

慢性腎疾患患者におけるチオール化合物の
曝露量予測に関する探索的研究

2020 年

田 久 保 弘 章

目次

略語及び記号一覧	1
緒言	3
第 1 章 Dalcetrapib の生体試料中での安定性と存在形態	5
第 1 節 Dalcetrapib の血漿中での安定性	5
第 2 節 血漿中での dalcetrapib 代謝物の存在形態	6
第 3 節 Dalcetrapib-SH と血漿タンパクとの SS 結合の可逆性	6
第 4 節 Dalcetrapib の肝 S9 及び小腸粘膜ホモジネート中での安定性	8
第 5 節 考察	9
第 6 節 小括	10
第 2 章 Dalcetrapib を単回投与したラット及びサルにおける薬物動態	11
第 1 節 吸収	11
第 2 節 分布	14
第 3 節 排泄	16
第 4 節 代謝	17
第 5 節 考察	18
第 6 節 小括	21
第 3 章 Dalcetrapib を反復投与したラットにおける薬物動態と蓄積性	22
第 1 節 吸収	22
第 2 節 分布	23
第 3 節 排泄	24
第 4 節 考察	25
第 5 節 小括	28

第 4 章	チオール化合物の慢性腎疾患（CKD）患者における曝露量の予測性検証	29
第 1 節	チオール化合物の健康成人における PBPK モデルの構築	30
第 2 節	チオール化合物の CKD 患者における曝露量の予測	33
第 3 節	モデル検証及び感度分析	36
第 4 節	考察	38
第 5 節	小括	42
総括及び結論	43
実験の部	45
第 1 章に関する実験	45
第 2 章に関する実験	50
第 3 章に関する実験	56
第 4 章に関する実験	58
謝辞	64
参考文献	65
論文目録	72

略語及び記号一覧

AUC	area under the plasma concentration-time curve
AUC ₀₋₂₄	AUC from time zero to 24 hours
BDC	bile duct cannulated.
CKD	chronic kidney disease
CL	clearance
CL _H	hepatic clearance
CL _R	renal clearance
CL _{U_{int}H}	unbound metabolic intrinsic clearance
C _{max}	maximum plasma drug concentration
CYP	cytochrome P450
DTT	dithiothreitol
F _a	fraction moving into enterocytes
f _B	unbound fraction in blood
FDA	U.S. Food and Drug Administration
f _e	fraction excreted unchanged in urine
F _g	fraction escaping gut-wall elimination
F _h	fraction escaping hepatic elimination
f _p	unbound fraction in plasma
GFR	glomerular filtration rate
HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-UV	HPLC with a UV detection
HV	healthy volunteers
k _a	absorption rate constant
K _p	tissue to plasma concentration ratio
logD	pH dependent distribution coefficient
logP	octanol-water partition coefficient
MDR1	multidrug resistance 1
n.a.	not applicable

n.c.	not calculated
n.d.	not detected
NEM	N-ethyl maleimide
PBPK	physiologically based pharmacokinetic
P-gp	P-glycoprotein
PK	pharmacokinetics
pK _a	acidic dissociation constant
PMDA	Pharmaceutical and Medical Devices Agency
R _{ac}	accumulation ratio
Radio-ODS-HPLC	reverse-phase HPLC with a radioisotope detection
Radio-Gel-HPLC	size-exclusion HPLC with radioisotope detection
R _B	blood to plasma concentration ratio
SF	scaling factor
SS	disulfide
t _{1/2}	elimination half-life
TC	tissue composition
t _{lag}	lag time
V _{ss}	apparent volume of distribution at steady state

緒言

近年、創薬研究においてモダリティが多様化しており、これまでの中心であった低分子や抗体だけではなく、中分子、核酸、ペプチド、抗体薬物複合体などの研究が盛んに行われている。加えて低分子創薬においても従来の非共有結合性医薬品の枠を超えて、共有結合性医薬品の開発が注目を集めつつある^{1,2}。これらの医薬品は標的タンパクと共有結合することにより低い用量で長時間の薬効が期待できる³。そうした長所にも関わらず、多くの製薬企業は共有結合性医薬品の開発を避ける傾向にある。これまでも多くの共有結合性医薬品が承認されてきたが、いずれも共有結合を意図して合成されたものではなく、*aspirin*、*penicillin* 及び *omeprazole* のように開発が始まってからその作用メカニズムが明らかになったものが多い。共有結合性を示す一部の医薬品は標的以外のタンパク質とも共有結合し、ハプテンとして働くことで免疫反応を惹起し毒性を発現するとの報告や、特異体質性の毒性発現に関与するとの報告もあり、製薬企業は共有結合性医薬品の開発を避けてきた^{4,5}。しかし近年、*ibrutinib*、*neratinib*、*dacomitinib* など標的タンパクに不可逆的に共有結合し薬効を発現することを意図した化合物ががん治療の領域で徐々に承認されてきた。こうした共有結合性化合物は標的タンパクへの選択性が高く、安全性が期待される。現時点でこうした薬剤の開発は特にがん治療の領域で盛んに進められているが、今後、他の治療領域にも広がることが期待される。

共有結合性を示す化合物のうち、チオール基を有する化合物は生体内で同じくチオール基を有するシステインやグルタチオンなどの低分子化合物や、高分子量のペプチドやタンパク質（酵素、細胞膜）とジスルフィド（SS）結合を形成する。*Captopril* や *N-acetylcysteine* などを用いた実験から一般的に SS 結合は可逆的で、生体内に豊富に存在するチオール基を有する成分と結合及び解離を繰り返すと考えられている⁶⁻⁸。一方生体内で代謝されてチオール基を有する活性代謝物を生成する *clopidogrel* や *prasugrel* は標的タンパクと不可逆的に共有結合しているとの報告もある^{9,10}。そのため共有結合性医薬品は生体内への蓄積性や薬物動態（PK）の低い予測性が懸念され、製薬企業が共有結合性医薬品の開発を避ける原因の一つになっている可能性がある。共有結合性医薬品についてヒトの PK を予測できれば、共有結合性を示す化合物の医薬品開発へのハードルを下げられると期待される。共有結合性医薬品に関するヒトの PK 予測については、少数ながら既に検討例があり、今後も報告が増えていくと思われた^{11,12}。一方で、高齢者や患者などのスペシャルポピュレーションに関するヒトの PK 予測についての報告はない。そこで著者は慢性腎疾患（Chronic kidney disease、CKD）における曝露量の予測に着手した。

CKD を伴う患者数は世界的に増加傾向にある^{13,14}。腎臓は様々な生理的な機能を持ち、その一つとして医薬品の生体内からの消失にも関与する重要な臓器である。その病態下では様々な生理的変化が起こることが知られており、CKD は腎臓だけでなく肝臓から消失する化合物の PK にも影響し、場合によっては血漿中濃度の増加により副作用を引き起こすことさえある^{15,16}。血漿中薬物濃度の上昇に起因する毒性の発現や過剰な薬効発現を避け、適切な臨床試験を計画するためには、事前にその PK を精度よく予測することが重要となる。近年、生理学的薬物動態 (Physiologically-based pharmacokinetic、PBPK) モデルを用いて CKD 患者における薬物の PK を予測する論文が多数報告されている^{17,18}。また Sayama らは 151 化合物について CKD 患者と健康成人 (HV) の PK を比較することで、タンパク結合率、肝代謝クリアランス及び腎排泄クリアランスのスケールリングファクター (SF) を算出し、CKD 患者に静脈内投与した化合物の PK を HV の血漿中濃度推移から適切に予測した¹⁹。しかしこれまでに生体内で共有結合する化合物について CKD の PK への影響を検証した報告はなく、既存の方法を応用できるかどうかは明らかでない。CKD 患者における PK の評価は米国食品医薬品局 (FDA) のドラフトガイダンスでも推奨されており、CKD 患者における共有結合性化合物の曝露量の予測性を検証することは製薬企業にとって極めて有用である²⁰。加えて本研究が他のスペシャルポピュレーションでの PK の予測性検証のきっかけになるほか、共有結合性化合物の医薬品開発へのハードルを下げることに繋がると考えられた。そこで本研究では、共有結合性を示すチオール化合物について CKD 患者における曝露量の予測性を検証することとした。

本研究では生体内で速やかに代謝されてチオール基を有する活性体となる dalcetrapib の生体試料中での安定性や生体試料中での存在形態について検討し、dalcetrapib 活性体が生体試料中で内因性の血漿タンパクなどと可逆的な SS 結合を形成していることを明らかにした (第 1 章)。続いて第 2 章では ¹⁴C-dalcetrapib を単回投与したラット及びサルについて、吸収、分布、代謝、排泄を検討し、共有結合性を示す dalcetrapib 活性体が比較的速やかに体外へ排泄されることを明らかにした。第 3 章では ¹⁴C-dalcetrapib をラットに一日一回反復経口投与し、反復投与による体内動態への影響や組織への蓄積性が低いことを示した。第 4 章では共有結合性を示すチオール基を有する化合物の PBPK モデルを構築し、CKD 患者における血漿中チオール化合物の曝露量の予測性を検証した。共有結合性を示す化合物の曝露量については、その予測性の低さが懸念されたが、複雑な経路でチオール化合物を生成する場合を除き、その曝露量の変化を概ね精度よく予測できた。以上、dalcetrapib の生体試料中での安定性、dalcetrapib から生成するチオール化合物の体内動態、反復投与による蓄積性及び CKD 患者における曝露量の予測性について 4 章に渡り論述する。

第 1 章 Dalcetrapib の生体試料中での安定性と存在形態

Dalcetrapib は日本たばこ産業株式会社で創製された cholesteryl ester transfer protein (CETP) 阻害剤である。Dalcetrapib はその構造中にチオエステルを含む (Figure 1)。投与された dalcetrapib は生体中で加水分解されて dalcetrapib-SH を生成し、CETP のシステイン残基に SS 結合することでその薬理作用を発現すると考えられている²¹。

チオール基を有する captopril や N-acetylcysteine などは、システインやグルタチオンなどのチオール基を有する生体中の低分子や、同じくチオール基を有する血漿タンパクと SS 結合を介して共有結合するとともにその結合は可逆性を示すことが知られている^{7,8}。Dalcetrapib に関しても体内で生成した dalcetrapib-SH が類似の挙動を示すと推測されることから、本章では ^{14}C で標識した dalcetrapib (^{14}C -dalcetrapib) を用いて、生体試料中での安定性、血漿試料中での存在形態及びその結合性を検討した。

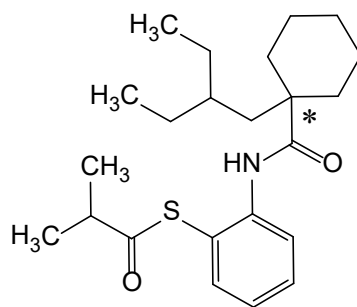


Figure 1 Structure of ^{14}C -dalcetrapib. * The position of the ^{14}C label.

第 1 節 Dalcetrapib の血漿中での安定性

^{14}C -Dalcetrapib をラット (Sprague-Dawley 系、雄性)、サル (カニクイザル、雄性) 及びヒト (日本人、男性) の血漿に添加し (最終濃度 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$)、 37°C で 5、10 及び 15 分間インキュベートした。その結果、いずれの種においても 15 分後の反応液中に未変化体は検出されなかった (Table 1)。一方、反応後の血漿に還元剤である dithiothreitol (DTT) を加え、更に N-ethyl maleimide (NEM) でチオール基を誘導体化することで、いずれの種においても総放射能の 97%以上が dalcetrapib-SH/NEM 誘導体 (NEM 誘導体) として検出された。

Table 1 Metabolic stability of dalcetrapib in plasma from rat, monkey and human.			
Incubation time (min)	Percentage of dalcetrapib (%)		
	Rat	Monkey	Human
5	n.d.	2.0	1.6
10	n.d.	0.8.	n.d.
15	n.d. (97.3)	n.d. (98.0)	n.d. (98.4)

The values in parentheses represent the percentage of dalcetrapib-SH/NEM in the sample. n.d.: not detected.

第2節 血漿中での dalcetrapib 代謝物の存在形態

^{14}C -Dalcetrapib をラット（Sprague-Dawley 系、雄性）、サル（カニクイザル、雄性）及びヒト（日本人、男性）の血漿に添加し（最終濃度 0.1、1 及び 10 $\mu\text{g/mL}$ ）、37°C で 10 分間インキュベートした。その結果、総放射能のそれぞれ 96.2%、95.5%及び 90.9%がタンパク結合型と算出された（Table 2）。0.1 から 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲においてタンパク結合型の割合はほぼ一定であった。反応後の血漿を DTT 及び NEM で処置すると、タンパク結合型の大部分は非結合型として回収されたことから、このタンパク結合型の大部分はタンパク質との SS 結合体（dalcetrapib-SS-protein）として存在していると推測された。

Table 2 *In vitro* plasma protein binding and protein binding via disulfide bond of ^{14}C -dalcetrapib in rat, monkey and human plasma

Species	Plasma concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Percentage of protein binding (%)	Dalcetrapib-SS-protein
Rat	0.1	96.2 \pm 0.9	91.7 \pm 1.2
	1	93.9 \pm 1.5	90.0 \pm 1.5
	10	91.5 \pm 1.6	86.7 \pm 1.6
Monkey	0.1	95.5 \pm 1.4	85.5 \pm 1.4
	1	89.8 \pm 0.6	81.8 \pm 1.0
	10	83.9 \pm 0.8	78.9 \pm 0.7
Human	0.1	90.9 \pm 4.0	81.6 \pm 3.7
	1	88.3 \pm 1.3	81.3 \pm 1.3
	10	86.1 \pm 2.9	81.0 \pm 2.7

Each value is the mean \pm SD of three samples.

第3節 Dalcetrapib-SH と血漿タンパクとの SS 結合の可逆性

^{14}C -Dalcetrapib をヒト（日本人、男性）の血漿に添加し（最終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ ）、37°C で 10 分間インキュベートした後、ゲルろ過カラムを用いたラジオ検出器付き高速液体クロマトグラフィー（Radio-Gel-HPLC）で分析すると、総放射能の 62%はタンパク画分に溶出された。このことから dalcetrapib-SH は主に血漿タンパクと共有結合していると考えられた（Figure 2A）。また、インキュベート後の血漿に大過剰の非標識 dalcetrapib-SH（最終濃度 1000 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加して同様に分析すると、このタン

パック画分の放射能は 20%に低下し、残りの放射能は低分子量の非結合型画分に回収された (Figure 2B)。したがって、dalcetrapib-SS-protein はチオール化合物 (dalcetrapib-SH など) が共存すると可逆的に交換すると考えられた。

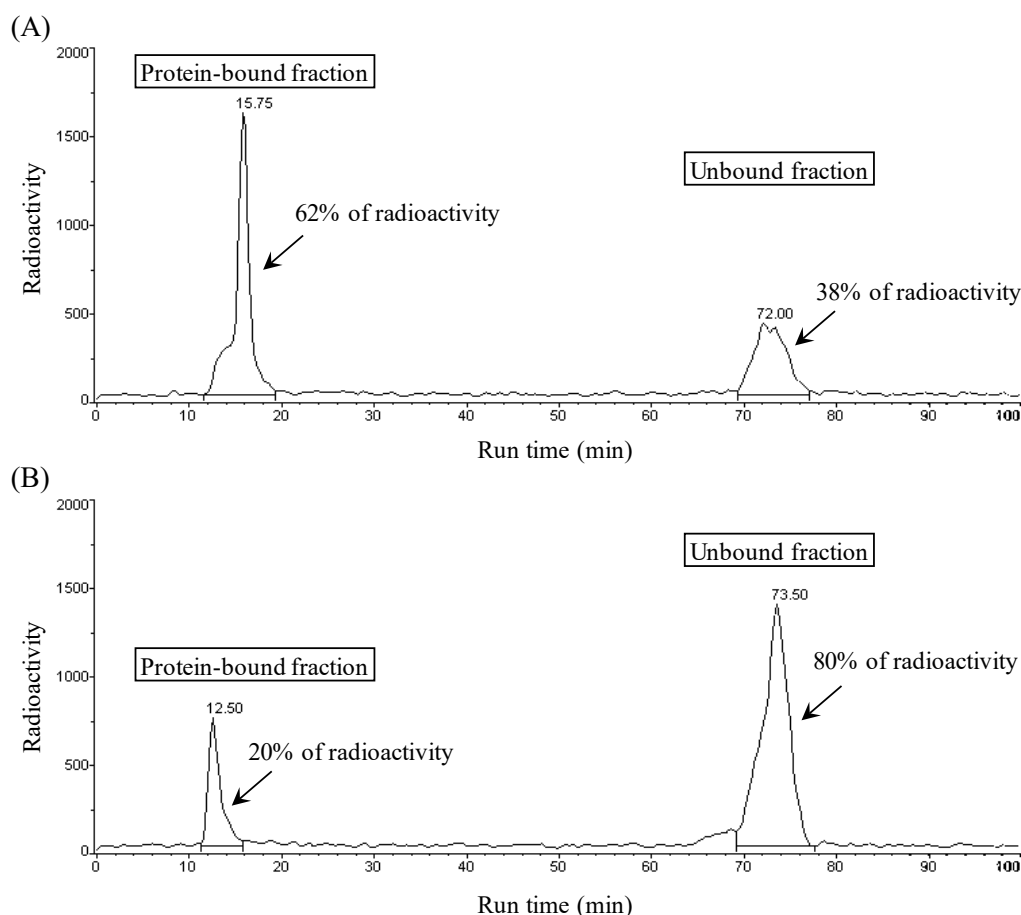


Figure 2 Thiol-disulfide exchange of dalcetrapib-SS-protein in the presence of unlabeled dalcetrapib-SH in plasma samples. After ^{14}C -dalcetrapib was incubated at 37°C for 10 minutes in human plasma, the sample was injected onto a Radio-Gel-HPLC without treatment (A) or after treatment with an extremely excessive amount of dalcetrapib-SH.

^{14}C -Dalcetrapib をヒトの血漿に添加し (最終濃度 $10\ \mu\text{g/mL}$)、 37°C で 10 分間インキュベートした後、アセトニトリルで処理し HPLC で分析すると、dalcetrapib-SH と dalcetrapib-SS-dalcetrapib が検出された (Figure 3A)。インキュベート後の血漿を DTT 及び NEM で処理後、アセトニトリルを添加し同様に分析すると、NEM 誘導体のみが検出された (Figure 3B)。したがって dalcetrapib-SS-protein は有機溶媒や DTT などの還元剤が共存すると、還元型チオールの dalcetrapib-SH に変換されると考えられた。

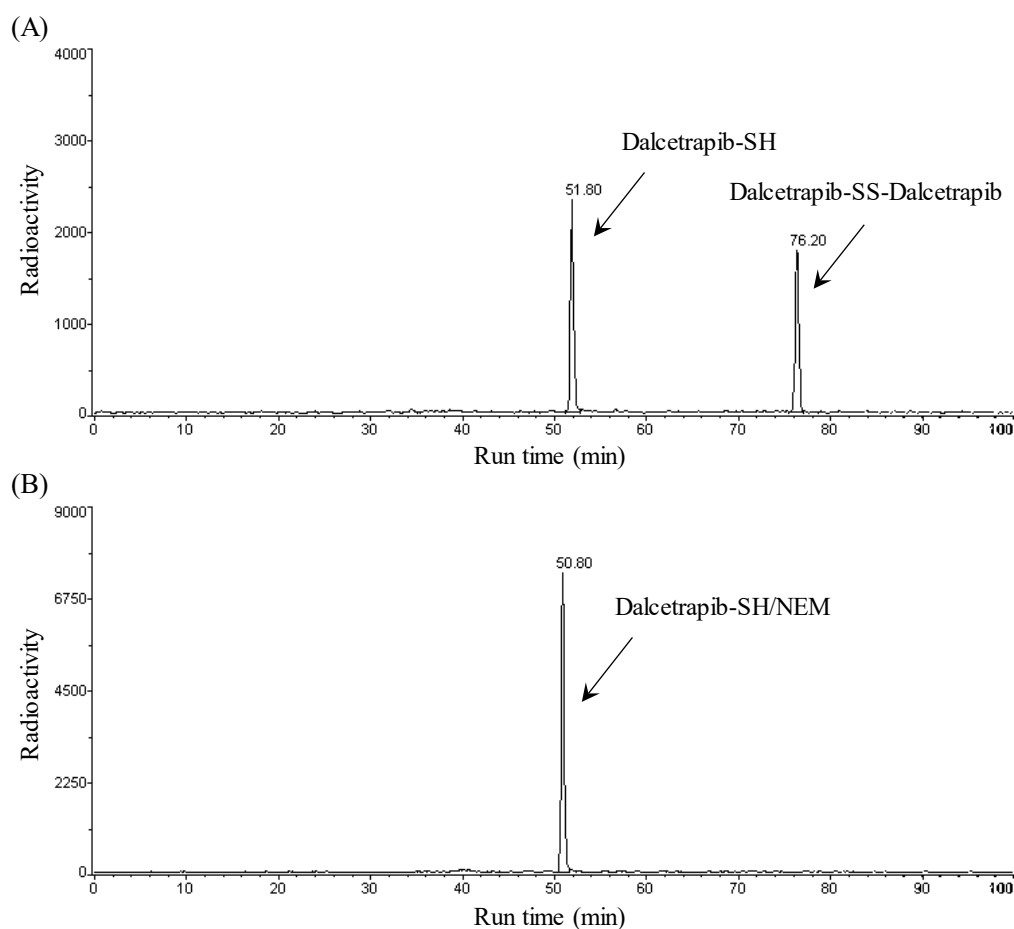


Figure 3 Liberation of dalcetrapib-SH from mixed disulfide with human plasma proteins in the process of extraction using organic solvent. After ^{14}C -dalcetrapib was incubated at 37°C for 10 minutes (A) or 15 minutes (B) in human plasma, the sample was extracted with acetonitrile (A) or pretreated with DTT and NEM before extraction with acetonitrile (B), and the extracts were injected onto a Radio-ODS-HPLC.

第4節 Dalcetrapib の肝 S9 及び小腸粘膜ホモジネート中での安定性

^{14}C -Dalcetrapib をラット (Sprague-Dawley 系、雄性)、サル (カニクイザル、雄性) 及びヒト (男性) の肝 S9 に添加し (最終濃度 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$)、 37°C で 15 分間インキュベートした。その結果、 ^{14}C -dalcetrapib は速やかに減少し、いずれの種においても未変化体の残存率は 5%未満となった (Table 3)。反応後の肝 S9 を DTT 及び NEM で処理すると、ラットで総放射能の 77.2%、サルで 61.1%、ヒトで 85.5%が NEM 誘導体として検出された。

^{14}C -Dalcetrapib をラット小腸粘膜ホモジネートに添加し (最終濃度 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$)、 37°C で 15 分間インキュベートした。その結果、 ^{14}C -dalcetrapib は速やかに減少し、未変化体は検出されなかった。この試

料を DTT 及び NEM で処理すると、総放射能の 43.0%が NEM 誘導体として検出された。

Table 3 Metabolic stability of dalcetrapib in liver S9 fractions and homogenate of small intestinal mucosa from rat, monkey or human

Species	Source	Percentage of dalcetrapib (%)	Percentage of dalcetrapib-SH/NEM (%)
Rat	Liver S9	3.7	77.2
	Small intestinal mucosa	n.d.	43.0
Monkey	Liver S9	1.9	61.1
Human	Liver S9	4.7	85.5

n.d.: Not detected.

第 5 節 考察

ラット、サル及びヒトの血漿、肝 S9 及びラット小腸粘膜ホモジネートを用いた *in vitro* 安定性試験において、dalcetrapib は速やかに加水分解された。また、反応後の試料を DTT 及び NEM で処理すると大部分が NEM 誘導体として検出されたことから、加水分解により dalcetrapib-SH に変換されることが示された。Bentley ら及び Gross らはヒトにおいて dalcetrapib が非特異的エステラーゼやリパーゼにより速やかに加水分解を受けることを示しており^{22,23}、生体試料中での不安定性を示した本研究結果とよく一致した。Okamoto らは dalcetrapib が血漿中で CETP を阻害することを示したが²¹、本研究結果から dalcetrapib は生体内で速やかに加水分解され、dalcetrapib-SH として CETP 阻害に寄与すると考えられた。

生体内における低分子量のチオール (R-SH) としてはシステイン、グルタチオンなどが、高分子量としてはペプチド、酵素、細胞膜などのタンパク質 (protein-SH) の存在がよく知られており、これらは体液中で分子間又は分子内で酸化型の SS 結合体として存在している²⁴。そのため還元型チオールの dalcetrapib-SH は生体内の R-SH や protein-SH と SS 誘導体である dalcetrapib-SS-R、dalcetrapib-SS-protein を形成するか、又は二量体 (dalcetrapib-SS-dalcetrapib) を形成し、特にタンパク含量の多い血漿や組織中においては、dalcetrapib-SH の大部分が dalcetrapib-SS-protein として存在していると考えられた (Figure 4)。また dalcetrapib-SS-protein は、血漿や組織中で dalcetrapib-SS-dalcetrapib や dalcetrapib-SS-R と dalcetrapib-SH を介して酸化還元平衡にあると推測された。そこで本研究において生体試料中の dalcetrapib-SH を測定する際には SS 結合の可逆性を考慮し、生体試料に DTT を添加することで SS 誘導体から dalcetrapib-SH を遊離させ、NEM を添加することでチオール基を NEM 誘導体として安定化して定量した。また dalcetrapib-SH、dalcetrapib-SS-dalcetrapib、dalcetrapib-SS-R 及び dalcetrapib-SS-protein を dalcetrapib 活性体と総称することとした (Figure 4)。

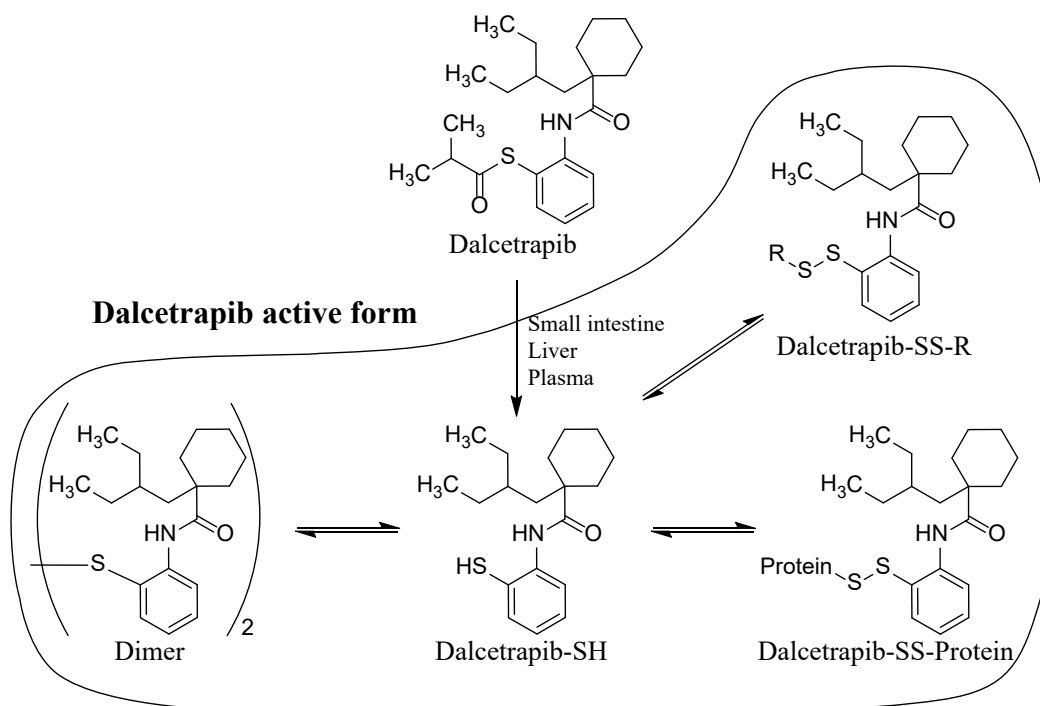


Figure 4 Proposed biotransformation pathway of dalcetrapib in rats, monkeys and humans. R: thiol-containing low molecular weight component

第6節 小括

ラット、サル及びヒトの血漿、肝臓、小腸試料中での安定性、血漿中での存在形態、血漿成分との結合の可逆性について検討した。Dalcetrapib は血漿、肝臓、小腸などで速やかに加水分解されて還元型チオールの dalcetrapib-SH に変換された。生体内にはシステインやグルタチオンなどの低分子量の内因性チオールやチオール基を有する高分子量のペプチドやタンパク質などが存在している。したがって、体内で生成した dalcetrapib-SH は、生体内でそれら又は dalcetrapib-SH と SS 結合を形成して存在していると考えられた。また、これらの SS 結合体は互いに dalcetrapib-SH を介した酸化還元平衡にあると推測されるため、本論文では dalcetrapib-SH、dalcetrapib-SS-dalcetrapib、dalcetrapib-SS-R 及び dalcetrapib-SS-protein を総称して dalcetrapib 活性体と総称することとした。

第2章 Dalcetrapib を単回投与したラット及びサルにおける薬物動態

前章の結果より、dalcetrapib は経口投与後速やかに加水分解され、チオール基を有する dalcetrapib 活性体となり、生体中で同様にチオール基を有する生体成分と可逆的な SS 結合を形成していると推測された。チオール基を有する化合物としては captopril や N-acetylcysteine などが医薬品として既に承認されているもののその数は少なく、非臨床試験として動物に投与した際の薬物動態に関する情報も少ない。また、dalcetrapib の毒性試験ではラット及びサルが用いられていることから、それらの動物種での体内動態を明らかにすることは毒性と体内動態の関係性を理解するうえでも極めて有用である。そこで本章では、dalcetrapib 又は ^{14}C -dalcetrapib をラット (Sprague-Dawley 系、雄性) 及びサル (カニクイザル、雄性) に単回経口投与することで dalcetrapib の吸収、分布、代謝及び排泄について検討した。

第1節 吸収

^{14}C -Dalcetrapib を 10 及び 100 mg/kg の用量でそれぞれ静脈内及び経口投与したラット及びサルにおける放射能の血漿中濃度推移を確認した。

^{14}C -Dalcetrapib を静脈内投与したラットにおける放射能の血漿中濃度は 2 相性の消失を示し、 α 相は 0.78 時間、 β 相は 14.6 時間の半減期で低下した (Table 4 及び Figure 5A)。また、 ^{14}C -dalcetrapib を経口投与した際には、放射能の血漿中濃度は投与後 0.5～8 時間でほぼ一定の値を示し、以後 13.0 時間の半減期で減少した (Table 4 及び Figure 6A)。血漿中放射能の AUC から算出した吸収率は 28.9% であった。

^{14}C -Dalcetrapib を静脈内投与したサルにおける放射能の血漿中濃度はラットと同様に 2 相性の消失を示し、 α 相は 0.58 時間、 β 相は 13.8 時間の半減期で低下した (Table 4 及び Figure 5B)。また、 ^{14}C -dalcetrapib を経口投与した際には、放射能の血漿中濃度は投与後 2～12 時間でほぼ一定の値を示し、以後 13.7 時間の半減期で減少した (Table 4 及び Figure 6B)。血漿中放射能の AUC から算出した吸収率は 59.3% であった。

Dalcetrapib 又は ^{14}C -dalcetrapib を 10 及び 100 mg/kg の用量でそれぞれ静脈内及び経口投与したラット及びサルにおける dalcetrapib 活性体の血漿中濃度推移を確認した。

Dalcetrapib を静脈内投与したラットにおける dalcetrapib 活性体の血漿中濃度は 2 相性の消失を示し、

α 相は 0.15 時間、 β 相は 5.5 時間の半減期で低下した (Table 5 及び Figure 5A)。血液－血漿中濃度比 (R_B 、第 2 節参照) を用いて算出した血液クリアランス (CL_B) は 30.0 mL/min/kg であった。また分布容積 (V_{ss}) は 5.18 L/kg と体内総水分量よりも大きかった。Dalcetrapib を経口投与した際には、dalcetrapib 活性体の血漿中濃度は投与後 1.7 時間に最大となり、以後いったん減少した後、4 から 8 時間にかけてはほぼ一定の値を示し、それ以後 4.0 時間の半減期で減少した (Table 5 及び Figure 6A)。また、dalcetrapib 活性体として算出した BA は 26.9% であった。

^{14}C -dalcetrapib を静脈内投与したサルにおける dalcetrapib 活性体の血漿中濃度は 12.5 時間の半減期で減少した (Table 5 及び Figure 5B)。 CL_B 及び V_{ss} はそれぞれ 12.6 mL/min/kg 及び 6.25 L/kg であった。 ^{14}C -dalcetrapib を経口投与したサルにおける dalcetrapib 活性体の血漿中濃度は投与後 4 時間に最大となり、以後 8.4 時間の半減期で減少した (Table 5 及び Figure 6B)。Dalcetrapib 活性体の BA は 18.0% であった。

Table 4 Pharmacokinetic parameters of radioactivity after intravenous or oral administration of ^{14}C -dalcetrapib to rats and monkeys.

Parameters	Rat		Monkey	
	Intravenous	Oral	Intravenous	Oral
Dose (mg/kg)	10	100	10	100
C_0 ($\mu\text{g eq./mL}$)	23.95 \pm 12.98	n.a.	7.23 \pm 0.88	n.a.
C_{\max} ($\mu\text{g eq./mL}$)	n.a.	2.38~3.29	n.a.	5.98~10.31
t_{\max} (h)	n.a.	0.5~8	n.a.	2~12
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.78 \pm 0.07	n.a.	0.58 \pm 0.13	n.a.
$t_{1/2\beta}$ (h)	14.6 \pm 1.0	13.0 \pm 0.8	13.8 \pm 0.6	13.7 \pm 1.2
AUC _{0-inf} ($\mu\text{g eq.}\cdot\text{h/mL}$)	21.40 \pm 1.55	61.95 \pm 8.18	48.52 \pm 2.52	287.6 \pm 122.0
CL (L/h/kg)	0.47 \pm 0.04	n.a.	0.20 \pm 0.01	n.a.
V_{ss} (L/kg)	6.79 \pm 0.57	n.a.	3.96 \pm 0.11	n.a.
Absorbed fraction (%)	n.a.	28.9 \pm 3.8	n.a.	59.3 \pm 25.2

Each value is the mean \pm SD of three animals. n.a.: not applicable

Table 5 Pharmacokinetic parameters of dalcetrapib active form after intravenous or oral administration of dalcetrapib to rats and monkeys

Parameters	Rat ^a		Monkey ^b	
	Intravenous	Oral	Intravenous	Oral
Dose (mg/kg)	10	100	10	100
C ₀ (μg eq./mL)	14.17±4.99	n.a.	7.94	n.a.
C _{max} (μg eq./mL)	n.a.	2.80±0.75	n.a.	2.16
t _{max} (h)	n.a.	1.7±0.6	n.a.	4
t _{1/2α} (h)	0.15±0.09	n.a.	n.a.	n.a.
t _{1/2β} (h)	5.5±1.3	4.0±0.3	12.5	8.4
AUC _{0-inf} (μg eq.·h/mL)	6.75±1.09	18.16±4.71	19.41	35.03
CL (L/h/kg)	1.51±0.26	n.a.	0.52	n.a.
V _{ss} (L/kg)	5.18±0.97	n.a.	6.25	n.a.
BA (%)	n.a.	26.9±7.0	n.a.	18.0

^a Each value is the mean ± SD of three animals. ^b Each value was obtain from pooled sample of three animals. n.a.: not applicable.

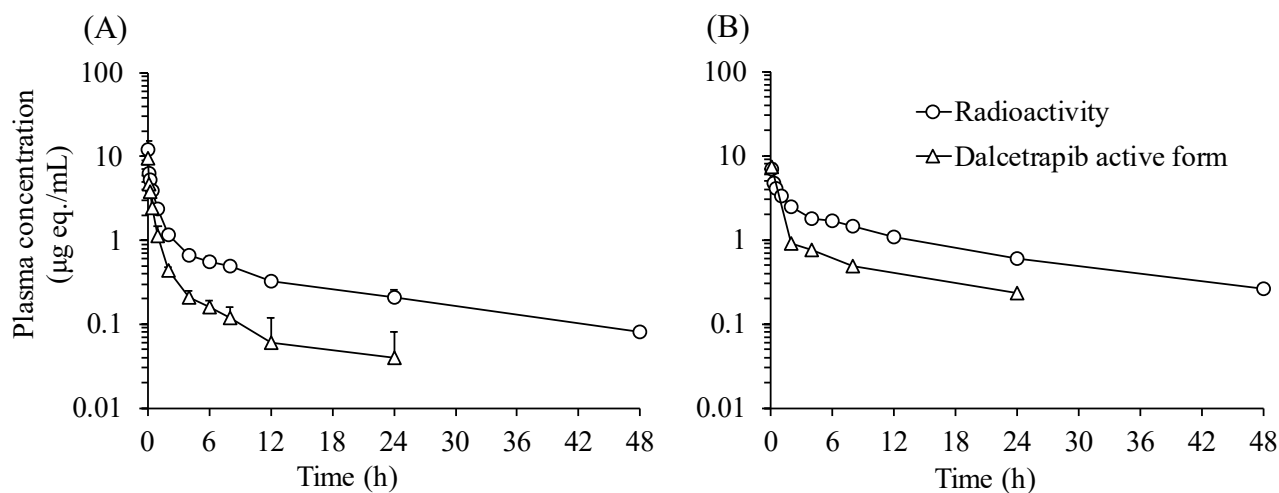


Figure 5 Plasma concentration-time curves of dalcetrapib active form and total radioactivity after intravenous administration of ¹⁴C-dalcetrapib or dalcetrapib at a dose of 10 mg/kg to rats (A) and monkeys (B)

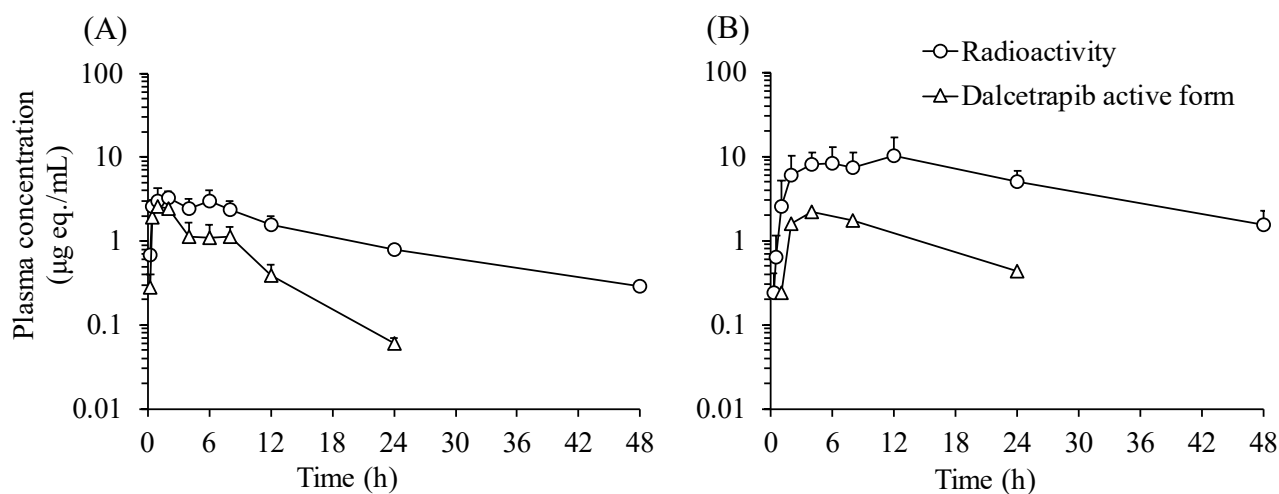


Figure 6 Plasma concentration-time curves of dalcetrapib active form and total radioactivity after oral administration of ^{14}C -dalcetrapib or dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats (A) and monkeys (B)

第2節 分布

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量で経口投与したラットにおいて、投与後 30 分ですべての組織から放射能が検出され、大部分の組織で投与後 2 時間に最高となったが、脂肪では 24 時間後に最高濃度を示した (Table 6)。投与後 2 時間における放射能濃度としては、肝臓及び副腎が血漿よりも高かった。これら組織中の放射能は投与後 24 時間から 168 時間にかけて低下したが、肝臓、副腎、脂肪、褐色脂肪及び脾臓において比較的高い放射能が検出された。一方、大脳及び小脳における放射能の分布は低く、投与後 168 時間では検出限界未満であった。

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量で経口投与したサルにおいて、投与後 168 時間で小脳を除くすべての組織から放射能が検出された。放射能の組織内濃度は腸間膜リンパ節が最も高く、次いで肝臓、甲状腺、脂肪、副腎などの組織で血漿よりも高かった。

Table 6 Tissue concentrations of radioactivity after oral administration of ^{14}C -dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats and monkeys.

Tissue	Radioactivity concentration ($\mu\text{g eq./g or mL}$)					
	Rats					Monkeys
	0.5 h	2 h	24 h	168 h	$t_{1/2}$ (h)	168 h
Plasma	3.56 \pm 1.17	5.65 \pm 3.14	0.87 \pm 0.11	0.05 \pm 0.01	34.9	0.31 \pm 0.10
Blood	2.29 \pm 0.70	3.79 \pm 2.01	0.99 \pm 0.08	0.25 \pm 0.01	72.5	0.30 \pm 0.08
Cerebrum	0.17 \pm 0.05	0.34 \pm 0.15	0.04 \pm 0.01	n.d.	n.c.	0.02 \pm 0.02
Cerebellum	0.18 \pm 0.04	0.35 \pm 0.14	0.05 \pm 0.01	n.d.	n.c.	N.D.
Bone marrow	0.86 \pm 0.24	2.03 \pm 0.64	0.48 \pm 0.18	n.d.	n.c.	0.93 \pm 0.91
Pituitary gland	0.91 \pm 0.28	1.53 \pm 0.68	0.24 \pm 0.21	n.d.	n.c.	n.a.
Eyeball	0.13 \pm 0.03	0.31 \pm 0.12	0.09 \pm 0.02	n.d.	n.c.	0.03 \pm 0.01
Harderian gland	0.81 \pm 0.23	2.44 \pm 0.94	1.03 \pm 0.28	0.04 \pm 0.04	30.7	n.a.
Submaxillary gland	0.69 \pm 0.17	1.33 \pm 0.65	0.27 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01	59.2	0.09 \pm 0.03
Thyroid	0.91 \pm 0.24	3.08 \pm 1.70	1.47 \pm 0.26	n.d.	n.c.	1.98 \pm 0.60
Trachea	0.48 \pm 0.24	1.23 \pm 1.10	0.22 \pm 0.04	n.d.	n.c.	n.a.
Thymus	0.43 \pm 0.13	0.85 \pm 0.30	0.22 \pm 0.06	0.02 \pm 0.03	n.c.	0.20 \pm 0.19
Heart	0.96 \pm 0.25	2.37 \pm 1.28	0.48 \pm 0.08	0.07 \pm 0.01	51.8	0.13 \pm 0.04
Lung	0.76 \pm 0.31	1.68 \pm 0.80	0.45 \pm 0.08	0.08 \pm 0.01	57.8	0.16 \pm 0.06
Liver	14.8 \pm 6.38	43.8 \pm 17.3	19.2 \pm 3.49	2.29 \pm 0.30	46.9	4.55 \pm 1.63
Spleen	1.13 \pm 0.43	3.82 \pm 1.84	1.71 \pm 0.58	0.63 \pm 0.22	99.9	0.73 \pm 0.50
Pancreas	1.50 \pm 0.84	2.29 \pm 0.66	1.62 \pm 1.40	0.10 \pm 0.06	35.8	0.15 \pm 0.12
Adrenal gland	3.13 \pm 0.76	8.53 \pm 3.68	2.46 \pm 0.65	1.37 \pm 0.28	172.6	1.04 \pm 0.32
Kidney	2.74 \pm 1.06	4.61 \pm 1.70	1.09 \pm 0.12	0.17 \pm 0.02	53.7	0.82 \pm 0.32
Testis	0.19 \pm 0.04	0.67 \pm 0.19	0.21 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01	60.2	0.10 \pm 0.03
Epididymis	0.35 \pm 0.08	0.85 \pm 0.36	0.30 \pm 0.06	0.04 \pm 0.01	49.5	n.a.
Seminal vesicle	0.24 \pm 0.07	0.63 \pm 0.22	0.23 \pm 0.08	0.02 \pm 0.01	40.9	0.09 \pm 0.02
Prostate	0.49 \pm 0.12	1.36 \pm 0.51	0.44 \pm 0.31	n.d.	n.c.	n.a.
Mesenteric lymph node	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	9.86 \pm 4.90
Skeletal muscle	0.57 \pm 0.07	0.96 \pm 0.41	0.18 \pm 0.02	n.d.	n.c.	0.10 \pm 0.03
Fat	0.31 \pm 0.09	1.77 \pm 0.95	3.41 \pm 0.19	1.03 \pm 0.35	84	1.13 \pm 0.12
Brown fat	0.98 \pm 0.34	4.27 \pm 0.94	3.40 \pm 0.33	0.81 \pm 0.38	69.6	n.a.
Skin	0.47 \pm 0.12	1.18 \pm 0.35	0.61 \pm 0.15	0.04 \pm 0.03	36.6	0.36 \pm 0.14
Intracystic bile	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	13.69 \pm 5.1

Each value is the mean \pm SD of three animals. n.d.: not detected. n.c.: not calculated, n.a.: not applicable.

^{14}C -dalcetrapib をラット、サル及びヒトの血液に添加した結果、いずれの種の R_B も 0.84 以下であり血球への移行性は低かった (Table 7)。先に述べたように、dalcetrapib は血漿中において速やかに dalcetrapib-SH に加水分解され、dalcetrapib 活性体として存在する事から、この R_B は dalcetrapib 活性体の値を示していると考えられた。

Table 7 *In vitro* blood to plasma ratio of ¹⁴C-dalcetrapib in rat, monkey and human blood.

Species	Blood concentration (µg/mL)	R _B
Rat	0.1	0.84±0.04
	1	0.84±0.01
	10	0.76±0.02
Monkey	0.1	0.69±0.06
	1	0.69±0.01
	10	0.69±0.01
Human	0.1	0.63±0.02
	1	0.63±0.01
	10	0.62±0.03

Each value is the mean ± SD of three samples.

第3節 排泄

¹⁴C-Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量で経口投与したラット及びサルにおいて、投与後 168 時間までにそれぞれ 85.7 及び 62.7%が糞中に、6.4 及び 36.5%が尿中に排泄された (Table 8)。いずれの種においても放射能の大部分が 48 時間までに排泄された。なおラットにおいて、投与後 48 時間までの呼気中に放射能は認められなかった。

¹⁴C-Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量で経口投与した胆管ろうラットにおいて、投与後 48 時間までに投与放射能の 2.9%が尿中に、14.7%が胆汁中に、83.7%が糞中に排泄された。また投与後 24 時間までに得られた胆汁を別の胆管ろうラットに十二指腸内投与した結果、放射能の 7.7%が尿中に、37.1%が胆汁中に、52.4%が糞中に排泄された (Table 9)。

Table 8 Cumulative excretion of radioactivity in urine, feces and bile after oral administration of ^{14}C -dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats and monkeys.

Species	Time (h)	Cumulative excretion (% of dose)			
		Urine	Feces	Bile	Total
Rats	0-24	5.2±0.1	54.2±20.9	n.a.	59.3±21.0
	24-48	6.0±0.2	83.5±3.2	n.a.	89.5±3.1
	48-72	6.2±0.2	85.1±3.0	n.a.	91.3±2.8
	72-96	6.3±0.2	85.4±2.9	n.a.	91.7±2.7
	96-120	6.3±0.2	85.5±2.8	n.a.	91.9±2.7
	120-144	6.3±0.2	85.6±2.9	n.a.	91.9±2.7
	144-168	6.4±0.2	85.7±2.9	n.a.	92.1±2.7
BDC rats	0-24	2.6±1.5	41.7±32.1	13.1±4.0	57.4±33.0
	24-48	2.9±1.6	83.7±9.1*	14.7±4.6	101.3±5.3*
Monkeys	0-24	25.0±13.9	35.6±14.9	n.a.	60.7±25.2
	24-48	32.7±13.7	53.2±10.4	n.a.	85.9±12.2
	48-72	34.7±13.4	60.0±7.8	n.a.	94.7±9.4
	72-96	35.4±13.5	61.9±6.8	n.a.	97.4±9.5
	96-120	35.9±13.4	62.5±6.8	n.a.	98.4±9.4
	120-144	36.2±13.3	62.6±6.9	n.a.	98.9±9.5
	144-168	36.5±13.4	62.7±6.9	n.a.	99.2±9.7

Each value is the mean ± SD of three animals. n.a.: not applicable. BDC: bile duct cannulated. * including gastrointestinal contents.

Table 9 Cumulative excretion of radioactivity in urine, feces and bile in BDC rats given radioactive bile intraduodenally

Time (h)	Cumulative excretion (% of dose)			
	Urine	Feces	Bile	Urine+Bile
0-24	7.4±3.5	48.7±4.5	36.8±5.5	44.2±6.7
24-48	7.7±3.8	52.4±6.0*	37.1±5.2	44.8±6.4

Each value is the mean ± SD of three animals. Dose: Bile 1 mL/head (Bile collected after single administration of 100mg/kg ^{14}C -dalcetrapib). BDC: bile duct cannulated. * including gastrointestinal contents.

第 4 節 代謝

^{14}C -Dalcetrapib を経口投与したラットにおける投与後 4 時間の血漿中では dalcetrapib 活性体が主成分であり、試料中の割合は 57.7%であった。また代謝物としてチオール基のメチル抱合体 (dalcetrapib-S-Me) が検出されたが、その割合は 11.6%と低かった (Table 10)。投与後 4 時間のサル血漿においても主成分はラットと同様に dalcetrapib 活性体 (26.9%) であり、他にチオール基のグルクロン酸抱合体 (dalcetrapib-S-G) 及び dalcetrapib-S-Me が検出されたが、それらの試料中の割合は低かった (<6%)。ラット及びサルのいずれにおいても血漿試料中の多くが未同定代謝物であり、投与後 24 時間では試料中放射能の 84.7%以上がその他代謝物として検出された。サルの血漿を用いて LC/MS を用いて代謝物の同定を試みた結果、これらの成分の多くが dalcetrapib-S-G の水酸化体、すなわち極性代謝物と推測された。

Table 10 Relative abundance of dalcetrapib active form and its metabolites in plasma at 4 h and 24 h after oral administration of ¹⁴C-dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats and monkeys.

Metabolites	Percentage of sample radioactivity			
	Rat		Monkey	
	4 h	24 h	4 h	24 h
Dalcetrapib active form	57.7 (2.67)	6.6 (0.06)	26.9 (2.16)	8.6 (0.43)
Dalcetrapib-S-G	0 (n.d.)	0 (n.d.)	5.5 (0.44)	5.3 (0.27)
Dalcetrapib-S-Me	11.6 (0.54)	0 (n.d.)	2.9 (0.23)	1.3 (0.07)
Others	30.6 (1.42)	93.4 (0.79)	64.7 (5.19)	84.7 (4.25)

Each value was obtained from pooled samples of three animals. The values in parentheses represent the plasma concentration (μg eq./mL) of each compound. n.d.: not detected.

サルの尿中で少量の dalcetrapib-SH+dalcetrapib-SS-dalcetrapib 及び dalcetrapib-S-G が検出されたものの、ラット及びサルの尿試料中における 92.1%以上はその他代謝物であった (Table 11)。ラット胆汁中では dalcetrapib-S-G が主代謝物であったが、試料中の割合は 14.3%であった。尿中放射能の大部分はその他の代謝物として検出されたが、LC/MS を用いて代謝物の同定を試みた結果、これらの成分の多くが dalcetrapib-S-G の水酸化体又は dalcetrapib-S-Me の水酸化後のグルクロン酸抱合体、すなわち極性代謝物であると推測された。これらの極性代謝物は、血漿中の極性代謝物が尿中に排泄されたものと考えられた。

ラットとサルの糞中には、dalcetrapib 及び dalcetrapib 活性体 (dalcetrapib-SH+dalcetrapib-SS-dalcetrapib) が検出され、それらの試料中の割合はラットにおいてそれぞれ 49.2%及び 21.4%、サルにおいてそれぞれ 18.6%及び 35.5%であった。また、少量の dalcetrapib-S-Me が検出されたが、dalcetrapib-S-G は糞中からは検出されなかった。

Table 11 Relative abundance of dalcetrapib and its metabolites in excreta after oral administration of ¹⁴C-dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats and monkeys.

Metabolites	Percentage of sample radioactivity				
	Rat		BDC rat	Monkey	
	Urine (0-48h)	Feces (0-48h)	Bile (0-24h)	Urine (0-120h)	Feces (0-120h)
Dalcetrapib	0 (n.d.)	49.2 (41.1)	0 (n.d.)	0 (n.d.)	18.6 (11.6)
Dalcetrapib-SH+dimer*	0 (n.d.)	21.4 (17.8)	0 (n.d.)	5.8 (2.1)	35.5 (22.2)
Dalcetrapib-S-G	0 (n.d.)	0 (n.d.)	14.3 (1.9)	2.1 (0.8)	0 (n.d.)
Dalcetrapib-S-Me	0 (n.d.)	5.9 (4.9)	0 (n.d.)	0 (n.d.)	6.3 (3.9)
Others	100 (6.0)	23.5 (19.6)	85.7 (11.2)	92.1 (33.1)	39.6 (24.8)

Each value was obtained from pooled samples of three animals. The values in parentheses represent the cumulative excretion (%) of each compound. n.d.: not detected. * Dalcetrapib-SS-dalcetrapib

第 5 節 考察

ラット及びサルにおける dalcetrapib の吸収、分布、代謝及び排泄について検討した。Dalcetrapib を

ラット及びサルに経口投与した際の BA はそれぞれ 26.9 及び 18.0%であった。ラットの BA は ^{14}C -dalcetrapib を投与した際の吸収率とほぼ等しい結果であった。一方、サルの吸収率 (59.3%) と比較して、その BA は低値を示した。この結果はサルにおいて初回通過効果の可能性を示唆した。Kuhlmann 及び Heinig は、dalcetrapib をサルに経口投与した際、末梢血中の dalcetrapib 活性体濃度は門脈血中濃度に比べて極めて低値であることを報告していることから、dalcetrapib が初回通過効果の影響を受けたと推測しており、本結果とも一致した²⁵。

^{14}C -dalcetrapib をラットに経口投与後 2 時間の組織内濃度においては、肝臓及び副腎のみで血漿よりも高い放射能を示したことから組織全般への移行性は高くないと推測された。またサルの各組織への放射能の分布の傾向はラットと一致しており、dalcetrapib の分布組織に顕著な種差は無いと推測された。サルについては投与後 168 時間の一時点のみでの評価であることから、投与後短時間での組織分布の傾向についても確認する必要がある。

本研究において、ラット及びサルのいずれも投与放射能の大部分が糞中に排泄された。 ^{14}C -Dalcetrapib を経口投与した健康成人男性では、投与放射能は尿及び糞中にそれぞれ 31 及び 61%が排泄されたことから²⁶、ラット、サル及びヒトの主消失経路に顕著な種差は無いことが示唆された。なおラットにおいては、糞中放射能の 49.2 及び 21.4%が、またサルにおいては 18.6 及び 35.5%が dalcetrapib 及びその活性体であった。胆管ろうラットの胆汁中に dalcetrapib 及びその活性体は認められなかったことから、経口投与時に認められた糞中の dalcetrapib 及びその活性体は未吸収画分と推測された。

^{14}C -Dalcetrapib を投与したラット及びサルの尿及び血漿試料のラジオクロマトグラムにおいて、dalcetrapib-S-G 及び dalcetrapib-S-Me に加えて、早い保持時間に未知ピークが多数検出された (data not shown)。LC-MS/MS を用いた構造推定の結果、酸化された dalcetrapib-S-Me のグルクロン酸抱合体や、dalcetrapib-S-G が ethylbutylcyclohexyl 基で水酸化された微量な代謝物が多数検出された (Figure 7)。Kuhlmann 及び Heinig は、dalcetrapib を投与したサルにおいて初回通過効果により dalcetrapib 活性体から dalcetrapib-S-G 及び dalcetrapib-S-Me が生成することを示しており²⁵、dalcetrapib-S-G 及び dalcetrapib-S-Me の酸化はグルクロン酸抱合又はメチル抱合の後に起きると推測された。なお Husser らは、 ^{14}C -dalcetrapib を投与したヒトの血漿試料を用いて加速器質量分析を行い、サルで認められた代謝物を含む類似の微量な代謝物を多数検出した²⁷。このことから生成する代謝物に関しても種差はないと推測された。

^{14}C -Dalcetrapib を経口投与した胆管ろうラットにおいて、投与後 24 時間までに得られた放射性胆

汁を別の胆管ろうラットに十二指腸内投与した結果、胆汁へ排泄された放射能の 44.8%が再吸収を受けると考えられた。¹⁴C-Dalcetrapib を投与したサルでの投与後 168 時間での胆嚢内胆汁中放射能濃度は高く、血漿の 44.2 倍であった。これらのことから dalcetrapib 関連代謝物は生体中で腸肝循環を受けると推測された。

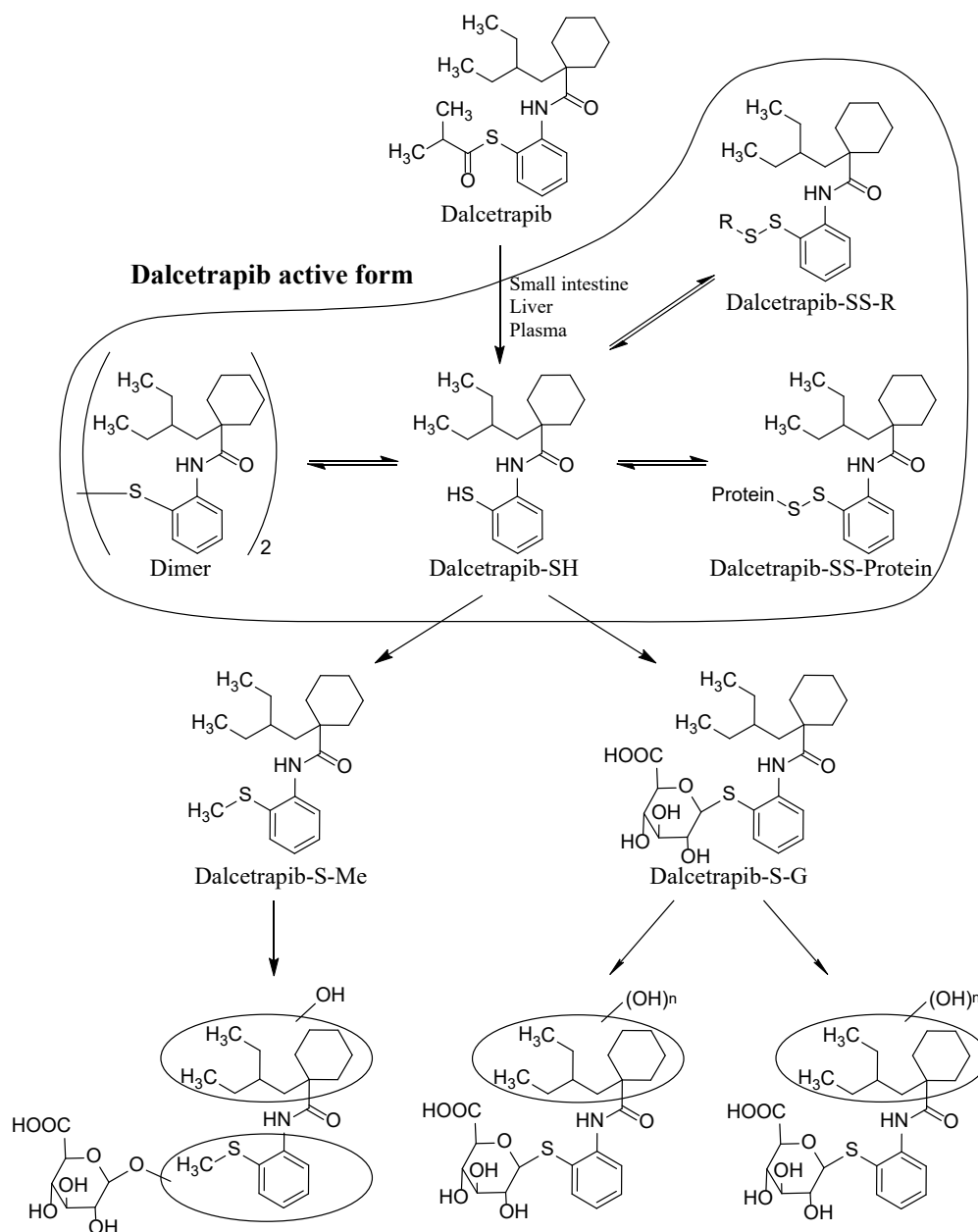


Figure 7 Proposed biotransformation pathway of dalcetrapib in rats and monkeys. R: thiol-containing low molecular weight component

第 6 節 小括

^{14}C -Dalcetrapib 又は dalcetrapib をラット及びサルに単回静脈内及び経口投与し、dalcetrapib の薬物動態を検討した。ラット及びサルにおける dalcetrapib の経口吸収性は中程度であり、ラットにおいて吸収後、速やかに全身に分布した。特に肝臓、副腎、脂肪などで高い放射能が検出された。サルでは腸間膜リンパ節（ラットは採取せず）が最も高く、その他の組織に顕著な種差は認められなかった。第 1 章の結果から dalcetrapib は投与後速やかに加水分解され、還元型チオール dalcetrapib-SH に変換された後、生体中で主にチオール基を有する内因性のタンパク質などと SS 結合を形成し、dalcetrapib 活性体として存在していると考えられた。Dalcetrapib 活性体はチオール基でグルクロン酸抱合又はメチル抱合を受けた後、更に水酸化又は水酸化後にグルクロン酸抱合を受けて極性の高い成分に代謝された。またその一部が尿及び胆汁中へ排泄され、腸肝循環を受けながら主に糞中から排泄されることが考えられた。Dalcetrapib 活性体は生体内で低分子量の内因性チオールやタンパク質などのチオール基と SS 結合を形成するが、結合は可逆的であり、代謝を受けた後、投与した放射能の大部分は速やかに体外に排泄されることが明らかとなった。

第3章 Dalcetrapib を反復投与したラットにおける薬物動態と蓄積性

これまでに captopril や N-acetylcysteine などのチオール化合物が医薬品として承認されてきた。これらのチオール化合物は血漿タンパクと共有結合するものの、その SS 結合は可逆的であることが示されている⁶⁻⁸。しかし、これらの化合物の生体内での蓄積性については十分に検討されていない。Farid らは prasugrel を投与したヒトの血漿を用いて、活性代謝物である R-138727 の血漿タンパクとの SS 結合が可逆的であることを DTT 処理により示した²⁸。一方、Algaier らはチオール基を有する prasugrel の活性代謝物が SS 結合を介して標的タンパクと不可逆的に共有結合することを *in vitro* 試験で示した¹⁰。Clopidogrel はチオール基を有する活性代謝物が血小板凝集作用を示すため、チオール化合物の共存下では作用の減弱が予想された。しかし Campbell らは *in vitro* 及び *in vivo* 試験のいずれにおいてもチオール化合物である tiopronin が clopidogrel の作用を減弱しないことを報告した⁹。このことから clopidogrel の活性代謝物も標的タンパクに不可逆的に共有結合していると推測された。

第1章では dalcetrapib 活性体の可逆性を、第2章ではラット及びサルに投与した ¹⁴C-dalcetrapib のほとんどが尿及び糞中に回収されることを示した。しかしチオール基を有する ¹⁴C 標識化合物を反復投与することで生体内への蓄積性を考察した報告は少ない。共有結合性を示すチオール化合物は反復投与により蓄積性を示す可能性も考えられる。そこで本章ではチオール基を有する dalcetrapib 活性体を生体内で速やかに生成する ¹⁴C-dalcetrapib をラット (Sprague-Dawley 系、雄性) に1日1回7日間反復経口投与し、dalcetrapib の吸収、分布及び排泄を確認することで、反復投与による薬物動態への影響や体内への蓄積性について検討した。

第1節 吸収

¹⁴C-Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量でラットに1日1回7日間反復経口投与し、放射能の血漿中濃度を測定した。初回、4 及び 7 回目投与における血漿中放射能は、いずれも投与後 0.5 から 12 時間でほぼ一定の値を示し (3.88~5.76 µg eq./mL)、その後低下した (Figure 8 及び Table 12)。また、いずれの投与日においても t_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-24} に違いは認められなかった。蓄積性の指標として算出した各投与後 24 時間での血漿中放射能濃度の初回投与後 24 時間に対する割合 (蓄積率、 R_{ac}) は反復投与により上昇したが、3 回目投与で定常状態となり、3~7 回目において初回投与時の 1.5~2.1 倍でほぼ一定となった。

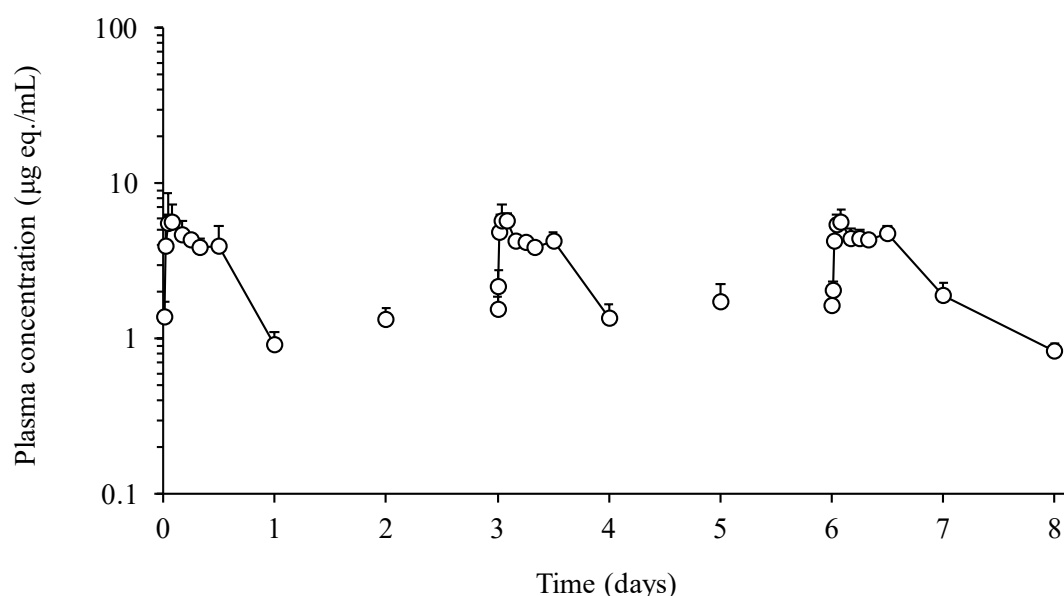


Figure 8 Plasma concentration-time curve of radioactivity after multiple oral administration of ^{14}C -dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats.

Table 12 Pharmacokinetic parameters of radioactivity after multiple oral administration of ^{14}C -dalcetrapib to rats.

Number of dosing	t_{\max} (h)	C_{\max} ($\mu\text{g eq./mL}$)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-24} ($\mu\text{g eq.}\cdot\text{h/mL}$)	R_{ac}
1 st	0.5~12	3.88~5.61	n.a.	81.38 \pm 15.58	1.0
2 nd	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.5
3 rd	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.7
4 th	0.5~12	3.88~5.75	n.a.	85.76 \pm 1.58	1.5
5 th	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.9
6 th	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.8
7 th	0.5~12	4.29~5.60	15.1 \pm 1.9	95.29 \pm 9.11	2.1

Each value is the mean \pm SD of three animals. n.a.: not applicable. R_{ac} was calculated as plasma concentration at 24 h after each dose / plasma concentration at 24 h after 1st dose.

第2節 分布

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回 7 日間ラットに反復経口投与し、放射能の組織内濃度を確認した。初回投与後 24 時間において、大部分の組織で放射能が検出された (Table 13)。組織中放射能は 4 回目投与後には定常状態に達し、7 回目投与後 24 時間での組織内放射能濃度の初回投与に対する割合 (R_{ac}) はいずれの組織も 4 倍未満であった。すべての組織のうち、副腎、脾臓及び血液中放射能濃度は 7 回目投与においてもわずかに上昇傾向を示し、4 日目と比べて約 1.5 倍増加した。

最終投与後 24 時間における放射能の組織内濃度は腸間膜リンパ節で最も高く、次いで、肝臓、副腎、脂肪の順であった。これらの濃度は血漿中濃度よりも 6 倍以上高かった。大脳や小脳における放射能濃度は他の組織と比較して低かった。なお、いずれの組織においても 7 回投与後 24 時間の R_{ac} は、単回投与時の各組織中放射能濃度（第 2 章、第 2 節）に基づき算出した消失速度定数 (λ) から見積もられた蓄積率 (predicted R_{ac}) と同等以下であった。

Table 13 Tissue concentrations of radioactivity after oral administration of ^{14}C -dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats.

Tissue	Radioactivity concentration ($\mu\text{g eq./g or mL}$)						Predicted R_{ac}
	24 h after 1 st dose	24 h after 4 th dose	R_{ac}	24 h after 7 th dose	R_{ac}	168 h after 7 th dose	
Plasma	0.86±0.15	1.28±0.09	1.5	1.58±0.10	1.8	0.14±0.03	2.6
Blood	0.96±0.15	2.23±0.30	2.3	3.08±0.10	3.2	1.95±0.32	4.9
Cerebrum	0.05±0.01	0.10±0.02	2.0	0.10±0.01	2.0	0.04±0.01	n.c.
Cerebellum	0.04±0.03	0.12±0.01	3.0	0.11±0.02	2.8	0.03±0.03	n.c.
Bone marrow	n.d.	1.50±0.44	n.c.	2.09±0.90	n.c.	1.01±0.22	n.c.
Pituitary gland	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.c.	n.d.	n.c.
Eyeball	0.12±0.03	0.20±0.01	1.7	0.23±0.02	1.9	0.08±0.02	n.c.
Harderian gland	1.29±0.35	2.14±0.12	1.7	1.90±0.25	1.5	0.23±0.02	2.4
Submaxillary gland	0.27±0.05	0.59±0.07	2.2	0.64±0.02	2.4	0.22±0.02	4.1
Thyroid	1.17±1.01	3.06±1.03	2.6	4.00±0.52	3.4	1.24±0.10	n.c.
Trachea	N.D.	0.70±0.15	n.c.	0.60±0.06	n.c.	0.28±0.02	n.c.
Thymus	0.19±0.05	0.49±0.10	2.6	0.45±0.03	2.4	0.16±0.02	n.c.
Heart	0.40±0.09	0.85±0.11	2.1	0.88±0.01	2.2	0.33±0.01	3.6
Lung	0.45±0.08	0.97±0.17	2.2	1.16±0.03	2.6	0.49±0.01	4.0
Liver	15.4±1.47	38.3±8.68	2.5	45.2±5.52	2.9	13.4±1.55	3.3
Spleen	1.44±0.60	3.53±0.30	2.5	5.68±0.82	3.9	3.34±0.31	6.5
Pancreas	1.38±1.12	9.93±11.3	7.2	2.04±0.97	1.5	0.57±0.45	2.7
Adrenal gland	3.30±0.74	6.63±0.31	2.0	11.6±1.28	3.5	5.31±0.48	10.9
Kidney	1.09±0.17	2.53±0.16	2.3	2.76±0.10	2.5	1.20±0.05	3.8
Testis	0.22±0.04	0.45±0.05	2.0	0.51±0.01	2.3	0.21±0.02	4.1
Epididymis	0.52±0.40	0.76±0.12	1.5	0.86±0.21	1.7	0.20±0.03	3.5
Seminal vesicle	0.47±0.44	0.43±0.02	0.9	0.49±0.03	1.0	0.11±0.01	3.0
Prostate	0.33±0.09	0.57±0.05	1.7	0.59±0.10	1.8	0.14±0.03	n.c.
Mesenteric lymph node	154±128	208±146	1.4	416±343	2.7	124±88.1	n.a.
Skeletal muscle	0.18±0.05	0.45±0.11	2.5	0.44±0.02	2.4	0.12±0.01	n.c.
Fat	5.37±2.73	12.3±1.41	2.3	11.0±1.85	2.0	3.45±0.32	5.6
Brown fat	4.81±2.55	8.34±0.73	1.7	4.13±0.43	0.9	1.36±0.33	4.7
Skin	1.45±0.77	1.77±0.27	1.2	1.28±0.21	0.9	0.28±0.04	2.7

Each value is the mean \pm SD of three animals. n.d.: not detected. n.a.: not applicable. n.c.: not calculated. R_{ac} was calculated as tissue concentration at 24 h after 4th or 7th dose / tissue concentration at 24 h after 1st dose. Predicted R_{ac} was calculated from the λ of each tissue in single dose study (Takubo et al., 2014)

第 3 節 排泄

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量でラットに 1 日 1 回 7 日間反復経口投与し、放射能の排泄を確

認した。その結果、放射能は主に糞中に排泄された (Figure 9)。最終投与後 168 時間で総投与量の 7.3% が尿に、87.3%が糞に、合わせて 94.6%が排泄された。

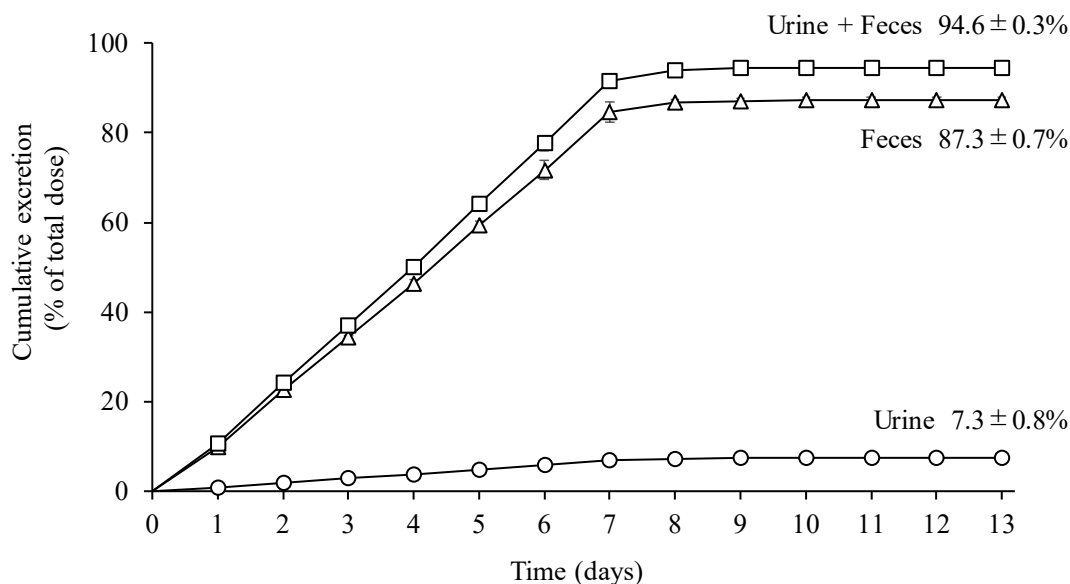


Figure 9 Cumulative excretion of radioactivity in urine and feces after multiple oral administration of ^{14}C -dalcetrapib at a dose of 100 mg/kg to rats. Mean \pm SD of three animals.

第4節 考察

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回 7 日間反復経口投与したラットにおける dalcetrapib の吸収、分布、排泄及び蓄積性を評価した。初回投与後 24 時間での放射能の血漿及び組織内濃度、最終投与後の放射能の消失半減期及び総排泄率のいずれも第2章で実施した単回投与時の結果とほぼ一致した。

3 回目及び 7 回目投与後 24 時間における放射能の血漿中濃度がほぼ一致していたことから血漿中の dalcetrapib 活性体は投与 3 回目には定常状態に達していると考えられた。Derks らは dalcetrapib を 1 日 1 回反復経口投与した臨床試験において、投与 3 回目には血漿中 dalcetrapib 活性体が定常状態に達し、蓄積性は認められなかったことを報告している²⁹。これらのことから dalcetrapib は種差無く反復投与後速やかに定常状態に達すると考えられた。

^{14}C -Dalcetrapib の投与により、放射能はほぼすべての組織に分布した。反復投与によりほとんどの組織の放射能濃度は 2~3 倍に増加し、4 回目投与時には定常状態に到達した。最も高い放射能濃度を

示した組織は腸間膜リンパ節であり、次いで肝臓、脂肪、副腎が他の組織と比較して高かった。腸間膜リンパ節はサルにおいても他の組織と比べて高い放射能濃度を示した（第 2 章）。脂溶性の高い mepitiostane や halofantrine はそれぞれラット及びイヌでリンパ吸収を受けることが知られている^{30,31}。また、Charman 及び Stella は脂溶性の指標であるオクタノール-水分配係数 (log P) の値が 5 より大きく、かつトリグリセリドへの溶解度が 50 mg/mL よりも大きい化合物はリンパ吸収を受けやすいと考察している³²。Dalcetrapib は消化管で加水分解を受け dalcetrapib-SH を生成するが、内因性のチオール基を有する成分と SS 結合を形成するほか、dalcetrapib の二量体も形成する^{23,33}。Dalcetrapib 及び dalcetrapib-SH の log P はそれぞれ 7.92 及び 6.04 であるのに対し、二量体は 12.52 であり、その脂溶性は極めて高い。したがって腸間膜リンパ節の放射能濃度が高い理由の一つとして、dalcetrapib のリンパ吸収の影響が推測された。Dalcetrapib は脂肪でも高い放射能濃度を示したが、これらの脂溶性の高さが原因の一つとして考えられた。なお肝臓も高い放射能濃度を示した。Dalcetrapib 活性体はメチル抱合やグルクロン酸抱合を受け、更に酸化代謝も受けることから、肝臓は薬物の消失組織として高い放射能を示していると考えられた³³。

同じく CETP 阻害剤である anacetrapib は脂肪において蓄積性を示すことが知られている。Anacetrapib を wild-type lean マウスに反復経口投与すると、未変化体の血漿中濃度は初回投与時に比べて約 2 倍に増加するが、脂肪は約 20 倍に増加した³⁴。この脂肪での蓄積は anacetrapib の脂溶性の高さ (log P=9.30) によるものと考察されている。前述のとおり dalcetrapib-SH の二量体の脂溶性も極めて高い。しかし、チオール基を有するタンパク質などが豊富な生体内で二量体の存在量は少なく、そのため anacetrapib ほどの脂肪への蓄積を示さなかったと推測された。また同種同効薬である anacetrapib 投与時の脂肪での蓄積率と比べて dalcetrapib の蓄積率はいずれの組織においても顕著に低かった。加えて 7 回投与後 24 時間の蓄積率はいずれの組織においても単回投与から見積もられた蓄積率と同等以下であったことから、反復投与時の組織への蓄積率は単回投与の結果から見積もることが可能であり、組織への蓄積性は低いことが示された。

Wetterau らはラットにおいて CETP 活性が最も高いのは肝臓であり、次いで腎臓、心臓、脳及び血漿の順に低下することを報告している³⁵。また、CETP は肝臓、副腎、脂肪及び脾臓などで合成されとの報告がある³⁶。ラットを用いた当試験及び第 2 章で実施したサルの分布試験において、放射能の組織中濃度は血漿を除き CETP 活性と同様の順で高かった。また本章及び第 2 章において dalcetrapib を投与したラットの肝臓、副腎、脂肪及び脾臓からの放射能の消失が緩やかなことを示したが、これらの組織と CETP 活性又は発現量には相関があると推測された。Dalcetrapib の組織からの

消失速度と CETP の発現量の関係を更に裏付けるためには、ラットその他組織での発現量や CETP 活性に加え、CETP 活性の高い動物種であるサル³⁷で同様のデータを取得して考察する必要がある。

チオール基を有する化合物は生体内でチオール基を有する内因性のタンパク質などと SS 結合により共有結合すると考えられる。チオール基を有する化合物の組織分布に一定の傾向があるかどうかを把握するため、チオール基を有する **captopril** 及び **tiopronin**、代謝されて速やかにチオール基を有する活性代謝物を生成する **prasugrel** の組織分布に関する論文情報と **dalcetrapib** の組織分布の結果を比較した。Heald らは ¹⁴C-captopril を経口投与したラットにおいて、腎臓、血液、肝臓、肺、心臓、脾臓及び皮膚で高い放射能を示すことを報告した³⁸。また **captopril** の標的タンパクであるアンジオテンシン変換酵素の酵素活性が高い肺や精巣からの放射能の消失が緩やかであった³⁹。Chiba らは ³⁵S-tiopronin を経口投与したラットにおいて腎臓、脾臓、副腎及び肝臓で高い放射能を示すことを報告した⁴⁰。また肝疾患や白内障の治療薬である **tiopronin** は水銀排泄増加作用も有し、標的臓器である肝臓や眼球に加えて、水銀貯蔵量が有意に低下した腎臓、脾臓、脾臓及び脳で放射能の消失が緩やかであった⁴¹。¹⁴C-Prasugrel を経口投与したラットでは消失臓器である肝臓及び腎臓に加えて大動脈で血液より高い放射能を示すことが Hagihara らにより報告されている⁴²。また ¹⁴C-prasugrel をラットへ反復経口投与した際、作用部位である血液で最も高い蓄積率を示した⁴³。本章において ¹⁴C-dalcetrapib は腸間膜リンパ節で特に高い放射能濃度を示し、次いで肝臓及び副腎で血漿よりも高い放射能を示した。Dalcetrapib については、CETP のシステイン残基をセリン残基に変換した変異型 CETP を用いた検討結果²¹から、CETP のシステイン残基との SS 結合により CETP 活性を阻害すると推測されている。また消失臓器である肝臓や腎臓に加えて、副腎、脂肪及び脾臓などの CETP 合成組織や作用部位である血液で放射能の消失が緩やかであった。これらのチオール化合物で共通して高い放射能が検出されたか、放射能の緩やかな消失が認められた組織は消失臓器である肝臓又は腎臓のみであった。Captopril、dalcetrapib 活性体及び prasugrel 活性代謝物はチオール基でメチル抱合を受けることが知られている。肝臓及び腎臓に thiol methyltransferase が多く発現しており⁴⁴、チオール化合物がこれらの組織で放射能の高い分布を示す一因になっていると考えられた。これらの化合物は共通してチオール基を有するものの、分布する組織にその他の傾向は認められず、いずれも薬理作用を示す組織で緩やかな消失を示した。したがって、これらのチオール化合物は生体中で標的組織と強く結合することで、持続的な作用を示すと考えられた。

第5節 小括

^{14}C -Dalcetrapib を一日一回反復経口投与したラットにおける dalcetrapib 活性体の吸収、分布、排泄及び蓄積性を評価した。 ^{14}C -Dalcetrapib をラットに反復経口投与すると、放射能の血漿及び組織内濃度はいずれも投与後速やかに定常状態に到達した。投与終了後、すべての組織で放射能濃度は低下し、投与した放射能はほぼ全て尿及び糞中に回収された。Dalcetrapib 活性体はその大部分が生体内のタンパク質などと SS 結合により共有結合すると考えられるが、反復投与時の体内への蓄積性は低いことが明らかとなった。

放射性標識されたチオール化合物を用いて反復投与により組織への蓄積性を検討した報告は極めて少ない。本検討は反復投与されたチオール化合物がチオール基を有する内因性のタンパク質などと SS 結合により共有結合するが、体内への蓄積性が低いことを示す重要な検討結果であると考えられた。

第4章 チオール化合物の慢性腎疾患（CKD）患者における曝露量の予測性検証

共有結合性を示す化合物のうち、チオール基を有する化合物は生体内で同じくチオール基を有する内因性化合物やタンパク質などと SS 結合を形成する。一般的に SS 結合は可逆的だが、生体内で代謝されてチオール基を有する活性代謝物を生成する clopidogrel や prasugrel は標的タンパクと不可逆的に共有結合しているとの報告もある。共有結合性を示す一部の化合物は標的以外のタンパク質とも共有結合し、ハプテンとして働くことで免疫反応を惹起し毒性を発現するとの報告や、特異体質性の毒性発現に関与するとの報告もあり、製薬企業は共有結合性医薬品の開発を避けてきた^{4,5}。また共有結合性を示す化合物は生体内に豊富に存在する血漿や組織のタンパク質などと共有結合するため、体内からの消失が遅い可能性や PK の低い予測性が懸念され、製薬企業が共有結合性医薬品の開発を避ける原因の一つになっている可能性がある。共有結合性医薬品についても非共有結合性医薬品と同様にヒトの PK を予測できれば臨床試験を効率的に計画できるため、共有結合性を示す医薬品開発のハードルを下げられると思われた。共有結合性医薬品に関するヒトの PK 予測については、少数ながら報告例はあるものの^{11,12}、高齢者や疾患時における予測についての報告はない。

CKD を伴う患者数は世界的に増加傾向にある。腎臓は様々な生理的な機能を持ち、その一つとして医薬品の生体内からの消失にも関与する重要な臓器である。その病態下では様々な生理的変化が起こるため、FDA ドラフトガイダンスでは腎臓だけでなく肝臓から消失する化合物についても臨床試験で CKD 患者の PK を評価することを推奨している²⁰。近年、PBPK モデルを用いて CKD 患者における薬物の血漿中濃度推移を予測する論文が多数報告されている。加えて Sayama らは 151 化合物について CKD 患者と HV の薬物動態を比較し、タンパク結合率、肝代謝クリアランス、腎排泄クリアランスの SF を算出した¹⁹。また、得られた SF を PBPK モデルに組み込むことで、HV の血漿中濃度推移から CKD 患者の曝露量を予測することに成功した。しかし SF のバリデーションデータセットには静脈内投与時の血漿中濃度データが用いられ、またチオール化合物も含まれていなかった。

そこで本章ではチオール化合物の HV における血漿中濃度推移を基に top-down アプローチで PBPK モデルを構築した。更に Sayama らが報告した SF を用いて遊離型肝固有クリアランス (CL_{UintH})、腎クリアランス (CL_R) 及び血漿中非結合型分率 (f_p) を CKD 患者のパラメータ値に変換して PBPK モデルに組み込むことにより、CKD 患者におけるチオール化合物の曝露量の予測を試みた。また得られた値を実測値と比較することでその予測性を検証した。チオール化合物としては主に代謝及び尿中排泄で消失する captopril 及び tiopronin、生体中でチオール基を有する活性体を生成し、代謝により消

失する dalcetrapib 及び prasugrel を用いた (Figure 10 及び Table 14)。

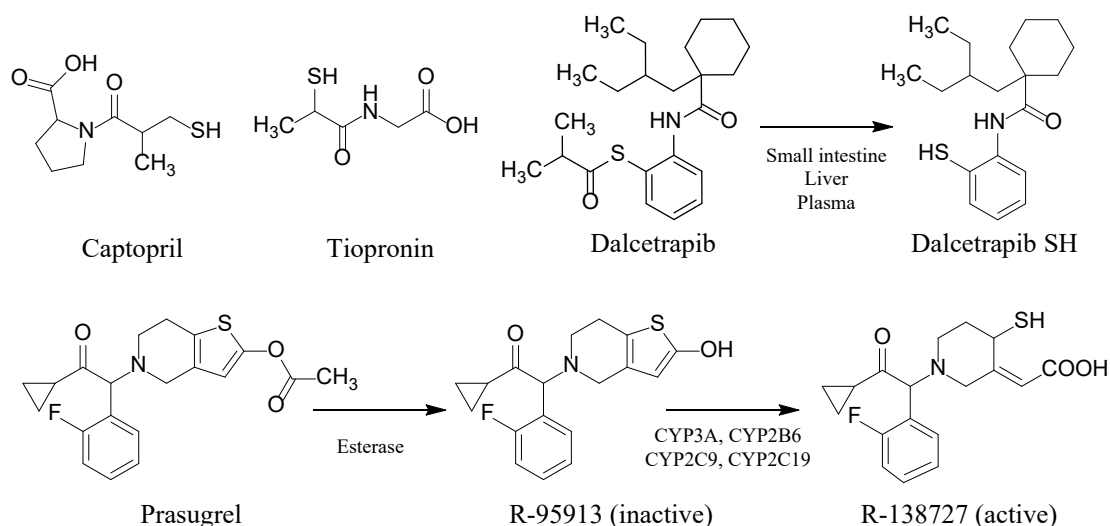


Figure 10 Structure of each compound.

Table 14 Main elimination route of each compound

Compound	Metabolism	Urinary excretion
Captopril	S-Methylation (minor route)	Approx. 40% is excreted in the urine
Tiopronin	Oxidation and hydrolysis	Approx. 35-50% is excreted in the urine
Dalcetrapib	Active form, which is rapidly formed by hydrolysis of dalcetrapib, is metabolized by S-methylation and/or S-glucuronidation.	0% (Active form)
Prasugrel	R-95913, which is formed by hydrolysis of prasugrel, is metabolized by oxidation to R-138727 (active metabolite). R-138727 is metabolized by S-methylation and conjugation with cysteine.	0% (R-138727)

第 1 節 チオール化合物の健康成人における PBPK モデルの構築

当研究においては、Sayama らが報告した PBPK モデル⁴⁵に消化管コンパートメントを消化管吸収率 (F_a)、吸収速度定数 (k_a) 及び Lag time (t_{lag}) でつなぎ、経口投与時の血漿中濃度推移を表現可能な PBPK モデルとした (Figure 11)。各コンパートメントは血流律速を仮定し、また肝臓と腎臓を消失臓器とした。チオール化合物は生体内において内因性のタンパク質などと SS 結合すると考えられるが、その可逆性を考慮し、本モデルの組織コンパートメントに結合メカニズムを含めなかった。また、dalcetrapib 及び prasugrel を経口投与したヒトの血漿中に未変化体は検出されない。そのため、これらの化合物は生体内で極めて速やかにチオール化合物である dalcetrapib 活性体及び活性代謝物である R-138727 に代謝されると仮定して、これらの生成過程を PBPK モデルに含めなかった。

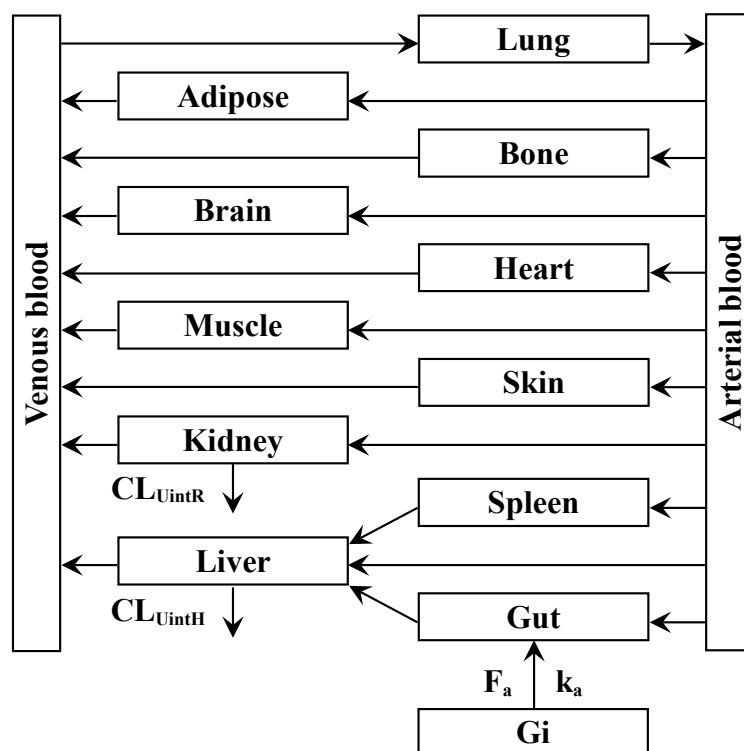


Figure 11 Structure of the PBPK model consisting of 14 compartments including the simplified gastrointestinal compartment.

PBPK モデルを構築する際には $f_{p,HV}$ 、 $CL_{U_{intH},HV}$ 及び $CL_{R,HV}$ を用い、化合物ごとに HV の PBPK モデルを構築し、血漿中濃度推移をシミュレーションした。各組織の組織－血漿中濃度比 (K_p) は Rodgers らの Tissue Composition (TC) モデル式^{46,47}を用いて算出し、予測及び実測の V_{ss} の比較から得られた SF をすべての組織に乗ずることにより最適化した⁴⁵。更に Phoenix WinNonlin を用いて HV における各化合物の血漿中濃度を PBPK モデルに当てはめることで k_a 、 t_{lag} 及び SF_{Kp} を算出し、最終モデルとした。

Captopril を 10 mg の用量で経口投与した HV の血漿中濃度推移⁴⁸を基に PBPK モデルを構築した結果、得られた予測曲線は概ね実測値と一致した (Figure 12)。投与後 6 及び 8 時間の血漿中濃度は実測値を過小評価したものの、その血漿中濃度は C_{max} の 2.5% と低く、captopril の血漿中濃度推移を予測する上で影響は小さいと判断した。

Tiopronin を 500 mg の用量で経口投与した HV の血漿中濃度推移⁴⁹を基に PBPK モデルを構築した。得られた予測曲線は実測値を概ね再現したものの二相性の推移を示さず、実測値よりもやや速や

かに消失した。

Dalcetrapib を 600 mg の用量で経口投与した HV における dalcetrapib 活性体の血漿中濃度推移⁵⁰を基に PBPK モデルを構築した結果、得られた予測曲線は実測値をよく再現した。

Prasugrel を 60 mg の用量で経口投与した HV における R-138727 の血漿中濃度推移⁵¹を基に PBPK モデルを構築した結果、得られた予測曲線は実測値をよく再現した。

各化合物の実測及び予測した血漿中濃度推移から算出した PK パラメータはほぼ等しい値を示した (Table 15)。Tiopronin と prasugrel で算出された V_{ss} は実測値と予測値で乖離が認められたほか、いずれの化合物も消失相の半減期を過小評価する傾向にあったが、その程度は大きくはなく、各化合物の PBPK モデルを構築できたと判断した。

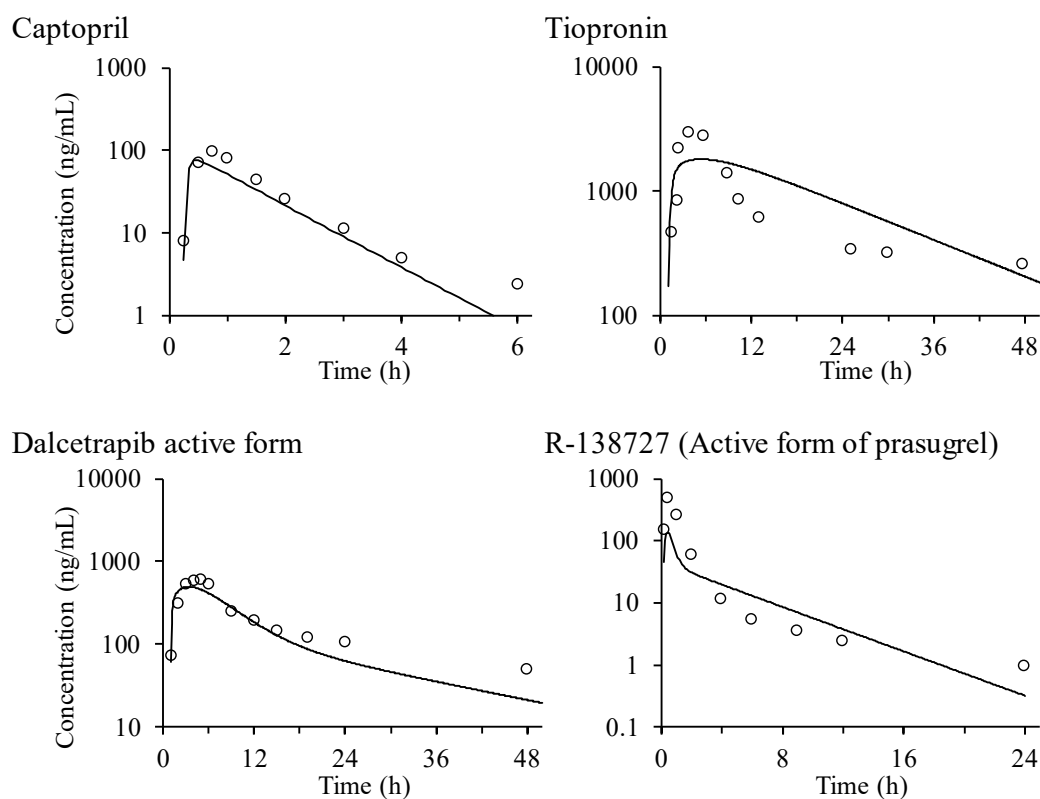


Figure 12 Observed and simulated plasma concentration-time profile of each compound after single oral administration in HV. Captopril, 10 mg; tiopronin, 500 mg; dalcetrapib, 600 mg; prasugrel, 60 mg

Table 15 Pharmacokinetic parameters of each compound in HV

Parameters		Captopril		Tiopronin		Dalcetrapib active form		R-138727	
		Observed	Predicted	Observed	Predicted	Observed	Predicted	Observed	Predicted
Dose	(mg)	10 ⁵²	10 ⁵²	500 ⁴⁹	500 ⁴⁹	492.1 ⁵⁰	492.1 ⁵⁰	56.1 ⁵¹	56.1 ⁵¹
F		0.65 ⁴²	0.58	1 ^a	0.94	0.29 ³³	0.28	0.28 ⁵⁶	0.24
f _{e,IV}		0.38 ^b	0.38	0.51 ^b	0.46	0 ⁵⁰	0	0 ^b	0
CL _{tot,p}	(mL/min/kg)	11	13	2.4	2.5	3.6	3.8	6.2	6.9
CL _{H,b}	(mL/min/kg)	9.6	11	1.9	2.0	5.7	6.1	10	12
CL _{R,b}	(mL/min/kg)	5.9	7.1	2	2.1	0	0	0	0
V _{SS}	(L/kg)	1.2	1.1	9.3	3.1	5.8	5.0	0.89	1.7
t _{1/2}	(h)	1.7	0.8	53	12	23	16	7.5	3.4
SF _{Kp} ^c		n.a.	2.5	n.a.	20	n.a.	0.0035	n.a.	19
k _a ^c	(1/min)	n.a.	0.039	n.a.	0.0044	n.a.	0.0046	n.a.	0.066
t _{lag} ^c	(min)	n.a.	14	n.a.	57	n.a.	56	n.a.	5.2

Each value was calculated from the observed or simulated plasma concentration.

^a Assumed, ^b PMDA web site, ^c fitted, n.a.: not applicable.

第2節 チオール化合物のCKD患者における曝露量の予測

構築した PBPK モデルを用いて captopril を 50 mg の用量で経口投与した HV の血漿中濃度推移を予測した。予測された血漿中濃度推移は実測値⁵²をよく再現した (Figure 13)。次に、PBPK モデルを構築した際に算出した CL_{U_{int}HV}、CL_{R,HV}及び f_{p,HV}を Sayama らが報告した SF¹⁹で補正し、HV の PBPK モデルに導入することで severe CKD 患者における captopril の血漿中濃度推移を予測した。予測した CKD 患者における C_{max}及び AUC の HV に対する比 (それぞれ C_{max} ratio 及び AUC ratio) は実測値をわずかに過大評価したが (Table 16)、予測された CKD 患者の C_{max}及び AUC はいずれも実測値の 2 倍誤差範囲内であり、CKD 患者における曝露量の変化の傾向をよく予測できていると考えられた (Figure 15)。また CKD 患者における t_{1/2} の HV に対する比 (t_{1/2} ratio) もよく予測できていた (Table 16)。

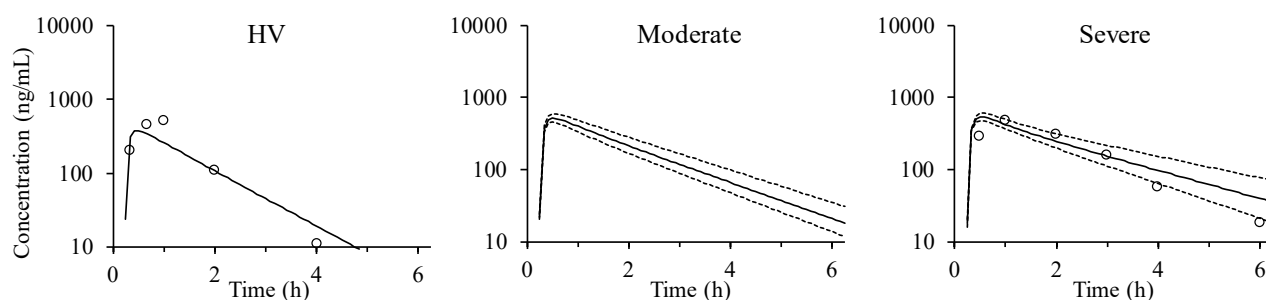


Figure 13 Observed and simulated plasma concentration-time profile of captopril after single oral administration in HV and CKD patients by the PBPK model combined with SFs. The solid lines represent averaged predicted curves. The dotted lines represent the predicted ranges of plasma concentrations. Captopril, 50 mg

Tiopronin についても captopril と同様の手法により $CL_{U_{intH,HV}}$ 、 $CL_{R,HV}$ 及び $f_{p,HV}$ を SF で補正し、PBPK モデルを用いて moderate CKD 患者の血漿中濃度推移を予測した (Figure 14)。GFR が 48~63 ml/min/1.73 m² の Group 1⁴⁹ において、予測した C_{max} ratio は実測値を 25%程度過小評価したが、AUC ratio はよく予測できていた。一方、GFR が 34~28 ml/min/1.73 m² の Group 2 では、 C_{max} ratio 及び AUC ratio のいずれも大きく過小評価した (Table 16)。なお予測した CKD 患者における $t_{1/2}$ ratio は実測値をわずかに過大評価した。

Dalcetrapib についても同様に moderate 及び severe CKD 患者における dalcetrapib 活性体の血漿中濃度推移を予測した (Figure 14)。いずれにおいても AUC ratio はよく予測できていた (Table 16)。 C_{max} ratio は実測値の比よりも約 20%過小評価したが、予測した C_{max} 及び AUC はいずれも実測値の 2 倍誤差範囲内であり、CKD 患者における曝露量の変化の傾向をよく予測できていると考えられた (Figure 15)。また予測した CKD 患者における $t_{1/2}$ ratio は実測値をわずかに過大評価した (Table 16)。

Prasugrel も同様に moderate CKD 患者における R-138727 の血漿中濃度推移を予測した (Figure 14)。予測した C_{max} ratio 及び AUC ratio は実測値をわずかに過大評価した (それぞれ 1.1 及び 1.2 倍)。予測した AUC は実測値の 2 倍誤差範囲内であったが、 C_{max} は 2 倍誤差範囲をわずかに外れた (Figure 15)。また CKD 患者における $t_{1/2}$ ratio はよく予測できていた (Table 16)。

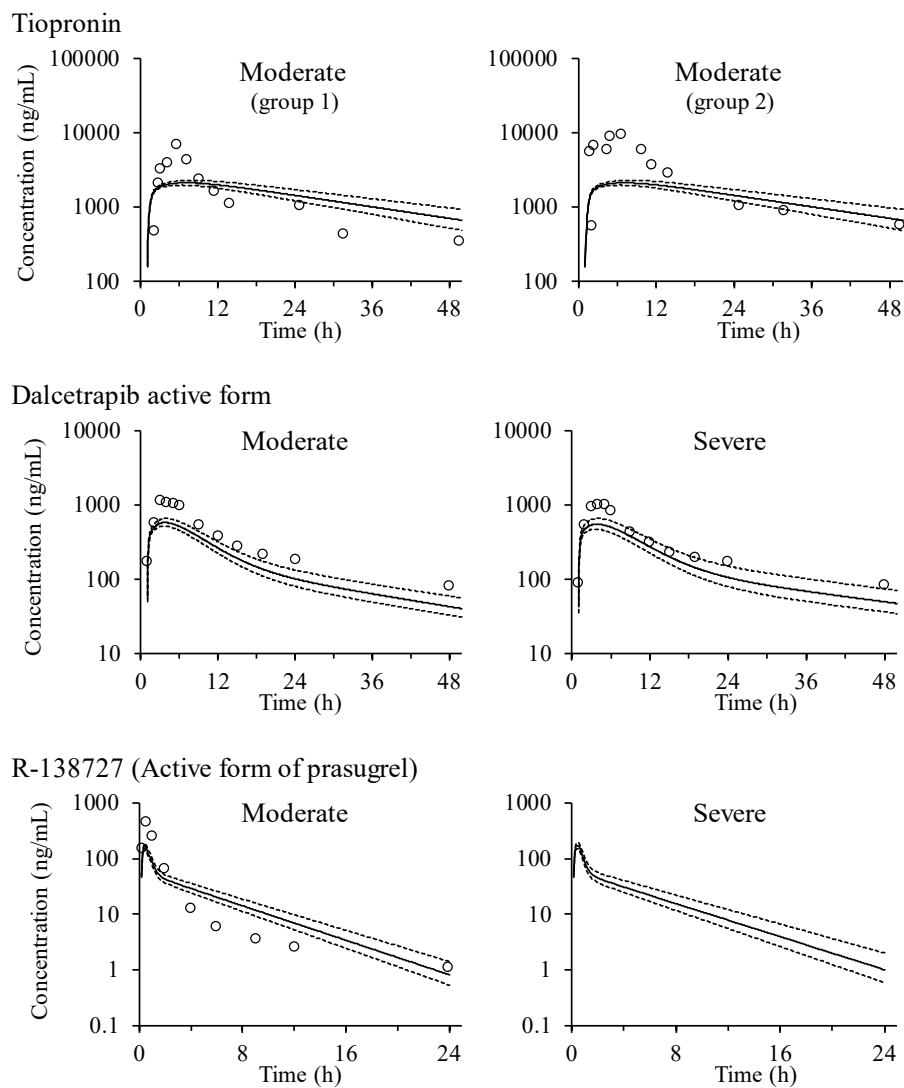


Figure 14 Observed and simulated plasma concentration-time profile of each compound after single oral administration in CKD patients by the PBPK model combined with SFs. The solid lines represent averaged predicted curves. The dotted lines represent the predicted ranges of plasma concentrations. Tiopronin, 500 mg; dalcetrapib, 600 mg; prasugrel, 60 mg

Table 16 Observed and predicted changes of C_{\max} and AUC of each compound in CKD

Compound	PK Parameter	Ratio to HV							
		Moderate CKD				Severe CKD			
		Observed	Predicted			Observed	Predicted		
			Min	-	Max		Min	-	Max
Captopril	C_{\max}	n.a.	1.2	-	1.6	1.1	1.3	-	1.6
	AUC	n.a.	1.5	-	2.4	1.7	1.8	-	3.2
	$t_{1/2}$	n.a.	1.4	-	1.7	2.1	1.5	-	2.5
Tiopronin Group 1	C_{\max}	1.7	1.1	-	1.3	n.a.	1.1	-	1.3
	AUC	1.6	1.6	-	2.6	n.a.	2.0	-	3.7
	$t_{1/2}$	1.3	1.6	-	2.4	n.a.	2.2	-	3.5
Tiopronin Group 2	C_{\max}	2.7	1.1	-	1.3	n.a.	1.1	-	1.3
	AUC	3.3	1.6	-	2.6	n.a.	2.0	-	3.7
	$t_{1/2}$	1.5	1.6	-	2.4	n.a.	2.2	-	3.5
Dalcetrapib active form	C_{\max}	1.6	1.0	-	1.3	1.6	1.0	-	1.3
	AUC	1.8	1.2	-	1.8	1.7	1.3	-	2.1
	$t_{1/2}$	1.1	1.3	-	1.4	1.2	1.6	-	1.6
R-138727	C_{\max}^a	0.9	1.1	-	1.4	n.a.	1.1	-	1.5
	AUC ^a	0.9	1.2	-	1.8	n.a.	1.3	-	2.1
	$t_{1/2}^a$	1.2	1.1	-	1.3	n.a.	1.1	-	1.4

^a active metabolite of prasugrel; n.a.: not applicable.

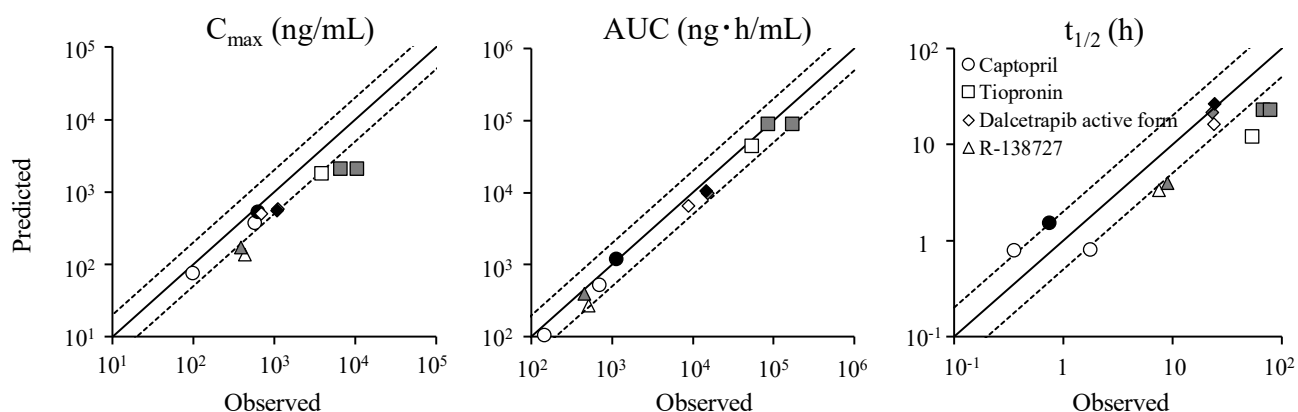


Figure 15 Relationship between observed and simulated pharmacokinetic parameters in HV and patients with moderate or severe CKD. Solid and dotted lines indicate unity and two-fold error between predicted and observed values, respectively. White, gray and black symbols indicate HV, moderate CKD and severe CKD, respectively.

第3節 モデル検証及び感度分析

構築した PBPK モデルを検証するために、CKD 患者に投与した際の用量とは異なる用量、すなわち captopril、tiopronin、dalcetrapib 及び prasugrel をそれぞれ 50、750、900 及び 15 mg で投与した HV

における血漿中濃度を予測し、実測値の PK パラメータと比較した^{28,52-54}。その結果、tiopronin の消失半減期を大きく過小評価したものの、4 化合物のいずれの PK パラメータもほぼ実測値と一致しており (Table 17)、CKD 患者における化合物の曝露量の変化を評価するうえで妥当な PBPK モデルが構築されていると判断した。

Table 17 Pharmacokinetic parameters of each compound in HV in model qualification study

Compound	Dose (mg)	Parameter	Observed	Predicted	Predicted / Observed
Captopril ⁵²	50	C _{max} (ng/mL)	556	380	0.68
		AUC (ng·h/mL)	684	532	0.78
		t _{1/2} (h)	0.35	0.81	2.32
Tiopronin ⁵³	750	C _{max} (ng/mL)	7001	2712	0.39
		AUC (ng·h/mL)	78005	68164	0.87
		t _{1/2} (h)	53.0	12.3	0.23
Dalcetrapib ⁵⁴ active form	900	C _{max} (ng/mL)	955	745	0.78
		AUC (ng·h/mL)	10217	9892	0.97
		t _{1/2} (h)	13.0	16.3	1.26
R-138727 ²⁸	15	C _{max} ^a (ng/mL)	80	34	0.42
		AUC ^a (ng·h/mL)	122	68	0.55
		t _{1/2} ^a (h)	3.7	3.4	0.91

^a Active metabolite of prasugrel.

次に、生理学的パラメータの変化が化合物の曝露量に与える影響を確認するために、感度分析を行った。体内で化合物の消失に関わる臓器である肝臓及び腎臓、体内に占める割合が大きい筋肉及び脂肪に加え、皮膚及び脳の組織血流量及び容量を変動パラメータに選択した。併せて、CKD 病態時に変動させるパラメータである CL_{U_{intH}}及び CL_Rを選択し、これらを±30%変動させた際の AUC への影響を確認した。その結果、いずれの化合物においても最も影響の大きいパラメータは CL_{U_{intH}}であり、AUC は最大で 43%変化した (Figure 16)。次に影響の大きいパラメータは CL_Rであり、尿中排泄を受ける captopril 及び tiopronin の AUC はそれぞれ最大で約 9%及び 16%変化した。生理学的パラメータについては、体内重量の 50%を占める筋肉も含めて AUC への影響はほとんどなく⁵⁵、いずれの化合物においても 6%未満の変化であった。

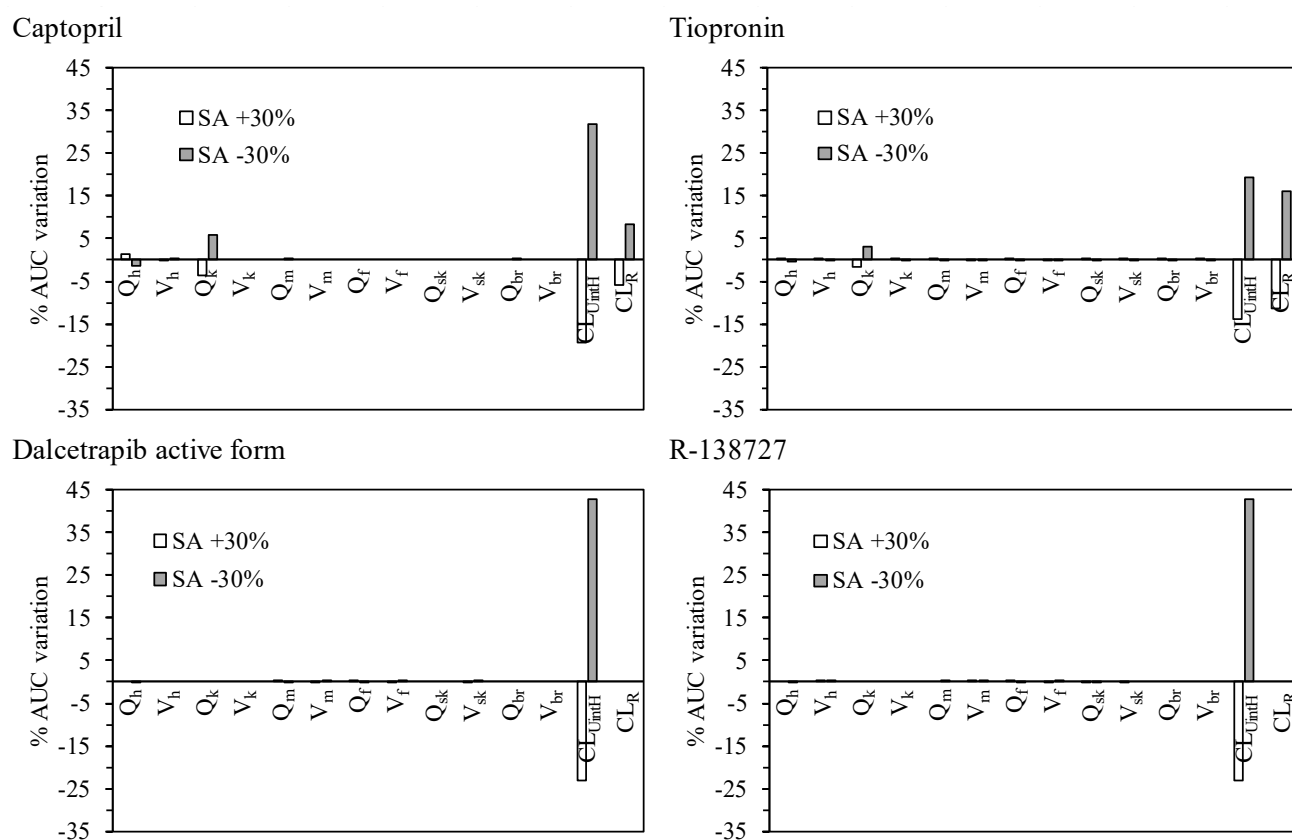


Figure 16 Sensitivity analysis of each parameter on AUC of each compound. Each parameter was varied by $\pm 30\%$ of the value. Q_h : liver blood flow, V_h : volume of liver, Q_k : kidney blood flow, V_k : volume of kidney, Q_m : muscle blood flow, V_m : volume of muscle, Q_f : adipose tissue blood flow, V_f : volume of adipose tissue, Q_{sk} : skin blood flow, V_{sk} : volume of skin, Q_{br} : brain blood flow, V_{br} : volume of brain, $CL_{U_{intH}}$: unbound metabolic intrinsic clearance, CL_R : renal blood clearance.

第4節 考察

チオール基を有し主に代謝及び尿中排泄を受けて消失する 2 化合物、及び代謝されてチオール基を有する活性体に変換された後、代謝により消失する 2 化合物の計 4 化合物を用いて、CKD がそれらの曝露に与える変化の予測性を検討した。

Tiopronin を用いた検討において、Group 2 の C_{max} ratio 及び AUC ratio はいずれも実測値の比を大きく過小評価した。その原因として CKD の分類方法が影響していると推測された。CKD が tiopronin の血漿中濃度推移に与える影響を検討した原論文⁴⁹に従い、Group 1 及び 2 は moderate CKD に分類された（それぞれの GFR は 63~48 mL/min/1.73 m² 及び 34~28 mL/min/1.73 m²）。一方、FDA draft guidance では GFR により moderate 及び severe CKD をそれぞれ 59~30 mL/min/1.73 m² 及び 29~15 mL/min/1.73

m^2 と定義している²⁰。仮に Group 2 を severe CKD に分類した場合、 C_{max} ratio は依然として過小評価するが、AUC ratio は実測値の比をよく予測できていた (Table 16)。Sayama らが算出した SF も FDA draft guidance と同様の分類方法でデータセットを作成して算出された¹⁹。Tiopronin の原論文で moderate CKD と分類された Group 2 は FDA draft guidance で severe CKD に分類される患者も含まれたため、Group 2 の予測結果は実測値を大きく過小評価したと考えられた。一方で Group 2 を severe CKD と考えても予測結果は C_{max} ratio を大きく過小評価していた。前述のとおり、HV の PBPK モデルを構築した際に算出した V_{ss} は実測値と予測値の乖離が大きい。分布容積は C_{max} にも影響することから、分布容積の予測精度の低さが C_{max} の変化率の予測精度の低さに影響した可能性が推測された。この点に関しては、生体中のチオール成分との共有結合性を考慮したモデルを構築し、CKD 病態時における C_{max} の変化率への影響を確認することで関連性の有無を考察できると考えられた。なお Group 2 の CKD 患者における消失半減期を視覚的によく予測できているにも関わらず (Figure 14)、 C_{max} を顕著に過小評価したことから吸収過程を適切に予測できていないと推測された。本研究においては、CKD が消化管吸収率 (F_a) 及び消化管代謝回避率 (F_g) へ及ぼす影響はないと仮定し¹⁹、チオール化合物の血漿中濃度推移を予測した。実際、tiopronin のクリアランス (CL) は 105 mL/min と報告されている⁵⁶。したがって、tiopronin の F_h 及び F_g も高く、CKD は F_g に影響しないと推測された。一方で、chronic renal failure ラットの小腸で P 糖タンパク質 (P-gp) がダウンレギュレーションされることが知られている^{57,58}。Tiopronin が排出トランスポーターの基質かどうかの情報はないが、 C_{max} ratio の過小評価に P-gp との関連が疑われた。Tiopronin の P-gp に対する基質性の評価など、更なる検討が必要である。

Dalcetrapib は消化管、肝臓及び血漿中で速やかに加水分解され dalcetrapib-SH となるため、dalcetrapib を経口投与したヒトの血漿中に未変化体は検出されない^{23,33}。そこで本研究では dalcetrapib 活性体の血漿中濃度推移を基に PBPK モデルを構築した。その結果、CKD 病態下における dalcetrapib 活性体の曝露量を適切に予測できていたことから、dalcetrapib 活性体が生成する過程は極めて速やかであり、CKD 病態下においてもこの過程は影響を受けていないと推測された。

Prasugrel を投与したヒトの血漿中においても未変化体は検出されないため、その活性代謝物である R-138727 への変換は極めて速いと仮定し、その PBPK モデルも R-138727 の血漿中濃度推移を基に構築した。R-138727 の血漿中濃度に対する CKD の影響を検討した原論文において、活性代謝物は moderate CKD 患者においても HV とほぼ等しい血漿中濃度推移を示した⁵¹。しかし本研究では曝露量が 1.1~1.2 倍増加すると予測され、dalcetrapib とは異なり CKD 病態時の曝露量の変化の傾向を予測

できていなかった。この原因として CKD により代謝能が低下し R-138727 の BA が低下した可能性が考えられた。プロドラッグである rilmazafone の活性代謝物で同様の事象が報告されている⁵⁹。Rilmazafone は腸管でアミノペプチダーゼにより速やかに脱グリシル化された後に代謝物 M1 を生成し、更にシトクロム P450 (CYP)3A4 で代謝されて代謝物 M2 を生成する⁶⁰。CKD 病態下において M1 の C_{max} は増加するが、M2 の C_{max} は低下した。この原因として、代謝速度の速い M1 の生成過程は CKD による影響を受けにくく、一方で M2 の生成過程は代謝速度が遅く CKD の影響を受けたため、M2 の C_{max} が低下したと考えられた。Prasugrel はその吸収の過程で消化管に発現する carboxylesterase 2 によってチオラクトン中間体である R-95913 に代謝された後⁶¹、CYP によって活性代謝物である R-138727 に酸化される^{62,63}。したがって prasugrel においても CYP 発現量及び活性低下により活性代謝物の生成量が低下しているものの、活性代謝物の生成過程が PBPK モデルに含まれていないことで、活性代謝物の曝露量の過大評価につながったと考えられた。Prasugrel の吸収過程及び活性代謝物の生成過程は dalcetrapib に比べて複雑である。本予測手法でも CKD 病態時の曝露量の変化を大きく見誤ってはいないものの、prasugrel のような化合物をより正確に予測するためには、活性代謝物の生成過程を PBPK モデルに組み込む必要があると考えられた。CKD 病態時における R-138727 の曝露量の変化の傾向を適切に予測できなかった原因としては、上記の他に CKD 病態下で代謝能が低下したことに対する代償作用として胆汁中排泄 CL が増加した可能性も考えられた。Prasugrel の同種同効薬であり、同じくプロドラッグである clopidogrel において、moderate CKD 患者よりも severe CKD 患者で非活性代謝物の濃度が低下することが報告されている⁶⁴。この非活性代謝物及びグルクロン酸抱合体はラットの胆汁中に認められている⁶⁵。また chronic renal failure ラットの肝臓で P-gp のタンパク発現量及び胆汁中排泄 CL の増加が知られている⁶⁶。Prasugrel を投与したラットにおいても R-138727 の前駆体や代謝物が胆汁中に検出されていることから⁴³、CKD 病態下で胆汁中排泄 CL が増加し、R-138727 の曝露量が低下した可能性も考えられた。これらを考慮するとチオール代謝物の生成に複数の代謝過程を経る必要があるプロドラッグに本手法を適用することは難しいと考えられた。なお Farid らは還元剤である DTT を用いて、ヒト血漿中における R-138727 の SS 結合が可逆的であることを示したが²⁸、R-138727 と標的タンパクの結合が不可逆的との報告もある¹⁰。本研究で用いた PBPK モデルはチオール化合物と生体成分との不可逆的な結合メカニズムを含んでいない。このメカニズムを含んでいたら予測値を更に過大評価したと考えられることから、この過大評価は本モデルが不可逆的な結合メカニズムを組み込むことの必要性を示すものではないと推測された。

SS 結合を示す薬物を含まないデータセットを用いた Sayama らの研究では、各薬物の消失相にお

ける推移をよく予測できていた¹⁹。しかし本研究においては、HV の消失半減期をいずれの化合物も過小評価する傾向にあり、dalcetrapib に比べて captopril、tiopronin 及び R-138727 でその程度はわずかながら大きかった (Figure 12 及び Table 15)。この原因の一つとしてチオール基の反応性が考えられた。Captopril、tiopronin 及び R-138727 のチオール基の pK_a はそれぞれ 4.02、3.86 及び 3.82 であり、dalcetrapib-SH の pK_a (6.54) より低い。pH 7.4 の生理的条件下において、captopril、tiopronin 及び R-138727 は dalcetrapib-SH に比べてイオン型の存在率が高く、そのためチオール基の反応性も高いと考えられる^{67,68}。本研究で用いた PBPK モデルは生体成分との SS 結合を介した共有結合のメカニズムを含んでいない。この結合は可逆的ではあるが、SS 結合の解離が律速となり、消失半減期を過小評価した可能性が推測された。なお、CKD 患者における半減期の HV に対する比はいずれの化合物も精度よく予測できているか、わずかに過大評価している程度であった。SS 結合は可逆性を示すことから半減期の変化に対する共有結合性の影響は小さいと推測された。ところでヒトの血漿を用いた *in vitro* 試験において、添加した captopril 及び dalcetrapib 活性体の約 30% 及び 80% が血漿タンパクと SS 結合を形成する^{6,33}。前述のとおり pK_a から想定される captopril におけるチオール基の反応性は dalcetrapib-SH のそれよりも強いと考えられ、SS 結合率の結果とは一致しなかった。これは SS 結合率を検討する際の実験条件の違いが一因と考えられた。Captopril では透析法により算出した SS 結合率が報告されているが、dalcetrapib 活性体では活性炭を用いた方法で算出した。第 1 章で示したように、測定条件の違いによりタンパク質との SS 結合率は変化する可能性があることから、半減期と SS 結合率の関係性を把握するためには実験条件の設定に注意を要すると考えられた。

一般的に bottom-up approach は PBPK モデルを構築するために多くの実験データを必要とするが、創薬段階にすべてのインプットパラメータを実験から得ることは難しい。そのため本研究では top-down approach を用いて PBPK モデルを構築し、CKD 病態時のチオール化合物に対する血漿中での曝露量を予測した。その結果、チオール基を有する活性代謝物かつ二次代謝物である R-138727 の変化の傾向を適切に予測できていなかった。しかし、それ以外のチオール化合物は曝露量の変化を精度よく予測でき、各化合物の C_{max} 及び AUC の大部分を 2 倍誤差範囲内に予測できた。また消失経路による違いは予測精度に影響しないと考えられた。今後、化合物数を増やし、更に検証していく必要はあるが、チオール化合物での予測は成功したと考えられた。承認されたチオール化合物の数は少なく、多くの製薬企業がチオール化合物での医薬品開発を避ける傾向にあると思われる。共有結合性を有するチオール化合物のヒトにおける曝露量の予測性は低い可能性が考えられたが、本研究の結果から CKD 病態時における血漿中チオール化合物の曝露量の変化は PBPK モデルを用いて精度よく予測で

きると考えられました。

第 5 節 小括

Captopril、tiopronin、dalcetrapib 活性体及び prasugrel の活性代謝物である R-138727 について PBPK モデルを構築し、CKD 患者の曝露量の変化を予測した。生成過程が複雑な R-138727 では曝露量の変化を適切に予測できず、実測値の 2 倍誤差範囲もわずかに超えた。しかし、その他の 3 化合物はほぼ適切に予測できた。チオール化合物は SS 結合により生体成分と共有結合しているため曝露量の予測性は低いと思われたが、本手法により CKD 患者における血漿中チオールの曝露量の変化を予測できると考えられた。

総括及び結論

近年、共有結合能を有する化合物の医薬品開発への適用が注目を集めている。その一方でこれらの化合物はその結合性から体内に蓄積するリスクが懸念されるほか、ヒトにおける曝露量を予測することも難しい可能性が考えられた。そこで本研究では dalcetrapib を用いて、ラット、サル及びヒト試料中での存在形態と SS 結合の可逆性、ラット及びサルの薬物動態、ラットに反復投与した際の蓄積性を検討した。また HV におけるチオール化合物の PBPK モデルを構築し、CKD が血漿中チオール化合物の曝露に及ぼす影響について、その予測性を検証した。

1. Dalcetrapib の生体試料中での安定性と存在形態

Dalcetrapib はラット、サル及びヒトのいずれにおいても血漿、肝臓又は小腸粘膜などの生体試料中で速やかに加水分解され、dalcetrapib-SH となることが in vitro 試験で明らかになった。Dalcetrapib-SH は生体内で dalcetrapib 活性体として dalcetrapib-SH 自身やチオール基を有するタンパク質などと可逆的な SS 結合を形成し、dalcetrapib-SH を介して酸化還元平衡にあると考えられた。

2. Dalcetrapib を単回投与したラット及びサルにおける薬物動態

Dalcetrapib の経口吸収率は中程度であった。¹⁴C-Dalcetrapib を投与したラット及びサルにおいて、吸収された放射能は速やかに体内に分布し、肝臓や副腎などの一部の組織で血漿よりも高い放射能が検出された。その一方で眼球や脳への移行性は低かった。投与後 168 時間のサルにおいても同様の傾向が認められた。ラット及びサルの主排泄経路は糞中排泄であり、投与後 168 時間までに投与放射能の大部分が尿及び糞中に排泄された。なおラットを用いた検討で、吸収された放射能の一部は腸肝循環を受けた。Dalcetrapib は体内で加水分解された後 dalcetrapib 活性体として内因性のタンパク質などと SS 結合し、dalcetrapib-SH を介して酸化還元的な平衡状態にあると考えられる。Dalcetrapib 活性体は dalcetrapib-S-G 及び dalcetrapib-S-Me に代謝された後、更に水酸化又は水酸化後にグルクロン酸抱合を受けて極性の高い成分に代謝された。¹⁴C-Dalcetrapib を用いた臨床マスバランス試験でも同様の排泄経路、同様の代謝物が報告されており、ラット、サル及びヒトにおいて dalcetrapib の薬物動態に顕著な種差は無いと考えられた。

3. Dalcetrapib を反復投与したラットにおける薬物動態と蓄積性

¹⁴C-Dalcetrapib をラットに 1 日 1 回 7 日間反復投与した結果、血漿及び組織内放射能は速やかに定常状態に到達した。また組織への蓄積性は低かった。Dalcetrapib の主排泄経路は糞中排泄であり、投与放射能は速やかに尿及び糞中に排泄された。尿及び糞中累積排泄率は単回投与時の値とほぼ等しかった。投与後に生成した dalcetrapib 活性体はチオール基を有する内因性のタンパク質などと共有結合していると考えられるが、反復投与による薬物動態への影響はなく、体内への蓄積性も低いことが示された。

4. チオール化合物の CKD 患者における曝露量の予測と予測性の検証

チオール化合物は生体内のタンパク質などと SS 結合による共有結合を形成するため、PK の予測性の低さが懸念された。そこでチオール基を有し尿中排泄を受ける captopril 及び tiopronin、代謝されてチオール基を有する活性体となった後、代謝により消失する dalcetrapib 及び prasugrel について HV の PBPK モデルを構築し、CKD 患者における曝露量の変化を予測した。チオール基を有する活性代謝物の生成メカニズムが複雑な prasugrel を除く 3 化合物については、CKD 病態時の曝露量の変化を概ね精度よく予測することができた。

製薬企業にとって医薬品の体内への蓄積は副作用発現を考えるうえで大きなリスクである。また投与した薬物が体内に残存し蓄積する場合、その曝露量を予測することは極めて難しい。本研究では dalcetrapib を用いて、その活性体が可逆的な SS 結合によりチオール基を有する内因性のタンパク質などと結合していること、dalcetrapib を反復投与しても dalcetrapib 活性体の体内への蓄積性は低いことを示した。またチオール基を有する活性代謝物の生成メカニズムが複雑な薬剤を除き、チオール化合物の CKD 患者における曝露量を概ね精度よく予測できることを探索的に示した。高齢者や患者などのスペシャルポピュレーションにおける化合物の曝露量を予測することは、副作用の回避や効率的な臨床試験を計画するうえで極めて重要である。共有結合性化合物は製薬企業における開発プログラムに入りにくい傾向にあるが、蓄積性が無く、CKD 患者における PK を予測できることを示した本研究はチオール化合物を含めた共有結合性医薬品の開発推進に貢献すると考えられた。

実験の部

第 1 章に関する実験

1-1. 被験物質及び試薬

非標識 dalcetrapib、dalcetrapib-SH 及び dalcetrapib-SH/NEM は日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所で合成したものを、また、 ^{14}C -dalcetrapib ($141\ \mu\text{Ci}/\text{mg}$ 、chemical purity: >95%) は積水メディカル (株) 創薬支援センター (旧東海研究所) で合成したものを使用した。その他の試薬は特に断らない限り市販品を使用し、いずれも extra pure 又は LC/MS グレードのものを使用した。

1-2. 添加液の調製

Dalcetrapib の添加液については、 ^{14}C -dalcetrapib トルエン溶液を規定量採取し、窒素気流下にて蒸発乾固した。次に規定量のイソプロピルアルコールを加えて溶解し、 $1\ \text{mg}/\text{mL}$ の添加液を調製した。この添加液をイソプロピルアルコールにより希釈し、 0.1 及び $0.01\ \text{mg}/\text{mL}$ の添加液を調製した。また、 $1\ \text{mg}/\text{mL}$ の添加液と dalcetrapib のイソプロパノール溶液を混合し、 $10\ \text{mg}/\text{mL}$ の添加液を調製した。非標識 dalcetrapib-SH の添加液については、dalcetrapib-SH を規定量秤量し、規定量のイソプロピルアルコールを加えて溶解し、 1 及び $20\ \text{mg}/\text{mL}$ の添加液を調製した。

1-3. 生体試料

ラット (Sprague-Dawley 系、雄性) 及びサル (カニクイザル、雄性) の肝 S9 画分は日本チャールス・リバー (株) より購入し、ヒト (男性) の肝 S9 画分は (株) ケー・エー・シーより購入した。In vitro 代謝試験にはタンパク濃度を最終濃度 $2\ \text{mg}/\text{mL}$ に調製した。ラットの小腸粘膜ホモジネート画分については、日本チャールス・リバー (株) より購入したラット (Sprague-Dawley 系 (Crj: CD(SD))、雄性) をエーテル深麻酔により安楽死させた後に放血し、十二指腸から回腸部分を摘出した。得られた小腸を PBS で洗浄し、スライドガラスを用いて粘膜を採取した後、 $0.1\ \text{mol}/\text{L}$ リン酸緩衝液 (pH 7.4) $9\ \text{mL}$ を加え、テフロンホモジナイザーを用いて小腸粘膜ホモジネートを調製した。In vitro 代謝試験に用いたホモジネートのタンパク濃度を Lowry 法⁶⁹により定量した結果、最終濃度 $8.6\ \text{mg}/\text{mL}$ であった。ラットの血液及び血漿については、日本チャールス・リバー (株) より購入したラット (Sprague-Dawley 系 (Crj: CD(SD))、雄性) をエーテル深麻酔により安楽死させ、下大静脈よりヘパリン処理したシリンジを用いて血液を採取した。また得られた血液を遠心分離 ($1700\ \text{g}$ 、 15 分間) して血漿を得た。サルの血液については、ハムリー (株) から購入し、血漿は日本たばこ産業 (株) の薬物動態研

究所に保管しているものを使用した。ヒトの血液については、日本たばこ産業（株）医薬総合研究所にボランティア登録されている日本人健康成人男性よりヘパリン処理した真空採血管を用いて血液を採取した。また、血液を遠心分離することにより血漿を得た。

1-4. *In vitro* 安定性試験

1-4-1. 血漿中安定性

^{14}C -Dalcetrapib (5.22 MBq/mg) イソプロピルアルコール溶液 10 μL をラット、サル及びヒトの血漿 1 mL に添加し（最終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ ）、37°C で 15 分間インキュベートした。その後、血漿を 100 μL 分取し、1-5-1 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib を定量した。また 15 分間インキュベートした試料 200 μL について、1-5-2 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib 活性体と代謝物を定量した。

1-4-2. 血漿中代謝物の存在形態

1-4-2-1. 血漿タンパクとの SS 結合型成分 (dalcetrapib-SS-protein)

活性炭末は低分子量の脂溶性成分を吸着するが、タンパク質を吸着しない性質を持つため、血漿中のタンパクと結合していない成分を定量するために使用されている⁷⁰。すなわち血漿にデキストラン-活性炭末懸濁液を添加して遠心分離すると、非結合型は活性炭で除去され、上清にはタンパク結合型が移行する。この方法に従い血漿中の血漿タンパクとの SS 結合型と非結合型を以下のように定量した。

^{14}C -Dalcetrapib の添加液 4 μL をラット、サル及びヒトの血漿 400 μL に *in vitro* で添加し（最終濃度 0.1、1 及び 10 $\mu\text{g/mL}$ ）、37°C で 10 分間インキュベートした。次に血漿 100 μL を 3 例採取し、以下に示す処理（a、b 及び c）を行った。

- a: 血漿 100 μL を採取し、PBS 400 μL を添加した後、37°C で 1 時間インキュベートした。次にアセトニトリル 40 μL 及びデキストラン-活性炭末懸濁液 500 μL を添加して、室温で 1.5 時間インキュベートした。遠心分離（11000 g、10 分間）により活性炭を沈殿させ、上清 500 μL を -DTT 処理試料として採取し、放射能を測定した。
- b: 血漿 100 μL を上記 a と同様に処理した。ただし血漿タンパクと SS 結合している dalcetrapib 活性体をタンパクから遊離させるために、PBS 400 μL の代わりに PBS 360 μL 及び 25 mmol/L DTT 40 μL を添加した。遊離した dalcetrapib-SH は放置すると再び SS 結合を形成するため、アセトニトリルの代わりに 1 mol/L NEM 40 μL を添加して、チオール基を NEM 誘導体に変換して安定

化した。これを+DTT 処理試料として上記と同様に上清を採取し、放射能を測定した。

c: 血漿 100 μ L を上記 a と同様に処理した。ただし、デキストラン-活性炭末懸濁液の代わりに PBS 500 μ L を加えた。これを control 試料として、上記と同様に上清中の放射能を測定した。

放射能と血漿タンパクとのタンパク結合率は、タンパク結合成分の放射能の全血漿中放射能に対する割合として次式に従い算出した。

$$\text{タンパク結合率 (\%)} = \frac{(\text{a:-DTT 処理試料中放射能})}{(\text{c:control 試料中放射能})} \times 100 \quad (\text{式 1-1})$$

放射能と血漿タンパクとの SS 結合によるタンパク結合率 (SS 結合率) は、DTT 及び NEM 処理によってタンパクから解離する放射能の全血漿中放射能に対する割合として次式に従い算出した。

$$\text{SS 結合率 (\%)} = \frac{(\text{a:-DTT 処理試料中放射能}) - (\text{b:+DTT 処理試料中放射能})}{(\text{c:control 試料中放射能})} \times 100 \quad (\text{式 1-2})$$

1-4-2-2. タンパク結合型成分の可逆性

^{14}C -Dalcetrapib 10 μ L をヒトの血漿 1 mL に添加し (最終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$)、37°C で 10 分間インキュベートした後、Radio-Gel-HPLC に供して 1-6-3 項に従いタンパク結合体を分離分析した。また、インキュベート後の試料に大過剰の非標識 dalcetrapib-SH (最終濃度 1000 $\mu\text{g/mL}$) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートし、1-6-3 項に従い dalcetrapib-SS-protein の可逆性について検討した。またインキュベート後の血漿試料について、1-5-1 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib を、1-5-2 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib 活性体と代謝物を定量した。

1-4-2-3. 肝臓 S9 中安定性

^{14}C -Dalcetrapib をラット、サル及びヒトの肝 S9 に添加し (最終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$)、37°C で 15 分間インキュベートした。反応後に反応液を採取し、1-5-1 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib を定量した。また 1-5-2 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib 活性体と代謝物を定量した。

1-4-2-4. 小腸粘膜ホモジネート中安定性

^{14}C -Dalcetrapib をラットの小腸粘膜ホモジネートに添加し (最終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$)、37°C で 15 分間インキュベートした。反応後に反応液を採取し、1-5-1 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib を定量した。また 1-5-2 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib 活性体と代謝物を定量した。

1-5. 処理方法

1-5-1. 生体試料中 dalcetrapib の定量

^{14}C -Dalcetrapib を添加した生体試料中 dalcetrapib を定量する際には規定量の試料を採取し、2 倍量のアセトニトリルを添加した後、攪拌して反応を終了させた。遠心分離（11000 g、10 分間）して得られた上清を、1-6-1 項に従い逆相系カラムを用いたラジオ検出器付き高速液体クロマトグラフィー（Radio-ODS-HPLC）に供して dalcetrapib を定量した。

1-5-2. 生体試料中 dalcetrapib 活性体及び代謝物の定量法

1. Dalcetrapib 又は ^{14}C -dalcetrapib を投与したラット及びサル（第 2 章）の血漿、及び dalcetrapib 又は ^{14}C -dalcetrapib を添加した生体試料に DTT を添加し、37℃で 1 時間インキュベートすることにより二量体、dalcetrapib-SS-R、dalcetrapib-SS-protein から dalcetrapib-SH を遊離させた。
2. この反応液に NEM を添加して、チオール基を NEM 誘導体に変換して安定化した。
3. ^{14}C -Dalcetrapib を投与した動物（第 2 章）から得られた生体試料中の dalcetrapib 活性体とその他の代謝物を定量する場合は、アセトニトリルを添加し、遠心分離（11000 g、10 分間）して得られた上清を、1-6-1 項に従い Radio-ODS-HPLC に供して dalcetrapib 及びその代謝物の濃度を分析した。また、dalcetrapib を投与した動物（第 2 章）から得られた生体試料中の dalcetrapib 活性体のみを定量する場合は、NEM 誘導体に変換後の生体試料をヘキサンで抽出し、1-6-2 項に従い UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-UV）に供して dalcetrapib 活性体を定量した。

1-5-3. 排泄物中 dalcetrapib 及び代謝物の定量法

^{14}C -Dalcetrapib を投与後のラット及びサル（第 2 章）から得られた尿、糞及び胆汁中の dalcetrapib と代謝物は Radio-ODS-HPLC を用いて定量した。尿と胆汁の試料は直接 Radio-ODS-HPLC に注入し、また、糞ホモジネートはアセトニトリルで dalcetrapib と代謝物を抽出した後、その抽出物を Radio-ODS-HPLC に注入して、1-6-1 項に従い定量した。

1-6. 分析条件

1-6-1. Radio-ODS-HPLC の分析条件

HPLC 装置は LC-10A システム（島津製作所）を、分離カラムは Mightysil RP-18 GP (4.6×150 mm I.D.、関東化学) を用いた。カラム温度は 40℃に設定した。移動相は A 液に 0.05% ぎ酸水溶液、B 液にアセトニトリルを用い、0～10 分まで B 液 0→10%、10～45 分まで B 液 10%→80%、45～65 分まで B 液 80%→100%、65～85 分まで B 液 100%、85～87 分まで B 液 100→0%、87～100 分まで B 液 0% のグラジエントで、分析時間を 100 分とした。移動相の流速は 1 mL/min とした。溶出液をフローシンチレーション計数装置（flo/one β、液体用セル、液体シンチレーター：Ultima Flo AP、Packard）に導入し、放射能を検出することにより、dalcetrapib、又は dalcetrapib と代謝物を定量した。

1-6-2. HPLC-UV の分析条件

HPLC 装置は LC-10A システム（島津製作所）を、分離カラムは Mightysil RP-18 GP (4.6×150 mm I.D.、関東化学) を用いた。カラム温度は 45℃に設定した。移動相にアセトニトリル / 精製水 (7 : 3 v/v) を用いて流速 1 mL/min で溶出させ、UV246nm で dalcetrapib 活性体を検出した。分析時間は 20 分とした。

1-6-3. Radio-Gel-HPLC の分析条件

HPLC 装置は LC-10A システム（島津製作所）を、分離カラムは TSK-GEL G2000SWXL (7.8×300 mm I.D.、東ソー) を用いた。カラム温度は 30℃に設定した。移動相は A 液に 20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 7.0)、B 液にアセトニトリルを用い、0～40 分まで B 液 0%、40～45 分まで B 液 0%→100%、45～75 分まで B 液 100%、75～80 分まで B 液 100→0%、80～100 分まで B 液 0% のグラジエントで、分析時間を 100 分とした。移動相の流速を 0.5 mL/min とした。溶出液をフローシンチレーション計数装置（flo/one β、液体用セル、液体シンチレーター：Ultima Flo AP、Packard）に導入し、放射能を検出することによりタンパク結合体を分離分析した。

1-7. 放射能の測定

血漿、尿及び胆汁試料は、規定量をバイアルに量り取り、シンチレーター (ULTIMA GOLD、Packard) を加えて放射能測定用試料とした。また、放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 1900CA 又は 2500TR、Packard) を用いて 5 分 1 回で測定した。

第 2 章に関する実験

2-1. *In vivo* ラット試験

2-1-1. 試験動物

Sprague-Dawley 系 (Crj: CD(SD)) 雄性ラットは日本チャールス・リバー (株) より購入した。ラットを用いた薬物動態試験は日本たばこ産業 (株) 薬物動態研究所にて実施した。投与した時の体重及び週齢はそれぞれ 249~314 g 及び 7 週齢であった。

2-1-2. 投与液の調製

経口投与液の調製のため、 ^{14}C -dalcetrapib 及び非標識 dalcetrapib 若しくは非標識 dalcetrapib のみを採取し、メノウ乳鉢上で混合、磨砕した。ついで 0.5% メチルセルロース水溶液 (0.5% MC) を少量ずつ加えて均一に懸濁し、10 mg/mL の投与液を調製した。静脈内投与液の調製のため、 ^{14}C -dalcetrapib 及び非標識 dalcetrapib 若しくは非標識 dalcetrapib のみを秤量し、ジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬) を加えて溶解し、25 mg/mL の投与液を調製した。

2-1-3. 投与方法

経口投与の際には、1 群 3 匹の非絶食ラットに経口ゾンデを用いて胃内へ投与した。静脈内投与の際には、1 群 3 匹の非絶食ラットを用い、大腿静脈に投与した。

2-1-3. ^{14}C -Dalcetrapib を用いた吸収、分布、代謝、排泄試験

2-1-3-1. 血漿試料の採取

ラットにおける放射能の吸収率は以下の方法で算出した。 ^{14}C -Dalcetrapib をラットに経口又は静脈内投与し、投与後 5、10、15、30 分、1、2、4、6、8、12、24、48 及び 72 時間 (5 及び 10 分は静脈内投与群のみ) に、ヘパリン処理した採血管 (テルモキャピラリー: 150 μL /本) を用いて尾静脈から血液を採取した。採取した血液は遠心分離 (1700 g、15 分間) して血漿を分取し、放射能測定用試料とした。放射能測定は 2-1-3-5 項に準じた。

2-1-3-2. 組織内濃度

^{14}C -Dalcetrapib をラットに経口投与した後、投与後 30 分、2、24 及び 168 時間後にエーテル深麻酔により安楽死させ、ヘパリン処理した注射針を用いて腹大静脈より血液を採取した。血液の一部から

遠心分離により血漿を得た。臓器及び組織は、大脳、小脳、骨髄、下垂体、眼球、ハーダー腺、顎下腺、甲状腺、気管、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、骨格筋、脂肪、褐色脂肪及び皮膚を採取し、放射能測定用試料とした。ただし肝臓については規定量の精製水を加えホモジナイズした後、放射能測定用試料とした。放射能測定はいずれも 2-1-3-5 項に準じた。

2-1-3-3. 尿、糞及び呼気中排泄

^{14}C -Dalcetrapib をラットに経口投与した後、個別のガラス製代謝ケージ、メタボリカ（(株) 杉山元医理器）内で飼育し試験を実施した。メタボリカ内の空気を外部設置ポンプで吸引することにより呼気をトラップカラム（メチルセロソルブ / モノエタノールアミンの混液（2 : 1、v/v））に導入し、呼気中に排泄された $^{14}\text{CO}_2$ を捕集した。投与後 24 時間ごとに 48 時間までトラップ内の溶媒を回収し、放射能測定用試料とした。尿及び糞は投与後 24 時間ごとに 168 時間まで分別回収した。尿については規定量を採取後、試料中の放射能を測定し、糞試料は精製水を加えてホモジナイズしてから放射能を測定した。なお尿及び糞はドライアイス凍結下で採取した。放射能測定はいずれも 2-1-3-5 項に準じた。

2-1-3-4. 胆汁中排泄及び腸肝循環

胆汁中排泄試験では、 ^{14}C -dalcetrapib を経口投与した雄性胆管ろうラットをボールマンケージ内で飼育し試験を実施した。胆汁は投与後 24 及び 48 時間まで採取し、胆汁の容量を測定後、放射能を測定した。尿及び糞は投与後 24 時間ごとに 48 時間まで室温で採取し、2-1-3-3 項に準じて処理した。なお胆汁の採取はドライアイス凍結下で行った。

腸肝循環試験では、胆汁中排泄試験で得られた 0～24 時間の胆汁を別の雄性胆管ろうラットの十二指腸内に投与した後、胆汁中排泄試験と同様に胆汁、尿及び糞を回収し、放射能を測定した。なおいずれの試料も室温で採取した。放射能測定はいずれも 2-1-3-5 項に準じた。

2-1-3-5. 放射能測定

血漿、尿及び胆汁試料は規定量をバイアルに量り取り、シンチレーター（ULTIMA GOLD、Packard）を加えて、呼気はシンチレーター（HIONIC FLUOR、Packard）を加えて、放射能測定用試料とした。臓器及びホモジネート試料はサンプルオキシダイザー用コーン（Packard）に量り取り、乾燥後、サン

プルオキシダイザー (Oximate80-model307、Packard) で燃焼させる事により生じた $^{14}\text{CO}_2$ を CARBO-SORB E (Packard) で捕集し、シンチレーター (PERMA-FLUOR E+、Packard) を加えて放射能を測定した。放射能の測定は液体シンチレーションカウンタ (Tri-Carb 1900CA 又は 2500TR、Packard) を用いて 5 分 1 回で測定した。

2-1-3-6. 血漿における代謝物組成

^{14}C -Dalcetrapib を経口投与したラットの投与後 0.5、2、4、8 及び 24 時間の血漿について、血漿中の dalcetrapib 活性体及びその他の代謝物を 1-5-2 項及び 1-6-1 項に従い分析した。更に LC/MS を用いて血漿中代謝物の構造を推定した。

2-1-3-7. 尿、糞及び胆汁における代謝物組成

^{14}C -Dalcetrapib を経口投与したラットの投与後 48 時間までの尿及び糞、及び投与後 24 時間までの胆汁について、試料中の dalcetrapib と代謝物を 1-5-3 項及び 1-6-1 項に従い定量した。また尿及び胆汁は LC/MS を用いて代謝物の構造を推定した。

2-1-4. Dalcetrapib を投与したラットにおける dalcetrapib 活性体の血漿中濃度測定試験

2-1-4-1. 試料採取及び定量

Dalcetrapib をラットに経口又は静脈内投与し、投与後 5、10、15、30 分、1、2、4、6、8、12、24 及び 48 時間 (5 及び 10 分は静脈内投与群のみ) に採血した後、血液を遠心分離 (1700 g、15 分間) して血漿を分取した。得られた血漿について 1-5-2 項及び 1-6-2 項に従い dalcetrapib 活性体の血漿中濃度を定量した。

2-1-4-2. 定量値の算出

ラット血漿中における dalcetrapib 活性体の定量については、クロマトグラムの保持時間から dalcetrapib 活性体のピークを同定し、ピーク面積値から絶対検量線法により濃度を算出した。検量線作成用試料の dalcetrapib 活性体のピーク面積値 (y) と検量線の添加濃度 (x) との関係を用いて最小二乗法 (重み $1/y$) により検量線式を求めた。dalcetrapib 活性体の試料中の濃度は検量線の傾き及び y 切片の値を用いて算出した。

2-1-4-3. 精度管理

ラット血漿中における dalcetrapib 活性体の定量については、測定のパッチごとに検量線 (50~10000 ng/mL) を作成し、その直線性及び傾きを確認するとともに、QC 試料 (100、1000 及び 5000 ng/mL、n=2) の測定を行うことにより真度及び精度の管理を行った。

精度管理の判断基準については、6 つの QC 試料のうち少なくとも 4 つが理論濃度の $\pm 20\%$ 以内であり、同一濃度の QC 試料が $\pm 20\%$ を超えないこととした。また検量線の相関係数は 0.95 以上であることとした。

2-2. *In vivo* サル試験

2-2-1. 試験動物

サルを用いた薬物動態試験は積水メディカル (株) 創薬支援センター (旧東海研究所) にて実施した。投与時の推定年齢は 3~4 歳であった。

2-2-2. 投与液の調製

経口投与液の調製のために ^{14}C -dalcetrapib 及び非標識 dalcetrapib を規定量採取し、メノウ乳鉢上で混合、磨砕した。ついで 0.5% メチルセルロース水溶液 (0.5% MC) を少量ずつ加えて均一に懸濁し、20 mg/mL の投与液を調製した。静脈内投与液の調製のために ^{14}C -dalcetrapib 及び非標識 dalcetrapib を規定量採取し、ジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬) を加えて溶解し、100 mg/mL の投与液を調製した。

2-2-3. 投与方法

経口投与の際には、給餌 1 時間後の雄性サルに 100 mg/18.5 MBq/5 mL/kg の投与液をカテーテル (Nelaton Catheter、No.6、出雲ゴム工業) で胃内投与した。更に投与直後に同カテーテルを蒸留水 5mL で洗い流すことにより投与した。静脈内投与の際には、空腹時の雄性サルに 10 mg/7.4 MBq/0.1mL/kg で前肢橈側皮静脈内投与した。投与に際しては一晩絶食後に投与し、投与後 4 時間目の試料採取後に給餌した。

2-2-4. 試料採取

2-2-4-1. 血液及び血漿試料の採取

^{14}C -Dalcetrapib をサルに経口又は静脈内投与し、代謝ケージに収め、経時的に大腿静脈より血液をヘパリンナトリウム入り真空採血管（テルモ）を用いて採取した。採取時間は投与後 5、15、30 分、1、2、4、6、8、12 及び 24 時間、以後 24 時間毎に 168 時間までとした。採取した血液は遠心分離（1800 g、4℃、15 分間）して血漿を分取した。投与後 1、2、4、8 及び 24 時間の血漿については 1-5-2 項及び 1-6-1 項に従い dalcetrapib 活性体の血漿中濃度を定量した。

2-2-4-2. 組織試料の採取

投与後 168 時間の採血を実施した後、塩酸ケタミン（ケタラール 50、三共）・塩酸キシラジン（セラクター、バイエルジャパン）混合液（混合比 1:1）を 0.1 mL/kg で筋肉内投与して麻酔したのち、腹大動脈より採血致死させ、血漿、血液、大脳、小脳、眼球、顎下腺、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、胆汁（胆嚢内）、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、精巣、精嚢、腸間膜リンパ節、骨格筋（大腿部より採取）、皮膚（側腹部より採取）、白色脂肪（精巣周辺部より採取）、骨髄を摘出した。

得られた血液の一部を放射能測定用試料とし、残りの血液は遠心分離（1800 g、4℃、15min）して血漿を分取し、その一部を放射能測定用試料とした。骨髄、骨格筋、皮膚及び白色脂肪はその一部を採取して放射能測定用試料とした。甲状腺、腸間膜リンパ節及び副腎は全湿重量を測定後、必要に応じてその一部を切り取り、その湿重量を測定して放射能測定用試料とした。眼球は両眼の湿重量を測定し、放射能測定用試料とした。胆嚢内胆汁は全容量を測定後、その一部を放射能測定用試料とした。他の組織は全湿重量を測定後、2 倍量の生理食塩液（大塚製薬）を加えて重量を測定したのち、ポリトロンホモジナイザー（キネマチカ）を用いて約 33% ホモジネートを調製し、その一部の重量を測定して放射能測定用試料とした。

2-2-4-3. 尿及び糞試料の採取

代謝ケージにて自然排泄された尿及び糞を採取した。採取時間は尿、糞ともに投与後 24 時間毎に 168 時間までとした。なお尿は氷冷下で採取した。尿は蒸留水を加えて希釈し、その一部を放射能測定用試料とした。糞は蒸留水を加えてホモジネートを調製した後、その一部を放射能測定用試料とした。投与後 168 時間の尿及び糞を採取後、代謝ケージを水で洗浄し、10 L に希釈したのち、その一部を放射能測定用試料とした。

2-2-5 放射能測定

血液及び組織は燃焼用カップろ紙（アドバンテック）に入れ、乾燥したのち、自動燃焼装置（ASC-113、ALOKA）で燃焼した。燃焼後 CO₂吸収剤 Oxisorb-CO₂（PACKARD）6 mL 及びシンチレーター Oxiprep-2（PACKARD）12 mL を加えて放射能を測定した。血漿は組織溶解剤 SOLUENE-350（PACKARD）2 mL を加えて溶解したのち、シンチレーター HIONICFLUOR（PACKARD）10 mL を加えて放射能を測定し、尿中排泄率及びケージ洗浄液中放射能の割合を算出した。蒸留水で希釈された尿及びケージ洗浄液は、その一部にシンチレーター HIONICFLUOR 10 mL を加えて放射能を測定した。糞及び組織ホモジネートは、その一部を燃焼用カップろ紙に入れ、血液と同様の手法で放射能を測定し、糞中排泄率及び組織内濃度を算出した。各試料中の放射能の測定は液体シンチレーションカウンター（2500TR、PACKARD）で 2 分間計数して行った。

2-2-6. 血漿における代謝物組成

¹⁴C-Dalcetrapib を経口又は静脈内投与したサル投与後 1、2、4、8 及び 24 時間の血漿又は 5 分、2、4、8 及び 24 時間の血漿については 2-1-3-6.項に準じた。また LC/MS を用いてその他の血漿中代謝物の構造を推定した。

2-2-7. 尿及び糞における代謝物組成

¹⁴C-Dalcetrapib を経口投与したサル投与後 120 時間までの尿及び糞については 2.1.3.7 項に準じた。また尿は LC/MS を用いて代謝物の構造を推定した。

2-3. In vitro 血球移行率

¹⁴C-Dalcetrapib をラット、サル及びヒトの血液に添加し（最終濃度 0.1、1 及び 10 µg/mL）、恒温槽内で 37°C、10 分間平衡化した。次いで、ヘマトクリット値、血液及び血漿の放射能を測定し、下記の式を用いて血球移行率を算出した。

$$\text{血球移行率(\%)} = \frac{\text{血液中放射能濃度} - \text{血漿中放射能濃度} \times \frac{(100 - \text{Ht})}{100}}{\text{血液中放射能濃度}} \times 100 \quad (\text{式 2-1})$$

2-4. データ処理及び解析

2-4-1. 薬物動態パラメータの算出

2-4-1-1. 吸収の項（第2章、第1節）におけるパラメータ

Dalcetrapib 及び ^{14}C -dalcetrapib を投与した時の dalcetrapib 活性体又は放射能の血漿中濃度推移からノンコンパートメント解析により薬物動態パラメータを算出した。算出には Microsoft Excel (Microsoft Corporation) を用いた。

Dalcetrapib 活性体又は放射能の血漿中濃度の実測値より最高濃度 (C_{\max}) 及びその到達時間 (t_{\max}) を求めた。半減期は t_{\max} 以降の濃度を用い、最小二乗法によりみかけの α 相又は β 相の半減期 $t_{1/2\alpha}$ 又は $t_{1/2\beta}$ を算出した。血漿中濃度-時間曲線下面積値 (AUC) は、各測定時間における血漿中濃度を直線で結び台形法により計算し、 $AUC_{0-\infty}$ は下記の式を用いて算出した。

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{\text{last}} + \frac{C_{\text{tz}}}{\beta} \quad (\text{式 2-2})$$

ここで AUC_{last} は濃度を算出できた最終時点までの AUC であり、 C_{tz} は濃度を算出できた最終時点の濃度である。放射能の吸収率及び dalcetrapib 活性体の BA は、経口投与又は静脈内投与時の AUC を用量補正し、比を出すことにより算出した。

2-4-1-2. 分布の項（第2章、第2節）におけるパラメータ

^{14}C -dalcetrapib を投与した時の各組織の放射能濃度推移からノンコンパートメント解析により消失速度定数 λ 及び消失半減期 $t_{1/2}$ を算出した。

2-4-2. 尿、糞、胆汁又は呼気中排泄率の算出

各試料採取区間において得られた放射能の試料中濃度に区間毎の試料採取量を乗じて、各区間における放射能の試料中排泄量を算出した。得られた区間毎の試料中排泄量を合計し累積排泄量を算出した。次に累積排泄量を投与量で除することで累積排泄率 (% of dose) を算出した。

第3章に関する実験

3-1. 試験動物

2-1-1 項に記載した。

3-1-1. 投与液の調製

2-1-2 項に準じた。

3-1-2. 投与方法

2-1-3 項に準じた。

3-1-3. ^{14}C -Dalcetrapib を用いた吸収、分布、排泄試験

3-1-3-1. 血液及び血漿試料の採取

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量でラットに 1 日 1 回 7 日間反復経口投与した後、投与後 15、30 分、1、2、4、6、8、12 及び 24 時間（初回及び 4 回投与）、投与後 24 時間（2、3、5、6 回投与）及び投与後 15、30 分、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96 及び 120 時間（7 回投与）に採血を行った。操作は 2-1-3-1 項に準じた。

3-1-3-2. 組織内濃度

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量でラットに 1 日 1 回 7 日間反復経口投与した後、初回及び 4 回投与後 24 時間、7 回投与後 24 及び 168 時間における放射能の組織内濃度を測定した。操作は 2-1-3-2 項に準じた。ただし腸間膜リンパ節も採取し、サンプルオキシダイザー用コーン（Packard）に量り取った。

3-1-3-3. 尿及び糞中排泄

^{14}C -Dalcetrapib を 100 mg/kg の用量でラットに 1 日 1 回 7 日間反復経口投与した後、投与後 24 時間及び 7 回投与後 24 時間ごとに 168 時間までの尿及び糞を回収した。操作は 2-1-3-3 項に準じたが、試料採取は室温で実施した。

3-1-3-4. 放射能測定

2-1-3-5 項に準じた。

3-2. データ処理及び解析

3-2-1. 薬物動態パラメータの算出

3-2-1-1. 吸収の項（第 3 章、第 1 節）におけるパラメータ

解析手法は 2-4 項に準じた。初回、4 回及び 7 回投与後 24 時間までの AUC (AUC_{0-24})、7 回投与後の消失半減期を算出した。血漿中放射能の蓄積率 (R_{ac}) は各投与後 24 時間の放射能濃度を初回投与

後 24 時間の放射能濃度で割ることにより算出した。

3-2-1-2. 分布の項（第 3 章、第 2 節）におけるパラメータ

各組織中放射能の R_{ac} は 4 回又は 7 回投与後 24 時間での放射能の組織内濃度を初回投与後 24 時間の組織内濃度で割ることにより算出した。

また、2-4-1-2 項で算出した各組織中放射能の消失速度定数 λ から以下の式により蓄積率の予測値 (Predicted R_{ac}) を算出した。

$$Predicted R_{ac} = \frac{1}{1 - e^{-\lambda \tau}} \quad (\text{式 3-1})$$

τ は投与間隔を示す。

3-2-2. 尿及び糞中排泄率の算出

2-4 項に準じた。

第 4 章に関する実験

4-1. データの収集

HV、moderate 及び severe CKD 患者の経口投与時における captopril⁵²、tiopronin⁴⁹、dalcetrapib 活性体⁵⁰、R-138727 (prasugrel 活性代謝物)⁵¹ の血漿中濃度推移、 f_p 、未変化体尿中排泄率 (f_e)、 C_{max} 、AUC 及び $t_{1/2}$ は文献、PMDA 及び FDA の申請資料パッケージから収集した。腎機能の分類については CKD 患者での PK を報告した各原著論文に従った。そのため tiopronin の moderate CKD 患者は糸球体ろ過量 (GFR) が 63~48 ml/min/1.73 m² 及び 34~28 ml/min/1.73 m² をそれぞれ group 1 及び group 2 に分類した。Captopril は Cockcroft-Gault 式により算出したクレアチニンクリアランスを基に severe CKD 患者を定義した。LogP、pH-dependent distribution coefficient (logD)、acidic dissociation constants (pK_a) などの *in silico* パラメータは JChem for Excel (ChemAxon、Budapest、Hungary) を用いて算出した。各化合物は式 4-1 に示す pH 6.5 及び pH 7.4 における logD の差 ($\Delta \log D$) に基づいて酸性、塩基性及び中性に分類した。

$$\Delta \log D = \log D_{pH6.5} - \log D_{pH7.4} \quad (\text{式 4-1})$$

すなわち、 $\Delta \log D$ が正若しくは負となる化合物をそれぞれ酸性及び塩基性化合物、 $\Delta \log D$ が 0 となる化合物を中性化合物と分類した。血漿中濃度予測に用いた化合物の物理化学的及び薬物動態学的デ

ータを Table 18 に示した。一部の化合物の R_B が文献などから得られなかったため、酸性化合物の R_B を 0.6 とした⁷¹。

Table 18 Parameters used for the construction of PBPK model

Parameter	Captopril	Tiopronin	Dalcetrapib-SH	R-138727 ^b	Methods/references
logP	0.727	-0.533	6.039	0.826	Predicted using JChem for Excel
logD 6.5	-1.72	-3.12	5.77	0.51	Predicted using JChem for Excel
logD 7.4	-2.42	-3.77	5.23	-0.04	Predicted using JChem for Excel
pK _a , base	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Predicted using JChem for Excel
pK _a , acid	4.02	3.86	6.54	3.82	Predicted using JChem for Excel
BW	70 kg	70 kg	70 kg	70 kg	Assumed
f _p	0.77	0.238	0.091 ^{33,a}	0.02	PMDA website
R _B	0.7	0.6 ^c	0.63 ^{33,a}	0.6 ^c	PMDA website

^a dalcetrapib active form, ^b active metabolite of prasugrel, ^c assumed, n.a.: not applicable.

4-2. CKD 患者の CL 予測

CL は以下の式に基づき健康成人に経口投与した際の血漿中濃度の AUC から算出した。

$$CL = \frac{Dose}{AUC} \cdot F_a \cdot F_g \cdot F_h \quad (\text{式 4-2})$$

$$F = F_a \cdot F_g \cdot F_h \quad (\text{式 4-3})$$

ここで F はバイオアベイラビリティ、 F_a は消化管吸収率、 F_g は消化管代謝回避率、 F_h は肝代謝回避率を示す。CKD 病態下で F_a と F_g は変化しないと仮定した。

CL_R と肝クリアランス (CL_H) は血漿 CL から以下の式で算出した。

$$CL_R = \frac{CL}{R_B} \cdot f_e \quad (\text{式 4-4})$$

$$CL_H = \frac{CL}{R_B} \cdot (1 - f_e) \quad (\text{式 4-5})$$

遊離型肝固有クリアランス ($CL_{U_{intH}}$) は Well-stirred モデル式に基づき、以下の式から算出した⁷²。

$$CL_{U_{intH}} = \frac{Q_H \cdot CL_H}{f_B \cdot (Q_H - CL_H)} \quad (\text{式 4-6})$$

ここで Q_H は肝血流量である。また f_B は f_p を R_B で除することにより算出した。

Moderate 及び severe CKD 患者の CL_R 、 f_p 及び $CL_{U_{intH}}$ の HV に対する相対比を表す SF は Sayama らの報告¹⁹ から引用した。すなわち CL_R の SF は病態時の GFR の変化率と同じとし、Moderate 及び severe CKD 患者の GFR はそれぞれ 59~30 mL/min/1.73m² 及び 29~15 mL/min/1.73m² と定義した。

Moderate 及び severe CKD 患者の f_p の SF はそれぞれ 107~119% 及び 120~151%、 $CL_{U_{intH}}$ の SF はそれ

ぞれ 55～82%及び 48～80%とした。病態時の各パラメータ ($CL_{R,CKD}$ 、 $f_{p,CKD}$ 及び $CL_{U_{intH},CKD}$) は HV の各パラメータに SF を乗じることによって算出した。

CKD 病態下において Q_H 及び R_B は変化しないと仮定し、以下の well-stirred モデル式で $f_{p,CKD}$ 及び $CL_{U_{intH},CKD}$ を用いて CKD 病態下の CL_H ($CL_{H,CKD}$) を予測した。

$$CL_{H,CKD} = \frac{Q_H \cdot \frac{f_{p,CKD}}{R_B} \cdot CL_{U_{intH},CKD}}{Q_H + \frac{f_{p,CKD}}{R_B} \cdot CL_{U_{intH},CKD}} \quad (\text{式 4-7})$$

算出した $CL_{R,CKD}$ 及び $CL_{H,CKD}$ を以下の式のとおり組み合わせることにより、病態下の CL (CL_{CKD}) を予測した。

$$CL_{CKD} = (CL_{R,CKD} + CL_{H,CKD}) \cdot R_B \quad (\text{式 4-8})$$

4-3. CKD 患者における化合物の血漿中濃度の予測

PBPK モデルの構築から CKD 患者における各化合物の血漿中濃度のシミュレーションまでのワークフローを Figure 17 に示した。

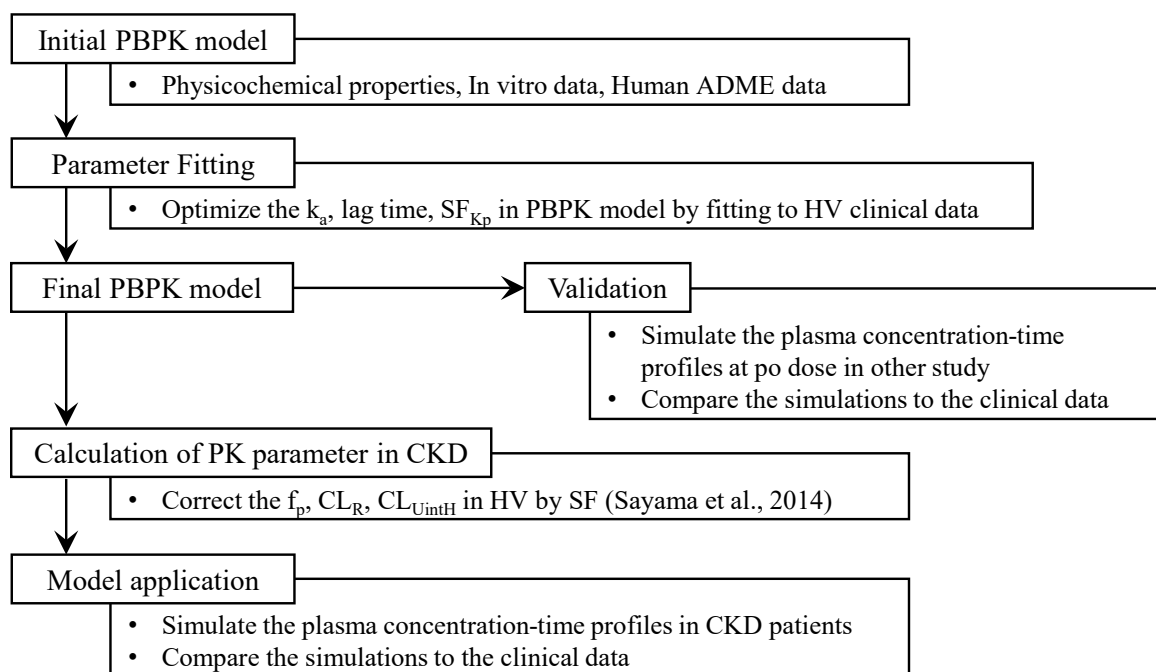


Figure 17 Workflow for the construction, validation and application of a PBPK model for SH compounds in CKD patients.

当研究では、Sayama らが報告した PBPK モデル⁴⁵に消化管コンパートメントを F_a 、 k_a 及び t_{lag} でつなぎ、経口投与時の血漿中濃度推移を表現可能な PBPK モデルとした (Figure 11)。PBPK モデルは Phoenix WinNonlin、version 6.3 (Certara、Princeton、NJ、USA) を用いて構築した。すなわち肺、脂肪、骨、脳、心臓、骨格筋、腎臓、脾臓、肝臓、皮膚及び小腸の 11 組織から構成され、それぞれのコンパートメントを生理的な組織血流量により静脈及び動脈コンパートメントで結んだ。各コンパートメントでは血流律速が仮定された。投与部位である消化管、小腸、その他の非消失臓器、消失臓器である肝臓及び腎臓コンパートメントにおける微分方程式はそれぞれ式 4-9～4-13 で表された。

$$\frac{dX_G}{dt} = -X_G \cdot k_a \quad (\text{式 4-9})$$

$$\frac{dC_{SI}}{dt} \cdot V_{SI} = Q_{SI} \cdot \left(C_a - \frac{C_{SI}}{K_{pSI/R_B}} \right) + X_G \cdot k_a \quad (\text{式 4-10})$$

$$\frac{dC_T}{dt} \cdot V_T = Q_T \cdot \left(C_a - \frac{C_T}{K_{pT/R_B}} \right) \quad (\text{式 4-11})$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_H}{dt} \cdot V_H = & Q_T \cdot C_a + Q_{SP} \cdot \frac{C_{SP}}{K_{pSP/R_B}} + Q_{SI} \cdot \frac{C_{SI}}{K_{pSI/R_B}} \\ & - (Q_H + Q_{SP} + Q_{SI}) \cdot \frac{C_H}{K_{pH/R_B}} - \frac{f_P}{R_B} \cdot CL_{UintH} \cdot \frac{C_H}{K_{pH/R_B}} \end{aligned} \quad (\text{式 4-12})$$

$$\frac{dC_R}{dt} \cdot V_R = Q_R \cdot \left(C_a - \frac{C_R}{K_{pR/R_B}} \right) - CL_R \cdot C_a \quad (\text{式 4-13})$$

V は組織容量、 Q は組織血流量、 C は濃度、 X は量を表し、 T は組織、 a は動脈、 H は肝臓、 SP は脾臓、 SI は小腸、 R は腎臓、 G は投与部位である消化管コンパートメントを表す。各組織の K_p は $\log P$ 、 pK_a 、 $f_{p,HV}$ から Rodgers らの TC モデル (式 4-14) にて算出した^{46,47}。

$$K_p = \left[f_{EW} + \frac{1+10^{pK_a-pH_{IW}}}{1+10^{pK_a-pH_p}} \cdot f_{IW} + \frac{10^{\log P}}{1+10^{pK_a-pH_p}} \cdot f_{NL} \right] \cdot f_p + \frac{0.3 \cdot 10^{\log P} + 0.7}{1+10^{pK_a-pH_p}} \cdot f_{NP} + K_{aPR} \cdot [PR]_T \quad (\text{式 4-14})$$

f は組織中の各組成コンパートメント容量 (IW : intracellular water、 EW : extracellular water、 NL : neutral lipids、 NP : neutral phospholipids)、 $[PR]_T$ は組織中タンパク濃度 (albumin)、 K_{aPR} は薬物のそれぞれのタンパクへの結合定数を表す。 K_p を次式に代入しヒトの V_{ss} を予測した。

$$V_{ss} = V_B \cdot R_B + \sum V_{T,i} \cdot K_{p,i} \quad (\text{式 4-15})$$

V_B は血液容量を、 $V_{T,i}$ は*i* 番目の組織における組織容量を表す。また SF_{Kp} はヒトにおける予測及び実測の V_{SS} の相違から次式により算出された。

$$SF_{Kp} = \frac{V_{SS,in vivo} - V_B \cdot R_B}{\sum V_{T,i} \cdot K_{p,i}} \quad (\text{式 4-16})$$

得られた SF_{Kp} をすべての組織に適用することにより、次式を用いてヒトの V_{SS} を算出した⁴⁵。

$$V_{SS} = V_B \cdot R_B + \sum V_{T,i} \cdot SF_{Kp} \cdot K_{p,i} \quad (\text{式 4-17})$$

次に Phoenix WinNonlin を用いて HV における各化合物の血漿中濃度を PBPK モデルに当てはめることで k_a 、 t_{lag} 及び SF_{Kp} を最適化し、PBPK モデルを構築した。なおチオール化合物は生体内においてチオール基を有する内因性のタンパク質などと SS 結合することが知られているが、その可逆性を考慮し、本モデルの組織コンパートメントに結合メカニズムを含めなかった。また dalcetrapib 及び prasugrel を経口投与したヒトの血漿中に未変化体は検出されない。そのため、これらの化合物は生体内で極めて速やかに代謝され、それぞれ dalcetrapib 活性体及び R-138727 を生成すると仮定して、これらの生成過程を PBPK モデルに含めなかった。

次いで、病態時のパラメータである $f_{p,CKD}$ 、 $CL_{U_{intH,CKD}}$ 及び $CL_{R,CKD}$ を PBPK モデルに導入し、CKD 患者の血漿中濃度をシミュレーションした。その際、CKD 患者における K_p は HV と同様の手法で $f_{p,CKD}$ を用いて再計算した。予測された HV 及び CKD 患者の血漿中濃度から C_{max} 、AUC 及び $t_{1/2}$ などの PK パラメータを Phoenix WinNonlin のノンコンパートメント解析で算出した。また HV の C_{max} 、AUC 及び $t_{1/2}$ に対する CKD 患者の比（それぞれ C_{max} ratio、AUC ratio 及び $t_{1/2}$ ratio）を次式に従い算出した。

$$C_{max} \text{ ratio} = C_{max, moderate \text{ or } severe CKD} / C_{max, HV} \quad (\text{式 4-18})$$

$$AUC \text{ ratio} = AUC_{moderate \text{ or } severe CKD} / AUC_{HV} \quad (\text{式 4-19})$$

$$t_{1/2} \text{ ratio} = t_{1/2, moderate \text{ or } severe CKD} / t_{1/2, HV} \quad (\text{式 4-20})$$

4-4. PBPK モデルの検証

構築した PBPK モデルを検証するために、CKD 患者に投与した用量とは異なる用量、すなわち captopril、tiopronin、dalcetrapib 及び prasugrel をそれぞれ 50、750、900 及び 15 mg の用量で投与した HV における captopril、tiopronin、dalcetrapib 活性体及び R-138727 の血漿中濃度をシミュレーション

した。次にそれぞれの C_{\max} 、AUC 及び $t_{1/2}$ を算出し、実測値^{28,52-54}と比較した。

4-5. PBPK モデルの感度分析

HV において生理学的パラメータのばらつきが化合物の AUC に与える影響を確認するために、感度分析を行った。体内において化合物の消失に関わる臓器である肝臓及び腎臓、体内に占める割合が大きい筋肉、脂肪に加え、皮膚及び脳における組織血流量及び容量を変動パラメータに選択した。併せて CKD 病態時の血漿中濃度推移を予測する際に SF で補正するパラメータである CL_{intH} 及び CL_R を選択し、これらを $\pm 30\%$ 変動させた際の曝露への影響を確認した。個々のパラメータが AUC に与える影響は以下の式を用いて検討した。

$$SA\% = \frac{AUC_{\pm 30\%} - AUC_{\text{Optimized}}}{AUC_{\text{Optimized}}} \times 100\% \quad (\text{式 4-21})$$

謝辞

本研究に際し、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、本論文をまとめる機会を提供してくださいました大阪薬科大学 大学院薬学研究科 臨床薬学教育研究センター 岩永 一範 教授に謹んで深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、幾多の有用なコメントをいただきました大阪薬科大学 薬剤学研究室 永井 純也 教授、臨床薬学教育研究センター 中村 任 教授並びに薬学教育研究センター 宮崎 誠 教授に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、研究者としての道筋をお示し頂き、論文投稿の機会を与えてくださった日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 高槻リサーチセンター 薬物動態研究所 元副所長 小村 弘 博士（現 大阪市立大学 URA センター）、学位取得の機会を作って頂き、ご助言、激励を賜りました薬物動態研究所 所長 野村 幸広 氏に心より感謝いたします。

本研究に対して特段のご高配を賜りました日本たばこ産業株式会社 執行役員 医薬総合研究所 所長 大川 滋紀 博士、薬物動態研究所 前所長 小粥 基弘 氏、副所長 谷口 寿生 氏、副所長 伊東 惣一郎 博士に感謝の意を表します。

本研究において貴重なご助言及びご協力を戴きました日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 高槻リサーチセンター 薬物動態研究所 石川 智弘 氏、元研究員 佐山 裕行 博士（現 アステラス製薬株式会社）、薬物動態研究所の皆様に深く感謝いたします。

最後に、これまで私を温かく見守り、励まし、思う存分研究に専念できる環境を与えてくれた妻と子供たちに心より感謝いたします。

参考文献

1. Baillie T. A., Targeted Covalent Inhibitors for Drug Design. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55, 13408–13421 (2016).
2. Lonsdale R., Ward R. A., Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* 47, 3816–3830 (2018).
3. Bauer R. A., Covalent inhibitors in drug discovery: From accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* 20, 1061–1073 (2015).
4. Park B. K., Kitteringham N. R., Maggs J. L., Pirmohamed M., Williams D. P., The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 177–202 (2005).
5. Lee W. M., Drug-induced hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 349, 474–485 (2003).
6. Park B. K., Grabowski P. S., Yeung J. H. K., Breckenridge A. M., Drug protein conjugates--I. A study of the covalent binding of [¹⁴C]captopril to plasma proteins in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1755–60 (1982).
7. Harada D., Naito S., Otagiri M., Kinetic analysis of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and albumin through the formation of mixed disulfides in human and rat serum in vitro. *Pharm. Res.* 19, 1648–54 (2002).
8. Narazaki R., Harada K., Sugii A., Otagiri M., Kinetic analysis of the covalent binding of captopril to human serum albumin. *J. Pharm. Sci.* 86, 215–9 (1997).
9. Campbell C. L., Berger P. B., Nuttall G. A., Orford J. L., Santrach P. J., Oliver W.C., Ereth M. H., Thompson C. M., Murphy M. K., McGlassen D. L., Schrader L. M., Steinhubl S. R., Can N-acetylcysteine reverse the antiplatelet effects of clopidogrel? An in vivo and vitro study. *Am. Heart J.* 150, 796–799 (2005).
10. Algaier I., Jakubowski J. A., Asai F., von Kügelgen I., Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1908–1914 (2008).
11. Leung L., Yang X., Strelevitz T. J., Montgomery J., Brown M. F., Zientek M. A., Banfield C., Gilbert A. M., Thorarensen A., Dowty M. E., Clearance prediction of targeted covalent inhibitors by in vitro-in vivo extrapolation of hepatic and extrahepatic clearance mechanisms. *Drug Metab. Dispos.* 45, 1–7 (2017).

12. Shibata Y., Chiba M., The role of extrahepatic metabolism in the pharmacokinetics of the targeted covalent inhibitors afatinib, ibrutinib, and neratinib. *Drug Metab. Dispos.* 43, 375–384 (2015).
13. De Nicola L., Zoccali C., Chronic kidney disease prevalence in the general population: Heterogeneity and concerns. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31, 331–335 (2016).
14. Hill N. R., Fatoba S. T., Oke J. L., Hirst J. A., O’Callaghan C. A., Lasserson D. S., Hobbs F. D. R., Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11, e0158765 (2016).
15. Dreisbach A. W., The influence of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Clin. Pharmacol. Ther.* 86, 553–556 (2009).
16. Nolin T. D., Naud J., Leblond F. A., Pichette V., Emerging evidence of the impact of kidney disease on drug metabolism and transport. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 898–903 (2008).
17. Zhao P., Vieira M de LT, Grillo J. A., Song P., Wu T-C., Zheng J. H., Arya V., Berglund E. G., Atkinson Jr A. J., Sugiyama Y., Pang K. S., Reynolds K. S., Abernethy D. R., Zhang L., Lesko L. J., Huang S.-M., Evaluation of Exposure Change of Nonrenally Eliminated Drugs in Patients With Chronic Kidney Disease Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation. *J. Clin. Pharmacol.* 52, 91S-108S (2012).
18. Hsueh C.H., Hsu V., Zhao P., Zhang L., Giacomini K. M., Huang S. M., PBPK Modeling of the Effect of Reduced Kidney Function on the Pharmacokinetics of Drugs Excreted Renally by Organic Anion Transporters. *Clin. Pharmacol. Ther.* 103, 485–492 (2018).
19. Sayama H., Takubo H., Komura H., Kogayu M., Iwaki M., Application of a physiologically based pharmacokinetic model informed by a top-down approach for the prediction of pharmacokinetics in chronic kidney disease patients. *AAPS J.* 16, 1018–1028 (2014).
20. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry Pharmacokinetics in Patients with Impaired Renal Function — Study Design , Data Analysis , and Impact on Dosing. (2020). (<https://www.fda.gov/media/78573/download>).
21. Okamoto H., Yonemori F., Wakitani K., Minowa T., Maeda K., Shinkai H., A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuate atherosclerosis in rabbits. *Nature* 406, 203–207 (2000).
22. Bentley D., Young A.-M., Rowell L., Gross G., Tardio J., Carlile D., Evidence of a drug-drug interaction linked to inhibition of ester hydrolysis by orlistat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60, 390–6 (2012).

23. Gross G., Tardio J., Kuhlmann O., Solubility and stability of dalcetrapib in vehicles and biological media. *Int. J. Pharm.* 437, 103–109 (2012).
24. Shimada K., Mitamura K., Derivatization of thiol-containing compounds. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 659, 227–41 (1994).
25. Kuhlmann O., Heinig K., Dalcetrapib pharmacokinetics and metabolism in the cynomolgus monkey. *Xenobiotica* 41, 430–436 (2011).
26. Derks M., Busse-Reid R., Kuhlmann O., Paehler A., [¹⁴C]-dalcetrapib ADME following a single oral dose in healthy male subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87, S9–S37 (2010).
27. Husser C., Pähler A., Seymour M., Kuhlmann O., Schadt S., Zell M., Profiling of dalcetrapib metabolites in human plasma by accelerator mass spectrometry and investigation of the free phenothiol by derivatisation with methylacrylate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 152, 143–154 (2018).
28. Farid N.A., Smith R.L., Gillespie T.A., Rash T.J., Blair P.E., Kurihara A., Goldberg M. J., The disposition of prasugrel, a novel thienopyridine, in humans. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1096–1104 (2007).
29. Derks M., Anzures-Cabrera J., Turnbull L., Phelan M., Safety, tolerability and pharmacokinetics of dalcetrapib following single and multiple ascending doses in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase I study. *Clin. Drug Investig.* 31, 325–335 (2011).
30. Khoo S. M., Edwards G. A., Porter C. J. H., Charman W. N., A conscious dog model for assessing the absorption, enterocyte-based metabolism, and intestinal lymphatic transport of halofantrine. *J. Pharm. Sci.* 90, 1599–1607 (2001).
31. Ichihashi T., Kinoshita H., Takagishi Y., Yamada H., Effect of oily vehicles on absorption of mepitiostane by the lymphatic system in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 560–4 (1992).
32. Charman W. N. A., Stella V. J., Estimating the maximal potential for intestinal lymphatic transport of lipophilic drug molecules. *Int. J. Pharm.* 34, 175–178 (1986).
33. Takubo H., Ishikawa T., Kuhlmann O., Nemoto H., Noguchi T., Nanayama T., Komura H., Kogayu M., Pharmacokinetics and disposition of dalcetrapib in rats and monkeys. *Xenobiotica* 44, 1117–1126 (2014).
34. Hartmann G., Kumar S., Johns D., Gheyas F., Gutstein D., Shen X., Burton A., Lederman H., Lutz R., Jackson T., Chavez-Eng C., Mitra K., Disposition into Adipose Tissue Determines Accumulation and Elimination Kinetics of the Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibitor Anacetrapib in Mice. *Drug Metab. Dispos.* 44, 428–434 (2016).

35. Wetterau J. R., Zilversmit D. B., Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 875, 610–7 (1986).
36. Arai T., Yamashita S., Hirano K-I., Sakai N., Kotani K., Fujioka S., Nozaki S., Keno Y., Yamane M., Shinohara E., et al., Increased plasma cholesteryl ester transfer protein in obese subjects. A possible mechanism for the reduction of serum HDL cholesterol levels in obesity. *Arterioscler. Thromb. a J. Vasc. Biol.* 14, 1129–36 (1994).
37. Tsutsumi K., Hagi A., Inoue Y., The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 579–581 (2001).
38. Heald A. F., Ita C. E., Singhvi S. M., Migdalof B. H., Tissue distribution of ¹⁴C- and ³⁵S-captopril in rats after intravenous and oral administration. *Xenobiotica.* 15, 51–6 (1985).
39. Cushman D. W., Cheung H. S., Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 250, 261–5 (1971).
40. Chiba T., Kitoo H., Toshioka N., [Studies on thiol and disulfide compounds. I. Absorption distribution metabolism and excretion of ³⁵S-2-mercaptopropionylglycine]. *Yakugaku Zasshi* 93, 112–8 (1973).
41. ファイザー株式会社、チオラ医薬品インタビューフォーム（2015 年改訂版）
(<https://www.pmda.go.jp/drugs/2002/P200200023/index.html>)
42. Hagihara K., Kurihara A., Kawai K., Kazui M., Takahashi M., Kawabata K., Farid N. A., Ikeda T., Absorption, distribution and excretion of the new thienopyridine agent prasugrel in rats. *Xenobiotica* 37, 788–801 (2007).
43. 医薬品医療機器総合機構：プラスグレル塩酸塩、エフィエント錠 3.75mg、5mg、申請資料概要（2014 年 3 月）(<https://www.pmda.go.jp/drugs/2014/P201400039/index.html>)
44. Jakoby W. B., “Enzymatic Basis of Detoxication” Vol. 2, 131–140, Academic Press, Inc., London (1980).
45. Sayama H., Komura H., Kogayu M., Iwaki M., Development of a hybrid physiologically based pharmacokinetic model with drug-specific scaling factors in rat to improve prediction of human pharmacokinetics. *J. Pharm. Sci.* 102, 4193–4204 (2013).
46. Rodgers T., Leahy D., Rowland M., Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: Predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J. Pharm. Sci.* 94, 1259–1276 (2005).
47. Rodgers T., Rowland M., Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue

distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *J. Pharm. Sci.* 95, 1238–57 (2006).

48. Duchin K. L., Singhvi S. M., Willard D. A., Migdalof B. H., McKinstry D. N., Captopril kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 31, 452–458 (1982).
49. Carlsson M. S., Denneberg T., Emanuelsson B.-M., Kågedal B., Lindgren S., Pharmacokinetics of 2-Mercaptopropionylglycine (Tiopronin) in Patients with Impaired Renal Function. *Drug Investig.* 7, 101–112 (1994).
50. Phelan M., Anzures-Cabrera J., Carlile D. J., Rowell L., Kuhlmann O., Arold G., Robson R., Bentley D., Effect of hepatic and renal impairment on the pharmacokinetics of dalcetrapib: Altered distribution of the active thiol? *Clin. Pharmacokinet.* 52, 255–265 (2013).
51. Small D. S., Wrishko R. E., Ernest C. S., Ni L., Winters K. J., Farid N. A., Li Y. G., Brandt J. T., Salazar D. E., Borel A. G., Kles K. A., Payne C. D., Prasugrel pharmacokinetics and pharmacodynamics in subjects with moderate renal impairment and end-stage renal disease. *J. Clin. Pharm. Ther.* 34, 585–94 (2009).
52. Onoyama K., Hirakata H., Iseki K., Fujimi S., Omae T., Kobayashi M., Kawahara Y., Blood concentration and urinary excretion of captopril (SQ 14,225) in patients with chronic renal failure. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 3, 456–9 (1981).
53. Carlsson M. S., Denneberg T., Emanuelsson B. M., Kågedal B., Lindgren S., Steady-State Pharmacokinetics of 2-Mercaptopropionylglycine (Tiopronin) in Healthy Volunteers and Patients with Cystinuria. *Drug Investig.* 7, 41–51 (1994).
54. Derks M., Kawamura H., Abt M., Meneses-Lorente G., Phelan M., Ishikawa T., Effects of Food Intake on the Pharmacokinetic Properties of Dalcetrapib: Findings From Three Phase I, Single-Dose Crossover Studies in Healthy Volunteers. *Clin. Ther.* 33, 754–765 (2011).
55. Davies B., Morris T., Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* 10, 1093–5 (1993).
56. Carlsson S. M., Denneberg T., Emanuelsson B.-M., Kågedal B., Lindgren S., Pharmacokinetics of intravenous 2-mercaptopropionylglycine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38, 499–503 (1990).
57. Leblond F. A., Petrucci M., Dubé P., Bernier G., Bonnardeaux A., Pichette V., Downregulation of intestinal cytochrome P450 in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1579–1585 (2002).
58. Naud J., Michaud J., Boisvert C., Desbiens K., Leblond F. A., Mitchell A., Jones C., Bonnardeaux A., Pichette V., Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J. Pharmacol.*

Exp. Ther. 320, 978–985 (2007).

59. Kobayashi S., Uchida E., Oguchi K., Yasuhara H., Koshikawa S., Akizawa T., et al., Pharmacokinetic Study of Rilimazafone Hydrochloride in patients with Chronic Renal Failure. *Rinsho yakuri/Japanese J. Clin. Pharmacol. Ther.* 23, 573–580 (1992).
60. 共和薬品株式会社 リスミー錠 添付文書（2019 年改訂版）. 1-4 (2019) (<https://www.amed-di.com/medical/di/download?type=1&pid=1355&id=0>)
61. Williams E. T., Jones K. O., Ponsler G. D., Lowery S. M., Perkins E. J., Wrighton S. A., Ruterbories K. J., Kazui M., Farid N. A., The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1227–1232 (2008).
62. Rehm J. L. F., Eckstein J. A., Farid N. A., Heim J. B., Kasper S. C., Kurihara A., Wrighton S. A., Ring B. J., Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.* 34, 600–7 (2006).
63. Hagihara K., Kazui M., Ikenaga H., Nanba T., Fusegawa K., Izumi T., et al., Ikeda T., Kurihara A., The intestine as an important contributor to prasugrel active metabolite formation in vivo. *Drug Metab. Dispos.* 39, 565–570 (2011).
64. Deray G., Bagnis C., Brouard R., Necciari J., Leenhardt A. F., Raymond F., et al., Baumelou A., Clopidogrel activities in patients with renal function impairment. *Clin. Drug Investig.* 16, 319–28 (1998).
65. 医薬品医療機器総合機構：硫酸クロピドグレル、プラビックス錠 25mg、75mg、申請資料概要（2006 年 1 月）(<https://www.pmda.go.jp/drugs/2006/P200600005/index.html>)
66. Naud J., Michaud J., Leblond F. A., Lefrancois S., Bonnardeaux A., Pichette V., Effects of Chronic Renal Failure on Liver Drug Transporters. *Drug Metab. Dispos.* 36, 124–128 (2008).
67. Wall S. B., Oh J. Y., Diers A. R., Landar A., Oxidative modification of proteins: An emerging mechanism of cell signaling. *Front. Physiol.* 3 SEP, 1–9 (2012).
68. Poole L. B., The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 80, 148–57 (2015).
69. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275 (1951).
70. Masumoto H., Hashimoto K., Hakusui H., Takaichi M., Yokota T., Honda T., et al., Studies on the Pharmacokinetics of Ebselen in Rats (1): Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion after Single

Oral Administration. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 12, 596–609 (1997).

71. Poulin P., Theil F. P., Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J. Pharm. Sci.* 91, 129–156 (2002).
72. De Buck S. S., Sinha V. K., Fenu L. A., Nijssen M. J., Mackie C. E., Gilissen R. A., Prediction of human pharmacokinetics using physiologically based modeling: a retrospective analysis of 26 clinically tested drugs. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1766–80 (2007).

論文目録

1. Hiroaki Takubo, Tomohiro Ishikawa, Olaf Kuhlmann, Hiroyuki Nemoto, Tomoyuki Noguchi, Toyomichi Nanayama, Hiroshi Komura, Motohiro Kogayu
Pharmacokinetics and disposition of dalcetrapib in rats and monkeys
Xenobiotica. 44:1117-26 (2014).
2. Hiroaki Takubo, Toshio Taniguchi, Kazunori Iwanaga, Yukihiro Nomura
Evaluation of the changes in exposure to thiol compounds in chronic kidney disease patients using the PBPK model
Xenobiotica. 51:31-39 (2021).
3. Hiroaki Takubo, Tomohiro Ishikawa, Toshio Taniguchi, Kazunori Iwanaga, Yukihiro Nomura
The influence of multiple oral administration on the pharmacokinetics and distribution profile of dalcetrapib in rats
Xenobiotica. 51:82-87 (2021).