HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	小腸グルクロン酸抱合代謝が医薬品の体内動態に与える影響
Author(s)	古川, 貴子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第6917号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6917
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55796
Type	doctoral thesis
File Information	Takako_Furukawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

小腸グルクロン酸抱合代謝が医薬品の体内動態に与える影響

北海道大学大学院生命科学院

古　川　　貴　子

略語表

AUC	Area under the plasma concentration-time curves
BSA	Bovine serum albumin
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray ionidation
HPLC	High-performance liquid chromatography
LC-MS/MS	High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LC-UV/MS/MS	High-performance liquid chromatography coupled with ultra violet detector and tandem mass spectrometry
MRM	Multiple reaction monitoring
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
PAPS	Adenosin 3’-phosphate 5’-phosphosulfate
SULT	Sulfotransferases
T_{max}	Time taken to reach maximum concentration
UDPGA	Uridine 5’-diphosphate-glucuronic acid
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultra violet detection

目次

序論

本論

第1章　新規カルボン酸化合物の経口バイオアベイラビリティに対する小腸グルクロン酸抱合代謝の影響

1-1.　はじめに

1-2.　実験方法

1-3.　結果

1-4.　考察

第2章　ラットにおける *in vitro* 代謝クリアランスを用いた小腸グルクロン酸抱合代謝の定量的予測

2-1.　はじめに

2-2.　実験方法

2-3.　結果

2-4.　考察

第3章　小腸グルクロン酸抱合代謝活性のヒト, ラット, イヌ, およびサル間の種差に関する検討

3-1.　はじめに

3-2.　実験方法

3-3.　結果

3-4.　考察

総括

謝辞

参考文献

序論

創薬研究開発において，薬物動態が問題となって開発中止となる医薬品は，近年著しく減少したと言われている (Frank and Hargreaves, 2003)。その理由は，多くの薬物の代謝に関与する薬物代謝酵素である CYP の基礎研究が進展し，動物の *in vivo* および *in vitro* 体内動態 (PK) 試験をもとに，非臨床段階でヒト PK の予測が可能になったためである。現在では創薬研究の初期の段階より *in vivo* および *in vitro* PK 試験を行い，ヒトにおいて良好な PK を示すことが期待できる医薬品候補をスクリーニングしている。その結果，近年の医薬品候補化合物は CYP 以外の代謝酵素，特に第Ⅱ相代謝酵素と言われる UGT や SULT により体内から消失する化合物が増加傾向にある (Yokoi, 2009)。しかしながら，CYP 以外の代謝酵素については比較的研究が進んでおらず，化合物のスクリーニング方法やヒト PK の予測方法は十分に確立されていない。

UGT によるグルクロン酸抱合代謝は，カルボキシル基，水酸基，アミンを有する薬物の主要な代謝経路の 1 つである。CYP に次いで多くの薬物の消失に寄与する代謝酵素であり，米国の処方数トップ 200 の医薬品の約 70%が代謝により体内から消失するが，そのうち約 15%が主にグルクロン酸抱合代謝により消失することが知られている (Williams *et al.*, 2004)。UGT は肝や腎に加え小腸にも多く発現し，薬物動態に影響すると考えられている。近年，小腸におけるグルクロン酸抱合代謝が薬物のヒトの経口バイオアベイラビリティ (F) に影響を与えることを示す複数の知見が報告されている (Ritter, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011)。例えば，骨粗鬆症治療薬である raloxifene はヒト F が数%と低いが，その一因は小腸で UGT による初回通過代謝を受けるためと考えられている (Kemp *et al.*, 2002; Mizuma, 2009)。また，小腸コレステロール吸収阻害薬である ezetimibe は，ヒトおよびラットにおいて小腸の UGT により代謝され，血漿中には主にグルクロン酸抱合体として検出されることが報告されている (van Heek *et al.*, 2000; Kosoglou *et al.*, 2005)。また，サプリメントとして広く用いられている resveratrol (Wenzwl *et al.*, 2005)，quercetin (Chen *et al.*, 2005) 等の多くのフラボノイドは，ヒトにおける血漿中濃度が投与量に比して著しく低いことが知られており，その一因は小腸におけるグルクロン酸抱合代謝であることが報告されている (Zhang *et al.*, 2007)。このように，小腸グルクロン酸抱合代謝は医薬品を含む UGT 基質化合物の F を著しく低下させる場合がある。また，ヒト F への影響の程度は明らかにされていないが，フェニル基を有する薬物には小腸に発現する UGT 分子種の基質となる薬物 (acetaminophen, irinotecan, tamoxifen など) が複数報告されている (Wu *et al.*, 2011)。そのため，創薬初期段階で小腸グルクロン酸抱合がヒト体内動態へ与える影響を定量的に予測することは，ヒトにおいて高い F が期待できる医薬品候補を創製するために重要である。しかしながら，小腸グルクロン酸抱合代謝の基質となる化合物の定量的な PK パラメーターの予測方法については，まだあまり議論されていない。

F と消化管代謝の関係は以下の式で表される。

$$F = F_a \times F_g \times F_h$$

F_a は吸収フラクション，F_g は小腸アベイラビリティ，F_h は肝アベイラビリティを表す。F_a と F_g は *in vivo* 実験による分離評価が困難であるため，通常は分離せずに F_aF_g と表される。医薬品候補の F_aF_g と，小腸抽出物を用いた *in vitro* 代謝試験における代謝固有クリアランス (CL_{int}) との相関を調べることは，体内動態の決定因子を明らかにするために重要である。CYP3A の基質である化合物に関しては，F_aF_g と CL_{int} の関係を調べた報告がいくつかある。CYP3A はヒトにおいて肝と小腸の両方で最も多数の薬物の代謝に関与する酵素と考えられている。加藤ら (2003) は CYP3A の基質である 10 個の市販薬を用いて，F_aF_g と肝ミクロソーム中の *in vitro* CYP 代謝固有クリアランス ($CL_{int,CYP}$) との関係を調べ，$CL_{int,CYP}$ が 78 μL/min/mg 以上のとき，F_aF_g が顕著に低くなることを示した。なお，CYP3A 基質の肝ミクロソーム中の $CL_{int,CYP}$ は，小腸ミクロソーム中の $CL_{int,CYP}$ と相関関係にあることが知られている (Komura and Iwaki, 2008; Kadono *et al.*, 2010)。また，門野ら (2010) は，CYP3A の基質である 13 化合物を用いて，ヒトの F_aF_g と小腸ミクロソーム中の $CL_{int,CYP}$ の間に相関があることを見出し (図 序-1)，$CL_{int,CYP}$ から F_g を予測するモデル式である simplified F_g model (SIA モデル) を提案した。

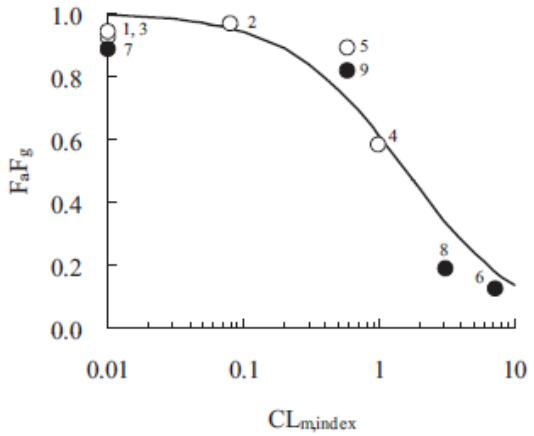


図 序-1. CYP3A 基質の F_aF_g と $CL_{m,\,index}$ (評価化合物とリファレンス化合物の $CL_{int,CYP}$ の比) の関係
曲線は SIA モデルによるフィッティングカーブを示す。

しかし UGT の基質については，小腸でグルクロン酸抱合代謝を受けることが知られている薬物の数が限られているために，同様の検討はまだ十分に行われていない。

筆者は，アステラス製薬で合成された類似構造を有する 3 つの新規カルボン酸化合物が，ラット，イヌ，およびサルにおいて小腸グルクロン酸抱合代謝を受けることを見出した (Furukawa *et al.*, 2012b)。次に，ラットを用いて，構造の異なる複数の UGT 基質の F_aF_g と，小腸ミクロソームを用いて求めた *in vitro* グルクロン酸抱合代謝クリアランス ($CL_{int,UGT}$) との関係を調べ，その関係に SIA モデルを適用し F_g の予測式の構築を検討した (Furukawa *et al.*, 2012a)。さらに，F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の相関関係をヒト，ラット，イヌ，およびサル間で比較した (Furukawa *et al.*, 2013)。これらの結果について以下，順に述べる。

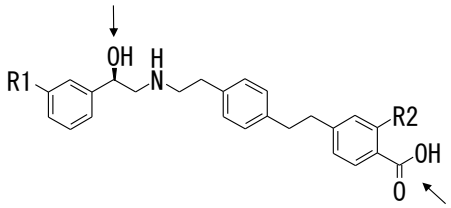
本論

第 1 章　新規カルボン酸化合物の経口バイオアベイラビリティに対する小腸グルクロン酸抱合代謝の影響

1-1. はじめに

カルボン酸は NSAIDs やフィブラート系高脂血症薬など多くの薬物の薬理活性に必須の官能基である。グルクロン酸抱合代謝はカルボン酸の重要な代謝経路であり，特に小腸における代謝は著しい低 F を引き起こす場合があるため，創薬初期段階よりその体内動態の決定要因を調べ，ヒトで高い F を示す可能性が高い化合物を見出すことが求められる。

本研究において筆者は，新規薬物候補として合成された新規カルボン酸化合物 1 とその構造類似体 2, 3 (図 1-1) について，小腸グルクロン酸抱合代謝が F_aF_g に与える影響を調べるために，以下の検討を行った (Furukawa *et al.*, 2012b)。まず，化合物 1–3 のラット，イヌ，サルにおける PK を調べ，F_aF_g を算出した。また，化合物 1 の消失にグルクロン酸抱合が関与しているかを調べるため，ラット胆汁および尿中の代謝物プロファイルを調べた。次に，ラット，イヌ，およびサルの $CL_{int,UGT}$ を算出し，F_aF_g との関係を調べた。



Compound		
1	R1 = CL,	R2 = $OCH_2CH_2(CH_3)_2$
2	R1 = H,	R2 = $OCH_2CH_2(CH_3)_2$
3	R1 = H,	R2 = $OCH_2CH_2CH_3$

図 1-1. 新規カルボン酸化合物 1–3 の構造
矢印はグルクロン酸抱合代謝を受ける可能性のある部位を示す。

1-2. 実験方法

1-2-1. 試薬

化合物 1–3 はアステラス製薬にて合成された。雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット，雄性ビーグル犬，雄性カニクイザル，およびヒトのプール小腸ミクロソーム (それぞれ n = 110, 11, 15, 18) は XenoTech より購入した。UDPGA は Sigma-Aldrich より購入した。NADPH•4Na は Roche Diagnostics より購入した。β-グルクロニダーゼ (Source: *Helix pomatia*, 活性 80000 units/mL) は和光純薬工業より購入した。リコンビナントヒト UGT である Supersomes™ (組み換えバキュロウイルスの導入により，ヒト UGT 1A1, 1A3, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B7, 2B15, 2B17 が発現した昆虫細胞のミクロソーム) は BD Gentest より購入した。その他の試薬は試薬特級または分析

用のグレードを購入した。

1-2-2. 動物

雄性 SD ラット (8 週齢, 約 0.2 kg, 日本チャールズリバー) および雄性ビーグル犬 (約 12 kg, アステラスリサーチテクノロジー) を用いた *in vivo* 試験はアステラスリサーチテクノロジーにて実施した。カニクイザル (約 5 kg, 新日本科学) を用いた *in vivo* 実験は新日本科学にて実施した。本試験は国際医学団体協議会によって策定された「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」に従い, アステラス製薬の動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

1-2-3. ラット, イヌ, およびサルにおける *in vivo* PK 試験

[静脈内および経口投与後の血漿採取]

試験に用いる動物は投与前約 17 時間絶食とし, n = 3 で実施した。化合物は溶液として 1 mg/kg (イヌへの化合物 1 投与時は 0.2 mg/kg, サルへの化合物 2 投与時は 0.5 mg/kg) を静脈内および経口投与した。イヌおよびサルにおいては, 経口投与後 7 日間の休薬期間後に, 同一個体に静脈内投与を行った。血液サンプルは静脈内投与後 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 時間, 経口投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 時間にヘパリン存在下で採取した。血液サンプルは採取後速やかに氷冷し, 16,000 *g*, 4℃ で 2 分間遠心して血漿サンプルを得た。血漿サンプルは LC-MS/MS 分析まで -20°C で保存した。

[ラット尿および胆汁の採取]

ラットの尿および胆汁サンプルは, 胆管カニューレしたラット (n = 2) に化合物 1 を 1 mg/kg 経口投与して得た。コントロールの尿および胆汁サンプルは, 投与溶媒のみを経口投与して得た。尿および胆汁は, 化合物 1 のカルボニル基のグルクロン酸抱合体であるアシルグルクロニドの分解を防ぐために, 尿および胆汁とほぼ同量になるようにあらかじめ 100 mmol/L クエン酸水溶液 (pH 4.7) を添加した容器に, 0–6 時間および 6–24 時間に分けて採取した。サンプルは LC-MS/MS 分析まで -20°C で保存した。

1-2-4. 化合物 1–3 の血漿中濃度測定

血漿サンプルの測定前処理操作は, 化合物 1–3 のアシルグルクロニドの分解を防ぐために 4°C または氷冷下で実施した。血漿 0.03 mL に, 内部標準物質 (IS) を溶解した 50%アセトニトリル溶液 0.03 mL, 0.1%ギ酸-アセトニトリル 0.15 mL を添加した後, 16,000 *g* で 5 分間遠心し, 得られた上清を LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS は Acquity UPLC と Quattro Ultima Triple Quadrupole Mass Spectrometer (いずれも Waters 製) により構成したシステムを用い, 分析カラムは Capcell PAK C18 MG (2.0 × 35 mm, 3 µm, 資生堂製) を用いた。HPLC 条件はカラム温度 40°C, 流速 0.35 mL/min とし, 移動相は A 液 (0.1%ギ酸-10%アセトニトリル水溶液) と B 液 (0.1%ギ酸-90%アセトニトリル水溶液) のグラジェントとした。LC-MS/MS 分析は ESI ポジティブモードでイオン化し, MRM モードで各化合物の検出感度が最大となる条件でイオンを検出した (キャピラリー温度 330°C, 窒素ガス流量 40 psi, ソース電圧 4.5 kV)。各化合物と IS のピークエリア比を算出し, 化合物 1–3 の標準濃度溶液をブランク血漿サンプルに添加して作成し

た検量線を用いて，血漿中未変化体濃度を算出した。

1-2-5. PK 解析

化合物投与後 0 時間から最終採血時点までの AUC (AUC_{0-t})，静脈内投与後の血漿からの全身クリアランス (CL_t) は，アステラス製薬にて構築したプログラムを用いてモデル非依存的解析により算出した。F は経口投与後の AUC_{0-t} を 静脈内投与後の AUC_{0-t} で割ることにより求めた。F_aF_g は式 (1)–(3) を用いて算出した。

$$CL_h = (CL_t/R_b) \times (1 - f_e) \quad (1)$$

$$F_h = 1 - CL_h / Q_h \quad (2)$$

$$F_aF_g = F / F_h \quad (3)$$

CL_h は肝クリアランス，R_b は血液-血漿中濃度比，f_e は静脈内投与後の尿中未変化体排泄率 /100，Q_h は肝血流量を示す。化合物 1–3 は肝代謝および尿中排泄によって体内より消失すると仮定した。化合物 1–3 の f_e は，化合物 1 の静脈内投与後の尿中未変化体排泄率が 1%未満であったことから 0 と仮定した。R_b は一般的に用いられる値である 1 と仮定した。ラット，イヌ，およびサルの Q_h は 58.8, 27.0, および 43.6 mL/min/kg を用いた (Sawada, 1985)。F_h と F_aF_g は，CL_h と F の 3 例の平均値より算出した。

1-2-6. 人工膜透過性評価

人工膜透過性評価 (PAMPA) は，PAMPA Evolution (pION 製) を用いて，pION のプロトコールに従って実施した。すなわち，96 well マイクロタイタープレート (pION 製) と 96 well フィルタープレート (polyvinylidene difluoride，ミリポア製) とで構成され，20% (w/v) ドデカン溶液-レチシン混合液をコートした 125 µm 厚マイクロフィルターディスク (0.45-µm pores，pION 製) を挟んだサンドイッチプレートを用いた。評価化合物の 10 mmol/L DMSO 溶液 0.005 mL を pH 6.5 の緩衝液 (pION 製) で希釈して 50 µM にして，ドナー側に添加した。アクセプター側に pH 7.4 の緩衝液 (pION 製) を添加し，25°C で 2 時間インキュベートした後，ドナー側とアクセプター側のサンプルの UV スペクトル (270–400 nm) を測定した。膜透過係数 (P_{app}) は PAMPA Evolution 付属のソフトウェア (pION 製) を用いて算出した。

1-2-7. 化合物 1 投与後のラット胆汁および尿の LC-UV/MS/MS 分析

化合物 1 投与後のラット胆汁および尿サンプル 0.1 mL にアセトニトリル 100 µL を添加し，30 分間静置した。16000 *g* で 5 分間遠心し，上清をフィルターろ過した後，LC-UV/MS/MS にて分析した。LC-UV/MS/MS は Acquity UPLC (Waters 製)，LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher 製) で構成したシステムを用いた。分析カラムは Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Waters 製) を用い，カラム温度 40°C とした。移動相 A 液 (5 mmol/L ギ酸アンモニウム-5%アセトニトリル水溶液) および B 液 (アセトニトリル) のグラジェントで流速 0.2 mL/min として分析し，未変化体の保持時間が約 11 分になるようにグラジェント条件を調整し

た。UV の検出波長は 284 nm とした。MS/MS 条件は ESI ポジティブイオンモード, キャピラリー温度 330°C, 窒素ガス流量 40 psi, ソース電圧 4.5 kV とした。

1-2-8. 化合物 1 のラット胆汁中代謝物の脱抱合

[β-グルクロニダーゼによる脱抱合]

β-グルクロニダーゼは 0.2% NaCl 水溶液で 1:3 (v/v) の割合で希釈して使用した。ラット胆汁 0.025 mL, β-グルクロニダーゼ 0.02 mL, 100 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.125 mL, 水 0.08 mL を混合した。37°C で 2 時間加温した後, 反応液 0.05 mL を分取し, 0.1%ギ酸-アセトニトリル 0.1 mL と混合して LC-MS/MS サンプルとした。

[アルカリ添加による脱抱合]

化合物 1-アシルグルクロニドのアルカリ加水分解は次のように実施した。ラット胆汁 0.025 mL に 1 mol/L NaOH 0.025 mL を添加し, 37°C で 10 分間加温した後, 1 mol/L HCl 0.025 mL を添加し中和した。これに 100 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.125 mL, 水 0.05 mL を添加した後, サンプル 0.05 mL を分取し, 0.1%ギ酸-アセトニトリル 0.1 mL と混合して LC-MS/MS サンプルとした。

1-2-9. 小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

小腸ミクロソームを用いた *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験は次の条件で実施した。反応液 (1 mL) の組成は, 化合物濃度 0.2 μmol/L, 小腸ミクロソームタンパク濃度 0.1 mg/mL, 50 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 8 mmol/L $MgCl_2$ とし, ミクロソームタンパク 1 mg あたりのアラメチシン濃度は 50 μg/mg とした。37°C で 30 分間プレインキュベーションした後, UDPGA を 2 mmol/L になるように添加して反応開始とした。

小腸ミクロソームを用いた *in vitro* CYP 代謝試験は次の条件で実施した。反応液 (1 mL) は化合物濃度 0.2 μmol/L, 小腸ミクロソームタンパク濃度 0.2 mg/mL, 100 mmol/L Na,K-リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.1 mmol/L EDTA として調整した。37°C で 30 分間プレインキュベーションした後, NADPH を 2 mmol/L になるように添加して反応開始とした。

37°C で加温した後, 反応液 0.05 mL を 3–5 時点サンプリングし, IS を含む 0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液 0.1 mL と混合して反応停止とした。サンプルを 4°C, 16,000 *g* で 5 分間遠心し, 上清を LC-MS/MS 測定用サンプルとした。アッセイは n = 2 で実施した。

1-2-10. CL_{int} の算出

$CL_{int,UGT}$ および $CL_{int,CYP}$ は, 1-2-9 に示した実験における未変化体の残存率の経時変化より, 式 4 を用いて最小二乗法による直線回帰により算出した (Naritomi *et al.*, 2001)。

$$CL_{int}\ (\mu L/min/mg\ protein) = \text{消失速度定数} / \text{ミクロソームタンパク濃度} \qquad (4)$$

1-2-11. リコンビナントヒト UGT を用いた *in vito* グルクロン酸抱合代謝試験

ヒトリコンビナントヒト UGT (Supersomes™) を用いて, BD Gentest のプロトコールに従って化合物 1–3 の *in vito* グルクロン酸抱合代謝試験を実施した。反応液 (0.25 mL) の組成は, 化合物濃度 0.2 μmol/L, Supersomes™ タンパク濃度 0.1 mg/mL, 50 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 5 μg/mL alamethicin, 8 mmol/L $MgCl_2$ とした。37°C で 30 分間プレインキュベーションした後, UDPGA を 2 mmol/L になるように添加し反応を開始した。37°C で 0, 30, および 60 分間加温した後, 反応液 0.05 mL を 0.1%ギ酸-アセトニトリル 0.1 mL と混合して反応停止とした。サンプルを 4°C, 16,000 *g* で 5 分間遠心し, 上清を LC-MS/MS 測定用サンプルとした。アッセイは n = 2 で実施した。

1-3. 結果

1-3-1. 化合物 1–3 のラット, イヌ, およびサルにおける PK パラメーター

いずれの化合物も, F はラット (0.13–0.35) およびサル (0.26–0.44) においては低い値を示した (表 1-1)。F_h および F_aF_g を算出したところ, F_h (ラット 0.74–0.86, サル 0.68–0.87) は比較的高い値であったが, F_aF_g (ラット 0.16–0.47, サル 0.39–0.51) は低い値であった。従って, ラットおよびサルにおける低 F の原因は F_aF_g であると考えられた。一方, イヌの F および F_aF_g は 0.43–0.80 および 0.81–1.0 であり, 他の 2 種に比べ高かった。F_h は他動物種と同様に, イヌにおいても 0.53–0.88 と高かった。

表 1-1. 化合物 1–3 を静脈内および経口投与したときの PK パラメーター

(平均値±標準偏差, n = 3)

Compound	iv				po		
	$AUC_{0\text{-}t}$ (ng·hr/mL)	CL_t (mL/min/kg)	f_e	F_h	$AUC_{0\text{-}t}$ (ng·hr/mL)	F	F_aF_g
Rat							
1	2020 ± 143	8.27 ± 0.61	<0.01	0.86	272 ± 85	0.13 ± 0.04	0.16
2	1100 ± 221	15.5 ± 3.2	NT	0.74	261 ± 73	0.24 ± 0.07	0.32
3	1130 ± 81	14.7 ± 1.0	NT	0.75	399 ± 122	0.35 ± 0.11	0.47
Dog							
1	1330 ± 221*	12.8 ± 2.3	<0.01	0.53	585 ± 247*	0.43 ± 0.13	0.81
2	3080 ± 1675	6.44 ± 2.90	<0.01	0.76	2240 ± 853	0.77 ± 0.11	1.00
3	5830 ± 2192	3.23 ± 1.48	<0.01	0.88	4680 ± 1794	0.80 ± 0.01	0.91
Monkey							
1	1210 ± 220	14.0 ± 2.5	<0.01	0.68	324 ± 139	0.26 ± 0.07	0.39
2	1543 ± 299*	11.1 ± 2.0	<0.01	0.75	462 ± 192*	0.32 ± 0.18	0.43
3	2950 ± 275	5.68 ± 0.51	<0.01	0.87	1280 ± 343	0.44 ± 0.13	0.51

iv: intravenous; po: oral; NT: not tested.
*パラメーターは投与量 1 mg/kg 当たりに換算した。

1-3-2. 人工膜透過性評価

F_aF_g への F_a の寄与を推測するため，化合物 1–3の PAMPA 膜透過性を評価した結果，P_{app} はいずれも $>30 \times 10^{-6}$ cm/s であった。門野ら (2010) は P_{app} が $>1 \times 10^{-6}$ cm/s である化合物は F_a が >0.8 と高いことを報告している。従って，化合物 1–3 の F_a は良好であり，ラットおよびサルにおける低 F_aF_g の主要因は F_g と考えられた。

1-3-3. 化合物 1 のラットにおける代謝物プロファイル

評価化合物の *in vivo* における消失にグルクロン酸抱合代謝が関与しているかを調べるため，化合物 1 をラットに経口投与したときの胆汁および尿中の代謝物プロファイルを調べた。ラット胆汁の LC-UV クロマトグラムには，代謝物ピークが 1 つのみ検出された (図 1-2)。このピークは化合物 1 のグルクロン酸抱合体に相当する m/z の値 (未変化体より m/z が 176 大きい値) を示した。ラット胆汁を β-グルクロニダーゼ処理したところ，この代謝物ピークは消失し，未変化体ピーク

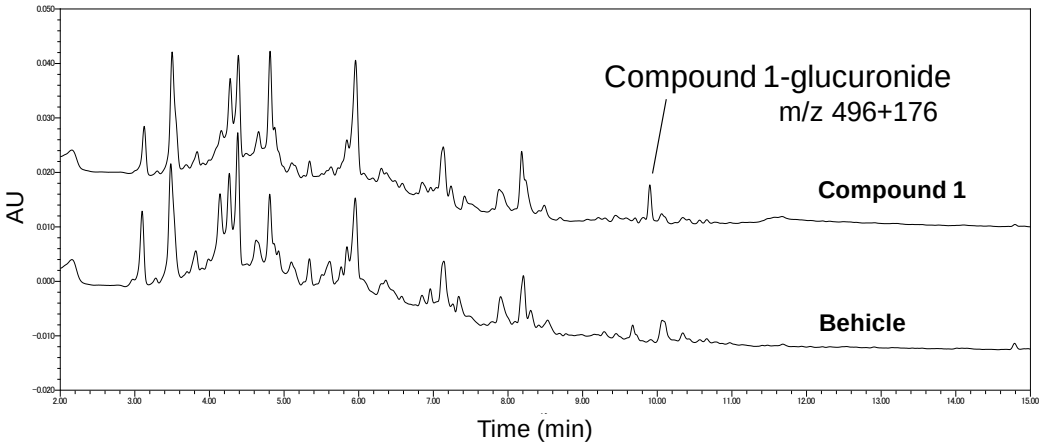


図 1-2. 化合物 1 または投与溶媒のみを投与後 0–6 時間のラット胆汁の LC-UV クロマトグラム

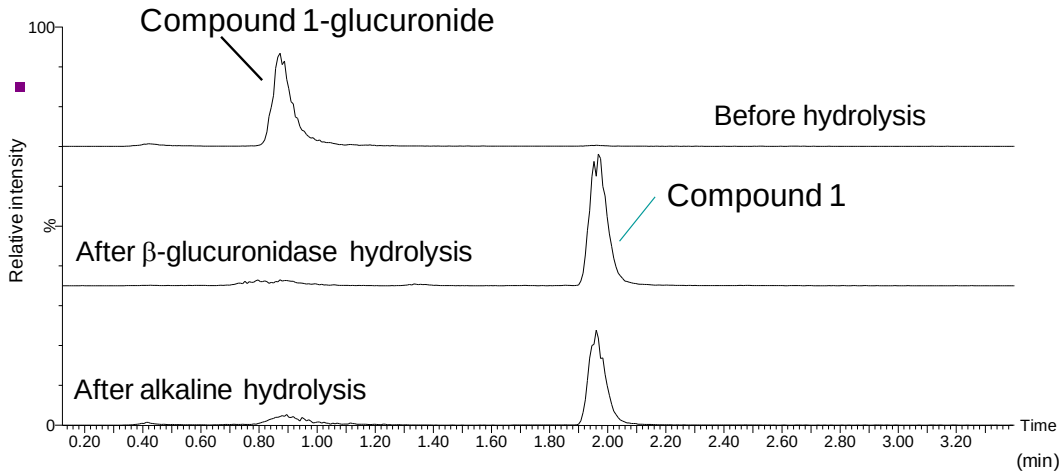


図 1-3. 化合物 1 投与後のラット胆汁中の LC-MS/MS クロマトグラム
MRM モードで m/z 496.2→251.21 および 672.2→251.21 をトレース。

が増大したことから (図 1-3), 代謝物はグルクロン酸抱合体であることが示された。また, 胆汁をアルカリ処理したところ, β-グルクロニダーゼ処理の際と同様に, 代謝物ピークの消失と未変化体ピークの増大が認められた (図 1-3)。水酸基のグルクロン酸抱合体は一般にアルカリに対して安定であるが, アシルグルクロニドは不安定であることから (Tong *et al.*, 2007), 抱合部位はカルボン酸部分と推定された。化合物 2 および 3 の代謝される可能性のある部位は化合物 1 と同じであることから, 化合物 2 および 3 においてもカルボン酸部分がグルクロン酸抱合代謝を受けると推測された。

一方, ラットの尿中には明確な未変化体および代謝物ピークは検出されなかった。

1-3-4. 小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

ラット, イヌ, サル, およびヒト小腸ミクロソームを用いて求めた化合物 1–3 の $CL_{int,UGT}$ を表 1-2 に示した。また, F_aF_g との関係を調べるために, 図 1-4 を作成した。化合物 1–3 のラット $CL_{int,UGT}$ は 184–731 μL/min/mg であり, F_aF_g が低い化合物ほど大きい傾向を示した。イヌ $CL_{int,UGT}$ は 38.3–59.6 μL/min/mg と比較的小さい値であり, F_aF_g が高いという結果を支持していた。サル $CL_{int,UGT}$ は 101–252 μL/min/mg であり, ラットと同様に, 低 F_aF_g であるほど $CL_{int,UGT}$ が高い傾向を示した。

化合物 1–3 はヒトミクロソーム中でも代謝されたが, $CL_{int,UGT}$ (26.9–114 μL/min/mg) はラットおよびサルに比べ小さい値であった。各化合物の反応液中の小腸ミクロソーム中には, グルクロン酸抱合体に相当するピーク (未変化体+176 の m/z) が認められた (データは割愛する)。

表 1-2. 化合物 1–3 の小腸ミクロソーム中 *in vitro* 代謝固有クリアランス

Compound	$CL_{int,UGT}$ (μL/min/mg)				$CL_{int,CYP}$ (μL/min/mg)			
	Rat	Dog	Monkey	Human	Rat	Dog	Monkey	Human
1	731	59.6	252	114	ND	ND	58.9	ND
2	243	44.9	149	68.2	ND	ND	ND	ND
3	184	38.3	101	26.9	ND	ND	ND	ND

ND: no depletion.

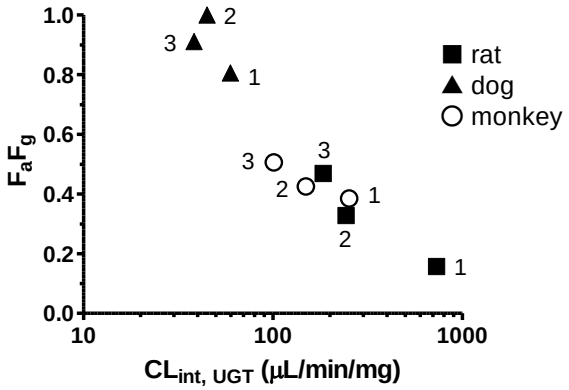


図 1-4. 化合物 1–3 の F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の関係

化合物 1 はラット凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験において CYP 代謝物と推測される N-脱アルキル体が検出されており (アステラス製薬社内資料), 小腸でも CYP 代謝を受ける可能性が考えられたことから, $CL_{int,CYP}$ についても検討した (表 1-2)。化合物 1 のサル $CL_{int,CYP}$ は 58.9 μL/min/mg であり, $CL_{int,UGT}$ の 1/4 程度であった。その他の動物種では化合物の減少は認められなかった。化合物 2, 3 はいずれの動物種においても未変化体の減少は認められなかった。従って, 小腸 CYP 代謝が化合物 1–3 の F_aF_g に与える影響は UGT 代謝に比べ小さいと考えられた。

1-3-5. ヒトリコンビナント UGT を用いた *in vitro* 代謝試験

化合物 1–3 はヒトミクロソーム中でも代謝されたため, ヒト小腸に発現している分子種 (Ohno and Nakajin, 2009) のリコンビナント UGT を用いて, 化合物 1–3 の代謝に寄与する UGT 分子種を調べた。表 1-3 に示すとおり, UGT1A7, 1A8, および 1A9 が高い化合物 1–3 の代謝活性を示した。化合物 1 については UGT1A3 も代謝活性を示した。

表 1-3. ヒトリコンビナント UGT 各分子種による化合物 1–3 の *in vitro* グルクロン酸抱合代謝クリアランス

Compound	$CL_{int,UGT}$ (μL/min/mg)									
	1A1	1A3	1A6	1A7	1A8	1A9	1A10	2B7	2B15	2B17
1	ND	31.5	ND	130	316	132	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	158	27.5	58.9	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	39.0	8.59	30.9	ND	ND	ND	ND

ND: no depletion.

1-4. 考察

小腸グルクロン酸抱合代謝の基質として知られている化合物の多くはフェノール化合物であるが (Wu *et al.*, 2011), カルボン酸である化合物 1 のラット胆汁中の代謝物検索および脱抱合試験の結果より, 主な抱合部位はカルボン酸部位であることが示された。ラット胆汁の LC-UV/MS/MS クロマトグラム上に認められた化合物 1-アシルグルクロニドのピークは, 小腸ミクロソームを用いた *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験の反応液中に検出された抱合体ピークと一致しており (アステラス製薬社内資料), *in vitro* および *in vivo* の代謝部位は同じと考えられた。化合物 1 は水酸基を有しているが, この水酸基はグルクロン酸抱合をほとんど受けないと考えられた。化合物 1–3 は同じ官能基を有する構造類似化合物であることから, 化合物 2 および 3 も化合物 1 と同様にカルボン酸部分がグルクロン酸抱合代謝を受けると推測された。化合物 1–3 と同様に, いくつかのカルボン酸化合物は主にヒト小腸に存在する UGT 分子種 (1A3, 1A7, 1A9, 1A10, および 2B7)

により代謝されることが報告されている (Sakaguchi *et al.*, 2004)。従って, 新薬候補を選択する際には, フェノール化合物だけでなくカルボン酸化合物についても, 小腸グルクロン酸抱合代謝に注意する必要があると考えられる。

化合物 1–3 のラットにおける F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の間には逆相関関係が認められ, $CL_{int,UGT}$ が大きい化合物ほど F_aF_g が小さい傾向が認められた (図 1-4) 。ラットにおいては, Mistry ら (1987) により3つのオピオイド化合物において同様の *in vitro-in vivo* 相関が認められることが報告されている。F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の間に相関関係が認められるという結果は, 小腸グルクロン酸抱合代謝安定性が化合物の F_aF_g の決定因子であることを示している。本研究および Mistry らの研究で用いた化合物は構造類似体であり, 代謝に寄与する UGT 分子種も共通しているために, 良好な相関が得られた可能性が考えられる。F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の関係の汎用性を調べるためには, さらに広範囲な構造の化合物を用いて検討する必要がある。

イヌおよびサルの小腸にも UGT が発現しており, morphine (Bock *et al.*, 2002) や raloxifene (Kosaka *et al.*, 2011) などのいくつかの化合物について, 小腸ミクロソーム中でグルクロン酸抱合代謝を受けることが示されている。一方, *in vivo* の研究は raloxifene (Kosaka *et al.*, 2011) に限られている。イヌにおける化合物 1–3 の $CL_{int,UGT}$ の値は他の動物種に比べ一様に小さく (表 1-2), F_aF_g との相関を検討することはできなかったが, F_aF_g が高い (表 1-1) という結果を支持していた。サルではラットと同様に F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の間に相関が認められたこと (図 1-4), $CL_{int,UGT}$ はラットと同程度の高い値を示し, F_aF_g が低いという結果を支持していたことから, サルにおいても低 F_aF_g の原因は小腸グルクロン酸抱合代謝であると考えられた。しかしながら, 消化管の血流量, UGT の発現量, 化合物の吸収部位などの消化管代謝に影響し得るパラメーターに種差がある場合, F_g と $CL_{int,UGT}$ の関係は動物種ごとに異なる可能性が考えられるため, さらに様々な F_g と $CL_{int,UGT}$ の値を示す複数の化合物を用いて, 動物種ごとに *in vitro-in vivo* の関係を調べる必要があるだろう。

化合物1–3はヒト小腸ミクロソーム中でも代謝されたが, $CL_{int,UGT}$ はラットおよびサルに比べ小さな値であった。中でも化合物 3 の $CL_{int,UGT}$ は 26.9 μL/min/mg と小さいことから, 高い F_aF_g が期待される。最近, 西牟田ら (2011) は, $CL_{int,UGT}$ と PAMPA の P_{app} からヒト F_g を予測する式 5 を提案した。

$$F_g = 0.011 \cdot P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm/s}) / (0.011 \cdot P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm/s}) + CL_{int,UGT}) \quad (5)$$

式 5 により化合物 3 の F_g を算出したところ, 0.92 と算出された。この結果からも, 化合物 3 はヒト F_aF_g が高いことが期待される。しかしながら, 彼らの研究は, 予測方法を構築するために用いたモデル化合物が 5 つと少ないことに加え, モデル化合物の F_g, $CL_{int,UGT}$, および P_{app} の値が同程度であることから, さらに多くの化合物を用いた検証が必要であろう。

化合物 1–3 と同様に, UGT 基質にはしばしば顕著な PK パラメーターの種差が認められる。例えば, raloxifene の F はヒトでは 2%と著しく低いが (Kemp *et al.*, 2002), ラットでは比較的良好 (39%) であり, この F の種差は F_aF_g の種差に起因することが報告されている (Kosaka *et al.*, 2011)。ヒトにおいて raloxifene の代謝に主に寄与している UGT1A10 がラットでは欠損している

ことが, この種差の原因であると考えられている (Jeong *et al.*, 2005)。また Soars ら (2001) は, UGT1A1 と 2B7 の基質について, 肝ミクロソーム中での $CL_{int,UGT}$ はイヌの方がヒトより 1 桁大きいことを示した。これらの知見より, UGT 基質の代謝安定性の種差は, 各 UGT 分子種の発現量の種差に起因する可能性が考えられる。化合物 1–3 は主として UGT1A7, 1A8, および 1A9 により代謝された (表 1-3)。UGT1A7, 1A8, および 1A9 はアミノ酸配列の相同性が高く, 基質特異性も顕著にオーバーラップしていることが知られている (Gong *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2005)。UGT1A7, 1A8, および 1A9 の mRNA 発現量は, ヒトにおいては全 UGT 分子種の 5%未満と低い (Ohno and Nakajin, 2009) が, ラットにおいては 27% (Shelby *et al.*, 2003), サルにおいては 38% (Nishimura *et al.*, 2009) と高レベルに発現していることが報告されている。筆者が知る限り, イヌでは小腸における UGT の mRNA 発現レベルの網羅的解析は報告されていないが, このような UGT 分子種の発現の種差が化合物 1–3 の F_aF_g および $CL_{int,UGT}$ の種差の一因である可能性が考えられる。しかしながら, mRNA の発現量はタンパク発現量を反映していない場合があることに留意する必要がある。それぞれの動物において, どの分子種が小腸におけるグルクロン酸抱合に重要かを明確にするためには, UGT 各分子種の特異的基質や抗体, およびタンパク発現量に関する研究の進展が必要である。

要約すると, 筆者は構造が類似した 3 つの新規カルボン酸化合物が小腸グルクロン酸抱合代謝の基質であること, および, ラット, イヌ, およびサルにおける F_aF_g の決定因子は小腸グルクロン酸抱合代謝であることを見出した。また, 3 化合物はヒト小腸ミクロソーム, およびヒト小腸に発現する UGT 分子種により代謝されることから, ヒト PK も小腸グルクロン酸抱合代謝に影響を受けると考えられた。

第 2 章　ラットにおける *in vitro* 代謝クリアランスを用いた小腸グルクロン酸抱合代謝の定量的予測

2-1. はじめに

第 1 章では, 構造が類似した 3 つのカルボン酸化合物について, 小腸グルクロン酸抱合代謝の基質となること, および, ラットとサルにおいては F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ との間に良好な相関関係があることを見出した。しかしながら, このような *in vitro-in vivo* 相関が異なる構造の化合物間でも成立するかについては, まだ調べられていない。様々な UGT 基質で F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ との間に逆相関が認められれば, その関係に SIA モデルを適用して, $CL_{int,UGT}$ から F_g を予測する式を構築することができる。現在のところ, ヒトで小腸グルクロン酸抱合代謝を受けることが知られている薬物の数は限られているが, ラットにおいては F_aF_g の算出や小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験に加え, 経口投与後の門脈血漿中代謝物濃度測定などの *in vivo* における詳細な検討により, 小腸でグルクロン酸抱合代謝を受けることが直接的に示されている化合物が比較的多く報告されている。ラットを用いた研究は様々な条件での検討が可能であり, ヒト PK のサポートデータを得る手段として有用である。

筆者は, ヒトにおいて $CL_{int,UGT}$ から F_aF_g を予測するための基盤となる情報を得ることを目的として, 様々な構造の 9 市販化合物を用いて, ラットにおける F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ との相関関係を調べることとした (Furukawa *et al.*, 2012a)。さらに, この相関関係を門野ら (2010) が考案した SIA モデルにあてはめて, $CL_{int,UGT}$ から F_aF_g を予測するための式を構築した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

雄性 SD ラットのプール小腸ミクロソームおよび S9 (それぞれ n = 110 および 97 のプール) は XenoTech より購入した。PAPS, ketoprofen, raloxifene, および quercetin は Sigma-Aldrich より購入した。Tolcapone は United States Pharmacopeia より購入した。Telmisartan は LTK Laboratories より購入した。Entacapone, raloxifene 4'-glucuronide (R4'G), raloxifene 6-glucuronide (R6G), ezetimibe phenoxy glucuronide (EPG), および ezetimibe hydroxy glucuronide (EHG) は Toronto Research Chemicals より購入した。Resveratrol は東京化成工業より購入した。Buprenorphine (レペタン注, 0.2 mg) は大塚製薬より購入した。Ezetimibe は AK scientific より購入した。化合物 4 および 5 はアステラス製薬にて合成された。その他の試薬については第 1 章の 1-2-1 に記載した。

2-2-2. 動物

使用した動物については第 1 章の 1-2-2 に記載した。

2-2-3. モデル化合物の選択

F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ との相関関係を調べるために用いるモデル化合物として，ラットにおいて小腸代謝を受けるとの報告がある化合物，またはラットにおける主代謝物がグルクロン酸抱合体である化合物を選択した (表 2-1, 図 2-1)。

2-2-4. ラットにおける *in vivo* PK 試験

[静脈内-経口投与法]

試験方法は第 1 章 1-2-3 に記載した。評価化合物の主消失経路はいずれも尿中排泄ではないため $CL_r = 0$ と仮定し，R_b は実測値を用いた。

[門脈-循環血同時採血法]

試験は Hoffman ら (1995) の方法に従って実施した。化合物は溶液として 1 mg/kg (resveratrol は 3 mg/kg) を経口投与した。血液サンプルは投与後 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 240 分後に，ヘパリン存在下で門脈内および腹大動脈から同時に採取した (各ポイント n = 3 または 4)。血液サンプルの処理は第 1 章 1-2-3 と同様に行った。

2-2-5. 血漿中濃度測定

Resveratrol および quercetin の血漿中濃度測定用サンプル調製は，Meng ら (2004) および Lan ら (2007) の方法を一部改編して実施した。

Resveratrol の濃度測定用サンプルは，血漿 0.1 mL，0.5 mol/L 酢酸 0.01 mL，2 mg/mL アスコルビン酸 0.01 mL，および IS 溶液 0.01 mL を混合し，さらに酢酸エチル 1 mL を添加して混合した。有機層を分取して窒素気流下で溶媒を留去した後，残渣を 50%メタノールに溶解して調製した。

Quercetin の濃度測定用サンプルは，血漿 0.1 mL，0.5 mol/L 酢酸 0.01 mL，2 mg/mL アスコルビン酸 0.01 mL，および IS 溶液 0.01 mL を混合した後，アセトニトリル 0.2 mL を添加して撹拌・遠心し，上清を分取して調製した。

その他の化合物については，血漿 0.03 mL に 50%アセトニトリル 0.03 mL，IS 溶液 0.03 mL，および 0.1%ギ酸-アセトニトリル 0.15 mL を添加した後，16000 *g* で 5 分間遠心し，得られた上清を LC-MS/MS で分析した。サンプル調製は 4°C または氷冷下で実施した。

表 2-1. ラットにおけるモデル化合物の代謝に対するグルクロン酸抱合代謝の寄与

Compounds	Data for intestinal glucuronidation	Enzymes contri--buting to clearance	Reference
Ketoprofen	—	UGT	Palylyk-Colwell and Jamali, 2004
Tolcapone	—	UGT, CYP	Drug Approval Package for Tasmar; Lave *et al.*, 1996
Telmisartan	*In vitro, in vivo*	UGT	Drug Approval Package for Micards; Ebner *et al.*, 1999
Raloxifene	*In vitro*	UGT	Dalvie *et al.*, 2008, Lindstrom *et al.*, 1984
Entacapone	—	UGT	Wikberg *et al.*, 1993; Wikberg and Vuorela, 1994
Resveratrol	*In situ, in vivo*	UGT	Kuhnle *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002
Buprenorphine	*In vitro, in vivo*	UGT, CYP	Mistry and Houston, 1987; Brewster *et al*, 1981
Quercetin	*In vivo*	UGT, SULT	Chen *et al.*, 2005
Ezetimibe	*In vivo*	UGT	van Heek *et al.*, 2000

—: 情報なし。

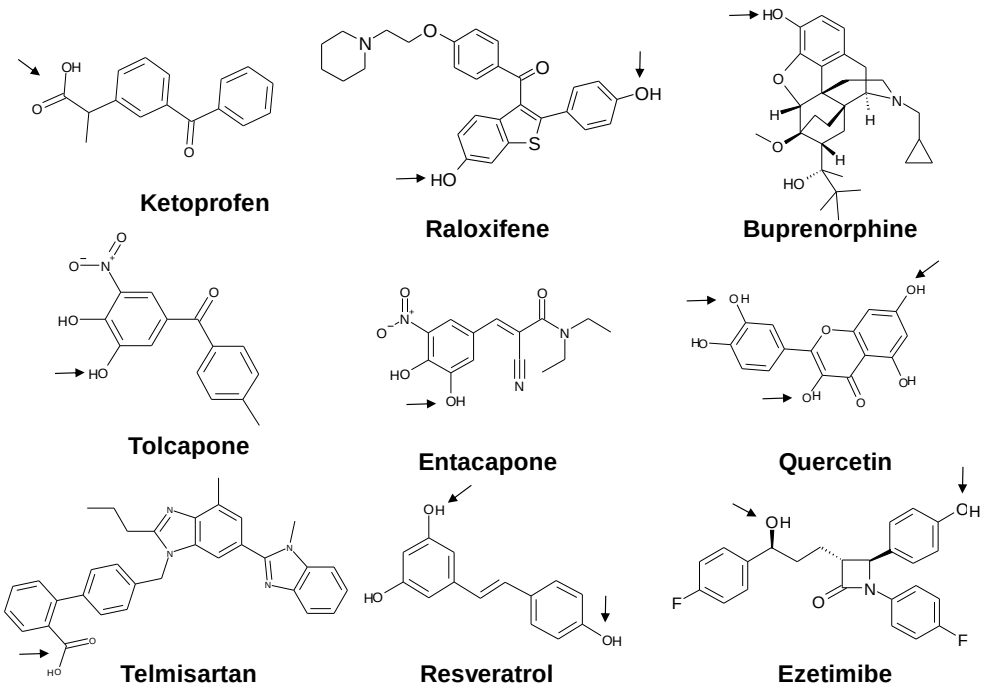


図 2-1. 評価化合物の構造
矢印の位置は抱合代謝部位を示す。代謝部位は Sabolovic *et al.*, 2004 (ketoprofen), Drug Approval Package for Tasmar (tolcapone), Ebner *et al.*, 1999 (telmisartan), Kemp *et al.*, 2002 (raloxifene), Wu *et al.*, 2011 (entacapon, resveratrol, quercetin), Brown *et al.*, 2011 (buprenorphine), van Heek *et al.*, 2000 (ezetimibe) より引用。

2-2-6. LC-MS/MS 分析条件

Raloxifene, resveratrol, および quercetin の測定は LC-VP/LC-20A series (島津製作所製) と API-3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems 製) で構成した LC-MS/MS システムを用いた。その他の化合物の測定は Acquity UPLC と Quattro Ultima Triple Quadrupole Mass Spectrometer (いずれも Waters 製) で構成したシステムを用いた。

HPLC による分離は, カラム温度 40°C, 流速 0.3–0.4 mL/min とし, 移動相は A 液 (0.1%ギ酸-10%アセトニトリル水溶液) と B 液 (0.1%ギ酸-90%アセトニトリル水溶液), または C 液 (10 mmol/L 酢酸アンモニウム-10%アセトニトリル水溶液) と D 液 (10 mmol/L 酢酸アンモニウム-90%アセトニトリル水溶液) のグラジェントで分析した。Resveratrol は 10%メタノールと 70%メタノールのグラジェントで分析した。分析カラムは Capcell PAK C18 MG (2.0 × 35 mm, 3 µm, 資生堂製), Inertsil ODS-4 (2.1 × 30 mm, 3 µm, ジーエルサイエンス製) , Supelco Discovery HS C18 (2.1 × 75 mm, 3 µm, Supelco 製) のいずれかを用いた。LC-MS/MS 分析は ESI ポジティブモードまたはネガティブモードでイオン化し, MRM 条件でイオンを検出した。その他の分析条件は表 2-2 に示した。

表 2-2. LC-MS/MS 分析条件

Compound	IS	Column	Polarity	Monitering ion (precursor > product)
Ketoprofen	Tolmetin	Capcell PAK C18 MG	Positive	255.0 > 208.9
Tolcapone	Diazepam	Inertsil ODS-4	Positive	274.0 > 181.8
Telmisartan	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	515.4 > 497.5
Raloxifene	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	474.3 > 112.0
R4’G	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	650.1 > 474.2
R6G	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	650.1 > 474.2
Entacapone	Diazepam	Inertsil ODS-4	Positive	305.6 > 232.5
Resveratrol	Naringenin	Supelco Discovery HS C18	Negative	227.1 > 185.1
Buprenorphine	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	468.2 > 396.2
Quercetin	Naringenin	Capcell PAK C18 MG	Negative	301.0 > 151.1
Ezetimibe	Diclofenac	Capcell PAK C18 MG	Negative	408.0 > 271.1
EPG	Diclofenac	Capcell PAK C18 MG	Negative	584.0 > 112.9
EHG	Diclofenac	Capcell PAK C18 MG	Negative	584.1 > 447.0
Compound 4	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	504.3 > 131.3
Compound 5	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	532.2 > 404.3

2-2-7. R_b の測定

ヘパリン存在下で採取した血液に, 50 μg/mL 化合物溶液を化合物濃度が 1 μg/mL となるように添加した。37ºC で 20 分間 (quercetin の場合は 5 分間) 加温した後, 全血中濃度測定のためにサンプルを 0.05 mL 分取して 0.1 mL の水を添加した。Quercetin の場合は, 水の代わりに 2 mg/mL のアスコルビン酸を添加した。残りの血液サンプルを 4°C, 1,800 *g* で 10 分間遠心して血漿サンプルを得た。全血および血漿サンプルは 2-2-5 に記載した方法で処理した後, LC-MS/MS 分析を行った。R_b は全血サンプル中濃度／血漿サンプル中濃度として算出した。

2-2-8. PK 解析

静脈内-経口投与法による F_aF_g の算出方法は第 1 章 1-2-5 に記載した。

門脈-循環血同時採血法による F_aF_g の算出は式 6 を用いて行った。

$$F_aF_g = Q_{pv} \times R_b \times (AUC_{pv} - AUC_{sys}) / Dose \qquad (6)$$

門脈血漿中の AUC (AUC_{pv}) および循環血中の AUC (AUC_{sys}) は台形法で算出した。ラットにおける門脈血流量 (Q_{pv}) の値は 39.2 mL/min/kg を用いた (Davies and Morris, 1993)。

2-2-9. 小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

小腸ミクロソームを用いた *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験および CYP 代謝試験の操作方法は, 第 1 章 1-2-9 に示した。反応液からのサンプリング時点は, 反応開始後 0, 10, 20, 30, 45, 60 分間 (resveratrol および quercetin の場合は 0, 1, 2, 5, 10, 20 分間) とした。

2-2-10. 小腸ミクロソームを用いた quercetin の *in vitro* 硫酸抱合代謝試験

反応液 (1 mL) は quercetin 濃度 0.2 μmol/L, 小腸 S9 タンパク濃度 0.1 mg/mL, 10 mmol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) となるよう調整した。37°C で 5 分間加温した後, PAPS を 0.02 mmol/L となるように添加して反応を開始した。37°C で 0, 1, 2, 5, 10 分間加温した後, IS を含む 0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液 0.1 mL と混合して反応停止とした。サンプルを 4°C, 16,000 *g* で 5 分間遠心し, 上清を LC-MS/MS 測定用サンプルとした。アッセイは n = 2 で実施した。

2-2-11. CL_{int} の算出

$CL_{int,UGT}$, $CL_{int,CYP}$, および $CL_{int,SULT}$ (*in vitro* 硫酸抱合代謝固有クリアランス) の算出方法は第 1 章 1-2-10 に示した。

2-2-12. PAMPA アッセイ

PAMPA アッセイの手順は第 1 章 1-2-6 に示した。

2-2-13. ラット $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g の相関関係への SIA モデルの適用

門野ら (2010) は以下の手順で SIA モデルを構築した。F_aF_g は以下の式で表わされる。

$$F_aF_g = CL_{ab} / (CL_{ab} + CL_m) \quad (7)$$

ここで CL_{ab} は吸収クリアランス, CL_m は小腸代謝クリアランスを表わす。消化管膜透過性が高い化合物の場合, $F_a = 1$ と仮定できることから, 式 7 は以下のように表わされる。

$$F_g = CL_{ab} / (CL_{ab} + CL_m) \quad (8)$$

消化管膜透過性が高い化合物の場合, CL_{ab} はどの化合物も一定の値に近づくと仮定すると, 式 8 は以下のように単純化して表わすことができる。

$$F_g = 1 / (1 + A \times CL_m) \quad (9)$$

ここで A は CL_{ab} の逆数であり, 定数として取り扱うことができると仮定する。さらに CL_m は CL_{int} に比例すると仮定すると, 式 9 は以下のように表わされる。

$$F_g = 1 / (1 + \alpha \times CL_{int}) \quad (10)$$

α は empirical scaling factor であり, CL_m と CL_{int} をつなぐ係数および A を含む定数と定義する。

式 10 を, モデル化合物 (buprenorphine と quercetin を除く) の F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の関係にあてはめて α を算出し, ラット F_g の予測式を構築した。式のフィッティングは MULTI (Yamaoka *et al.*, 1981) を用いて最小二乗法で行った。

2-3. 実験結果

2-3-1. モデル化合物を静脈内および経口投与したときの PK パラメーター

化合物を静脈内および経口投与したときの PK パラメーターを表 2-3 に示した。Ketoprofen, tolcapone, telmisartan については, 静脈内および経口投与したときの PK パラメーターより式 1–3 を用いて F_aF_g を算出した。Ketoprofen および tolcapone は F が 0.97 であり, F_aF_g はほぼ 1と算出された。Telmisartan の F は 0.51 であり, F_aF_g は 0.61 と算出された。Raloxifene, entacapone, resveratrol, buprenorphine, quercetin, ezetimibe については, $CL_{t,blood}$ が Q_h を上回っており式 1–3 を適用できないため, 後述する門脈-循環血同時採血法で F_aF_g を算出した。

2-3-2. モデル化合物の門脈-循環血同時採血法における PK パラメーター

Raloxifene, entacapone, resveratrol, buprenorphine, quercetin, ezetimibe については, 門脈-循環血同時採血法で F_aF_g を算出した。AUC_{pv}, AUC_{sys}, および F_aF_g を表 2-3 に示した。Raloxifene および entacapone の F_aF_g はそれぞれ 0.30 および 0.20 と低い値を示した。Resveratrol, buprenorphine, ezetimibe, quercetin の F_aF_g はさらに著しく小さく, 0.01 未満であった。

表 2-3. ラットにおける PK パラメーター

Compound	R_b	CL_t (mL/min/kg)	$CL_{t,blood}$ (mL/min/kg)	F	F_h	AUC_{pv} (ng·min/mL)	AUC_{sys} (ng·min/mL)	F_aF_g
Ketoprofen	1.0[a]	1.14	1.14	0.97	0.98	—	—	0.99
Tolcapone	0.63	6.57	10.4	0.97	0.82	—	—	1.0
Telmisartan	0.61[b]	6.12	10.0	0.51	0.83	—	—	0.61
Raloxifene	1.0	56.2	55.6	0.074	—	8630	973	0.30
Entacapone	0.57	49.5	86.6	0.066	—	23300	14400	0.20
Resveratrol	0.78	195[d]	251	0.38[d]	—	7130	1710	0.055
Buprenorphine	0.60[c]	35.4[c]	59.0	0.14[c]	—	1930	358	0.037
Quercetin	0.68	147[e]	216	0.053[e]	—	5990	2310	0.033
Ezetimibe	0.81	84.9	105	—	—	880	16.4	0.027

[a] 仮定の値; [b]Shimasaki *et al.*, 1999; [c]Mistry *et al.* 1987; [d]Marier *et al.*, 2002; [e]Chen *et al.*, 2005.
—: 未算出または試験未実施。
$CL_{t,blood} = CL_t / R_b$.

2-3-3. ラット F_a および PAMPA 膜透過性

F_aF_g への F_a の寄与を推測するため, モデル化合物について, 文献よりラット F_a を調べた。文献より得た F_a は 0.5 以上であり, 中程度から高い値であった。また, PAMPA アッセイにより膜透過性を調べたところ, ketoprofen, tolcapone, telmisartan, raloxifene, entacapone, resveratrol, ezetimibe の PAMPA 膜透過性は $>1.0 \times 10^{-6}$ cm/s と高く (表 2-4), F_a は 1 に近いと推測された (Kadono *et al.*, 2010)。Buprenorphine および quercetin については, 十分な定量感度を得られなかったため, PAMPA 膜透過性を評価することができなかった。

表 2-4. モデル化合物のラット F_a と PAMPA 膜透過性

Compound	F_a	Reference for F_a	P_{app} in PAMPA ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Ketoprofen	0.99[a]	—	7.0
Tolcapone	0.83[b]	Drug Approval Package for Tasmar	18
Telmisartan	0.79–0.86[c]	Shimasaki *et al.*, 1999	>30
Raloxifene	0.71[b]	Lindstrom *et al.*, 1984	3.0
Entacapone	0.54[b]	Drug Approval Package for Comtan	4.1
Resveratrol	0.77–0.80[b]	Wenzel and Somoza, 2005	1.7
Buprenorphine	0.88–1.0[d]	Mistry and Houston, 1987	Not tested
Quercetin	0.59[e]	Chen *et al.*, 2005	<1.5
Ezetimibe	0.40–0.66[b]	Drug Approval Package for Zetia	>30

[a] 本試験の結果より仮定。 [b] アイソトープ標識化合物を経口投与したときの胆汁および尿中放射能排泄率の合計。 [c] 腸管結紮ループ法によるアイソトープ標識化合物の吸収性。 [d] アイソトープ標識化合物を静脈内および十二指腸内投与したときの PK パラメーターより算出。 [e] 化合物を静脈内および経口投与したときの未変化体および代謝物の PK パラメーターより算出。

2-3-4. 門脈血中のグルクロン酸抱合体濃度推移

消化管でグルクロン酸抱合代謝を受けていることを直接的に示すデータを得るため，門脈-循環血同時採血法検討時の門脈血漿中にグルクロン酸抱合体が検出されるかを調べたところ，評価したすべての化合物で，投与直後から門脈血中にグルクロン酸抱合体に相当するピーク (未変化体より m/z が 176 大きいピーク) が検出された。代表的な小腸グルクロン酸抱合代謝を受ける薬物である ezetimibe と raloxifene については，抱合体の合成標品を用いて門脈血漿中濃度を定量した。T_{max} を含む投与後 5–60 分の未変化体および抱合体の濃度-時間推移を図 2-2 に示した。Ezetimibe については，主代謝物である EPG とマイナー代謝物である EHG (Kosoglou *et al.*, 2005; van Heek *et al.*, 2000) の両方を定量したところ，門脈血漿中には未変化体の 10 倍以上の EPG が検出され，EHG は検出されなかった。Raloxifene については，R4'G と R6G の 2 つの主代謝物 (Kemp *et al.*, 2002) を定量したところ，門脈血漿中の R4'G と R6G を合計した濃度は未変化体を 3–8 倍上回っており，ラットでの主代謝物である R6G の濃度は R4'G を 10 以上上回っていた。

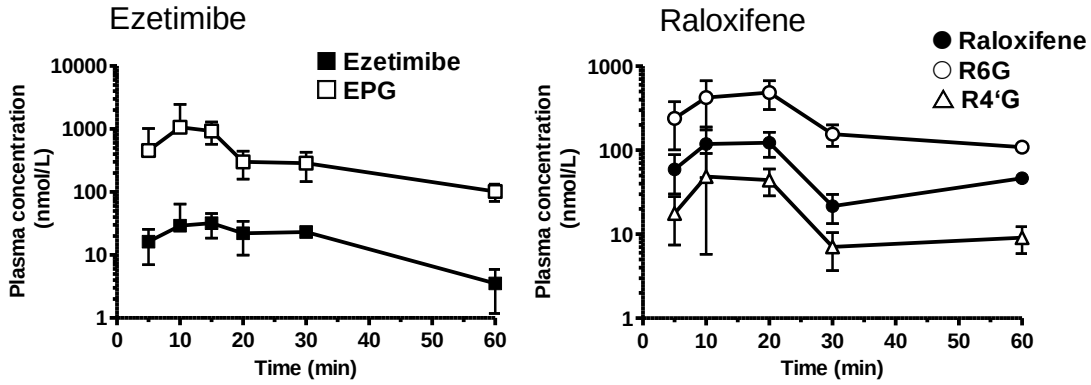


図 2-2. 経口投与後の門脈血漿中の未変化体およびグルクロン酸抱合体の濃度推移
(平均値±標準偏差, n = 3–4)

2-3-5. 小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

モデル化合物のラット小腸ミクロソーム中での $CL_{int,UGT}$ および $CL_{int,CYP}$ を表 2-5 に示した。$CL_{int,UGT}$ は, F_aF_g が <0.1 と著しく低い resveratrol, quercetin, および ezetimibe において高い値を示し, それぞれ 19200, 7940, 1170 μL/min/mg であった。Buprenorphine も F_aF_g が著しく低いが, $CL_{int,UGT}$ は比較的小さく, 95.0 μL /min/mg であった。F_aF_g が 0.2–0.6 と中程度～低い telmisartan, raloxifene, および entacapone の $CL_{int,UGT}$ はそれぞれ 138, 667, および 321 μL/min/mg であった。F_aF_g が 1 である tolcapone および ketoprofen の $CL_{int,UGT}$ は小さかった (57.8 μL/min/mg, no depletion)。$CL_{int,UGT}$ は基質濃度 0.2 μmoL/L および 2 μmoL/L で概ね同じ値を示した (アステラス製薬社内資料)。

表 2-1 に示したとおり, いくつかのモデル化合物は CYP でも代謝されることが報告されているため, 小腸ミクロソーム中の CYP 代謝安定性についても評価した。Buprenorphine の $CL_{int,CYP}$ は 44.7 μL/min/mg であり, $CL_{int,UGT}$ (95.0 μL/min/mg) の約 1/2 の大きさであった。この結果は, UGT に加え CYP が buprenorphine の低 F_aF_g の原因であることを示唆している。他の化合物については明確な減少は認められず, $CL_{int,CYP}$ は算出できなかった。

Quercetin は主代謝経路の一つに硫酸抱合があることから (表 2-1), ラット小腸 S9 を用いて, PAPS 存在下で *in vitro* 硫酸抱合代謝安定性を評価した。その結果, $CL_{int,SULT}$ は 302 μL/min/mg であり, SULT も quercetin の小腸代謝に関与していることが示唆された。

表 2-5. ラット小腸ミクロソームまたは S9 中の *in vitro* 代謝固有クリアランス

Compounds	$CL_{int,UGT}$ (μL/min/mg)	$CL_{int,CYP}$ (μL/min/mg)	$CL_{int,SULT}$ (μL/min/mg)
Ketoprofen	ND	ND	NT
Tolcapone	57.8	ND	NT
Telmisartan	138	ND	NT
Raloxifene	667	ND	NT
Entacapone	321	ND	NT
Resveratrol	19200	ND	NT
Buprenorphine	95.0	44.7	NT
Quercetin	7940	ND	302
Ezetimibe	1170	ND	NT

ND: no depletion; NT: not tested.

2-3-6. ラットにおける F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の相関と F_g 予測式の構築

ラットにおける F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の相関を検討するため，図 2-3 を作成した。*In vitro* 小腸グルクロン酸抱合代謝試験において化合物の減少が認められなかった ketoprofen の $CL_{int,UGT}$ は 10 μL/min/mg と仮定してプロットした。その結果，CYP 代謝を受ける buprenorphine を除いて，評価化合物の F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の間には負の相関が認められた。

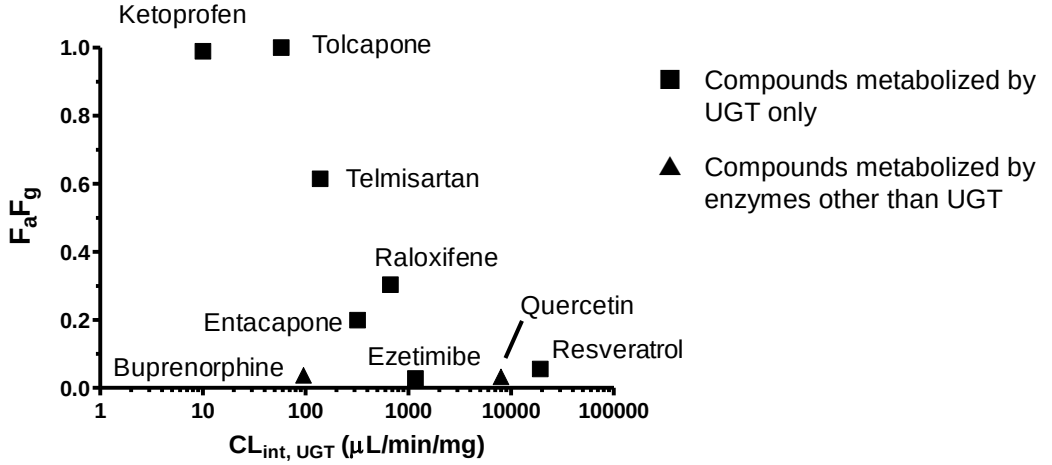


図 2-3. ラットにおける UGT 基質の $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g の関係

得られた相関に対し，門野ら (2010) が提案した SIA モデルの適用を検討した。PAMPA および F_a の文献値より，ほとんどの評価化合物の F_a は良好と推測されることから，$F_aF_g = F_g$ と仮

定した。Buprenorphine と quercetin は小腸ミクロソーム中で UGT だけでなく他の酵素で代謝されたため，SIA モデルを適用するモデル化合物からは除いた。SIA モデルを 7 つのモデル化合物のプロットに当てはめた結果，α は 0.0050 と算出され，得られたフィッティングカーブはモデル化合物の値とよく一致した (図 2-4)。

得られた式の信頼性を検証するため，第 1 章で用いた化合物 1–3 の $CL_{int,UGT}$ を式に代入して予測 F_g を算出した。それに加えて，アステラス製薬で合成された化合物 4 および 5 についても，同様に予測 F_g を算出した。化合物 4 および 5 は化合物 1–3 とは異なる骨格の化学構造を有する UGT 基質であり，代謝部位はそれぞれ水酸基およびカルボン酸である。化合物 4, 5 の PAMPA の P_{app} は 1×10^{-6} cm/sec を上回り，F_a はいずれも良好と推測されることから $F_aF_g = F_g$ とみなすことができる。算出された化合物 1–5 の予測 F_g は，静脈内-経口投与法により実験的に得られた F_aF_g に近い値であった (図 2-4, 表 2-6)。

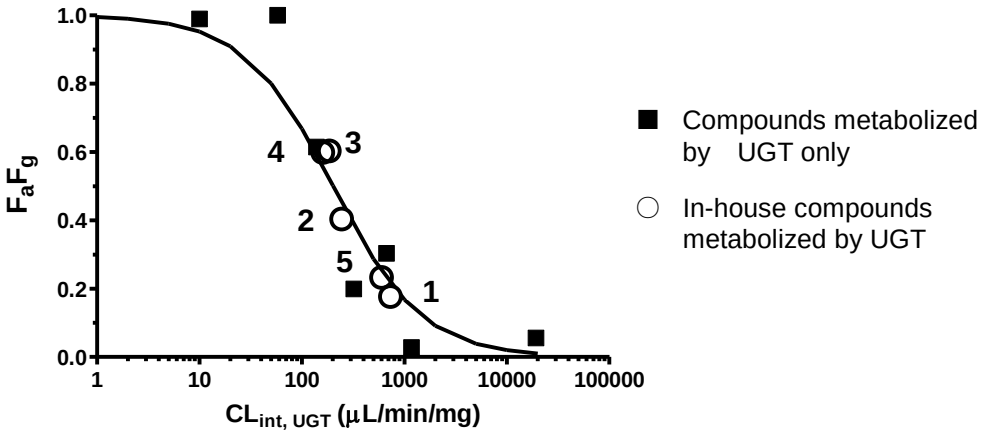


図 2-4. SIA モデルによるフィッティングカーブと化合物 1–5 の $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g の関係

表 2-6. 化合物 1–5 の *in vitro* パラメーター，ラットに静脈内および経口投与したときの PK パラメーター，および予測 F_g

In-house compound	P_{app} in PAMPA ($\times 10^{-6}$ cm/s)	$CL_{int,UGT}$ (mL/min/mg)	R_b	$CL_{t,blood}$ (mL/min/kg)	F	F_aF_g	Predicted F_g
1	>30	731	0.59	14.0	0.13	0.18*	0.22
2	>30	243	0.63	24.5	0.24	0.40*	0.45
3	>30	184	0.60	24.5	0.35	0.60*	0.52
4	22	160	0.50	27.6	0.32	0.60	0.56
5	>30	596	0.70	38.9	0.079	0.23	0.25

*化合物 1–3 の F_aF_g は R_b の実測値を用いて再算出した。

2-4. 考察

第1章にて類似化合物間で認められた F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ との相関は，ラットにおいては様々な構造を有する化合物間でも同様に認められた。本研究では F_aF_g の算出方法の第一選択は，静脈内および経口投与後の PK パラメーターより F_aF_g を求める静脈内-経口投与法とした。第1章でも用いたこの方法は簡便で非侵襲性であるため，創薬初期段階で詳細な検討が難しい場合や，ヒトで F_aF_g を見積もる際に有用である。低 CL_t である ketoprofen, tolcapone, および telmisartan はこの方法を用いて F_aF_g を算出した (表 2-3)。しかし，この方法は CL_t が Q_h を超える化合物の場合は，式 1–3 を適用できないため用いることができない。そこで CL_t が Q_h を超える entacapone, buprenorphine, resveratrol, ezetimibe, raloxifene, quercetin については，直接的に F_aF_g を求めことができる門脈-循環血同時採血法を用いた。門脈-循環血同時採血法は，*in situ* 腸管灌流法などの F_aF_g を調べる他の手法に比べ簡便という利点がある。創薬初期段階で F_aF_g を求める際には，簡便さおよび化合物の PK パラメーターの特徴を考慮して方法を選択する必要がある。

序論でも述べたとおり，吸収および消化管代謝は実験的に分離評価することが困難であるため，通常は分離せずに F_aF_g と表わされる。F_a は一般的にアイソトープ標識した化合物を用いた吸収実験により評価する。表 2-4 に示したとおり，ketoprofen, tolcapone, telmisartan, raloxifene, resveratrol, buprenorphine については，F_a は 0.7 を上回る高い値であった。Entacapone の F_a (0.54) は，胆汁および尿への排泄率と等しいとして算出されているが，引用した研究 (Drug Approval Package for Comtan) におけるアイソトープの胆汁，尿および糞からの回収率は約 80% であり，未回収の 20%は吸収された後に体内に留まっていると考えられることから，実際の吸収率は高いと考えられる。Quercetin および ezetimibe の F_aF_g はそれぞれ 0.033 および 0.027 と著しく低いが，F_a は 0.59 および 0.40–0.66 と中程度であることから，F_aF_g の決定因子は F_g であると考えられた。消化管で代謝を受ける化合物の場合，消化管細胞内に取り込まれて代謝された後，代謝物が消化管内にもどる場合があることが知られていることから (Fan *et al.*, 2013)，アイソトープ実験等で求めた F_a は真の値より低く見積もられている可能性がある。そのため，本研究のモデル化合物については PAMPA 膜透過性も併せて評価した。その結果，ketoprofen, tolcapone, telmisartan, raloxifene, entacapone, resveratrol, ezetimibe の PAMPA 膜透過性は $>1.0 \times 10^{-6}$ cm/s と高く，F_a は 1 に近いと推測された (Kadono *et al.*, 2010) ことから，$F_aF_g = F_g$ とみなすことができると考えられた。

小腸で薬物がグルクロン酸抱合代謝を受けることを直接的に示すために，経口投与後の門脈血中のグルクロン酸抱合体をモニターすることは重要である。Ezetimibe については経口投与直後の門脈血中に未変化体を大きく上回る量の EPG が検出された (図 2-2)。この結果は，ezetimibe 投与直後のラット門脈血中のほとんどが EPG であり，未変化体は <5%であったという van Heek ら (2000) の報告を支持する。EPG は消化管からほとんど吸収されないため (van Heek *et al.*, 2000)，門脈血漿の抱合体は，肝で生成した抱合体の腸肝循環によるものではないと推測された。Raloxifene についても，ezetimibe と同様に，投与後 60 分までの R4'G と R6G の総濃度は，未変化体を 3–8 倍上回っていた (図 2-2)。門脈血漿中には，Jeong ら (2005) がラット小腸ミクロソーム中で見出した結果と同様に，ラットの主代謝物として知られる R6G が検出され

た。Entacapone, resveratrol, buprenorphine, quercetin についても，投与後比較的早い時間よりグルクロン酸抱合体に相当するピークが検出された。これらの結果は，経口投与した化合物がラット小腸でグルクロン酸抱合代謝を受けていることを示している。

図 2-3 に示したように，buprenorphine を除いたモデル化合物の $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g には負の相関が認められた。この結果は，ほとんどのモデル化合物の $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g に直接的な関係があり，$CL_{int,UGT}$ を用いて F_aF_g を予測できることを示している。そこで我々は，UGT のみで代謝された 7 つのモデル化合物 (ketoprofen, tolcapone, telmisartan, raloxifene, entacapone, resveratrol, ezetimibe) の相関関係に，門野ら (2010) が構築した SIA モデルを適用して F_g の予測式を導いた。このモデルは F_g，小腸ミクロソーム中の CL_{int} および empirical scaling factor (α) のみで構成されており，必要なパラメーターが少ないことから創薬初期段階においても実用的である。$F_aF_g = F_g$ という仮定のもとで得られたフィッティングカーブは，モデル化合物の実測値とよく一致し，α は 0.0050 と算出された。得られた予測式により，UGT 基質である化合物 1–5 の F_g を精度よく予測できたことから，この式により UGT 基質のラット F_g を予測可能と判断することができた。今回は 7 化合物を用いて予測式を構築したが，モデル化合物の数をさらに加えることにより，式の信頼性はさらに向上すると期待される。

ヒトを含む様々な動物の小腸には，約 10 種類の UGT 分子種の mRNA が発現している (Shelby *et al.*, 2003; Buckley and Klaassen, 2007; Nishimura *et al.*, 2009; Ohno and Nakajin, 2009)。ヒトにおいては小腸特異的に発現している分子種として 1A7, 1A8, および 1A10 があり (Ohno and Nakajin, 2009)，raloxifene (Jeong *et al.*, 2005) およびいくつかのフラボノイド (Zhang *et al.*, 2007) の小腸グルクロン酸抱合代謝に大きな影響を与えていることが報告されている。ラットにおいても 1A2, 1A3, および 1A7 を含む複数の分子種の mRNA が小腸に発現しており (Shelby *et al.*, 2003)，小腸代謝に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし，化合物のラットにおける代謝に関与する UGT 分子種の同定試験はほとんど実施されていないことから，本研究ではモデル化合物の代謝に関与する分子種は考慮しなかった。小腸に発現する分子種の特異的阻害剤や抗体はまだ報告数が限られているが，充分な情報が得られた際には，さらなる研究の発展が期待される。

本研究では UGT の基質に焦点を当てたが，小腸には UGT に加えて CYP や SULT，エステラーゼ等が存在することが報告されており，複数の酵素で代謝される化合物もある。本研究においても，buprenorphine の小腸ミクロソーム中の $CL_{int,CYP}$ は $CL_{int,UGT}$ の約半分と無視できない大きさであり (表 2-5)，buprenorphine の小腸代謝には UGT に加えて CYP も関与する可能性が考えられた。Mistry ら (1987) は buprenorphine を含む 3 つのオピオイド化合物を用いて *in vitro* と *in vivo* の小腸代謝クリアランスに良好な相関を見出している。しかし本研究においては，buprenorphine は図 2-3 に示した $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g の相関から外れていた。両研究で異なる結果となった要因としては，Mistry らの研究では雌性ラットを用いているが，本研究では雄性ラットを用いたことが考えられる。Buprenorphine の代謝に対する CYP 代謝の寄与は，メスに比べオスの方が大きいことが知られている。本研究においては，buprenorphine は雄性ラットの小腸においてグルクロン酸抱合代謝と CYP 代謝の両方を受けた結果，低 F_aF_g になったと考えられる。

また, quercetin は小腸 S9 中で SULT でも代謝されたことから, 小腸で UGT に加えて SULT でも代謝されると考えられた。そのため, quercetin は図 2-3 に示した $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g の相関関係に当てはまっていたが, F_g の予測式の構築からは除外した。Quercetin のラット *in vivo* PK に, 小腸におけるグルクロン酸代謝および硫酸抱合代謝が関与していることは Chen ら (2005) により報告されているが, 血漿中の各抱合体濃度は分離せずに定量されており, グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の生成比率は不明である。小腸における硫酸抱合代謝が化合物の PK プロファイルに影響を与えるとの論文はいくつか報告されている。例えば, ポリフェノール構造を有するフラボノイドには経口バイオアベイラビリティが低いものがあるが, これらの化合物はヒト小腸 S9 または cytosol 中で PAPS 存在下で代謝されることから, 小腸 SULT が F_g に影響していると考えられている (Maiti and Chen, 2003; Huang *et al.*, 2009)。また水間ら (2005) は, sulbutamol を含む3つの硫酸抱合代謝の基質がヒトで 0.1–0.7 という低い F_g を示し, その結果低 F になることを報告している。小腸硫酸抱合代謝を受ける化合物の報告はまだ少数だが, 小腸 SULT が F_g に与える影響を明らかにするためには, 硫酸抱合の基質を用いた $CL_{int,SULT}$ と F_g の比較が有用と考えられる。

結論として, 筆者は様々な構造の UGT 基質について, ラットの F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の間に良好な相関があることを見出した。得られた相関に SIA モデルを適用して構築した F_g の予測式により, モデル外の化合物 1–5 のラット F_g を精度よく予測できたことから, 予測式は妥当と判断された。ヒトにおいても同様の相関があり, UGT 基質の F_g を予測できることが期待される。

第 3 章　小腸グルクロン酸抱合代謝活性の

ヒト, ラット, イヌ, およびサル間の種差に関する検討

3-1. はじめに

第 2 章ではラットにおいて UGT 基質 7 化合物の $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g に逆相関関係があることを示した。さらに中森ら (2012) は, UGT 基質 11 化合物を用いて, ヒトにおいてもラットと同様に *in vitro* と *in vivo* に相関があることを示した (Nakamori *et al.*, 2012)。しかしながら, イヌおよびサルにおいても, ラットおよびヒトと同様に F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ に相関があるか否かについては, まだ検討されていない。

前述のとおり, ヒトを含む様々な動物の小腸には, 約 10 の UGT 分子種の mRNA が発現しており, 小腸特異的に発現している分子種として, ヒトにおいては 1A7, 1A8, および 1A10 が (Ohno and Nakajin, 2009), ラットにおいては 1A2, 1A3, および 1A7 が (Shelby *et al.*, 2003), サルにおいては 1A8 が (Nishimura *et al.*, 2009) 報告されている。しかしながら, これらの発現分子種の種差が UGT 基質の代謝安定性の種差に影響しているか否かについては, まだ明らかとなっていない。なお, UGT は各分子種の特異的基質や抗体がオーバーラップしているため, 各分子種の存在量に関する情報は限られていることから mRNA 発現量をもとに議論されることが多いが, mRNA 量は発現タンパク量を反映していない場合がある点に留意する必要がある。

近年, BSA 存在下でヒト肝または小腸ミクロソームを用いたグルクロン酸抱合代謝実験を実施すると, BSA 非存在下に比べ *in vitro* 代謝クリアランスが大きく増大することが報告されている (Rowland *et al.*, 2007, 2008; Gill *et al.*, 2012)。増大の程度は特に UGT1A9 および 2B7 の基質で大きいと言われている。この場合の *in vitro* 代謝クリアランスは, BSA およびミクロソームタンパクに結合していない非結合型化合物のクリアランス ($CL_{int,u}$) を指す。UGT 基質の中でも特にカルボン酸化合物は, BSA への結合率が一般に >90% と高いため, BSA 添加条件下で得られた $CL_{int,UGT}$ を反応液中の化合物の非結合型分率で補正して $CL_{int,u,UGT}$ を算出する必要がある。BSA 添加により $CL_{int,u,UGT}$ が増大するメカニズムは次のように考えられている (Rowland *et al.*, 2007; Rowland *et al.*, 2008)。ミクロソーム調製時および *in vitro* 代謝試験中に, 生体膜成分よりアラキドン酸などの脂肪酸が生成し, 特に UGT1A9 および 2B7 による化合物のグルクロン酸抱合代謝を競合的に阻害するが, BSA 存在下では脂肪酸が BSA に吸着するため, UGT 基質化合物に対する競合阻害が起こらなくなる。その結果, BSA 添加により $CL_{int,u,UGT}$ が大きくなると考えられている。しかし筆者が知る限り, ヒト以外の動物種の小腸ミクロソームについては, BSA 添加による $CL_{int,u,UGT}$ への影響は調べられていない。

そこで著者は, ヒトと汎用される実験動物であるラット, イヌ, およびサルの小腸グルクロン酸抱合代謝活性の種差を調べる目的で, 以下の検討を行った。まず UGT 基質 17 化合物について小腸ミクロソームを用いて $CL_{int,u,UGT}$ を調べた。また, 文献より収集した PK パラメーターおよび自社化合物の実験データより, 各動物種における F_aF_g を算出した。続いて, ラットおよびヒトと同様に, イヌおよびサルにおける $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の関係性を調べ, 得られた相関関係を動物種

間で比較した。さらに BSA 存在下での $CL_{int,u,UGT}$ を調べ, BSA 非存在下の値と比較して $CL_{int,u,UGT}$ の増加の程度を調べた。

第 3 章では *in vitro* 小腸グルクロン酸抱合代謝活性として $CL_{int,u,UGT}$ を用いた。第 1 章および第 2 章では, *in vitro* 代謝試験時のミクロソームタンパク濃度を 0.1 mg/mL と比較的低くしていたことから, ミクロソームタンパクへの結合率は考慮せずに $CL_{int,UGT}$ を用いて F_aF_g の関係を検討した。しかし本章では, ヒトミクロソーム中で十分な基質の代謝を検出するためにミクロソームタンパク濃度を最大で 0.4 mg/mL としたこと, および BSA 存在下でも試験を行ったことから, 反応液中の化合物のフリー体濃度を求めて $CL_{int,u,UGT}$ を算出した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

ヒト, 雄性 SD ラット, 雄性ビーグル犬, および雄性カニクイザルのプール小腸ミクロソーム (それぞれ n = 13, 110, 6, 9) は XenoTech より購入した。Diclofenac, gemfibrozil, indomethacin, tolfenamic acid, BSA (fatty acid free) は Sigma-Aldrich より購入した。Etodolac は LKT Laboratories より購入した。Telmisartan acyl-β-D-glucuronide, gemfibrozil 1-O-β-glucuronide は Toronto Research Chemicals より購入した。Mycophenolic acid は和光純薬工業より購入した。化合物 6 はアステラス製薬にて合成された。その他の試薬については第 1 章 1-2-1 および第 2 章 2-2-1 に記載した。

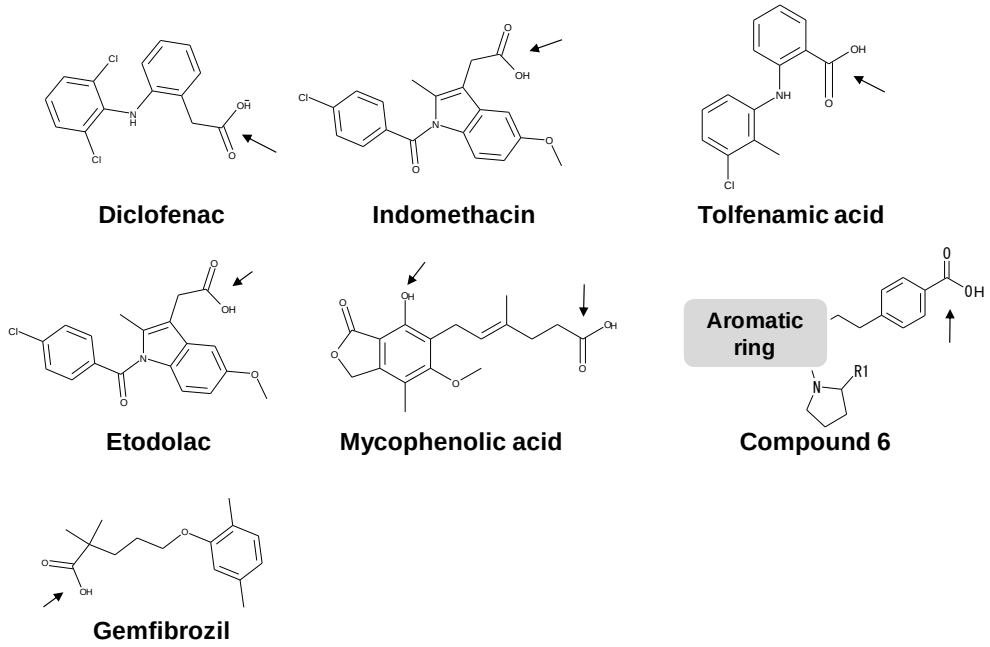


図 3-1. 評価化合物の構造

第 1 章, 第 2 章で用いた化合物の構造式は, それぞれ図 1-1, 図 2-1 に示した。矢印の位置は抱合代謝部位を示す。代謝部位は Kumar *et al.*, 2002 (diclofenac), Ritter, 2007 (etodolac, mycophenolic acid), Yang *et al.*, 2006 (gemfibrozil, indomethacin,) より引用。Tolfenamic acid および化合物 6 の代謝部位は構造より推定。

3-2-2. 小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

小腸ミクロソームを用いた *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験および CYP 代謝試験の手順は第 1 章 1-2-9 に示した。ミクロソームタンパク濃度は, buprenorphine, ezetimibe, quercetin, raloxifene, および化合物 1–3 の場合は 0.1 mg/mL, etodolac および indomethacin の場合は 0.4 mg/mL, その他の化合物の場合は 0.2 mg/mL とした。

BSA を添加する場合の反応液中の BSA 濃度は, 1%で $CL_{int,u,UGT}$ の増大が頭打ちになるとの報告があることから (Rauland *et al*, 2007, 2008), 1%とした。

3-2-3. LC-MS/MS 分析条件

Gemfibrozil, gemfibrozil 1-O-β-glucuronide, quercetin の測定には Acquity UPLC system および Xevo Triple Quadruple Mass Spectrometer (いずれも Waters 製) で構成した LC-MS/MS システムを用いた。その他の化合物の測定には Acquity UPLC および Quattro Ultima Triple Quadrupole Mass Spectrometer (いずれも Waters 製) で構成したシステムを用いた。HPLC による分離はカラム温度 40°C, 流速 0.3–0.6 mL/min とし, 移動相は A 液と B 液または C 液と D 液のグラジェントで分析した。移動相の組成は第 2 章 2-2-6 に示した。LC-MS/MS 分析は ESI ポジティブモードまたはネガティブモードでイオン化し, MRM 条件でイオンを検出した。分析カラムは Capcell PAK C18 MG (2.0 × 35 mm, 3 μm, 資生堂製) または Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Waters 製) のいずれかを用い, カラム温度 40°C とした。その他の分析条件は表 3-1 に示した。第 1 章, 第 2 章で用いた化合物の分析条件は第 1 章 1-2-4, 第 2 章 2-2-6 に示した。

表 3-1. LC-MS/MS 分析条件

Compound	IS	Column	Polarity	Monitering ion (precursor > product)
Diclofenac	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	293.6 > 249.8
Etodolac	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	288.2 > 171.0
Gemfibrozil	Carprofen	Acquity UPLC BEH C18	Negative	248.8 > 120.9
Gemfibrozil 1-O-β-glucuronide	Carprofen	Acquity UPLC BEH C18	Negative	424.9 > 120.9
Indomethacin	Carprofen	Capcell PAK C18 MG	Negative	356.0 > 312.1
Mycophenolic acid	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	321.0 > 303.1
Quercetin	Carprofen	Acquity UPLC BEH C18	Negative	301.0 > 151.1
Telmisartanacyl -β-D-glucuronide	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	691.2 > 515.4
Tolfenamic acid	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	262.1 > 243.6
Compound 6	Diazepam	Capcell PAK C18 MG	Positive	437.2> 405.8

3-2-4. *In vitro* 代謝試験時の反応液中のタンパク非結合型分率の測定

In vitro グルクロン酸抱合代謝試験における反応液中の化合物のタンパク非結合型分率 ($f_{u,inc}$) は平衡透析法により求めた。8 kDa の半透膜を用いた 96 well 平衡透析プレートは Tharmo Fisher Scientific より購入した。プレートのドナー側に反応液 (UDPGA 非添加) を, アクセプター側にリン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加し, 37°C で 6 時間振とうした。振とう後, 両側より 0.05 mL を分取し, それぞれのサンプルに IS を溶解した 0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液 0.1 mL を添加した。16,000 *g*, 4°C で 5 分間遠心した後, 上清を LC-MS/MS で分析した。アッセイは n = 3 で実施した。$f_{u, inc}$ は式 11 により算出した。

$$f_{u,inc} = C_{acceptor\ side} / C_{donor\ side} \qquad (11)$$

ここで $C_{acceptor\ side}$ および $C_{donor\ side}$ は, それぞれアクセプター側およびドナー側の化合物濃度を指す。検討はヒト小腸ミクロソームを用いて行い, ラット, イヌ, およびサルにおける値はヒトで代用した。また *in vitro* CYP 代謝試験における $f_{u,inc}$ の値は *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験の反応液中の値で代用した。

3-2-5. $CL_{int,u}$ の算出

$CL_{int,UGT}$ および $CL_{int,CYP}$ の算出方法は第 1 章 1-2-10 に示した。

Gemfibrozil および telmisartan について BSA の $CL_{int,u,UGT}$ に対するの影響を調べる場合は, グルクロン酸抱合体の生成速度 (*v*) をもとに, 式 12 を用いて算出した。

$$CL_{int,UGT}\ (\mu L/min/mg\ protein) = v\ /\ ミクロソームタンパク量\ /\ 化合物濃度 \qquad (12)$$

得られた $CL_{int,UGT}$ および $CL_{int,CYP}$ を $f_{u,inc}$ で補正して (CL_{int} / $f_{u,inc}$), $CL_{int,u,UGT}$ および $CL_{int,u,CYP}$ を算出した。

3-2-6. $CL_{int,u,UGT}$ のヒトとラット, イヌ, およびサル間の比較

$CL_{int,u,UGT}$ の値をヒト, ラット, イヌ, およびサル間で比較した際の決定係数 (r^2) は, GraphPad Prism 5 (GraphPad Aoftware) を用いて算出した。

3-2-7. 化合物 6 のラット, イヌ, およびサルの *in vivo* PK 試験

アステラスにて合成された新規カルボン酸化合物 6 は, 第 1 章および第 2 章でも用いた化合物 1–3 とは異なる骨格の化学構造を有する。PAMPA の P_{app} は $>1.0 \times 10^{-6}$ cm/s と高く, F_a は良好と推測される。本化合物のラット, イヌ, およびサルにおける PK 試験および血漿中濃度測定は第 1 章 1-2-3 および 1-2-4 に記載した方法と同様に行った。

3-2-8. R_b の測定

R_b の測定は第 2 章 2-2-7 に記載した方法と同様に実施した。

3-2-9. F_aF_g の算出

本章で用いた化合物 6 を除く UGT 基質の PK パラメーターは文献または本研究の第 1 章および第 2 章より引用した。F_aF_g の算出方法は第 1 章 1-2-5 に示した。ヒト Q_h は 20.7 mL/min/kg を用いた (Sawada, 1985).

3-2-10. $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の相関への SIA モデルの適用

第 2 章 2-2-13 と同様に, SIA モデルを各動物種における $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の相関関係にあてはめて empirical scaling factor である α を算出した。

3-3. 実験結果

3-3-1. ヒト, ラット, イヌ, およびサル小腸ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験

UGT 基質 17 化合物について, 各動物種の小腸ミクロソーム中での $CL_{int,u,UGT}$ を求めた (表 3-2)。$CL_{int,u,UGT}$ はヒトにおいて 5.20–8320 μL/min/mg, ラットにおいて ND–8820 μL/min/mg, イヌにおいて 3.15–20100 μL/min/mg, サルにおいて 15.5–7170 μL/min/mg であった。$CL_{int,u,UGT}$ をヒトとラット, イヌ, およびサル間で比較したところ (図 3-2) , ヒトーラット間 (r^2 = 0.666), ヒトーイヌ間 (r^2 = 0.604), およびヒトーサル間 (r^2 = 0.833) の $CL_{int,u,UGT}$ には相関が認められたが, 多くの化合物の ヒト $CL_{int,u,UGT}$ の値は, ラット, イヌ, およびサルに比べ低い値であった。本実験で評価した化合物の代謝に寄与する UGT 分子種は, 表 3-3 に示したとおり化合物によって異なる。動物種間の $CL_{int,u,UGT}$ の相関に関しては, 各化合物の代謝に関与する UGT 分子種による違いは認められなかった。しかしながら, 表 3-3 に示した各化合物の代謝に寄与する UGT 分子種はヒトにおける情報であり, 各実験動物における分子種の寄与は不明であることに留意する必要がある。

表 3-2. ヒト, ラット, イヌ, およびサル小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,UGT}$

Compound	$CL_{int,UGT}$ (μL/min/mg)				$f_{u,inc}$ [d]	$CL_{int,u,UGT}$ (μL/min/mg)			
	Human	Rat	Dog	Monkey		Human	Rat	Dog	Monkey
Buprenorphine	26.7	95.0[c]	89.9	66.1	0.85	31.3	111	105	77.4
Diclofenac	59.0[a]	9.93	15.2	90.9	0.94 [a]	62.7	10.6	16.1	96.8
Entacapone	27.0[a]	321	670	702	1.0	27.0	321	670	702
Etodolac	6.20[a]	9.27	3.20	15.5	1.0[a]	6.20	9.27	3.15	15.5
Ezetimibe	266	1170[c]	8250	662	0.41	649	2860	20100	1620
Gemfibrozil	17.0[a]	15.4	39.8	39.5	0.97[a]	17.5	15.9	41.0	40.8
Indomethacin	4.20[a]	ND	37.6	16.4	0.80[a]	5.20	ND	47.0	20.5
Mycophenolic acid	31.1[a]	206	87.1	95.4	0.85	36.4	241	102	112
Quercetin	3590	7940[c]	6160	6450	0.90[a]	3990	8820	6840	7170
Raloxifene	2770	667[c]	854	1720	0.33[a]	8320	2010	2570	5170
Telmisartan	20.0[a]	155	83.8	47.9	0.92[a]	21.7	168	91.1	52.0
Tolcapone	40.0[a]	58.1	151	322	0.39[a]	103	148	388	825
Tolfenamic acid	155[a]	652	378	1440	0.88[a]	176	741	430	1640
Compound 1	114[b]	731[b]	59.6 [b]	252[b]	1.00	114	731	59.6	252
Compound 2	68.2[b]	243[b]	44.9 [b]	149[b]	0.92	73.7	263	48.5	161
Compound 3	26.9[b]	184[b]	38.3[b]	101[b]	1.00	26.9	184	38.3	101
Compound 6	41.7	66.2	486	97.7	0.71	58.4	92.7	681	137

[a]Nakamori, 2012; [b]Furukawa, 2012b; [c]Furukawa, 2012a. [d]ラット, イヌ, およびサルにおける値はヒトで代用した。
ND: no depletion.

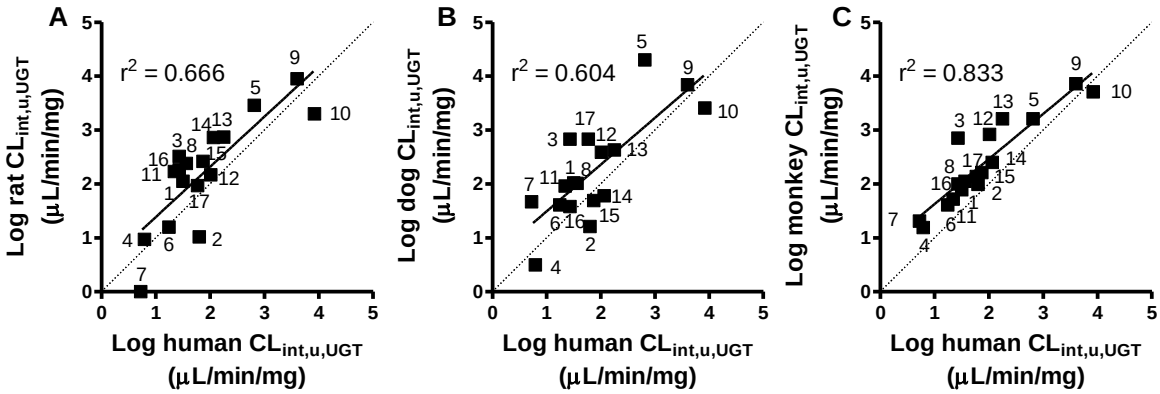


図 3-2. ヒト, ラット, イヌ, およびサルの $CL_{int,u,UGT}$ の比較
x と y 軸はそれぞれヒトとラット (A), ヒトとイヌ (B), ヒトとサル (C) の値を示す。実線は線形回帰直線, 破線は x = y を示す。Indmethacin のラット $CL_{int,u,UGT}$ は *in vitro* 代謝試験で未変化体の減少が認められなかったため 1 μL/min/mg としてプロットした。化合物は 1: buprenorphine, 2: diclofenac, 3: entacapone, 4: etodolac, 5: ezetimibe, 6: gemfibrozil, 7: indomethacin, 8: mycophenolic acid, 9: quercetin, 10: raloxifene, 11: telmisartan, 12: tolcapone, 13: tolfenamic acid, 14–16: compound 1–3, 17: compound 6。

表 3-3. 評価化合物のグルクロン酸抱合代謝に関与するヒト UGT 分子種

UGT substrates	Primary UGTs	Other UGTs	Other enzymes
Buprenorphine[a, b]	1A1, 1A3, 2B7	None	CYP
Diclofenac[c, d]	2B7	1A9, 2B15, 2B17	CYP
Entacapone[c]	1A7, 1A9	1A1, 1A3, 1A4, 2B7, 2B17	—
Etodolac[c,d,e]	1A9	1A10, 2B7	CYP
Ezetimibe[f]	1A1, 1A3	1A4, 1A9, 2B7, 2B15	—
Gemfibrozil[c, g]	2B7	1A3	CYP
Indomethacin[c, h]	1A9	1A1, 1A3, 2B7	CYP
Mycophenolic acid[i]	1A9	1A1, 1A7, 1A8, 1A10	—
Quercetin[c, j]	Multiple	Multiple	—
Raloxifene[c, k]	1A10	1A8, 1A9	CYP
Telmisartan[c]	1A3	1A8, 1A10	—
Tolcapone[c]	1A9	1A1, 1A3, 1A4, 2B7, 2B17	—
Tolfenamic acid[c]	1A9, 2B7	1A1, 1A7, 2B15	—
Compound 1[l]	1A7, 1A8, 1A9	1A3	CYP
Compound 2[l]	1A7, 1A8, 1A9	None	CYP
Compound 3[l]	1A7, 1A8, 1A9	None	CYP
Compound 6	Not tested	Not tested	CYP

[a]Kobayashi *et al.*, 1998; [b]Rouguieg *et al.*, 2010; [c]Nakamori *et al.*, 2012; [d]Sabolovic *et al.*, 2004; [e]Cayen *et al.*, 1981; [f]Ghosal *et al.*, 2004; [g]Kilford *et al.*, 2009, [h]Mano *et al.*, 2007; [i]Court, 2005; [j]Boersma *et al.*, 2002; [k]Jeong *et al.*, 2005; [l]Furukawa, 2012b.
—: 情報なし。

3-3-2. ヒト, ラット, イヌ, サルの F_aF_g

文献から引用または実験により得た PK パラメーターを用いて算出した F_aF_g を表 3-4 に示した。17 の UGT 基質のうち, *in vivo* PK パラメーターが文献より得られなかった化合物は表 3-4 から除いた。また, buprenorphine および quercetin のラット F_aF_g は, 第 2 章で述べたとおり, ラット小腸で UGT 以外の代謝酵素により代謝されるために除いた。さらに diclofenac, indomethacin, および quercetin のイヌ F_aF_g は, イヌ小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,CYP}$ が $CL_{int,u,UGT}$ と同程度以上の値を示しており (表 3-5), 小腸において UGT だけでなく CYP でも代謝される可能性が考えられたために除いた。

ヒト, ラット, イヌ, およびサル間の F_aF_g の比較については, 複数の動物種で F_aF_g の値が得られた化合物の数が限られているためにポイントの分布に偏りがあり, 関係性を検証することは適切ではないと考えられたため, データは不掲載とした。

表 3-4. *In vivo* PK パラメーター

Species	Compound	$CL_{t,plasma}$ (mL/min/kg)	F	R_b	F_aF_g
Human	Diclofenac	3.5[a]	0.54[a]	0.63[a]	0.74[a]
	Entacapone	12[a]	0.25[a]	0.59[a]	1.0[a]
	Etodolac	0.66[a]	0.80[a]	0.55[a]	0.85[a]
	Gemfibrozil	1.7[a]	0.98[a]	0.58[a]	1.0[a]
	Indomethacin	1.4[a]	1.0[a]	0.55[a]	1.0[a]
	Quercetin	11.0[a]	0.0010[a]	1.0[a]	0.0030[a]
	Raloxifene	14.7[a]	0.02[a]	1.0[a]	0.069[a]
	Telmisartan	8.4[a]	0.43[a]	0.67[a]	1.0[a]
	Tolcapone	1.9[a]	0.6[a]	0.61[a]	0.71[a]
	Tolfenamic acid	2.2[a]	0.6[a]	0.66[a]	0.72[a]
Rat	Diclofenac	15.7[b]	0.79[b]	0.70[j]	1.0
	Entacapone	—	—	0.57[e]	0.20[e, m]
	Etodolac	0.159[c]	0.94[c]	0.55[l]	0.95
	Ezetimibe	—	—	0.81[e]	0.027[e, m]
	Gemfibrozil	1.77[d]	0.86[d]	0.83[d]	0.89
	Indomethacin	6.36[d]	0.92[d]	0.97[d]	1.0
	Raloxifene	—	—	1.0[e]	0.30[e , m]
	Telmisartan	6.12[e]	0.51[e]	0.61[e]	0.61[e]
	Tolcapone	6.57[e]	0.97[e]	0.63[e]	1.0[e]
	Compound 1	8.27[f]	0.13[f]	0.59	0.18
	Compound 2	15.5[f]	0.24[f]	0.63	0.40
	Compound 3	14.7[f]	0.35[f]	0.60	0.60
	Compound 6	21.4	0.81	0.56	1.0
Dog	Etodolac	1.60[c]	0.96[c]	0.55[l]	1.0
	Ezetimibe	25.9[g]	0.0058[g]	0.81[l]	0.027[n]
	Gemfibrozil	2.27[d]	0.75[d]	0.64[d]	0.86
	Raloxifene	—	—	1.1[k]	0.36[k, m]
	Telmisartan	6.75[d]	1.0[d]	1.2[d]	1.0
	Tolcapone	1.89[h]	0.67[h]	0.57	0.76
	Tolfenamic acid	2.88[i]	0.50[i]	0.69	0.59
	Compound 1	12.8[f]	0.42[f]	0.84	0.98[o]
	Compound 2	6.44[f]	0.77[f]	0.63	1.0[o]
	Compound 3	3.23[f]	0.80[f]	0.54	1.0[o]
	Compound 6	7.00	0.27	0.65	0.45
Monkey	Diclofenac	10.2[d]	0.59[d]	1.0[d]	0.77
	Gemfibrozil	5.77[d]	0.86[d]	0.67[d]	1.0
	Indomethacin	3.86[d]	1.0[d]	1.1[d]	1.0
	Raloxifene	18.9[d]	0.030[d]	1.4[d]	0.04
	Telmisartan	2.82[d]	0.94[d]	1.2[d]	1.0
	Compound 1	14.0[f]	0.26[f]	0.72[l]	0.47[o]
	Compound 2	11.1[f]	0.32[f]	0.63[l]	0.53[o]
	Compound 3	5.68[f]	0.44[f]	0.57[l]	0.57[o]
	Compound 6	17.1	0.11	0.61[l]	0.31

[a]Nakamori *et al.*, 2012; [b]Peris-Ribera *et al.*, 1991; [c]Cayen *et al.*, 1981; [d]Deguchi *et al.*, 2011; [e]Furukawa *et al.*, 2012a; [f]Furukawa *et al.*, 2012b; [g]PMDA review report, 2007; [h]FDA approval package, 1998; [i]Priymenko *et al.*, 1993; [j]Nakamori *et al.*, 2011; [k]Kosaka *et al.*, 2011.

[l]R_b 値は他動物種の平均値で代用した。 [m]F_aF_g の値は経口投与後の門脈血漿中および循環血漿中の AUC より求めた。 [n]$CL_t/R_b > Q_h$ であったため CL_t/R_b を Q_h の 90% と仮定して F_aF_g を算出した (Kilford *et al.*, 2009)。 [o]R_b を用いて再算出した。

—: データを F_aF_g の算出に用いなかった。

表 3-5. ヒト, ラット, イヌ, およびサル小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,CYP}$

Compound	$CL_{int,u,CYP}$ (μL/min/mg)			
	Human	Rat	Dog	Monkey
Buprenorphine	NT	52.4[b]	137	NT
Diclofenac	ND[a]	ND	14.1	ND
Entacapone	ND[a]	ND[c]	NT	NT
Etodolac	ND[a]	ND	ND	NT
Ezetimibe	NT	ND[c]	NT	NT
Gemfibrozil	ND[a]	ND	ND	ND
Indomethacin	ND[a]	ND	44.2	ND
Mycophenolic acid	NT	NT	NT	NT
Quercetin	ND[a]	ND[c]	17900	NT
Raloxifene	26.8	ND[c]	372	1180
Telmisartan	ND[a]	ND[c]	ND	ND
Tolcapone	ND[a]	ND[c]	ND	NT
Tolfenamic acid	ND[a]	NT	ND	NT
Compound 1	ND[b]	ND[b]	ND[b]	58.9[b]
Compound 2	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
Compound 3	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
Compound 6	NT	ND	46.2	11.7

[a]Nakamori, 2012; [b]Furukawa, 2012b; [c]Furukawa, 2012a.
ND: no depletion; NT: not tested (文献等より F_aF_g が得られなかった化合物または *in vivo* で CYP 代謝物が見出されていない化合物は試験を行わなかった).

3-3-3. $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の相関関係と動物種間の比較

各動物種における $CL_{int,u,UGT}$ (表 3-2) と F_aF_g (表 3-4) の相関関係を図 3-3 に示した。なお, ヒトにおける bazedoxifene の数値は中森らの論文 (2012) より引用して用いた。第 2 章においてラットの $CL_{int,UGT}$ と F_aF_g に良好な逆相関が認められたが, $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g 間にも同程度の良好な相関が認められた。イヌおよびサルにおいても, ラットおよびヒトと同様に, $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g に逆相関が認められた。得られた相関に SIA モデルをあてはめてフィッティングカーブを作成し, empirical scaling factor (α) を算出した (図 3-3, 表 3-6)。本実験に用いた化合物は PAMPA またはアイソトープ標識体を用いた吸収性評価試験により吸収性は良好であることが示されていることから (Furukawa *et al.*, 2012a, 2012b; Nakamori *et al.*, 2012) $F_aF_g = F_g$ と仮定した。α の値はヒト, ラット, およびサルでは近い値を示し, フィッティングカーブに顕著な差はなかった。一方, イヌにおける α の値は他動物種の 1/3–1/4 と小さく, フィッティングカーブは他動物種より右方にシフトしていた (図 3-4)。

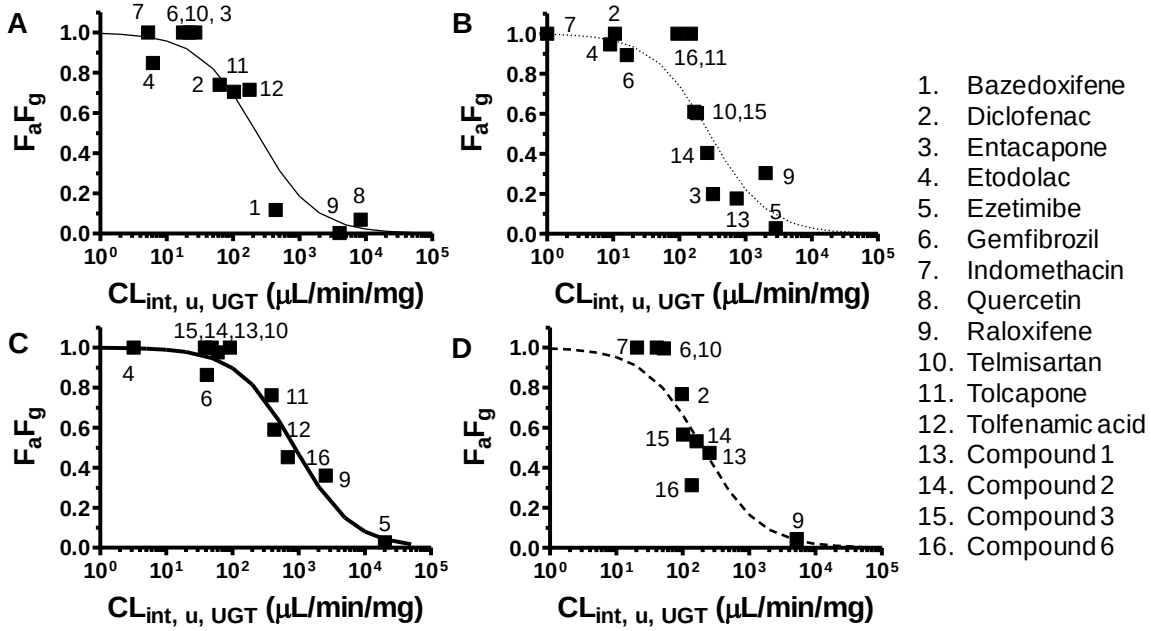


図 3-3. 評価化合物のヒト (A), ラット (B), イヌ (C), およびサル (D) における F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の関係

表 3-6. $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の関係より求めた SIA モデルの empirical scaling factor (α)

Parameter	Human	Rat	Dog	Monkey
α	0.0044	0.0035	0.0011	0.0050

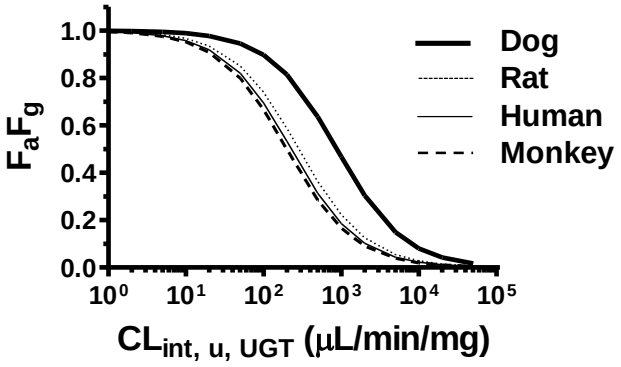


図 3-4. $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の関係の動物種間比較

3-3-4. ヒト, ラット, イヌ, およびサルにおける $CL_{int,u,UGT}$ への BSA の効果

BSA 存在下での $CL_{int,u,UGT}$ を調べ (表 3-7), BSA 非存在下の値と比較して増加率を求めた (図 3-5)。評価化合物は, 予備検討において BSA 存在下での *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験で消失が認められた buprenorphine, etodolac, ezetimibe, raloxifene とした。これに加えて, グルクロン酸抱合体の合成標品を購入可能であった gemfibrozil と telmisartan についても検討した。Gemfibrozil と telmisartan については, グルクロン酸抱合体の生成速度をもとに BSA 非存在下および存在下の $CL_{int,u,UGT}$ を算出した (表 3-7)。その他の化合物については, 表 3-2 に示した BSA 非存在下の値と, 表 3-7 に示した BSA 存在下の値を比較した。BSA 添加による $CL_{int,u,UGT}$ の増加率は動物種によって異なり, ヒトでは 0.87–9.2 倍, ラットでは 2.3–22 倍, イヌでは 0.38–6.3 倍, サルでは 0.62–34 倍であった。Buprenorphine, ezetimibe, および gemfibrozil の $CL_{int,u,UGT}$ の増大は, 4 動物種中でサルにおいて最も大きく, 次いでラットにおいて大きかった。一方 raloxifene の $CL_{int,u,UGT}$ はヒトで最も大きく増大した。イヌ $CL_{int,u,UGT}$ の増大の程度は raloxifene を除く 4 化合物で最も小さかった。

BSA 非存在下および存在下において, 評価化合物のヒトとラット, イヌ, およびサル小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,UGT}$ を比較した (図 3-6)。化合物数が少ないために明確な結論は出せないが, BSA 添加により各動物種間の $CL_{int,u,UGT}$ の相関性が改善する傾向は認められなかった。

表 3-7. BSA 存在下および非存在下における小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,UGT}$

BSA	Compound	$CL_{int,UGT}$ (μL/min/mg)				$f_{u,inc}$	$CL_{int,u,UGT}$ (μL/min/mg)			
		Human	Rat	Dog	Monkey		Human	Rat	Dog	Monkey
−	Gemfibrozil	24.1	2.50	33.5	11.2	0.97[a]	24.9	2.57	34.5	11.5
	Telmisartan	41.1	155	77.8	40.0	0.92[a]	44.7	168	84.6	43.5
+	Buprenorphine	68.7	721	198	600	0.30	232	2435	667	2030
	Etodolac	2.89	ND	ND	11.4	0.051	56.9	ND	ND	225
	Ezetimibe	77.0	691	2630	1330	0.024	3210	28800	110000	55200
	Gemfibrozil	0.336	0.063	0.131	0.824	0.010	33.6	6.3	13.1	82.4
	Raloxifene	546	98.0	51.1	67.7	0.021	26000	4660	2430	3220
	Telmisartan	0.729	66.2	1.39	2.48	0.019	38.9	3530	73.9	132

Gemfibrozil と telmisartan の $CL_{int,UGT}$ はグルクロン酸抱合体の生成速度より求めた。
[a]Nakamori, 2012.
ND: no depletion.

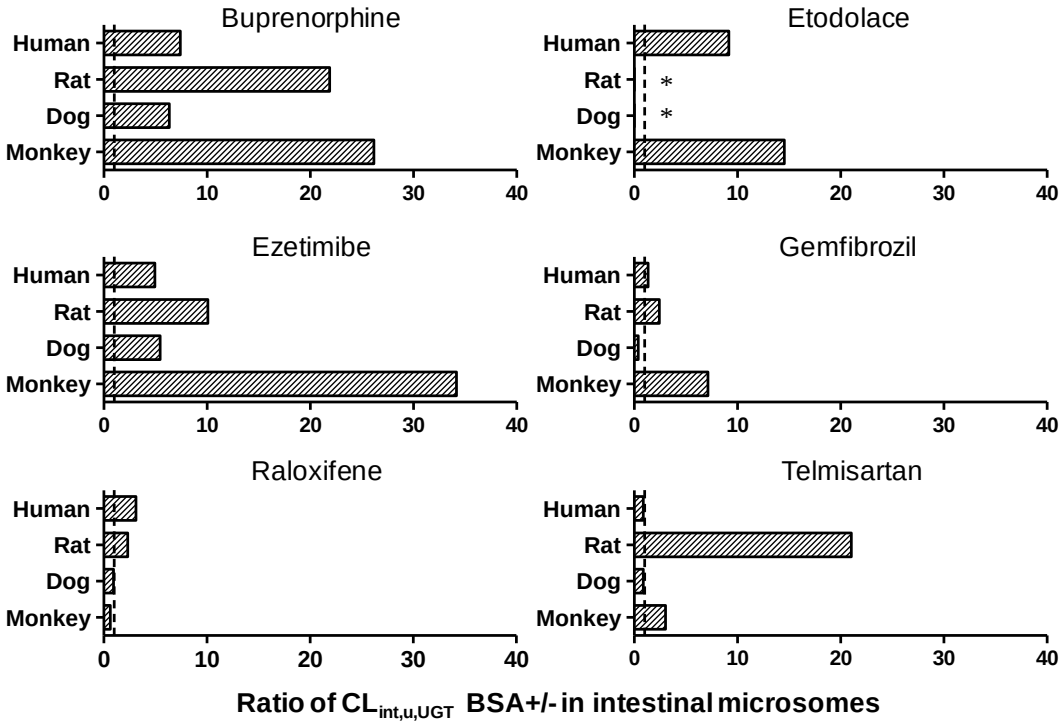


図 3-5. BSA 添加条件／非添加条件におけるヒト, ラット, イヌ, およびサル小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,UGT}$ の比
破線は BSA 添加条件／非添加条件 = 1 を示す。
*BSA 存在下では化合物の減少が認められなかったため算出できなかった。

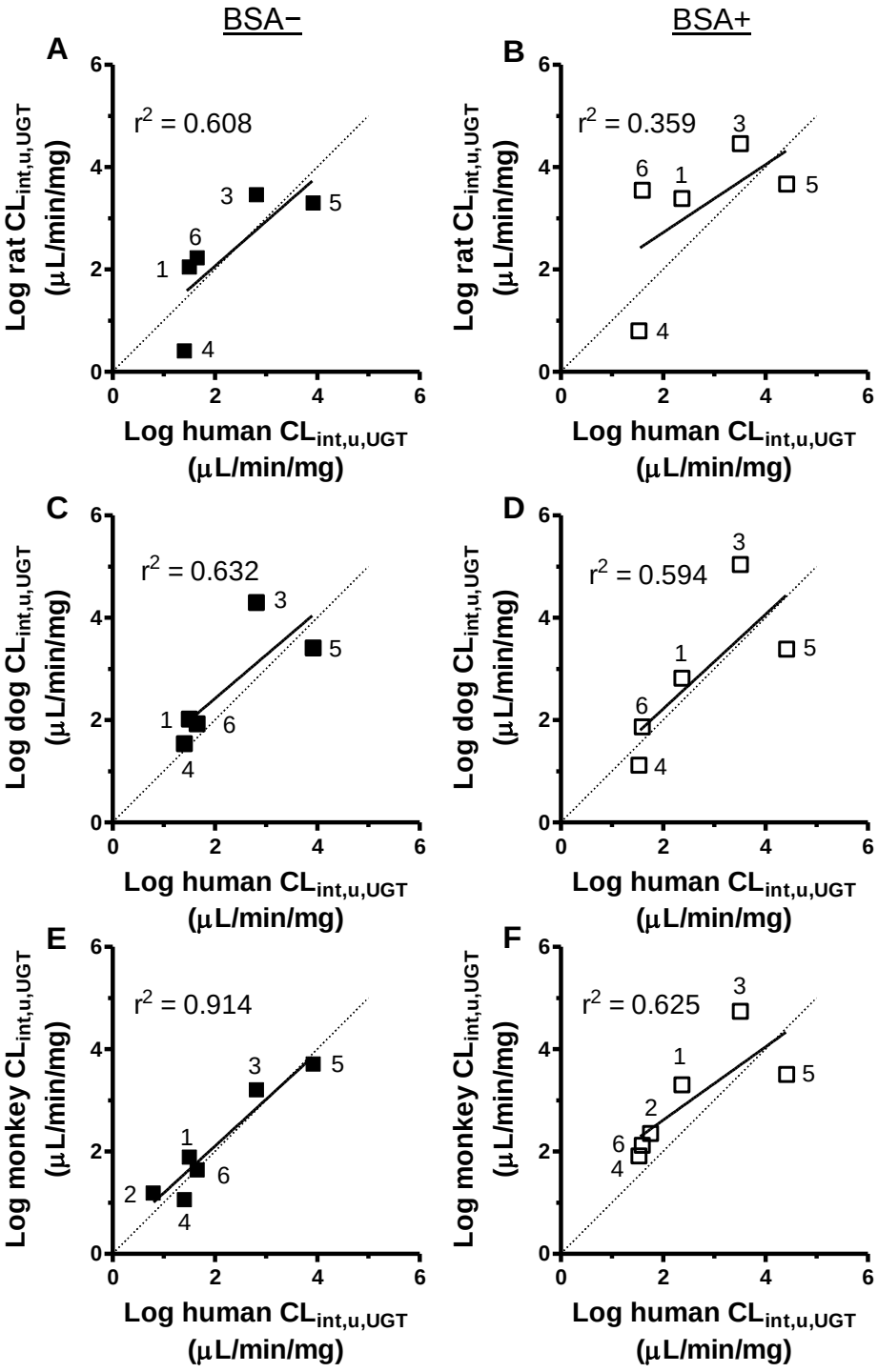


図 3-6. 小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,UGT}$ のヒトとラット, イヌ, およびサルの比較

A, C, E (■) は BSA 非添加, B, D, F (□) は BSA 添加条件を示す。x および y 軸はそれぞれヒトとラット (A, B), ヒトとイヌ (C, D), ヒトとサル (E, F) の値を示す。実線は線形回帰直線, 破線は x = y を示す。化合物は 1: buprenorphine, 2: etodolac, 3: ezetimibe, 4: gemfibrozil, 5: raloxifene, 6: telmisartan。

3-4. 考察

本研究で検討した化合物は，ヒトにおいてそれぞれ異なる UGT 分子種で代謝されるが (表 3-3)，$CL_{int,u,UGT}$ のヒトと各動物種間の相関係数は高く (図 3-2)，代謝に寄与する分子種による顕著な違いは認められなかった。前述のとおり，UGT の各分子種は基質特異性が明確ではなく，ほとんどの UGT 基質は複数の分子種により代謝されることが一因と考えられる。

第 2 章で述べたラットおよび中森ら (2012) が報告したヒトと同様に，イヌおよびサルにおいても UGT 基質の $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g には逆相関が認められ，SIA モデルを適用することができた (図 3-3)。しかしながら，算出した α の値はイヌとその他の動物種で顕著に異なっていた (表 3-6, 図 3-4)。α は CL_{ab} の逆数，および CL_m と $CL_{int,u,UGT}$ を結ぶ係数を含む値であり，吸収や消化管代謝に影響し得るパラメーター (化合物の吸収部位や吸収速度，血流量，代謝酵素の発現量など) の種差が α の種差の原因になる可能性が考えられる。実際，多くの化合物でイヌにおける経口投与時の T_{max} はラットやヒトに比べ早い，すなわち吸収速度が速い傾向があることが報告されている (Chiou *et al.*, 2000) 。その原因としては，イヌは小腸の tight junction のサイズがラットやヒトに比べ大きいために，パラセルラールートの吸収が大きいことが考えられている (Madani *et al.*, 1999) 。この吸収速度の違いが F_aF_g に影響し，α に種差が生じた可能性が考えられる。また，$CL_{int,u,UGT}$ (μL/min/mg) を体重あたりの値 (μL/min/kg) に補正する小腸のスケーリングファクター (SF)，すなわち体重あたりの小腸ミクロソームタンパク量 (mg microsomes/kg body weight) の種差が，α の種差の要因である可能性も考えられる。通常，組織の固有クリアランスはミクロソームタンパク当りの値 (μL/min/mg) を SF で体重あたりの値 (μL/min/kg) に補正して表わされる。しかし小腸ミクロソームの SF は報告数が限られており，広く一般的に使用されている値がないため，小腸の固有クリアランスは，本研究と同様に，通常 SF で補正せずに取り扱われる。ヒト，ラット，およびサルの SF についてはいくつか報告があり，それぞれ 40–90 mg/kg (Soars *et al.*, 2002; Bruyere *et al.*, 2010; Madani *et al.*, 1999), 30–40 mg/kg (Martignoni *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2009), 50 mg/kg (Fisher *et al.*, 2007) と顕著な種差は認められていない。イヌの SF は信頼できる値が報告されていないため比較できないが，今後の研究によって信頼できる値が得られた際には，SF の影響についても検討する必要があるだろう。

Yang ら (2007) は，小腸代謝と CL_{int} の関係を表すモデルとして，式 13 および 14 で表される Q_{gut} モデルを提案している。

$$F_g = Q_{gut} / (Q_{gut} + f_{uG} \times CL_{int}) \quad (13)$$

$$Q_{gut} = Q_{villi} \times CL_{perm} / (Q_{villi} + CL_{perm}) \quad (14)$$

f_{uG} は小腸細胞中のフリー体濃度，Q_{villi} は消化管絨毛血流量 (小腸血流量の約 48%)，CL_{perm} は膜透過クリアランスを示す。本モデルにおける CL_{int} は体重あたりの値 (μL/min/kg) である。本モデルにおいて $f_{uG} = 1$ かつ $CL_{perm} >> Q_{villi}$ と仮定すると，式 15 が導かれる。

$$F_g = 1 / (1 + CL_{int} / Q_{villi}) \quad (15)$$

中森ら (2012) は SIA モデルと式 15 を比較し, SIA モデルの α は SF / Q_{villi} に相当することを述べた。文献値を用いて算出したヒト, ラット, およびサルにおける SF / Q_{villi} (表 3-8) は, 本研究で得られた α (表 3-6) の値の 2 倍以内と比較的近く, 中森らの考察を支持する結果であった。しかしながら, 小腸の SF および Q_{villi} のデータは報告数が限られており, 広く一般的に使用されている値がないことに留意する必要がある。信頼できる SF および Q_{villi} の値が得られた際には, あらためて検証する必要があるだろう。

表 3-8. SF / Qvill の算出

Species	SF (mg/kg)	Q_{vill}[d] (mL/min/kg)	SF / Q_{vill}
Human	40–90[a]	7.54	0.0053–0.0119
Rat	30–40[b]	14.4	0.0021–0.0028
Dog	—	10.4	—
Monkey	50[c]	12.0	0.0042

[a]Soars *et al.*, 2002; Bruyere *et al.*, 2010; Madani *et al.*, 1999. [b]Martignoni *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2009. [c]Fisher *et al.*, 2007. [d]Davies and Morris, 1993.

前述のとおり, 近年, 組織ミクロソームを用いた *in vitro* グルクロン酸抱合代謝試験は BSA 添加条件で実施される例が多い (Rowland *et al.*, 2007, 2008; Kilford *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2012)。ヒト小腸ミクロソーム中においては, 本研究においても既報の研究と同様に, 1A9 および 2B7 で主に代謝される buprenorphine (7.4 倍) および etodolac (9.2 倍) で $CL_{int,u,UGT}$ が大きく増大し, 次いで 1A9 および 2B7 がマイナーな代謝酵素の一つである ezetimibe (4.9 倍) および raloxifene (3.1 倍) で大きな増大が認められた。Ezetimibe における増加率は, Gill ら (2012) の報告とほぼ同程度であった。Gemfibrozil (1.4 倍) は 2B7 の基質だが, Gill らの報告と同様に, BSA 添加の影響はあまり認められなかった。Gemfibrozil は 1A3 でも代謝されるが, 1A3 で主に代謝される telmisartan (0.87 倍) も gemfibrozil と同様に BSA 添加の影響が認められなかったことから, gemfibrozil は小腸ミクロソーム中では 2B7 より 1A3 の寄与が大きいのかもしれない。Telmisartan において BSA 添加の影響が認められなかったという結果は, BSA 添加により約 4 倍の増大が認められたという Gill らの報告と異なっていた。彼らは未変化体の減少により $CL_{int,u,UGT}$ を算出しているが, telmisartan は BSA への結合率が高いため, BSA 存在下では未変化体の減少が小さく, 精度よく $CL_{int,u,UGT}$ の値を得ることが難しい。そのため, 本研究においては, グルクロン酸抱合体の生成速度より $CL_{int,u,UGT}$ を算出した。この条件の違いが両者の違いの一因と考えられる。

ラット, イヌ, およびサル小腸ミクロソーム中においても BSA 存在下で $CL_{int,u,UGT}$ の増大が認められた (表 3-7, 図 3-5)。BSA による $CL_{int,u,UGT}$ 増大の程度はそれぞれの化合物および動物種で異なっており, 一定の傾向は認められなかった。ヒトと異なり, ラット小腸には 1A9 および 2B7 が発現していない。イヌにおいても, 前述のとおり網羅的な分子種の発現は調べられていないが,

現在のところ UGT1A9 および 2B7 の存在は報告されていない。また，サル小腸には 2B7 が発現していない。脂肪酸を含む UGT1A9 および 2B7 の基質は，ヒトと動物では別の分子種によりグルクロン酸抱合されるために，その増大の程度はヒトと動物では異なるのかもしれない。各分子種の特異的阻害剤を用いた実験を行うことにより，それぞれの動物において UGT1A9 および 2B7 の基質の代謝にどの分子種が寄与しているかを調べることができるが，現在のところ見出されている分子種特異的な阻害剤は，1A4 に対する hecogen などごく少数であるため (Uchaipichat *et al.*, 2006)，検討にはこの分野の進展が待たれる。また，BSA による $CL_{int,u,UGT}$ への影響は UGT1A9，2B7，1A1，1A6 等の一部の UGT 分子種でしか調べられていないが (Rowland *et al.*, 2007, 2008)，その他の分子種についても調べることにより，異なる動物種間でも何らかの傾向が見出されるかもしれない。

近年 Kilford ら (2009) は，肝ミクロソームを用いて BSA 添加条件で得た $CL_{int,u,UGT}$ を用いることにより CL_h の予測精度が向上することを報告した。一方 F_g の予測については，筆者が知る限り，BSA 存在下で得られた小腸ミクロソーム中の $CL_{int,u,UGT}$ を用いて F_g を予測した例は報告されていない。本研究においては，BSA 添加条件で $CL_{int,u,UGT}$ を求めることができた化合物が限られていることから，F_g の予測に対する BSA 添加の影響を調べることはできなかった。しかしながら図 3-3 で示したように，UGT 基質の F_aF_g と BSA 非存在下の $CL_{int,u,UGT}$ には良好な相関が認められることから，SIA モデルを用いて UGT 基質の F_aF_g を予測する際には，CL_h の予測とは異なり，BSA 添加は必須ではない可能性が考えられる。

結論として，UGT 基質の $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の相関関係は，イヌおよびサルにおいても，ヒトおよびラットと同様に認められ，SIA モデルで表すことができた。SIA モデルの α は，ヒト，ラット，およびサルにおいては比較的近い値であったが，イヌでは他の動物種と 3 倍以上異なっていた。BSA 添加による $CL_{int,u,UGT}$ の増加は，ヒトだけでなく，ラット，イヌ，サルの小腸ミクロソームでも認められたが，その増加率は動物種および化合物ごとに異なっていた。しかし，BSA の添加の有無にかかわらず，$CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g には良好な相関が認められていることから，SIA モデルを用いて $CL_{int,u,UGT}$ から F_aF_g を予測する際には，BSA 添加は必須ではない可能性が考えられた。これらの知見は，創薬研究において化合物の体内動態の決定因子を明らかにし，ヒトで高い F_aF_g が期待できる医薬品候補を創製するために有用である。

総括

化学構造が類似した 3 つの新規カルボン酸化合物が小腸グルクロン酸抱合代謝の基質であること，およびその F_aF_g の決定因子は小腸グルクロン酸抱合代謝安定性であることを見出した。

ラットにおいて，様々な構造の吸収性が良好な UGT 基質 7 化合物を用いて，F_aF_g と $CL_{int,UGT}$ の間に逆相関が成り立つことを見出した。この関係に SIA モデルをあてはめることにより，ラット $CL_{int,UGT}$ より F_g を予測する式を構築した。

イヌおよびサルにおいても，ラットおよびヒトと同様に，$CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g の間に逆相関関係が認められたが，SIA モデルによるフィッティングカーブには種差があり，特にイヌでは大きく異なっていることを見出した。

BSA 添加による $CL_{int,u,UGT}$ の増加は，これまでに報告されているヒトだけでなく，ラット，イヌ，およびサルの小腸ミクロソームにおいても認められ，その増加率は動物種および化合物ごとに異なっていた。しかしながら，BSA 非添加条件において $CL_{int,u,UGT}$ と F_aF_g に良好な相関が認められていることから，SIA モデルを用いて $CL_{int,u,UGT}$ から F_aF_g を予測する際には，BSA 添加は必須ではない可能性が考えられた。

これらの知見は，創薬研究において化合物の体内動態の決定因子を明らかにし，ヒトで高い F_aF_g が期待できる医薬品候補を創製するために有用である。

謝辞

本論文の発表ならびに作成にあたり，終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜わりました北海道大学大学院薬学研究院 原島 秀吉 教授に深く感謝いたします。

本研究を行う機会を与えて下さいましたアステラス製薬株式会社 研究本部 塚本 紳一 本部長に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり，終始御指導御鞭撻を賜りましたアステラス製薬株式会社 研究本部 創薬推進研究所 寺村 俊夫 所長，創薬推進研究所 創薬代謝研究室 田端 健司 室長，アステラス分析科学研究所株式会社 GLP 分析研究部 寺下 茂之 部長 に謹んで感謝申し上げます。

本論文の発表ならびに作成にあたり，終始丁寧なご指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 菅原 満 教授，秋田 英万 准教授，武隈 洋 准教授に深謝いたします。

本論文の発表ならびに作成にあたり，終始暖かい御激励をいただきました北海道大学 大塚 榮子 名誉教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり，終始丁寧なご指導を賜りましたアステラス製薬株式会社 研究本部 創薬推進研究所 成富 洋一 氏，代謝研究所 山野 勝弘 氏に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり，終始有益なご助言，ご討論をいただきましたアステラス製薬株式会社 研究本部 創薬推進研究所 創薬代謝研究室 手塚 和宏 氏，中森 文洋 氏，森口 博行 氏，田中 浩一郎 氏，門野 啓太郎 氏に心より感謝申し上げます。化合物をご提供いただきましたアステラス製薬株式会社 研究本部 化学研究所 平山 復志 氏，大根 和彦 氏に感謝申し上げます。実験にご協力いただきましたアステラスリサーチテクノロジー 薬理研究部 中島 淑光 氏，平野 雅裕 氏に感謝申し上げます。種々のご協力をいただきましたアステラス製薬株式会社 研究本部 創薬推進研究所の皆様ならびにアステラスリサーチテクノロジー 薬理研究部および創薬推進研究部の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

Bock KW, Bock-Hennig BS, Munzel PA, Brandenburg JO, Kohle CT, Soars MG, Riley RJ, Burchell B, von Richter O, Eichelbaum MF, Swedmark S, Orzechowski A. (2002). Tissue-specific regulation of canine intestinal and hepatic phenol and morphine UDP-glucuronosyltransferases by beta-naphthoflavone in comparison with humans. Biochem Pharmacol 63:1683-1690.

Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NH, van Iersel ML, van Bladeren PJ, Rietjens IM. (2002). Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. Chem Res Toxicol 15:662-670.

Brewster D, Humphrey MJ, McLeavy MA. (1981). Biliary excretion, metabolism and enterohepatic circulation of buprenorphine. Xenobiotica 11:189-196.

Brown SM, Holtzman M, Kim T, Kharasch ED. (2011). Buprenorphine metabolites, buprenorphine-3-glucuronide and norbuprenorphine-3-glucuronide, are biologically active. Anesthesiology 115:1251-1260.

Buckley DB, Klaassen CD. (2007). Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. Drug Metab Dispos 35:121-127.

Cayen MN, Kraml M, Ferdinandi ES, Greselin E, Dvornik D. (1981). The metabolic disposition of etodolac in rats, dogs, and man. Drug Metab Rev 12:339-362.

Chen X, Yin OQ, Zuo Z, Chow MS. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. Pharm. Res. 22:892-901.

Chiou WL, Jeong HY, Chung SM, Wu TC. (2000). Evaluation of using dog as an animal model to study the fraction of oral dose absorbed of 43 drugs in humans. Pharm Res 17:135-140.

Court MH. (2005). Isoform-selective probe substrates for *in vitro* studies of human UDP-glucuronosyltransferases. Methods Enzymol 400:104-116.

Dalvie D, Kang P, Zientek M, Xiang C, Zhou S, Obach RS. (2008). Effect of intestinal glucuronidation in limiting hepatic exposure and bioactivation of raloxifene in humans and rats. Chem Res Toxicol 21:2260-2271.

Deguchi T, Watanabe N, Kurihara A, Igeta K, Ikenaga H, Fusegawa K, Suzuki N, Murata S, Hirouchi M, Furuta Y, Iwasaki M, Okazaki O, Izumi T. (2011). Human pharmacokinetic prediction of UDP-glucuronosyltransferase substrates with an animal scale-up approach. Drug Metab Dispos 39:820-829.

Ebner T, Heinzel G, Prox A, Beschke K, Wachsmuth H. (1999). Disposition and chemical stability of telmisartan 1-O-acylglucuronide. Drug Metab Dispos. 27:1143-1149.

Fan Y, Tang L, Zhou J, Feng Q, Xia B, Liu Z. (2013). Simultaneous determination of sulfation and glucuronidation of flavones in FVB mouse intestine *in vitro* and *in vivo*. J Appl Toxicol 33:273-280.

FDA Drug Approval Package, Comtan (Entacapone) Tablets, Application No.20796, 30 Dec. 1999, Pharmacology Reviews, 90, available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/20796_Comtan_pharmr_P1.pdf (last accessed Nov 2010).

FDA Drug Approval Package, Zetia (Ezetimibe) Tablets, Application No.21445, 25 Oct. 2002, Pharmacology Reviews, 62, available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/21445_Zetia_pharmr_P2.pdf (last accessed Nov 2010).

FDA Drug Approval Package, Micards (Telmisartan) Tablets, Application No.20850, 10 Nov. 1998, Pharmacology Reviews, 32-51, available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20850_MICARDIS_pharmr_P1.pdf, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20850_MICARDIS_pharmr_P2.pdf (last accessed Nov 2010).

FDA Drug Approval Package, Tasmar (Tolcapone) Tablets, Application No.20697, 1 Jan. 1998, Pharmacology Reviews, 136, available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20697_Tasmar_pharmr_P3.pdf (last accessed Nov 2010).

Fisher MB, Labissiere G. (2007). The role of the intestine in drug metabolism and pharmacokinetics: an industry perspective. Curr Drug Metab 8:694-9.

Frank R, Hargreaves R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov 2:566-580.

Furukawa T, Nakamori F, Tetsuka K, Naritomi Y, Moriguchi H, Yamano K, Terashita S, Teramura T. (2012a). Quantitative prediction of intestinal glucuronidation of drugs in rats using *in vitro* metabolic clearance data. Drug Metab Pharmacokinet 27:171-180.

Furukawa T, Naritomi Y, Tetsuka K, Nakamori F, Moriguchi H, Yamano K, Terashita S, Tabata K, Teramura T. (2013). Species differences in intestinal glucuronidation activities between humans, rats, dogs and monkeys. Xenobiotica: *in press*.

Furukawa T, Yamano K, Naritomi Y, Tanaka K, Terashita S, Teramura T. (2012b). Method for predicting human intestinal first-pass metabolism of UGT substrate compounds. Xenobiotica 42:980-988.

Gertz M, Harrison A, Houston JB, Galetin A. (2010). Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from *in vitro* clearance and permeability data. Drug Metab Dispos 38:1147-1158.

Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Achanfuo-Yeboah J, Iannucci R, Chowdhury S, Alton K, Patrick JE, Zbaida S. (2004). Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of ezetimibe (Zetia). Drug Metab Dispos 32:314-320.

Gill KL, Houston JB, Galetin A. (2012). Characterization of *in vitro* glucuronidation clearance of a

range of drugs in human kidney microsomes: comparison with liver and intestinal glucuronidation and impact of albumin. Drug Metab Dispos 40:825-835.

Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, Popescu NC. (2001). Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. Pharmacogenetics 11:357-368.

Hoffman DJ, Seifert T, Borre A, Nellans HN. (1995). Method to estimate the rate and extent of intestinal absorption in conscious rats using an absorption probe and portal blood sampling. Pharm Res 12:889-894.

Huang C, Chen Y, Zhou T, Chen G. (2009). Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases. Xenobiotica 39:312-322.

Jeong EJ, Liu Y, Lin H, Hu M. (2005). Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. Drug Metab Dispos 33:785-794.

Kadono K, Akabane T, Tabata K, Gato K, Terashita S, Teramura T. (2010). Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor. Drug Metab Dispos 38:1230-1237.

Kato M, Chiba K, Hisaka A, Ishigami M, Kayama M, Mizuno N, Nagata Y, Takakuwa S, Tsukamoto Y, Ueda K, Kusuhara H, Ito K, Sugiyama Y. (2003). The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature. Drug Metab Pharmacokinet 18:365-372.

Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. (2002). Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. Drug Metab Dispos 30:694-700.

Kilford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston JB, Galetin A. (2009). Prediction of drug clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes. Drug Metab Dispos 37:82-89.

Kobayashi K, Yamamoto T, Chiba K, Tani M, Shimada N, Ishizaki T, Kuroiwa Y. (1998). Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4. Drug Metab Dispos 26:818-821.

Komura H, Iwaki M. (2008). Species differences in in vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A substrates. J Pharm Sci 97:1775-1800.

Komura H, Iwaki M. (2011). In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. Drug Metab Rev 43:476-498.

Kosaka K, Sakai N, Endo Y, Fukuhara Y, Tsuda-Tsukimoto M, Ohtsuka T, Kino I, Tanimoto T, Takeba N, Takahashi M, Kume T. (2011). Impact of intestinal glucuronidation on the pharmacokinetics of raloxifene. Drug Metab Dispos 39:1495-1502.

Kosoglou T, Statkevich P, Johnson-Levonas AO, Paolini JF, Bergman AJ, Alton KB. (2005).

Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. Clin Pharmacokinet 44:467-494.

Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, Hahn U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. Biochem. Biophys Res Commun 272:212-217.

Kumar S, Samuel K, Subramanian R, Braun MP, Stearns RA, Chiu SH, Evans DC, Baillie TA. (2002). Extrapolation of diclofenac clearance from in vitro microsomal metabolism data: role of acyl glucuronidation and sequential oxidative metabolism of the acyl glucuronide. J Pharmacol Exp Ther 303:969-978.

Lan K, Jiang X, He J. (2007). Quantitative determination of isorhamnetin, quercetin and kaempferol in rat plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to the pharmacokinetic study of isorhamnetin. Rapid Commun. Mass Spectrom 21:112-120.

Lave T, Dupin S, Schmitt M, Kapps M, Meyer J, Morgenroth B, Chou RC, Jaeck D, Coassolo P. (1996). Interspecies scaling of tolcapone, a new inhibitor of catechol-O-methyltransferase (COMT). Use of *in vitro* data from hepatocytes to predict metabolic clearance in animals and humans. Xenobiotica 26:839-851.

Lindstrom TD, Whitaker NG, Whitaker GW. (1984). Disposition and metabolism of a new benzothiophene antiestrogen in rats, dogs and monkeys. Xenobiotica 14:841-847.

Madani S, Paine MF, Lewis L, Thummel KE, Shen DD. (1999). Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. Pharm Res 16:1199-1205.

Maiti S, Chen G. (2003). Tamoxifen induction of aryl sulfotransferase and hydroxysteroid sulfotransferase in male and female rat liver and intestine. Drug Metab Dispos 31:637-644.

Mano Y, Usui T, Kamimura H. (2007). Contribution of UDP-glucuronosyltransferases 1A9 and 2B7 to the glucuronidation of indomethacin in the human liver. Eur J Clin Pharmacol 63:289-296.

Marier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.P., and Ducharme, M.P. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. J Pharmacol Exp Ther 302: 369-373.

Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2:875-94.

Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. (2004). Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. J Agric Food Chem 52:935-942.

Mistry M, Houston JB. (1987). Glucuronidation in vitro and in vivo. Comparison of intestinal and

hepatic conjugation of morphine, naloxone, and buprenorphine. Drug Metab Dispos 15:710-717.

Mizuma T. (2009). Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. Int J Pharm 378:140-141.

Mizuma T, Kawashima K, Sakai S, Sakaguchi S, Hayashi M. (2005). Differentiation of organ availability by sequential and simultaneous analyses: intestinal conjugative metabolism impacts on intestinal availability in humans. J Pharm Sci 94:571-575.

Nakamori F, Naritomi Y, Furutani M, Takamura F, Miura H, Murai H, Terashita S, Teramura T. (2011). Correlation of intrinsic in vitro and in vivo clearance for drugs metabolized by hepatic UDP-glucuronosyltransferases in rats. Drug Metab Pharmacokinet 26:465-73.

Nakamori F, Naritomi Y, Hosoya K, Moriguchi H, Tetsuka K, Furukawa T, Kadono K, Yamano K, Terashita S, Teramura T. (2012). Quantitative prediction of human intestinal glucuronidation effects on intestinal availability of UDP-glucuronosyltransferase substrates using in vitro data. Drug Metab Dispos 40:1771-1777.

Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y. (2001). Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. Drug Metab Dispos 29:1316-1324.

Nishimura M, Koeda A, Morikawa H, Satoh T, Narimatsu S, Naito S. (2009). Tissue-specific mRNA expression profiles of drug-metabolizing enzymes and transporters in the cynomolgus monkey. Drug Metab Pharmacokinet 24:139-144.

Nishimuta H, Sato K, Yabuki M, Komuro S. (2011). Prediction of the Intestinal First-pass Metabolism of CYP3A and UGT Substrates in Humans from in vitro Data. Drug Metab Pharmacokinet 26:592-601.

Ohno S, Nakajin S. (2009). Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Drug Metab Dispos 37:32-40.

Palylyk-Colwell EL, Jamali F. (2004). Effect of gonadectomy and hormones on sex differences in ketoprofen enantiomer glucuronidation and renal excretion of formed glucuronides in the rat. Pharm Res 21:989-995.

Peris-Ribera JE, Torres-Molina F, Garcia-Carbonell MC, Aristorena JC, Pla-Delfina JM. (1991). Pharmacokinetics and bioavailability of diclofenac in the rat. J Pharmacokinet Biopharm 19:647-665.

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) in Japan (2007). Review Report for Zetia (Ezetimebe) tablets:16, available from: http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/P200700023/170050000_21900AMY00021000_A100_2.pdf (last accessed Apr 2013).

Priymenko N, Ferre JP, Rascol A, Costes G, Toutain PL. (1993). Migrating motor complex of the

intestine and absorption of a biliary excreted drug in the dog. J Pharmacol Exp Ther 267:1161-1167.

Ritter JK. (2007). Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drugs and xenobiotics. Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. 3:93-107.

Rouguieg K, Picard N, Sauvage FL, Gaulier JM, Marquet P. (2010). Contribution of the different UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with the main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes. Drug Metab Dispos 38:40-45.

Rowland A, Gaganis P, Elliot DJ, Mackenzie PI, Knights KM, Miners JO. (2007). Binding of inhibitory fatty acids is responsible for the enhancement of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 activity by albumin: implications for in vitro-in vivo extrapolation. J Pharmacol Exp Ther 321:137-147.

Rowland A, Knights KM, Mackenzie PI, Miners JO. (2008). The "albumin effect" and drug glucuronidation: bovine serum albumin and fatty acid-free human serum albumin enhance the glucuronidation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 substrates but not UGT1A1 and UGT1A6 activities. Drug Metab Dispos 36:1056-1062.

Sabolovic N, Heydel JM, Li X, Little JM, Humbert AC, Radominska-Pandya A, Magdalou J. (2004). Carboxyl nonsteroidal anti-inflammatory drugs are efficiently glucuronidated by microsomes of the human gastrointestinal tract. Biochim Biophys Acta 1675:120-129.

Sakaguchi K, Green M, Stock N, Reger TS, Zunic J, King C. (2004). Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms. Arch Biochem Biophys 424:219-225.

Sawada Y. (1985). Animal scale up. In: Hanano M, Umemura K, eds. Applied Pharmacokinetics ―Theory and Experiments―. Tokyo: Soft Science, Inc.:477.

Shelby MK, Cherrington NJ, Vansell NR, Klaassen CD. (2003). Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. Drug Metab Dispos 31:326-333.

Shimasaki M, Yamashita K, Imanishi R, Yokoyama K, Kuritani M, Oiwa Y, Igarashi T. (1999). Pharmacokinetics of ^{14}C-telmisartan (1): absorption, distribution and protein binding of ^{14}C-telmisartan after a single oral administration to rats. Xenobio Metabol and Dispos 14:425-431.

Soars MG, Riley RJ, Findlay KA, Coffey MJ, Burchell B. (2001). Evidence for significant differences in microsomal drug glucuronidation by canine and human liver and kidney. Drug Metab Dispos 29:121-126.

Tong Z, Li H, Goljer I, McConnell O and Chandrasekaran A (2007). In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. Drug Metab Dispos 35:2203-2210.

Uchaipichat V, Mackenzie PI, Elliot DJ, Miners JO. (2006). Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin,

phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfinpyrazone) "probes" for human udp-glucuronosyltransferases. Drug Metab Dispos 34:449-56.

van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Alton KB, Sybertz EJ, Davis HR, Jr. (2000). Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. Br J Pharmacol 129:1748-1754.

Webb LJ, Miles KK, Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK. (2005). Analysis of substrate specificities and tissue expression of rat UDP-glucuronosyltransferases UGT1A7 and UGT1A8. Drug Metab Dispos 33:77-82.

Wenzel E, Somoza V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. Mol Nutr Food Res 49:472-481.

Wikberg T, Vuorela A. (1994). Metabolite profiles of two [14C]-labelled catechol O-methyltransferase inhibitors, nitecapone and entacapone, in rat and mouse urine and rat bile. Eur. J. Drug Metab Pharmacokinet 19:125-135.

Wikberg T, Vuorela A, Ottoila P, Taskinen J. (1993). Identification of major metabolites of the catechol-O-methyltransferase inhibitor entacapone in rats and humans. Drug Metab Dispos 21:81-92.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. (2004). Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios. Drug Metab Dispos 32:1201-1208.

Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. (2011). First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. J Pharm Sci 100:3655-3681.

Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. (1981). A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. J Pharmacobiodyn 4:879-885.

Yang J, Jamei M, Yeo KR, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A (2007). Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. Curr Drug Metab 8:676-684.

Yang XX, Hu ZP; Boelsterli UA, Zhou SF. (2006). Drug acyl glucuronides: reactivity and analytical implication. Current Pharmaceutical Analysis 2:259-277.

Yokoi T. (2009). Evaluation of phase II drug metabolizing enzymes in the discovery stage. Folia Pharmacol Jpn 134:334-337.

Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, van Breemen RB. (2002). Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. Pharm Res 19:1907-1914.

Zhang L, Zuo Z, Lin G. (2007). Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. Mol Pharm 4:833-845.