

Analysis and Prediction of Drug-Drug Interaction on Hepatic Uptake Transporter OATP

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42366

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文

肝トランスポーターを介した薬物相互作用の
予測およびそのバイオマーカーに関する研究

金沢大学大学院 自然科学研究科
生命科学専攻

学籍番号 : 0923032524

氏名 : 渡邊 将規

指導教官 : 玉井 郁巳

提出日 : 2015年1月8日

目次

第一章 序論.....	6
第二章 OATP を介した DDI 予測におけるカニクイザルの有用性に関する検討.....	12
第 1 節 諸言.....	12
第 2 節 実験材料および実験方法.....	15
第 1 項 材料および試薬.....	15
第 2 項 動物.....	15
第 3 項 OATP 基質の肝細胞取り込みの種差比較.....	16
第 4 項 Rosuvastatin の肝細胞取り込みの種差.....	17
第 5 項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する OATP 阻害剤の影響.....	17
第 6 項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する RIF の影響.....	18
第 7 項 カニクイザルを用いた DDI 試験.....	18
第 8 項 カニクイザル血漿中 rosuvastatin および RIF 濃度測定.....	18
第 3 節 結果.....	20
第 1 項 OATP 基質の肝細胞取り込みの種差比較.....	20
第 2 項 Rosuvastatin の肝細胞取り込み.....	24
第 3 項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する OATP 阻害剤の影響.....	25
第 4 項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する RIF の影響.....	26
第 5 項 カニクイザルを用いた DDI 試験.....	27
第 4 節 考察.....	30
第三章 OATP を介した DDI 予測における DHEAS のバイオマーカーとしての有用性に関する検討.....	34
第 1 節 諸言.....	34
第 2 節 実験材料および実験方法.....	37
第 1 項 材料および試薬.....	37
第 2 項 動物.....	37
第 3 項 DHEAS の肝細胞取り込み.....	37
第 4 項 DHEAS の肝細胞取り込みに対する Na ⁺ 依存性評価.....	38
第 5 項 DHEAS の肝取り込みに対する RIF の影響.....	39
第 6 項 サルを用いた DDI 試験.....	39
第 7 項 カニクイザル血漿中 DHEAS および試験薬の濃度測定.....	40
第 3 節 結果.....	41
第 1 項 DHEAS の肝細胞取り込み.....	41
第 2 項 DHEAS の肝細胞取り込みに対する Na ⁺ 依存性評価.....	41
第 3 項 DHEAS の肝取り込みに対する RIF の影響.....	42
第 4 項 カニクイザルを用いた DDI 試験.....	44

第 4 節 考察.....	49
第四章 結論.....	53
發表論文.....	55
謝辭.....	74

略語表

ACE	; Angiotensin-converting enzyme
ARB	; AngiotensinII Receptor Blocker
ATV	; Atorvastatin
AUC	; Area under the curve
BCRP	; Breast cancer resistance protein
C_{max}	; Maximum concentration
CYP	; Cytochrome P450
DDI	; Drug-drug interaction
DHEAS	; Dehydroepiandrosterone sulfate
EMA	; European Medicines Agency
FDA	; Food and Drug Administration
HMG-CoA	; 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
KHB	; Krebs-Henseleit buffer
LC-MS/MS	; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LST	; Liver-Specific Organic Anion Transporter
MATE	; Multidrug and toxin extrusion
NTCP	; Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide
OAT	; Organic anion transporter
OATP	; Organic anion transporting polypeptide
OCT	; Organic cation transporter
P-gp	; P-glycoprotein
PGT	; Prostaglandin transporter
PRV	; Pravastatin
PTV	; Pitavastatin

RIF ; Rifampicin

RSV ; Rosuvastatin

第一章 序論

複数の薬剤が処方される臨床現場において、その組み合わせによっては薬物相互作用 (Drug-Drug Interaction、DDI) により薬効の減弱、時には増大によって重篤な副作用が発症する場合がある。例えば、1993年にウイルス感染症の治療薬として上市された sorivudine は fluorouracil (5-FU) との薬物代謝酵素上での相互作用により、発売後 40 日間で 15 名の死者を出した^{1,2)}。また、mibefradil は薬物代謝酵素阻害により、市販後に多くの薬剤との著しい DDI が多数報告されたことから市場から撤退した^{3,4)}。さらに cisapride は cisapride の肝臓における代謝を阻害する薬剤との併用により、DDI が原因と考えられる心室性不整脈や錐体外路症状などの重篤な副作用が相次ぎ、販売中止になった⁵⁾。こうした重篤な副作用や市場からの撤退のリスクを低減させるために、医薬品開発においては開発候補化合物の有効性・安全性評価の一部として DDI を検討し、生じる可能性のある DDI の性質とその程度を *in vitro* 実験ならびに臨床試験により評価することが重要である。DDI は一般に薬物の吸収、分布、代謝、排泄の過程で影響を及ぼし、薬物の血中濃度や組織中濃度を変化させる薬物動態学的相互作用と薬物の血中濃度に変化を与えずに受容体などの作用部位での相互作用により薬効を増強または減弱させる薬力学的相互作用に分類されるが、本論文では薬物動態学的相互作用に焦点を当てる。

1990 年代に DDI が原因で市場から撤退する薬剤が相次ぎ、DDI を評価することの重要性を鑑みて、DDI 研究の実施方法や情報提供に関する一般的な指針を示すことを目的に 1997 年から 2001 年にかけて日米欧の 3 極の規制当局から DDI に関するドラフトガイダンス/ガイドラインが発行された。その後、科学的知見の集積、関連する学問や技術の進歩を踏まえて、2012 年 2 月に米国の Food and Drug Administration (FDA) から DDI に関するドラフトガイダンス⁶⁾が、2012 年 6 月に EU の European Medicines Agency (EMA) より DDI ガイドライン⁷⁾が改訂された。日本からは「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (案)」⁸⁾が発行される予定である。2001 年の日本の DDI ガイドラインにおいて、DDI 評価が必要なトランスポーターとして小腸、肝臓、腎臓、脳など

に発現する P 糖タンパク質(P-gp)が唯一記載されていた。その後のトランスポーター分子の同定、基質となる医薬品に関する知見の蓄積、さらに臨床でのトランスポーターを介した DDI 試験が蓄積された。その結果を踏まえて、欧米の改訂された新 DDI ガイダンス/ガイドラインでは、P-gp を含む複数のトランスポーターの DDI に関する記載が新たに追加された。日本の DDI ガイドラインにおいても、従来の P-gp の記載に加えて、吸収に関わるトランスポーター、肝臓および腎臓におけるトランスポーターを介した DDI に関する指針が示された。トランスポーターが関与する臨床 DDI の報告も多く、日米欧の三極の規制当局ともに医薬品開発におけるトランスポーターを介した DDI 評価の重要性が示されている。

DDI に関するドラフトガイダンス/ガイドラインでは DDI を評価すべきトランスポーターとして、小腸上皮細胞や肝細胞、腎尿管上皮細胞、脳血管内皮細胞等に発現する P-gp、乳癌耐性蛋白 (BCRP)、有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) 1B1、1B3、有機アニオントランスポーター (OAT) 1、3、有機カチオントランスポーター (OCT) 1、2、多剤排出輸送体(MATE)1、2-K が挙げられている⁶⁻⁸⁾。これらトランスポーターは *in vitro* や *in vivo* 研究により薬物の吸収、分布または排泄に関与し、薬物の体内動態を規定する因子であることが明らかになっており⁹⁾、臨床試験でこれらトランスポーターを介した DDI が認められて

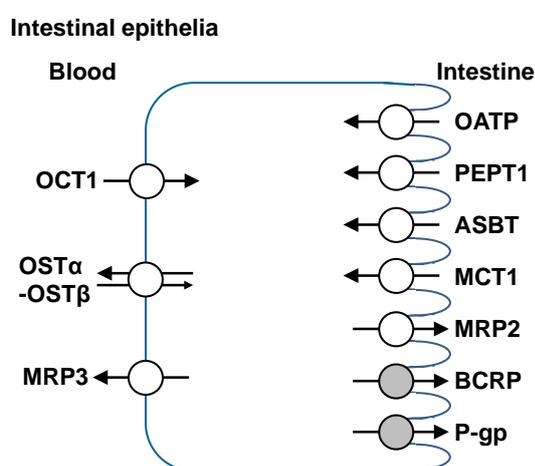


Fig I-1 Selected human transport proteins for drugs and endogenous substances in intestinal epithelia⁹⁾.

Those coloured in gray indicate that the transport proteins are of importance for drug absorption. Intestinal epithelia contain in their apical (luminal) membrane several uptake transporters including one or more members of the organic anion transporting polypeptide (OATP) family; peptide transporter 1(PEPT1); ileal apical sodium/bile acid co-transporter (ASBT); and monovalent carboxylic acid transporter 1 (MCT1). The apical ATP-dependent efflux pumps include multidrug resistance protein 2 (MRP2); breast cancer resistance protein (BCRP); and P-glycoprotein (P-gp). The basolateral membrane of intestinal epithelia contains organic cation transporter 1 (OCT1); heteromeric organic solute transporter (OSTα-OSTβ); and MRP3

いることから、DDI ドラフトガイダンス/ガイドラインに取り上げられたと考えられる。

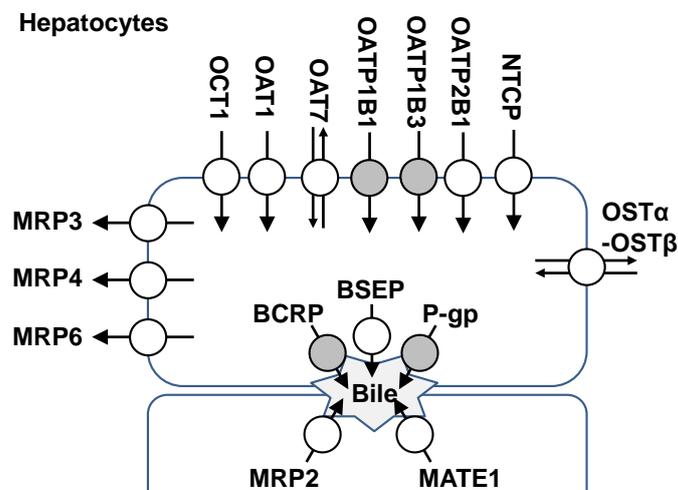


Fig. I-2 Selected human transport proteins for drugs and endogenous substances in hepatocyte⁹⁾.

Those coloured in gray indicate that the transport proteins are of importance for drug distribution and excretion. Human hepatocyte uptake transporters in the basolateral (sinusoidal) membrane include the sodium/taurocholate co-transporting peptide (NTCP); organic cation transporter 2 (OCT2); three members of the OATP family (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1); organic anion transporter 2 (OAT2) and OAT7; and OCT1. Efflux pumps in the hepatocyte basolateral membrane include MRP3, MRP4 and MRP6. Apical (canalicular) efflux pumps of the hepatocytes comprise P-gp; bile-salt export pump (BSEP); BSEP; and MRP2. In addition, multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1) is located in the apical hepatocyte membrane.

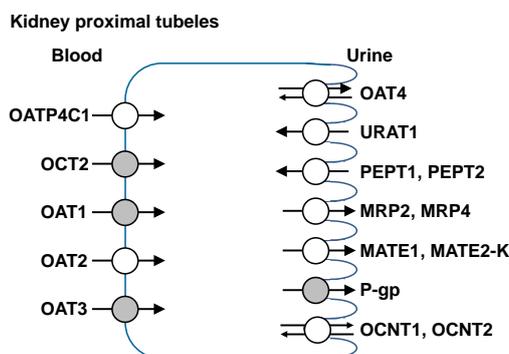


Fig I-3 Selected human transport proteins for drugs and endogenous substances in kidney proximal tubules⁹⁾.

Those coloured in gray indicate that the transport proteins are of importance for drug distribution and excretion. Kidney proximal tubules contain in the apical (luminal) membrane OAT4; urate transporter 1 (URAT1); PEPT1 and PEPT2; MRP2 and MRP4; MATE1 and MATE2-K; P-gp; organic cation/ergothioneine transporter (OCTN1); and organic cation/carnitine transporter (OCNT2). Basolateral uptake transporters in proximal tubule epithelia include OATP4C1; OCT2; and OAT1, OAT2 and OAT3.

抗不整脈薬 quinidine が強心薬 digoxin の血漿中濃度を上昇させる例のように P-gp を介した DDI は以前から知られていたが^{10, 11)}、トランスポーターを介した DDI の重要性が広く認知されるきっかけとなったのは cerivastatin の DDI による毒性発症である¹²⁾。Cerivastatin は 1999 年に米国で上市されたが横紋筋融解症による死亡例が多数報告されたため、市場からの撤退を余儀なくされた高脂血症治療薬 (HMG-CoA 還元酵素阻害剤) である¹³⁾。Gemfibrozil との併用により cerivastatin の血漿中濃度が上昇し、単剤投与と比較して高頻度で横紋筋融解症が発症した¹⁴⁻¹⁷⁾。さらに、cyclosporin A が cerivastatin の血中濃度を上昇させることも報告されていた¹²⁾。Cerivastatin 血中濃度上昇機構は cyclosporin A による cerivastatin の OATP1B1 を介した肝取り込み阻害が原因であることが示唆された¹⁸⁾。Gemfibrozil との DDI についても、主な原因は gemfibrozil およびそのグルクロン酸抱合体による CYP2C8 阻害と考えられているが、OATP1B1 阻害も一部寄与することが示唆されている^{19, 20)}。また、cyclosporin A と他の OATP 基質 (HMG-CoA 還元酵素阻害剤、bosentan、repaglinide) との臨床 DDI 試験が多数報告されている。HMG-CoA 還元酵素阻害剤である atorvastatin、fluvastatin、lovastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin、simvastatin は cyclosporin A との併用により AUC が 2.6 倍から 15 倍に上昇する²¹⁻³⁰⁾。また、cyclosporin A との併用により bosentan の AUC は 2 倍に上昇し³¹⁾、repaglinide の AUC は 2.4 倍に上昇するとの報告もある³²⁾。OAT や OCT など他のトランスポーターを介した DDI による基質の AUC の上昇は 2 倍以下³³⁻⁴²⁾であることから薬物トランスポーターの中でも特に OATP を介した DDI を医薬品開発の過程で適切に評価することが重要である。

OATP は小腸、肝臓、腎臓、脳などの細胞膜に発現し、内因性化合物や薬物の細胞内への取り込みを担う薬物トランスポーターである^{43, 44)}。最初の OATP 分子の同定は 1994 年に得られたラット肝臓からの Oatp1a1 であり⁴⁵⁾の、その後ヒトの OATP 分子種として OATP-A (OATP1A2)⁴⁶⁾、LST-1 (OATP-C/OATP1B1)⁴⁷⁾やプロスタグランジンの輸送に関与するプロスタグランジン トランスポーター(PGT/OATP2A1)が同定されるなど相次いで⁴⁸⁻⁵⁰⁾。Tamai らは、OATP に種差のあることから、ラットとヒトの分類を分けるため

にヒト OATP をアルファベットで分類することを提案するとともに、OATP-B (OATP2B1)、OATP-D (OATP3A1)、OATP-E (OATP4A1) の分子同定を報告した⁵¹⁾。その後多くの OATP 分子種が見出されたこともあり、国際命名委員会により整理され、現在ではヒトについては OATP1A2 (OATP-A)、1B1 (OATP-C)、1B3、1C1、2A1 (PGT)、2B1 (OATP-B)、3A1 (OATP-D)、4A1 (OATP-E)、4C1、5A1、6A1 の 11 分子種が報告されている⁵²⁻⁵⁴⁾。中でも特に OATP1B1 と 1B3 は DDI や遺伝子多型によって、その基質となる薬物の体内動態が大きく変化する例が報告された⁵⁴⁻⁵⁷⁾ことで、薬物動態・薬効・毒性の決定因子として注目されるに至っている。

OATP1B1 と OATP1B3 はともに肝臓の血管側膜に発現する 12 回膜貫通型の取り込みトランスポーターであり、内因性化合物や薬物の肝取り込みに寄与している^{53, 54)}。基質選択性は広く、前述の HMG-CoA 還元酵素阻害剤に加えて、グリニド系の糖尿病治療薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬などの医薬品がある。また、内因性化合物ではステロイドホルモン代謝物、ビリルビン、胆汁酸塩、甲状腺ホルモン、プロスタグランジンなど多様な化合物が *in vitro* 試験の結果、基質になることが明らかにされている^{45, 51, 55, 58-62)}。

OATP を介した DDI の検討について、アフリカツメガエル卵母細胞や HEK293 細胞を用いた OATP 発現系など *in vitro* の試験系が報告されている^{58, 59)}。また単離した肝細胞を用いた試験系や OATP と MRP2 もしくは BCRP のような排泄型トランスポーターを MDCK-II 細胞のような極性細胞に共発現させたダブルトランスフェクタントを用いた試験系も報告されている^{63, 64)}。これら試験系は薬物の体内動態の理解や DDI のメカニズム解明に大いに役に立つものの、定量的な DDI の予測精度は高くない⁶⁵⁾。その理由として、用いる *in vitro* 試験系により得られる阻害作用が異なること、被相互作用薬の消失経路に対する OATP の寄与率、あるいは阻害剤の血漿中濃度時間変化による OATP 阻害率の変動などの要因が考えられる。DDI ガイダンス/ガイドラインでも臨床における DDI 試験実施のクライテリアが示されるだけに留まっており、定量的な DDI 予測は今後の課題として挙げられて

いる^{6,8)}。定量的な DDI 予測には *in vitro* から *in vivo* をつなぐ手段が必要であり、ヒトでの DDI を予測可能な *in vivo* モデルが必要と考えられる。

医薬品開発早期における DDI の予測は開発候補化合物の成功確度や臨床試験計画の立案、市場からの撤退リスクの評価に重要な要素である。特に複数の化合物の中から開発候補化合物を選択する探索的創薬研究段階においては、化合物選択の観点から定量的な DDI 予測が必要であり、臨床試験（Phase I 試験）に入ってからでは、早期にヒトにおける DDI のリスク評価が必要である。

以上のような背景から、本研究では OATP1B1/1B3 を介した DDI 予測のための評価系としてカニクイザルに着目し、本モデルの有用性および OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーについて検討した。第二章ではヒトとカニクイザルの OATP 基質の肝取り込みの種差およびカニクイザルを用いた *in vivo* DDI 試験により、カニクイザルの OATP1B1/1B3 を介したヒトでの DDI 予測のモデル動物としての有用性について評価した。第三章では初期の臨床試験で OATP1B1/1B3 を介した DDI のリスク評価を実施することを目的に DDI バイオマーカーとして内因性化合物である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) の有用性について評価した。まずはヒトとカニクイザルの肝細胞を用いて DHEAS の肝取り込みの種差について検討し、次いでカニクイザルの DHEAS の血漿中濃度に与える RIF (OATP 阻害剤) の影響を検討した。本研究によりカニクイザルが OATP1B1/1B3 を介したヒトでの DDI 予測のためのモデル動物として有用であり、また DHEAS が OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーとなる可能性を示す知見を得たので以下に詳述する。

第二章 OATP を介した DDI 予測におけるカニクイザルの有用性に関する検討

第1節 諸言

従来、薬物動態研究は吸収、分布、代謝、排泄を総合的に評価するために動物を用いた *in vivo* 試験、およびヒトや動物の臓器から抽出した画分（臓器スライス、細胞、ミクロソーム、S9 等）を用いた *in vitro* 試験によって実施されている。その中でも医薬品の承認申請に必要な DDI 試験の多くは、ヒト肝ミクロソーム (CYP 阻害試験および酵素同定試験)、ヒト代謝酵素発現系タンパク（酵素同定試験）、肝細胞（酵素誘導試験）、およびヒトトランスporter発現細胞（トランスporter基質評価および阻害評価）などを用いた *in vitro* 試験であり、動物を用いた *in vivo* の DDI 試験を規制当局から求められることは少ない。その理由として、ヒトと動物間でみられる薬物動態の種差が挙げられる⁶⁶⁾。例えば多くの医薬品の代謝に関与するチトクロム P450 (CYP) の各分子種の発現量をヒトとラットで比較した場合、ヒト肝臓では CYP3A4 や CYP2C9 の発現量が高いのに対し、雄ラットでは CYP2C11、雌ラットでは CYP2C12 が高く、種差と同時にラットでは雌雄差もある^{66 67)}。また肝細胞を用いた酵素誘導に関する研究において rifampicin (RIF) はヒト CYP3A を強く誘導するが、イヌでは誘導作用を示すものの弱く、ラットでは誘導作用を示さない⁶⁸⁾。一方、dexamethasone はラットでは強く CYP3A を誘導するが、ヒトでは誘導作用が弱い⁶⁸⁾。医薬品の組織分布や排泄に関与する薬物トランスporter群のひとつである OATP に関してもヒトとラット間で相同性が高くなく、肝取り込みに働く OATP 分子種の寄与に種差が報告されている⁶⁹⁾。したがって、DDI ガイドライン/ガイダンスにおいても非臨床における DDI 研究はヒト試料を用いた *in vitro* の試験が提示されている⁶⁻⁸⁾。

本博士論文研究開始後、ヒトおよび動物の試料を用いた *in vitro* 試験と動物を用いた *in vivo* 試験を組み合わせた手法によりヒトでの体内動態を予測する方法論が報告された。Nishimuta らはヒトおよびカニクイザルの小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験およびカニクイザルを用いた *in vivo* 試験から経口投与された薬物の吸収と代謝が同時に起こる小腸での複雑な薬物動態のヒト予測を可能にした⁷⁰⁾。また Ogasawara らはマクロライド

系抗菌剤の CYP3A に対する mechanism-based inhibition（不可逆的酵素阻害）についてカニクイザルを用いて評価可能であることを示し、DDI 評価におけるカニクイザルの有用性を示した⁷¹⁾。トランスポーターを介した DDI に関しても OAT3 を介した腎尿細管分泌での DDI 予測に probenecid を基質としたカニクイザルが適していることが Tahara らによって示された⁷²⁾。しかし、本研究開始時点では OATP を介した DDI の動物モデルはげっ歯類を用いた研究に留まっており、ヒトでの DDI を予測しうる *in vivo* の動物モデルの研究が期待されていた。

以上のような背景から、本章では OATP1B1/1B3 を介した DDI 予測のための評価系としてカニクイザルの有用性について検討した。カニクイザルとヒトの間で OATP1B1 および OATP1B3 の遺伝子配列並びにアミノ酸の配列相同性が高いことが報告されている^{73, 74)}。したがって、カニクイザルは OATP1B1/1B3 を介した DDI 研究のモデル動物として適しているのではないかと考えた。しかしながら、肝に発現する OATP1B1 および OATP1B3 の基質認識性や発現量などヒトとカニクイザルの種差については十分に研究されていない。したがって第二章ではまず、ヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いて OATP 基質の取り込みを評価し、ヒトとカニクイザルの肝取り込みの種差について明らかにした。次にモデル基質として rosuvastatin を選択し、肝取り込みの種差について検討した。Rosuvastatin は OATP の基質⁵⁴⁾と報告されている HMG-CoA 還元酵素阻害剤である。HMG-CoA 還元酵素阻害剤はいずれも OATP の基質になる⁵⁴⁾ことが知られているが、atorvastatin や simvastatin は脂溶性が高く、*in vivo* では OATP を介して肝に取り込まれた後、薬物代謝酵素により代謝を受けて排泄される⁷⁵⁾。一方、rosuvastatin は OATP を介して肝に取り込まれた後、代謝を受けずに未変化体のまま排泄されるため^{76, 77)}、DDI 研究において酵素阻害の影響を考慮せずにトランスポーターの影響を評価可能な基質と考えられる。また、rosuvastatin の肝取り込みに与える OATP 阻害剤や代表的な OATP 阻害剤である rifampicin (RIF) の阻害の影響の種差を *in vitro* で評価した。*In vivo* 試験では OATP 基

質として rosuvastatin と OATP 阻害剤として RIF をモデル化合物として用い、カニクイザルにおける RIF の単回経口投与が rosuvastatin の体内動態に与える影響を評価した。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 材料および試薬

Atorvastatin calcium trihydrate と midazolam は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から購入した。Rifampicin (RIF)は Sigma Aldrich (St. Louis, MO)から、pitavastatin calcium, rosuvastatin calcium および fluvastatin sodium は LKT Laboratories (St. Paul, MN) から、pravastatin sodium は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)から入手した。 ^3H Estradiol 17 β -D-glucuronide (^3H E2-17 β GA, 34.3 Ci/mmol)、及び ^3H estrone sulfate, ammonium salt (^3H ES, 45.6 Ci/mmol) は PerkinElmer (Boston, MA)から入手した。 ^3H Rosuvastatin calcium (^3H rosuvastatin, 10 Ci/mmol)、 ^3H atorvastatin calcium (^3H atorvastatin, 10 Ci/mmol)、 ^3H pitavastatin calcium (^3H pitavastatin, 5 Ci/mmol)、 ^3H pravastatin sodium salt (^3H pravastatin, 5 Ci/mmol)は American Radiolabeled Chemicals, Inc (St. Louis, MO)から購入した。ヒト肝細胞 (pool of 20, mix gender)および雄カニクイザル肝細胞 (pool of 3)は Xenotech, LLC (Lenexa, KS, USA)から購入した。その他の試薬は市販の特級品または生化学用を使用した。

第2項 動物

動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「ハムリー株式会社試験研究所の実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守し、ハムリー株式会社 (Ibaraki, Japan)及び大日本住友製薬株式会社(Osaka Japan)の動物実験審査委員会の承認のもと、ハムリーで実施した。雄カニクイザルは Guangxi Handsome Experimental Primates Farming Development Co., Ltd. (Guangxi, China)から購入した個体を使用した。カニクイザルは温度と湿度が管理 ($24 \pm 3^\circ\text{C}$ and $50 \pm 20\%$)された部屋で一日当たりの照明 12 時間の人工照明下で飼育した。餌は市販のサル用飼料 (PS-A type; Oriental Yeast Co., Ltd.)を与えた。

第3項 OATP 基質の肝細胞取り込みの種差比較

購入したヒトおよびカニクイザル肝細胞は Hepatocyte Isolation Kit (Xenotech, LLC) を用いて、添付のプロトコールに従って融解し、生細胞を単離した。Krebs-Henseleit buffer (118 mM NaCl、5 mM KCl、1.1 mM MgSO₄、2.5 mM CaCl₂、1.2 mM KH₂PO₄、25 mM, NaHCO₃、10 mM glucose、10 mM HEPES, pH7.4, KHB)を用いて 2.0 × 10⁶ cells/mL に調製した細胞懸濁液を 37°Cの恒温槽で 5 分間プレインキュベーションし、等量の放射能標識された各基質溶液を添加することで肝細胞取り込みを開始した。基質は OATP の基質として報告されている [³H]atorvastatin (最終濃度 10 nM)、 [³H]pitavastatin (最終濃度 20 nM)、 [³H]pravastatin (最終濃度 20 nM)、 [³H]rosuvastatin (最終濃度 10 nM)、 [³H]E2-176G (最終濃度 2.9 nM)、 [³H]ES (最終濃度 2.2 nM) を使用した。

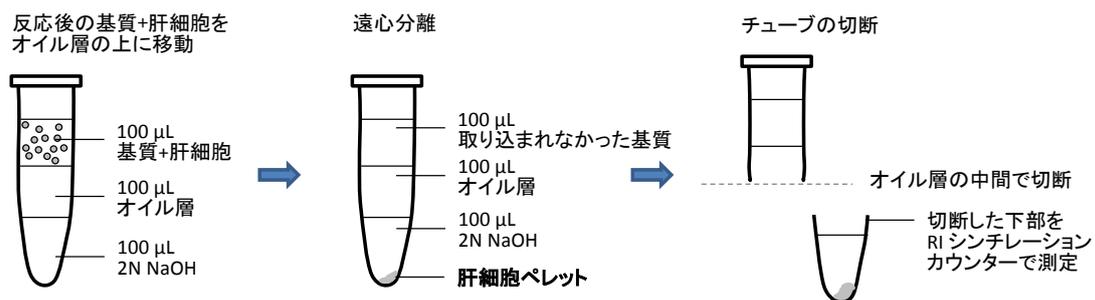


Fig. II-1 オイルレイヤー法の概要 (株式会社ベリタス社 凍結肝細胞を用いたトランスポーターアッセイ 使用方法より改変)

0.5 または 2 分インキュベーションした後、反応の停止はオイルレイヤー法で実施した⁷⁸⁻⁸¹⁾。つまり反応後の溶液 (100 µL) を 2 N NaOH に hepatocyte filtration oil を重層したマイクロチューブ(Hepatocyte Transporter Suspension Assay Kit, BD Biosciences [San Jose, CA]、Fig. II-1 参照)に移し、卓上遠心器で 30 秒遠心分離 (14000×g) することにより取り込みを停止した。反応液の一部は反応溶液中の放射能濃度を測定するために 100 µL の 2N NaOH の入った液体シンチレーションバイアルに移した。遠心分離後のマイクロチューブは NaOH 層に移行した細胞を溶解させるため、室温で一晩放置した。剃刀でオイル層を切断し、下層

の細胞が溶解した NaOH 層を液体シンチレーションバイアルに移した。バイアルに 100 μL 2N HCl を加えて中和した後、5 mL の液体シンチレーションカクテル ハイオニックフロー (Packard) を加えた。よく混合した後に放射活性を液体シンチレーションカウンター (Accu FLEX LSC 7400; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) で測定した。

肝細胞中の放射エネルギー (dpm/ 10^5 cells) を反応溶液中の放射能濃度 (dpm/mL) で除し、 10^6 cells 肝細胞当たりの取り込み量 ($\mu\text{L}/10^6$ cells) として算出した。 $[^3\text{H}]$ 標識体の細胞膜への吸着の影響を除くため、取り込み活性は 0.5 分と 2.0 分の取り込み量の傾きから取り込みクリアランス ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells) を算出し、過剰量 (300 μM) の非標識体存在下での取り込みクリアランスを別途求め、その差をトランスポーターを介した輸送として求めた。

第 4 項 Rosuvastatin の肝細胞取り込みの種差

基質に $[^3\text{H}]$ rosuvastatin (最終濃度 10 nM) を用いて第 3 項と同様にヒトおよびカニクイザルの肝細胞の取り込み試験を実施した。つまり、第 3 項に従って調製した 2.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液に基質溶液を添加し、0.5、1、2、5 分間インキュベーションした。オイルレイヤー法により反応を停止し、その後の処理は第 3 項に従って実施した。

第 5 項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する OATP 阻害剤の影響

各種阻害剤を含む $[^3\text{H}]$ rosuvastatin 溶液を調製し、第 3 項と同様にヒトおよびカニクイザルの肝細胞の取り込み試験を実施した。つまり、第 3 項にしたがって調製した 2.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液に各種阻害剤を含む $[^3\text{H}]$ rosuvastatin 溶液 (最終濃度 10 nM) を添加し、0.5 または 2 分間インキュベーションした。オイルレイヤー法により反応を停止し、その後の処理は第 3 項にしたがって実施した。阻害効果はコントロールに対する取り込み活性 (% of control) を 100% にして相対評価した。

第 6 項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する RIF の影響

各濃度の RIF を含む^[3H] rosuvastatin 溶液を調製し、第 3 項と同様にヒトおよびカニクイザルの肝細胞の取り込み試験を実施した。つまり、第 3 項にしたがって調製した 2.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液に RIF を含む^[3H]rosuvastatin 溶液（最終濃度 10 nM）を添加し、0.5 または 2 分間インキュベーションした。オイルレイヤー法により反応を停止し、その後の処理は第 3 項にしたがって実施した。

第 7 項 カニクイザルを用いた DDI 試験

OATP1B1/1B3 を介した *in vivo* における DDI を検討するため、カニクイザルを用いて、rosuvastatin の体内動態に RIF が与える影響を評価した。本評価では同じ 4 頭のオスのカニクイザルを用いた。各投与は 13 日間の休薬期間を置いて実施した。第 1 期では 5 mg/kg の rosuvastatin calcium（以下、rosuvastatin）を単回経口投与した。第 2 期では 5 mg/kg の rosuvastatin の単回経口投与の 5 分前に、10 mg/kg の RIF を単回経口投与した。投与後の所定時間に橈側皮静脈又は伏在静脈から採血し、 $2100 \times g$ 、 $4^\circ C$ で 15 分間遠心し、血漿を採取した。rosuvastatin の分解を止めるため、得られた血漿の一部に等量の 0.1% acetic acid を加えた。血漿および 0.1% acetic acid を加えた血漿は分析まで $-20^\circ C$ で保存した。

第 8 項 カニクイザル血漿中 rosuvastatin および RIF 濃度測定

カニクイザル血漿中の rosuvastatin および RIF の濃度測定は除タンパクにより前処理し、LC-MS/MS にて測定した。Rosuvastatin の測定は 50 μL の 0.1% acetic acid を加えた血漿に 200 μL の fluvastatin のメタノール溶液（I.S.溶液：100 ng/mL）を、RIF の測定は 50 μL の血漿に 200 μL の rifapentine のメタノール溶液（I.S.溶液：100 ng/mL）を加えてよく混合した後、13000 rpm、 $4^\circ C$ で 5 分間遠心分離した。遠心後の上清 100 μL に 10 mM ギ酸アンモニウムを 100 μL 添加し、LC-MS/MS に注入した。LC-MS/MS は Agilent 1290 Infinity LC システム（Agilent technologies, Santa Clara, CA）および Triple QuadTM 5500 LC/MS/MS システム

(AB SCIEX, Framingham, MA)、または Agilent 1200 LC システム (Agilent technologies, Santa Clara, CA) および API3000 LC/MS/MS システム(AB SCIEX, Framingham, MA)を使用した。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 Colum (1.7 μ m 2.1 mm \times 30 mm, Waters, Milford, MA) を用い、40 $^{\circ}$ C で使用した。移動相には 10 mM ギ酸アンモニウム (A) 及び アセトニトリル (B) を用い、流速は 0.3 mL/min とし、グラジエント条件は rosuvastatin 測定時には gradient [min, B%] = [0, 10]-[3, 90]-[4, 90]-[4.1, 10]-[6,10]とし、RIF 測定時には、アイソクラティックで 10 mM ギ酸アンモニウム : アセトニトリル=65 : 35 とした。質量分析器はエレクトロスプレー法のポジティブイオンモードを使用し、各化合物の測定条件は、(m/z: precursor ion \rightarrow product ion): rosuvastatin (482.1 \rightarrow 258.1)、fluvastatin (412.2 \rightarrow 224.1)、RIF (823.5 \rightarrow 791.4)、rifapentine (878.1 \rightarrow 846.6) とした。

第3節 結果

第1項 OATP 基質の肝細胞取り込みの種差比較

OATP の基質として報告されている atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin、estradiol 17 β -D-glucuronide、および estrone sulfate のヒトおよびカニクイザル肝細胞への取り込みを評価した。OATP1B1 や OATP1B3 のようなトランスポーターを介する膜透過は、低温下で低下する。そこで OATP 基質のトランスポーターを介した肝取り込みおよび受動拡散による細胞内移行を評価するために 37°C および 4°C で実施した。いずれの OATP 基質においても 4°C より 37°C において高い取り込み活性を示したことから、ヒトおよびカニクイザル肝細胞へのトランスポーターを介した取り込みが示唆された (Fig. II-2)。本研究において用いた OATP 基質はヒトの OATP1B1 や OATP1B3 の基質であり、OATP1B1 や OATP1B3 などのトランスポーターを介して肝細胞に取り込まれることが知られている。カニクイザルにおいてもヒトと同様にそれらトランスポーターを介した肝取り込みが示唆された。トランスポーターを介した肝取り込みクリアランスはヒトとカニクイザル肝細胞との間で高い相関性 ($R^2=0.9888$) を示したことから、OATP 基質はカニクイザルにおいても OATP1B1 や OATP1B3 などヒトに類似した取り込み機構の存在が示唆された。 $[^3\text{H}]$ Pravastatin をのぞき、初期取り込みクリアランス値はカニクイザルの方が高かった (Table. II-1) ことから、カニクイザルの方がヒトよりも OATP1B1 や OATP1B3 などの発現量が高いもしくは OATP 基質に対して親和性が高いことが考えられた。

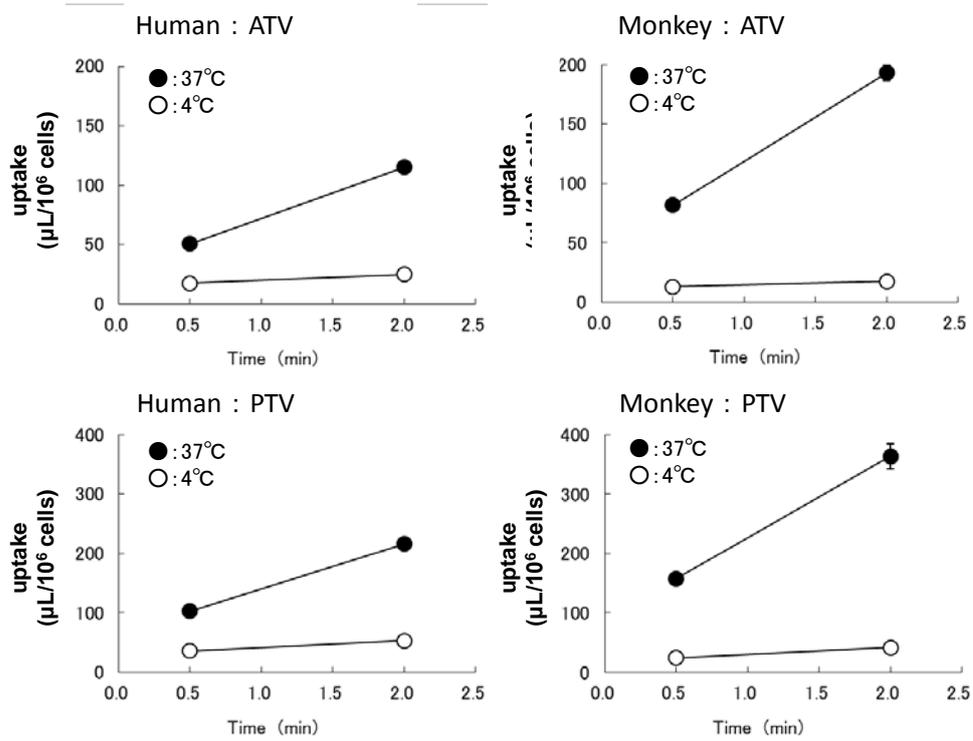


Fig. II-2 OATP substrates uptake by isolated hepatocytes from human (left) and monkey (right). The uptake was determined at 37°C (●) and 4°C (○). Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). ATV; atorvastatin, PTV; pitavastatin.

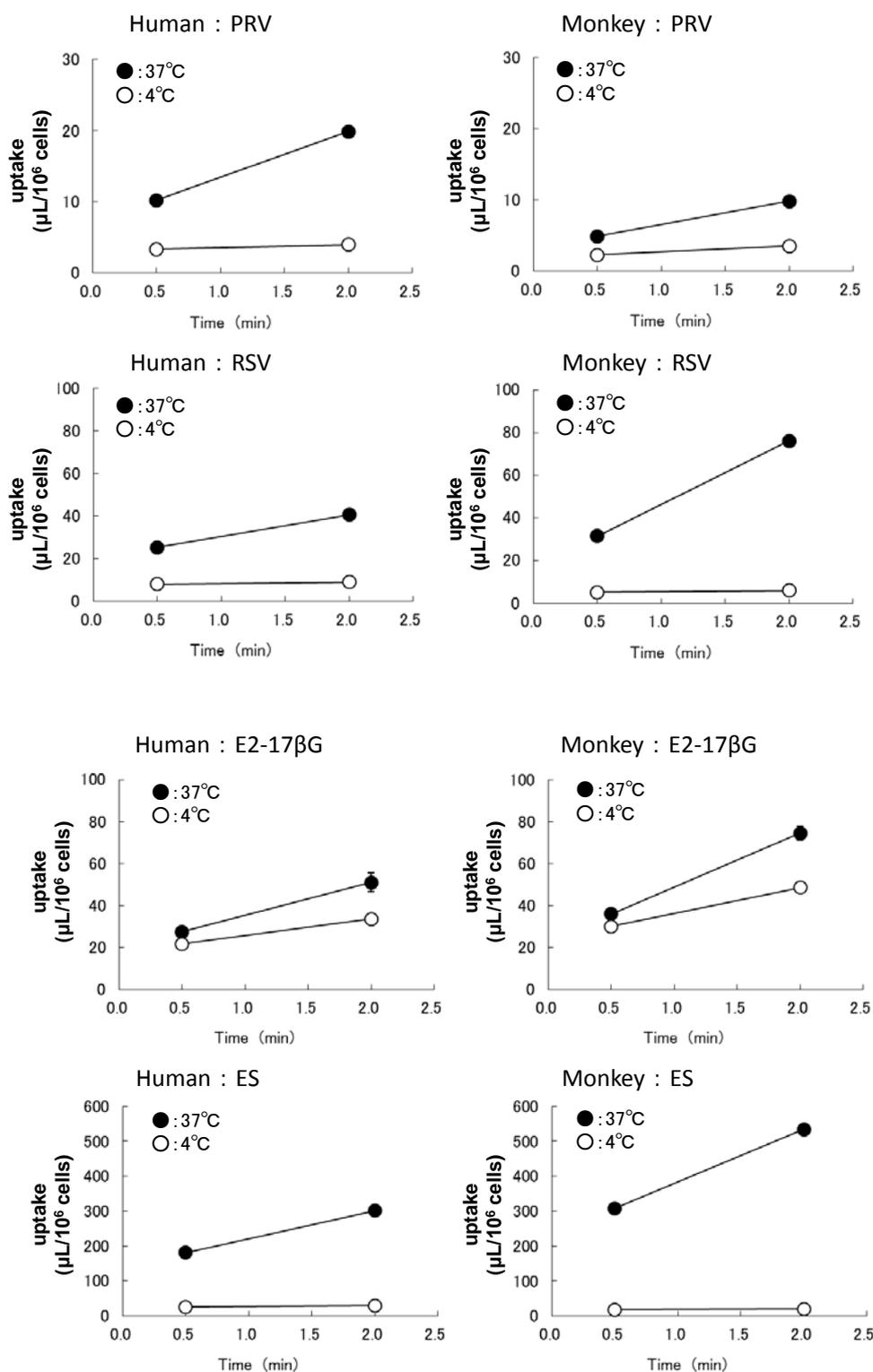


Fig. II-3 OATP substrates uptake by isolated hepatocytes from human (left) and monkey (right). The uptake was determined at 37°C (●) and 4°C (○). Each point represents the mean ± S.E. (n = 3). PRV; pravastatin, PTV; pitavastatin, E2-17βGA; estradiol 17β-D-glucuronide, ES; estrone sulfate

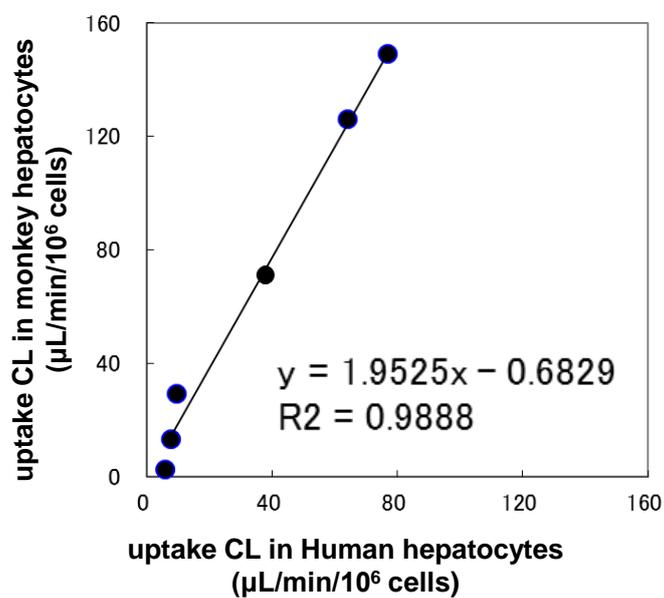


Fig. II-4 Comparison of uptake clearance in human with monkey hepatocytes

Table II-1

Comparison of uptake clearance in human with monkey hepatocytes

uptake CL (µ L/min/10 ⁶ cells)	
Human	Monkey
[³ H]ATV	71.2
[³ H]PTV	125.9
[³ H]PRV	2.4
[³ H]RSV	29.2
[³ H]E ₂ -17 β G	13.3
[³ H]ES	149.1

ATV; atorvastatin, PTV; pitavastatin, PRV; pravastatin, RSV; rosuvastatin, E2-17βGA; estradiol 17β-D-glucuronide, ES; estrone sulfate

第 2 項 Rosuvastatin の肝細胞取り込み

Rosuvastatin は OATP を介して肝に取り込まれた後、代謝を受けずに未変化体のまま排泄される。そのため DDI 研究において酵素阻害の影響を考慮せずにトランスポーターを介した DDI 評価が可能な基質と考えられ、rosuvastatin を OATP のモデル基質として選択し、今後の検討に用いた。ヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いて³H]rosuvastatin の取り込みを経時的に測定した。4°C のインキュベーションでは両細胞ともに 0.5 分と 5 分で³H] rosuvastatin の取り込み量はほとんど増加しなかったが、37°C でインキュベーションでは両細胞ともに 0.5 分、1 分、2 分、3 分、5 分と経時的に取り込み量が増加した (Fig. II-5)。この結果より rosuvastatin はカニクイザル肝細胞においてもヒトと同様にトランスポーターを介して取り込まれることが示唆された。両細胞ともに 3 分まで直線性があったため、初期取り込み活性評価に関する以降の検討はインキュベーション時間を 3 分とした。

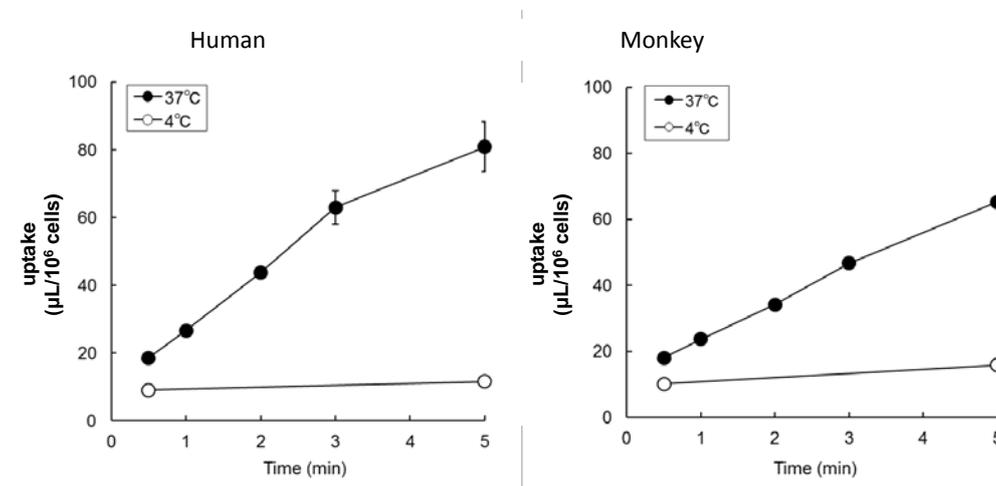


Fig. II-5 Time profiles of ³H]rosuvastatin by isolated hepatocytes from human (left) and monkey (right). The uptake was determined at 37°C (●) and 4°C (○). Each point represents the mean ± S.E. (n=3).

第3項 Rosuvastatin の肝取り込みに対する OATP 阻害剤の影響

Gemfibrozil、clarithromycin、eltrombopag、rifamycin、sulfobromophthalein はヒト OATP1B1 および OATP1B3 に対する阻害作用が報告されており、ヒト OATP1B1 に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 10 μM⁸²⁾、96 μM⁸³⁾、2.7 μM⁸⁴⁾、0.23 μM⁸⁵⁾ および 0.18 μM⁸⁶⁾ であり、gemfibrozil、clarithromycin、rifamycin、sulfobromophthalein のヒト OATP1B3 に対する IC₅₀ 値はそれぞれ >200 μM⁸⁷⁾、56 μM⁸⁸⁾、3 μM⁸⁹⁾ および 0.65 μM⁹⁰⁾ である。溶解度を勘案してヒト OATP1B1 または OATP1B3 に対する IC₅₀ 値より高い濃度を設定し、ヒトおよびカニクイザル肝細胞の³H]rosuvastatin の取り込みに対する各種 OATP 阻害剤の影響を評価した。

本研究により評価した OATP 阻害剤はいずれもヒト肝細胞において³H]rosuvastatin の取り込み阻害を示し、また、カニクイザル肝細胞においても³H]rosuvastatin の取り込み阻害を示した (Fig. II-6)。また、その影響はカニクイザル肝細胞においてヒト肝細胞よりも強い阻害が観測される傾向にあった。以上の結果より、カニクイザルにおいても rosuvastatin の肝取り込みに OATP が寄与する可能性が示唆され、また OATP に対する阻害作用の種差が示された。

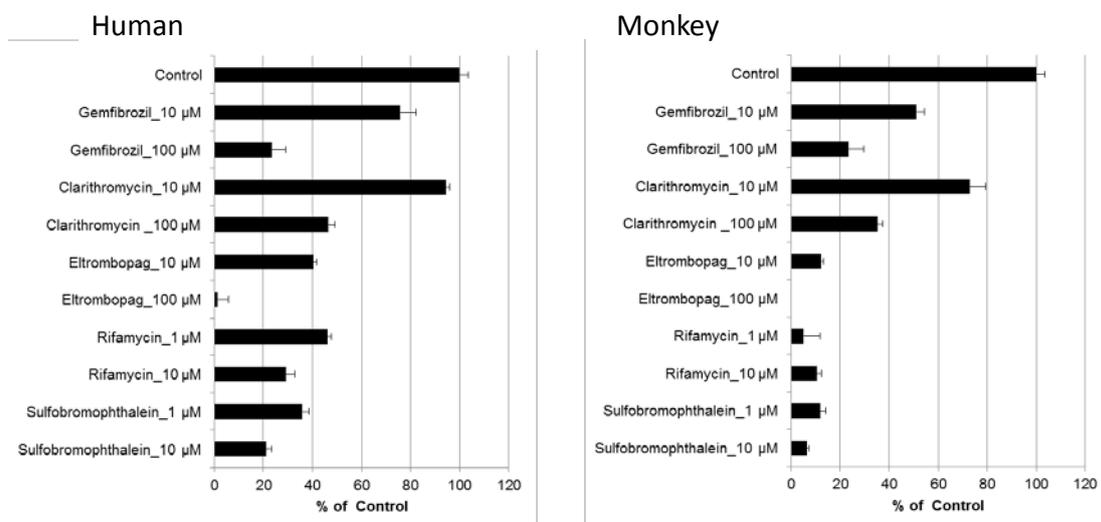


Fig. II-6 Inhibitory effects of OATP inhibitors on rosuvastatin uptake by isolated hepatocytes from human (left) and monkey (right). Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3).

第4項 Rosuvastatinの肝取り込みに対するRIFの影響

RIFはヒト OATP1B1/1B3 に対して強い阻害 ($IC_{50} = 0.94 - 11.9 \mu\text{M}$) を有することが多数報告されている⁹¹⁻⁹⁴。また臨床 DDI 試験においても RIF は併用により OATP1B1/1B3 の基質である atorvastatin、pitavastatin、pravastatin の AUC をそれぞれ 6.8-8.5 倍⁹⁵⁻⁹⁶、6.7 倍⁹⁷、2.3 倍⁹⁸に上昇させることが報告されており、*in vivo*においても OATP1B1/1B3 を強く阻害することが示唆されている。以降の検討では RIF を OATP1B1/1B3 のモデル阻害剤として用いた。

ヒトおよびカニクイザル肝細胞の³H]rosuvastatin の取り込みに対する RIF の影響を評価した結果、RIF はヒト肝細胞およびカニクイザル肝細胞の³H]rosuvastatin の取り込み活性に濃度依存的な阻害を示し、 IC_{50} 値はヒト肝細胞およびカニクイザル肝細胞でそれぞれ $2.85 \mu\text{M}$ および $0.229 \mu\text{M}$ であった。RIF はヒトの OATP1B1/1B3 と同様に、カニクイザルの OATP1B1/1B3 も阻害する可能性が示唆された (Fig. II-7)。

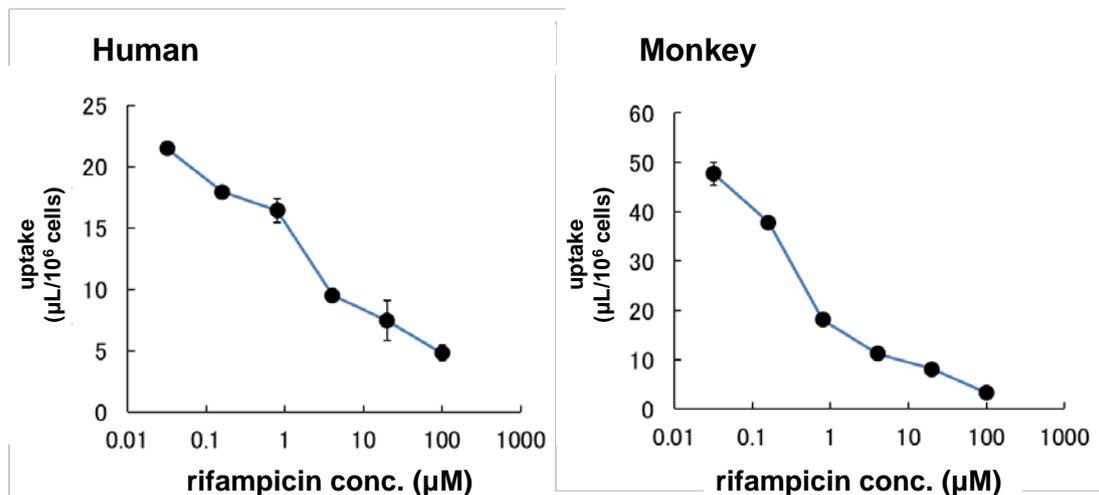


Fig. II-7 Inhibitory effects of RIF on ³H]rosuvastatin uptake by isolated hepatocytes from human (left) and monkey (right). Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

第5項 カニクイザルを用いた DDI 試験

これまでの *in vitro* の検討により、OATP 基質はカニクイザル肝細胞においてもヒト肝細胞と同様にトランスポーターを介して肝細胞に取り込まれること、rosuvastatin がカニクイザルにおいても OATP1B1/1B3 の基質であり、OATP1B1/1B3 を介した DDI 評価のモデル基質となりうることが示された。また、カニクイザルにおけるモデル阻害剤として RIF を使用することの妥当性が示された。カニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した DDI の評価モデル動物として利用可能かどうかを検討するために、カニクイザルにおける rosuvastatin の体内動態に与える RIF の影響をクロスオーバー試験により評価した。

まず、5 mg/kg の rosuvastatin を単独で雄のカニクイザル 4 匹に単回経口投与し、13 日間の休薬期間を経て、同じカニクイザル 4 頭に 5 mg/kg の rosuvastatin と 10 mg/kg の RIF を単回経口投与した。経時的に採血し、LC-MS/MS を用いて rosuvastatin の血漿中濃度を測定した。血漿中濃度推移を Fig. II-8 に、薬物動態パラメータを Table. II-2 に示す。Rosuvastatin 単独投与群 (Control) と 10 mg/kg の RIF を併用した群で C_{max} は約 6.6 倍上昇 ($p=0.053$) し、AUC は約 3.5 倍上昇 ($p<0.05$) した。RIF の濃度推移を Fig. II-9 に示す。臨床において 600 mg 一日一回投与後 15 日から 18 日の RIF の C_{max} は約 10 μM と報告されており⁹⁹⁾、今回の投与量でのカニクイザルにおける RIF の暴露はヒトと同程度と考えられた。また、RIF のヒト血清タンパク結合率は 60-90% と報告されている。カニクイザル血清タンパク結合率の報告はないものの、ヒトと同程度と仮定すると、少なくとも 0.5 時間から 8 時間までの RIF の遊離濃度は第 4 項で得られた IC_{50} 値を上回ることが示された。以上の結果より、RIF 併用による rosuvastatin の濃度上昇は RIF の OATP1B1/1B3 阻害によるものと考えられた。

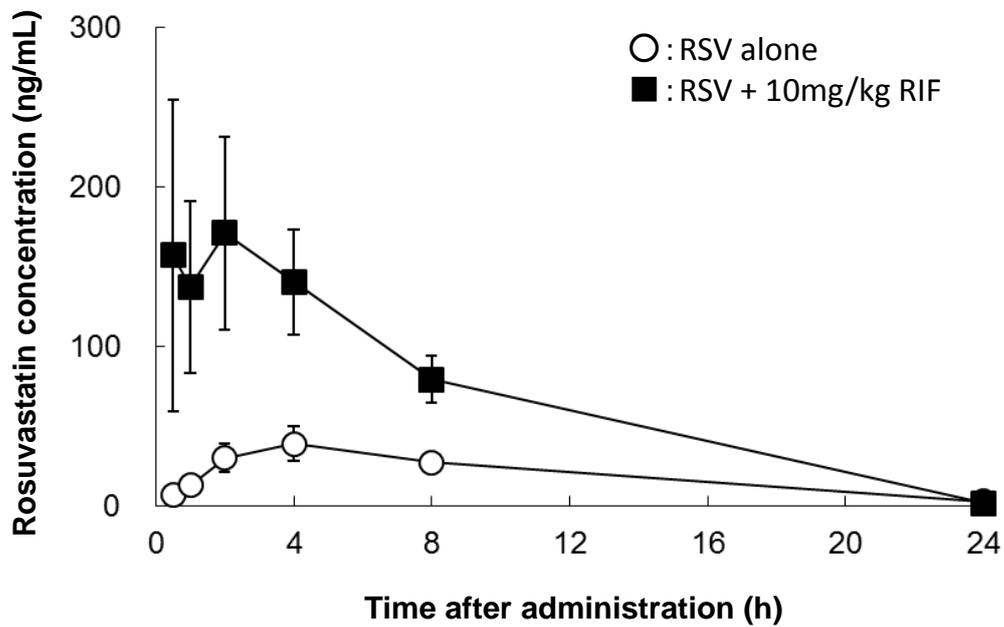


Fig.II-8 Effect of RIF on plasma concentration-time profiles of rosuvastatin after oral administration to male cynomolgus at dose of 5 mg/kg (○, control; ■, with 10 mg/kg RIF). Each point represents the mean \pm S.D. (n = 4). RSV; rosuvastatin, RIF; rifampicin.

Table II-2 Pharmacokinetic parameters of rosuvastatin after oral administration with or without RIF (10 mg/kg) in cynomolgus monkeys
Each value represents the mean \pm S.D. (n=4).

Rosuvastatin (5 mg/kg)		Control			+ 10 mg/kg RIF		
PK parameters		mean	\pm	S.D.	mean	\pm	S.D.
C_{max}	ng/mL	40.1	\pm	22.8	267	\pm	201
AUC_{0-24}	h*ng/mL	468	\pm	252	1660*	\pm	795 *
AUC_{inf}	h*ng/mL	489	\pm	255	1667*	\pm	797 *
t_{max}	hr	5.0	\pm	2.0	2.1	\pm	1.4
$t_{1/2}$	hr	5.3	\pm	1.0	3.1	\pm	0.2

*p < 0.05, compared to the control values obtained without RIF administration

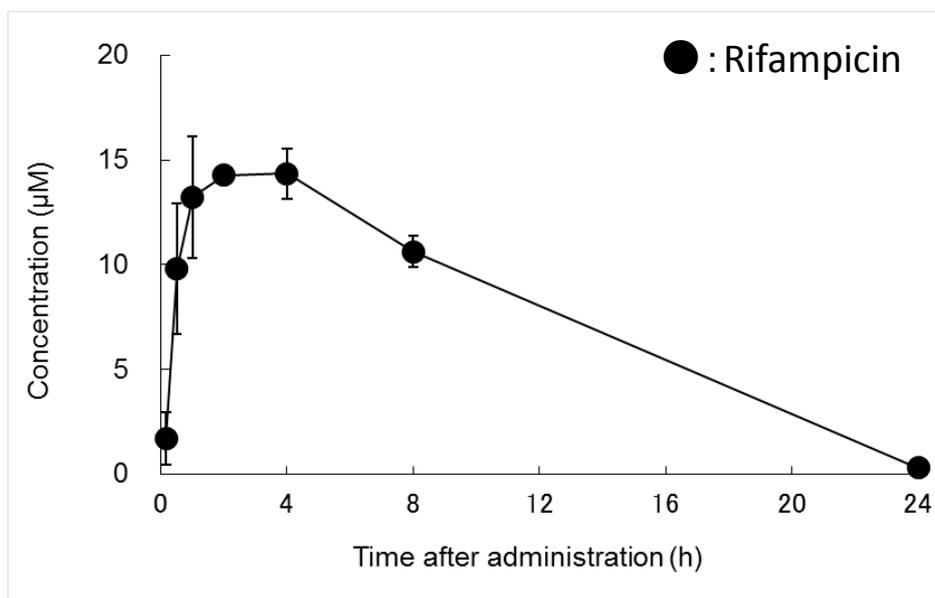


Fig.II-9 Plasma concentration-time profiles of RIF after oral administration to male cynomolgus at dose of 10 mg/kg. Each point represents the mean \pm S.D. (n=4).

第4節 考察

近年のトランスポーター研究の進展および日米欧三極の規制当局の DDI ガイダンス/ガイドラインの改訂に相まって、医薬品開発におけるトランスポーターを介した DDI の重要性が周知されるようになってきた。その中でも OATP1B1/1B3 を介した DDI は被相互作用薬の AUC を大幅に上昇させるケースがあること、並びに重篤な副作用引き起こす可能性があることから重要である。現在、米国の DDI ドラフトガイダンスでは DDI を考慮する基準として *in vitro* 阻害試験で得られた IC₅₀ 値が臨床での C_{max} よりも 10 倍以下、つまり C_{max} / IC₅₀ > 0.1 が定められている。欧州では肝流入遊離体最大濃度 ([I]_{u,inlet,max}) / IC₅₀ > 0.04、日本では [I]_{u,inlet,max} / IC₅₀ > 0.25 と基準に違いがあるものの、これは臨床 DDI 試験の実施の可否を判断する基準であり、実際の DDI の程度を予測するためのものではない。したがって *in vitro* からの DDI 予測は被相互作用薬の吸収、分布、代謝、排泄過程を十分に勘案した上で、阻害剤の阻害能や *in vivo* での濃度推移、時には組織中濃度から、被相互作用薬への影響を考える必要があり、DDI 予測の精度には限界がある。このような背景から臨床での DDI を予測できる *in vivo* の DDI 評価系が望まれていた。本研究では OATP1B1/1B3 を介した DDI 予測のモデル動物としてカニクイザルを用いることができるかどうかを評価するため、肝細胞を用いた *in vitro* 試験およびカニクイザルを用いた *in vivo* 試験を実施した。

ヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いた *in vitro* 試験では各種 OATP 基質のトランスポーターを介した肝細胞取り込みがヒトおよびカニクイザルともに認められた。またその取り込み活性にはヒトとカニクイザルの間で高い相関性 (R²=0.9888) が認められ、カニクイザルの肝細胞においてもヒト肝細胞と同様に、おそらく OATP1B1/1B3 により OATP 基質薬物が肝へ取り込まれることが示唆された。

次に OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル基質として rosuvastatin、モデル阻害剤として RIF の妥当性を *in vitro* 試験により評価した。Rosuvastatin は OATP を介して肝に取り込まれた後、代謝を受けずに未変化体のまま排泄される。そのため DDI 研究において酵

素阻害の影響を考慮せずにトランスポーターを介した DDI 評価が可能な基質と考えられ、OATP のモデル基質として選択した。RIF は多くの論文で OATP1B1/1B3 を強く阻害することが報告され、臨床においてもスタチンとの DDI が報告されている OATP 阻害剤である。まず rosuvastatin を用いて *in vitro* 取り込み試験および *in vitro* 取り込み阻害試験を実施した。その結果 rosuvastatin はヒトおよびカニクイザル肝細胞への時間依存的、温度依存的な取り込み活性を示したことから、その取り込みにはトランスポーターの関与が示唆された。また、その取り込みは各種 OATP1B1/1B3 の阻害剤で阻害された。ヒトにおける rosuvastatin の肝取り込みには OATP1B1/1B3 が関与することが報告されている^{100, 101)}。これらの結果より、rosuvastatin のカニクイザルにおける肝取り込みにはヒト同様に OATP1B1/1B3 が関与すると考えられた。さらに OATP1B1/1B3 阻害剤である RIF は、ヒト肝細胞と同様にカニクイザル肝細胞においても濃度依存的な rosuvastatin の肝取り込み阻害を示した。以上の結果より、カニクイザルにおいて OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル基質として rosuvastatin が、モデル阻害剤として RIF を使用することの妥当性が *in vitro* 試験から確認された。

カニクイザルとヒトの間で OATP1B1 および OATP1B3 の遺伝子配列並びにアミノ酸の配列相同性が高いとの報告がある^{73, 74)}。前述の *in vitro* の結果と併せて、カニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物として有用であることが考えられ、rosuvastatin (モデル基質) と RIF (モデル阻害剤) との併用による DDI を検討した。カニクイザルにおける DDI 試験は 5 mg/kg の rosuvastatin の単回経口投与時に 10 mg/kg の RIF を単回経口投与で併用した。併用投与時の RIF の血漿中濃度は *in vitro* で得られた IC₅₀ 値を上回り、十分に OATP1B1/1B3 を阻害する暴露が確認された。RIF 併用により血漿中 rosuvastatin 濃度が上昇し、ヒトと同様にカニクイザルにおいても rosuvastatin と RIF の DDI が認められた。

Rosuvastatin の大部分は肝臓に取り込まれた後に未変化体のまま主に胆汁中に排泄され、肝臓での代謝の寄与は大きくない^{76, 77)}。Rosuvastatin の肝取り込みに関与するトラン

スポーターとして、OATP1B1/1B3 以外に OATP2B1 や sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)が報告されている¹⁰¹⁻¹⁰⁴。OATP2B1 に関してはその発現量は OATP1B1 や OATP1B3 と比較して低いことがヒトおよびカニクイザルで報告されているため、その寄与は低いと考えられる^{100, 101}。一方、ヒト肝細胞において NTCP は rosuvastatin の肝取り込みに約 35%の寄与があると報告されている¹⁰²。カニクイザル肝細胞における rosuvastatin 取り込みに対する NTCP の寄与は不明であるが、RIF のヒト NTCP に対する IC₅₀ 値は 277 μM であり¹⁰⁶、*in vivo* DDI 試験で得られた C_{max} (14 μM) と比較すると、本試験では RIF は NTCP を阻害していないと考えられる。カニクイザルにおける rosuvastatin の体内動態については、吸収過程におけるトランスポーターの寄与や消失経路に占める腎排泄の割合等、不明な点が残されており、DDI のメカニズムについてさらに追加検討する必要があるが、RIF による rosuvastatin の血漿中濃度の上昇は代謝阻害や NCTP 阻害ではなく、rosuvastatin の肝取り込みに関与する OATP1B1/1B3 の阻害がそのメカニズムであることが示唆された。

以上の結果より、カニクイザルは OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物として有用であることが示唆された。本学位論文研究の実施中において、Shen らはモデル基質に rosuvastatin を、モデル阻害剤に RIF をそれぞれ用いて、カニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した *in vivo* DDI の評価モデル動物として有用であることを報告した¹⁰⁷。また、Takahashi らはカニクイザルを用いた OATP 阻害による DDI 評価に pitavastatin が有用であることが報告された¹⁰⁸。これらの報告は本研究で示した結果を支持するものであり、OATP1B1/1B3 の基質になる、もしくは阻害する開発候補化合物の *in vivo* トランスポーター評価ツールとしてカニクイザルが創薬初期の段階で応用できることを強く示唆された。

本検討のように、医薬品開発の探索段階もしくは前臨床段階で OATP1B1/1B3 を介した DDI が疑われるような化合物に対しては、カニクイザルを用いた *in vivo* DDI 試験を実施することにより、化合物の優先順位づけや早期に DDI リスクの判断が可能になるものと期待される。今後、カニクイザルを用いて開発候補化合物等の OATP を介した DDI を評価

するためには、本試験の RIF で実施したように、ヒトとカニクイザル肝細胞の OATP 基質取り込みに対する阻害の種差を把握し、また OATP 基質のヒトとカニクイザルの体内動態の種差を考慮した上で実施することが重要であると考えられる。

第三章 OATP を介した DDI 予測における DHEAS のバイオマーカーとしての有用性に関する検討

第1節 諸言

臨床における DDI は被相互作用薬と相互作用薬を併用することにより評価することが一般的である。しかしながら、臨床で追加の DDI 試験を実施することなく、臨床 Phase I 試験の中で DDI を評価できれば、早期に DDI リスクについて判断することができ、臨床試験計画の立案ならびに安全な臨床試験の推進に極めて有用である。

臨床 Phase I 試験の中で DDI を判断する手法のひとつとして、DDI のバイオマーカーとなる内因性化合物を用いた評価が挙げられる。従来、尿中の 6 β -hydroxycortisol が CYP3A 誘導の有用な指標であることが知られていたが¹⁰⁹⁻¹¹¹、最近になり、creatinine、thiamine、N-methylnicotinamide、6 β -hydroxycortisol などの内因性化合物が OCT2 や MATE などの腎トランスポーターを作用点とする DDI のバイオマーカーとなることが報告された¹¹²⁻¹¹⁵。しかしながら、DDI を捉える上で重要な P-gp や BCRP、OATP1B1/1B3 についてはその相互作用を代替できるバイオマーカーは見出されていないのが現状である。OATP1B1/1B3 の基質となる内因性化合物として、抱合型および非抱合型の bilirubin、cholic acid や Taurocholic Acid などの胆汁酸類、estradiol-17 β -glucuronide や estrone-3-sulfate や dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) などのステロイド抱合体、leukotrienes C4、E4、prostaglandin E2、thromboxane B2 などのエイコサノイド、thyroxine や triiodothyronine などの甲状腺ホルモンがある^{45, 51, 55, 58-62}。抱合型および非抱合型の bilirubin は肝疾患および胆道系疾患に対する検査で測定されているが、bilirubin の生成増加、抱合の低下や胆汁排泄の減少など複雑な要因により濃度の変動するため、OATP1B1/1B3 の機能を反映するバイオマーカーとしては不適と考えられた。胆汁酸類については OATP1B1/1B3 の基質であるものの、肝への取り込みは主に NTCP が寄与していることが報告されている¹¹⁶ため不適と考えられた。prostaglandin E2 等も複数の臓器に広く発現が認められている prostaglandin transporter (OATP2A1) への親和性が高く¹¹⁷、甲

状腺ホルモンも monocarboxylate transporter (MCT) や脳や精巣に発現する OATP1C1 への親和性が高く¹¹⁸⁾、不適と考えられた。ステロイドホルモンの抱合代謝物である estradiol-17 β -glucuronide や estrone-3-sulfate は *in vitro* のトランスポーター研究において OATP1B1/1B3 のプローブ基質として用いられており⁹²⁾、OATP に対する親和性は良好であり、有望な候補である。しかしながら、血漿中のそれらの濃度は非常に低濃度であり、測定が困難である。そこで我々は OATP1B1/1B3 のバイオマーカー候補として血漿中に比較的多く存在している DHEAS に着目した。

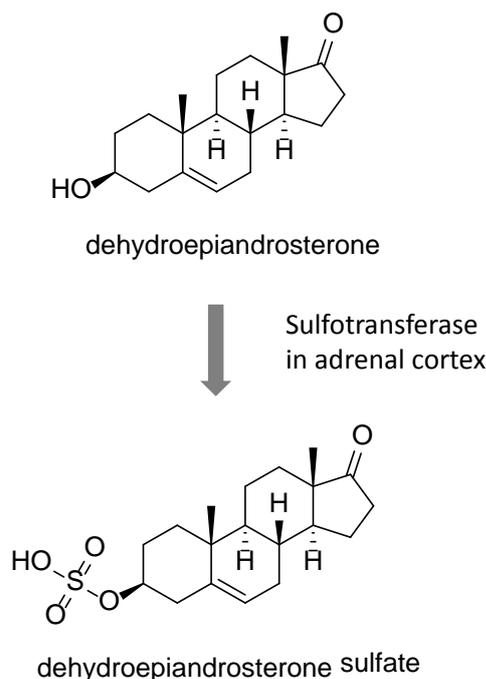


Fig. III-1 DHEAS の生成

DHEAS はステロイドホルモンの一種である dehydroepiandrosterone の硫酸抱合体であり、主に副腎皮質で生成し、血液中に比較的高濃度（男性：1450 ng/mL、女性：851 ng/mL）存在することが知られている¹¹⁹⁻¹²²⁾。DHEAS は末梢組織において sulfatase により脱硫酸化され前駆体である dehydroepiandrosterone に再変換されるため、DHEAS と dehydroepiandrosterone の間で平衡状態にある。血液中での dehydroepiandrosterone 存在比率は DHEAS の 1%程度であり、sulfatase による脱硫酸化は DHEAS の血中濃度にあまり影響を与えないと考えられた。DHEAS はヒトにおいて OATP1B1 および OATP1B3 をはじめ複数の OATP 分子の基質になることが報告されている^{46, 123-125)}。しかし、同時に胆汁酸トランスポーターである NTCP の基質にもなり、その寄与は不明である。したがって DHEAS の肝取り込みにおいて OATP1B1/1B3 の寄与が大きければ、OATP1B1/1B3 のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

第三章の目的は DHEAS が OATP1B1/1B3 のバイオマーカーとなる可能性について検討することである。前章において、ヒトおよびカニクイザルのスタチンの肝取込みに大きな相違が見られず、薬物の肝取込みに対する OATP1B1/1B3 解析モデルとして有益であることを示すことができた。したがって、本研究ではヒトで探索する前の最初の段階としてまずはカニクイザルを用いて DHEAS のバイオマーカーとしての可能性を評価した。まずはヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いて、DHEAS が OATP1B1/1B3 を介して肝に取り込まれるかどうかを *in vitro* 試験で評価した。続いて、OATP 阻害剤である rifampicin (RIF) 投与後のカニクイザルの血漿中 DHEAS 濃度を測定し、その変動を評価した。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 材料および試薬

Atorvastatin calcium trihydrate と midazolam は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から購入した。Dehydroepiandrosterone sulfate sodium salt dehydrate (DHEAS)、dehydroepiandrosterone-2, 2, 3, 4, 4, 6-d6 sulfate sodium salt dehydrate (DHEAS-d6)および RIF は Sigma Aldrich (St. Louis, MO)から pitavastatin calcium、rosuvastatin calcium および fluvastatin sodium は LKT Laboratories (St. Paul, MN)から、pravastatin sodium は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)から入手した。 $[^3\text{H}]$ Dehydroepiandrosterone sulfate, sodium salt ($[^3\text{H}]$ DHEAS) (70.5 Ci/mmol) は PerkinElmer (Boston, MA)から入手した。ヒト肝細胞(pool of 20, mix gender)および雄サル肝細胞(pool of 3)は Xenotech, LLC (Lenexa, KS, USA)から購入した。その他の試薬は市販の特級品または生化学用を使用した。

第2項 動物

動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「ハムリー株式会社試験研究所の実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守し、ハムリー株式会社 (Ibaraki, Japan)及び大日本住友製薬株式会社(Osaka Japan)の動物実験審査委員会の承認のもと、ハムリーで実施した。雄カニクイザルは Guangxi Handsome Experimental Primates Farming Development Co., Ltd. (Guangxi, China)から購入した個体を使用した。カニクイザルは温度と湿度が管理 ($24 \pm 3^\circ\text{C}$ and $50 \pm 20\%$)された部屋で一日当たりの照明 12 時間の人工照明下で飼育した。餌は市販のサル用飼料 (PS-A type; Oriental Yeast Co., Ltd.)を与えた。

第3項 DHEAS の肝細胞取り込み

購入したヒトおよびカニクイザル肝細胞は Hepatocyte Isolation Kit (Xenotech, LLC)を用いて、添付のプロトコールに従って融解し、生細胞を単離した。Krebs-Henseleit buffer

(118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM, NaHCO₃, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH7.4, KHB)を用いて 2.0 × 10⁶ cells/mL に調製した細胞懸濁液を 37°C の恒温槽で 5 分間プレインキュベーションし、等量の [³H]DHEAS 溶液(0.2 μCi/mL)を添加することで肝細胞取り込みを開始した。取り込み時の [³H]DHEAS 濃度は 1.42 nmol/L (0.2 μCi/mL)および肝細胞濃度は 1.0 × 10⁶ cells/mL とした。37°C または氷上で所定時間インキュベーションした後、反応液を 2 N NaOH に hepatocyte filtration oil を重層したマイクロチューブ(Hepatocyte Transporter Suspension Assay Kit, BD Biosciences [San Jose, CA])に移し、卓上遠心器で 30 秒遠心分離 (14000×g) することにより取り込みを停止した。反応液の一部は反応溶液中の放射能濃度を測定するために 100 μL の 2N NaOH の入った液体シンチレーションバイアルに移した。遠心分離後のマイクロチューブは NaOH 層に移行した細胞を溶解させるため、室温で 3 時間以上放置した。剃刀でオイル層を切断し、下層の細胞が溶解した NaOH 層を液体シンチレーションバイアルに移した。バイアルに 100 μL 2N HCl を加えて中和した後、5 mL の液体シンチレーションカクテルハイオニックフロー (Packard)を加えた。よく混合した後放射活性を液体シンチレーションカウンター(Accu FLEX LSC 7400; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)で測定した。

肝細胞中の放射能 (dpm/10⁵ cells)を反応溶液中の放射能濃度 (dpm/mL) で除し、10⁶ cells 肝細胞当たりの取り込み量 (μL/10⁶ cells) を算出した。

第 4 項 DHEAS の肝細胞取り込みに対する Na⁺依存性評価

DHEAS のヒトおよびカニクイザル肝細胞への取り込みに対する Na⁺依存性評価は KHB の NaCl と NaHCO₃ を 5 mM KCl および 25 mM KHCO₃ に置換した KHB-Na⁺(-)(pH7.4)を用いて、第 3 項同様にオイルレイヤー法で実施した。即ち、第 3 項に示した方法にしたがって KHB および KHB-Na⁺(-)を用いて調製した 2.0 × 10⁶ cells/mL の細胞懸濁液に [³H]DHEAS 溶液を添加し、取り込みを開始した。取り込み時の [³H]DHEAS 濃度は 1.42 nmol/L (0.1 μCi/mL)および肝細胞濃度は 1.0 × 10⁶ cells/mL で 2 分間インキュ

バージョンした。その後の処理は第 3 項に従って実施した。第 3 項同様に肝細胞中の放射エネルギーを反応溶液中の放射能濃度で除し、 10^6 cells 肝細胞当たりの取り込み量 ($\mu\text{L}/10^6$ cells) を算出し、 37°C の取り込み量から 4°C の取り込み量を差し引くことでトランスポーターを介した取り込み活性を算出した。

第 5 項 DHEAS の肝取り込みに対する RIF の影響

各濃度の RIF または非標識体の DHEAS を含む $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ 溶液を調製し、第 3 項と同様にオイルレイヤー法によりヒトおよびカニクイザルの肝細胞の取り込み試験を実施した。つまり、第 3 項に従って調製した 2.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液に RIF を含む $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ 溶液 ($0.2 \mu\text{Ci/mL}$) を添加し、取り込みを開始した。取り込み時の $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ 濃度は 1.42 nmol/L ($0.1 \mu\text{Ci/mL}$) および肝細胞濃度は 1.0×10^6 cells/mL で 0.5 分または 3 分間インキュベーションした。その後の処理は第 3 項に従って実施した。初期取り込み活性は 0.5 分と 3.0 分の取り込み量の傾きから取り込みクリアランス ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells) を算出した。

第 6 項 サルを用いた DDI 試験

DHEAS の血漿中濃度に与える RIF の影響を評価した。本評価では同じ 4 頭のオスのカニクイザルを用いた。各投与は少なくとも 13 日間の休薬期間を置いて実施した。第 1 期では 4 つのスタチン {atorvastatin calcium trihydrate (以下、atorvastatin)、pitavastatin calcium (以下、pitavastatin)、pravastatin sodium (以下、pravastatin)、rosuvastatin Calcium (以下、rosuvastatin)、各 1 mg/kg } および midazolam (1 mg/kg) を合わせたカクテル (以下、カクテル基質) を単回経口投与した。第 2 期ではカクテル基質の単回経口投与の 5 分前に、 2 mg/kg の RIF を、第 3 期ではカクテル基質の単回経口投与の 5 分前に、 10 mg/kg の RIF を単回経口投与した。投与後の所定時間に橈側皮静脈又は伏在静脈から採血し、 $2,100 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心し、血漿を採取した。スタチンの分解を止めるため、

得られた血漿の一部に等量の 0.1% acetic acid を加えた。血漿および 0.1% acetic acid を加えた血漿は分析まで -20 °C で保存した。

第 7 項 カニクイザル血漿中 DHEAS および試験薬の濃度測定

カニクイザル血漿中の DHEAS、atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin および midazolam の濃度測定は除タンパクにより前処理し、LC-MS/MS にて測定した。Atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin の測定は 50 μ L の 0.1% acetic acid を加えた血漿に 200 μ L の fluvastatin のメタノール溶液 (I.S.溶液 : 100 μ g/mL) を、DHEAS の測定は 20 μ L の血漿に 200 μ L の DHEAS-d6 のメタノール溶液 (I.S.溶液 : 10 ng/mL) を加えてよく混合した後に 14,000 \times g、4 °C で 5 分間遠心分離した。遠心後の上清 100 μ L に 10 mM ギ酸アンモニウムを 100 μ L 添加し、LC-MS/MS に注入した。LC-MS/MS は LC-30AC HPLC システム(Shimadzu, Kyoto, Japan)および QTRAP® 6500 LC-MS/MS システム(AB SCIEX, Framingham, MA)を使用した。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 Colum (1.7 μ m 2.1 mm \times 30 mm, Waters, Milford, MA) を用い、40 °C で使用した。移動相には 10 mM ギ酸アンモニウム (A) 及び アセトニトリル (B) を用い、流速は 0.3 mL/min とし、グラジエント条件は gradient [min, B%] = [0, 10]-[3, 90]-[4, 90]-[4.1, 10]-[6,10]とした。Atorvastatin、pitavastatin、および midazolam の測定時、質量分析器はエレクトロスプレー法のポジティブイオンモードを使用し、各化合物の測定条件は、(m/z: precursor ion \rightarrow product ion): atorvastatin (559.178 \rightarrow 440.100)、fluvastatin (412.107 \rightarrow 265.800)、midazolam (326.006 \rightarrow 291.000)、pitavastatin (422.086 \rightarrow 290.100) とし、rosuvastatin、pravastatin の測定時、質量分析器はエレクトロスプレー法のネガティブイオンモードを使用し、各化合物の測定条件は、(m/z: precursor ion \rightarrow product ion): rosuvastatin (480.022 \rightarrow 418.000)、fluvastatin (409.987 \rightarrow 348.100)、pravastatin (423.185 \rightarrow 320.8) とした。

第3節 結果

第1項 DHEASの肝細胞取り込み

ヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いて $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ の取り込みを経時的に測定した。両細胞とも 4°C では0.5分から5分にかけて取り込み量の増加はほとんどなかったが、 37°C では時間依存的な取り込みが認められ、DHEASの取り込みにトランスポーターが関与することが示唆された。両細胞ともに3分まで直線性があったため、初期取り込み活性評価に関する以降の検討の取り込み時間は2分もしくは3分とした。

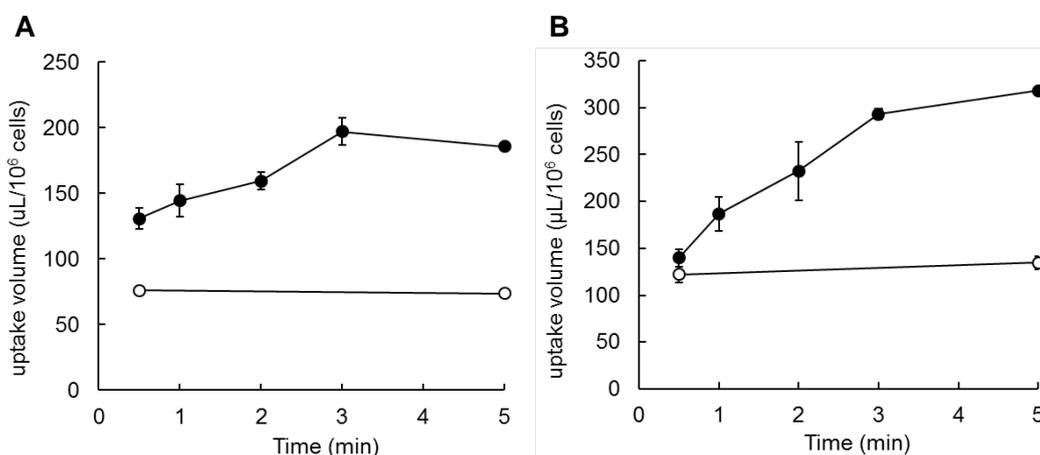


Fig. III-2 Time profiles of $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ uptake by isolated hepatocytes from human (A) and monkey (B). The uptake was determined at 37°C (●) and 4°C (○). Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

第2項 DHEASの肝細胞取り込みに対する Na^+ 依存性評価

$[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ の肝細胞取り込みに対するOATP以外のトランスポーターとして、胆汁酸のナトリウム依存的な取り込みに働くNTCP(SLC10A1)の寄与を見積もるため、 Na^+ 依存性試験を実施した。 37°C における取り込み活性から 4°C における取り込み活性を差し引いたトランスポーターを介した取り込み活性はヒト細胞においては Na^+ 非存在下のKHB中で

も活性は低下しなかったが、カニクイザル肝細胞においては Na⁺非存在下の KHB 中で約 60%に活性が低下した。したがって、ヒトとは異なり、カニクイザル肝細胞における [3H]DHEAS の取り込みには OATP とは異なる Na 依存性のトランスポーター (NTCP 様のトランスポーター) の寄与が示唆された。

Table III-1

Hepatocytes uptake of [3H]DHEAS in KHB buffer and in Na⁺-free KHB buffer
Each value represents the mean ± S.E. (n=3).

Species	Buffer	[3H]DHEAS uptake volume (μl/10 ⁶ cells)		
		37°C	4°C	transporter mediated (37°C- 4°C)
Human	Control (KHB)	121 ± 6	59 ± 2	62
	Na ⁺ free buffer	139 ± 3	63 ± 2	76
Monkey	Control (KHB)	169 ± 8	83 ± 7	86
	Na ⁺ free buffer	124 ± 8	75 ± 7	49

This assay was conducted to incubation for 2 min.

第 3 項 DHEAS の肝取り込みに対する RIF の影響

[3H]DHEAS の肝細胞取り込みに対する OATP 阻害剤である RIF の影響を評価した。前章で述べたとおり、RIF は OATP1B1/1B3 に対して強い阻害能を有し、臨床においても OATP1B1/1B3 を阻害する。ヒトおよびカニクイザル肝細胞ともに RIF の濃度依存的な [3H]DHEAS 取り込み阻害が認められた。また、非標識 DHEAS (300 μM) 存在下においても [3H]DHEAS 取り込み阻害が認められた。したがって、[3H]DHEAS の肝取り込みは OATP1B1/1B3 を介して取り込まれることが示唆され、また RIF は次項で実施したカニクイザルを用いた DDI 試験の阻害剤として妥当であることが確認された。

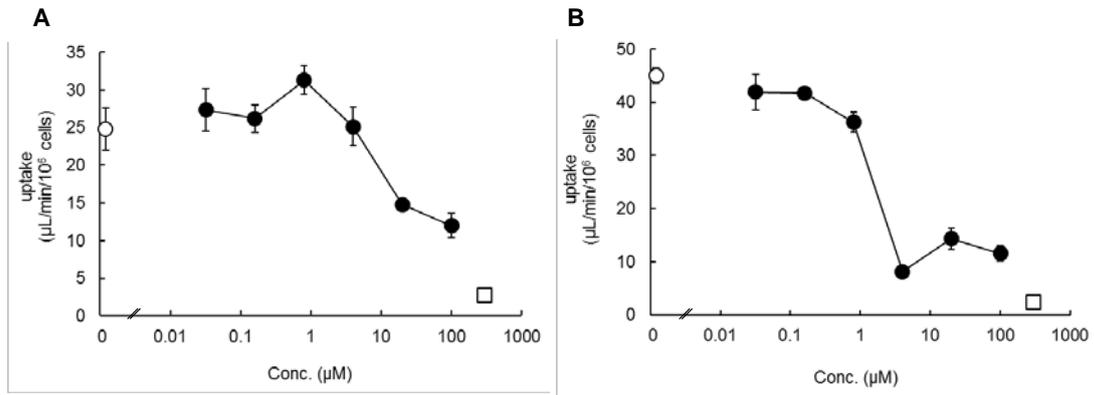


Fig. III-3 Inhibitor effect of RIF on [³H]DHEAS uptake into human (A) and monkey (B) hepatocytes (○, control; ●, RIF; □, unlabeled 300 µM DHEAS). Each point represents the mean ± S.E. (n=3). Time profiles of [³H]DHEAS uptake into human (A) and monkey (B). The uptake was determined at 37°C (●) and 4°C (○). Each point represents the mean ± S.E. (n=3).

第4項 カニクイザルを用いた DDI 試験

これまでの *in vitro* による検討により、DHEAS は主に OATP1B1/1B3 によって肝細胞に取り込まれること、並びに OATP 阻害剤である RIF がその取り込みを阻害することが示された。DHEAS が OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーとして利用可能かどうかを検討するために、カニクイザルにおける内因性 DHEAS の血漿中濃度に与える RIF の影響を評価した。

まず、4 つのスタチン (atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin) および midazolam を合わせたカクテル (各 1 mg/kg、以下カクテル基質) を雄のカニクイザル 4 匹に単回経口投与した (第一期)。休薬期間を経て、同じカニクイザル 4 頭にカクテル基質と 2 mg/kg の RIF を単回経口投与した (第二期)。さらに休薬期間を経て、同じカニクイザル 4 頭にカクテル基質と 10 mg/kg の RIF を単回経口投与した (第三期)。投与後経時的に採血し、LC-MS/MS を用いてカクテル基質および DHEAS の血漿中濃度を測定した。まずは RIF のカニクイザルにおける 4 つのスタチン (atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin) および midazolam の体内動態に与える影響を評価した。

血漿中濃度推移を Fig. III-4 に、薬物動態パラメータを Table. III-2 に示す。2 mg/kg の RIF 併用によって、 C_{max} および AUC はコントロールと比較してそれぞれ 2.6 倍および 2.3 倍 (atorvastatin)、3.7 倍および 3.4 倍 (pitavastatin)、4.4 倍および 2.9 倍 (rosuvastatin) に上昇した。10 mg/kg の RIF 併用時にはさらに上昇が認められ、 C_{max} および AUC の上昇倍率はそれぞれ 11.0 倍および 12.9 倍 (atorvastatin)、10.6 倍および 11.3 倍 (pitavastatin)、28.0 倍および 14.6 倍 (rosuvastatin) であった。Pravastatin は第一期および第二期の多くの血漿中濃度が検出限界以下 (3 ng/mL) であったため、 C_{max} および AUC は算出しなかった。10 mg/kg の RIF を併用した第三期の血漿からは pravastatin が検出された。いずれのスタチンも血漿中濃度が上昇したことから、RIF はカニクイザルの OATP1B1/1B3 を十分に阻害していると考えられた。一方、CYP3A 基質である midazolam の血漿中濃度は RIF の併用によってほとんど影響を受けなかった。RIF は反復投与により

薬物代謝酵素系を誘導するが、RIFの単回投与においてはCYP3Aの阻害や誘導はないと考えられた。

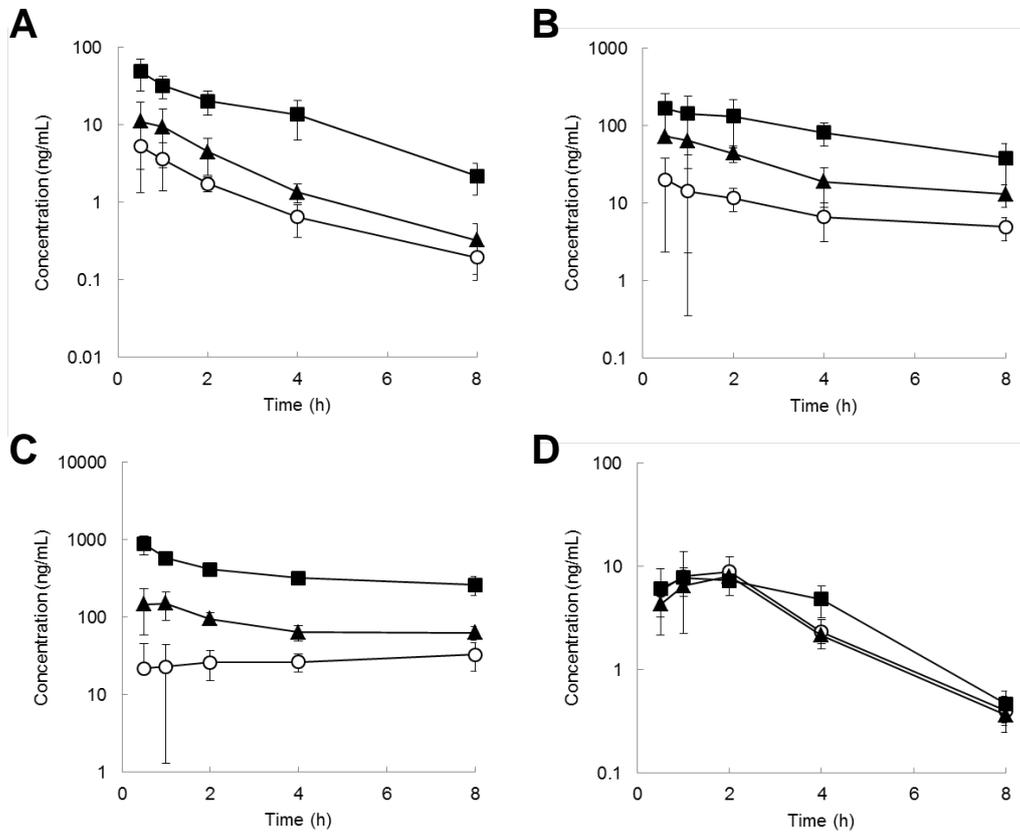


Fig. III-4 Effect of RIF on plasma concentration-time profiles of atorvastatin (A), pitavastatin (B), rosuvastatin (C), and midazolam (D) after oral administration to male cynomolgus at dose of each 1 mg/kg (○, control; ▲, with 2 mg/kg RIF; ■, with 10 mg/kg RIF).

Table III-2

Pharmacokinetic parameters of atorvastatin, pitavastatin, rosuvastatin, and midazolam after oral administration of test-drugs (1 mg/kg, each) with and without RIF (2 or 10 mg/kg) in cynomolgus monkeys

Each value represents the mean \pm S.D. (n=4).

	C_{\max} (ng/mL)	t_{\max} (h)	AUC _{0-last} (ng•h/mL)
Atorvastatin			
control	5.28 \pm 3.9	0.5 \pm 0.0	9.71 \pm 3.49
+2 mg/kg RIF	12.2 \pm 7.3*	0.6 \pm 0.3	22.5 \pm 11.4*
+10 mg/kg RIF	49.1 \pm 21.4**	0.5 \pm 0.0	115 \pm 16 ^c
Pitavastatin			
Control	21.2 \pm 17.1	1.3 \pm 0.9	67.1 \pm 25.1
+2 mg/kg RIF	87.1 \pm 89.2	1.0 \pm 0.7	225 \pm 92**
+10 mg/kg RIF	188 \pm 91*	1.9 \pm 1.5	685 \pm 213**
Rosuvastatin			
Control	37.8 \pm 16.7	5.1 \pm 3.6	213 \pm 77
+2 mg/kg RIF	190 \pm 181	1.1 \pm 0.6	641 \pm 291*
+10 mg/kg RIF	908 \pm 526*	0.9 \pm 0.8	2942 \pm 888***
Midazolam			
Control	9.68 \pm 5.02	1.8 \pm 0.5	27.5 \pm 11.4
+2 mg/kg RIF	9.02 \pm 2.55	1.8 \pm 0.5	23.9 \pm 4.1
+10 mg/kg RIF	10.0 \pm 3.2	2.3 \pm 1.3	31.4 \pm 8.0

* $P < 0.05$, compared to the control values obtained without RIF administration

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$

DHEAS の血漿中濃度推移を Fig. III-5 に、薬物動態パラメータを Table. III-3 に示す。

10 mg/kg の RIF 投与により、DHEAS の C_{max} および AUC はともに約 2 倍に増加した。低投与量である 2 mg/kg の RIF 併用による C_{max} および AUC の上昇はともに約 1.2 倍であり、血漿中の内因性 DHEAS 濃度に与える RIF の影響は RIF の投与量依存的であった。OATP 阻害薬の RIF により血漿中 DHEAS の上昇が認められたことから、DHEAS は OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

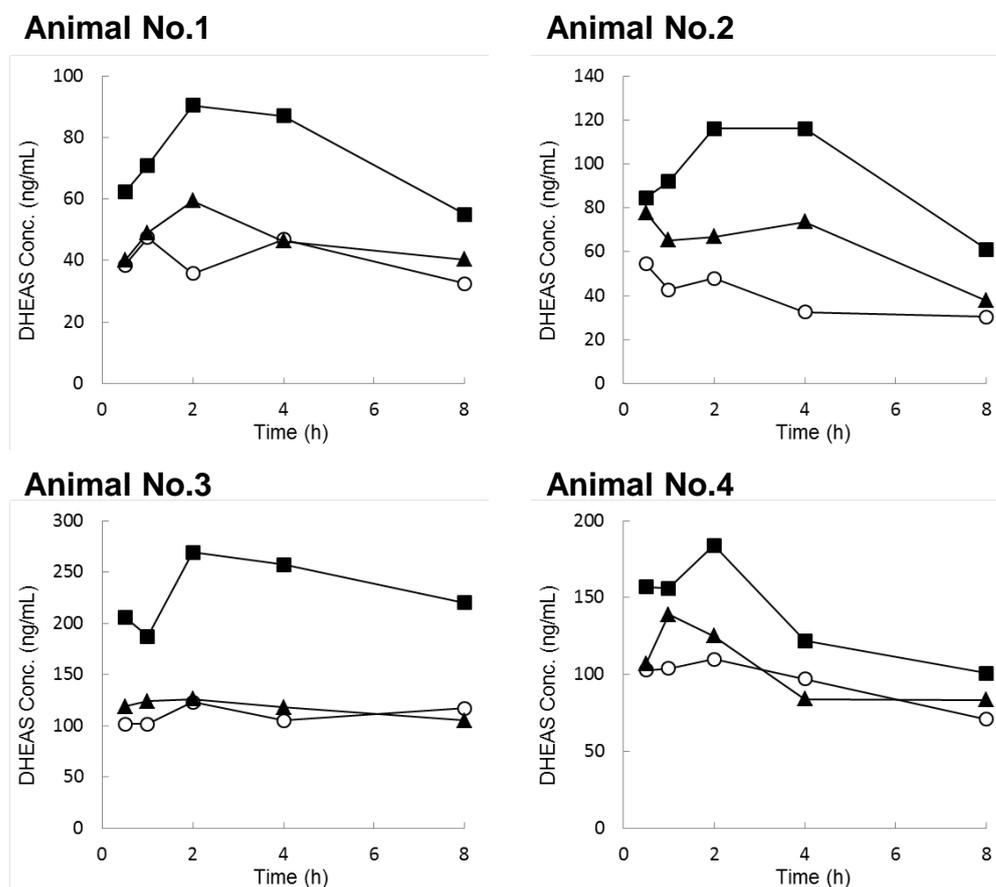


Fig. III-5 Effect of RIF on plasma concentration-time profiles of DHEAS after RIF oral administration to male cynomolgus monkey (○, control; ▲, with 2 mg/kg RIF; ■, with 10 mg/kg RIF).

Table III-3

Pharmacokinetic parameters of DHEAS after oral administration of RIF to male cynomolgus monkey (control, 2 or 10 mg/kg RIF).

Each value represents the mean \pm S.D (n=4)

	C_{\max} (ng/mL)	$AUC_{0.5-8h}$ (ng·h/mL)
DHEAS		
control	83.3 \pm 38.3	530 \pm 282
+2 mg/kg RIF	101 \pm 38.0	609 \pm 240*
+10 mg/kg RIF	165 \pm 80*	1030 \pm 550*

*p < 0.05, compared to the control values obtained without RIF administration

第4節 考察

ヒトでの評価の前段階としてカニクイザルを用いた本章の検討結果から、DHEAS が OATP を介した DDI のバイオマーカーとしての可能性が示された。 *In vitro* 試験により、DHEAS はヒトおよびカニクイザル肝細胞への時間依存的な取り込みが認められ、その取り込みは OATP に阻害作用を有する RIF により濃度依存的に阻害された (Fig. III-2、III-3)。既にアフリカツメガエルの卵母細胞や OATP 発現細胞を用いた検討から DHEAS は OATP1B1 や OATP1B3 の基質になることが報告されている^{46, 122-124)}。本研究結果と併せて、DHEAS の肝細胞取り込みには OATP が関与することが示唆された。またカニクイザルを用いた *in vivo* 試験において、RIF の用量依存的に血漿中 DHEAS の C_{max} および AUC の上昇が観測された (Fig. III-5、Table III-3)。

カニクイザルとヒトの間で OATP1B1 および OATP1B3 の遺伝子配列並びにアミノ酸の配列相同性が高いとの報告がある^{73, 74)}。また前章でカニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した *in vivo* DDI の評価モデル動物として有用であることを示した。加えて、他の研究者からも OATP 基質として rosuvastatin や pitavastatin を用い、RIF による阻害作用を評価した結果からも、カニクイザルの OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物としての有用性が示されている^{107, 108)}。以上を勘案すると DHEAS の有用性をヒトで評価する前にカニクイザルを用いて OATP 上での DDI 予測バイオマーカーとしての検討したことは妥当であると考えられる。

DHEAS の肝取り込みに関与する OATP 以外のトランスポーターの寄与を検討するため、DHEAS の肝取り込みの Na^+ 依存性を測定した。肝細胞には OATP 以外に Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が胆汁酸などを肝に取り込むトランスポーターとして発現しており、NTCP はその名のとおりに、 Na^+ 依存的に胆汁酸を輸送する^{126, 127)}。ヒト肝細胞においては Na^+ 非存在下でも DHEAS の取り込み活性は低下しなかったが、カニクイザル肝細胞においては Na^+ 非存在下で取り込み活性が約 60% に低下した (Table. III-1)。カニクイザルにおいては DHEAS の肝取り込みに一部 NTCP 様のトラン

スポーターの関与が示唆された。NTCP は胆汁酸などの肝取り込みに関与し、胆汁酸の腸肝循環に関与する重要なトランスポーターである^{128, 129)}。胆汁酸は OATP の基質になることも知られている⁴⁵⁾。OATP と NTCP の両方の基質になる化合物もあることから、カニクイザルの肝取り込みに一部 NTCP が関与する可能性はあるが、ヒト肝細胞において NTCP の関与は示唆されなかった。したがって、カニクイザルにおいて観察された血漿中 DHEAS 濃度の変動は NTCP 様の Na⁺依存的トランスポーターが関与するため OATP 活性を過小評価している可能性が考えられる。一方、ヒトでは NTCP の関与が小さいことから、DHEAS はカニクイザルよりも OATP1B1/1B3 を介した DDI 予測のバイオマーカーとして有用であることが期待される。

カニクイザルを用いた *in vivo* の実験によって、RIF の投与量依存的に OATP の基質であるスタチンの血漿中濃度を上昇させ、一方、CYP3A 基質である midazolam¹³⁰⁻¹³²⁾は RIF により影響を受けないことを示した (Fig. III-4、Table. III-2)。RIF は OATP 阻害剤として用いられており、臨床においては RIF の併用によりスタチン類の血漿中濃度 AUC がそれぞれ、6.8-8.5 倍 (atorvastatin)、6.7 倍 (pitavastatin)、2.3 倍 (pravastatin) に上昇することが報告されている⁹⁵⁻⁹⁸⁾。最近、カニクイザルを用いて rosuvastatin や pitavastatin と RIF の併用による DDI の試験が報告され^{107, 108)}、OATP1B1/1B3 を介した DDI を予測する *in vivo* モデルとしての有用性が示されているが、本研究もカニクイザルおよびスタチン類や RIF が OATP1B1/1B3 を介した DDI モデルとして有用であることを支持する結果であった。

DHEAS をバイオマーカーとした OATP1B1/1B3 上での DDI 有無の評価は、同一個体のカニクイザルを用いる必要がある。Fig. III-5 に示すように RIF を投与していないコントロールのカニクイザル血漿中の DHEAS 濃度は約 30~120 ng/mL であり、個体差が大きい。もし、異なるカニクイザルを用いた場合、今回の DHEAS の個体間差は約 4 倍であるので、RIF による約 2 倍の DHEAS の濃度上昇は検出できない可能性がある。

本研究では RIF を投与しないコントロール群の DHEAS 濃度と RIF 投与後の DHEAS

濃度を比較することにより評価したが、同一個体で RIF 投与直前と投与後の DHEAS 濃度を測定することで OATP1B1/1B3 を介した DDI の評価をすることも可能である。この場合、DHEAS のサーカディアンリズムに注意する必要がある。若年男子において、DHEAS はサーカディアンリズムがあることが報告されている¹³³⁾。Fig.III-5 のようにカニクイザル血漿中の DHEAS 濃度は一定ではないので、カニクイザルにおいてもサーカディアンリズムを示す可能性がある。

Fig. III-5 のように 10 mg/kg の RIF によって血漿中 DHEAS 濃度上昇したことから、DHEAS が肝臓の OATP 活性を観察できるバイオマーカーになる可能性を示した。DHEAS の濃度上昇の程度はスタチンの濃度上昇よりも低かったが、スタチンを投与しなくても OATP1B1/1B3 を介した DDI を評価できるため、医薬品開発の早期に開発候補化合物の OATP 阻害薬としての DDI 予測に有益である。さらにヒトにおいて NTCP の寄与が小さいことが示されたことから、臨床ではカニクイザルよりも変化の程度が大きくなり、バイオマーカーとしてより有益であることが期待できる。

カニクイザルにおいて RIF の投与により血漿中 DHEAS 濃度が上昇したことは、RIF による肝臓の OATP 阻害の結果であると考えられるが、他の可能性について以下に考察した。まずは RIF の NTCP 阻害の可能性を考えた。カニクイザル肝細胞の DHEAS 取り込みに一部 NTCP が寄与することが *in vitro* の検討より示されたが、RIF のヒト NTCP に対する IC₅₀ 値は 277 μM であり、その阻害作用は強くない¹⁰⁶⁾。NTCP と BSEP の共発現細胞系においても、高濃度の RIF (100 μM) によりタウロコール酸の輸送を約 50% 阻害する程度であった¹³⁴⁾。RIF のカニクイザル NTCP に対する阻害作用は報告されていないが、ヒトと同程度と仮定すると、*in vivo* では RIF は NTCP をほとんど阻害していないと考えられ、血漿中 DHEAS 濃度上昇の原因にはならないと考えられる。DHEAS は、さらに他のトランスポーターとして organic solute transporter (OST) や OAT3 の基質になる。しかし、RIF が OST を阻害するといった情報はなく、また OAT3 発現細胞を用いた検討で fexofenadine の取り込みを 80 μM まで阻害しなかったとの結果¹³⁵⁾があるため、RIF 投与

による血漿中 DHEAS 濃度上昇の原因として OAT3 は考えにくい。次に RIF による DHEAS 生成に関与する硫酸抱合酵素の誘導について考察した。一般的に酵素誘導されるには 2 日間以上必要である¹¹⁰⁾、また酵素誘導によって影響を受けやすい CYP3A の基質である midazolam の血漿中濃度はほとんど変化がなかったことから、硫酸抱合酵素の誘導が原因であるとは考えにくい。

血漿中 DHEAS 濃度の上昇が RIF による OATP 阻害だけとは限らず、RIF と DHEAS の DDI 機構についてさらなる検討が必要であると考えられるが、本研究は DHEAS が OATP1B1/1B3 上での DDI を予測するバイオマーカーとして有用であることを強く示唆した最初の報告である。ヒトにおいても DHEAS が OATP 活性のバイオマーカーとして有用であれば、医薬品開発の最初の臨床試験 (Phase I 試験) で OATP を介した DDI の予測が可能になる。通常、DDI 試験は Phase II 試験以降で実施されることが多いので、初期の臨床試験で予測が可能であれば、早期にヒトにおける DDI のリスクを判断することができ、その後の臨床試験計画の立案やより安全性の高い臨床試験の遂行が可能になる。

本研究により、OATP が DHEAS の肝取り込みに関与し、RIF によりその肝取り込みが阻害されること、並びにカニクイザルにおいて RIF が血漿中の内因性 DHEAS 濃度を上昇させることを示した。DHEAS は *in vivo* の OATP1B1/1B3 活性のバイオマーカーとなる有用な内因性化合物であり、DDI 予測のバイオマーカーとして有用であると考えられる。

第四章 結論

トランスポーターを介した DDI の実例が報告されるようになり、また日米欧三極の DDI のドラフトガイダンス/ガイドラインにトランスポーターを介した DDI 研究の必要性が示されたことから、医薬品開発におけるその重要性が認識されている。特に肝臓に発現する OATP1B1/1B3 を介した DDI は重篤な副作用につながるケースもあることから医薬品開発の初期の段階から評価が必要である。

現在のトランスポーターを介した DDI 研究はトランスポーター発現系を用いた *in vitro* の阻害試験が主に実施されている。この *in vitro* 阻害試験の結果は臨床で DDI 試験が必要かどうかの判断に用いられているに過ぎず、ヒトでの DDI を予測できる *in vivo* の動物モデルが期待されていた。そこで本研究ではヒトの OATP1B1 および OATP1B3 の遺伝子配列並びにアミノ酸の配列相同性が高いカニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物になるかどうかを第二章で検討した。その結果、OATP のモデル基質として rosuvastatin、モデル阻害薬として RIF を用いた検討により、カニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物として適している可能性を示唆することができた。

第三章では OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーを探索することを目的に研究を実施した。数多く報告されている OATP の基質となる内因性化合物の中からステロイドホルモンの抱合代謝物の一つである DHEAS に着目し、その有用性について評価した。その結果、DHEAS の肝取り込みには OATP1B1/1B3 が関与することが示され、またカニクイザルにおいて OATP の阻害剤である RIF 投与により血漿中 DHEAS 濃度が上昇することを示すことができた。本結果は DHEAS が OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーとして有用であることを強く示唆した最初の報告である。ヒトにおいても DHEAS が OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーとして有用であれば、医薬品開発の最初の臨床試験（Phase I 試験）で OATP を介した DDI の予測が可能になるであろう。

本研究によりカニクイザルの OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物としての有用

性、並びに DHEAS の OATP1B1/1B3 を介した DDI のバイオマーカーとしての有用性を示すことができた。医薬品の薬物動態に関連する因子のヒトとカニクイザルの種差についての研究はまだ十分でなく、カニクイザルが必ずしもヒトの薬物動態を予測しうるモデル動物とは限らないが、本研究のように *in vitro* 試験により、ヒトとカニクイザルの種差を把握し、カニクイザルを用いた *in vivo* 試験の結果と組み合わせることでヒトにおける薬物動態や DDI の予測が可能になるものと考えられる。また、本研究で示された DHEAS の有用性はカニクイザルを用いた検討であるため、臨床での有用性の評価やその応用が望まれる。

以上、トランスポーター研究のさらなる発展と本研究の成果により、早期の DDI リスクの判断並びにより安全な臨床試験の推進が期待される。

発表論文

本研究内容は下記の論文に発表予定である

Watanabe, M. Watanabe, T. Yabuki, M. and Tamai, I. Dehydroepiandrosterone Sulfate, a Useful Endogenous Probe for Evaluation of Drug-Drug Interaction on Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) in Cynomolgus Monkeys. *Drug. Metab. Pharmacokinet. in press*

参考文献

1. Diasio RB. Sorivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Br J Clin Pharmacol.* 46:1-4 (1998).
2. Watabe T, Okuda H, Ogura K. Lethal drug interactions of the new antiviral, sorivudine, with anticancer prodrugs of 5-fluorouracil. *Yakugaku Zasshi.* 117:910-921 (1997).
3. Po AL, Zhang WY. What lessons can be learnt from withdrawal of mibefradil from the market? *Lancet.* 351:1829-1830 (1998).
4. [No authors listed] Roche cites drug interactions in mibefradil withdrawal. *Am J Health Syst Pharm.* 55:1445 (1998).
5. Bedford TA, Rowbotham DJ. Cisapride. Drug interactions of clinical significance. *Drug Saf.* 15:167-175 (1996). Erratum in: *Drug Saf* 17:196 (1997).
6. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2012) Guidance for Industry: Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations [Draft Guidance], U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf>.
7. Committee for Human Medicinal Products (CHMP) (2012) Guideline on the Investigation of Drug Interactions [Final], European Medicines Agency, London.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf.

8. 厚生労働省：医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（案）。
<http://www.nihs.go.jp/mhlw/20131488.pdf>
9. International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 9:215-236 (2010).
10. Das G, Barr CE, Carlson J. Reduction of digoxin effect during the digoxin-quinidine interaction. *Clin Pharmacol Ther.* 35:317-321 (1984).
11. Doherty JE. The digoxin-quinidine interaction. *Annu Rev Med.* 33:163-170 (1982).
12. Muck W, Mai I, Fritsche L, Ochmann K, Rohde G, Unger S, Johne A, Bauer S, Budde K, Roots I, Neumayer HH, Kuhlmann J. Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 65:251-261 (1999).
13. FDA talk paper (2001) Bayer voluntarily withdraws. Baycol on August 2001.
14. Ozdemir O, Boran M, Gökçe V, Uzun Y, Koçak B, Korkmaz S. A case with severe rhabdomyolysis and renal failure associated with cerivastatin-gemfibrozil combination therapy--a case report. *Angiology.* 51:695-697 (2000).
15. Bruno-Joyce J, Dugas JM, MacCausland OE. Cerivastatin and gemfibrozil-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother.* 35:1016-1019 (2001).
16. Roca B, Calvo B, Monferrer R. Severe rhabdomyolysis and cerivastatin-gemfibrozil combination therapy. *Ann Pharmacother.* 36:730-731 (2002).
17. Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 72:685-691

- (2002).
18. Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *Pharmacol Exp Ther.* 2003 304:610-6.
 19. Ogilvie BW, Zhang D, Li W, Rodrigues AD, Gipson AE, Holsapple J, Toren P, Parkinson A. Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 34:191-197 (2006).
 20. Shitara Y, Hirano M, Sato H, Sugiyama Y. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 311:228-36.
 21. Åsberg, A., Hartmann, A., Fjeldsa, E., Bergan, S. and Holdaas, H.; Bilateral pharmacokinetic interaction between cyclosporine A and atorvastatin in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.,* 1: 382–386 (2001).
 22. Hermann M, Asberg A, Christensen H, Holdaas H, Hartmann A, Reubsæet JL (2004). Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 76: 388–391.
 23. Lemahieu WP, Hermann M, Asberg A, Verbeke K, Holdaas H, Vanrenterghem Y et al. (2005). Combined therapy with atorvastatin and calcineurin inhibitors: no interactions with tacrolimus. *Am J. Transplant* 5: 2236–2243.
 24. Park JW, Siekmeier R, Lattke P, Merz M, Mix C, Schuler S et al. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluvastatin in heart transplant

- recipients taking cyclosporine A. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 6: 351–361.
25. Olbricht C, Wanner C, Eisenhauer T, Kliem V, Doll R, Boddaert M et al. (1997). Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses. *Clin Pharmacol Ther* 62: 311–321.
 26. Hasunuma T, Nakamura M, Yachi T, Arisawa N, Fukushima K, Iijima H et al. (2003). The drug-drug interactions of pitavastatin (NK-104), a novel HMG-CoA reductase inhibitor and cyclosporine. *J Clin Ther Med* 19: 381–389.
 27. Regazzi MB, Iacona I, Campana C, Raddato V, Lesi C, Perani G et al. (1993). Altered disposition of pravastatin following concomitant drug therapy with cyclosporin A in transplant recipients. *Transplant Proc* 25: 2732–2734.
 28. Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CD et al. (2004). Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 76: 167–177.
 29. Arnadottir M, Eriksson LO, Thysell H, Karkas JD (1993). Plasma concentration profiles of simvastatin 3-hydroxy-3-methyl-glutarylcoenzyme A reductase inhibitory activity in kidney transplant recipients with and without cyclosporin. *Nephron* 65: 410–413.
 30. Ichimaru N, Takahara S, Kokado Y, Wang JD, Hatori M, Kameoka H et al. (2001). Changes in lipid metabolism and effect of simvastatin in renal transplant recipients induced by cyclosporine or tacrolimus. *Atherosclerosis* 158: 417–423.
 31. Binet I, Wallnöfer A, Weber C, Jones R, Thiel G (2000). Renal hemodynamics and pharmacokinetics of bosentan with and without cyclosporine A. *Kidney Int* 57: 224–231.
 32. Kajosaari LI, Niemi M, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT (2005b). Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide. *Clin*

Pharmacol Ther 78: 388–399.

33. Li M, Anderson G. D., Wang J. Drug–drug interactions involving membrane transporters in the human kidney. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2: 505–532 (2006).
34. Cundy K. C. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin. Pharmacokinet.* 36, 127–143 (1999).
35. Laskin OL, de Miranda P, King DH, Page DA, Longstreth JA, Rocco L, Lietman PS. Effects of probenecid on the pharmacokinetics and elimination of acyclovir in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 804–807 (1982).
36. Somogyi A., Stockley C., Keal J., Rolan P, Bochner F. Reduction of metformin renal tubular secretion by cimetidine in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 23: 545–551 (1987).
37. Somogyi, A. Muirhead, M. Pharmacokinetic interactions of cimetidine 1987. *Clin. Pharmacokinet.* 12: 321–366 (1987).
38. Somogyi, A. A., Bochner, F. Sallustio, B. C. Stereoselective inhibition of pindolol renal clearance by cimetidine in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 51: 379–387 (1992).
39. Feng B, Obach RS, Burstein AH, Clark DJ, de Morais SM, Faessel HM. Effect of human renal cationic transporter inhibition on the pharmacokinetics of varenicline, a new therapy for smoking cessation: an in vitro–in vivo study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83: 567–576 (2008).
40. Shiga T, Hashiguchi M, Urae A, Kasanuki H, Rikihisa T. Effect of cimetidine and probenecid on pilsicainide renal clearance in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67: 222–228 (2000).
41. Tsuruoka S, Ioka T, Wakaumi M, Sakamoto K, Ookami H, Fujimura A. Severe arrhythmia as a result of the interaction of cetirizine and pilsicainide in a patient

- with renal insufficiency: first case presentation showing competition for excretion via renal multidrug resistance protein 1 and organic cation transporter 2. *Clin. Pharmacol. Ther.* 79: 389–396 (2006).
42. Abel S, Nichols D. J., Brearley C. J. Eve M. D. Effect of cimetidine and ranitidine on pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose of dofetilide. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49: 64–71 (2000).
43. Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics.* 8:787-802 (2007).
44. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 34:45-78 (2013).
45. Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 91:133-137 (1994).
46. Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology.* 109:1274-1282 (1995).
47. Abe T, Kakyō M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Matsuno S, Kondo H, Yawo H. Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J Biol Chem.* 273:22395-22401 (1998).
48. Kanai N, Lu R, Satoriano J A, Bao Y, Wolkoff A W, Schuster V L. Identification and

- characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268: 866-869 (1995).
49. Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster V L. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J. Clin. Invest.* 98: 1142-1149 (1996).
 50. Pucci ML, Bao Y, Chan B, Itoh S, Lu R, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Schuster VL. Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA: species-specific substrate affinities. *Am. J. Physiol.* 277: R734-R741 (1999).
 51. Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun.* 273:251-260 (2000).
 52. Kakyo M, Sakagami H, Nishio T, Nakai D, Nakagomi R, Tokui T, Naitoh T, Matsuno S, Abe T, Yawo H. Immunohistochemical distribution and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2). *FEBS Lett.* 445:343-346 (1999).
 53. Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T. (2004). The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet.* 19:171-179.
 54. Kalliokoski A, Niemi M.. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 158:693-705 (2009).
 55. Tamai I, Nakanishi T. OATP transporter-mediated drug absorption and interaction. *Curr Opin Pharmacol.* 13:859-63 (2013).
 56. Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu J, Sai Y, Tsuji A, Yokoi T. Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther.* 302:804-813 (2002).
 57. Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S,

- Kusuhara H, Urasaki Y, Urae A, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 73:554-565 (2003).
58. Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem.* 274:17159-17163 (1999).
 59. Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res.* 18:1262-1269 (2001).
 60. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem.* 274:37161-37168 (1999).
 61. König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G156-164 (2000).
 62. Cui, Y., König, J., Leier, .I, Buchholz, U. and Keppler, D.: Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J. Biol. Chem.*, 276: 9626–9630 (2001). Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S and Yawo H. (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274:17159-17163 (1999).
 63. Letschert K, Komatsu M, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D. Vectorial transport of

- the peptide CCK-8 by double-transfected MDCKII cells stably expressing the organic anion transporter OATP1B3 (OATP8) and the export pump ABCC2. *J Pharmacol Exp Ther.* 313:549-56 (2005).
64. Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:1059-1067 (2005).
65. Sharma P, Butters CJ, Smith V, Elsby R, Surry D. Prediction of the in vivo OATP1B1-mediated drug-drug interaction potential of an investigational drug against a range of statins. *Eur J Pharm Sci.* 47:244-255 (2012).
66. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2:875-894 (2006).
67. Mugford CA, Kedderis GL. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 30:441-498 (1998).
68. Lu C, Li AP. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact.* 134:271-281 (2001).
69. Nakakariya M, Shimada T, Irokawa M, Maeda T, Tamai I. Identification and species similarity of OATP transporters responsible for hepatic uptake of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23:347-355 (2008).
70. Nishimuta H, Sato K, Mizuki Y, Yabuki M, Komuro S. Prediction of the intestinal

- first-pass metabolism of CYP3A substrates in humans using cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos.* 38:1967-1975 (2010).
71. Ogasawara A, Negishi I, Kozakai K, Kume T. In vivo evaluation of drug-drug interaction via mechanism-based inhibition by macrolide antibiotics in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos.* 37:2127-2136(2009).
72. Tahara H, Kusuhara H, Chida M, Fuse E, Sugiyama Y. Is the monkey an appropriate animal model to examine drug-drug interactions involving renal clearance? Effect of probenecid on the renal elimination of H2 receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 316:1187-1194 (2006).
73. White, E.P., Pimprale, S., Yu, Z., Ketty, V., Bourgea, J., Patten, C.J., Crespi, C., and Xiao, G.: Cloning and characterization of cynomolgus monkey and rhesus monkey organic anion transporting polypeptide 1B3, and comparison of their function with human OATP1B3. International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) 14th North American Meeting; 2006 Oct 22–26 (2006); Rio Grande, P.R.
74. Ebeling, M., Küng, E., See, A., Broger, C., Steiner, G., Berrera, M., Heckel, T., Iniguez, L., Albert, T., et al.: Genome-based analysis of the nonhuman primate *Macaca fascicularis* as a model for drug safety assessment. *Genome. Res.*, 21: 1746–1756 (2011).
75. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 80:565-581 (2006).
76. 塩野義製薬株式会社 クレストール錠 2.5mg/クレストール錠 5mg 添付文書 (2014年6月改訂)
77. 塩野義製薬株式会社 クレストール錠 2.5mg/クレストール錠 5mg 医薬品インタビューフォーム (2011年1月改訂)
78. Li, A. P. Primary hepatocyte cultures as an in vitro experimental model for the

- evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol. Series* 43, 103–130 (1997).
79. Jigorel E. et. al. Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 33, 1418-1422 (2005).
80. Griffin SJ and Houston JB. Prediction of in vitro intrinsic clearance from hepatocytes: comparison of suspensions and monolayer cultures. *Drug Metab Dispos* 33:115-120 (2005).
81. Xia CQ, Milton MN, Gan LS. Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. *Curr Drug Metab.* 8:341-363 (2007).
82. Yamazaki M, Li B, Louie SW, Pudvah NT, Stocco R, Wong W, Abramovitz M, Demartis A, Laufer R, Hochman JH, Prueksaritanont T, Lin JH. Effects of fibrates on human organic anion-transporting polypeptide 1B1-, multidrug resistance protein 2- and P-glycoprotein-mediated transport. *Xenobiotica.* 35:737-753 (2005).
83. Seithel A, Eberl S, Singer K, Auge D, Heinkele G, Wolf NB, Dörje F, Fromm MF, König J. The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab Dispos.* 35:779-786 (2007).
84. European Medicines Agency. CHMP Assesment report for Revolade (International Nonproprietary Name: eltrombopag). Doc.Ref.: EMA/CHMP/279276/2010
85. Sharma P, Holmes VE, Elsby R, Lambert C, Surry D. Validation of cell-based OATP1B1 assays to assess drug transport and the potential for drug-drug interaction to support regulatory submissions. *Xenobiotica.* 40:24-37 (2010).
86. Bednarczyk D. Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Anal Biochem.* 405:50-58

(2010).

87. Noé J, Portmann R, Brun ME, Funk C. Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab Dispos.* 35:1308-1314 (2007).
88. Yamaguchi H, Takeuchi T, Okada M, Kobayashi M, Unno M, Abe T, Goto J, Hishinuma T, Shimada M, Mano N. Screening of antibiotics that interact with organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 using fluorescent probes. *Biol Pharm Bull.* 34:389-395 (2011).
89. Vavricka SR, Van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology.* 36:164-172 (2002).
90. Baldes C, Koenig P, Neumann D, Lenhof HP, Kohlbacher O, Lehr CM. Development of a fluorescence-based assay for screening of modulators of human organic anion transporter 1B3 (OATP1B3). *Eur J Pharm Biopharm.* 62:39-43 (2006).
91. Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 304:223-228 (2003).
92. Izumi S, Nozaki Y, Komori T, Maeda K, Takenaka O, Kusano K, Yoshimura T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17 β -glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein. *Drug Metab Dispos.* 41:1859-1866 (2013).
93. Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, Kühn J, Jia J, Grube M, Kroemer HK, Siegmund W, Weitschies W. Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging

- contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. *Drug Metab Dispos.* 38:1024-1028 (2010).
94. Soars MG, Barton P, Ismail M, Jupp R, Riley RJ. The development, characterization, and application of an OATP1B1 inhibition assay in drug discovery. *Drug Metab Dispos.* 40:1641-1648 (2012).
95. Lau, Y.Y., Huang, Y., Frassetto, L. and Benet, L.Z.: Effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 81: 194–204 (2007).
96. He, Y.J., Zhang, W., Chen, Y., Guo, D., Tu, J.H., Xu, L.Y., Tan, Z.R., Chen, B.L., Li, Z., Zhou, G., et al.: Rifampicin alters atorvastatin plasma concentration on the basis of SLCO1B1 521T>C polymorphism. *Clin. Chim. Acta*, 405: 49-52 (2009)
97. Chen, C., Mireles, R.J., Campbell, S.D., Lin, J., Mills, J.B., Xu, J.J. and Smolarek, T.A.: Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab. Dispos.*, 33: 537–546 (2005).
98. Deng, J.W., Song, I.S., Shin, H.J., Yeo, C.W., Cho, D.Y., Shon, J.H. and Shin, J.G.: The effect of SLCO1B1*15 on the disposition of pravastatin and pitavastatin is substrate dependent: the contribution of transporting activity changes by SLCO1B1*15. *Pharmacogenet. Genomics*, 18: 424–433 (2008).
99. 第一三共株式会社. リファジンカプセル 150mg 添付文書 2014年9月改訂(第22版)
100. Kimoto E, Yoshida K, Balogh LM, Bi YA, Maeda K, El-Kattan A, Sugiyama Y, Lai Y. Characterization of organic anion transporting polypeptide (OATP) expression and its functional contribution to the uptake of substrates in human hepatocytes. *Mol Pharm.* 9:3535-3542(2012).
101. Kitamura S, Maeda K, Wang Y, Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters

- in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab Dispos.* 36:2014-2023 (2008).
102. Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology.* 130:1793-1806 (2006).
103. Bi YA, Qiu X, Rotter CJ, Kimoto E, Piotrowski M, Varma MV, Ei-Kattan AF, Lai Y. Quantitative assessment of the contribution of sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) to the hepatic uptake of rosuvastatin, pitavastatin and fluvastatin. *Biopharm Drug Dispos.* 34:452-461 (2003).
104. Choi MK, Shin HJ, Choi YL, Deng JW, Shin JG, Song IS. Differential effect of genetic variants of Na(+)-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) on the uptake of HMG-CoA reductase inhibitors. *Xenobiotica.* 41:24-34 (2011).
105. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, and Sugiyama Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 34:1229–1236 (2006).
106. Vildhede A, Karlgren M, Svedberg EK, Wisniewski JR, Lai Y, Noren A, Artursson P. Hepatic uptake of atorvastatin: influence of variability in transporter expression on uptake clearance and drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 42:1210-1218 (2014).
107. Shen, H., Yang, Z., Mintier, G., Han, Y.H., Chen, C., Balimane, P., Jemal, M., Zhao, W., Zhang, R., et al.: Cynomolgus monkey as a potential model to assess drug interactions involving hepatic organic anion transporting polypeptides: in vitro, in vivo, and in vitro-to-in vivo extrapolation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 344: 673–685 (2013).

108. Takahashi, T., Ohtsuka, T., Yoshikawa, T., Tatekawa, I., Uno, Y., Utoh, M., Yamazaki, H. and Kume, T.: Pitavastatin as an in vivo probe for studying hepatic organic anion transporting polypeptide-mediated drug-drug interactions in cynomolgus monkeys. *Drug Metab. Dispos.*, 41: 1875-1882 (2013).
109. Tran JQ, Kovacs SJ, McIntosh TS, Davis HM, Martin DE. Morning spot and 24-hour urinary 6 beta-hydroxycortisol to cortisol ratios: intraindividual variability and correlation under basal conditions and conditions of CYP 3A4 induction. *J Clin Pharmacol.* 39:487-494 (1999).
110. Totsuka S, Watanabe T, Koyanagi F, Tanaka K, Yasuda M, Manabe S. Increase in urinary excretion of 6beta-hydroxycortisol in common marmosets as a marker of hepatic CYP3A induction. *Arch Toxicol.* 73:203-227 (1999).
111. Galteau MM, Shamsa F. Urinary 6beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *Eur J Clin Pharmacol.* 59:713-733 (2003).
112. Imamura Y, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Okazaki O, Izumi T, Inoue K, Yuasa H, Kusuhara H, Sugiyama Y. Prediction of fluoroquinolone-induced elevation in serum creatinine levels: a case of drug-endogenous substance interaction involving the inhibition of renal secretion. *Clin Pharmacol Ther.* 89:81-88 (2011).
113. Kato K, Mori H, Kito T, Yokochi M, Ito S, Inoue K, Yonezawa A, Katsura T, Kumagai Y, Yuasa H, Moriyama Y, Inui K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Investigation of endogenous compounds for assessing the drug interactions in the urinary excretion involving multidrug and toxin extrusion proteins. *Pharm Res.* 31:136-147(2014) .
114. Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, Moriyama Y, Inoue K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Tanabe K, Yuasa H, Sugiyama Y. N-methylnicotinamide is an endogenous

- probe for evaluation of drug-drug interactions involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther.* 92:635-641(2012).
- 115.Imamura Y, Tsuruya Y, Damme K, Heer D, Kumagai Y, Maeda K, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Izumi T, Sugiyama Y, Kusuhara H. 6 β -Hydroxycortisol is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions involving a multispecific renal organic anion transporter, OAT3/SLC22A8, in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 42:685-694 (2014).
- 116.牧野 勲 胆汁酸の腸管循環機構と機能 胆道 15 卷 15-24 (2001)
- 117.Nomura T, Chang HY, Lu R, Hankin J, Murphy RC, Schuster VL. Prostaglandin signaling in the renal collecting duct: release, reuptake, and oxidation in the same cell. *Journal of Biological Chemistry* 280:28424-28429 (2005).
- 118.鈴木悟 甲状腺ホルモン輸送信州医誌, 59 : 403-410 (2011).
- 119.Parker, C.R. Jr. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids*, 64: 640-647 (1999).
- 120.Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF. DHEA and DHEA-S: a review. *J Clin Pharmacol.* 39:327-348 (1999).
- 121.Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 145C:213-225 (2015).
- 122.Nomoto K, Arita S, Yonei Y. Development of a Model of Functional Endocrine Age in Japanese People -Serum Dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-s) Concentration as an Index of Aging- *Anti-Aging Medicine* 8:69-74 (2011).
- 123.Kullak-Ublick, G.A., Ismail, M.G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P.J. and Hagenbuch, B.: Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of

- human liver. *Gastroenterology*, 120: 525-533 (2001).
124. Treiber, A., Schneiter, R., Häusler, S. and Stieger, B.: Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 1400-1407 (2007).
125. Koenen, A., Köck, K., Keiser, M., Siegmund, W., Kroemer, H.K. and Grube, M.: Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20: 774-780 (2012).
126. Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest.* 93:1326-1331 (1994).
127. Hagenbuch B, Meier PJ. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis.* 16:129-136 (1996).
128. Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ. In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology.* 107:1781-1787 (1994).
129. Döring B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr.* 70:105-68 (2012).
130. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, Raisys VA, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther.* 271:549-556 (1994).
131. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Bacchi CE, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Perkins JD, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A

- variability after liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther.* 271:557-566 (1994).
132. Streetman DS, Bertino JS Jr, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics.* 10:187-216(200).
133. Montanini, V., Simoni, M., Chiossi, G., Baraghini, G.F., Velardo, A., Baraldi, E., Marrama, P.: Age-related changes in plasma dehydroepiandrosterone sulphate, cortisol, testosterone and free testosterone circadian rhythms in adult men. *Horm. Res.*, 29: 1-6 (1988).
134. Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann A.F. Sugiyama, Y.: Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab. Dispos.*, 34: 1575-1581 (2006).
135. Kusuhara H1, Miura M, Yasui-Furukori N, Yoshida K, Akamine Y, Yokochi M, Fukizawa S, Ikejiri K, Kanamitsu K, Uno T, Sugiyama Y. Effect of coadministration of single and multiple doses of rifampicin on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 41:206-213 (2013).

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域・薬学系教授 玉井郁巳 先生に謹んで深謝いたします。

本研究に関する終始有益な御指導と御助言をを賜りました金沢大学医薬保健研究域・薬学系准教授 中西猛夫 先生、金沢大学医薬保健研究域・薬学系助教 小森久和 先生に謹んで深謝いたします。

本研究に際し、終始温かい御支援と御協力を賜りました大日本住友製薬株式会社 前臨床研究所 船橋斉 所長、矢吹昌司 副所長に謹んで深謝いたします。

本研究に際し、終始有益な貴重な御指導と御助言を賜りました大日本住友製薬株式会社前臨床研究所 薬物動態第2グループ 渡邊貴夫 GM に謹んで深謝いたします。

本研究の遂行に多大な御協力をいただきました大日本住友製薬株式会社 前臨床薬研究所 荻原治子 さん、中峰静代 さん、伊墻万由 さんに心より感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、終始深い御理解と御協力をいただきました日本住友製薬株式会社 前臨床研究所の皆様から心から感謝いたします

本研究を実施するにあたり、深い御理解と御協力をいただきました金沢大学大学院 自然科学研究科 薬学系・金沢大学 医薬保健学域 薬物動態研究室の皆様から心から感謝いたします。

最後に、この社会人と学生の両立生活におきまして、深い理解と温かい愛情を持って、私を支援していただきました家族に心から感謝いたします。