3 の基質になる可能性を検討する場合、OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞株を用いた試験系において、被験薬の発現細胞内への取り込みが、非発現細胞内への取り込みよりも 2 倍を超えて高く、既知の対象とするトランスポーターの典型阻害薬により、阻害薬の添加濃度と K_i 値より理論的に見積もられる程度に阻害される場合、被験薬を OATP1B1 及び OATP1B3 基質と判断する（図 6-4 参照）。ただし、被験薬の吸着などにより、発現細胞内への取り込みが、非発現細胞内への取り込みと比較して 2 倍以上の差が認められない場合でも、典型阻害薬により、阻害薬の添加濃度と K_i 値より理論的に見積もられる程度、減少することをもって、基質と判断することができる。また、あらかじめ OATP1B1 及び OATP1B3 の典型基質を用いて、トランスポーター機能の十分な維持が確認されているヒト肝細胞を用いた取り込み試験においても、OATP1B1 又は OATP1B3 の関与を検討可能である。被験薬のヒト肝細胞への取り込みが認められた場合、典型阻害薬により、阻害薬の添加濃度と K_i 値より理論的に見積もられる程度に阻害される場合、被験薬を OATP1B1 又は OATP1B3 基質と判断する。

被験薬の OATP1B1 及び OATP1B3 に対する阻害を検討する場合、検討時に用いる OATP1B1 及び OATP1B3 の基質は、臨床で併用される薬物を考慮して選択することを推奨するが、選択が困難な場合は OATP1B1 及び OATP1B3 の典型基質（表 6-5）の利用も可能である。この際、 K_m 値より十分に低いと考えられる基質濃度を用いて検討する。あわせて、典型基質（表 6-5）を用いた検討を実施すると共に、典型阻害薬（表 6-5）を使用し、阻害薬の添加濃度と K_i 値より理論的に見積もられる程度、典型基質の取り込みが減少することを確認し、OATP1B1 及び OATP1B3 の機能が十分に観察できる試験系であることを確認する。阻害試験を実施する場合の濃度設定は、被験薬の K_i 値が、臨床推定用量における非結合形薬物の門脈血中最高濃度（ $[I]_{u, \text{inlet, max}}$ ）の 4 倍以上であるか否かを判断可能な濃度範囲をカバーするよう考慮する。 K_i 値が $4 \times ([I]_{u, \text{inlet, max}})$