

実習レポート 分子薬物動態学教室

10191043 鈴木健一

実験日：2019/7/1 ~ 2019/7/4

実習班：グループ B-3 班

1 日目

in vivo 動物実験

動物実験のプロトコル

- 3 班：対照群
- 阻害群が FLV(fluvastatin)、OLM(olmesartan) を投与するのに対し、対照群は生理用食塩水を投与する。
- ラット体重：312g
- 投薬スケジュール priming dose として RIF 溶液 (30 mM in 生理食塩水)0.39 mL を頸静脈より瞬時投与する。その後、RIF 溶液 (3.75mM in 生理食塩水)1.248 mL/hr を頸静脈に定速静脈内投与する。定速投与 20 分後に FLV、OLM を各 0.670 μ mol 分、2.0 mM 溶液を 0.312 mL 頸動脈に瞬時投与する。
- 採血スケジュール生理用食塩水を瞬時投与後、1,3,5,10,15,30,60,90 分後にヘパリン 2 μ L を入れたチューブに大腿動脈から採血する予定だったが、血の出が悪かったため頸静脈から採血を行った。それに応じて採血のタイムスケジュールが 3,4,5,10,15,30,60,90 分となった。

2 日目

FLV, OLM, RIF の血漿中・臓器中濃度測定のための準備

- 検量線作成のための溶液を調整する。
- *in vivo* 実験で得た肝臓・腎臓サンプル、血漿サンプルを LC-MS/MS 測定用に調整する。

RIF の蛋白非結合形薬物分率の測定

- 非特異的な膜やデバイスへの薬物の定着を測定するために 30 μ M RIF の PBS 溶液を調整する。

- サンプルを遠心機で限外濾過する。

3 日目

生理学的薬物速度論 (PBPK) モデルを用いた薬物動態の *in silico* 解析

(1)

表 1 の実測値を片対数グラフにプロットして

$$C = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t)$$

を満たすパラメータを最小二乗法で求める。

結果

最小二乗法で求めた初期値は以下のようにになった。

	A	B	α	β
HX1	81	4.3	0.63	0.047
LX1	56	17	16.64	0.5264

(2)

最小二乗法で求めた初期値をもとに、非線形最小二乗法プログラムによって A, B, α , β の最適値を求める。また、それをもとに全身クリアランス CL_{tot} を求める。

プログラムを実行した結果パラメータの最適値は以下のようにになった。

	A	B	α	β
HX1	89.82	4.439	0.6698	0.04503
LX1	55.00	17.28	0.3215	0.009237

これをもとにして全身クリアランス CL_{tot} を求める。

$$C = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t)$$

の両辺を $t = 0$ から $t = \infty$ まで積分すると

$$\int_0^{\infty} C \, dt = AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta}$$

である。

また、HX1 と LX1 は胆汁排泄でのみ消失するので、

$$CL_{tot} = CL_H$$

が成り立つ。また、

$$CL_{tot} = \frac{Dose}{AUC}$$

$$CL_{int,H} = \frac{Q_h \cdot CL_H}{f_B \cdot (Q_h - CL_H)}$$

以上の式から AUC, CL_{tot} , $CL_{int,H}$ は以下ようになる。

	AUC	CL_{tot}	$CL_{int,H}$
HX1	232.7	42.9	505.0
LX1	2043.6	4.89	17.77

(3)

ラット *in vivo* における PS_{inf} , CL_{bile} , PS_{eff} を求める。

肝細胞数が 30 (10^6 cells/g liver)、肝臓の臓器容積が 29.75(mL/kg rat)、肝比重が 1.0(g/mL) であるから、

$$PS_{inf} \text{ [mL/min/kg rat]} = PS_{inf} \text{ [mL/min/} 10^6 \text{cells]} \times 30 \times 29.75 \times 1.0$$

として PS_{inf} , CL_{bile} を求める。また、実習書 2-9 にある式をもとに、 $CL_{met} = 0$ であることから

$$CL_{int,all} = PS_{inf} \times \frac{CL_{bile}}{PS_{eff} + CL_{bile}}$$

に PS_{inf} , CL_{bile} を代入して PS_{eff} を得る。以上を HX1,LX1 について計算した結果以下ようになった。

	PS_{inf}	CL_{bile}	PS_{eff}
HX1	520	1.34	0.0408
LX1	18.7	1.81	0.0986

(4)

LX1,HX1 の消失過程の律速段階を理解する。

HX1 は $Q_h=60$ mL/min/kg、 $f_B CL_{int,H}=151$ mL/min/kg であるため血流律速よりではあるが固有クリアランスの値も無視はできない程度である。LX1 は $Q_h=60$ mL/min/kg、 $f_B CL_{int,H}=5.33$ mL/min/kg であるから、固有クリアランス律速であると言える。また、固有クリアランスに対する律速段階は、どちらも肝臓から血液への backflux(PS_{eff}) が胆汁排出 (CL_{bile}) に対して小さいため

$$CL_{int,all} = PS_{inf}$$

に近似され、肝取り込み律速といえる。

(5)

各コンパートメントにおける物質収支式を立てる。

$$\frac{dC_{br}}{dt} = \frac{Q_{br}}{V_{br}} \left(C_a - \frac{C_{br}}{kp_{br}} \right) \quad (1)$$

$$\frac{dC_{mu}}{dt} = \frac{Q_{mu}}{V_{mu}} \left(C_a - \frac{C_{mu}}{kp_{mu}} \right) \quad (2)$$

$$\frac{dC_{he}}{dt} = \frac{1}{V_{he}} (Q_h (C_a - C_{he}) - f_B PS_{inf} C_{he} + f_h PS_{eff} C_h) \quad (3)$$

$$\frac{dC_h}{dt} = \frac{1}{V_h} (f_B PS_{inf} C_{he} - f_h PS_{eff} C_h - f_h CL_{bile} C_h) \quad (4)$$

$$\frac{dX_{bile}}{dt} = f_h CL_{bile} C_h \quad (5)$$

$$\frac{dC_a}{dt} = \frac{1}{V_a} (C_v - C_a) (Q_{br} + Q_{mu} + Q_h) \quad (6)$$

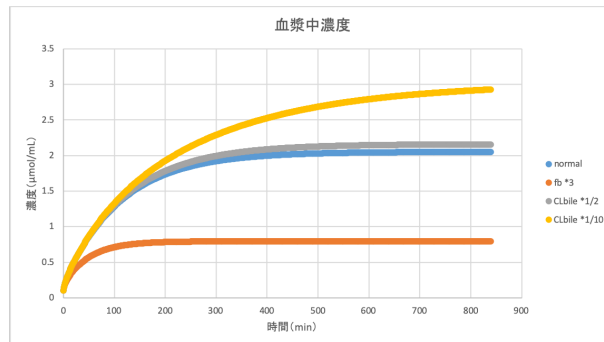
$$V_v \frac{dC_v}{dt} = Q_{br} \frac{C_{br}}{kp_{br}} + Q_{mu} \frac{C_{mu}}{kp_{mu}} + Q_{he} C_{he} - (Q_{br} + Q_{mu} + Q_h) C_v \quad (7)$$

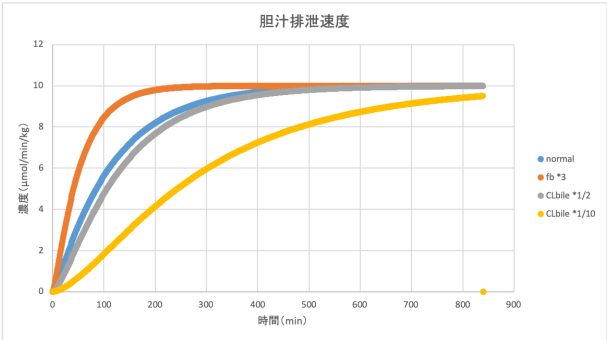
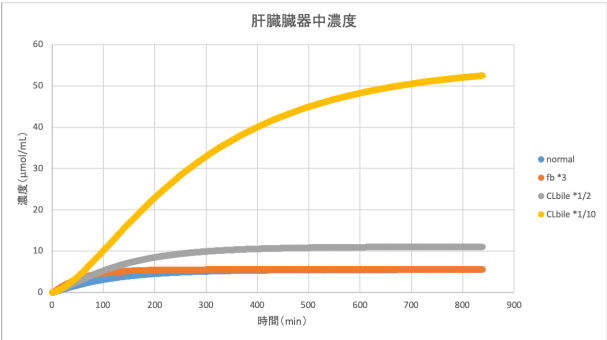
(6)

(5) のモデルをプログラム上で記述し、以下の課題に取り組む

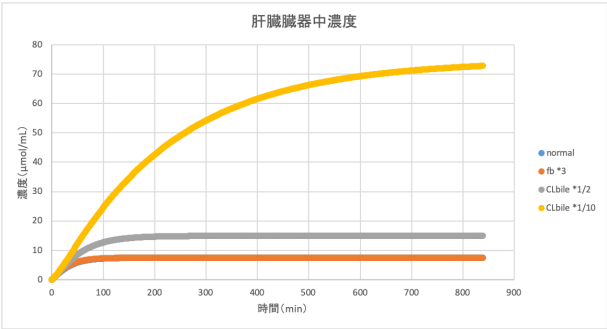
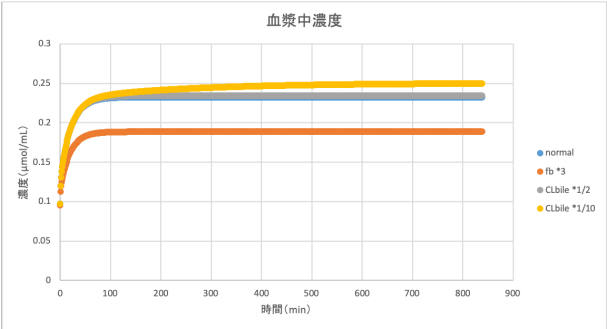
プログラムで求めた結果 HX1、LX1 のそれぞれの数値のグラフは以下ようになった。

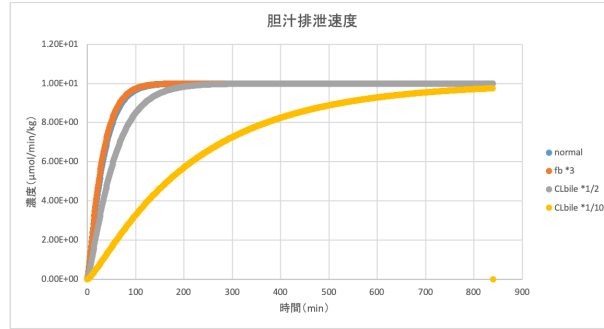
HX1





LX1





まず式を整理するにあたって律速段階を確認する。

HX1 - CL_H

$$Q_H : f_B CL_{int,H} = 60 : 151$$

より「やや血流律速」と言えるので、肝クリアランス CL_H は、 Q_H の変動に大きく影響される。また、 $f_B CL_{int,H}$ の変動にもわずかに影響される。

$$CL_H = \frac{Q_H f_B CL_{int,H}}{Q_H + f_B CL_{int,H}} \quad (8)$$

HX1 - $CL_{int,H}$

$$CL_{bile} : PS_{eff} = 1.34 : 0.0408$$

より「取り込み律速」と言えるので、肝固有クリアランス $CL_{int,H}$ は、 PS_{inf} の変動に大きく影響され、 CL_{bile} や PS_{eff} の変動にはほとんど影響されない。

$$CL_{int,H} \approx PS_{inf} \quad (9)$$

LX1 - CL_H

$$Q_H : f_B CL_{int,H} = 60 : 5.33$$

より「固有クリアランス律速」と言えるので、肝クリアランスは、 $f_B CL_{int,H}$ の変動に大きく影響され、 Q_H の変動にはほとんど影響されない。

$$CL_H \approx f_B CL_{int,H} \quad (10)$$

LX1 - $CL_{int,H}$

$$CL_{bile} : PS_{eff} = 1.81 : 0.0986$$

より「取り込み律速」と言えるので、肝固有クリアランス $CL_{int,H}$ は、 PS_{inf} の変動に大きく影響され、 CL_{bile} や PS_{eff} の変動にはほとんど影響されない。

$$CL_{int,H} \approx PS_{inf} \quad (11)$$

課題 1

HX1

定常状態では静注速度と消失速度が等しいことから

$$I = CL_{tot} \cdot C_{ss}$$

また HX1 は肝臓から胆汁を介する経路でのみ消失するので

$$CL_{tot} = CL_H$$

として良い。これと式 (8) より

$$C_{p,ss} = I \cdot \frac{Q_H + f_B \cdot CL_{int,H}}{Q_H \cdot f_B \cdot CL_{int,H}}$$

と表される。HX1 は「やや血流律速」であるため、 f_B が 3 倍になると血漿中濃度は $1/3$ とまでは行かないが、かなり減少することがグラフからも確認される。

また、定常状態では胆汁排泄速度 $\frac{dX_{bile}}{dt}$ が静注速度 I と等しいので、式 (5) より

$$C_{H,ss} = \frac{I}{f_h \cdot CL_{bile}}$$

が成り立つ。したがって肝臓臓器中濃度は f_B に依存しないので、濃度の上限は変わらない。しかし、濃度の変化については式 (4) より f_B に依存する項があるため、立ち上がりが早くなることがわかる。

最後に胆汁排泄速度 $\frac{dX_{bile}}{dt}$ は式 (5) より C_H に依存するので、グラフの立ち上がりが早いほど胆汁排泄速度のグラフの立ち上がりも早いことがわかる。

LX1

LX1 は HX1 とは異なって固有クリアランス律速であるため、式 (10) より

$$C_{p,ss} = \frac{I}{f_B \cdot CL_{int,H}}$$

が成り立つ。したがって、 f_B が 3 倍になると血漿中濃度は $1/3$ になることがグラフからも認められる。一方、 C_H に変化がないため、肝臓臓器中濃度と胆汁排泄速度のグラフに関しては変化が生じなかった。

課題 4

HX1

HX1 は取り込み律速の薬物なので、式 (9) より CL_{bile} が $1/2$ 倍になっても、肝固有クリアランスはほとんど変動せず、血漿中濃度もほとんど変化しない。しかし CL_{bile} が $1/10$ 倍になると取り込み律速とは

言えなくなるため、肝固有クリアランスが減少する。だが、HX1 は血流律速寄りであるため、肝固有クリアランスの変動の影響を受けにくく、血漿中濃度はさほど変化しない。一方、肝臓臓器中濃度は

$$C_{H,ss} = \frac{I}{f_h \cdot CL_{bile}}$$

が成り立つので CL_{bile} の変動が直接影響する。同様に $\frac{dX_{bile}}{dt}$ も式 (5) より CL_{bile} に依存するため、 CL_{bile} が減少すると、グラフの立ち上がりが遅くなり、濃度の最大値が増加する。また、胆汁排泄速度 $\frac{dX_{bile}}{dt}$ は式 (5) より CL_{bile} に依存するので、 CL_{bile} が減少に応じてグラフの立ち上がりが遅くなることがわかる。

LX1

LX1 も HX1 と同様に取り込み律速なので、 CL_{bile} が 1/2 倍になっても、肝固有クリアランスはほとんど変動せず、血漿中濃度もほとんど変化しない。しかし CL_{bile} が 1/10 倍になると取り込み律速とは言えなくなるため、肝固有クリアランスが減少する。LX1 は固有クリアランス律速なので、固有クリアランス減少の影響を受けやすいが、 CL_{bile} の減少に対してもそれほど血漿中濃度が増加しないことがグラフからわかる。肝臓臓器中濃度と胆汁排泄速度については HX1 と同じ議論が可能となるため、変化の具合も HX1 と同じようになった。

FLV, OLM の肝細胞への取り込みに対する阻害効果の解析

RIF の濃度が $100\mu\text{M}$ のときの取り込み (% of control) を % P_{dif} の初期値、取り込み (% of control) がだいたい $50 + 0.5 \times \Gamma P_{dif}$ になるような RIF 濃度の μM を K_i の初期値とした。

初期値を入力して、

$$\%CL = \frac{1}{1 + \frac{I_{RIF}}{K_i}} \cdot (100 - \%P_{dif}) + \%P_{dif}$$

の式に非線形最小二乗法プログラムによって fitting を行い、% P_{dif} , K_i の最適値を計算させると結果は以下ようになった。

	FLV	OLM
K_i	2.10	1.57
% P_{dif}	34.1	7.97

4 日目

限外濾過法による RIF の蛋白非結合形薬物分率の算出

1 ~ 3 班の平均回収率が 0.381、4 ~ 6 班の平均回収率が 0.167、であったので、RIF の蛋白非結合形薬物分率は

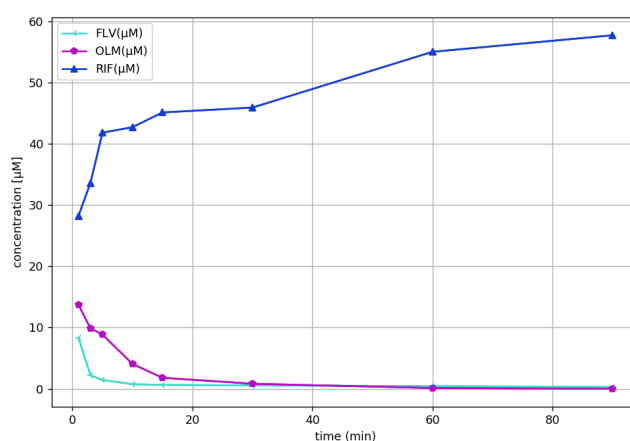
$$f_b = 0.381 \div 0.167 = 0.439$$

となった。

in vivo 動物実験における体内動態の解析

LC-MS/MS の定量データ・検量線データから算出された FLV, OLM, RIF の濃度は下表の通りとなった。FLV は 1 班のデータを借りている。

min	1	3	5	10	15	30	60	90
FLV 濃度推移 (μM)	8.31	2.2	1.44	0.74	0.641	0.543	0.429	0.29
OLM 濃度推移 (μM)	13.7	9.87	8.85	4.06	1.79	0.821	0.117	0
RIF 濃度推移 (μM)	28.2	33.6	41.8	42.7	45.1	45.9	55	57.7



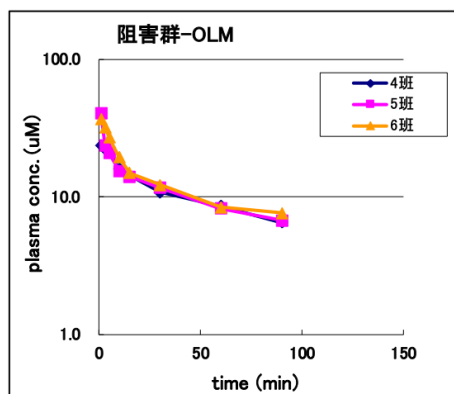
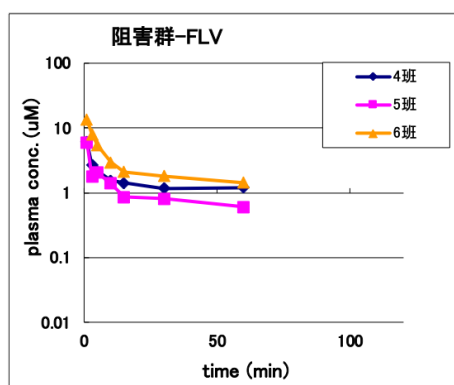
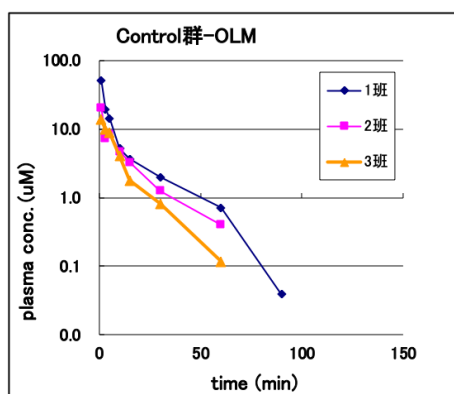
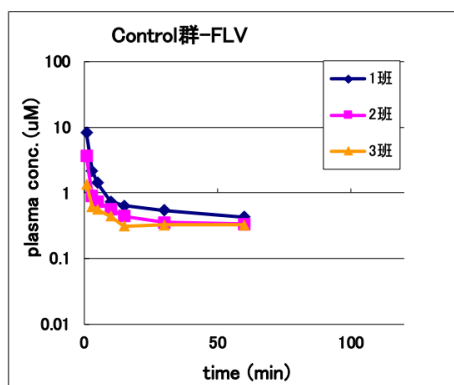
ここから 3 班の FLV、OLM の体内動態パラメータを算出する。 AUC_{0-90} は 1min, 3min のデータから線形的に 0min の数値を計算し、台形法で求める。さらに $AUC_{0-\infty}$ は、値のないところを消失相の傾きから外挿して計算する。FLV は 60min と 90min から消失相の傾きを求め、OLM は 30min と 60min から消失相の傾きを求め、90min の値に外挿して求めた。そして、測定された Dose の濃度を用いて、 CL_{tot} を

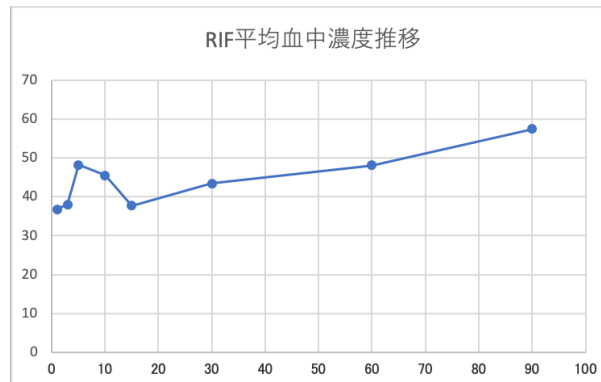
$$CL_{tot} = \frac{\text{Dose}}{AUC_{0-\infty}}$$

より計算した。最後に薬物濃度を 90min での血漿中薬物濃度で割ることで K_p を算出した。

	単位	FLV	OLM
AUC_{0-90}	nmol · min/mL	67.135	139.255
$AUC_{p,0-\infty}$	nmol · min/mL	89.3529094	141.0565251
$CL_{p,tot}$	mL/min/kg	22.38315477	0.987228346
$CL_{b,tot}$	mL/min/kg	33.40769368	21.16225835
$CL_{int,h}$	mL/min/kg	376.8875097	1720.702117
$C_{liver,90min}$	nmol/mL	2.42	0.46
$K_{p,app,liver}$		8.344827586	3.931623932

全ての班の FLV,OLM の濃度推移は以下のグラフのようになった。





また動態パラメータの表は以下のようになる。

FLV

・線形台形法によるAUC計算							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
AUC _{p,0min-Nmin}	9.8375	4.3115	#DIV/0!		6.8925	7.06	14.8625
AUC _{p,Nmin-Endmin}	57.2975	37.5155	0		118.94	80.955	188.815
End	90	90	90		90	90	90
・対数台形法により外装したAUC計算							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
β	0.0130525	0.0054056	#NUM!		0.0050467	0.0095344	0.0078064
AUC _{p,last-∞}	22.217909	52.538512	#NUM!		206.0771	85.689333	172.934
β 算出に利用した点	60, 90	60, 90	60, 90		60, 90	30,60	30,60
t=last	90	90	90		90	90	90
・0から∞までのAUC							
AUC _{p,0min-∞}	89.352909	94.365512	#DIV/0!		331.9096	173.70433	376.6115
Pharmacokinetics Analysis							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
AUC _p	89.352909	94.365512	#DIV/0!		331.9096	173.70433	376.6115
CL _{p,tot}	22.383155	21.194184	#DIV/0!		6.0257371	11.513818	5.3105122
CL _{b,tot}	33.407694	31.63311	#DIV/0!		8.9936375	17.184802	7.9261377
CL _{b,tot} (average)		32.52040186				11.3681925	
Flvastatinの消失過程はやや血流律速である。				in silico外挿			
Well stirred modelより							
	control	RIF	unit	RIF/control		ki	2.1
						P _{dif}	34.1
f _b CL _{int,H}	71.006283	14.025626	mL/min/kg				
CL _{int,H}	355.03141	70.128131	mL/min/kg	0.1975266		%CL _{int,h} =%P _{dif}	40.426913
・肝臓中血漿中濃度比							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
C _{liver}	2.42	2.8	1.8		2.98	1.35	5.41
K _{p,liver}	8.3448276	9.8591549	#DIV/0!		2.8653846	1.6523868	4.0074074
K _{p,liver ave}		9.101991258				2.841726268	

OLM

・台数法によるAUC計算							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
AUC _{p,0min-Nmin}	59.1	23.555	14.6575		23.825	44.6	37.875
AUC _{p,Nmin-Endmin}	269.6105	155.16	122.8425		906.9	887.3	961.9
End	90	90	90		90	90	90
・対数台形法により外装したAUC計算							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
β	0.0972614	0.0380805	0.064945		0.0093707	0.0066755	0.0078225
AUC _{p,last-∞}	0.397897	10.556585	1.8015251		693.64867	1006.6673	975.39543
β 算出に利用した2点	60,90	30,60	30,60		60,90	60,90	30,60,90
t=last		90	90		90	90	90
・0から∞までのAUC							
AUC _{p,0min-∞}	329.1084	189.27158	139.30153		1624.3737	1938.5673	1975.1704
Pharmacokinetics Analysis							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
AUC _p	329.1084	189.27158	139.30153		1624.3737	1938.5673	1975.1704
CL _{p,tot}	6.0770251	10.566827	14.357345		1.2312438	1.0316897	1.0125708
CL _{b,tot}	9.0701868	15.771383	21.428873		1.8376773	1.5398354	1.5112998
CL _{b,tot} (average)		15.42348072				1.629604163	
Olmesartanの消失仮定は固有クリアランス律速である。				in silico外挿			
Well stirred modelより					ki		1.57
	control	RIF	unit	RIF/control	P _{dif}		9
f ₀ CL _{int,H}	20.760007	1.6751	mL/min/kg				
CL _{int,H}	1092.6319	88.163158	mL/min/kg	0.0806888		%CL _{int,h} =%P _{dif}	15.693927
・肝臓中血漿中濃度比							
	1班	2班	3班		4班	5班	6班
Cliver	0.33	0.36	0.46		0.849	1.18	1.76
K _{p,liver}	8.5271318	0.8955224	3.9316239		0.1306154	0.1755952	0.2306684
K _{p,liver ave}		4.451426034				0.178959679	

今回の実習で用いた RIF は肝細胞の血管側に発現する取り込みトランスポーターである OATP 類を阻害する。したがって肝臓への取り込み阻害がなされると薬物の血中濃度が上昇することが想定される。今回の実習では薬物として FLV と OLM を用いた。その濃度推移について見てみると、FLV はコントロール群と阻害群であまり変化がないのに対して、OLM は阻害群のほうが濃度の低下が食い止められていることが認められる。したがって OLM は OATP 類が主となって肝取り込みをしていることが想定される。

一般的に未知のペアの薬物について、薬物間相互作用を予測する上で、なんのパラメーターを考慮する必要があるか。

薬物の取り込み・排出において、非線形的な挙動の原因となるのがトランスポーター、代謝酵素、血漿蛋白・組織蛋白との飽和である。これらが薬物同士で競合したり、影響し合わないかを考慮する必要がある。今回の実習では肝取り込みトランスポーターの阻害係数 K_i や拡散の影響 $\%P_{dif}$ に注目したが、それ以外にも胆汁排泄ベシクルや肝臓内の代謝酵素への阻害効果も検証する必要がある。また、薬によっては尿細管などでの再吸収トランスポーターを阻害することで尿中排泄効率を高める場合も考えられるなど、様々な要因を考慮する必要がある。

指定課題

1

$$\frac{CL_H}{F_H} = \frac{Dose}{AUC} = f_B \cdot CL_{int,H}$$

より、 $CL_{int,H}$ は AUC に反比例する。したがって、肝固有クリアランスは

$$\frac{1}{1.6} = 62.5\%$$

に低下する。

2

$$\%CL = \frac{1}{1 + \frac{10 \times 0.1}{0.25}} = 20\%$$

3

OATP1B3 の寄与率 x は以下のように求められる。

$$0.2x + (1 - x) = 0.625$$

$$x = 46.875\%$$

4

OATP1B1 の寄与率 y は以下のように求められる。

$$0.2 \times 0.46875 + 0.2y + (1 - 0.46875 - y) = \frac{1}{2.7}$$

$$y = 105.46\%$$

5

静脈内投与だった場合は、

$$AUC = \frac{Dose}{CL_H} = Dose \cdot \frac{Q_H + f_B \cdot CL_{int,H}}{Q_H \cdot f_B \cdot CL_{int,H}}$$

となる。肝固有クリアランス律速の場合は

$$AUC = \frac{Dose}{f_B \cdot CL_{int,H}}$$

となるので経口投与の場合と変わらないと考えらるが、血流律速の場合は

$$AUC = \frac{Dose}{Q_H}$$

となるので、AUC が変化しないと考えられる。

6

- 代謝酵素 X の寄与が他の代謝酵素に比べて小さい。
- 薬物 A には再取り込みも大きくなる。

などが考えられる。