

抗結核薬デラマニドの  
ヒト薬物動態予測に関する研究

2022年

柴田昌和

# 目次

略語表.....	1
第1章 序論.....	2
第2章 デラマニドの薬物トランスポーターに対する基質性および阻害性	
第1節 緒言.....	5
第2節 実験方法.....	8
第1項 試験材料.....	8
第2項 経細胞輸送実験.....	9
第3項 細胞取り込み輸送実験.....	11
第4項 膜ベシクル取り込み輸送実験.....	12
第5項 タンパク質定量.....	13
第6項 放射能計測.....	13
第7項 データ解析.....	13
第3節 結果.....	15
第1項 P-gp および BCRP に対する基質性.....	15
第2項 OATP1B1, OATP1B3 および OCT1 に対する基質性.....	18
第3項 P-gp および BCRP に対する阻害性.....	20
第4項 OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1 および OCT2 に対する 阻害性.....	21
第5項 BSEP に対する阻害性.....	25
第4節 考察.....	26
第3章 デラマニドの動物における吸収, 分布および排泄	
第1節 緒言.....	30
第2節 実験方法.....	31
第1項 試験材料.....	31
第2項 動物.....	31
第3項 マウス, ラットおよびイヌにおけるデラマニド単回静脈内投与後の 血漿中動態評価.....	32
第4項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の血液および血漿中 動態評価.....	32
第5項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の組織分布性評価.....	33
第6項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の尿および糞中への 排泄評価.....	33
第7項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の胆汁および尿中へ の排泄評価.....	34
第8項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の腸肝循環評価.....	34
第9項 LC-MS/MS を用いた血漿中デラマニドの定量.....	35
第10項 放射能計測.....	36

第 11 項 データ解析.....	36
第 3 節 結果.....	37
第 1 項 マウス, ラットおよびイヌにおけるデラマニド単回静脈内投与後の 血漿中動態.....	37
第 2 項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の血液および血漿中 動態.....	38
第 3 項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の組織分布性.....	40
第 4 項 ラットにおける <sup>[14C]</sup> デラマニド単回経口投与後の胆汁, 尿および糞 中排泄.....	43
第 4 節 考察.....	45
第 4 章 デラマニドのヒト薬物動態予測	
第 1 節 緒言.....	49
第 2 節 実験方法.....	50
第 1 項 $CL_{human}$ および $V_{ss, human}$ の予測.....	50
第 2 項 $C_{ss}$ -MRT アプローチによるヒト PK プロファイル予測.....	52
第 3 項 PBPK モデリング アプローチによるヒト PK プロファイル予測 .....	52
第 4 項 データ解析 (Goodness of fit の比較, 予測精度の検証) .....	56
第 3 節 結果.....	56
第 1 項 $CL_{human}$ および $V_{ss, human}$ の予測性検証.....	56
第 2 項 $C_{ss}$ -MRT アプローチによるヒト PK プロファイルの予測性検証.....	58
第 3 項 PBPK モデリングアプローチによるヒト PK プロファイルの予測性 検証.....	60
第 4 項 PBPK モデリングアプローチによるヒト組織プロファイルのシミュ レーション .....	61
第 4 節 考察.....	62
第 5 章 総括.....	68
引用文献.....	71
論文目録.....	80
謝辞.....	81

## 略語表

ABC	ATP-binding cassette
AUC	Area under the concentration time curve
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSA	Bovine serum albumin
BSEP	Bile-salt export pump
CL	Total clearance
CL <sub>int</sub>	Intrinsic clearance
C <sub>max</sub>	Maximum blood or plasma concentration
C <sub>ss</sub>	Steady-state plasma concentration
CYP	Cytochrome P450
DDI	Drug drug interaction
EMA	European Medicines Agency
FDA	US Food and Drug Administration
HIV	Human immunodeficiency virus
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney
[ <sup>3</sup> H]E3S	Estrone 3-sulfate, ammonium salt, [6,7- <sup>3</sup> H(N)]-
[ <sup>3</sup> H]E <sub>2</sub> 17βG	Estradiol 17β- D-glucuronide, [estradiol-6,7- <sup>3</sup> H(N)]-
[ <sup>3</sup> H]TCA	Taurocholic acid, [ <sup>3</sup> H(G)]-
[ <sup>3</sup> H]PAH	Aminohippuric acid, p-[glycyl-2- <sup>3</sup> H]
H <sub>t</sub>	Hematocrit value
IVIVE	In vitro–in vivo extrapolation
K <sub>p, tissue</sub>	Tissue-to-plasma concentration ratio
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LLC-PK1	Porcine kidney epithelial cell line
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare
MRT	Mean residence time
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
PBPK	Physiologically based pharmacokinetic
P-gp	P-glycoprotein
SF	Scaling factor
SLC	Solute carrier
t <sub>max</sub>	Time to maximum concentration
t <sub>1/2</sub>	Terminal elimination half-life
V <sub>ss</sub>	Volume of distribution at steady-state

## 第1章 序論

結核はいまだに深刻な健康問題であり、世界の主要な死因のひとつである。2019年には、全世界で約1000万人が結核を罹患し、約150万人が死亡したと報告されている [1]。日本においては約2万人が結核を罹患し、約2000人の死亡が報告されており、注目すべき疾患のひとつとされている。また、結核の病変部位のうち約85%が肺であり肺結核と呼ばれるが、約15%では肺以外の部位に病変が認められることがあり、まとめて肺外結核と呼ばれる[1]。現在の肺結核に対する標準治療は、リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミドを中心とした多剤併用療法を経過観察しながら行う必要があり、投与期間は6か月と長期にわたるため患者にとって治療は負担となる [2]。結核の病態は、標準治療で使用される抗結核薬のうちイソニアジドとリファンピシンに耐性を持つ結核菌による多剤耐性結核 (MDR-TB) およびヒト免疫不全ウイルス (HIV) との重複感染のケースがあり、このときの薬物治療はさらに複雑なものとなっている。MDR-TB患者は、第一選択薬に比べて効果が低いが多剤併用で効果が期待される第二選択薬 (キノロン系、リネゾリド、ベダキリンなど) を含む組み合わせで、少なくとも9か月、長い場合は18か月間の治療を受けなければならない [1]。そのため、治療期間を短縮し、他の抗結核薬や抗レトロウイルス薬と安全に併用できる新たな化学療法が求められている。

デラマニド (Deltyba™, OPC-67683, Delamanid, ニトロ-ジヒドロイミダゾオキサゾール誘導体, 大塚製薬株式会社, 東京, 日本) は、肺のMDR-TBの治療薬として、欧州, 日本, 韓国, 香港, 中国, ロシアなどで承認されている薬物である[3,4]。デラマニドは結核菌の細胞壁を構成する長鎖脂肪酸であるミコール酸の生成を強力に阻害するメカニズムを有する。非臨床試験においては、薬物感受性の高い結核菌株と第一選択薬に耐性のある結核菌株の両者に対して、*in vitro* および *in vivo* において強力な活性を示す[4]。MDR-TB患者を登録した臨床試験では、デラマニドの有効性と良好な安全性が確認さ

れている[5, 6]。デラマニドの薬物動態特性, 特に代謝に関連する検討についてはこれまでに複数報告されている[4, 7, 8, 9]。デラマニドは主にヒトの血漿中アルブミンによって代謝され, 一次代謝物である M1 を生成する (Figure 1-1) [7]。また, デラマニドの血漿中代謝については種差が認められている (Figure1-2) [7]。

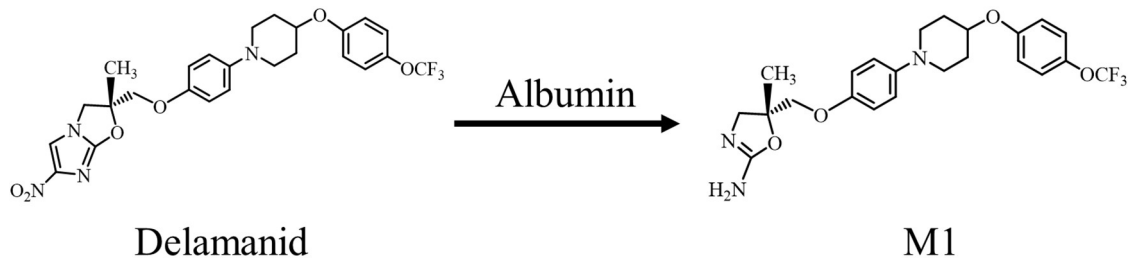


Figure 1-1 Main metabolic pathway of delamanid. ([7]を一部改変)

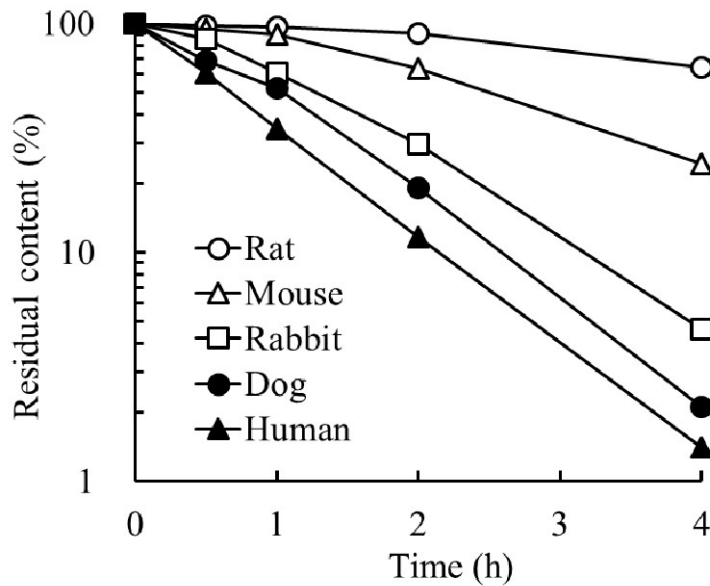


Figure 1-2 Stability of delamanid in animal and human plasma in vitro. ([7]を一部改変)

[<sup>14</sup>C]delamanid (5 μg/ml, 9.3 μmol/L) was incubated in rat, mouse, rabbit, dog, or human plasma at 37°C.

Data points are the means of duplicate determinations.

デラマニドはin vitroヒト肝ミクロソームにおいて, 多くの薬物代謝に関わるチトクロームP450 (CYP) ではほとんど代謝されない[4]。また, ヒト肝ミクロソームにおいてデラ

マニドは主要なヒトCYPアイソフォーム（CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1およびCYP3A）に対して、治療濃度を大幅に上回る100  $\mu\text{mol/L}$ においても阻害作用を示さなかった[10]。これらの結果から、デラマニドはCYP阻害作用を有する薬物またはCYPで代謝される薬物と併用したときに、代謝に関連する薬物相互作用（DDI）リスクがなく、安全に他剤と併用可能であると考えられている。臨床DDIリスクの評価および予測は薬物の適正使用をするうえで重要である。これまで米国食品医薬品庁（FDA）、欧州医薬品庁（EMA）および日本の厚生労働省（MHLW）においてそれぞれDDIに関するガイダンスおよびガイドラインが発出され、すでに運用が行われている[11, 12, 13]。DDIガイダンスおよびガイドラインによると、代謝酵素を介したDDIに加えて組織分布を制御するトランスポーターを介したDDIが生じる可能性があり、実験データに基づいて臨床DDI試験の必要性を判断するための決定樹が提示されている。デラマニドの代謝についての情報はこれまで報告されているものの、分布情報およびトランスポーターの基質性および阻害性に関する情報は報告されていない。薬物の分布および代謝に関する情報が明らかとなれば、解析的アプローチによりヒト薬物動態を定量的に予測できる可能性がある。本研究では、アルブミンで代謝されるという特徴をもつ抗結核薬デラマニドのヒトにおける薬物動態予測を目的として以下の検討を行った。はじめに、薬物動態評価試験の一環としてデラマニドの体内動態、特に分布性について知見を得る目的で、*in vitro*薬物トランスポーターに関する検討を行った（第2章）。続いて、マウス、ラットおよびイヌを用いて*in vivo*における吸収、分布および排泄に関する検討を行った（第3章）。最後に、得られたデータと先行研究のアルブミンによる代謝データを合わせて、解析的アプローチでヒト薬物動態を予測し、検証した（第4章）。さらにヒトにおける肺外組織への分布性を予測し、肺外結核に対する有効性について考察した。

## 第2章 デラマニドの薬物トランスポーターに対する基質性および阻害性

### 第1節 緒言

ヒトの消化管，肝臓，腎臓，脳などには，多数の薬物排出・取り込みトランスポーターが発現しており，薬物の吸収，分布，排泄を制御し，DDIにも関与している（Figure 2-1）[14]。これらのトランスポーターは，感染症の治療に汎用される抗生物質をはじめとする薬物の体内動態を決定する重要な役割を担っている[15, 16]。

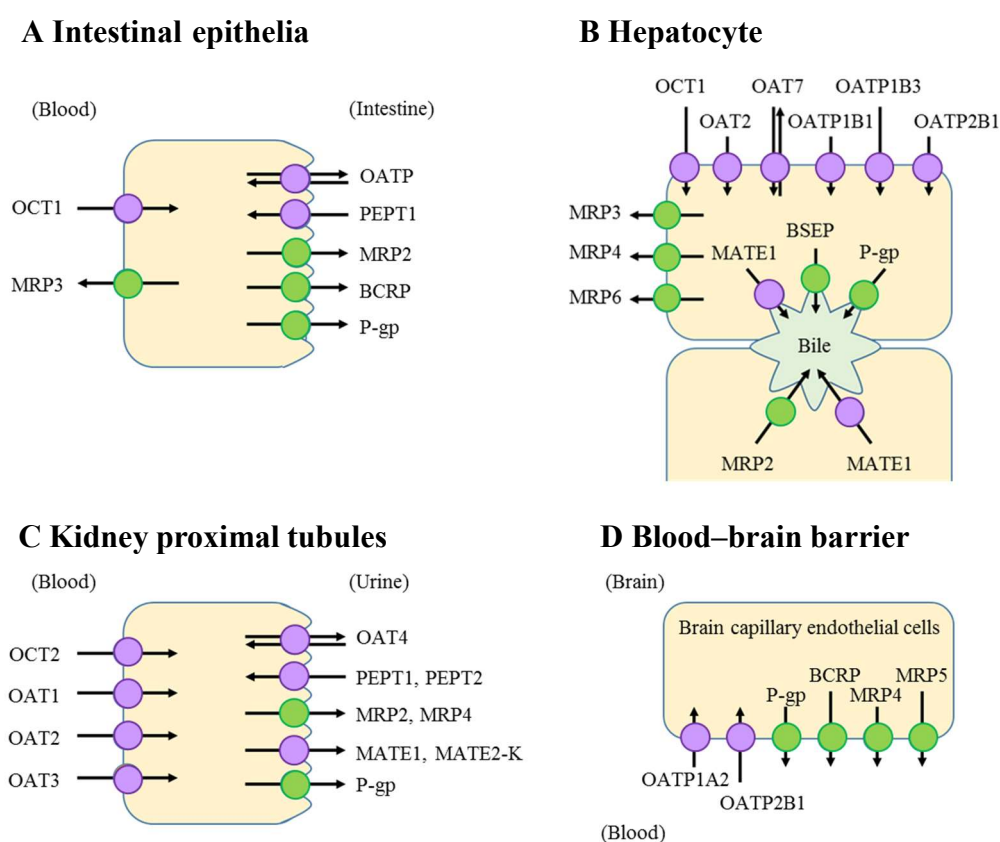


Figure 2-1 Human typical transport proteins for drugs and endogenous substances. ([14]を一部改変)  
Intestinal epithelia (A), hepatocyte (B), kidney proximal tubules (C) or blood-brain barrier (D).

The two major superfamilies of membrane transporters are the ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) superfamilies. ABC transporters (green symbols); P-gp, P-glycoprotein; MRP, multidrug resistance protein; BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile-salt export pump. SLC transporters (purple symbols); PEPT, peptide transporter; OCT, organic cation transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OAT, organic anion transporter; MATE, multidrug and toxin extrusion protein.



例えば、経口投与後に消化管から吸収される過程において、フルオロキノロン系抗菌剤や  $\beta$ -ラクタム系抗菌剤は主に消化管膜上の peptide transporter 1 および organic anion transporting polypeptide (OATP) を介して吸収される[15, 16, 17]。一方、消化管細胞に吸収されたフルオロキノロン系抗菌剤は、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp, MDR1) および breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) によって消化管内腔に排出されるという報告がある[18]。 $\beta$ -ラクタム系抗生物質は、organic anion transporter (OAT) の基質であり、腎基底膜から近位尿細管細胞に取り込まれ、最終的にはネフロンの内腔に入って排泄される[19]。また、排出トランスポーターである P-gp および BCRP は、肝臓、腎臓、乳腺などにも発現しており、生体にとっての異物を細胞外に排出している[14, 20]。さらに、P-gp および BCRP は脂溶性化合物の血液脳関門透過を制限し、この透過過程におけるマクロライド系やフルオロキノロン系抗菌剤との DDI が報告されている[15, 18, 21, 22]。一般的に、抗生物質の治療効果を高めるために他の抗生物質あるいは他の薬物と併用することがある。生体において、抗生物質の消化管からの吸収、分布、肝代謝、胆汁中または腎排泄過程には複数種類の薬物トランスポーターが関与している。したがって、新規抗生物質をこのようなトランスポーターの基質や阻害剤と併用した場合、予期せぬ DDI が生じる可能性がある。例えば、リファンピシンやマクロライド系抗生物質はヒト OATP ファミリーの強力な阻害剤となるものがあり、 $\beta$ -ラクタム系やキノロン系などの他の抗生物質の肝臓への取り込みを阻害することで、DDI を引き起こす可能性がある[23, 24]。また、エタンブトールはカチオン性化合物の肝または腎への取り込みに関与する organic cation transporter (OCT) に対する阻害能を有している[25]。さらに、リファンピシンは CYP3A4 の誘導を介して薬物の代謝に影響を与えうる。エリスロマイシンは CYP3A4 阻害作用に加えて P-gp 阻害作用も有しており、P-gp の基質であるフェキソフェナジンの吸収が増加することが報告されている[26]。また、HIV 感染症の治療に使用される抗レトロウイルス剤は、代

謝酵素およびトランスポーター阻害能を有するため、他の薬物の薬物動態や臨床効果に影響を与える可能性がある[27]。そのため、DDIポテンシャルを *in vitro* で評価し、臨床的影響を考察することは重要であると考えられる。

抗結核薬デラマニドは主にアルブミンによって代謝され、一次代謝物であるM1を生成する (Figures 1-1 および1-2) [7, 8]。デラマニドはヒトおよび動物の肝ミクロソームにおいて、チトクロームP450 (CYP) ではほとんど代謝されない[4]。また、*in vitro*のヒト肝ミクロソームにおいて、デラマニドは主要なヒトCYPアイソフォーム (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1およびCYP3A) に対して、治療濃度を大幅に上回る100  $\mu\text{mol/L}$ においても阻害作用を示さなかった[10]。これらの結果から、デラマニドはCYP阻害作用を有する薬物またはCYPで代謝される薬物と併用したときに、代謝に関連するDDIのリスクがなく、安全に他剤と併用可能であると考えられている。臨床DDIリスクの評価および予測は薬物の適正使用をするうえで重要である。これまでFDA, EMAおよびMHLWにおいてそれぞれDDIに関するガイダンスおよびガイドラインが発出され、すでに運用されている[11, 12, 13]。DDIガイダンスおよびガイドラインによると、代謝酵素を介したDDIに加えて、組織分布を制御するトランスポーターを介したDDIが生じる可能性があり、非臨床試験結果に基づいて臨床DDI試験の必要性を判断するための決定樹が提示されている。しかし、デラマニドの薬物トランスポーター基質性および阻害性に関する情報は報告されていない。そこで本章における研究では、临床上重要とされる薬物トランスポーターに対するデラマニドの基質性および阻害能の評価を実施した。具体的には、薬物動態に影響を与えることが知られているABCトランスポーター (P-gp, BCRPおよびbile salt export pump [BSEP]) , Solute carrier (SLC) トランスポーター (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1およびOCT2) を発現させた組換え細胞培養系または膜ベシクルを用いて、一連の*in vitro*試験を行った。

## 第2節 実験方法

### 第1項 試験材料

[<sup>14</sup>C]デラマニドは、Quotient Bioresearch (Cardiff, United Kingdom) において合成されたものを用いた (Figure 2-2)。 [<sup>3</sup>H]ジゴキシン, [<sup>3</sup>H]プラゾシン, [<sup>14</sup>C]マンニトール, Estrone 3-Sulfate, Ammonium Salt, [6,7-<sup>3</sup>H(N)]- (<sup>13</sup>H]E3S), Estradiol 17β- D-Glucuronide, [estradiol-6,7-<sup>3</sup>H(N)]- (<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17βG) および aurocholic acid, [<sup>3</sup>H(G)]- (<sup>3</sup>H]TCA) は, PerkinElmer (Waltham, MA) から購入した。 *p*-[glycyl-2-<sup>3</sup>H]aminohippuric acid (<sup>3</sup>H]PAH) および [<sup>14</sup>C]メトホルミンは, それぞれ American Radiolabeled Chemicals (St.Louis, MO) および Moravек Biochemicals (Brea, CA) から購入した。ジゴキシン, PAH, E3S sodium salt, sodium TCA, ベラパミル, プロベネシド, リファンピシン, 無水キニジン, シクロスポリンは, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。 E<sub>2</sub>17βG sodium salt および Ko143 は, それぞれ Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) および Tocris Bioscience 社 (Bristol, United Kingdom) から購入した。

P-gp 発現細胞 (ブタ腎上皮細胞由来 LLC-PK1 細胞にヒト P-gp の cDNA を含むベクターを導入した細胞) およびコントロール細胞 (ベクターのみを導入した LLC-PK1 細胞) は BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) のライセンスに基づいて使用した。BCRP 発現細胞 (ブタ腎上皮細胞由来 LLC-PK1 細胞にヒト BCRP の cDNA を含むベクターを導入した細胞) およびコントロール細胞 (ベクターのみを導入した LLC-PK1 細胞), および OATP1B1, OATP1B3 , OCT1 および OCT2 発現 HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞にヒト OATP1B1, OATP1B3 , OCT1 および OCT2 の cDNA を含むベクターをトランスフェクションした細胞) およびコントロール細胞 (HEK293 細胞にベクターのみをトランスフェクションした細胞) は, 積水メディカル株式会社薬物動態研究所 (東京, 日本) にて構築したものを使用した。OAT1 および OAT3 発現 S<sub>2</sub> 細胞 (Temperature-sensitive simian virus 40 large T 抗原遺伝子を持つトランスジェニックマウスの腎近位尿

細管中間部由来細胞にヒト OAT1 又は OAT3 の cDNA を含むベクターをトランスフェクションした細胞) およびコントロール細胞 (ベクターのみをトランスフェクションした細胞) は株式会社富士バイオメディックス (東京, 日本) にて構築され, 積水メディカル株式会社が所有する細胞を使用した。BSEP 発現膜ベシクルおよびコントロール Sf9 細胞膜ベシクルは, Solvo Biotechnology (Boston, MA) から購入し, 使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。すべての他の試薬および溶媒は, 分析用または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) グレードのものを使用した。

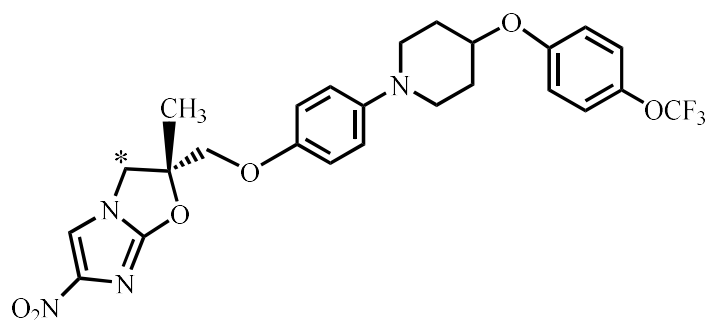


Figure 2-2 Chemical structure of [ $^{14}\text{C}$ ]delamanid.

The asterisk denotes the position of the  $^{14}\text{C}$ -label.

## 第2項 経細胞輸送実験

細胞は  $75\text{ cm}^2$  のフラスコで培養し, 3~5 日ごとに継代を行った。P-gp 発現細胞およびコントロール細胞はそれぞれ  $4 \times 10^4$  cells/insert の密度で, BCRP 発現細胞およびコントロール細胞はそれぞれ  $2.5 \times 10^4$  cells/insert の密度で, 24 ウェルのトランスウェルプレート ( $0.3\text{ cm}^2$  のポリエチレンテレフタレート製多孔質フィルターのカルチャーインサートで, P-gp 発現細胞の場合は孔径  $3\text{ }\mu\text{m}$ , BCRP 発現細胞の場合は孔径  $0.4\text{ }\mu\text{m}$ , セルカルチャーインサート 24 ウェルコンパニオンプレート ; BD Falcon, Bedford, MA) に播種した。播種した P-gp 発現細胞は 8~9 日間, BCRP 発現細胞は 7~8 日間,  $\text{CO}_2$  インキュベーター ( $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ ) で培養し, 細胞輸送活性の測定に必要な細胞単層膜を調製し

た。P-gp および BCRP 発現細胞を入れたフラスコとプレートの培地はそれぞれ 2~3 日 および 2~5 日ごとに交換した。フラスコでの継代には 9%の非働化したウシ胎児血清 (FBS), 50  $\mu\text{g/ml}$  の Gentamicin, 100  $\mu\text{g/ml}$  の Hygromycin B を含む Medium199 を, トランスウェルプレートに播種後は, 9% FBS, 50  $\mu\text{g/ml}$  の Gentamicin を含む Medium199 を用いた。輸送評価実験の前に, 細胞単層膜の電気抵抗値を測定した。電気抵抗値は, P-gp 発現細胞では 303~714  $\Omega \text{ cm}^2$ , BCRP 発現細胞および対照細胞では 138~474  $\Omega \text{ cm}^2$  であり, これらの値は許容範囲 (100~800  $\Omega \text{ cm}^2$ ) 内であった。トランスウェルプレートでは, P-gp 発現細胞単層膜の apical 側の体積を 100  $\mu\text{l}$ , basal 側の体積を 600  $\mu\text{l}$  に維持した。BCRP 発現細胞単層膜の apical 側の体積は 250  $\mu\text{l}$ , basal サイド側の体積は 900  $\mu\text{l}$  に維持した。トランスウェルプレートの apical 側と basal 側の両側の培地を除去し, Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, pH7.4) または典型的阻害剤 (ベラパミルおよび Ko143) 含有 HBSS で置き換え, 37°C で 1 時間プレインキュベーションした。Apical 側から basal 側への薬物輸送を評価するために, apical 側の培地を $^3\text{H}$ ジゴキシン (P-gp の基質),  $^3\text{H}$ プラゾシン (BCRP の基質),  $^{14}\text{C}$ デラマニドまたは $^{14}\text{C}$ マンニトール溶液に, basal 側の培地を HBSS または阻害剤溶液に, それぞれ適宜交換した。また, basal 側から apical 側への輸送を評価するために, apical 側の培地を HBSS または阻害剤溶液に適宜交換し, basal 側の培地を $^3\text{H}$ ジゴキシン (P-gp の基質),  $^3\text{H}$ プラゾシン (BCRP の基質),  $^{14}\text{C}$ デラマニドまたは $^{14}\text{C}$ マンニトール溶液に交換した。その後, 37°C で所定の時間 (基質性評価時において,  $^3\text{H}$ ジゴキシンおよび被験物質は 1, 2, 4 時間および 2, 3, 4 時間,  $^3\text{H}$ プラゾシンは 0.25, 0.5, 1 時間, 阻害性評価時において,  $^3\text{H}$ ジゴキシンおよび $^3\text{H}$ プラゾシンは 2 および 1 時間) インキュベートした。所定の時間に, basal 側または apical 側のサンプルを 70  $\mu\text{L}$  (P-gp の場合) または 100  $\mu\text{L}$  (BCRP の場合) 採取し, 液体シンチレーションカクテル Hionic-Fluor (PerkinElmer) 10 mL を加え混合し, 放射能濃度を測定した。インキュベーションは triplicate で行った。

### 第3項 細胞取り込み輸送実験

細胞は 75 cm<sup>2</sup> のフラスコで培養し、3～5 日ごとに継代を行った。OATP1B1 および OATP1B3 発現細胞とコントロール細胞を、ラット尾部由来のコラーゲン I (BD フェルコン社製) を塗布した 24 ウェルプレートに  $3.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) で 1 日間培養した。さらに、同じ培地に 10 mmol/L 酪酸添加培地を 0.5 mL 添加し、更に 1 日間で培養したものを試験に使用した。OCT1 および OCT2 発現細胞とコントロール細胞は、コラーゲン I を塗布した 24 ウェルプレートに、同じ培地で  $2.5 \times 10^5$  cells/well で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) で 2 日間培養した。培地は 9%FBS, Antibiotic-antimycotic および 2 mmol/L L-Glutamine を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium を使用した。OAT1 および OAT3 発現 S<sub>2</sub> 細胞、およびコントロール細胞を 75cm<sup>2</sup> のフラスコで培養し、2 日または 4 日ごとに継代を行った。コラーゲンコート 24 ウェルプレート (Corning, Tewksbury, MA) に  $2.5 \times 10^5$  cells/well または  $4.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) で 2 日間培養した。新生牛皮由来のコラーゲン I (Corning, Tewksbury, MA) を塗布した 24 ウェルプレートに、 $2.5 \times 10^5$  または  $4.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) で 2 日間培養した。培地は 5%FBS, 10 ng/ml Epidermal growth factor, 0.08 unit/mL インスリン, 10 µg/mL トランスフェリンを含む RITC80-7 (株式会社機能性ペプチド研究所, 山形, 日本) を用いた。播種した各ウェルの培地を HBSS (OAT の場合は HBSS の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を使用) または典型的阻害剤含有 HBSS で置き換え、37°C で 15 分間プレインキュベートした。阻害剤を含む基質溶液または基質溶液で HBSS を置換することで取り込みを開始した。37°C で所定時間の反応後、反応溶液を除去し、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 1mL で 1-3 回洗浄した。リン酸緩衝生理食塩水を除去した後、各ウェルに 0.1 mol/L NaOH 0.5 mL を加え、ピペッティングで十分に混合して

細胞を溶解させた。細胞溶解液 0.3 mL に Hionic-Fluor 10 mL を加え混合し、放射能濃度を測定した。また、第 5 項の方法で細胞溶解液中のタンパク濃度を測定した。インキュベーションは triplicate で行った。同様の手順で、インキュベーション前のサンプル中の基質濃度を測定した。細胞溶解液中の量とインキュベーション前に観察された濃度に基づいて、取り込み量を算出した。

#### 第4項 膜ベシクル取り込み輸送実験

反応開始前にガラス繊維フィルター（マルチスクリーン HTS FB 高流速タイプ：フィルター；グラスファイバーFB，孔径；1.0  $\mu\text{m}$ ，Merck）を Washing-Mix 溶液 200  $\mu\text{L}$ /well で 1 回洗浄した。続いて、0.1%BSA 溶液 200  $\mu\text{L}$ /well を添加し、30 分以上静置した。0.1%BSA 溶液を吸引除去し、Washing-Mix 溶液 200  $\mu\text{L}$ /well で 2 回洗浄した。BSEP 発現膜ベシクルまたはコントロール膜ベシクルを、2 mmol/L HEPES-Tris, 100 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 10 mmol/L  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , 50 mmol/L sucrose に基質または阻害剤を加えた反応バッファー中で、37°C で 5 分間プレインキュベーションした。その後、10 mmol/L Mg-ATP 溶液 20  $\mu\text{L}$  を加えて取り込み反応を開始し、37°C で 5 分間反応した。氷冷した Washing-mix 溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え反応を停止した。反応停止後の試料 200  $\mu\text{L}$  をガラス繊維フィルターに添加し、吸引ろ過した。ガラス繊維フィルターを氷冷した Washing-mix 溶液 200  $\mu\text{L}$  で 5 回洗浄後バイアルに移し、0.5 mL のエタノールと 5 mL の液体シンチレーションカクテル Ultima Gold (PerkinElmer) と混合して、放射能を測定し、膜ベシクル内の基質量を算出した。残りの反応停止後の試料 30  $\mu\text{L}$  を、5 mL の Ultima Gold と混合して、放射能を測定し、初期濃度を測定した。インキュベーションは triplicate で行った

## 第5項 タンパク質定量

細胞溶解液中のタンパク質含有量は、bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いてアッセイした。各細胞溶解液サンプルまたは BSA 溶液 (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mg protein/mL) を 20  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートに入れ、各ウェルにキット試薬混合物を 200  $\mu$ L ずつ加えて混合した。混合液を 37°C で 30 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (HT ; DS Pharma Biomedical, 大阪, 日本) で 562 nm の UV 吸光度を測定した。測定は duplicate で行った。

## 第6項 放射能計測

液体シンチレーションカウンター (LSC; 2500TR, 3100TR, 1900CA; PerkinElmer) を用いて、各試料中の放射能を計測した。計数効率は、外部標準線源法により補正した。放射能の検出限界は、バックグラウンドの放射能とした。

## 第7項 データ解析

P-gp および BCRP 発現 LLC-PK1 細胞またはコントロール細胞を用いた経細胞輸送実験では透過量と初期濃度から、以下の式に従って Permeation volume と Permeation volume ratio および Permeation clearance ratio を算出した。Permeation clearance は透過量とインキュベーション時間の線形回帰により求めた。

$$\text{Permeation volume}(\mu\text{L}/\text{well}) = \frac{\text{透過量 (dpm/well)}}{\text{初期濃度 (dpm}/\mu\text{L})}$$

$$\text{Permeation volume ratio} = \frac{\text{Basal to apical 方向の Permeation volume } (\mu\text{L}/\text{well})}{\text{Apical to Basal 方向の Permeation volume } (\mu\text{L}/\text{well})}$$

$$\text{Permeation clearance ratio} = \frac{\text{Basal to apical 方向の Permeation clearance } (\mu\text{L}/\text{well} / \text{hour})}{\text{Apical to basal 方向の Permeation clearance } (\mu\text{L}/\text{well} / \text{hour})}$$



さらに、トランスポーター発現細胞の Permeation clearance と対照細胞の Permeation clearance の比を Net flux ratio とした。

$$\text{Net flux ratio} = \frac{\text{トランスポーター発現細胞のPermeation clearance ratio}}{\text{コントロール細胞のPermeation clearance ratio}}$$

OAT, OCT, OATP 発現 HEK293 細胞または S<sub>2</sub> 細胞を用いた取り込み実験では、細胞溶解液中の基質量と初期基質濃度から、以下の式に従って Uptake volume を算出した。さらに、トランスポーター発現細胞の取り込み量とコントロール細胞の取り込み量の比を取り込み比とした。

$$\text{Uptake volume (uL/mg)} = \frac{\text{Uptake amount (dpm/well)}}{\text{タンパク質量 (mg/well)} \times \text{初期濃度 (dpm/}\mu\text{L)}}$$

$$\text{Uptake volume ratio} = \frac{\text{トランスポーター発現細胞のUptake volume}}{\text{コントロール細胞のUptake volume}}$$

膜ベシクルを用いた取り込み実験では、1 チューブあたりの取り込み量とタンパク質含有量を用いて Uptake volume を算出した。

$$\text{Uptake volume (uL/mg)} = \frac{\text{Uptake amount (dpm/well)}}{\text{タンパク質量 (mg/tube)} \times \text{反応液中濃度 (dpm/}\mu\text{L)}}$$

阻害性評価においては、経細胞輸送実験では阻害剤存在下と非存在下での Net flux ratio を残存活性 (% of control) として、以下のように求めた。

$$\text{残存活性 (\% of control)} = \frac{\text{阻害剤添加時のNet flux ratio}}{\text{阻害剤非添加時のNet flux ratio}} \times 100$$

取り込み阻害実験では、以下の式に従って残存活性を算出した。

$$\text{残存活性 (\% of control)} = \frac{B - A}{D - C} \times 100$$

A: 阻害剤添加時のコントロール細胞（またはコントロール膜ベシクル群）における Uptake volume

B: 阻害剤添加時のトランスポーター発現細胞（またはトランスポーター発現膜ベシクル群）における Uptake volume

C: 阻害剤非添加時のコントロール細胞（またはコントロール膜ベシクル群）における Uptake volume

D: 阻害剤非添加時のトランスポーター発現細胞（またはトランスポーター発現膜ベシクル群）の Uptake volume

単層膜透過実験および取り込み阻害実験において、50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）は最高濃度でのコントロールの活性に対する残存活性の割合が50.0%以上であれば、IC<sub>50</sub>は最大濃度よりも大きいと判断した。

### 第3節 結果

#### 第1項 P-gp および BCRP に対する基質性

[<sup>14</sup>C]デラマニド（5 μmol/L）の P-gp 発現 LLC-PK1 細胞における apical 側から basal 側への Permeation clearance は 0.233 μL/well/h および basal 側から apical 側への Permeation clearance は 0.251 μL/well/h であり、Permeation clearance 比は 1.1 であった。これはコントロール LLC-PK1 細胞における apical 側から basal 側への Permeation clearance である 0.160 μL/well/h および basal 側から apical 側への Permeation clearance である 0.167 μL/well/h から算出した Permeation clearance 比の 1.0 と同等であり、特定のフラックスの方向性がないことを示している（Fig 2-3A）。Net flux ratio は 1.1 であり、デラマニドは

P-gp の基質ではないことが示された。なお、P-gp の典型的基質である $^3\text{H}$ ジゴキシンの Net flux ratio は 8.9 であり、用いた細胞において P-gp の輸送能が確認できた (Fig 2-3B)。

$^{14}\text{C}$ デラマニドの BCRP 発現 LLC-PK1 細胞における apical 側から basal 側への Permeation clearance は  $0.536 \mu\text{L}/\text{well}/\text{h}$  および basal 側から apical 側への Permeation clearance は  $0.647 \mu\text{L}/\text{well}/\text{h}$  であり、Permeation clearance 比は 1.2 であった (Fig 2-3C)。これはコントロール LLC-PK1 細胞における apical 側から basal 側への Permeation clearance である  $0.568 \mu\text{L}/\text{well}/\text{h}$  および basal 側から apical 側への Permeation clearance である  $0.616 \mu\text{L}/\text{well}/\text{h}$  から算出した Permeation clearance 比の 1.1 と同等であり、特定のフラックスの方向性がないことを示している。Net flux ratio は 1.1 であり、デラマニドは BCRP の基質ではないことが示された。なお、BCRP の典型的基質である $^3\text{H}$ プラゾシンの Net flux ratio は 13.3 であり、用いた細胞において BCRP の輸送能が確認できた (Fig 2-3D)。

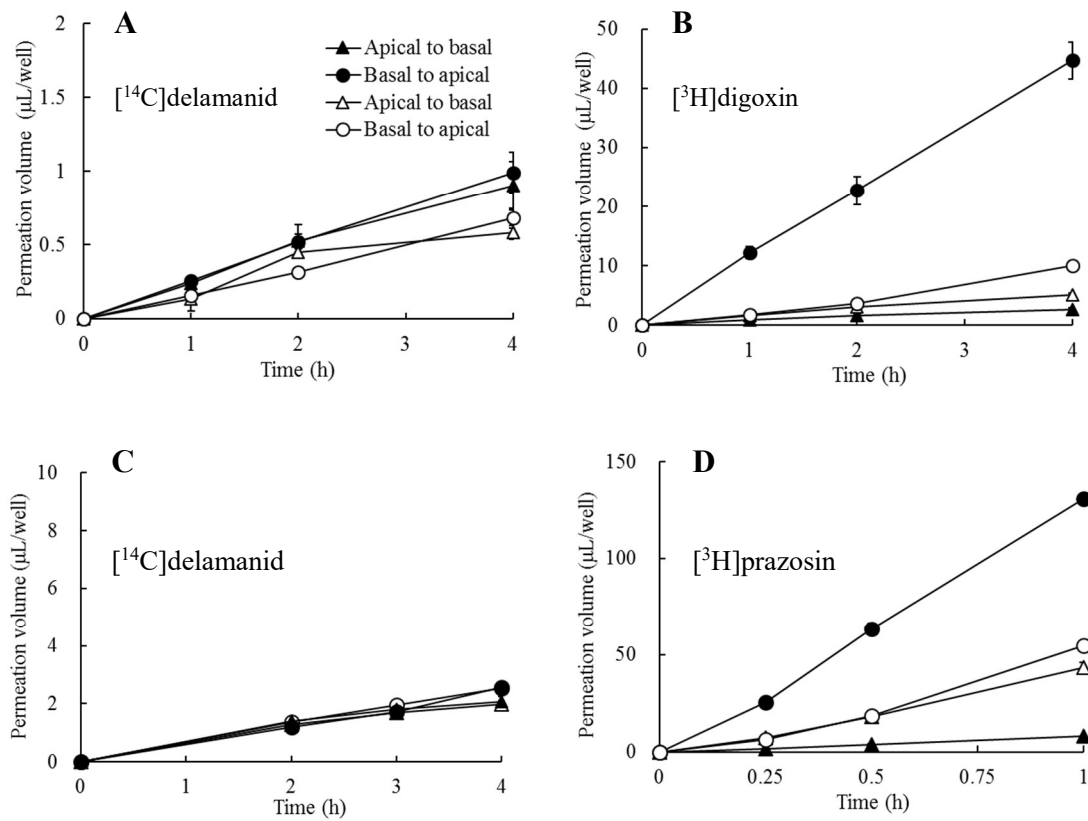


Figure 2-3 Time profiles for the transcellular transport of [<sup>14</sup>C]delamanid across control LLC-PK1 cells (open symbols) and P-gp- or BCRP expressing LLC-PK1 cells (closed symbols).

[<sup>14</sup>C]delamanid (5 µmol/L) for P-gp (A), [<sup>3</sup>H]digoxin (1 µmol/L) for P-gp (B), [<sup>14</sup>C]delamanid (5 µmol/L) for BCRP (C), [<sup>3</sup>H]prazosin (0.01 µmol/L) for BCRP (D). Circles, basal side-to-apical side flux; triangles, apical side-to-basal side flux. Data are expressed as the mean ± SD from triplicate determinations.

## 第 2 項 OATP1B1, OATP1B3 および OCT1 に対する基質性

[<sup>14</sup>C]デラマニド (1 μmol/L) の OATP1B1 および OATP1B3 発現 HEK293 細胞における Uptake volume ratio は, 5 分間のインキュベーション後に 1.4 および 1.0 であった (Figure 2-4A)。さらに, OATP 阻害剤であるリファンピシン (10 μmol/L) の存在下においてもデラマニドの取り込み活性はほぼ同じであった (Data not shown)。これらの結果から, デラマニドが OATP1B1 と OATP1B3 のいずれの基質でもないことを示された。一方, OATP の典型的基質である [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17 G の Uptake volume ratio は, OATP1B1 発現 HEK293 細胞では 5 分後に 416.0, OATP1B3 発現 HEK293 細胞では 5 分間のインキュベーション後に 96.2 となり (Figure 2-4B), 用いた細胞において OATPs の取り込み輸送活性が確認できた。 [<sup>14</sup>C]デラマニド (1 μmol/L) の OCT1 発現 HEK293 細胞における Uptake volume ratio は, 10 分間のインキュベーション後に 0.9 であった (Figure 2-5A)。さらに, OCT1 阻害剤であるキニジン (10 μmol/L) の存在下でも, デラマニドの取り込み活性はほぼ同じであった (Data not shown)。これらの結果から, デラマニドは OCT1 の基質ではないことが示された。一方, OCT1 の典型的基質である [<sup>14</sup>C]メトホルミンの OCT1 発現 HEK293 細胞における Uptake volume ratio は, 10 分間のインキュベーション後に 12.0 となり (Figure 2-5B), 用いた細胞において OCT1 の取り込み輸送活性が確認できた。

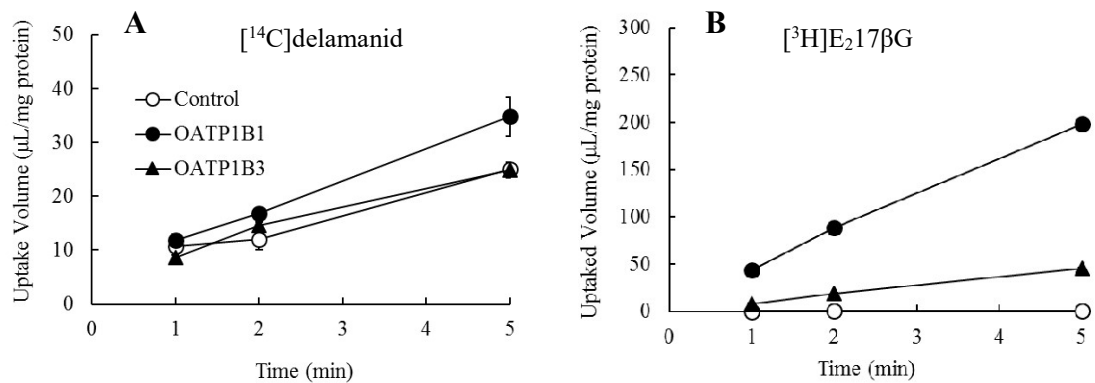


Figure 2-4 Time profiles of  $[^{14}\text{C}]$ delamanid uptake into control HEK293 cells (open symbols) and OATP-expressing HEK293 cells (closed symbols).  $[^{14}\text{C}]$ delamanid (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (A) or  $[^3\text{H}]$ E<sub>2</sub>17 $\beta$ G (0.05  $\mu\text{mol/L}$ ) (B).

Circles, OATP1B1; triangles, OATP1B3. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD from triplicate determinations.

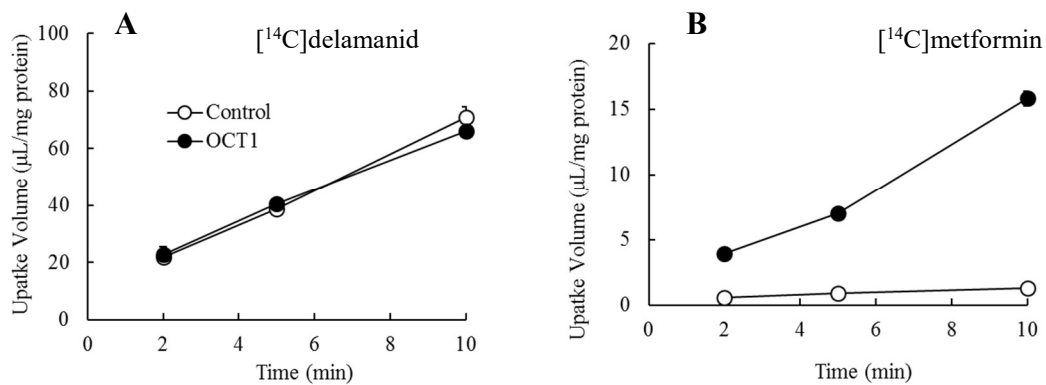


Figure 2-5 Time profiles of  $[^{14}\text{C}]$ delamanid uptake into control HEK293 cells (open symbols) and OCT1-expressing HEK293 cells (closed symbols).  $[^{14}\text{C}]$ delamanid (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (A) or  $[^{14}\text{C}]$ metformin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) (B).

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD from triplicate determinations.

### 第3項 P-gp および BCRP に対する阻害性

P-gp または BCRP 発現 LLC-PK1 細胞において、デラマニドは 5  $\mu\text{mol/L}$  まで P-gp 基質である $^3\text{H}$ ジゴキシンまたは BCRP 基質である $^3\text{H}$ プラゾシンの輸送活性 (apical 側から basal 側または basal 側から apical 側への Permeation clearance および Net flux ratio) に対して影響を与えず、残存活性に影響を及ぼさなかった (Table 2-1)。デラマニドの P-gp および BCRP に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $> 5 \mu\text{mol/L}$  であった。P-gp 阻害剤であるベラパミルおよび BCRP 阻害剤である Ko143 は、 $^3\text{H}$ ジゴキシンおよび $^3\text{H}$ プラゾシンの輸送活性に影響を与え、残存活性が 14.2% および 17.3% であり、明らかな阻害作用が認められた。

Table 2-1 Inhibitory effects of delamanid on P-gp and BCRP-mediated transports of  $^3\text{H}$ digoxin and  $^3\text{H}$ prazosin

Delamanid Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	P-gp-mediated transport		BCRP-mediated transport	
	% of remaining	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	% of remaining	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
0.03	106.0	$> 5$	—	$> 5$
0.1	119.1		82.7	
0.3	99.0		74.7	
1	123.4		93.3	
3	109.2		80.0	
5	129.2		86.7	
Inhibitor <sup>a</sup>	14.2	— <sup>b</sup>	17.3	—

The transport of  $^3\text{H}$ digoxin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) and  $^3\text{H}$ prazosin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) was determined after incubation at 37°C for 2 and 1 h, respectively. At 0  $\mu\text{mol/L}$ , the ratio of transport from the basal to the apical side to the transport from the apical to the basal side was as follows (the data represent the ratio for transporter-expressing LLC-PK1 cells/the ratio for transporter-nonexpressing LLC-PK1 cells): 13.1/1.4 for P-gp-mediated transport and 8.2/1.1 for BCRP-mediated transport. The values of percent remaining are the ratio of net transport in the presence of inhibitor to that in the absence of inhibitor (concentration, 0  $\mu\text{mol/L}$ ). Each value represents the ratio of the mean permeation rate obtained from triplicate determinations.

<sup>a</sup> The inhibitors were verapamil at 30  $\mu\text{mol/L}$  for P-gp-mediated transport and Ko143 at 1  $\mu\text{mol/L}$  for BCRP-mediated transport. <sup>b</sup> —, not applicable.

#### 第4項 OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1 および OCT2 に対する阻害性

OATP1B1 または OATP1B3 発現 HEK293 細胞において、デラマニドは 5  $\mu\text{mol/L}$  までこれらの基質である $[\text{^3H}]\text{E}_2\beta 17\text{G}$ の取り込み活性(Uptake volume および Uptake volume ratio)に対して影響を与えず、残存活性に影響を及ぼさなかった (Table 2-2)。デラマニドの OATP1B1 および OATP1B3 に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $> 5 \mu\text{mol/L}$  であった。OATP1B1 および OATP1B3 阻害剤であるリファンピシンは、 $[\text{^3H}]\text{E}_2\beta 17\text{G}$ の取り込み活性に対して影響を与え、残存活性が 2.9%および 0.8%であり、明らかな阻害作用が認められた。OAT1 または OAT3 発現  $\text{S}_2$ 細胞において、デラマニドは 5  $\mu\text{mol/L}$  まで OAT1 または OAT3 の基質である $[\text{^3H}]\text{PAH}$  または $[\text{^3H}]\text{E}_3\text{S}$ の取り込み活性に対して影響を与えず、残存活性に影響を及ぼさなかった (Table 2-3)。デラマニドの OAT1 および OAT3 に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $> 5 \mu\text{mol/L}$  であった。OAT1 および OAT3 阻害剤であるプロベネシドは、 $[\text{^3H}]\text{PAH}$  または $[\text{^3H}]\text{E}_3\text{S}$ の取り込み活性に対して影響を与え、残存活性が 5.9%および 6.5%であり、明らかな阻害作用が認められた。OCT1 または OCT2 発現 HEK293 細胞において、デラマニドは 5  $\mu\text{mol/L}$  まで OCT1 または OCT2 の基質である $[\text{^{14}C}]\text{メトホルミン}$ の取り込み活性に対して影響を与えず、残存活性に影響を及ぼさなかった (Table 2-4)。デラマニドの OCT1 および OCT2 に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $> 5 \mu\text{mol/L}$  であった。OCT1 および OCT2 阻害剤であるキニジンは、 $[\text{^{14}C}]\text{メトホルミン}$ の取り込み活性に対して影響を与え、残存活性が 2.0%および 1.3%であり、明らかな阻害作用が認められた。



Table 2-2 Inhibitory effects of delamanid on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17βG

Delamanid Concentration (μmol/L)	OATP1B1-mediated uptake		OATP1B3-mediated uptake	
	% of remaining	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	% of remaining	IC <sub>50</sub> (μmol/L)
0.03	— <sup>b</sup>	> 5	—	> 5
0.1	94.9		98.9	
0.3	105.6		102.0	
1	97.0		102.1	
3	102.1		97.3	
5	104.9		100.7	
Inhibitor <sup>a</sup>	2.9	—	0.8	—

The uptake volume of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17βG (50 μmol/L) in transporter-nonexpressing cells ranged from 0.501 ± 0.115 to 0.969 ± 0.228 μL/mg protein/2 min (for both the OATP1B1 and OATP1B3 controls). The OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake volumes of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17βG in transporter-expressing HEK293 cells minus the corresponding values in transporter-nonexpressing control HEK293 cells were 140 ± 2 μL/mg protein/2 min for OATP1B1-expressing cells and 15.5 ± 1.0 μL/mg protein/2 min for OATP1B3-expressing cells. The uptake volumes are the means ± SDs from triplicate determinations. The uptake as the percent remaining is the ratio of the transporter-mediated uptake volume in the presence of inhibitor to that in the absence of inhibitor (concentration, 0 μmol/L) and is expressed as the mean ± SD from triplicate determinations.

<sup>a</sup> The inhibitor was rifampin at 10 μmol/L. <sup>b</sup> —, not applicable.

Table 2-3 Inhibitory effects of delamanid on OAT1-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]PAH and OAT3-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]E3S

Delamanid Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	OAT1-mediated uptake		OAT3-mediated uptake	
	% of remaining	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	% of remaining	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )
0.03	— <sup>b</sup>	> 5	—	> 5
0.1	91.2		116.3	
0.3	90.8		112.3	
1	79.6		107.8	
3	81.3		105.4	
5	75.9		114.7	
Inhibitor <sup>a</sup>	5.9	—	6.5	—

In transporter-nonexpressing control S<sub>2</sub> cells, the uptake volume of [<sup>3</sup>H]PAH (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ranged from  $0.636 \pm 0.095$  to  $0.947 \pm 0.141$   $\mu\text{L/mg protein/2 min}$  and that of [<sup>3</sup>H]E3S (50  $\text{nmol/L}$ ) ranged from  $0.874 \pm 0.155$  to  $2.20 \pm 0.37$   $\mu\text{L/mg protein/2 min}$ . The OAT1- and OAT3-mediated uptake volumes of [<sup>3</sup>H]PAH and [<sup>3</sup>H]E3S are the uptake volumes in transporter-expressing cells minus the uptake volumes in the corresponding transporter-nonexpressing cells and were  $51.2 \pm 4.2$   $\mu\text{L/mg protein/2 min}$  for OAT1-expressing cells and  $30.5 \pm 0.2$   $\mu\text{L/mg protein/2 min}$  for OAT3-expressing cells. The uptake volumes are the means  $\pm$  SDs from triplicate determinations. The uptake as the percent remaining is the ratio of uptake volume in the presence of an inhibitor to that in the absence of the inhibitor (concentration, 0  $\mu\text{mol/L}$ ) and is expressed as the mean  $\pm$  SD from triplicate determinations.

<sup>a</sup> The inhibitor was probenecid at 100  $\mu\text{mol/L}$ . <sup>b</sup> —, not applicable.

Table 2-4 Inhibitory effects of delamanid on OCT1- and OCT2-mediated uptake of [<sup>14</sup>C]metformin

Delamanid Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	OCT1-mediated uptake		OCT2-mediated uptake	
	% of remaining	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	% of remaining	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )
0.03	— <sup>b</sup>	> 5	—	> 5
0.1	101.5		88.1	
0.3	86.9		109.2	
1	99.1		116.5	
3	130.9		107.4	
5	117.4		109.6	
Inhibitor <sup>a</sup>	2.0	—	1.3	—

The uptake volume of [<sup>14</sup>C]metformin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in transporter-nonexpressing control HEK293 cells ranged from  $0.941 \pm 0.046$  to  $1.08 \pm 0.09$   $\mu\text{L/mg protein/5 min}$  for the OCT1 control and from  $0.478 \pm 0.026$  to  $0.564 \pm 0.095$   $\mu\text{L/mg protein/2 min}$  for the OCT2 control. The OCT1- and OCT2-mediated uptake volumes of [<sup>14</sup>C]metformin are the values in transporter-expressing cells minus those in the corresponding control cells and were  $4.67 \pm 0.29$  for OCT1-expressing cells and  $66.3 \pm 3.4$  for OCT2-expressing cells. The uptake volumes are the means  $\pm$  SDs from triplicate determinations. The uptake as the percent remaining is the ratio of the transporter-mediated uptake volume in the presence of inhibitor to that in the absence of inhibitor (concentration, 0  $\mu\text{mol/L}$ ) and is expressed as the mean  $\pm$  SD from triplicate determinations.

<sup>a</sup> The inhibitor was quinidine at 100  $\mu\text{mol/L}$  for OCT1-mediated uptake and quinidine at 300  $\mu\text{mol/L}$  for OCT2-mediated uptake. <sup>b</sup> —, not applicable.

## 第 5 項 BSEP に対する阻害性

BSEP 発現膜ベシクルにおいて、デラマニドは 5  $\mu\text{mol/L}$  まで BSEP の基質である [ $^{14}\text{C}$ ]TCA の取り込み活性に対して影響を与えず、残存活性に影響を及ぼさなかった (Table 2-5)。

デラマニドの BSEP に対する  $\text{IC}_{50}$  は > 5  $\mu\text{mol/L}$  であった。BSEP 阻害剤であるシクロスポリンは、[ $^{14}\text{C}$ ]TCA の取り込み活性に対して影響を与え、残存活性が 11.1% であり、明らかな阻害作用が認められた。

Table 2-5 Inhibitory effects of delamanid on BSEP-mediated uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]TCA

Delamanid Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	BSEP-mediated uptake	
	% of remaining	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
0.03	— <sup>b</sup>	> 5
0.1	95.5	
0.3	100.8	
1	99.0	
3	108.6	
5	95.7	
Inhibitor <sup>a</sup>	11.1	—

The uptake volume of [ $^{14}\text{C}$ ]TCA (2  $\mu\text{mol/L}$ ) in transporter-nonexpressing control vesicles ranged from  $17.1 \pm 5.8$  to  $22.9 \pm 1.8$   $\mu\text{L/mg protein/5 min}$ . The BSEP-mediated uptake volume of [ $^{14}\text{C}$ ]TCA is the value in BSEP-expressing vesicles minus that in BSEP-nonexpressing control vesicles and was  $77.5 \pm 11.2$   $\mu\text{L/mg protein/5 min}$ . The uptake as the percent remaining is the ratio of the uptake volume in the presence of inhibitor to that in the absence of inhibitor (concentration, 0  $\mu\text{mol/L}$ ) and is expressed as the mean  $\pm$  SD from triplicate determinations.

<sup>a</sup> The inhibitor was cyclosporine at 10  $\mu\text{mol/L}$ . <sup>b</sup> —, not tested.

## 第4節 考察

FDA, EMA および MHLW から発出されている DDI ガイダンスおよびガイドラインでは、開発化合物の代謝酵素およびトランスポーターを介した DDI の *in vitro* における検討方法および臨床 DDI 試験実施に関する決定樹が規定されている[11, 12, 13]。結核の治療では多剤併用が標準療法であり、DDI についての知見は特に重要であると考えられる。デラマニドについて、代謝酵素に関する DDI は *in vitro* および *in vivo* で報告されているもののトランスポーターに関する報告はされていなかったため、臨床上重要と考えられているトランスポーターについて検討を行った。DDI ガイダンスおよびガイドラインでは、臨床上重要なトランスポーターとして小腸、肝臓、腎臓および脳に発現している ABC トランスポーターである P-gp/ABCB1 および BCRP/ABCG2, SLC トランスポーターである OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1 および OCT2 等に焦点が当てられている。さらに、肝細胞から胆汁酸塩を輸出する ABC トランスポーター BSEP についての記述もされている。P-gp および BCRP は消化管上皮細胞の頂膜および血液脳関門などに存在し、多様な薬物を認識する。消化管においては管腔内に戻して排泄することで経口吸収を制限し、血液脳関門においては脳実質への移行を制限することが知られている[14, 20]。P-gp や BCRP などの消化管内に発現しているトランスポーターに対する薬物の阻害能を *in vitro* で評価するためには、消化管内腔において上皮細胞の apical 側に存在する薬物の想定最大濃度を考慮する必要がある。被験薬を経口投与するとき、EMA の DDI ガイドラインで推奨されている実験濃度は、最大投与量の 0.1 倍の投与量 / 250 ml とされている[11]。しかし、デラマニドは溶解性が低いため、承認用量である 100 mg は消化管内で完全に溶解しないと考えられる。実際、デラマニドは腸液の pH よりも低い pH1.2 や pH2 の緩衝液にもわずかにしか溶解しない。デラマニドの最大溶解度は pH1.2 における 55  $\mu\text{mol/L}$  から pH2 における 4  $\mu\text{mol/L}$  へと、pH が高くなるにつれて劇的に低下するため、高濃度における実験は溶解度によって制限される。本章にお

る *in vitro* 試験系において、HBSS におけるデラマニドの溶解度は 5  $\mu\text{mol/L}$  以下であった (5  $\mu\text{mol/L}$  よりも高い濃度では析出が認められた)。臨床上想定されるデラマニドの血漿中濃度は、承認用量である 100 mg を 1 日 2 回投与後の定常状態における最高血漿中濃度 ( $C_{\text{max}}$ ) 414 ng/mL (すなわち 0.77  $\mu\text{mol/L}$ ) であった。以上のことから、本章における *in vitro* 阻害性評価実施濃度範囲である 0.03 または 0.1~5  $\mu\text{mol/L}$  は臨床で想定される濃度を反映していると考えられた。また、*in vitro* トランスポーター基質性評価時の透過試験においてはできるだけ低濃度での評価が望ましいが、 $[^{14}\text{C}]$ デラマニドの放射能の測定感度を考慮し、P-gp および BCRP 基質性評価時は 5  $\mu\text{mol/L}$  を設定した。この濃度において、デラマニドは P-gp および BCRP の基質とならず (Fig 2-3A および B)、ジゴキシンの P-gp を介した輸送およびプラゾシンの BCRP を介した輸送に影響を与えなかった (Table 1)。本検討の結果から、デラマニドのヒトにおける体内動態が P-gp および BCRP の阻害剤によって変化する可能性は低く、P-gp および BCRP の基質性を有する薬物の体内動態を変化させる可能性も低いと結論づけた。OATP は肝細胞の細胞膜でアニオン性の有機化合物を、OCT1 はカチオン性の有機化合物を認識し、これらは循環血液から肝臓への基質の取り込みに関与していることが知られている[14, 28, 29]。また、OAT は腎細胞膜上で中性およびアニオン性化合物を、OCT2 はカチオン性化合物を認識し[14, 30]、これらは腎細胞への取り込みと最終的な体外への排泄に重要な役割を果たしている。肝からの消失および腎排泄は、経口投与した薬物の初期過程としての取り込み能力に支配される[28]。したがって、OATP および OCT1 を介した肝臓への取り込み輸送速度は、一般的に基質薬物の肝臓での代謝運命を決定する。本章における研究において、デラマニドは OATP1B1, OATP1B3 および OCT1 の基質ではなく、これらとトランスポーターの取り込みに関与していないことが明らかになった (Figures 2-4 および 2-5)。これらの結果は、デラマニドの肝細胞への取り込みは能動輸送ではなく受動輸送による可能性が高いことを強く示唆している。したがって、強い OATP 阻害能を有し、

抗結核薬として第一選択薬であるリファンピシンと併用しても、デラマニドの肝臓内動態に影響を与えないと予想される。また、デラマニドは尿中に未変化体として排泄されず[31]、腎排泄経路を介した相互作用の可能性は低いと考えられるため、本章における研究では腎取り込みトランスポーターである OAT1、OAT3 および OCT2 の基質認識性については検討していない。

デラマニドは OATP1B1 および OATP1B3 を阻害しなかった (Table 2-2)。したがって、デラマニドが OATP の基質性を有する併用薬の肝取り込みに対する影響は小さいと考えられる。さらに、デラマニドは OAT1、OAT3 および OCT2 を阻害しなかった (Tables 2-3 および 2-4)。これらの結果から、デラマニドは併用薬物にこれらのトランスポーターの基質薬物があった場合の肝および腎取り込みまたは腎排泄に影響を与えないと考えられる。以上の結果から、デラマニドは組織分布に関わる ABC および SLC トランスポーターに関連する DDI をほとんど引き起こさないと予想され、ファーストラインでの使用に適していると考えられる。実際、デラマニドの臨床相互作用試験の情報として、ファーストラインで使用される Rifater (リファンピシン、イソニアジドおよびピラジナミドの合剤) との併用試験結果が報告されている[32]。本試験では、デラマニドはリファンピシン、イソニアジドおよびピラジナミドの薬物動態を変化させなかった。

胆汁酸は、肝取り込みトランスポーターである Na<sup>+</sup>-タウロコール酸共輸送ポリペプチドによって肝細胞内に取り込まれた後、排出トランスポーターBSEPによって胆汁中に分泌されることが知られている[33]。これらフラックスのベクトル和が、胆汁の排泄速度を決定する。BSEPの機能が阻害剤や遺伝子変異によって低下すると、最終的には肝内胆汁うっ滞が起こり、肝毒性を引き起こすことになる。したがって、BSEPによる胆汁酸の輸送は、臨床的に重要な意味を持つことが知られている。本章の研究において、デラマニドはBSEPを阻害しなかったことから、結核の長期治療薬として適していると考えられた。

デラマニドは臨床で想定される濃度より高い 5  $\mu\text{mol/L}$  においても排出系 ABC トランスポーター (P-gp, BCRP および BSEP) および取り込み系 SLC トランスポーター (OATPs, OCTs および OATs) に対して阻害作用を示さなかった。これらの *in vitro* データから、デラマニドは併用される薬物の分布や体内動態を支配するトランスポーターの活性に影響を与えず、DDI を引き起こす可能性は低いことが示唆された。また、デラマニドに P-gp, BCRP, OATP および OCT1 の基質性は認められなかったことから、デラマニドの主な組織分布過程は受動輸送であり、他剤からトランスポーターを介した影響を受けず、DDI を受ける可能性は低いことを示唆している。これらの結果は、複数の抗結核薬および抗 HIV 薬を併用している HIV/AIDS 感染者の結核および MDR-TB 患者にとって重要であると考えられた。



### 第3章 デラマニドの動物における吸収、分布および排泄

#### 第1節 緒言

結核は空気中の結核菌に感染することで一般的には肺に対して病巣を形成するが、リンパの流れに沿って他の臓器にも病巣を形成し肺外結核となる可能性がある。世界的に見ると、2019年には結核の届出症例のうち肺外結核が15%を占めていた[1]。韓国においては、2013年には肺外結核が全結核症例の20.4%を占めていた[3]。年齢、性別、出身地およびヒト免疫不全ウイルス感染は、肺外結核の独立した危険因子と考えられている。肺外結核のうち、頻度の高い罹患部位は、胸膜、リンパ節、消化器、骨・関節、中枢神経、泌尿生殖器であることが報告されている[1, 34, 35]。しかしながら、ほとんどの結核治療薬は結核の最も一般的な病型である肺結核に特化して開発されている。肺外結核の治療を考えると、肺結核の治療に有効な薬物は肺外の感染部位に到達すれば有効であるという仮定に基づき、通常、肺結核に関連するデータから外挿されることがある[34]。例えば、リファンピシン、イソニアジド、ピラジナミド、プロピオンアミド、エチオナミド、フルオロキノロン系薬（レボフロキサシンおよびモキシフロキサシン）は、脳脊髄液へ移行することが報告されている[35]。高用量のリファンピシンとモキシフロキサシンの静脈内投与の併用による第2相臨床試験では、脳脊髄液への曝露量が増加し、結核性髄膜炎患者の生存率の向上につながったと報告されている[36]。したがって、肺外結核の治療のために肺結核用に開発された抗結核薬を適用する際には、肺外結核における標的組織への薬物分布を考慮することが重要であると考えられる。

デラマニドの薬物動態特性については、これまでに複数報告されている[4, 7, 8, 9]。マウスにデラマニドを単回経口投与後、肺におけるデラマニド濃度は血漿中濃度の約3倍であった[9]。この結果から、デラマニドは経口投与後にターゲット組織である肺に移行することが示唆される。しかし、デラマニドの肺外組織への分布やその排泄経路に関する情報はほとんど報告されていない。そこで本章では、i) デラマニドをマウ

ス、ラットおよびイヌに静脈内投与後の薬物動態特性の評価と、ii) [<sup>14</sup>C]デラマニドを雌雄ラットに単回経口投与後の吸収、各組織への分布および排泄特性の検討を目的に *in vivo* 試験を実施した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 試験材料

デラマニドおよび内標準物質は、大塚製薬株式会社（東京，日本）で合成されたものを使用した。 [<sup>14</sup>C]デラマニドは Quotient Bioresearch（Cardiff, United Kingdom）により合成されたものを使用した (Figure 2-2)。その他の化学物質はすべて市販のものを使用した。

### 第2項 動物

5 週齢の雄性 ICR マウスを日本エスエルシー株式会社（静岡，日本）より購入した。5 週齢の雄性または雌性 Sprague-Dawley ラットおよび胆管カニュレーション手術が施された 7 および 10 週齢の雄性および雌性ラットは日本チャールズリバー株式会社（神奈川県，日本）より購入した。6 ヶ月齢の雄性ビーグル犬は Covance Research Products, Inc.（Cumberland, VA）から購入した。動物は温度，湿度，照明サイクル，換気回数が管理された施設で一定期間飼育した後，実験に使用した。非絶食条件下では飼料および水を自由摂取させた。絶食条件下では水を自由摂取させ，投与前日の夕方から投与 12 時間の採血終了後まで絶食させた。すべての動物実験は大塚製薬株式会社動物実験指針に基づき，社内動物実験委員会の審査および承認を経て行われた。

### 第3項 マウス, ラットおよびイヌにおけるデラマニド単回静脈内投与後の 血漿中動態評価

デラマニドは実験当日にジメチルスルホキシドに溶解し, マウス, ラットおよびイヌにそれぞれ 3 mg/1.5 mL/kg, 3 mg/0.5 mL/kg および 3 mg/0.1 mL/kg で静脈内投与した。血液は, マウスでは投与後 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 32 および 48 時間後に, ラットでは投与後 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 32, 48, 72 および 96 時間後に, イヌでは投与後 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 32, 48, 72 および 96 時間後にヘパリン処理した注射筒を用いて採血した (各時点でマウスおよびラットは n=3, イヌは n=4)。血液は 4°C で 1870 g, 10 分間遠心分離 (05PR-22, HITACHI, 日本) し, 血漿を得た。血漿は高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で分析するまで, すべて -20°C で保存した。

### 第4項 ラットにおける [<sup>14</sup>C] デラマニド単回経口投与後与の血液および 血漿中動態評価

[<sup>14</sup>C] デラマニドは 5% アラビアゴム溶液に懸濁し, 3 mg/5 mL/kg (4.25-6.25 MBq/5 mL/kg) で雄性および雌性ラットに経口投与した (各 n=3)。経口投与後 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間後に尾静脈からヘパリン処理した注射筒を用いて血液を採取した。血液 0.05 mL にバイオメリット専用組織溶解液 (ナカライテスク株式会社) 1 mL を添加し, バイオメリット組織溶解装置 (第一化学薬品株式会社) を用いて 50°C で約 30 分間超音波処理後, Hionic-Fluor 16 mL を添加, 混合し, 放射能計測用試料とした。

## 第5項 ラットにおける<sup>14</sup>C]デラマニド単回経口投与後の組織分布性評価

[<sup>14</sup>C]デラマニドを3 mg/kg で雄性および雌性ラットに経口投与した (各 n=3)。経口投与後 2, 8, 24, 72, 168 時間後に麻酔下でラットの下大静脈からヘパリン処理した注射筒を用いて採血した。血液の一部はキャピラリーチューブ (テルモ株式会社) を用いて 15000 g で 5 分間遠心分離 (CT12, HITACHI, 日本) した後ヘマトクリット値 ( $H_t$ ) を測定した。さらに残りの血液の一部を 4°C で 1870 g, 10 分間遠心分離して血漿を得た。上述の各時点においてラットの組織 (大脳, 小脳, 延髄, 下垂体, 眼球, ハーダー腺, 顎下腺, 甲状腺, 気管, 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 胃, 小腸, 大腸, 副腎, 腎臓, 精囊 [雄のみ], 精巣 [雄のみ], 卵巣 [雌のみ], 子宮 [雌のみ], 褐色脂肪, 脂肪, 筋肉, 皮膚, 大腿骨, 骨髄, リンパ節) を採取した。血液および組織サンプルは第4項と同様の方法で処理し, 放射能計測用試料とした。血漿サンプルは水 1 mL と液体シンチレーションカクテル ACS II (Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire, UK) 10 mL を加え, 放射能計測用試料とした。血球中の放射能の分布である血球移行率 (%) を以下の式を用いて算出した。

$$\text{血球移行率 (\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{\text{血漿中放射能濃度}}{\text{血液中放射能濃度}} \right) \times \left[ \frac{(100 - H_t)}{100} \right] \right\} \times 100$$

## 第6項 ラットにおける<sup>14</sup>C]デラマニド単回経口投与後の尿および糞中への排泄評価

[<sup>14</sup>C]デラマニドを3 mg/kg で雄性および雌性ラットに経口投与後, 個体別に代謝ケージ (メタボリカ, 株式会社杉山元医理器) に収容した (各 n=3)。尿と糞は投与後 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, 144-168 時間の区間毎に採取した。区間毎の排せ尿量を測定した後, 尿 1 mL を ACS II 10 mL に加え, 放射能計測用試料とした。区間毎の糞重量を測定し, 水を加えてホモジネートした後, 一部を採取し第4項と同様の方法で処理

し，放射能計測用試料とした。

#### 第7項 ラットにおける<sup>[14C]</sup>デラマニド単回経口投与後の胆汁および尿中への排泄評価

胆管カニュレーション手術が施された雄性および雌性ラットに<sup>[14C]</sup>デラマニドを 3 mg/kg で経口投与後，個体別に代謝ケージに収容した（各 n=3）。胆汁は投与後 0-4, 4-8, 8-24, 24-32, 32-48, 48-56, 56-72 時間の区間毎に，尿は投与後 0-24, 24-48, 48-72 時間の区間毎に採取した。区間毎の排泄胆汁および尿量を測定し，胆汁 0.1 mL または尿 0.5 mL のサンプルに水 1 mL を加え，第4項と同様の方法で処理し，放射能計測用試料とした。

#### 第8項 ラットにおける<sup>[14C]</sup>デラマニド単回経口投与後の腸肝循環評価

胆管カニュレーション手術が施された雄ラットに<sup>[14C]</sup>デラマニドを 3 mg/kg で経口投与後，8-24 時間の間に得られた胆汁サンプル 1 mL を胆管にカニュレーションを施した別の雄ラットの十二指腸に投与した（n=3）。投与後のラットは個体別に代謝ケージに収容した。胆汁は十二指腸に投与後 0-4, 4-8, 8-24, 24-32, 32-48, 48-56, 56-72 時間の区間毎に，尿は 0-24, 24-48, 48-72 時間の区間毎に採取した。区間毎の排泄胆汁および尿量を測定し，胆汁 0.1 mL または尿 0.5 mL のサンプルに水 1 mL を加え，第4項と同様の方法で処理し，放射能計測用試料とした。

## 第9項 LC-MS/MSを用いた血漿中デラマニドの定量

血漿中デラマニドの定量は、バリデートされた方法で LC-MS/MS を用いて行った。LC は Waters HPLC system (Waters, Milford, MA) および MS/MS は TSQ-7000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., San Jose, CA) を用いた。以下に LC-MS/MS の条件を示した。

HPLC conditions :

Column : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG (3 μm, 2.0 mmID×50 mm, Shiseido Co., Ltd.)

Analytical mobile phase : A: Water / formic acid (100/0.2, v/v)

B: Methanol / formic acid (100/0.2, v/v)

Flow rate : 0.25 mL/min

Gradient condition :

<u>Time (min)</u>	<u>A(%)</u>	<u>B(%)</u>	<u>curve</u>
Initial	70	30	-
1.00	10	90	Linear gradient
8.00	10	90	-
8.01	70	30	-
<u>15.00</u>	<u>70</u>	<u>30</u>	<u>Stop</u>

Column temperature : ambient

Autosampler temperature : 4°C

Injection volume : 10 μL

MS/MS conditions :

Ionization method : Electrospray ionization (ESI)

ESI spray voltage : 4.5 kV

Ionization mode : Positive

Electron multiplier voltage : 1.4 kV

Sheath gas pressure : 70 psi (N<sub>2</sub>)

Auxiliary gas flow rate : 10 units (N<sub>2</sub>)

Capillary temperature : 240°C

Collision gas pressure : ca 2.0 mTorr (Argon)

デラマニド定量時のモニターイオンは  $m/z$  535.2 (Precursor ion) および  $m/z$  352 (Product ion) とし、データ取得および処理は Xcalibur ソフトウェア (Version 1.2, Thermo Fisher Scientific Inc) を用いた。血漿サンプル中のデラマニド濃度の定量下限値から定量上限値の範囲は、ラットとイヌではそれぞれ 3~500 ng/mL, マウスでは 6~1000 ng/mL であった。

## 第10項 放射能計測

液体シンチレーションカウンター (LSC-3500, アロカ株式会社, 東京) を用いて、各試料中の放射能を計測した。計数効率、外部標準線源法により補正した。放射能の検出限界は、バックグラウンド放射能の 2 倍とした。測定した放射能は [<sup>14</sup>C]デラマニドの量として表した。

## 第 11 項 データ解析

薬物動態パラメータは、Phoenix WinNonlin version 4.0.1 (Pharsight, a Certara company, Princeton, NJ, USA) を使用して、マウスとラットにおいてはサンプリング時間あたりの平均血漿中濃度から、イヌにおいては個体別の血漿中濃度からノンコンパートメントモデル解析により求めた。

### 第3節 結果

#### 第1項 マウス、ラットおよびイヌにおけるデラマニド単回静脈内投与後の 血漿中動態

マウス、ラットおよびイヌにデラマニドを 3 mg/kg で単回静脈内投与後のデラマニドの血漿中濃度推移および薬物動態パラメータを Figure 3-1 および Table 3-1 に示した。CL は小さく  $V_{ss}$  は大きかった。動物種による顕著な違いは認められなかった。

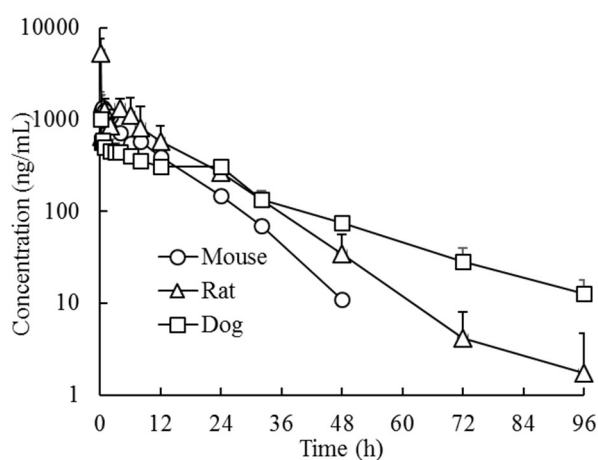


Figure 3-1 Plasma concentrations of delamanid after intravenous administration of a single dose of delamanid (3 mg/kg) in mice, rats, and dogs.

Values represent the mean + standard deviation of three mice and rats and four dogs.

Table 3-1 Pharmacokinetic parameters of delamanid after a single intravenous administration in mice, rats, and dogs

Parameter <sup>a</sup>		Value for		
		Mouse	Rat	Dog
Dose	(mg/kg)	3	3	3
$C_0$	(ng/mL)	1198.9	13923.4	1320.6
$AUC_t$	(ng · h/mL)	13388	21551	13822
$AUC_{\infty}$	(ng · h/mL)	13491	21566	14140
$t_{1/2}$	(h)	6.3	9.2	17.6
CL	(mL/min/kg)	3.7	2.3	3.6
$V_{ss}$	(L/kg)	2.3	1.7	5.3
MRT	(h)	10.5	12.5	24.5

Values are the mean of n = 3 (mouse and rat) and n = 4 (dog).

<sup>a</sup>  $C_0$ , predose concentration;  $AUC_t$ , area under the curve to the last data point.



## 第2項 ラットにおける<sup>14</sup>C]デラマニド単回経口投与後の血液および血漿中 動態

[<sup>14</sup>C]デラマニドを経口投与後の血中放射能濃度推移および薬物動態パラメータをFigure 3-2およびTable 3-2に示した。非絶食条件下の雄性ラットでは、投与後8.0 hに血中C<sub>max</sub> 581.8 ng equivalent/mL (ng eq/mL) に達し、その後緩やかに減少した (半減期 [t<sub>1/2</sub>]= 82.3 h)。絶食条件下の雄性ラットでは、投与後6.3 hに血中C<sub>max</sub> 735.1 ng eq/mLに達し、その後緩やかに減少した (t<sub>1/2</sub>=49.5 h)。AUC<sub>0-168 h</sub>およびAUC<sub>0-∞</sub>の値は、非絶食条件下の雄性ラットではそれぞれ19.4および22.8 μg eq·h/mL, 絶食条件下の雄性ラットではそれぞれ19.6および20.9 μg eq·h/mLであった。同様に、非絶食条件下の雌性ラットの血液中C<sub>max</sub>は、投与後8.0 hで643.0 ng eq/mLに達し、その後緩やかに減少した (t<sub>1/2</sub>=57.2 h)。非絶食条件下の雌性ラットでは、投与後5.0時間に血中C<sub>max</sub>が814.9 ng eq/mLに達し、その後緩やかに減少した (t<sub>1/2</sub>=59.8 h)。AUC<sub>0-168 h</sub>およびAUC<sub>0-∞</sub>の値は、非絶食条件下の雌性ラットではそれぞれ20.3および22.3 μg eq·h/mL, 絶食条件下の雌性ラットでは19.7および21.3 μg eq·h/mLであった。食餌条件および性別により、血中動態特性に顕著な差は認められなかった。

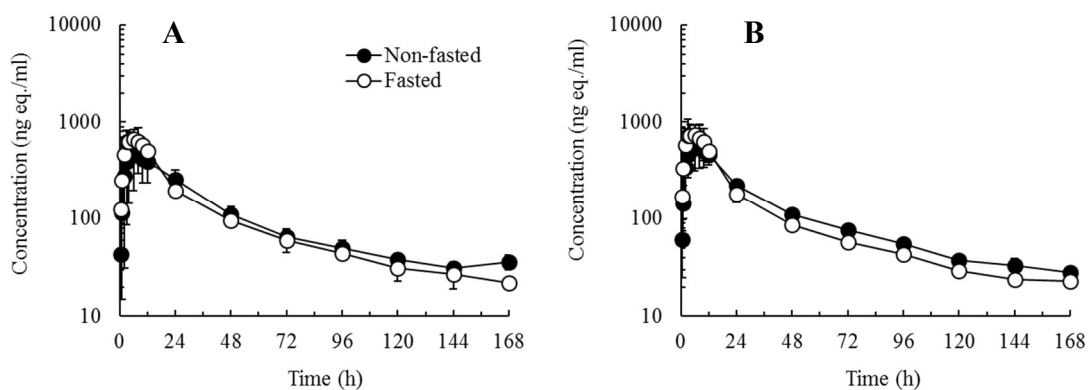


Figure 3-2 Blood radioactivity concentrations after oral administration of a single dose of [<sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg) in male (A) and female (B) rats. The values represent the mean ± SD of three rats.

Table 3-2 Pharmacokinetic parameters of radioactivity in blood after a single oral administration of [<sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg) in rats

Gender	Feeding	t <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng eq/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-168 h</sub> (µg eq-h/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (µg eq-h/mL)
Male	Non-fasted	8.0 ± 0.0	581.8 ± 284.8	82.3 ± 17.1	19.4 ± 5.1	22.8 ± 5.1
Male	Fasted	6.3 ± 3.5	735.1 ± 96.2	49.5 ± 1.9	19.6 ± 1.4	20.9 ± 1.5
Female	Non-fasted	8.0 ± 0.0	643.0 ± 306.9	57.2 ± 3.7	20.3 ± 2.7	22.3 ± 2.8
Female	Fasted	5.0 ± 1.7	814.9 ± 283.3	59.8 ± 7.3	19.7 ± 4.0	21.3 ± 3.7

The values represent the mean ± SD of three rats.

### 第3項 ラットにおける<sup>14</sup>C]デラマニド単回経口投与後の組織分布性

[<sup>14</sup>C]デラマニドを経口投与後の血中，血漿中および組織中放射能濃度をTable 3-2およびTable 3-3に示した。雌雄ラットの大部分の組織における放射能濃度は，投与後8時間または24時間でピークに達した。血漿と比較して，投与8時間後には眼球と大腿骨を除くすべての組織で放射能濃度が高かった。放射能濃度が最も高かったのは肝臓で，次いで副腎，ハーダー腺，褐色脂肪，脾臓，腎臓，脂肪組織であった。また，脳と肺にも放射能の分布が認められた。肺における放射能のC<sub>max</sub>は，血漿C<sub>max</sub>の2.8倍から5.2倍であった。放射能の分布パターンに顕著な性差は認められなかった。投与2時間後の放射能の血球移行率は，雌雄ラットともに低かった（それぞれ4%および10%）。しかし，投与168時間後には，放射能の血球移行率はそれぞれ76%および60%に増加した。

Table 3-3 Radioactivity concentrations in various tissues after a single oral administration of [<sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg) in male rats

Tissue	Radioactivity concentration (ng eq/g or ml)				
	2 h	8 h	24 h	72 h	168 h
Blood	283.3 ± 37.4	403.0 ± 103.3	196.1 ± 30.7	52.5 ± 5.7	18.5 ± 2.8
Plasma	430.7 ± 65.4	552.9 ± 172.3	244.9 ± 30.3	43.3 ± 7.7	7.1 ± 1.5
Cerebrum	482.6 ± 50.2	1225.6 ± 428.0	588.5 ± 88.5	216.4 ± 24.9	185.2 ± 22.4
Cerebellum	505.2 ± 122.1	1276.9 ± 409.5	777.3 ± 46.5	314.9 ± 36.0	219.7 ± 53.9
Medulla oblongata	568.7 ± 103.4	1669.9 ± 511.8	1175.3 ± 271.0	544.0 ± 65.5	348.7 ± 48.9
Hypophysis	1594.8 ± 720.8	1892.4 ± 959.0	1504.6 ± 334.3	497.6 ± 77.4	194.4 ± 31.2
Eyeball	144.2 ± 35.2	264.0 ± 95.1	132.1 ± 9.3	60.1 ± 9.4	29.9 ± 5.7
Harder's gland	1086.2 ± 191.3	2910.1 ± 973.2	1794.4 ± 83.3	572.1 ± 38.4	175.8 ± 26.5
Submaxillary gland	959.2 ± 199.2	1551.1 ± 519.4	665.1 ± 69.0	179.2 ± 21.0	71.8 ± 14.6
Thyroid gland	807.0 ± 232.5	1487.5 ± 543.8	634.3 ± 87.1	292.4 ± 145.3	126.9 ± 26.9
Trachea	1002.9 ± 668.2	849.4 ± 200.1	448.2 ± 127.2	256.7 ± 40.4	86.7 ± 31.7
Thymus	361.3 ± 21.3	804.1 ± 249.9	527.5 ± 68.8	154.3 ± 43.6	45.7 ± 10.4
Heart	815.1 ± 102.3	1365.2 ± 493.2	518.1 ± 35.6	211.8 ± 8.4	119.2 ± 8.0
Lung	816.5 ± 145.7	1563.2 ± 420.9	833.3 ± 74.2	183.3 ± 26.6	88.2 ± 4.0
Liver	2751.2 ± 546.4	5193.7 ± 1446.3	2747.3 ± 286.3	1056.5 ± 252.0	354.5 ± 68.5
Pancreas	1231.0 ± 193.7	2087.6 ± 777.9	1113.0 ± 484.4	213.8 ± 30.4	92.2 ± 12.6
Spleen	469.1 ± 97.6	1072.6 ± 308.8	652.6 ± 97.9	196.7 ± 20.1	91.4 ± 25.2
Stomach	2165.2 ± 1797	1081.5 ± 465.9	372.4 ± 27.0	135.9 ± 16.7	82.3 ± 41.1
Small intestine	2545.4 ± 460.9	1451.2 ± 432.0	428.5 ± 48.0	93.3 ± 23.3	45.2 ± 24.9
Large intestine	448.0 ± 149.9	1238.1 ± 437.9	399.2 ± 66.8	99.8 ± 26.6	60.1 ± 32.9
Adrenal gland	1369.3 ± 209.0	3232.9 ± 849.4	2550.9 ± 327.9	1199.2 ± 366.2	555.5 ± 152.6
Kidney	1145.6 ± 262.9	2033.9 ± 669.8	1258.3 ± 197.7	531.8 ± 21.5	301.0 ± 31.5
Seminal vesicle	354.1 ± 109.7	711.8 ± 297.6	463.6 ± 57.6	140.3 ± 24.1	57.8 ± 14.2
Testis	224.0 ± 34.0	615.0 ± 224.2	428.6 ± 25.0	266.9 ± 29.4	215.2 ± 35.7
Brown fat	1608.6 ± 463.7	2395.2 ± 807.4	702.1 ± 51.5	199.5 ± 20.0	119.2 ± 22.9
Fat	845.9 ± 365.4	1999.1 ± 903.9	397.6 ± 27.7	36.4 ± 1.7	20.3 ± 10.5
Muscle	425.4 ± 33.5	860.2 ± 249.6	340.6 ± 42.0	132.4 ± 10.9	82.4 ± 25.4
Skin	486.9 ± 123.9	973.8 ± 124.3	404.9 ± 44.0	125.7 ± 25.3	68.9 ± 20.8
Femur	188.9 ± 69.2	457.3 ± 130.4	124.0 ± 51.1	38.6 ± 8.7	40.5 ± 12.0
Bone marrow	526.2 ± 116.8	983.3 ± 213.6	647.9 ± 114.2	135.0 ± 7.0	60.2 ± 27.0
Lymph node	644.2 ± 194.4	1390.3 ± 325.0	655.6 ± 104.3	122.7 ± 9.7	111.9 ± 57.3
H <sub>i</sub> (%)	37 ± 1	36 ± 2	38 ± 1	38 ± 1	38 ± 0
Transfer ratio (%) <sup>a</sup>	4 ± 7	13 ± 4	22 ± 8	49 ± 4	76 ± 3

The values represent the mean ± SD of three rats.

<sup>a</sup> Transfer ratio (%) of radioactivity into blood cells.

Table 3-4. Radioactivity concentrations after a single oral administration of [<sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg) in female rats

Tissue	Radioactivity concentration (ng eq/g or mL)				
	2 h	8 h	24 h	72 h	168 h
Blood	319.6 ± 141.8	294.0 ± 77.4	185.2 ± 42.9	83.8 ± 43.4	47.4 ± 27.1
Plasma	463.6 ± 218.8	416.3 ± 104.3	273.3 ± 61.9	96.9 ± 60.7	34.2 ± 30.7
Cerebrum	565.7 ± 152.9	1052.1 ± 168.5	575.2 ± 325.8	354.4 ± 90.9	187.1 ± 27.9
Cerebellum	606.9 ± 164.7	824.7 ± 339.6	1069.6 ± 111.9	533.7 ± 187.1	403.4 ± 133.2
Medulla oblongata	642.6 ± 156.4	1128.0 ± 535.5	1385.4 ± 195.0	944.1 ± 223.3	702.8 ± 188.8
Hypophysis	1001.8 ± 348.6	1250.9 ± 610.6	1464.7 ± 261.8	441.3 ± 195.6	235.9 ± 127.3
Eyeball	131.8 ± 34.2	164.9 ± 71.0	189.2 ± 10.0	74.7 ± 32.8	51.9 ± 27.1
Harder's gland	1213.9 ± 363.3	1952.3 ± 902.0	2499.6 ± 379.5	981.1 ± 465.7	179.7 ± 133.6
Submaxillary gland	1012.0 ± 275.2	1115.4 ± 456.5	1051.4 ± 140.7	364.0 ± 178.0	203.4 ± 128.4
Thyroid gland	852.3 ± 230.3	1190.3 ± 677.7	776.8 ± 45.7	303.9 ± 126.8	214.1 ± 152.3
Trachea	454.3 ± 183.8	864.3 ± 591.8	504.0 ± 171.9	310.6 ± 187.5	210.9 ± 124.4
Thymus	399.7 ± 102.3	562.2 ± 222.7	821.2 ± 88.5	297.1 ± 189.1	120.7 ± 85.8
Heart	832.9 ± 249.0	891.8 ± 319.6	802.1 ± 177.1	408.3 ± 166.8	302.7 ± 123.4
Lung	845.7 ± 180.4	2184.9 ± 654.3	2113.3 ± 679.1	251.9 ± 30.1	140.4 ± 14.2
Liver	3239.2 ± 856.2	3035.0 ± 850.4	2799.5 ± 283.5	1124.5 ± 455.5	742.7 ± 393.4
Pancreas	1415.7 ± 385.6	1457.8 ± 653.6	1228.2 ± 212.6	419.3 ± 232.3	240.1 ± 145.5
Spleen	536.3 ± 182.1	760.7 ± 336.4	1102.8 ± 84.4	363.1 ± 162.8	260.3 ± 142.2
Stomach	1565.0 ± 661.1	920.8 ± 209.6	522.3 ± 104.2	209.8 ± 109.1	110.3 ± 57.5
Small intestine	3520.7 ± 643.2	846.2 ± 100.4	652.8 ± 126.2	143.4 ± 104.4	87.2 ± 51.4
Large intestine	509.1 ± 222.8	802.7 ± 495.6	520.2 ± 69.8	142.3 ± 59.0	96.7 ± 62.5
Adrenal gland	1539.5 ± 467.9	2365.6 ± 795.0	4234.6 ± 1036.0	2029.2 ± 346.3	1464.8 ± 526.0
Kidney	1322.5 ± 335.7	1419.8 ± 512.4	1713.9 ± 108.4	790.2 ± 360.7	612.1 ± 229.1
Ovary	649.2 ± 188.1	811.9 ± 333.9	1006.6 ± 96.9	418.6 ± 166.2	248.0 ± 156.9
Uterus	438.9 ± 143.8	574.0 ± 209.4	761.1 ± 67.3	307.4 ± 119.6	237.0 ± 131.3
Brown fat	1581.8 ± 409.4	1425.6 ± 283.6	1261.9 ± 348.0	431.5 ± 221.9	266.0 ± 123.0
Fat	1100.6 ± 223.4	1726.7 ± 876.9	1001.2 ± 435.5	167.0 ± 201.7	62.8 ± 65.4
Muscle	567.8 ± 186.0	496.1 ± 214.1	536.7 ± 125.1	272.2 ± 107.0	145.9 ± 51.4
Skin	456.1 ± 151.7	476.9 ± 177.1	476.6 ± 123.5	207.1 ± 116.2	110.4 ± 51.9
Femur	75.7 ± 20.8	123.6 ± 65.6	221.2 ± 117.4	47.1 ± 13.3	22.5 ± 11.7
Bone marrow	435.9 ± 96.1	460.9 ± 140.0	826.8 ± 68.8	228.3 ± 178.0	99.0 ± 73.0
Lymph node	967.2 ± 316.9	926.3 ± 404.1	1157.6 ± 58.3	278.5 ± 155.3	157.8 ± 130.3
H <sub>t</sub> (%)	38 ± 0	38 ± 0	39 ± 1	39 ± 2	38 ± 1
Transfer ratio (%) <sup>a</sup>	10 ± 3	12 ± 6	9 ± 11	32 ± 9	60 ± 13

The values represent the mean ± SD of three rats.

<sup>a</sup> Transfer ratio (%) of radioactivity into blood cells.

#### 第4項 ラットにおける<sup>14</sup>C]デラマニド単回経口投与後与の胆汁，尿および糞中排泄

<sup>14</sup>C]デラマニドを経口投与後の尿中および糞中に排泄された累積放射能を Figure 3-3 に示した。投与後 168 時間以内に尿中および糞中に排泄された放射能は，雄性ラットでは投与量の 6.3%および 91.6%であり，雌性ラットでは投与量の 6.5%および 92.2%であった。尿中および糞中に排泄された総放射能は，雄性ラットで 97.9%，雌性ラットで 98.7%であった。経口投与後 72 時間以内にほとんどの放射能が尿中に排泄され，72 時間から 168 時間までの放射能の排泄は僅かであった。胆管カニュレーション手術が施された雄性および雌性ラットに<sup>14</sup>C]デラマニドを経口投与後の尿中および糞中に排泄された累積放射能を Figure 3-4 に示した。投与後 72 時間以内に胆汁中および尿中に排泄された放射能は，雄性ラットでは投与量の 34.1%および 6.5%であり，雌性ラットでは投与量の 36.9%および 7.6%であった。また，<sup>14</sup>C]デラマニドを経口投与後に収集したラット胆汁の一部を，別の胆管カニュレーション手術が施された雄性ラットの十二指腸内に投与後の胆汁中および尿中に排泄された累積放射能を Figure 3-5 に示した。投与後 72 時間以内に胆汁中および尿中に排泄された放射能は，投与量の 8.5%および 1.9%であり，十二指腸内に投与した放射能の約 10%が再吸収され全身循環に入ることが示された。

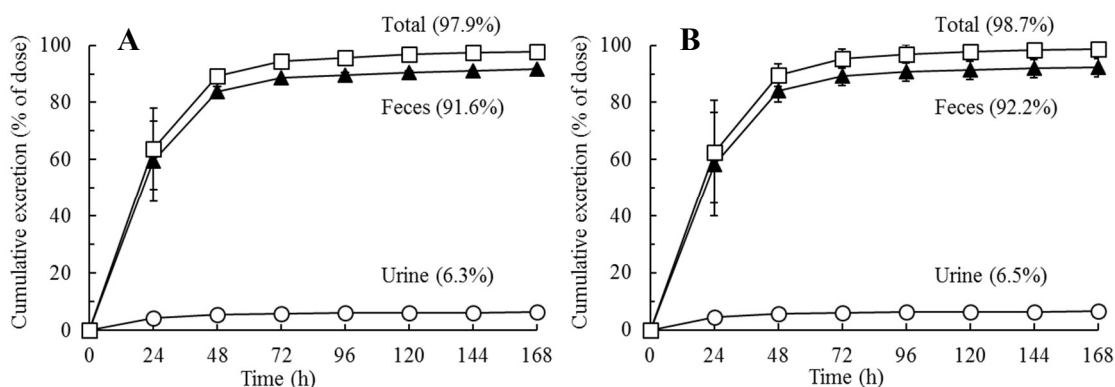


Figure 3-3 Urinary and fecal excretion of radioactivity after oral administration of a single dose of <sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg) in male (A) and female (B) rats. The values represent the mean ± SD of three rats.

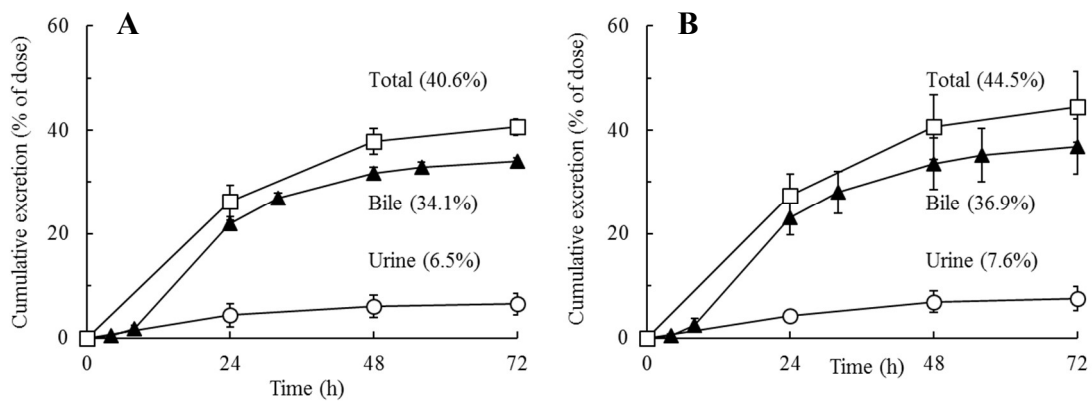


Figure 3-4 Cumulative biliary and urinary excretion of radioactivity after oral administration of a single dose of [<sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg) in male (A) and female (B) rats. The values represent the mean ± SD of three rats.

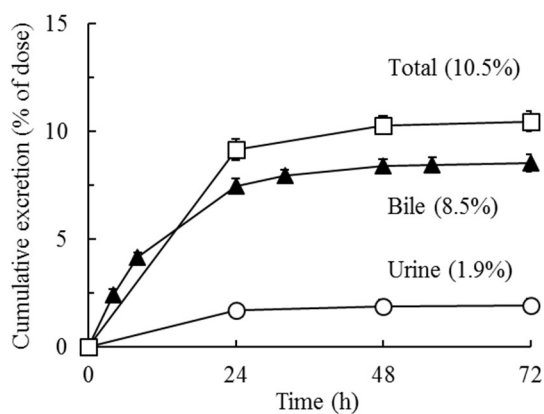


Figure 3-5 Total radioactivity in biliary and urinary excretions from male rats after a single intraduodenal administration of bile obtained from animals treated with a single oral dose of [<sup>14</sup>C]delamanid (3 mg/kg). The values represent the mean ± SD of three rats.

## 第4節 考察

これまでの研究で、慢性肺結核モデルマウスにおいて、デラマニドは用量依存的に結核菌の増殖を抑えることが証明されている[4]。同報告において、デラマニドを 0.625 mg/kg/day の用量で投与したとき、結核菌の生存率は 95%減少した。また、マウスにデラマニドを 3 mg/kg で経口投与したとき、4 時間後に血漿  $C_{max}$  は 431 ng/mL に達し[9]、ヒトにおける承認用量であるデラマニド 100 mg を 1 日 2 回投与したときの曝露 (414 ng/mL) に近い結果が得られた[8]。別の試験では、雄性ラットにデラマニドを 3 mg/kg で単回経口投与後、6 時間で血漿  $C_{max}$  は 493.5 ng/mL に達した[37]。さらに、著者らの先行研究においてデラマニドの血清タンパク結合率が動物とヒトの間で類似していることを報告した[7]。したがって、本章における研究では臨床有効血漿濃度に近いと考えられる 3 mg/kg の投与量を用いた。本検討において、動物におけるデラマニドの重要な薬物動態特性が確認できた。マウス、ラットおよびイヌにデラマニドを静脈内投与後の分布容積がいずれの動物でも大きかったことから、動物種に依らず組織移行性が良好であると考えられた (Table 3-1 および Figure 3-1)。ラットに $^{14}\text{C}$ デラマニドを経口投与したときの放射能の血中動態は、食餌条件または性別によらず類似していた (Table 3-2 および Figure 3-2)。次に、雌雄のラットにおいて、デラマニド由来の放射能は採取したすべての組織に分布しており、血液および肺を含むほとんどすべての組織における放射能曝露は血漿よりも高かった (Tables 3-3 および 3-4)。組織の放射能は時間の経過とともに緩やかに減少したが、投与後 168 時間時点でも検出可能であった。これらの結果から、デラマニド由来の放射能は経口投与後に緩やかに体外に排出されることが明らかとなった。また、血球移行率は時間の経過とともに徐々に増加しており血液中の放射能は血漿に比べて緩やかに消失することが示唆された。大脳、小脳、延髄および眼球に放射能が認められたことから、デラマニドは血液脳関門および血液網膜関門を透過することが示唆された。最終採取時点 (投与後 168 時間) においても、ほとんどの組織の放射能濃度は血漿よりも高かった (Tables 3-3 および 3-4)。さらに、デラマニド投与後のほぼ



全量が投与後 72 時間までに尿および糞中に排泄された (Figure 3-3)。経口投与後のデラマニドに由来する放射能の吸収率は投与量の約 41~45%であった。吸収された放射能の 82%以上が胆汁を介して排泄されることが示唆された (Figure 3-4)。十二指腸投与後の胆汁および尿中に排泄された放射能の合計から、約 10%の放射能が腸肝循環を受けた (Figure 3-5)。放射能の排泄パターンには性別による顕著な差は認められなかった。本章における組織分布データおよび先行研究結果をもとに、デラマニドの肺外結核に対する治療有効性について考察した。ラットに $^{14}\text{C}$ デラマニドを経口投与後の各組織への分布性を評価した結果、血漿および組織中放射能の大部分は、以下のデータからデラマニドの代謝物ではなく、デラマニドに由来するものであると考えられた。 $^{14}\text{C}$ デラマニドを 3 mg/kg でラットに経口投与後の血漿中放射能  $C_{\max}$  は 553 ng eq/mL であり、これは以前の研究で同投与量のデラマニドをマウスに経口投与後の血漿中デラマニド濃度 (493.5 ng/mL) と同等であった[37]。また、ラットに 30 mg/kg のデラマニドを単回経口投与したところ、デラマニドと代謝物の濃度の合計に対するデラマニドの濃度の比は 97%であった[8]。別の検討において、雄性ラットに $^{14}\text{C}$ デラマニド (3 mg/kg) を単回経口投与したときの血漿試料のラジオクロマトグラムにおいて主な成分はデラマニドであった (Figure 3-6)。これらの結果から、ラットの血漿中放射能は主にデラマニドであると考えられた。ラット  $t_{\max}$  における放射能の肺/血漿中濃度比 ( $K_{p, \text{lung}}$ , 2.83-5.25) は、以前の報告におけるマウスの  $K_{p, \text{lung}}$  値 (2.99) と同等であった[9]。これらの結果から、ラット肺における放射能の大部分はデラマニドである可能性が高いと考えられた。別の検討において、雄性ラットの肺ホモジネート中のラジオクロマトグラムにおいて、デラマニドのピークがメインで検出 (全ピークに対して 55.0%) され、次いで M1 が検出された (Figure 3-6)。また、肝臓、大脳、心臓および精巣におけるデラマニドの割合は、それぞれ全ピークに対して 79.2%, 65.1%, 100%および 64.4%であった (Figure 3-6)。これらの結果からも、今回の検討における血漿および組織中放射能の大部分はデラマニドであると考えられた。

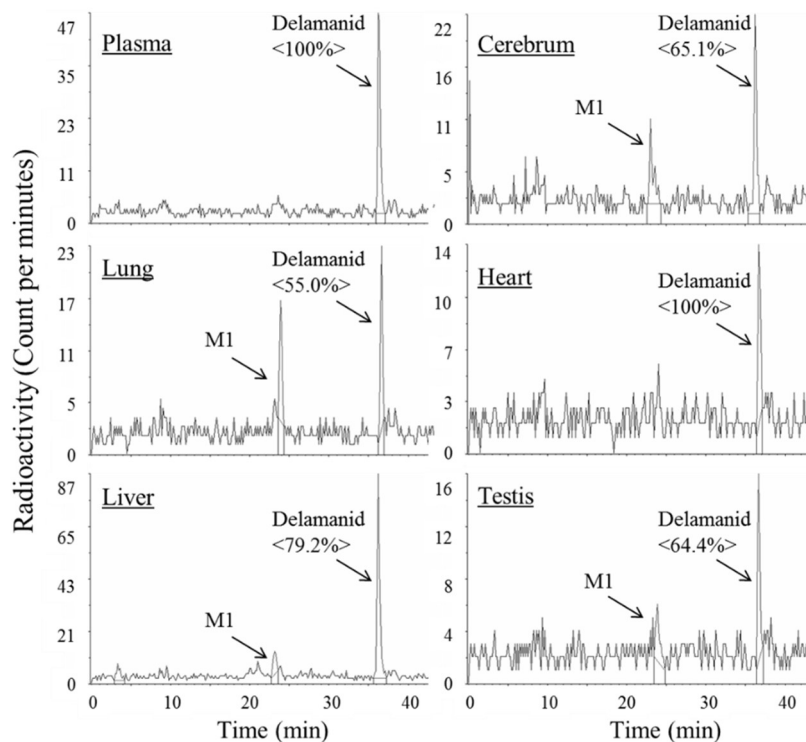


Figure 3-6 Radiochromatography of plasma and typical tissues at 8 hours after oral administration of a single dose of [<sup>14</sup>C]-delamanid (3 mg/kg) in male rats.

The values in parentheses represent the % of total peak area.

非臨床薬効試験において、肺外結核に対するデラマニドの強い薬理効果を示唆する報告がある[38]。この報告では、BALB/c マウスの肝臓、脾臓、肺に複数種類の結核菌株を感染させたモデルに対して、デラマニドは 0.03125 mg/body weight (約 1.625 mg/kg) 以上の用量で、MDR-TB コロニーを 99%以上減少させた。このデータは、デラマニドがあらゆるタイプの MDR-TB および感受性結核を減少させることを示唆しており、デラマニドの肺外結核に対する活性を裏付ける結果であった。マウスにデラマニドを 3 mg/kg で単回経口投与したときの  $t_{max}$  における肺内濃度は 1287 ng/g であった[9]。このデータをもとに、デラマニドを 0.625 mg/kg (肺結核に対する有効用量) で投与した場合の肺内濃度は 268 ng/g と推定され、これは結核治療に有効な組織中濃度であると考えられた。今回の検討において、[<sup>14</sup>C]デラマニドを 3 mg/kg でラットに経口投与したときの  $t_{max}$  に

における肺内放射能濃度と、ラジオクロマトグラムにおけるデラマニドの割合（55.0%）から算出したデラマニドの肺内濃度は、雄性ラットで 860 ng/g および雌性ラットで 1202 ng/g であった。さらに、デラマニドを 0.625 mg/kg の用量で投与した場合のデラマニドの肺内濃度は雄性ラットで 179 ng/g、雌性ラットで 250 ng/g と推定され、これは肺結核マウスに対する推定有効組織中濃度（268 ng/g）と同程度であった。このことから、マウスおよびラットともに、肺結核治療に必要なデラマニドの肺内濃度が確認できた。代表的な肺外組織として肝臓を考慮した場合、3 mg/kg を経口投与したときの  $t_{max}$  におけるデラマニドの肝臓中濃度は、ラジオクロマトグラムにおけるデラマニドの割合（79.2%）から雄性ラットで 2404 ng/g、雌性ラットで 4113 ng/g と算出された。さらに、デラマニドを 1.625 mg/kg（肺外結核に対する有効用量）で投与した場合、雌雄のラットにおけるデラマニドの肝臓中濃度は、それぞれ 1302 および 2228 ng/g と推定された。推定した肝臓中濃度は、肺内濃度よりも高かった。実際、デラマニドはマウス肝臓に感染した MDR-TB に対して効果を発することが示されている[38]。また、 $t_{max}$  におけるデラマニドの脳、心臓および精巣中濃度を同様に推定したところ、雄および雌ラットの脳で 798 および 685 ng/g、雄および雌ラットの心臓で 1365 および 892 ng/g、雄ラットの精巣で 396 ng/g であった。これらの濃度は、肺結核マウスに対する推定有効組織中濃度に達していると考えられた。今回の試験では、肺外結核のヒトで影響を受ける可能性のある組織、すなわち、リンパ節、胃、小腸、大腸、骨髄、脳、小脳、延髄、下垂体で、肺と同等のレベルの放射能が観察された。さらに、ラットにおいて投与後 168 時間以内にほとんどの組織の放射能が血漿よりも高かったことから、デラマニドは様々な組織に強い親和性を持ち、組織における長時間の曝露につながっていると考えられた。以上の結果から、デラマニドはヒトにおいても多くの組織に分布し、それらの組織に感染した結核菌を効果的に消失させることができ、肺結核だけでなく肺外結核の治療にも有効性が期待できることを示唆している。

## 第4章 デラマニドのヒト薬物動態予測

### 第1節 緒言

第3章においてデラマニドがラットの肺, 脳および様々な組織に広く分布していることを報告した。また, 結核モデルマウスにおいて, デラマニドは肺に加えて肝臓や脾臓でも MDR-TB 株に対して強力な増殖抑制効果を示すことが明らかになっている[38]。これらのことから, デラマニドは多くの組織に分布し, 組織に感染した結核菌を効果的に排除することが期待できる。このような考察は動物実験結果に基づいたヒトへの外挿であり, 理想的にはヒトにおける組織移行性および薬理効果の検証が望まれる。しかし, ヒトにおける組織中濃度を検討することは困難であり, 検証するための方法論として解析的アプローチによる血漿中および組織中濃度推移の予測が挙げられる。ヒトにおける薬物濃度を定量的に予測するためには, 薬物の薬物動態的特性, 特に代謝および分布を理解すること, すなわち CL (全身クリアランス) および  $V_{ss}$  (定常状態における分布容積) を精度よく予測することが重要である。ヒトの CL ( $CL_{human}$ ) および  $V_{ss}$  ( $V_{ss, human}$ ) については, これまで種々の予測方法論が報告されており, 実測値と予測値を比較することで検証されている。予測された  $CL_{human}$  と  $V_{ss, human}$  を用いて, ヒト血漿中濃度一時間推移 (PK プロファイル) をシミュレーションするシンプルな方法として, 定常状態における血漿中薬物濃度 ( $C_{ss}$ ) および平均滞留時間 (MRT) を用いた  $C_{ss}$ -MRT アプローチが報告されている[39]。このアプローチは, PK プロファイルは線形であり, 動物種によらず類似するという仮定に基づいており, ヒトおよび動物の PK プロファイルを標準化した曲線は重ね合わせることができるというコンセプトである。例えば,  $C_{ss}$ -MRT アプローチを用いて, 肝代謝型である4種の化合物および腎排泄型である4種のセフェム系抗生物質について, ヒト PK プロファイルを精度良くシミュレーションできたと報告されている[39, 40]。ヒトの動態プロファイルをシミュレーションする別のアプローチとして, 生理学的薬物速度論 (Physiologically based pharmacokinetic : PBPK) モデリングア

アプローチが挙げられる。本アプローチでは、各臓器の組織-血漿分配係数 ( $K_{p, \text{tissue}}$ ) や固有クリアランス ( $CL_{\text{int}}$ ) などの薬物特有の動態パラメータと、臓器血流量や組織容積などの生理学的パラメータが組み込まれる[41]。PBPK モデルではモデル構築のために多くのデータが必要であるが、対象組織や血漿中の薬物濃度推移をシミュレーションするための有効な手法となる場合がある。例えば、リファペンチンの PBPK モデルでは、定常状態における肺内濃度をシミュレーションし、結核菌の最小発育阻止濃度と比較することで、用法用量、有効性および安全性について評価されている[42]。また、エファビレンツにおいては、シミュレーションした脳内プロファイルと中枢神経系の毒性の関連性が議論されている[43]。本章における研究では、ヒトを含む動物種間でデラマニドの分布に種差がないことおよびヒトの全身アルブミンが代謝に関与することを仮定し、全身性のパラメータである  $V_{ss}$  および  $CL$  に基づく  $C_{ss}$ -MRT アプローチと、各臓器における  $K_{p, \text{tissue}}$ ,  $CL_{\text{int}}$  および生理学的パラメータを用いて構築した PBPK モデルを用いて、デラマニドのヒトの PK プロファイルをシミュレーションした。さらに、ヒトにおけるデラマニドの血漿および組織中濃度のシミュレーション結果から、肺外結核に対する効果の可能性を議論した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 $CL_{\text{human}}$ および $V_{ss, \text{human}}$ の予測

アロメトリー法により  $V_{ss, \text{human}}$  を予測した。すなわち、第3章で報告した静脈内投与後の  $V_{ss, \text{mouse}}$ ,  $V_{ss, \text{rat}}$  および  $V_{ss, \text{dog}}$  を各体重で補正した値を以下の式を用いて回帰し、係数 (a) とべき乗数 (b) を求めた。次に、ヒトの典型的な体重 (70 kg) を用いてヒトの  $V_{ss}$  を算出した。

$$V_{ss} = a \times (BW)^b$$

デラマニドの特徴であるアルブミンによる代謝に注目し、スケーリングファクター(SF)

を用いた *in vitro-in vivo extrapolation* (IVIVE) 法のコンセプトに基づいてヒト  $CL_{human}$  を以下の式で算出した。

$$CL_{int,albumin} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \times (\text{Physiological albumin content})$$

$$CL_{human} = CL_{int,albumin} \times (\text{SF of plasma albumin}) \text{ or } (\text{SF of whole body albumin})$$

ヒト体内に存在するアルブミン量に関して、2種のSFを文献情報[44, 45]に基づいて算出した (Table 4-1)。まず、ヒト血漿中  $t_{1/2}$  (0.64 h) [7]と生理的なアルブミン含量値 (4.18 g/100 mL 血漿) [44]からヒトにおけるアルブミンの  $CL_{int}$  ( $CL_{int,albumin}$ )を算出した。次に  $CL_{int,albumin}$  を各SF, すなわちヒトの血漿アルブミン量 (血管内のみ) または全身アルブミン量 (血管内および血管外の合計) を用いて  $CL_{human}$  を算出した。

Table 4-1 Calculation of scaling factor for human albumin

Parameter	Value	Reference
Body weight (kg)	70	[44]
Plasma albumin (g/100 mL)	4.18	[44]
Plasma volume (mL)	3000	[44]
Extravascular to intravascular ratio of albumin	1.4	[45]
Scaling factors (mg albumin/kg body weight)		
Plasma albumin	1791	
Whole-body albumin	4299	

## 第2項 C<sub>ss</sub>-MRTアプローチによるヒトPKプロファイル予測

第3章で報告したマウス、ラットおよびイヌにデラマニドを静脈内投与後の血漿中濃度 (Y 軸) を各動物の C<sub>ss</sub> (C<sub>ss,animal</sub>=dose/V<sub>ss,animal</sub>) で、時間 (X 軸) を各動物の MRT (MRT<sub>animal</sub>=V<sub>ss,animal</sub>/CL<sub>animal</sub>) で除すことでデラマニドの標準化 PK プロファイル (Transformed pharmacokinetic profile) を描いた。Transformed pharmacokinetic profile が動物およびヒトでも同一であるという仮定に基づき、Transformed pharmacokinetic profile に予測 C<sub>ss,human</sub> (dose/予測 V<sub>ss,human</sub>) および MRT<sub>human</sub> (予測 V<sub>ss,human</sub>/予測 CL<sub>human</sub>) を乗じて静脈内投与後のヒト PK プロファイルを描いた。予測 V<sub>ss,human</sub> および予測 CL<sub>human</sub> は、それぞれアロメトリー法および IVIVE 法による予測値を用いた。得られた静脈内投与 PK プロファイルを元に、デラマニド 100mg を単回経口投与したときのヒトの PK プロファイルを下記に示した一次吸収 1 コンパートメントモデルを用いてシミュレーションした。

$$C_t = \frac{F \times Dose \times k_a}{V_d \times (k_a - k_{el})} \times (e^{-k_{el} \times t} - e^{-k_a \times t})$$

経口吸収速度定数 (k<sub>a</sub>) は、観察されたヒトの PK プロファイル[31]に Lag time (0.69 h) を考慮して上式にフィッティングすることで得られた 0.85 h<sup>-1</sup> を使用した。バイオアベイラビリティ (F) は、[<sup>14</sup>C]デラマニドを用いたヒトマスバランス試験における経口吸収率の平均値である 0.36 を用いた[31]。

## 第3項 PBPKモデリングアプローチによるヒトPKプロファイル予測

デラマニドのヒト PBPK モデルの概略図を下記に示した (Figure 4-1)。各コンパートメントは臓器の体積と血流量で表され、生理学的パラメータは文献を参考にした[44, 46]。このモデルでは、アルブミン含有量が多い組織[59]または体積が大きい組織[46]に注目し、10 組織を採用してモデルを構築した。10 組織を除く組織は、Rest コンパートメントとしてまとめた。Rest コンパートメントの体積または血流は、総体積または総血流速度から 10 種類の組織の合計を差し引いた値を用いた。

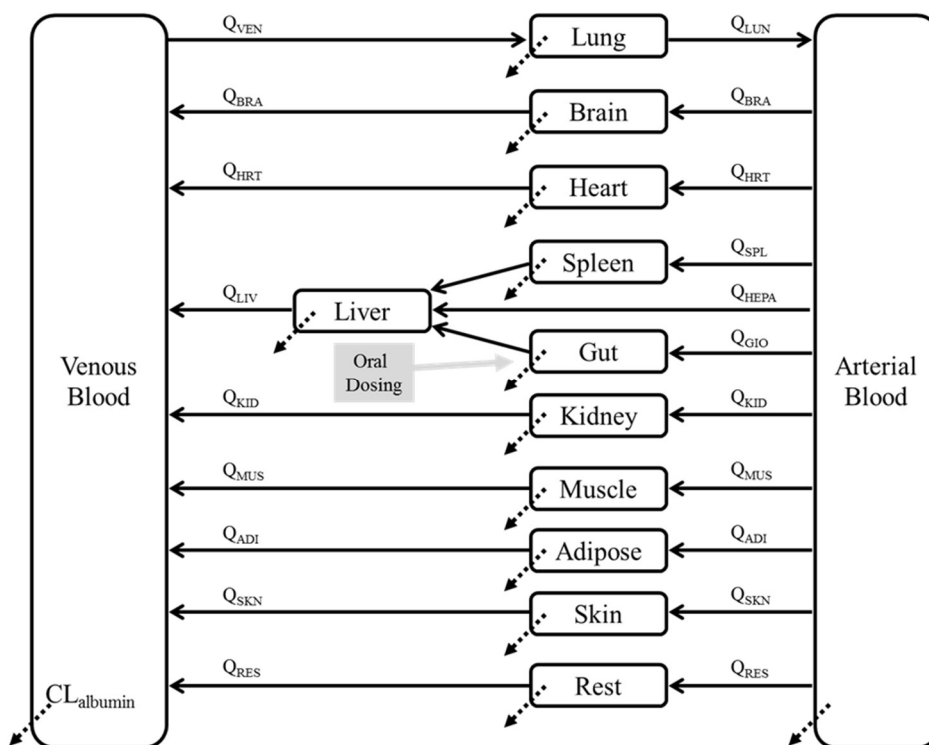


Figure 4-1 Physiologically based pharmacokinetic model of delamanid including metabolism by albumin. The line and dotted arrows represent the blood flow rate ( $Q$ ) of tissues and clearance by albumin ( $CL_{\text{albumin}}$ ).

血漿中のデラマニド濃度 ( $C_{\text{plasma}}$ ) および組織中のデラマニド濃度 ( $C_{\text{tissue}}$ ) は以下の式に従って算出した。

$$C_{\text{plasma}} = \frac{C_{\text{blood}}}{R_b}$$

$$C_{\text{tissue}} = \frac{A_{\text{tissue}}}{V_{\text{tissue}}}$$

ここで、 $C_{\text{blood}}$ 、 $R_b$ 、 $A_{\text{tissue}}$ 、および  $V_{\text{tissue}}$  は、それぞれデラマニドの血中濃度、血液-血漿濃度比、組織内のデラマニド量および組織容積を表す。 $R_b$  (0.73) は $^{14}\text{C}$ デラマニドを用いたラット *in vivo* 試験の値を用いた (第3章)。デラマニドの消失は、体内に存在するアルブミンによる代謝のみが関与すると仮定した。すなわち、PBPKモデルにおけるアルブミンによる代謝クリアランス ( $CL_{\text{albumin}}$ ) は、血液や組織のコンパートメントに含まれるアルブミン量に依存すると仮定した。物質収支式において、血漿中アルブミンに



よるクリアランス ( $CL_{\text{albumin,plasma}}$ ) と組織中アルブミンによるクリアランス ( $CL_{\text{albumin,tissue}}$ )

を以下のように表した。

$$CL_{\text{albumin,plasma}} = k_{el,plasma} \times V_{\text{venous}} \times (1 - H_t)$$

$$CL_{\text{albumin,tissue}} = k_{el,plasma} \times K_{p,\text{albumin,tissue}} \times V_{\text{tissue}}$$

$k_{el,plasma}$ ,  $H_t$  および  $K_{p,\text{albumin,tissue}}$  は、それぞれヒト血漿中のデラマニドの消失速度定数、ヘマトクリット値、アルブミンの組織/血漿中濃度比を表す。 $k_{el,plasma}$  は、in vitro ヒト血漿中  $t_{1/2}$  から  $1.083 \text{ h}^{-1}$  を算出した[7]。 $K_{p,\text{albumin,tissue}}$  は、文献報告値を使用した[47]。Rest コンパートメントの  $K_{p,\text{albumin}}$  の値は、報告値の平均値である 0.112 を用いた。物質収支式を解くことで、各コンパートメントにおけるデラマニド量の時間推移を求めた。代表的なコンパートメントである静脈血、肺、消化管、肝臓およびその他の組織における物質収支式は以下に示した。

・ 静脈血

$$\begin{aligned} \frac{dA_{\text{venous}}}{dt} = & \frac{C_{\text{brain}}}{\left(\frac{K_{p,\text{brain}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{brain}} + \frac{C_{\text{heart}}}{\left(\frac{K_{p,\text{heart}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{heart}} + \frac{C_{\text{liver}}}{\left(\frac{K_{p,\text{liver}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{liver}} \\ & + \frac{C_{\text{kidney}}}{\left(\frac{K_{p,\text{kidney}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{kidney}} + \frac{C_{\text{muscle}}}{\left(\frac{K_{p,\text{muscle}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{muscle}} + \frac{C_{\text{adipose}}}{\left(\frac{K_{p,\text{adipose}}}{R_b}\right)} \\ & \times Q_{\text{adipose}} + \frac{C_{\text{skin}}}{\left(\frac{K_{p,\text{skin}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{skin}} + \frac{C_{\text{rest}}}{\left(\frac{K_{p,\text{rest}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{rest}} - C_{\text{venous}} \\ & \times Q_{\text{venous}} - \frac{C_{\text{venous}}}{R_b} \times CL_{\text{albumin,plasma}} \end{aligned}$$

・ 肺

$$\frac{dA_{\text{lung}}}{dt} = C_{\text{venous}} \times Q_{\text{venous}} - \frac{C_{\text{lung}}}{\left(\frac{K_{p,\text{lung}}}{R_b}\right)} \times Q_{\text{lung}} - \frac{C_{\text{lung}}}{K_{p,\text{lung}}} \times CL_{\text{albumin,lung}}$$

・消化管

$$\frac{dA_{gut}}{dt} = C_{arterial} \times Q_{gut} + k_a \times F \times A_{dose} \times \frac{C_{gut}}{\left(\frac{K_{p,gut}}{R_b}\right)} \times Q_{gut} - \frac{C_{gut}}{K_{p,gut}} \times CL_{albumin,gut}$$

・肝臓

$$\begin{aligned} \frac{dA_{liver}}{dt} = & C_{arterial} \times Q_{hepa} + \frac{C_{spleen}}{\left(\frac{K_{p,spleen}}{R_b}\right)} \times Q_{spleen} + \frac{C_{gut}}{\left(\frac{K_{p,gut}}{R_b}\right)} \times Q_{gut} \\ & - \frac{C_{liver}}{\left(\frac{K_{p,liver}}{R_b}\right)} \times Q_{liver} - \frac{C_{liver}}{K_{p,liver}} \times CL_{albumin,liver} \end{aligned}$$

・その他の組織

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = C_{arterial} \times Q_{tissue} - \frac{C_{tissue}}{\left(\frac{K_{p,tissue}}{R_b}\right)} \times Q_{tissue} - \frac{C_{tissue}}{K_{p,tissue}} \times CL_{albumin,tissue}$$

$K_{p,tissue}$ は放射性標識したデラマニドを用いたラット組織分布試験と、組織中のデラマニドの割合（第3章）から各組織および血漿AUC比を計算した。すなわち、 $K_{p, lung}$ ,  $K_{p, brain}$ ,  $K_{p, heart}$ および $K_{p, liver}$ はそれぞれ1.86, 2.00, 2.92および10.33を用いた。ラット組織分布試験において組織中のデラマニドの割合が不明な臓器については、放射能の組織AUCを用いて $K_{p,tissue}$ を計算した。すなわち $K_{p, spleen}$ ,  $K_{p, gut}$ ,  $K_{p, kidney}$ ,  $K_{p, muscle}$ ,  $K_{p, adipose}$ および $K_{p, skin}$ はそれぞれ2.78, 2.55, 6.28, 1.86, 3.94および1.99を用いた。Restコンパートメントの $K_{p,tissue}$  ( $K_{p, rest}$ )は、ラット組織分布試験における29組織のAUCの平均値である3.62を用いた。 $Q_{tissue}$ ,  $k_a$ ,  $F$ および $A_{dose}$ は、それぞれ組織血流量, 吸収速度定数, バイオアベイラビリティおよび投与量を表す。デラマニドは消化管コンパートメントに投与され、ラグタイムをもって吸収されると仮定した。構築したPBPKモデルを用いて、ヒトにデラマニド100 mgを単回経口投与したときの血漿中濃度推移をシミュレーションした。続いて、デラマニドの臨床レジメンである100 mgを1日2回で、5日間反復経口投与したときの肺, 脳, 心臓および肝臓中濃度推移をシミュレーションした。

#### 第4項 データ解析 (Goodness of fitの比較, 予測精度の検証)

デラマニドの臨床 PK データに関する情報は、健常な日本人 6 名を対象とした経口投与試験から得られた[31]。V<sub>ss, human</sub> および CL<sub>human</sub> は、放射性標識したデラマニドを用いたヒトマスバランス試験における経口吸収率を用いて、経口投与後のそれぞれのパラメータから算出した[31]。本試験におけるノンコンパートメント解析、コンパートメント解析、PBPK モデルの構築およびシミュレーションは、Phoenix WinNonlin version 8.0 (Certara LP) を用いて行った。各手法の予測性能の評価には、goodness-of-fit plot を用いた。

### 第 3 節 結果

#### 第1項 CL<sub>human</sub> および V<sub>ss, human</sub> の予測性検証

動物の静脈内投与データを用いて、V<sub>ss, human</sub> をアロメトリー法で予測した。対数変換した V<sub>ss</sub> および体重は、アロメトリー式を適用することで、ほぼ直線的に比例し、良好な相関関係が得られた (R<sup>2</sup>=0.9951 ; Figure 4-2)。アロメトリー式の係数(a)は 3.2036、べき乗数(b)は 1.1434 であった。体重 70 kg のヒトの場合、予測 V<sub>ss, human</sub> は 5.89 L/kg であり、実測値との乖離 (予測値/実測値の比) は 2 倍以内であった (Table 4-2)。デラマニドの CL<sub>human</sub> は IVIVE 法にて予測した。すなわち、デラマニドの in vitro ヒト血漿中 t<sub>1/2</sub> [7]と生理的アルブミン含量[44]から、ヒトにおけるアルブミン CL<sub>int</sub> (CL<sub>int,albumin</sub>) を 0.432 μL/min/mg と算出し、2 つの SF を用いて in vivo の CL<sub>human</sub> を算出した (Table 4-1)。血漿アルブミンの SF を用いた場合、予測 CL<sub>human</sub> は 0.774 mL/min/kg であり、予測値と実測値の乖離は 0.29 であった。一方、全身アルブミンの SF を用いた場合、予測 CL<sub>human</sub> は 1.86 mL/min/kg であり、予測値と実測値の乖離は 0.69 であった。全身アルブミンの SF を用いた場合の予測 CL<sub>human</sub> は、血漿アルブミンの SF を用いた場合と比較して、より実測値に近かった。

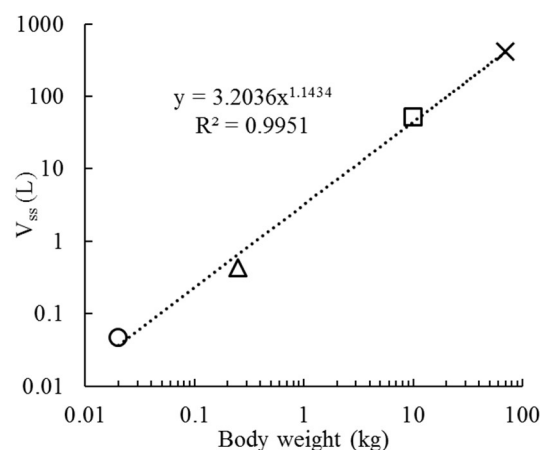


Figure 4-2 Linear regression analysis of log–distribution volumes at steady state versus log–body weights for mice, rats, and dogs after intravenous administration of 3 mg/kg delamanid.

The symbols represent mice (○), rats (△), dogs (□), and human (×, predicted). The body weights were 0.02, 0.25, 10, and 70 kg in mice, rats, dogs, and humans, respectively.

Table 4-2 Predicted human pharmacokinetic parameters of delamanid and accuracies

Prediction method	Predicted value	Observed value <sup>c</sup>	Fold error difference <sup>d</sup>
<b>V<sub>ss</sub><sup>a</sup> (L/kg)</b>			
Allometric scaling	5.89	4.37	1.35
<b>CL <sup>b</sup> (mL/min/kg)</b>			
IVIVE using SF of plasma albumin	0.774	2.71	0.29
IVIVE using SF of whole-body albumin	1.86		0.69

IVIVE, In vitro–in vivo extrapolation; SF, Scaling factor

<sup>a</sup> Predicted V<sub>ss</sub> were calculated using V<sub>ss</sub> of mouse, rat, and dog after intravenous administration and each body weight [44].

<sup>b</sup> Predicted CL were calculated using in vitro half-life in human plasma (0.64 h [7]) and SFs in Table 3.

<sup>c</sup> CL and V<sub>ss</sub> were calculated using F = 0.36 of the average oral absorption fraction in humans [31].

<sup>d</sup> Predicted value versus observed value ratio was calculated.

## 第2項 $C_{ss}$ -MRTアプローチによるヒトPKプロファイルの予測性検証

マウス、ラットおよびイヌにおけるデラマニドのTransformed pharmacokinetic profileは、ほぼ重なり合った (Figure 4-3)。ヒトのTransformed pharmacokinetic profileも重なり合っていると仮定し、第1項の予測 $V_{ss, human}$  (5.89 L/kg) および $CL_{human}$  (1.86 mL/min/kg) を用いて、静脈内投与後のヒトのPKプロファイルをシミュレーションし、1コンパートメントモデルを用いてフィッティングを行うことで $k_{el}$ および $V_d$ をそれぞれ $0.0177\text{ h}^{-1}$ および $7.73\text{ L/kg}$ と推定した。デラマニド100 mgを単回経口投与したときのヒトPKプロファイルを、推定パラメータおよび吸収率を用いて1次吸収1コンパートメントモデルを用いてシミュレーションした。シミュレーションしたヒトPKプロファイルと実測PKプロファイルは類似していた (Figure 4-4)。シミュレーションしたヒトPKプロファイルを解析して得られたPKパラメータ ( $t_{max}$ , AUCおよび $t_{1/2}$ ) は、実測PKプロファイルを解析して得られたPKパラメータの2倍以内の誤差であった (Table 4-3)。シミュレーションしたヒトPKプロファイルから得られた $t_{1/2}$ は実測PKプロファイルから得られた $t_{1/2}$ よりもわずかに長く、実測 $C_{max}$ はシミュレーションされた $C_{max}$ よりも低かった。

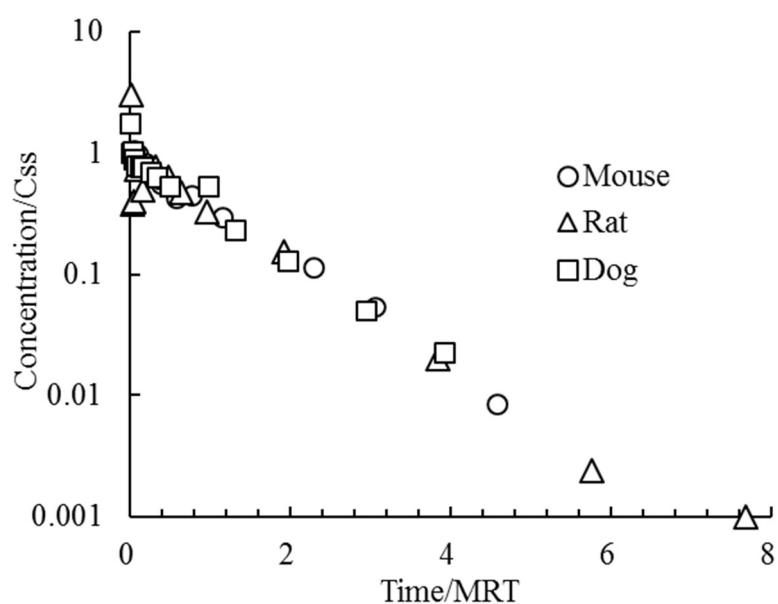


Figure 4-3 Transformed pharmacokinetic profile of delamanid in animals after intravenous administration.

Table 4-3 Simulated and observed human PK parameters of delamanid after 100 mg oral dose and the prediction accuracy <sup>c</sup>

Parameter	Predicted PK parameters <sup>a</sup>			Fold error difference <sup>b</sup>	
	C <sub>ss</sub> -MRT	PBPK modeling	Observed value	C <sub>ss</sub> -MRT	PBPK modeling
	C <sub>max</sub> (ng/mL)	46.6	203.4	198.4	0.23
t <sub>max</sub> (h)	5	2	4	1.25	0.50
AUC <sub>168h</sub> (ng · h/mL)	2826	4381	3150	0.90	1.39
AUC <sub>∞</sub> (ng · h/mL)	3004	4385	3168	0.95	1.38
t <sub>1/2</sub> (h)	41.0	16.7	23.7	1.73	0.71

<sup>a</sup> In the simulation, the k<sub>a</sub>, lag time, and F used values of 0.85 h<sup>-1</sup>, 0.69 h, and 0.36, respectively. In the C<sub>ss</sub>-MRT approach, the human PK profile after a single oral administration of delamanid was simulated using the one-compartment model with first-order absorption kinetics

<sup>b</sup> Predicted value versus observed value ratio was calculated

### 第3項 PBPKモデリングアプローチによるヒトPKプロファイルの予測性検証

デラマニドは血漿および組織中のアルブミンによって代謝されるという仮定のもとで構築したPBPKモデルを用いて、ヒトにデラマニドを経口投与後のPKプロファイルをシミュレーションした (Figure 4-4)。シミュレーションしたヒトPKプロファイルは、実測PKプロファイルと良く一致していた。シミュレーションされたPKプロファイルから得られたPKパラメータ ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ , AUC および  $t_{1/2}$ ) は、実測PKプロファイルから得られたPKパラメータの2倍以内の誤差であった (Table 4-3)。

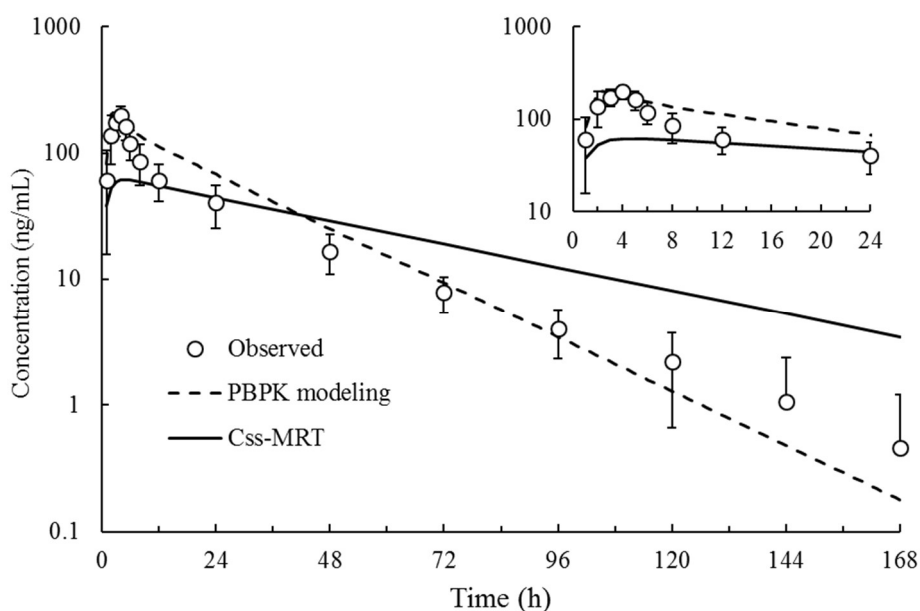


Figure 4-4 Simulated and observed human plasma PK profile of oral administration of 100 mg delamanid using the  $C_{ss}$ -MRT and PBPK modeling approaches.

The open circles with error bar represent the observed clinical data (n = 6, mean  $\pm$  SD). The above figure shows the concentrations up to 24 h after administration

## 第4項 PBPK モデリングアプローチによるヒト組織プロファイルのシミュレーション

### シミュレーション

デラマニドのヒト PBPK モデルを用いて、肺 MDR-TB に対する臨床レジメン（100mg を 1 日 2 回）で 5 日間反復経口投与したときのヒトにおけるデラマニドの肺、脳、心臓、肝臓の濃度時間プロファイルを実行した (Figure 4-5)。Figure 4-5 中の実線および点線は、シミュレーションされたデラマニドの組織プロファイルおよび肺における有効濃度 (268 ng/g, 第 3 章) を示している。これらの組織では、投与後 96 時間でデラマニドの濃度が定常状態に達し、その濃度は有効濃度よりも高かった。

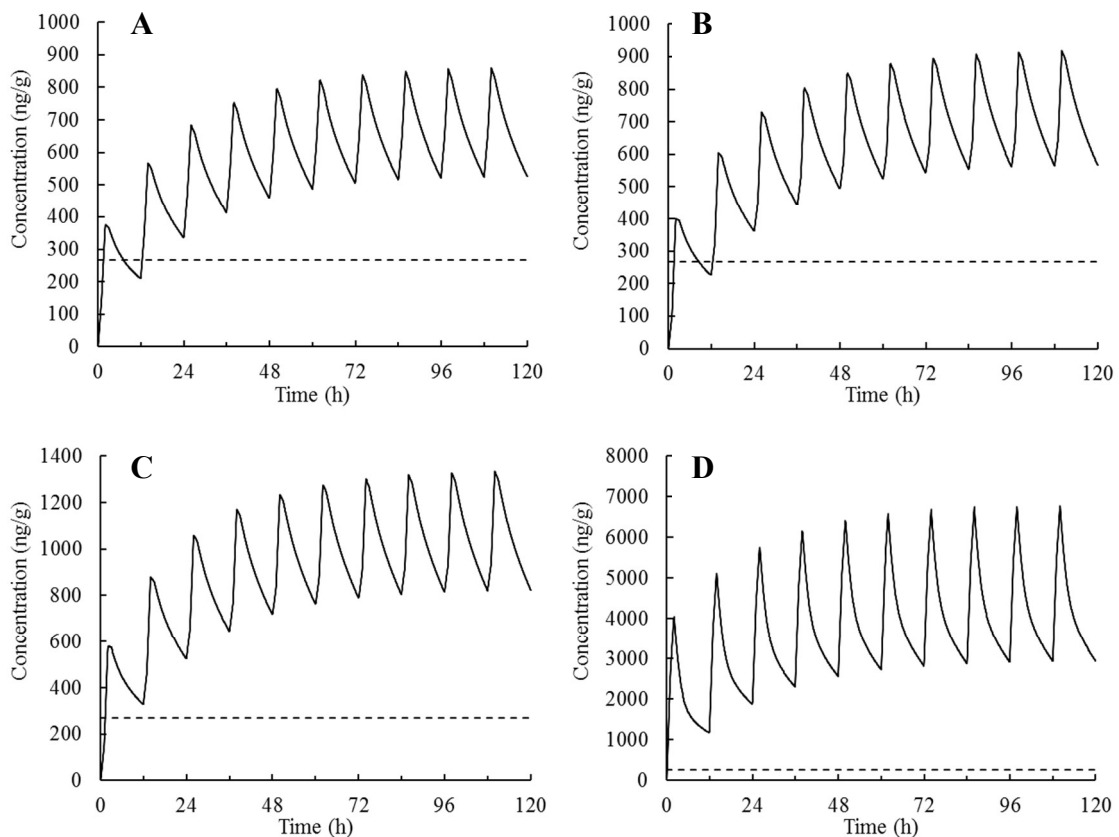


Figure 4-5 Simulated lung (A), brain (B), heart (C), and liver (D) concentration–time profiles of delamanid in humans after 5 days of repeated 100 mg oral dosing twice a day using PBPK modeling.

The dotted line shows the speculated effective concentration (268 ng/g) [8].



## 第4節 考察

ヒト PK 予測は、医薬品候補化合物のスクリーニングおよび開発段階における戦略および方針決定に重要な役割を果たすようになりつつある。これまでに様々なヒト PK 予測法が報告されており、予測値と実測値を比較することで検証されている。本章における研究では、アルブミン代謝というユニークな特徴を有するデラマニドのヒトにおける曝露を予測するために、2つの異なるアプローチ ( $C_{ss}$ -MRT および PBPK モデリング) を用いて、ヒト PK プロファイルをシミュレーションし、臨床試験の結果と比較した。さらに、構築した PBPK モデルを用いて組織中デラマニドのプロファイルをシミュレーションし、肺外結核に対するデラマニドの有効性について考察した。なお、デラマニドは高脂溶性薬物であり溶解度が低いため、ヒトにおける吸収率を推定することは困難であると考え、本章における研究では実測データから得られた吸収パラメータ ( $k_a$  および  $F$ ) を用いた。薬物の動態特性を理解する上で重要なパラメータは  $V_{ss}$  および  $CL$  であり、それぞれ薬物の全身における組織分布特性および体内からの消失特性を表す。 $CL_{human}$  予測方法の例としては、単一または複数の動物種における  $CL_{animal}$  を用いたアロメトリックスケールリング法や主要代謝酵素の  $SF$  を用いた IVIVE 法などが挙げられる[48, 49]。本検討においては、デラマニドの特徴であるアルブミンによる代謝に着目した[7, 8]。 $V_{ss, human}$  の予測に関しては、複数種の  $V_{ss, animal}$  を用いたアロメトリー法や生理学的特徴に基づいた数式を用いる  $\text{Øie-Tozer}$  法などが挙げられる[50, 51]。本検討においては、デラマニドの  $V_{ss, human}$  予測にはマウス、ラットおよびイヌの静脈内投与後の  $V_{ss}$  ( $V_{ss, mouse}$ ,  $V_{ss, rat}$  および  $V_{ss, dog}$ ) を用いたアロメトリー法を適用した (第3章)。 $C_{ss}$ -MRT アプローチを用いたシミュレーションでは、予測  $V_{ss, human}$  および  $CL_{human}$  を用いて  $C_{ss, human}$  および  $MRT_{human}$  を算出した (第2節, 第2項)。デラマニドのマウス、ラットおよびイヌにおける PK データに基づいたアロメトリー法により、体重と  $V_{ss}$  の間に良好な相関が示された ( $R^2=0.9951$ , Figure 4-2)。さらに、回帰直線から予測した  $V_{ss, human}$  は、実測  $V_{ss, human}$  に対

して2倍以内の誤差であり、良好な予測精度であった (Table 4-2)。これらの結果から、デラマニドの  $V_{ss}$  に大きな種差はなく、 $V_{ss}$  の違いは主に体重差に起因することが示唆された。CL に関して、*in vitro* アルブミン代謝活性と体内アルブミン量に基づいて2種類の SF を考慮し、IVIVE 法で  $CL_{human}$  を予測した (Table 4-1 および Table 4-2)。全身アルブミンの SF を用いた場合の  $CL_{human}$  の予測精度は、血漿アルブミンの SF を用いた予測精度よりも高かった (Table 4-2)。デラマニドは主にアルブミンによって代謝され、他の代謝酵素は関与せず尿および胆汁中への排泄の寄与は無視できることを考慮すると [31]、デラマニドのヒトにおける代謝は血漿中のアルブミンだけでなく、様々な組織のアルブミンが寄与しており、アルブミンの代謝活性のみで *in vivo* CL を十分説明できることが示唆された。さらに、予測  $V_{ss, human}$  および  $CL_{human}$  を用いた  $C_{ss}$ -MRT アプローチでは、マウス、ラットおよびイヌにおける静脈内投与後の PK プロファイルから得られた Transformed pharmacokinetic profile は重なり合うことが示され (Figure 4-3)、動物種間で PK プロファイルが類似していることが示唆された。アロメトリー法による予測  $V_{ss, human}$  および IVIVE 法による予測  $CL_{human}$  を用いて  $C_{ss, human}$  ( $dose/$ 予測  $V_{ss, human}$ ) および  $MRT_{human}$  (予測  $V_{ss, human}/$ 予測  $CL_{human}$ ) を算出し、Transformed pharmacokinetic profile および吸収パラメータと組み合わせて、デラマニドをヒトに経口投与後の PK プロファイルをシミュレーションした。シミュレーションしたヒト PK プロファイルは、実測プロファイルと概ね類似していた (Figure 4-3)。しかし、 $C_{ss}$ -MRT アプローチの Goodness-of-fit plot において、低濃度側では過大予測、高濃度側では過小予測の傾向が認められた (Figure 4-6)。このような実測値と予測値の乖離は、PK プロファイルの消失相に起因すると考えられる。デラマニドをヒトに経口投与したときの実測 PK プロファイルは、二相性の消失であった。この PK プロファイルを2コンパートメントモデルにフィッティングし、分布容積を推定したところ、中心コンパートメントにおける分布容積は 1.14 L/kg、末梢コンパートメントにおける分布容積は 3.63 L/kg であった (Data not shown)。投与後の中心コ

ンパートメントから末梢コンパートメントへの分布速度は、ヒトと動物では種差がある可能性が考えられる。しかし、アロメトリー法によるデラマニドの予測  $V_{ss, human}$  は実測値とほぼ同じであり、中心コンパートメントと末梢コンパートメントの分布容積の和である  $V_{ss}$  としては予測可能であることが示唆された。

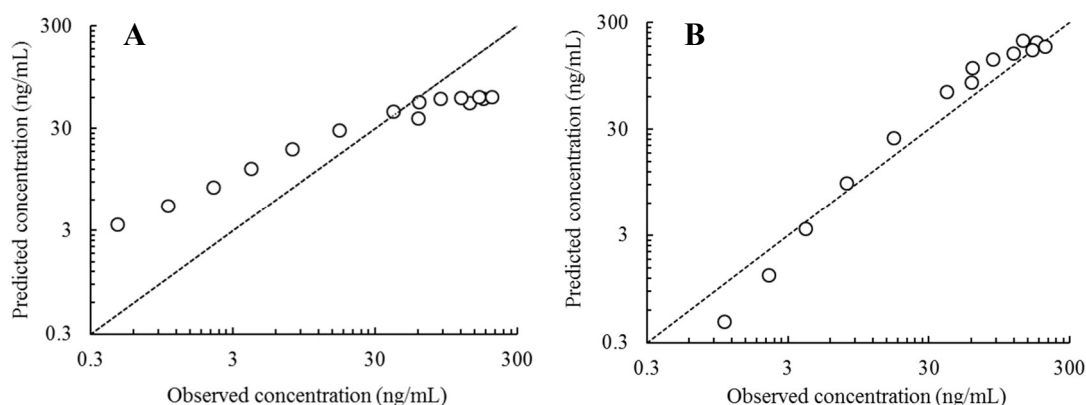


Figure 4-6 Goodness-of-fit plots of observed and predicted concentrations in the  $C_{ss}$ -MRT approach (A) and PBPK modeling approach (B).

PBPK モデリングアプローチでは、デラマニドが血中および各臓器中のアルブミンによって代謝されるという仮定[7,8]に基づき、2つの血液（動脈および静脈）コンパートメント、10組織（肺、脳、心臓、肝臓、脾臓、小腸、腎臓、筋肉、脂肪および皮膚）コンパートメントおよび残りの組織を一つにまとめた Rest コンパートメントをモデルに採用した（Figure 4-1）。すべてのコンパートメントにおいて、デラマニドはアルブミン量に応じて代謝されると仮定した。組織分布を考慮するために、物質収支式の各  $K_{p, tissue}$  には、 $[^{14}C]$ デラマニドを経口投与後のラット  $K_{p, tissue}$ （第3章）を使用した。デラマニドは組織分布に関連する取り込みおよび排泄トランスポーターの基質認識性はなかったため、受動拡散により分布すると仮定した（第2章）。一般的に、受動拡散による分布には動物間で種差が小さいと考えられている。デラマニドにおいては、分布特性を含む PK プロファイルに種差がないと仮定した  $C_{ss}$ -MRT アプローチにおいて、実測ヒト PK プロ

ファイルと比較的精度良く予測できたことから、分布は受動拡散であるという仮定は妥当だと考えられる。そこで、PBPK モデルの物質収支式においてはラットの  $K_{p,tissue}$  を用いた。 $K_{p,rest}$  値については、全組織のラットの平均  $K_{p,tissue}$  値を採用し、さらに 1/3~3 倍の範囲で感度分析を行った。その結果、シミュレーションした PK プロファイルおよび PK パラメータにほとんど影響しなかった (Data not shown) ことから、本 PBPK モデルにおける Rest コンパートメントは、分布や代謝への寄与が無視できることが示唆された。言い換えると、10 組織を含んだ PBPK モデルで、デラマニドのヒト PK を十分説明できると考えられた。この PBPK モデルを用いてシミュレーションしたデラマニドの経口投与後のヒト PK プロファイルは、実測プロファイルとよく一致した (Table 4-3 および Figure 4-4)。また、PBPK モデルの Goodness-of-fit plot はすべての濃度で良好な予測精度であった (Figure 4-6)。このことから、本モデルはデラマニドのヒト体内動態を適切に記述できていることが示唆された。デラマニド[7,8]と同様に、アルブミンによる代謝はアスピリン[52,53]、オルメサルタンメドキシミル[54]、p-ニトロフェニルエステル類[55,56,57,58,59]、シンナモイルイミダゾール[60]、カルバリル[61]、有機リン酸系殺虫剤[62]、長鎖および短鎖脂肪酸エステル[63]など、いくつかの化合物で報告されている。現時点ではアルブミンによる代謝が関連するこれらの化合物について、ヒト PK 予測に関する報告はされていない。これら化合物のアルブミンによる代謝メカニズムがデラマニドと類似していると仮定すると、同様に IVIVE 法または PBPK モデリング アプローチのいずれかによって、 $CL_{human}$  およびヒト PK プロファイルを適切に予測できる可能性がある。

先行研究におけるマウスおよびラットの薬効試験および動態試験の結果[9,38]から、肺における有効濃度は 268 ng/g であることを推定した (第 3 章)。また、MDR-TB マウスモデルの薬効試験において、デラマニドを約 1.625 mg/kg で経口投与したとき、肝臓、脾臓および肺の MDR-TB 菌のコロニー形成を 99%以上減少させ、肺以外の組織に感染

した MDR-TB に対して強い薬理効果を示すことが証明されている[38]。この時のマウスの肝臓および脾臓の濃度は、肺における推定有効濃度 268 ng/g よりも十分に高いことが予測された（第 3 章）。これらの非臨床データから、デラマニドの曝露が肺と同等以上の組織においては、結核菌を排除できることが示唆された。

この PBPK モデルを用いて、MDR-TB に対する治療レジメン（100 mg を 1 日 2 回経口投与）でヒトに 5 日間の反復経口投与後の肺、脳、心臓および肝臓における濃度推移をシミュレーションした（Figure 4-5）。これらの組織における未変化体の存在比は、ラットにおいて明らかになっている値を用いた（第 3 章）。定常状態におけるヒト肺内デラマニド濃度をシミュレーションしたところ、推定有効濃度である 268 ng/g よりも十分に高かった。この結果は、シミュレーション濃度により肺結核に対するデラマニドの臨床効果を説明できる可能性があることを示唆している。脳内プロファイルのシミュレーションにおいて、デラマニドの脳内曝露は肺よりもさらに高かった。実際、臨床研究において、経口投与後のデラマニドがヒトの脳脊髄液中に移行することが報告されている[64]。これらの結果は、デラマニドが脳における結核である髄膜炎の治療に有効であることを示唆している。同様に、肺外結核を代表する臓器である肝臓と心臓におけるデラマニドのシミュレーションした曝露量は肺よりも高く（Figure 4-5）、これらの組織においてもデラマニドの薬理活性が期待できることが示唆された。

肺外結核は疾患背景が多様であり、患者数も限られているため、治療法の確立は困難であると考えられる。マウス[4,8]およびヒトの研究[31]のいずれにおいても、デラマニドの PK は正常状態と結核病態時の間でほとんど差は認められなかった。したがって、今回のシミュレーション結果は、肺および肺外結核の病態に対するデラマニドの臨床的有用性を示唆できる可能性がある。

本研究で構築したデラマニドの PBPK モデルは、ラットのアルブミン代謝活性がヒトよりも低かったため、ラットには適用できなかった[7]。しかし、ヒト PBPK モデリング

アプローチでは、ラットの  $K_{p, \text{tissue}}$  を用いた分布情報と臓器のアルブミン量に依存した代謝クリアランスを組み込んだモデルを用いて、ヒトの実測 PK プロファイルをシミュレーションすることに成功した。この結果は、モデルの妥当性を示すものと考えられる。本章における研究では、デラマニドのヒトにおける薬物動態パラメータ（すなわち、CL および  $V_{ss}$ ）は線形であると仮定した。非臨床試験のデータにおいて、動物では静脈内または経口投与後のデラマニドの  $t_{1/2}$  は類似の値であることから、3 mg/kg の静脈内または 3~10 mg/kg の経口投与後の曝露レベルで線形動態が維持されることが考えられた[8]。臨床のデータにおいて、ヒトにおけるデラマニド 100, 200, 400 mg (約 1.4, 2.6, 5.7 mg/kg) の単回投与後の  $t_{1/2}$  は類似しており[31]、この用量範囲では CL と  $V_{ss}$  の直線性が維持されることが示唆された。このような非臨床および臨床の情報から、本試験の用量レベル（非臨床においては 3 mg/kg、臨床においては約 1.4 mg/kg）では PK の線形性が確立していると考えられた。本試験の用量レベル外においては、非線形動態 ( $V_{ss}$  や CL の飽和) が認められた場合は、別途適切な数理モデルを取り入れることが必要となる可能性がある。

## 第5章 総括

本研究では、抗結核薬デラマニドの体内動態、特にこれまで報告されていなかった分布性について検討を行い、*in vitro* においてはヒト薬物トランスポーターに対する基質性および阻害能を示さないこと、*in vivo* においては種差や性差がなく組織移行性が高いことを明らかとした。さらに、先行研究において示されているアルブミンで代謝されるという特徴を合わせて、解析的アプローチによりデラマニドのヒトにおける薬物動態予測が可能であることを示した。

第2章では、デラマニドの *in vitro* における薬物トランスポーターに関する検討を実施した。生体内で薬物分布に影響する主要なトランスポーターである P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 および OCT1 に対するデラマニドの基質性を評価した結果、これらに対する基質性は認められないことが明らかとなった。このことから、デラマニドの主な組織分布は能動輸送ではなく受動輸送であると考えられた。さらに、臨床における薬物相互作用で重要なトランスポーターである P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 および BSEP に対する阻害性を評価した結果、いずれも臨床で想定される血漿中および消化管内濃度において阻害性が認められないことが明らかとなった。これらの結果から、デラマニドはトランスポーターを介した DDI を引き起こす可能性は低く、他剤と安全に併用可能であることを示した。

第3章では、デラマニドの動物における吸収、分布及び排泄について評価した。マウス、ラットおよびイヌにデラマニドを静脈内投与したとき、いずれの動物においても分布容積は大きいことが明らかとなった。さらに、雌雄ラットに [<sup>14</sup>C]デラマニドを経口投与したとき、吸収されたデラマニド由来の放射能は各組織に広く分布した後ゆっくりと消失し、主に糞中に排泄され、一部は胆汁中に排泄されることが明らかとなった。ラット

における吸収、分布および排泄特性に顕著な性差は認められないことも明らかとなった。これらの結果から、デラマニドはヒトにおいても長時間にわたり様々な組織に広く分布することが示唆された。

第4章では、第2章および第3章で得られたデラマニドの分布特性データと先行研究のアルブミンによる代謝データを合わせて、デラマニドのヒト血漿中濃度—時間推移 (PK プロファイル) を2つの異なるアプローチ ( $C_{ss}$ -MRT および PBPK モデリングアプローチ) を用いてシミュレーションし、ヒト薬物動態予測の可能性について検討した。 $C_{ss}$ -MRT アプローチでは、マウス、ラットおよびイヌにおける静脈内投与後のデータをもとにアロメトリー法により  $V_{ss, human}$  を予測した。 $CL_{human}$  は全身アルブミン量を用いた SF を考慮し、IVIVE 法により予測した。これらのパラメータから予測したヒト  $C_{ss}$  および MRT を組み合わせて、デラマニドをヒトに単回経口投与したときの PK プロファイルをシミュレーションしたところ、 $C_{max}$  は実測値とやや乖離があったものの実測プロファイルと概ね一致した。また、PBPK モデリングアプローチではデラマニドが循環血漿および組織中のアルブミンによって代謝されるという仮定のもとにモデルを構築し、シミュレーションした PK プロファイルは実測 PK プロファイルと一致した。これら2つの異なるアプローチによりデラマニドのヒト PK プロファイルを精度よく予測できた結果から、分布及び代謝に関して設定した仮定が妥当であった可能性が示唆される。さらに、PBPK モデルを用いて、肺結核に対する臨床治療レジメンでヒトにデラマニドを反復経口投与後の定常状態における肺、脳、肝臓および心臓内のデラマニド濃度をシミュレーションした結果、いずれの臓器においても結核菌に対する有効濃度より高い値を示した。したがって、デラマニドは肺結核だけでなく肺外結核の治療に有用である可能性が示唆された。



以上のように，本研究成果は抗結核薬デラマニドの薬物動態特性，特にこれまで報告されていなかった分布に関する知見，非臨床データを用いたヒト薬物動態予測法および予測結果から肺外結核に対する有効性を示唆する情報を提供するものであり，臨床における他剤との併用および適応拡大に貢献することが期待される。

## 引用文献

- [1] World Health Organization. (2019). Global tuberculosis report 2019. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [2] Falzon D, Jaramillo E, Schönemann HJ, Arentz M, Bauer M, Bayona J, Blanc L, Caminero JA, Daley CL, Duncombe C, Fitzpatrick C, Gebhard A, Getahun H, Henkens M, Holtz TH, Keravec J, Keshavjee S, Khan AJ, Kulier R, Leimane V, Lienhardt C, Lu C, Mariandyshev A, Migliori GB, Mirzayev F, Mitnick CD, Nunn P, Nwagboniwe G, Oxlade O, Palmero D, Pavlinac P, Quelapio MI, Raviglione MC, Rich ML, Royce S, Rüsç-Gerdes S, Salakaia A, Sarin R, Sculier D, Varaine F, Vitoria M, Walson JL, Wares F, Weyer K, White RA, Zignol M. (2011). WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. *Eur Respir J*, 38: 516–528.
- [3] Sasaki H, Haraguchi Y, Itotani M, Kuroda H, Hashizume H, Tomishige T, Kawasaki M, Matsumoto M, Komatsu M, Tsubouchi H. (2006). Synthesis and antituberculosis activity of a novel series of optically active 6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]oxazoles. *J Med Chem*, 49:7854–7860.
- [4] Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, Kawasaki M, Tsubouchi H, Sasaki H, Shimokawa Y, Komatsu M. (2006). OPC-67683, a nitrodihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med*, 3:e466.
- [5] Gler MT, Skripconoka V, Sanchez-Garavito E, Xiao H, Cabrera-Rivero JL, Vargas-Vasquez DE, Gao M, Awad M, Park SK, Shim TS, Suh GY, Danilovits M, Ogata H, Kurve A, Chang J, Suzuki K, Tupasi T, Koh WJ, Seaworth B, Geiter LJ, Wells CD. (2012). Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med*, 366:2151–2160.
- [6] von Groote-Bidlingmaier F, Patientia R, Sanchez E, Balanag V Jr, Ticona E, Segura P, Cadena E, Yu C, Cirule A, Lizarbe V, Davidaviciene E, Domete L, Variava E, Caoili

J, Danilovits M, Bielskiene V, Staples S, Hittel N, Petersen C, Wells C, Hafkin J, Geiter LJ, Gupta R. (2019). Efficacy and safety of delamanid in combination with an optimised background regimen for treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel group phase 3 trial. *Lancet Respir Med*, 7:249-259.

[7] Shimokawa Y, Sasahara K, Koyama N, Kitano K, Shibata M, Yoda N, Umehara K. (2015). Metabolic mechanism of delamanid, a new antituberculosis drug, in human plasma. *Drug Metab Dispos*, 43: 1277–1283.

[8] Sasahara K, Shimokawa Y, Hirao Y, Koyama N, Kitano K, Shibata M, Umehara K. (2015). Pharmacokinetics and metabolism of delamanid, a novel anti-tuberculosis drug, in animals and humans: importance of albumin metabolism in vivo. *Drug Metab Dispos*, 43: 1267–1276. doi:10.1124/dmd.115.064527.

[9] Hirao Y, Koga T, Koyama N, Shimokawa Y, Umehara K. (2015). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods for determination of delamanid in mouse plasma and lung. *American J Anal Chem*, 6: 98–105.

[10] Shimokawa Y, Sasahara K, Yoda N, Mizuno K, Umehara K. (2014). Delamanid does not inhibit or induce cytochrome P450 enzymes in vitro. *Biol Pharm Bull*, 37:1727–1735.

[11] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry, In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry; 2020.

[12] European Medicines Agency. 21 June 2012. Guideline on the investigation of drug interactions. European Medicines Agency, London, United Kingdom.

[13] MHLW. Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of

information; 2018.

[14] Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev*, 9:215–236.

[15] Tsuji A. (2006). Impact of transporter-mediated drug absorption, distribution, elimination and drug interactions in antimicrobial chemotherapy. *J Infect Chemother*, 12:241–250.

[16] Hua WJ, Hua WX. (2014). The role of transporters in the pharmacokinetics of antibiotics. *Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 3:1000168.

[17] Arakawa H, Shirasaka Y, Haga M, Nakanishi T, Tamai I. (2012). Active intestinal absorption of fluoroquinolone antibacterial agent ciprofloxacin by organic anion transporting polypeptide, Oatp1a5. *Biopharm Drug Dispos*, 33:332–341.

[18] Alvarez AI, Pérez M, Prieto JG, Molina AJ, Real R, Merino G. (2008). Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. *J Pharm Sci*, 97: 3483–3493.

[19] Burckhardt G. (2012). Drug transport by organic anion transporters (OATs). *Pharmacol Ther*, 136:106–130.

[20] Schinkel AH, Jonker JW. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55:3–29.

[21] Schwarz UI, Gramatté T, Krappweis J, Oertel R, Kirch W. (2000). P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38:161–167.

[22] Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama Y. (2007). Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metab Dispos*, 35:1873–1879.

- [23] Lau YY, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. (2007). Effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 81:194–204.
- [24] Seithel A, Eberl S, Singer K, Auge D, Heinkele G, Wolf NB, Dörje F, Fromm MF, König J. (2007). The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab Dispos*, 35:779–786.
- [25] Pan X, Wang L, Grundemann D, Sweet DH. (2013). Interaction of ethambutol with human organic cation transporters of the SLC22 family indicates potential for drug-drug interactions during antituberculosis therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 57:5053–5059.
- [26] Petri N, Tannergren C, Rungstad D, Lennernäs H. (2004). Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model. *Pharm Res*, 21:1398–1404.
- [27] Chauvin B, Drouot S, Barrail-Tran A, Taburet AM. (2013). Drug-drug interactions between HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and antiviral protease inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 52:815–831.
- [28] Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. (2013). Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos*, 34:45–78.
- [29] Fahrmayr C, Fromm MF, König J. (2010). Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev*, 42:380 – 401.
- [30] Sekine T, Miyazaki H, Endou H. (2006). Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290:F251–F261.
- [31] European Medicines Agency. (2013). Assessment report. Delyba. European Medicines Agency, London, UK.
- [32] Lewis JM, Sloan DJ. (2015). The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Ther Clin Risk Manag*, 11:779–791.

- [33] Takikawa H. (2002). Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 9:443–447.
- [34] Lee JY. (2015). Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis*, 78: 47–55.
- [35] World Health Organization. Guidelines for the programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis. World Health Organization: Geneva, 2008.
- [36] Ruslami R, Ganiem AR, Dian S, Apriani L, Achmad TH, van der Ven AJ, Borm G, Aarnoutse RE, van Crevel R. (2013). Intensified regimen containing rifampicin and moxifloxacin for tuberculous meningitis: an open-label, randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*, 13: 27–35.
- [37] Miyamoto G, Shimokawa Y, Itose M, Koga T, Hirao Y, Kashiyama E. (2005). *Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*, Washington, DC, poster F-1466.
- [38] Okada M, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamasa K, Muraki Y, Kuwayama S, Izumiya M, Matsumoto M, Sakatani M. Poster F-1467: In vivo efficacy of novel antituberculous candidate OPC-67683 against multi-drug resistant M. tuberculosis using SCID mice and SCID-PBL/hu mice. In 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, 16–19 December 2005.
- [39] Wajima T, Yano Y, Fukumura K, Oguma T. (2004). Prediction of human pharmacokinetic profile in animal scale up based on normalizing time course profiles. *J Pharm Sci*, 93:1890–1900.
- [40] Fura A, Vyas V, Humphreys W, Chimalokonda A, Rodrigues D. (2008). Prediction of human oral pharmacokinetics using nonclinical data: examples involving four proprietary compounds. *Biopharm Drug Dispos*, 29:455–468.
- [41] Zhuang X, Lu C. (2016). PBPK modeling and simulation in drug research and development.

Acta Pharma Sin B: 6:430–440.

[42] Zurlinden TJ, Eppers GJ, Reisfeld B. (2016). Physiologically based pharmacokinetic model of rifapentine and 25-desacetyl rifapentine disposition in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 60:4860–4868.

[43] Curley P, Rajoli RK, Moss DM, Liptrott NJ, Letendre S, Owen A, Siccardi M. (2017). Efavirenz is predicted to accumulate in brain tissue: an in silico, in vitro, and in vivo investigation. *Antimicrob Agents Chemother*, 61: e01841-16.

[44] Davies B, Morris T. (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, 10:1093–1095.

[45] Sawada Y, Hanano M, Sugiyama Y, Harashima H, Iga T. (1984). Prediction of the volumes of distribution of basic drugs in humans based on data from animals. *J Pharmacokinet Biopharm* 12:587–596.

[46] Sadiq MW, Nielsen EI, Khachman D, Conil JM, Georges B, Houin G, Laffont CM, Karlsson MO, Friberg LE. (2017). A whole-body physiologically based pharmacokinetic (WB-PBPK) model of ciprofloxacin: a step towards predicting bacterial killing at sites of infection. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 44:69–79.

[47] Ballard P, Arundel PA, Leahy DE, Rowland M. (2003). Prediction of in vivo tissue distribution from in vitro data. 2. Influence of albumin diffusion from tissue pieces during an in vitro incubation on estimated tissue-tounbound plasma partition coefficients ( $K_{pu}$ ). *Pharm Res*, 20:857–863.

[48] Ring BJ, Chien JY, Adkison KK, Jones HM, Rowland M, Do Jones R, Yates James WT, Ku MS, Gibson CR, He H, Ragini V, Punit M, Volker F, Sandeep D, Sinha VK, Björnsson T, Lavé T, Poulin P. (2011). PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 3: comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci*,

100:4090–4110.

[49] Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Rajlic IL, Obach RS. (2013). Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 2: clearance. *J Clin Pharmacol*, 53:178–191.

[50] Jones RD, Jones HM, Rowland M, Gibson CR, Yates JW, Chien JY, Ring BJ, Adkison KK, Ku MS, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Björnsson T, Lavé T, Poulin P. (2011). PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 2: comparative assessment of prediction methods of human volume of distribution. *J Pharm Sci*, 100:4074–4089.

[51] Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Rajlic IL, Obach RS. 2013. Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 1: volume of distribution at steady state. *J Clin Pharmacol*, 53:167–177.

[52] Rainsford KD, Ford NLV, Brooks PM, Watson HM. (1980). Plasma aspirin esterases in normal individuals, patients with alcoholic liver disease and rheumatoid arthritis: characterization and the importance of the enzymic components. *Eur J Clin Invest*, 10:413–420.

[53] Liyasova MS, Schopfer LM, Lockridge O. (2010). Reaction of human albumin with aspirin in vitro: mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. *Biochem Pharmacol*, 79:784–791.

[54] Ma SF, Anraku M, Iwao Y, Yamasaki K, Kragh-Hansen U, Yamaotsu N, Hirono S, Ikeda T, Otagiri M. (2005). Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human serum albumin and identification of its catalytic active sites. *Drug Metab Dispos*, 33:1911–1919.



- [55] Means GE, Bender ML. 1975. Acetylation of human serum albumin by p-nitrophenyl acetate. *Biochemistry*, 14:4989–4994.
- [56] Kurono Y, Maki T, Yotsuyanagi T, Ikeda K. (1979). Esterase-like activity of human serum albumin: structure-activity relationships for the reactions with phenyl acetates and p-nitrophenyl esters. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 27:2781–2786.
- [57] Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. (2000). Role of Arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem J*, 349:813–819.
- [58] Sakurai Y, Ma SF, Watanabe H, Yamaotsu N, Hirono S, Kurono Y, Kragh-Hansen U, Otagiri M. 2004. Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. *Pharm Res*, 21:285–292.
- [59] Lockridge O, Xue W, Gaydess A, Grigoryan H, Ding SJ, Schopfer LM, Hinrichs SH, Masson P. (2008). Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines. *J Biol Chem*, 283:22582–22590.
- [60] Ohta N, Kurono Y, Ikeda K. (1983). Esterase-like activity of human serum albumin II: reaction with N-trans-cinnamoylimidazoles. *J Pharm Sci*, 72:385–388.
- [61] Sogorb MA, Carrera V, Vilanova E. (2004). Hydrolysis of carbaryl by human serum albumin. *Arch Toxicol*, 78:629–634.
- [62] Sultatos LG, Basker KM, Shao M, Murphy SD. (1984). The interaction of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion and their oxygen analogues with bovine serum albumin. *Mol Pharmacol*, 26:99–104.
- [63] Wolfbeis OS, Gürakar A. (1987). The effect of fatty acid chain length on the rate of arylester hydrolysis by various albumins. *Clin Chim Acta*, 164:329–337.
- [64] Tucker EW, Pieterse L, Zimmerman MD, Udawadia ZF, Peloquin CA, Gler MT, Ganatra S,

Tornheim JA, Chawla P, Caoili JC, Ritchie B, Jain SK, Dartois V, Dooley KE. (2019). Delamanid central nervous system pharmacokinetics in tuberculous meningitis in rabbits and humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 63:e00913-19.

## 論文目録

1. Antitubercular Agent Delamanid and Metabolites as Substrates and Inhibitors of ABC and Solute Carrier Transporters

H. Sasabe, Y. Shimokawa, **M. Shibata**, K. Hashizume, Y. Hamasako, Y. Ohzoe, E. Kashiya, K. Umehara

*Antimicrob agents chemother*, 60(6) (2016) 3497-3508.

2. Absorption, distribution and excretion of the anti-tuberculosis drug delamanidin rats: Extensive tissue distribution suggests potential therapeutic value for extrapulmonary tuberculosis

**M. Shibata**, Y. Shimokawa, K. Sasahara, N. Yoda, H. Sasabe, M. Suzuki, K. Umehara

*Biopharm Drug Dispos*, 38 (2017) 301-312.

3. Prediction of Human Pharmacokinetic Profiles of the Anti-tuberculosis Drug Delamanid from Nonclinical Data: Potential Therapeutic Value Against Extrapulmonary Tuberculosis

**M. Shibata**, M. Masuda, K. Sasahara, H. Sasabe, T. Sasaki, S. Kim, K. Takeuchi, K. Umehara, E. Kashiya

*Antimicrob agents chemother*, 65(8) (2021) e02571-20.

## 謝辞

本論文の執筆に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 立川 正憲教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の執筆に際し、多大なるお時間を割いて頂き、幾多の有益な御助言、御指導を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野 小暮 健太郎教授に心から感謝の意を表します。

本論文の執筆に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 異島 優准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御懇意なる御指導、御鞭撻を賜り、長年に渡り論文執筆の後押しをしていただいた大塚製薬株式会社 徳島研究所 榎山 英二所長、徳島研究所 前臨床研究センター 梅原 健センター長、徳島研究所 前臨床研究センター 薬物動態研究部 竹内 健二部長に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、御指導、御協力、有益な御助言を賜りました大塚製薬株式会社 徳島研究所 前臨床研究センター 薬物動態研究部 笹邊 裕之氏、下川 義彦氏、笹原 克則氏、依田 典朗氏、鈴木 智樹氏および大塚製薬株式会社 新薬開発本部 榊田 正敏氏、佐々木 智啓氏、金 盛烈氏に心から感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、御協力を賜りました積水メディカル株式会社 橋爪 研太氏、濱迫 裕介氏、大曾根 義泰氏、鈴木 水成氏に心から感謝の意を表します。

日頃から有益な御指導、御鞭撻を賜りました大塚製薬株式会社の諸先輩、同輩の皆様に心から御礼申し上げます。

最後になりましたが、深い理解をもって常に支えてくれ、応援してくれた妻と子供たちに心から感謝致します。また、郷里の祖父母と両親に深く感謝致します。