

—総説—

## カニクイサルを用いた薬物相互作用試験のヒトへの 外挿性に関する研究

小笠原明人

**要約:** 医薬品開発過程で開発候補化合物の薬物相互作用の可能性を見極めることは、安全な医薬品を開発する上で重要である。本総説では、著者らの研究に基づき、カニクイサルを用いて主要な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) 3A が関与する薬物相互作用試験のヒトへの外挿性について述べる。カニクイサルに CYP3A のプローブ薬物であるミダゾラム (1 mg/kg) またはシンバスタチン (20 mg/kg) を経口投与した時、両薬物の血漿中濃度は可逆的な CYP3A 阻害剤であるケトコナゾールを併用投与 (経口投与 : 5 mg/kg, 20 mg/kg) することによって著しく上昇した。また、カニクイサルにおける血漿中ミダゾラム濃度は、ヒト CYP3A に対する不可逆的な阻害剤であるマクロライド系抗生物質 (エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン) を反復経口投与 (15 mg/kg, 1日2回, 3日間) することによって顕著に上昇した。さらに、エリスロマイシンおよびクラリスロマイシンに関しては、反復経口投与が終了した翌日もミダゾラムの血漿中動態に及ぼす作用が持続した。以上、カニクイサルで認められた CYP3A 阻害に起因する薬物相互作用は、いずれもヒトにおいて報告されている結果と同程度であることが明らかになった。したがって、カニクイサルを用いた本試験系は、開発候補化合物の臨床における薬物相互作用の危険性を評価するために有用であると考えられた。

**索引用語:** 薬物相互作用、カニクイサル、シトクロム P450、アゾール系抗真菌薬、マクロライド系抗生物質、mechanism-based inhibitor、ミダゾラム、シンバスタチン

## Usefulness of an Animal Model Using Cynomolgus Monkeys for Prediction of Drug-drug Interaction in Humans

Akihito OGASAWARA

**Abstract:** It is important to assess the potential for drug candidates to cause drug-drug interactions (DDIs) during drug development. This review describes the usefulness, based on our recent studies, of an animal model using cynomolgus monkeys for the prediction of clinical DDIs caused by inhibition of cytochrome P450 (CYP) 3A, a major drug-metabolizing enzyme in humans. Following oral dosing of midazolam (1 mg/kg) or simvastatin (20 mg/kg), typical substrates for CYP3A, to cynomolgus monkeys, the plasma concentrations of the two drugs were significantly increased by coadministration of ketoconazole (oral: 5 mg/kg, 20 mg/kg), a typical reversible inhibitor of human CYP3A. Furthermore, midazolam concentrations in plasma were significantly increased after repeated oral dosing of macrolide antibiotics, erythromycin, clarithromycin or azithromycin, which are irreversible inhibitors of human CYP3A. In addition, the effects of erythromycin and clarithromycin on the pharmacokinetics of midazolam were maintained on the day after completion of treatment of the macrolide antibiotics. Thus, the results of the DDIs studies using cynomolgus monkeys were similar to those in humans, suggesting that the cynomolgus monkey is a suitable animal model for the prediction of clinical DDIs caused by CYP3A inhibition.

**Key phrases:** drug-drug interaction, cynomolgus monkey, cytochrome P450,azole antifungal, macrolid antibiotic, mechanism-based inhibitor, midazolam, simvastatin

## 1. 緒言

近年、高齢化社会および生活習慣病の増加に伴い、臨床での薬物療法は多剤併用が主流になりつつある。服用された薬物は、消化管から生体内に吸収された後、血流により標的部位に分布して薬理作用を発現する。一方、生体は薬物を異物として認識し、主に複数の薬物代謝酵素群による代謝反応によって解毒化した後、尿や胆汁中に排泄する。そのため、薬物代謝酵素は、循環血液中の薬物濃度を決定する重要な因子の一つであり、臨床における薬効および副作用の発現に大きく関与している。薬物相互作用は、主に多剤併用療法において認められる事象であり、その発現機序から薬物動態学的な相互作用と薬力学的な相互作用に分類される。薬物動態学的な相互作用は全体の 53% を占め、そのうち代謝過程におけるものが最も多いことが報告されている<sup>1)</sup>。薬物相互作用に関する知見は 1960 年代に既に報告されていたが<sup>2)</sup>、本邦において薬物相互作用回避の重要性が再認識されたのは、1993 年に報告されたソリブジン事件である。これ以降、臨床における薬物相互作用が原因で市場からの撤退を余儀なくされた薬物(ミベフラジル、アステミゾール、シサプリド、セリバスタチンなど)が相次ぎ、薬物相互作用を回避した安全な医薬品の開発が重要視されている。

シトクロム P450 (CYP) は、薬物代謝において中心的な役割を担う酸化還元酵素であり、主に肝臓、小腸、腎臓、ならびに肺のミクロソーム画分に発現している。CYP は、基質特異性の異なる複数の分子種からなる遺伝子スーパーファミリーを形成しており<sup>3)</sup>、ヒトにおいては主に CYP1、CYP2、ならびに CYP3 ファミリーの分子種が薬物代謝に関与している。特に CYP3 ファミリーは、ヒトの肝臓において全 CYP 含量の約 30%<sup>4)</sup>を、また、小腸においては約 80%<sup>5)</sup>を占める主要な CYP 分子種である。

医薬品開発過程において、開発候補化合物の薬物代謝酵素に対する影響は、主に肝ミクロソーム画分、肝細胞、あるいは CYP 発現系ミクロソーム画分を用いて評価される。一方、ラットなどの実験動物を用いた薬物相互作用試験は、CYP の基質特異性および阻害剤感受性の動物種差の懸念から、その報告例は少ない。しかしながら、*in vitro* 試験の成績から *in vivo* での相互作用の程度を見積もるには、実測することが困難な薬物代謝酵素近傍での阻害剤濃度を見積もる必要があるなど限界があるため、臨床での薬物相互作用の予測精度向上を目的に、実験動物を用いた *in vivo* 試験を併用することは有用と思われる。

サルは医薬品開発研究において幅広く用いられている実験動物であり、特に薬物動態学研究および毒性学研究において、非げっ歯類の動物種として頻繁に選択される。ラットやイヌなどと比較してサルは遺伝学的にヒトに近く、特に旧世界サルに属するカニクイサルやアカゲサルの主

要な CYP 分子種のアミノ酸配列は、ヒトと高い相同性を示すことが報告されている<sup>6)</sup>。また、開発候補化合物のヒトにおける薬物動態は、サルを用いた実験結果から精度良く予測できることも報告されており<sup>7)</sup>、サルは薬物動態研究に不可欠な動物種として注目されている。

本総説では、カニクイサルを用いた薬物相互作用試験の有用性を評価するため、カニクイサルを用いて実施した CYP3A 阻害に基づく薬物相互作用試験の成績について述べる。

## 2. カニクイサルにおけるミダゾラムの体内動態に対するケトコナゾールの影響

薬物による CYP 阻害は、その機構から、1) 同一の基質結合部位に対する競合阻害、2) ヘム鉄への配位結合による可逆的な不活性化、3) 代謝物または代謝物中間体の共有結合による不可逆的な不活性化に大別される。分子内に含窒素複素環を有するアゾール系抗真菌薬は、CYP の活性中心に存在するヘム鉄に配位結合して不活性化することが知られており、その中でもケトコナゾールおよびイトラコナゾールは、特に CYP3A に対して強い阻害作用を有している<sup>8)</sup>。ケトコナゾールおよびイトラコナゾールが関与する薬物相互作用の報告は非常に多く、これらの薬物との併用投与により、CYP3A によって代謝される薬物の血漿中濃度は、著しく上昇することが報告されている<sup>9-16)</sup>。一方、分子内にトリアゾール環を有するフルコナゾールは、CYP3A に対する阻害作用が弱く、ケトコナゾールやイトラコナゾールに比べて併用薬に及ぼす影響は小さい<sup>17-19)</sup>。

そこで、カニクイサルを用いた薬物相互作用試験のヒトへの外挿性を検討するため、3 種類のアゾール系抗真菌薬(ケトコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾール)のカニクイサル CYP3A に対する阻害作用を評価した。なお、CYP3A に対するプローブ薬物として、ヒトおよびカニクイサルのいずれの動物種においても CYP3A によって主に 1'-水酸化体に代謝されるミダゾラムを使用した。

### 2. 1. 肝臓および小腸ミクロソーム画分におけるミダゾラム 1'-水酸化活性に対するアゾール系抗真菌薬の影響

ヒトおよびカニクイサルの肝臓ならびに小腸ミクロソームを用いて、各種アゾール系抗真菌薬のミダゾラム 1'-水酸化活性に対する阻害様式および阻害定数 ( $K_i$ ) を算出した (Table 1)。カニクイサルの肝臓および小腸ミクロソーム画分におけるアゾール系抗真菌薬の  $K_i$  は、ヒトのミクロソーム画分で得られた結果とほぼ同等であった。また、いずれの動物種においても、アゾール系抗真菌薬の阻害強度に肝臓と小腸のミクロソーム画分の間で、著しい違いは認められなかった。ケトコナゾールは、カニクイサルの肝

臓および小腸マイクロソーム画分において、ヒトと同様に非競合的阻害剤として作用した。一方、カニクイサルにお

**Table 1** Kinetic parameters for the inhibition of 1'-hydroxymidazolam formation by ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ), and fluconazole (FCZ).

Inhibitor	Microsome	Inhibition type		$K_i$ ( $\mu$ M)	
		Human	Monkey	Human	Monkey
KTZ	Liver	Noncom	Noncom	0.032	0.025
	Intestine	Noncom	Noncom	0.044	0.015
ITZ	Liver	Com	Noncom	0.13	0.096
	Intestine	Com	Noncom	0.099	0.062
FCZ	Liver	Noncom	Mixed	21	14
	Intestine	Noncom	Mixed	35	47

Each value represents the mean of duplicate measurements.  
Noncom : noncompetitive, Com : competitive, Mixed : mixed-type

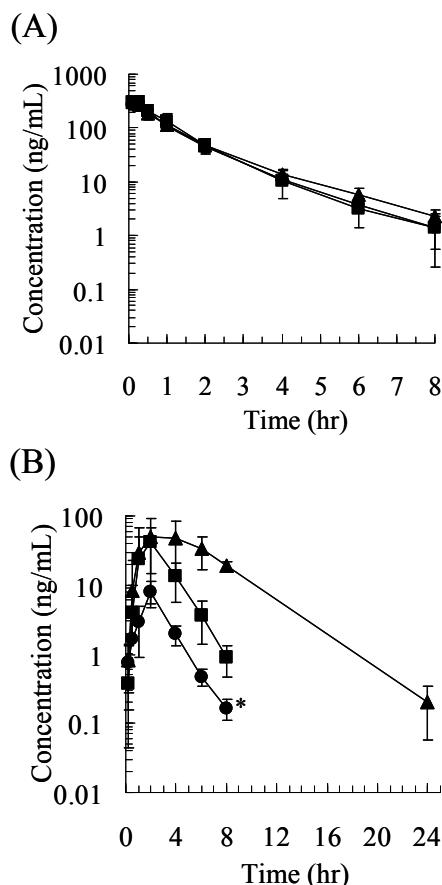
るイトラコナゾールおよびフルコナゾールの  $K_i$  はヒトと同程度であるものの、阻害様式は両動物種間で異なっていた。なお、両薬物のヒトにおける阻害様式（イトラコナゾール：競合的阻害、フルコナゾール：非競合的阻害）は、これまでに報告されている結果と一致した<sup>20-24</sup>）。ヒトの CYP3A 分子種のうち CYP3A4 および CYP3A5 に関しては、非常に多くの医薬品の薬物代謝に関与していることから詳細な検討が行われている。CYP3A5 のアミノ酸配列は CYP3A4 のそれと 83% の相同性を示すものの、その基質特異性および阻害剤感受性は CYP3A4 と異なることも報告されている<sup>22, 25-28</sup>）。カニクイサルの CYP3A 分子種に関しては、これまでに肝臓および小腸 cDNA ライブラリーから CYP3A4 cDNA および CYP3A5 cDNA が単離され、そのアミノ酸配列は、いずれもヒトの相同分子種と 90% 以上の相同性を示すことが報告されている<sup>6</sup>）。しかしながら、カニクイサルの肝臓および小腸における総 CYP3A 分子種発現量に占める CYP3A5 の割合は、ヒトに比べて大きいことも推察されており<sup>29</sup>）、これがヒトとカニクイサルの阻害様式の違いに影響した可能性も考えられた。

**2. 2. カニクイサルにおける血漿中ミダゾラム濃度に対するケトコナゾールの影響**

カニクイサルにミダゾラムを静脈内 (0.3 mg/kg) または経口投与 (1 mg/kg) した時の血漿中ミダゾラム濃度推移を Fig.1 に、血漿中ミダゾラム濃度から算出した PK パラメータを Table 2 に示した。ケトコナゾールの投与媒体を併用投与した時の血漿中ミダゾラム濃度推移(コントロール) から、カニクイサルにおけるミダゾラムの小腸および肝利用率 ( $F_{ABS} \cdot F_G$  および  $F_H$ ) は、それぞれ 0.023 および 0.696 と見積もられた。これは、他の動物種と同様、カ

ニクイサルにおけるミダゾラムの消化管吸収率を 100% と仮定した場合、経口投与されたミダゾラムは小腸を通過して門脈血液に至る過程でそのほとんどが代謝されて消失することを意味している。

ケトコナゾール併用下 (経口投与, 5 または 20 mg/kg)



**Fig. 1** Effect of oral coadministration of ketoconazole (●; 0 mg/kg, ■; 5 mg/kg, ▲; 20 mg/kg) on the plasma concentration time profiles of midazolam after intravenous (A) and oral (B) administration to monkeys at the doses of 0.3 and 1 mg/kg, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of data obtained from four monkeys, except where denoted. The point with an asterisk indicates the mean  $\pm$  S.D. of three monkeys.

ニクイサルにミダゾラムを静脈内投与した時、血漿中ミダゾラム濃度はコントロールと同程度であった。静脈内投与されたミダゾラムは、主に肝臓の CYP3A によって代謝され血漿中から消失する。したがって、本投与条件において、ケトコナゾールの肝 CYP3A に対する阻害作用は軽微であることが示唆された。一方、ミダゾラムを経口投与した時、ミダゾラムの  $C_{max}$  および  $AUC_{inf}$  は、ケトコナゾール併用投与 (経口投与, 5 または 20 mg/kg) で著しく上昇した。以上の結果から、カニクイサルにおけるケトコナゾール併用投与時の薬物相互作用は、主に小腸の CYP3A 阻害に起因していることが示唆された。

ヒトにおけるミダゾラムとケトコナゾールの薬物相互

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of midazolam following intravenous (0.3 mg/kg) or oral (1 mg/kg) administration of midazolam with a concomitant oral dose of vehicle or ketoconazole (5, 20 mg/kg).

	Intravenous (midazolam, 0.3 mg/kg)			Oral (midazolam, 1 mg/kg)		
	+ Vehicle	+Ketoconazole (5 mg/kg)	+Ketoconazole (20 mg/kg)	+ Vehicle	+ Ketoconazole (5 mg/kg)	+ Ketoconazole (20 mg/kg)
$C_{max}$ (ng/mL)				8.1±3.0	44.0±23.4	64.5±43.9
$T_{max}$ (hr)				1.8±0.5	1.8±0.5	3.5±1.9
$t_{1/2}$ (hr)	1.7±1.1	1.3±0.2	1.6±0.3	1.1±0.2	1.0±0.1	2.4±0.4*
$CL_{tot}$ (mL/hr/kg)	820±102	813±243	796±123			
$Vd_{ss}$ (mL/kg)	1043±53	916±208	1104±128			
$AUC_{inf}$ (hr·ng/mL)	371±50	396±120	384±60	20±4	117±73	434±148*
F				0.016±0.003	0.106±0.094	0.341±0.108*
$F_H$				0.696±0.038	0.699±0.090	0.705±0.046
$F_{ABS} \cdot F_G$				0.023±0.005	0.164±0.163	0.485±0.153
<i>Ratios (+ Ketoconazol/Vehicle)</i>						
$C_{max}$					6.3±4.7	8.7±7.4
$AUC_{inf}$					6.0±3.7	21.7±6.5
F					6.7±5.7	20.9±5.2
$F_H$					1.0±0.1	1.0±0.0
$F_{ABS} \cdot F_G$					7.2±6.9	20.6±4.7

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys.

\* $p < 0.05$ , compared with the values in the monkeys coadministered with vehicle.

**Table 3** Pharmacokinetic parameters of ketoconazole (KTZ) following oral (5, 20 mg/kg) administration of KTZ concomitant with midazolam (MDZ, 0.3 or 1 mg/kg).

KTZ (mg/kg)	MDZ	$T_{max}$ (hr)	$C_{max}$ (ng/mL)	$t_{1/2}$ (hr)	$AUC_{inf}$ (hr·ng/mL)
5	Oral (1 mg/kg)	2.5±1.0	41±23	3.0±1.0	148±88
20		5.0±2.6	346±226	2.5±0.2	2477±1185
5	Intravenous (0.3 mg/kg)	3.0±1.2	53±39	2.9±1.1	190±90
20		3.5±1.0	574±470	2.9±0.5	2067±973

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys.

作用は、ミダゾラムを静脈内投与した時にも認められており、ケトコナゾールによる肝 CYP3A 阻害が示唆されている（ケトコナゾール併用投与：200 mg、1 日 2 回投与、によりミダゾラムの AUC がコントロールに比べて約 5 倍上昇）<sup>30</sup>。また、ヒトにおけるケトコナゾールによるミダゾラムの血漿中動態に対する作用は、ミダゾラムを静脈内投与した時よりも経口投与した時のほうが大きいことが報告されている。つまり、ヒトにおけるケトコナゾールによる相互作用は、カニクイサルと異なり、小腸および肝臓の両方で生じていることを意味している。なお、ヒトとカニクイサルで認められたケトコナゾールによる肝臓および小腸 CYP3A に対する作用に違いは、薬物相互作用試験時の血漿中ケトコナゾール濃度（Table 3、ヒト  $C_{max}$ ：9.2  $\mu$ M、カニクイサル  $C_{max}$ ：0.65  $\mu$ M）の違いに起因していることが推察された。

### 3. カニクイサルにおけるシンバスタチンの体内動態に対するケトコナゾールの影響

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬のシンバスタチンは、代表的なスタチン系抗高脂血症治療薬として全世界で広く使用されている。シンバスタチンは分子内にラクトン環を有するプロドラッグであり、小腸および肝臓において HMG-CoA 還元酵素阻害活性を有するシンバスタチン酸に加水分解された後、薬理作用を発現する。スタチン系薬剤の有用性は、多くの臨床試験の結果から明らかであるが、副作用として腹痛、発疹、倦怠感などのほか、重篤なものとして横紋筋融解症が報告されている。また、横紋筋融解症の発症率は、CYP3A 阻害作用を有する薬物と併用投与した時に増大することが報告されている<sup>31,32</sup>。

シンバスタチンは、ヒトにおいて主に CYP3A によって 3 種類の代謝物（3'-水酸化体、3',5'-ジヒドロキシ体、6'-エキソメチレン体）に代謝された後、胆汁を介して排泄される<sup>33,34</sup>。そのため、シンバスタチンは、CYP3A が関与する薬物相互作用試験におけるプローブ薬物の一つとして推奨されている。ヒトにおけるシンバスタチンの血漿中濃度は、CYP3A 阻害作用を有するケトコナゾールやイトラコナゾールなどのアゾール系抗真菌薬との併用時に著しく上昇することが報告されており<sup>12,16</sup>、欧米や我が国において併用注意あるいは併用禁忌となっている。

そこで、カニクイサルの CYP3A 阻害に起因した薬物相互作用試験の有用性を評価するため、カニクイサルにおける血漿中シンバスタチン濃度に対するケトコナゾールの影響を評価し、ヒトで報告されている結果と比較した。

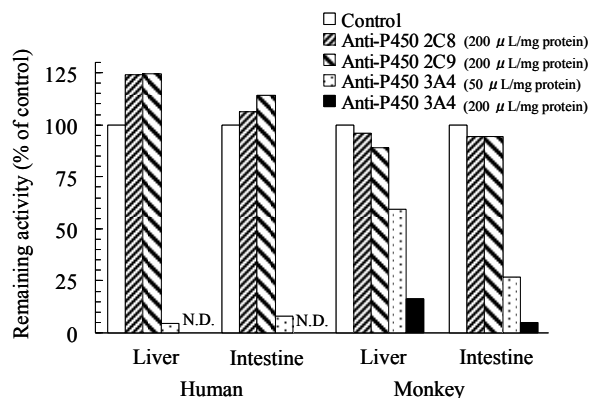
### 3. 1. カニクイサルにおけるシンバスタチン代謝に関する CYP 分子種の推定

カニクイサルにおけるシンバスタチン代謝に関する CYP 分子種を推定するため、カニクイサルの肝および小腸マイクロソーム画分を用いて、シンバスタチン代謝に対する阻害剤感受性試験および抗体阻害試験を行った。カニクイサルにおけるシンバスタチン代謝活性は、ヒトと同様、CYP3A の特異的阻害剤であるケトコナゾールにより著しく阻害された (Table 4)。また、カニクイサルの肝臓および小腸マイクロソーム画分におけるシンバスタチン代謝活性は、ヒトと同様、抗ヒト CYP3A ウサギ血清存在下で著しく減少した (Fig. 2)。一方、抗ヒト CYP2C8 および抗ヒト CYP2C9 ウサギ血清添加時のシンバスタチン代謝活性は、いずれのマイクロソーム画分においてもコントロールと同程度であった。以上の結果から、カニクイサルにおいてシンバスタチンは、主に CYP3A によって代謝されることが示唆された。

**Table 4** IC<sub>50</sub> values of ketoconazole for simvastatin metabolism in human and monkey microsomes.

	Microsome	IC <sub>50</sub> (μM)
Human	Liver	0.023
	Intestine	0.051
Monkey	Liver	0.012
	Intestine	0.007

Each value represents the mean of duplicate determinations.



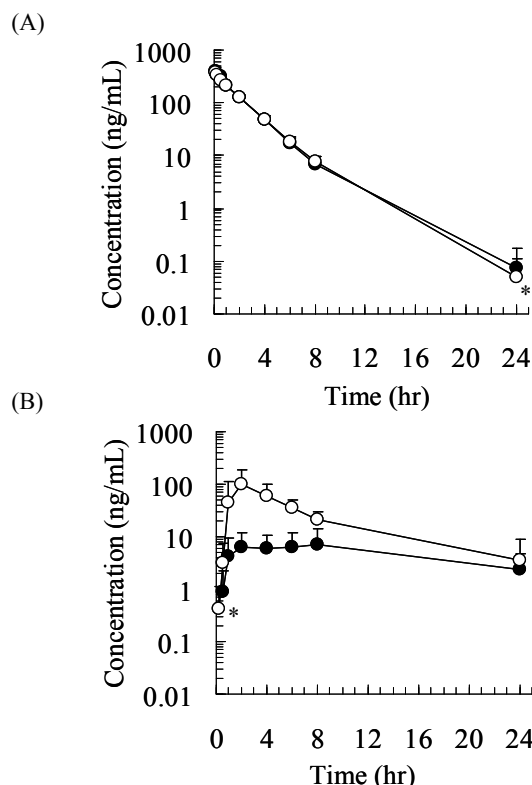
**Fig. 2** Effects of anti-human CYP antisera on simvastatin metabolism in human and monkey microsomes.

Before determining simvastatin metabolic activity, human and monkey microsomes were pre-incubated at room temperature for 20 min with 50 μL/mg or 200 μL/mg microsomal protein of rabbit serum for human CYPs (2C8, 2C9, 3A4) or control serum. Bars represent the mean of duplicate measurements.

### 3. 2. カニクイサルにおけるシンバスタチン投与時の血漿中シンバスタチン濃度に対するケトコナゾールの影響

カニクイサルにケトコナゾールを併用投与 (経口投与,

20 mg/kg) した時の血漿中シンバスタチン濃度推移を Fig.3 に、また、PK パラメータを Table 5 に示した。シンバスタチンをカニクイサルに経口投与 (20 mg/kg) した時の生体内利用率は、0.008 と著しく低かった。また、シンバスタチンの小腸および肝臓における利用率は、それぞれ 0.016 および 0.52 と見積もられ、ミダゾラムと同様、肝臓よりもむしろ小腸において初回通過代謝を受けることが明らかとなった。



**Fig. 3** Effects of oral coadministration of ketoconazole (●; 0 mg/kg, ○; 20 mg/kg) on the plasma concentration-time profiles of simvastatin after intravenous (A) and oral (B) administration to monkeys at the doses of 1 and 20 mg/kg, respectively. Each point represents the mean ± S.D. of data obtained from four monkeys, except where denoted. The points with an asterisk indicate the mean ± S.D. of three monkeys or the mean of two monkeys.

カニクイサルにケトコナゾール併用下でシンバスタチンを経口投与 (20 mg/kg) した時、血漿中シンバスタチン濃度はシンバスタチン単独投与時 (コントロール) に比べて上昇し、C<sub>max</sub> および AUC はそれぞれ 12.9 倍および 6.3 倍増加した (Fig.3B、Table 5)。一方、シンバスタチンを静脈内投与 (1 mg/kg) した時の血漿中シンバスタチン濃度は、ケトコナゾール併用投与により影響を受けなかった (Fig. 3A、Table 5)。以上の結果から、カニクイサルにおけるケトコナゾールによる薬物相互作用は、主に小腸における CYP3A 阻害に起因することが示唆された。臨床試験においては、ケトコナゾール併用投与 (1 日 1 回、400 mg、10 日間) により、シンバスタチンの C<sub>max</sub> および AUC は

**Table 5** Pharmacokinetic parameters of simvastatin following intravenous (1 mg/kg) or oral (20 mg/kg) administration of simvastatin with a concomitant oral dose of vehicle or ketoconazole (20 mg/kg).

		Intravenous (simvastatin, 1 mg/kg)		Oral (simvastatin, 20 mg/kg)	
		+ Vehicle	+ Ketoconazole (20 mg/kg)	+ Vehicle	+ Ketoconazole (20 mg/kg)
$C_{max}$	(ng/mL)			7.9±6.1	104.9±86.3
$T_{max}$	(hr)			5.0±2.6	4.0±2.3
$t_{1/2}$	(hr)	2.1±0.8	1.9±0.6		4.8±2.3
$CL_{tot}$	(mL/hr/kg)	1288±110	1309±110		
$Vd_{ss}$	(mL/kg)	2567±245	2770±507		
AUC	(hr·ng/mL)	773±64	762±68	120±95	587±343*
F				0.008±0.006	0.038±0.021*
$F_H$		0.52±0.04	0.52±0.04		
$F_{ABS} \cdot F_G$				0.016±0.013	0.075±0.042
<i>Ratios (+ Ketoconazole/+ Vehicle)</i>					
$C_{max}$					12.9±4.6
AUC			1.0±0.1		6.3±2.6
F					6.3±2.6
$F_H$			1.0±0.1		
$F_{ABS} \cdot F_G$					6.6±2.8

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys.

\* $p < 0.05$ , compared with the values in the monkeys coadministered with vehicle.

**Table 6** Pharmacokinetic parameters of ketoconazole following oral (20 mg/kg) administration of ketoconazole concomitant with simvastatin (1 or 20 mg/kg).

		Oral (ketoconazole, 20 mg/kg)	
		+ Simvastatin (i.v., 1 mg/kg)	+ Simvastatin (p.o., 20 mg/kg)
$C_{max}$	(ng/mL)	719±637	621±569
$T_{max}$	(hr)	2.5±1.0	3.5±1.9
$t_{1/2}$	(hr)	4.6±0.7	3.0±0.6
AUC	(hr·ng/mL)	1710±1325	2167±814

Each value represents the mean ± S.D. of four monkeys.

それぞれ 7.4 倍および 12.6 倍上昇したと報告されており<sup>16)</sup>、カニクイサルで認められた血漿中シンバスタチン濃度の上昇率は、ヒトにおいて報告されている結果と同程度であった。しかしながら、ヒトにおける血漿中シンバスタチン濃度の消失半減期は、ケトコナゾール併用により約 2 倍遅延しており<sup>16)</sup>、ケトコナゾールによる肝臓でのシンバスタチン代謝阻害が示唆されている。カニクイサルにおける血漿中ケトコナゾール濃度は、ミダゾラムとの併用試験時と同様、ヒトに比べて明らかに低いことから (Table 6)、ケトコナゾールの体内暴露の違いがケトコナゾールの CYP3A 阻害作用の違いに影響したと推察された。Ishigami らは、ラットを用いてシンバスタチンとイトラコナゾールの薬物相互作用試験を行い、イトラコナゾールを併用経口投与 (50 mg/kg) することによりシンバスタチンの AUC は約 1.6 倍増加することを報告している<sup>35)</sup>。しかしながら、ヒトにおけるイトラコナゾールのシンバスタチンの体内動態に及ぼす作用は、ラットに比べて顕著である (AUC : 10 倍以上増加)<sup>12)</sup>。なお、ラットとヒトの間で認められ

たイトラコナゾールに対する感受性の違いは、シンバスタチン代謝に関与する CYP 分子種の違い (ヒト : CYP3A 分子種、ラット : CYP2C 分子種) に起因すると推察されている。これに対して、カニクイサルにおいてシンバスタチンは、ヒトと同様に主に CYP3A によって代謝されること明らかとなった。また、カニクイサルにおける血漿中シンバスタチン濃度は、ヒトと同様、ケトコナゾール併用時に顕著に上昇した。

#### 4. カニクイサルにおけるミダゾラムの体内動態に対するマクロライド系抗生物質の影響

代謝物または代謝物中間体が CYP に共有結合することによって不可逆的に不活性化する阻害剤は、mechanism-based inhibitor と呼ばれ、その *in vivo* における阻害作用は、不活性化された CYP が再合成されるまで継続する。そのため、mechanism-based inhibitor は併用薬の血漿中濃度に与える影響が大きく、重篤な副作用発現に至る場合が多いことから、臨床において最も回避すべき薬物相互作用である。開発候補化合物の不可逆的な CYP 阻害の可能性は、主に *in vitro* 試験にてマイクロソーム画分のインキュベーション時間依存的な CYP 活性の変動 (time-dependent inhibition : TDI) を測定して評価する。さらに、開発候補化合物が不可逆的な CYP 阻害作用を有する場合、ヒトにおける薬物相互作用を定量的に予測する方法論も報告されている。しかしながら、精度良く *in vivo* での作用を見積もるには、評価化合物の *in vitro* TDI 試験での不活性化パラメータ、ヒトにおける薬物代謝酵素近傍の評価化合物濃度、併用薬の全身クリアランスに占める不

活性化される酵素による代謝クリアランスの割合、ならびに不活性化される酵素のヒトにおける turnover rate を適切に見積もる必要があり、非臨床試験において、これら全てを精度良く見積もることは非常に困難である。

そこで、ヒト CYP3A に対する典型的な mechanism-based inhibitor であるマクロライド系抗生物質 (エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン) を用いて、カニクイサルの CYP3A に対する作用を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。

#### 4. 1. ヒトおよびカニクイサルにおけるミダゾラム 1'-水酸化活性に対するマクロライド系抗生物質の作用 (可逆的阻害作用)

ヒトおよびカニクイサルの肝臓ならびに小腸マイクロソーム画分を用いて、各種マクロライド系抗生物質のミダゾラム 1'-水酸化活性に対する IC<sub>50</sub> を算出した (Table 7)。なお、本試験はマクロライド系抗生物質の可逆的な CYP3A 阻害作用を評価するため、マイクロソーム画分とマクロライド系抗生物質のプレインキュベーションは CYP3A の補酵素である NADPH の非存在下で行い、さらに CYP3A 活性は反応時間 5 分以内で測定した。カニクイサルにおけるエリスロマイシンおよびクラリスロマイシンの可逆的な阻害作用は、ヒトに比べて若干強い傾向があるものの、両動物種間の IC<sub>50</sub> の乖離は 2 倍以内であった。一方、アジスロマイシンの阻害作用は、いずれのマイクロソーム画分においても他のマクロライド系抗生物質に比べて弱く、阻害率は添加濃度 160 μM においても 20% 程度であった。

**Table 7** IC<sub>50</sub> values of erythromycin, clarithromycin, and azithromycin for 1'-hydroxymidazolam formation in liver and intestinal microsomes obtained from human and monkey.

Macrolide	IC <sub>50</sub> (μM)			
	Human		Monkey	
	Liver	Intestine	Liver	Intestine
Erythromycin	28	25	18	15
Clarithromycin	55	54	34	32
Azithromycin	>160	>160	>160	>160

Each value represents the mean of two determinations.

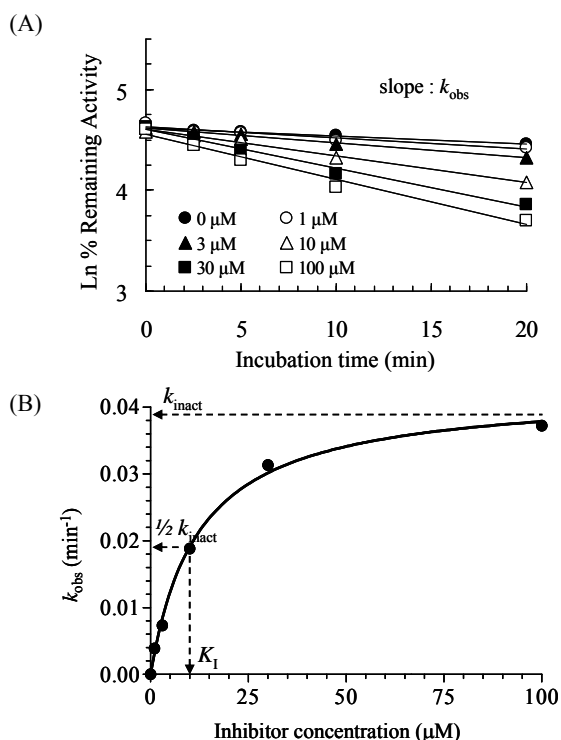
#### 4. 2. ヒトおよびカニクイサルにおけるミダゾラム 1'-水酸化活性に対するマクロライド系抗生物質の作用 (Time-dependent inhibition)

マクロライド系抗生物質の CYP3A に対する不活性化作用は、ヒトおよびカニクイサルのマイクロソーム画分を用いた *in vitro* 試験にて評価した。まず、マクロライド系抗生物質、NADPH ならびにマイクロソーム画分を含む反応系を 37°C にてインキュベーションし、CYP3A に対する不活性化反応を行った。次いで、経時的に反応溶液の一部を分取

し、これを CYP3A の基質であるミダゾラムを含む反応系に添加して、残存する CYP3A 活性を測定した。不活性化反応時間 (インキュベーション時間) を横軸に、CYP3A 活性の残存率を縦軸にプロットすると、残存率は不活性化反応時間および阻害剤濃度に依存して低下する。これらを直線回帰し、回帰直線の傾きに相当する見かけの不活性化速度定数  $k_{obs}$  を算出した (Fig. 4A)。さらに、不活性化速度定数と阻害剤濃度の間には (式 1) の関係が成立することから、不活性化パラメータ ( $K_I$  および  $k_{inact}$ ) を非線形最小二乗法にて近似して算出した (Fig. 4B)。

$$k_{obs} = k_{inact} \cdot [I] / (K_I + [I]) + k_d \quad (式 1)$$

- $k_{inact}$  : 最大不活性化速度定数
- $K_I$  : 見かけの解離定数
- [I] : 阻害剤濃度
- $k_d$  : 阻害剤非存在下の不活性化速度定数



**Fig. 4** Methods for the calculation of inactivation parameters,  $k_{obs}$  (A),  $k_{inact}$ , and  $K_I$  (B).

To determine the inactivation kinetic constants for CYP3A, the natural logarithm of the remaining MDZ 1'-hydroxy activity is plotted against the incubation time. The apparent inactivation rate constant ( $k_{obs}$ ) is determined from the slope of the initial linear phase. Furthermore, the value of  $k_{obs}$  is plotted against the inhibitor concentrations, and the inactivation kinetic parameters ( $k_{inact}$  and  $K_I$ ) were determined by the nonlinear least-squares method

CYP3A に対するマクロライド系抗生物質の不活性化パラメータを Table 8 にまとめた。クラリスロマイシンのカ

**Table 8** Inactivation kinetic parameters of erythromycin, clarithromycin, and azithromycin for CYP3A in liver and intestinal microsomes obtained from human and monkey.

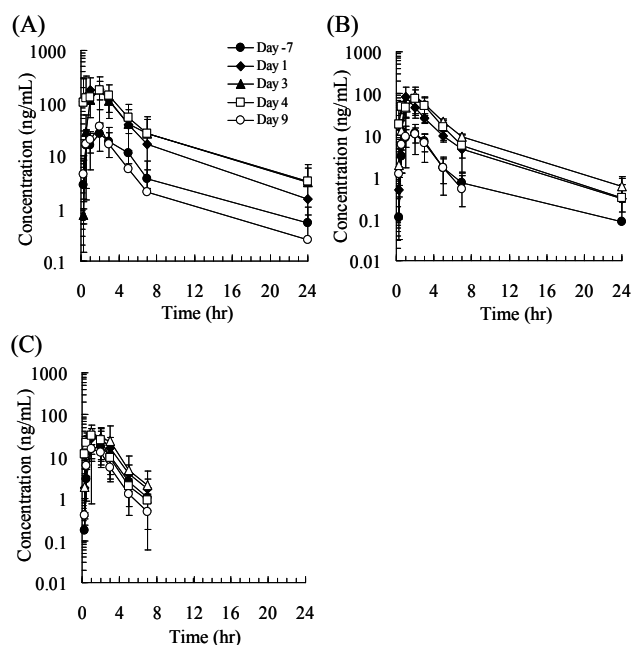
	Human		Monkey	
	Liver	Intestine	Liver	Intestine
<b>Erythromycin</b>				
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	15.6	26.5	6.4	5.1
$k_{\text{inact}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0325	0.0218	0.0352	0.0123
$k_{\text{inact}}/K_I$ ( $10^{-3} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )	2.1	0.8	5.5	2.4
$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0029	0.0116	0.0000	0.0054
<b>Clarithromycin</b>				
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	12.3	32.6	13.5	3.5
$k_{\text{inact}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0425	0.0271	0.0325	0.0292
$k_{\text{inact}}/K_I$ ( $10^{-3} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )	3.5	0.8	2.4	8.3
$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0075	0.0120	0.0000	0.0049
<b>Azithromycin</b>				
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	449	1281	455	723
$k_{\text{inact}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0072	0.0093	0.0037	0.014
$k_{\text{inact}}/K_I$ ( $10^{-3} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )	0.016	0.0073	0.0081	0.020
$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0033	0.0056	0.0000	0.0030

Each value represents the mean of two determinations.

ニクイサル肝ミクロソーム画分における  $k_{\text{inact}}$  および  $K_I$  は、いずれもヒト肝ミクロソーム画分における結果と同程度であった。しかしながら、カニクイサルにおけるエリスロマイシンの  $k_{\text{inact}}/K_I$  は、いずれのミクロソーム画分においてもヒトに比べて約3倍大きく、CYP3A不活性化作用は、ヒトに比べてカニクイサルで強いことが示唆された。また、クラリスロマイシンに関しても、小腸ミクロソーム画分における阻害剤感受性に種差が認められ、エリスロマイシンと同様、カニクイサルでさらに強いCYP3A不活性化作用 ( $k_{\text{inact}}/K_I$ ) が確認された (ヒト:  $0.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 、カニクイサル:  $8.3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )。これらの種差は、カニクイサルにおけるエリスロマイシンおよびクラリスロマイシンの  $K_I$  が、ヒトの1/10から1/5程度であったことに由来する。なお、アジスロマイシンのCYP3A不活性化作用は、いずれの動物種においても他のマクロライド系抗生物質に比べて著しく小さかった。Unoらのグループは、カニクイサルの主要組織におけるCYP分子種の発現レベルをreal-time RT-PCRにて測定し、小腸で発現しているCYP分子種としてCYP2J2、CYP3A4、CYP3A5、CYP4F11、CYP4F12、ならびにCYP4F45を確認している<sup>29)</sup>。さらに、カニクイサル小腸の総CYP3A発現量に占めるCYP3A5の割合は、ヒトに比べて大きいことも推察されている<sup>29)</sup>。また、ヒトCYP3A4のmechanism-based inhibitor (ベラパミルおよびエリスロマイシン) に対する感受性は、CYP3A5と異なることも報告されていることから<sup>36, 37)</sup>、小腸ミクロソーム画分において認められた顕著な動物種差は、CYP3A分子種の発現量の違いに起因している可能性も考えられた。

#### 4. 3. カニクイサルにおけるマクロライド系抗生物質反復経口投与時の血漿中ミダゾラム濃度の変動

カニクイサルにおけるマクロライド系抗生物質の *in vivo* での作用は、血漿中ミダゾラム濃度を指標に評価した。マクロライド系抗生物質は15 mg/kgを1日2回、3日間経口投与した。また、ミダゾラムは抗生物質投与7日前 (Day -7)、抗生物質投与1日目 (Day1) と3日目 (Day3)、さらに抗生物質3日間投与の翌日 (Day 4) と6日後 (Day9)



**Fig. 5** Effects of erythromycin (A), clarithromycin (B), and azithromycin (C) on the plasma concentration-time profiles of midazolam after oral administration (1 mg/kg) to cynomolgus monkeys. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of data obtained from four monkeys. Plasma concentrations of midazolam were below the lower limit of quantification (0.3 ng/mL) at 24 h after dosing during the azithromycin phase (C).



**Table 9** Pharmacokinetic parameters of midazolam following oral administration (1 mg/kg) of midazolam in the absence and presence of erythromycin, clarithromycin, and azithromycin (15 mg/kg b.i.d. for 3 days).

		Day-7	Day 1	Day 3	Day 4	Day 9
Erythromycin	C <sub>max</sub> (ng/mL)	28	169** (7.7)	195** (7.3)	141** (5.5)	28 (1.2)
	AUC (hr·ng/mL)	116	597* (9.1)	747** (7.0)	633* (7.3)	80 (0.7)
Clarithromycin	C <sub>max</sub> (ng/mL)	13	79*** (6.2)	73*** (5.9)	80*** (6.1)	13 (1.0)
	AUC (hr·ng/mL)	35	197*** (6.0)	323*** (9.9)	244*** (7.3)	34 (1.1)
Azithromycin	C <sub>max</sub> (ng/mL)	20	38** (2.0)	45** (2.3)	31* (1.6)	16 (0.8)
	AUC (hr·ng/mL)	51	80 (1.6)	94* (2.0)	66 (1.4)	37 (0.7)

Each value represents the geometric mean of four monkeys.

The values in parentheses represent the ratio to control values obtained on Day -7.

\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 compared with control values obtained on Day -7.

にそれぞれ経口投与 (1 mg/kg) した。Fig. 5 に、ミダゾラム単独またはマクロライド系抗生物質を併用投与した時の血漿中ミダゾラム濃度推移を示した。また、ミダゾラムの PK パラメータを Table 9 にまとめた。カンクイサルにおける血漿中ミダゾラム濃度は、マクロライド系抗生物質を反復経口投与することにより著しく上昇した (Fig. 5)。エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ならびにアジスロマイシン反復投与最終日 (Day 3) におけるミダゾラムの AUC は、コントロール (Day -7) に比べて、それぞれ 7.0 倍、9.9 倍、ならびに 2.0 倍上昇し、いずれも臨床試験で認められているミダゾラムの AUC 上昇率(それぞれ 3.4 - 4.4 倍、7.0 倍、ならびに 1.3 倍)<sup>38-40)</sup>と同程度であった。また、エリスロマイシンおよびクラリスロマイシンの CYP3A 阻害作用は、マクロライド系抗生物質の反復投与が終了した翌日 (Day 4) も持続し、ミダゾラムの AUC はいずれもコントロールに比べて 7.3 倍上昇した。Day 4 におけるミダゾラム投与直前の血漿中エリスロマイシンおよびクラリスロマイシン濃度(それぞれ 0.01 μM および 0.4 μM) は、いずれも可逆的な CYP3A 阻害試験時の IC<sub>50</sub> (Table 7、15-34 μM) に比べて著しく低いことから、Day 4 に認められたマクロライド系抗生物質の CYP3A 阻害作用は CYP3A の不活性化に起因することが推察された。

医薬品開発過程における開発候補化合物の CYP 阻害作用の確認は、主にヒト試料を用いた *in vitro* 試験系で行われており、実験動物を用いた報告例は少ない。また、ラットの mechanism-based inhibitor に対する感受性は、ヒトと異なることも報告されている。例えば、ヒト CYP3A に対する mechanism-based inhibitor であるミベフラジルは、ラットにおいてミダゾラム代謝活性を不可逆的に阻害することが報告されているものの、エリスロマイシンおよびクラリスロマイシンは、ラット肝ミクロソーム画分のミダゾ

ラム水酸化活性に対して TDI 作用を示さないことも報告されている<sup>41)</sup>。一方、カンクイサルにおいてマクロライド系抗生物質は、CYP3A に対して明らかな TDI 作用を示した。また、カンクイサルにおけるマクロライド系抗生物質の不活性化作用 (*k<sub>inact</sub>/K<sub>i</sub>*) は、ヒトと同等かそれ以上であった。これらの結果は、カンクイサルで得られた試験結果がヒトにおける薬物相互作用の可能性を考察するために有用であることを示唆するものであった。

## 5. 結論

ヒトの CYP3A プロブ薬物であるミダゾラムおよびシンバスタチンを用いて、カンクイサルで薬物相互作用試験を実施した結果、これらの血漿中濃度は、可逆的 (ケトコナゾール) および不可逆的 CYP3A 阻害剤 (マクロライド系抗生物質) により著しく上昇することを明らかにした。また、カンクイサルで認められたこれらの薬物相互作用は、ヒトにおいて報告されている結果と同程度であることから、本試験系は医薬品開発過程において開発候補化合物の臨床における薬物相互作用の危険性を評価するために有用であると考えられた。

今後、カンクイサルを用いた薬物相互作用試験を医薬品開発上の標準的手法として普及させるためには、異なる CYP 基質および CYP 阻害薬を用いた広範な研究が必要と思われる。

## 6. 謝辞

本総説を終えるに際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生化学教室教授 原 明博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の機会を与え頂きました田辺三菱製薬株式会社

土屋 裕弘 社長、村松 実 研究本部長、平社 和之 前薬物動態研究所長、ならびに高松 康雄 薬物動態研究所長に心より感謝申し上げます。さらに、研究途上種々の御協力および御便宜を図って下さいました田辺三菱製薬株式会社薬物動態研究所の研究員各位に感謝致します。

## 7. 引用文献

- 1) Chiba H., *Farumashia*, **31**, 992-996 (1995)
- 2) Christensen L. K., Hansen J. M., Kristensen M., *Lancet*, **7321**, 1298-1301 (1963)
- 3) Nelson D. R., Koymans J., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W., *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42 (1996)
- 4) Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F. P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 414-423 (1994)
- 5) Paine M. F., Hart H. L., Ludington S. S., Haining R. L., Rettie A. E., Zeldin D. C., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 880-886 (2006)
- 6) Iwasaki K., Uno Y., *Xenobiotica*, **39**, 578-581 (2009)
- 7) Ward K. W., Smith B. R., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 603-611 (2004)
- 8) Venkatakrishnan K., von Moltke L. L., Greenblatt D. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **38**, 111-180 (2000)
- 9) Olkkola K. T., Backman J. T., Neuvonen P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **55**, 481-485 (1994)
- 10) Varhe A., Olkkola K. T., Neuvonen P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **56**, 601-607 (1994)
- 11) Jalava K. M., Olkkola K. T., Neuvonen P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **61**, 410-415 (1997)
- 12) Neuvonen P. J., Kantola T., Kivistö K. T., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **63**, 332-341 (1998)
- 13) Greenblatt D. J., Wright C. E., von Moltke L. L., Harmatz J. S., Ehrenberg B. L., Harrel L. M., Corbett K., Counihan M., Tobias S., Shader R. I., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**, 237-247 (1998)
- 14) Yasui N., Kondo T., Otani K., Furukori H., Kaneko S., Ohkubo T., Nagasaki T., Sugawara K., *Psychopharmacology*, **139**, 269-273 (1998)
- 15) Mazzu A. L., Lasseter K. C., Shamblen E. C., Agarwal V., Lettieri J., Sundaresen P., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **68**, 391-400 (2000)
- 16) Chung E., Nafziger A. N., Kazierad D. J., Bertino J. S. Jr., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **79**, 350-361 (2006)
- 17) Olkkola K. T., Ahonen J., Neuvonen P. J., *Anesth. Analg.*, **82**, 511-516 (1996)
- 18) Varhe A., Olkkola K. T., Neuvonen P. J., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 465-470 (1996)
- 19) Kharasch E. D., Walker A., Hoffer C., Sheffels P., *J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 1187-1197 (2005)
- 20) Wrighton S. A., Ring B. J., *Pharm. Res.*, **11**, 921-924 (1994)
- 21) von Moltke L. L., Greenblatt D. J., Schmider J., Duan S. X., Wright C. E., Harmatz J. S., Shader R. I., *J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 783-791 (1996)
- 22) Gibbs M. A., Thummel K. E., Shen D. D., Kunze K. L., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 180-187 (1999)
- 23) Wang J. S., Wen X., Backman J. T., Taavitsainen P., Neuvonen P. J., Kivistö K. T., *Pharmacol. Toxicol. (Oxford, U.K.)*, **85**, 157-161 (1999)
- 24) Isoherranen N., Kunze K. L., Allen K. E., Nelson W. L., Thummel K. E., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1121-1131 (2004)
- 25) Aoyama T., Yamano S., Waxman D. J., Lapenson D. P., Meyer U. A., Fischer V., Tyndale R., Inaba T., Kalow W., Gelboin H. V., *J. Biol. Chem.*, **264**, 10388-10395 (1989)
- 26) Huang W., Lin Y. S., McConn D. J., Calamia J. C., Totah R. A., Isoherranen N., Glodowski M., Thummel K. E., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1434-1445 (2004)
- 27) Soars M. G., Grime K., Riley R. J., *Xenobiotica*, **36**, 287-299 (2006)
- 28) Isoherranen N., Ludington S. R., Givens R. C., Lamba J. K., Pusek S. N., Dees E. C., Blough D. K., Iwanaga K., Hawke R. L., Schuetz E. G., Watkins P. B., Thummel K. E., Paine M. F., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 146-154 (2008)
- 29) Uno Y., Hosaka S., Matsuno K., Nakamura C., Kito G., Kamataki T., Nagata R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **466**, 98-105 (2007)
- 30) Tsunoda S. M., Velez R. L., von Moltke L. L., Greenblatt D. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **66**, 461-471 (1999)
- 31) Segaert M. F., De Soete C., Vandewiele I., Verbanck J., *Nephrol., Dial., Transplant.*, **11**, 1846-1847 (1996)
- 32) Horn M., *Arch. Dermatol.*, **132**, 1254 (1996)
- 33) Vickers S., Duncan C. A., Vyas K. P., Kari P. H., Arison B., Prakash S. R., Ramjit H. G., Pitzemberger S. M., Stokker G., Duggan D. E., *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 476-483 (1990)
- 34) Prueksaritanont T., Gorham L. M., Ma B., Liu L., Yu X., Zhao J. J., Slaughter D. E., Arison B. H., Vyas K. P., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1191-1199 (1997)
- 35) Ishigami M., Kawabata K., Takasaki W., Ikeda T., Komai T., Ito K., Sugiyama Y., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1068-1072 (2001)
- 36) McConn II D. J., Lin Y. S., Allen K., Kunze K. L., Thummel K. E., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1083-1091 (2004)
- 37) Wang Y. H., Jones D. R., Hall S. D., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 664-671 (2005)
- 38) Gorski J. C., Jones D. R., Haehner-Daniels B. D., Hamman M. A., O'Mara E. M. Jr., Hall S. D., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**, 133-143 (1998)
- 39) Zimmermann T., Yeates R. A., Laufen H., Scharpf F., Leitold M., Wildfeuer A., *Arzneim-Forsch*, **46**, 213-217 (1996)
- 40) Okudaira T., Kotegawa T., Imai H., Tsutsumi K., Nakano S., Ohashi K., *J. Clin. Pharmacol.*, **47**, 871-876 (2007)
- 41) Sekiguchi N., Kato M., Takada M., Watanabe H., Higashida A., Sakai S., Ishigai M., Aso Y., *Xenobiotica*, **38**, 368-381 (2008)

## 8. 特記事項

本総説は岐阜薬科大学博士論文(乙第332号)の内容を中心にまとめたものである。