

安全性評価向上のための生理的条件を考慮した トキシコキネティクスの応用に関する研究

2009 年

千葉大学大学院 医学薬学府 創薬生命科学専攻
高齢者薬物学講座 高齢者薬剤学研究室

三井田 宏明

目次

目次	1
略語一覧	3
緒言	5
第1章 無アルブミンラットを用いた遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析	8
1.1 序論	8
1.2 材料および方法	11
1.3 結果	16
1.4 考察	28
第1章 小括	31
第2章 妊娠ラットにおけるタンパク結合率の低下および TK/TD への影響	32
2.1 序論	32
2.2 材料および方法	34
2.3 結果	40
2.4 考察	51
第2章 小括	54
第3章 ラットにおける薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現、あるいは活性に対する妊娠の影響	55
3.1 序論	55
3.2 材料および方法	57
3.3 結果	64
3.4 考察	73
第3章 小括	76
第4章 毒性試験における薬物吸収に対する物性および消化管内環境の関与	77
4.1 序論	77
4.2 材料および方法	80
4.3 結果	84
4.4 考察	91
第4章 小括	93

總括	94
論文目録	103
謝辞	104
審査	106

略語一覽

- AGP: α_1 -acid glycoprotein
- ALT: alanine aminotransferase
- AST: aspartate aminotransferase
- AUC: area under the plasma concentration-time curve
- BCS: Biopharmaceutics Classification System
- Bsep: bile salt export pump
- CAT: carnitine acetyltransferase
- $C_{\max}$: maximum plasma concentration
- C_0 : plasma concentration at time 0
- CPT: carnitine palmitoyltransferase
- CYP: cytochrome P450
- DMSO: dimethyl sulfoxide
- ECD: 7-ethoxycoumarin O-dealkylase
- ELISA: enzyme linked immunosorbent assay
- FAOS: fatty acid oxidation system
- FaSSIF: fasted state simulated intestinal fluid
- FDA: Food and Drug Administration
- FeSSIF: fed state simulated intestinal fluid
- GST: glutathione S-transferase
- HPLC: high performance liquid chromatograph
- HT: hematocrit
- ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
- IgA: immunoglobulin A
- IgE: immunoglobulin E
- IgG: immunoglobulin G
- IgM: immunoglobulin M
- JP1: Japanese Pharmacopoeia 1

- JP2: Japanese Pharmacopoeia 2
- LC/MS/MS: liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry
- LDH: lactic dehydrogenase
- MCD: 7-methoxycoumarin O-dealkylase
- MRP2: multidrug resistance-associated protein 2
- MRP6: multidrug resistance-associated protein 6
- NAR: Nagase Analbuminemia Rats
- NEFA: non-esterified fatty acid
- Ntcp: sodium taurocholate cotransporting polypeptide
- Oatp1b1: organic anion transporting polypeptide
- Oatp2b1: organic anion transporting polypeptide
- OCTN2: organic cation/carnitine transporter 2
- PCD: 7-propoxycoumarin O-dealkylase
- PD: pharmacodynamics
- P-gp: P-glycoprotein
- PK: pharmacokinetic (s)
- PL: phospholipid
- PPAR α : peroxisome proliferator activated receptor α
- ST: sulfotransferase
- T.CHO: total cholesterol
- TD: toxicodynamics
- TG: triglyceride
- TK: toxicokinetic (s)
- $t_{\max}$: time to reach maximum plasma concentration
- $t_{1/2}$: terminal elimination half-life
- UGT: UDP-glucuronosyltransferase

緒言

医薬品開発において毒性試験を行う目的は、動物実験や *in vitro* 試験により薬物の毒性学的影響を用量、曝露期間、投与経路との関連で明らかにし、臨床使用におけるヒトでの毒性を推定することにある。しかし、投与量と血中濃度で代表される全身的曝露との間には個体差、系統差、種差が存在することが多く、投与用量のみをもとに動物を用いた毒性試験結果をヒトに外挿することは必ずしも適切ではない。そこで、毒性試験に用いた動物から直接血液を採取し、被験物質による全身的曝露を把握し、毒性症状と併せて考察することが重要である。そのため、より科学的な試験動物種の選択や用量設定法の一つとして、毒性試験における薬物動態データ、すなわちトキシコキネティクス (TK) データの利用について専門家の間で議論がなされ、1994 年 10 月に日・米・EU 三極医薬品規制ハーモナイゼーション (ICH) にて、TK データの取得は毒性試験を実施するにあたり必要不可欠との最終合意が達成された¹⁾。これを受け、本邦においても 1996 年 7 月 2 日にトキシコキネティクス (毒性試験における全身的曝露の評価) に関するガイダンス²⁾が出された。

以来、医薬品の承認申請データとして TK はその一部を担ってきたが、近年、非臨床試験での曝露評価が重要となる局面が増してきている。例えば経口投与で開発している薬物についてもヒトで静脈内投与を行い、bioavailability を測定して、薬物の個人間曝露変動を評価する必要性や、ヒトにおける主代謝物について、ヒトで特異的または高頻度に発生する毒性を評価する必要性などが米国食品医薬品局 (FDA) からガイダンスとして示されており^{3), 4)}、医薬品開発において規制当局から要求される非臨床データは増え続けている。これらの臨床試験計画や安全性評価には TK が必須であることから、TK の重要性も増し続けているといえる。また重要であるがゆえに、測定データの信頼性の保証にも注目が集まっており、TK の測定法は、2001 年に出版された FDA ガイダンス⁵⁾に記載された分析法バリデーションの項目を満たすことが求められている。また 2007 年には FDA と企業研究者により、分析法バリデーションに関する白書⁶⁾が出された。その中ではクロマト法や ligand binding assay による分析の妥当性に影響を及ぼす因子とその影響を評価するためのバリデーション項目が新たに数多く提示されており、今後、ヒトのリスクアセスメントに資するデータとしての信頼性が、より一層求められていくことになると考えられる。

以上のような経緯で導入、実施されている TK であるが、上述した目的にとどまらず、科学としてさらに踏み込むことで、医薬品開発における毒性学的課題が生じた際の解釈や問題解決に活用されることが期待されている⁷⁾⁻⁹⁾。例えば以下のような点が課題として考えられる。

- ・ TK/トキシコダイナミクス (TD) 相関が崩れた場合。遊離型薬物濃度や毒性原因代謝物の非線形な上昇、毒性標的臓器への高濃度に蓄積など、原因の追究が可能か。
- ・ TK/TD に種差が認められた場合。種差の原因に動態が関与しているか否か。ヒトへの類似性を考慮したリスクアセスメントが可能か。
- ・ 病態や毒性発現時、薬剤への感受性が高い状態（高齢、幼若、妊娠）において、通常の状態との TK/TD の差が認められた場合。動態の差に原因があるかどうか。
- ・ Bioavailability の向上が必要な場合。再現性良く、十分な曝露をかけられる状態で毒性試験を遂行できるか否か。食餌の有無や投与媒体の種類などと薬物物性の関係から曝露の向上への寄与が可能か。

このような課題に対し、科学的な面からの解釈を行い、問題解決につなげることができれば、TK はより質の高い毒性研究に寄与することができると考える。しかしながら実際には、毒性試験の申請用データを提供することに終始しがちであり、毒性研究の質向上のための TK/TD 解析の応用は十分とは言えない。

そこで本研究では、毒性評価動物が置かれた各種生理的条件に着目し、薬物動態と毒性の観点から以下の研究を行った。

第 1 章では“無アルブミンラットを用いた遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析”と題し、遊離型薬物濃度が上昇して、総薬物濃度ではモニターできない急激な毒性増強を起こすケース（肝/腎障害などの病態、高用量曝露時）を考慮し、遊離型薬物濃度に基づいた TK/TD 解析の有用性を、無アルブミンラットを用いてクロフィブレート为例に検討した。

第 2 章では“妊娠ラットにおけるタンパク結合率の低下および TK/TD への影響”と題し、妊娠が母動物の薬物動態や毒性に及ぼす影響が十分に研究されていないことから薬物の分布に焦点を当て、薬物のタンパク結合率と TK/TD の変化を検討した。

第 3 章では“ラットにおける薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現、あるいは

は活性に対する妊娠の影響 ” と題し、妊娠中の薬物代謝、輸送に焦点を当て、代謝酵素とトランスポーターの発現や活性を調べた。

第 4 章では “ 毒性試験における薬物吸収に対する物性および消化管内環境の関与 ” と題して、薬物の物性と吸収による体内曝露量との相関に着目し、化合物の溶解性、脂溶性等の物性パラメータと非げっ歯類の毒性試験における給餌タイミングによる曝露差との相関を検討した。

第 5 章は本論文の総括であり、結語と今後の展望を述べたものである。

第1章 無アルブミンラットを用いた遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析

1.1 序論

血漿に存在し、薬物と結合するタンパク質として、アルブミン、 α_1 -酸性糖タンパク (AGP)、免疫グロブリン、リポタンパクなどが知られている^{10), 11)}。とりわけ、哺乳類の血清中最も豊富に存在するタンパク質として知られ、主に酸性薬物と結合するアルブミンと、主に塩基性薬物と結合する AGP は、薬物の全身への分布に重要な役割を果たす^{12), 13)}。毒性試験における TK では、ほとんどの場合、血漿中の総薬物濃度を測定することで TD との相関を評価しているが、タンパク質に結合している薬物ではなく遊離型の薬物が組織に移行し、直接的に TD に影響することが知られている^{8), 9)} (図1)。通常は、総薬物濃度と遊離型薬物濃度は一定の比を保つと考えられるため、総薬物濃度のモニターで問題はないが、例えば薬物に高濃度曝露された時や肝/腎障害が起こった時などでは、タンパク結合の飽和や血漿タンパク質の減少によるタンパク結合率の低下と遊離型分率の増加が起こり、総薬物濃度が TD に相関しなくなるケースが考えられる。実際に、ラットにガラクトサミンを投与して肝障害を発生させると、AGP が減少し、プロプラノロールのタンパク結合率減少と相関することがラットで報告されている^{10), 14)}。またタンパク結合率は動物種によっても異なるため、毒性の種差を考えるうえでも重要な要因の一つである^{8), 9), 15)}。以上のことから、総薬物濃度ベースの TK は適切な TD の解釈につながらない場合があると考えられる。例えば M3 選択的抗コリン薬であるザミフェナシンは抗コリン作用に基づく眼の副作用を、抗てんかん薬であるフェニトインは運動失調を、それぞれ引き起こすが、その時の総薬物濃度ベースの最高血漿中濃度 (C_{max}) は、ヒトと動物との間で大きく異なる。一方、遊離型薬物濃度ベースで比較するとその種差がなくなり、副作用が起こる時の C_{max} はほぼ同じ値となる^{8), 9)}。このような知見があるにもかかわらず、その測定法が簡便ではないことから、遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析はほとんど実施されていない。

一方、臨床でも同様に、血漿タンパク質の減少が新生児¹⁶⁾、妊婦¹⁷⁾、高齢者¹⁸⁾および肝/腎障害患者^{19), 20)}といった感受性の高い患者で報告されている。また血漿タ

ンパク質濃度と遊離型薬物濃度との相関を示す例として、幼児や肝障害患者において、血漿アルブミン濃度の低値に伴い遊離のフェニトイン濃度やループ利尿薬濃度の上昇がそれぞれ報告されている^{21), 19)}。したがって高感受性患者への薬物治療にあたって遊離型薬物濃度を把握することは、副作用を避け、薬物の適正使用につながるであろうと思われる。以上のことから、遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析の研究は有用であると考えられる。

そこで、タンパク結合が低い状態における TK/TD を調べるため、Sprague-Dawley (SD) ラットから確立された長瀬無アルブミンラット (Nagase Analbuminemia Rats: NAR) を用いて実験を行うこととした。NAR は遺伝的に血漿アルブミンを欠損した系統である²²⁾。アルブミンは血漿中で最も多く存在するタンパク質であるため²³⁾、NAR においては薬物のタンパク結合率が低くなり、特にタンパク結合率の高い薬物においてそれは顕著になると考えられる。実際に、タンパク結合率の高いワルファリンやフェニトインのタンパク結合率は、SD ラットに比べ NAR で低いことが報告されている^{24), 25)}。しかしながら遊離型薬物濃度とその毒性の相関に関する報告はほとんどない。

クロフィブレートは高脂血症治療薬として臨床で使用されているペルオキシソーム増殖剤である。薬物動態としては、速やかに加水分解されてクロフィブリン酸となり、薬理作用を発現する。タンパク結合率は比較的高いことが知られている²⁶⁾。またアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) などの血中酵素や総コレステロール (T.CHO)、トリグリセリド (TG) などの脂質パラメータの増加、肝細胞肥大、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼのような脂肪酸代謝酵素の誘導、およびチトクローム P450 (CYP) の誘導などを起こすことが知られている²⁷⁾。よって、タンパク結合が飽和するような状況下ではクロフィブリン酸の遊離型濃度が上昇し、上述したようなクロフィブレートの作用が増強すると考えられる。

本章では、遊離型薬物濃度に基づいた TK/TD 解析の有用性を検討するため、クロフィブレートを NAR と SD ラットに 4 日間経口投与した際の TK/TD を調べた。検査項目として、クロフィブリン酸の血漿中総濃度および遊離型濃度測定、血液化学的検査、肝臓の病理組織学的検査、肝臓の脂肪酸代謝酵素および薬物代謝酵素測定、および肝臓のマイクロアレイ解析を行った。

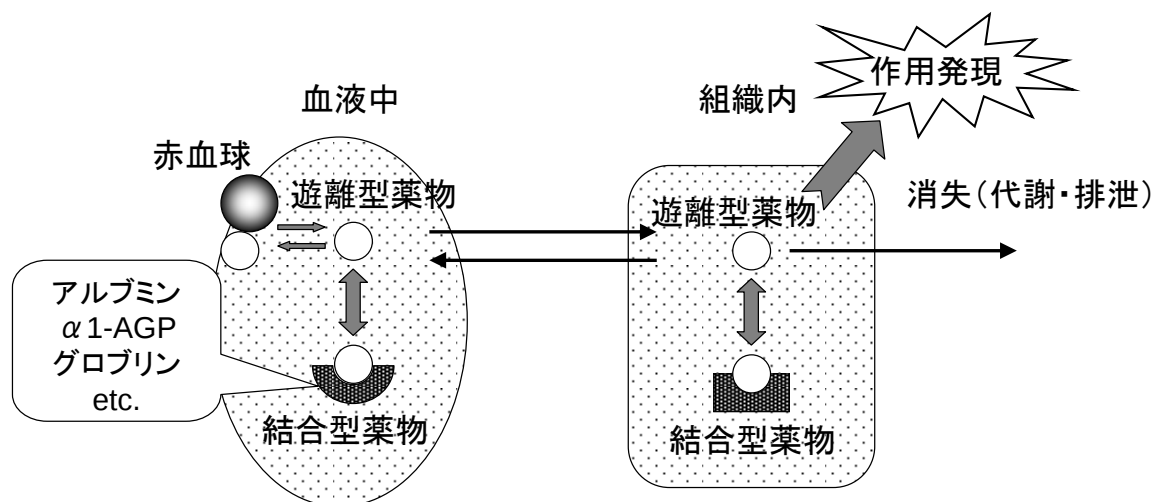


図1 遊離型薬物の分布と作用発現

1.2 材料および方法

1.2.1 材料

- ・ クロフィプレート (和光純薬)
- ・ クロフィブリン酸 (和光純薬)
- ・ パルミトイル CoA (Sigma-Aldrich)
- ・ アセチル CoA (Sigma-Aldrich)
- ・ 7-メトキシクマリン (Sigma-Aldrich)
- ・ 7-エトキシクマリン (Sigma-Aldrich)
- ・ 7-プロポキシクマリン (既報²⁸⁾に従って合成)
- ・ CYP1A2 および CYP2B1/2 一次抗体 (Chemicon International)
- ・ CYP2C6, CYP2C11 および NADPH P450 reductase 一次抗体 (第一化学薬品)
- ・ CYP2E1, CYP3A および CYP4A 一次抗体 (GE Healthcare)
- ・ アルブミン一次抗体 (BETHYL Laboratories)

1.2.2 実験動物の飼育管理、投与および採材

NAR および SD ラット雄 (日本 SLC) を 6 週齢で購入し、室温 23 ± 1 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明 1 日 12 時間 (7:00 – 19:00) の環境下でケージに個別飼育した。固形飼料 Certified Rodent Diet 5002 (PMI) と水道水は自由摂取させて馴化し、7 週齢で実験に用いた。

クロフィプレートを 1% Tween-80 溶液により懸濁して 2 および 6% 懸濁液を調製し、200 および 600 mg/kg の用量で 4 日間、NAR および SD ラットに経口投与した ($n = 3/\text{群}$)。

TK 測定のため、投与 4 日目の投与前、投与後 2、4、7、24 時間に約 0.5 mL の血液を頸静脈より無麻酔下で採取した。採取した血液をヘパリンリチウム存在下、 4 、 $9,600 \times g$ で 5 分間遠心分離し、血漿を得た。得られた血漿は TK 測定に用いるまで -80 で冷凍保存した。

血液化学的検査のため、投与 4 日目の投与後 24 時間の解剖直前にエーテル麻酔下で腹大動脈から血液を採取した。採取した血液をヘパリンリチウム存在下、 4 、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。動物は、放血により安楽死させた。

放血致死後、肝臓の一部を採取し、脂肪酸代謝酵素および薬物代謝酵素測定、ならびにマイクロアレイ解析を行うまで-80℃で冷凍保存した。残りの肝臓は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、病理組織学的検査に供した。

1.2.3 TK 測定

血漿中クロフィブリン酸の測定は、Barra らの方法²⁹⁾に従った。概要を以下に示した。

凍結血漿を解凍後、各群 3 例の血漿サンプル約 0.2 mL を群ごとにプールした。

【総薬物濃度測定】

- ・ プール血漿から 100 μ L 分取し、25 μ L の 0.25M 硫酸、75 μ L のアセトニトリル、500 μ L のクロロホルムと約 30 秒間混和した。
- ・ 4℃ 冷却下、 $1,870 \times g$ で 10 分間遠心分離した。
- ・ 得られた混液から水層とタンパク質層を除き、有機層を窒素気流下で乾固した。
- ・ ペレットを 100 μ L の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 移動相で溶解し、約 30 秒間混和した。
- ・ 得られた溶液から 20 μ L を HPLC に注入した。

【遊離型薬物濃度測定】

- ・ プール血漿から 0.5 mL 分取し、25℃、 $238,000 \times g$ で 3 時間 40 分超遠心した。
- ・ 得られたタンパクフリーの上清から 20 μ L を HPLC に注入した。

【HPLC 装置構成】

- ・ ポンプ、オートサンプラー、デガッサー：Waters 2690 Separations Module (Waters)
- ・ カラム恒温槽：2690 Column Heater (Waters)
- ・ UV 検出器：Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters)

【分析条件】

- ・ カラム：ODS-3 150 $\times$ 2.1 mm i.d. (GL サイエンス)
- ・ カラム温度：40

- ・ 移動相：アセトニトリル / 蒸留水 / 酢酸 = 60 : 40 : 1 (v/v/v)
- ・ 流速：0.2 mL
- ・ 検出波長：UV 275 nm

1.2.4 TK パラメータ解析

血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-24hr}) は台形法を用い、計算ソフト Microsoft EXCEL2003 (マイクロソフト) で算出した。最高血漿中濃度 (C_{max}) および最高血漿中濃度到達時間 (t_{max}) は実測値を採用した。

1.2.5 血液化学的検査

自動分析装置 TBA-200FR (東芝メディカル) を用い、以下の項目について検査を行った。

- ・ AST、ALT、乳酸脱水素酵素 (LDH) ...JSCC 標準化対応法
- ・ T.CHO、リン脂質 (PL)、TG、遊離脂肪酸 (NEFA) ...酵素法
- ・ 総タンパク ...Biuret 法

また、高速電気泳動装置 REP8JF71000 (Helena Laboratories) を用い、アルブミン画分の測定を行った。アルブミン画分の濃度は、総タンパク濃度にアルブミン画分の割合を乗じて算出した。

1.2.6 病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリンで固定された肝臓を常法に従ってパラフィンに包埋した。肝臓の病理組織標本はヘマトキシリン - エオジンで染色して作製し、光学顕微鏡で観察した。

1.2.7 酵素液の調製

凍結された肝臓を解凍し、氷冷下、湿重量の 3 倍量の 1.15%塩化カリウム溶液でホモジナイズした。このホモジネートを 4℃ 冷却下、 $700 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清の一部を $700 \times g$ 上清画分として採取した。残りの上清は 4℃ 冷却下、 $9,000 \times g$ で 20 分間遠心分離し、得られた上清をさらに 4℃ 冷却下、 $105,000 \times g$ で 1 時間超遠心した。得られた上清をサイトゾル画分として使用した。沈渣は氷冷下、上清と同

量の 1.15%塩化カリウム溶液で懸濁し、さらに 4℃、105,000 × g で 1 時間超遠心した。得られた沈渣を、上清と同量の 20%グリセロール含有 1.15%塩化カリウム溶液で懸濁し、ミクロソーム画分として使用した。

1. 2. 8 脂肪酸代謝酵素測定

パルミトイル CoA 酸化活性 (FAOS 活性)、カルニチンアセチルトランスフェラーゼ活性 (CAT 活性) およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性 (CPT 活性) 測定には 700 × g 上清画分を使用した。基質としてパルミトイル CoA およびアセチル CoA を使用し、Gray ら^{30), 31)}の方法で FAOS、CAT、CPT 活性を測定した。

1. 2. 9 チトクローム P450 含量および活性の測定

P450 含量と 7-アルコキシマリン O-脱アルキル化活性測定にはミクロソーム画分を使用した。P450 含量およびタンパク質濃度の測定は、それぞれ Omura と Sato の方法³²⁾、Lowry らの方法³³⁾に従った。7-メトキシマリン O-脱アルキル化活性 (MCD)、7-エトキシマリン O-脱アルキル化活性 (ECD) および 7-プロポキシマリン O-脱アルキル化活性 (PCD) の測定は Matsubara²⁸⁾らの方法で行った。

1. 2. 10 Western blot 解析

Western blot 解析にはミクロソーム画分およびサイトソーム画分を使用した。各ミクロソームのタンパク質濃度は 2 mg protein/mL (CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A、CYP4A、NADPH P450 reductase 用) または 4 mg protein/mL (CYP1A2 用) に調製した。同様に、各サイトソーム画分のタンパク質濃度は 2 mg protein/mL (アルブミン用) に調製した。これらのサンプルはトリス SDS BME サンプル処理液で 2 倍希釈し、95℃で 5 分間加熱した。その後、1.5 μL (CYP2C6、CYP2C11、NADPH P450 reductase 用)、2.5 μL (アルブミン用)、5 μL (CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2E1、CYP3A、CYP4A) の各サンプルを 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、電気泳動を行った。その後タンパクを、blotting 装置 (アトー) を用いてゲルから Immobilon ポリビニリデンフルオリド膜に移した。この膜は ECL ブロッキング剤でブロックし、一次抗体 (抗ラット抗体)、ビオチン標識二次抗体、streptavidin-horseradish peroxidase conjugate、および ECL Western blotting detection

reagent を続けて添加した。その膜をフィルムに感光させた。

1. 2. 11 マイクロアレイ解析

肝臓を RNeasy Mini Kit (QUIAGEN) の RLT buffer でホモジナイズし、総 RNA をキットの説明に従って単離した。マイクロアレイ解析は Affymetrix 社の標準プロトコールに従った。概要を以下に示した。

- ・ 各肝臓から調製した 5 µg の総 RNA を、GeneChip® One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) を用いて cDNA 合成に使用した。
- ・ ビオチン標識した cRNA 混液を GeneChip® IVT Labeling Kit (Affymetrix) を用いて転写した。
- ・ ビオチン標識した cRNA target サンプル (約 10 µg) をそれぞれ GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) に 45 、16 時間でハイブリダイズした。
- ・ Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて GeneChip® を洗浄・染色した後、GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) でスキャンした。
- ・ 得られたマイクロアレイ画像データは GeneChip® Operating Software Ver. 1.2 (Affymetrix) を用いた MAS5 解析により数値化した後、Spotfire 8.0 (Spotfire) を使用してデータ解析を行った。
- ・ マイクロアレイデータは、上位 2% および下位 2% のシグナル値を除去した後に平均シグナル強度を 1 とする (Trimmed mean normalization) ことで、アレイデータ間のスケール補正を行った。

1. 2. 12 統計解析

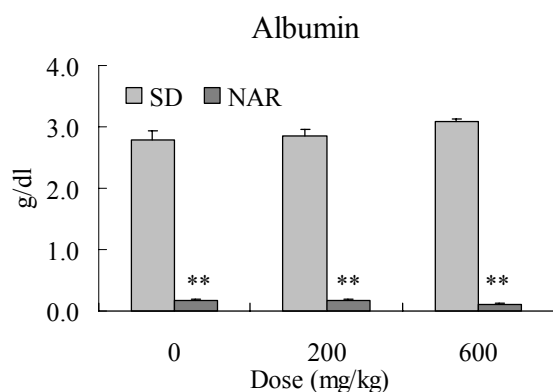
分散の均一性は F-test (有意水準 25%) で行い、平均値の有意差検定は Student's t test または Dunnett's test で行った。統計処理は SAS® System Release 8.2 (SAS Institute) または Microsoft® Excel 2000 を用いて行った。有意水準は 5% とした。

1.3 結果

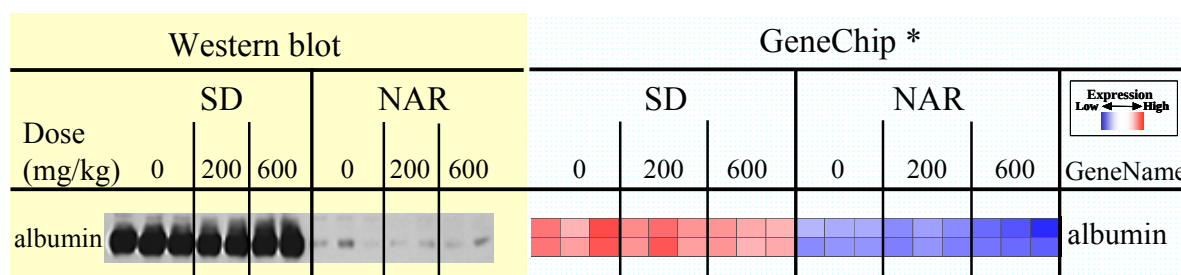
1.3.1 血漿および肝臓中アルブミン分析

血漿中アルブミン濃度を電気泳動で解析したところ、SD ラットではおよそ 3 g/dL 検出されたのに対し、NAR においては、全ての群でほとんど検出されなかった (Fig. 1-1A)。肝臓におけるアルブミンのタンパク質と mRNA を Western blot とマイクロアレイで解析したところ、NAR におけるアルブミンの欠損が確認された (Fig. 1-1B)。これらの結果は既報^{34), 35)}と一致していた。以上のことから、本実験はアルブミンが欠損している条件下で実施されたことを確認した。

(A)



(B)



*All GeneChip signals showed Presence Calls

Fig. 1-1. Analysis of albumin in plasma and liver after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. (A) The albumin concentration in plasma measured by electrophoresis. (B) The protein and mRNA contents of albumin in the liver measured by Western blot and microarray analysis. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. **: Significantly different from the mean value of the corresponding group of SD rats ($p < 0.01$, Dunnett's test).

1.3.2 血漿中総薬物濃度および遊離型薬物濃度

血漿中の総薬物濃度および遊離型薬物濃度の測定は HPLC で行った。Fig.1-2 および Table 1-1 に示したように、総薬物濃度は、同じ用量で比較すると SD ラットより NAR で低かった。一方、遊離型薬物濃度は SD ラットより NAR で高かった。総薬物濃度と遊離型薬物濃度の比という観点では、NAR の 600 mg/kg における総 AUC_{0-24hr} の値は、SD ラットの 200 mg/kg の値とほぼ同レベルであったにもかかわらず、それぞれの用量における遊離型 AUC_{0-24hr} の値は、NAR の方が SD ラットより 4.1 倍高かった。さらに SD ラットにおける 200 mg/kg と 600 mg/kg の総薬物濃度は用量比以下の増加であったが、遊離型薬物濃度はほぼ用量比通り増加した。すなわち、 C_{max} 値は総薬物濃度で 2.0 倍に対し、遊離型薬物濃度で 2.7 倍であった。一方、NAR では総薬物濃度、遊離型薬物濃度ともにほぼ用量比通りに増加し、 C_{max} 値は総薬物濃度で 3.0 倍に対し、遊離型薬物濃度で 2.9 倍であった。クロフィブレードのタンパク結合率は SD ラットで 67.7%から 98.6%の間であり、クロフィブレードの曝露が高いほど低値を示した。一方、NAR ではタンパク結合率はいずれの場合も低く、ほぼ全ての曝露域で 20%前後の値を示した。

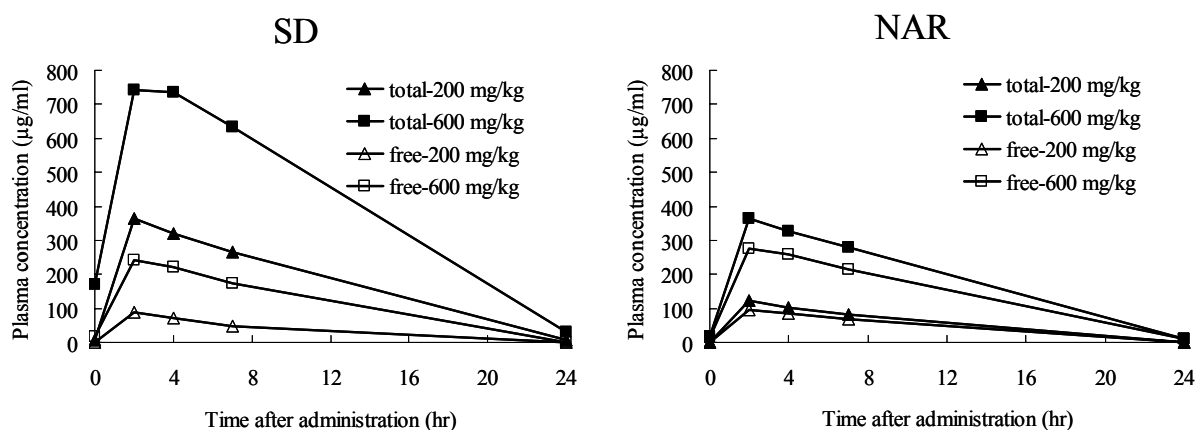


Fig. 1-2. Total and free clofibric acid concentrations in plasma after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. Each symbol expresses the concentration of pooled plasma (n=3).

Table 1-1. Total and free clofibric acid concentrations and protein binding in plasma after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. Each data expresses the concentration of pooled plasma (n=3).

Strain	Dose (mg/kg)	Matrix	Plasma concentration (µg/ml)					C _{max} (µg/ml)	t _{max} (hr)	AUC _{0-24hr} (µg•hr/ml)
			0	2	4	7	24 (hr)			
SD	200	total	8.48	363.0	319.9	265.5	5.63	363.0	2	4237
		free	0.12	89.2	72.2	48.4	0.12	89.2	2	844
		protein binding (%)	98.6	75.4	77.4	81.8	97.9			
	600	total	168.6	742.9	736.1	634.1	30.5	742.9	2	10095
		free	17.0	240.3	220.1	174.5	0.983	240.3	2	2801
		protein binding (%)	89.9	67.7	70.1	72.5	96.8			
NAR	200	total	0.58	122.2	103.2	81.0	0	122.2	2	1313
		free	0.64	96.2	84.2	66.8	0.45	96.2	2	1075
		protein binding (%)	-10.3*	21.3	18.4	17.5	N.D.			
	600	total	17.3	363.3	325.9	278.0	11.5	363.3	2	4436
		free	13.8	275.7	259.9	214.3	10.2	275.7	2	3445
		protein binding (%)	20.2	24.1	20.3	22.9	11.3			

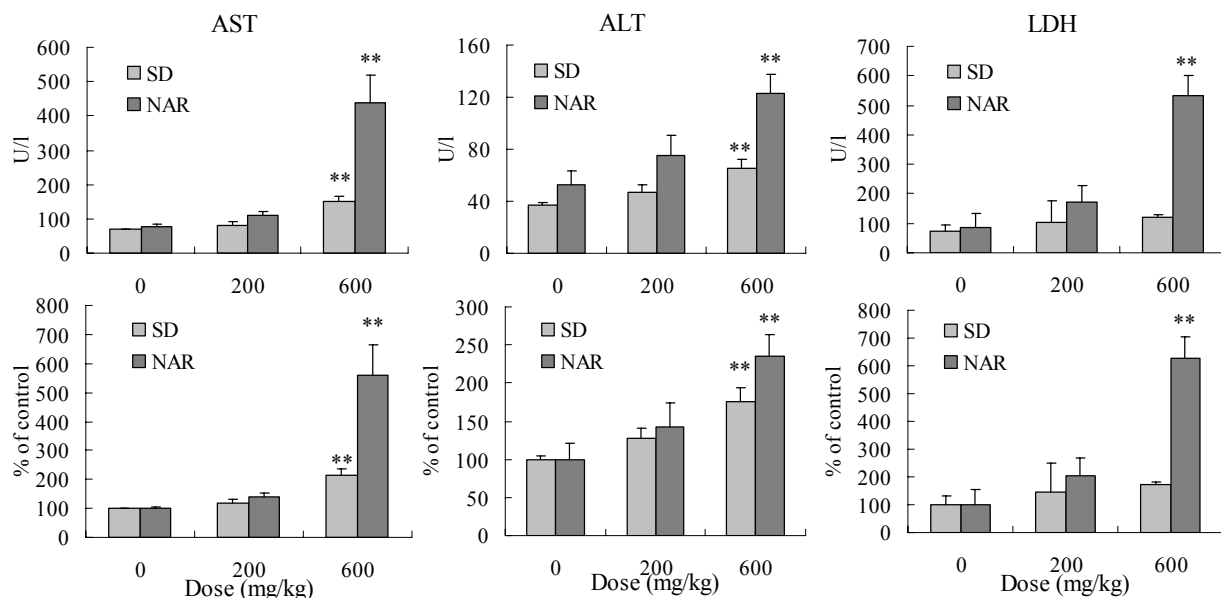
N.D.: Not determined.

0: < 0.5 µg/ml (below the limit of quantitation).

*: Minus figure at just before administration (0 hr) and 24 hr after administration in NAR was considered to be a result from the low exposure around the lower limit of quantitation (< 0.5 µg/ml for total drug concentration; < 0.1 µg/ml for free drug concentration).

1.3.3 血液化学パラメータへの影響

血液化学パラメータは解剖時に採取したサンプルで実施した。実測値とコントロールに対するパーセンテージとして標準化した値を Fig. 1-3 に示した。AST、ALT、LDH などの逸脱酵素は用量にしたがって増加し、その増加は SD ラットより NAR で顕著であった。一方、T.CHO、PL、TG、NEFA などの脂質パラメータは用量にしたがって減少し、脂質パラメータのコントロール群の実測値が NAR で高いものの、その減少は SD ラットより NAR で顕著であった。血液化学パラメータと総 AUC_{0-24hr} 、遊離型 AUC_{0-24hr} との関係を評価するため、相関分析を行った (Fig. 1-4)。本実験において採取した血漿の容量は、個体別の血漿中濃度を測定するためには不十分であったため、一群各 3 例の個体別血漿をプールし、群としての総薬物濃度および遊離型薬物濃度を測定した。よって NAR と SD の、系統ごとの相関分析は行わなかった。分析の結果、総 AUC_{0-24hr} より遊離型 AUC_{0-24hr} で決定係数が高く、血液化学パラメータの変化との高い相関が認められた。



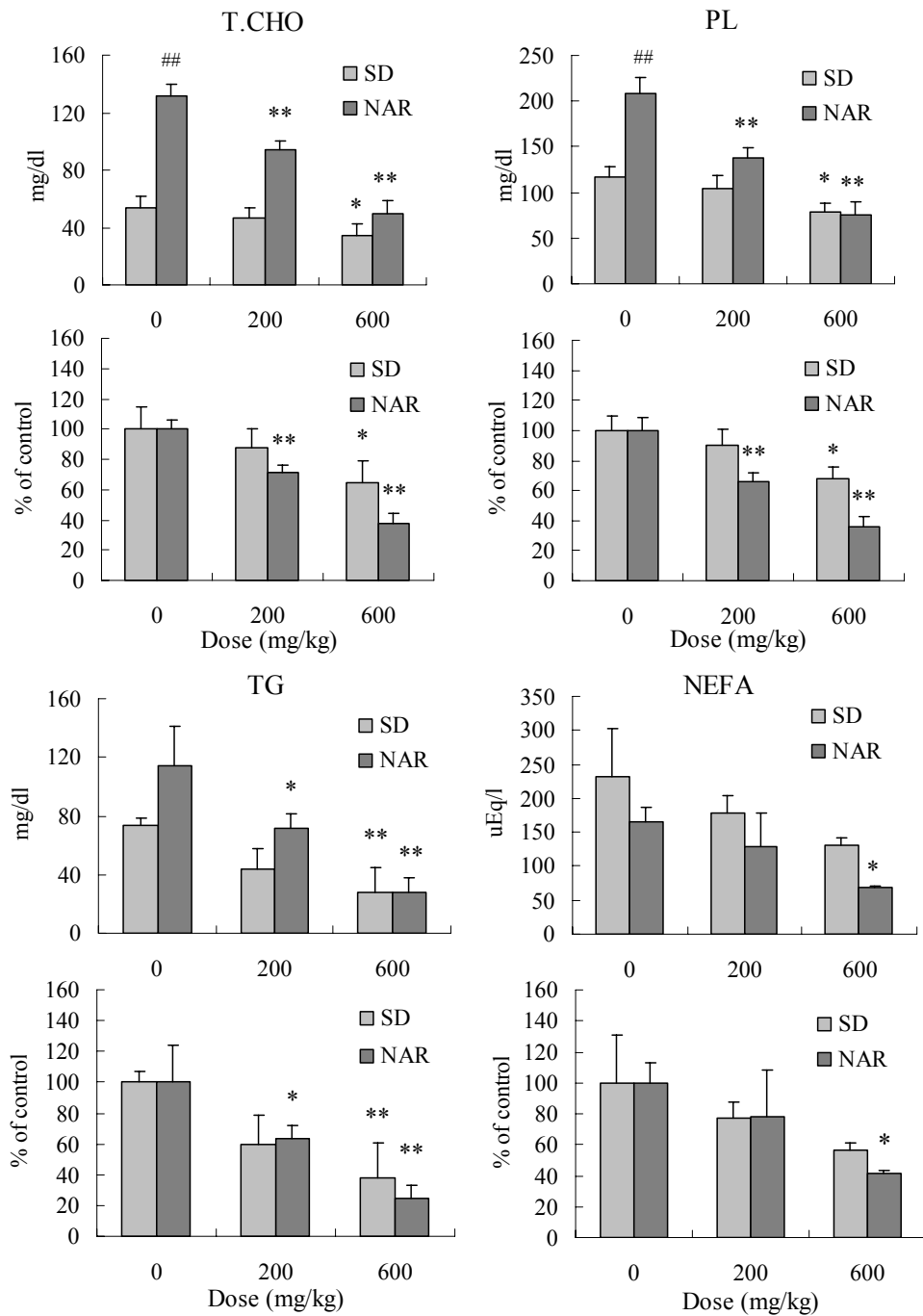
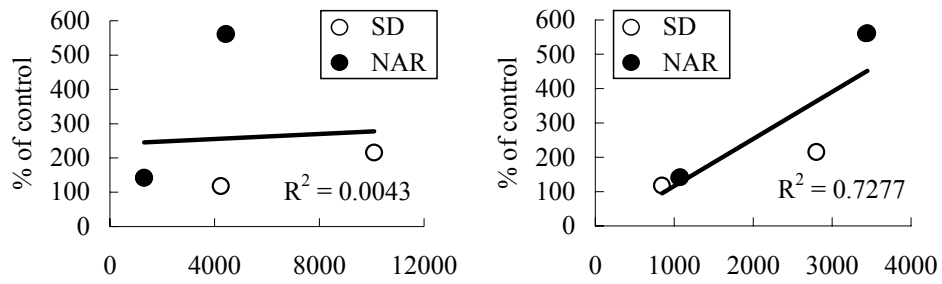
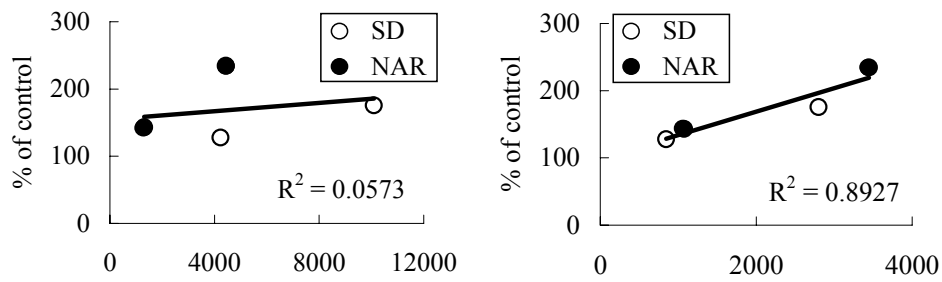


Fig. 1-3. Changes in blood chemistry after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. The upper and lower figures express actual values and normalized values compared with the mean values of each control group as % of the control, respectively. *, **: Significantly different from the mean value of the each rat control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Dunnett's test). ##: Significantly different from the mean value of SD rats at 0 mg/kg group ($p < 0.01$, Student's t test).

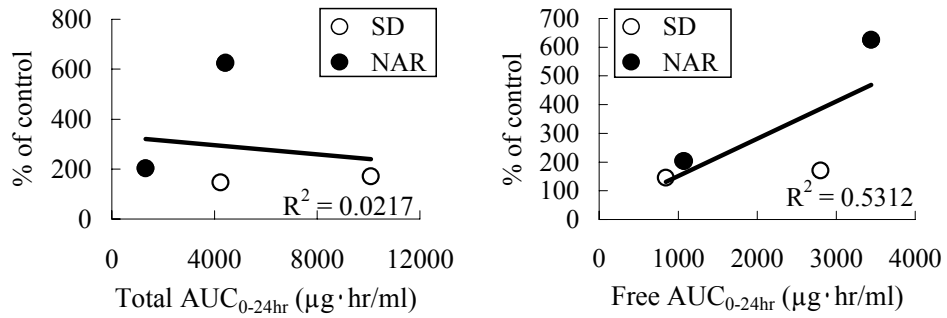
AST



ALT



LDH



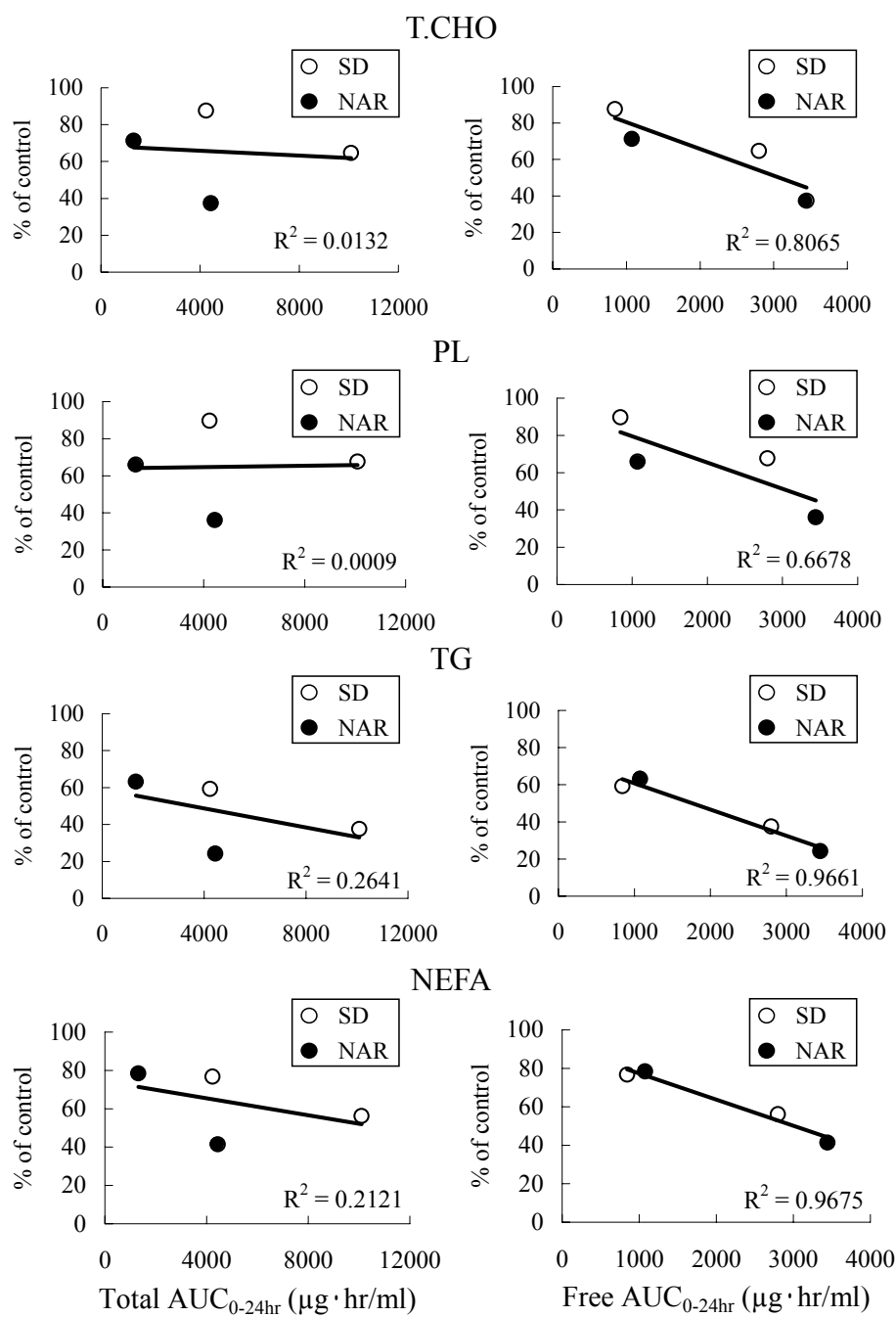


Fig. 1-4. Correlation of mean relative values in blood chemistry and AUC_{0-24hr} values of clofibric acid after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. X axis of left and right figures express total and free AUC_{0-24hr} values, respectively.

1.3.4 肝細胞肥大

病理組織学的検査において、好酸性顆粒を伴う肝細胞肥大が観察された。SD ラットと NAR の各用量における肥大の程度を、グレーディングスコアとしてスコア化し、Table 1-2 にまとめた。グレーディングスコアは用量に伴って増加し、SD ラットより NAR で大きな増加を示した。

Table 1-2. Histopathological findings in liver after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR.

Organ	Strain		0 mg/kg			200 mg/kg			600 mg/kg		
Liver hepatocellular hypertrophy	SD	Individual	—	—	—	1	1	1	2	3	2
		Mean	—			1			2.33		
	NAR	Individual	—	—	—	1	2	2	4	2	3
		Mean	—			1.67			3		

Grading: —; no findings 1; Zone 3, slight 2; Zone 2 to 3, slight 3; Zone 1 to 3, slight 4; Zone 1 to 3, moderate

1.3.5 脂肪酸代謝酵素の活性および発現

SD ラットおよび NAR の肝 700 × g 上清画分中 FAOS、CAT および CPT 活性を Fig. 1-5 に示した。両ラットにおいて、これらの活性は用量にしたがって同様に上昇した。また脂肪酸代謝酵素の mRNA 含量も両ラットで増加した (Fig. 1-6)。しかしながら mRNA 含量の増加の程度は SD ラットより NAR で大きかった。

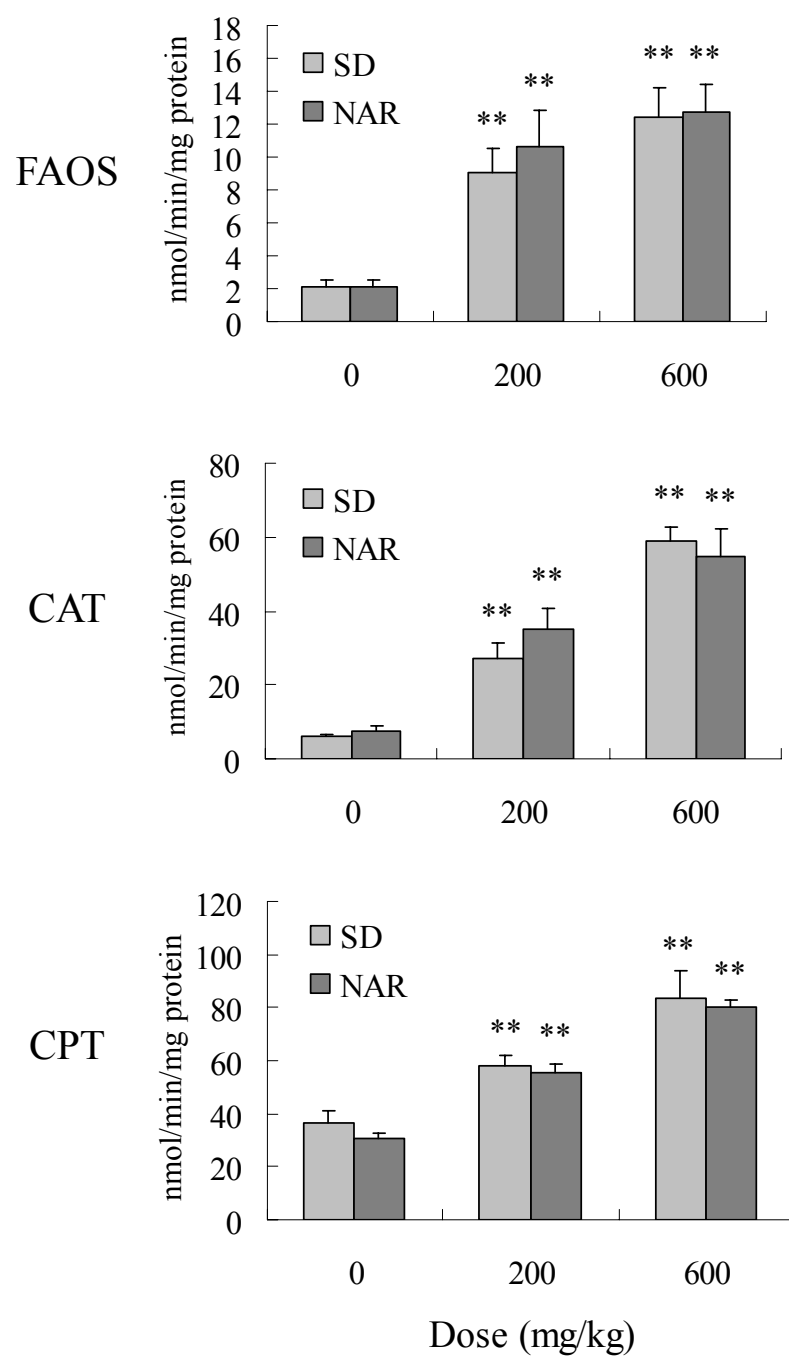


Fig. 1-5. Fatty acid metabolizing enzyme activities after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. *, **: Significantly different from the mean value of the each rat control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Dunnett's test).

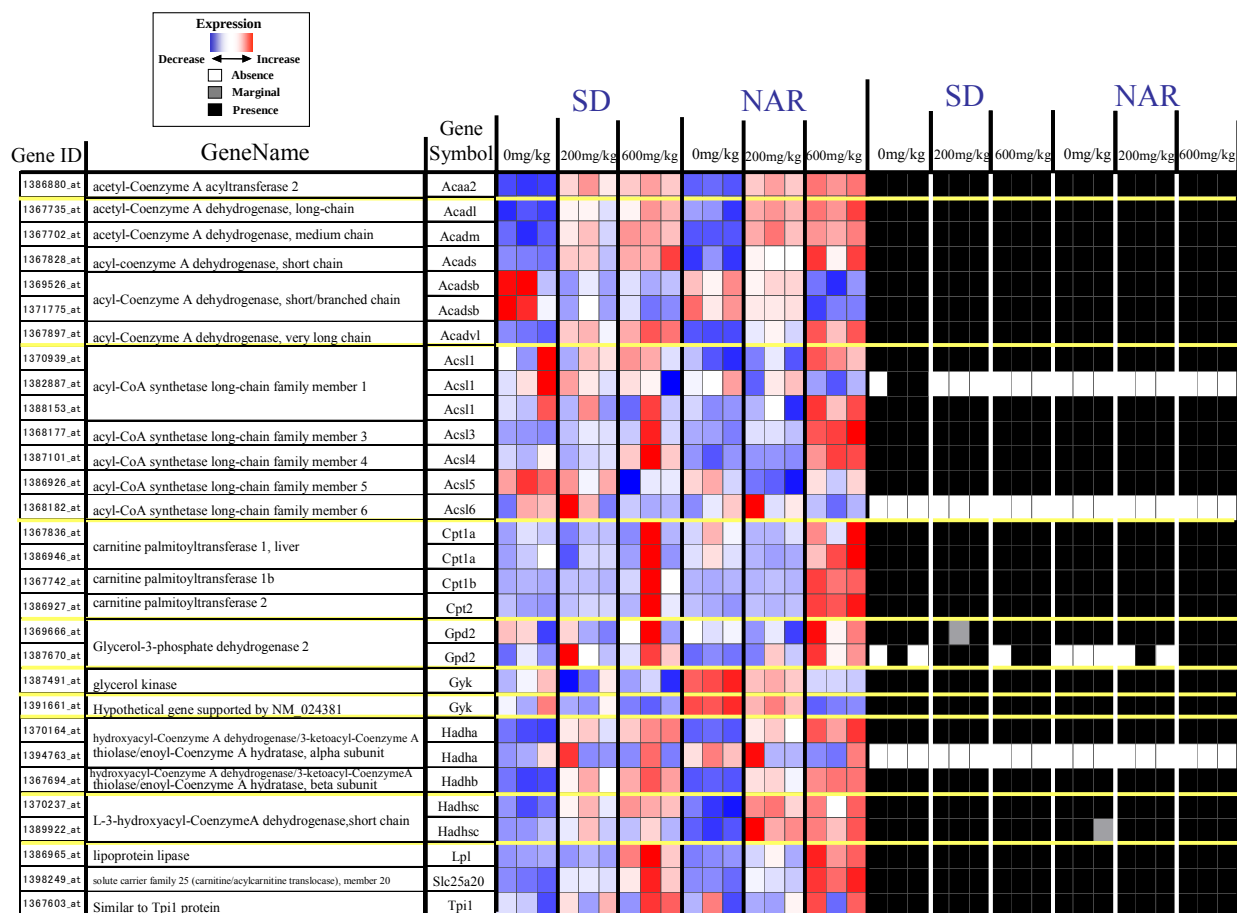


Fig. 1-6. mRNA content of fatty acid metabolizing enzymes in the liver measured by microarray analysis after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR.

1. 3. 6 チトクローム P450 含量、活性および発現

SD ラットおよび NAR における、肝ミクロソーム画分中の P450 含量、および MCD、ECD、PCD 活性を Fig. 1-7 に示した。両ラットにおいて、含量や各活性値は用量にしたがって同様に上昇した。肝臓における CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A、CYP4A および NADPH P450 reductase のタンパクおよび mRNA 含量を、Western blot およびマイクロアレイでそれぞれ解析した (Fig. 1-8)。各解析結果は、両ラットにおける CYP1A2 の発現低下と CYP2B1/2、3A、4A および NADPH P450 reductase の誘導を示唆していた。SD ラットに比べて NAR では、CYP4A のベースの発現が低く、また NADPH P450 reductase の誘導が大きいという違いはあったものの、その他の分子種における発現低下と誘導の程度は、両ラットでほぼ同様で

あった。

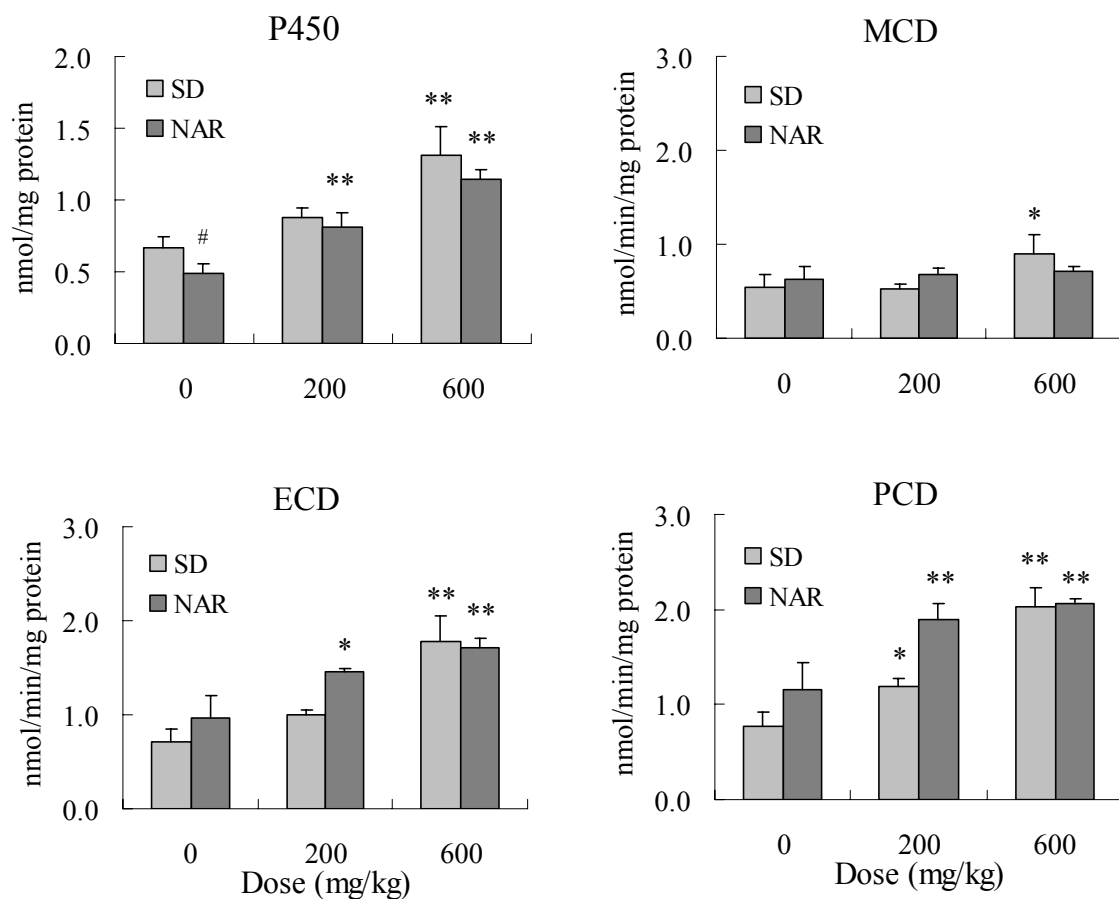
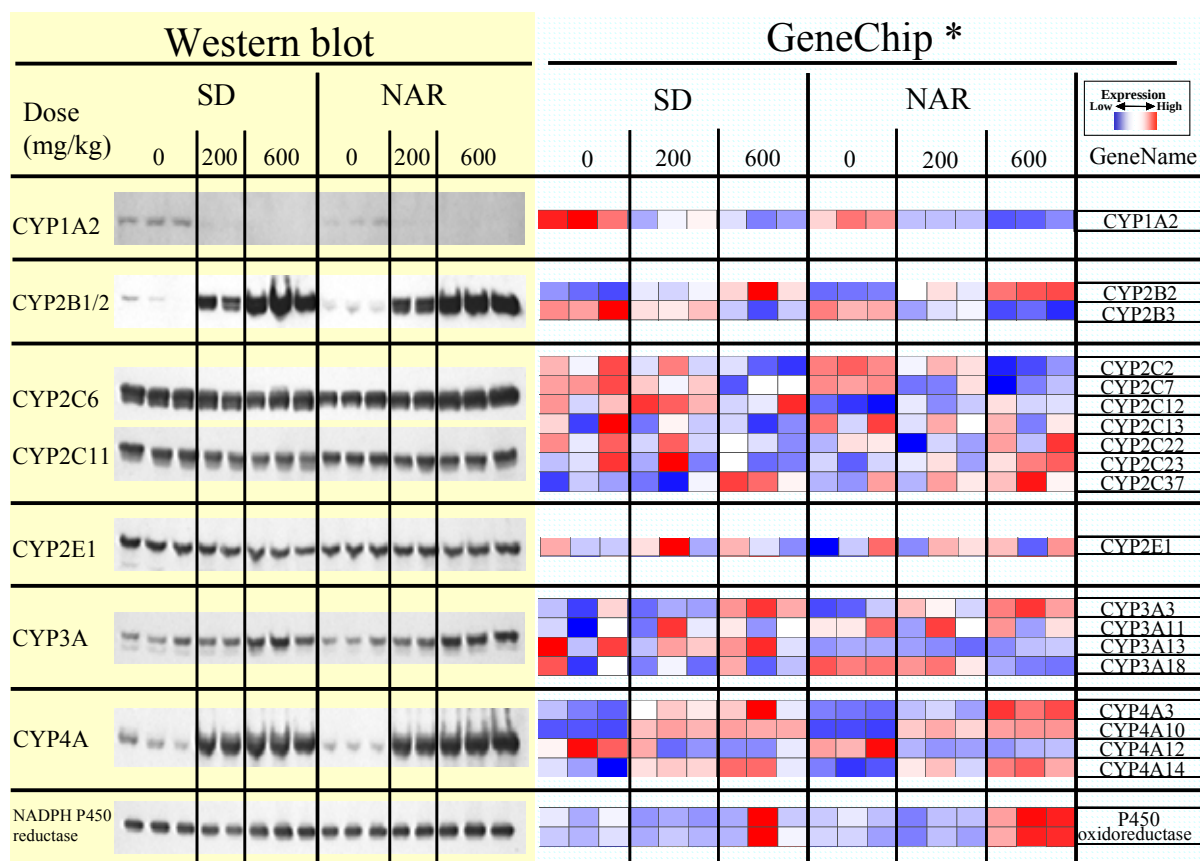


Fig. 1-7. P450 content and ACD activities after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. *, **: Significantly different from the mean value of the each rat control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Dunnett's test). #: Significantly different from the mean value of SD rats at 0 mg/kg group ($p < 0.05$, Student's t test).



*All GeneChip signals showed Presence Calls

Fig. 1-8. Protein and mRNA contents of CYP1A2, 2B1/2, 2C6, 2C11, 2E1, 3A, 4A and NADPH P450 reductase in the liver measured by Western blot and microarray analysis after a 4-day repeated dosing of clofibrate in SD rats and NAR.

1.4 考察

今回の実験において、同じ用量における遊離型薬物濃度は、NARの方がSDラットより高い値を示した。逆に総薬物濃度はNARの方がSDラットより低い値であった。一方、総 AUC_{0-24hr} の値は、同じ用量において、両ラットで同等の値を示した。よってクロフィブレートについて、通常通り総薬物濃度に基づいた TK/TD 解析を行ったとすると、NARの600 mg/kgとSDラットの200 mg/kgは同等の作用が出ることが見込まれる。しかしながら600 mg/kgにおけるNARの遊離型 AUC_{0-24hr} の値は、200 mg/kgのSDラットの値より4.1倍高く、実際のクロフィブレートの作用も、両ラット間で同質ではあったものの、その程度はNARの方が強く認められた。そのような変化として、AST、ALT、LDHなどの逸脱酵素、T.CHO、TG、NEFAなどの脂質パラメータ、肝細胞肥大、肝臓における脂肪酸代謝酵素の mRNA 含量の増加や CYP4A の誘導が挙げられる。また血液化学パラメータにおける上記の変化の程度は、総 AUC_{0-24hr} ではなく遊離型 AUC_{0-24hr} に高い相関を示していた。以上のことから、クロフィブレートの薬理作用として知られる変化²⁷⁾は、総じてSDラットよりNARで強く発現し、それは遊離型薬物濃度がNARで高いことに起因していると考えられた。NARにおける脂肪酸代謝酵素の活性上昇と、NADPH P450 reductaseを除く第Ⅰ相酵素の誘導については、SDラットとの間に大きな違いはなかったが、その理由の一つとしてすでに最大反応に近く、差が評価しにくかったことが考えられる。

TK 測定において、SDラットでは、総薬物濃度は用量比以下の増加であったが、遊離型薬物濃度はほぼ用量比通りに増加した。一方、NARでは総薬物濃度、遊離型薬物濃度ともにほぼ用量比通りに増加した。これはSDラットでタンパク結合の飽和が起こり、クロフィブリン酸が血漿から各組織へ分布してしまうため、総薬物濃度が上がりにくくなったためと考えられる。一方NARでは、アルブミンが欠損しているため、グロブリンのような低親和性のタンパク質にクロフィブリン酸が結合する。このときの結合率は低く、高濃度までその結合が飽和しないため、総薬物濃度も用量比通りに増加したと考えられる。以上の結果は、通常の動物を用いた毒性試験においても何らかの理由でタンパク結合が飽和する場合、総薬物濃度に基づいた TK/TD 解析では、毒作用と曝露の相関が取れなくなり、曝露に基づいた毒性評

価が成立しなくなる可能性を示唆している。そのような場合は TK/TD の解釈を慎重に行う必要がある。

NAR は高脂血症を示す SD ラットから発見された系統である²²⁾。そのため、本章でも、NAR におけるコントロール群の脂質パラメータの値は、SD ラットより高かった。またデータは示していないが、NAR における peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) の mRNA 発現は、SD ラットより 2.5 倍高かった。PPAR α のタンパク発現量の、SD ラットと NAR における比較検討は行っていないが、NAR の PPAR α アゴニストに対する感受性は SD ラットより高い可能性がある。よって遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析のモデルとして NAR を考える場合は、PPAR α を介した反応が強めに起こる可能性を考慮しておく必要がある。

遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析の有用性を述べている報告はいくつか存在するが、ルーチンの毒性評価においては未だ一般的ではない。本章では、アルブミンを完全欠損した NAR を用い、タンパク結合が低い状況を模すことで、血漿タンパク結合率の飽和があった際の、遊離型薬物濃度 / 総薬物濃度比の上昇と、それに伴う毒性の増悪との相関を示すことができた。薬物によってはタンパク結合率が動物種によって異なるため、TK/TD の種差があった場合、遊離型薬物濃度をモニターすることで解釈が可能となるケースが考えられる。また、血漿タンパク結合の飽和は、薬物に高濃度曝露されたり、併用薬との薬物相互作用によりタンパク結合の競合が起きたり、薬剤性の肝障害や腎障害による生合成阻害や尿中への喪失で、血漿タンパクが減少したりした際に起こると考えられる。例えば実際に、血漿タンパクの一つである AGP が、化学物質による肝障害で、ラットにおいて減少することが報告されている³⁶⁾。よってこのような状況下でも、遊離型薬物濃度のモニターが毒性の解釈に有用と考えられる。上述した状況は非臨床の毒性試験においてのみではなく、臨床の場合、とりわけ新生児や妊婦、高齢者、肝障害、腎障害患者といったハイリスク患者においても起こりうる。そのため、遊離型薬物濃度を知ることで、副作用を避け、薬物の適正使用につなげることができるだろう。NAR は、タンパク結合率が飽和した際に起こる副作用を予測するためのモデル動物になりうると考えられる。また、遊離型薬物濃度の曝露を上げることにより、通常の毒性試験では評価しきれない、開発化合物の潜在的な毒性を明らかにするためのモデル動物としても、利用する価値があると考えられる。遊離型薬物濃度の測定には、限外ろ過法や

平衡透析法、超遠心法、高速分析先端法など、時間も労力もかかる方法を使う必要があり、ルーチンの薬物動態測定には不向きなのは確かである。しかしながら、上述したような、総薬物濃度ベースの曝露評価が不適切な解釈を導くケース、とりわけ、タンパク結合率の高い薬物が投与された場合では、遊離型薬物濃度の変動幅が大きくなると考えられることから、遊離型薬物濃度に基づく TK/TD 解析を積極的に取り入れていく価値があると考ええる。

第1章 小括

- 血漿中アルブミンが存在しない無アルブミンラット（NAR）において、総薬物濃度が下がり、遊離型薬物濃度が上がるという、薬物動態の特徴をタンパク結合率の高いクロフィプレートにおいて確認した。
- 毒性や薬理作用は、遊離型薬物濃度の高いNARで強く発現する傾向を示した。
- 毒性や薬理作用は、総薬物濃度より遊離型薬物濃度に相関することを確認した。
- 遊離型薬物濃度をモニターすることは、以下のようなケースでの事象の解釈に有用であると考えられた。
 - タンパク結合率の動物種差およびTK/TDの種差があった場合。
 - 高曝露，薬物相互作用，肝障害や腎障害等で毒性増強があった場合。
- NARを遊離型薬物濃度上昇のモデル動物として、副作用の予測や潜在的な毒性の検出に利用できることを示した。

第2章 妊娠ラットにおけるタンパク結合率の低下 および TK/TD への影響

2.1 序論

妊娠期間中は、多くの生理学的変化が起こることが知られており、薬物によっては、その血漿中濃度にも影響が出る場合がある^{37), 38)}。例えば、消化管の運動性低下や、胃酸分泌の低下に伴う胃内 pH の上昇が、薬物の吸収を変化させる、循環血漿量の増加やタンパク結合率の変化が、みかけの分布容積を増加させ、投与直後における血漿中濃度(C_0)を減少させる。CYP のような代謝酵素の活性が変化し、薬物のクリアランスが変わる、糸球体ろ過速度が上がり、薬物の消失が促進される、などである。

アルブミン、AGP、免疫グロブリン、リポタンパク質などは薬物と結合する血清タンパク質として知られている^{10), 11)}。とりわけ、哺乳類の血清中最も豊富に存在するタンパク質として知られ、主に酸性薬物と結合するアルブミンと、主に塩基性薬物と結合する AGP は、薬物の全身への分布に重要な役割を果たす^{12), 13)}。一方、妊娠が後期へと進むにつれ、循環血漿量がアルブミンの生成を上回る割合で増大し、低アルブミン血症を引き起こすことが知られている³⁹⁾。さらに、ヒト血清アルブミンのサイトに結合し、アルブミン親和性薬物のタンパク結合率を下げる NEFA^{40), 41)}が、妊娠期間中に増加することも知られている⁴²⁾。第1章でも触れたように、総薬物濃度ではなく、遊離型の薬物濃度が毒作用に直接影響することも広く受け入れられている^{8), 9)}。したがって、血漿タンパク結合率の低下、遊離型薬物濃度の上昇とそれに続く薬効や毒性の増強が、妊娠期間中に起こる可能性が考えられる。実際に、いくつかの薬剤で妊娠期間中の遊離型薬物濃度の上昇が報告されており、ヒトにおいては、薬効や毒性が増強する可能性が注目されている¹⁰⁾。

一方で妊娠動物は、医薬品の生殖発生毒性を検出するために使用されている⁴³⁾。妊娠動物を用いた毒性試験において、TK は、投与の正確さを保証するためのみならず、予想される TK プロファイルからの違いの有無を示すためにも重要である。妊娠動物においては、非妊娠動物と比較して、TK が変化する可能性が考えられる。実際に、いくつかの薬物について、動物でも妊娠中の遊離型薬物濃度の上昇が起き

ることが報告されている^{44), 45)}。遊離型薬物濃度が増えることにより、毒性が増強する可能性があるため、母動物毒性が非妊娠動物の毒性と異なった時、その解釈に遊離型薬物濃度の測定は有用であると考えられる。しかしながら、妊娠と非妊娠の毒性の違いを調べることは毒性試験のサポートデータであるため、妊娠動物における TK の変化と毒性の変化の相関はこれまで十分に研究されていない。

そこで本章では、妊娠が TK に及ぼす影響を調べるため、妊娠後期である妊娠 20 日のラットを用いて、アルブミン、AGP、免疫グロブリン (IgA、IgE、IgG、IgM)、NEFA の血清中濃度と循環血漿量を非妊娠のラットと比較した。さらに、両ラットにジクロフェナクナトリウムと塩酸プロプラノロールを単回静脈内、あるいは単回経口投与し、血漿中の総薬物濃度と遊離型薬物濃度を測定した。ジクロフェナクナトリウムのフリー体であるジクロフェナクは、主にアルブミンに結合し⁴⁶⁾、塩酸プロプラノロールのフリー体であるプロプラノロールは、主に AGP に結合することが知られている⁴⁷⁾。よって、これら 2 つの薬剤は、妊娠と非妊娠のラットでタンパク結合率が異なり、TK の違いが認められるのではないかと予想し、本章で選択した。また、静脈内投与は、みかけの分布容積の違いを調べるために行った。経口投与は、一般的に用いられる投与経路での影響を調べるために行った。次に TK の変化と毒性がどのように相関するかを調べるため、急性の消化管障害を引き起こすことが知られているジクロフェナクは⁴⁶⁾、単回投与後 24 時間で解剖して、光学顕微鏡を用いた消化管の病理組織学的検査を行った。

2.2 材料および方法

2.2.1 材料

- ・ ジクロフェナクナトリウム（和光純薬）
- ・ 塩酸プロプラノロール（東京化成）

2.2.2 実験動物の飼育管理

SD ラット雌雄（日本チャールス・リバー）を購入し、雄は交配用に使用した。8 週齢から 10 週齢で動物室に移し、室温 23 ± 3 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、照明 1 日 12 時間（7:00 – 19:00）の環境下でケージに個別飼育した。固形飼料 Certified Rodent Diet 5002（PMI）と水道水は自由摂取させて馴化した。馴化後、交配のため雌雄を 1:1 でケージに同居させ、交尾が確認された日を妊娠 0 日とした。妊娠 20 日と非妊娠の雌を、12 週齢から 13 週齢で実験に用いた。

2.2.3 血清タンパク質、NEFA およびヘマトクリット（HT）の測定

エーテル麻酔下、翼状針を用いて腹大動脈から採血した。動物は、腹大動脈からの放血により安楽死させた。HT の測定は、ヘパリンリチウム入り採血管に採取した血液を入れ、ミクロヘマトクリット法で行った。血清タンパク質と NEFA の測定のため、分離剤入りスピッツ管に採取した血液を入れ、室温に約 30 分間放置した。その後、 4°C 、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、血清を得た。血清中アルブミンおよび NEFA の測定は、自動分析装置 TBA-200FR（東芝メディカル）を用い、それぞれ bromcresol green 法ならびに酵素法で行った。血清中 AGP の測定は、ラット α_1 -AG プレート（メタボリックエコシステム）を用い、放射免疫拡散法にて duplicate で測定した。血清中免疫グロブリンの測定は、希釈した血清サンプルを用いて酵素結合免疫測定法（ELISA）にて、rat IgA、IgE、IgG、IgM ELISA Quantitation Kit（BETHYL Laboratories）で測定した。吸光度は、マイクロプレートリーダー（日本モレキュラーデバイス株式会社）を用いて 450 nm で測定した。

2.2.4 循環血漿量の測定

生理食塩水で溶解した 0.05%エバンスブルーを、シリンジで尾静脈から 0.1 mL/100

g 投与した。エーテル麻酔下で開腹し、エバンスブルー投与後 10 分で腹大動脈から翼状針で採血した。動物は採血後、腹大動脈からの放血により安楽死させた。採血した血液はヘパリンリチウム加サンプルチューブに移し、 4°C 、 $9,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し血漿を得た。除タンパク処理のため、血漿に 100% (w/v) トリクロロ酢酸を等量加え、混和後、室温に 10 分以上放置した。さらに血漿タンパク質に結合したエバンスブルーを解離させるため、トリクロロ酢酸と混和した血漿サンプルを氷上で 2 分間、超音波処理した。この後、サンプルを 4°C 、 $800 \times g$ で 10 分間遠心分離した。得られた上清を吸光光度計 U-3000 (日立ハイテック) を用いて 620 nm で吸光度を測定し、既知濃度のエバンスブルーとラットブランク血漿を用いて作成した検量線で濃度を求めた。この結果から体重 100 g あたりの血漿量を算出した。妊娠ラットの体重は、母体重量から子宮およびその内容物を差し引いて算出した。

2.2.5 ジクロフェナク、プロプラノロールの血漿中総濃度、遊離型濃度の測定

動物は一晩絶食した後、実験に用いた。ジクロフェナクナトリウムは、生理食塩水で調製した 10%ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液に溶解して、30 mg/kg で単回尾静脈内投与、あるいは 100 mg/kg で単回経口投与した ($n = 5/\text{群}$)。塩酸プロプラノロールは生理食塩水に溶解して、10 mg/kg で単回尾静脈内投与、あるいは 50 mg/kg で単回経口投与した ($n = 5/\text{群}$)。静脈内投与については投与後 5、15、30 分、1、4、7、24 時間に、経口投与については投与後 15 分、1、2、4、7、24 時間に、約 0.25 mL の血液を頸静脈より無麻酔下で採取した。採取した血液をヘパリンリチウム存在下、 4°C 、 $9,600 \times g$ で 5 分間遠心分離し、血漿を得た。得られた血漿は TK 測定に用いるまで -80°C で冷凍保存した。TK 測定時は、凍結血漿を解凍し、1 例あたり 120 μL の血漿を 1 群 5 例、採血ポイントごとにプールした。総薬物濃度の測定のため、100 μL のプール血漿を、後述する方法に従って前処理した。また遊離型薬物濃度測定のため、残りのプール血漿を 25°C 、 $238,000 \times g$ で 3 時間 40 分超遠心し、上清 100 μL を後述する方法に従って前処理した。

ジクロフェナクの測定法を以下に示した。

【前処理法】

- ・ 100 μL の血漿を 300 μL の 3.5%リン酸、100 μL の蒸留水、25 μL のアセト

ニトリルと混和し、その混液を、予め 500 μ L のメタノールと 500 μ L の蒸留水でコンディショニングした固相抽出カラム Oasis® MAX (Waters) にロードした。

- ・ 固相カラムを 500 μ L の 2%アンモニア水で洗浄し、300 μ L の 5%ギ酸メタノールで溶出した。
- ・ 得られた溶出液を窒素気流下で乾固し、ペレットを 60 μ L の 5%ギ酸メタノールと 40 μ L の蒸留水で再溶解した。
- ・ 再溶解液を液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS/MS) に 30 μ L 注入した。

【LC/MS/MS 装置構成】

- ・ HPLC (ポンプ、オートサンプラー、デガッサー) : Waters 2795 Separations Module (Waters)
- ・ カラム恒温槽 : 2695/2795 Column Heater (Waters)
- ・ MS/MS : Quattro micro (Waters)

【分析条件】

- ・ カラム : Xterra MS C₁₈ 50 $\times$ 2.1 mm i.d. (Waters)
- ・ カラム温度 : 40
- ・ 移動相 : 0.05 %ギ酸 / アセトニトリル = 60 : 40 (v/v)
- ・ 流速 : 0.2 mL
- ・ イオン化法 : ESI-negative
- ・ イオン検出モード : multiple reaction monitoring
- ・ キャピラリー電圧 : 3.5kV
- ・ ソース温度 : 120
- ・ デソルベーション温度 : 350 度
- ・ デソルベーションガス : 650 L/hr
- ・ コーンガス : 40 L/hr
- ・ モニターイオンおよびコーン電圧、コリジョン電圧
m/z 294.0 $\rightarrow$ m/z 290.1、18 V、12 eV

プロプラノロールの測定法を以下に示した。

【前処理法】

- ・ 100 μ L の血漿を 300 μ L の 2.5%リン酸、100 μ L の蒸留水と混和し、その混液を、予め 500 μ L のメタノールと 500 μ L の蒸留水でコンディショニングした固相抽出カラム Oasis® MCX (Waters) にロードした。
- ・ 固相カラムを 500 μ L の 2%塩酸で洗浄し、300 μ L の 5%アンモニアメタノールで溶出し、溶出液に 200 μ L の蒸留水を加えた。
- ・ 得られた溶液を液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS/MS) に 30 μ L 注入した。

【LC/MS/MS 装置構成】

- ・ HPLC (ポンプ、オートサンプラー、デガッサー) : Waters 2795 Separations Module (Waters)
- ・ カラム恒温槽 : 2695/2795 Column Heater (Waters)
- ・ MS/MS : Quattro micro (Waters)

【分析条件】

- ・ カラム : Xterra MS C₁₈ 150 × 2.1 mm i.d. (Waters)
- ・ カラム温度 : 40
- ・ 移動相 : 1 %アンモニア水 / アセトニトリル = 50 : 50 (v/v)
- ・ 流速 : 0.2 mL
- ・ イオン化法 : ESI-positive
- ・ イオン検出モード : multiple reaction monitoring
- ・ キャピラリー電圧 : 2.5kV
- ・ ソース温度 : 120
- ・ デソルベーション温度 : 450 度
- ・ デソルベーションガス : 700 L/hr
- ・ コーンガス : 50 L/hr
- ・ モニターイオンおよびコーン電圧、コリジョン電圧

m/z 260.0 → m/z 116.0、32 V、19 eV

2.2.6 TK パラメータ解析

血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC_{all})、投与直後における血漿中濃度 (C₀)、消失半減期 (t_{1/2}) はノンコンパートメント解析により、計算ソフト WinNonlin Professional Version 4.0.1 (Pharsight) で算出した。C_{max} および t_{max} は実測値を採用した。

2.2.7 タンパク結合動態の解析

結合型薬物濃度は、総薬物濃度から遊離型薬物濃度を除して算出した。結合型薬物と遊離型薬物の濃度の相関は Michaelis-Menten の式 (ジクロフェナクの解析用) および Michaelis-Menten 型非線形 + 線形式 (プロプラノロールの解析用) Scatchard プロットを使い、WinNonlin Professional Version 4.0.1 (Pharsight) で解析した。以下のモデル式を使用した。

Michaelis-Menten 式: $C_b = B_{\max} \cdot C_u / (K_d + C_u)$

Michaelis-Menten 型非線形 + 線形式: $C_b = B_{\max} \cdot C_u / (K_d + C_u) + A \cdot C_u$

A : 比例定数、 B_{max} : 最大結合濃度、 C_b : 結合型濃度、 C_u : 遊離型濃度
K_d : 解離定数

2.2.8 病理組織学的検査

ジクロフェナクナトリウムの単回投与後 24 時間、エーテル麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、胃、十二指腸、回腸、盲腸、大腸を採材した。採材した各消化管組織は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従ってパラフィンに包埋した。病理組織標本はヘマトキシリン - エオジンで染色して作製し、光学顕微鏡で観察した。

2.2.9 統計解析

分散の均一性は F-test (有意水準 25%) で行い、平均値の有意差検定は Student's t test または Aspin-Welch's t-test で行った。統計処理は SAS® System Release 8.2 (SAS

Institute) を用いて行った。有意水準は 5%とした。

2.3 結果

2.3.1 血清タンパク質と NEFA の濃度

アルブミン、AGP、免疫グロブリン、および NEFA の血清中濃度を Table 2-1 に示した。非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットにおいて血清アルブミン、AGP、および IgG の濃度が有意に低かった。一方、IgM は妊娠ラットで有意に高く、IgA は両ラット間で有意な差がなかった。IgE は両ラットともに定量限界以下の濃度であった。総免疫グロブリン量のうち、かなりの部分が IgG で占められるため、総免疫グロブリン濃度としては、妊娠ラットの方が非妊娠ラットより有意に低かった。NEFA の濃度は非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットで有意に高い値を示した。

Table 2-1. Concentrations of serum proteins and NEFA in non-pregnant and pregnant rats.

	Non-pregnant rats	Pregnant rats
Albumin (g/dl)	2.82 ± 0.25	2.11 ± 0.15**
AGP (μg/ml)	113 ± 17	60.3 ± 5.6**
IgA (mg/l)	13.6 ± 4.0	15.6 ± 7.1
IgG (mg/l)	6786 ± 2180	1142 ± 605**
IgM (mg/l)	251 ± 46	391 ± 82**
IgE (mg/l)	N.D.	N.D.
NEFA (μEq/l)	401 ± 79	1170 ± 225**

Each data represents the mean ± S.D. of 10 rats.

N.D.: Not determined.

** : Significantly different from the mean value of the non-pregnant rats. (p<0.01, Aspin-Welch's t test)

2.3.2 循環血漿量と HT

循環血漿量と HT の値を Table 2-2 に示した。循環血漿量は、妊娠ラットあるいは非妊娠ラットの体重 100 g あたりで標準化した。非妊娠ラットに比べ、妊娠ラット

において、循環血漿量は高値を示し、HT は低値を示した。

Table 2-2. Circulating plasma volume and HT in non-pregnant and pregnant rats.

	Non-pregnant rats	Pregnant rats
Plasma volume (ml/100 g body wt)	9.08 ± 0.89	12.6 ± 1.6**
HT (%)	39.1 ± 1.6	31.4 ± 1.2**

Plasma volume was normalized by 100 g body weight of dams or non-pregnant rats. Each data represents the mean ± S.D. of 5-7 rats.

** : Significantly different from the mean value of the non-pregnant rats.
($p < 0.01$, Student's t test)

2.3.3 ジクロフェナクおよびプロプラノロールの血漿中総濃度および遊離型濃度

ジクロフェナクナトリウムを単回静脈内投与、または単回経口投与した後の、ジクロフェナクの血漿中総濃度および遊離型濃度を Fig. 2-1、Table 2-3 および Table 2-4 に示した。静脈内投与後、非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットで、総濃度の C_0 および AUC_{all} はそれぞれ 2.0 倍および 1.9 倍高値を示した。また、遊離型濃度の C_0 および AUC_{all} はそれぞれ 2.4 倍および 3.9 倍高値を示した。 $t_{1/2}$ については、総濃度で 1.7 倍、遊離型濃度で 3.1 倍長かった。同様に経口投与後の値を比較すると、非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットで、総濃度の C_{max} および AUC_{all} はそれぞれ 0.6 倍低値および 1.1 倍高値を示した。また、遊離型濃度の C_{max} および AUC_{all} はそれぞれ 3.8 倍および 3.9 倍高値を示した。遊離型分率については全ての採血時点において、非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットは高いパーセンテージを示し、その差は、曝露が高い採血時点ほど大きかった。塩酸プロプラノロールを単回静脈内投与、または単回経口投与した後の、プロプラノロールの血漿中総濃度および遊離型濃度を Fig. 2-2、Table 2-5 および Table 2-6 に示した。ジクロフェナクの結果とは異なり、 C_0 、 C_{max} 、 AUC_{all} 、遊離型分率の全てにおいて、妊娠ラットと非妊娠ラットは同様の値を示した。

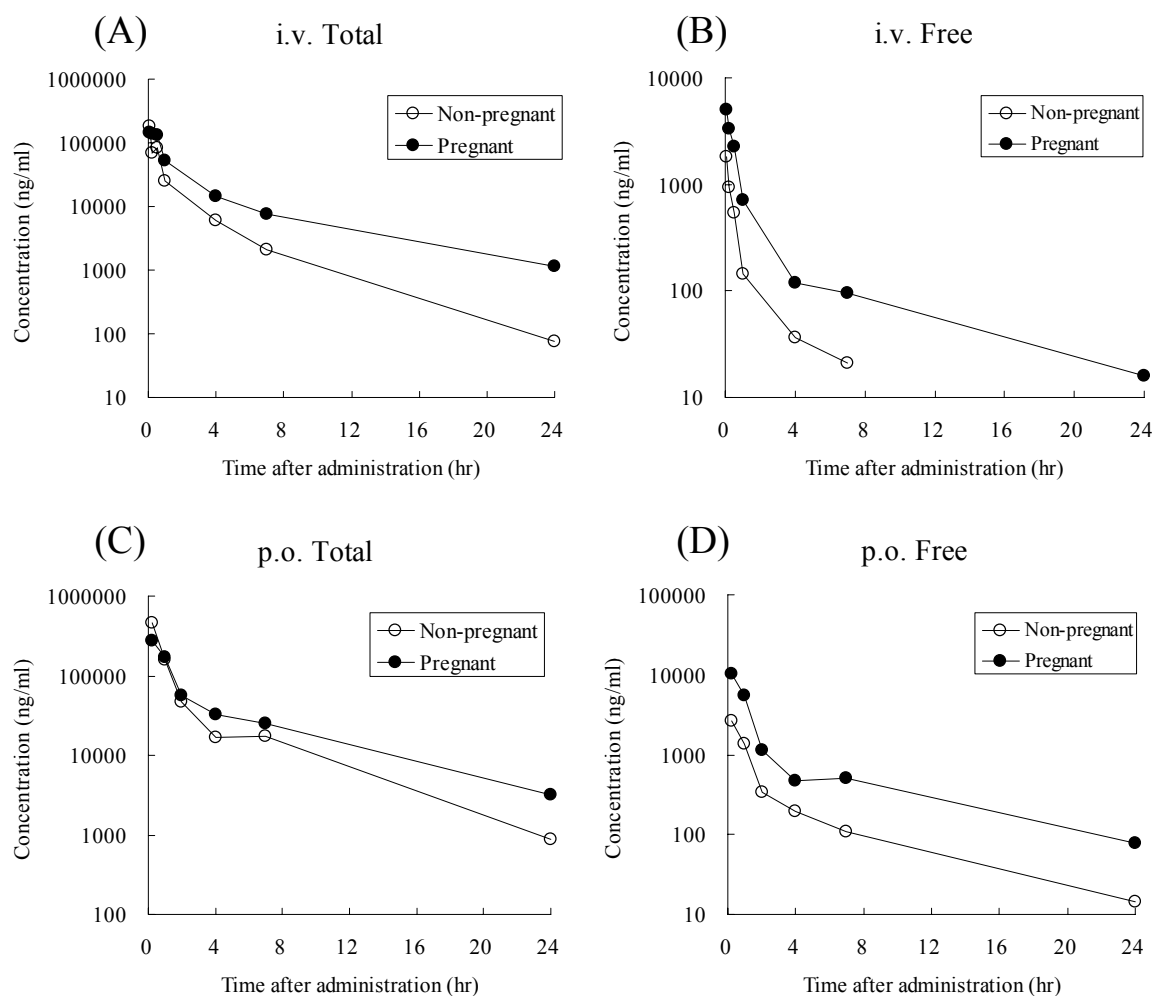


Fig. 2-1. Total and free diclofenac concentrations in plasma after single intravenous and oral administration to non-pregnant and pregnant rats. Pooled plasma samples (n=5) were used for the measurement. (A) Total concentration, intravenous administration, 30 mg/kg. (B) Free concentration, intravenous administration, 30 mg/kg. (C) Total concentration, oral administration, 100 mg/kg. (D) Free concentration, oral administration, 100 mg/kg.

Table 2-3. The total and free diclofenac concentrations in plasma and TK parameters after a single intravenous administration at a dose level of 30 mg/kg to non-pregnant and pregnant rats.

Variable	Plasma concentrations of diclofenac (ng/ml)							C ₀ (ng/ml)	t _{1/2} (hr)	AUC _{all} (ng· hr/ml)	
	0.083	0.25	0.5	1	4	7	24 (hr)				
Non-pregnant	total	184645	69338	82832	24939	5910	2101	74.3	300433	3.28	164082
	free	1818	936	544	143	36.7	21.0	0	2529	2.17	1302
	free fraction %	1.0	1.3	0.7	0.6	0.6	1.0	N.D.			
Pregnant	total	143877	135977	133967	51307	14175	7443	1133	147972	5.73	319087
	free	4971	3298	2265	710	120	94.4	16.1	6095	6.82	5095
	free fraction %	3.5	2.4	1.7	1.4	0.8	1.3	1.4			

Pooled plasma samples (n=5) were used for the measurement.

N.D.: Not determined.

0: < 5 ng/ml (below the limit of quantitation).

Table 2-4. The total and free diclofenac concentrations in plasma and TK parameters after a single oral administration at a dose level of 100 mg/kg to non-pregnant and pregnant rats.

Variable	Plasma concentrations of diclofenac (ng/ml)							C _{max} (ng/ml)	t _{max} (hr)	AUC _{all} (ng* hr/ml)
	0.25	1	2	4	7	24	(hr)			
Non-pregnant	total	462473	160406	46584	16858	17167	884	462473	0.25	662797
	free	2676	1363	343	196	108	14.2	2676	0.25	4736
	free fraction %	0.6	0.8	0.7	1.2	0.6	1.6			
Pregnant	total	273080	172224	56503	32083	24805	3231	273080	0.25	727712
	free	10195	5539	1126	467	504	78.7	10195	0.25	18510
	free fraction %	3.7	3.2	2.0	1.5	2.0	2.4			

Pooled plasma samples (n=5) were used for the measurement.

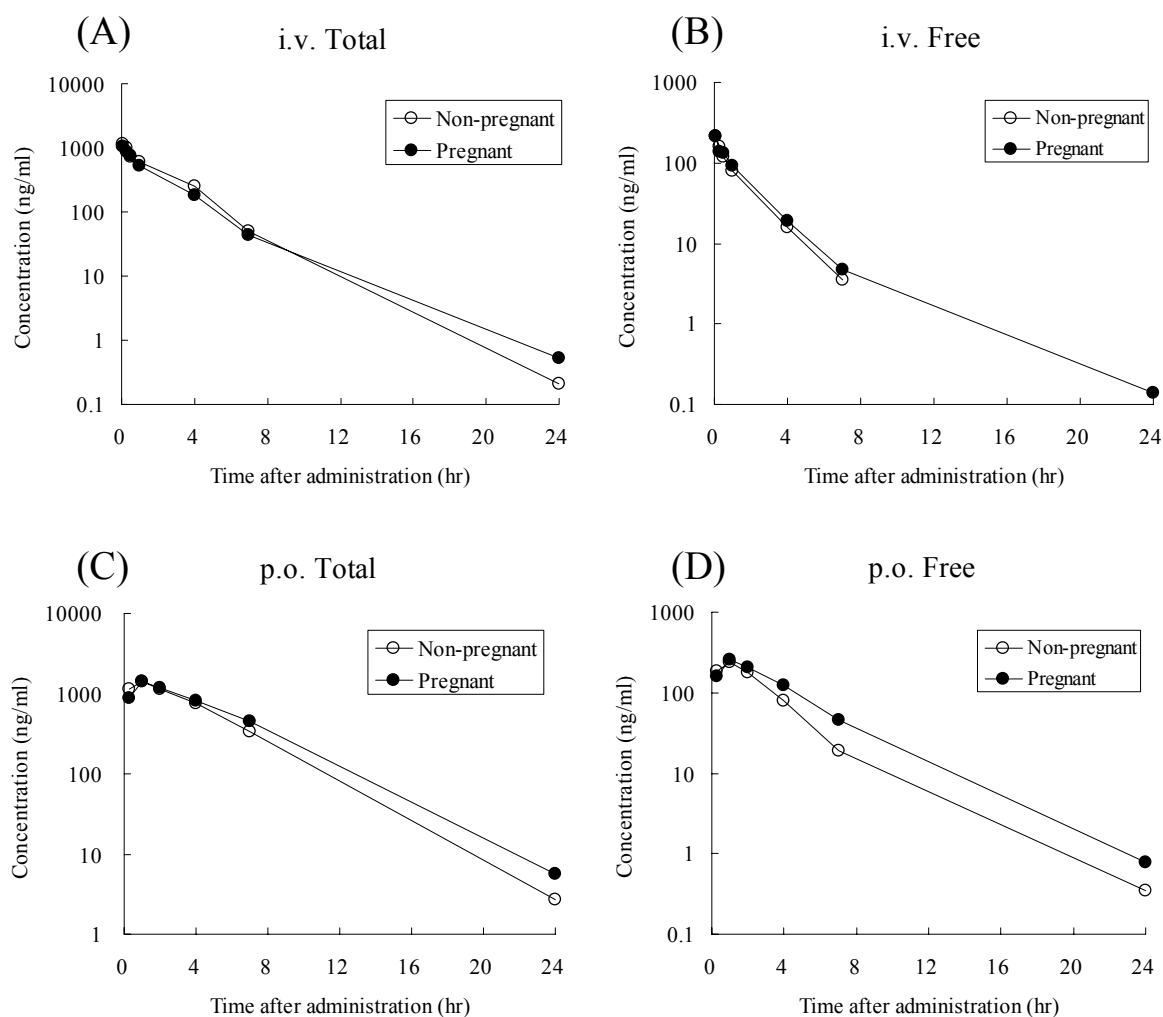


Fig. 2-2. Total and free propranolol concentrations in plasma after single intravenous and oral administration to non-pregnant and pregnant rats. Pooled plasma samples (n=5) were used for the measurement. (A) Total concentration, intravenous administration, 10 mg/kg. (B) Free concentration, intravenous administration, 10 mg/kg. (C) Total concentration, oral administration, 50 mg/kg. (D) Free concentration, oral administration, 50 mg/kg.

Table 2-5. The total and free propranolol concentrations in plasma and TK parameters after a single intravenous administration at a dose level of 10 mg/kg to non-pregnant and pregnant rats.

Variable		Plasma concentrations of propranolol (ng/ml)							C ₀ (ng/ml)	t _{1/2} (hr)	AUC _{all} (ng· hr/ml)
		0.083	0.25	0.5	1	4	7	24 (hr)			
Non-pregnant	total	1164	999	717	594	247	50.2	0.206	1256	1.99	2959
	free	216	159	118	78.8	16.0	3.51	0	252	1.34	336
	free fraction %	18.6	15.9	16.5	13.3	6.5	7.0	N.D.			
Pregnant	total	1053	889	771	524	183	43.9	0.518	1145	2.36	2563
	free	214	140	132	92.2	19.2	4.65	0.137	264	2.97	383
	free fraction %	20.3	15.7	17.1	17.6	10.5	10.6	26.4			

Pooled plasma samples (n=5) were used for the measurement.

N.D.: Not determined.

0: < 0.1 ng/ml (below the limit of quantitation).

Table 2-6. The total and free propranolol concentrations in plasma and TK parameters after a single oral administration at a dose level of 50 mg/kg to non-pregnant and pregnant rats.

Variable		Plasma concentrations of propranolol (ng/ml)						C _{max} (ng/ml)	t _{max} (hr)	AUC _{all} (ng·hr/ml)
		0.25	1	2	4	7	24 (hr)			
Non-pregnant	total	1124	1444	1126	765	333	2.66	1444	1	8780
	free	187	243	181	78.5	19.0	0.348	243	1	967
	free fraction %	16.6	16.8	16.1	10.3	5.7	13.1			
Pregnant	total	891	1413	1163	803	459	5.65	1413	1	10072
	free	162	259	204	122	45.8	0.779	259	1	1383
	free fraction %	18.2	18.3	17.5	15.2	10.0	13.8			

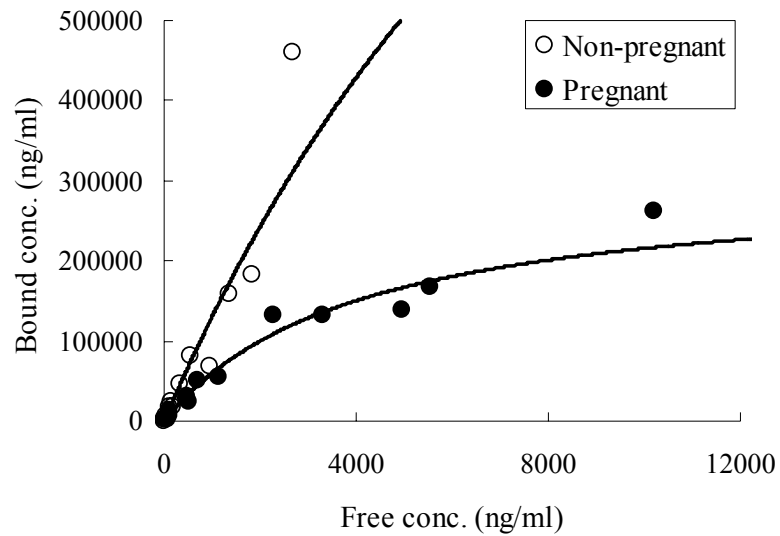
Pooled plasma samples (n=5) were used for the measurement.

2.3.4 タンパク結合動態の解析

ジクロフェナクの結合動態の解析は、血漿中の遊離型濃度と結合型濃度の関係のプロット (Fig. 2-3A) および Scatchard plot (Fig. 2-3B) によって行った。カーブフィッティングは Michaelis-Menten の式を用いて行った。妊娠ラットにおけるジクロフェナクのタンパク結合動態は非線形性を示し、ジクロフェナクの遊離型濃度が上がるにつれて結合型濃度は飽和した。一方、非妊娠ラットにおいては、ほぼ線形で

あり、飽和には至らなかった (Fig. 2-3A)。Scatchard plot の回帰直線の傾きは、両ラット間で異なり、非妊娠ラットでは x 軸とほぼ平行で、結合型の濃度が上がっても遊離型と結合型の濃度比が変わらなかったが、妊娠ラットでは右肩下がりで結合型の濃度が上がると結合型の濃度比が低下した (Fig. 2-3B)。同様に、プロプラノロールの結合動態は、血漿中の遊離型濃度と結合型濃度の関係のプロット (Fig. 2-4A) および Scatchard plot (Fig. 2-4B) によって行った。カーブフィッティングは Michaelis-Menten 型非線形 + 線形式を用いて行った。妊娠ラットと非妊娠ラットにおけるプロプラノロールのタンパク結合動態は、高濃度域では同様であった。しかしながら低濃度域では、妊娠ラットは非妊娠ラットより低い結合型濃度比を示した。

(A)



(B)

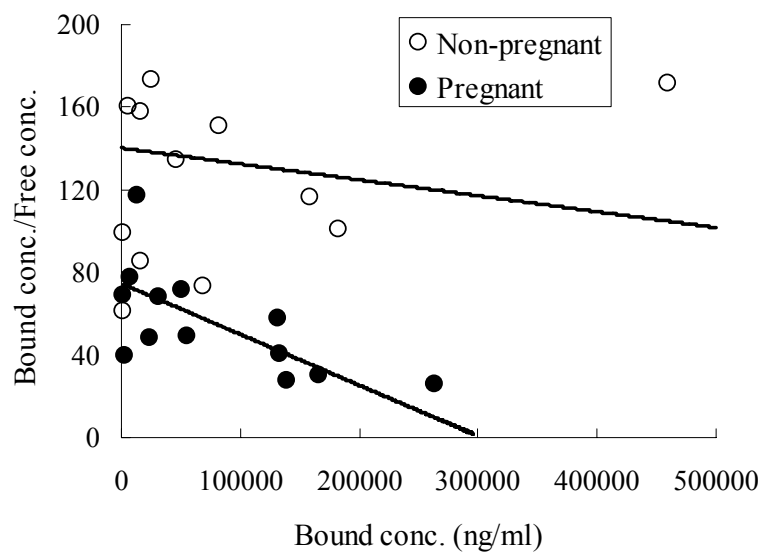
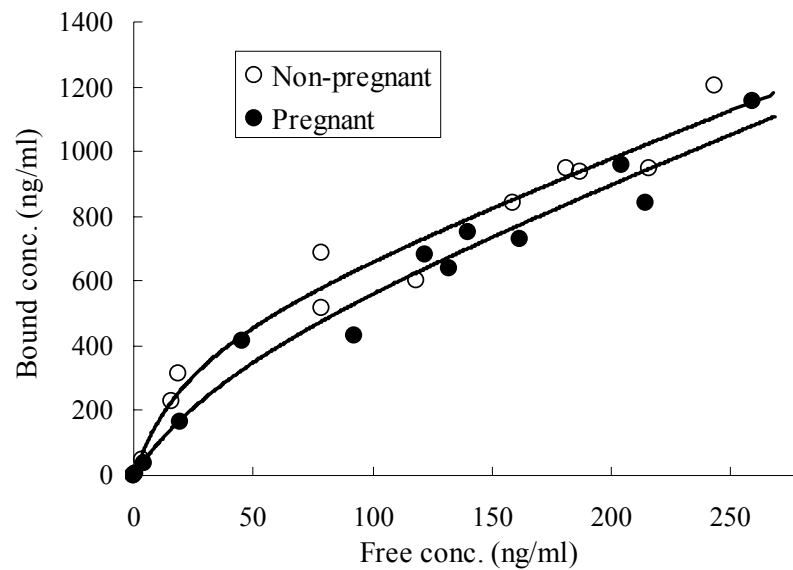


Fig. 2-3. Protein binding of diclofenac in non-pregnant and pregnant rats after a single intravenous and oral administration of diclofenac sodium. (A) The relationship between free and bound concentrations of diclofenac in plasma. (B) The Scatchard plots. Each symbol represents the results of the pooled plasma samples ($n=5$). The solid lines represent the predicted values by the Michaelis-Menten equation.

(A)



(B)

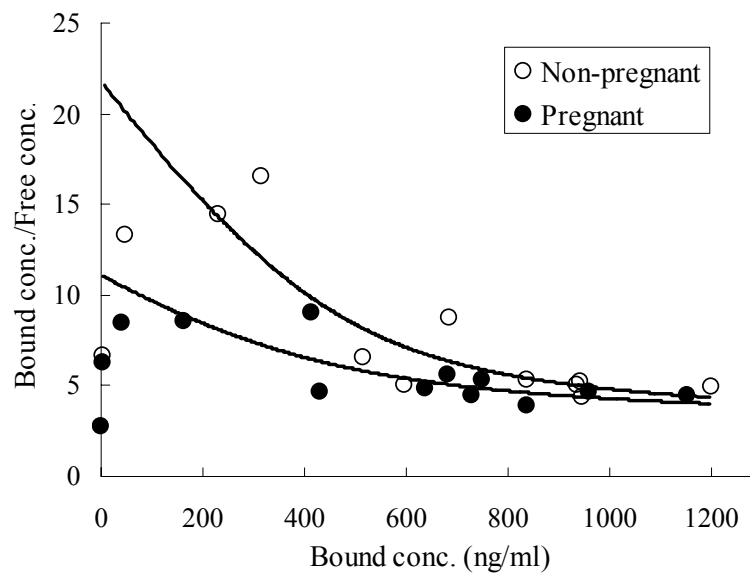


Fig. 2-4. Protein binding of propranolol in non-pregnant and pregnant rats after a single intravenous and oral administration of propranolol hydrochloride. (A) The relationship between free and bound concentrations of propranolol in plasma. (B) The Scatchard plots. Each symbol represents the results of the pooled plasma samples (n=5). The solid lines represent the predicted values by the Michaelis-Menten type non-linear plus linear

2.3.5 ジクロフェナクナトリウム投与後の病理組織学的検査

ジクロフェナクナトリウムを単回静脈内投与、あるいは単回経口投与した後の病理組織学的検査において、妊娠ラット、非妊娠ラットともに、消化管のびらんと潰瘍が観察された。びらんと潰瘍の程度はグレーディングスコアとしてスコア化し、静脈内投与を Table 2-7 に、経口投与を Table 2-8 にまとめた。非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットにおいて、病理所見が認められる頻度、グレーディングスコア、びらんより重篤な変化である潰瘍が認められる頻度が高い傾向にあった。

Table 2-7. Microscopic findings in gastrointestinal tracts after a single intravenous administration of diclofenac in non-pregnant and pregnant rats.

Organ	Pathological findings	Grading score	Non-pregnant				Pregnant			
			T ^{a)}	1	2	3	T ^{a)}	1	2	3
Stomach (PY)	Erosion		1	1	0	0	0	0	0	0
	Ulcer		1	1	0	0	4	3	1	0
Duodenum	Erosion		0	0	0	0	2	2	0	0
	Ulcer		0	0	0	0	2	0	2	0
Ileum	Erosion		1	1	0	0	0	0	0	0
Cecum	Ulcer		2	2	0	0	4	4	0	0
Colon	Ulcer		1	1	0	0	0	0	0	0

Grading score: 1: slight 2: moderate 3: marked ^{a)}Total number of animals observed each finding.

Data are expressed as the number of animals observed each grading score. Each non-pregnant and pregnant rat group consists of 5 rats.

Table 2-8. Microscopic findings in gastrointestinal tracts after a single oral administration of diclofenac in non-pregnant and pregnant rats.

Organ	Pathological findings	Grading score	Non-pregnant				Pregnant			
			T ^{a)}	1	2	3	T ^{a)}	1	2	3
Stomach (PY)	Erosion		1	1	0	0	0	0	0	0
	Ulcer		1	0	1	0	4	0	1	3
Stomach (GL)	Ulcer		1	0	1	0	0	0	0	0
Duodenum	Erosion		0	0	0	0	2	2	0	0
	Ulcer		0	0	0	0	2	0	2	0
Cecum	Erosion		0	0	0	0	1	1	0	0
	Ulcer		1	0	1	0	2	2	0	0

Grading score: 1: slight 2: moderate 3: marked ^{a)}Total number of animals observed each finding.

Data are expressed as the number of animals observed each grading score. Each non-pregnant and pregnant rat group consists of 5 rats.

2.4 考察

非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットでは、血清中のアルブミン、AGP、総免疫グロブリンの濃度は低値を示し、NEFA の濃度は高値を示した。また、循環血漿量は増加し、HT は低下していた。以上のことから、血清タンパク質の濃度が低下した要因の一つとして、循環血漿量の増加に伴う血液希釈が考えられる。しかしながら低下の程度はタンパク質によって異なるため、血液希釈だけでは全ての低下を説明できない。特に IgG については、他の血清タンパク質より低下の割合が大きかった。IgG はヒト妊娠期間中において、免疫付与のために胎盤を介して胎児に供給されることが知られている⁴⁸⁾。同じことがラットでも起こり、これが妊娠ラットの IgG 減少の原因となっている可能性が考えられる。以上の本章で認められた全ての変化は、遊離型の薬物濃度とみかけの分布容積を増大させ、TK/TD の変化を引き起こす可能性が考えられた。

ジクロフェナクの単回静脈内投与後、非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットでは、総濃度の C_0 は低く、 AUC_{all} は高く、 $t_{1/2}$ は長くなっていたが、その変化の程度は比較的小さいものであった。一方、遊離型濃度の C_0 、 AUC_{all} はともに高く、 $t_{1/2}$ は長くなっており、その変化の程度も総濃度に比べて大きかった。遊離型分率については、全ての採血時点において、非妊娠ラットに比べ、妊娠ラットは高いパーセンテージを示し、その差は、曝露が高い採血時点ほど大きかった。一般的に用いられる投与経路である経口投与後も同様に、総濃度の変化の程度は小さかったが、遊離型濃度では C_{max} や AUC_{all} が増加した。よって、妊娠ラットにおけるジクロフェナクの曝露変化は、アルブミン濃度の低下とアルブミン親和性薬物のタンパク結合率を下げる NEFA の増加によってタンパク結合が飽和した結果、遊離型分率が上昇し、みかけの分布容積の増大と消失の遅延が起こったために生じたと考えられる。毒性試験においては、一般的に TK として、血漿中の総薬物濃度のみが測定される。よって生殖発生毒性試験において、ルーチンの TK 解析では、総濃度の曝露以上に母動物毒性が強く発現し、解釈に支障をきたす可能性がある。実際に、ジクロフェナク投与後の光学顕微鏡による病理組織学的検査において、妊娠ラットでより重篤な消化管毒性が観察された。よって妊娠ラットにおいて毒性がより重篤であったのは、遊離型ジクロフェナクの曝露増加が関連していたためと考えられる。一方、塩酸プロ

プロプラノロールの単回静脈内投与および単回経口投与後では、AGP の濃度が妊娠ラットで低いにも関わらず、 C_0 、 C_{max} 、 AUC_{all} 、遊離型分率の全てにおいて、両ラットは同様の値を示した。

妊娠ラットと非妊娠ラットの TK が、ジクロフェナクでは異なっていたにも関わらず、プロプラノロールでは差が認められなかった理由を調べるため、血漿中の遊離型濃度と結合型濃度の関係のプロット、および Scatchard plot によってタンパク結合動態の解析を行った。その結果、ジクロフェナクについては、両ラットにおける両プロットのアフィニティ・キャパシティー曲線に全濃度域で差が認められ、ジクロフェナクのタンパク結合動態が異なることが確認された。一方、プロプラノロールのタンパク結合動態は、高濃度域では同様であったものの、低濃度域では、妊娠ラットは非妊娠ラットより低い結合型濃度比を示した。プロプラノロールは主に AGP に結合するが、AGP の血清中濃度はアルブミンに比べてかなり低いことは文献的にも知られており¹⁰⁾、今回の測定データでも確認された。よって、AGP はプロプラノロールの高濃度域では結合部位が飽和し、非特異的なタンパク結合がみられたと考えられる。妊娠ラットにおいては、AGP の濃度が低いため、この結合部位の飽和が、非妊娠ラットより低濃度のプロプラノロール曝露で生じると考えられる。しかしながら今回は、多くの採血時点で、両ラットの結合動態に差が出る濃度域より高曝露となり、両ラットとも AGP が飽和していたため、TK パラメータに顕著な差が認められなかったと考えられる。本章では、高曝露を負荷した方が、タンパク結合の飽和を起こし、両ラットの TK に差が生じるであろうと予想し、できるだけ高用量を選択したが、予想に反して AGP の飽和は低濃度から生じてしまった。もし、AGP に結合し、比較的低曝露を維持するような薬剤を投与したとすれば、妊娠と非妊娠のラット間で TK の差が認められるかもしれない。臨床の場を考えると、毒性試験よりかなり低い曝露域で治療を行うため、AGP に結合する薬剤を投与された妊婦のファーマコキネティクス (PK) が、非妊娠時と異なる可能性が示唆される。実際に妊婦において、ピバカイン、リドカイン、そしてプロプラノロールの AGP との結合低下と、用量調節の必要性が議論されている¹⁰⁾。

免疫グロブリンについては、これに優先的かつ特異的に結合するような薬剤があまり一般的ではない。しかしながら妊娠ラットにおいては、他の血清タンパク質に比べてかなりの割合で低下していたため、低親和性ではあっても非特異的結合タン

パク質として、何らかの薬剤のタンパク結合の変化に寄与する可能性はあると考える。

結論として本章では、妊娠ラットと非妊娠ラットの、薬剤の分布の変化によって TK/TD に差が生じるケースを示すことができた。その差は、総薬物濃度では十分に評価できないため、ルーチンの TK 解析では説明のつかない母動物毒性が起こった場合は、その解釈のために遊離型濃度の TK が有用と考えられる。また臨床において、てんかんや感染症、うつ病、高血圧などが、妊婦であっても薬物治療が必要な疾病として知られており³⁷⁾、妊婦の PK とファーマコダイナミクス (PD) の変化が報告されている¹⁰⁾。よって、妊娠動物によって得られる TK/TD や PK/PD の変化に関する知見は、上述のような疾病に対する新規治療薬を開発し、妊婦に投与する際、投与計画や用量の調節などの適正使用に貴重な情報を与えるものとする。

第2章 小括

- 妊娠ラットにおいて、タンパク結合率低下と血漿容量増加に伴うと考えられる、遊離型薬物の曝露増加を確認した。
- ジクロフェナクを用いた検討により、妊娠ラットの遊離型薬物曝露の増加は、毒性の増強を伴う可能性が示唆された。
- プロプラノロールのような AGP 結合薬では、低濃度域で妊娠ラットの遊離型薬物濃度が高くなる可能性が示唆された。
- 一般毒性試験と比較して強い母動物毒性が起こった場合は、その解釈のための一つの方法として、遊離型薬物濃度の TK 測定が有用であると考えられた。
- 非臨床において、妊娠動物によって得られた TK/TD の変化に関する知見は、臨床で新規治療薬を妊婦に投与する際の適正使用に貴重な情報を与えうると考えられた。

第3章 ラットにおける薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現、 あるいは活性に対する妊娠の影響

3.1 序論

妊娠期間中に、多くの生理学的変化が起こることはすでに第2章の序論で述べた。したがって、第2章では妊娠時の薬物の分布に焦点をあて、タンパク結合率と遊離型薬物濃度の観点から、妊娠ラットと非妊娠ラットの違いを検討した。一方、本章では、薬物の代謝に大きな役割を果たす薬物代謝酵素、ならびに吸収、分布および排泄に大きな役割を果たすトランスポーターが、妊娠中に受ける変化とPK/TKに及ぼす影響について焦点をあて検討した。

CYPやUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)などの薬物代謝酵素は、異物の代謝に重要な役割を果たしているが、その発現は病態、性別、年齢、栄養状態など、様々な要因によって影響を受けることが知られている。妊娠もそれらの要因の一つであり、妊娠によってCYPやUGTの活性が変動するというヒトの報告が数多くなされている^{17), 49)}。ラットにおいても、チトクロームP450含量およびCYP1A1、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2E1、CYP4A1、UGT1A、UGT2B1といった分子種の肝臓におけるタンパク発現レベルが、非妊娠に比べ妊娠で減少していることが報告されている⁵⁰⁾⁻⁵³⁾。また、CYP2D2の活性上昇やCYP2C6、UGT1A、UGT2B1の活性低下が妊娠ラットにおいて報告されている^{50), 53)}。しかしながら、ラット肝臓における薬物代謝酵素の包括的な活性変化やクリアランスに及ぼす影響については、まだ十分に調べられていない。一方、妊娠中に多くの有機アニオンやグルクロン酸抱合体の胆汁分泌が減少することが、以前から知られている⁵⁴⁾⁻⁵⁷⁾。このことから、薬物の吸収や分布、薬物や胆汁酸の排泄に重要であるトランスポーターの発現や活性が、妊娠中に変化していることが示唆される。

実際に、抱合型ビリルビンやグルタチオン抱合体のような多価アニオン性抱合体を輸送する、多剤耐性タンパク質であるMRP2⁵⁸⁾のタンパク質発現が、妊娠ラットで有意に減少したという報告がある⁵⁹⁾。さらに、肝細胞の側底細胞膜で抱合胆汁酸の取り込みを行う、ナトリウム依存的胆汁酸取り込みトランスポーターであるNtcp⁶⁰⁾の、mRNAとタンパク質の発現減少も報告されている⁶¹⁾。しかしながら、肝臓のみならず、腎臓や小腸において、妊娠がトランスポーターにどのような影響を

及ぼすかは、ほとんど知られていない。妊娠によって薬物代謝酵素やトランスポーターの発現や活性が変化し、薬物のクリアランスに影響を与えると、薬効や毒性の増減につながる可能性がある。

第2章でも述べたように、妊娠動物は医薬品の生殖発生毒性を検出するために使用されており、その中で TK 測定が行われている。妊娠動物における TK や TD が非妊娠動物と異なり、毒性試験の進行や解釈を難しくするケースが生じることがあるが、その理由として、上述のような CYP やトランスポーターの妊娠中の変動が引き金になっている可能性は十分に考えられる。しかしながら、そのような観点からの研究はほとんど行われていない。

そこで本章では、妊娠による薬物代謝酵素やトランスポーターの変動を網羅的に調べ、TK/TD への影響を考察するため、妊娠後期である妊娠 20 日のラットを用いて、薬物代謝酵素に関しては肝臓のチトクローム P450 含量測定、マイクロアレイ解析、Western blot 解析、分子種特異的基質を用いた代謝酵素活性測定を、トランスポーターに関しては薬物動態に深く関与する臓器である肝臓、腎臓、小腸のマイクロアレイ解析を行った。

3.2 材料および方法

3.2.1 材料

- ・ フェナセチン (和光純薬)
- ・ 2-ベンゾキサゾリノン (和光純薬)
- ・ クロルゾキサゾン (Sigma-Aldrich)
- ・ アセトアミノフェン (Sigma-Aldrich)
- ・ ヒドロキシクロルゾキサゾン (Sigma-Aldrich)
- ・ 6 β -ヒドロキシテストステロン (Sigma-Aldrich)
- ・ レセルピン (Sigma-Aldrich)
- ・ β -NADP ナトリウム塩 (Sigma-Aldrich)
- ・ グルコース-6-リン酸 2 ナトリウム水和物 (Sigma-Aldrich)
- ・ グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (Sigma-Aldrich)
- ・ テストステロン (東京化成)
- ・ フェノール (和光純薬)
- ・ 1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン (和光純薬)
- ・ 1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (和光純薬)
- ・ エタクリン酸 (和光純薬)
- ・ *p*-ニトロフェノール (和光純薬)
- ・ CYP1A2、CYP2B1/2 および CYP2D1 一次抗体 (Chemicon International)
- ・ CYP2C6、NADPH P450 reductase、UGT1A6 および UGT2B 一次抗体 (第一化学薬品)
- ・ CYP2E1, CYP3A および CYP4A 一次抗体 (GE Healthcare)
- ・ GST Yc、GST Yb2 および GST Yp 一次抗体 (フナコシ)
- ・ UGT1A1 (サンタクルーズバイオテクノロジー)

3.2.2 実験動物の飼育管理および採材

SD ラット雌雄 (日本チャールス・リバー) を購入し、雄は交配用に使用した。8 週齢から 10 週齢で動物室に移し、室温 23 ± 3 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、照明 1 日 12 時間 (7:00 – 19:00) の環境下でケージに個別飼育した。固形飼料 Certified Rodent Diet

5002 (PMI) と水道水は自由摂取させて馴化した。馴化後、交配のため雌雄を 1 : 1 でケージに同居させ、交尾が確認された日を妊娠 0 日とした。妊娠 20 日と非妊娠の雌を、12 週齢から 13 週齢で実験に用いた。動物はエーテル麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、肝臓、腎臓、空腸、回腸を採材した。採材した各臓器は以降の検査項目を行うまで -80 °C で冷凍保存した。

3.2.3 酵素液の調製

凍結された肝臓を解凍し、氷冷下、湿重量の 3 倍量の 1.15%塩化カリウム溶液でホモジナイズした。このホモジネートを 4 °C 冷却下、700 × g で 10 分間遠心分離し、上清を 4 °C 冷却下、9,000 × g で 20 分間遠心分離した。得られた上清をさらに 4 °C 冷却下、105,000 × g で 1 時間超遠心した。得られた上清をサイトゾル画分として使用した。沈渣は氷冷下、上清と同量の 1.15%塩化カリウム溶液で懸濁し、さらに 4 °C 、105,000 × g で 1 時間超遠心した。得られた沈渣を、上清と同量の 20%グリセロール含有 1.15%塩化カリウム溶液で懸濁し、ミクロソーム画分として使用した。

3.2.3 チトクローム P450 含量および P450 分子種 (CYPs) の活性の測定

P450 含量と CYPs の活性測定にはミクロソーム画分を使用した。P450 含量およびタンパク質濃度の測定は、それぞれ Omura と Sato の方法³²⁾、Lowry らの方法³³⁾に従った。CYPs の活性測定は、フェナセチン O-脱エチル化活性 (CYP1A2)、クロルゾキサゾン 6-水酸化活性 (CYP2E1) およびテストステロン 6β-水酸化活性 (CYP3A) を以下の方法で測定することによって行った。

- CYP1A2 および CYP3A の活性

【酵素反応】

- 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 30 μL およびミクロソーム画分 3 μL (CYP1A2) あるいは 0.6 μL (CYP3A) および蒸留水 189 μL (CYP1A2) あるいは 191.4 μL (CYP3A) を混和して反応液を調製した。
- 50%アセトニトリル溶液で調製した基質 3 μL を 222 μL の反応液と混和した。
- 終濃度として 50 μM (CYP1A2) または 100 μM (CYP3A) の基質を 37 °C で

- 5 分間ブレインキュベーションした後、2.5 mM β -NADP、25 mM グルコース-6-リン酸、0.5 units/mL のグルコース-6-リン酸脱水素酵素、10 mM 塩化マグネシウムからなる NADPH 再生系を 75 μ L 添加して反応を開始した。
- 37 °C で 10 分間インキュベーションした後、200 μ L の反応液を採取し、内部標準として 0.1 μ M レセルピンを含む 100 μ L のメタノールと 100 μ L のアセトニトリルの混液に添加して反応を停止した。
 - サンプルを 4 °C、1,870 $\times$ g で 15 分間遠心分離して除タンパクした。
 - 得られた上清 10 μ L (CYP1A2) または 20 μ L (CYP3A) を LC/MS/MS に注入し、反応生成物であるアセトアミノフェンまたは 6 β -ヒドロキシテストステロンを測定した。

【LC/MS/MS 装置構成】

- HPLC (ポンプ、オートサンプラー、デガッサー): Waters 2795 Separations Module (Waters)
- カラム恒温槽: 2695/2795 Column Heater (Waters)
- MS/MS: Quattro micro (Waters)

【分析条件】

- カラム: CAPCELL PAK C18 MG II 100 $\times$ 2.0 mm i.d. (資生堂)
- カラム温度: 50 °C
- 移動相:
 - A) ギ酸 / 0.1 M 酢酸アンモニウム / メタノール = 2 : 50 : 950 (v/v/v)
 - B) ギ酸 / 0.1 M 酢酸アンモニウム / 蒸留水 / メタノール = 2 : 50 : 900 : 50 (v/v/v/v)
- アセトアミノフェン;
 - 移動相 A 0-1 分 20%、1-4 分 20 $\rightarrow$ 80% (リニアグラジエント)
- 6 β -ヒドロキシテストステロン;
 - 移動相 A 0-1 分 20%、2-5 分 50 $\rightarrow$ 70% (リニアグラジエント)
- 流速: 0.3 mL/min
- イオン化法: ESI-positive

- ・ イオン検出モード：multiple reaction monitoring
- ・ キャピラリー電圧：3.5kV
- ・ ソース温度：120
- ・ デソルベーション温度：300 度
- ・ モニターイオンおよびコーン電圧、コリジョン電圧
アセトアミノフェン；m/z 152 → m/z 110、30 V、15 eV
6β-ヒドロキシテストステロン；m/z 305 → m/z 269、25 V、20 eV
レセルピン；m/z 609 → m/z 195、55 V、40 eV

- ・ CYP2E1 の活性

【酵素反応】

- ・ 0.25 mM EDTA-0.25 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 200 μL およびミクロソーム画分 25 μL を混和して反応液を調製した。
- ・ 1%炭酸ナトリウム溶液で調製した基質 5μL と蒸留水 220 μL を反応液に添加した。
- ・ 終濃度として 10 μM の基質を 37 °C で 5 分間プレインキュベーションした後、2.5 mM β-NADP、25 mM グルコース-6-リン酸、40 units/mL のグルコース-6-リン酸脱水素酵素、10 mM 塩化マグネシウムからなる NADPH 再生系を 50 μL 添加して反応を開始した。
- ・ 37 °C、10 分間のインキュベーション後、酢酸エチル 5 mL を添加して反応を停止し、2.5 mM 2-ベンゾキサゾリノン溶液を内部標準として 50 μL 添加した。
- ・ 5 分間振盪後、サンプルを 4 °C、1,200 × g で 10 分間遠心分離した。
- ・ 酢酸エチル層を窒素気流下で乾固し、残渣を移動相 200 μL で溶解した後、3 分間超音波処理した。
- ・ 50 μL を HPLC に注入し、反応生成物であるヒドロキシクロルゾキサゾン を測定した。

【HPLC 装置構成】

- ・ HPLC (ポンプ、オートサンプラー、デガッサー)：Waters 2695 Separations

Module (Waters)

- ・ カラム恒温槽：2690Column Heater (Waters)
- ・ UV 検出器：Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters)

【分析条件】

- ・ カラム：Hibar RT250-4.0 LiChrosorb RP-8 250 $\times$ 4.0 mm i.d. (関東化学)
- ・ カラム温度：40
- ・ 移動相：アセトニトリル / 0.5%リン酸 = 3 : 7 (v/v)
- ・ 流速：1.0 mL
- ・ 検出波長：287 nm

3. 2. 4 スルフォトランスフェラーゼ (ST)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) および UGT 活性の測定

ST および GST 活性測定にはサイトゾル画分を、UGT 活性測定にはミクロソーム画分を、それぞれ使用した。タンパク質濃度の測定は、Lowry らの方法³³⁾に従った。フェノール基質を用いた ST 活性の測定は Gregory らの方法⁶²⁾で行った。1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン基質を用いた GST 活性 (GST-C 活性)、1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン基質を用いた GST 活性 (GST-D 活性) およびエタクリン酸基質を用いた GST 活性 (GST-EA 活性) の測定は Habig らの方法⁶³⁾で行った。*p*-ニトロフェノール基質を用いた UGT 活性の測定は Bock らの方法⁶⁴⁾で行った。

3. 2. 5 Western blot 解析

Western blot 解析にはミクロソーム画分およびサイトソル画分を使用した。各ミクロソームのタンパク質濃度は 2 mg protein/mL (CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2D1、CYP2E1、CYP3A、CYP4A、NADPH P450 reductase、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B 用) に調製した。同様に、各サイトゾル画分のタンパク質濃度は 2 mg protein/mL (GST Yc、GST Yb2、GST Yp 用) に調製した。これらのサンプルはトリス SDS BME サンプル処理液で 2 倍希釈し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。その後、3 μ L (CYP2C6、NADPH P450 reductase、GST Yc、GST Yb2 用)、10 μ L (CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2D1、CYP2E1、CYP3A、CYP4A、UGT1A6、GST Yp 用)、20 μ L (UGT1A1、

UGT2B 用)の各サンプルを 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、電気泳動を行った。その後タンパクを、blotting 装置 (アトー) を用いてゲルから Immobilon ポリビニリデンフルオリド膜に移した。この膜は ECL ブロッキング剤でブロックし、一次抗体 (抗ラット抗体)、ビオチン標識二次抗体、streptavidin-horseradish peroxidase conjugate、および ECL Western blotting detection reagent を続けて添加した。その膜をフィルムに感光させた。

3.2.6 マイクロアレイ解析

肝臓と腎臓は RNeasy Mini Kit (QUIAGEN) の RLT buffer で、空腸と回腸は TRIzol[®] reagent (Invitrogen) でそれぞれホモジナイズし、総 RNA をキットの説明に従って単離した。マイクロアレイ解析は Affymetrix 社の標準プロトコールに従った。概要を以下に示した。

- ・ 各臓器から調製した 5 µg の総 RNA を、GeneChip[®] One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) を用いて cDNA 合成に使用した。
- ・ ビオチン標識した cRNA 混液を GeneChip[®] IVT Labeling Kit (Affymetrix) を用いて転写した。
- ・ ビオチン標識した cRNA target サンプル (約 10 µg) をそれぞれ GeneChip[®] Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) に 45、16 時間でハイブリダイズした。
- ・ Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて GeneChip[®] を洗浄・染色した後、GeneChip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix) でスキャンした。
- ・ 得られたマイクロアレイ画像データは GeneChip[®] Operating Software Ver. 1.2 (Affymetrix) を用いた MAS5 解析により数値化した後、Spotfire 8.0 (Spotfire) を使用してデータ解析を行った。
- ・ マイクロアレイデータは、上位 2% および下位 2% のシグナル値を除去した後に平均シグナル強度を 1 とする (Trimmed mean normalization) ことで、アレイデータ間のスケール補正を行った。mRNA 発現レベルの fold change は、妊娠ラットの平均シグナル値を非妊娠ラットの値で除して算出した。各プローブセットに関して、MAS5 解析により得られる Detection Call (P/A Call) を基に、Presence Call の Signal データを信頼できる遺伝子発現データとして、また Absence Call の Signal データは検出限界以下として解析に用いた。非妊娠ラットと妊娠ラッ

トの比較において、一方で Presence Call であったものがもう一方で Absence Call となった遺伝子、またはその逆の変動を示した遺伝子については、統計学的には非有意でも有意な変化と判断した。

3.2.7 統計解析

分散の均一性は F-test (有意水準 25%) で行い、平均値の有意差検定は Student's t test または Aspin-Welch's t-test で行った。統計処理は SAS[®] System Release 8.2 (SAS Institute) または Microsoft[®] Excel 2000 を用いて行った。有意水準は 5%とした。

3.3 結果

3.3.1 チトクローム P450 含量

妊娠および非妊娠ラットにおける肝臓の P450 含量を Fig. 3-1 に示した。非妊娠に比べ妊娠では P450 含量が有意に減少していた。

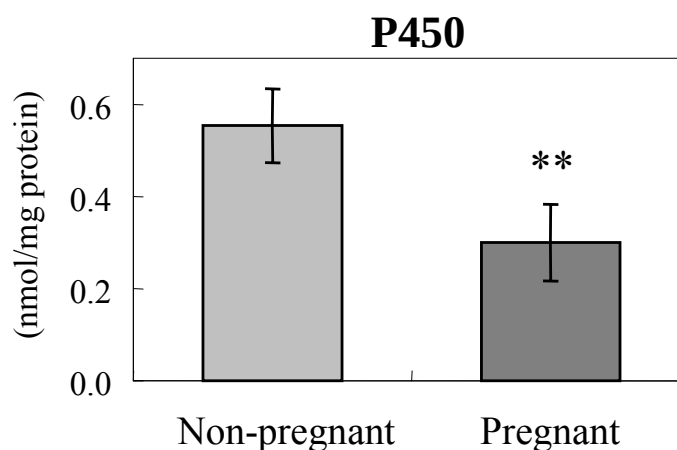


Fig. 3-1. P450 content in non-pregnant and pregnant rats. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats. **: Significantly different from the mean value of non-pregnant rats ($p < 0.01$, Student's t test).

3.3.2 CYPs のマイクロアレイ解析結果

非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットの肝臓で有意に発現が変動した CYP 遺伝子を Table 3-1 に示した。分子種によって発現の増減はあったが、薬物代謝の観点からは、Cyp1a2、Cyp2e1、Cyp3a18 の発現低下が、薬物の代謝に影響を与えうる変化として示唆された。

Table 3-1. Modified genes in pregnant rats for CYPs (n = 5).

Gene symbol	Entrez Gene	Affymetrix probe ID	Fold change	P/A call ^a
Phase I drug metabolizing enzyme gene				
[Increased]				
Cyp1b1	25426	1368990_at	1.61 *	P → P
Cyp2b3	286953	1370475_at	1.21 **	P → P
Cyp2c6	246070	1370580_a_at	1.17 ***	P → P
Cyp2c7	29298	1370241_at	1.32 ***	P → P
Cyp2c12	25011	1368155_at	1.25 ***	P → P
Cyp2c22	171518	1387949_at	1.73 ***	P → P
Cyp2s1	308445	1390282_at	1.44	A → P
Cyp4a2	24306	1394844_s_at	1.45 **	P → P
Cyp4a3	298423	1370397_at	1.74 ***	P → P
Cyp4f17	500801	1392720_at	1.24	A → P
[Decreased]				
Cyp1a2	24297	1387243_at	0.85 #	P → P
Cyp2a1	24894	1387511_at	0.76 **	P → P
Cyp2a1 /// Cyp2a2	24894 /// 24895	1369275_s_at	0.77 *	P → P
Cyp2c23	83790	1367988_at	0.68 **	P → P
Cyp2d1 /// Cyp2d5	266684 /// 286963	1370377_at	0.78 **	P → P
Cyp2d3	24303	1370496_at	0.47 ***	P → P
Cyp2d4v1	171522	1370329_at	0.34 **	P → P
Cyp2d4v1	171522	1387913_at	0.35 **	P → A
Cyp2e1	25086	1367871_at	0.59 ***	P → P
Cyp2f4	54246	1368608_at	0.76 *	P → P
Cyp2j3	313375	1370706_a_at	0.23 ***	P → P
Cyp2t1	171380	1368265_at	0.38 ***	P → P
Cyp3a18	252931	1398307_at	0.13 *	P → P
Cyp4f4	286904	1387973_at	0.77 *	P → P
Cyp4v3	266761	1370889_at	0.61 *	P → P
Cyp4v3	266761	1388127_at	0.75 *	P → P

(a) P and A represent $\geq 75\%$ and $\leq 75\%$ of the animals in either non-pregnant (left) or pregnant (right) group exhibited Presence Call by MAS 5.0 data analysis, respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; significant difference from non-pregnant rats.

$p < 0.1$; difference tendency from non-pregnant rats.

3.3.3 CYPs の Wester blot 解析結果

肝 CYPs の Wester blot 解析結果を Fig. 3-2 に示した。非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットにおいて CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2E1、CYP3A のタンパク発現低下が認められた。

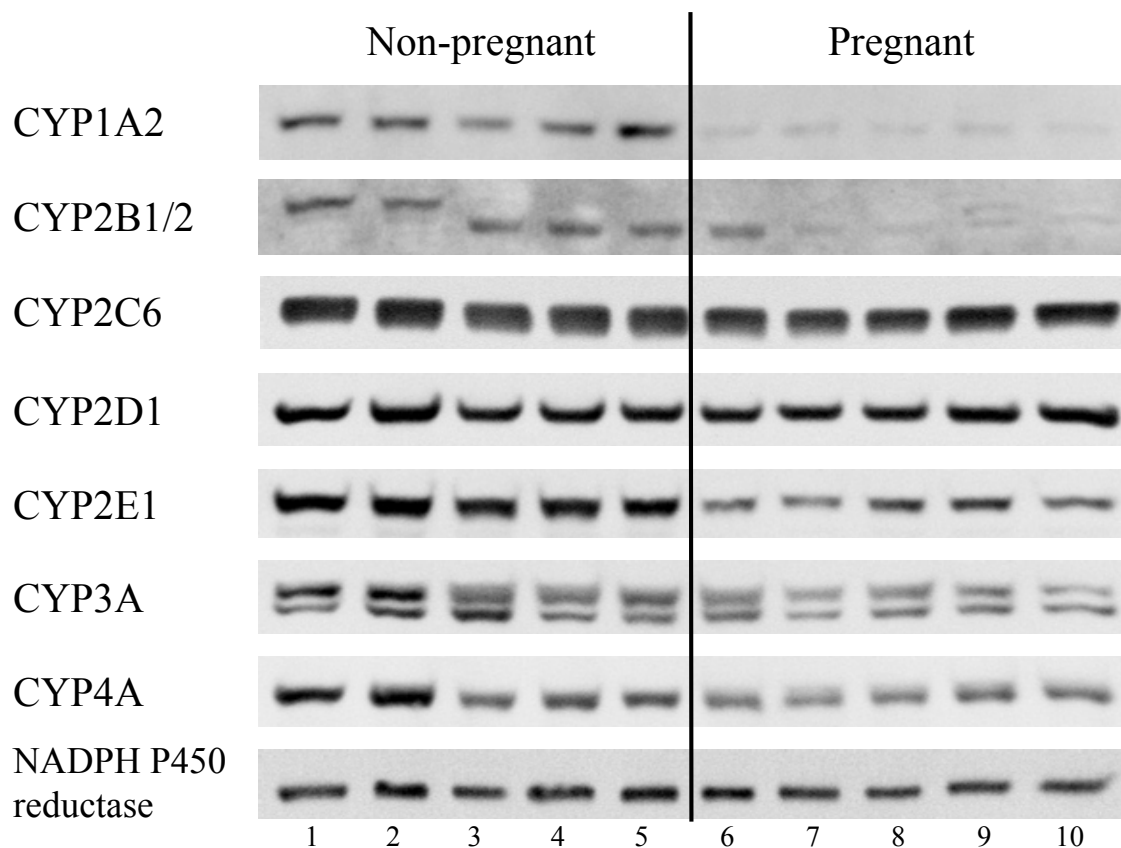


Fig. 3-2. Protein expression for CYPs in non-pregnant and pregnant rats. 1-5: Number of non-pregnant rats. 6-10: Number of pregnant rats.

3.3.4 CYPs の活性

肝 CYPs のマイクロアレイ解析および Wester blot 解析の結果、CYP1A2、CYP2E1 および CYP3A については、遺伝子発現、タンパク発現ともに妊娠ラットで低下が認められた。そこでこれらの分子種について、分子種特異的な基質を用いた代謝酵素活性測定を行った。その結果、その全てについて、妊娠ラットにおける活性の低下が認められた (Fig. 3-3)。妊娠ラットにおける、遺伝子およびタンパクの発現解析と酵素活性測定の結果を、非妊娠ラットからの変動の観点から Table 3-2 にまとめた。

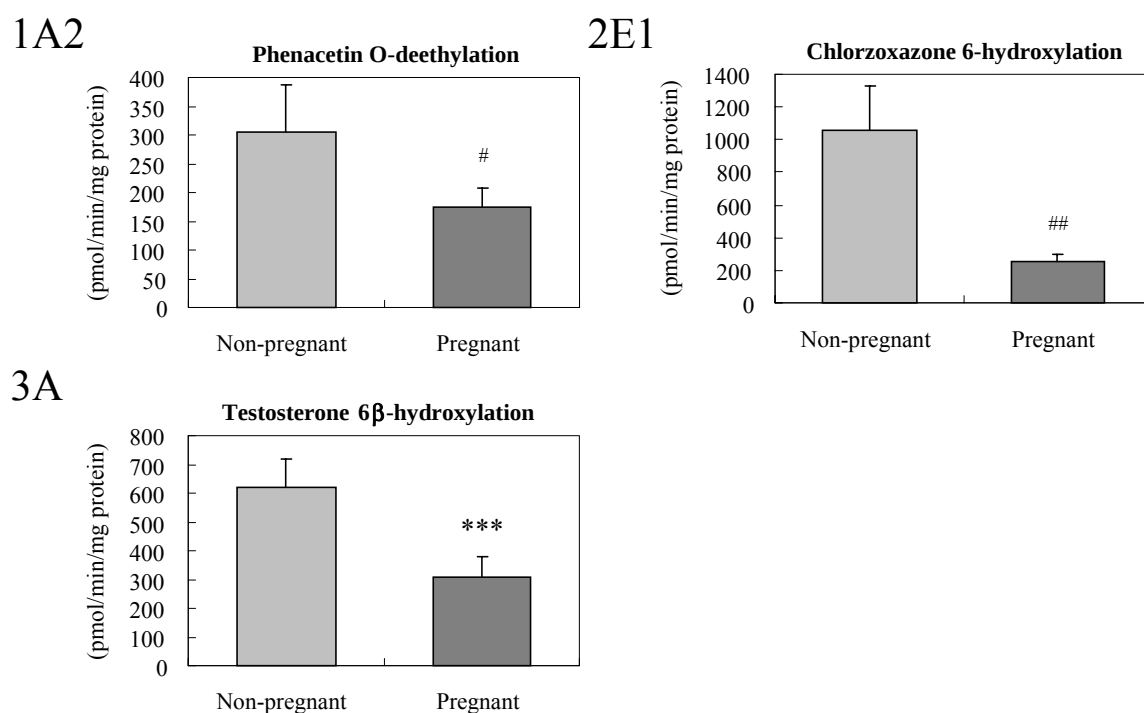


Fig. 3-3. CYPs specific activities in non-pregnant and pregnant rats. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats. ***: Significantly different from the mean value of non-pregnant rats ($p < 0.001$, Student's t test). #, ##: Significantly different from the mean value of non-pregnant rats ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Aspin-Welch's t -test).

Table 3-2. Change of mRNA and protein expression, and activity for CYPs in pregnant rats compared with non-pregnant rats.

	1A2	2B	2C	2D	2E1	3A
mRNA	↓	-	↑	↓	↓	↓
protein	↓	↓	-	-	↓	↓
activity	↓	-	-	-	↓	↓

↑ : increase, ↓ : decrease, - : no change

3.3.5 第 相酵素のマイクロアレイ解析結果

非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットの肝臓で有意に発現が変動した第 相酵素の

遺伝子を Table 3-3 に示した。分子種によって発現の増減はあったが、薬物代謝の観点からは、ST1A1(Sult1a1) GST μ (Gstm2, Gstm3) GST π (Gstp1) GST θ (Gstt1, Gstt3) UGT1A(Ugt1a1 ~ Ugt1a3, Ugt1a5 ~ Ugt1a9) および UGT2(Ugt2a1, Ugt2b3) の発現低下が、薬物の代謝に影響を与えうる変化として示唆された。

Table 3-3. Modified genes in pregnant rats for Phase II drug metabolizing enzymes (n = 5).

	Gene symbol	Entrez Gene	Affymetrix probe ID	Fold change	P/A call ^a
Phase	drug metabolizing enzyme gene				
[Increased]					
	Mgst1	171341	1367612_at	1.31 ***	P → P
	Ugt2b36	83808	1368397_at	1.20 ***	P → P
	Sult4a1	58953	1368562_at	5.88 ***	A → P
[Decreased]					
	Sult1a1	83783	1370019_at	0.50 *	P → P
	Sult1e1	25355	1368733_at	0.70	P → A
	Sult1c2	171072	1369531_at	0.17	P → A
	Sult1c2	171072	1377672_at	0.13	P → A
	Sult1c2a	316153	1370943_at	0.10 ***	P → P
		24421 ///			
	Gsta2 /// Gsta3 /// Yc2	24422 ///	1367774_at	0.88 *	P → P
		494500			
	Gstk1	297029	1398378_at	0.81 **	P → P
	Gstm2	24424	1370952_at	0.65 **	P → P
	Gstm3	81869	1387023_at	0.75 *	P → P
	Gsto1	114846	1389832_at	0.56 **	P → P
	Gstp1	24426	1388122_at	0.75 **	P → P
	Gstt1	25260	1368354_at	0.58 **	P → P
		25260 ///			
	Gstt1 /// Gstt3	499422	1371942_at	0.38 **	P → P
	Mgst3_predicted	289197	1388300_at	0.25 ***	P → P
		113992 ///			
		154516 ///			
	Ugt1a1 /// Ugt1a2 ///	24861 ///			
	Ugt1a3 /// Ugt1a5 ///	301595 ///	1370613_s_at	0.70 *	P → P
	Ugt1a6 /// Ugt1a7 ///	396527 ///			
	Ugt1a8 /// Ugt1a9	396551 ///			
		396552 ///			
		574523			
	Ugt2a1	63867	1369850_at	0.61 *	P → P
	Ugt2b3	266685	1387955_at	0.89 *	P → P

(a) P and A represent $\geq 75\%$ and $\leq 75\%$ of the animals in either non-pregnant (left) or pregnant (right) group exhibited Presence Call by MAS 5.0 data analysis, respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; significant difference from non-pregnant rats.

3.3.6 第 相酵素の Wester blot 解析結果

肝第 相酵素のうち、GST ファミリーと UGT ファミリーについて Wester blot 解析した結果を Fig. 3-4 に示した。非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットにおいて GST Yp (π)、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B のタンパク発現低下が認められた。

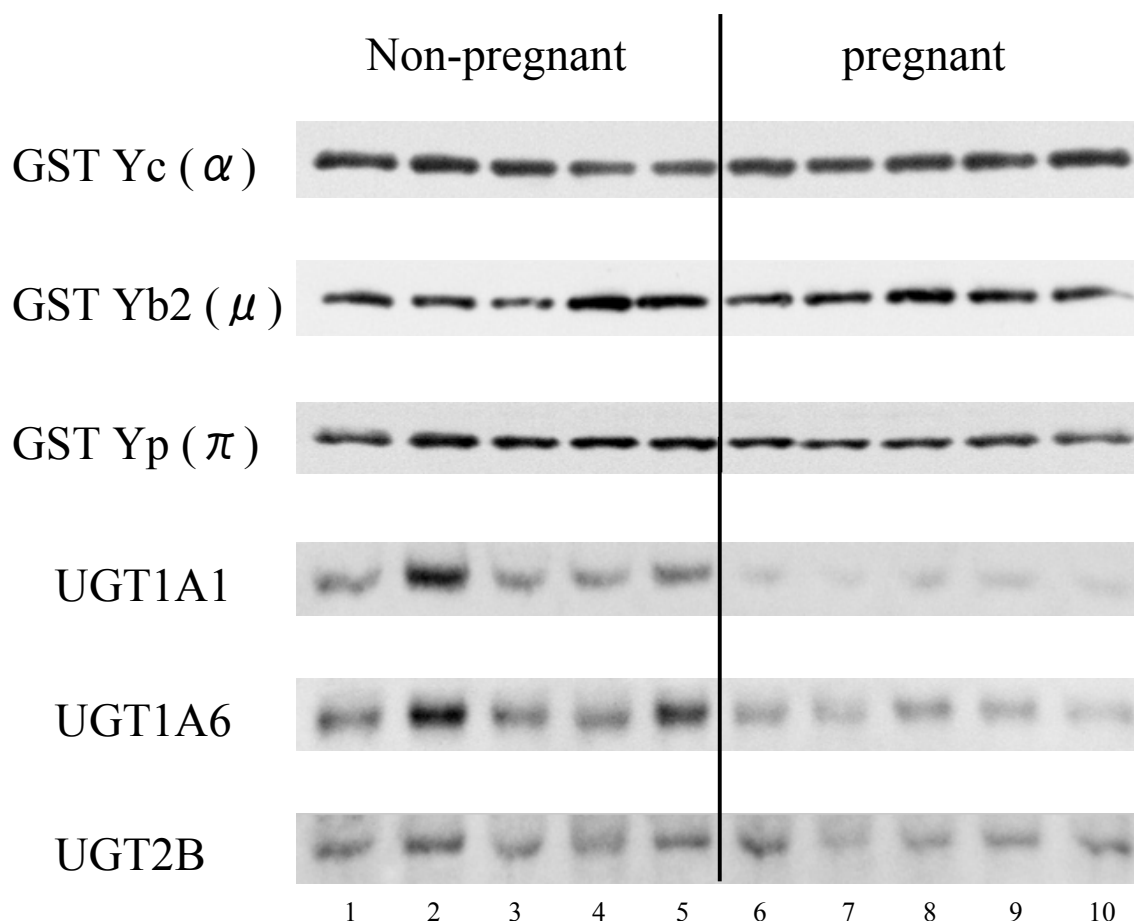


Fig. 3-4. Protein expression for Phase II drug metabolizing enzymes in non-pregnant and pregnant rats. 1-5: Number of non-pregnant rats. 6-10: Number of pregnant rats.

3.3.7 第 相酵素の活性

ST1A の特異的基質であるフェノールを用いて ST 活性を、GST の分子種非特異的な基質である 1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼンを用いて GST-C 活性を、GST μ の特異的基質である 1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼンを用いて GST-D 活性を、GST π の特異的基質であるエタクリン酸を用いて GST-EA 活性を、UGT1A6 の特異的基質で

ある *p*-ニトロフェノールを用いて UGT 活性を、それぞれ測定した。その結果、GST-D 活性と UGT 活性について低下が、GST-EA 活性について増加が、妊娠ラットの肝臓において認められた (Fig. 3-5)。妊娠ラットにおける、遺伝子およびタンパクの発現解析と酵素活性測定の結果を、非妊娠ラットからの変動の観点から Table 3-4 にまとめた。UGT1A については、遺伝子発現、タンパク発現、酵素活性の全てにおいて、妊娠ラットで低下を示した。

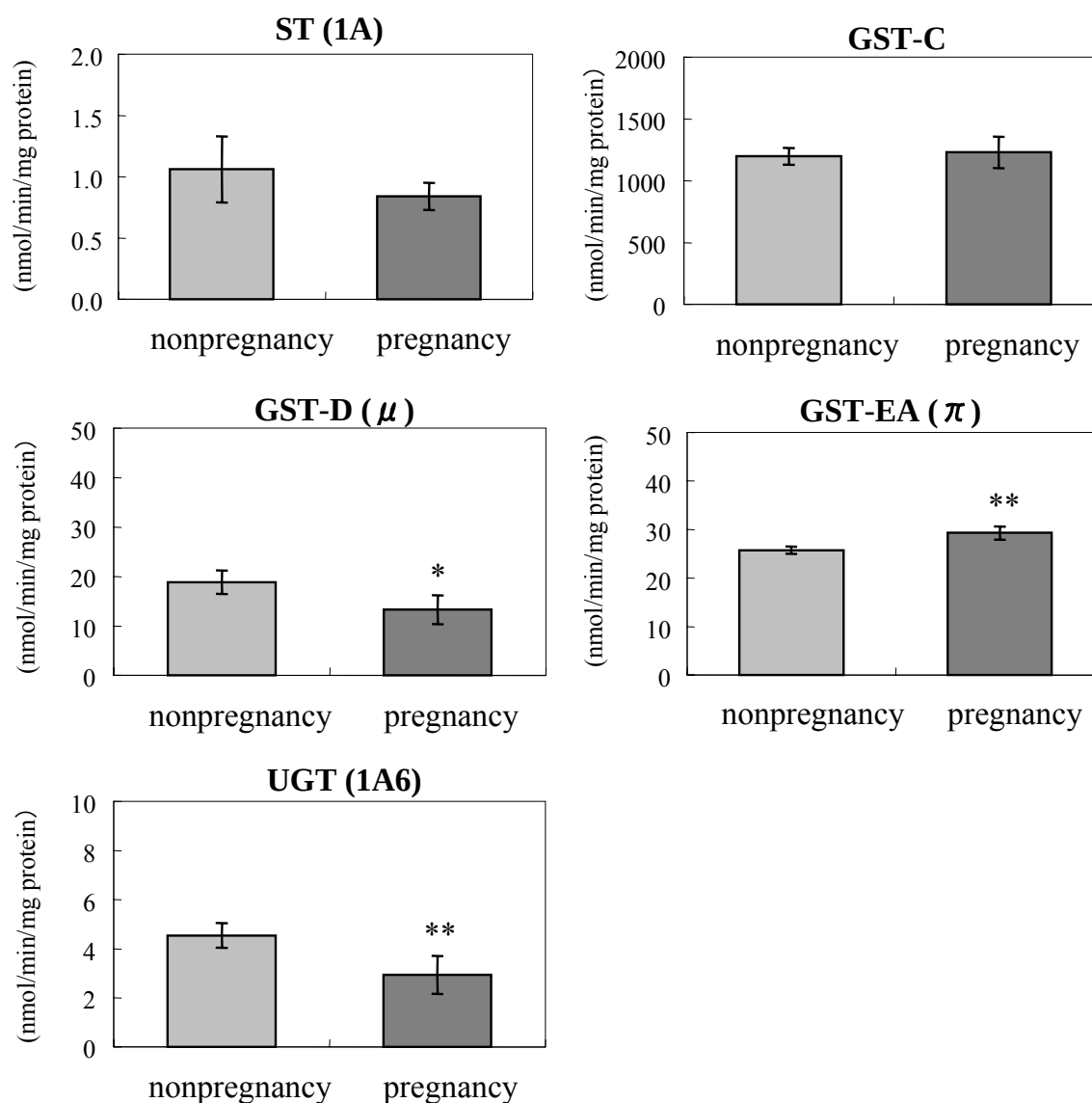


Fig. 3-5. Phase II drug metabolizing enzyme specific activities in non-pregnant and pregnant rats. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats. *, **: Significantly different from the mean value of non-pregnant rats ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Student's t test).

Table 3-4. Change of mRNA and protein expression, and activity for Phase II drug metabolizing enzymes in pregnant rats compared with non-pregnant rats.

	ST1A1	GST μ	GST π	GST θ	UGT1A	UGT2
mRNA	↓	↓	↓	↓	↓	↓
protein	NT	-	↓	NT	↓	↓
activity	-	↓	↑	NT	↓	NT

↑ : increase, ↓ : decrease, - : no change, NT: not tested.

3.3.8 トランスポーターのマイクロアレイ解析結果

非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットの肝臓、腎臓、空腸、回腸で有意に発現が変動したトランスポーターの遺伝子を Table 3-5 に示した。肝臓では、変動のあった P-糖タンパク質 (P-gp)、胆汁酸排泄トランスポーター (Bsep)、Mrp2、Mrp6、Ntcp、有機カチオン/カルニチントランスポーター (OCTN2)、有機アニオントランスポーター (Oatp1b2 および Oatp2b1) は全て発現が低下していた。その他の臓器ではトランスポーターによって発現の増減があった。また腎臓については Mrp2 および Oatp2b1 が、空腸については P-gp、Mrp2 および OCTN2 が、回腸については P-gp、OCTN2 および Oatp2b1 が、肝臓では発現が低下しているにもかかわらず発現が増加しており、臓器特異的な発現変動が認められた。

Table 3-5. Modified genes in pregnant rats for transporters (n = 5).

Gene symbol	Protein name	Entrez Gene	Affymetrix probe ID	Liver		Kidney		Jejunum		Ileum	
				Fold change	P/A call ^a	Fold change	P/A call ^a	Fold change	P/A call ^a	Fold change	P/A call ^a
ABC transporter related genes											
Abcb1a	P-gp	170913	1370464_at	0.52 **	P→P			1.54 [#]	P→P		P→P
Abcb1a	P-gp	170913	1370465_at	0.66 [#]	P→P			2.50 **	P→P	1.48 *	P→P
Abcb1l	Bsep	83569	1368769_at	0.79 **	P→P						
Abcc1	Mrp1	24565	1371005_at					0.81 *	P→P	0.79 *	P→P
Abcc2	Mrp2	25303	1368497_at	0.82 [#]	P→P	1.32 *	P→P	1.43 *	P→P		
Abcc3	Mrp3	140668	1369698_at							1.32 **	P→P
Abcc6	Mrp6	81642	1368452_at	0.74 ***	P→P						
solute carrier family related genes											
Slc10a1	Ntcp	24777	1368609_at	0.81 **	P→P						
Slc10a2	ASBT	29500	1368745_at					1.51 ***	P→P	1.52 **	P→P
Slc15a1	Pept1	117261	1369381_a_at			0.81 **	P→P				
Slc21a4	OAT-K1	80899	1368498_a_at			0.88 **	P→P				
Slc21a4	OAT-K1	80899	1387974_a_at			1.43 *	P→P				
Slc22a2	Oct-2	29503	1387303_at					1.42 *	P→P	1.34 **	P→P
Slc22a5	OCTN2	29726	1367950_at	0.50 *	P→P	0.82 *	P→P				
Slc22a12	URAT1	365398	1396039_at			0.85	P→A				
Slco1a4	Oatp1a4	170698	1387093_at								
Slco1b2	Oatp1b2	58978	1369746_a_at	0.62 ***	P→P						
Slco1b2	Oatp1b2	58978	1387679_at	0.63 *	P→P						
Slco2a1	Oatp2a1	24546	1387492_at							0.83 *	P→P
Slco2b1	Oatp2b1	140860	1368295_at	0.80 **	P→P	1.20 [#]	P→P	0.82 **	P→P	1.16 *	P→P
Slco2b1	Oatp2b1	140860	1368296_at	0.78 **	P→P		P→P		P→P	1.29 *	P→P

(a) P and A represent $\geq 75\%$ and $\leq 75\%$ of the animals in either non-pregnant (left) or pregnant (right) group exhibited Presence Call by MAS 5.0 data analysis, respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; significant difference from non-pregnant rats.

$p < 0.1$; difference tendency from non-pregnant rats.

3.4 考察

肝臓におけるチトクローム P450 含量は非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットで有意に減少していた。このことから CYPs の発現および活性の低下が予想された。そこで薬物代謝酵素の遺伝子発現を網羅的に調べるため、肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、第 Ⅰ相の薬物代謝酵素として、Cyp1a2、Cyp2e1、Cyp3a18 の妊娠ラットにおける発現低下が注目された。CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2D1、CYP2E1、CYP3A、CYP4A、NADPH P450 reductase について、Western blot 解析を行ったところ、妊娠ラットにおいて CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2E1、CYP3A のタンパク発現低下が認められた。CYP1A2、CYP2E1 および CYP3A については、遺伝子発現、タンパク発現ともに低下が認められたため、これらについて分子種特異的な基質を用いた代謝酵素活性測定を行ったところ、その全てについて活性の低下が認められた。CYP1A2 については、本章における結果とは逆にタンパク発現の増加が報告されている⁶⁵⁾。しかし、この報告においても活性は本章と同様に低下していた。タンパク発現の結果が異なった理由は不明だが、フェノタイプとして活性が下がることは確かであると考えられる。CYP2E1 については、本章の序論で述べたように、mRNA 発現⁶⁶⁾、タンパク発現の低下が報告されているが^{52), 65)}、ダイレクトな活性低下を調べた報告はほとんどなく、本章でラット妊娠後期における活性の低下を示すことができた。CYP3A に関しては、CYP3A1 の mRNA およびタンパク発現が非妊娠ラットと変わらないという知見があるが^{52), 67)}、それ以外の情報は不十分である。本章における結果から、CYP3A ファミリーとしては発現や活性の低下の方向に変動しているものと考えられる。妊娠中に CYP を中心とするミクロソーム酵素の活性が低下する理由として、プロゲステロンを高濃度に保ち妊娠を維持するため、プロゲステロンやその代謝物が CYP の down-regulation に直接的、または間接的に関わっているのではないかと考えられている^{52), 68)}。また CYP の down-regulation が、妊娠中の活性代謝物による毒性のリスク低減に寄与しているのではないかと⁶⁷⁾、という解釈もある。詳細なメカニズムは不明であるが、妊娠によって CYP の発現が変動することは確かであり、その影響について考察していく必要があると考える。

第 Ⅰ相の薬物代謝酵素についても同様に検討したところ、マイクロアレイ解析で、妊娠ラットにおける ST1A1、GST μ 、GST π 、GST θ 、UGT1A および UGT2 の発現

低下が注目された。二量体である GST α 、GST μ 、GST π をそれぞれ構成する、GST Yc、GST Yb、GST Yp、ならびに UGT1A1、UGT1A6、UGT2B について Western blot 解析を行ったところ、妊娠ラットにおいて GST Yp(π)、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B のタンパク発現低下が認められた。代謝酵素活性測定では妊娠ラットにおいて GST μ と UGT1A6 について低下が、GST π について増加がそれぞれ認められた。以上のことから、第 Ⅲ 相酵素については、遺伝子発現、タンパク発現、酵素活性の全てで同方向に変動した分子種は、その全てについて低下を示した UGT1A のみであった。UGT1A については、mRNA の発現に変化はないものの、タンパク発現と酵素活性の低下が起こるという報告があり⁵³⁾、遺伝子の動きは今回と異なったものの、その他は同様の結果であり、機能的には妊娠で低下するものと考えられる。妊娠ラットにおける GST に関する情報は不十分であるが、GST μ については、遺伝子発現や GST-D 活性の低下が報告されており^{66), 69)}、同様の結果となった。しかしながら活性の増加が見られた GST π についてはほとんど情報がなく、その影響について調べる余地が残されている。

トランスポーターに関しては、非妊娠ラットに比較し、妊娠ラットの肝臓で変動のあった P-gp、Bsep、Mrp2、Mrp6、Ntcp、OCTN2、Oatp1b2 および Oatp2b1 は全て発現が低下していた。その他の臓器ではトランスポーターによって発現の増減があった。また P-gp、Mrp2、OCTN2、Oatp2b1 については、肝臓では発現が低下しているにもかかわらず、他の臓器では発現が増加しており、臓器特異的な発現変動が示唆された。Mrp2 については、妊娠ラットにおいてタンパク発現低下し⁵⁹⁾、単離灌流ラット肝を用いた実験系で基質である 2, 4-dinitrophenyl-S-glutathione の排出が低下することが確認されている⁷⁰⁾。Ntcp については mRNA、タンパク質の発現減少と、妊娠ラットから調製した培養肝細胞でナトリウム依存性^[3H]タウロコール酸取り込みが減少することが確認されている⁶¹⁾。しかしながらそれ以外のトランスポーターに関する、妊娠ラットにおける情報は乏しい。本章では、マイクロアレイ解析を用いて、薬物動態に深く関与する臓器である肝臓、腎臓、小腸における遺伝子発現の網羅的プロファイリングを行い、妊娠ラットで数多くのトランスポーターの発現が変動している可能性が示唆された。これまで、マイクロアレイ解析を用いて妊娠ラットの臓器における遺伝子発現のプロファイリングを行った報告はないため、今回の結果は重要な情報を含んでいると考えられる。今後は遺伝子発現変動の見ら

れたトランスポーターについて、タンパク発現を調べることで、より詳細な情報が得られるであろう。臓器によって異なる変動を示す理由については不明であるが、Mrp2 や Bsep の発現はエストロゲンやプロゲステロンの影響を受ける可能性が示唆されており^{71), 72)}妊娠の維持のために性ホルモンによって異なる制御を受け、異物クリアランスを変化させているかもしれない。これは妊娠時特有の異物に対するホメオスタシスの調節につながっている可能性もあり興味深い。特に消化管における、妊娠中のトランスポーター発現変動とその生理的意義についてはほとんど情報がないため、今後の研究で明らかになってくる分野であると考えられる。

以上、マイクロアレイ解析を活用することで、妊娠ラットにおいて発現が変動する薬物代謝酵素やトランスポーターの分子種を効率的に調べることができた。本章で発現や活性の変動が確認された代謝酵素やトランスポーターは、薬物の動態に重要な役割を示すことが広く知られているため、妊娠中は薬物のクリアランス変化、ひいては毒性の増強や薬効の減弱を引き起こす可能性がある。ヒトにおいては、代謝酵素やトランスポーターの機能変化と薬物のクリアランスの変化の関連について、比較的多くの知見があるが¹⁷⁾、実験動物における情報は未だ十分ではなく、特に *in vivo* の薬物動態に対する影響についてはほとんど知られていない。今後は、これらの分子種によって特異的に代謝、輸送される基質をラットに投与し、妊娠で曝露や毒性が変化するか否かが確認できれば、より直接的な知見が得られていくものとする。それによりヒトにおけるクリアランス変化のメカニズム解析や、動物からヒトへの外挿が可能になっていくことが期待される。

第3章 小括

- 妊娠ラットにおいて、CYP1A2、CYP2E1 および CYP3A の遺伝子発現、タンパク発現、酵素活性の低下を確認した。
- マイクロアレイ解析を用い、妊娠ラットの肝臓、腎臓、小腸におけるトランスポーターの遺伝子発現プロファイルを明らかにした。
- P-gp、Mrp2、OCTN2、Oatp2b1 については、肝臓では発現が低下しているにもかかわらず、他の臓器では発現が増加しており、臓器特異的な発現変動が示唆された。
- 妊娠ラットでは、発現や活性の変動が確認された代謝酵素やトランスポーターにより、薬物のクリアランス変化、ひいては毒性の増強や薬効の減弱を引き起こす可能性が示唆された。

第4章 毒性試験における薬物吸収に対する物性および 消化管内環境の関与

4.1 序論

医薬品として開発される化合物として、最も構成比の高いものは経口剤である。その薬物物性は、吸収による体内曝露量に影響を与えるが、特に毒性試験での大量投与の場合、その影響は顕著であると考えられる。経口市販薬の分子量は約半世紀で約 140 増加し⁷³⁾、脂溶性が増してきていることが伺える。一般的に高脂溶性化合物は、標的タンパクへの薬物存在確立が増加するため高活性であり、分子量の増加はできるだけ高活性の化合物を開発してきた結果だと考えられる。しかしながら脂溶性が上がりすぎると毒性関連タンパク質との相互作用のリスクも上がり、また溶解性の低下に伴うバイオアベイラビリティーの低下が生じ、薬として必要な性質を損なってしまう。そこで国内外の各製薬企業では新薬の探索を行う際、薬物動態に影響を与える溶解性、脂溶性、膜透過性といった物性についてスクリーニングを行い、より薬として好ましい性質を備えた化合物を開発候補に選択しようと試みている。例えば経験則から提唱された Lipinski らの Rule of Five⁷⁴⁾は、分子量や分配係数の値、水素結合ドナーやアクセプターの数に基準を設定し、吸収性や膜透過性の素性の良い化合物を選択する目安として広く受け入れられている。また FDA から提出された Biopharmaceutics Classification System (BCS) というガイダンス⁷⁵⁾では、溶解性と膜透過性を指標に化合物を 4 つにクラス分けし (Class I: High Permeability, High Solubility、Class II: High Permeability, Low Solubility、Class III: Low Permeability, High Solubility、Class IV: Low Permeability, Low Solubility) この分類に基づいて生物学的同等性試験等の方法を検討することを求めている。すなわち、Class I の薬物では、*in vivo* による同等性試験が免除されるのに対し、Class IV の薬物では、*in vivo* による同等性が必要となる。よって溶解性や膜透過性が良い化合物では開発コストや期間の短縮が見込めるため、BCS は物性スクリーニングの指標としても用いられる。以上のように、物性研究に対する製薬企業の関心は高く、開発化合物は数多くの物性データが取得されている。

一方、生体側の要因として、消化管内容物が物性に依存する曝露差をより増幅することも考えられる。餌の有無は消化管内環境に影響を与えるが、非げっ歯類の毒

性試験における給餌タイミングは試験施設に依存し、試験実施にあたり吟味されることは稀である。しかしながら、これまでにカニクイザルを用いた経口投与毒性試験において、施設間で AUC が大きく異なり、結果として毒性所見に乖離が認められた原因が、給餌タイミングの違いであった事例を経験した。図 2 は化合物 A をカニクイザル雄に 1000 mg/kg 単回経口投与した後の AUC である。X 社で行った 3 試験（28 日間投与毒性試験、3 箇月間投与毒性試験、3 ヶ月間投与 6 箇月休薬毒性試験）の AUC はいずれも同程度で、DS 社で行った 3 箇月間投与毒性試験の AUC と比較し、かなりの低値を示した。両施設の実験条件の比較を行った結果、図 3 のように給餌タイミングが異なったことから、X 社においても DS 社と同じ給餌条件で 14 日間投与毒性試験を行ったところ、DS 社と同等の高曝露を得ることができた（図 2）。化合物 A の物性を調べたところ脂溶性が高かったため、投与後の吸収相で飽食状態にあると、餌の脂肪分により溶解性が増し、吸収が上がるのではないかと推察された。このことから、化合物の物性によっては給餌条件が変わることにより、毒性試験における曝露が変動し、低曝露や曝露のバラつきによって毒性評価に影響を及ぼすケースが起こり得ることが分かった。

そこで本章では、いくつかの化合物を用い、その物性データと給餌パターンによる曝露の差を調べ、その関連性を考察した。吸収に影響を与える物性パラメータとしては、溶解性、脂溶性、膜透過性があるが、この中でも特に溶解性と脂溶性に着目した。理由は、膜透過性は化合物間で異なっても高々 10^2 オーダー未満の違いしかないが⁷³⁾、溶解性や脂溶性はともに 10^5 オーダー以上の違いがあり、餌の有無と消化管内環境の違いによる、曝露への影響を評価するために適したパラメータと考えたためである。溶解性としては、胃から小腸における各 pH での溶解性を把握するため、日本薬局方崩壊試験第 1 液（JP1）、pH 4.0 緩衝液および日本薬局方崩壊試験第 2 液（JP2）を、また絶食と飽食下における消化液の組成の違いによる溶解性の差を把握するため、人工腸液（絶食；FaSSIF、飽食；FeSSIF）⁷⁶⁾をそれぞれ用いた。また脂溶性の指標として、分配係数 LogD を用いて評価した。各化合物はカニクイザルに単回経口投与し、給餌のタイミングを変えて絶食時と飽食時の曝露をクロスオーバー法で評価した。

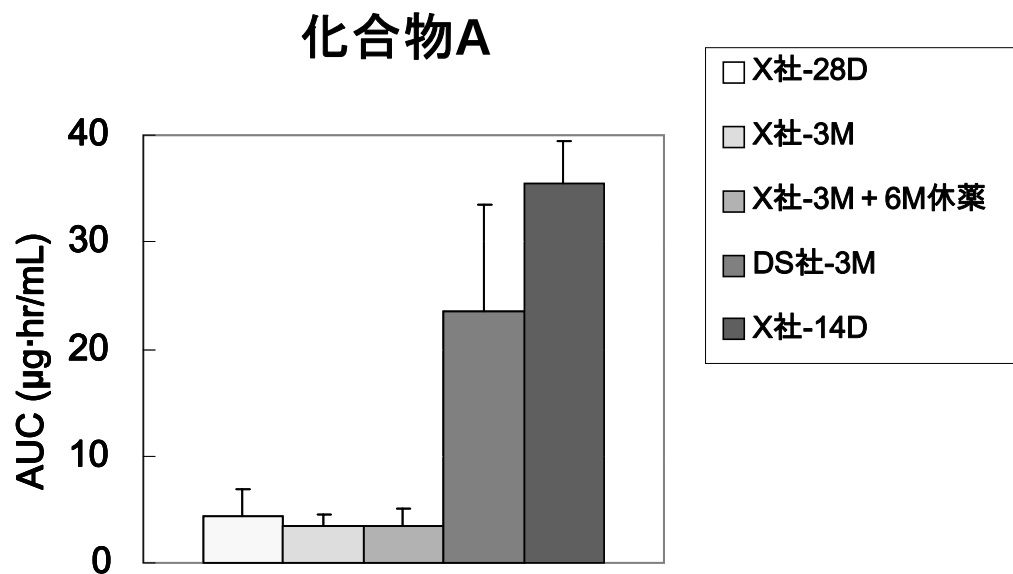


図2 化合物Aをカニクイザル雄 (n=3) に 1000 mg/kg 単回経口投与した後のAUC比較

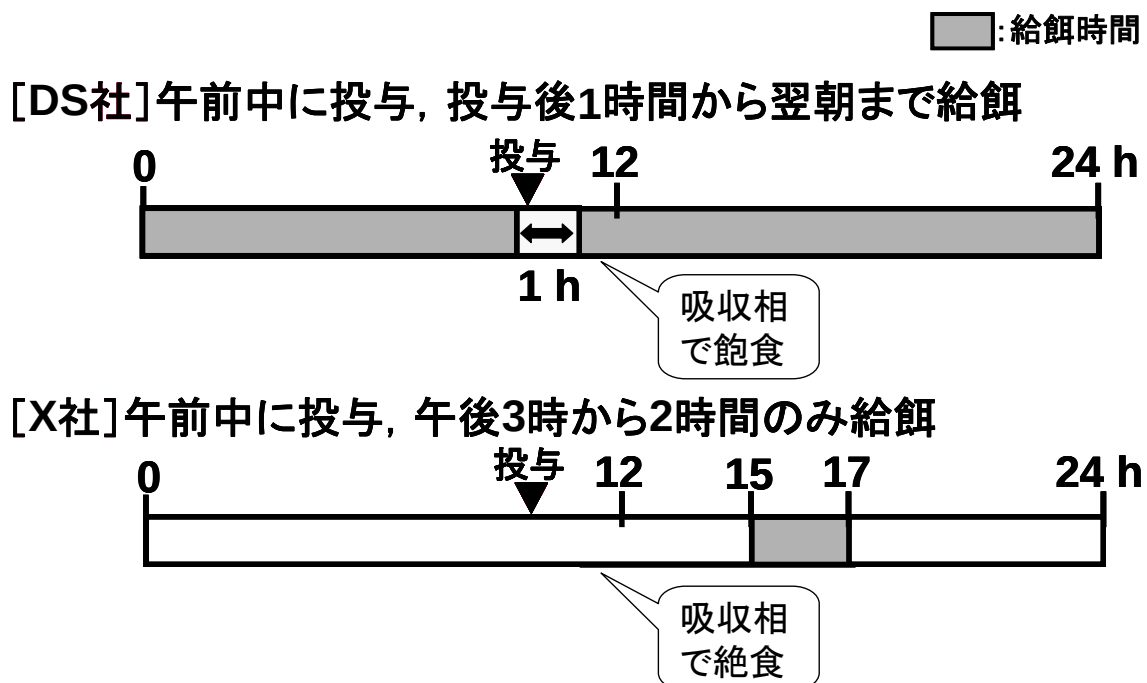


図3 施設間の給餌タイミングの違い

4.2 材料および方法

4.2.1 材料

- ・ JP1 (関東化学)
- ・ JP2 (関東化学)
- ・ 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4 (関東化学)
- ・ タウロコール酸ナトリウム (ナカライテスク)
- ・ 卵黄レシチン COATSOME NC-50 (日本油脂)
- ・ 投与化合物 (第一三共株式会社開発候補 7 化合物：化合物 A ~ G)

4.2.2 溶解性試験

試験液は、JP1、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4)、JP2、FaSSIF、FeSSIF を用いた。FaSSIF は、文献⁷⁶⁾に示される組成すなわち、3 mM タウロコール酸ナトリウム、0.75 mM 卵黄レシチン、3.9 g/L リン酸二水素カリウム、7.7 g/L 塩化カリウムとし、水酸化ナトリウム水溶液にて pH 6.5 に調整した。FeSSIF は、15 mM タウロコール酸ナトリウム、3.75 mM 卵黄レシチン、8.65 g/L 酢酸、15.2 g/L 塩化カリウムとし、水酸化ナトリウム水溶液にて pH 5.0 に調整した。

化合物をガラスチューブに秤量し試験液を加え、25℃で30分間攪拌・振とうしたのち、孔径 0.45 μm の PTFE フィルターにてろ過し、ろ液をアセトニトリルまたはメタノールで希釈し、10 μL を HPLC 測定し濃度を求めた。

【HPLC 装置構成】

- ・ HPLC (ポンプ、オートサンプラー、デガッサー): Waters 2690 Separations Module (Waters)
- ・ カラム恒温槽: 2690 Column Heater (Waters)
- ・ UV 検出器: Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters)
- ・ PDA 検出器: Waters 2996 Photo Diode Array Detector (Waters)

【分析条件】

- ・ カラム：XTerra MS C18 100 × 4.6 mm i.d. (Waters)
- ・ カラム温度：40
- ・ 移動相：0.1%リン酸水溶液と 0.1%リン酸アセトニトリルを化合物の保持特性に応じたグラジエントプログラムで流した。
- ・ 流速：1.2 mL
- ・ 検出波長：化合物に応じた測定波長

4.2.3 LogD の算出

物性予測プログラム Pallas(CompuDrug International Inc.)による計算値を用いた。

4.2.4 実験動物の飼育管理

2 歳齢以上のカニクイザル雌雄（ハムリー）を購入し、検疫を終了した後に使用した。動物室にて、設定温度 24 （許容範囲：18 - 28 ） 設定湿度 60%（許容範囲：30 - 70%） 照明 12 時間（7:00 – 19:00）の環境下でステンレス製ケージに個別飼育した。サル用固形飼料（PS：オリエンタル酵母工業）を投与日以外の期間は 1 日 1 回午前中に、投与日は投与後 30 分（飽食下での薬物吸収を仮定）あるいは 4 時間（絶食下での薬物吸収を仮定）に 1 例当り 100 ± 5 g 給餌した。飲料水は給水ノズルから水道水を自由に摂取させた。

4.2.5 化合物 A から G の血漿中濃度の測定

化合物 A から G は、0.5%メチルセルロース溶液または 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁し、100 mg/kg を中心に 10 ~ 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した（雌雄各 2 例）。給餌は投与後 30 分（飽食条件）あるいは 4 時間（絶食条件）に行い、1 週間程度休薬して化合物を wash out した後、もう一方の給餌条件下で投与する、クロスオーバー法で両給餌条件下の曝露比較を試みた。投与後 1、2、4、7 および 24 時間に、約 0.3 mL の血液を大腿部血管より無麻酔下で採取した。採取した血液をヘパリンリチウム存在下、4 、9,600 × g で 5 分間遠心分離し、血漿を得た。得られた血漿は測定に用いるまで -80 で冷凍保存した。凍結血漿を解凍し、除タンパク法または固相抽出法により前処理後、HPLC または LC/MS/MS にて各化合物に適した条件で血漿中濃度測定を行った。なお、化合物 A のみ投与後 1 時間給餌

を飽食条件、投与後 4 時間給餌を絶食条件とし、動物はそれぞれ雄 3 例および雄 6 例を用いた。採血時間は投与後 2、4、8、24 時間とした。

4.2.6 TK パラメータ解析

AUC は台形法を用い、計算ソフト Microsoft EXCEL2003 (マイクロソフト) で算出した。

4.2.7 化合物 A から G の物性と曝露の相関性評価方法

サルの胃内 pH として、絶食時に pH 2 未満、飽食時におおよそ pH 5~7 となることが報告されている⁷⁷⁾。またサルの小腸内 pH に関する報告はほとんどないため、ヒトを模した人工腸液と同じく、絶食時に pH 6.5 付近、飽食時に pH 5 付近と仮定した。また胃における化合物の溶解性の評価のため、絶食時は JP1、飽食時は JP2 への溶解性データが適しており、小腸における溶解性の評価のため、絶食時は FaSSIF、飽食時は FeSSIF への溶解性データが適していると仮定した。小腸では飽食時の胆汁酸成分が、絶食時より多いと考えられるが、両人工腸液はその点が考慮された組成となっており、胆汁酸の影響も評価できる。さらに小腸内の飼料の有無により、飼料中脂肪分 (粗脂肪分として約 10%前後含有⁷⁸⁾) が化合物の溶解性に影響すると考え、脂溶性の指標として飽食時の pH 5.0 の LogD のデータが適していると仮定した。

以上のことから、絶食および飽食時のサル消化管における環境と、そこにおける薬物の状態を考察するための物性データとの相関を評価する表として、Table 4-1 のようなマトリックスを考えた。青字で示した部分には各化合物における測定値を、赤字で示した部分には後述する判定基準に基づく溶解性と脂溶性の評価を入力した。その後、物性データと絶食時および飽食時の平均 AUC の相関を考察した。なお絶食時の脂溶性推察の参考値として、pH 6.0 と pH 6.8 における LogD も併記した。

溶解性の判定基準として、分子量が 500、臨床投与量が 1 mg/kg のとき消化管膜透過性が良好とされる薬物が必要な溶解性が 10 µg/mL である⁷⁹⁾ことから、今回は 10 µg/mL 以上を高溶解性、以下を低溶解性とした。脂溶性の目安として、一般的に LogD が -2 以上 5 未満⁷⁴⁾の範囲が適切で、これより低いと水溶性が高すぎて消化管膜の透過性が低下し、高いと脂溶性が高すぎて溶解性が低下するため、吸収が低下

すると考えられている。そのため脂溶性の判定基準として 5 以上を高脂溶性、-2 未満を低脂溶性と判断した。平均 AUC は、絶食時と飽食時で 2 倍以上差があった場合を生物学的有意差ありと判断した。

Table 4-1. Relationships between physicochemical properties, a condition of each gastrointestinal tract, and systemic exposures of each drug.

Physicochemical property	Physiological condition		
	Gastrointestinal tract	Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)			
JP1 (pH 1.2)	Stomach	<pH 2 Solubility in JP1	pH 5 - 7 Solubility in JP2
Acetate buffer (pH 4.0)			
JP2 (pH 6.8)			
Simulated intestinal fluid (µg/mL)			
FaSSIF (pH 6.5)	Small intestine	pH 6.5 Solubility in FaSSIF	pH 5 Bile acid Solubility in FeSSIF
FeSSIF (pH 5.0)			
Lipophilicity			
LogD (pH 5.0)	Lipophilicity (LogD value)		Food Lipophilicity (LogD at pH 5.0)
(pH 6.0)			
(pH 6.8)			
AUC (µg·h/mL)		AUC in fasted condition	AUC in fed condition
AUC: Mean AUC _{0-24h}			

4.3 結果

化合物 A から G の物性と曝露の相関

化合物 A から G の物性データと、雌雄各 2 例、計 4 例のカニクイザルにおける平均 AUC の相関を、Table 4-2 から Table 4-8 にそれぞれ示した。溶解性や脂溶性の評価は高いと判定された場合赤字で、低いと判定された場合青字で記載した。また両給餌条件における AUC に 2 倍以上の差があった場合、高い方の値を赤字で、低い方の値を青字で記載した。なお、化合物 A については雄 3 または 6 例のカニクイザルを用いた。

化合物 A は、絶食時、飽食時ともに胃での溶解性は低く、小腸での溶解性は高かった (Table 4-2)。一方、飽食時の小腸での脂溶性は高かった。AUC は飽食時の方が絶食時より高い値を示したが、これは飽食時小腸での高脂溶性により、餌の脂肪分への溶解性が増したためと考えられた。

Table 4-2. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound A.

<Compound A>

Physicochemical property	Physiological condition		
	Gastrointestinal tract	Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)			
JP1 (pH 1.2)	<0.03	Stomach	<pH 2
Acetate buffer (pH 4.0)	0.03	Low	pH 5 - 7
JP2 (pH 6.8)	0.05		Low
Simulated intestinal fluid (µg/mL)			
FaSSIF (pH 6.5)	11	Small intestine	pH 6.5
FeSSIF (pH 5.0)	32		pH 5
		High	Bile acid
			High
Lipophilicity			
LogD (pH 5.0)	5.08		Food
(pH 6.0)	5.08		
(pH 6.8)	5.08		High
AUC (µg·h/mL)			
1000 mg/kg		3.47	23.6

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 6 in fasted condition, n = 3 in fed condition).

化合物 B は、絶食時、飽食時ともに胃での溶解性は低かった（Table 4-3）。一方、小腸での溶解性は絶食時に低く、飽食時に高かった。飽食時の小腸での脂溶性は中程度であった。AUC は飽食時の方が絶食時より高い値を示したが、これは飽食時の小腸での溶解性が高いためと考えられた。

Table 4-3. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound B.

<Compound B>

Physicochemical property			Physiological condition	
			Gastrointestinal tract	Fasted condition Fed condition
pH solubility (µg/mL)				
JP1 (pH 1.2)	0.8	Stomach	<pH 2 Low	pH 5 - 7 Low
Acetate buffer (pH 4.0)	0.2			
JP2 (pH 6.8)	0.5			
Simulated intestinal fluid (µg/mL)				
FaSSIF (pH 6.5)	5.1	Small intestine	pH 6.5 Low	pH 5 Bile acid High
FeSSIF (pH 5.0)	37			
Lipophilicity				
LogD (pH 5.0)	0.8			Food Medium
(pH 6.0)	0.8			
(pH 6.8)	0.8			
AUC (µg·h/mL)				
10 mg/kg			1397	2917

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 4).

化合物 C は、絶食時、飽食時ともに胃および小腸での溶解性は高かった(Table 4-4)。一方、飽食時の小腸での脂溶性は低かった。AUC は飽食時の方が絶食時より低い値を示したが、これは絶食時の小腸での低脂溶性により、餌の脂肪分で溶解性が低下したためと考えられた。

Table 4-4. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound C.

<Compound C>

Physicochemical property			Physiological condition		
			Gastrointestinal tract	Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)					
JP1 (pH 1.2)	9100		Stomach	<pH 2	pH 5 - 7
Acetate buffer (pH 4.0)	14000			High	High
JP2 (pH 6.8)	44000				
Simulated intestinal fluid (µg/mL)					
FaSSIF (pH 6.5)	>1000		Small intestine	pH 6.5	pH 5
FeSSIF (pH 5.0)	>1000			High	Bile acid High
Lipophilicity					
LogD (pH 5.0)	-4.68				Food
(pH 6.0)	-4.67				Low
(pH 6.8)	-4.59				
AUC (µg·h/mL)					
100 mg/kg				75894	26300

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 4).

化合物 D は、絶食時、飽食時ともに胃での溶解性は低く、小腸での溶解性は高かった (Table 4-5)。一方、飽食時の小腸での脂溶性は中程度であった。AUC は絶食時と飽食時で差がなかったが、これは胃や小腸における溶解性の特徴に差がなく、飽食時の小腸における脂溶性も中程度であったためと考えられた。

Table 4-5. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound D.

<Compound D>

Physicochemical property		Physiological condition		
		Gastrointestinal tract	Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)				
JP1 (pH 1.2)	0.9	Stomach	<pH 2	pH 5 - 7
Acetate buffer (pH 4.0)	0.8		Low	Low
JP2 (pH 6.8)	0.9			
Simulated intestinal fluid (µg/mL)				
FaSSIF (pH 6.5)	17	Small intestine	pH 6.5	pH 5
FeSSIF (pH 5.0)	198			Bile acid
			High	High
Lipophilicity				
LogD (pH 5.0)	0.8			Food
(pH 6.0)	0.8			
(pH 6.8)	0.8			Medium
AUC (µg·h/mL)				
100 mg/kg			114	126

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 4).

化合物 E は、絶食時、飽食時ともに胃での溶解性は低く、小腸での溶解性は高かった (Table 4-6)。一方、飽食時の小腸での脂溶性は中程度であった。AUC は絶食時と飽食時で差がなかった、これは胃や小腸における溶解性の特徴に差がなく、飽食時の小腸における脂溶性も中程度であったためと考えられた。

Table 4-6. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound E.

<Compound E>

Physicochemical property			Physiological condition		
			Gastrointestinal tract	Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)					
JP1 (pH 1.2)	N.D.		Stomach	<pH 2	pH 5 - 7
Acetate buffer (pH 4.0)	N.D.			Low	Low
JP2 (pH 6.8)	3.9				
Simulated intestinal fluid (µg/mL)					
FaSSIF (pH 6.5)	52.9		Small intestine	pH 6.5	pH 5
FeSSIF (pH 5.0)	60.8			High	Bile acid High
Lipophilicity					
LogD (pH 5.0)	2.50				Food
(pH 6.0)	2.50				Medium
(pH 6.8)	2.46				
AUC (µg·h/mL)					
100 mg/kg				203	287

N.D.: Not detected.

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 4).

化合物 F は、絶食時、飽食時ともに胃での溶解性は低く、小腸での溶解性は高かった (Table 4-7)。一方、飽食時の小腸での脂溶性は中程度であった。AUC は絶食時と飽食時で差がなかった、これは胃や小腸における溶解性の特徴に差がなく、飽食時の小腸における脂溶性も中程度であったためと考えられた。

Table 4-7. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound F.

<Compound F>

Physicochemical property	Physiological condition			
	Gastrointestinal tract		Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)				
JP1 (pH 1.2)	6.2	Stomach	<pH 2	pH 5 - 7
Acetate buffer (pH 4.0)	7.3		Low	Low
JP2 (pH 6.8)	9.7			
Simulated intestinal fluid (µg/mL)				
FaSSiF (pH 6.5)	38.8	Small intestine	pH 6.5	pH 5
FeSSiF (pH 5.0)	177.1		High	Bile acid
				High
Lipophilicity				
LogD (pH 5.0)	3.11			Food
(pH 6.0)	3.12			Medium
(pH 6.8)	3.13			
AUC (µg·h/mL)				
100 mg/kg			318	395

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 4).

化合物 G は、絶食時、飽食時ともに胃および小腸での溶解性は低かった(Table 4-8)。一方、飽食時の小腸での脂溶性は高かった。AUC は絶食時と飽食時で差がなかったが、これは飽食時の小腸での脂溶性、すなわち LogD が 5.47 で、一般的に薬として好ましいとされる LogD が-2 以上 5 未満⁷⁴⁾の範囲を超えており、高脂溶性すぎたことで溶解性が抑えられ、曝露の増加につながらなかったのではないかと考えられた。

Table 4-8. Relationships between physicochemical properties and systemic exposure of Compound G.

<Compound G>

Physicochemical property	Physiological condition		
	Gastrointestinal tract	Fasted condition	Fed condition
pH solubility (µg/mL)			
JP1 (pH 1.2)	<0.25	Stomach	pH 5 - 7
Acetate buffer (pH 4.0)	<0.25		Low
JP2 (pH 6.8)	<0.25		Low
Simulated intestinal fluid (µg/mL)			
FaSSIF (pH 6.5)	5.4	Small intestine	pH 5
FeSSIF (pH 5.0)	8.3		Bile acid
			Low
Lipophilicity			
LogD (pH 5.0)	5.47		Food
(pH 6.0)	4.55		High
(pH 6.8)	3.74		
AUC (µg·h/mL)			
300 mg/kg		183	148

AUC: Mean AUC_{0-24h} (n = 4).

4.4 考察

化合物 A は、絶食時、飽食時ともに胃および小腸での溶解性は同じ特徴を示した。一方、飽食時の小腸での脂溶性は、LogD がほぼ 5 で高いと考えられた。AUC は飽食時の方が絶食時より高い値を示したことから、餌の脂肪分が消化管内にあることにより溶解性が上がり、AUC が上昇したのではないかと考えた。同様に考察すると、化合物 B は、胃での溶解性は絶食、飽食で特徴に差がなかったものの、小腸での溶解性は絶食時に低く、飽食時に高かった。飽食時の小腸での脂溶性は中程度で、餌の有無による大きな影響はないと考えられることから、飽食時の AUC の方が絶食時より高かったのは、小腸での溶解性の差に起因すると考えられた。化合物 C は、胃および小腸での溶解性の特徴に差がなかったが、飽食時の小腸での脂溶性は低かったため、餌の脂肪分により溶解性が低下し、AUC が飽食時で低下したと考えた。化合物 D から F は、絶食、飽食で胃および小腸での溶解性の特徴に差がなく、飽食時の小腸での脂溶性も中程度で、曝露に影響を与えるべき顕著な要因がなかったことから、絶食時と飽食時の AUC に差がなかったのではないかと考えた。化合物 G は、絶食時、飽食時ともに胃および小腸での溶解性の特徴に差がなかった。一方、飽食時の小腸での脂溶性は高かったため、絶食時と飽食時の AUC に差が出ることが考えられるが、実際は差がなかった。原因としては飽食時の LogD が 5.47 で、一般的に薬として好ましいとされる LogD が -2 以上 5 未満⁷⁴⁾の範囲を超えており、高脂溶性すぎたことで溶解性が抑えられ、曝露の増加につながらなかったのではないかと考えた。

以上のことから、絶食、飽食における曝露の差を考察するためには、まず溶解性を考え、そこで特徴に差がなければ脂溶性を考慮することで説明がつくことを見出した。また胃における吸収は、小腸に比較してほとんど無視できることから、最終的には小腸での溶解性が曝露評価に重要であり、胃での溶解性は、高い場合に胃酸による安定性を考慮するための指標として使用できるのではないかと考えた。そこで、物性情報から給餌条件による曝露の差を予測するための決定樹を作成した(図 4)。この決定樹では、化合物 A から G は各物性条件から、図示した結論と一致した。

以上のように、pH 溶解性、腸液溶解性、脂溶性の 3 種類の物性パラメータを取得

し考察することで、カニクイザルを用いた毒性試験における給餌タイミングの違いによる曝露の違いに科学的根拠を与え、評価することが可能であった。サルは曝露の個体差が大きいため、試験間や施設間で曝露が異なった場合、個体差と解釈されることが多い。よって曝露の差を科学的に説明できることは、その後の試験の計画や評価を適切に行うことができ、有意義と考えられる。げっ歯類の反復投与毒性試験は、通常、餌を自由摂取させて行うことから給餌のコントロールは非現実的であるが、非げっ歯類においては、一定の時刻に一定量給餌することが一般的であることからそれが可能である。このことから、各化合物に適した給餌条件を設定することで、再現性の高い毒性試験に寄与できるものとする。

本章ではカニクイザルを用いて検討を行ったが、非げっ歯類として毒性試験に頻繁に用いられるイヌについても同様の検討が可能である。ただし、イヌはサルと異なり胃内 pH が絶食時に上昇し、飽食時に低下することが知られている。よって小腸内の pH もサルとは異なった挙動を示すことが予想され、そのような基礎データを取得したうえで検討を進める必要がある。今後も給餌タイミングによる曝露への影響を物性との関連で考察することで、非げっ歯類を用いた毒性試験における曝露変動の予測精度や頑健性が向上していくものとする。

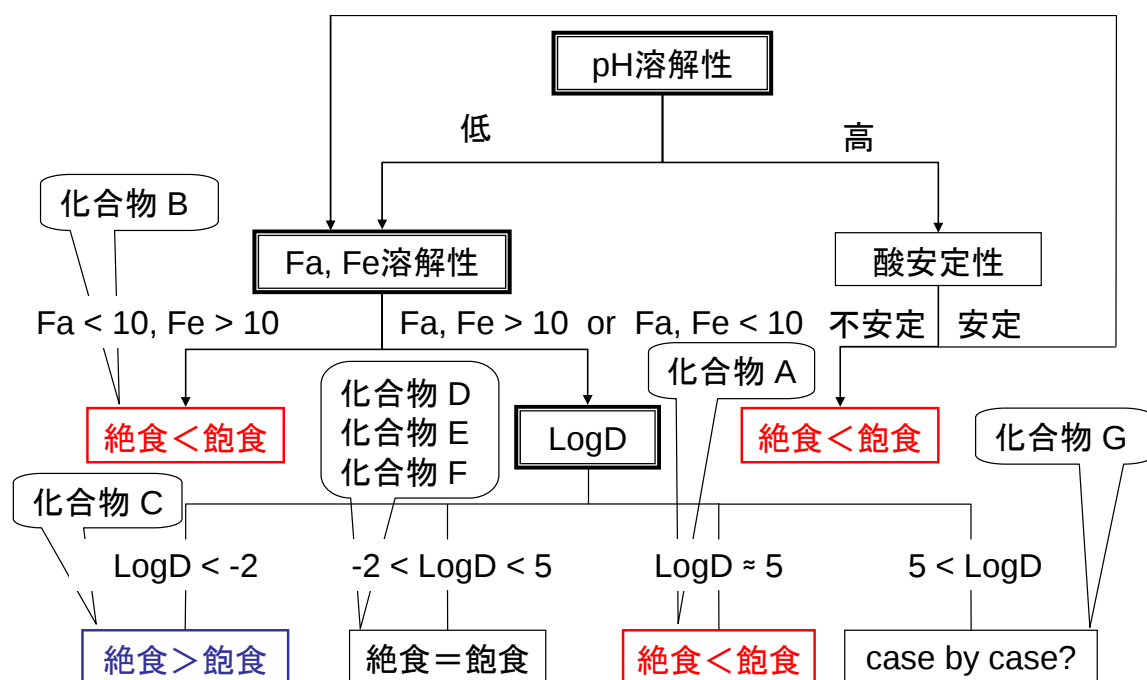


図4 物性と給餌タイミングによる曝露の差に関する決定樹

第4章 小括

- カニクイザルを用いた毒性試験において、給餌タイミングの違いで曝露が異なる化合物が存在することを確認した。
- 給餌タイミングによる曝露の差を説明しうる物性として、pH 溶解性、腸液溶解性、脂溶性の寄与が大きいことが示唆された。
- 物性データを取得し、考察することで曝露の差に科学的根拠を与え、再現性良く、十分な曝露を負荷することのできる、適切な毒性試験の計画や評価に寄与しうることを明らかにした。

総括

本研究では、TK を、医薬品開発における毒性学的課題が生じた際の解釈や問題解決に活用すべく、毒性評価動物が置かれた各種生理的条件に着目し、薬物動態と毒性の観点から以下の研究を行った。

第1章では、NAR を用い、遊離型薬物濃度が上昇して、総薬物濃度ではモニターできない急激な毒性増強を起こすケースを考慮し、遊離型薬物濃度に基づいた TK/TD 解析の有用性を検討した。毒性や薬理作用は、遊離型薬物濃度の高い NAR で強く発現する傾向を示し、総薬物濃度より遊離型薬物濃度に相関することを確認した。遊離型薬物濃度をモニターすることは、タンパク結合率の動物種差および TK/TD の種差があった場合や、高曝露、薬物相互作用、肝障害、腎障害等で毒性増強があった場合の解釈に有用と考えられた。また、NAR は、遊離型薬物濃度上昇のモデル動物として、副作用の予測や潜在的な毒性の検出に利用できる可能性を示した。

第2章では、妊娠が母動物の薬物動態や毒性に及ぼす影響は十分に研究されていないことから薬物の分布に焦点を当て、妊娠ラットにおける薬物のタンパク結合率と TK/TD の変化を検討した。その結果、タンパク結合率低下と血漿容量増加に伴うと考えられる、遊離型薬物の曝露増加を確認した。また妊娠ラットの遊離型薬物曝露増加は、毒性の増強を伴う可能性が示唆された。よって、一般毒性試験と比較して強い母動物毒性が起こった場合は、その解釈のための一つの方法として、遊離型濃度の TK 測定が有用と考えられる。また非臨床において、妊娠動物によって得られた TK/TD の変化に関する知見は、臨床で新規治療薬を妊婦に投与する際の適正使用に貴重な情報を与えるうると考えられた。

第3章では、妊娠中の薬物代謝、輸送に焦点を当て、妊娠ラットにおける代謝酵素とトランスポーターの発現や活性を調べた。その結果、CYP1A2、CYP2E1 および CYP3A の遺伝子発現、タンパク発現、酵素活性の低下を確認した。また、マイクロアレイ解析を用い、妊娠ラットの肝臓、腎臓、小腸におけるトランスポーターの遺伝子発現プロファイルを明らかにした。発現や活性の変動が確認された代謝酵素やトランスポーターにより、薬物のクリアランス変化、ひいては毒性の増強や薬効の減弱が引き起こされる可能性があるため、一般毒性試験と母動物毒性が異なっ

た場合は、代謝酵素やトランスポーターの発現や活性変動が影響している可能性があると考えられた。

第4章では、薬物の物性と吸収による体内曝露量との相関に着目し、化合物の溶解性や脂溶性といった物性パラメータと、非げっ歯類の毒性試験における給餌タイミングによる曝露差との相関を検討した。その結果、カニクイザルを用いた毒性試験において、給餌のタイミングの違いで曝露が異なる化合物があることを確認し、こうした曝露の差を説明しうる物性として、pH 溶解性、腸液溶解性、脂溶性の寄与が大きいことが示唆された。よって、物性データを取得し、考察することで曝露の差に科学的根拠を与え、再現性良く、十分な曝露を負荷することのできる適切な毒性試験の計画や評価に寄与しうると考えられた。

以上、本研究において得られた知見により、医薬品開発において、TK が毒性試験結果に科学的解釈を与えうることを示すことができた。言い換えると TK は、曝露の保証や試験計画に必要な情報提供のためだけではなく、毒性発現の解釈やヒトへのリスクアセスメントに重要な役割を果たすことが可能である。安全性評価向上にむけて積極的に TK を活用するためには、分析技術、非線形時の薬物動態学、毒性学の全てに精通し、かつ新たな問題に取り組むことが必要である。

例えば近年、小児適用医薬品のための非臨床試験として、幼若動物を用いた毒性試験の重要性に対する認識が高まっており、海外では 2005 年に欧州医薬品審査庁からガイドライン案⁸⁰⁾が、2006 年に FDA からガイダンス⁸¹⁾がそれぞれ出され、幼若動物毒性試験に関する取り組みが始まっている。幼若動物では腎機能や代謝など、薬物動態に関わる機能が成獣とは異なることが知られており⁸²⁾、その試験計画や結果の解釈には多くの科学的知見が必要となるため、幼若動物における TK は一つの大きな研究領域となりうると考えられる。今後ヒトへのリスクアセスメントやヒトにおけるリスクマネジメントに寄与すべく、TK が応用されることを期待する。

参考文献

- 1) International conference on harmonization harmonized tripartite guideline (ICH-S3A, 1994): Note for guidance on toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies.
- 2) 薬審第 443 号 トキシコキネティクス (毒性試験における全身的曝露の評価) に関するガイダンスについて (1996.7.2)
- 3) Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations (2000)
- 4) Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites (2008)
- 5) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001)
- 6) Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm. Res.* 24, 1962-1973 (2007)
- 7) Cayen MN. Considerations in the design of toxicokinetic programs. *Toxicol. Pathol.* 23, 148-157 (1995)
- 8) Batra VK. Toxicokinetic/toxicodynamic correlations: goals, methods, and limitations. *Toxicol. Pathol.* 23, 158-164 (1995)
- 9) Smith DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in toxicology. *Xenobiotica* 27, 513-525 (1997)
- 10) Notarianni LJ. Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clin. Pharmacokinet.* 18, 20-36 (1990)
- 11) Takamura N, Tokunaga J, Arimori K. Interpretations of laboratory test data on serum protein binding. *Yakugaku Zasshi* 127, 231-236 (2007)
- 12) Kragh-Hansen U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacol. Rev.* 33, 17-53 (1981)
- 13) Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20, 309-323 (2005)
- 14) Sugihara N, Furuno K, Kita, N, Murakami T, Yata, N. Plasma α_1 -acid glycoprotein

- concentration in rats with chemical liver injury. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2516-2519 (1992)
- 15) Kosa T, Maruyama T and Otagiri T. Species differences of serum albumins: I. Drug Binding Sites. *Pharmaceutical Research* 14, 1607-1612 (1997)
 - 16) Jardine LA, Jenkins-Manning S, Davies MW. Albumin infusion for low serum albumin in preterm newborn infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 3, CD004208 (2004)
 - 17) Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 989-1008 (2005)
 - 18) Roberts J, Tumer N. Age and diet effects on drug action. *Pharmac. Ther.* 37, 111-149 (1988)
 - 19) Goto S, Yoshitomi H, Miyamoto A, Yamada H, Fujii S, Nakayama T, Fujiwara K. Further investigations on the binding of loop diuretics to serum proteins from patients with liver disease. *J. Pharmacobiodyn.* 4, 865-873 (1981)
 - 20) Tiula E, Tallgren LG, Neuvonen PJ. Serum protein binding of phenytoin, diazepam and propranolol in chronic renal diseases. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 25, 545-552 (1987)
 - 21) Wolf GK, McClain CD, Zurakowski D, Dodson B, McManus ML. Total phenytoin concentrations do not accurately predict free phenytoin concentrations in critically ill children. *Pediatr. Crit. Care Med.* 7, 434-439 (2006)
 - 22) Nagase S, Shimamune K, Shumiya S. Albumin-deficient rat mutant. *Science* 205, 590-591 (1979)
 - 23) Kragh-Hansen U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacol. Rev.* 33, 17-53 (1981)
 - 24) Hirate J, Zuh C, Horikoshi I, Nagase S. Disposition of warfarin in analbuminemic rats. *Int. J. Pharmaceut.* 65, 149-157 (1990)
 - 25) Hirate J, Horikoshi I, Nagase S. Disposition of phenytoin in analbuminemic rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 11, 773-783 (1990)
 - 26) Cayen MN, Ferdinandi ES, Greselin E, Robinson WT, Dvornik D. Clofibrate and clofibric acid: comparison of the metabolic disposition in rats and dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200, 33-43 (1977)
 - 27) Kramer JA, Blomme EA, Bunch RT, Davila JC, Jackson CJ, Jones PF, Kolaja KL, Curtiss

- SW. Transcription profiling distinguishes dose-dependent effects in the livers of rats treated with clofibrate. *Toxicol. Pathol.* 31, 417-431 (2003)
- 28) Matsubara T, Otsubo S, Yoshihara E, Touchi A. Biotransformation of coumarin derivatives. (2). Oxidative metabolism of 7-alkoxycoumarin by microsomal enzymes and a simple assay procedure for 7-alkoxycoumarin O-dealkylase. *Jpn. J. Pharmacol.* 33, 41-56 (1983)
- 29) Barra J, Taburet AM, Jardel A, Fessi H, Puisieux F. High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of ethyl clofibrate and clofibric acid in plasma. Evaluation of plasma stability of ethyl clofibrate polylactic nanocapsules in human and rat plasmas. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 661, 178-182 (1994)
- 30) Gray TJ, Beamand JA, Lake BG, Foster JR, Gangolli SD. Peroxisome proliferation in cultured rat hepatocytes produced by clofibrate and phthalate ester metabolites. *Toxicol. Lett.* 10, 273-279 (1982)
- 31) Gray TJ, Lake BG, Beamand JA, Foster JR and Gangolli SD. Peroxisome proliferation in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67, 15-25 (1983)
- 32) Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 (1964)
- 33) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- 34) Esumi H, Okui M, Sato S, Sugimura T, Nagase S. Absence of albumin mRNA in the liver of analbuminemic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3215-3219 (1980)
- 35) Emori T, Takahashi M, Sugiyama K, Shumiya S, Nagase S. Age-related changes in plasma proteins of analbuminemic rats. *Jikken Doubutsu* 32, 123-132 (1983)
- 36) Sugihara N, Furuno K, Kita N, Murakami T, Yata N. Plasma α_1 -acid glycoprotein concentration in rats with chemical liver injury. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2516-2519 (1992)
- 37) Loebstein R, Lalkin A, Koren G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. *Clin. Pharmacokinet.* 33, 328-343 (1997)
- 38) Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 989-1008 (2005)
- 39) Loebstein R, Koren G. Clinical relevance of therapeutic drug monitoring during pregnancy. *Ther. Drug Monit.* 24, 15-22 (2002)

- 40) Sakai T, Maruyama T, Imamura H, Shimada H, Otagiri M. Mechanism of stereoselective serum binding of ketoprofen after hemodialysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 786-792 (1996)
- 41) Takamura N, Maruyama T, Otagiri M. Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin. Chem.* 43, 2274-2280 (1997)
- 42) Yoshikawa T, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T, Hanano M, Kawasaki S, Yanagida M. Effect of late pregnancy on salicylate, diazepam, warfarin, and propranolol binding: Use of fluorescent probes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36, 201-208 (1984)
- 43) International conference on harmonization harmonized tripartite guideline (ICH-S5, 2005): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility.
- 44) Stock B, Dean M, Levy G. Serum protein binding of drugs during and after pregnancy in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 264-268 (1980)
- 45) Dean M, Penglis S, Stock B. The pharmacokinetics of salicylate in the pregnant Wistar rat. *Drug Metab. Dispos.* 17, 87-90 (1989)
- 46) Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin. Pharmacokinet.* 33, 184-213 (1997)
- 47) Walle UK, Walle T, Bai SA, Olanoff LS. Stereoselective binding of propranolol to human plasma, α_1 -acid glycoprotein, and albumin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34, 718-723 (1983)
- 48) Glezen WP, Alpers M. Maternal immunization. *Clin. Infect. Dis.* 28, 219-224 (1999)
- 49) Tracy TS, Venkataramanan R, Glover DD, Caritis SN. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 633-639 (2005)
- 50) Dickmann LJ, Tay S, Senn TD, Zhang H, Visone A, Unadkat JD, Hebert MF, Isoherranen N. Changes in maternal liver Cyp2c and Cyp2d expression and activity during rat pregnancy. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1677-1687 (2008)
- 51) Czekaj P, Wiaderkiewicz A, Florek E, Wiaderkiewicz R. Expression of cytochrome CYP2B1/2 in nonpregnant, pregnant and fetal rats exposed to tobacco smoke. *Acta. Biochim. Pol.* 47, 1115-1127 (2000)

- 52) He XJ, Ejiri N, Nakayama H, Doi K. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.* 78, 64-70 (2005)
- 53) Luquita MG, Catania VA, Pozzi EJ, Veggi LM, Hoffman T, Pellegrino JM, Ikushiro S, Emi Y, Iyanagi T, Vore M, Mottino AD. Molecular basis of perinatal changes in UDP-glucuronosyltransferase activity in maternal rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 49-56 (2001)
- 54) Gallagher TF, Mueller MN, Kappas A. Estrogen pharmacology. IV. Studies of the structural basis for estrogen-induced impairment of liver function. *Medicine (Baltimore)* 45, 471-479 (1966)
- 55) Vore M, Bauer J, Pascucci V. The effect of pregnancy on the metabolism of [14C]phenytoin in the isolated perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206, 439-447 (1978)
- 56) Vore M, Soliven E, Blunden M. The effect of pregnancy on the biliary excretion of [14C]phenytoin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 257-262 (1979)
- 57) Auansakul AC, Vore M. The effect of pregnancy and estradiol-17 beta treatment on the biliary transport maximum of dibromosulfophthalein, and the glucuronide conjugates of 5-phenyl-5-p-hydroxyphenyl[14C]hydantoin and [14C]morphine in the isolated perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.* 10, 344-349 (1982)
- 58) Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* 271, 15091-15098 (1996)
- 59) Cao J, Huang L, Liu Y, Hoffman T, Stieger B, Meier PJ, Vore M. Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. *Hepatology* 33, 140-147 (2001)
- 60) Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 635-661 (2002)
- 61) Arrese M, Trauner M, Ananthanarayanan M, Pizarro M, Solís N, Accatino L, Soroka C, Boyer JL, Karpen SJ, Miquel JF, Suchy FJ. Down-regulation of the Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide during pregnancy in the rat. *J. Hepatol.* 38, 148-155 (2003)
- 62) Gregory JD, Lipmann F. The transfer of sulfate among phenolic compounds with 3',

- 5'-diphosphoadenosine as coenzyme. *J. Biol. Chem.* 229, 1081-1090 (1957)
- 63) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139 (1974)
- 64) Bock KW, Froling W, Remmer H, Rexer B. Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on substrate specificity of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta.* 327, 45-56 (1973)
- 65) Czekaj P, Wiaderkiewicz A, Florek E, Wiaderkiewicz R. Tobacco smoke-dependent changes in cytochrome P450 1A1, 1A2, and 2E1 protein expressions in fetuses, newborns, pregnant rats, and human placenta. *Arch. Toxicol.* 79, 13-24 (2005)
- 66) He XJ, Yamauchi H, Suzuki K, Ueno M, Nakayama H, Doi K. Gene expression profiles of drug-metabolizing enzymes (DMEs) in rat liver during pregnancy and lactation. *Exp. Mol. Pathol.* 83, 428-434 (2007)
- 67) Borlakoglu JT, Scott A, Henderson CJ, Wolf CR. Alterations in rat hepatic drug metabolism during pregnancy and lactation. *Biochem. Pharmacol.* 46, 29-36 (1993)
- 68) Dean ME, Stock BH. Hepatic microsomal metabolism of drugs during pregnancy in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 3, 325-331 (1975)
- 69) Polidoro G, Di Ilio C, Arduini A, Federici G. Effect of pregnancy on hepatic glutathione S-transferase activities in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 30, 1859-1860 (1981)
- 70) Cao J, Stieger B, Meier PJ, Vore M. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G757-766 (2002)
- 71) Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppel TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D, Boyer JL. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113, 255-264 (1997)
- 72) Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol.* 44, 1150-1157 (2006)
- 73) 秋元克哉 . 薬らしい物性とパラレルスクリーニング . *ファルマシア* 43, 977-981 (2007)

- 74) Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3-26 (2001)
- 75) Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System (2000)
- 76) Galia E, Nicolaides E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm. Res.* 15, 698-705 (1998)
- 77) Kondo H, Shinoda T, Nakashima H, Watanabe T, Yokohama S. Characteristics of the gastric pH profiles of unfed and fed cynomolgus monkeys as pharmaceutical product development subjects. *Biopharm. Drug Dispos.* 24, 45-51 (2003)
- 78) オリエンタル酵母工業株式会社 実験動物用飼料 DATA BOOK (2002)
- 79) Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 235-249 (2000)
- 80) Guideline on the Need for Non-clinical Testing in Juvenile Animals on Human Pharmaceuticals for Paediatric Indications (2005)
- 81) Guidance for Industry: Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products (2006)
- 82) 小児適用医薬品のための非臨床試験検討 製薬協 医薬品評価委 基礎研 資料 14 (2007)

論文目録

本学位論文の一部は下記学会誌に発表した。

原著論文

- 1) Miida H, Arakawa S, Shibaya Y, Honda K, Kiyosawa N, Watanabe K, Manabe S, Takasaki W, Ueno K. Toxicokinetic and toxicodynamic analysis of clofibrate based on free drug concentrations in nagase analbuminemia rats (NAR). *J. Toxicol. Sci.* 33, 349-361 (2008)
- 2) Miida H, Noritake Y, Shimoda H, Honda K, Matsuoka T, Sakurai K, Shirai M, Manabe S, Takasaki W, Ueno K. Decrease in protein binding and its effect on toxicokinetics (TK)/toxicodynamics (TD) of diclofenac and propranolol in pregnant rats. *J. Toxicol. Sci.* 33, 525-536 (2008)

謝辞

本研究を行うに際し、格別たる御指導と御高閲を賜りました千葉大学大学院 薬学
研究院 高齢者薬剤学研究室 上野 光一 教授に謹んで深く御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、有益な御助言や叱咤激励を賜りました
中村 智徳 講師(現、群馬大学医学部附属病院薬剤部副部長) ならびに佐藤 洋美 助
教に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、毒性学をご教授下さり、また本論文の作成にあたり、懇切なご助言
やご高閲を賜りました第一三共株式会社 安全性研究所所長 真鍋 淳 博士ならびに
グループ長 高崎 渉 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、薬物動態学を基礎からご教授下さいました第一三共株式会
社 研究開発本部 データサイエンス部部長 長沼 英夫 博士ならびに薬物動態研究所
グループ長 泉 高司 博士、中村 公一 博士、稲葉 真一 氏に心より御礼申し上げま
す。

本研究の遂行にあたり、定量分析を基礎からご教授下さいました、第一三共 RD ア
ソシエ株式会社 分析第二部 グループ長 川端 清 博士ならびに佐復 直純 氏に心よ
り感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、薬物物性の解析に多大なご協力を下さいました第一三共株式
会社 分析評価研究所 長崎 博隆 氏に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、薬物代謝酵素活性の解析に多大なご協力を下さいました第一
三共株式会社 薬物動態研究所 西矢 由美 氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の計画および遂行に際し、多大なるご助言およびご協力を頂きました、第一
三共株式会社 安全性研究所 清澤 直樹 博士、則武 結美子 氏、荒川 真悟 氏、本多

久美 氏、渡辺 恭子 氏、松岡 俊樹 氏、柴谷 由佳梨 氏、下田 瞳 氏をはじめとする研究員の皆様に心より深く御礼申し上げます。

審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院 薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 堀江 利治

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 千葉 寛

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 佐藤 信範