

薬物の経口吸収評価を目的とした
in vitro 細胞透過性試験の新規モデル解析

2016

尾關 和久

目次	ページ
論文リスト	2
略語表	3
序論	5
第1章 薬物の細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデル構築	11
1. 緒言	12
2. 理論	14
3. 考察	25
第2章 細胞透過性試験のシミュレーションによる検証	28
1. 緒言	29
2. 方法	31
3. 結果	33
4. 考察	37
第3章 Caco-2 細胞透過性試験によるモデルの有用性評価	40
1. 緒言	41
2. 方法	42
3. 結果	46
4. 考察	53
総括	56
謝辞	59
引用文献	60

論文リスト

本論文は、以下の原著論文に基づいたものである。

Kazuhisa Ozeki, Motohiro Kato, Yuuji Sakurai, Masaki Ishigai, Toshiyuki Kudo, Kiyomi Ito

Evaluation of the appropriate time range for estimating the apparent permeability coefficient (P_{app})

in a transcellular transport study

International Journal of Pharmaceutics 495 (2015) 963-971

略語表

本論文では、以下の略語を用いた。

ABC	ATP-binding cassette
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter、頂膜ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター
ATP	adenosine triphosphate、アデノシン三リン酸
BCRP	breast cancer resistance protein、乳癌耐性タンパク質
BSA	bovine serum albumin、牛血清アルブミン
C ₁	Apical 側薬物濃度
C ₂	細胞内薬物濃度
C ₃	Basal 側薬物濃度
DDI	drug–drug interaction、薬物相互作用
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
FaSSIF	fasted state simulated intestinal fluid、絶食時小腸内模擬腸液
FBS	fetal bovine serum、ウシ胎児血清
Fu ₁	Apical 側の非結合形分率
Fu ₂	細胞内の非結合形分率
Fu ₃	Basal 側の非結合形分率
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid
MCT	monocarboxylate transporter、モノカルボン酸トランスポーター
MRP	multidrug resistance protein、多剤耐性関連タンパク質
Neaa	non-essential amino acids、非必須アミノ酸
OAT	organic anion transporter、有機アニオントランスポーター

OCT	organic cation transporter、有機カチオントランスポーター
P _{app}	apparent permeability coefficient、見かけの透過係数
P-gp	P-glycoprotein、P-糖タンパク質
PS ₁	Apical 側から細胞内への取り込みクリアランス
PS ₂	細胞内から Apical 側への排出クリアランス
PS ₃	細胞内から Basal 側への排出クリアランス
PS ₄	Basal 側から細胞内への取り込みクリアランス
S.D.	standard deviation、標準偏差
SLC	solute carrier
TEER	transepithelial electrical resistance、経上皮電気抵抗
V ₁	Apical 側の容量
V ₂	細胞内容量
V ₃	Basal 側の容量

序論

薬物投与経路としての経口投与の長所として、①投与が自然で簡便であること、②幅広い物性の医薬品に応用可能であること、③注射と比べて容量が多くても投与が可能であること、④消化管の吸収効率は皮膚などと比べて良好であること、⑤吸収部位や吸収パターンの制御が技術的に可能であること、⑥一般に注射と比べて安全なことなどが挙げられる (1)。厚生労働省から発表されている薬価基準収載品目リストにおいて、医薬品は内用薬 (口から飲み込む薬)、注射薬、外用薬 (軟膏、坐薬、吸入薬、うがい薬など)、歯科用薬剤に分類されており (2)、2015 年 12 月現在の収載品目約 15,000 のうち内服薬に分類されている薬物は約 60%と半数以上が経口投与剤である。一方、経口投与の問題点として、①服用が不確実であること、②幼児・老人は服用困難な場合があること、③意識のない患者には投与不可能であること、④味や臭いが重要になること、⑤胃腸障害を起こす可能性があること、⑥消化管内は薬物が分解しやすい環境下にあること、⑦食物の影響を受けやすいこと、⑧吸収に一定時間がかかること、⑨生物学的利用率の低い薬物があることが挙げられている (1)。

経口投与された薬物が循環血中に入るまでの過程を図 1 に示す。経口投与された薬物は消化管管腔から上皮細胞を通過して吸収され、小腸上皮細胞および肝臓において一部が代謝され、代謝されなかった薬物が循環血中へ移行する。このことから生物学的利用率は吸収率と小腸上皮細胞および肝臓での代謝を免れた比率の積で表現され、生物学的利用率の高い薬物を開発するためには、上皮細胞透過性が高い薬物をスクリーニングすることが重要である。

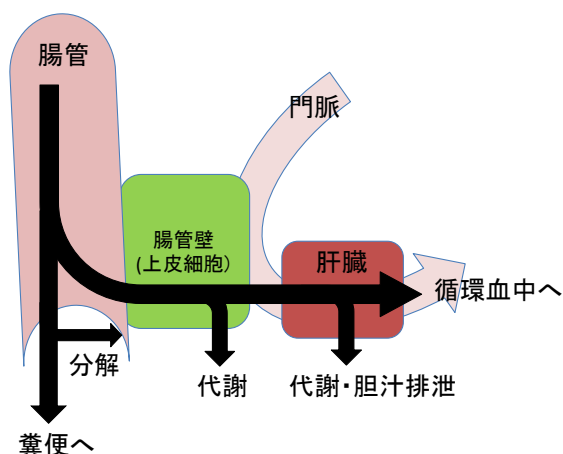


図1 経口投与された薬物が循環血中に入るまでの過程

上皮細胞透過性が低い薬物の一例として、骨粗鬆症治療薬であるエチドロン酸二ナトリウムが挙げられる。エチドロン酸二ナトリウムはヒトに ^{14}C 標識体を経口投与したときの吸収率が約4～7%と非常に低く、また生物学的利用率は1～6%と個人差が大きいことが報告されている (3)。エチドロン酸二ナトリウムは小腸上皮細胞および肝臓でほとんど代謝されないことから、生物学的利用率の個人差は上皮細胞透過性が低いことに起因すると考えられる (3)。このように臨床上、吸収率が低い薬物では血中濃度の個人間変動が大きいという問題が起きている。

経口投与される薬物の分類方法の一つとして、Amidon らにより 1995 年に提唱された Biopharmaceutics Classification System (BCS クラス) (4)がある。薬物の溶解性および膜透過性の科学的データに基づき、薬物を4つのクラスに分類する概念で、クラス I は溶解性および膜透過性の両方が高い薬物、クラス II は溶解性が低く膜透過性が高い薬物、クラス III は溶解性が高く膜透過性が低い薬物、クラス IV は溶解性および膜透過性の両方が低い薬物と定義されている。アメリカ、イギリス、スペインおよび日本の各国における 2005 年売上ランキング上位 200 の経口剤をそれぞれ抽出し、それらを BCS クラスに分類すると、約 40% がクラス III、IV に分類され、膜透過性が低い薬物が多く含まれていることが報告されている

(5)。また、メルク社で合成される薬物の平均分子量は、1960 年には約 200 だったのに対して、2000 年では約 600 と年々増加傾向になっているにも関わらず、脂溶性の指標である Log P はほとんど変わらないため、膜透過性は低下傾向にあることが報告されている (6)。製薬会社では高い薬効性を有する化合物を合成したにも関わらず、薬物の膜透過性評価の段階で開発候補化合物として不適と判断することが増えており、創薬初期段階においてできるだけ正確に膜透過性を評価することが求められている。

薬物の上皮細胞透過性を *in vitro* で評価し、ヒト経口吸収率を予測する系として一般的に実施されているのが Caco-2 細胞を用いた透過性試験である (7-10)(図 2)。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株で、培養すると小腸の円柱上皮細胞に似た刷子縁やタイトジャンクションの形態学的特徴を示し、単層の細胞層を形成する。この細胞をトランスメンブレン上で培養し、管腔側 (刷子縁膜側) である Apical 側に薬物を添加し、血管側である Basal 側の溶液を経時的にサンプリングすることにより、時間あたりに透過した薬物量を測定する。

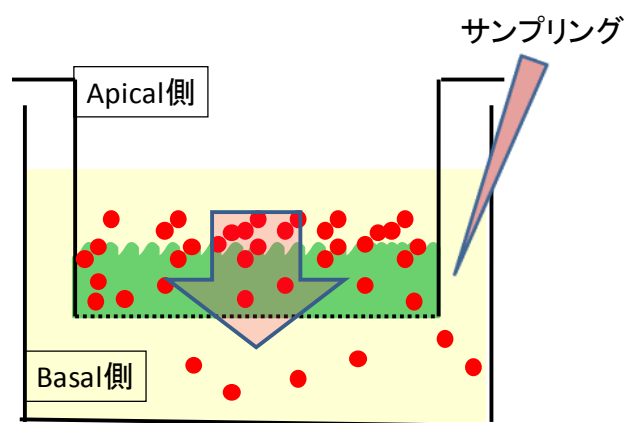


図 2 Caco-2 細胞を用いた細胞透過性評価

Caco-2 細胞をトランスメンブレン上で培養し、Apical 側 (管腔側) に薬物を添加した後、Basal 側 (血管側) の溶液を経時的にサンプリングし薬物濃度を測定することにより、細胞透過性を評価する。

このような実験において評価した Caco-2 細胞の透過性はヒトにおける経口吸収率と相関することが明らかとなっており(7, 11-13)、この相関からヒトにおける経口吸収率を予測することが可能になっている(図3)。

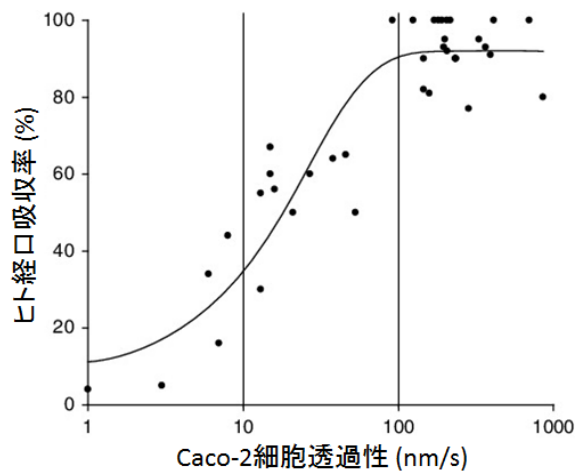


図3 Caco-2 細胞透過性とヒト経口吸収率の関係(14)

構造に偏りが無いように無作為に選択された 37 種類の市販薬について、Caco-2 細胞透過性と文献で報告されているヒト経口吸収率(15-17)の関係を明らかにした(14)。

Caco-2 細胞を用いた細胞透過性評価では通常、Apical 側に薬物を添加した後、60～180 分間のインキュベーションを行い、インキュベーション終了時の Basal 側薬物濃度を原点と結ぶことによって、透過速度 (dQ/dt) が算出される(図4)。 dQ/dt は、みかけの透過係数 (P_{app}) と細胞表面積と添加濃度の積で表されることから、 P_{app} は式(1)によって算出される(7, 16)。

$$P_{app} = \frac{1}{C_1(0) \times S} \times \frac{dQ}{dt} \quad (1)$$

dQ/dt は薬物の透過速度 (単位時間あたりに Basal 側に出現する薬物量)、
 S は細胞全体の表面積、 $C_1(0)$ は Apical 側の薬物添加濃度。

このときの前提条件として、薬物の細胞内分布は無視できること、Basal 側の薬物濃度は直線的に増加すること、一度透過した薬物は細胞内に戻らないこと (すなわちシンク条件) 、Apical 側の濃度変化は小さいこと、細胞内への薬物の蓄積は考慮しないこと、などが仮定されている(7, 11, 16, 18)。しかし、Caco-2 細胞透過性試験ではしばしば Apical 側に薬物を添加してから Basal 側に薬物が出現するまでにラグタイムが認められ、また、インキュベーションの後半には Basal 側の薬物濃度推移が頭打ちになり、直線的に増加する時間範囲が限定的であることが報告されている (図 4) (19-22)。このようなケースでは、1 時点の Basal 側濃度のみから正確な P_{app} を評価することは困難である。

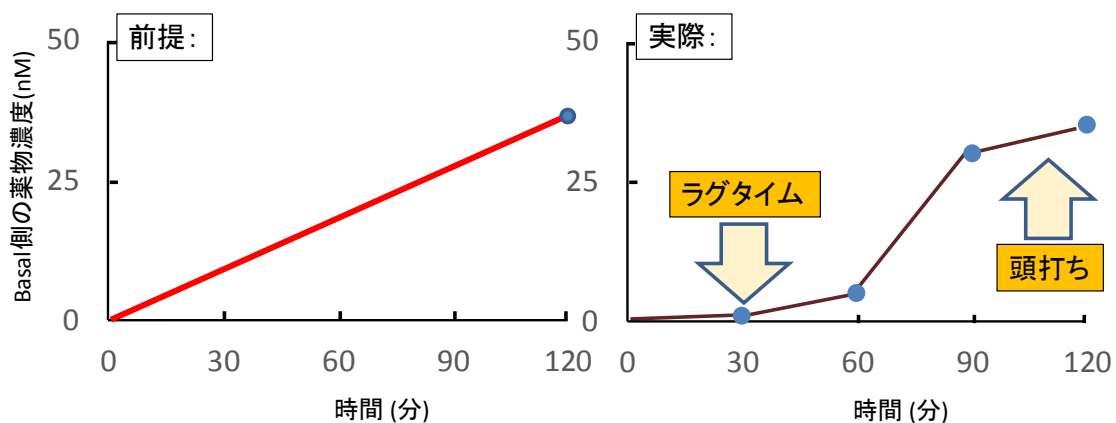


図 4 Caco-2 細胞を用いた薬物の細胞透過性評価の前提と実際 (概念図)

Basal 側の薬物濃度推移にラグタイムが認められる理由の 1 つとして、薬物が細胞内に分布しマトリックスと結合することが考えられる。Moyes らは Caco-2 細胞をトランスメンブレン上で 21 日間培養し、ヨウ化プロピジウム液で染色したのち、共焦点顕微鏡で細胞の高さを測定した結果、 $27.2 \pm 1.7 \mu\text{m}$ (平均 $\pm$ S.D., $n=27$) であることを報告した(18, 23)。Caco-2 細胞を 24well プレートで培養することを想定すると、各 well の表面積 (0.33 cm^2) と細胞の高さの積から各 well の細胞内容量は $0.9 \mu\text{L}$ と算出され、この値を用いるこ

とで薬物の細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデルの構築が可能と考えられた。

また、インキュベーション後半には Basal 側薬物濃度が上昇し、Basal 側から細胞内への back flux によってシンク条件が成立しなくなることが、Basal 側の薬物濃度推移が頭打ちになる理由の一つであると考えられる(21)。欧州医薬品庁の薬物相互作用に関するガイドラインでは、薬物の Caco-2 細胞透過性試験において、Basal 側の薬物濃度が添加濃度の 10%以下となるようなシンク条件が成立した状態を維持していることを確認することと記載されている(24)。

しかし、これまでに Caco-2 細胞透過性試験において Apical 側、細胞内、Basal 側の各々の薬物濃度推移を測定し、式 (1) の前提条件が成立しているか否かについて検証した例はなく、また、Basal 側の濃度推移が直線になる時間範囲について詳細に検討した例も報告されていない。

目的

本研究では、薬物の細胞透過性試験において透過係数 P_{app} を適切に評価するために、以下の検討を行った。

- 1、細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデルとして3-コンパートメントモデルを構築し、各部位の薬物濃度推移の解析解を導いた。さらに、本モデルにおける膜透過クリアランスと P_{app} との関係を明らかにするとともに、得られた解析解を Taylor 展開し、Basal 側濃度推移が直線になる時間範囲について検討した。
- 2、薬物の細胞透過性試験における Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移に及ぼす薬物の膜透過性と細胞内結合の影響をシミュレーションにより検討した。
- 3、代表的な薬物を用いて Caco-2 細胞透過性試験を実施し、Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移を本モデルに当てはめることにより、モデルの有用性を確認した。

第 1 章 薬物の細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデル構築

1. 緒言

薬物の膜透過性やトランスポーターを介する薬物相互作用の評価を目的として経細胞輸送試験に関する理論的検討を行う場合、経細胞輸送モデルとして多くの研究者は Apical 側、細胞内、Basal 側の 3 つのコンパートメントから成るモデルを使用している(11, 20, 21, 25-27)。3-コンパートメントモデル以外を使用した例として、Trun らは P-糖タンパク質 (P-gp) を発現させた Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いて amprenavir、quinidine および loperamide の透過性試験を実施し、Apical 側と Basal 側から成る 2-コンパートメントモデルを用いて濃度推移を評価しているが(28)、2-コンパートメントモデルは細胞内分布が大きい薬物には適用できない。また、薬物の膜透過における非攪拌水層の影響を考慮するために、Timo らは Apical 側と Basal 側のそれぞれに非攪拌水層を組み込んだ 5-コンパートメントモデルを構築し、metoprolol、propranolol、verapamil、ibuprofen、atenolol、antipyrine の細胞透過性評価に有用であることを報告している(29-31)。

トランスポーターを介する薬物相互作用評価を行うために、Ken らは数式処理システム Mathematica[®]を用いて3-コンパートメントモデルの物質収支式から解析解を初めて求めた(20)。P-gp を発現させた MDCK 細胞を用いて10個の市販薬の透過性試験を実施した結果、verapamil、labetalol および minoxidil においては Basal 側の濃度推移に15～30分のラグタイムが見られたが、3-コンパートメントモデルでは膜透過速度の大きい薬物のラグタイムが過小評価された(20)。その理由として薬物の細胞内滞留性がうまく記述できないことが挙げられ、Apical 側と Basal 側をそれぞれ2つに分割し細胞膜コンパートを追加した5-コンパートメントモデルを用いて同様の検討を行った結果、評価したすべての薬物のラグタイムを表現することが可能であったが、5-コンパートメントモデルの物質収支式から解析解を得ることは複雑で簡単でないことが報告されている(20)。

Caco-2細胞透過性試験では、薬物のトランスメンブレンへの吸着を防止するために、Apical 側および Basal 側に牛血清アルブミン (BSA) を添加する場合がある(32)。その場合、

Apical 側、Basal 側のそれぞれの部位において、一部の薬物は BSA と結合する。また、一部の薬物は Caco-2細胞内マトリックスとも結合することが報告されており(20)、非結合形薬物のみが細胞膜を透過すると考えられる。

そこで我々は、Apical 側、細胞内、Basal 側から成る 3-コンパートメントモデルに細胞内での薬物の非結合形分率を組み込むことによって、細胞内滞留性を表現できるのではないかと考えた。本章では、Apical 側、細胞内、Basal 側の 3 つのコンパートメントの物質収支式から、Laplas 変換を用いて各々の濃度推移に関する解析解を求めた。また、各部位における非結合形分率を考慮して式の展開を行った。

さらに、本モデルにおける膜透過クリアランスと P_{app} との関係を明らかにした。Caco-2 細胞を用いた P_{app} 評価は、Basal 側の薬物量が直線的に増加するという仮定に基づいているにもかかわらず、Basal 側濃度が直線的に増加する時間範囲が限定的であることが報告されていることから (図 4) (19-22)、得られた解析解を Taylor 展開し、Basal 側濃度推移が直線になる時間範囲について検討した。

2. 理論

2.1 薬物の細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデル

薬物の細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデルとして、図5に示すモデルを構築した。本モデルはApical側、細胞内、Basal側の3つのコンパートメントから成り、上述のKenらが構築した3-コンパートメントモデル(20)およびNagarら、Tachibanaら、Sunら、Sugimotoらのモデル等と同等である(20, 21, 26, 33-35)。

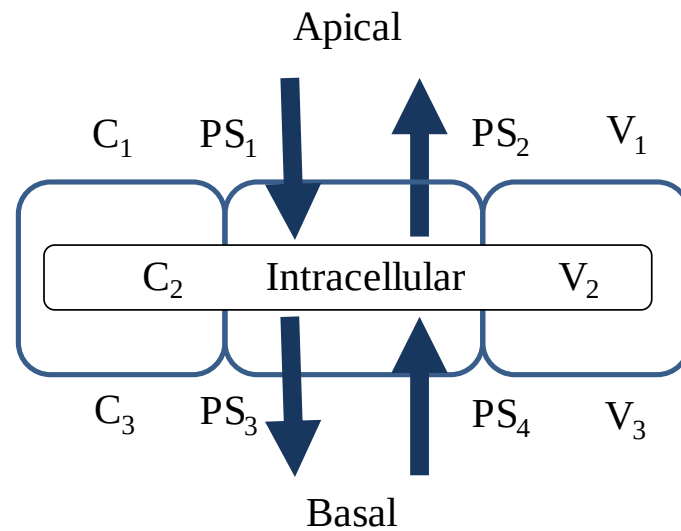


図5 細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデル

C_1 、 C_2 、 C_3 : それぞれApical側、細胞内、Basal側の薬物濃度

V_1 、 V_2 、 V_3 : それぞれApical側、細胞内、Basal側の容量

PS_1 : Apical側から細胞内への取り込みクリアランス

PS_2 : 細胞内からApical側への排出クリアランス

PS_3 : 細胞内からBasal側への排出クリアランス

PS_4 : Basal側から細胞内への取り込みクリアランス

本モデルにおいて、各部位の物質収支式は以下のように表される。

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = -PS_1 \times C_1 + PS_2 \times C_2 \quad (2)$$

$$V_2 \frac{dC_2}{dt} = PS_1 \times C_1 + PS_4 \times C_3 - (PS_3 + PS_2) \times C_2 \quad (3)$$

$$V_3 \frac{dC_3}{dt} = -PS_4 \times C_3 + PS_3 \times C_2 \quad (4)$$

式 (2) - (4) を Laplace 変換すると、式 (2-A) - (4-A) が得られる：

$$s\tilde{C}_1 - C_1(0) = \frac{(-PS_1 \times \tilde{C}_1 + PS_2 \times \tilde{C}_2)}{V_1} \quad (2-A)$$

$$s\tilde{C}_2 - C_2(0) = \frac{(PS_1 \times \tilde{C}_1 + PS_4 \times \tilde{C}_3 - (PS_2 + PS_3) \times \tilde{C}_2)}{V_2} \quad (3-A)$$

$$s\tilde{C}_3 - C_3(0) = \frac{(-PS_4 \times \tilde{C}_3 + PS_3 \times \tilde{C}_2)}{V_3} \quad (4-A)$$

これらの式から、以下の行列式が誘導される：

$$\begin{pmatrix} s + \frac{PS_1}{V_1} & \frac{-PS_2}{V_1} & 0 \\ \frac{-PS_1}{V_2} & s + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} & \frac{-PS_4}{V_2} \\ 0 & \frac{-PS_3}{V_3} & s + \frac{PS_4}{V_3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{C}_1 \\ \tilde{C}_2 \\ \tilde{C}_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} C_1(0) \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

行列式を変換することにより、式 (2-B) - (4-B) が得られる：

$$\tilde{C}_1 = \frac{\begin{pmatrix} C_1(0) & \frac{-PS_2}{V_1} & 0 \\ 0 & S + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} & \frac{-PS_4}{V_2} \\ 0 & \frac{-PS_3}{V_3} & S + \frac{PS_4}{V_3} \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} S + \frac{PS_1}{V_1} & \frac{-PS_2}{V_1} & 0 \\ \frac{-PS_1}{V_2} & S + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} & \frac{-PS_4}{V_2} \\ 0 & \frac{-PS_3}{V_3} & S + \frac{PS_4}{V_3} \end{pmatrix}} \quad (2-B)$$

$$\tilde{C}_2 = \frac{\begin{pmatrix} S + \frac{PS_1}{V_1} & C_1(0) & 0 \\ \frac{-PS_1}{V_2} & 0 & \frac{-PS_4}{V_2} \\ 0 & 0 & S + \frac{PS_4}{V_3} \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} S + \frac{PS_1}{V_1} & \frac{-PS_2}{V_1} & 0 \\ \frac{-PS_1}{V_2} & S + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} & \frac{-PS_4}{V_2} \\ 0 & \frac{-PS_3}{V_3} & S + \frac{PS_4}{V_3} \end{pmatrix}} \quad (3-B)$$

$$\tilde{C}_3 = \frac{\begin{pmatrix} S + \frac{PS_1}{V_1} & \frac{-PS_2}{V_1} & C_1(0) \\ \frac{-PS_1}{V_2} & S + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} & 0 \\ 0 & \frac{-PS_3}{V_3} & 0 \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} S + \frac{PS_1}{V_1} & \frac{-PS_2}{V_1} & 0 \\ \frac{-PS_1}{V_2} & S + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} & \frac{-PS_4}{V_2} \\ 0 & \frac{-PS_3}{V_3} & S + \frac{PS_4}{V_3} \end{pmatrix}} \quad (4-B)$$

これらの式を解くことにより、式 (2-C) - (4-C) が得られる：

$$\tilde{C}_1 = \frac{C_1(0) \left\{ S^2 + \left(\frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) S + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\}}{S \left\{ S^2 + \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) S + \frac{PS_1 \times PS_3}{V_1 \times V_2} + \frac{PS_1 \times PS_4}{V_1 \times V_3} + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\}} \quad (2-C)$$

$$\tilde{C}_2 = \frac{C_1(0) \left(\frac{PS_1}{V_2} S + \frac{PS_1 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right)}{S \left\{ S^2 + \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) S + \frac{PS_1 \times PS_3}{V_1 \times V_2} + \frac{PS_1 \times PS_4}{V_1 \times V_3} + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\}} \quad (3-C)$$

$$\tilde{C}_3 = \frac{C_1(0) \frac{PS_1 \times PS_3}{V_2 \times V_3}}{S \left\{ S^2 + \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) S + \frac{PS_1 \times PS_3}{V_1 \times V_2} + \frac{PS_1 \times PS_4}{V_1 \times V_3} + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\}} \quad (4-C)$$

これらの式を逆 Laplace 変換することにより、以下の解析解が得られる。

$$C_1 = C_1(0) + A_1(1 - e^{-\alpha t}) + B_1(1 - e^{-\beta t}) \quad (5)$$

$$C_2 = A_2(1 - e^{-\alpha t}) + B_2(1 - e^{-\beta t}) \quad (6)$$

$$C_3 = A_3(1 - e^{-\alpha t}) + B_3(1 - e^{-\beta t}) \quad (7)$$

$A_1 \sim A_3$ 、 $B_1 \sim B_3$ および α 、 β は、膜透過クリアランスと容量から成るハイブリッドパラメータであり、以下のように表される。

$$A_1 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta - \alpha)} \left\{ \alpha^2 - \left(\frac{PS_4}{V_3} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} \right) \alpha + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\} \quad (8)$$

$$B_1 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha - \beta)} \left\{ \beta^2 - \left(\frac{PS_4}{V_3} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} \right) \beta + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\} \quad (9)$$

$$A_2 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta - \alpha)} \times \frac{PS_1}{V_2} \times \left(-\alpha + \frac{PS_4}{V_3} \right) \quad (10)$$

$$B_2 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha - \beta)} \times \frac{PS_1}{V_2} \times \left(-\beta + \frac{PS_4}{V_3} \right) \quad (11)$$

$$A_3 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta - \alpha)} \times \frac{PS_1 \times PS_3}{V_2 \times V_3} \quad (12)$$

$$B_3 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha - \beta)} \times \frac{PS_1 \times PS_3}{V_2 \times V_3} \quad (13)$$

$$\alpha = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) + z \right\} \quad (14)$$

$$\beta = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) - z \right\} \quad (15)$$

$$z = \left\{ \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right)^2 - 4 \left(\frac{PS_1 \times PS_3}{V_1 \times V_2} + \frac{PS_1 \times PS_4}{V_1 \times V_3} + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

すなわち、本モデルに基づいてApical側、細胞内、Basal側の薬物濃度推移はそれぞれ2つの定常状態 (α 相および β 相 ; $\alpha > \beta$) が存在する指数関数式で表現することができた。

2.2 薬物の非結合形分率を組み込んだモデル式の展開

Caco-2細胞透過性試験において非結合形薬物のみが細胞膜を透過すると仮定すると、透過速度は非結合形濃度基準の膜透過クリアランスと非結合形薬物濃度の積で表され、「膜透過クリアランス×薬物濃度=非結合形濃度基準の膜透過クリアランス×非結合形分率×薬物濃度」の関係が成り立つ。したがって、非結合形薬物の Apical 側から細胞内への取り込みクリアランス、細胞内から Apical 側への排出クリアランス、細胞内から Basal 側への排出クリアランス、Basal 側から細胞内への取り込みクリアランスは、それぞれ PS_1/Fu_1 、 PS_2/Fu_2 、 PS_3/Fu_2 、 PS_4/Fu_3 と表される (Fu_1 、 Fu_2 、 Fu_3 はそれぞれ Apical 側、細胞内、Basal 側の薬物の非結合形分率) (図6)。

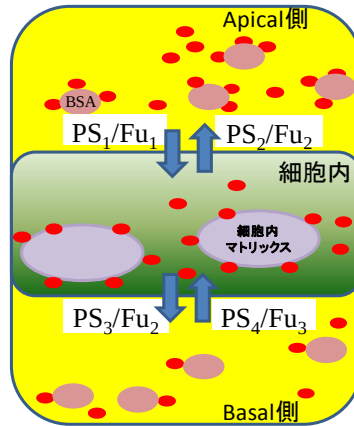


図6 Caco-2細胞透過性試験における非結合形分率の概念

PS₁ : Apical側から細胞内への取り込みクリアランス

PS₂ : 細胞内からApical側への排出クリアランス

PS₃ : 細胞内からBasal側への排出クリアランス

PS₄ : Basal側から細胞内への取り込みクリアランス

Fu₁ : Apical側の非結合形分率

Fu₂ : 細胞内の非結合形分率

Fu₃ : Basal側の非結合形分率

受動拡散により膜透過する薬物を想定して、非結合形薬物の膜透過クリアランスはすべて等しい ($PS_1/Fu_1=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3$) と仮定すると、PS₂、PS₃、PS₄はそれぞれ $PS_2=PS_1 \times Fu_2/Fu_1$ 、 $PS_3=PS_1 \times Fu_2/Fu_1$ 、 $PS_4=PS_1 \times Fu_3/Fu_1$ と表され、式 (8) - (16) から以下の式 (8') - (16') が誘導される :

$$A_1 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta - \alpha)} \left\{ \alpha^2 - \left(\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1} + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} \right) \alpha + \left(\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1} \right) \right\} \quad (8')$$

$$B_1 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha - \beta)} \left\{ \beta^2 - \left(\frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} \right) \beta + \left(\frac{\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \right\} \quad (9')$$

$$A_2 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta - \alpha)} \times \frac{\frac{PS_1}{Fu_1}}{V_2} \times \left(-\alpha + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right) \quad (10')$$

$$B_2 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha - \beta)} \times \frac{\frac{PS_1}{Fu_1}}{V_2} \times \left(-\beta + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right) \quad (11')$$

$$A_3 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta - \alpha)} \times \left(\frac{\frac{PS_1}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \quad (12')$$

$$B_3 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha - \beta)} \times \left(\frac{\frac{PS_1}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \quad (13')$$

$$\alpha = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{\frac{PS_1}{Fu_1}}{V_1} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right) + z \right\} \quad (14')$$

$$\beta = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{\frac{PS_1}{Fu_1}}{V_1} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right) - z \right\} \quad (15')$$

$$z = \left\{ \left(\frac{\frac{PS_1}{Fu_1}}{V_1} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right)^2 - 4 \left(\frac{\frac{PS_1}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_1 \times V_2} + \frac{\frac{PS_1}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_1 \times V_3} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1} \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (16')$$

P-gp基質を想定して、非結合形薬物の受動拡散による膜透過クリアランスはすべて等しく ($PS_1/Fu_1=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3$)、細胞内からApical側への排出クリアランス (PS_2) は独立した変数と仮定すると、 PS_3 および PS_4 はそれぞれ $PS_3=PS_1 \times Fu_2/Fu_1$ および $PS_4=PS_1 \times Fu_3/Fu_1$ と表され、式 (8) - (16) から以下の式 (8'') - (16'') が誘導される。

$$A_1 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta-\alpha)} \left\{ \alpha^2 - \left(\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1} + \frac{PS_2 + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} \right) \alpha + \left(\frac{PS_2 \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \right\} \quad (8'')$$

$$B_1 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha-\beta)} \left\{ \beta^2 - \left(\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1} + \frac{PS_2 + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} \right) \beta + \left(\frac{PS_2 \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \right\} \quad (9'')$$

$$A_2 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta-\alpha)} \times \frac{PS_1}{Fu_1} \times \left(-\alpha + \frac{PS_1 \times Fu_3}{V_3} \right) \quad (10'')$$

$$B_2 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha-\beta)} \times \frac{PS_1}{Fu_1} \times \left(-\beta + \frac{PS_1 \times Fu_3}{V_3} \right) \quad (11'')$$

$$A_3 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta-\alpha)} \times \left(\frac{PS_1 \times \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{Fu_1 \times V_2 \times V_3} \right) \quad (12'')$$

$$B_3 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha-\beta)} \times \left(\frac{PS_1 \times \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{Fu_1 \times V_2 \times V_3} \right) \quad (13'')$$

$$\alpha = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} + \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1 \times V_3} \right) + z \right\} \quad (14'')$$

$$\beta = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{PS_1}{Fu_1} + \frac{PS_2 + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right) - z \right\} \quad (15'')$$

$$z = \left\{ \left(\frac{PS_1}{Fu_1} + \frac{PS_2 + \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_2} + \frac{\frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_3} \right)^2 - 4 \left(\frac{PS_1 \times \frac{PS_1 \times Fu_2}{Fu_1}}{V_1 \times V_2} + \frac{PS_1 \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_1 \times V_3} + \frac{PS_2 \times \frac{PS_1 \times Fu_3}{Fu_1}}{V_2 \times V_3} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (16'')$$

2.3 膜透過クリアランスからの P_{app} 算出方法

Basal側の薬物濃度が直線的に増加することを想定し、シンク条件 (Basal側から細胞内へのback fluxは無視できる) および C_2 が定常状態であることを仮定すると、式 (3) において $dC_2/dt=0$ および $PS_4 \times C_3=0$ となり、式 (17) が得られる。

$$0 = PS_1 \times C_1 - (PS_2 + PS_3) \times C_2 \quad (17)$$

式 (17) を変形すると式 (18) が得られる：

$$C_2 = \frac{PS_1}{(PS_2 + PS_3)} C_1 \quad (18)$$

一方、式 (4) においてシンク条件を仮定すると、 $PS_4 \times C_3=0$ となり、式 (19) が得られる：

$$V_3 \frac{dC_3}{dt} = PS_3 \times C_2 \quad (19)$$

式 (18) を式 (19) に代入すると、以下の式が導かれる：

$$V_3 \frac{dC_3}{dt} = PS_3 \times \frac{PS_1}{(PS_2 + PS_3)} C_1$$

$$\frac{V_3}{C_1} \frac{dC_3}{dt} = PS_3 \times \frac{PS_1}{(PS_2 + PS_3)}$$

式 (1) において、 $dQ/dt = (V_3 \times dC_3)/dt$ であることから、Apical側からBasal側への P_{app} を表す式として、式 (20) が誘導される：

$$P_{app\ AtoB} = \frac{1}{C_1(0) \times S} \times \frac{dQ}{dt} = \frac{V_3}{C_1 \times S} \frac{dC_3}{dt} = PS_3 \times \frac{PS_1}{(PS_2 + PS_3) \times S} \quad (20)$$

すなわち、上記の条件下において、 P_{app} は $PS_1 \sim PS_3$ と S のみの関数として表されることが明らかとなった。

2.4 Basal 側薬物濃度推移の直線領域

式 (7) において、 $t \geq 3/\alpha$ の時、 $e^{-\alpha t} \leq 0.05$ となり、式 (7) は以下の式に近似される：

$$C_3 = A_3 + B_3(1 - e^{-\beta t}) \quad (21)$$

さらに、 $t \leq 0.3/\beta$ の時、式 (21) の最終項を Taylor 展開すると以下のように近似される：

$$1 - e^{-\beta t} = 1 - (1 - \beta t + \frac{\beta^2 t^2}{2} - \frac{\beta^3 t^3}{6} - \dots - \frac{\beta^n t^n}{n!} - \dots) > 0.86\beta t \cong \beta t \quad (22)$$

すなわち、 C_3 は $3/\alpha \leq t \leq 0.3/\beta$ の時間範囲では以下の直線式に近似される：

$$C_3 = A_3 + B_3 \times \beta \times t \quad (23)$$

加えて、式 (13) と式 (12) から $B_3 = \frac{-\alpha}{\beta} A_3$ と表されることから、以下の式が誘導される：

る：

$$C_3 = A_3 - A_3 \times \alpha \times t \quad (24)$$

式 (24) に $C_3=0$ を代入することにより、Basal 側に薬物が出現するまでのラグタイムとして以下の式が誘導される：

$$t = \frac{A_3}{A_3 \times \alpha} = \frac{1}{\alpha} \quad (25)$$

Basal 側薬物濃度推移におけるラグタイムおよび直線領域に関する模式図を図 7 に示す。

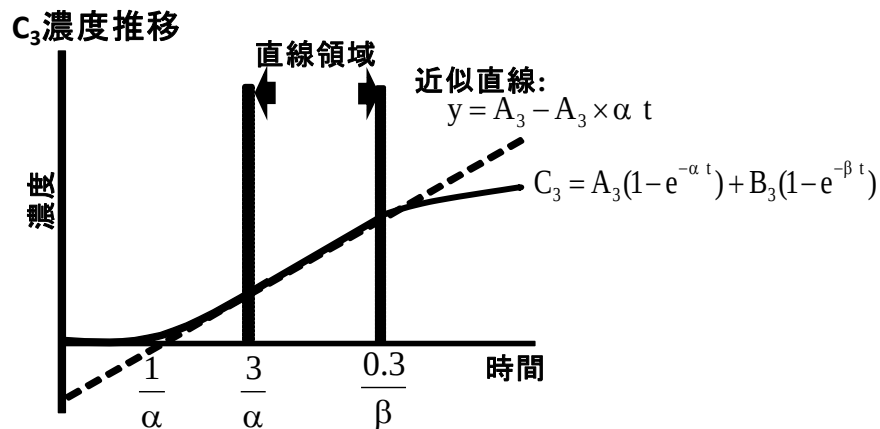


図 7 Basal 側の薬物濃度推移

Basal 側濃度推移は $C_3 = A_3(1 - e^{-\alpha t}) + B_3(1 - e^{-\beta t})$ (式 (7)) と表され、 $\frac{3}{\alpha} \leq t \leq \frac{0.3}{\beta}$ の時間範囲では直線式 $C_3 = A_3 - A_3 \times \alpha \times t$ (式 (24)) に近似される。Basal 側に薬物が出現するまでのラグタイムは $t = 1/\alpha$ (式 (25)) である。 A_3 、 B_3 、 α 、 β はそれぞれ式 (12)、(13)、(14)、(15) により表される (本文参照)。

3. 考察

細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデルとして、Apical 側、細胞内、Basal 側から成る 3-コンパートメントモデルを構築し、各コンパートメントの物質収支式から Laplas 変換を用いて解析解を求めた結果、式 (5) - (7) に示したように、各部位の濃度推移はそれぞれ 2 つの定常状態 (α 相および β 相 ; $\alpha > \beta$) が存在する指数関数式で表現できた。Ken らは、同様の 3-コンパートメントモデルに基づいて、Mathematica®を使用して以下の解析解を導いている(20)。

$$C_A = \frac{C_A(0)}{V_B V_{cell}} \left\{ \frac{CL_d^2}{bc} + \frac{-CL_d^2 + 2bV_B CL_d - b^2 V_B V_{cell}}{(-b)(b-c)} e^{-bt} + \frac{-CL_d^2 + 2cV_B CL_d + cV_{cell} CL_d - c^2 V_B V_{cell}}{(-c)(c-b)} e^{-ct} \right\}$$

$$C_{cell} = \frac{C_A(0)CL_d}{V_B V_{cell}} \left\{ \frac{CL_d}{bc} + \frac{-CL_d + bV_B}{(-b)(b-c)} e^{-bt} + \frac{-CL_d + cV_B}{(-c)(c-b)} e^{-ct} \right\}$$

$$C_B = \frac{C_A(0)CL_d^2}{V_B V_{cell}} \left\{ \frac{1}{bc} - \frac{1}{(-b)(b-c)} e^{-bt} - \frac{1}{(-c)(c-b)} e^{-ct} \right\}$$

b と c は膜透過クリアランスと容量からなるハイブリッドパラメータであり、以下のよう表される。

$$b = \frac{-2CL_d V_A V_B - CL_d V_A V_{cell} - CL_d V_B V_{cell} - CL_d \sqrt{4V_A^2 V_B^2 + V_A^2 V_{cell}^2 - 2V_A V_B V_{cell}^2 + V_B^2 V_{cell}^2}}{2V_A V_B V_{cell}}$$

$$c = \frac{-2CL_d V_A V_B - CL_d V_A V_{cell} - CL_d V_B V_{cell} + CL_d \sqrt{4V_A^2 V_B^2 + V_A^2 V_{cell}^2 - 2V_A V_B V_{cell}^2 + V_B^2 V_{cell}^2}}{2V_A V_B V_{cell}}$$

C_A 、 C_B 、 C_{cell} はそれぞれ Apical 側、Basal 側、細胞内の薬物濃度、 V_A 、 V_B 、 V_{cell} はそれぞれ Apical 側、Basal 側、細胞内の容量を表し、 $C_A(0)$ は Apical 側の薬物添加濃度を表す。4 つの膜透過クリアランスはすべて等しい値 (CL_d) としている。

本研究で導かれた解析解である式 (5) - (7) は、 $PS_1=PS_2=PS_3=PS_4$ と仮定した場合、これらの Ken らによる解析解と同一であることが確認された。

本解析解は、4 つの膜透過クリアランス ($PS_1 \sim PS_4$) と Apical 側、細胞内、Basal 側の容量 ($V_1 \sim V_3$) および Apical 側の薬物添加濃度 ($C_1(0)$) のみによって Apical 側、細胞内、Basal 側の薬物濃度推移 ($C_1 \sim C_3$) を記述するものであり、それらのパラメータ値を変化させることにより種々の実験時の各部位の濃度推移シミュレーションが Excel などの表計算ソフトでも可能になった。これまで Apical 側、細胞内、Basal 側濃度推移を微分方程式で表した報告は多いが(11, 20, 21, 25-27)、数値解を求めるために Winnolin[®]や SaamII[®]などのソフトウェアが必要なことから不便であった。また種々の実験条件を想定したシミュレーションを行う場合、微分方程式では 1 条件ずつ個別に行わなければならないのに対して、表計算ソフトに解析解を入力しておくことで、入力パラメータ値の変更により複数の条件下でのシミュレーションを瞬時に行うことができる。すなわち、実験を行う前に複数の条件でシミュレーションを実施し、その結果から実験条件の設定を行う場合等において、本解析解の有用性は高い。

式 (8') - (16') および式 (8'') - (16'') では、受動拡散による非結合形薬物の膜透過クリアランスはすべて等しい (受動拡散により膜透過する薬物: $PS_1/Fu_1=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3$ 、P-gp 基質: $PS_1/Fu_1=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3$) と仮定した。経細胞輸送試験の理論的なアプローチやモデル解析において、4 つの膜透過クリアランスをそれぞれ独立した変数としている例もあるが(36)、受動拡散による膜透過クリアランスはすべて等しいと仮定されているケースが多い(20, 21, 25, 26, 33-35)。上述の Ken らも、3-コンパートメントモデルにおいて膜透過クリアランスはすべて等しいと仮定している(20)。P-gp を強制発現させたブタ腎臓近位尿細管由来上皮細胞株 (LLC-PK1) あるいは MDCK 細胞を用いた P-gp 基質の細胞透過性試験のモデル解析においても、細胞内から Apical 側への排出クリアランスは P-gp による排出クリアランスと受動拡散による膜透過クリアランスに分けているものの、Apical 側および Basal 側ともに

受動拡散による膜透過クリアランスはすべて等しいと仮定されている(26, 33)。

式 (7) を Taylor 展開することにより、Basal 側濃度推移は $3/\alpha \leq \text{時間} \leq 0.3/\beta$ の条件で $C_3 = A_3 - A_3 \times \alpha \times t$ (式 (24)) という直線の式に近似され、Basal 側濃度が直線的に増加する時間範囲は $3/\alpha \leq t \leq 0.3/\beta$ であることが明らかとなった。Caco-2 細胞透過性試験では通常、1 時点の Basal 側濃度のみから P_{app} を評価しているが、正確な P_{app} の評価のためには、 $3/\alpha \sim 0.3/\beta$ の時間範囲に複数回のサンプリングを実施し、2 点の傾きから透過速度を評価する必要があることが明らかとなった。Basal 側濃度推移のラグタイムに関しては複数の報告(35, 37)があり、明確な定義はなされていないが、Robert らは、Basal 側の総薬物量を時間に対してプロットし、その直線が x 軸と交わるところがラグタイムであることを報告している(37)。この定義に基づくと、本研究からラグタイムは $t = 1/\alpha$ (式 (25)) と表されることが明らかとなった (図 7)。

第2章 細胞透過性試験のシミュレーションによる検証

1. 緒言

1 章において、式 (5) - (7) に示したように、Caco-2 細胞透過性試験における Apical、細胞内、Basal 側の薬物濃度推移は、それぞれ 2 つの定常状態 (α 相および β 相 ; $\alpha > \beta$) が存在する指数関数式で表現できた。本章では、本モデルに基づいて細胞透過性試験における種々の前提条件について検証する目的で、各部位の濃度推移に及ぼす膜透過クリアランスと細胞内結合の影響についてシミュレーションにより検討した。

一番目として、受動拡散により膜透過する薬物の Caco-2 細胞透過性試験を想定したシミュレーションを実施し、Apical 側の濃度推移に及ぼす Apical 側の液量と膜透過クリアランスの影響について検討を行った。

二番目として、Caco-2 細胞透過性試験では薬物の細胞内マトリックスとの結合が Basal 側濃度推移におけるラグタイムの原因の一つと考えられることから、受動拡散により膜透過する薬物と P-gp 基質を想定して、細胞内の非結合形分率を変化させ、Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移がどのように変化するかをシミュレーションした。

三番目として、Basal 側薬物濃度推移の直線領域開始時間および終了時間に及ぼす膜透過クリアランスと細胞内結合の影響について、同様に受動拡散により膜透過する薬物と P-gp 基質を想定して詳細に検討した。

Caco-2 細胞の刷子縁膜側には ATP 加水分解エネルギーを利用して薬物を細胞外に排出する ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターとして P-gp(10, 36, 38-41)、乳癌耐性タンパク質 (breast cancer resistance protein; BCRP) (42)、多剤耐性関連タンパク質 (multidrug resistance protein; MRP) (43-45)などが、イオン濃度勾配を利用して基質を輸送する SLC (solute carrier) トランスポーターとして有機アニオントランスポーター (organic anion transporter; OAT) (46)、頂膜ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター (apical sodium-dependent bile acid transporter; ASBT) (47, 48)、モノカルボン酸トランスポーター (monocarboxylate transporter; MCT) (49)、有機カチオントランスポーター (organic cation transporter; OCT) (50)などが発現

していることが報告されている。特に P-gp は経口投与された薬物の吸収を妨げ、基質になる薬物も多いことから、創薬初期からヒトの吸収率評価とともにスクリーニングの一環として、P-gp の基質となる可能性を検討する試験が一般的に行われている(13, 26, 51, 52)。近年、厚生労働省医薬食品局(53)、アメリカ食品医薬品局(54)、欧州医薬品庁(24)からそれぞれ発表された薬物相互作用に関するガイダンス・ガイドラインおよび関連した論文(55-57)において、被験薬が P-gp の基質となる可能性を検討する試験の一つとして、Caco-2 細胞を用いた透過性試験が記載されている(24, 53, 54)。すなわち、Apical 側に薬物を添加し Basal 側からサンプリングする試験 (AtoB 試験) と、Basal 側に薬物を添加し Apical 側からサンプリングする試験 (BtoA 試験) を実施し、式 (1) を用いてそれぞれ P_{app} を算出する。AtoB 試験の P_{app} に対して BtoA 試験の P_{app} の比が 2 以上の場合に P-gp 基質と判断することとされている(24, 53, 54)。被験薬が P-gp 基質と判断された場合、臨床薬物相互作用試験の必要性を考慮することが記載されており、P-gp 基質と判断するための Caco-2 細胞透過性試験において、正確に P_{app} を評価することが重要である。

2. 方法

2.1 Apical 側薬物濃度推移のシミュレーション

受動拡散により膜透過する薬物を想定し、式 (5) および式 (8') - (16') を用いて、Apical 側に薬物を添加120分後までのApical側の薬物濃度推移をシミュレーションした。 $PS_1/Fu_1 (=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3)$ の値を 0.66、1.98、6.6、19.8、 33×10^{-6} mL/sの5段階に変化させ、 Fu_1 、 Fu_2 、 Fu_3 は1に設定した。これらの値は、式 (20) において24wellプレートを想定し、 $S=0.33 \text{ cm}^2$ とすると、 P_{app} として1、3、10、30、 50×10^{-6} cm/sに相当し、種々の薬物で報告されている P_{app} の範囲 (図3) に設定した。また、24wellプレートを想定し、 V_1 はメーカー推奨液量である100 μ Lと限界液量である250 μ Lに設定した。 V_2 は24wellプレートの表面積と細胞の高さの積である0.9 μ L (序論参照)、 V_3 は推奨液量である600 μ Lとした。Apical側の薬物添加濃度は10 μ Mに設定した。

2.2 細胞内非結合形分率を変化させた時のApical側、細胞内、Basal側薬物濃度推移のシミュレーション

受動拡散により膜透過する薬物とP-gp基質を想定し、式 (5) - (7) および式 (8') - (16') (受動拡散により膜透過する薬物) あるいは式 (8'') - (16'') (P-gp基質) を用いて、 Fu_2 を変化させた時のApical側、細胞内、Basal側の薬物濃度推移をシミュレーションした。 Fu_1 および Fu_3 は1に設定した。受動拡散により膜透過する薬物においては $PS_1/Fu_1 (=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3)$ を 3.3×10^{-6} mL/sとし、P-gp基質においてはdigoxinやcyclosporineの文献値 (39, 58) に基づいて非結合形薬物の細胞内からApical側への排出クリアランス (PS_2/Fu_2) が受動拡散による膜透過クリアランス ($PS_1/Fu_1=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3$) の10倍であると仮定し、 $PS_1/Fu_1 (=0.1 \times PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3)$ を 18.2×10^{-6} mL/sとした。これらの値は、式 (20) において $S=0.33 \text{ cm}^2$ とすると、 P_{app} として 5×10^{-6} cm/sに相当し、種々の薬物で報告されている P_{app} の範囲 (図3) の中間的な値に設定した。 Fu_2 は0.01、0.1、1の3段階に変化させた。

V_1 は250 μL 、 V_2 は0.9 μL 、 V_3 は600 μL とした。

2.3 Basal側薬物濃度推移における直線領域のシミュレーション

式 (14') - (16') (受動拡散により膜透過する薬物) あるいは式 (14'') - (16'') (P-gp 基質) を用いて、Basal 側薬物濃度推移における直線領域の開始時間 ($t=3/\alpha$) と終了時間 ($t=0.3/\beta$) に及ぼす膜透過クリアランスと細胞内結合の影響をシミュレーションした。

受動拡散により膜透過する薬物においては $PS_1/Fu_1 (=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3)$ を0.066、0.198、0.66、1.98、6.6、19.8、 $33 \times 10^{-6} \text{ mL/s}$ とし、P-gp基質においては $PS_1/Fu_1 (=0.1 \times PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3)$ を0.364、1.09、3.64、10.9、36.4、109、 $182 \times 10^{-6} \text{ mL/s}$ とした。これらの値は、式 (20) において $S=0.33 \text{ cm}^2$ とすると、 P_{app} として0.1、0.3、1、3、10、30、 $50 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ に相当し、種々の薬物で報告されている P_{app} の範囲 (図3) に設定した。2.2と同様に、 Fu_1 および Fu_3 は1とし、 Fu_2 は0.01、0.1、1の3段階に変化させ、 V_1 は250 μL 、 V_2 は0.9 μL 、 V_3 は600 μL とした。

3. 結果

3.1 Apical 側薬物濃度推移のシミュレーション

受動拡散により膜透過する薬物を想定し、Caco-2細胞透過性試験におけるApical側液量と膜透過クリアランスを変化させ、Apical側の濃度推移をシミュレーションした結果を図8と表1に示す。Apical側薬物濃度は、 P_{app} が大きいほど速やかに減少し、特にApical側の液量が少ないときに顕著に減少することが明らかとなった。

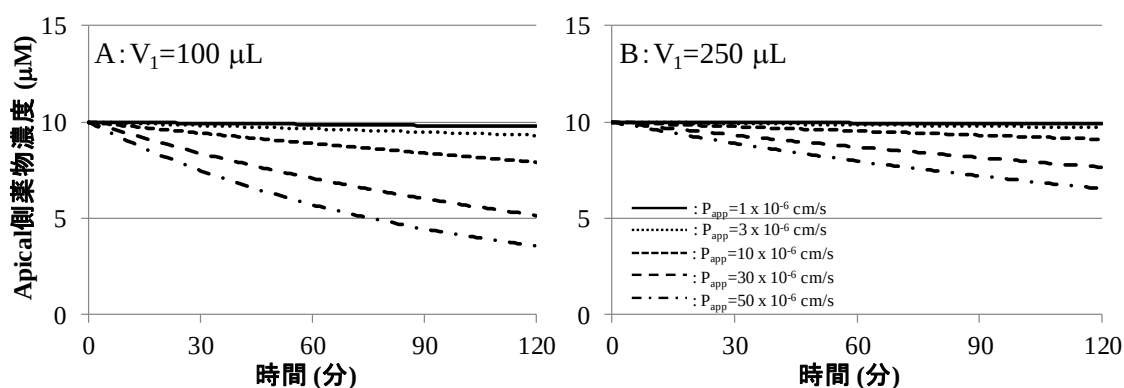


図8 Apical側薬物濃度推移シミュレーション

式 (5) および式 (8') - (16') を用いて、Apical側の薬物濃度推移をシミュレーションした。 $V_2=0.9 \mu\text{L}$ 、 $V_3=600 \mu\text{L}$ とし、 V_1 を100、250 μL の2段階に、 P_{app} を1、3、10、30、 $50 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ の5段階に変化させた。

表1 Apical 側の薬物添加濃度に対する120分後の減少率 (%)

$V_1 (\mu\text{L})$	$P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$				
	1	3	10	30	50
100	3.30	7.84	21.5	48.7	64.4
250	0.944	2.79	8.89	23.5	34.6

3.2 細胞内非結合形分率を変化させた時の Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移シミュレーション

式 (5) - (7) および式 (8') - (16') (受動拡散により膜透過する薬物) あるいは式 (8'') - (16'') (P-gp基質) を用いて、 Fu_2 を変化させた時のApical側、細胞内、Basal側の濃度推移をシミュレーションした結果を図9に示す。

受動拡散により膜透過する薬物の細胞内およびBasal側濃度推移は、 Fu_2 によって大きく変化することが明らかとなった (図9A)。特に Fu_2 が0.01の時、薬物の細胞内濃度が高くなり、Basal側への出現が遅れることが示された。P-gp基質については、細胞内濃度は Fu_2 によって大きく変化するものの、Basal側濃度推移は受動拡散により膜透過する薬物と比較して Fu_2 による影響は小さかった (図9B)。Apical側の濃度推移は、受動拡散により膜透過する薬物およびP-gp基質ともに Fu_2 の影響はほとんど見られなかった。

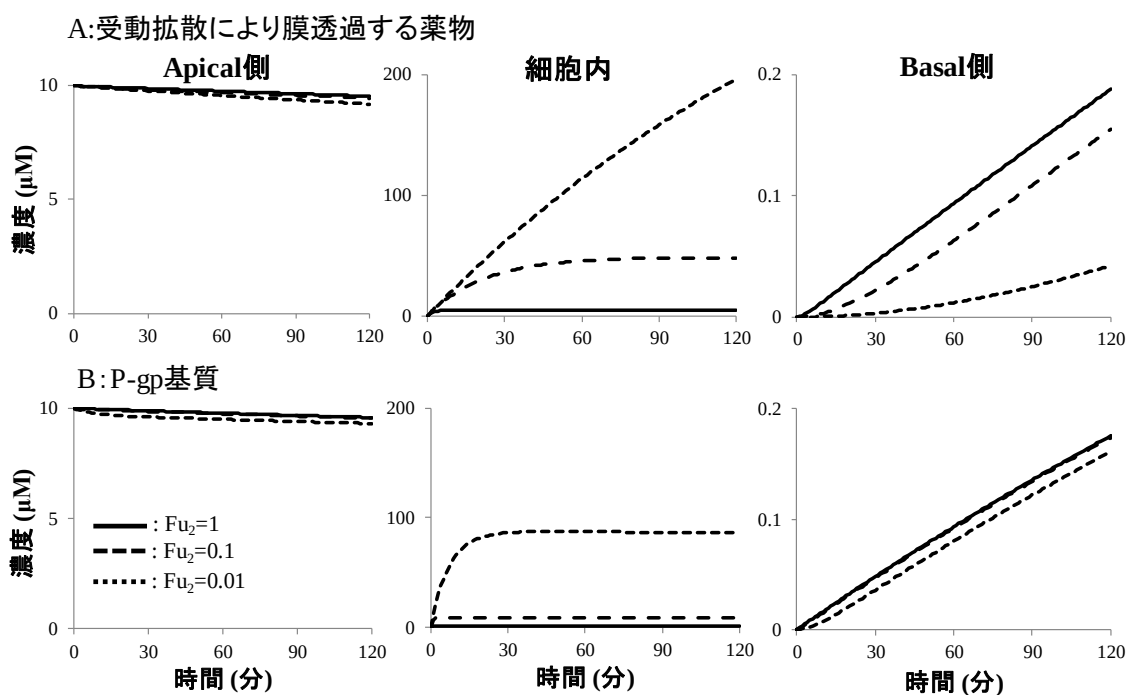


図9 Fu_2 を変化させた時のApical側、細胞内、Basal側の薬物濃度推移シミュレーション

式 (5) - (7) および式 (8') - (16') (A: 受動拡散により膜透過する薬物) あるいは式 (8'') - (16'') (B: P-gp 基質) を用いて、Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移をシミュレーションした。 $P_{app}=5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 、 $V_1=250 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $V_2=0.9 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $V_3=600 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $Fu_1=Fu_3=1$ とし、 Fu_2 を 1、0.1、0.01 の 3 段階に変化させた。

3.3 Basal 側薬物濃度推移における直線領域のシミュレーション

式 (14') - (16') (受動拡散により膜透過する薬物) あるいは式 (14'') - (16'') (P-gp 基質) を用いて、Basal 側薬物濃度推移における直線領域の開始時間 ($t=3/\alpha$) と終了時間 ($t=0.3/\beta$) に及ぼす膜透過クリアランスと細胞内結合の影響をシミュレーションした結果を図 10 に示す。

受動拡散により膜透過する薬物および P-gp 基質のいずれにおいても、Basal 側薬物濃度推移における直線領域の開始時間 ($t=3/\alpha$) は、 P_{app} が大きくなるに従って早くなり、 Fu_2 が小さくなるに従って遅くなった (図 10)。終了時間 ($0.3/\beta$) は、 P_{app} が大きくなるに従って

早くなったが、 Fu_2 の影響は見られなかった。

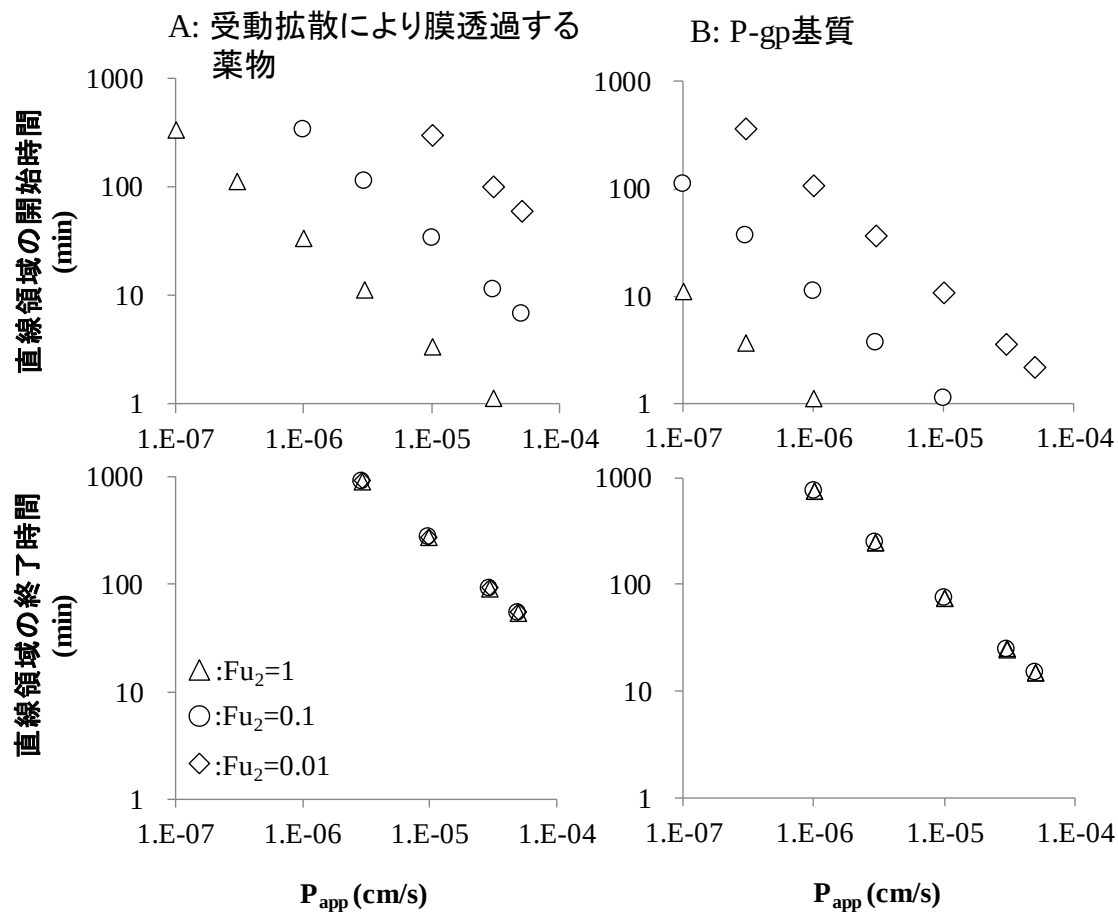


図 10 Basal 側薬物濃度推移における直線領域の開始時間 ($t=3/\alpha$) と終了時間 ($t=0.3/\beta$) に及ぼす膜透過クリアランスと細胞内結合の影響

式 (5) - (7) および式 (8') - (16') (受動拡散により膜透過する薬物) あるいは式 (8'') - (16'') (P-gp 基質) を用いて、Basal 側薬物濃度推移における直線領域の開始時間 ($t=3/\alpha$) と終了時間 ($t=0.3/\beta$) に及ぼす膜透過クリアランスと細胞内結合の影響をシミュレーションした。 $V_1=250 \mu\text{L}$ 、 $V_2=0.9 \mu\text{L}$ 、 $V_3=600 \mu\text{L}$ 、 $Fu_1=Fu_3=1$ とし、 Fu_2 を 1、0.1、0.01 の 3 段階に、 P_{app} を 0.1、0.3、1、3、10、30、 $50 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ の 7 段階に変化させた。

4. 考察

上述のように、式 (1) による P_{app} 評価のための前提条件の一つとして、Apical 側の薬物濃度変化は小さいことが仮定されている(11)。この前提条件について検証する目的で、第 1 章で求めた解析解を用いて Apical 側薬物濃度推移のシミュレーションを行った。その結果、Apical 側の薬物濃度変化は P_{app} と Apical 側の液量に依存し、Apical 側の液量が少ない場合に、 P_{app} が大きい薬物の Apical 側濃度はインキュベーション時間中に大きく減少することがわかった (図 8、表 1)。トランスウエルのメーカーから公表されているプロトコールでは 24well の場合、Apical 側の液量として 100 μL が推奨されており(59)、Caco-2 細胞透過性試験において Apical 側の液量を 100 μL に設定している報告例も多い(60)。本研究の結果より、 P_{app} が $30 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ の薬物では、Apical 側の液量が 100 μL のとき、120 分のインキュベーション時間中に Apical 側の濃度が約 50%低下し、Apical 側の液量を 250 μL としても、Apical 側の濃度は約 25%低下することがシミュレーションされた (図 8、表 1)。このことから、式 (1) による P_{app} 評価において Apical 側の濃度変化を考慮する必要があることが示唆された。

Basal 側薬物濃度推移における直線領域の開始時間と終了時間に及ぼす P_{app} と Fu_2 の影響をシミュレーションした結果、直線領域の開始時間はその両者によって影響を受けることが明らかとなった (図 10)。一般的に、経細胞輸送試験ではインキュベーション時間を 60～180 分間に設定する場合が多い(60)。仮にインキュベーション時間を 120 分間とすると、受動拡散により膜透過する薬物において P_{app} が $2.8 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 以下の場合、 Fu_2 が 1 であっても、直線領域はインキュベーション時間中に始まらないことがシミュレーションされ (図 10)、 Fu_2 が小さくなるにしたがって直線領域の開始がさらに遅くなった。 Fu_2 が 0.01 の場合、 P_{app} が $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ のような高い透過性を持つ薬物においても直線領域の開始が 300 分となり、細胞内結合が強いとインキュベーション時間内に直線範囲が存在しないことが示唆された。

一方、直線領域の終了時間は P_{app} にのみ影響されるパラメータであり、 Fu_2 の違いによる影響はなかった (図 10)。受動拡散により膜透過する薬物の P_{app} が $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ より大きい場合、直線領域は 120 分より早く終了した。 P_{app} を評価するためのシンク条件として、欧州医薬品庁の薬物相互作用に関するガイドライン(24)では、Apical 側濃度に対して Basal 側濃度が 10%以下であることとされているが、本結果より、Basal 側濃度の直線領域はそうのように一律に定義されるものではなく、薬物の膜透過性に依存することが明らかとなった。

上述のように、受動拡散により膜透過する薬物の Caco-2 細胞透過性試験から算出される P_{app} とヒト吸収率は相関することが報告されており (図 3) (14)、 P_{app} が $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 以下の薬物は吸収率が約 30%以下と低く、 $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 以上の薬物は吸収率が約 90%以上と高いことが予測される。しかし、 P_{app} が $1 \sim 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ の範囲においては、予測吸収率は約 30~90%と変動が大きく、 P_{app} を正確に評価することが求められる。この範囲では、 Fu_2 が 1 に近い薬物において直線領域の開始時間は 30 分以内であり、直線領域終了時間は 120 分を超えることがシミュレーションにより明らかとなった (図 10)。すなわち、細胞内結合が弱く膜透過性が中程度の薬物については、従来法により 120 分後の Basal 側濃度のみから式 (1) に基づいて P_{app} を算出しても、過小評価の可能性は小さいと考えられた。

P_{app} の値が等しいとき、受動拡散により膜透過する薬物と比べて、P-gp 基質では直線領域の開始時間および終了時間が早くなる傾向を示した (図 9B および 10B)。例えば、 Fu_2 が 0.01、 P_{app} が $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ の場合、直線領域の開始時間は受動拡散により膜透過する薬物では 300 分、P-gp 基質では 11 分とシミュレーションされた。また、直線領域の終了時間が 120 分より遅いため P_{app} の最低値は、受動拡散により膜透過する薬物では $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ であったのに対し、P-gp 基質では $6.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ であった。この理由は、同じ P_{app} を示す薬物において、 $PS_2/Fu_2 = 10 \times PS_1/Fu_1$ のとき、P-gp 基質の PS_1/Fu_1 と PS_2/Fu_2 は受動拡散により膜透過する薬物と比べてそれぞれ 5.5 倍と 55 倍大きいためである (式 (20) および本章 2.3 参

照)。すなわち、P-gp 基質では、受動拡散により膜透過する薬物と比較して直線領域が早く終了することに注意する必要性が示唆された。

第3章 Caco-2細胞透過性試験によるモデルの有用性評価

1. 緒言

1 章では薬物の細胞内分布を考慮した経細胞輸送モデルとして、Apical 側、細胞内、Basal 側から成る 3-コンパートメントモデルを構築し、各部位の薬物濃度推移に関する解析解を求め、2 章ではその解析解を用いて、各部位の濃度推移に及ぼす P_{app} と Fu_2 の影響についてシミュレーションにより検討した。本章では、受動拡散により膜透過する代表的な薬物および P-gp の代表的な基質を用いて、実際に Caco-2 細胞透過性試験を行い、Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移を本モデルに当てはめることにより、モデルの有用性を評価するとともに、薬物の物性と細胞内結合および Basal 側濃度推移の直線領域との関連について検討した。

受動拡散により膜透過する薬物および P-gp 基質として、それぞれ脂溶性や血漿タンパク結合率が大きく異なる薬物を選択した (表 2、3、4)。具体的には、受動拡散により膜透過する薬物として atenolol (clog P: 0.22)、metoprolol (clog P: 1.95)、propranolol (clog P: 3.48) (29, 39)、P-gp 基質として digoxin (clog P: 1.36)、cyclosporine (clog P: 3.54)、verapamil (clog P: 4.33)(29, 39, 61)を用いた。

2. 方法

2.1 実験材料および試薬

[³H]atenolol、[³H]metoprolol、[³H]propranolol、[³H]digoxin、[³H]cyclosporine、[³H]verapamil およびHionic-Fluor[®]はPerkinElmer Life and Analytical Sciences (MA、USA) から購入した。牛血清アルブミン (BSA) 、L-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン (100X) は Sigma-Aldrich Corp. (MO、USA) から購入した。4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) はDojindo Laboratories (Kumamoto、Japan) から購入した。Hank's balanced salt solution (HBSS) はNissui Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo、Japan) から購入した。Non-essential amino acids solution 10 mM (100x) (Neaa) およびDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) はLife Technologies Corp. (CA、USA) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Hyclone Laboratories Inc. (UT、USA) から購入した。塩化ナトリウムはNacalai Tesque Inc. (Kyoto、Japan) から購入した。絶食時小腸内模擬腸液 (FaSSIF) (3 mM Na taurocholate、0.2 mM lecithin、34.8 mM水酸化ナトリウム、68.62 mM塩化ナトリウムおよび19.12 mMマレイン酸) はCeleste Corp. (Tokyo、Japan) から購入した。その他の試薬は市販の最高品質のものを購入した。

2.2 Caco-2細胞透過性試験

2.2.1 細胞培養

液体窒素内保存している Caco-2 細胞 (CACO-2 Lot No.028 (Passage 51) Riken BRC Cell Bank) を融解した後、24well のトランスウエル (Corning HTS Transwell、pore size 0.4 μ m、polycarbonate membrane) の膜上に 1.0×10^5 cells/well の濃度で播種し、温度 37°C、5% CO₂ に維持されたインキュベータ内で、10% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン (100x) 、L-グルタミン塩化ナトリウム溶液および Neaa を含む DMEM で培養した。培地は2〜3日ごとに交換し、播種後 21 または 23 日目に経細胞輸送試験を行った。

2.2.2 経上皮電気抵抗 (TEER) 測定

Apical側の培地を吸引により取り除いた後、37°Cに加温したHBSS/HEPES緩衝液 (pH 7.4) で細胞を3回洗浄し、Basal側の培地もHBSS/HEPES緩衝液に置換した。Millicell-ERS (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) を用いて各wellのTEERを測定し、1000 Ω ($330 \Omega \times \text{cm}^2$) 以下のものは除外した(62)。

2.2.3 経細胞輸送試験

受動拡散により膜透過する薬物であるatenolol、metoprolol、propranololについてはApical側からBasal側への輸送試験 (AtoB試験) を行い、P-gp基質であるdigoxin、cyclosporine、verapamilについてはAtoB試験とBasal側からApical側への輸送試験 (BtoA試験) を行った。

AtoB試験はTEER測定後、Apical側およびBasal側のHBSS/HEPES緩衝液を吸引除去し、4%BSAを含むHBSS/HEPES緩衝液 (pH 7.4) をBasal側に600 μL 添加した。その後、37°Cで30分間、220 rpmで振盪しながらプレインキュベーションを行った。Apical側に10 μM [^3H]atenolol、10 μM [^3H]metoprolol、10 μM [^3H]propranolol、0.1 μM [^3H]digoxin、0.1 μM [^3H]cyclosporineまたは0.1 μM [^3H]verapamilを含むFaSSIF/HEPES緩衝液 (pH7.4) を250 μL 添加することによって透過性試験を開始した。なお、2章のシミュレーション結果 (図8、表1) に基づき、Apical側薬物濃度の減少を抑えるために、Apical側の液量を250 μL に設定した。

BtoA試験はTEER測定後、Apical側およびBasal側のHBSS/HEPES緩衝液を吸引除去し、4%BSAを含むHBSS/HEPES緩衝液 (pH 7.4) をApical側に250 μL 添加した。その後、37°Cで30分間、220 rpmで振盪しながらプレインキュベーションを行った。Basal側に0.1 μM [^3H]digoxin、0.1 μM [^3H]cyclosporineまたは0.1 μM [^3H]verapamil を含むFaSSIF/HEPES緩衝液 (pH7.4) を600 μL 添加することによって透過性試験を開始した。

各wellは37°Cを維持するように加温しながら、220 rpmで振盪した。開始30、60、90、120分後にApical側およびBasal側のサンプルを50 μL 採取した後、Apical側およびBasal側の溶

液をすべて吸引除去し、氷冷した1.5 mLのHBSS/HEPES緩衝液で細胞を2回洗浄した後、2 N 水酸化ナトリウム水溶液0.5 mLで溶解した。

細胞溶解液および Apical 側と Basal 側から採取したサンプルをシンチレーションバイアルに移し、シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor®) 4 mL を加えて液体シンチレーションカウンター (型式: TRI-CARB 3110TR、PerkinElmer Life and Analytical Sciences) で放射能を測定した。細胞内全薬物量を細胞内容量 0.9 μ L (序論参照) で除することにより細胞内薬物濃度を算出した。すべての経細胞輸送試験は triplicate で実施した。

2.3 Basal 側における薬物の非結合形分率 (Fu_3) 測定

各薬物の4%BSA中の非結合形分率をRED device system (Thermo Scientific、MA、USA) を用いて平衡透析法により測定した。RED device systemは1つのセルが透析膜によって2つのチャンバーに分かれている。0.03 μ Mの薬物と4%BSAを含むHBSS/HEPES緩衝液を一方のチャンバーに添加し、もう一方のチャンバーにHBSS/HEPES緩衝液を添加した後、37°C、100 rpmで4時間振盪した。各々のチャンバーからサンプル50 μ Lを採取し、シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor®) 4 mLを加えて、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。HBSS/HEPES緩衝液中薬物濃度を4%BSA含有緩衝液中薬物濃度で除することにより Fu_3 を算出した。試験はtriplicateで実施した。

2.4 Caco-2細胞透過性試験のモデル解析

Atenolol、metoprolol、propranololについては、Apical側、細胞内、Basal側濃度推移を式 (5) - (7) 、 (8') - (16') に同時に当てはめ、非線形最小二乗法により Fu_2 および PS_1/Fu_1 の最適値を求めた。Apical側にタンパク質は存在しないことから $Fu_1=1$ と設定した。Digoxin、cyclosporine、verapamilについてはAtoB試験およびBtoA試験の結果を式 (5) - (7) 、 (8'') - (16'') に同時に当てはめ、 Fu_2 、 $PS_1/Fu_1 (=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3, Fu_1=1)$ および PS_2 の最適値を算出

した。2.3において実測した各薬物の4%BSA中非結合形分率を Fu_3 として使用した。非線形最小二乗法による最適化計算はシミュレーション解析&モデリングソフトSAAMII version 1.2[®] (SAAM Institute、WA、USA) を使用して重みづけ1/yで実施した。得られたパラメータの最適値を用いて、式 (14') - (15') および式 (14'') - (15'') に基づいて、Basal側濃度推移 (BtoA試験ではApical側濃度推移) の直線領域開始時間 ($3/\alpha$) および終了時間 ($0.3/\beta$) を算出した。また、得られたパラメータの最適値を式 (20) に代入することにより、各薬物のAtoB試験における P_{app} を算出し、従来の方法により120分後のBasal側濃度から式 (1) を用いて算出した P_{app} と比較した。

2.5 薬物の脂溶性 ($\log P$) と Fu_2 の関係

各薬物の Fu_2 の最適値を $\log P$ に対してプロットし、両者の相関関係を評価した。各薬物の $\log P$ は digoxin を除いて、既報の値を使用した(41)。Digoxin の $\log P$ は、ADMET predictor[®] (Northern Science Consulting Inc.、Sapporo、Japan) を使用して計算した。

3. 結果

3.1 Basal 側における薬物の非結合形分率 (F_{u3})

平衡透析により測定した各薬物の F_{u3} の値は 0.023 (cyclosporine) ～0.870 (atenolol) の範囲であった (表 2)。

表2 薬物の4%BSA 溶液中非結合形分率

薬物名	4%BSA溶液中非結合形分率(F_{u3})
Atenolol	0.870 $\pm$ 0.005
Metoprolol	0.824 $\pm$ 0.036
Propranolol	0.278 $\pm$ 0.019
Digoxin	0.366 $\pm$ 0.037
Cyclosporine	0.023 $\pm$ 0.001
Verapamil	0.321 $\pm$ 0.016

平均値 $\pm$ S.D., triplicate

3.2 Caco-2細胞透過性試験とモデル解析

受動拡散により膜透過する 3 つの薬物 (atenolol, metoprolol, propranolol) の Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移と当てはめ曲線を図 11 に、当てはめ計算による解析結果と各薬物の $\text{clog } P$ 値を表 3 に示す。いずれの薬物についても、各部位の濃度推移の当てはめ曲線は実測値とよく合っていた。 F_{u2} は、propranolol では atenolol の 1/100 程度と薬物によって大きく異なり、 $\text{clog } P$ が大きい薬物ほど小さい値となった。直線領域の開始時間 ($3/\alpha$) についても、metoprolol が 7 分、propranolol が 38 分と、薬物によって大きく異なっていた。また、終了時間 ($0.3/\beta$) は metoprolol が 62 分、propranolol が 72 分となり、これらの薬物では 120 分のインキュベーション時間内に直線領域は終了することが明らかとなった。式 (20) により算出した P_{app} は、従来の方法により 120 分後の Basal 側濃度から式 (1) を用いて算出した値と比較して、約 1.1～1.3 倍大きい値を示した。

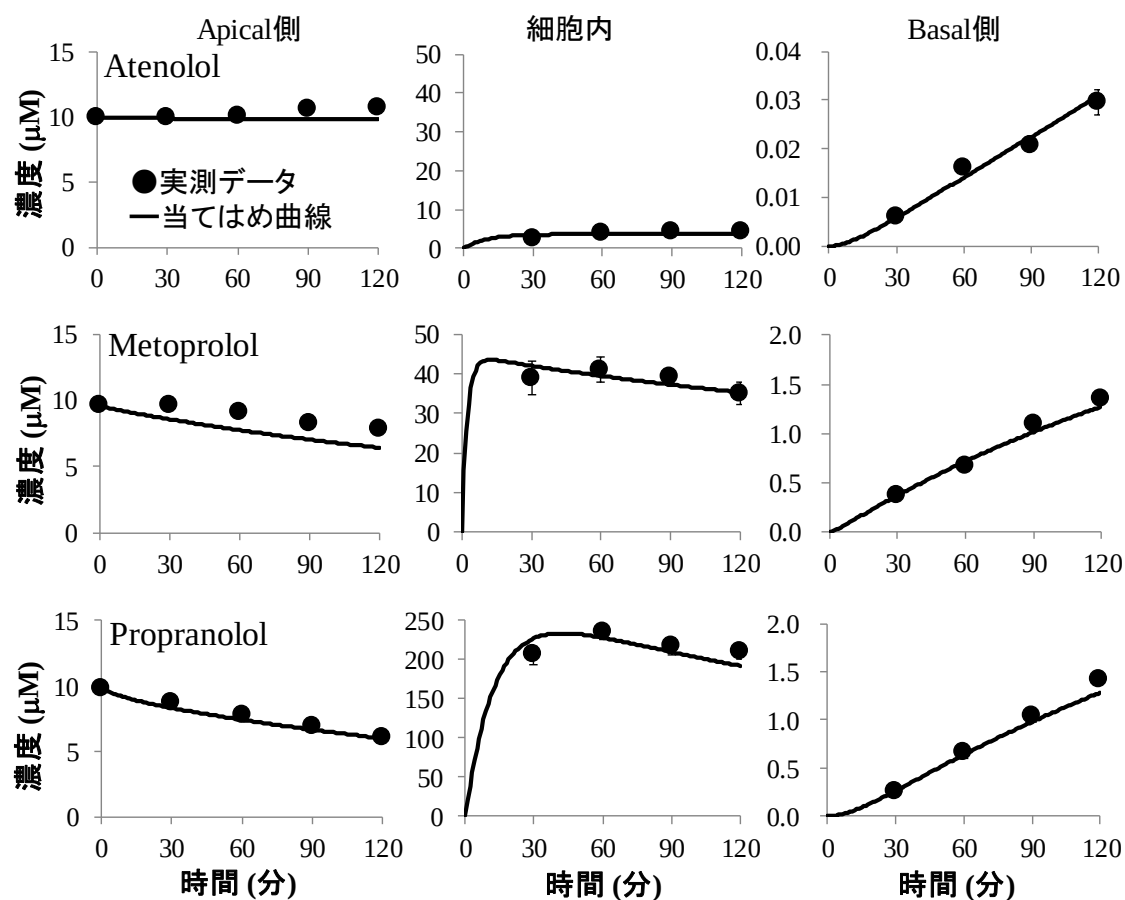


図 11 受動拡散により膜透過する薬物の Caco-2 細胞透過性試験における各部位の濃度推移

4%BSA を含む HBSS/HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を Basal 側に、10 μM [^3H]atenolol、10 μM [^3H]metoprolol あるいは 10 μM [^3H]propranolol を含む FaSSIF/HEPES 緩衝液 (pH7.4) を Apical 側に添加し、37°C インキュベーションし、30、60、90、120 分後に Apical 側、細胞内、Basal 側の放射能濃度を測定した。各部位の濃度推移を式 (5) - (7)、式 (8') - (16') に同時に当てはめ、非線形最小二乗法により Fu_2 および $PS_1/Fu_1 (=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3, Fu_1=1)$ の最適値を求めた。それぞれのポイントは triplicate の平均値 $\pm$ S.D. を表す。

表 3 受動拡散により膜透過する薬物の Caco-2 細胞透過性試験解析結果

	clog P	当てはめ計算により得られた ラグタイム 収束値 (± S.D.) (min)			直線領域(min)		P _{app} ¹⁾ (10 ⁻⁶ cm/s)	従来法により 算出した P _{app} ²⁾ (10 ⁻⁶ cm/s)
		Fu ₂	PS ₁ /Fu ₁ (x10 ⁻⁶ mL/s)	(1/ <i>a</i>)	開始 (3/ <i>a</i>)	終了 (0.3/ <i>β</i>)		
Atenolol	0.22	1.35±0.14	0.566±0.024	9.81	29.4	3242	0.858	0.757
Metoprolol	1.95	0.106±0.003	29.9±1.0	2.34	7.02	62.4	45.3	34.1
Propranolol	3.48	0.0172±0.0007	32.4±0.9	12.7	38.1	71.9	49.0	38.9

¹⁾: 式 (20) より算出²⁾: 120分後の Basal 側濃度から式 (1) を用いて算出

3 つの P-gp 基質 (digoxin、cyclosporine、verapamil) の AtoB 試験と BtoA 試験における Donor 側、細胞内、Receiver 側の濃度推移と当てはめ曲線を図 12 に、当てはめ計算による解析結果と各薬物の $\text{clog } P$ 値を表 4 に示す。いずれの薬物についても、各部位の濃度推移の当てはめ曲線は実測値とほぼ合っていた。Digoxin および cyclosporine の細胞内濃度については、低値のために測定誤差が大きく、当てはめ曲線と実測値の差が大きくなったものと考えられる。

P-gp 基質においても受動拡散により膜透過する薬物 (表 3) と同様に、 $\text{clog } P$ が大きい薬物では Fu_2 が小さく、特に cyclosporine の Fu_2 は約 0.002 ときわめて小さい値となった (表 4)。AtoB 試験における直線領域の開始時間は 9.3 分 (digoxin) から 320 分 (cyclosporine) と P-gp 基質においても薬物により大きく異なった。Cyclosporine では AtoB および BtoA 試験のいずれにおいても直線領域の開始時間は 300 分を超えており (表 4)、120 分までのインキュベーション時間内に直線領域は始まらないことが明らかとなった。また、終了時間は verapamil では AtoB 試験において 106 分となり、120 分のインキュベーション時間内に直線領域は終了することが明らかとなった。式 (20) により算出した P_{app} は、従来の方法により 120 分後の Basal 側濃度から式 (1) を用いて算出した P_{app} と比較して、digoxin、cyclosporine および verapamil において、それぞれ約 0.94、5.2 および 1.6 倍大きな値を示した。

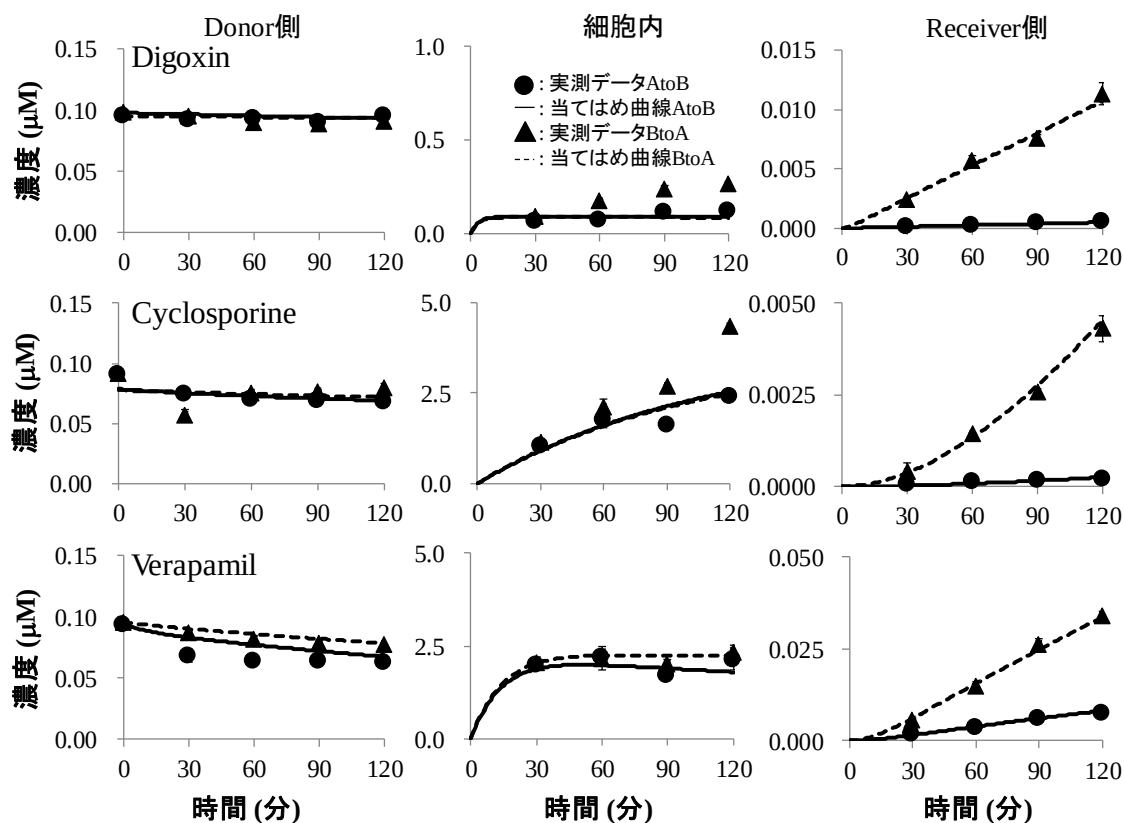


図 12 P-gp 基質の Caco-2 細胞透過性試験における各部位の濃度推移

AtoB試験においては4%BSAを含むHBSS/HEPES緩衝液 (pH 7.4) をBasal側に、 $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ digoxin、 $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ cyclosporineあるいは $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ verapamil を含むFaSSIF/HEPES緩衝液 (pH7.4) をApical側に添加した。BtoA試験においては4%BSAを含むHBSS/HEPES緩衝液 (pH 7.4) をApical側に、 $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ digoxin、 $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ cyclosporineあるいは $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ verapamil を含むFaSSIF/HEPES緩衝液 (pH7.4) をBasal側に添加した。37℃でインキュベーションし、30、60、90、120分後にApical側、細胞内、Basal側の放射能濃度を測定した。AtoB試験およびBtoA試験における各部位の薬物濃度推移を式 (5) - (7) 、式 (8'') - (16'') に同時に当てはめ、非線形最小二乗法により Fu_2 、 $PS_1/Fu_1 (=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3, Fu_1=1)$ および PS_2 の最適値を求めた。それぞれのポイントはtriplicateの平均値 $\pm$ S.D.を表す。

表 4 P-gp 基質の Caco-2 細胞透過性試験解析結果

当てはめ計算により得られた収束値(±S.D.)					AtoB試験			BtoA試験			P _{app} ¹⁾ (10 ⁻⁶ cm/s)	従来法により 算出した P _{app} ²⁾ (10 ⁻⁶ cm/s)
clog P				ラグタイム (min) (1/α)	直線領域(min)		ラグタイム (min) (1/α)	直線領域 (min)				
	Fu ₂	PS ₁ /Fu ₁ (x10 ⁻⁶ mL/s)	PS ₂ /Fu ₂ (x10 ⁻⁶ mL/s)		開始 (3/α)	終了 (0.3/β)		開始 (3/α)	終了 (0.3/β)			
Digoxin	1.36	0.111±0.015	4.45±0.12	39.3±2.6	3.09	9.26	1177	3.09	9.28	682	1.37	1.46
Cyclosporine	3.54	0.00213±0.00053	6.63±0.46	49.3±11.9	106	319	1724	124	371	514	2.38	0.460
Verapamil	4.33	0.0154±0.0007	26.2±0.5	41.7±2.0	13.5	40.5	106	13.9	41.6	126	30.6	19.8

¹⁾: 式 (20) より算出

²⁾: 120分後の Basal 側濃度から式 (1) を用いて算出

3.3 薬物の脂溶性 (clog P) と Fu_2 の関係

対象とした薬物の clog P と Fu_2 の最適値との相関を図 13 に示す。受動拡散により膜透過する薬物および P-gp 基質について、同じグラフにプロットした。 Fu_2 は薬物の clog P と有意な負の相関関係を示すことが明らかとなった。

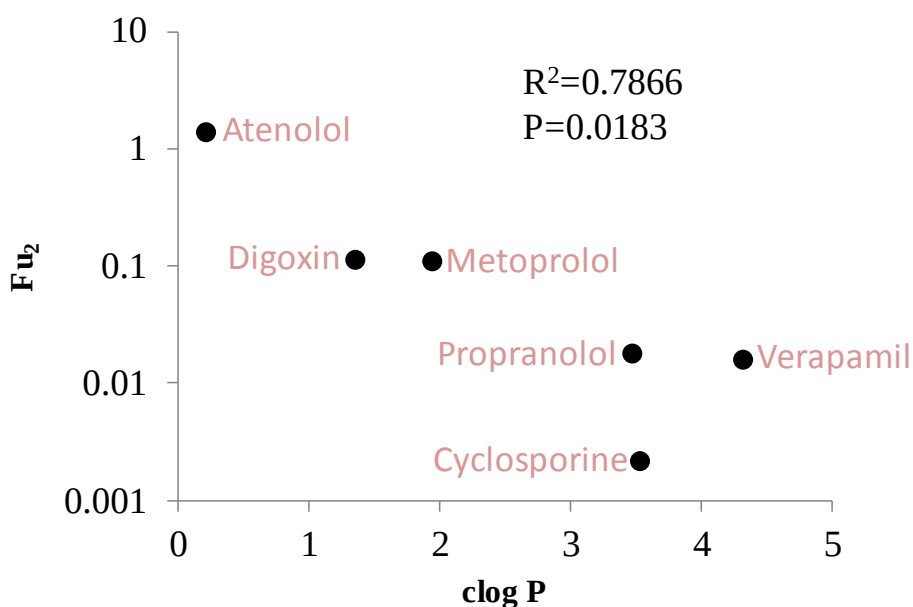


図 13 薬物の細胞内非結合形分率 (Fu_2) と clog P との関係

Caco-2 細胞透過性試験における Apical 側、細胞内、Basal 側薬物濃度を式 (5) - (7) および式 (8') - (16') あるいは式 (8'') - (16'') に当てはめることにより、細胞内非結合形分率 (Fu_2) の最適値を算出した。各薬物の clog P は digoxin を除いて、既報の値を使用した(41)。Digoxin の clog P は、ADMET predictor[®] (Northern Science Consulting Inc., Sapporo, Japan) を使用して計算した。

4. 考察

受動拡散により膜透過する薬物 (atenolol、metoprolol、propranolol) およびP-gp基質 (digoxin、cyclosporine、verapamil) についてCaco-2細胞透過性試験を実施し、Apical側、細胞内、Basal側の濃度推移を1章で構築したモデルに当てはめた結果、当てはめ曲線は実測値とよく合っており (図11、12)、本モデルの有用性が確認された。

上述のように、Caco-2細胞透過性試験において式 (1) を用いて P_{app} を算出するときの前提条件として、薬物の細胞内分布は無視できること、Basal側の薬物濃度は直線的に増加すること、一度透過した薬物は細胞内に戻らないこと (すなわちシンク条件)、Apical側の濃度変化は小さいこと、細胞内への薬物の蓄積は考慮しないこと、などが仮定されている (7, 11, 16, 18)。しかし、実際にCaco-2細胞透過性試験を実施した結果、図11および12に示すように、metoprololおよびpropranololについてはインキュベーション120分間でApical側の濃度がそれぞれ約20%および約40%減少していた。また、propranolol、cyclosporine、verapamilはインキュベーション終了時に添加した薬物の約8%が細胞内に分布していた (図11および12)。さらに、cyclosporineのBasal側濃度推移における直線領域開始時間はAtoB試験およびBtoA試験のいずれにおいても300分を超え、120分間のインキュベーション時間内に直線領域は存在しないことがわかった (図12、表4)。AtoB試験における120分後のBasal側濃度のみから式 (1) を用いて算出した P_{app} は、 Fu_2 、 PS_1/Fu_1 、 PS_2 の最適値を用いて式 (20) により算出した P_{app} と比較して5.2倍過小評価していた。これは、cyclosporineの Fu_2 が約0.002と非常に小さく、Basal側への出現が遅いためと考えられる。一方、metoprolol、propranololおよびverapamilでは120分のインキュベーション時間の途中で直線領域が終了することが明らかとなった。これらの結果は2章のシミュレーション結果 (図8、9、10) とも合致し、これらの薬物では式 (1) の仮定が必ずしも成立していないことが明らかとなった。

Atenololの Fu_2 の最適値が1を超えた理由として、使用した細胞内容量 (V_2) の値に起因することが考えられる。本解析において、 V_2 は共焦点顕微鏡を用いて測定された細胞の高さ

と今回実験に使用したwellの表面積から算出された値である0.9 μL (序論参照) に設定した。しかし、既報において、細胞の大きさは培養条件によって変わることが明らかになっていることから(23)、本試験での実際の細胞内容量が0.9 μL より大きい可能性が考えられた。

Propranolol、cyclosporine、verapamilの Fu_2 は、atenololと比較して約1/60～1/500倍の値 (表3、4) を示した。一般的に脂溶性が高い薬物は細胞内マトリックスと強く結合することが報告されており(63, 64)、これらの薬物は脂溶性 (表3、4) や血漿タンパク結合率 (表5) が高いことから、細胞内マトリックスとも強く結合することが考えられる (図14)。本研究において、 clog P が大きい薬物は Fu_2 が小さく (図13)、直線領域の開始が遅くなることが明らかとなった。そのため、脂溶性が高い薬物の P_{app} を正確に評価するためには、Apical側、細胞内、Basal側の濃度測定を行い、本研究で構築した3-コンパートメントモデルにその推移を当てはめることが推奨される。

表 5 薬物の血漿タンパク結合率(65)

薬物名	血漿タンパク結合率(%)
Atenolol	<5
Metoprolol	11
Propranolol	87
Digoxin	25
Cyclosporine	93
Verapamil	90

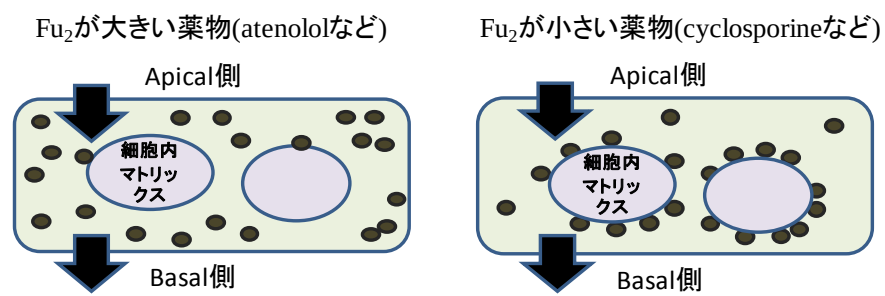


図14 Caco-2細胞透過性試験における薬物と細胞内マトリックスとの結合の概念図

総括

医薬品開発において、薬物のヒトにおける経口吸収率を *in vitro* から予測する系として、一般的に Caco-2 細胞を用いた透過性試験が実施されている。Caco-2 細胞を用いた見かけの透過係数 (P_{app}) 評価は、Basal 側の薬物量が直線的に増加するという仮定に基づいている。しかし、薬物によって Apical 側に添加してから Basal 側に出現するまでにラグタイムが存在したり、Basal 側の薬物濃度が直線的な増加の後、頭打ちになったりする場合がある。このようなケースでは、 P_{app} を適切に評価できていない可能性があると考えられた。そこで本研究では、薬物の細胞透過性試験において P_{app} を適切に評価するために、細胞内分布を考慮したモデルを構築するとともに、モデル式を展開することによって、 P_{app} を評価するための適切な時間範囲を明らかにした。さらに、受動拡散により膜透過する代表的な薬物および P-gp 基質を用いて Caco-2 細胞透過性試験を実施し、モデルの有用性を確認した。

1. 細胞内分布を考慮したモデル構築

3-コンパートメントモデルに基づいて、Apical 側、細胞内および Basal 側の薬物濃度推移をそれぞれ微分方程式で記述し、Laplas 変換を利用して解析解を導いた結果、各部位の濃度推移はそれぞれ 2 つの定常状態が存在する指数関数式により表現できることが明らかとなった。

2. 細胞透過性試験のシミュレーションによる検証

本モデルを用いて Apical 側薬物濃度推移をシミュレーションした結果、Apical 側の液量が少ない場合、 P_{app} が大きい薬物の Apical 側薬物濃度が大きく低下することがわかった。また、Basal 側薬物濃度推移の式を Taylor 展開することにより、 $3/\alpha \leq \text{時間} \leq 0.3/\beta$ の条件で直線の式に近似された。受動拡散により膜透過する薬物と P-gp 基質を仮定してシミュレーションを行った結果、いずれにおいても直線領域の開始時間である $3/\alpha$ は P_{app} が大きくなるに従って小さくなり、細胞内非結合形分率 (Fu_2) が小さくなるに従って大きくなった。一方、直線領域の終了時間である $0.3/\beta$ も P_{app} が大きくなるに従って小さくなるが、

Fu₂の影響はほとんど受けなかった。P_{app}を評価するためのシンク条件として、欧州医薬品庁の薬物相互作用に関するガイドラインでは、Apical 側の濃度に対して Basal 側濃度が 10%以下であることとされているが、本結果より、Basal 側濃度推移の直線領域はそうに一律に定義されるものではなく、薬物の膜透過性に依存することが明らかとなった。

3. Caco-2 細胞透過性試験によるモデルの有用性評価

受動拡散により膜透過する代表的な薬物 (atenolol、metoprolol、propranolol) および P-gp 基質 (digoxin、cyclosporine、verapamil) を用いて、Caco-2 細胞の Apical 側に薬物を添加する透過性 (AtoB) 試験を行い、Apical 側、細胞内、Basal 側の濃度推移を本モデルに当てはめることにより、膜透過クリアランスおよび Fu₂ の最適値を算出した。P-gp 基質については、Basal 側に薬物を添加する (BtoA) 試験も実施し、両試験の結果を同時にモデルに当てはめた。その結果、本モデルによって、いずれの濃度推移も表現することが可能であった。膜透過クリアランスおよび Fu₂ の最適値を用いて、Receiver 側の直線領域の開始と終了時間を算出した結果、metoprolol および digoxin では薬物添加後 10 分以内に直線領域が始まるのに対し、脂溶性 (cLog P) の大きい薬物では Fu₂ の値が小さく、直線領域の開始時間が遅れる傾向が見られた。Cyclosporine では AtoB 試験および BtoA 試験のいずれにおいても 120 分のインキュベーション時間内に直線領域は始まらず、AtoB 試験において 120 分後の Basal 側濃度から従来の方法により算出した P_{app} は 5.2 倍の過小評価となった。一方、metoprolol、propranolol および verapamil では 120 分のインキュベーション時間の途中で直線領域が終了することが明らかとなった。

本研究の結果より、細胞透過性 (AtoB) 試験において Basal 側濃度推移から正確な P_{app} を評価するためには、 $3/\alpha \sim 0.3/\beta$ の時間範囲に複数回のサンプリングを実施し、2 点の傾きから透過速度を評価する必要があることが明らかとなった。 α は膜透過性と細胞内結合に、 β は膜透過性のみに依存するパラメータであり、特に脂溶性が大きい薬物については Basal 側濃度の直線領域の開始が遅いことから、P_{app} の過小評価を避けるためには本研究

で構築した 3-コンパートメントモデルに各部位の濃度推移を当てはめることが推奨される。

国内外の医薬品品目の動向を見ると、2010 年問題と言われるようにブロックバスターが立て続けに特許切れを迎え、最近では、医薬品開発の成功確率がさらに低くなっており、創薬の難しさが一段と増していることが報告されている。これまでの医薬品開発は低分子医薬品を中心としたブロックバスターを主軸としていたが、現在の創薬アプローチは大きく変化している(66)。低分子医薬品のターゲットはほとんど枯渇していることから、難しいターゲットを狙うために薬効を中心にスクリーニングすることによって、分子量が大きく膜透過性の低い化合物が選択される傾向がある。Pfizer 社で合成される薬物候補化合物は、平均分子量の増加に伴い脂溶性も増加し、2000 年代において平均 Log P が約 3 であり、最大で Log P が 6 を超える化合物も存在することが報告されている(6)。創薬段階における *in vitro* 評価の対象は、これまでの低分子を中心としたものから、分子量や Log P が大きい薬物へと変化しているにもかかわらず、評価方法の妥当性が十分に検証されていないケースも見受けられる。Caco-2 細胞透過性試験による P_{app} の評価についても、上述のように種々の仮定に基づいているが、多様な医薬品の細胞透過性評価に対応しているのか不明なまま、製薬会社では効率を重視して従来法で実施されている。本研究において、Log P が大きい薬物については従来法では正確な P_{app} を評価できないことが示されたが、今後、多様な医薬品の P_{app} を正確に評価できるように本モデルをさらに改良していくことが必要であろう。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室 伊藤清美 教授に深く感謝致しますと共に、謹んで御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導、御助言及び御協力を賜りました中外製薬株式会社 前臨床研究部 加藤基浩 氏に深く感謝致しますと共に、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導と御助言を賜りました同会社 石谷雅樹 氏、櫻井裕治 氏に深く感謝致しますと共に、厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、適切な御助言、御協力を賜りました武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室 工藤敏之 講師に心より御礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するにあたり、種々の御協力、御助言を賜りました武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室の皆様へ深く感謝致します。

引用文献

1. 杉山雄一. 薬物バイオアベイラビリティ評価と改善の科学 -より良き医薬品開発のために-. 現代医療社:4 (1998).
2. 厚生労働省. 薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について(平成 27 年 12 月 11 日適用). <http://www.mhlw.go.jp/topics/2014/03/tp0305-01.html>.
3. 大日本住友製薬. ダイドロネル錠 200. 医薬品インタビューフォーム(2013).
4. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 12:413-420 (1995).
5. T. Takagi, C. Ramachandran, M. Bermejo, S. Yamashita, L.X. Yu, and G.L. Amidon. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm.* 3:631-643 (2006).
6. C.A. Lipinski. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 44:235-249 (2000).
7. P. Artursson, K. Palm, and K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 46:27-43 (2001).
8. F. Faassen, G. Vogel, H. Spanings, and H. Vromans. Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *Int J Pharm.* 263:113-122 (2003).
9. J. Li, D.A. Volpe, Y. Wang, W. Zhang, C. Bode, A. Owen, and I.J. Hidalgo. Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the in vitro efflux of statin drugs. *Drug Metab Dispos.* 39:1196-1202 (2011).
10. D.A. Volpe. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future medicinal chemistry.* 3:2063-2077 (2011).
11. H. Sun, E.C. Chow, S. Liu, Y. Du, and K.S. Pang. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4:395-411 (2008).
12. P. Matsson, C.A. Bergstrom, N. Nagahara, S. Tavelin, U. Norinder, and P. Artursson. Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening. *J Med Chem.* 48:604-613 (2005).
13. J.W. Polli, S.A. Wring, J.E. Humphreys, L. Huang, J.B. Morgan, L.O. Webster, and C.S. Serabjit-Singh. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther.* 299:620-628 (2001).
14. K.C. Cheng, C. Li, and A.S. Uss. Prediction of oral drug absorption in humans--from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4:581-590 (2008).

15. P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis, and L. Illum. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res.* 11:1358-1361 (1994).
16. P. Artursson and R.T. Borchardt. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res.* 14:1655-1658 (1997).
17. S.D. Thummel KE. Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetic data. In: Hardman JG, Limbard LE, Gilman AG, editors, *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th edition. . New York: McGraw-Hill:1927-2023 (2001).
18. S. Taparia, J.C. Fleet, J.B. Peng, X.D. Wang, and R.J. Wood. 1,25-Dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D--mediated regulation of TRPV6 (a putative epithelial calcium channel) mRNA expression in Caco-2 cells. *Eur J Nutr.* 45:196-204 (2006).
19. S. Bhoopathy, C. Bode, V. Naageshwaran, E.A. Weiskircher-Hildebrandt, and I.J. Hidalgo. Principles and experimental considerations for in vitro transporter interaction assays. *Methods Mol Biol.* 1113:229-252 (2014).
20. K.R. Korzekwa, S. Nagar, J. Tucker, E.A. Weiskircher, S. Bhoopathy, and I.J. Hidalgo. Models to predict unbound intracellular drug concentrations in the presence of transporters. *Drug Metab Dispos.* 40:865-876 (2012).
21. H. Sun and K.S. Pang. Permeability, transport, and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: a theoretical study. *Drug Metab Dispos.* 36:102-123 (2008).
22. G.T. Knipp, N.F. Ho, C.L. Barsuhn, and R.T. Borchardt. Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci.* 86:1105-1110 (1997).
23. S.M. Moyes, J.F. Morris, and K.E. Carr. Culture conditions and treatments affect Caco-2 characteristics and particle uptake. *Int J Pharm.* 387:7-18 (2010).
24. E.M. Agency. Guideline on the Investigation of Drug Interactions.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf.
25. S. Nagar and K. Korzekwa. Commentary: nonspecific protein binding versus membrane partitioning: it is not just semantics. *Drug Metab Dispos.* 40:1649-1652 (2012).
26. T. Tachibana, S. Kitamura, M. Kato, T. Mitsui, Y. Shirasaka, S. Yamashita, and Y. Sugiyama. Model analysis of the concentration-dependent permeability of P-gp substrates. *Pharm Res.* 27:442-446 (2010).

27. P. Palumbo, U. Picchini, B. Beck, J. van Gelder, N. Delbar, and A. DeGaetano. A general approach to the apparent permeability index. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 35:235-248 (2008).
28. T.T. Tran, A. Mittal, T. Gales, B. Maleeff, T. Aldinger, J.W. Polli, A. Ayrton, H. Ellens, and J. Bentz. Exact kinetic analysis of passive transport across a polarized confluent MDCK cell monolayer modeled as a single barrier. *J Pharm Sci.* 93:2108-2123 (2004).
29. T. Korjamo, A.T. Heikkinen, P. Waltari, and J. Monkkonen. The asymmetry of the unstirred water layer in permeability experiments. *Pharm Res.* 25:1714-1722 (2008).
30. A.T. Heikkinen, J. Monkkonen, and T. Korjamo. Kinetics of cellular retention during Caco-2 permeation experiments: role of lysosomal sequestration and impact on permeability estimates. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:882-892 (2009).
31. A.T. Heikkinen, J. Monkkonen, and T. Korjamo. Determination of permeation resistance distribution in in vitro cell monolayer permeation experiments. *Eur J Pharm Sci.* 40:132-142 (2010).
32. D. Shah, S. Paruchury, M. Matta, G. Chowan, M. Subramanian, A. Saxena, M.G. Soars, J. Herbst, R. Haskell, P. Marathe, and S. Mandlekar. A systematic evaluation of solubility enhancing excipients to enable the generation of permeability data for poorly soluble compounds in Caco-2 model. *Drug metabolism letters.* 8:109-118 (2014).
33. H. Sugimoto, S. Matsumoto, M. Tachibana, S. Niwa, H. Hirabayashi, N. Amano, and T. Moriwaki. Establishment of in vitro P-glycoprotein inhibition assay and its exclusion criteria to assess the risk of drug-drug interaction at the drug discovery stage. *J Pharm Sci.* 100:4013-4023 (2011).
34. K. Korzekwa and S. Nagar. Compartmental models for apical efflux by P-glycoprotein: part 2--a theoretical study on transporter kinetic parameters. *Pharm Res.* 31:335-346 (2014).
35. S. Nagar, J. Tucker, E.A. Weiskircher, S. Bhoopathy, I.J. Hidalgo, and K. Korzekwa. Compartmental models for apical efflux by P-glycoprotein--part 1: evaluation of model complexity. *Pharm Res.* 31:347-359 (2014).
36. D. Tam, H. Sun, and K.S. Pang. Influence of P-glycoprotein, transfer clearances, and drug binding on intestinal metabolism in Caco-2 cell monolayers or membrane preparations: a theoretical analysis. *Drug Metab Dispos.* 31:1214-1226 (2003).

37. R.A. Bellantone, N. Nicolettos, and F.M. Plakogiannis. Faster determination of membrane permeabilities without using the lag time method. *Int J Pharm.* 248:81-92 (2002).
38. J. Hunter, M.A. Jepson, T. Tsuruo, N.L. Simmons, and B.H. Hirst. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem.* 268:14991-14997 (1993).
39. M.V. Varma, K. Sateesh, and R. Panchagnula. Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport. *Mol Pharm.* 2:12-21 (2005).
40. P. Acharya, T.T. Tran, J.W. Polli, A. Ayrton, H. Ellens, and J. Bentz. P-Glycoprotein (P-gp) expressed in a confluent monolayer of hMDR1-MDCKII cells has more than one efflux pathway with cooperative binding sites. *Biochemistry.* 45:15505-15519 (2006).
41. A. Avdeef and K.Y. Tam. How well can the Caco-2/Madin-Darby canine kidney models predict effective human jejunal permeability? *J Med Chem.* 53:3566-3584 (2010).
42. C.Q. Xia, N. Liu, D. Yang, G. Miwa, and L.S. Gan. Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 33:637-643 (2005).
43. T. Hirohashi, H. Suzuki, X.Y. Chu, I. Tamai, A. Tsuji, and Y. Sugiyama. Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Pharmacol Exp Ther.* 292:265-270 (2000).
44. B.S. Bock-Hennig, C. Kohle, K. Nill, and K.W. Bock. Influence of *t*-butylhydroquinone and beta-naphthoflavone on formation and transport of 4-methylumbelliferone glucuronide in Caco-2/TC-7 cell monolayers. *Biochem Pharmacol.* 63:123-128 (2002).
45. H.M. Prime-Chapman, R.A. Fearn, A.E. Cooper, V. Moore, and B.H. Hirst. Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 311:476-484 (2004).
46. Y. Sai, Y. Kaneko, S. Ito, K. Mitsuoka, Y. Kato, I. Tamai, P. Artursson, and A. Tsuji. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 34:1423-1431 (2006).

47. I.J. Hidalgo and R.T. Borchardt. Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochim Biophys Acta*. 1035:97-103 (1990).
48. E. Neimark, F. Chen, X. Li, and B.L. Shneider. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology*. 40:149-156 (2004).
49. I. Tamai, H. Takanaga, H. Maeda, Y. Sai, T. Ogihara, H. Higashida, and A. Tsuji. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 214:482-489 (1995).
50. I. Elimrani, K. Lahjouji, E. Seidman, M.J. Roy, G.A. Mitchell, and I. Qureshi. Expression and localization of organic cation/carnitine transporter OCTN2 in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 284:G863-871 (2003).
51. D. Hallifax, E. Turlizzi, U. Zanelli, and J.B. Houston. Clearance-dependent underprediction of in vivo intrinsic clearance from human hepatocytes: comparison with permeabilities from artificial membrane (PAMPA) assay, in silico and caco-2 assay, for 65 drugs. *Eur J Pharm Sci*. 45:570-574 (2012).
52. Y. Shirasaka, T. Sakane, and S. Yamashita. Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane. *J Pharm Sci*. 97:553-565 (2008).
53. 厚生労働省医薬食品局審査管理課. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(最終案). <http://www.nihs.go.jp/mss/T140710-jimu.pdf>.
54. U.S. Food and Drug Administration. Drug Interaction Studies —Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>.
55. K.M. Hillgren, D. Keppler, A.A. Zur, K.M. Giacomini, B. Stieger, C.E. Cass, L. Zhang, and C. International Transporter. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 94:52-63 (2013).
56. D. Tweedie, J.W. Polli, E.G. Berglund, S.M. Huang, L. Zhang, A. Poirier, X. Chu, B. Feng, and C. International Transporter. Transporter studies in drug development: experience to date and follow-up on decision trees from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 94:113-125 (2013).
57. J. Yu, T.K. Ritchie, A. Mulgaonkar, and I. Ragueneau-Majlessi. Drug disposition and drug-drug interaction data in 2013 FDA new drug applications: a systematic review. *Drug Metab Dispos*. 42:1991-2001 (2014).

58. E.F. Oga, S. Sekine, Y. Shitara, and T. Horie. P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of herbals on digoxin transport. *J Ethnopharmacol.* 144:612-617 (2012).
59. C.I.L. Sciences. Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide.
60. J. Bentz, M.P. O'Connor, D. Bednarczyk, J. Coleman, C. Lee, J. Palm, Y.A. Pak, E.S. Perloff, E. Reyner, P. Balimane, M. Brannstrom, X. Chu, C. Funk, A. Guo, I. Hanna, K. Heredi-Szabo, K. Hillgren, L. Li, E. Hollnack-Pusch, M. Jamei, X. Lin, A.K. Mason, S. Neuhoﬀ, A. Patel, L. Podila, E. Plise, G. Rajaraman, L. Salphati, E. Sands, M.E. Taub, J.S. Taur, D. Weitz, H.M. Wortelboer, C.Q. Xia, G. Xiao, J. Yabut, T. Yamagata, L. Zhang, and H. Ellens. Variability in P-glycoprotein inhibitory potency (IC₅₀) using various in vitro experimental systems: implications for universal digoxin drug-drug interaction risk assessment decision criteria. *Drug Metab Dispos.* 41:1347-1366 (2013).
61. K. Cholkar, H.M. Trinh, A.D. Vadlapudi, Z. Wang, D. Pal, and A.K. Mitra. Interaction Studies of Resolvin E1 Analog (RX-10045) with Efflux Transporters. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 31:248-255 (2015).
62. B. Pressand D. Di Grandi. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. *Curr Drug Metab.* 9:893-900 (2008).
63. G.A. Sawada, C.L. Barsuhn, B.S. Lutzke, M.E. Houghton, G.E. Padbury, N.F. Ho, and T.J. Raub. Increased lipophilicity and subsequent cell partitioning decrease passive transcellular diffusion of novel, highly lipophilic antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther.* 288:1317-1326 (1999).
64. G. Krishna, K. Chen, C. Lin, and A.A. Nomeir. Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2. *Int J Pharm.* 222:77-89 (2001).
65. B.c. Laurence Brunton, Bjorn knpplman. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e (Goodman and Gilman"S the Pharmacological Basis of Therapeutics). (2011).
66. 厚生労働省. 医薬品産業ビジョン 2013.
http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iryuu/shinkou/dl/vision_2013a.pdf.