

博士論文

小腸P-糖蛋白質を介する薬物相互作用の評価におけるaliskirenの有用性に  
関する研究

Studies on applicability of aliskiren in the evaluation of drug–drug interactions via  
intestinal P-glycoprotein

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である.

2015 年9 月

(September 2015)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 博士後期課程 薬科学専攻  
臨床薬剤学講座

築本美喜子

Mikiko Tsukimoto

本論文に用いられた略語は以下の通りである.

ASBT	apical sodium dependent bile acid transporter
ATPase	adenosine triphosphatase
$AUC$	area under the plasma concentration–time curve
BCRP	breast cancer resistance protein
BSEP	bile salt export pump
$C_b$	blood concentrations
$C_{free}$	drug concentration with ultracentrifugation
$CL_{tot}$	total plasma clearance
$C_{max}$	maximum plasma concentration
CMC	carboxymethyl cellulose
$C_p$	plasma concentrations
CsA	cyclosporin A
$C_{total}$	drug concentration without ultracentrifugation
CYP	cytochrome P450
$D$	dose
DDI	drug–drug interaction
$E_H$	hepatic extraction ratio
EMA	European Medicines Agency
$F$	bioavailability
$F_A$	fractions of the dose absorbed from the gut lumen
FDA	US Food and Drug Administration
$f_e$	fraction of the dose excreted as the unchanged drug in the urine
$F_G$	intestinal availability

$F_H$	hepatic availability
$f_p$	plasma unbound fraction
$f_{u, mic}$	unbound fractions in monkey and human liver microsomal suspensions
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HPMC	hydroxypropylmethyl cellulose
IC <sub>50</sub>	half maximal (50%) inhibitory concentration
K <sub>m</sub>	Michaelis constant
KO	knockout
LC/MS/MS	liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
Luciferin-H	6-deoxyluciferin
Luciferin-H EGE	ethylene glycol ester of 6'-deoxyluciferin
Luciferin-IPA	luciferin isopropyl acetal
Luciferin-ME	luciferin 6'-methyl ether
Luciferin ME-EGE	ethylene glycol ester of luciferin 6'-methyl ether
Luciferin-PPXE	luciferin 6'-phenylpiperazinylyl
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
MCT	monocarboxylate transporter
MDR1	multidrug resistance transporter 1
MRP	multidrug resistance-associated protein
<i>MRT</i>	mean residence time
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter

OCTN	carnitine/organic cation transporter
OST	organic solute and steroid transporter
$P_{app}$	apparent permeability coefficient
PEPT	peptide transporter
P-gp	P-glycoprotein
P-gp KO	<i>mdr1a/1b</i> gene-deficient
$Q_H$	hepatic blood flow rate
$R_b$	blood/plasma concentration ratio
SD	standard deviation
$t_{1/2}$	terminal elimination half-life
$T_{max}$	time to reach $C_{max}$
URAT	urate transporter
$Vd_{ss}$	steady-state volume of distribution
WT	wild-type

## 目次

序論	1
第1章 Aliskiren, P-gp 阻害剤 cyclosporin A および zosuquidar の <i>in vitro</i>	
動態評価	
第1節 諸言	6
第2節 方法	6
第3節 結果	15
第4節 考察	20
第2章 P-gp欠損マウスにおける aliskiren の血中動態評価	
第1節 諸言	22
第2節 方法	22
第3節 結果	25
第4節 考察	27
第3章 カニクイザルにおける aliskiren の血中動態評価	
第1節 諸言	28
第2節 方法	28
第3節 結果	35
第4節 考察	41
総括	45
謝辞	47
参考文献	48

## 序論

臨床において、複数の薬剤を用いた治療が行われており、医薬品の作用および副作用を想定する上で、併用した薬剤の影響を知ることは、薬剤の適正使用において有用である。開発中の薬剤が、薬物相互作用を受けるかあるいは薬物相互作用を起こす可能性があるかについて評価および予測することは重要である。米国食品医薬品庁 (US Food and Drug Administration, 以下 FDA) は薬物相互作用に関するドラフトガイダンスを、欧州医薬品庁 (European Medicines Agency (EMA)) は薬物相互作用 (drug-drug interaction (DDI)) に関する新ガイドラインを示し、すでに運用が行われている [1,2]。ガイドラインでは、開発している薬剤が、トランスポーターの基質あるいは阻害剤であるかどうかおよび臨床試験が必要であるかどうかについて決定するための decision tree が提示されている。日本においても、DDI に関するガイドラインが 10 年ぶりに改訂され、2014年7月に「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（最終案）」が公表されるに至っている。[3,4]。創薬開発において、小腸上皮、肝臓、腎臓および脳血流関門のトランスポーターについて考慮する必要があり、種々の予測法が提示されている [5-8]。以下に主要トランスポーターの発現部位について引用した図を示した(Figure 1) [5]。臨床においてトランスポーターを介した DDI を示す基質や阻害剤が種々報告されるとともに、小腸、肝臓および腎臓のトランスポーターを介した相互作用のメカニズムを検討するために代謝されにくい選択的なプローブが示されている[5,9]。また、薬物の経口投与時の吸収やバイオアベイラビリティにおける小腸の取り込みおよび排出トランスポーターの重要性や、小腸トランスポーターと代謝酵素の相互作用に着目した予測法について報告されている [10]。

本研究で用いた aliskiren は、経口で投与される直接的レニン阻害剤であり[11,12]、FDA により承認された高血圧薬である。また、Aliskirenは、FDAによって multidrug resistance transporter 1 (MDR1) / P-gp の基質として示されている [1]。Aliskiren は、臨床において cyclosporin A (CsA) および itraconazole を併用したときに血中濃度が上昇するおそれがある

り、日本国内での併用は禁忌となっている [13]. Aliskiren の P-glycoprotein (P-gp) を介した排出がこれらの薬剤により抑制され则认为られており、P-gp の *in vitro* および *in vivo* 動態への関与について aliskiren を用いて評価することは有用であるとする。

Aliskiren のバイオアベイラビリティは、以前にヒトで 2.6 % であると報告されている [12, 14]. Aliskiren は、主に胆汁および糞中に投与量の 77.5 % が、尿中に 0.4 % が排泄され、約 1.4 % が cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) により酸化的代謝を受ける [12,15]. 経口および静脈内投与時の aliskiren の尿中排泄率から吸収率は約 5 % と算出され、静脈内持続投与による検討において、肝抽出率が求められ約 10 % と報告されている [14,15].

*In vitro* において aliskiren の P-gp 基質認識性は、ヒト P-gp 発現ベシクルを用いた ATPase 活性測定法により評価されており、 $K_m$  は 2  $\mu\text{M}$  と報告されている [16]. 一方で、aliskiren は、有機アニオントランスポーター (OATP) 2B1 の基質でもあり、OATP2B1 発現 HEK293 細胞を用いた検討において、 $K_m$  が 72  $\mu\text{M}$  であることが報告されている [16]. Aliskiren の輸送における P-gp の関与は、P-gp の発現細胞においては明確にはされていない。最近の研究において、aliskiren は、OATP1A2 発現細胞において 15 分まで直線的な取り込みを示しており、naringin により IC<sub>50</sub> が 75.5  $\mu\text{M}$  で阻害されることが報告されている [17].

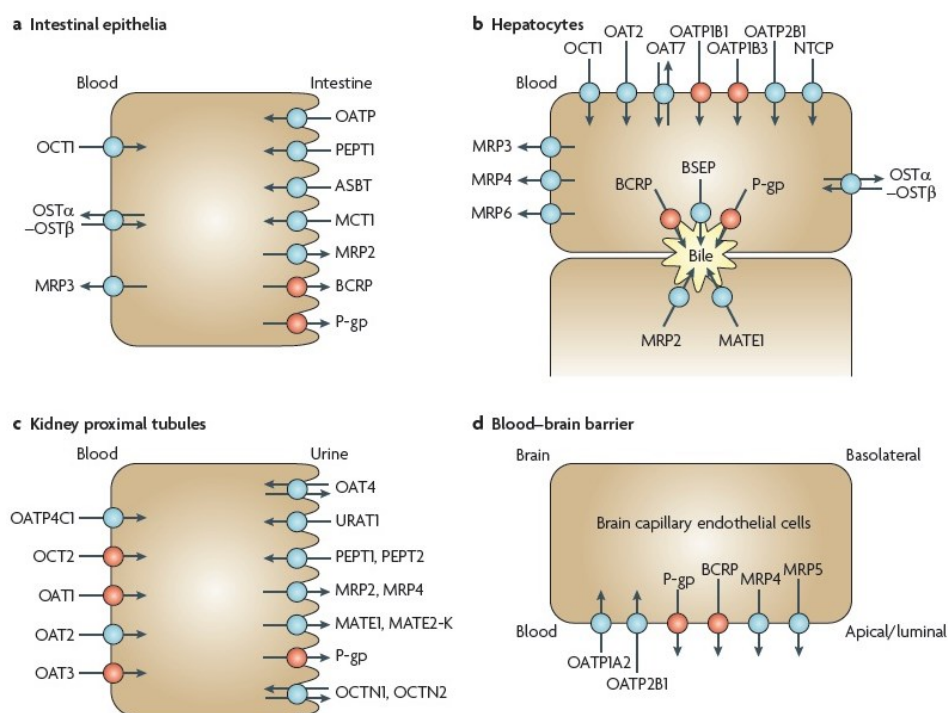


Figure 1 Selected human transport proteins for drugs and endogenous substances [5].

P-gp: P-glycoprotein; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter; MRP: multidrug resistance-associated protein; PEPT: peptide transporter; BCRP: breast cancer resistance protein; OAT: organic anion transporter; NTCP: sodium taurocholate cotransporting polypeptide; BSEP; bile salt export pump; MATE: multidrug and toxic compound extrusion; URAT: urate transporter; OCTN: carnitine/organic cation transporter; OST: organic solute and steroid transporter; ASBT: apical sodium dependent bile acid transporter; MCT: monocarboxylate transporter

Table I Summary of statistical analysis of aliskiren pharmacokinetic variables with drugs or juice

Drug	Dose	Dose of aliskiren	Ratio of geometric means		Reference
			aliskiren + inhibitor / aliskiren		
			<i>AUC</i>	<i>C<sub>max</sub></i>	
Cyclosporin A	200 mg	75 mg	4.28 - 4.78	2.49	[18]
	600 mg	75 mg	4.99 - 5.56	2.48	[18]
Ketoconazole	200 mg	300 mg	1.78	1.83	[16]
Atorvastatin	80 mg	300 mg	1.47	1.50	[16]
Digoxin	0.25 mg	300 mg	0.99	0.98	[16]
Verapamil	240 mg	300 mg	1.88 - 1.97	2.02	[19]
Itraconazole	100 mg (First Dose 200 mg)	150 mg	6.45 - 6.54	5.81	[20]
Gapefruit-juice	200 mL	150 mg	0.39	0.19	[21]
	300 mL	300 mg	0.62 - 0.63	0.39	[17]
Orange juice	200 mL	150 mg	0.37 - 0.38	0.20	[22]
Apple juice	200 mL	150 mg	0.37	0.16	[22]



Aliskiren とさまざまな既知の薬物あるいはジュースの経口での併用投与時の薬物相互作用が、臨床において検討されている (Table 1) [16-22]. Cyclosporin A (CsA) は、CYP3A4 および P-gp の基質かつ阻害剤であり、OATPs 阻害剤として知られている [1, 23-25]. Aliskiren の 75 mg を健常人に単回で経口投与時に、CsA の 200 mg および 600 mg を併用投与時の aliskiren の血漿-時間曲線下面積 ( $AUC$ ) および最大血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) は、各々 5 および 2.5 倍に増加した [18]. Ketoconazole (CYP3A4 および P-gp 阻害剤) の 200 mg を 1 日 2 回で投与した際、aliskiren の 300 mg を投与時の定常状態の  $AUC$  および  $C_{max}$  は、いずれも 1.8 倍に上昇した [1,16,24,25]. Verapamil (CYP3A4 阻害剤 および P-gp の基質かつ阻害剤) の 240 mg を毎日投与し、aliskiren の 300 mg を単回で併用時には、 $AUC$  および  $C_{max}$  は 2 倍の上昇を示すことが報告されている [1,19,24,25]. Itraconazole (CYP3A4 および P-gp の阻害剤) の 100 mg を 1 日 2 回の併用投与時には、単回で 150 mg を投与された aliskiren の  $AUC$  および  $C_{max}$  は、各々 6.5 および 5.8 倍に上昇した [1, 20, 25]. 一方で、グレープフルーツジュース (CYP3A4, P-gp, OATP1A2 および OATP2B1 の阻害剤), オレンジジュースおよびリンゴジュース (OATP1A2 および OATP2B1 の阻害剤) の 200 mL を 5 日間 1 日 3 回併用後の 3 日目に、150 mg を単回投与時の aliskiren の  $C_{max}$  は、81, 80 および 84 %,  $AUC$  は、61, 62 および 63 % に各々減少した [9,10,17,21,22,26-37]. グレープフルーツジュースの 300 mL を併用時に、300 mg を単回で併用時の aliskiren の  $AUC$  および  $C_{max}$  は、同様に各々 37 から 38 % および 61 % に減少した [17]. 以前の臨床研究において、健常人で aliskiren は、digoxin (P-gp の基質), atorvastatin (CYP3A4 および P-gp の基質かつ阻害剤, OATP1B の基質), verapamil, itraconazole あるいは CsA の血中動態に大きな影響を与えないことが報告されている [1,16,18-20,25,38-42]. このように臨床において、aliskiren は、P-gp および CYP3A4 阻害剤を併用時には、阻害されて血漿中濃度の上昇を示し、グレープフルーツジュース、オレンジジュースおよびリンゴジュースのような OATPs 阻害剤併用時には血漿中濃度の低下を示す. 一方で、P-gp および OATPs を

介した輸送および CYP3A4 による代謝を阻害しないことが示されている。

今回の研究の目的は、ヒトにおける P-gp を介した DDI を起こす可能性を検討するために、P-gp 基質のプローブとしての aliskiren 利用の可能性について評価することである。本研究において、P-gp が aliskiren の *in vitro* および *in vivo* 薬物動態に関与しているかどうかに加えて、カニクイザルで P-gp を介した DDI が再現できるかについて検討する。Aliskiren は、ヒトと同様に、サルにおいて経口で低いバイオアベイラビリティ (1.4%) を示している [43]。加えて、グレープフルーツジュースの併用により、ヒトで単回投与時の aliskiren の *AUC* および  $C_{max}$  は、減少しており、CYP 3A4 は、aliskiren の薬物相互作用に大きな影響を与えていないと考えられた。よって、P-gp の関与する DDI の検討をする上で本化合物を用いることは有用と考える。CsA はおよび zosuquidar は、P-gp 阻害剤として知られており、aliskiren の併用薬として用いて検討することとした。

第1章では、*in vivo* 薬物動態試験に用いた aliskiren、P-gp 阻害剤 CsA および zosuquidar の化合物プロファイルを知るために、*in vitro* 動態評価を行った。また、aliskiren の経細胞輸送における P-gp の関与を明らかにする目的で、P-gp 過剰発現細胞および Caco-2 細胞を用いて、aliskiren の輸送を評価した。

第2章では、P-gp 欠損マウスを用いて、*in vivo* 動態における P-gp の関与を明らかにする目的で、*mdr1a/1b* 遺伝子欠損 (P-gp KO) および 野生型 (WT) のマウスにおける aliskiren の血中動態を比較した。

第3章では、DDI 試験の前に、カニクイザルでの aliskiren のバイオアベイラビリティがヒトとほぼ同等であることを確認する目的で、カニクイザルにおける aliskiren の薬物動態について評価した。また、カニクイザルにおいて、P-gp を介した DDI が再現できるかについて明らかにする目的で、P-gp 阻害剤である CsA および zosuquidar を併用時の aliskiren の薬物動態における CsA あるいは zosuquidar によるサル消化管 P-gp への影響について評価した。

## 第1章 Aliskiren, P-gp 阻害剤 cyclosporin A および zosuquidar の *in vitro*

### 動態評価

#### 第1節 諸言

Aliskiren は, FDA のドラフトガイダンスの中で, multidrug resistance transporter 1 (MDR1) / P-glycoprotein (P-gp) の基質の一つとして示されている. しかしながら, *in vitro* における aliskiren の P-gp 基質認識性は, ヒト P-gp 発現ベシクルを用いた ATPase 活性測定法により評価されているのみであり ( $K_m$ : 2  $\mu$ M) [16], aliskiren の輸送における P-gp の関与は, P-gp の発現細胞においては明確にはされていない. CsA および zosuquidar は, P-gp 阻害剤として知られている. Efflux, ATPase および calcein-AM 阻害評価により, P-gp への種々阻害剤の  $IC_{50}$  が, さまざまな基質に対して報告されており, CsA の P-gp 阻害における  $IC_{50}$  は, 0.74-6.18  $\mu$ M であった [44]. Zosuquidar は, 有力な P-gp 阻害剤であると報告されており,  $K_i$  は 59 nM であった [45-49].

本章では, *in vivo* 評価に用いた aliskiren および P-gp 阻害剤の CsA および zosuquidar の *in vitro* 動態プロファイルについて検討した. また, aliskiren の輸送における P-gp の役割について, P-gp 過剰発現細胞および Caco-2 細胞を用いて検討した結果を報告する.

#### 第2節 方法

##### 1.2.1. 試薬

Aliskiren および zosuquidar は, 各々 NARD Institute Ltd (Hyogo) および Tanabe R & D Service (Osaka) により合成されたものを用いた. Cyclosporin A (CsA), quinidine sulfate dehydrate, verapamil, carbamazepine および lucifer yellow は, Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO) から購入した. Ketoconazole および erythromycin は Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka) から購入した. ヒトおよびカニクイザルのプール血漿は, Biopredic International (Rennes) および Valley Biomedical Products & Services, Inc. (VA) から各々購入

した．プールされたヒトおよびサル（ヒト：200および13ドナー，サル：10および9個体）は，XenoTech, LLC (Lenexa, KS) より購入した．組換えヒト CYP (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6および3A4) は，P450 reductase とともにヒト CYP cDNA を共発現させ，CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4 ミクロソームについては，加えてチトクローム b5 を同時に共発現させて昆虫細胞発現系から作製したミクロソーム (Gentest Supersomes) であり，BD Biosciences (San Jose, CA) から購入して用いた．CYP活性 (CYP1A2: luciferin 6'-methyl ether (Luciferin-ME), CYP2C9: 6-deoxyluciferin (Luciferin-H), CYP2C19: ethylene glycol ester of 6'-deoxyluciferin (Luciferin-H EGE), CYP2D6: ethylene glycol ester of luciferin 6'-methyl ether (Luciferin ME-EGE), CYP3A4: luciferin- 6'- phenylpiperazinylyl (Luciferin-PPXE) および luciferin isopropyl acetal (Luciferin-IPA)) の測定のための P450-GLO キット，luciferin 検出試薬およびエステラーゼ含有および非含有の再構築バッファーは，Promega Corporation (WI) より購入した．ミクロソームは，使用まで，-80 °Cに保存した．LLC-GA5-COL150 細胞 (P-gp- 過剰発現細胞) は LLC-PK1 細胞の中にヒト MDR1 cDNA の遺伝子導入によって，作製されており [50, 51]，Riken Gene Bank (Tsukuba) から購入した．Caco-2 細胞は，ATCC から購入した (Manassas, VA)．全ての他の試薬と溶媒は，分析グレードであり，市販されたものを用いた．

### 1.2.2. 緩衝液中の溶解性

リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) は，50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液に 2N NaOH を添加して調製した．Aliskiren, zosuquidar および CsA は，1mg/mL の濃度になるように緩衝液に添加し，懸濁液は超音波処理 (1分以内) した．溶液は，37 °Cで1 時間放置した．その後，ULTRAFREE- MC filter (0.45 $\mu\text{m}$  pore, Merck Millipore, co., MA) を用いてフィルター濾過した．濾液は，適当量のacetonitrile / methanol (1:1, v/v) を添加して測定試料とした．Aliskiren および zosuquidarは，液体クロマトグラフィーによって，CsA は液体クロマトグラフィー-タ

ンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) で各々測定し、絶対検量線法により算出した。

### 1.2.3. 血漿蛋白結合性

Aliskiren, zosuquidar および CsA の血漿蛋白結合性は、超遠心法により検討した [52]. 被験化合物含有80% acetonitrile 溶液を、プールしたマウス (n=2), サルおよびヒト (n=4) 血漿の 300  $\mu$ Lに添加し、最終濃度 10  $\mu$ M (acetonitrile濃度, 0.8% v/v) に調製した. 血漿試料の 200  $\mu$ L を、チューブに添加し、37  $^{\circ}$ C, 436,000 gで4 時間遠心した. 上清中の非結合型の画分を取得し、非結合型薬物濃度を測定した. 血漿試料を、生理食塩水で 9 倍に希釈し、血漿中薬物添加濃度を測定した. 各々の試料は 1  $\mu$ M carbamazepine 含有の 9 倍量の acetonitrile 溶液に添加し、遠心 (1548  $\times$  g, 15 分間)した. 上清は、LC/MS/MS で分析した. 同じマトリックスを含む標準液を調製して検量線とし、血漿中非結合型濃度および血漿中薬物添加濃度を定量した. 血漿非結合型画分 ( $f_p$ ) は、以下の式で算出した.  $C_{free}$  および  $C_{total}$  は、血漿中非結合型濃度および血漿中薬物添加濃度とした.

$$f_p = C_{free} / C_{total}$$

### 1.2.4. ミクロソーム結合

サルおよびヒト肝ミクロソーム (0.25 mg/mL) に aliskiren を最終濃度 1  $\mu$ M で添加時のミクロソーム非結合型分率は、1.2.3. と同様に超遠心法によって検討した (n=3). ミクロソームは、代謝安定性試験と同様の濃度になるように、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (PBS, pH 7.4)で懸濁した. ミクロソーム試料は、4 $^{\circ}$ C, 436,000 g で4 時間遠心した. 超遠心後の上清画分を、試料の 17 倍量の 0.1  $\mu$ M carbamazepine 含有 acetonitrile 溶液、等量の80% acetonitrile 溶液および等量のミクロソーム懸濁液の混液中に添加し、超遠心前の試料を、試料の 17 倍量の 0.1  $\mu$ M carbamazepine 含有 acetonitrile 溶液、等量の80% acetonitrile 溶液および等量の PBS の混液中に添加し、各々遠心 (1548  $\times$  g, 15 分間) した. 上清は、

LC/MS/MS で分析した。肝ミクロソーム中非結合型分率 ( $f_{u,mic}$ ) は、1.2.3. と同様に、ミクロソーム中非結合型濃度および薬物添加濃度を測定して算出した。

#### 1.2.5. ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

サルおよびヒトの肝臓および小腸ミクロソームにおける aliskiren の代謝への CsA および zosuquidar の0.1-100  $\mu$ M の濃度での阻害の影響について検討した (n=3)。ミクロソーム固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) は、未変化体の減少量を測定することにより決定した。1ウェルあたり全量 105  $\mu$ Lの反応混液は、種々の濃度での阻害剤を添加あるいは非添加の条件で、各試薬の最終濃度が、100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4), 0.25 mg/mLの肝臓および小腸ミクロソーム, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM NADPH ならびに 1  $\mu$ M aliskiren になるように調製した。NADPH を除いた基質含有溶液 91 $\mu$ L は 37  $^{\circ}C$  で 10 分間プレインキュベーションした。7.5 mM NADPH 14  $\mu$ L の添加により、反応を開始した。37  $^{\circ}C$  で 0, 20 および 40 分間インキュベーション後、反応は、0.1  $\mu$ M erythromycin 含有 acetonitrile / methanol (v/v; 1/1) 溶液の 105  $\mu$ L を添加して終了した。反応終了後、混合物は、15,521  $\times$  g で10 分間、4  $^{\circ}C$  で遠心し、上清は LC/MS/MS 分析した。

#### 1.2.6. 遺伝子組換えヒト CYP を用いた CYP 阻害試験

CYP 阻害試験は、25 - 200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中にヒト組換え CYP (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 あるいは 3A4), 基質 (luciferin-ME, luciferin-H, luciferin-H EGE, luciferin ME-EGE, luciferin-PPXE あるいは luciferin-IPA), NADPH-生成系 (1.3 mM  $NADP^+$ , 3.3 mM glucose 6-phosphate, 3.3 mM  $MgCl_2$  および 0.4 unit/ml glucose- 6- phosphate dehydrogenase), 50 $\mu$ M クエン酸ナトリウムを含む混合溶液に、必要に応じて 20mM トリス緩衝液を添加して、被験化合物として aliskiren, zosuquidar および CsA (0.4 - 100  $\mu$ M) を添加および非添加の条件で試験した。CYP 濃度 (2 - 10 pmol/ml), 基質濃度 (3-100 $\mu$ M), イン

インキュベーション温度 (室温あるいは37 °C) および他の条件は、反応が線形性を示す範囲内で行った。被験化合物、ヒト組換え CYP および基質を含む混合溶液中で、20 分間のプレインキュベーション後、NADPH 生成系の添加によって各反応を開始した。30分間インキュベーション後、反応混合溶液は、luciferin 検出試薬を添加して、CYP 反応を停止すると同時に発光を開始した。発光は、室温で 20 分間安定化し、プレートリーダーで発光を検出した (InfiniteF200, Tecan Group Ltd., Switzerland)。被験化合物によるCYP 活性の阻害は、被験化合物未処理におけるCYP 活性の正味の発光シグナルに対する被験化合物添加による活性の変化を求めることで、算出した。試験は n=3 で実施した。

#### 1. 2. 7. LLC-GA5-COL150細胞を用いた経細胞輸送試験

LLC-GA5-COL150 細胞の培養は、10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, liquid (終濃度:100 U/mL penicillin G, 100 µg/ mL streptomycin) および 150 ng/mL colchicine 含有の Medium 199 を用いて行った。細胞は、ディッシュに播種し、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> の条件下において単層で培養した。細胞は、 $0.64 - 0.8 \times 10^5$  cells /wellの密度で 24ウェルプレート の微小孔のポリカーボネート膜インサート (3 µm pore size, 0.33cm<sup>2</sup>, Corning Costar, Inc., Cambridge, MA) に播種し、各々 apical および basolateral 側に 0.2 および 0.6 mLの培地を添加し培養した。培地は、2, 3日ごとに交換し、試験の 24 時間前に colchicine の含まれていない新鮮な培地に置換した。細胞は、播種後 5 あるいは 6 日間培養して輸送試験に用いた。Aliskiren の輸送方向性は、20 mM HEPES 含有の Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH7.4) において検討した。輸送試験の開始の約 1 時間前に、添加側および受け側の両側の培地を HBSS (pH7.4) に置換し、37 °Cでプレインキュベーションした。1 µM quinidine あるいは aliskiren 含有 のHBSS (pH7.4) を apical および basolateral 側に、非含有の HBSS (pH7.4) を 受け側の basolateral および apical 側に、各々置換して、輸送試験を開始した。両方向の輸送試験において、培地は添加 2 時間後に受け側から採取した。

HBSS (pH7.4) 中の quinidine および aliskiren の濃度は、IS として 1 $\mu$ M carbamazepine 含有の acetonitrile を添加して、LC/MS/MS により測定した。100 $\mu$ M Lucifer yellow は、各々のウェルごとの細胞単層の状態を確認するために被験化合物とともに添加した。Lucifer yellow の濃度は、430/535 nmの励起/発光波長を蛍光分光光度計で各々の溶液の蛍光強度を測定し、0.1-2.5  $\mu$ M の濃度で作製した検量線を用いることで定量した。実際の膜透過係数 ( $P_{app}$ ; cm/s) は、Artursson ら [53] によって記載された方法に従って算出した。*Flux ratio* は、以下の式に従って算出した。

$$Flux\ ratio = P_{app}\ (B\text{-}to\text{-}A) / P_{app}\ (A\text{-}to\text{-}B)$$

$P_{app}\ (B\text{-}to\text{-}A)$  および  $P_{app}\ (A\text{-}to\text{-}B)$  は、各々 basolateral から apical および apical から basolateral 方向への  $P_{app}$  を示した。

#### 1.2.8. Caco-2細胞を用いた経細胞輸送試験

Caco-2 細胞は、4  $\times$  10<sup>5</sup> cells /flask (75 cm<sup>2</sup>) の細胞密度で播種し、37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> において、1% MEM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic (終濃度: 100 Unit/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin および 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B) 含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium 中で培養した。輸送試験は、Multi-Screen Caco-2 plate ユーザーガイドに従い、その一部を変更して実施した [54-55]。Caco-2 細胞は、1.5  $\times$  10<sup>4</sup> cells /well の細胞密度で 96 ウェルプレート of 微小孔のポリカーボネートインサート (0.4  $\mu$ m pore size, 0.11 cm<sup>2</sup>, Merck Millipore, co., MA) 上に播種し、10 から 11 日間培養した単層を用いた。播種した細胞の培地は、2, 3 日ごとに交換した。

Caco-2 細胞単層膜における apical から basolateral への輸送試験を実施した。Apical 側に 75  $\mu$ L の HBSS (pH 6.5), basolateral 側に 250  $\mu$ L の 4% 牛血清アルブミン (BSA) 含有の HBSS (pH 7.4) を用い、37  $^{\circ}$ C, 30 分間プレインキュベーションした。輸送試験開始時に、apical 側は各々最終濃度で 10  $\mu$ M aliskiren, CsA および zosuquidar 含有の HBSS (pH6.5)



および basolateral 側は 4% BSA 含有の HBSS (pH 7.4) に置換し, 37 °C でインキュベーションを行った. 試験開始後 2 時間に, basolateral 側の試料を採取し, 透過した化合物濃度を測定した.

Aliskiren の basolateral から apical への輸送 および apical から basolateral への輸送は, BSA を含まない HBSS (pH 7.4) で検討した. 10  $\mu$ M aliskiren 含有の HBSS は各々 apical あるいは basolateral 側に添加し, 阻害剤として verapamil および CsA は, 10 および 100  $\mu$ M の濃度で両側に添加した. 透過性試験試料は, 37 °C で 2 時間インキュベーション後に受け側から採取した. 被験化合物の HBSS 中濃度は IS として carbamazepine 含有の acetonitrile を添加して, LC/MS/MS によって測定した. 求めた濃度から,  $P_{app}$  および *Flux ratio* を算出した. 100  $\mu$ M lucifer yellow は, 被験化合物とともに添加した. Lucifer yellow の濃度は, 1.2.7. と同様に蛍光分光光度計で定量した.

## 1.2.9. 定量

### 1.2.9.1 HPLCを用いた定量

Aliskiren および zosuquidar の溶解度試験時の定量は, HP1100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて行った.

LC 条件は以下の通りで行った.

カラム温度 : 40 °C

カラム : Inertsil ODS-3 (75 x 3 mm,i.d.,3 $\mu$ m particle size; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)

溶液速度 : 1 ml/min

測定時間 : 10 min

移動相 : (A) 0.025% trifluoroacetic acid

(B) acetonitrile

LCグラジエント条件 :

0-4min : (A)/ (B) 90/10%→30/70%

4-6min : (A)/ (B) 30/70%→30/70%

6-10min : (A)/ (B) 90/10%→90/10%

UV検出 : 210 nm

流速 : 1.0 mL/min

温度 : 40°C

### 1.2.9.2 LC/MS/MSを用いた定量

Aliskiren, zosuquidar, CsA および IS (erythromycin, carbamazepine あるいは verapamil) の定量は LC/MS/MS 装置を用いて行った.

LC : Acquity ultraperformance liquid chromatograph (UPLC, Waters, Milford, MA)

カラム : Acquity UPLC BEH C18 column

(30 x 2.1 mm, i.d., 1.7µm particle size; Waters)

移動相 :

<条件1,3>

(A) 10mM ammonium acetate buffer

(B) 10 mM ammonium acetate/ acetonitrile (1 : 9)

<条件2>

(A) 0.1% formic acid buffer

(B) acetonitrile

LCグラジエント条件 :

<条件1>

0—0.2 min : (A)/ (B)90/10%→0/100%

0.2—0.7 min : (A)/ (B) 0/100%→0/100%

0.7—1 min : (A)/ (B) 90/10%→90/10%

<条件2>

0—0.2 min : (A)/ (B)98/2%→1/99% (あるいは 98/2%→5/95%)

0.2—0.7 min : (A)/ (B) 1/99%→1/99% (あるいは 5/95%→5/95%)

0.7—1 min : (A)/ (B) 98/2%→98/2%

<条件3>

0—2.2min : (A)/ (B)90/10%→0/100%

2.2—2.7min : (A)/ (B) 0/100%→0/100%

2.7—3min : (A)/ (B) 90/10%→90/10%

流速 : 0.5 mL/min

温度 : 50°C

オートサンプラー : 5 - 8 °C

インジェクション量 : 2 - 5 µL

MS/MS : Quattro Premier tandem quadrupole mass spectrometer (Waters)

(マウス, ヒト, サル血漿蛋白結合性評価以外で使用)

Xevo TQ triplequadrupole mass spectrometer (Waters)

(マウス, ヒト, サル血漿蛋白結合, Caco-2細胞膜透過性評価で使用)

capillary voltage : 0.5 - 3.4 kV

source temperature : 120 - 150 °C

desolvation gas temperature : 350- 600°C

flow rate : 800 - 1200 liters/h (nitrogen)

cone gas flow rate : 50- 100 liters/h.

モニターイオン (Precursor Ion  $[M+H]^+$  (m/z) > Product Ion (m/z)

(Collision Energy (V))) :

aliskiren : 552.4 > 436.3 (20) < 条件1, 2 >

zosuquidar : 528.3 > 241.0(20) < 条件2 >

CsA : 1202.9 > 99.8 (60) < 条件2, 3 >

quinidine : 325.2 > 80.7 (30) < 条件2 >

erythromycin : 734.4 > 157.8(30) < 条件2 >

carbamazepine : 237.2 > 194.1 or 236.9 > 193.6 (20) < 条件1, 2, 3 >

verapamil : 455.3 > 164.9 (30) < 条件2 >

Nitrogen (99.9% purity) およびargon (99.9999% purity) は cone およびcollision ガスに用いた.

#### 1. 2. 10. データ解析

IC50 値は, Prism 5J software package (version 5.02; GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いて非線形回帰解析により算出した.

### 第3節 結果

#### 1. 3. 1. 緩衝液中の溶解性

*In vivo* 試験を実施する上で, aliskiren, CsAおよびzosuquidar を投与時の投与溶液中の溶解性を明らかにする目的で溶解性試験を実施した. Aliskiren, CsA および zosuquidar のリン酸緩衝液 (pH 6.5) 中の溶解性は, 各々 > 1000, 1.2 および 2.8  $\mu\text{g/mL}$ であった (Tables 2 および 3).

#### 1. 3. 2. 血漿およびミクロソーム蛋白結合性

Aliskiren , CsA および zosuquidar の分布, 代謝, 排泄等の体内動態を理解する上で, 血

漿中の非結合型分率を知ることは有用である。投与した薬剤のマウス系統差および種差を明らかにする目的で血漿蛋白結合率について検討した。Aliskiren の雄 FVB マウス, Mdr1a/b KO マウス, 雄サルおよびヒト血漿蛋白結合率は, 各々 78.2, 75.3, 63.2 および 51.6 %であった (Table 2). 雄サルおよびヒトでの CsA の結合率は, 97.1 および 96.8 % であり, zosuquidar は 99.5 あるいは 99.0 % であった (Table 3). 肝ミクロソーム懸濁液中の非結合型分率 ( $f_{u,mic}$ ) を算出し, 肝ミクロソームにおける見かけの代謝クリアランスを補正する目的で, 肝ミクロソーム結合率について測定した。Aliskiren のサルおよびヒト肝ミクロソーム懸濁液中の非結合型分率は, 0.70 および 0.62 であった。

### 1.3.3. ヒトおよびサルの肝臓および小腸ミクロソームにおける aliskiren の *in vitro* 代謝における CsA および zosuquidar の影響

*In vivo* 動態試験におけるヒトとサルの種差を把握する目的で, ヒトおよびサル肝臓・小腸ミクロソームにおける代謝安定性試験を実施した。Aliskiren の肝固有クリアランスは, ヒト肝ミクロソームにおいて低かった (13.1  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ )。ミクロソーム結合により補正された値は, 21.1  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  であり, 以前報告された値 (41.3  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) より低い値を示した [16]。Aliskiren は, ヒト小腸ミクロソーム中でほとんど代謝されず, クリアランスは算出されなかった (Table 2)。サル肝臓および小腸ミクロソームにおけるクリアランスは, 各々 86.7 および 14.5  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  であった (Table 2)。小腸ミクロソームでの結合率は, 肝臓と同等と仮定したとき, aliskiren のサル肝臓および小腸ミクロソームにおけるクリアランスは, 125 および 20.8  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  であり, ヒトより早く代謝された。CsA および zosuquidar は, サル肝臓ミクロソーム中で, aliskiren の代謝を濃度依存的に阻害し,  $\text{IC}_{50}$  はいずれも 1.1  $\mu\text{M}$  であった (Table 3)。さらに, CYP3A4 阻害剤として用いた ketoconazole は, aliskiren の代謝をほとんど完全に阻害し (データには示さず), ヒト肝ミクロソームで報告された結果と同様であった [12]。Aliskiren はヒト肝臓, ヒトおよびサル小腸ミクロソ

ーム中でほとんど代謝されなかったため、代謝阻害試験時のCsA および zosuquidar の  $IC_{50}$  は算出されなかった。

#### 1.3.4. 遺伝子組換えヒト CYP を用いた aliskiren, CsA および zosuquidar の CYP 阻害

CYP3A4で代謝されるとの報告がある aliskiren と[12,15]併用する zosuquidar および CsA について、CYP3A4を含めた主要5分子種を阻害するかを明らかにする目的で、CYP阻害試験を実施した。CYP 阻害試験は、阻害剤として0.4-100  $\mu$ M の aliskiren, zosuquidar および CsA を用い、遺伝子組み換え P-450 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 および 3A4) および適切な基質を含む混合溶液のインキュベーションにより実施した。Luciferin-IPA を基質としたときの CYP3A4 活性は、CsA および zosuquidar により濃度依存的に阻害され、 $IC_{50}$  は、各々 33 および 1.3  $\mu$ Mであった (Table 3)。また、CsA および zosuquidar の  $IC_{50}$  は、luciferin-PPXE を基質としたときの CYP3A4 および他の分子種において、 $> 41 \mu$ M であった。Aliskiren は、CYP2D6 および CYP3A4 活性をわずかに阻害し、最大濃度で51 % の阻害を示した (データは示さず)。

#### 1.3.5. Aliskiren のLLC-GA5-COL150 細胞における透過性

経細胞でのaliskiren の輸送における P-gp の役割を明らかにする目的で、P-gp -過剰発現細胞の単層膜を用いて輸送方向性を評価した。Quinidine および aliskiren の B-to-A の輸送は A-to-B と比較して各々 79.7 および 1.5 倍高かった (Table 4)。Lucifer yellow は、細胞間隙輸送のプローブとして被験化合物と同時に添加し、 $1.7 - 4.2 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$  の透過係数を示した。Lucifer yellow の $P_{app}$  は、 $50 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 以下であると細胞障害性はないと判断されており、今回の試験において、被験化合物による単層膜への細胞障害等の影響はなかったと考えられた。

### 1.3.6. Aliskiren, CsA および Zosuquidar の Caco-2 細胞における透過性

P-gpを発現した細胞であるCaco-2細胞を用いて, aliskiren の輸送における P-gp の役割を明らかにする目的で, aliskiren の輸送方向性を評価し, P-gp 阻害剤共存下での輸送への影響を検討した. Caco-2 細胞においてapical 側に HBSS (pH 6.5) および basolateral 側に 4% BSA 含有 HBSS (pH 7.4) の輸送バッファーを用いたときの被験化合物の A-to-B の輸送透過性を検討した. その結果, aliskiren は, 極めて低い透過性を示した ( $2.5 \times 10^{-7}$  cm/s) (Table 2). 一方で, CsA および zosuquidar の透過性は, 73 および  $76 \times 10^{-7}$  cm/sであり, 中程度であった (Table 3). Table 5 では, HBSS (pH7.4) の輸送バッファーを用いた時の aliskiren の輸送におけるP-gp 阻害剤 verapamil および CsA の影響を示した. Caco-2 細胞における aliskiren の B-to-A の輸送は, A-to-B の輸送と比較して, 著しく高く, *Flux ratio* は 42.4 であった. 10 あるいは100  $\mu$ M の verapamil および CsA の存在下で, *Flux ratio* は, 阻害剤非添加時と比較して, 各々 35 あるいは 16 % および 25 あるいは 9 % に減少した. P-gp 阻害を十分示すことのできる過剰量でCsA を添加した際, 100  $\mu$ M CsA 含有の添加溶液には析出が認められた. 同時に添加された lucifer yellow の透過は, いずれも添加量の 0.5 % 以下であった. また, lucifer yellow の膜透過係数は, verapamil および CsA の存在下で影響を受けなかった ( $P_{app} \leq 4.2 \times 10^{-7}$  cm/s). Lucifer yellow の $P_{app}$  は,  $20 \times 10^{-7}$  cm/s以下であると細胞障害性はないと判断されており, 今回の試験において, 被験化合物による単層膜への細胞障害等の影響はなかったと考えられた.

Table 2 Summary of *in vitro* data for aliskiren

<i>In vitro</i> parameters		Aliskiren
Solubility (pH6.5) ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup>		>1000
Plasma protein binding (%)	Male Mouse (FVB) <sup>a</sup>	78.2
	Male Mouse (P-gp KO) <sup>a</sup>	75.3
	Male Monkey <sup>c</sup>	69.0 $\pm$ 12.8
	Human <sup>c</sup>	54.9 $\pm$ 2.7
Microsome protein binding (%)	Male Monkey <sup>b</sup>	30.4 $\pm$ 2.6
	Human <sup>b</sup>	38.4 $\pm$ 5.9
Microsomal $CL_{\text{liver, int}}$ ( $\mu\text{L/min/mgP}$ )	Male Monkey <sup>d</sup>	86.7 $\pm$ 7.0
	Human <sup>d</sup>	13.1 $\pm$ 9.8
Microsomal $CL_{\text{small intestine, int}}$ ( $\mu\text{L/min/mgP}$ )	Male Monkey <sup>d</sup>	14.5 $\pm$ 4.9
	Human <sup>d</sup>	N.C.
Permeability in caco-2 cells ( $\times 10^{-7} \text{cm/sec}$ ) <sup>b</sup>	$P_{\text{app}}$ (A-to-B)	2.5 $\pm$ 0.1

N.C.: Not calculated.

<sup>a</sup>Each value represents the mean of duplicate measurements. Each value represents the mean  $\pm$  SD of<sup>b</sup>triplicate,<sup>c</sup>quadruplicate and<sup>d</sup>six experiments.Table 3 Summary of *in vitro* data for P-gp inhibitors

<i>In vitro</i> parameters		CsA	Zosuquidar
Solubility (pH6.5) ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		2.8 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.1
Plasma protein binding (%)	Male Monkey <sup>b</sup>	97.1 $\pm$ 0.1	99.5 $\pm$ 0.2
	Human <sup>b</sup>	96.8 $\pm$ 0.4	99.0 $\pm$ 0.2
CYP inhibition (1A2/2C9/2C19/2D6 /3A4 (PPXE, IPA))	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	>100 / >100 / 85.5 $\pm$ 29.0 / >100 / >100, 32.8 $\pm$ 8.7	>100 / >100 / >100 / 41.6 $\pm$ 16.8 / 56.2 $\pm$ 9.4, 1.3 $\pm$ 0.6
Permeability in caco-2 cells ( $\times 10^{-7} \text{cm/sec}$ ) <sup>a</sup>	$P_{\text{app}}$ (A-to-B)	72.4 $\pm$ 15.9	75.9 $\pm$ 20.0
Inhibition of the metabolism of aliskiren in monkey liver microsomes	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2

Each value represents the mean  $\pm$  SD of<sup>a</sup>triplicate or or<sup>b</sup>quadruplicate experiments.

Table 4 Kinetic parameters for transcellular transport in LLC-GA5-COL150 cells

Cells		Quinidine $P_{\text{app}}$ ( $\times 10^{-7} \text{cm/s}$ )	Flux ratio (B-to-A/A-to-B)	Aliskiren $P_{\text{app}}$ ( $\times 10^{-7} \text{cm/s}$ )	Flux ratio (B-to-A/A-to-B)
LLC-GA5-COL150	A-to-B	8.3 $\pm$ 3.4		3.6 $\pm$ 0.5	
	B-to-A	662.3 $\pm$ 36.5	79.7	5.4 $\pm$ 0.7	1.5

The amount transported to the receiver side in the A-to-B and B-to-A directions for 2 h after adding the drugs was quantitated to evaluate the transport of 1  $\mu\text{M}$  of quinidine and aliskiren across LLC-GA5-COL150 monolayers. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



Table 5 Kinetic parameters for transcellular transport in Caco-2 cells

	$P_{app}$ ( $\times 10^{-7}$ cm/sec)		Flux ratio (% of control)	
	A-to-B	B-to-A		
Control	0.48 $\pm$ 0.15	20.21 $\pm$ 1.10	42.4	(100)
+ Verapamil (10 $\mu$ M)	1.47 $\pm$ 0.25	21.77 $\pm$ 0.89	14.8	(35)
+ Verapamil (100 $\mu$ M)	1.72 $\pm$ 0.08	11.76 $\pm$ 0.45	6.8	(16)
+ CsA (10 $\mu$ M)	0.42 $\pm$ 0.29	4.46 $\pm$ 0.13	10.6	(25)
+ CsA (100 $\mu$ M)	1.29 $\pm$ 0.15	5.05 $\pm$ 0.22	3.9	(9)

The amount transported to the receiver side in the A-to-B and B-to-A directions for 2 h after adding the drugs was quantitated to evaluate the transport of aliskiren (10  $\mu$ M) across caco-2 monolayers in the presence or absence of verapamil and CsA. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.

#### 第4節 考察

Aliskiren は、以前の報告において、ヒトで P-gp および CYP3A4 の基質であることが示された [12, 16]. 以前報告された aliskiren および CsA の併用時の臨床研究から、P-gp は aliskiren の薬物動態において重要な役割を示していることが示されており、一方で、CYP3A4 の寄与は、それほど大きくないと考察されている[18].

Aliskiren の輸送における P-gp の役割を、二種類の P-gp 発現細胞を用いて検討した (Tables 4 および 5). P-gp 過剰発現細胞において、aliskiren の *Flux ratio* は、1.5 であり、B-to-A 輸送は A-to-B の輸送より高く、輸送方向性を示しており (Table 4), aliskiren は、quinidine と同様に、P-gp の基質であることが示唆された.

Caco-2 細胞を用いた膜透過性試験において、A-to-B 方向の膜透過性は、P-gp 阻害剤の添加および非添加時に関わらず、比較的低い値を示していた ( $P_{app} = 0.42 - 1.72 \times 10^{-7}$  cm/s) (Table 5). この結果から、P-gp 過剰発現細胞における aliskiren の *Flux ratio* が、明確に高い値を示さなかったのは、P-gp 輸送を排除した場合の aliskiren そのものの膜透過性の低さに寄与する可能性が示された. また、P-gp 過剰発現細胞において、aliskiren は高い輸送方向性を示さなかったのにもかかわらず、Caco-2 細胞において aliskiren の B-to-A での  $P_{app}$  は、A-to-B の  $P_{app}$  より、42 倍高い輸送を示しており、この要因として、Caco-2 細胞の basolateral 側での未知の取り込みトランスポーターが発現している可能性が示唆された. Caco-2 細胞における aliskiren の輸送は、verapamil および CsA によって阻害されており、

一方で aliskiren の輸送は、これらの阻害剤では完全には阻害されなかったことから、他のトランスポーターの関与も疑われるものの、P-gp の基質であることが確認された。

第1章では、P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送において、P-gp の基質である aliskiren は、輸送方向性を示すことが示された。

## 第2章 P-gp欠損 マウスにおける aliskiren の血中動態評価

### 第1節 諸言

第1章において、P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送試験で、P-gp の基質である aliskiren が輸送方向性を示すことが明らかになった。臨床において、aliskiren に、CsA, ketoconazole, verapamil, itraconazole のような P-gp 阻害剤を併用した時、aliskiren の血中濃度の上昇が認められている [16-20]。これらの薬剤は、CYP 3A4 の阻害剤でもあるため、ヒトで P-gp および CYP3A4 の基質であることが示されている aliskiren の *in vivo* 血中動態に、P-gp がどの程度関与しているかは明らかではない。

本章では、*in vivo* 消化管吸収における P-gp の関与を明らかにするため、*mdr1a/1b* 遺伝子欠損 (P-gp KO) および 野生型 (WT) のマウスにおける aliskiren の血中動態について比較検討した。

### 第2節 方法

#### 2.2.1. 被験化合物

Aliskiren は NARD Institute Ltd (Hyogo) により、zosuquidar は Tanabe R & D Service により合成されたものを経口および静脈内投与試験に用いた。内部標準物質に用いた carbamazepine は、Sigma-Aldrich Corporation から購入した。

#### 2.2.2. 動物

6 週齢の雄マウス野生型 (WT) および *mdr1a/1b* 遺伝子欠損 (Pgp-KO) マウス (18.7–25.8 g) は、Taconic Biosciences, Inc. (Germantown, NY) から購入した。マウスは、使用前の 1 週間順化した。食餌 (CRF-1, Oriental Yeast Co., Tokyo) は、自由に摂取させ、投与前日より、一晩絶食した。水は、自由摂取とした。Aliskiren の投与後 7 時間にマウスに食餌を与えた。マウスは、温度および湿度が管理された部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。全て

の動物実験は、Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (Osaka) の動物倫理委員会によって、承認された。

### 2.2.3. マウスにおける血中動態試験

Aliskiren の静脈内投与液 (1mg/kg body weight (b.wt.)) は、生理食塩水を用いて調製した。Aliskiren は、イソフルラン麻酔下で 5 mL/kg の用量で、絶食した WT および P-gp KO マウスの大腿静脈に投与した。Aliskiren の経口投与溶液 (30 mg/kg b.wt.) は、蒸留水を用いて調製し、10 mL/kg の用量で経口的に投与した。6 匹のマウスに静脈内投与後、0.083, 0.5, 1, 3, 7 および 24 時間に、経口投与後、0.25, 0.5, 1, 3, 7 および 24 時間に、血液試料は、尾静脈よりヘパリン処理された微量採血管 (Terumo corporation, Tokyo) を用い、約 30  $\mu$ L を採取した。血液試料の一部は、投与後 24 時間に麻酔下で心臓より採取した。血漿試料は、遠心により血液より分離し、-20  $^{\circ}$ C に保存した。血漿試料の 5 - 10  $\mu$ L は、内部標準物質 (IS) として 0.1  $\mu$ M carbamazepine を含む acetonitrile を用いて除蛋白処理し、遠心して得られた上清を濾過した。血漿中の未変化体濃度は、LC/MS/MS に、この濾液を注入して測定した。同様に血漿を含む標準試料を調製し、最終濃度 0.1 から 1000 ng/mL の濃度の範囲の検量線を用いて定量した。

### 2.2.4. 血漿試料中未変化体濃度の定量

Aliskiren および IS (carbamazepine) の定量は LC/MS/MS 装置を用いて行った。

LC : Acquity ultraperformance liquid chromatograph (UPLC, Waters, Milford, MA)

カラム : Acquity UPLC BEH C18 column (50 x 2.1 mm, i.d., 1.7  $\mu$ m particle size; Waters)

移動相

(A) 0.1% formic acid buffer

(B) acetonitrile

LCグラジエント条件：

0—0.5min : (A)/ (B)98/2%→98/2%

0.5—2min : (A)/ (B)98/2%→2/98%

2—2.5min : (A)/ (B) 2/98%→2/98%

2.5—3min : (A)/ (B) 98/2%→98/2%

流速： 0.5 mL/min

温度： 50℃

オートサンプラー： 8 °C

インジェクション量： 5 µL

MS/MS： Quattro Premier tandem quadrupole mass spectrometer (Waters)

capillary voltage： 3.2 kV

source temperature： 150 °C

desolvation gas temperature： 450℃

flow rate： 1000 liters/h (nitrogen)

cone gas flow rate： 100 liters/h

モニターイオン (Precursor Ion  $[M+H]^+$  (m/z) > Product Ion (m/z) (Collision Energy (V)))：

aliskiren： 552.4 > 436.3 (20)

carbamazepine： 237.2 > 194.1 (20)

Nitrogen (99.9% purity) および argon (99.9999% purity) は cone および collision ガスに  
用いた.

## 2.2.5. データ解析

薬物動態パラメーターは、Phoenix WinNonlin (version 6.2; Pharsight, a Certara company, St.

Louis, MO)を用いて非コンパートメント解析によって個々の動物ごとに算出した。最大血漿中濃度 ( $C_{\max}$ ) およびその到達時間 ( $T_{\max}$ ) は実測値より求めた。消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、最終の 2 から 3 時点の対数線形回帰より  $\lambda$  を推定し、 $t_{1/2} = 0.693/\lambda$  より算出した。血漿中濃度曲線下面積 ( $AUC$ ) は、最終測定時点までの台形法により ( $AUC_{0-t_h}$ )、あるいは  $\lambda$  値を用いて最終時点までの外挿により ( $AUC_{\infty}$ ) 算出した。全身血漿クリアランス ( $CL_{tot}$ ) は、静脈内投与量を  $AUC$  で割って算出した。定常状態の分布容積 ( $V_{dss}$ ) は、静脈内投与における平均滞留時間 ( $MRT$ ) を用いて、 $V_{dss} = MRT \cdot CL_{tot}$  として求めた。バイオアベイラビリティ ( $F$ ) は、aliskiren の経口および静脈内投与後の投与量補正した  $AUC$  より算出した。

## 2.2.6. 統計解析

全ての統計解析は SAS software (version 9.1.3; SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。薬物動態パラメーターの有意差は、対応のある Student の両側  $t$  検定により求めた。全ての場合において、 $p$ -値  $< 0.05$  のとき、有意差ありとみなした。

## 第3節 結果

### 2.3.1. Pgp- KO および WT マウスにおける aliskiren の経口および静脈内投与時の血中動態

Aliskiren のマウスに静脈内および経口投与時の血中動態における P-gp の寄与を検討するために、WT および P-gp-KO マウスを用い、in vivo 投与試験を実施した (Figure 2 および Table 6)。Aliskiren を 1mg/kg の投与量で静脈内投与後の  $V_{dss}$  および  $AUC$  は、P-gp KO マウスにおいて WT マウスより、2.7倍 ( $p < 0.01$ ) および 1.2 倍高く、P-gp KO マウスにおける  $CL_{tot}$  は、WT マウスより、0.87倍低かった。Aliskiren を 30 mg/kg の投与量で経口投与後の血漿中濃度は、P-gp KO マウスにおいて、WT マウスより、投与後のすべての時点において高い値を示した。P-gp KO マウスに経口投与後の  $C_{\max}$ ,  $AUC$  および  $F$  は、WT マ

ウスと比較して、各々 3.4, 6.9 および 5.9 倍高かった (各々  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  および  $p < 0.001$ ).

Table 6 Pharmacokinetic parameters of the unchanged form of aliskiren after its intravenous (1 mg/kg) or oral (30 mg/kg) administration to WT and P-gp KO mice

Parameter	i.v. (1 mg/kg)			p.o. (30 mg/kg)			P-gp KO/WT	
	WT		P-gp KO	WT		P-gp KO	i.v.	p.o.
$C_0$ or $C_{max}$ (ng/mL)	1570	± 135	1357 ± 229	66.9	± 98.2	229.5 ± 128.3 <sup>a</sup>	0.9	3.4
$T_{max}$ (hr)	-		-	2.6	± 2.4	0.9 ± 1.1	-	0.4
$AUC_{0-t}$ (ng h/mL)	364	± 26	430 ± 85	182	± 53	1269 ± 394 <sup>c</sup>	1.2	7.0
$AUC_{\infty}$ (ng h/mL)	367	± 25	433 ± 84	185	± 52	1281 ± 392 <sup>c</sup>	1.2	6.9
$CL_{tot}$ (mL/h/kg)	2737	± 190	2375 ± 413	-		-	0.87	-
$Vd_{ss}$ (mL/kg)	1179	± 514	3134 ± 957 <sup>b</sup>	-		-	2.7	-
$F_{0-4 hr}$ (%)	-		-	1.7	± 0.5	9.8 ± 3.1 <sup>c</sup>	-	5.9
$F_{\infty}$ (%)	-		-	1.7	± 0.5	9.9 ± 3.0 <sup>c</sup>	-	5.9

<sup>a</sup> $p < 0.05$ , significantly different from WT mice,

<sup>b</sup> $p < 0.01$ ,

<sup>c</sup> $p < 0.001$ .

Each value represents the mean ± S.D. of six mice.

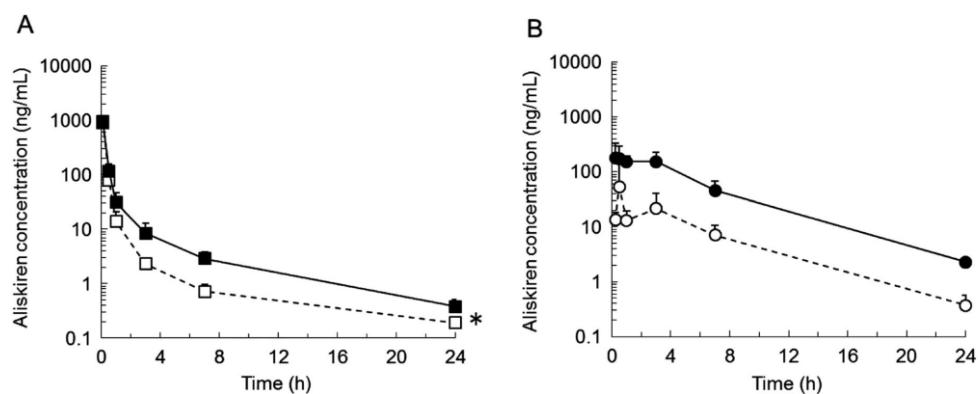


Figure 2 Plasma concentration-time profiles of aliskiren after its intravenous (A) and oral (B) administration to P-gp KO and WT mice at a dose of 1 and 30 mg/kg, respectively.

Each point represents the mean ± S.D. of data obtained from six mice, except where denoted. \*, mean of two mice. Opened or closed squares and circles represent the mean concentration of aliskiren after its intravenous and oral administration to WT or P-gp KO mice, respectively.

#### 第4節 考察

P-gp の KO マウスを用い, aliskiren のマウスに静脈内および経口投与時の血中動態における P-gp の寄与を検討した. Aliskiren の P-gp の KO マウスにおいて静脈内投与時の  $AUC$  および  $CL_{tot}$  は, WT マウスとほぼ同等であった (Figure 2 および Table 6). 一方で, Aliskiren の経口投与時の  $C_{max}$ ,  $AUC$  および  $F$  は, WT マウスより, P-gp KO マウスにおいて高い値を示した. これらのパラメーターの増加は, aliskiren の小腸における吸収過程において, P-gp が大きく寄与していることを示唆した. これらの結果は, 以前報告された臨床での知見を支持していた [18,19]. また, P-gp KO マウスにおける aliskiren の  $V_{dss}$  は, WT マウスより高い値を示した. これらのマウスにおける血漿蛋白結合率は, 75.3 - 78.2 % とほぼ等しく (Table 2), これにより分布に違いが出るとは考えにくい. P-gp を発現しているいくつかの臓器への aliskiren の分布は, P-gp の排出により制限されており, ノックアウトされたことにより, aliskiren の分布が上昇した可能性が示された.

本章の結果より, マウスにおいて, P-gp は, aliskiren の消化管吸収に重要な役割を示すことが確認された.



### 第3章 カニクイザルにおける aliskiren の血中動態評価

#### 第1節 諸言

第1章における検討の結果, aliskiren は, P-gp 基質として, 経細胞輸送において輸送方向性を示した. 第2章において, P-gp KO マウスを用いた in vivo 評価において, aliskiren の小腸における吸収過程において, P-gp が大きく寄与していることが示唆された.

Aliskiren は, ヒトと同様に, サルにおいて経口で低いバイオアベイラビリティ (1.4%) を示している[43]. また, 以前の報告において, カニクイザルの MDR1 の cDNA およびアミノ酸配列は, ヒトに非常に類似していることが示されている (96-97%) [56]. カニクイザルのアミノ酸配列のヒトとの相同性は, マウス Mdr1 あるいは 3 (80.3% あるいは 87%) およびラット MDR1 (80.2%) より高かった[57]. また, カニクイザルの CYP3A4/5 の cDNA およびアミノ酸配列はヒトの CYP3A4/5 と 91-96 % の高い相同性があった [58]. よって, カニクイザルを用いることは, ヒトにおける薬物相互作用を予測する上で役立つと考えられた. CsA および zosuquidar は, P-gp 阻害剤として知られており, aliskiren の併用薬として用いて検討することとした.

本章の研究目的は, aliskiren のサル血中動態への P-gp の関与について評価することである. はじめに, aliskiren の カニクイザルにおける血中動態について評価した. その後で, P-gp を介したDDI が, カニクイザルで再現するかどうかについて, P-gp 阻害剤である CsA および zosuquidar を用いて aliskiren の DDI を評価した.

#### 第2節 方法

##### 3.2.1. 被験化合物

ラジレス®錠 150mg (アリスキレンとして150mg), ネオーラル®内用液 10% (1 瓶 (50mL)中シクロスポリン (日局) 5.0g, 100 mg/mL) およびサンディミュン®点滴静注用 250mg (1アンプル (5 mL) 中シクロスポリン (日局) 250 mg, 50 mg/mL) は, 経口および静

脈内投与試験に用いるため、Novartis Pharma K.K. (Tokyo) より購入した。Zosuquidar は、Tanabe R & D Service により合成されたものを、経口および静脈内投与試験ならびに定量に用いた。定量用の aliskiren は NARD Institute Ltd により合成されたものを、定量用の CsA および内部標準物質として用いた verapamil は、Sigma -Aldrich Corporation から購入した。

### 3.2.2. 動物

雄カニクイザル (4.5-7.3 kg, 5-7才) は、Celeste Corporation (Tokyo) により入手した。食餌は、Laboratory Animal Diet PS (Oriental Yeast Co.) を 1 日 1 回で、午前 10 時に与え、水は自由摂取とした。投与前は、一晩絶食し、食餌は aliskiren の投与後 7 時間に与えた。動物は、温度および湿度が管理された部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。全ての動物実験は、Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation の動物倫理委員会によって承認された上で実施した。

### 3.2.3. サルにおける薬物動態試験

P-gp 阻害剤 zosuquidar および CsA は、種々の投与量で aliskiren と併用投与した。各阻害剤の併用試験において、各々 4 匹の同じサルを 1 群として用いた。二つの併用試験期間内で、各々 aliskiren は単独で単回投与した。少なくとも 1 週間以上の休薬期間を経て各投与試験を行った。

#### 3.2.3.1 Aliskiren および zosuquidar のサルにおける併用試験

Aliskiren の静脈内投与液 (0.3 mg/mL/kg b.wt.) は、生理食塩水で調製した。Aliskiren の経口投与懸濁液 (2 mg/mL/kg b.wt.) は、0.5% hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC, w/v) / 0.1% Tween 80 (v/v) 水溶液で調製した。Aliskiren として 150 mg 含有のラジレス®錠の錠剤は、

二つに割って、2 mL のチューブに入れ、少量の 0.5%-HPMC (w/v) / 0.1% Tween 80 (v/v) およびジルコニアビーズを添加した。チューブは、ミキサーミル (MM 301; Retsch) で、28/s の回転数で、30 分間振とうした。Zosuquidar の経口投与液 (10 あるいは 100 mg / 3 mL/kg b.wt.) は、0.5% HPMC (w/v) / 0.033% Tween 80 (v/v) 水溶液で調製した。

Zosuquidar の経口投与 (10 mg/kg b.wt.) 後 1 時間に aliskiren は、静脈内投与した。血液試料は、zosuquidar の経口投与後、0.25, 0.5 および 1 時間に、aliskiren の静脈内投与後、0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 および 24 時間に橈側皮静脈より採取した。尿試料は、aliskiren の投与後 0-7 および 7-24 時間でドライアイス中のフラスコに採取した。Aliskiren は、zosuquidar (10 あるいは 100 mg/kg b.wt.) の経口投与直後に経口で投与した。血液試料は、経口投与後、0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 および 24 時間に採取した。Aliskiren 単独の単回経口および静脈内投与では阻害剤なしの投与媒体とともに投与した。

血漿試料は血液から遠心により分離し、尿試料は遠心により上清を分取し、-20 °C で保存した。血漿および尿試料の 20 µL は、内部標準物質 (IS) として 0.01 µM verapamil を含む acetonitrile を用いて除蛋白処理し、遠心して得られた上清を濾過した。血漿および尿中の未変化体濃度は、LC/MS/MS に、この濾液を注入して測定した。同様に血漿および尿を含む標準試料を調製し、LC/MS/MS を用いて、最終濃度の 0.3 から 3000 ng/mL の濃度範囲の検量線を用いて定量を行った。

### 3.2.3.2 Aliskiren および CsA のサルにおける併用試験

Aliskiren (2 mg/3mL /kg b.wt.) の経口投与液は、0.5% (w/v) carboxymethyl cellulose 水溶液 (CMC) を用いて 3.2.3.1 と同様に懸濁液として調製した。Aliskiren (2 mg/kg b.wt.) および CsA (30 mg/kg b.wt.) の経口投与用の混合懸濁液 (3 mL/kg b.wt.) は、0.5 % (w/v) CMC で調製した。CsA 製剤の経口および静脈内投与には、ネオーラル®内容液 (100 mg/mL) およびサンディミュン®点滴静注用 (50 mg/mL) を各々用いた。

Aliskiren は, CsA を 10, 30 あるいは 100 mg/kg b.wt. で経口および 1, 3 あるいは 10 mg/kg b.wt. で静脈内投与後すぐに経口投与した. 血液試料は, CsA の経口投与後 15, 30 分, 1, 2, 3, 5, 7 および 24 時間に, 静脈内投与時には, さらに投与後 5 分においても採取した. Aliskiren 単独での単回経口投与では, 併用時の CsA の経口投与のかわりに 0.5% CMC の投与媒体のみで投与し, CsA の静脈内投与のかわりに, Cremophor EL (d:1.050g/cm<sup>3</sup>, 0.124mL/kg) を同時に投与した.

血漿試料は, 血液より遠心して分離し, -20 °C で保存した. 血漿試料の 10-25 µL は, 内部標準物質 (IS) として 0.01 µM verapamil を含む acetonitrile を用いて除蛋白処理し, 遠心して得られた上清を濾過した. 血漿中の未変化体濃度は, LC/MS/MS に, この濾液を注入して測定した. 同様に血漿を含む標準試料を調製し, aliskiren は, 最終濃度 下限 0.1 ~ 1 から上限 500 ~ 10000 ng/mL および CsA は, 下限 3 ~ 10 から上限 10000 ng/mL の濃度の範囲の検量線を用いて定量した.

#### 3.2.4. 血液/血漿中濃度比

Aliskiren をサルに単回静脈内投与後 1 時間にヘパリン処理したシリンジ中に全血を採取した. 血液は遠心して, 血漿および血球に分離し, 血漿画分を採取した. 全血および血漿試料は, 各々 IS (verapamil) 含有の acetonitrile と混和して除蛋白後に遠心した. 採取した上清は, LC/MS/MS によって分析した. 血液/血漿中濃度比 ( $R_b$ ) は, 以下の式により算出した.

$$R_b = C_b / C_p$$

$C_b$  および  $C_p$  は, 血液および血漿中化合物濃度 を示した.

#### 3.2.5. 血漿試料中未変化体濃度の定量

Aliskiren, zosuquidar, CsA および IS (verapamil) の定量は LC/MS/MS 装置を用いて行っ

た.

LC : Acquity ultraperformance liquid chromatograph (UPLC, Waters, Milford, MA)

カラム : Acquity UPLC BEH C18 column (30 x 2.1 mm, i.d., 1.7 $\mu$ m particle size; Waters)

移動相

(A) 10mM ammonium acetate buffer

(B) 10 mM ammonium acetate/ acetonitrile (1 : 9)

LCグラジエント条件 :

0—2.2min : (A)/ (B)90/10%→0/100%

2.2—2.7min : (A)/ (B) 0/100%→0/100%

2.7—3min : (A)/ (B) 90/10%→90/10%

流速 : 0.5 mL/min

温度 : 50°C

オートサンプラー : 8 °C

インジェクション量 : 2 - 5  $\mu$ L

MS/MS : Xevo TQ triplequadrupole mass spectrometer (Waters)

capillary voltage : 0.5 kV

source temperature : 150 °C

desolvation gas temperature : 600°C

flow rate : 1200 liters/h (nitrogen)

cone gas flow rate : 50 - 100 liters/h

モニターイオン(Precursor ion  $[M+H]^+$  (m/z) > Product ion (m/z)(Collision energy (V))) :

aliskiren : 552.3 > 436.1 (20)

zosuquidar : 528.3 > 241.0(20)

CsA : 1202.8 > 156.1(45)

verapamil : 455.3 > 164.9 (30)

Nitrogen (99.9% purity) および argon (99.9999% purity) は cone および collision ガスに用いた.

### 3.2.6. データ解析

薬物動態パラメーターは、マウスで行った解析と同様に、Phoenix WinNonlin (version 6.2; Pharsight, a Certara company, St. Louis, MO) を用いて、非コンパートメント解析によって個々の動物ごとに算出した.

Aliskiren の全身クリアランスへの非肝臓への寄与が、腎クリアランスであると仮定した場合、肝抽出率 ( $E_H$ ) および肝利用率 ( $F_H$ ) は以下の式で示された.

$$E_H = \frac{CL_{tot} \cdot (1 - f_e)}{R_b \cdot Q_H} \quad (1)$$

$$F_H = 1 - E_H \quad (2)$$

は、 $R_b$  は、aliskiren の静脈内投与後 1 時間での血液/血漿中濃度比として求めた.  $Q_H$  は、サルでの肝血流量 44 mL/min/kg [57] とした.  $f_{e\ 0-24\ h}$  は aliskiren の静脈内投与後 0-24 時間での投与量に対する尿中未変化体薬物排泄率として示した. Aliskiren の経口投与時のバイオアベイラビリティ ( $F$ ) は  $F_A$ ,  $F_G$ , および  $F_H$  を用いて以下の式で表された.

$$F = F_A \cdot F_G \cdot F_H \quad (3)$$

$F_A$  および  $F_G$  は、吸収率および消化管利用率とした.  $F_A \cdot F_G$  は以下の式で示された,

$$F_A \cdot F_G = \frac{F}{F_H} \quad (4)$$

Aliskiren の経口投与時の  $AUC$  ( $AUC_{po}$ ) は  $F$ , 投与量 ( $D$ ) および  $CL_{tot}$  を用いて以下の式で示された.

$$AUC_{po} = \frac{F \cdot D_{po}}{CL_{tot}} \quad (5)$$

$AUC_{po}$ ,  $F_A$ ,  $F_G$ ,  $F_H$  および  $CL_{tot}$  は, P-gp 阻害剤である zosuquidar あるいは CsA 存在および非存在下において検討し, 比較した. Aliskiren 単独経口投与および P-gp 阻害剤併用時の  $AUC_{po}$  比は, 式 (3) および (5) を用いて以下の式で示された.

$$\frac{AUC_{po+inh}}{AUC_{po}} = \frac{F_{A+inh} \bullet F_{G+inh}}{F_A \bullet F_G} \bullet \frac{F_{H+inh}}{F_H} \bullet \frac{CL_{tot}}{CL_{tot+inh}} \quad (6)$$

Aliskiren 単独で投与後の尿には, aliskiren の未変化体は, 投与量の 2 % 以下で排泄されるため, 阻害剤の存在および非存在下の aliskiren の腎クリアランスの変化への寄与は, 無視できると仮定して,  $F_H$  は, zosuquidar あるいは CsA を併用投与しない時の  $f_e$  を用いて算出した. また, aliskiren の経口投与後の  $F_A \bullet F_G$  は, CsA を静脈内投与で併用時の有無にかかわらず変化しないとみなした場合, 以下のように示された.

$$F_A \bullet F_G = F_{A+inh(iv)} \bullet F_{G+inh(iv)} \quad (7)$$

CsA の静脈内併用投与時の aliskiren の経口投与時の  $AUC_{po}$  が最大で上昇する割合は, 式 (6) に式 (7) を代入して, 以下の式で示された.

$$\frac{AUC_{po+inh(iv)}}{AUC_{po}} = \frac{F_{H+inh(iv)}}{F_H} \bullet \frac{CL_{tot}}{CL_{tot+inh(iv)}} \quad (8)$$

Aliskiren の経口投与時の  $AUC_{po}$  が, CsA を経口および静脈内の各々の経路で併用された際に, 各々最大の上昇を示したとき, CsA の併用投与の有無における各々 aliskiren の  $F_H$  および  $CL_{tot}$  の比は, 同程度を示すと考えた場合, 以下の式で示された.

$$\frac{F_{H+inh(po)}}{F_H} \bullet \frac{CL_{tot}}{CL_{tot+inh(po)}} = \frac{F_{H+inh(iv)}}{F_H} \bullet \frac{CL_{tot}}{CL_{tot+inh(iv)}} \quad (9)$$

よって, CsA を経口併用投与後の aliskiren の  $F_A \bullet F_G$  の増加は, 式 (6) に, 式 (8) および (9) を代入して, 以下のように算出された.

$$\frac{F_{A+inh(po)} \bullet F_{G+inh(po)}}{F_A \bullet F_G} = \left( \frac{AUC_{po+inh(po)}}{AUC_{po}} \right) / \left( \frac{AUC_{po+inh(iv)}}{AUC_{po}} \right) \quad (10)$$

### 3.2.7. 統計解析

全ての統計解析は SAS software (version 9.1.3; SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った. 薬

物動態パラメーターの有意差は、対応のある Student の両側  $t$  検定により求めた。全ての  
場合において、 $p$ -値  $< 0.05$  のとき、有意差ありとみなした。

### 第3節 結果

#### 3.3.1. Aliskiren をカニクイザルに経口および静脈内投与時の薬物動態

雄カニクイザルに単回で静脈内あるいは経口投与で 0.3 あるいは 2 mg/kg を各々投与後  
24 時間までの aliskiren の血漿中濃度について検討した (Figure 3A, B および Table 7)。  
Aliskiren を経口投与時の  $C_{max}$  は投与後 3 時間に 18.9 ng/mL であった。一方で、静脈内  
投与後の  $CL_{tot}$  は、236 mL/h/kg であった。経口および静脈内投与の AUC から算出された  
 $F$  は、1.8 % であった。Aliskiren の静脈内投与後 0-24 時間のサルの尿へ排泄される割合 ( $f_{e0-t}$ )  
は投与量の 0.029 であった。Aliskiren の単回静脈内投与後 1 時間の血液/血漿中濃度比  
( $R_b$ ) は、0.32 であった。これらの結果より、カニクイザルにおける aliskiren の  $F_H$  およ  
び  $F_A \cdot F_G$  値は、0.72 および 0.025 であった。

#### 3.3.2. Aliskiren のカニクイザルにおける血中動態への zosuquidar の影響

Aliskiren のカニクイザルにおける血中動態への P-gp 阻害剤 zosuquidar の影響を評価  
するために、aliskiren をサルに静脈内あるいは経口投与時に、zosuquidar を経口併用投与  
時における血漿中濃度について検討した。Figure 3A および Table 7 で示したように、  
zosuquidar の単回経口投与により、aliskiren の経口投与後の血漿中 aliskiren 濃度が増加し  
た。Aliskiren の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t h}$  は、zosuquidar の 10 mg/kg の併用経口投与により、  
20.9 および 8.3 倍高く ( $p=0.07$ )、100 mg/kg の併用投与で 23.1 および 13.9 倍高かった  
( $p=0.15, 0.19$ )。Aliskiren の  $C_{max}$  値は zosuquidar の 10 mg/kg の投与でほぼ最大を示した。  
Zosuquidar の 100 mg/kg の投与 3 あるいは 6 時間以内において、4 匹のサルのうち 2  
匹において軽い嘔吐が観察された。嘔吐したこれらサルにおける個々の aliskiren の  $C_{max}$



および  $AUC_{0-t_h}$  値 ( $C_{max} = 163$  および  $337$  ng/mL,  $AUC_{0-t_h} = 614$  および  $1572$  ng hr/mL) は, 他の 2 匹のサル の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  値の範囲以内であった ( $C_{max} = 1179$  および  $74$  ng/mL,  $AUC_{0-t_h} = 6113$  および  $260$  ng hr/mL). これらの結果から, aliskiren の暴露と嘔吐の間には関連がないことが示唆された. 加えて嘔吐した 2 匹のサル の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  値は, 4 匹のサル における平均値  $\pm 2 \times \text{standard deviation}$  (SD) の範囲内であった. それゆえ, これらのサル はデータ解析に加えることとした.

一方, aliskiren の静脈内投与後の未変化体の  $AUC_{0-t_h}$  値は, zosuquidar の  $10$  mg/kg を併用経口投与により, ほとんど影響を受けなかった (Figure 3B および Table 7). Aliskiren の静脈内投与時に zosuquidar の  $10$  mg/kg を経口併用投与後の血漿中 zosuquidar の濃度推移と薬物動態パラメーターは, aliskiren の経口投与時に zosuquidar の  $10$  mg/kg の経口併用投与時とほぼ等しかった (Table 8). Zosuquidar の経口併用時の aliskiren の静脈内投与後の  $CL_{tot}$  値は  $1.3$  倍高く, 一方で,  $F_H$  は  $0.88$  倍低かった. これらの結果により式 (6) から, aliskiren の  $2$  mg/kg を経口投与時の  $F_A \cdot F_G$  値は, zosuquidar の  $10$  mg/kg を併用経口時に  $12.8$  倍高くなることが示された (Table 7).

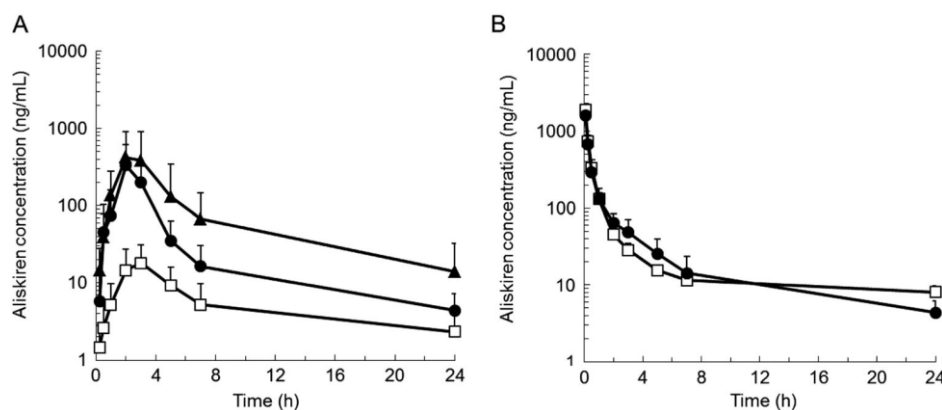


Figure 3 Plasma concentration-time profiles of aliskiren after its oral (A) or intravenous (B) administration with a concomitant oral dose of vehicle or zosuquidar (10 or 100 mg/kg) to monkeys

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of data obtained from four monkeys. (A) Opened squares, closed circle and triangle represent the mean concentration of aliskiren after its oral (2 mg/kg) administration with vehicle, or 10 or 100 mg/kg zosuquidar, respectively. (B) Opened squares and closed circle represent the mean concentration of aliskiren after its intravenous (0.3 mg/kg) administration with vehicle or 10 mg/kg zosuquidar, respectively.

Table 7 Pharmacokinetic parameters of aliskiren after its oral (2 mg/kg) or intravenous (0.3mg/kg) administration with a concomitant oral dose of vehicle or zosuquidar (10 or 100 mg/kg) to monkeys

Parameter	Aliskiren; 2 mg/kg, p.o.						Aliskiren; 0.3 mg/kg, i.v.			
	+ Vehicle		+ zosuquidar; 10 mg/kg, p.o.		+ zosuquidar; 100 mg/kg, p.o.		+ Vehicle		+ zosuquidar; 10 mg/kg, p.o.	
$C_{max}$ or $C_0$ (ng/mL)	18.9	± 13.3	333	± 284	438	± 506	3029	± 649	2488	± 1147
$T_{max}$ (h)	3.0	± 1.4	2.0	± 0.0	2.5	± 0.6	-		-	
$AUC_{0-t h}$ (ng h/mL)	135	± 100	969	± 749	2140	± 2706	1038	± 213	1014	± 299
$CL_{tot}$ (mL/h/kg)	-		-		-		236	± 53	304	± 105
$f_{e\ 0-t\ h}$	-		-		-		0.029	± 0.019	-	
$R_b$	-		-		-		0.32	± 0.07	-	
$F_{0-t\ h}$	0.018	± 0.011	-		-		-		-	
$F_H$	-		-		-		0.72	± 0.08	0.64	± 0.13
$F_A * F_G$	0.025	± 0.015	-		-		-		-	
$C_{max\ +inh} / C_{max}$			20.9	± 9.8	23.1	± 12.4				
$CL_{tot\ +inh} / CL_{tot}$									1.3	± 0.2
$AUC_{0-t\ h\ +inh} / AUC_{0-t\ h}$			8.3	± 3.2	13.9	± 8.0			1.0	± 0.2
$F_{H\ +inh} / F_H$									0.88	± 0.10
$(F_{H\ +inh} / F_H) * (CL_{tot} / CL_{tot\ +inh})$			0.71	± 0.17						
$(F_{A\ +inh} * F_{G\ +inh}) / (F_A * F_G)$			12.8	± 8.0						

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys. Aliskiren was given orally to animals immediately after the oral administration of zosuquidar (10 or 100 mg/kg b.wt.). Aliskiren was given intravenously to animals 1hr after the oral administration of zosuquidar (10 mg/kg b.wt.).  $f_e$  0-t h represents the fraction of the dose excreted as the unchanged drug in the urine from 0 to 24 h after the intravenous dosing of aliskiren,  $R_b$  is the blood/plasma concentration ratio, which was determined to be approximately unity 1hr after the intravenous dosing of aliskiren.  $F_H$ ,  $F_A$ , and  $F_G$  were calculated from eqs. 1, 2, 3, and 4, respectively, as described in the *Materials and Methods*, using the hepatic blood flow rate in monkeys ( $Q_H$ : 44 ml/min/kg) [59].

Table 8 Pharmacokinetic parameters of zosuquidar after its oral (10 or 100 mg/kg) administration with the intravenous or oral co-administration of aliskiren to monkeys

Parameter	Aliskiren; 2 mg/kg, p.o.				Aliskiren; 0.3 mg/kg, i.v.			
	+ zosuquidar; 10mg/kg, p.o.		+ zosuquidar; 100mg/kg, p.o.		+ zosuquidar; 10mg/kg, p.o.			
$C_{max}$ (ng/mL)	70.7 ±	43.2	375 ±	303	70.7 ±	72.8		
$T_{max}$ (h)	3.0 ±	0.0	2.8 ±	0.5	3.1 ±	1.3		
$AUC_{0-t h}$ (ng h/mL)	562 ±	304	4221 ±	3448	565 ±	475		

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys. Aliskiren was given orally to animals immediately after the oral administration of zosuquidar (10 or 100 mg/kg b.wt.). Aliskiren was given intravenously to animals 1hr after the oral administration of zosuquidar (10 mg/kg b.wt.).

### 3.3.3. カニクイザルにおける aliskiren の血中動態における CsA の影響

Aliskiren のサルにおける血中動態への CsA の影響を検討するために、CsA を併用経口あるいは静脈内投与時の aliskiren の経口投与後の血漿中 aliskiren 濃度について検討した。製剤中に含まれる界面活性剤等による P-gp 阻害の影響を排除する目的で、投与媒体として 0.5% (w/v) CMCを用いて検討した。CsA の 30 mg/kg (0.5% (w/v) CMC 懸濁液) を併用で経口投与時の aliskiren の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  値の平均値は各々 4.2 および 5.4 倍に増加した (Figure 4A および Table 9)。ネオーラル経口投与液として 10, 30 および 100 mg/kg の投与量で CsA を併用経口投与時の aliskiren の  $C_{max}$  値は、単独投与時と比較して、各々 18.2, 20.1 および 11.0 倍高く、 $AUC_{0-t_h}$  値は、18.6, 42.1 および 31.3 倍高かった。Aliskiren の  $T_{max}$  値は、単独投与時には 2 時間であったが、CsA を経口で併用時には 2.5-6 時間に遅延した。ネオーラル経口投与溶液として CsA を 30 mg/kg の投与量で併用経口投与時における aliskiren の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  は、最大値 441 ng/mL および 4285 ng h/mLを示し、CsA の 100 mg/kgの投与量で減少した。

サンディミュン静注剤として CsA の1, 3 および 10 mg/kg を併用で静脈内投与時における経口投与時の aliskiren の  $C_{max}$  値は、単独時と比較して各々 1.0, 1.3 および 1.9 倍高かった (Figure 4B および Table 9)。CsA の 1 および 3 mg/kg を併用で静脈内投与した時、aliskiren の  $AUC_{0-t_h}$  値は、いずれも0.9 倍であり、ほとんど影響を受けなかった。CsA の 10 mg/kgを併用時では、2.2 倍高かった。Aliskiren の  $C_{max}$  あるいは  $AUC$  は、単独投与時と CsA の 1 から10 mg/kg を併用で静脈内投与時において、ほとんど差がないことが示された。Aliskiren の  $T_{max}$  値は、単独投与時には 3.0 時間であったが、CsAを静脈内投与で併用時には 3.3-6.0 時間まで遅延した。

サルに aliskiren を併用で投与した時の CsA の薬物動態パラメーターは、Table 10 に示した。Aliskiren の経口投与時に、CsA の 30 mg/kg を 0.5% (w/v) CMC 懸濁液で 経口投与後の CsA の 個体別の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  値は、12 ng/mL および 43 ng hr/mL あるいは

それ以下であった。血漿中濃度は、4 匹のサルの中の 1 匹は検出されなかった（データに示さず）。Aliskiren 投与時のネオーラル経口投与液として CsA を併用で経口投与後の CsA の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  は、用量依存的に増加した。サルに、ネオーラルとして CsA の 100 mg/kg を投与後、CsA の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-t_h}$  は、484 ng/mL および 6567 ng h/mL であった。Aliskiren 投与時に、CsA の 1, 3 および 10 mg/kg を静脈内投与後の CsA の  $C_0$  および  $AUC_{0-t_h}$  は、用量依存的に増加した (Table 10)。Aliskiren の経口投与時に、CsA の 10 mg/kg を静脈内投与後の CsA の平均血漿中濃度推移は、30 mg/kg を経口投与後の同じ時点での濃度より高かった。

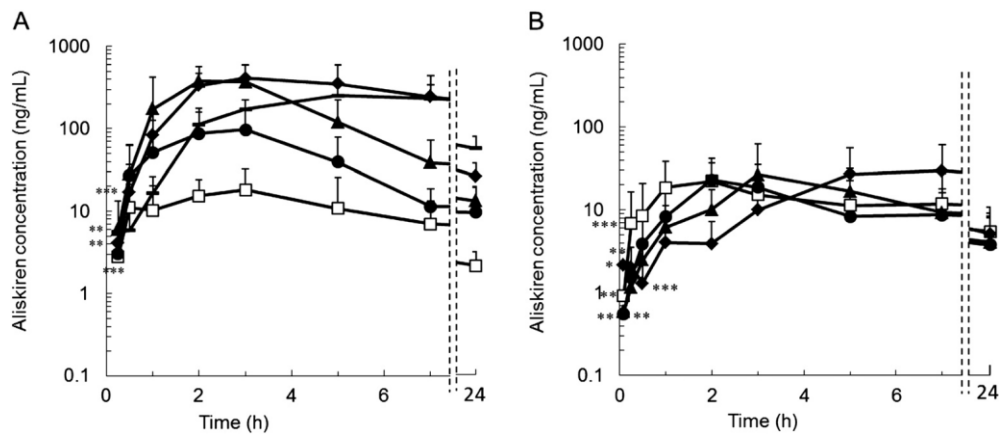


Figure 4 Plasma concentration-time profiles of aliskiren after its oral (2mg/kg) administration with a concomitant oral (A) or intravenous (B) dose of vehicle or CsA to monkeys

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of data obtained from four monkeys, except where denoted. (A) \*\*\*, mean  $\pm$  S.D. of three monkeys, \*\*, mean of two monkeys or \*, value of one monkey. Opened squares or closed circles, triangles, diamonds, and bars represent the mean concentration of aliskiren after its oral (2 mg/kg) administration with vehicle or cyclosporine A (30 mg/kg suspended in a 0.5% (w/v) CMC, 10, 30, and 100 mg/kg as Neoral oral solution), respectively. (B)† and \*\*\*, mean  $\pm$  S.D. of three monkeys, \*\*, mean of two monkeys or \*, value of one monkey. Opened squares or closed circles, triangles, and diamonds represent the mean concentration of aliskiren after its oral (2 mg/kg) administration with vehicle or cyclosporine A (1, 3†, and 10 mg/kg as Sandimmune I.V.), respectively.

Table 9 Pharmacokinetic parameters of aliskiren after its oral (2 mg/kg) administration with a concomitant oral or intravenous dose of vehicle or cyclosporine A (p.o.; 10, 30 or 100 mg/kg, i.v.; 1, 3 or 10 mg/kg) to monkeys

Parameter	Aliskiren; 2 mg/kg, p.o.																			
	CsA; p.o.										CsA; i.v.									
	+ Vehicle		+ 30 mg/kg (0.5% CMC)		+ 10 mg/kg (Neoral)		+ 30 mg/kg (Neoral)		+ 100 mg/kg (Neoral)		+ Vehicle		+ 1 mg/kg, (Sandimmune I.V.)		+ 3 mg/kg, (Sandimmune I.V.) <sup>a</sup>		+ 10 mg/kg, (Sandimmune I.V.)			
$C_{max}$ (ng/mL)	26.1	± 10.3	99.3	± 80.0	396	± 212*	441	± 187**	254	± 81**	27.3	± 17.1	25.2	± 18.1	29.5	± 34.6	30.7	± 30.8		
$T_{max}$ (h)	2.0	± 0.8	2.5	± 0.6	2.5	± 0.6	4.0	± 1.2*	6.0	± 1.2**	3.0	± 2.7	3.3	± 2.5	3.3	± 1.5	6.0	± 1.2		
$AUC_{0-t}$ (ng h/mL)	162	± 101	554	± 483	1799	± 1312	4285	± 2880*	3601	± 1056***	244	± 229	190	± 138	200	± 179	402	± 393		
$C_{max+inh} / C_{max}$			<b>4.2</b>	± <b>3.2</b>	<b>18.2</b>	± <b>11.7</b>	<b>20.1</b>	± <b>11.9</b>	<b>11.0</b>	± <b>4.6</b>			<b>1.0</b>	± <b>0.3</b>	<b>1.3</b>	± <b>0.7</b>	<b>1.9</b>	± <b>1.8</b>		
$AUC_{0-t, h: +nh} / AUC_{0-t}$			<b>5.4</b>	± <b>6.1</b>	<b>18.6</b>	± <b>18.3</b>	<b>42.1</b>	± <b>40.5</b>	<b>31.3</b>	± <b>20.9</b>			<b>0.9</b>	± <b>0.3</b>	<b>0.9</b>	± <b>0.2</b>	<b>2.2</b>	± <b>1.3</b>		

\*  $p < 0.05$ , significantly different from the oral administration of aliskiren alone.

\*\*  $p < 0.01$ .

\*\*\*  $p < 0.001$ .

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys, except where denoted. *a*, mean ± S.D. of three monkeys. The oral dosing suspensions (3mL/kg.wt.) of the mixtures of aliskiren (2 mg/kg b.wt.) and CsA (30 mg/kg b.wt.) were prepared in 0.5% (w/v) CMC and administered. Neoral oral solution (100 mg/mL) or Sandimmune I.V. (50 mg/mL for injection) was administered as the oral or intravenous dosing solution of CsA, respectively. Aliskiren was given orally to animals immediately after the oral (10, 30 or 100 mg/kg b.wt.) or intravenous (1, 3, or 10 mg/kg b.wt.) administration of CsA.

Table 10 Pharmacokinetic parameters of cyclosporine A after its oral (10, 30 or 100 mg/kg) or intravenous (1, 3 or 10 mg/kg) administration with a concomitant oral dose of aliskiren (2 mg/kg) to monkeys

Parameter	CsA; p.o.									CsA; i.v.								
	+ 10 mg/kg (Neoral)			+ 30 mg/kg (Neoral)			+ 100 mg/kg (Neoral)			+ 1 mg/kg, (Sandimmune I.V.)			+ 3 mg/kg, (Sandimmune I.V.) <sup>a</sup>			+ 10 mg/kg, (Sandimmune I.V.)		
$C_{max}$ or $C_0$ (ng/mL)	81.7	± 13.8		248	± 77		484	± 196		892	± 529		16381	± 10995		77323	± 46561	
$T_{max}$ (hr)	2.8	± 0.5		4.0	± 1.2		6.5	± 1.0		-			-			-		
$AUC_{0-t}$ (ng h/mL)	284	± 35		1058	± 237		6567	± 2023		359	± 82		2526	± 836		20004	± 5942	

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys, except where denoted. *a*, mean ± S.D. of three monkeys. Neoral oral solution (100 mg/mL) or Sandimmune I.V. (50 mg/mL for injections) was administered as the oral or intravenous dosing solution of CsA, respectively. Aliskiren was given orally to animals immediately after the oral (10, 30, or 100 mg/kg b.wt.) or intravenous (1, 3, or 10 mg/kg b.wt.) administration of CsA.

#### 第4節. 考察

カニクイザルにおける aliskiren の経口投与において、臨床投与量 (150 mg/man) に近い投与量として 2 mg/kg を選択した。pH6.5 での aliskiren の溶解性は良好であることから、この投与量において、小腸で溶解していることが示唆された (Table 2)。カニクイザルの  $F$  は 1.8 % であり、以前報告された値と同等であることが示されており (1.4%) [43]、ヒトの  $F$  と同等であることも示された (2.6%) [12,15]。Aliskiren のサルへの静脈内投与後、0-24 時間の尿中排泄率は、非常に低かった ( $fe_{0-24h}$ : 0.029) (Table 7)。Aliskiren のサルでの検討において得られた結果から、投与後 24 時間までに、投与した薬物が、ほぼ完全に排泄されたと仮定すると、 $F_A \cdot F_G$  値は極めて低く (0.025)、 $F_H$  は高いことが示唆された (0.72)。今回の結果から、aliskiren は、サルおよびヒトにおいて、ほぼ同様の動態を示すことが示唆された。

Aliskiren のカニクイザルの血中動態における P-gp 阻害剤 zosuquidar および CsA の影響について検討した。Zosuquidar の 10 あるいは 100 mg/kg を単回でサルに併用経口投与時に aliskiren を経口で投与した時の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-24h}$  値は、単独投与時と比較して各々 20.9 - 23.1 倍および 8.3 - 13.9 倍高い値を示した (Table 7)。以前の *ex vivo* 試験において、zosuquidar は、ヒト血漿中濃度として 200 ng/mL の濃度において最大に P-gp を阻害することが報告された [49, 60]。Zosuquidar のサルの  $f_p$  値は、ヒトの約半分であり、zosuquidar の 100 mg/kg をサルに併用経口投与後の  $C_{max}$  (375 ng/ml) では、P-gp を最大に阻害している可能性が示唆された (Tables 3 および 8)。Zosuquidar を患者に経口で投与した際、最大の P-gp 阻害に到達するよりも低い血漿中濃度で、重篤な小脳毒性を生じるとの報告がある [49, 61]。Zosuquidar の 10mg/kg をサルに単回で併用経口投与した時に、aliskiren を静脈内に投与後の aliskiren の  $CL_{tot}$  にほとんど影響を与えなかった。よって、この時に、肝臓および小腸の P-gp は、aliskiren の静脈内投与後のクリアランスにほとんど影響しなかったことが示唆された (Figure 3B および Table 7)。一方で、zosuquidar の 10 mg/kg を経口で併用

投与後の aliskiren の  $F_A \cdot F_G$  値は、式 (6) より算出した結果、aliskiren の単独投与後の 12.8 倍高い値を示しており、阻害剤による小腸 P-gp への影響が示唆された (Table 7).

CsA は溶解性が低いために、ネオーラル経口投与液として投与した (Tables 3). サルにおいてネオーラル経口投与液として CsA の 30 mg/kg を経口で併用投与時の aliskiren の経口投与後の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-th}$  値は、最大に増加を示した (Tables 9). サルに aliskiren 投与時に CsA の 100 mg/kg を経口で併用投与時に、CsA の  $C_{max}$  および  $AUC_{0-th}$  は、用量依存的に増加を示し、各々 484 ng/ml および 6567 ng h/ml に達した. これらの値は、 $R_b$  (約 2) を用いて血中濃度に換算した時、ヒトで 600 mg を投与時の約半分および同等の値であった [18, 62]. 一方で、CsA の 10 mg/kg を経口投与した時、サル小腸における暴露は、体重あたりで換算した場合には、600 mg を経口投与時のヒト小腸への暴露と同等であると考えられた. したがって、aliskiren を経口投与時に、ネオーラル経口投与液として CsA の 30 mg/kg を経口で併用投与した際には、サル消化管での aliskiren の P-gp による排出は、完全に阻害されていることが示唆された. 一方で、zosuquidar の 10 および 100 mg/kg を経口で併用投与後においては、aliskiren は完全に阻害されていないことが示唆された. サルにおける aliskiren の吸収過程における併用薬物の影響を排除するために、aliskiren を経口で投与した際に、CsA を静脈内で併用投与を行って、aliskiren の血中動態への影響を検討した. Aliskiren 投与時に CsA の 10 mg/kg を併用で静脈内投与後の CsA の平均血漿中濃度推移は、CsA の 30 mg/kg を経口投与後の同じ時点の濃度より高い値を示した (データには示さず). Aliskiren が経口で投与された時、CsA の 30 mg/kg を経口投与あるいは CsA の 10 mg/kg を静脈内で併用投与時に、aliskiren の  $AUC_{0-th}$  は、各々最大で 42.1 あるいは 2.2 倍に増加した (Table 9). ネオーラル経口投与液として CsA の 30 mg/kg を併用経口投与した時、サル小腸において aliskiren の排出および代謝が、完全に阻害された場合、式 (10) より、aliskiren の  $F_A \cdot F_G$  値は、単独で経口投与した時と比較して、19.1 倍高い値を示すことが示唆された. CsA の 30 mg/kg を経口で併用時に、aliskiren の  $F_A \cdot F_G$  値は、0.48 と見

積もられており、aliskiren の  $T_{max}$  値は、CsA の併用により遅延しているため、CsA は、サル小腸において、取り込みトランスポーターも阻害している可能性が示唆された。Aliskiren は、OATPs のような取り込みトランスポーターの基質であることが示されており [16, 17]、臨床試験において、グレープフルーツジュースの併用により、aliskiren の  $AUC$  および  $C_{max}$  は、減少することが示されている [17, 21]。これらの結果から、aliskiren は、ヒトにおいて CYP3A4、P-gp の阻害より、むしろ取り込みトランスポーターの阻害の影響を受ける可能性が示唆された。CsA および zosuquidar は、サル肝臓ミクロソームにおいて、aliskiren の代謝を阻害した (Table 3)。今回の *in vitro* 代謝試験の結果は、aliskiren が、サル肝臓および小腸ミクロソームにおいて、ヒトより CYP3A4 により早く代謝され、サル小腸においても、CsA および zosuquidar により、その代謝が阻害される可能性を示していた。さらに、サルにおける aliskiren の吸収およびバイオアベイラビリティは、ヒトの約半分および 2/3 程度であった。サル小腸における aliskiren の吸収における代謝の寄与は、ヒトよりも大きい (2倍程度) ことが示唆された。以前に、P-gp の mRNA 発現量は、サル小腸でヒトより、29 倍と非常に高いとの報告がある [63]。このことから、サルにおける aliskiren の低いバイオアベイラビリティおよび P-gp 阻害剤の併用時の aliskiren の  $F_A \cdot F_G$  値の大きな増加は、小腸膜での排出トランスポーターの高い活性による可能性が示唆された。

Fexofenadine は、臨床試験時に、itraconazole の併用により、 $C_{max}$  および  $AUC$  は、2-3 倍に増加し、グレープフルーツジュースおよび naringin の併用時には、 $AUC$  は、22-58 % 減少することが報告されている [64-67]。ここで示した fexofenadine のような P-gp 基質を用いたさらなる研究により、*in vivo* での P-gp 阻害におけるヒトおよびサルにおける類似性と違いをより理解することが可能になると考える。一方で、さらに研究を進めていくうえで、サル小腸における aliskiren への CYP3A および OATPs の寄与を考慮していく必要がある。サル小腸における P-gp および CYP3A 活性が、zosuquidar の経口投与により完全に阻害されていたと仮定した場合、CsA 併用時に観察された aliskiren での大きな  $AUC$  の増



加には、CsA の他の排出トランスポーターへの付加的な影響が示唆された。

今回の結果から、マウスおよびサルにおいて、P-gp は、aliskiren の消化管吸収に大きな影響を与えることが確認された。サルへの aliskiren の経口投与時における zosuquidar および CsA のような有力な P-gp 阻害剤の経口併用投与により、aliskiren の  $C_{max}$  および AUC は、大きな増加を示し、aliskiren は、カニクイザルにおいて、P-gp を介した薬物相互作用を検討するために有用で感度の良い in vivo 基質であることが確認できた。今回の研究において、探索化合物の aliskiren との併用試験は、ヒトにおける薬物相互作用を検討するために役立つ可能性が示唆された。さらに、aliskiren は、FDA および EMA (2012) において、各々 digoxin および dabigatran の使用が推奨されている P-gp を介した臨床における薬物相互作用のプローブとしても役立つ可能性が示唆された [1,2]。

## 総括

Aliskiren は、P-glycoprotein (P-gp) の基質であり、cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) により代謝される。本研究の目的は、医薬品の開発過程において探索化合物が、ヒトにおける P-gp を介した薬物相互作用 (DDI) を起こす可能性について検討するために、P-gp 基質のプロープとしての aliskiren の有用性を評価することである。本研究において、P-gp が aliskiren の *in vitro* および *in vivo* 薬物動態に関与しているかどうかに加えて、カニクイザルで P-gp を介した DDI が再現できるかについて検討した。

Aliskiren の膜輸送における P-gp の役割は、2 種類の P-gp 発現細胞を用いて評価した。LLC-GA5-COL150 細胞 (P-gp- 過剰発現細胞) において、aliskiren の B-to-A 輸送は A-to-B の輸送より大きく、*Flux ratio* は、1.5 であり、輸送方向性を示していることから、aliskiren は、quinidine と同様に、P-gp の基質であることが示唆された。また、Caco-2 細胞において aliskiren の B-to-A での  $P_{app}$  は、A-to-B の  $P_{app}$  より、42 倍高かった。Caco-2 細胞における aliskiren の輸送は、verapamil および cyclosporin A (CsA) によって阻害されており、aliskiren は、P-gp の基質であることが示された。一方で aliskiren の輸送は、これらの阻害剤では完全には阻害されなかったことから、aliskiren の輸送には、他のトランスポーターも関与していることが示唆された。P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送において、P-gp の基質である aliskiren は、輸送方向性を示すことが示された。

*Mdr1a/1b* 遺伝子欠損 (P-gp KO) マウスを用い、野生型 (WT) のマウスと比較することで、aliskiren の静脈内および経口投与時の血中動態における P-gp の寄与を評価した。Aliskiren の 30mg/kg を経口投与後の最大血漿中濃度 ( $C_{max}$ )、血漿中濃度時間曲線下面積 (*AUC*) およびバイオアベイラビリティ (*F*) は、P-gp KO マウスでは WT マウスと比較して、各々 3.4, 6.9 および 5.9 倍大きかった。一方で、aliskiren の 1 mg/kg を P-gp KO マウスへの静脈内投与後の *AUC* および全身クリアランスは、WT マウスと比較して、ほとんど変化しなかった。これらの結果より、P-gp は、aliskiren の消化管吸収に重要な役割を示すことが確認

された.

カニクイザルにおいて, aliskiren の薬物動態について検討し, さらに P-gp 阻害剤である CsA および zosuquidar と aliskiren の DDI について評価した. カニクイザルにおける aliskiren の  $F$  は 1.8 % であり, サルおよびヒトにおいて, ほぼ同様の動態を示すことが示唆された. サルに 2 mg/kg の投与量で経口投与時の aliskiren の  $AUC$  は, zosuquidar を 10 mg/kg の投与量で経口併用時には, 8.3 倍に上昇し, CsA の 30 mg/kg を経口で併用時には, 42 倍に上昇した. 一方で, aliskiren の 0.3 mg/kg を静脈内投与時に zosuquidar の 10 mg/kg を経口投与で併用時および aliskiren の 2 mg/kg を経口投与時に CsA の 1-10 mg/kg を静脈内投与で併用時に,  $AUC$  は, ほとんど影響を受けなかった. これらの結果から, サルにおいて, P-gp は aliskiren の消化管吸収を強く制限していることが示された. また, aliskiren の薬物動態における CsA あるいは zosuquidar による消化管 P-gp への影響は, サルで感度よく再現できることが示された. したがって, 本研究により, aliskiren は, サルにおいて消化管 P-gp 阻害を評価するための感度の良い基質として用いることが可能であることが明らかとなった.

本研究は, aliskiren を用いた探索化合物の併用試験が, ヒトにおける P-gp を介した DDI を検討する上で有用であることを示すとともに, aliskiren が P-gp を介した臨床における DDI の評価プローブとしても役立つ可能性を明らかにした.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇切丁寧な御指導と御高配を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬剤学教室 賀川 義之教授に深く感謝の意を表します。

また，本研究にあたり，ご指導，ご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 薬局管理学教室 前田 利男前教授，静岡県立大学大学院薬学研究院 生化学教室 鈴木 隆教授，静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬剤学教室 宮寄 靖則准教授，石井 康子講師，内野 智信講師ならびに谷澤 康玄助教に深く感謝致します。

本論文の御高覧と，御指導，御助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬効解析学教室 伊藤 邦彦教授，静岡県立大学大学院薬学研究院 衛生分子毒性学教室 吉成 浩一教授ならびに静岡県立大学大学院薬学研究院 薬物動態学教室 尾上 誠良教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり，協力を賜りました静岡県立総合病院に厚くお礼申し上げます。

本研究の機会を与え頂きました田辺三菱製薬株式会社 研究本部 松本 健 前探索スクリーニングセンター長ならびに大菊 鋼 探索生物研究所長（現 研究コアユニット長）に心より感謝申し上げます。さらに，研究途上種々の御協力および御便宜を図って下さいました田辺三菱製薬株式会社 研究本部 薬物動態研究所および探索スクリーニングセンター（現 探索生物研究所）の研究員各位に感謝致します。

最後に，これまでの研究生活を支えてくれた家族ならびに友人に心より感謝致します。

## 参考文献

1. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry Drug, Interaction Studies -Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations DRAFT GUIDANCE 2012.
2. European Medicines Agency, Guideline on the Investigation of Drug Interactions Final 2012.
3. 千葉寛. 薬物相互作用のガイドライン改定に寄せて.ファルマシア 2014; 7: 637.
4. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(最終案).  
2014. <http://www.japal.org/contents/dom/notice/005091.html>
5. Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 215–236.
6. Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, et al. International Transporter Consortium. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. Clin Pharmacol Ther 2013; 94: 52–63.
7. Tweedie D, Polli JW, Berglund EG, et al. International Transporter Consortium. Transporter studies in drug development: experience to date and follow-up on decision trees from the International Transporter Consortium. Clin Pharmacol Ther 2013; 94: 113–125.
8. 前田和哉. トランスポーターを介した相互作用.ファルマシア 2014; 7:659–663.
9. Müller F1, Fromm MF. Transporter-mediated drug–drug interactions. Pharmacogenomics 2011; 12: 1017–1037.
10. Estudante M1, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: An overview. Advanced Drug Delivery Reviews 65 2013; 1340–1356.
11. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, et al. Structurebased design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 2003; 308: 698–705.

12. Vaidyanathan S, Jarugula V, Dieterich HA, Howard D, Dole WP. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47: 515–531.
13. 添付文書 ラジレス錠150mg
14. Azizi M, Webb R, Nussberger J, et al.. Renin inhibition with aliskiren: where are we now, and where are we going? *J Hypertens* 2006; 24: 243–256.
15. Waldmeier F, Glaenzel U, Wirz B, et al. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1418–1428.
16. Vaidyanathan S, Camenisch G, Schuetz H, et al. Pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren in combination with digoxin, atorvastatin, and ketoconazole in healthy subjects: the role of P-glycoprotein in the disposition of aliskiren. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 1323–1338.
17. Rebello S, Zhao S, Hariry S, Dahlke M, Alexander N, Vapurcuyan A, Hanna I, Jarugula V. Intestinal OATP1A2 inhibition as a potential mechanism for the effect of grapefruit juice on aliskiren pharmacokinetics in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68: 697–708.
18. Rebello S, Compain S, Feng A, Hariry S, Dieterich HA, Jarugula V. Effect of cyclosporine on the pharmacokinetics of aliskiren in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2011; 51: 1549–1560.
19. Rebello S, Leon S, Hariry S, Dahlke M, Jarugula V. Effect of verapamil on the pharmacokinetics of aliskiren in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 2011; 51: 218–228.
20. Tapaninen T, Backman JT, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. Itraconazole, a P-glycoprotein and CYP3A4 Inhibitor, markedly raises the plasma concentrations and enhances the renin-inhibiting effect of aliskiren. *J Clin Pharmacol* 2011; 51: 359–367.
21. Tapaninen T, Neuvonen PJ, Niemi M. Grapefruit juice greatly reduces the plasma concentrations of the OATP2B1 and CYP3A4 substrate aliskiren. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 339–342.
22. Tapaninen T, Neuvonen PJ, Niemi M. Orange and apple juice greatly reduce the plasma

- concentrations of the OATP2B1 substrate aliskiren. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71: 718–726.
23. Kajosaari L, Niemi M, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen P, Backman J. Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78:388-399.
  24. Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, et al. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299: 620-628.
  25. Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *J Clin Pharmacol.* 1999; 39: 1203-1211.
  26. Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 312: 1151–1160.
  27. Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, Sawada Y. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in Caco-2 cells. *Biol. Pharm.Bull.* 1998; 21: 1062–1066.
  28. Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M et al. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metab. Dispos.* 2005; 33: 518–523.
  29. Bailey DG, Dresser GK. Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4: 281–97.
  30. Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JM. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* 1991; 337: 268–9.
  31. Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997; 99: 2545–53.
  32. Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JM. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* 1991; 337: 268–9.
  33. Yee GC, Stanley DL, Pessa LJ, Dalla Costa T, Beltz SE, Ruiz J, Lowenthal DT. Effect of

- grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet* 1995; 345: 955–6.
34. Edwards DJ, Bellevue FH 3rd, Woster PM. Identification of 6',7'-dihydroxybergamottin, a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 1287–90.
  35. Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71: 11–20.
  36. Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Ohtani H, Sawada Y. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 518–23.
  37. Mandery K, Bujok K, Schmidt I, Keiser M, Siegmund W, Balk B, König J, Fromm MF, Glaeser H. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1746–53.
  38. Lau YY, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. Effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2007; 81: 194–204.
  39. Carol W. Holtzman, Pharm.D., Barbara S. Wiggins, Pharm.D., Sarah A. Spinler, Pharm.D. Role of P-glycoprotein in Statin Drug Interactions. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1601–1607.
  40. Bogman, K.a, Peyer, A.-K.a, Török, M.a, Küsters, E.b, Drewe, J, HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132: 1183–1192.
  41. Cook JA, Feng B, Fenner KS, Kempshall S, Liu R, Rotter C, Smith DA, Troutman MD, Ullah M, Lee CA. Refining the in vitro and in vivo critical parameters for P-glycoprotein, [I]/IC<sub>50</sub> and [I<sub>2</sub>]/IC<sub>50</sub>, that allow for the exclusion of drug candidates from clinical digoxin interaction studies. *Mol Pharm.* 2010; 7 :398–411.
  42. Li J1, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, Hidalgo IJ. Use of Transporter Knockdown Caco-2 Cells to Investigate the In Vitro Efflux of Statin Drugs. *Drug Metab Dispos.*



- 2011; 39: 1196-202.
43. Xu Z, Cacatian S, Yuan J, et al. Optimization of orally bioavailable alkyl amine renin inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 694–699.
44. Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, et al. In vitro P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 786–792.
45. Dantzig AH, Law KL, Cao J, Starling JJ. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem* 2001; 8: 39–50.
46. Sato W, Fukazawa N, Suzuki T, Yusa K, Tsuruo T. Circumvention of multidrug resistance by a newly synthesized quinoline derivative, MS-073. *Cancer Res* 1991; 51: 2420–2424.
47. Dantzig AH, Shepard RL, Cao J, et al.. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* 1996; 56: 4171–4179.
48. Green LJ, Marder P, Slapak CA. Modulation by LY335979 of P-glycoprotein function in multidrugresistant cell lines and human natural killer cells. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1393–1399.
49. Sandler A, Gordon M, De Alwis DP, et al. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3265–3272.
50. Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, et al. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 840–845.
51. Ueda K, Okamura N, Hirai M, et al. Human Pglycoprotein transports cortisol, aldosterone and

- dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992; 267: 24248–24252.
52. Barré J, Chamouard JM, Houin G, Tillement JP. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, and ultracentrifugation compared for determining the plasma-proteinbinding characteristics of valproic acid. *Clin Chem* 1985; 31: 60–64.
  53. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990; 79: 476–482.
  54. Millipore Corporation User Guide Multi-Screen Caco-2 Assay System 2003.
  55. Galkin A, Pakkanen J, Vuorela P. Development of an automated 7-day 96-well Caco-2 cell culture model. *Pharmazie* 2008; 63: 464–469.
  56. Utoh M, Uno Y, Ohtsuka T, Kume T. Identification and analysis of drug transporters in cynomolgus Macaques. 27th JSSX Annual Meeting, Chiba, Japan, 2012.
  57. Jones PM, George AM. A new structural model for P-glycoprotein. *J Membrane Biol* 1998; 166: 133–147.
  58. Iwasaki K, Uno Y. Cynomolgus monkey CYPs: a comparison with human CYPs. *Xenobiotica* 2009; 39: 578–581.
  59. Hosea NA, Collard WT, Cole S, et al. Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. *J Clin Pharmacol* 2009; 49: 513–533.
  60. Sophie C, Dinesh PA, James G, Wright AS, Michael B, Leon A. A population pharmacokinetic model for doxorubicin and doxorubicinol in the presence of a novel MDR modulator, zosuquidar trihydrochloride (LY335979). *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 107–118.
  61. Rubin EH, de Alwis DP, Pouliquen I, et al. A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3710–3717.

62. Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 1986; 11: 107–132.
63. Takahashi M, Washio T, Suzuki N, et al. Characterization of gastrointestinal drug absorption in cynomolgus monkeys. *Mol Pharm* 2008; 5: 340–348.
64. Shimizu M, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Effects of itraconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61: 538–544.
65. Banfield C, Gupta S, Marino M, Lim J, Affrime M. Grapefruit juice reduces the oral bioavailability of fexofenadine but not desloratidine. *Clin Pharmacokinetics* 2002; 41: 311–318.
66. Dresser G, Kim R, Bailey DG. Effect of grapefruit juice volume on the reduction of fexofenadine bioavailability: possible role of organic anion transporting polypeptides. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77: 170–177.
67. Bailey DG, Dresser GK, Leake BF, Kim RB. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 495–502.