

**サンドイッチ培養肝細胞を用いた
薬物の肝胆系動態評価に関する研究**

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

福田 元

博 士 論 文

サンドイッチ培養肝細胞を用いた 薬物の肝胆系動態評価に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻 分子作用学講座

学 籍 番 号 1023032532

氏 名 福 田 元

主任指導教員名 玉井 郁巳

目次

第1章	諸言	1
第2章	サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物の胆汁中排泄トランスポーター の推定	7
第1節	序文	7
第2節	結果	9
第1項	TA-0201CA の <i>in vivo</i> 血漿中動態および肝胆系移行動態評価	9
第2項	ラット SCH を用いた TA-0201CA の肝取り込みトランスポーターの推定	13
第3項	ラット SCH を用いた TA-0201CA の <i>in vitro</i> 肝胆移行動態評価	16
第4項	ラット SCH を用いた TA-0201CA の胆管側排泄トランスポーターの推定	18
第5項	ラット Bsep および Mrp2 発現膜ベシクルを用いた TA-0201CA の取り込み実験	23
第6項	ラット Bsep および Mrp2 発現膜ベシクルを用いた取り込み阻害実験	24
第3節	考察	25
第3章	サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる 薬物間相互作用の評価	29
第1節	序文	29
第2節	結果	31
第1項	Mrp2 を介した CDF 取り込みに及ぼす E ₂ と E ₂ 17G の影響	31
第2項	E ₂ 、E ₂ 17G、および bilirubin の CDFDA 加水分解活性に及ぼす影響	33
第3項	ラット SCH の胆管腔への CDF 蓄積に及ぼす E ₂ 曝露時間の影響	35
第4項	ラット SCH の胆管腔への CDF 蓄積に及ぼす E ₂ 曝露濃度の影響	38
第5項	Mrp2 阻害を介した薬物間相互作用に基づく細胞障害性の評価	42
第6項	ラット SCH の胆管腔への CDF 蓄積に及ぼす bilirubin 曝露の影響	43
第3節	考察	46
第4章	サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる 薬物 - 内因性物質間相互作用の評価	49
第1節	序文	49
第2節	結果	51
第1項	ヒト BSEP 発現膜ベシクルを用いた [³ H]taurocholic acid の輸送に対する CIL および CAN の影響	51
第2項	ヒト SCH における CIL の代謝プロファイル	52
第3項	ヒト SCH の細胞内 CIL、CAN 量に及ぼす代謝阻害剤の影響	53
第4項	ヒト SCH における [³ H]taurocholic acid の肝胆移行動態に及ぼす CIL 曝露の影響	54
第3節	考察	56
第5章	結論	60

第6章	実験方法	65
I	試薬	65
II	実験動物	66
III	サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物の胆汁中排泄トランスポーターの推定 (第2章)	67
IV	ラット肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物間相互作用の評価 (第3章)	76
V	ヒト肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物-内因性物質間相互 作用の評価 (第4章)	82
第7章	引用文献	86
第8章	謝辞	101

略語一覧

語句略語	語句略語内容
SCH	Sandwich-cultured hepatocytes (サンドイッチ培養肝細胞)
BEI	Biliary excretion index
QTLI	Quantitative time-lapse imaging analysis
NTCP	Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OAT	Organic anion transporter
OCT	Organic cation transporters
BSEP	Bile salt export pump
MRP	Multidrug resistance-associated protein
BCRP	Breast cancer resistance protein
MDR (P-gp)	Multidrug resistance protein (P-glycoprotein)
CYP	Cytochrome P450
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase
TA-0201	N-[6-[2-[(5-Bromo-2-pyrimidinyl)oxy]ethoxy]-5-(4-methylphenyl)-4-pyrimidinyl]-4-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl) benzenesulfonamide sodium salt
TA-0201CA	TA-0201 carboxylic acid form
CDFDA	5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate
CDF	5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
E ₂	Estradiol
E17G	Estradiol 17β-D-glucuronide

CIL	Candesartan cilexetil
CAN	Candesartan
FTC	Fumitremorgin C
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
WEM	William's medium E
HBSS	Hanks' balanced salt solution
PBS	Phosphate buffered saline
ATP	Adenosine triphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
SDR	Sprague-Dawley Rat
EHBR	Eisai Hyperbilirubinemic Rat
AUC	Area under the plasma concentration curve (薬物血中濃度 - 時間曲線下面積)
T _{1/2}	Plasma half life (血漿中半減期)
V _{dss}	Distribution volume (分布容積)
CL _{tot}	Total body clearance (全身クリアランス)
CL _{bile}	Biliary clearance (胆汁排泄クリアランス)
CL _{bile,int}	Intrinsic biliary clearance (胆汁排泄固有クリアランス)
CL _{uptake,int}	Intrinsic uptake clearance (取り込み固有クリアランス)
HPLC	High performance liquid chromatography
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
LC-MS/MS	Liquid chromatography mass spectrometry

LSC	Liquid scintillation counter (液体シンチレーションカウンター)
FDA	Food and Drug Administration (アメリカ食品医薬品局)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際 会議)
ITC	International Transporter Consortium
DDI	drug-drug interaction (薬物間相互作用)

第1章 緒言

医薬品の研究開発において、候補化合物の有効性や安全性を担保するため、ヒトあるいは実験動物における体内動態を *in vitro/in vivo* 実験により評価することが必須である。特に薬物の体内からの消失は、その滞留性を決定付けることから、薬理作用や副作用の発現に大きく影響する特に重要なプロセスと言える。薬物の主要な消失臓器の一つとして肝臓が挙げられる。肝臓における薬物の消失は、第1相（酸化、還元反応など）および第2相（グルクロン酸抱合、硫酸抱合、グルタチオン抱合など）代謝と、第3相代謝とも称される胆汁中排泄に分けられる。これまで薬物の体内からの消失については、代謝に関する研究に主眼が置かれてきた。代謝により消失する薬物に関してはヒト肝ミクロソームあるいはヒト肝細胞等を用いた実験により、ヒトにおける代謝プロファイルあるいは代謝クリアランスを比較的精度良く予測する方法がすでに確立されている^{1) 2)}。しかし近年、医薬品研究開発の初期段階において多数の化合物の代謝的安定性を高速に評価する **high-throughput screening** が一般化されたことにより、代謝的により安定な化合物が選抜されるようになり、胆汁中排泄が薬物の消失に大きく関わるケースが増えてきている^{3) 4)}。実際に多くの薬物が動物あるいはヒトにおいて胆汁中に排泄されることが報告されており^{5) 6)}、胆汁中排泄は薬物の体内からの主要な消失経路の一つとしてその重要性が増している。薬物の胆汁中排泄には肝臓に発現するトランスポーターが重要な働きを担っている。血液から肝細胞への取り込みを担う主なトランスポーターとして血管側膜に発現する Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP ; SLC10A1)、organic anion-transporting polypeptides (OATPs ; SLCO family)、organic anion transporters (OATs ; SLC22A family)、organic cation transporters (OCTs ; SLC22A family) などが挙げられる。同様に、肝細胞から胆汁中への排泄を担う主なトランスポーターとして胆管側膜に発現する multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2 ; ABCG2)、breast cancer resistance protein (BCRP ; ABCG2)、bile salt export pump

(BSEP ; ABCB11)、P-glycoprotein (P-gp、product encoded by MDR ; ABCB1)、multidrug and toxin extrusion (MATE ; SLC47A family) などが挙げられる (Fig. A) ⁷⁾。

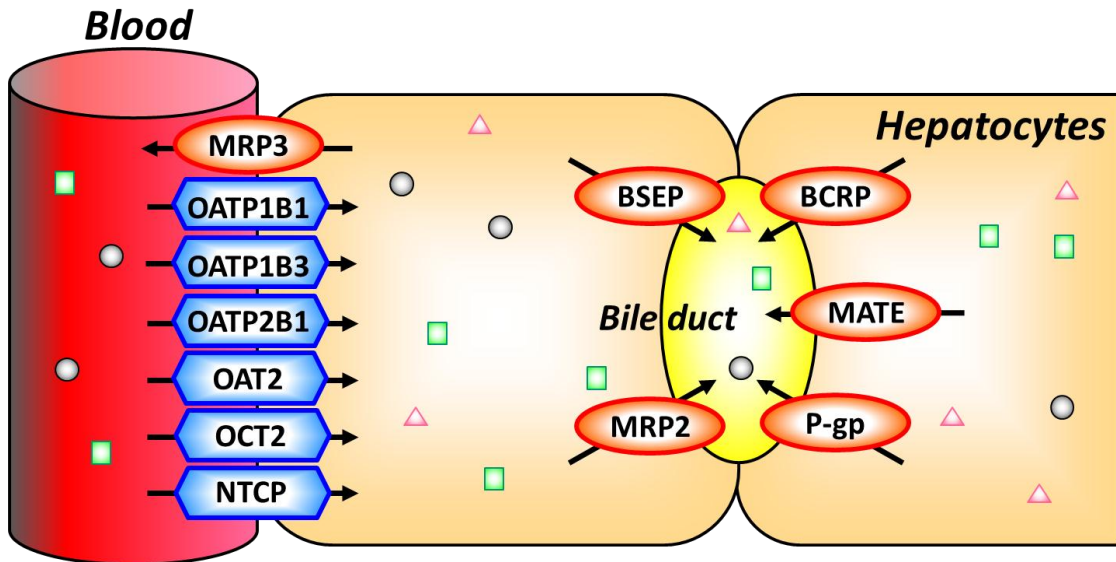


Fig. A Drug transporters expressed in human hepatocytes.

これらのトランスポーターは薬物および内因性物質の体内動態に大きく関与しており、その遺伝子多型や活性変動は薬理作用あるいは副作用に影響を及ぼし、重篤な遺伝病の原因にもなり得ることが知られている。例えば、MRP2 の遺伝子多型による機能欠損は、抱合型 bilirubin の胆汁中排泄を低下させるため高 bilirubin 血症を伴う慢性黄疸を主症状とする Dubin-Johnson 症候群の原因とされている ⁸⁾。また遺伝子多型や薬物間相互作用 (drug-drug interaction、DDI) によるトランスポーターの活性変動が、併用薬の薬理作用や副作用を大きく変動させることがある。例えば OATP1B1 の遺伝子多型による活性低下は、インスリン分泌促進薬である repaglinide の肝取り込みクリアランスを低下させるため、血中濃度の上昇を引き起こし、血糖降下作用を増強する ⁹⁾。また、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 rosuvastatin と免疫抑制薬 cyclosporine A との併用では、cyclosporine A による有機アニオントランスポー

ターOATPsの阻害により rosuvastatin の血中濃度が大幅に上昇することから、両薬剤の併用は禁忌とされている^{10) 11)}。このように、肝臓に発現するトランスポーターを介した薬物間相互作用や薬物 - 内因性物質間相互作用は、ときに重篤な副作用の発現につながることから、臨床現場における大きな問題となり得る。したがって、医薬品の研究開発段階においては、候補化合物の肝取り込みまたは胆汁排泄を含めた肝胆移行動態を理解することは重要であり、それはすなわち、候補化合物の胆汁排泄クリアランスやそのメカニズム、あるいは胆汁排泄過程における DDI や薬物 - 内因性物質間相互作用などを正確に把握することにほかならない。

これまでに薬物の肝胆移行動態を評価するためのいくつかの実験系が報告されている。肝取り込みの評価系としては遊離肝細胞¹²⁾、トランスポーター発現培養細胞¹³⁾、トランスポーター発現 oocytes¹³⁾、integration plot 法¹⁴⁾などが挙げられ、また、胆汁中排泄の評価系としては胆管側膜ベシクル¹⁵⁾、*in situ* 肝灌流法¹⁶⁾、トランスポーター機能欠損動物¹⁷⁾などが挙げられる。しかしながらこれらの方法にはスループットやコスト等の利便性の面、あるいは *in vivo* 環境を十分に反映していないなどそれぞれに課題があり、医薬品研究開発の初期段階から活用できる評価系の構築が望まれている。これらの観点では、初代培養肝細胞は肝取り込みや代謝などの多様な肝機能を維持しており、肝胆系移行動態の *in vitro* 評価系になり得ると期待される¹⁸⁾。しかし単離後の肝細胞は急速に細胞としての極性を失うことが知られており、さらに細胞をプレート上で単層培養することによりアルブミン分泌能、肝細胞の取り込み活性、代謝酵素活性などの肝特異的な機能が低下するといった問題点が挙げられる^{19) 20)}。このような背景の中、肝細胞をコラーゲンゲルにて重層培養したサンドイッチ培養条件にすることで肝細胞の三次元構造が形成され、肝機能が比較的長期間維持されることが報告された¹⁹⁾。さらにサンドイッチ培養条件では細胞としての極性が回復し、胆管腔の形成とともに胆管側膜上に排泄トランスポーターが局在化することが示された²¹⁾。Brouwer らのグループはサンドイッチ培養肝細胞 (sandwich-cultured hepatocytes、SCH)²²⁾。

を薬物の胆汁中排泄評価に応用した^{23) 24)}。彼らの提唱した方法論の特徴として、胆管腔を維持するために必要なタイトジャンクション機能を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在の有無によって調節しながら薬物の取り込み量を評価する点が挙げられる。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下では「細胞質+胆管腔」の薬物量が得られ、一方で $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非存在下では胆管腔の tight junction の開口により「細胞質のみ」の薬物量が得られる。したがって、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下の取り込み量から $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非存在下の取り込み量を差し引くことにより、胆管腔における薬物量を得ることができる。これに基づき Brouwer らは胆管側トランスポーターによる排泄能の指標として、以下の式により算出した Biliary Excretion Index (BEI%) を提唱した (Fig. B)²⁴⁾。

$$\text{BEI} = \frac{\text{「胆管腔」中薬物量}}{\text{「細胞質」} + \text{「胆管腔」中薬物量}} \times 100$$

$$= \frac{\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} \text{ 存在下の取り込み量} - \text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} \text{ 非存在下の取り込み量}}{\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} \text{ 存在下の取り込み量}} \times 100$$

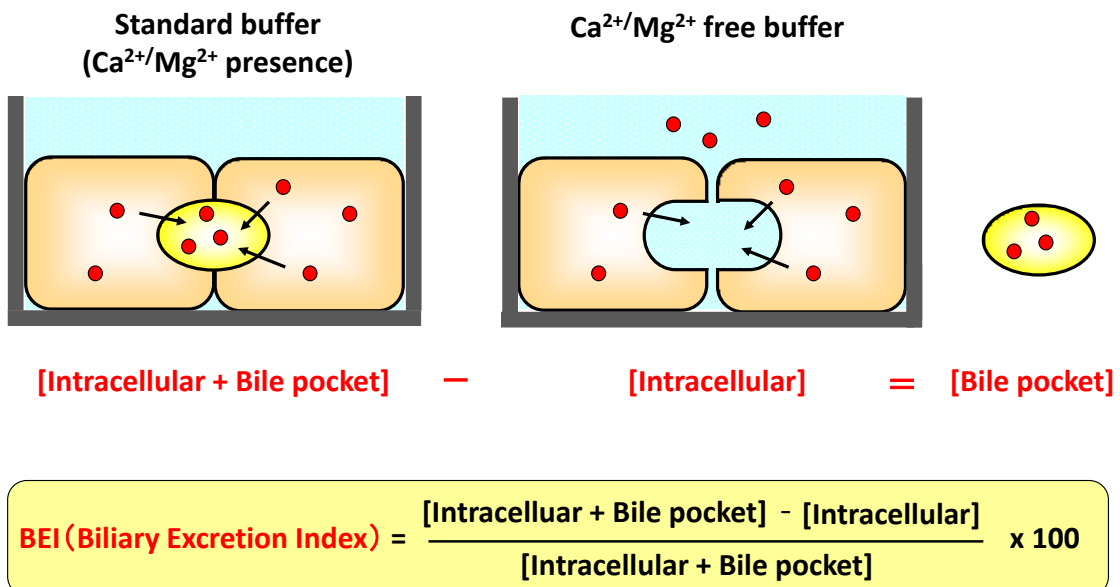


Fig. B Determination of BEI in SCH.

これまでに筆者らの研究グループでは、ラット SCH を用いて医薬品の胆汁排泄クリアランスの *in vitro-in vivo* 相関性について検証し、ラット SCH から求めた胆汁排泄クリアランスが *in vivo* クリアランスを良好に反映することをすでに報告している (Fig.C)²⁵⁾。本報告は、BSEP、MRP2、BCRP といった主要な排泄トランスポーターの基質を複数用いており、さらに非標識体での評価が可能な系を構築したという点で、医薬品研究開発への応用の可能性を広く示したものであった。その後も、多くの研究グループから *in vitro* 胆汁排泄評価系としての SCH の応用に関する報告がなされている^{4) 26)}。

本学位論文研究では SCH の医薬品研究開発への応用性についてさらに検討を行い、その成果を以下の 3 章にまとめた。

第2章 サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物の胆汁中排泄トランスポーターの推定

第3章 サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物
間相互作用の評価

第4章 サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物 -
内因性物質間相互作用の評価

最後に、これらの検討から得られた知見と、医薬品研究開発への SCH の応用に関しての今後の展望について、結論としてまとめた。

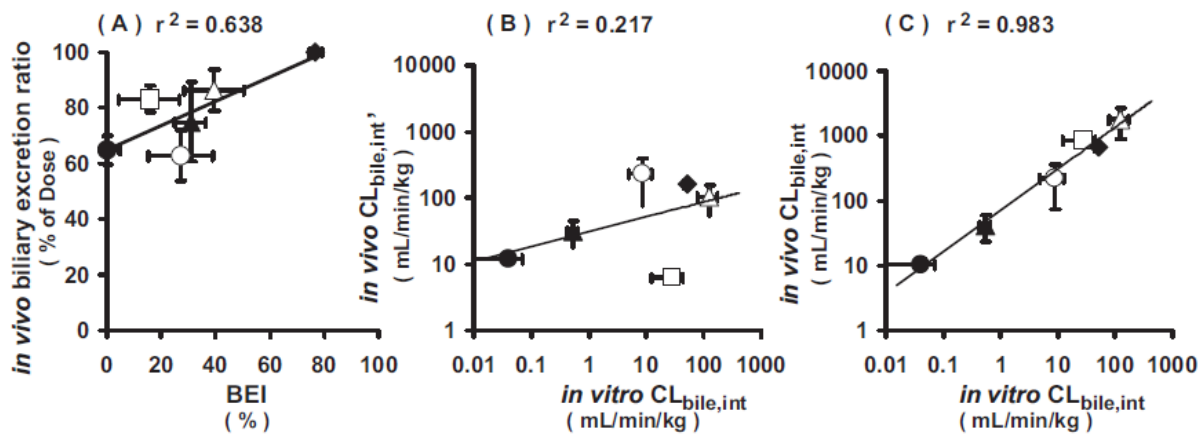


Fig. C *In vitro-in vivo* correlation of kinetic parameters for biliary excretion in rats

(Fukuda et al., 2008)²⁵ .

The correlation was assessed between BEI obtained from SCH and *in vivo biliary excretion ratio* (A), and intrinsic biliary clearance between *in vitro* and *in vivo* with six compounds. *In vivo* intrinsic biliary clearance was calculated on the basis of plasma total (B) or unbound concentrations (C).

第 2 章 サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物の胆汁中排泄トランスポーターの推定

第1節 序文

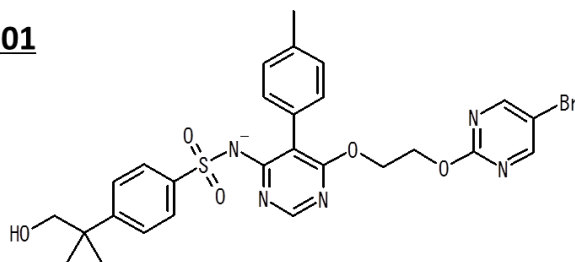
近年、より安全性の高い医薬品を臨床の現場に届けるため、ヒト代謝物の安全性評価が重視されている。ヒト代謝物の安全性評価については 2008 年に米国食品医薬局 (FDA) から Metabolite in Safety Test (MIST) ガイダンスが発行され²⁷⁾、未変化体の血中暴露に対して 10%以上存在する代謝物の評価が必要となった。続いて 2009 年には日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) による M3 (R2) ガイドラインが発行され²⁸⁾、代謝物の臨床での暴露量が、投与薬物に関連する総ての物質の暴露量の 10%を超え、かつ、ヒトにおける暴露量が毒性試験での最大暴露量よりも高い場合は、該当する代謝物の安全性を担保するための非臨床試験の実施が必要となった。医薬品の安全性に大きく影響する薬物動態特性として、体内からの消失が挙げられ、その消失メカニズムを明確にすることは、特に薬物間相互作用 (DDI) や遺伝子多型による薬物動態変動予測・回避の観点から重要である。例えば、単一の消失経路しか持たない薬物の場合、DDI や病態進行などで消失経路が影響を受けることにより、その体内動態が大きく変動するリスクがある。また消失に関わる分子の遺伝子多型の影響をより強く受けることから、臨床における個体差が生じやすく、予期せぬ副作用の発生につながる。したがって、体内からの消失に複数経路あるいは分子種が関与することが医薬品候補化合物にとってより望ましいプロファイルであると判断される。

N-[6-[2-[(5-Bromo-2-pyrimidinyl)oxy]ethoxy]-5-(4-methylphenyl)-4-pyrimidinyl]-4-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl) benzenesulfonamide sodium salt (TA-0201) は強力な薬理活性を持つ非ペプチド性のエンドセリン (ET) 受容体拮抗薬である。TA-0201 は ET_A 受容体に対して高い親和性と選択性を示し (ET_A に対する K_i 値: 0.015 ± 0.004 nM、ET_B に対する K_i 値: 41 ± 21 nM)、ET 前駆体誘発の昇圧作用に対して 0.01-10 mg/kg の投与量で抑制効果を示した²⁹⁾。TA-0201

はラットに経口投与後、主にカルボン酸体 (TA-0201CA) に代謝され、血漿、あるいは腎臓、肺、心臓などの薬理標的組織にはTA-0201CAが未変化体以上の濃度で検出された (Fig. 1-1)³⁰⁾。また TA-0201CA はヒト ET_A 受容体に対して強い阻害活性を示し、その K_i 値は 0.34 ± 0.20 nM であったことから、TA-0201CA は活性代謝物としてラットにおける薬理作用に大きく寄与することが示唆された (Yamauchi-Kohno R, Aihara H, unpublished observation)。近年の代謝物評価の動向を考慮すると、TA-0201 を候補化合物として開発するに際しては、未変化体の TA-0201 のみならず、その活性代謝物 TA-0201CA についても体内からの消失メカニズムを精査する必要があると言える。過去の検討において、TA-0201 を胆管カニュレーション処置ラットに静脈内投与した結果、投与量の大部分が TA-0201CA として胆汁中に排泄され、未変化体としての排泄量は無視できる程度であった (Kohno M, Kimura T, Ohashi N, unpublished observation)。この結果から、TA-0201 は大部分が TA-0201CA に代謝され、胆汁中に排泄されることが示された。また、TA-0201 の代謝に関しては、ヒト肝ミクロソームを用いた検討により主に CYP3A4/5 が関与していることが示されている³¹⁾。しかしながら薬理活性本体である TA-0201CA の胆汁中排泄のメカニズムについては未だ明らかになっていない。

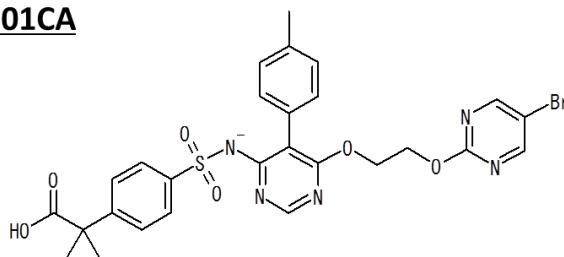
本章では TA-0201CA のラットにおける肝胆系移行のメカニズムの解明を試みた。これまでの体内動態特性や化学構造、トランスポーターの特性から Mrp2 の関与が想定された。そこで胆管側排泄トランスポーターMrp2 の関与を明らかにするため、Mrp2 を先天的に欠損した Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) と野生型 Sprague-Dawley rats (SDR) との TA-0201CA の薬物動態特性を比較した^{32) 33)}。また *in vitro* 試験として、これら両系統から単離した肝細胞より調製した SCH を用いた解析を行った。

TA-0201



Metabolism ↓ CYP3A4/5

TA-0201CA



Biliary Excretion ↓ Unknown ?

Fig. 1-1 Chemical structure and elimination pathways of endothelin receptor antagonist

TA-0201 and its carboxylic acid form TA-0201CA.

第2節 結果

第1項 TA-0201CA の *in vivo* 血漿中動態および肝胆系移行動態評価

胆管カニュレーション処置をした SDR および EHBR に、TA-0201CA を 1 mg/kg で静脈内投与時の血漿中濃度推移と胆汁中排泄推移を **Fig. 1-2** に示した。またこの際の薬物速度論的パラメータを **Table 1-1** に示した。SDR と比較して EHBR では高い血中濃度レベルを示した。また EHBR の全身クリアランスは SDR の約 10% と低値を示した、分布容積に有意な差は認められなかった。また投与後 180 分までの累積胆汁中排泄率は SDR で 97.5% であったのに対し、EHBR では 46.8% であった。全身クリアランスと胆汁中排泄率から算出した EHBR の胆汁排泄クリアランスは、SDR の 10% 以下であった。以上より、TA-0201CA の胆汁中排泄

には Mrp2 が関与していることが示された。一方, EHBR においても胆汁排泄が認められたことから、TA-0201CA の胆汁中排泄には Mrp2 以外のトランスポーターも関与していることが示された。

さらに SDR に TA-0201CA を 1 mg/kg で静脈内投与後、3 時間における肝臓中/血漿中遊離形薬物濃度比 ($K_{p,unbound}$) は 46.0 であり、肝臓への濃縮的な取り込みが観察された (Table 1-2)。これらの結果から、TA-0201CA は血管側の取り込みトランスポーターを介して肝臓中に取り込まれ、Mrp2 とその他の排泄トランスポーターにより胆汁中に排泄されることが示された。

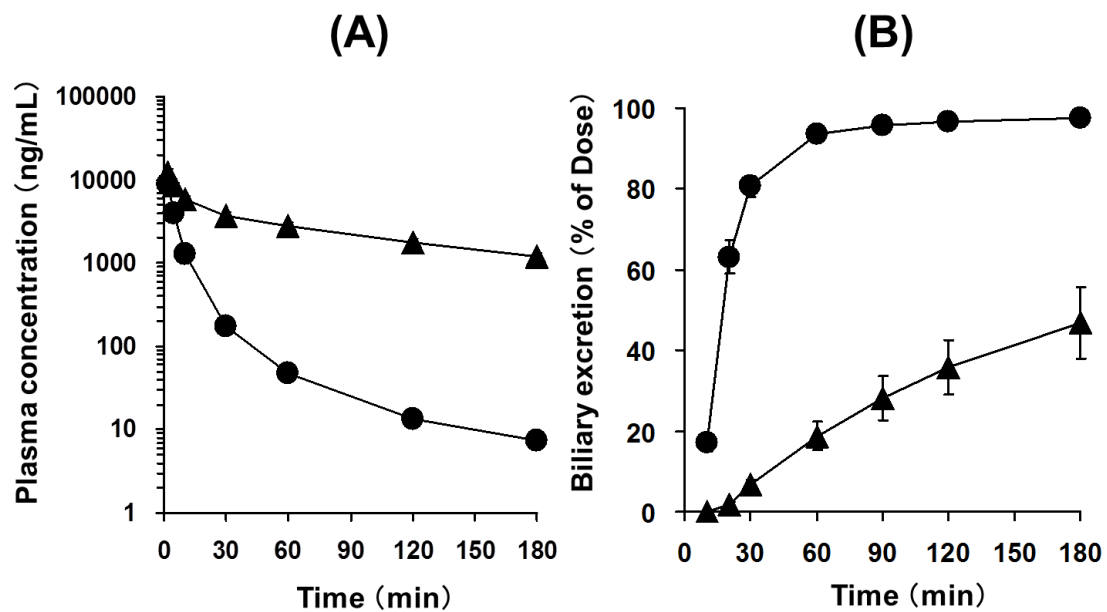


Fig. 1-2 Plasma concentration–time profile (A) and cumulative biliary excretion (B) of TA-0201CA.

TA-0201CA was intravenously administered to bile duct-cannulated SDR (closed circle) and EHBR (closed triangle) at a dose of 1 mg/kg. Data are shown as the mean \pm S.E.M. (N = 3 animals).

Table 1-1 Pharmacokinetic and biliary excretion parameters of TA-0201CA in SDR and EHBR.

TA-0201CA was intravenously administered to bile duct-cannulated SDR at a dose of 1 mg/kg. Data are shown as the mean \pm S.E.M. (N = 3 animals); *, $p < 0.05$ versus SDR.

	SDR	EHBR
Pharmacokinetic parameters		
$t_{1/2}$ (min)	34.4 \pm 1.1	93.3 \pm 3.8 *
AUC ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	76.2 \pm 12.1	681.1 \pm 56.8 *
CL_{tot} (mL/min/kg)	14.0 \pm 2.7	1.5 \pm 0.2 *
MRT (min)	9.7 \pm 0.7	119.5 \pm 6.8 *
V_{dss} (mL/kg)	134.2 \pm 23.2	181.5 \pm 18.0
f_p	0.004	0.004
Biliary excretion parameters		
Excretion ratio _{0-180 min} (% of dose)	97.5 \pm 1.8	46.8 \pm 8.9 *
CL_{bile} (mL/min/kg)	13.6 \pm 2.3	0.9 \pm 0.1 *
$\text{CL}_{\text{bile,int}}$ (L/min/kg)	4347.7 \pm 946.2	227.7 \pm 27.3 *

Table 1-2 Liver/plasma concentration ratio (K_p) of TA-0201CA after intravenous administration of TA-0201CA to SDR at the dose of 1 mg/kg.

The concentrations of TA-0201CA in plasma and liver were determined at 3 hours after administration, and liver/plasma concentration ratio (K_p) values were calculated. Data are shown as the mean \pm S.E.M. (N = 3 animals).

	Concentration (ng/mL)		Unbound fraction
	Total	Unbound	
Plasma	254.1 \pm 94.4	1.0 \pm 0.4	0.004
Liver	2996.2 \pm 700.2	41.9 \pm 9.8	0.014
K_p (Liver/Plasma)	13.1 \pm 1.9	46.0 \pm 6.8	-

第2項 ラット SCH を用いた TA-0201CA の肝取り込みトランスポーターの推定

TA-0201CA のラットにおける肝取り込みトランスポーターの推定を目的として、SDR から単離・調製したラット SCH を用いて TA-0201CA の取り込みを評価した。Ntcp の関与については Na⁺依存性を指標に³⁴⁾、それ以外のトランスポーターの関与についてはそれぞれの典型的基質あるいは阻害剤併用の影響を指標に判断した。試験に用いた各トランスポーターの基質または阻害剤を **Table 1-3** に示した。ラット SCH への TA-0201CA の取り込みは Na⁺枯渇条件下で有意に低下した。また、TA-0201CA の取り込みは taurocholic acid、estradiol 17β-D-glucuronide (E₂17G) および glycyrrhizin 共存下で有意に低下し、一方で、digoxin、tetraethylammonium (TEA)、ketoprofen 共存下では顕著な影響を受けなかった (**Fig. 1-3**)。Na⁺依存的な取り込みが観察されたこと、また taurocholic acid 存在下で取り込みが阻害されたことから、TA-0201CA の肝取り込みには Ntcp が関与することが示唆された。また、E₂17G および glycyrrhizin 存在下で取り込みが阻害されたことから Oatps の関与が示唆された。一方で、Oatp1a4 をほぼ完全に阻害する 10 μM digoxin の影響を受けなかったことから Oatp1a4 の関与は低いと推察された。さらに ketoprofen、TEA の影響を受けなかったことから、Oats、Octs の関与は低いと推察された。以上の結果をまとめると、TA-0201CA は Ntcp、Oatps を含む複数のトランスポーターにより肝臓に取り込まれることが示唆された。

Table 1-3 Substrates/inhibitors of sinusoidal uptake transporters.

Transporter	Substrate/Inhibitor	Concentration (μM)
Ntcp	Taurocholic acid ³⁴⁾	30
Oatps	E ₂ 17G ³⁵⁾	100
Oatps	Glycyrrhizin ³⁶⁾	30
Oatps	Digoxin ³⁷⁾	10
Octs	TEA ³⁸⁾	200
Oats	Ketoprofen ³⁹⁾	30

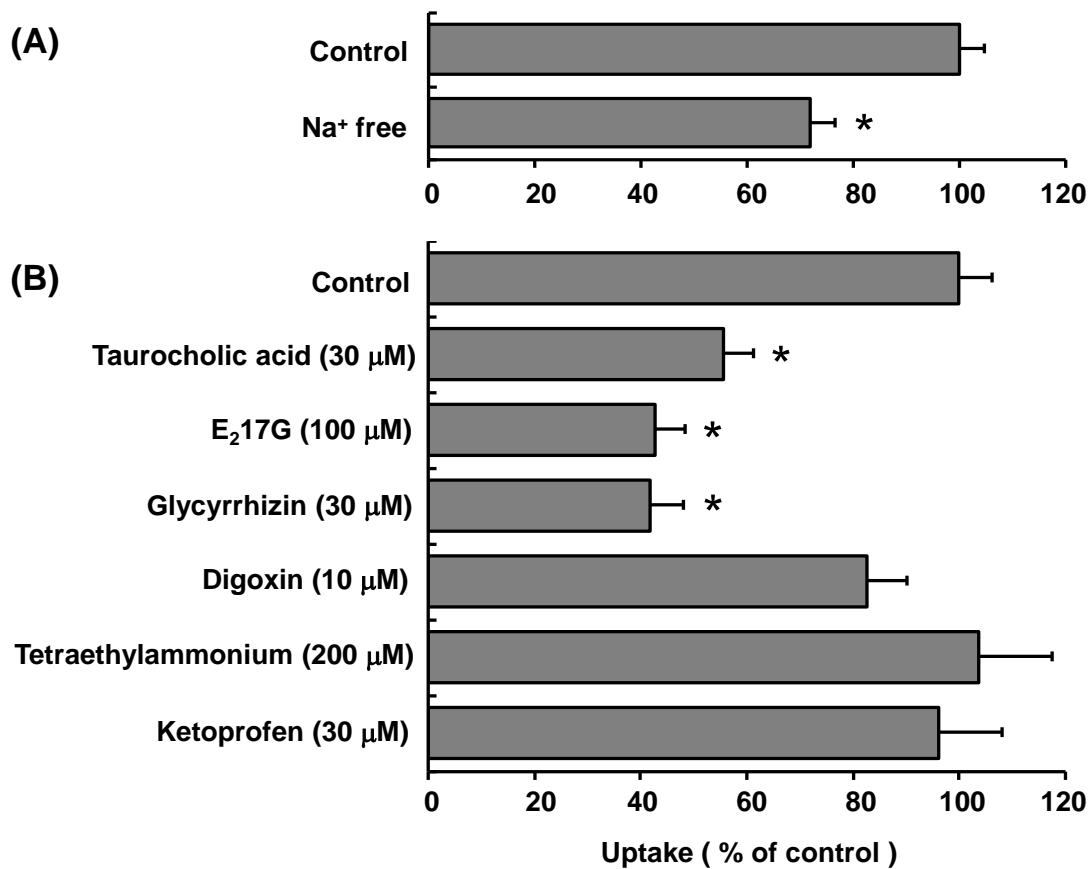


Fig. 1-3 Effect of Na⁺ depletion (replaced by choline, A) and excessive substrates or inhibitors of sinusoidal uptake transporters (B) on the TA-0201CA (1 μM) uptake into SCH from SDR.

After preincubation of rat SCH in standard buffer for 10 min, rat SCH were incubated with TA-0201CA in the presence or absence of inhibitors. The amount of uptake was evaluated at 10 min. Data are shown as the mean ± S.E.M. (N = 6 livers for control and N = 3 livers for the others); *, $p < 0.05$ versus control.

第3項 ラット SCH を用いた TA-0201CA の *in vitro* 肝胆移行動態評価

事前検討として SDR または EHBR から単離・調製したラット SCH を用いて、Mrp2 基質である [³H] E₂17G の BEI を測定した⁴⁰⁾。SDR および EHBR における BEI はそれぞれ 26.5 ± 5.2% および 5.0 ± 5.7% (means ± SD) であり、EHBR において TA-0201CA の胆汁排泄は顕著に低下した。この結果は EHBR における Mrp2 の機能欠損を反映しており、過去に報告された Mrp2 機能欠損 TR⁻ラットを用いた SCH と *in vivo* 動態の比較結果とよく一致した⁴¹⁾。以上の結果から、SDR と EHBR から単離・調製した SCH における BEI の比較によって、胆汁排泄における Mrp2 の関与を推定できるものと考えられた。

次に、SDR と EHBR から単離・調製した SCH を用いて TA-0201CA の肝胆系移行動態を評価し、比較した (Fig. 1-4)。SDR における TA-0201CA の肝取り込み固有クリアランス (CL_{uptake,int})、胆汁排泄固有クリアランス (CL_{bile,int})、BEI はそれぞれ 59.6 ± 5.7 μL/min/mg protein、33.4 ± 4.0 μL/min/mg protein、36.7 ± 2.0% であり、EHBR では 41.9 ± 2.4 μL/min/mg protein、19.0 ± 1.5 μL/min/mg protein、24.9 ± 1.4% であった。SDR と比較して EHBR において BEI は低値を示したことから、TA-0201CA の胆汁排泄には Mrp2 が関与していることが *in vitro* 試験系において示され、*in vivo* における結果と一致した。また EHBR では CL_{uptake,int} が低下したことから、CL_{bile,int} の低下には血管側膜を介した肝取り込みの低下と胆管側膜を介した細胞内から胆管腔中への排泄の低下の両者が寄与していると推察された。

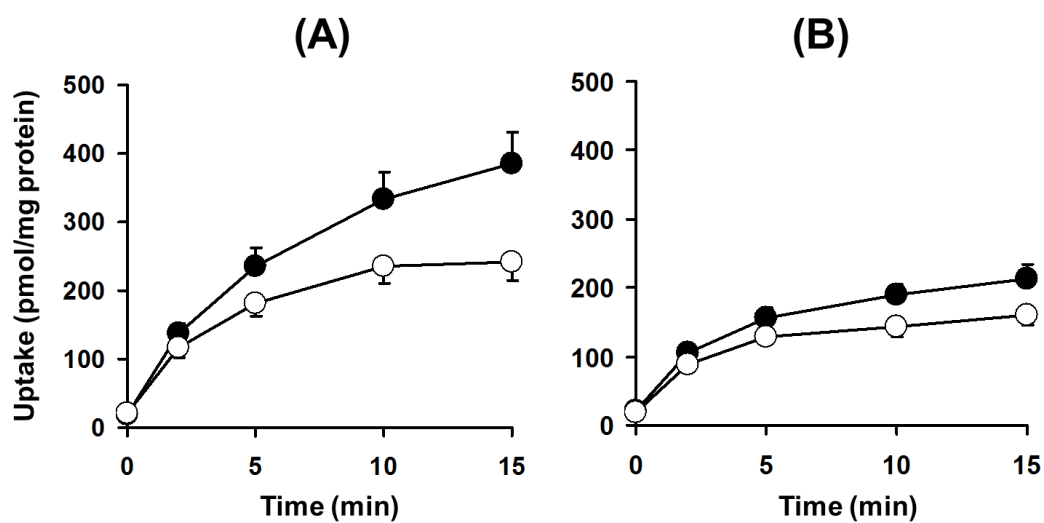


Fig. 1-4 Cumulative uptake of TA-0201CA in SCRH from SDR (A) and EHBR (B).

TA-0201CA (1 μ M) was incubated in standard buffer (closed circle) and Ca²⁺/Mg²⁺-free buffer (open circle). Data are shown as the mean \pm S.E.M. (N = 6 livers).

第4項 ラットSCHを用いたTA-0201CAの胆管側排泄トランスポーターの推定

事前検討として、胆管側排泄トランスポーターの基質と阻害剤を用いて、SDRから単離・調製したラットSCHにおける各排泄トランスポーターを阻害する試験条件の設定を行った。条件設定に用いたトランスポーターの典型的基質と阻害剤の組み合わせをTable 1-4に示した。

いずれの阻害剤も濃度依存的にそれぞれの基質のBEIを低下させた(Fig. 1-5)。GlibenclamideとMK-571は30 μMにおいてそれぞれBsep、Mrp2をほぼ完全に阻害した。またfumitremorgin C (FTC)は3 μMでBcrpを約75%、verapamilは30 μMでP-gpを約61%阻害し、その阻害効果はこの濃度で最大に達した。以上より、これらの濃度を各トランスポーターの阻害剤濃度として設定した。

Table 1-4 Typical substrates and inhibitors of canalicular efflux transporters.

Transporter	Substrate	Inhibitor
Bsep	[³ H]Taurocholic acid ⁴²⁾	Glibenclamide ⁴³⁾
Mrp2	[³ H] E ₂ 17G ⁴⁰⁾	MK-571 ⁴⁴⁾
Bcrp	Pitavastatin ⁴⁵⁾	FTC ⁴⁶⁾
P-gp	[³ H]Digoxin ⁴⁷⁾	Verapamil ⁴⁸⁾

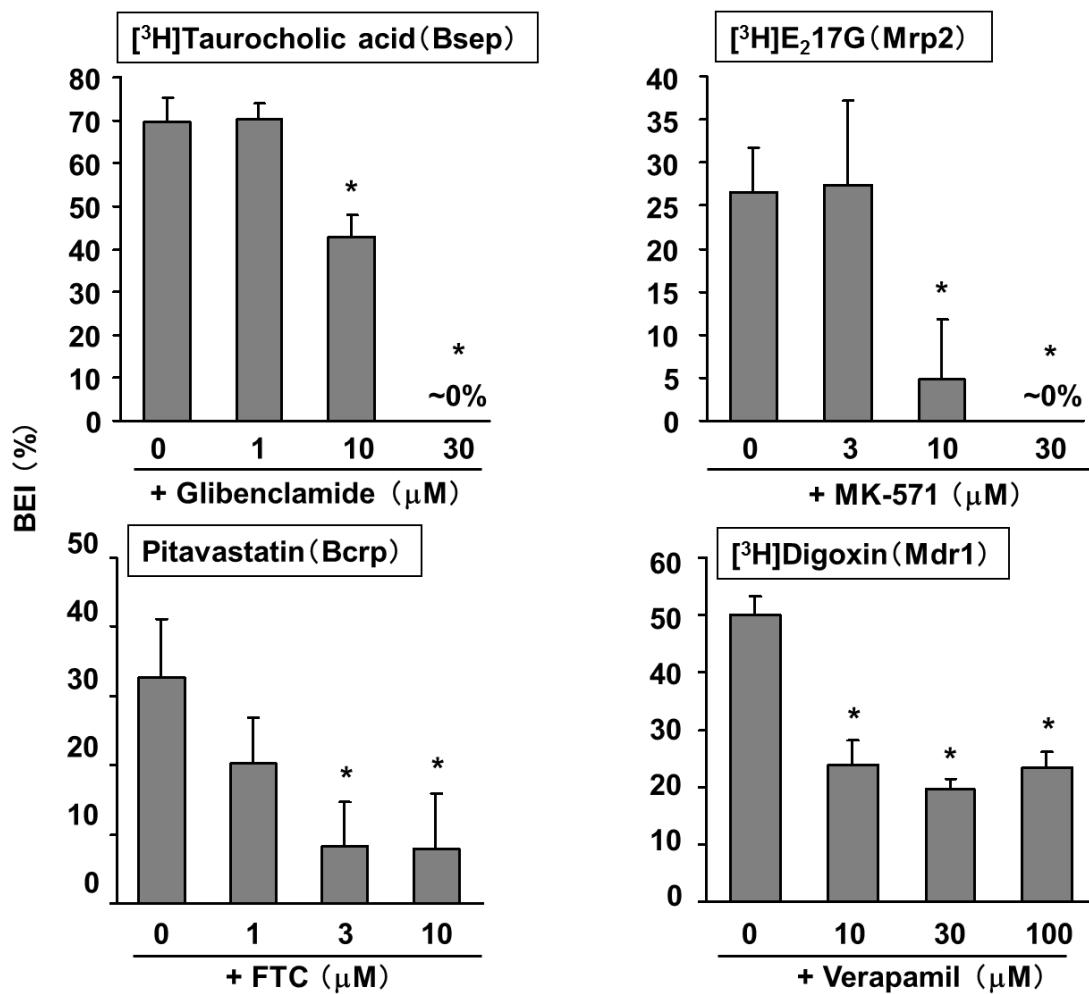


Fig. 1-5 Concentration-dependent inhibition of canalicular efflux transporters in SCRH from SDR.

Typical substrates (1 μM) were incubated with corresponding inhibitors in standard and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free buffers in rat SCH. BEI was calculated according to Materials and Methods. Data are shown as the mean \pm SD of triplicate determinations (N = 1 liver); *, $p < 0.05$ versus control.

次に、SDR と EHBR から単離・調製した SCH を用いて、TA-0201CA の胆管腔への排泄に対する各トランスポーター阻害剤の影響を評価した (Fig. 1-6)。SDR において、glibenclamide と MK-571 は TA-0201CA の BEI をそれぞれ 56.1、62.2%低下させた。また、FTC と verapamil は有意ではなかったものの僅かな低下を示した。これらの結果から、SCH における TA-0201CA の胆管側への排泄には主に Bsep と Mrp2 が関与していることが示唆された。EHBR にて同様の検討を行った結果、glibenclamide と MK-571 は TA-0201CA の BEI をそれぞれ 63.1、48.3%低下させ、また FTC は有意ではないが僅かな低下を示し、verapamil は低下を示さなかったことから、EHBR においても Bsep の関与が示され、SDR と一致した結果が得られた。興味深いことに Mrp2 が発現していない EHBR において MK-571 による BEI の低下が認められた。そこで、MK-571 の排泄トランスポーターに対する選択性を確認するため、SDR から単離・調製した SCH を用いて、 $[^3\text{H}]$ taurocholic acid の BEI に対する MK-571 の影響を評価した (Fig. 1-7)。その結果、 $[^3\text{H}]$ taurocholic acid の BEI は MK-571 の濃度依存的に低下したことから、Mrp2 阻害剤として用いた MK-571 は Bsep を阻害することが示された。

以上の結果より、ラット SCH における TA-0201CA の胆管腔への排泄には Mrp2 に加えて Bsep が関わることが示された。

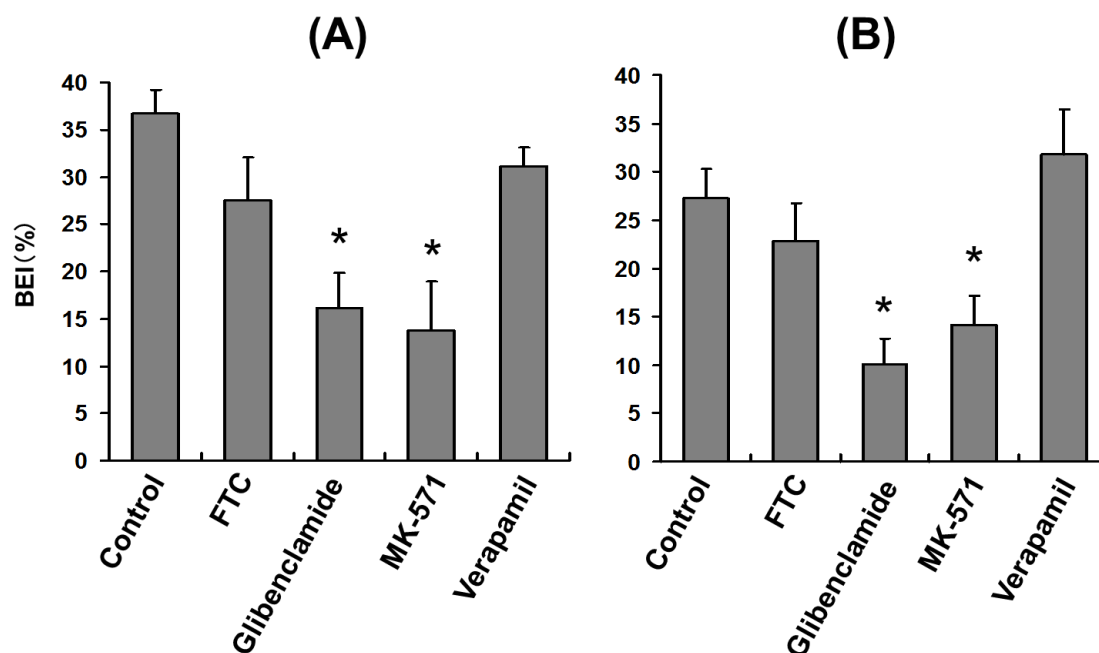


Fig. 1-6 Effect of canalicular efflux transporter inhibitors on the BEI of TA-0201CA (1 μ M) in SCH from SDR (A) and EHBR (B).

The concentration of each inhibitor is as follows, FTC: 3 μ M, glibenclamide: 30 μ M, MK-571: 30 μ M, verapamil: 30 μ M. Data are shown as the mean \pm S.E.M. (N = 3 and 6 livers for SDR and EHBR, respectively); *, $p < 0.05$ versus control.

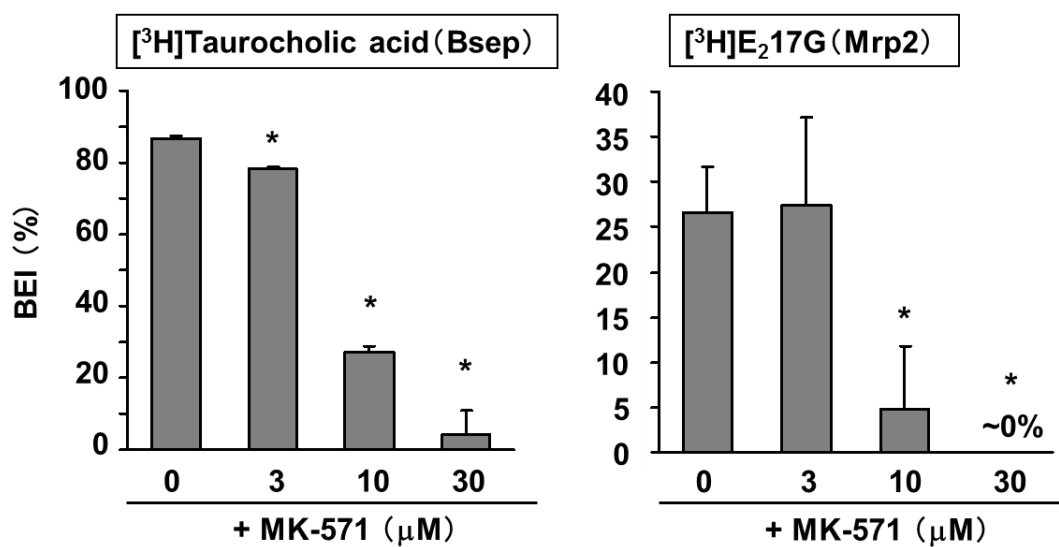


Fig. 1-7 Concentration-dependent inhibition of Mrp2 and Bsep by MK-571 in SCH from

SDR.

Typical substrates (1 μM) were pre- and co-incubated with MK-571. Data are shown as the

mean ± SD of triplicate determinations (N = 1 liver); *, $p < 0.05$ versus control.

第5項 ラット Bsep および Mrp2 発現膜ベシクルを用いた TA-0201CA の取り込み実験

TA-0201CA の胆汁排泄におけるトランスポーターの関与を分子レベルで実証するため、ラット Bsep、Mrp2 の発現膜ベシクルを用いて、TA-0201CA の ATP 依存的な取り込みを評価した (Fig. 1-8)。その結果、TA-0201CA の Bsep 発現膜ベシクルへの取り込みは観察されたが、Mrp2 発現膜ベシクルへの取り込みは観察されなかった。

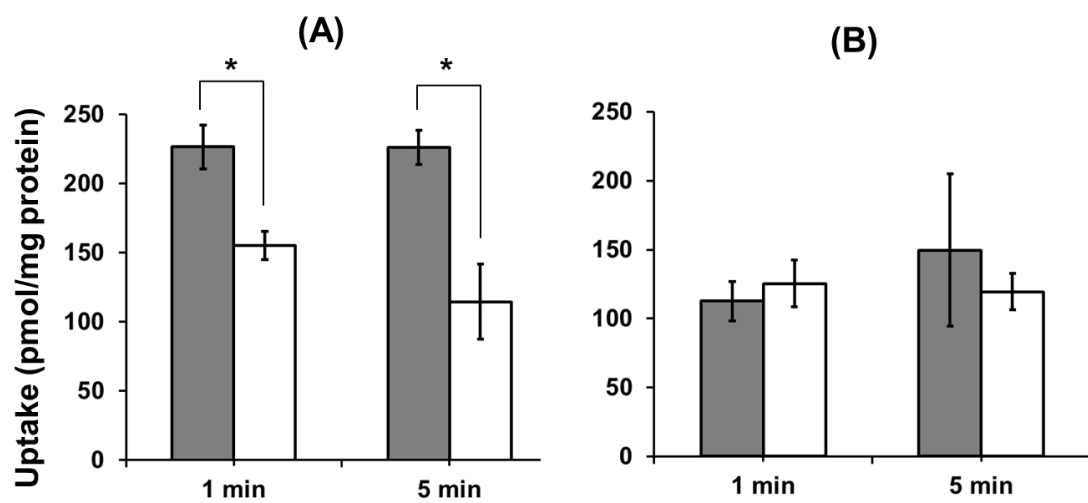


Fig. 1-8 TA-0201CA uptake into rat Bsep (A) or Mrp2 (B) -expressing membrane vesicles.

Uptake was measured in the presence of ATP (grey column) or AMP (white column) for 1 and 5 min at 37°C. Data are shown as the mean \pm SD (N = 3) ; *, $p < 0.05$ ATP versus AMP.

第6項 ラット Bsep および Mrp2 発現膜ベシクルを用いた取り込み阻害実験

TA-0201CA の Bsep あるいは Mrp2 への親和性を簡易的に評価するため、Bsep、Mrp2 発現膜ベシクルを用いて、それぞれの典型的な基質 ^3H taurocholic acid、 ^3H E₂17G の取り込みに対する TA-0201CA の影響を評価した (Fig. 1-9)。その結果、TA-0201CA は Bsep と Mrp2 のいずれに対しても濃度依存的な阻害を示し、それぞれに対する IC₅₀ は 211.5 ± 1.5 および 57.1 ± 1.2 μM と算出された。

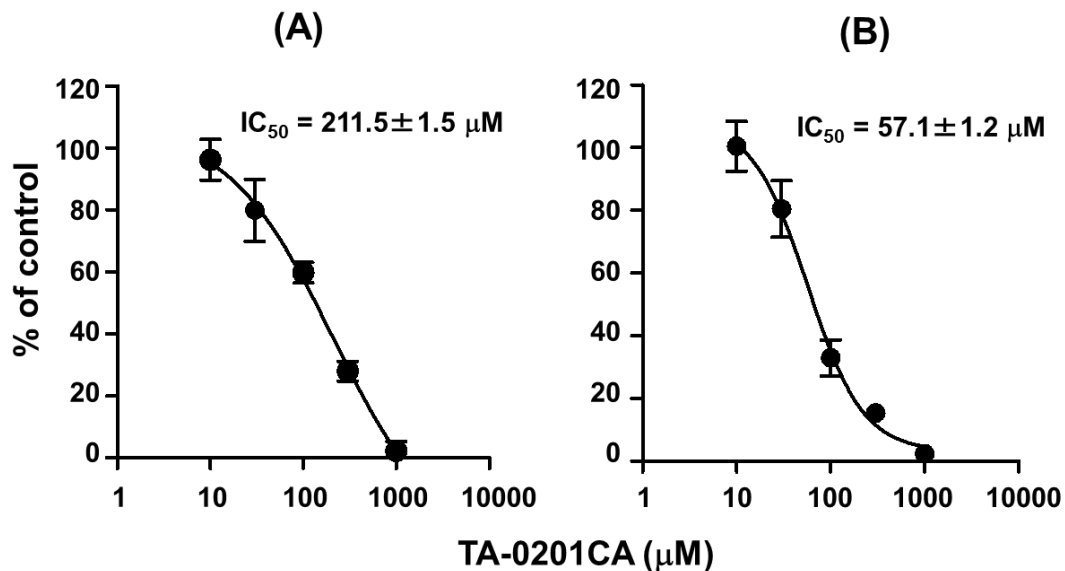


Fig. 1-9 Inhibitory effects of TA-0201CA on ^3H taurocholic acid (40 nM) uptake into rat Bsep-expressing membrane vesicles (A) and ^3H E₂17G (100 nM) uptake into rat Mrp2-expressing membrane vesicles (B).

Uptake was measured for 5 min at 37°C. Data are shown as the mean \pm SD (N = 5 for Bsep, N = 3 for Mrp2).

第3節 考察

本章では主消失経路が胆汁中排泄である TA-0201CA をモデル化合物として、薬物の胆汁中排泄に関わるトランスポーターの推定に SCH を応用した。本検討から得られた知見を以下に小括した。

- ① SDR と EHBR における薬物動態特性の比較から、TA-0201CA の胆汁排泄には Mrp2 が関与しており、他のトランスポーターも関与することが示された。
- ② SCH を用いた実験から、TA-0201CA の胆汁中排泄には Bsep が関与していることが示唆され、それは Bsep 発現膜ベシクルを用いた取り込み実験により裏付けられた。
- ③ SCH を用いた実験から、TA-0201CA の血液中から肝細胞内への取り込みには Oatps と Ntcp が関与していることが示唆された。

以上より、TA-0201CA の肝胆移行動態の主なメカニズムとして、Oatps と Ntcp により肝臓に取り込まれ、Mrp2 と Bsep により胆汁中に排泄されることが示唆された (Fig. 1-10)。本検討から、SCH が医薬品の肝胆系移行動態の解明に応用可能であることが示された。

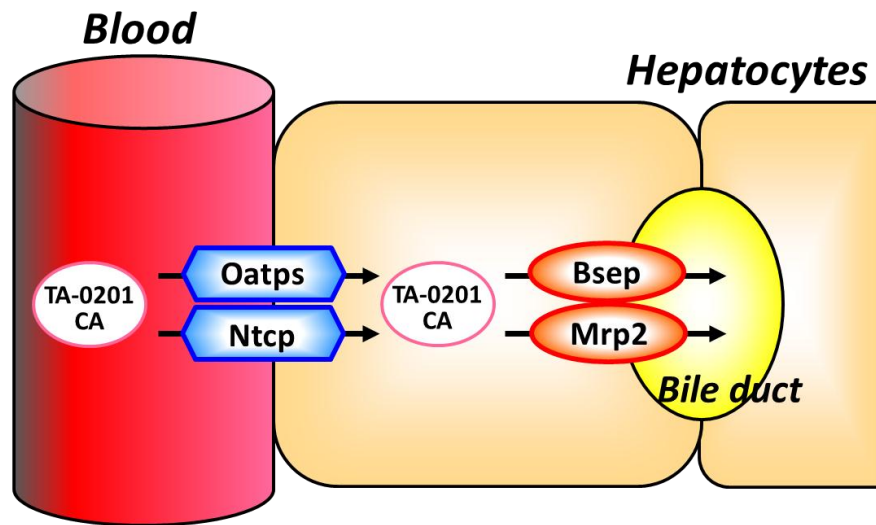


Fig. 1-10 Putative mechanism of hepatobiliary excretion of TA-0201CA.

本検討では Mrp2 欠損ラットである EHBR を SCH の評価に応用した。SDR と EHBR から調製した SCH における $[^3\text{H}]E_217\text{G}$ の BEI から、EHBR の Mrp2 欠損は肝細胞レベルでも維持されていることが明らかとなり、*in vivo* と同様に *in vitro* 実験においても SDR と EHBR の比較から Mrp2 の関与を見積もることが可能であることが示された。実際にラット SCH における TA-0201CA の BEI および $\text{CL}_{\text{bile,int}}$ は SDR と比較して EHBR で低く、*in vivo* と一致した結果が得られた。一方、TA-0201CA の $\text{CL}_{\text{uptake,int}}$ は SDR と比較して EHBR で低下した。考えられる原因の一つとして、EHBR における取り込みトランスポーターの down regulation による発現低下が挙げられる。Kuroda らは、SDR と比較して EHBR では Oatp1 (Oatp1a1) の mRNA が低下していることを報告している⁴⁹⁾。さらに EHBR においては TA-0201CA の平衡到達時の取り込み量も低かったことから、先の取り込みトランスポーターの発現変動に加えて、multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3) の発現誘導の可能性も挙げられる。Mrp3 は血管側からの排泄を担うトランスポーターであり、EHBR において発現が誘導されることが知られている^{49) 50)}。また、Mrp2 と Mrp3 の基質認識性はオーバーラップすること

から⁵⁰⁾、Mrp3によるTA-0201CAの血管側への排泄促進が取り込み量の低下に寄与している可能性が考えられる。一方で、このような報告は、遺伝子あるいは機能欠損動物の使用に際しては、代償的な反応に注意を払う必要があることを示唆している。例えば、EHBRと同様にMrp2を欠損したTR⁻ラットでは肝臓におけるBcrp発現が顕著に低下することや⁵¹⁾、BsepのノックアウトマウスではMdr1a/1bのmRNA発現が顕著に誘導されていることなどが知られている⁵²⁾。このように、医薬品の薬物動態に関わる因子（代謝酵素、トランスポーター）の推定に遺伝子あるいは機能欠損動物は有用なツールとなり得るが、上記のように代償的な発現誘導/低下の影響を把握することが重要である。

TA-0201CAの胆汁排泄におけるMrp2とBsepの関与について分子レベルで実証するため、TA-0201CAのトランスポーター発現膜ベシクルでの取り込み実験を行った結果、Bsepによる取り込みは確認されたが、Mrp2による取り込みは確認できなかった。この結果はEHBRにおける*in vivo*試験と矛盾する結果であった。これまでも*in vivo*実験でMrp2基質であることが示されているにも関わらず、ベシクルでは輸送が認められない化合物が報告されている⁵³⁾。原因は明らかにされていないが、膜やフィルターへの非特異的な吸着などが影響していると考察される。そこで、それぞれのトランスポーターに対するTA-0201CAの親和性について考察するため、トランスポーター発現膜ベシクルを用いた阻害実験を実施した結果、BsepとMrp2に対してそれぞれIC₅₀として211.5 ± 1.5 μMおよび57.1 ± 1.2 μMの親和性を示すことが確認された。競合阻害を仮定した場合、TA-0201CAはMrp2に対してより高親和性を示すものと推察される。

今回、SCHにおける胆管側の排泄阻害実験に用いたMK-571はMRPsの特異的な阻害剤として汎用されているが、本検討においてBsepを強く阻害することが示された。近年、ヒトトランスポーター発現膜ベシクルを用いた検討により、MK-571はMRP2のみならずMDR1、BCRPも阻害することが示されたことから⁵⁴⁾、MK-571は胆管側の排泄トランスポーターを非特異的に阻害する可能性が示唆された。本系の有用性をさらに高めるためには、

Mrp2 を含めた各トランスポーターに対するより選択的な阻害剤を探索する必要があると考えられる。また、近年報告されている、small interfering RNA (siRNA) によるトランスポーターのノックダウンの SCH への適用は本系の精度向上につながるものと考えられる⁵⁵⁾。ここで Mrp2、Bsep 以外のトランスポーターの関与について考察すると、EHBR から単離・調製した SCH において Bsep を完全に阻害した 30 μM glibenclamide 存在下においても TA-0201CA の排泄が認められたことから、Bcrp や Mdr1、あるいはその他のトランスポーターが TA-0201CA の排泄に関わると推察される。

TA-0201CA の肝胆移行動態には Ntcp と Bsep が一部関与することが示唆されたが、一般的に Ntcp/NTCP あるいは Bsep/BSEP (ラット/ヒト) は胆汁酸およびその抱合体を良好な基質とすることから^{7) 56)}、両トランスポーターの基質認識の許容性という観点で本知見は興味深い。近年、BSEP が pravastatin、vinblastin、fexofenadine を輸送すること^{57) 58) 59)}、また、NTCP が rosuvastatin、olmesartan を輸送することが報告されている^{60) 61)}。すなわち、これらのトランスポーターは胆汁酸のみならず、薬物トランスポーターとしても重要な働きを担うことが示唆される。特に BSEP は薬物 - 内因性物質 (胆汁酸など) 間相互作用の原因として広く認識されているが、それに加えて、薬物間相互作用の原因となり得ることも認識しなければならない。

以上、SCH は薬物の肝胆系移行動態を解明するための有用な *in vitro* ツールになり得ることが示された。また、トランスポーター欠損動物から調製した SCH はその *in vivo* 特性を維持しており、メカニズム解明に応用可能であると考えられた。本評価系のさらなる精度向上に向けた取り組みとして、より選択性の高い阻害剤の探索や siRNA の適用、また欠損動物におけるトランスポーター/代謝酵素などの発現変動の把握などが挙げられる。

第3章 サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物間相互作用の評価

第1節 序文

第2章でも関与が示された肝臓の胆管側膜上に発現する MRP2/Mrp2 (ヒト/ラット) は多くの医薬品およびそれらの代謝物の胆汁中排泄に関わっている⁶²⁾。また、MRP2 は抱合型 bilirubin の胆汁中排泄を担い、血中あるいは肝臓中 bilirubin レベルの恒常性維持に重要な役割を果たす⁸⁾。MRP2 を阻害する医薬品が薬物間相互作用 (DDI) や高 bilirubin 血症を引き起こすことから^{63) 64)}、医薬品開発過程において候補化合物の MRP2 との相互作用を評価することは重要である。胆管側排泄トランスポーターの阻害評価にはトランスポーター発現細胞から調製した膜ベシクルが汎用されているが⁶⁵⁾、膜ベシクルは細胞内環境を反映しておらず、薬物の肝取り込み、細胞内結合、さらには肝細胞内代謝などの影響を評価できないという欠点を有する。一方、前述のとおり MRP2 は抱合代謝物を基質として認識することから、未変化体のみならず代謝物による阻害にも注意する必要がある。Funk らは troglitazone の硫酸抱合体がラット Bsep を阻害し、その強度は未変化体と比較して 10 倍以上であることを明らかにした⁶⁶⁾。本知見は医薬品代謝物によるトランスポーターを介した薬物間相互作用の可能性を示すものである。このような場合、膜ベシクル実験では代謝物による阻害を見落としてしまい (false negative)、臨床における相互作用リスクを過小評価する可能性があることから、候補化合物の代謝物を考慮した精度の高い相互作用評価系が求められている。しかし現状では、医薬品の初期スクリーニングにおけるトランスポーターとの相互作用については、多くの場合膜ベシクル系による実験に依存している。そのため、医薬品候補化合物の代謝物によるトランスポーター阻害を直接評価するには、評価対象とする化合物の代謝物の同定と合成が必要になるが、医薬品研究開発の早期段階においては時間やコスト面での負担が大きい。そこで、本章では、SCH で維持されている薬物代

謝能を利用した未知代謝物とトランスポーターとの相互作用評価系の確立を試みた。

これまでに筆者らの研究グループでは、ラット Mrp2 機能の評価法として、5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA) を用いたラット SCH における Quantitative time-lapse imaging analysis (QTLI) 法を提唱した⁶⁷⁾。CDFDA 自身は蛍光を持たないが、トランスポーターを介さず受動的に細胞内に取り込まれエステル結合部が加水分解を受けることにより、Mrp2 特異的な蛍光基質 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) へ変換される (Fig. 2-1)⁶⁸⁾。また CDF は各 *in vitro* 評価系における Mrp2 機能評価、さらには SCH における胆管腔の蛍光イメージングに用いられる⁶⁹⁾。QTLI 法では、SCH で形成された胆管腔への CDF の蓄積を経時的にモニターすることにより、生細胞状態で Mrp2 機能の評価可能であり、薬物の細胞内取り込みと組織結合を考慮した評価を可能にすることを報告してきた。また、本法で得られた医薬品の Mrp2 阻害親和性は通常の BEI 法から得られた結果と一致することが確認されている⁶⁷⁾。

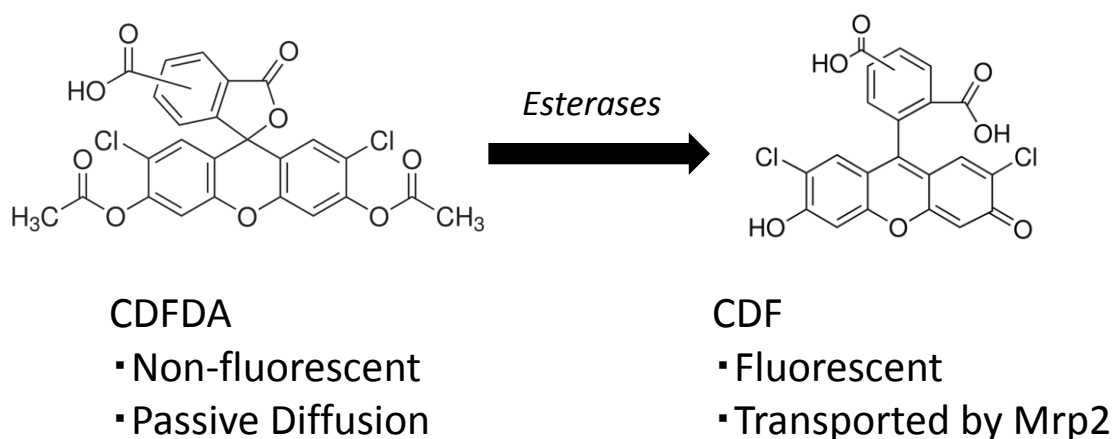


Fig. 2-1 Chemical structures of CDFDA and CDF, fluorescent Mrp2 substrate.

本章では、ラット SCH を用いて医薬品の代謝物による Mrp2 阻害を検出することを目的とし、モデル化合物として estradiol (E₂) と内因性物質である bilirubin を選択した。E₂ および bilirubin はいずれも肝臓において UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) を介してそれぞれ estradiol 17β-D-glucuronide (E₂17G)、bilirubin glucuronide に代謝され、いずれも Mrp2 の基質または阻害剤となることが知られている^{70) 71) 72)}。また、これらの代謝物生成による経時的な Mrp2 阻害の変化を捉えるため、我々のグループにて確立した QTLI 法を応用した。

第2節 結果

第1項 Mrp2 を介した CDF 取り込みに及ぼす E₂ と E₂17G の影響

代謝物によるトランスポーター阻害を検証するためのモデル化合物として E₂ と E₂17G を選択した。モデル化合物としての妥当性を検証するため、ラット Mrp2 発現膜ベシクルを用いて、Mrp2 を介した CDF 取り込みに及ぼす E₂ と E₂17G の影響について評価した結果を Fig. 2-2 に示した。

CDF の Mrp2 発現膜ベシクルへの取り込みは E₂17G の濃度依存的に減少し、300 μM ではほぼ完全に阻害された。一方、E₂ は評価最大濃度の 300 μM まで CDF 取り込みに影響を及ぼさなかった。速度論的解析により E₂17G の IC₅₀ は 59.8 μM と算出された。また Hill 係数は 1.57 と算出されたことから、E₂17G の濃度増加に従って Mrp2 に対する阻害親和性が上昇する (正の協同性) ことが示唆され、過去の報告と一致した結果が得られた⁷³⁾。

以上の結果より、E₂ 自身は Mrp2 を阻害せず、その代謝物であるグルクロン酸抱合体は Mrp2 を阻害することが示されたことから、E₂ は代謝物による Mrp2 阻害評価のモデル化合物として妥当であることが示された。

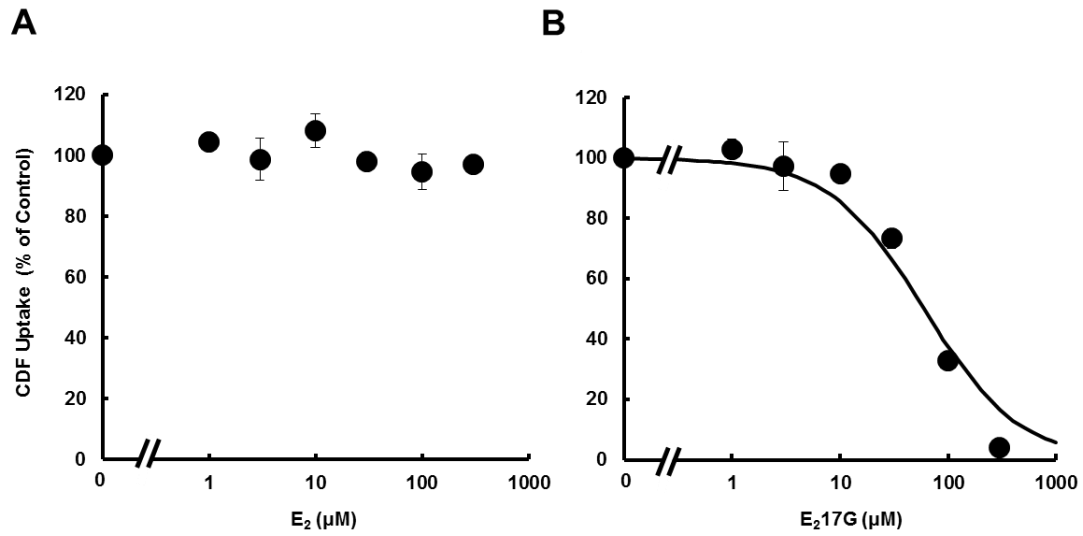


Fig. 2-2 ATP-dependent Mrp2-mediated transport of CDF by membrane vesicles prepared from Sf9 cells in the presence of E₂ (A) or E₂17G (B).

Mrp2-mediated transport of CDF (5 μM) was measured in the absence (Control) or presence of E₂ or E₂17G at 37°C for 3 min. Transporter-mediated transport was determined by subtracting the CDF uptake in the presence of AMP (4 mM) from that in the presence of ATP (4 mM). Inhibitory effect was expressed as % of Control. Each point represents the mean ± S.E.M. (n=3).

第2項 E₂、E₂17G、および bilirubin の CDFDA 加水分解活性に及ぼす影響

CDF は CDFDA の加水分解により生成することから、E₂、E₂17G、または bilirubin が加水分解に影響を及ぼす場合には、QTLI 法による Mrp2 活性の評価にも影響を及ぼすことが懸念される。したがって本項では、ラット肝細胞ホモジネートにおける CDFDA の加水分解に及ぼす E₂、E₂17G、bilirubin の影響を評価した。なお、bilirubin の主代謝物であるグルクロン酸抱合体は標品の入手が不可であったため、bilirubin を肝細胞中で3時間インキュベーションして代謝物を生成させることによって、その影響を評価した。

E₂ と E₂17G は CDFDA の加水分解に影響を及ぼさなかった (**Fig. 2-3**)。一方、bilirubin で処理した細胞においてわずかに蛍光が減少したが、その減少には濃度依存性が認められなかったことから、bilirubin およびそのグルクロン酸抱合体は CDFDA の加水分解に影響している可能性は低いと考えられた。

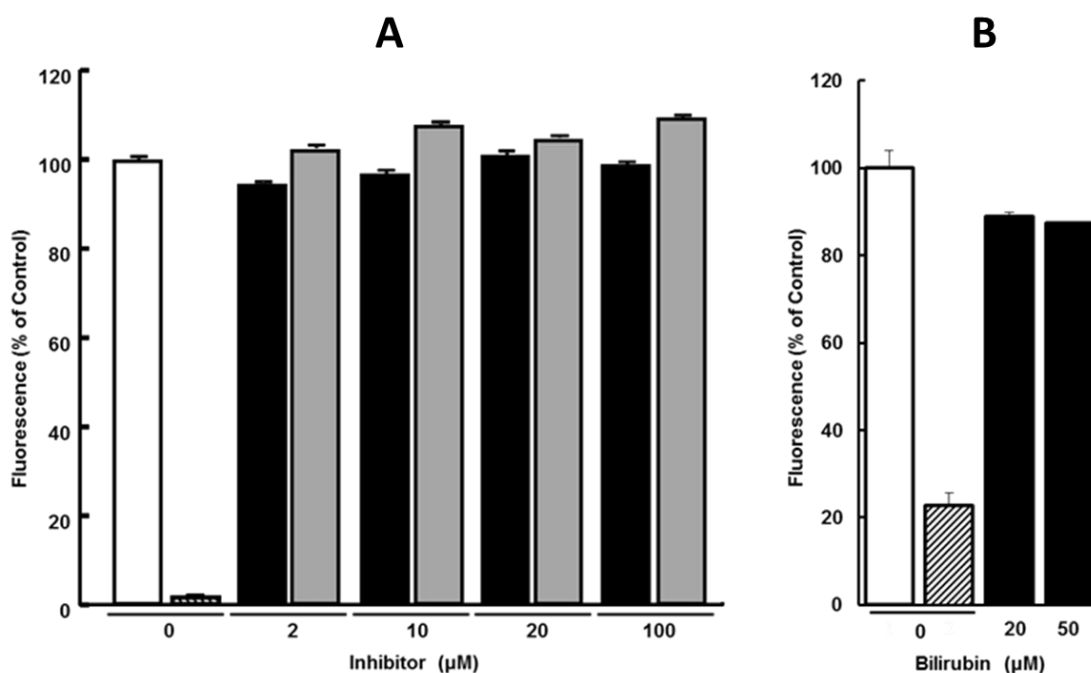


Fig. 2-3 Hydrolysis of CDFDA in rat hepatocyte homogenate in the presence of E₂, E₂17G or bilirubin.

CDFDA (10 μM) was incubated with rat hepatocyte homogenate at pH 7.4 and 37°C for 5 min in the absence (Control, white bar) or presence of E₂ (black bar) or E₂17G (grey bar) at the indicated concentrations (A). CDFDA was also incubated at pH 7.4 and 37°C for 5 min in the absence (Control, white bar) or presence of bilirubin (black bar) with rat hepatocyte homogenate pre-incubated with bilirubin at the indicated concentrations (B). Non-enzymatic conversion of CDFDA was assessed by incubating CDFDA with heat-denatured homogenate (at 99°C for 5 min, hashed bar). Effect of inhibitor is expressed as % of Control. Each bar represents the mean ± S.E.M. (n=3).

第3項 ラット SCH の胆管腔への CDF 蓄積に及ぼす E₂ 曝露時間の影響

E₂はラット肝細胞において E₂17G に代謝される。本検討ではラット SCH に E₂を事前曝露したときの Mrp2 活性への影響を、CDF の胆管腔への蓄積を指標に評価した。

SCH に 20 μM の E₂を 0、10、30、180 分間事前曝露したときの経時的な蛍光イメージングの結果を **Fig. 2-4** に示した。E₂ 未処理群における胆管腔への蛍光蓄積は CDFDA 添加後 4 分に定常に達した。E₂ 事前曝露群の胆管腔への蛍光蓄積は CDFDA 添加後 5 分まで直線的に増加したことから、以降の実験における評価時点は 2 分に設定した。CDFDA 添加 2 分後の胆管腔への蛍光蓄積は E₂ の事前曝露時間依存的に減少する傾向を示した。180 分事前曝露群では 30 分事前曝露群より胆管腔の蛍光が高値を示したが、細胞内における E₂17G 生成が飽和したことがその原因として挙げられた。

Mrp2 阻害のメカニズムをより詳細に検証するため、E₂および E₂17G の細胞内薬物濃度を測定した結果を **Table 2-1** に示した。事前曝露時間 10、30、180 分における E₂ の細胞内濃度に差は認められなかったが、細胞内 E₂17G 濃度は曝露時間に応じて増加し、30 分で定常に達した。この結果より、胆管腔への CDF 蓄積の減少は、細胞内で生成した E₂17G による Mrp2 阻害に起因することが示唆された。

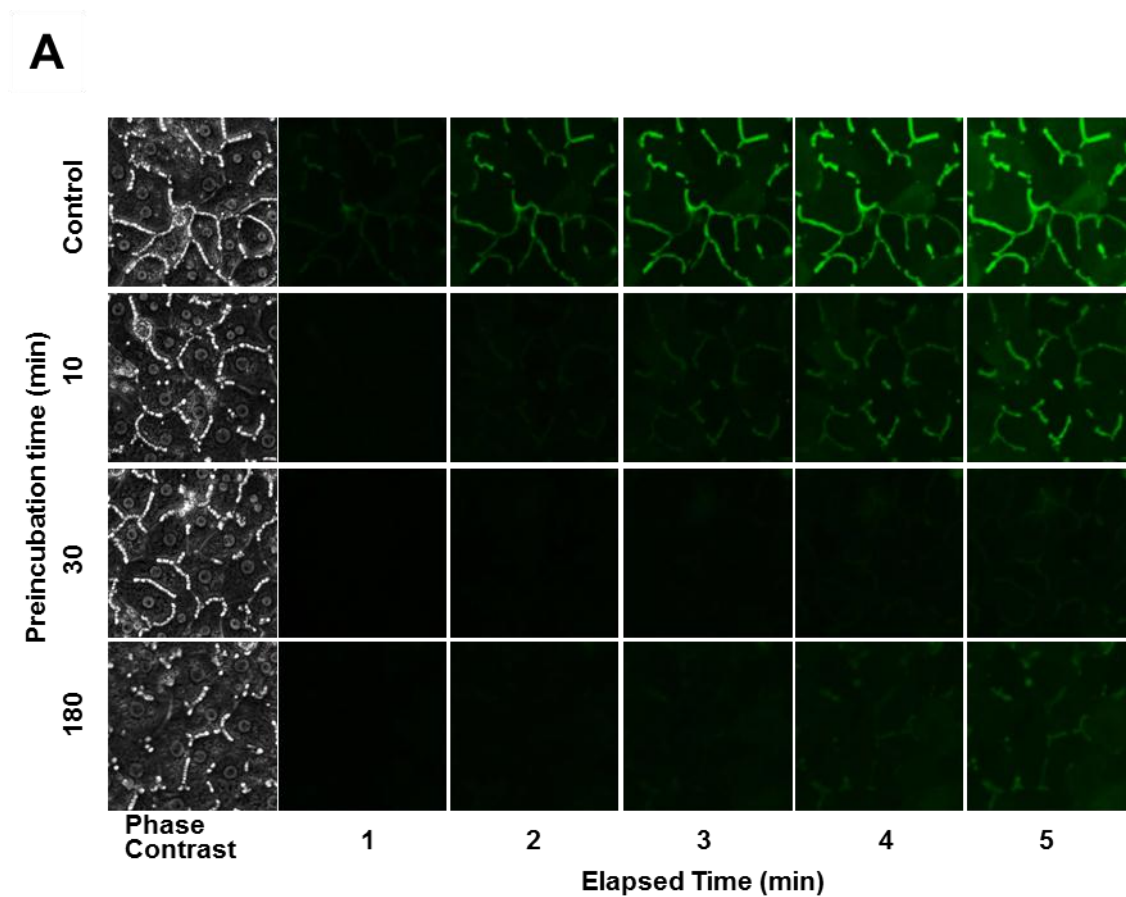


Fig. 2-4 Effect of E₂ pre-exposure on CDF accumulation in bile canaliculi in rat SCH by the QTLI method.

Time-lapse images of CDF accumulation were obtained for up to 5 min in SCH preincubated at pH7.4 and 37°C in the absence (1 % dimethyl sulfoxide, Control, open circle) or presence of E₂ (20 μM) for various periods of time (A). The fluorescence intensity in SCH preincubated with E₂ for 10 (closed circle), 30 (closed square), and 180 min (closed triangle) was quantitatively analyzed as described in Material and Methods (B). Values are the mean ± S.E.M of 6 regions of interest in quantitative analysis.

Fig. 2-4 (continued)

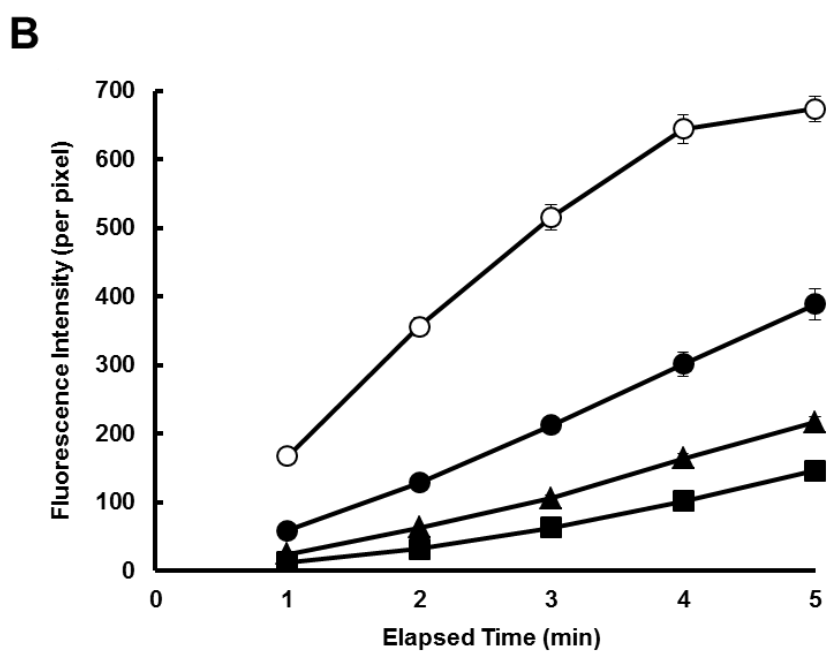


Table 2-1 Estimated intracellular concentrations of E₂ and E₂17G in rat SCH preincubated with E₂ for different periods of time.

Pre-exposure time (min)	Estimated intracellular concentration (μM)	
	E ₂	E ₂ 17G
0	N.D.	N.D.
10	434.2 ± 119.4	39.5 ± 11.5
30	562.6 ± 35.7	61.0 ± 4.7
180	449.5 ± 19.8	63.5 ± 2.1

Each value represents the mean ± S.E.M. from at least three individual culture plates.

N.D.; Not determined.

第4項 ラット SCH の胆管腔への CDF 蓄積に及ぼす E₂ 曝露濃度の影響

第3項にて、E₂ 事前曝露時間 10 分において胆管腔への蛍光蓄積の阻害が十分に観察されたことから、曝露時間を 10 分に設定し、ラット SCH における胆管腔への蛍光蓄積に対する E₂ の濃度依存性を評価した。またこの際の細胞内 E₂ および E₂17G 濃度と、胆管腔への蛍光蓄積の関係から、Mrp2 阻害の薬物速度論的解析を実施した。

SCH に 2、5、20 および 50 μM の E₂ を 10 分間事前曝露したときの蛍光イメージングの結果を Fig. 2-5 に、さらに 1、2、5、10、20 および 50 μM の E₂ を 10 分間事前曝露したときの細胞内 E₂ および E₂17G 濃度を Table 2-2 に示した。経時的な胆管腔への蛍光蓄積は E₂ の曝露濃度依存的に減少した。また細胞内 E₂17G は E₂ の曝露濃度依存的に増加したが、50 μM 曝露において E₂17G 濃度は定常に達した。細胞内 E₂17G 量と E₂ 曝露濃度から算出した E₂17G 生成の K_m、V_{max} および Hill 係数はそれぞれ $7.9 \pm 0.35 \mu\text{M}$ 、 $286 \text{ pmol}/10 \text{ min}/\text{dish}$ および 2.11 と算出された。

続いて、E₂ と E₂17G による Mrp2 を介した CDF の蛍光蓄積への影響を速度論的に解析した。E₂ 未処理群の蛍光蓄積を 100% としたときの E₂ 事前曝露群における蛍光蓄積と、細胞外 E₂、または細胞内 E₂17G 濃度をプロットした結果を Fig. 2-6 に示した。細胞外 E₂ および細胞内 E₂17G 濃度を基準に算出した IC₅₀ はそれぞれ $15.7 \pm 2.0 \mu\text{M}$ 、 $34.0 \pm 3.0 \mu\text{M}$ と算出された。ここで得られた E₂17G の IC₅₀ は、ラット Mrp2 発現膜ベシクルより得られた CDF 取り込みに対する E₂17G の IC₅₀ ($59.8 \mu\text{M}$) と近い値を示した。以上より、ラット SCH において観察された蛍光蓄積の減少、すなわち Mrp2 の阻害は、細胞内で E₂ より生成した E₂17G によるものと推察された。本検討より、それ自身が Mrp2 阻害能を有さない E₂ は E₂17G に代謝されることにより Mrp2 阻害を引き起こしたことが示された。さらに細胞外 E₂ 濃度から細胞内における Mrp2 阻害効果を見積もることができる可能性が示された。

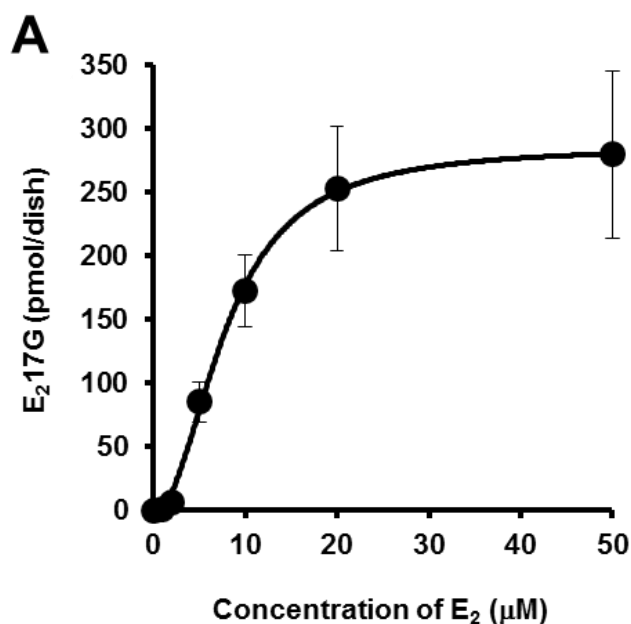


Fig. 2-5 Effect of E₂ concentration on CDF accumulation in bile canaliculi in rat SCH by the QTLI method.

E₂17G was determined by HPLC as described in Materials and Methods in SCH incubated with E₂ at concentrations ranging from 1 to 50 µM at pH 7.4 and 37°C for 10 min (A). Time-lapse images of CDF accumulation were obtained for up to 5 min in SCH preincubated at pH 7.4 and 37°C in the absence (1 % dimethyl sulfoxide, Control) or presence of E₂ at concentrations ranging from 2 to 50 µM for 10 min (B). The fluorescence intensity in SCH preincubated with 2 (closed triangle), 5 (closed square), 20 (closed circle), and 50 (closed diamond) µM E₂ was quantitatively analyzed as described in Materials and Methods (C). Values are the mean ± S.E.M of 6 regions of interest in quantitative analysis.

Fig. 2-5 (continued)

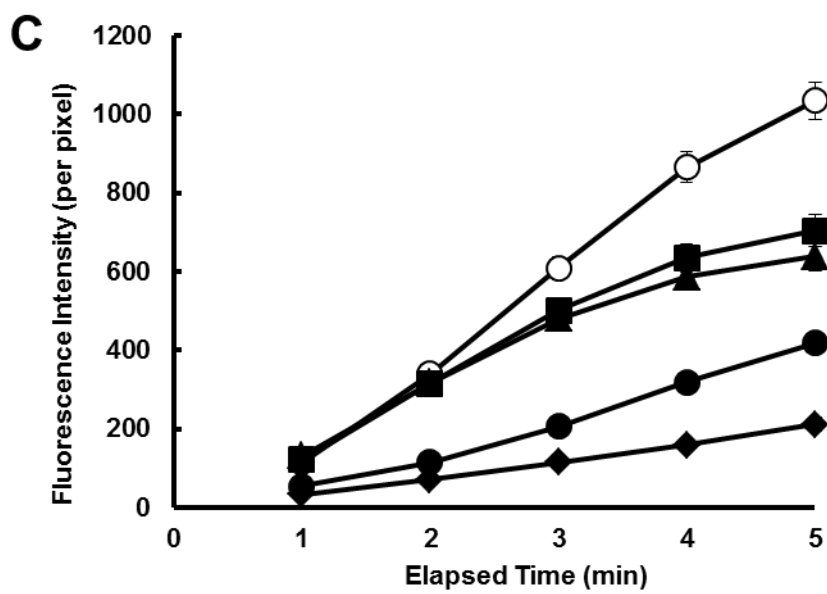
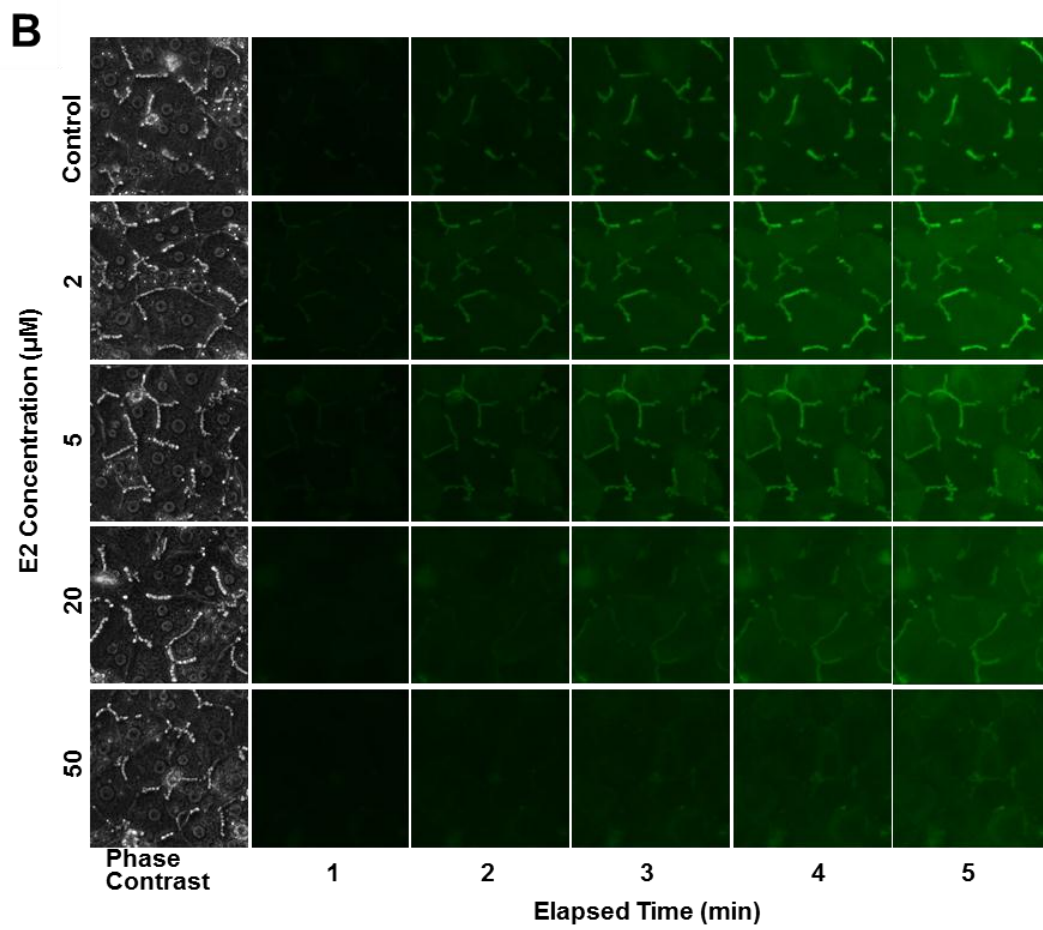


Table 2-2 Estimated intracellular concentrations of E₂ and E₂17G in rat SCH preincubated with E₂ at various concentrations

Concentration (μM)	Estimated intracellular concentration (μM)	
	E ₂	E ₂ 17G
0	N.D.	
1	1.4 ± 0.2	0.03 ± 0.03
2	3.7 ± 0.7	1.1 ± 0.2
5	30.1 ± 4.7	14.7 ± 2.7
10	134.7 ± 23.5	29.7 ± 4.8
20	493.8 ± 68.4	43.6 ± 8.4
50	2310.4 ± 574.4	48.1 ± 11.4

Each value represents the mean ± S.E.M. from at least three individual culture plates.

N.D.; Not determined

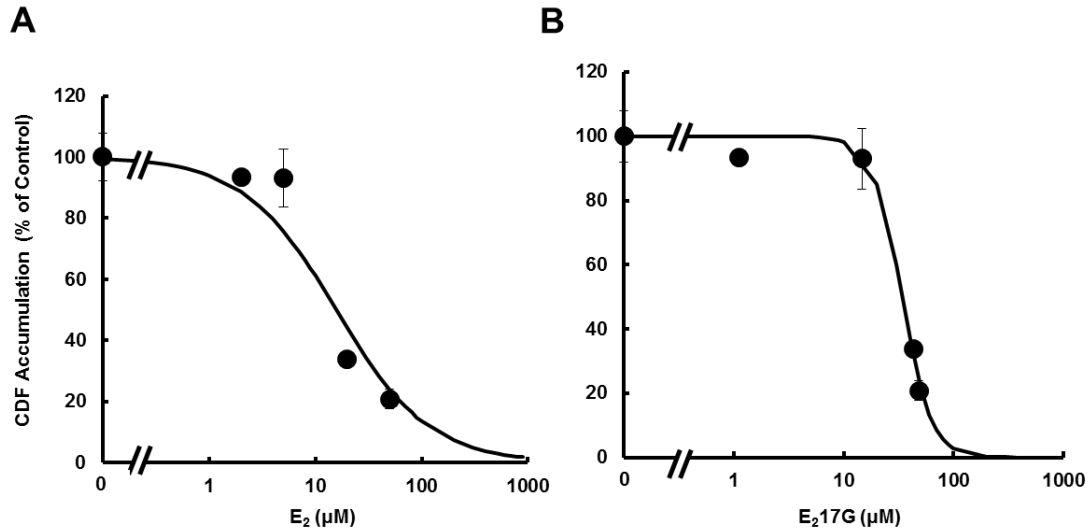


Fig. 2-6 A Kinetic analysis of inhibitory effects of E₂ and E₂17G on CDF accumulation by

QTLI method.

The Mrp2-mediated CDF transport relative to that in rat SCH not treated with E₂ (taken as 100%) is plotted against the concentration E₂ added to the extracellular medium (A) and the estimated intracellular concentration of E₂17G (B).

第5項 MRP2阻害を介した薬物間相互作用に基づく細胞障害性の評価

Mrp2は細胞内からの異物排出を担うことから、この機能を阻害することは異物の細胞内蓄積による細胞障害等の副作用を引き起こし得る。この検証のため本項では、Mrp2によって胆汁中に排泄される cisplatin⁷⁴⁾あるいは vinblastine⁷⁵⁾をラットSCHに24時間曝露した後の細胞障害性を、lactate dehydrogenase (LDH)活性を指標に評価し、さらにそれに対するE₂併用の影響について検証した。

ラットSCHに cisplatin あるいは vinblastine を24時間曝露後のLDH活性をFig. 2-7に示した。Cisplatinの細胞障害性はE₂併用により変化しなかったが、50 μM vinblastineの細胞障害性はE₂併用により増強した。以上より、E₂はE₂17G生成を介してMrp2を阻害し、併用薬の細胞からの排出を阻害することにより、その細胞障害を増強することが示された。

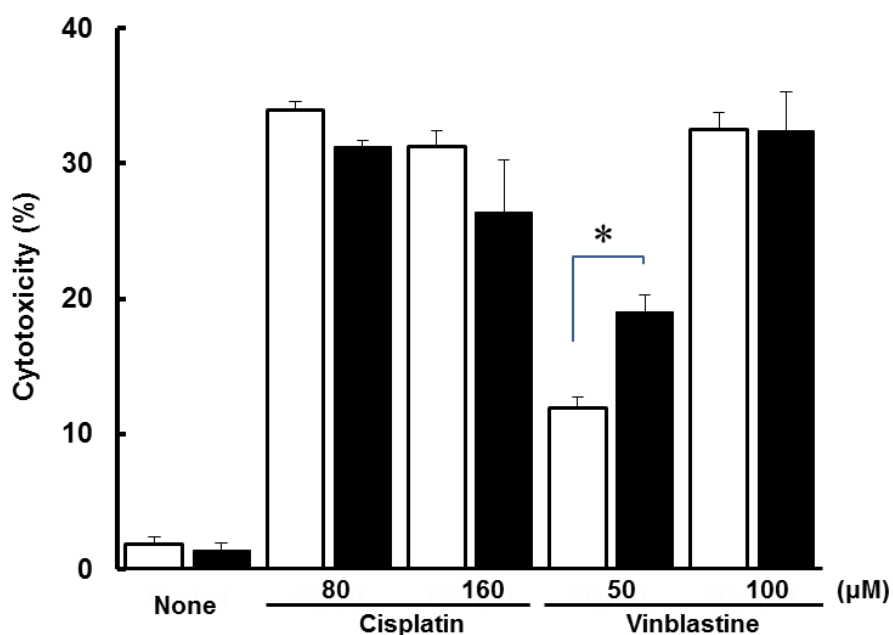


Fig. 2-7 Effect of E₂ on cytotoxicity of cisplatin and vinblastine in rat SCH.

Hepatocytes were treated with (closed bar) or without (open bar) E₂ (20 μM) for 24 hours in the absence or presence of cisplatin or vinblastine. Activity of LDH leaked from the cells was normalized by that from hepatocytes treated with Triton X (w/v; 1.0 %). Each bar shows the mean value of 7-8 results from individual wells.

第 6 項 ラット SCH の胆管腔への CDF 蓄積に及ぼす bilirubin 曝露の影響

Bilirubin はラット肝臓においてグルクロン酸抱合代謝を受け、Mrp2 を介して胆汁中へ排泄される⁷⁶⁾。E₂ と同様に肝代謝の影響が Mrp2 輸送に反映されるか否かについて検証するため、bilirubin の影響についても QTLI 法により評価した。

SCH に 20 および 50 μM の bilirubin を 3 時間事前曝露したときの蛍光イメージングの結果を Fig. 2-8 に示した。胆管腔への CDF の蛍光蓄積は CDFDA 添加後 3 分まで直線的に増加した。3 分における蛍光蓄積は bilirubin の事前曝露濃度依存的に低下したが、bilirubin 未処理群、あるいは bilirubin を CDFDA と同時添加した群で変化しなかった。以上より、bilirubin から生成したグルクロン酸抱合体によって Mrp2 が阻害されたものと推察された。

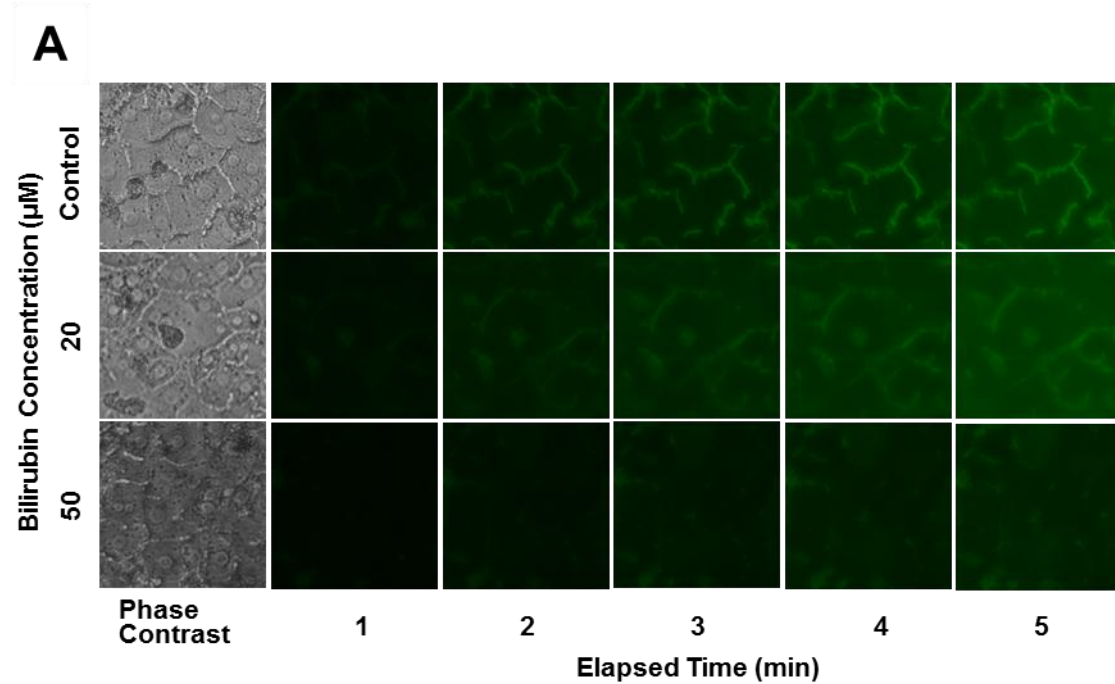
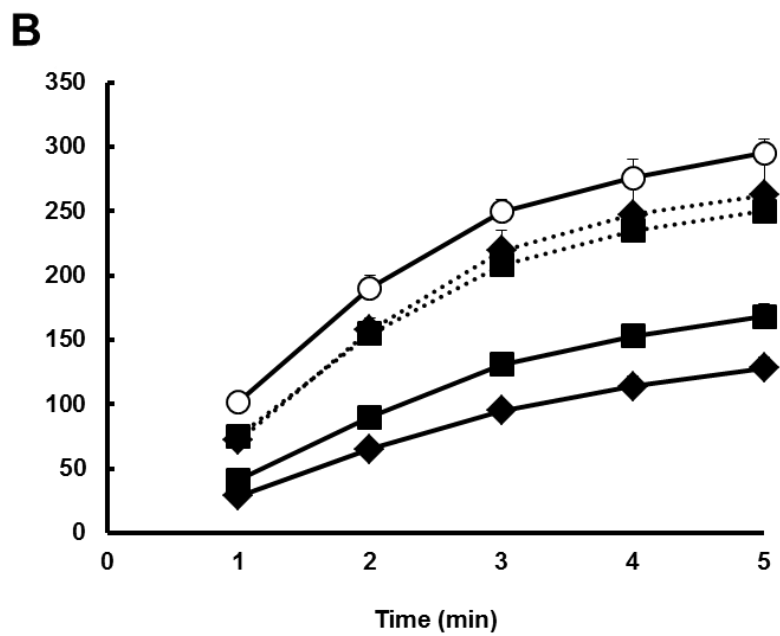


Fig. 2-8 Effect of bilirubin pre-exposure on CDF accumulation in bile canaliculi in rat SCH.

Time-lapse images of CDF accumulation were obtained for up to 5 min in SCH preincubated at pH 7.4 and 37°C in the absence (1 % dimethyl sulfoxide, Control) or presence of E₂ at the indicated concentrations for 3 hours (A). QTLI analysis of the fluorescence intensity in SCH pre-incubated without (open circle) or with 20 μM (closed square) and 50 μM (closed diamond) bilirubin for 3 hours (B). Dotted line shows the results in hepatocytes without preincubation of bilirubin but by adding bilirubin simultaneously with CDF. Values are the mean \pm S.E.M. of 6 regions of interest in quantitative analysis.

Fig. 2-8 (continued)



第3節 考察

本章では E₂ と bilirubin モデル化合物として、医薬品の代謝物による Mrp2 阻害の評価にラット SCH を応用した。本検討から得られた知見を以下に小括した。

- ① 膜ベシクルを用いた検討によって、E₂ は Mrp2 を阻害しないが、代謝物である E₂17G は Mrp2 を阻害することが示された。
- ② E₂ は添加濃度あるいは曝露時間に依存して Mrp2 を阻害した。E₂ と E₂17G の細胞内濃度から、細胞内で生成した E₂17G が Mrp2 阻害を示したものと推察された。
- ③ E₂ は E₂17G の生成を介して Mrp2 を阻害し、vinblastine の細胞からの排出を阻害することにより、その細胞障害を増強することが示された。
- ④ Bilirubin はグルクロン酸抱合体の生成を介して Mrp2 を阻害することが示唆された。

以上の結果から、SCH は医薬品代謝物による Mrp2 阻害を簡便に評価する系として有用であることが示された (Fig. 2-9)。

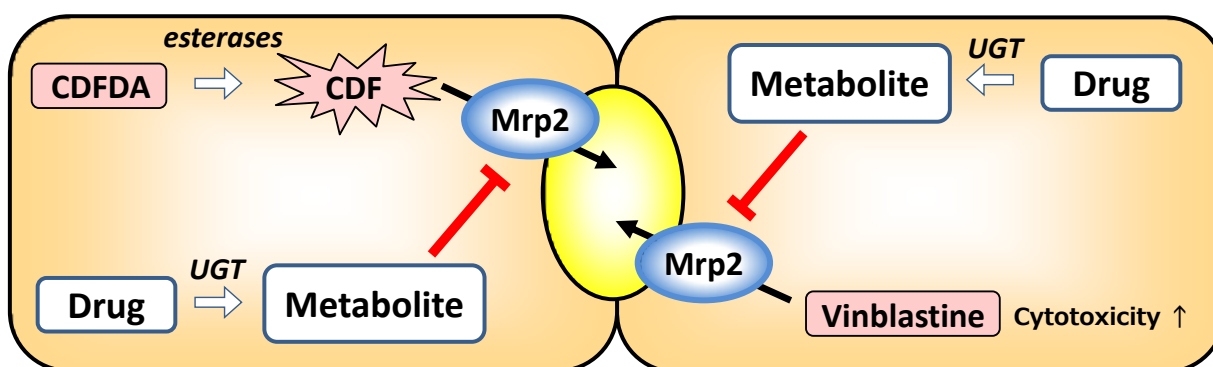


Fig. 2-9 Inhibition of Mrp2 by drug metabolites derived in SCH.

本検討では E₂ の主な代謝物として E₂17G に着目したが、E₂ は肝臓において一部 estradiol 3β-D-glucuronide (E₂3G) にも代謝されることが知られており^{77) 78)}、今回ラット SCH にて観察された E₂ 添加による Mrp2 阻害には、E₂3G あるいはそれ以外のマイナーな代謝物が一部関与している可能性が考えられた⁷⁹⁾。このように未知代謝物を包括した Mrp2 阻害評価が可能な点が本評価系の利点の一つとして挙げられる。また E₂17G は Mrp2 の細胞膜から細胞質への内在化を引き起こし、Mrp2 輸送活性を低下させることが報告されていることから⁸⁰⁾、今回観察された蛍光蓄積の減少には Mrp2 の内在化が関与する可能性がある。このようなトランスポーターに対する直接阻害以外の作用は膜ベシクル実験では検出が困難であり、代謝物による阻害と同様に false negative リスクの一因となり得る。この他にも医薬品によるトランスポーターの内在化の例が報告されていることから⁸¹⁾、今後、内在化を含めたトランスポーター機能変動が評価可能であることを示すことにより、SCH の薬物とトランスポーターの相互作用評価系としてのさらなる価値向上が期待される。

本評価系で適用した QTLI 法には大きな利点が二点挙げられる。一点目は胆管腔への蛍光蓄積を直接的に評価できる点である。このため通常法で必要となる 2 種 (Ca²⁺/Mg²⁺有無) のインキュベーション buffer が不要となり、使用肝細胞数の削減が可能である。二点目として生細胞での経時的な評価が可能な点が挙げられる。細胞からの薬物の抽出とその定量分析 (LC-MS/MS、LSC など) を要さず簡便な評価が可能であることから、特に創薬初期への応用面で有用な評価系となり得る。

本系では SCH における代謝活性の維持が肝要である。肝細胞の培養によりチトクローム P450 の発現は減少することが報告されているが、CYP2B1/2、3A、4A は培養 4 日目までは高活性を維持しているとの報告がなされている^{82) 83)}。また、2 週間培養した初代培養肝細胞において、UGT による *p*-nitrophenol ならびに testosterone の抱合活性は細胞単離直後に比較して、それぞれ 7、24 倍の活性を示し、また硫酸抱合活性は 2 倍以上の活性値を示すことが報告されている⁸⁴⁾。本検討の速度論解析から得られたラット SCH における E₂17G 生成

の見かけの K_m は $7.9 \mu\text{M}$ であり、ラット ($16 \mu\text{M}$)、ヒト ($8\text{-}26 \mu\text{M}$) 肝ミクロソームにおける同 K_m に近似した値が得られたことから^{77) 85)}、本系において UGT 活性が維持されていることが示唆される。近年の細胞培養技術の発展により、生体における代謝能を維持した長期の肝細胞培養が可能となっており⁸⁶⁾、今後これら周辺技術のさらなる発展により、本系がさらに重要な位置づけとなることが期待される。

これまでに筆者らはラット SCH を用いた QTLI によって、細胞内取り込みと組織結合を加味した上で阻害剤の Mrp2 に対する効果を評価できることを報告してきたが⁶⁷⁾、本検討結果から、薬物代謝も加味した評価系になり得ることが示された。したがって SCH の利用により代謝物を同定・合成することなく医薬品の未知代謝物による Mrp2 阻害の評価が可能であり、SCH が従来のベシクル法の欠点を克服した新たな評価系となり得ることが示された。さらに QTLI 法を利用することにより、相互作用薬の未変化体の血中濃度から、細胞内の代謝物による DDI の予測が可能となることが示唆された。本評価系は、医薬品の研究開発段階において代謝物による Mrp2 阻害リスクを簡便に検出し、false negative リスクを回避するためのツールとして期待される。

第4章 サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物 - 内因性物質間相互作用の評価

第1節 序文

Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) は肝細胞の胆管膜側に発現する排泄トランスポーターであり、抱合/非抱合型胆汁酸を肝細胞内から胆汁中に排泄して細胞内胆汁酸濃度を調節する役割を担う。BSEP の機能低下は細胞障害性を有する胆汁酸の細胞内蓄積を引き起こし、重篤な肝障害につながる。例えば、BSEP の遺伝子変異に起因する progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) は肝内胆汁うっ滞を呈し、無治療の場合は致死性の経過をたどる難治性肝疾患である⁸⁷⁾。したがって、BSEP を強く阻害する薬物が胆汁うっ滞や肝障害を引き起こすことが、これまでに数多く報告されている。抗糖尿病薬 troglitazone や抗うつ薬 nefazodone は重篤な肝障害により市場から撤退したが、これらの薬物が BSEP を強く阻害することから、BSEP 阻害による胆汁うっ滞が肝毒性に強く関与していることが示唆されている^{66) 88)}。このような背景から、BSEP の毒性学的な意義が重視されるようになり、現在では医薬品研究開発における候補化合物の BSEP の輸送機能に対する影響は無視できず、薬物と BSEP の相互作用評価の必要性は広く認識されつつある^{89) 90)}。BSEP 阻害評価法としていくつかの方法が用いられているが、最も汎用される方法の一つとして BSEP 発現膜ベシクルを用いたベシクル輸送試験がある⁹¹⁾。しかし本法は肝取り込みや代謝などの *in vivo* の過程を反映しない。このような観点から、第3章では未知代謝物によるトランスポーター阻害、すなわち *in vivo* におけるトランスポーター阻害の見落とし (false negative) リスクを回避するための評価系として SCH を提案した。それとは対照的に、未変化体自身が強いトランスポーター阻害を示す化合物であっても、その化合物が速やかに代謝・消失することで血中・肝臓中曝露が十分に低い場合では、臨床におけるトランスポーター阻害やそれに伴う副作用リスクは低くなる場合が想定される。このような場合、未変化体のみの

トランスポーター阻害から化合物の安全性を評価すると臨床における影響を過大評価することになり、false positive リスクが懸念される。

本章では、臨床における胆汁うっ滞の原因分子である BSEP に着目し、臨床をより良く反映すると考えられるヒト SCH を用いて、薬物による BSEP 阻害とそれに及ぼす薬物代謝の影響を評価した。BSEP 阻害の評価には、過去に SCH での応用例が報告されている [³H]taurocholic acid の BEI を指標として用いた⁹²⁾。また、モデル化合物として candesartan (CAN) のエステル型プロドラッグである candesartan cilexetil (CIL) を選択した (Fig. 3-1)。CIL は経口投与後、小腸および肝臓においてエステラーゼにより速やかに加水分解代謝を受けて活性体である CAN に変換されるため、血中曝露は極めて低い⁹³⁾⁹⁴⁾。上述の false positive リスクの検証のため、ヒト SCH における CIL の BSEP 阻害とそれに及ぼす代謝阻害剤の影響について評価し⁹³⁾、その結果を BSEP 発現膜ベシクルから得られた BSEP 阻害の結果と比較した。

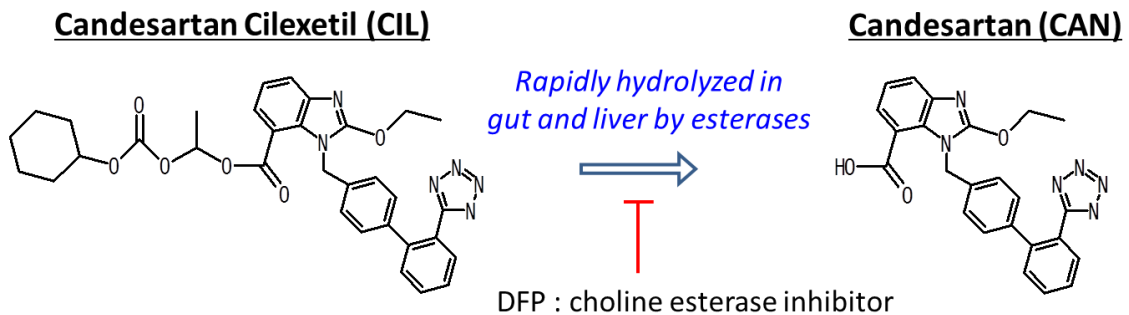


Fig. 3-1 Chemical structure of candesartan cilexetil and its active form candesartan.

第2節 結果

第1項 ヒト BSEP 発現膜ベシクルを用いた $[^3\text{H}]$ taurocholic acid の輸送に対する CIL および CAN の影響

BSEP 発現膜ベシクルへの $[^3\text{H}]$ taurocholic acid の輸送に対する CIL および CAN の影響を評価した。CIL と CAN はいずれも濃度依存的に $[^3\text{H}]$ taurocholic acid の取り込みを阻害し、 IC_{50} はそれぞれ $6.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 、 $70.5 \pm 2.4 \mu\text{M}$ であった (Fig. 3-2)。CIL、CAN ともに BSEP 阻害能を有することが示され、その阻害強度には約 10 倍の差が認められた。以上より、CIL 自身は強い BSEP 阻害能を有し、代謝を受けることにより阻害が減弱することが示された。

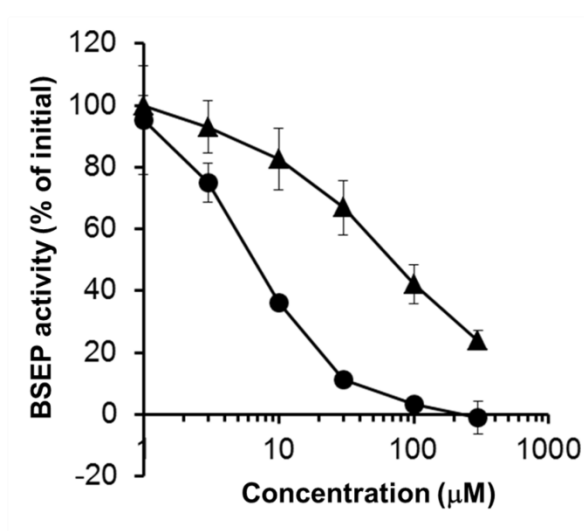


Fig. 3-2 ATP-dependent BSEP-mediated transport of $[^3\text{H}]$ taurocholic acid by membrane vesicles prepared from Sf9 cells in the presence of CIL (●) or CAN (▲). BSEP-mediated transport of $[^3\text{H}]$ taurocholic acid was measured in the absence (control) or in the presence of CIL (●) or CAN (▲) at 37°C for 5 min. BSEP-mediated transport was determined by subtracting the $[^3\text{H}]$ taurocholic acid uptake in the presence of AMP (4 mM) from that in the presence of ATP (4 mM). Inhibitory effect was expressed as % of control. Each point represents the means \pm S.E.M. ($n=3$).

第2項 ヒトSCHにおけるCILの代謝プロファイル

SCHとCILをインキュベーションした際の、細胞中および培地中のCIL未変化体量を測定し、その和を総未変化体CIL量として、経時的推移を示した (Fig. 3-3)。CILの総未変化体量は経時的に減少し、120分後には反応開始直後の約10%にまで減少した。この結果から、CILの代謝の影響を評価するため、以降の実験では評価時点を120分に設定した。

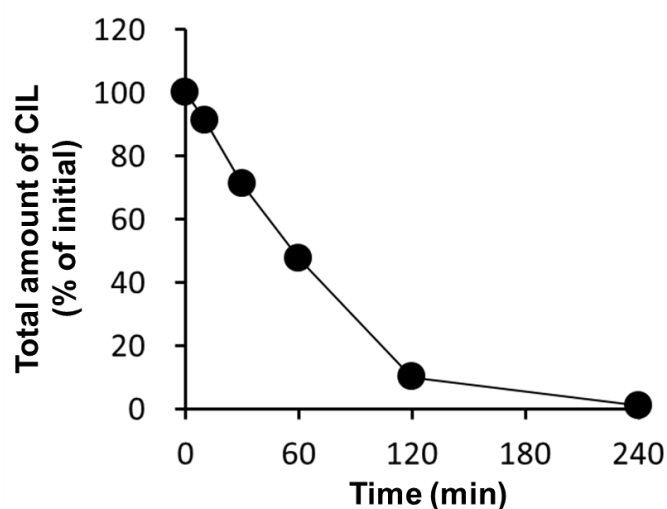


Fig. 3-3 Time profiles of a total CIL (intra- and extra-cellular amount) in human SCH.

30 μ M of CIL was incubated with human SCH up to 240 min. The amount was shown as percent of initial. Data represent means of duplicate determinations from one donor (lot. HC2-8) as a representative result of two donors (lot. HC2-8 and 582).

第3項 ヒトSCHの細胞内CIL、CAN量に及ぼす代謝阻害剤の影響

CILの加水分解代謝を阻害することが知られているコリンエステラーゼの不可逆的阻害薬 diisopropyl fluorophosphate (DFP) を用いて⁹³⁾、細胞内の未変化体CILと代謝体CAN量に及ぼすDFPの影響について評価した。反応時間120分における細胞内CIL未変化体量はDFPの濃度依存的に増加し、一方で細胞内の代謝体CAN量は減少した (Fig. 3-4)。以上より、DFPはCIL代謝を阻害することにより細胞内CIL量の増加を引き起こすことが示唆された。

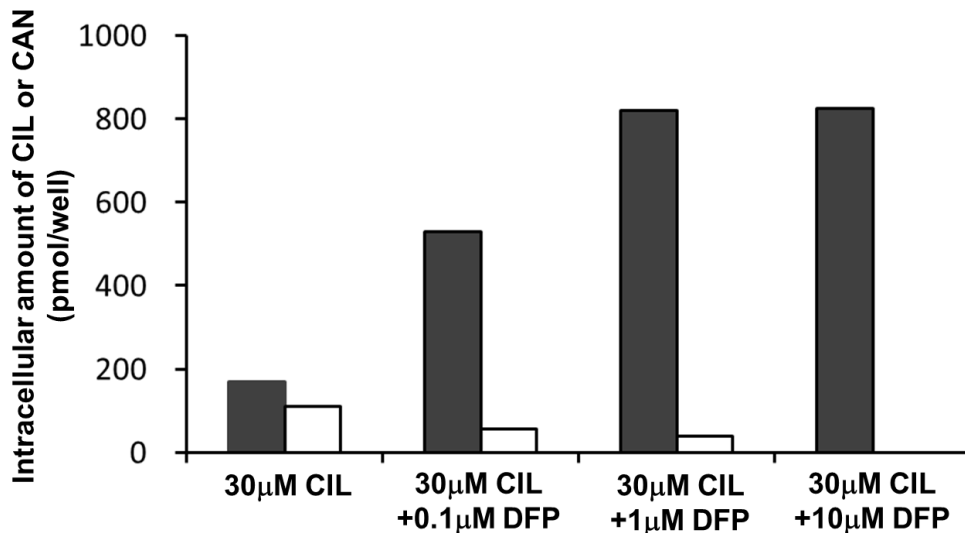


Fig. 3-4 Effect of DFP on intracellular accumulation of CIL and CAN in human SCH.

After 30 μM of CIL was incubated with human SCH in the presence of DFP (0.1, 1, 10 μM) for 120 min, intracellular amounts of CIL (black bars) and CAN (white bars) was determined. Data represent means of duplicate determinations from one donor (lot. HC2-8) as a representative result of two donors (lot. HC2-8 and 582) .

第4項 ヒト SCH における³H]taurocholic acid の肝胆移行動態に及ぼす CIL 曝露の影響

SCH を 10 μM の CIL に事前曝露した際の³H]taurocholic acid の BEI と推定細胞内薬物濃度を Fig. 3-5 に示した。CIL 曝露群における³H]taurocholic acid の BEI は 62.7%であり、コントロール（溶媒曝露）群における 66.5%とほぼ同等であったことから、ヒト SCH において CIL 単独では BSEP 阻害が観察されなかった。一方、CIL 代謝を阻害するため CIL と 1、10 μM の DFP を併用した事前曝露条件下で³H]taurocholic acid の BEI を評価した結果、CIL 単独曝露群と比較して BEI はそれぞれ 19.5、11.6%に低下した。10 μM の DFP 単独曝露では BEI に影響を与えなかったことから、代謝阻害によって細胞内量が増加した CIL が BSEP 阻害を示したものと推察された。このときの推定細胞内 CIL、CAN 濃度は Fig. 3-5 に示すとおりであった。

³H]Taurocholic acid の肝取り込みは CIL 単独群で低下し、さらに DFP 併用下でその低下は顕著になった。また、DFP 単独群では肝取り込みに影響を及ぼさなかった。以上より、CIL 自身が³H]taurocholic acid の肝取り込みトランスポーターである NTCP を阻害すること、また DFP 併用により増加した CIL が取り込みトランスポーター阻害をさらに増強したことが示唆された。

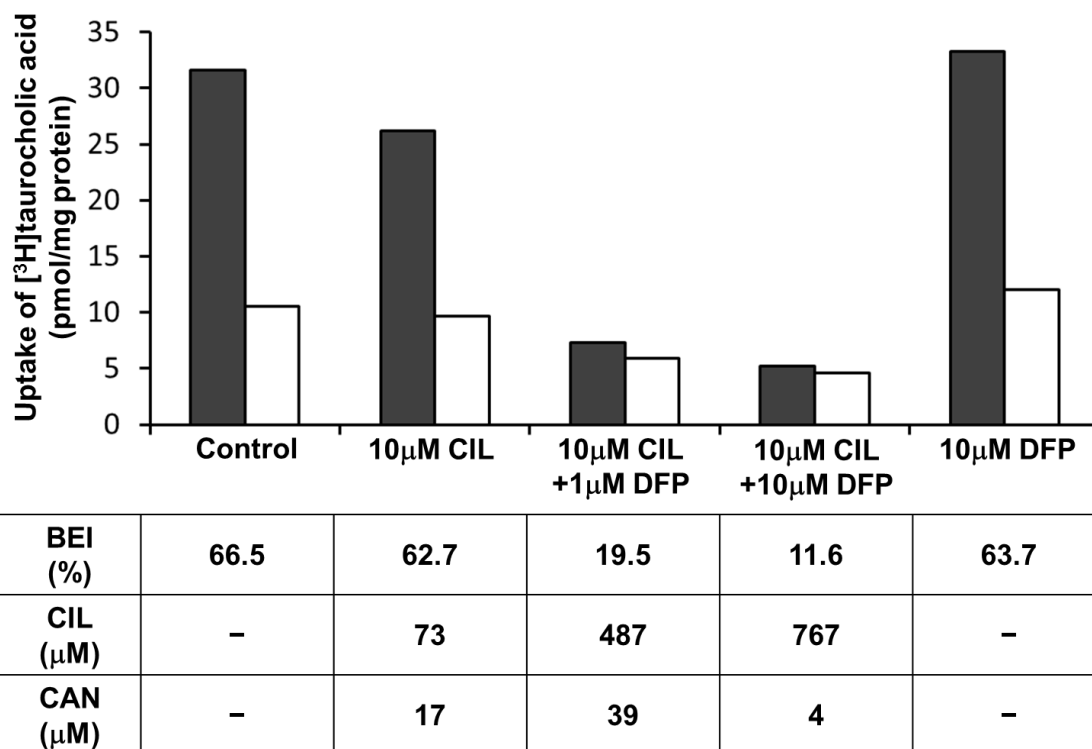


Fig. 3-5 Effect of CIL on the hepatobiliary disposition of [³H]TA in human SCH.

Accumulation of [³H]taurocholic acid in cells + bile (black bars, Ca²⁺/Mg²⁺ presence) and cells (white bars, Ca²⁺/Mg²⁺ absence) were measured in the presence of CIL (10 µM) and DFP (1, 10 µM) in human SCH. Table underneath the Figure lists actual value of BEI and calculated intracellular concentrations of both CIL and CAN as described under Materials and Methods. Data represent means of duplicate determinations from one human donor (lot.HC2-8).

第3節 考察

本章では、ヒト SCH を用いて CIL の BSEP 阻害を評価し、さらに CIL 代謝の変動が BSEP 阻害に及ぼす影響について検討した。本検討から得られた知見を以下に小括した。

- ① 膜ベシクルを用いた検討により、CIL は CAN に比べて強い BSEP 阻害を示すことが明らかとなった。
- ② ヒト SCH において CIL 曝露では BSEP 阻害が観察されないが、CIL の代謝阻害剤である DFP 共存下で顕著な BSEP 阻害が認められた (Fig. 3-6)。
- ③ BSEP 発現膜ベシクルと SCH における CIL の BSEP 阻害の相違は、代謝活性を維持した SCH における CIL の加水分解代謝に起因することが示された。

以上の結果から、SCH は肝細胞内で進行する薬物代謝を加味した BSEP 阻害評価に応用できる可能性が示され、さらに SCH を用いたトランスポーター阻害評価がヒトにも応用可能であることが示された。

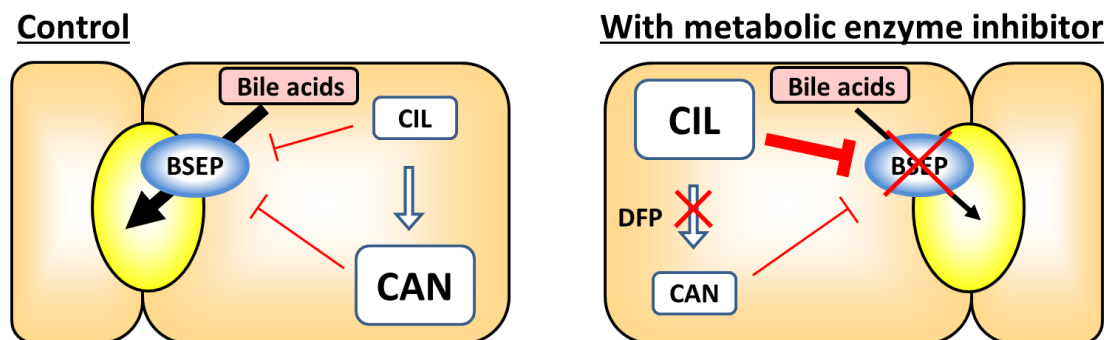


Fig. 3-6 Inhibition of BSEP by CIL in SCH

CIL は BSEP 発現膜ベシクルを用いた実験では強い BSEP 阻害を示した。一方、ヒト SCH においては CIL 単独曝露では BSEP 阻害が認められず、CIL の代謝阻害剤である DFP 共存下では顕著な BSEP 阻害を示した。これらの結果から、CIL は BSEP 阻害能を有するものの、代謝活性を維持するヒト SCH においてはエステラーゼによる加水分解代謝を受けて未変化体濃度が減少するために、顕著な BSEP 阻害を示さなかったものと考察された。すなわち薬物の BSEP 阻害を評価する際には、代謝による消失を加味する必要があり、ベシクル輸送実験からでは阻害の影響を過大評価する可能性が示された。

ヒト SCH において BSEP 阻害が認められたときの推定細胞内 CIL 濃度とベシクル輸送実験で得られた BSEP 阻害の IC₅₀ (6.2 μM) には乖離が認められた。この原因の一つとして CIL の細胞内成分への結合が挙げられる。薬物の肝細胞あるいはミクロソームへの結合はその薬物の脂溶性に相関することが報告されているが⁹⁵⁾、CIL の calculated logD_{7.4} (ACD/LogD Suite®; Advanced Chemistry Development, Inc.) は 5.82 と高く、CIL の細胞内遊離型薬物濃度は実測された総濃度と比較して低いと推察される。ヒト SCH における CIL と BSEP 阻害の関係をより定量的に理解するために、今後 CIL の遊離型薬物濃度を測定することが望まれる。一方、CAN は比較的弱いながらもベシクル輸送実験にて BSEP 阻害が確認されているが、細胞内の総薬物濃度としてはベシクル輸送実験の IC₅₀ (70.5 μM) に到達していないことから、ヒト SCH における BSEP 阻害には寄与していないと推察された。

Taurocholic acid の胆汁中排泄は BSEP に依存することから、SCH を用いた BSEP 機能評価の基質として汎用されている⁹²⁾。一方、taurocholic acid の胆汁中排泄には P-gp や BCRP が一部関与していることから^{52) 96)}、taurocholic acid の BEI に対するこれらのトランスポーターの影響は否定できない。Taurocholic acid の BEI に対する BSEP の寄与率を、選択的阻害剤あるいは siRNA 等を利用して明確にすることは、本評価系の科学的妥当性を裏付けるものと考えられる。

一般に肝臓における薬物相互作用のリスク評価は、以下の式で表されるように門脈血中

薬物濃度 ($I_{in,max}$) と阻害定数 (IC_{50} や K_i) の比較によって行われる^{97) 98)}。

$$f_u \times I_{in,max} / IC_{50} > 0.25 \text{ または } 0.1 \text{ (ただし、 } I_{in,max} = C_{max} + F_a \times Dose \times k_a / Q_h \text{)}$$

F_a : 吸収率
 $Dose$: 投与量
 k_a : 吸収速度定数
 Q_h : 肝血流速度
 f_u : 血液中遊離形分率

しかしながら薬物の BSEP 阻害に起因する胆汁うっ滞は上記の式からは必ずしも正確に予測できないことが示されている。Dawson らは 85 の医薬品についてベシクル輸送実験から得られた BSEP 阻害の IC_{50} と臨床での肝障害についての関連を網羅的に解析し、血中濃度と IC_{50} から肝障害の有無を明確に区別することはできないとの結論を得ている⁹⁹⁾。臨床において胆汁うっ滞を示すことが知られている glibenclamide や nifedipine は、強い BSEP 阻害を示すものの血中濃度が低く、上記の式からは胆汁うっ滞のリスクを見落とす (false negative) 例として挙げられる⁹⁹⁾。さらに Kis らはベシクル輸送実験の $IC_{50} < 25 \mu M$ の医薬品のほとんどが肝障害を引き起こすことを示しており¹⁰⁰⁾、また Thompson らはベシクル輸送実験の $IC_{50} < 500 \mu M$ を肝障害予測における BSEP 阻害のクライテリアとして提案している¹⁰¹⁾。このように BSEP 阻害に基づく肝障害の予測において、血中濃度を加味した従来の予測式が用いられず、 IC_{50} を指標にした画一的なクライテリア設定をせざるを得ない理由の一つとしては、ベシクル輸送実験では *in vivo* における肝取り込み、組織結合、あるいは代謝を反映していないことが挙げられる。このような現状からもより生体を反映した肝細胞を用いた BSEP 阻害評価の意義は高いと言える。

今回ヒト SCH とベシクルから得られた結果を CIL の臨床所見と比較した。ベシクル実験から得られた IC_{50} は $6.2 \mu M$ と、肝障害により市場撤退している医薬品群とほぼ同程度の強い阻害を示しており¹⁰⁰⁾、従来の考え方によると臨床における肝障害リスクは高いと判断さ

れるが、一方のヒト SCH では BSEP 阻害が認められていない。実際に CIL の臨床における重篤な肝障害の発生頻度は低いとされていることを勘案すると⁹⁴⁾、BSEP 阻害からの胆汁うっ滞/肝障害予測としては、ヒト SCH で得られた結果のほうがより臨床所見を反映していると考えられる。

さらに今回得られた結果は、エステラーゼ阻害剤との併用時や poor metabolizers の服用時には、CIL による胆汁うっ滞や肝障害が増強される可能性があることを示唆している。過去の構造活性相関研究より、エステルは BSEP に対して高親和性を示す構造であることが知られており¹⁰²⁾、また、多くの医薬品がカルボキシルエステラーゼに対して強い阻害を示すことが報告されている¹⁰³⁾。このような背景から、エステル型プロドラッグとエステラーゼ阻害剤との併用時には BSEP 阻害を介した胆汁うっ滞/肝障害を注意深くモニターする必要があると考えられる。

第 3 章における E₂ の事例とは対照的に、本章は膜ベシクル実験のみからでは臨床における胆汁うっ滞/肝障害リスクを過大評価し、false positive リスクが生じ得るケースと言える。False positive リスクは有望な化合物をドロップアウトさせてしまうという点で製薬企業にとって大きな損失であり、false negative リスクと同様に可能な限りそのリスクを低減すべきである。このような観点から、SCH は肝臓における排泄トランスポーターを介した相互作用を評価するための *in vitro* ツールとなる可能性を有しており、ベシクル輸送実験のみからでは得られない有益な情報を提供するものと考えられる。

第5章 結論

本論文ではサンドイッチ培養肝細胞（SCH）を薬物の肝胆系移行動態の評価に応用した。第2章にて薬物の肝取り込みおよび胆汁中排泄動態の解明、また第3、4章にて薬物代謝が関与するトランスポーター阻害の評価について検討を行い、それぞれ以下の結論を得た。

第2章

胆汁中排泄型薬物のモデル化合物として TA-0201CA を選択し、薬物の肝取り込みおよび胆汁中排泄に関わるトランスポーターを推定した。SDR と EHBR から単離・調製したラット SCH を用いた検討により、TA-0201CA は Oatps、Ntcp により肝臓に取り込まれ、Mrp2、Bsep により胆汁中に排泄されることが示唆された。SCH は肝取り込みおよび胆汁排泄のメカニズムを推定するための有用なツールとなり得ることが示された。

第3章

SCH を薬物の代謝物による Mrp2 を介した DDI 評価に応用した。また検出方法として、経時的かつ可視的に阻害を評価できる QTLI 法を用いた。モデル化合物として選択した estradiol は、それ自身は Mrp2 を阻害しないが、代謝により生成したグルクロン酸抱合体が Mrp2 阻害を示すことがベシクル実験より明らかとなった。ラット SCH を用いた場合、estradiol を曝露することにより細胞内でのグルクロン酸抱合体の生成を介して Mrp2 阻害が検出可能であった。同様に、SCH を用いることで bilirubin の代謝物を介した Mrp2 阻害を検出することができた。本研究から、SCH を用いた QTLI 法により、医薬品代謝物の同定・合成をすることなく代謝物による阻害を簡便に評価可能であること、また未知代謝物によるトランスポーター阻害を見落とす false negative リスクを回避できる可能性が示された。

第4章

第3章で検討した薬物代謝が関わるトランスポーター阻害について、ヒト肝細胞への応用の可能性を検証した。ここでは、毒性学的な重要性が高いBSEP阻害を評価対象とし、モデル化合物としてCANのエステル型プロドラッグであるCILを選択した。BSEP発現膜ベシクルを用いた阻害実験により、CIL自身は強いBSEP阻害を示すものの、加水分解代謝により阻害が大きく減弱することが明らかとなった。ヒトSCHではCILによる強いBSEP阻害は検出されず、細胞内での代謝による速やかな消失がその原因であることが示された。強い阻害が認められた膜ベシクル実験と比較すると、ヒトSCHにて得られた結果は、重篤な肝障害の発生頻度が低いというCILの臨床所見をより良く反映するものであった。以上より、ヒトSCHは薬物代謝を反映したBSEP阻害評価系となり得る可能性が示された。

医薬品候補化合物の体内動態に関わるトランスポーター評価は、国内では2001年発行のガイダンス、また米国FDAでは2006年発行のドラフトガイダンスにて公的に言及されているが¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾、この際に評価対象として挙げたのは消化管における排泄トランスポーターとしてのP-gpのみであった。その後、産官学のメンバーからなるInternational Transporter Consortium (ITC)が中心となり、医薬品開発のトランスポーター評価に関するWhite paperが2010年に出版され¹⁰⁶⁾、P-gp以外のトランスポーター評価の必要性が提唱された。その中では主に薬物の血中濃度に影響を及ぼすことが知られているトランスポーターを評価対象として推奨したが、肝臓においては取り込みトランスポーターのみであり、胆管側排泄トランスポーターに関しては言及されていなかった(消化管吸収トランスポーターとの位置付けでP-gp、BCRPのみ言及あり)。しかし、多くの研究によりMRP2、BSEPの重要性が認識されてきたことから、2012年にFDAから発行されたDrug Interactionsに関するドラフトガイダンス、またEMAから同年に発行された同ガイダンスにおいて、BSEPあるいは

MRPs の評価の必要性について言及がなされた^{97) 107)}。このような動向から、これらのトランスポーターを介した相互作用評価の重要性は今後さらに高まっていくことが予想される。胆管側排泄トランスポーターの阻害は肝臓中濃度の上昇を引き起こすと考えられるが、ヒトにおける肝臓中薬物濃度の測定は困難であるため、それらの臨床における検証データがほとんどないのが現状である。この観点から SCH を用いた QTLI 法は、相互作用薬の細胞外、即ち血中の未変化体濃度から、細胞内の未変化体または代謝物によるトランスポーター阻害が予測可能であることから、極めて有用な評価系であると考えられる。また近年、Positron Emission Tomography (PET) や Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) などのイメージング技術により組織中濃度を非侵襲的に定量化することが可能になってきた¹⁰⁸⁾。今後の PET、SPECT 技術を応用した臨床治験が蓄積し、排泄トランスポーター阻害と組織中薬物濃度の変化、さらには毒性発現との関係性がさらに明確になることによって、排泄トランスポーターの臨床上の位置づけはさらに重要になっていくと考えられる。またこれらの技術を組み合わせて SCH からの臨床予測の妥当性を科学的に検証することにより、SCH の肝胆系移行動態の評価ツールとしての有用性がますます高まることが期待される。

SCH は 1999 年に Brouwer らが薬物の胆汁排泄評価に応用して以降²⁴⁾、現在もなお唯一の *in vitro* 胆汁排泄評価系として認識されており、多くのグループが本評価系を研究・活用してきた。製薬企業においても医薬品候補化合物のプロファイリング、ヒトにおける動態予測、薬物間相互作用の予測などに応用されており、ヒトにおける有効性・安全性の担保に本評価系が大きく貢献してきた^{26) 109)}。このような背景から、2013 年に ITC から発行された White paper では肝胆系移行動態の評価ツールとして SCH に関しての言及がなされている⁸⁹⁾。さらに近年、SCH を用いた評価系の自動化による high-throughput screening への取り組みもなされており¹¹⁰⁾、医薬品研究・開発への利用は今後さらに広がっていくと考えられる。一方、ヒト肝細胞を用いる評価系には二つの大きな課題が挙げられる。一つ目は細胞の Lot (ドナー) 間差である。ヒト凍結肝細胞にはときに大きな Lot 間差が認められ¹¹¹⁾、この点

は現状でも大きな課題として残されている。この課題を克服する手段の一つとして HepaRG®細胞などの細胞株の利用が挙げられる。ヒト肝腫瘍由来細胞株である HepaRG®細胞はヒト肝細胞様の形態を示し、肝特異的な機能を維持・発現している¹¹²⁾。また HepaRG®細胞は凍結ヒト肝細胞において問題となる細胞 Lot 間差が小さく、細胞入手が容易であることから、ヒト肝細胞の代替ツールとして注目されている。実際に HepaRG®細胞はヒト肝細胞と同レベルの血管側あるいは胆管側のトランスポーター発現を示し、また CYP 誘導を初めとした長期間培養にも応用されている¹¹³⁾。さらに近年、人工多能性幹細胞である induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) が樹立され、創薬への応用の可能性が広がっている。Mizuguchi らのグループはヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導に成功した¹¹⁴⁾。ヒト肝細胞との機能の比較は今後の課題であるが、iPS 細胞ではヒト肝細胞と同程度の CYP3A4 の代謝活性やその誘導能を有するなど、薬物動態研究への応用の可能性が示されている¹¹⁵⁾。今後、ヒト肝細胞に代わるツールとして、均一な品質をもつ Lot の調製とその安定提供の実現が期待される。二つ目の課題は代謝酵素あるいはトランスポーター活性の維持が挙げられる。ヒト SCH における代謝酵素あるいはトランスポーター活性/発現は一部の分子種については培養期間中に低下していくことが知られており²⁶⁾、ヒトにおける肝胆移行動態の予測精度低下の原因となる。これらの活性低下は培養条件に依存することから²⁶⁾、主要な分子種が高活性/発現の状態に維持される培養条件（培地組成、細胞外基質、器材など）の確立は今後取り組むべき課題として挙げられる。近年、代謝酵素やトランスポーターの絶対定量が報告され¹¹⁶⁾、本手法がヒト SCH とヒト肝臓における発現量の比較に応用された。発現量を加味した *in vitro* - *in vivo* のブリッジングは培養期間中の発現量の低下を補正する手段となり得る可能性があり、代謝酵素やトランスポーターの発現量を網羅的に把握することは、ヒト SCH からの *in vivo* の予測精度向上に貢献するものと考えられる。

以上、本研究では SCH を医薬品の肝胆系移行動態のメカニズム解明と、薬物代謝を加味したトランスポーター阻害の評価に応用した。本研究成果は、医薬品研究開発における SCH

のさらなる応用の可能性を示すものであり、本評価系の利用は有効性・安全性に優れた医薬品の創製に貢献できるものと考えられる。

第6章 実験方法

I. 試薬

N-[6-[2-[(5-Bromo-2-pyrimidinyl)oxy]ethoxy]-5-(4-methylphenyl)-4-pyrimidinyl]-4-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl) benzenesulfonamide sodium salt (TA-0201) およびそのカルボン酸体 (TA-0201CA) は田辺三菱製薬 (株) にて合成されたものを使用した。[³H]Taurocholic acid は American Radiolabeled Chemicals (St.Louis、MO) より購入した。[³H]Estradiol 17β-D-glucuronide および [³H]Digoxin は PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、William's medium E (WEM)、standard Hanks' balanced salt solution (HBSS)、Ca²⁺/Mg²⁺ free Hanks' balanced salt solution、insulin、transferrin、collagenase type I、trypsin inhibitor、glycyrrhizic acid、estradiol 17β-D-glucuronide、ketoprofen、percoll、および verapamil は Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) より購入した。InVivoGro CP media および Torpedo antibiotic mix は Celsis In Vitro Technologies (Baltimore, MD) より購入した。CM4000 は Life Technologies (New York, NY) より購入した。Fetal bovine serum は Nichirei Bioscience (Tokyo, Japan)、および Euroclone (Pero, Italy) より購入した。5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein、5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate、diisopropyl fluorophosphates、sodium selenite、dexamethasone、および glibenclamide は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。Fumitremorgin C および MK-571 は Calbiochem (San Diego, CA) より購入した。Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)、phenol red、および tetraethylammonium は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。Pitavastatin は Toronto Research Chemicals (North York, Canada, ON) より購入した。Penicillin–streptomycin、phosphate-buffered saline、および trypan blue は Life Technologies (New York, NY) より購入した。Matrigel は BD Biosciences (San Jose, CA) より購入した。Candesartan cilexetil は LKT Laboratories (St. Paul, MN) より購入した。Candesartan は Kemprotec (Middlesbrough, UK)

より購入した。Human BSEP/Rat Bsep/Rat Mrp2 expressing membrane vesicles および BSEP/MRP2 assay reagent kit は GenoMembrane (Yokohama, Japan) より購入した。BCA protein assay kit は Pierce Chemical (Rockford, IL) より購入した。Human cryopreserved hepatocytes (Lot. HC2-8, 582) および Hepatocytes isolation kit は XenoTech (Lenexa, KS) より購入した。その他の試薬は特級あるいは分析グレードのものを用いた。

なお、全てのヒト組織を用いた *in vitro* 試験は田辺三菱製薬のヒト組織研究倫理委員会の承認を得た。

II. 実験動物

第2章にて用いた Sprague-Dawley 系雄性ラット (SDR) は日本チャールスリバー (Yokohama, Japan) より購入した。また Eisai Hyperbilirubinemic Rat (EHBR) は日本エスエルシー (Hamamatsu, Japan) より購入した。

第3章にて用いた Wister 系あるいは SDR、および EHBR は三協ラボサービス (Tokyo, Japan) より購入した。

購入した動物は1週間以上馴化飼育した後、実験に供した。なお、すべての動物実験は田辺三菱製薬動物実験倫理委員会指針あるいは金沢大学動物実験指針に従った。

Ⅲ. サンドイッチ培養ラット肝細胞を用いた薬物の胆汁中排泄トランスポーターの推定 (第2章)

1. ラットにおける TA-0201CA の血中濃度および胆汁排泄評価

SDR あるいは EHBR をジエチルエーテル軽麻酔下で仰臥位に保定し、開腹した。ポリエチレン製のカニューレ (内径 ; 0.28 mm、外径 : 0.61 mm、夏目製作所、東京) を総胆管に挿入した。7%炭酸水素ナトリウム水溶液で 1 mg/mL に調製した TA-0201CA を、尾静脈から 1 mL/kg の容量で急速投与し、2、5、10、30、60、120 および 180 分後に頸静脈から血液を、また 10、20、30、60、90、120 および 180 分後にカニューレから胆汁を採取した。血液を遠心分離し血漿画分を得た。血漿および胆汁にアセトニトリル/メタノール (70/30, v/v) を加えて除タンパク処理した上清を LC-MS/MS 分析用サンプルとした。

2. ラットにおける TA-0201CA の肝移行評価

Ⅲ-1 項と同様に、軽麻酔下で SDR に TA-0201CA を 1mg/kg の投与量で静脈内投与した。180 分後に頸静脈から血液を採取し、遠心分離によって血漿画分を得た。また肝臓を氷冷の生理食塩水で灌流し、一部を採取した。肝臓切片に 4 倍量 (v/w) の生理食塩水を添加し、氷冷下でホモジネートした。血漿および肝ホモジネートにアセトニトリル/メタノール (70/30, v/v) を加えて除タンパク処理した上清を LC-MS/MS にて分析した。

3. 血漿および肝臓中タンパク結合実験

TA-0201CA をブランク血漿およびブランク肝ホモジネートに 10 μ M になるように添加した。遠心分離前のサンプルを一部採取し、生理食塩水で 10 倍希釈したものを総濃度サンプルとした (C_t)。また、一部採取したものをそれぞれ 37°C および 4°C にて 436,000 g で 4 時間遠心分離後、非結合型画分を採取したものを遊離型濃度サンプルとした (C_f)。それぞれ

にアセトニトリルを添加して除タンパク処理した上清を LC-MS/MS にて分析した。血漿および肝臓中タンパクにおける遊離形分率 (f) は以下の式により算出した。

$$f=C_f/C_t \text{ (} C_f \text{: 遠心分離後のサンプル中薬物濃度、} C_t \text{: 遠心分離前のサンプル中薬物濃度)}$$

4. ラット肝細胞の単離・培養

SDR あるいは EHBR をペントバルビタール麻酔下で仰臥位に保定し、開腹した。門脈にカニューレを施した後、肝臓を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (0.5 mM EGTA、6 mg/L phenol red 含有) で 10 分間灌流し、引き続き standard HBSS (0.35 mg/mL collagenase type I、0.56 mg/mL CaCl_2 、0.05 mg/mL trypsin inhibitor 含有) にて 10 分灌流した。消化された肝細胞を supplemented DMEM (5% FBS、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin、6.25 ng/mL selenium、100 U/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin、1 μM dexamethazone 含有) に回収した。150 μm メッシュにて遊離肝細胞を濾過し、遠心用チューブへ移して遠心分離 (50 g、1 min) した。上清を捨て DMEM を加えて再度遠心分離 (50 g、1 min) し、この操作をさらに 2 回繰り返した。単離した肝細胞を DMEM で希釈し、trypan blue を添加して生細胞数を計数した。Viability が 80% 以上の肝細胞を播種した。最終濃度が 4×10^5 cells/mL なるように DMEM を添加し、 2×10^5 cells/well の濃度でコラーゲンコート済みの 24-well プレート (AGC テクノグラス、静岡) に播種した。37°C の CO_2 インキュベーター内で 2 時間、細胞を接着させた後、培地を吸引除去し、0.05 mg/mL の matrigel を含有する WEM (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin、6.25 ng/mL selenium、100 U/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin、0.1 μM dexamethazone 含有) で培地交換を行った。翌日より同培地にて毎日培地交換を行い、培養 5 日目に実験に供した。

5. ラット SCH を用いた薬物の取り込み実験

培地を吸引除去した細胞を standard HBSS あるいは $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (0.5 mM EGTA 含

有)にて1回洗浄した。その後、それぞれの HBSS を再度添加して、10 分間肝細胞をプレインキュベーションした。HBSS を吸引除去した後、基質を含む standard HBSS を添加して取り込み反応を開始した。所定の時間に薬液を吸引除去し、氷冷の standard HBSS にて細胞を4回洗浄した。

放射標識基質を用いた場合、0.1%の Triton-X を添加し、20 分間インキュベーションすることで細胞を破壊した。細胞懸濁液の一部をバイアルに移し、液体シンチレーションカウンター (LSC、Tri-Carb 3100TR、PerkinElmer Life and Analytical Sciences、Boston、MA) にて放射エネルギーを測定した。タンパク定量は BCA protein assay kit を用いて行った。

非標識基質を用いた場合、アセトニトリル/メタノール (70/30, v/v) を添加し、10 分間インキュベーションすることで細胞を破壊した。細胞懸濁液の一部をチューブに移し、除タンパク処理およびフィルター濾過を行った。ろ液をエバポレーターで乾固し、分析の初期移動相を添加したものを LC-MS/MS にて分析した。

6. ラット Bsep および Mrp2 発現膜ベシクルを用いた TA-0201CA の取り込み阻害実験

Bsep あるいは Mrp2 発現膜ベシクル原液 (5 mg/mL) を反応用 buffer で2倍希釈したベシクル懸濁液 20 μ L を 37 °C で5分間プレインキュベーションした。10 μ M の TA-0201CA を含む ATP (AMP) 含有アッセイミックスを 30 μ L をベシクル懸濁液に添加して取り込み実験を開始し、37 °C 条件下で5分間反応させた。この際のベシクルタンパク濃度は 50 μ g/reaction とした。所定の時間後、反応停止用 buffer を添加して反応を停止した。反応停止液をフィルター (HAWP02500, Millipore, Bradford, MA) 上に回収し、迅速濾過法により洗浄を行った。フィルター上に残存する TA-0201CA を精製水で抽出し、アセトニトリル/イソプロパノール混合液 (2/3, v/v) を等量添加した。遠心分離した上清を LC-MS/MS 分析用サンプルとした。

(1) Bsep 用 buffer の組成

反応用 buffer

HEPES-Tris	: 10 mM
KNO ₃	: 100 mM
Mg(NO ₃) ₂	: 10 mM
Sucrose	: 50 mM

ATP (AMP) 含有アッセイミックス

Mg ATP (Mg AMP)	: 10 mM
-----------------	---------

反応停止用 buffer

HEPES-Tris	: 10 mM
KNO ₃	: 100 mM
Sucrose	: 50 mM

(2) Mrp2 用 buffer の組成

反応用 buffer

MOPS-Tris	: 50 mM
KCl	: 70 mM
MgCl ₂	: 7.5 mM

ATP (AMP) 含有アッセイミックス

Mg ATP (Mg AMP)	: 10 mM
Glutathione	: 5 mM

反応停止用 buffer

MOPS-Tris : 40 mM

KCl : 70 mM

7. ラット Bsep および Mrp2 発現膜ベシクルを用いた TA-0201CA の取り込み阻害実験

Bsep および Mrp2 の典型的な基質としてそれぞれ $[^3\text{H}]$ taurocholic acid および $[^3\text{H}]$ estradiol 17 β -D-glucuronide を用いた。Bsep あるいは Mrp2 発現膜ベシクル原液 (5 mg/mL) を反応用 buffer で2倍希釈したベシクル懸濁液 20 μL を 37 $^{\circ}\text{C}$ で5分間プレインキュベーションした。基質および阻害剤を含む ATP (AMP) 含有アッセイミックスを 30 μL をベシクル懸濁液に添加して取り込み実験を開始し、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で5分間反応させた。 $[^3\text{H}]$ taurocholic acid および $[^3\text{H}]$ estradiol 17 β -D-glucuronide の基質濃度はそれぞれ 40、100 nM とし、ベシクルタンパク濃度は 50 $\mu\text{g}/\text{reaction}$ とした。所定の時間後、反応停止用 buffer を添加して反応を停止した。反応停止液をフィルター (HAWP02500, Millipore) 上に回収し、迅速濾過法により洗浄を行った。フィルターを回収してバイアルに入れ、フィルター上に残存する放射エネルギーを LSC にて測定した。ATP 存在下の取り込み量と AMP 存在下の取り込み量の差から、ATP 依存的な取り込み量を算出した。IC₅₀ 値は Prism software package (version 5; GraphPad Software Inc.) を用いた非線形回帰分析から算出した。

なお、各 buffer は III-6 と同様のものを用いた。

8. LC-MS/MS を用いた TA-0201CA および pitavastatin の定量分析

TA-0201CA および pitavastatin は以下の条件にて測定した。

HPCL 条件

HPLC system : Acquity™ UPLC system (Waters, Milford, MA)

Mobile phase : A ; 10 mM Ammonium acetate、 B ; Acetonitrile、

A/B ; 95/5→10/90 (3 分)

Flow rate : 0.4 mL/min

Column : Acquity™ UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, Waters)

Column temperature : 40°C

Injection volume : 3 μL

MS 条件

MS system : Waters Quattro Premier™ XE tandem quadrupole mass spectrometer (Waters)

Ion mode : ESI positive

Capillary voltage : 1.0 kV

Source temperature : 120°C

Desolvation gas temperature : 400°C

Gas flow rate : 1000 L/h (nitrogen)

Cone gas flow rate : 50 L/h

Monitoring ion transition : 630.09 > 203.00 (TA-0201CA) 、 422.13 > 290.10 (pitavastatin)

Collision energy : 27 (TA-0201CA)、 30 (pitavastatin)

Data acquisition : MassLynx™ Ver. 4.1 software with a QuanLynx™ program (Waters)

9. データ解析

(1) *In vivo* 薬物速度論的解析

薬物速度論的パラメータは MULTI コンピュータープログラムを用いて、モデル非依存的解析により求めた¹¹⁷⁾。見かけの消失半減期は消失相の消失速度定数 (λ_z) より求めた。 λ_z は血漿中濃度推移の消失相の片対数直線回帰より求めた。投与後無限大までの血漿中濃度-時間下面積 (AUC) は最終採血時点までは台形法にて算出し、最終採血時点からは λ_z を用いて無限大まで外挿した。全身クリアランス (CL_{tot}) は $Dose/AUC$ 、平均血中滞留時間 (MRT) は $AUMC$ (一次モーメント曲線下面積) / AUC 、定常状態の分布容積 (V_{dss}) は $CL_{tot} \times MRT$ より算出した。*In vivo* 胆汁中排泄クリアランス (CL_{bile}) は $CL_{bile} = X_{bile,0-180min}/AUC_{0-180min}$ により算出した。ただし、 $X_{bile,0-180min}$ および $AUC_{0-180min}$ はそれぞれ投与後 180 分までの胆汁中への累積排泄量、および AUC を示す。*In vivo* 胆汁排泄固有クリアランス ($CL_{bile,int}$) は以下の式より算出した。

$$CL_{bile,int} = \frac{Q_h \times CL_{bile}}{Q_h - CL_{bile}} \times \frac{1}{f_p}$$

ただし、 Q_h はラットにおける肝血流速度 (67 mL/min/kg)¹¹⁸⁾、 f_p は血漿中タンパク結合率を示す。また、血液/血漿中薬物濃度比は 1 と仮定した。

(2) *In vitro* 薬物速度論的解析

取り込み固有クリアランス ($CL_{uptake,int}$) および見かけの胆汁排泄固有クリアランス ($CL_{bile,int}$) は式に従って算出した。計算においてラット肝重量とタンパク含量はそれぞれ 40 g/kg of body weight、200 mg protein/g of liver weight とした^{119) 120)}。

$$CL_{\text{uptake,int}} = \frac{\Delta \text{uptake}(\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} \text{ presence}_{2-0\text{min}})}{\text{incubationtime} \times \text{concentration}(\text{medium})}$$

ただし、 Δuptake は 0 および 2 分における取り込み量の差を示し、 $\text{concentration}(\text{medium})$ は 0 分における培地中薬物濃度を示す。

$$CL_{\text{bile,int}} = \frac{\text{uptake}(\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} \text{ presence}) - \text{uptake}(\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} \text{ absence})}{\text{incubationtime} \times \text{concentration}(\text{medium})}$$

ただし、 $\text{uptake} (+\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+})$ および $\text{uptake} (-\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+})$ はそれぞれ $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ 存在下および非存在下におけるラット SCH への取り込み量を示し、また $CL_{\text{bile,int}}$ は 10 分にて評価した。

Biliary excretion index (BEI) は B-CLEAR technology (Qualyst, Inc., Raleigh, NC)²⁴⁾ によって下記の式に従って算出した。また BEI は 15 分にて評価した。

$$\text{BEI} = \frac{\text{uptake}(\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} \text{ presence}) - \text{uptake}(\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} \text{ absence})}{\text{uptake}(\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} \text{ presence})}$$

(3) ベシクル阻害実験の速度論的解析

ATP 存在下の取り込み量と AMP 存在下の取り込み量の差から、ATP 依存的な取り込み量を算出した。基質の取り込み活性に対する阻害効果の検討では、対照群 (control) の取り込み活性を 100% として、相対活性で示した。IC₅₀ は Prism software package (version 5; GraphPad Software Inc.) を用いて以下の式より算出した。

$$\% \text{ of control} = \text{IC}_{50} / (\text{IC}_{50} + [\text{I}]) \times 100$$

なお、IC₅₀ は 50% 阻害濃度、[I] は阻害剤濃度を表す。

10. 有意差検定

統計学的有意差の検定は t-検定にて行った。 $p < 0.05$ のときに 2 つのデータセットの間に有意差ありと判断した。

IV. ラット肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物間相互作用の評価 (第3章)

1. ラット Mrp2 発現膜ベシクルを用いた CDF の取り込み実験

Mrp2 の典型的な基質として 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) を用いた。Mrp2 発現膜ベシクル原液 (5 mg/mL) を反应用 buffer で 2 倍希釈したベシクル懸濁液 20 μ L を 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。基質および阻害剤を含む ATP (AMP) 含有アッセイミックスを 30 μ L をベシクル懸濁液に添加して取り込み実験を開始し、37°C 条件下で 5 分間反応させた。CDF の基質濃度は 5 μ M とし、ベシクルタンパク濃度は 50 μ g/reaction とした。所定の時間後、反応停止用 buffer を添加して反応を停止した。反応停止液をフィルター (HAWP02500, Millipore) 上に回収し、迅速濾過法により洗浄を行った。フィルター上に回収した CDF をプレートに移し、蛍光プレートリーダーにて蛍光強度 (ex; 490 \pm 10 nm, em; 535 \pm 25 nm) を測定した (ARVO™ X3, PerkinElmer, Waltham, MA)。ATP 存在下の取り込み量と AMP 存在下の取り込み量の差から、ATP 依存的な取り込み量を算出した。IC₅₀ 値は Prism software package (version 5; GraphPad Software Inc.) を用いた非線形回帰分析から算出した。

なお、各 buffer は III-6 と同様のものを用いた。

2. ディッシュのコラーゲンコート

pH3 の塩酸溶液は 0.01M の塩酸と精製水により調製した。Cellmatrix I-C 溶液 (新田ゼラチン) と塩酸溶液 (pH3) を 1 : 10 の割合で混合させた後に濾過滅菌を行い、コラーゲン溶液を調製した。コラーゲン溶液を 35-mm dish に 1 mL、1 well に 250 μ L 加え、15 分放置した後、アスピレーターで溶液を除去した。クリーンベンチ内で 1 時間乾燥させてから HBSS で 2 回 wash し、コラーゲンコート dish を作成した。

3. ラット肝細胞の単離およびサンドイッチ培養

ラットをジエチルエーテル麻酔下で仰臥位に保定し、開腹した。門脈にカニューレーションを施した後、肝臓を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (0.5 mM EGTA、6 mg/L phenol red 含有) で 10 分間灌流し、引き続き HBSS (0.35 mg/mL collagenase type I、0.56 mg/mL CaCl_2 、0.05 mg/mL trypsin inhibitor 含有) にて 10 分灌流した。消化された肝細胞を supplemented DMEM (5% FBS、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin、6.25 ng/mL selenium、100 U/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin、1 μM dexamethazone 含有) に回収した。ビーカー上に 150 μm メッシュにて遊離肝細胞を濾過した。濾過した遊離肝細胞を遠心用チューブへ移し、1 分間 800 rpm で遠心分離した。上清を吸引し 15 mL になるよう HBSS を加えた後、13.5 mL の percoll 溶液、1.5 mL の 10 x PBS を加えて肝細胞を懸濁させ、3 分間 1000 rpm で遠心した。上清を吸引し、HBSS に肝細胞を懸濁させ、3 分間 1000 rpm で遠心した。上清を吸引した後に 37°C の supplemented DMEM を加えた。細胞懸濁液の一部を採取し、trypan blue を添加して生細胞数を計数した。Viability が 80%以上の肝細胞を播種した。予めコラーゲンコートした 3.5 mm dish または 24-well プレートにそれぞれ 8×10^5 cells/well、 2×10^5 cells/well で播種し、播種 2 時間後、supplemented WEM (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin、6.25 ng/mL selenium、100 U/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin、0.1 μM dexamethazone 含有) に培地交換を行った。播種 24 時間後に 0.25 mg/mL の matrigel 含有 supplemented WEM に培地交換し、翌日より supplemented WEM にて毎日培地交換し、培養 5 日目に実験に供した。

4. ラット肝細胞ホモジネートを用いた CDFDA 加水分解阻害試験

上述の方法で単離した後に凍結してあるラット肝細胞を融解し、 2×10^6 cells/mL になるよう超純水を加えた。ホモジナイザーを用い、5000 rpm で 20 ストロークホモジナイズし、生成したホモジネート 200 μL をチューブに分注した。Inactivated (Background) 条件として、ヒートブロックインキュベーターで 99°C、5 min 加熱処理し、酵素の不活化を行った。ホモ

ジネートに E₂、E₂17G、bilirubin または 1% DMSO 含有 20 μM CDFDA を 200 μL 加え、攪拌した後、37 °C 恒温槽で 5 分間反応させた。Bilirubin のみ、30 分間インキュベーションを行った後に CDFDA を加えるという条件も行った。所定時間の反応後、氷冷 1% Triton-X を加えて反応を停止させた後、サンプルを遠心分離 (15000 rpm, 10 min, 4 °C) し、上清 150 μL を蛍光プレートリーダー (ARVO X3, PerkinElmer) で測定した。励起波長および蛍光波長は、それぞれ 490 ± 10 nm、535 ± 25 nm を用いて測定した。

5. ラット SCH における Quantitative time-lapse imaging analysis (QTLI) 法と E₂ のプレロード効果

培養 5 日後のラット SCH から培地を除去して standard HBSS を添加し、BZ-9000 蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE、大阪) チャンバー内 (37 °C、5%CO₂) に静置して 10 分間プレインキュベーションを行った。溶媒 (コントロール) あるいは各種阻害剤をラット SCH にプレロードし、所定時間後に最終濃度が 10 μM となるように CDFDA を培地 (125 mM NaCl、4.8 mM KCl、5.6 mM D-glucose、1.2 mM CaCl₂、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、25 mM HEPES、pH7.4) に添加した。CDFDA 添加後、毎分 Time-lapse imaging を行い、蛍光顕微鏡にて胆管腔に蓄積した蛍光を測定した。

蛍光顕微鏡画像の解析には BZ-II 解析アプリケーション (KEYENCE) の時系列測定を用いた。撮影画像中、胆管腔が明瞭に観察できる 150 μm x 150 μm の大きさの領域 (Analyzed region、以下 AR) を 6 箇所抽出し、それぞれの領域内の 8 個の胆管腔部分を関心領域 (Region of interest、以下 ROI) として定義した。細胞のない部分の蛍光強度を background として各 ROI の蛍光強度から差し引き、その平均値を AR あたりの蛍光強度 (1ピクセル) とした。6 箇所の AR の平均蛍光強度を各画像撮影時までに移行した蛍光強度として定義した。

観察条件

露光時間（位相差）：50 ms

露光時間（蛍光）：22.2 ms

使用フィルター：GFP（励起波長：470 ± 40 nm、吸収波長：535 ± 50 nm）

対物レンズの倍率：20 倍

Bit：12 bit

6. 曝露時間・濃度に依存した E₂17G 生成量の定量

曝露時間 30、180 min については、20 μM の E₂ を含んだ培地（125 mM NaCl、4.8 mM KCl、5.6 mM D-glucose、1.2 mM CaCl₂、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、25 mM HEPES、pH7.4）で事前に培養した後、20 μM の E₂ 含んだ Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS で 37 °C、10 分間インキュベーションを行った。曝露濃度 2~50 μM については、各濃度の E₂ を含んだ Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS で 37 °C、10 分間インキュベーションを行った。インキュベーション後の HBSS を回収し、細胞を 2 回洗浄してから 70% エタノールを加え、遠心分離（15000 rpm、10 min、4 °C）により除タンパクし、上清を HPLC にて測定した。

7. E₂17G の HPLC による定量

HPCL 分析は以下の条件で行った。

HPLC systems：Waters Alliance2690（Waters）

Mobile phase：Methanol/50 mM NH₄H₂PO₄、pH3（70：30、v/v）

Flow rate：0.7 mL/min

Column：ODS-80Ts 4.6 x 150（TOSOH）

Column temperature：40 °C

Injection volume : 20 μ L

Detector : Waters 2475

Detector fluorescence : ex.280 nm、em.310 nm

8. 細胞障害性試験

ラット SCH を cisplatin または vinblastine を含む WEM で 24 時間培養した後に細胞を洗浄し、新しい WEM に交換してさらに 24 時間培養した。以上の処理はすべて 20 μ M の E₂ 存在あるいは非存在下で行った。所定時間後、培地中に漏出した LDH (lactate dehydrogenase) の活性を LDH-cytotoxic Test (和光純薬) によって測定した。1% Triton X で処理した細胞を細胞障害 100%の指標として用いた。

9. データ解析

(1) グルクロン酸抱合代謝の速度論的解析

E_2 のグルクロン酸抱合生成に対する各 kinetics parameters は Kaleidagraph (ver. 3.5; Synergy Software Reading, PA) を用いて、以下の式より算出した。

$$V = (V_{\max}^{\gamma} \times S^{\gamma}) / (K_m^{\gamma} + S^{\gamma})$$

なお、 V_{\max} は最大反応速度、 S は基質 (E_2) 濃度、 K_m は V_{\max} の 1/2 を示す基質濃度、 γ は Hill 係数を表す。

(2) ベシクル阻害実験の速度論的解析

ATP 存在下の取り込み量と AMP 存在下の取り込み量の差から、ATP 依存的な取り込み量を算出した。基質の取り込み活性に対する阻害効果の検討では、対照群 (control) の取り込み活性を 100% として、相対活性で示した。IC₅₀ は Prism software package (version 5; GraphPad Software Inc.) を用いて以下の式より算出した。

$$\% \text{ of control} = IC_{50}^{\gamma} / (IC_{50}^{\gamma} + [I]^{\gamma}) \times 100$$

なお、IC₅₀ は 50% 阻害濃度、 $[I]$ は阻害剤濃度、 γ は Hill 係数を表す。

10. 有意差検定

統計学的有意差の検定は Students の t -検定にて行った。 $p < 0.05$ のときに 2 つのデータセットの間に有意差ありと判断した。

V. ヒト肝細胞を用いた薬物代謝とトランスポーターが関わる薬物-内因性物質間相互作用の評価 (第4章)

1. ヒト凍結肝細胞の融解とヒト SCH の調製

凍結肝細胞を 37°C の湯浴中で融解し、14 mL の Hepatocytes isolation kit A 液が入ったチューブに移して、90 g で 5 分間遠心分離した。上清を吸引除去し、残渣に 14 mL の Hepatocytes isolation kit B 液を添加した。細胞を分散させた後に、50 g で 3 分間遠心分離した。上清を吸引除去し、残渣に InVitroGro CP media を 3 mL 添加して細胞を十分に分散させた。細胞懸濁液の一部にトリパンブルーを添加して生細胞数を計数し、最終濃度が 0.7×10^6 cells/mL なるように InVitroGro CP media を添加した。 0.175×10^6 cells/well の濃度で 48-well のコラーゲンコートプレート (BioCoat®、BD Biosciences、San Jose、CA) に播種した。播種後、37°C で 4~5 時間 CO₂ インキュベーター内で細胞を接着させた後、0.25 mg/mL となるように Matrigel 濃度を調製した CM4000 含有 WEM に置換した。培養 2 日目から CM4000 含有 WEM にて毎日培地交換を行い、4 または 5 日目に実験に供した。

2. ヒト SCH における CIL のエステル加水分解実験

ヒト SCH に 30 μM の CIL を含有した培地 (WEM) を添加して代謝反応を開始した。反応時間は 0、10、30、60、120、および 240 分に設定した。また CIL 代謝の阻害試験として DFP を 0.1、1、および 10 μM 共存させた条件での CIL 代謝試験を同様に実施した。この際の評価時点は 120 分に設定した。各時点に培地を採取して氷冷 buffer にて細胞を洗浄した。さらに細胞にアセトニトリル/精製水 (50/50) を添加して細胞から薬物を抽出した。除タンパク処理後、HPLC-UV にて培地中、および細胞内薬物量を測定した。得られた細胞内薬物量を細胞タンパク量と細胞容積 ($7.69 \mu\text{L}/\text{mg protein}$)¹²¹⁾ で除することにより、細胞内薬物濃度を概算した。

3. ヒト SCH を用いた³H taurocholic acid の取り込み実験

ヒト SCH を 10、30 μM の CIL 単独、あるいは 1、10 μM の DFP 共存下で 120 分間曝露した。Standard HBSS で細胞を洗浄し、0.2 μM の³H taurocholic acid 含有の standard または Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS を添加して取り込み反応を開始した。10 分後に薬液を吸引除去し細胞を氷冷 standard HBSS で洗浄して反応を停止した。細胞をアセトニトリル/精製水 (50/50)、または 1% Triton-X で 10~20 分処理して細胞内の薬物を抽出し、LSC にて細胞内薬物量を測定した。

4. ヒト BSEP 発現膜ベシクルを用いた³H taurocholic acid の取り込み阻害実験

BSEP の典型的な基質として³H taurocholic acid を用いた。BSEP 発現膜ベシクル原液 (5 mg/mL) を反応用 buffer で 2 倍希釈したベシクル懸濁液 20 μL を 37 °C で 5 分間プレインキュベーションした。基質および阻害剤を含む ATP (AMP) 含有アッセイミックスを 30 μL をベシクル懸濁液に添加して取り込み実験を開始し、37 °C 条件下で 5 分間反応させた。³H taurocholic acid の基質濃度はそれぞれ 0.4 μM とし、ベシクルタンパク濃度は 50 μg/reaction とした。所定の時間後、反応停止用 buffer を添加して反応を停止した。反応停止液をフィルター (HAWP02500, Millipore) 上に回収し、迅速濾過法により洗浄を行った。フィルターを回収してバイアルに入れ、フィルター上に残存する放射エネルギーを LSC にて測定した。ATP 存在下の取り込み量と AMP 存在下の取り込み量の差から、ATP 依存的な取り込み量を算出した。IC₅₀ 値は Prism software package (version 5; GraphPad Software Inc.) を用いた非線形回帰分析から算出した。

なお、各 buffer は III-6 と同様のものを用いた。

5. HPLC-UV を用いた CIL および CAN の定量分析

HPCL-UV 分析は以下の条件で行った。

HPLC system : HP1100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

Mobile phase : A ; 0.1% Formic acid、 B ; Acetonitrile、 A/B ; 60/40→10/90 (15 分)

Flow rate : 0.25 mL/min

Column : Symmetry C18 column (2.1×150 mm, 3.5 μm, Waters)

Column temperature : 40 °C

Injection volume : 5 または 10 μL

Detector : G1315B UV detector

Detector UV wave length : 254 nm

6. データ解析

(1) BEI の算出

胆汁排泄の指標には biliary excretion index (BEI; %) を用いた。算出式を以下に示した。

$$\text{BEI} = \frac{\text{uptake}(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} \text{ presence}) - \text{uptake}(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} \text{ absence})}{\text{uptake}(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} \text{ presence})} \times 100$$

(2) ベシクル阻害実験の速度論的解析

ATP 存在下の取り込み量と AMP 存在下の取り込み量の差から、ATP 依存的な取り込み量を算出した。基質の取り込み活性に対する阻害効果の検討では、対照群 (control) の取り込み活性を 100% として、相対活性で示した。IC₅₀ は Prism software package (version 5; GraphPad Software Inc.) を用いて以下の式より算出した。

$$\% \text{ of control} = \text{IC}_{50} / (\text{IC}_{50} + [\text{I}]) \times 100$$

なお、IC₅₀ は 50% 阻害濃度、[I] は阻害剤濃度を表す。

第7章 引用文献

- 1) Obach RS (1999) Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos.*, **27**:1350-1359.
- 2) Stringer R, Nicklin PL., Houston JB (2008) Reliability of human cryopreserved hepatocytes and liver microsomes as in vitro systems to predict metabolic clearance., *Xenobiotica*, **38**:1313-1329.
- 3) Bi YA, Kazolias D, Duignan DB (2006) Use of cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture to measure hepatobiliary transport. *Drug Metab Dispos.* **34**:1658-1665.
- 4) Pan G, Boiselle C, Wang J (2012) Assessment of biliary clearance in early drug discovery using sandwich-cultured hepatocyte model. *J Pharm Sci.* **101**:1898-1908.
- 5) Levine WG (1978) Biliary excretion of drugs and other xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **18**:81-96.
- 6) Rollins DE, Klaassen CD (1979) Biliary excretion of drugs in man. *Clin Pharmacokinet* **4**:368-379.
- 7) Chandra P, Brouwer KL (2004) The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res.* **21**:719-735.
- 8) Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* **25**:1539-1542.
- 9) Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, Eichelbaum M, Kivistö KT, Neuvonen PJ (2005) Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* **77**:468-478.

- 10) AstraZeneca, Product information of CRESTOR®
- 11) Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CD, Windass AS, Schneck DW (2004) Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* **76**:167-177.
- 12) Nakakariya M, Shimada T, Irokawa M, Maeda T, Tamai I (2008) Identification and species similarity of OATP transporters responsible for hepatic uptake of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Pharmacokinet.* **23**:347-355.
- 13) Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A (2001) Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res.* **18**:1262-1269.
- 14) Murata M, Tamai I, Sai Y, Nagata O, Kato H, Sugiyama Y, Tsuji A (1998) Hepatobiliary transport kinetics of HSR-903, a new quinolone antibacterial agent. *Drug Metab Dispos.* **26**:1113-1119.
- 15) Tamai I, Maekawa T, Tsuji A (1990) Membrane potential-dependent and carrier-mediated transport of cefpiramide, a cephalosporin antibiotic, in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther.* **253**:537-544.
- 16) Chandra P, Johnson BM, Zhang P, Pollack GM, Brouwer KL (2005) Modulation of hepatic canalicular or basolateral transport proteins alters hepatobiliary disposition of a model organic anion in the isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos.* **33**:1238-1243.
- 17) Tsuda-Tsukimoto M, Maeda T, Iwanaga T, Kume T, Tamai I. (2006) Characterization of hepatobiliary transport systems of a novel alpha4beta1/alpha4beta7 dual antagonist, TR-14035. *Pharm Res.* **23**:2646-2656.

- 18) Ishigami M, Tokui T, Komai T, Tsukahara K, Yamazaki M, Sugiyama Y (1995) Evaluation of the uptake of pravastatin by perfused rat liver and primary cultured rat hepatocytes. *Pharm Res.* **12**:1741-1745.
- 19) Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG (1989) Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J.* **3**:174-177.
- 20) Foliot A, Glaise D, Erlinger S, Guguen-Guillouzo C (1985) Long-term maintenance of taurocholate uptake by adult rat hepatocytes co-cultured with a liver epithelial cell line. *Hepatology.* **5**:215-219.
- 21) LeCluyse EL, Audus KL, Hochman JH (1994) Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol.* **266**:C1764-1774.
- 22) Talamini MA, Kappus B, Hubbard A (1997) Repolarization of hepatocytes in culture. *Hepatology.* **25**:167-172.
- 23) Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, Lightfoot RM, Lee JI, Brouwer KL (1999) Use of Ca²⁺ modulation to evaluate biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* **289**:1592-1599.
- 24) Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, Gan LS, Lemasters JJ, Stieger B, Meier PJ, Brouwer KL (1999) Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol.* **277**:G12-21.
- 25) Fukuda H, Ohashi R, Tsuda-Tsukimoto M, Tamai I (2008) Effect of plasma protein binding on in vitro-in vivo correlation of biliary excretion of drugs evaluated by sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* **36**:1275-1282.
- 26) De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, Annaert P (2013)

- Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **9**:589-616.
- 27) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (2008) Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites.
- 28) ICH Harmonized Tripartite Guideline (2009) Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3 (R2).
- 29) Hoshino T, Yamauchi R, Kikkawa K, Yabana H, Murata S (1998) Pharmacological profile of T-0201, a highly potent and orally active endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* **286**:643-649.
- 30) Ohashi N, Nakamura S, Yoshikawa M (1999) Determination of TA-0201, a novel orally active non-peptide endothelin antagonist, in rat plasma and tissues by a liquid chromatography--electrospray ionization--tandem mass spectrometry system. *J Pharm Biomed Anal.* **19**:491-499.
- 31) Ohashi N, Ohashi R, Yoshikawa M (1998) Studies on the metabolic fate of a novel orally active nonpeptide endothelin antagonist TA-0201: Metabolism and first-pass metabolism of TA-0201 in rats. *Xenobio Metab Dispos.* **13**:546-556.
- 32) Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol.* **272**:G16-22.
- 33) Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, Yabuuchi H, Tsuji A (2008) Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos.* **36**:1088-1096.

- 34) Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B (1997) Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology*. **26**:1667-1677.
- 35) Kanai N, Lu R, Bao Y, Wolkoff AW, Vore M, Schuster VL (1996) Estradiol 17 beta-D-glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter. *Am J Physiol*. **270**:F326-331.
- 36) Ismail MG, Stanca C, Ha HR, Renner EL, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2003) Interactions of glycyrrhizin with organic anion transporting polypeptides of rat and human liver. *Hepatol Res*. **26**:343-347.
- 37) Sugiyama D, Kusuhara H, Shitara Y, Abe T, Meier PJ, Sekine T, Endou H, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Characterization of the efflux transport of 17beta-estradiol-D-17beta-glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*. **298**:316-322.
- 38) Urakami Y, Okuda M, Masuda S, Saito H, Inui KI (1998) Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. **287**:800-805.
- 39) Morita N, Kusuhara H, Sekine T, Endou H, Sugiyama Y (2001) Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. **298**:1179-1184.
- 40) Morikawa A, Goto Y, Suzuki H, Hirohashi T, Sugiyama Y (2000) Biliary excretion of 17beta-estradiol 17beta-D-glucuronide is predominantly mediated by cMOAT/MRP2. *Pharm Res*. 2000 17:546-552.
- 41) Abe K, Bridges AS, Yue W, Brouwer KL (2008) *In vitro* biliary clearance of angiotensin II receptor blockers and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in sandwich-cultured rat hepatocytes: comparison with *in vivo* biliary clearance. *J Pharmacol*

Exp Ther. **326**:983-990.

- 42) Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem.* **273**:10046-10050.
- 43) Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology.* **118**:422-430.
- 44) Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Charged amino acids in the transmembrane domains are involved in the determination of the substrate specificity of rat Mrp2. *Mol Pharmacol.* **59**:1077-1085.
- 45) Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H, Sugiyama Y (2005) Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol.* **68**:800-807.
- 46) Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM (2000) Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**:47-50.
- 47) Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, Hori R (1992) Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther.* **263**:840-845.
- 48) Schwab D, Fischer H, Tabatabaei A, Poli S, Huwyler J (2003) Comparison of in vitro P-glycoprotein screening assays: recommendations for their use in drug discovery. *J Med Chem.* **46**:1716-1725.
- 49) Kuroda M, Kobayashi Y, Tanaka Y, Itani T, Mifuji R, Araki J, Kaito M, Adachi Y (2004) Increased hepatic and renal expressions of multidrug resistance-associated protein 3 in Eisai hyperbilirubinuria rats. *J Gastroenterol Hepatol.* **19**:146-153.

- 50) Borst P, de Wolf C, van de Wetering K (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* **453**:661-673.
- 51) Yue W, Lee JK, Abe K, Sugiyama Y, Brouwer KL (2011) Decreased hepatic breast cancer resistance protein expression and function in multidrug resistance-associated protein 2-deficient (TR⁻) rats. *Drug Metab Dispos.* **39**:441-447.
- 52) Wang R, Chen HL, Liu L, Sheps JA, Phillips MJ, Ling V (2009) Compensatory role of P-glycoproteins in knockout mice lacking the bile salt export pump. *Hepatology.* **50**:948-956.
- 53) 日本薬物動態学会 DMPK 誌ニューズレター編集委員会 (2006) 創薬動態 医薬品創製のための考え方と最新情報
- 54) Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, Bergström CA, Artursson P (2009) Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res.* **26**:1816-1831.
- 55) Tian X, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang P, Brouwer KL (2004) Modulation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and Mrp3 expression and function with small interfering RNA in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* **66**:1004-1010.
- 56) Faber KN, Müller M, Jansen PL (2003) Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev.* **55**:107-124.
- 57) Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhara H, Sugiyama Y (2005) Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther.* **314**:876-882.
- 58) Lecureur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB, Schuetz JD (2000) Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol.* **57**:24-35.
- 59) Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Schuetz JD, Kusuhara H,

- Sugiyama Y (2008) Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. *Mol Pharmacol.* **73**:1474-1483.
- 60) Nakagomi-Hagihara R, Nakai D, Kawai K, Yoshigae Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T (2006) OATP1B1, OATP1B3, and mdr2 are involved in hepatobiliary transport of olmesartan, a novel angiotensin II blocker. *Drug Metab Dispos.* **34**:862-869.
- 61) Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology.* **130**:1793-1806.
- 62) Gerk PM, Vore M (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther.* **302**:407-415.
- 63) Mallants R, Van Oosterwyck K, Van Vaeck L, Mols R, De Clercq E, Augustijns P (2005) Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) affects hepatobiliary elimination but not the intestinal disposition of tenofovir disoproxil fumarate and its metabolites. *Xenobiotica.* **35**:1055-1066.
- 64) Fuksa L, Brckova E, Kolouchova G, Hirsova P, Hroch M, Cermanova J, Staud F, and Micuda S (2010) Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. *Toxicology* **267**, 165-171.
- 65) Elsby R, Smith V, Fox L, Stresser D, Butters C, Sharma P, Surry DD (2011) Validation of membrane vesicle-based breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 2 assays to assess drug transport and the potential for drug-drug interaction to support regulatory submissions. *Xenobiotica.* **41**:764-783.
- 66) Funk C, Pantze M, Jehle L, Ponelle C, Scheuermann G, Lazendic M, Gasser R (2001) Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone

- sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology.*, **167**: 83-98.
- 67) Nakanishi T, Shibue Y, Fukuyama Y, Yoshida K, Fukuda H, Shirasaka Y, and Tamai I (2011) Quantitative time-lapse imaging-based analysis of drug-drug interaction mediated by hepatobiliary transporter, multidrug resistance-associated protein 2, in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 984-991.
- 68) Kitamura T, Jansen P, Hardenbrook C, Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Arias IM. (1990) Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR-) rats with conjugated hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:3557-3561.
- 69) Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, Brouwer KL (2003) Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther.* **304**:801-809.
- 70) Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, and Keppler D (1997) ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem. J.* **327**, 305-310.
- 71) Herédi-Szabó K, Jemnitz K, Kis E, Ioja E, Jánossy J, Vereczkey L, and Krajcsi P (2009) Potentiation of MRP2/Mrp2-mediated estradiol-17 β -glucuronide transport by drugs – A concise review. *Chem. Biodivers.* **6**, 1970-1974.
- 72) Pascolo L, Bayon EJ, Cupelli F, Ostrow JD, Tiribelli C (1998) ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin by rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *Biochem J.* **331**:99-103.
- 73) Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JHM, Schinkel AH, and Borst P (2003) Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J. Biol. Chem.* **278**,

23538-23544.

- 74) Kawabe T, Chen Z-S, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S-I, and Kuwano M (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Letters* **456**, 327-331.
- 75) Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, and Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br. J. Cancer* **83**, 375-383.
- 76) Mottino A, Guibert E, Carnovale C, Morisoli L, and Rodriguez Garay E (1983) Formation of bilirubin monoglucuronide and diglucuronide in isolated rat hepatocytes. Effect of spironolactone. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 3157-3161.
- 77) Antonilli L, Brusadin V, Milella MS, Sobrero F, Badiani A., and Nencini P (2008) In vivo chronic exposure to heroin or naltrexone selectively inhibits liver microsome formation of estradiol-3-glucuronide in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 672-679.
- 78) Shiratani H, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T (2008) Species Differences in UDP-Glucuronosyltransferase Activities in Mice and Rats. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1745-1752.
- 79) Gerk PM, Li W, and Vore M (2004) Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1139-1145.
- 80) Meyers M, Slikker W, Pascoe G, and Vore M (1980) Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 87-93.
- 81) Román ID, Fernández-Moreno MD, Fueyo JA, Roma MG, Coleman R (2003) Cyclosporin A induced internalization of the bile salt export pump in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol Sci.* **71**:276-281.

- 82) Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Muller D, Albertini S, and Suter L (2003) Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: Possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol. Sci.* **73**, 386-402.
- 83) Farkas D, Tannenbaum SR (2005) Characterization of chemically induced hepatotoxicity in collagen sandwiches of rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **85**, 927-934.
- 84) Kern A, Bader A, Pichlmayr R, and Sewing KF (1997) Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 761-772.
- 85) Soars MG, Ring BJ, and Wrighton SA (2003) The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 762-767.
- 86) Yang Y, Li J, Pan X, Zhou P, Yu X, Cao H, Wang Y, Li L (2013) Co-culture with mesenchymal stem cells enhances metabolic functions of liver cells in bioartificial liver system. *Biotechnol Bioeng.* **110**:958-968
- 87) Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet.*, **20**: 233-238.
- 88) Kostrubsky SE, Strom SC, Kalgutkar AS, Kulkarni S, Atherton J, Mireles R, Feng B, Kubik R, Hanson J, Urda E, Mutlib AE (2006) Inhibition of hepatobiliary transport as a predictive method for clinical hepatotoxicity of nefazodone. *Toxicol Sci.*, **90**: 451-459.
- 89) Hillgren KM, Keppler D, Zur A, Giacomini KM, Stieger B, Cass CE, Zhang L (2013) Emerging Transporters of Clinical Importance: An Update from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* **94**:52-63.

- 90) Iwanaga T, Nakakariya M, Yabuuchi H, Maeda T, Tamai I (2007) Involvement of bile salt export pump in flutamide-induced cholestatic hepatitis. *Biol Pharm Bull.* **30**:739-744.
- 91) Yabuuchi H, Tanaka K, Maeda M, Takemura M, Oka M, Ohashi R, Tamai I (2008) Cloning of the dog bile salt export pump (BSEP; ABCB11) and functional comparison with the human and rat proteins. *Biopharm Drug Dispos.* **29**:441-448.
- 92) Kostrubsky VE, Strom SC, Hanson J, Urda E, Rose K, Burliegh J, Zocharski P, Cai H, Sinclair JF, Sahi J (2003) Evaluation of hepatotoxic potential of drugs by inhibition of bile-acid transport in cultured primary human hepatocytes and intact rats. *Toxicol Sci.* **76**:220-228.
- 93) Miwa K (1998) In vitro hydrolysis of candesartan cilexetil to candesartan. *J Hypertens.*, **16** (Suppl. 2): 130.
- 94) Takeda Pharmaceutical Company Limited., Interview form of BLOPRESS®
- 95) Austin RP, Barton P, Mohamed S, Riley RJ (2005) The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. *Drug Metab Dispos.*, **33**:419-425.
- 96) Blazquez AG, Briz O, Romero MR, Rosales R, Monte MJ, Vaquero J, Macias RI, Cassio D, Marin JJ (2012) Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol.* **81**:273-283.
- 97) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (2012) Guidance for Industry, Drug Interaction Studies--Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling (DRAFT GUIDANCE).
- 98) Horikawa M, Kato Y, Tyson CA, Sugiyama Y (2003) Potential cholestatic activity of various therapeutic agents assessed by bile canalicular membrane vesicles isolated from rats and humans. *Drug Metab Pharmacokinet.* **18**:16-22.
- 99) Dawson S, Stahl S, Paul N, Barber J, Kenna JG (2012) In vitro inhibition of the bile salt

export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans., *Drug Metab Dispos.*, **40**:130-138.

- 100) Kis E, Ioja E, Rajnai Z, Jani M, Méhn D, Herédi-Szabó K, Krajcsi P (2012) BSEP inhibition: in vitro screens to assess cholestatic potential of drugs. *Toxicol In Vitro.* **26**:1294-1299.
- 101) Thompson RA, Isin EM, Li Y, Weidolf L, Page K, Wilson I, Swallow S, Middleton B, Stahl S, Foster AJ, Dolgos H, Weaver R, Kenna JG (2012) In vitro approach to assess the potential for risk of idiosyncratic adverse reactions caused by candidate drugs. *Chem Res Toxicol.* **25**:1616-1632.
- 102) Hirano H, Kurata A, Onishi Y, Sakurai A, Saito H, Nakagawa H, Nagakura M, Tarui S, Kanamori Y, Kitajima M, Ishikawa T (2006) High-speed screening and QSAR analysis of human ATP-binding cassette transporter ABCB11 (bile salt export pump) to predict drug-induced intrahepatic cholestasis. *Mol Pharm.* **3**:252-265.
- 103) Fukami T, Takahashi S, Nakagawa N, Maruichi T, Nakajima M, Yokoi T (2010) In vitro evaluation of inhibitory effects of antidiabetic and antihyperlipidemic drugs on human carboxylesterase activities. *Drug Metab Dispos.* **38**:2173-2178.
- 104) 厚生労働省医薬局審査管理課長通知 医薬審発第八一三号 (2001年) 薬物相互作用の検討方法について
- 105) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (2006) Guidance for Industry, Drug Interaction Studies Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling (DRAFT GUIDANCE)
- 106) 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 (2010) Membrane transporters in drug

development. *Nat Rev Drug Discov.* **9**:215-236.

- 107) European Medicines Agency's Committee for Human Medicinal Products (2012) Guideline on the Investigation of Drug Interactions.
- 108) Mairinger S, Erker T, Muller M, Langer O (2011) PET and SPECT radiotracers to assess function and expression of ABC transporters in vivo. *Curr Drug Metab.* **12**:774-792.
- 109) Matsunaga N, Nunoya K, Okada M, Ogawa M, Tamai I (2013) Evaluation of hepatic disposition of paroxetine using sandwich-cultured rat and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* **41**:735-743.
- 110) Perry CH, Smith WR, St Claire RL 3rd, Brouwer KR (2011) Automated applications of sandwich-cultured hepatocytes in the evaluation of hepatic drug transport. *J Biomol Screen.* **16**:427-435.
- 111) Rogue A, Lambert C, Spire C, Claude N, Guillouzo A (2012) Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* **40**:151-158.
- 112) Zanelli U, Caradonna NP, Hallifax D, Turlizzi E, Houston JB (2012) Comparison of cryopreserved HepaRG cells with cryopreserved human hepatocytes for prediction of clearance for 26 drugs. *Drug Metab Dispos.* **40**:104-110
- 113) Grime K, Ferguson DD, Riley RJ (2010) The use of HepaRG and human hepatocyte data in predicting CYP induction drug-drug interactions via static equation and dynamic mechanistic modelling approaches. *Curr Drug Metab.* **11**:870-885.
- 114) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H (2011) Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther.* **19**:400-407.

- 115) Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A (2012) Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cell Reprogram*. **14**:171-185.
- 116) Schaefer O, Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Sakamoto A, Ishiguro N, Matsumaru T, Terasaki T, Ebner T (2012) Absolute quantification and differential expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. **40**:93-103.
- 117) Yamaoka K, Nakagawa T. (1983) A nonlinear least squares program based on differential equations, MULTI (RUNGE), for microcomputers. *J Pharmacobiodyn*. **8**:595-606.
- 118) Nies AS, Wilkinson GR, Rush BD, Strother JR, McDevitt DG. (1976) Effects of alteration of hepatic microsomal enzyme activity on liver blood flow in the rat. *Biochem Pharmacol*. **25**:1991-1993.
- 119) Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. **13**:29-83.
- 120) Davies B, Morris T (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*. **10**:1093-1095.
- 121) Brouwer KR (2010) Importance of hepatocellular concentration in predicting transporter based drug-drug interactions., *13th International conference on drug-drug interactions, Seattle*.

第8章 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご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 博士に深謝致します。また実験の遂行に際して親身にご指導ご助言を頂きました金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 准教授 中西 猛夫 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究に携わる機会を与えて下さいました、田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所 高松 康雄 所長、ならびに久米 俊行 部長に心より謝意を表すとともに、終始ご懇切なるご激励を賜りました山中 武志 グループマネージャーに感謝致します。また、本研究を遂行するきっかけを与えて下さり、また実験に際し有益なご助言をいただいた薬物動態研究所 大橋 力也 博士、築本 実 博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり多大なるご協力をいただいた金沢大学 薬物動態学研究室 池永 美穂 修士、ならびに田辺三菱製薬 薬物動態研究所 諸氏に心より感謝します。

最後に、本研究の遂行にあたり、終始支えていただいた 妻 縁、ならびに子 芽唯、涼真に感謝致します。