



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

高脂溶性薬物の体内動態に対する体脂肪減少の影響 評価

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-08-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 後藤, 昭彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/75237

高脂溶性薬物の体内動態に対する
体脂肪減少の影響評価

2017年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

後藤昭彦

高脂溶性薬物の体内動態に対する
体脂肪減少の影響評価

後 藤 昭 彦

目次

略語	1
第1章 緒言	3
1.1 はじめに	3
1.2 本研究の目的	3
1.3 高脂溶性薬物の一般的な薬物動態学的特性	4
1.3.1 組織分布について	4
1.3.2 消失について	5
1.3.3 経口吸収について	5
1.4 TAK-357 について	6
1.4.1 物理化学的性質	6
1.4.2 抗アルツハイマー病薬の現状と TAK-357 の薬理作用	6
第2章 TAK-357 のラットおよびイヌにおける体内動態	7
2.1 はじめに	7
2.2 実験材料と方法	7
2.2.1 被験物質, 試薬	7
2.2.2 動物	7
2.2.3 被験物質の投与および生体試料の採取	8
2.2.4 血漿蛋白結合および血球移行	9
2.2.5 放射能の測定	9
2.2.6 血漿中 TAK-357 の定量	10
2.2.7 データ処理	11
2.3 結果	11
2.3.1 ラットおよびイヌにおける未変化体の血漿中動態	11

2.3.2 組織分布.....	11
2.3.3 血球移行.....	12
2.3.4 血漿蛋白結合.....	12
2.3.5 血漿中組成.....	12
2.3.6 排泄および排泄物中組成.....	13
2.4 考察.....	13
2.5 小括.....	16
第3章 脂肪組織へ高濃度分布する薬物の体内動態に与える急激な体重低下の影響: 生理学的薬物動態 (PBPK) モデリング&シミュレーション.....	17
3.1 はじめに.....	17
3.2 実験材料と方法.....	17
3.2.1 被験物質, 試薬.....	17
3.2.2 動物.....	18
3.2.3 動物試験.....	18
3.2.4 血漿中 TAK-357 の定量.....	18
3.2.5 PBPK モデリング.....	19
3.2.6 シミュレーション.....	21
3.3 結果.....	22
3.3.1 動物実験.....	22
3.3.2 PBPK モデリング.....	22
3.3.3 シミュレーション.....	22
3.4 考察.....	23
3.5 小括.....	26
第4章 高濃度脂肪へ分布する薬物の動態に与える体脂肪変化の影響.....	27

4.1 はじめに.....	27
4.2 実験材料と方法.....	27
4.2.1 被験物質, 試薬.....	27
4.2.2 動物.....	28
4.2.3 動物実験.....	28
4.2.4 血漿蛋白結合.....	29
4.2.5 濃度測定法.....	29
4.2.6 薬物動態解析.....	30
4.2.7 シミュレーション.....	31
4.3 結果.....	32
4.3.1 実験データ.....	32
4.3.2 PBPK モデリング.....	33
4.3.3 シミュレーション.....	33
4.4 考察.....	33
4.5 小括.....	36
第5章 総合考察およびまとめ.....	37
5.1 TAK-357 のラットおよびイヌにおける薬物動態学的特徴および血漿中濃度上昇に対する定性的推定.....	37
5.2 イヌ TK 試験時に認められた血漿中濃度上昇の定量的原因推定.....	38
5.3 脂肪量変化が高脂溶性薬物の体内動態に与える影響および投与量調整の必要性.....	39
5.4 まとめ.....	40
謝辞	41
引用文献	42
図 (第1章).....	50
図表 (第2章).....	51

图表 (第3章).....61

图表 (第4章).....69

略語

本文及び図表で用いた略語は以下の通りである。

6-CB: 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl

A β : amyloid β (アミロイド β)

ADME: absorption, distribution, metabolism and excretion (吸収, 分布, 代謝, 排泄)

AGP: α_1 -acid glycoprotein (α_1 酸性糖蛋白)

AUC: Area Under the concentration-time Curve (薬物濃度時間曲線下面積)

BA: bioavailability (バイオアベイラビリティ)

BDDCS: Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System

CL_{int}: intrinsic clearance (肝固有クリアランス)

CL_p: total body clearance (全身クリアランス)

C_{max}: maximum concentration (最高血漿中濃度)

C_{trough}: trough concentration (トラフ濃度)

CYP: cytochrome P450 (チロクローム P450)

DIF: diffusion rate constant (拡散速度定数)

FOCE: first-order conditional estimation

GFR: glomerular filtration rate (糸球体ろ過量)

HPLC: high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)

HSA: human serum albumin (ヒト血清アルブミン)

IACUC: institutional animal care and use committee

K_a: absorption rate constant (吸収速度定数)

logD: octanol to water partition coefficient (オクタノール/水分配係数)

LSC: liquid scintillation counter (液体シンチレーションカウンター)

MATE: multidrug and toxin extrusion

MRM: multiple reaction monitoring

NMDA: N-methyl-d-aspartate

PBPK model: physiologically-based pharmacokinetic model (生理学的薬物動態モデル)

PCBs: poly chlorinated biphenyls (ポリ塩化ビフェニル)

PCDDs: polychlorinated dibenzo-p-dioxins (ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン)

PK: pharmacokinetics (薬物動態)

pKa: logarithmic acid dissociation constant (酸解離指数)

PK/PD: pharmacokinetics/pharmacodynamics

P_x : tissue to blood partition coefficient (組織血液分配係数)

$t_{1/2}$: half-life (半減期)

TAK-357: 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl)piperazine

TK: toxicokinetics (トキシコキネティクス)

TK/TD: toxicokinetics/toxicodynamics

T_{max} : time to reach C_{max} (C_{max} に達する時間)

V_{ss} : distribution volume at steady-state (定常状態における分布容積)

V_x : tissue or blood volumes (組織容量)

第1章 緒言

1.1 はじめに

医薬品の開発において薬物動態学的評価は必須のものであり、非臨床試験および臨床試験において実施されている。薬物の効果および副作用はその血漿中濃度、または組織中濃度と深く関わっている。薬物動態学は吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) を把握することにより、投与量と薬理効果の関係、および投与量と副作用の関係を考察する際に重要な情報となる (57)。近年では薬物濃度と薬効又は副作用の関係を定量的に解析にする Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) 解析や Toxicokinetics/Toxicodynamics (TK/TD) 解析を用いることにより用法用量などを効率的かつ適切に設定し、研究開発を進めていくことが推進されている (40)。これらの定量的な解析をするにあたって ADME 評価を行い、詳細な体内動態を評価をすることは非常に重要である。もし、臨床において薬物動態学的相互作用や個体間差、その他薬物濃度変化を引き起こす要因がある場合には副作用回避や薬効発現のために投与量を調整する必要がある。

1.2 本研究の目的

武田薬品工業株式会社において見出された新規アルツハイマー治療薬候補 TAK-357 について、4 週間回復期間評価を併せたイヌ 1 日 1 回 2 週間反復経口投与トキシコキネティクス (TK) 試験を実施したところ、2 匹の雄性イヌのうち 1 匹において最終投与 2 週間後から、摂餌量や体重の低下を伴う衰弱が認められた。この動物において、摂餌量や体重の低下を伴う衰弱が認められた最終投与 2 週間後から、TAK-357 血漿中濃度上昇が認められた (詳細は第 3 章に記載)。異常な血漿中薬物濃度上昇は安全性の懸念を惹起する。もし臨床において投薬に起因しない予期せぬ血漿中濃度上昇が起こる可能性があり、さらにその薬物の安全域が狭い場合、安全性の観点からその候補薬の開発推進に疑問が持たれると考えられる。本報告のテーマに選択した TAK-357 の投薬に起因しない予期せぬ血漿中濃度上昇は、TAK-357 の高脂溶性と脂肪重量変化に起因している可能性が考えられた。よって、この TAK-357 のイヌにおける予期せぬ血漿中濃度上昇の原因を推察し、脂肪組織重量変化が体内動態に

与える影響を評価することは、TAK-357の開発を推進していく上で非常に重要な研究であると考
えられた。さらに、TAK-357を高脂溶性薬物の特性を有した代表的薬物と位置付け、その他の高脂
溶性薬物においても同様の現象が起りうるか推察することは、一般的な高脂溶性薬物の体内動態を予
測する上で非常に有用である。

そこで本論文では上記目的を達成するために、以下の項目について検討した。

1. イヌ TK 試験時に認められた予期せぬ血漿中濃度上昇の原因を解明し、薬物動態学的検証を
行うためには、イヌを含めた動物における基本的な ADME 特性を評価し、どの過程に原因があるか
を推察することが有効と考えた。そこで放射能標識した TAK-357 ($[^{14}\text{C}]$ TAK-357) をラットおよびイ
ヌに投与した際の ADME 特性を評価した。

2. TAK-357 の非臨床 ADME 特性の評価から、脂肪組織重量低下により脂肪組織中に蓄積した
TAK-357 が血漿中に再分布することによって予期せぬ血漿中濃度上昇が起きたとする仮説を提案し
た。その仮説が定量的に説明できるか否かを生理学的薬物動態 (PBPK) モデル解析により評価した。

3. 脂肪組織重量の差異が高脂溶性薬物の体内動態にどのような影響を与えるかを TAK-357 をモ
デル薬物として評価した。肥満動物と正常動物の体内動態を比較した上で、体組成の違いによる高脂
溶性薬物の投与量調整の必要性を PBPK モデル解析により定量的に評価した。

1.3 高脂溶性薬物の一般的な薬物動態学的特性

1.3.1 組織分布について

組織分布は薬物の体内動態を特徴付ける重要な要素の一つである。組織分布が与える影響は単に
組織中の薬物濃度のみでなく、血漿中濃度レベルや血漿中半減期、総体内負荷量、排泄速度にも関わ
る (62)。薬物の組織分布には脂溶性、荷電、分子サイズ、分子立体構造、薬物表面積等の物理化学
的性質の他、血漿蛋白結合、薬理標的等の蛋白質への特異的結合やトランスポーターによる輸送など
が寄与する (20, 30, 51, 59, 66)。高脂溶性薬物は一般的に膜透過性がよく、脂質を含む組織へ多く移行
するため、分布容積が高くなる傾向にある (10, 16, 29)。そのため、特異的な輸送、結合等が関わらな

い場合にはその組織/血漿中濃度比はおおよそ薬物の脂溶性に依存していることも報告されている (22)。

1.3.2 消失について

薬物の主たる消失経路は未変化体としての尿中排泄，胆汁排泄および代謝である。尿中排泄は主に脂溶性の低い薬物が排泄されるため，高脂溶性薬物が未変化体として尿中に排泄される可能性は非常に低い (21)。薬物代謝は主に肝臓や小腸で起こる異物除去システムであり，概して薬物の脂溶性を下げることにより排泄されやすくする (68)。そのため多くの高脂溶性薬物は代謝を受けた後に代謝物として尿中又は胆汁を介して糞中に排泄される (5, 9, 53)。また，代謝組織である肝臓への移行にはトランスポーターである Organic anion transporter polypeptide (OATP) が関与する場合もある (5, 43)。

薬物の溶解度及び代謝速度からその動態特性を推定する Biopharmaceutics Drug Disposition

Classification System (BDDCS) による分類において，溶解度の低い高脂溶性薬物はクラス 2 またはクラス 4 に分類される (8)。代謝速度が速いクラス 2 の薬物は腸管における排出トランスポーターおよび肝臓における取りこみ及び排出トランスポーターの影響を受けやすい。一方で代謝速度の遅いクラス 4 では吸収および排泄トランスポーターの影響を受ける可能性はあるものの，例数が少ないためその傾向は明確ではない。

1.3.3 経口吸収について

薬物の経口吸収性には製剤からの溶出，薬物の溶解性，膜透過性などが関係する。生理学的要因としては胃内や腸管内の pH，消化管内容物の有無，腸管運動などが吸収に影響を与える (52)。溶解度が高く，膜透過性の高い薬物が吸収されやすい薬物である (7)。高脂溶性薬物は一般的に膜透過性は高いが溶解度が低いため，用量が上昇するに従い溶解できる薬物の投与量に対する比率が低下し，その結果吸収率は低下する。また，溶解度が低いため，その溶解性に影響を与える胃内 pH や摂餌の有無等に影響を受けやすいが，摂餌差の予測は非常に難しいことが知られている (60)。

1.4 TAK-357 について

1.4.1 物理化学的性質

TAK-357 (1-(4-methoxyphenyl)-4-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl)piperazine, Fig. 1-1) はアルツハイマー病の治療薬を目指して開発されてきた薬物である。TAK-357 は logD: 5.83 と非常に脂溶性の高い薬物であり、生理学的 pH において多くが非解離型として存在する薬物である。酸解離指数 (pKa) は 6.6, および 3.7 であり、分子量は 380.5 である。本研究では TAK-357 又は放射能で標識した TAK-357 ($[^{14}\text{C}]$ TAK-357) を用いて薬物動態評価を行った。

1.4.2 抗アルツハイマー病薬の現状と TAK-357 の薬理作用

アルツハイマー病は臨床診断としてエピソード記憶障害の進行から始まり、全体的な認知能力の低下まで緩やかに進行し、最終的に死に至る疾患である (19)。アルツハイマー病患者数は世界で 2015 年現在 4680 万人に達し、2050 年には 1 億 3200 万に増加すると考えられている (6)。アルツハイマー病の原因としては、アミロイド β 42 (A β 42) の凝集および蓄積に始まり、タウのリン酸化を介した神経変性や神経細胞死、またはタウのリン酸化を介さない経路によるシナプス・神経細胞の機能障害などによる認知能力の低下が示唆されている (69)。現在、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬や N-methyl-d-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬などがアルツハイマー患者の認知機能の改善のために処方されている (25, 31, 44)。しかしながら、アルツハイマー病は依然として神経疾患領域の中でも高いアンメットメディカルニーズがあり、死因としての割合が上昇している (61)。そのため、新たな治療オプションの開発が必要であり、今後の研究の進展が望まれている。現在、上述の治療メカニズムを有した薬物の他に、 β セクレターゼ阻害薬、 γ セクレターゼ阻害薬・調節薬、A β ワクチンなどの開発が進められている (17, 33, 45)。TAK-357 は海馬および大脳皮質由来の初代培養神経細胞において、インスリン様増殖因子 1 (IGF1) と協働することにより神経保護作用を示し、アルツハイマー病の治療薬を目指して開発されてきた (63)。

第2章 TAK-357 のラットおよびイヌにおける体内動態

2.1 はじめに

薬物動態評価は開発薬物の非臨床および臨床試験における薬効および安全性を総合的に評価するに当たり必須の項目である (57)。TAK-357 は探索的薬物動態評価により非常に長い血漿中半減期が示されている。一般的に開発薬物の体内からの排泄が不完全である場合や血漿中半減期が非常に長い場合には、そのメカニズム推定が必須となる。その理由は、①もし開発薬物又はその代謝物がある組織蛋白へ共有結合等の特異的な結合をする場合には、臨床および非臨床において安全性の懸念も考えられる、②反復投与後に定常状態に達するまでの時間が長く、その濃度の推定が難しくなる、③安全性上の問題が発生した際には、薬物の体内からの除去も難しくなるなどがある。また、今回イヌを用いたTK 試験で認められた血漿中濃度上昇の原因を推察する上でも TAK-357 の ADME を把握することは極めて重要である。そこで本章では ^{14}C TAK-357 又は TAK-357 を用いたラット、イヌにおける体内動態試験を実施し、長い血漿中半減期やイヌで認められた血漿中濃度上昇の原因を定性的に推察した。

2.2 実験材料と方法

2.2.1 被験物質, 試薬

TAK-357 は武田薬品工業株式会社、製薬研究所で合成されたものを用いた。 ^{14}C TAK-357 (放射科学的純度>97%, 非活性:5.75 MBq/mg) はビオブリッジ株式会社 (東京) で合成されたものを用いた。その他の試薬と試液は分析グレードのものを購入した。

2.2.2 動物

雄性 Crj:CD(SD)ラット (日本チャールスリバー, 神奈川) および雄性ビーグル犬 (北山ラベス, 山口) を用いた。ラットは雄性的投与時8週齢の動物を n=3 又は n=4 で用いた。食餌は固形飼料 CR-LPF (オリエンタル酵母, 東京) を自由摂餌とし、水は自由飲水とした。飼育はステンレスケージで行い、

搬入後1週間以上の馴化の後、試験に使用した。イヌは投与時7-24週齢で体重9.8-12.0 kgの雄性的ビーグル犬をn=3又はn=4で用いた。ステンレスケージ内で飼育し、固形飼料Labo D stock(日本農産 神奈川)を1日1回250 g 給餌し、水は自由引水とした。

2.2.3 被験物質の投与および生体試料の採取

経口投与の場合は $[^{14}\text{C}]$ TAK-357 または TAK-357 を 0.5% (w/v) メチルセルロース (信越化学, 東京) 溶液に懸濁した。 $[^{14}\text{C}]$ TAK-357 は 3 mg/kg の用量でラット (血漿中 PK 試験では 17.3 MBq/kg, 排泄試験では 2.3 MBq/kg, 組織分布試験では 8.7 MBq/kg) およびイヌ (4.3 MBq/kg) に経口投与した。TAK-357 は 0.3, 1 および 3 mg/kg の用量でラットに, 3 mg/kg の用量でイヌに経口投与した。静脈内投与の場合は TAK-357 をジメチルアセトアミド (和光純薬工業, 大阪) および 1,3-ブタンジオール (和光純薬工業) の混合液 (1:1, v/v) に溶解し, 1 mg/kg の用量でラット (n=3) およびイヌ (n=4) に投与した。投与は飽食下に行った。

$[^{14}\text{C}]$ TAK-357 又は TAK-357 投与後にラットの尾静脈またはイヌの橈側皮静脈から設定した時間に採血した。抗凝固剤にはヘパリンナトリウムを用い, 血液試料は 4°C で 10,000×g で 3 分間遠心することにより血漿試料を調製した。組織分布試験では, $[^{14}\text{C}]$ TAK-357 を経口投与 0.5, 2, 8, 24, 168, 332 および 672 時間後にラットをイソフルラン麻酔下で放血致死させた。その後, 脳, 脊髄, 下垂体, 眼球, ハーダー腺, 顎下腺, 甲状腺, 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 副腎, 腎臓, 精巣, 骨格筋, 皮膚, 腎周囲脂肪, 精巣周囲脂肪, 褐色脂肪, 骨髄, 胃, 腸および大腿骨を採取した。また, イヌにおいては $[^{14}\text{C}]$ TAK-357 を経口投与後の 672 時間にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させ, 脳, 肺, 肝臓, 腎臓, 腎周囲脂肪および精巣周囲脂肪を採取した。

ラットの尿および糞は代謝ケージ内で分離して採取し, 投与後 24 時間までは呼気中に含まれる二酸化炭素も採取した。イヌの排泄物は投与後 168 時間まで代謝ケージ内で採取し, その後は飼育ケージで飼育した。全ての動物試験は株式会社ネモト・サイエンス (茨城) にて実施された。これらの試験は株式会社ネモト・サイエンス動物実験倫理委員会にて評価, 承認された。

2.2.4 血漿蛋白結合および血球移行

マウスおよびラットのコントロール血漿および血液は日本チャールスリバーより購入した。イヌのコントロール血漿および血液は株式会社ナルク (千葉) より購入した。ヒトのコントロール血漿は Interstate Blood Bank (テネシー) より購入した。ヒトのコントロール血液は病院にて採取した。コントロール血液および血漿はそれぞれ 5 および 10 人の健康人ボランティアより採取され、混和されたものを用いた。ヒト血清アルブミン (HSA) およびヒト α_1 酸性糖蛋白 (AGP) は Sigma-Aldrich japan (東京) より購入した。

蛋白結合の評価のために、マウス、ラット、イヌおよびヒトの血漿、4% HSA, 0.05% AGP および 0.05% AGP と 4% HSA の混液に [14 C]TAK-357 を添加した (終濃度: 0.1, 1, 10 μ g/mL, n=3)。この血漿を 274,000 又は 316,000 \times g, 4°C で 14 時間超遠心した。超遠心上清中および血漿中の放射能は下記に記載の方法で測定した。蛋白結合率は式 2-1 を用いて算出した。

$$\text{蛋白結合率 (\%)} = \frac{(C_{PL} - C_{sup}) \times 100}{C_{PL}} \quad \text{式 2-1}$$

C_{PL} : 血漿中放射能濃度

C_{sup} : 超遠心上清中放射能濃度

血球移行率の評価のためにはラット、イヌおよびヒトの血液に [14 C]TAK-357 を添加した (終濃度: 0.1, 1, 10 μ g/mL, n=3)。37°C で 30 分間インキュベートした後に血液中および血漿中の放射能濃度を測定し、ヘマトクリット値(Hct)も測定した。血球移行率は式 2-2 を用いて算出した。

$$\text{血球移行率 (\%)} = 100 - \frac{C_{PL} \times (100 - Hct)}{C_{WB}} \quad \text{式 2-2}$$

C_{WB} : 血液中放射能濃度

2.2.5 放射能の測定

生体試料および有機溶媒抽出液中の放射能は液体シンチレーションカウンター(LSC, 日立アロカメディカル, 東京)を用いて測定した。総放射能濃度は測定放射能値と比活性から算出した。また、

代謝物の濃度は総放射能中の按分比を乗することにより算出た。総放射能および代謝物濃度は分子量を TAK-357 と同じとした TAK-357 換算値として表記した。血漿、尿、糞ホモジネート中の組成分析には放射性同位元素検出器 (625TR, パーキンエルマージャパン, 神奈川) を接続した高速液体クロマトグラフィー(HPLC, 島津製作所, 京都)を用いた。脂肪組織中の組成分析には HPLC で分離後、フラクションコレクト法で溶出液を採取後、LSC を用いて放射能を測定した。組成分析のために血漿試料は採取時点ごとに混和した。血漿および糞ホモジネート試料中の TAK-357 およびその関連物質はアセトニトリルで抽出し、脂肪組織試料ではクロロホルム/メタノール混液 (2:1, v/v) で抽出した。尿は遠心上清を HPLC 分析試料とした。前処理した試料は 40°C に設定した L-column ODS (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i.d., 化学物質評価研究機構, 東京) を設置した HPLC に注入した。移動相 A には 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/アセトニトリル混液 (9:1, v/v) を、移動相 B には 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/アセトニトリル混液 (1:9, v/v) を用い、流量を 1 mL/min とした。グラジエントプログラムとして 50%移動相 B から開始し、10 分までに 100%移動相 B に直線的に上昇させた。15 分間 100%移動相 B を維持後に 50%移動相 B に 0.1 分間で戻し、10.9 分間かけて再平衡化した。1 注入毎の総サイクル時間は 36 分である。有機溶媒による非抽出成分および定量下限未満の分画は未同定代謝物として算出した。

2.2.6 血漿中 TAK-357 の定量

血漿試料中の TAK-357 は質量分析器を接続した HPLC (LC/MS/MS) を用いて定量下限 1 ng/ml で定量した。血漿試料はメタノールで除蛋白し、遠心上清を移動相で希釈した後に 40°C に設定した ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm, Waters, マサチューセッツ) を接続した LC/MS/MS (API4000, Applied Biosystems/MDS SCIEX, カルフォルニア) に注入した。メタノール/水/ギ酸 = 700:300:2, v/v からなる均一濃度の移動相で 2.5 分間かけて、流速 0.5 mL/min でクロマトグラフ分離を行った。TAK-357 は m/z 381 \rightarrow 191 の multiple reaction monitoring (MRM) モードで検出し、内標準と

して関連物質 (m/z 433→134) を用いた。分析法はバリデートされており、検量線範囲 1-1000 ng/mL であった。精度および真度はそれぞれ 0.7%-6.7% および 2.1%-6.7% であった。

2.2.7 データ処理

終末相の血漿中半減期 ($t_{1/2}$)、薬物濃度時間曲線下面積 (AUC)、全身クリアランス (CL_p)、定常状態における分布容積 (V_{ss}) は WinNonlin ソフトウェア (バージョン 6.1, Certara, ニュージャージー) を用いた non-compartment 解析法により計算した。最大血漿中濃度 (C_{max}) および C_{max} に到達する時間 (T_{max}) は実験で得られたデータを採用した。バイオアベイラビリティ (BA) は経口投与および静脈内投与後の用量補正した無限時間までの AUC (AUC_{inf}) の比より算出した。

2.3 結果

2.3.1 ラットおよびイヌにおける未変化体の血漿中動態

TAK-357 をラットおよびイヌへ 1 mg/kg の用量で静脈内投与又はラットへ 0.3, 1 および 3 mg/kg の用量で、イヌへ 3 mg/kg の用量で経口投与した後の血漿中濃度推移を Fig. 2-1 に示した。また、TAK-357 の薬物動態パラメータを Table 2-1 に示した。ラットおよびイヌの CL_p はそれぞれ 0.180 L/h/kg および 0.0237 L/h/kg であり、 V_{ss} はそれぞれ 33.5 L/kg および 60.3 L/kg であった。3 mg/kg でラットおよびイヌへ経口投与後の終末相の $t_{1/2}$ はそれぞれ 211 時間 (約 9 日) および 1420 時間 (約 60 日) であり、経口投与後の BA はそれぞれ 59.2% および 66.6% であった。ラットの C_{max} および AUC_{inf} は 0.3-3 mg/kg の用量範囲でおおよそ用量比に応じた上昇が認められた。

2.3.2 組織分布

[^{14}C]TAK-357 をラットへ 3 mg/kg で単回経口投与後 0.5, 2, 8, 24, 168, 336 および 672 時間後の組織中総放射能濃度を Fig. 2-2 に示す。総放射能濃度は多くの組織において投与 2 時間後に C_{max} に達した。腸内濃度は投与後 0.5 時間が T_{max} であった。脊髄、ハーダー腺、胸腺、精巣、褐色脂肪においては投

与 8 時間後に C_{max} に達した。腎周囲脂肪や精巣周囲脂肪への総放射能の分布は遅く投与 24 時間後が T_{max} であった。最終評価時点である投与 672 時間後の脂肪組織/血漿濃度比はおよそ 500 であった。薬効標的的部位である脳中の総放射能濃度は試験期間を通して血漿中と比較して高かった。腎周囲脂肪を脂肪組織の代表として代謝物組成分析を評価した結果、脂肪組織中の放射能は有機溶媒(クロロホルムとメタノールの混液)により完全に抽出され、総放射能の 84.2-94.0%は未変化体であった。

[^{14}C]TAK-357 をイヌに 3 mg/kg の用量で経口投与 672 時間後に組織中総放射能濃度を測定した結果、評価したいずれの組織においても放射能を検出し、腎周囲脂肪中が最も高い濃度であった(Fig. 2-3)。脂肪組織/血漿中濃度比は約 300 であった。脂肪組織中の放射能はクロロホルムとメタノールの混液により完全に抽出され、総放射能の 98.2%は未変化体であった。

2.3.3 血球移行

In vitro で評価したラット、イヌおよびヒトの血球移行率はそれぞれ 14.3-15.1%、23.8-25.5%および 9.9-11.8%であり、いずれの種においても 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で濃度依存性は認められなかった (Table 2-2)。ラット、イヌおよびヒトの血液/血漿中濃度比 (R_b) は 0.70, 0.66 および 0.66 であった。

2.3.4 血漿蛋白結合

In vitro で評価したマウス、ラット、イヌおよびヒトの血漿蛋白結合率はそれぞれ 97.7%-98.0%、98.3-98.5%、98.9-99.2%および 97.1-97.4%であり、いずれの種においても 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で濃度依存性は認められなかった (Table 2-3)。更に、HSA、AGP および HSA と AGP の混液に対する蛋白結合率はそれぞれ 98.7-99.3%、96.6-98.6%および 99.4%であった。

2.3.5 血漿中組成

[^{14}C]TAK-357 をラットおよびイヌへ 3 mg/kg の用量で経口投与後の血漿中代謝物組成を調べた (Fig. 2-4)。血漿中組成分析試験における典型的ラジオクロマトグラムは Fig. 2-5A に示す。総放射能

の終末相半減期はラットで212時間、イヌで1070時間であった。ラット血漿中の総放射能および TAK-357 の AUC_{0-168h} はそれぞれ $20.2 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ および $12.8 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ であった。未変化体は総放射能の 63.0%であり、未同定代謝物が残りの 37.0%を占めると計算された。イヌ血漿中の総放射能および TAK-357 の AUC_{0-168h} はそれぞれ $41.3 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ および $38.3 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ であった。未変化体は総放射能の 92.8%を占め、残りの 7.2%は未同定代謝物であった。

2.3.6 排泄および排泄物中組成

$[^{14}\text{C}]$ TAK-357 をラットおよびイヌへ 3 mg/kg の用量で経口投与後の総放射能の排泄および排泄物中の代謝物組成を調べた (Table 2-4, 2-5)。糞中組成分析試験における典型的ラジオクロマトグラムは Fig. 2-5B に示す。ラットへ投与 672 時間後の累積の尿中および糞中排泄率はそれぞれ投与量の 12.6%および 60.1%であった。投与 672 時間後の屠体中から投与量の 24.3%の放射能が回収された。一方、24 時間まで回収した呼気中には放射能は検出されなかった。イヌにおいては投与 168 時間後までに投与量の 28.9%の放射能しか排泄物中から回収されず、尿中に 2.4%、糞中に 26.6%であった。また、投与後 312-336 時間、480-504 時間および 648-672 時間の間に回収された糞からは放射能が回収された。TAK-357 未変化体は尿中には検出されなかった。ラットおよびイヌ糞中では排泄された放射能の 43.0%および 60.5%が未変化体であり、残りは未同定代謝物であった。

2.4 考察

TAK-357 は非常に高脂溶性の薬物であり、本研究においてその特徴的な ADME 特性が明らかとなった。ラットにおける薬効用量である 3 mg/kg での経口投与後の BA はラット、イヌにおいて 50-70% であり、良好な吸収と低い初回通過効果が示唆された (Table 2-1)。なお、イヌの PK パラメータの算出にあたっては外挿された AUC の割合が高かった。AUC の外挿率が高いことは TAK-357 のイヌの PK 特性評価に不確実性を生む可能性が考えられる。よって、より正確なイヌ PK パラメータの算出には投与後より遅い時点での血液採取が必要と考えられた。TAK-357 はラットで 9 日、イヌで 60 日

という非常に長い終末相の血漿中半減期を示しており、これは低い CL_p および高い V_{ss} の値が反映された結果であると考えられた。ラットよりも低い CL_p かつ高い V_{ss} を示すイヌにおいては、より長い半減期を示す結果となった。 $[^{14}C]$ TAK-357を3 mg/kgで経口投与後した際、ラットで投与量の72.7%が4週間で、イヌで投与量の28.9%が1週間で排泄されるのみであった (Table 2-4)。一方、ラットにおいては未排泄の放射能が屠体から回収された。これらの結果はTAK-357およびその関連物質が非常に長い時間体内に残存していること示唆している。ラットにおける投与168時間後までの排泄率52.9%はイヌと比較して高かった。イヌにおいてラットと比較して高い未排泄率を示した結果は、イヌにおける低い CL_p 、高い V_{ss} 、その結果としての長い半減期を示したためと考えられる。。このような薬物を反復投与した際に、体内へ高濃度蓄積が想定されることや、体内から除去することが難しいことから、非常に長い半減期を介した体内へ長期残存を示す薬物について、安全性の観点から臨床試験実施に対する懸念となりえる。

組織分布試験から、脳内濃度が血漿中濃度より高かったことは標的組織である脳内への良好な移行が示唆された (Figs. 2-2, 2-3)。一方で、放射能が標的組織ではないラットおよびイヌの脂肪組織に高濃度分布することも明らかとなった。脂肪組織中の T_{max} は24時間と血漿中の T_{max} 2時間と比較して著しく遅かった。これはTAK-357およびその関連物質の脂肪組織の移行が遅く、定常状態に達するまでの時間がかかり長いことを示唆している。脂肪組織中の遅い T_{max} は高脂溶性薬物に共通した現象であり、その原因は血液と脂肪組織間の移行過程において拡散が遅速となっているためと考えられている (47)。投与672時間後において、脂肪組織/血漿中濃度比300-500という値は他の組織と比較して非常に高かった。この濃度比は他の一般的に知られる高脂溶性薬物 (クロルプロマジン: 41, ハロペリドール: 28, パラチオン: 101 等) と比較しても高いものであった (22, 35)。経口投与672時間(4週間)後においても脂肪組織中濃度はラットで1 $\mu\text{g equiv./g}$ 以上、イヌで10 $\mu\text{g equiv./g}$ 以上であった。脂肪組織の組織重量はラットでは体重の7-10%と報告されている (15)。一方で高濃度の放射能濃度を示したその他の組織の重量は皮膚で体重の19%、副腎で0.019%、肝臓で3.66%、膵臓で0.32%である。TAK-357およびその関連物質の組織中残存量は組織重量と組織中放射能濃度の掛け算で算出

されるため、ラットにおける TAK-357 およびその関連物質の残存量は脂肪組織中で最も高く、他の組織の 50 倍以上と算出された。イヌにおいて脂肪組織重量に関する情報は得られなかった。しかしながら、ビーグル犬の体脂肪率は 17-20%と報告されている (67)。体脂肪率は脂肪組織だけでなく、血液中やその他の組織中の脂質量も含んだ値と考えられる。そこで、本研究では脂肪組織重量は体重の 15%と仮定して脂肪組織中残存率を計算した。この仮定の下で、イヌ脂肪組織中の TAK-357 およびその関連物質の残存量は投与量の約 50%であり、血液や肝臓など他の組織より 100 倍以上高いと推定された。これらの計算結果はラットおよびイヌにおいて脂肪組織が TAK-357 およびその関連物質の貯蔵庫として機能していることを示している。脂肪組織中の放射能の組成はほぼ TAK-357 が占めた (Fig.2-5C)。さらに、脂肪組織中の TAK-357 および若干の代謝物は有機溶媒によりほぼ完全に抽出されたため、これらは脂肪組織中の成分に共有結合していないことが示唆された。これらの結果から、TAK-357 及びその由来成分が脂肪組織中の高濃度存在する現象は、TAK-357 の物理化学的性質によるものであると考えられ、同様の傾向はヒトにおいても認められると考えられた。

In vitro における血球移行率はいずれの種においても低く、一方で血漿蛋白結合率は高かったが、血球移行、血漿蛋白結合とも濃度依存性は認められなかった (Table 2-2, 2-3)。一部の薬物において血球移行率が高く、血球が薬物の貯蔵庫として機能することで血漿からの長い消失半減期を惹起することが知られている (38)。しかしながら、TAK-357 については *in vitro* における血球移行率の結果から、血球への移行が血漿からの消失半減期に及ぼす影響は小さいと考えられた。一方、TAK-357 はヒト血漿中で HSA と AGP の両方に強く結合し、これは低い CL_p にある程度寄与していると考えられた。

Table 2-5 に示されているように、TAK-357 経口投与後にラットおよびイヌ尿中には未変化体は検出されなかった。ラットの糞中では投与放射能量の 18.6%が排泄され、排泄された総放射能の 43.0%が未変化体であった。また、イヌの糞中では投与放射能量の 16.1%が排泄され、排泄された総放射能の 60.5%が未変化体であった。ラットおよびイヌの BA がそれぞれ 60%および 67%であることを考慮すると、この糞中未変化体画分は経口投与後の未吸収成分を含んでいると考えられる。また、糞中放

射能の40-60%および尿中の全ての画分は未同定の代謝物であったことから、少なくとも試験期間内においては吸収された TAK357 の主な消失経路は代謝であることが示唆された。

TAK-357 と同様の ADME 特性は 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) などのポリ塩化ビフェニル (PCBs) でも認められており、6-CB は脂肪組織に非常によく分布し、排泄は非常に遅い (54)。また、6-CB の脂肪組織中からの消失やラットの体内からの排泄は食餌制限による脂肪組織の減少によって加速される (37, 64, 65)。この状況下で血中濃度は上昇しており、これは物質が脂肪組織中から血液中へ再分布したことを反映していると考えられる。これらの文献情報は非常に高脂溶性薬物の体内動態は体組成、特に脂肪組織重量に影響を受けることを示唆している。Geyer らは脂肪組織が貯蔵組織として機能し、血液中濃度を低下させることにより、他のより敏感な組織を毒物から保護していると評価している (26)。体脂肪が減少した際には高脂溶性薬物は一時的な血中濃度の上昇を経て、排泄は速くなると考えられる。この一時的な薬物の血中濃度上昇が安全性上問題となる場合には、薬物は体内残存するものの体脂肪は一定に保つべきと考えられる。これらの情報を勘案すると、TAK-357 の臨床開発では体脂肪量の変化を観察し、体脂肪量の変化によって全身暴露が変化することから、安全性マージンを注意深く確認すべきであると考えられた。上記の結果ならびに考察から、TAK-357 の血漿中濃度と体重変化の関係についての更なる定量的な解析が、臨床試験条件の最適化やその結果解釈に重要と考えられた。

2.5 小括

本試験では TAK-357 の動物における ADME 特性を明らかとした。TAK-357 は高濃度に脂肪組織に分布し、その結果長い血漿中半減期と体内への蓄積を起こしていることが示唆された。また、TAK-357 の体内動態は動物およびヒトにおいて脂肪重量変化によって影響を受けることが示唆された。

第3章 脂肪組織へ高濃度分布する薬物の体内動態に与える急激な体重低下の影響:

生理学的薬物動態 (PBPK) モデリング&シミュレーション

3.1 はじめに

本章では、第1章で述べたイヌのTK試験時の最終投与2週間後から認められた TAK-357 の血漿中濃度上昇の原因について推察した。第2章では高脂溶性薬物である TAK-357 の非臨床 ADME 特性について評価し、非常に長い半減期と脂肪組織への高濃度の分布を明らかにした (27)。PCB やポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン (PCDDs) などの高脂溶性毒性物質は、TAK-357 と同様の特性が報告されている (34)。PCB の1種である 6-CB は脂肪組織への分布が非常に多く、血中半減期が100日以上とその消失が非常に遅い (54)。この 6-CB は摂餌制限による飢餓状態において、脂肪組織からの消失や体内からの排泄が加速する報告がある (37, 64, 65)。この状況下で血中 6-CB 濃度は高値を示していることから脂肪組織中から血中への再分布が示唆されている。6-CB での報告および TAK-357 の ADME 特性からイヌ脂肪組織中に残存した TAK-357 が体重減少に伴い血漿中へ再分布した可能性が考えられた。しかしながら、飢餓や感染による急激な体重低下の再現は動物倫理上問題である。そこで本章では、既存の PK データを用いた定量的な解析方法として生理学的薬物動態(PBPK)モデリング &シミュレーション(M&S)を用いた。PBPK M&S はヒト PK 予測 (24)、薬物間相互作用予測 (39)、組織中薬物濃度予測 (32) および安全性試験におけるリスク評価等 (49) に用いられている。また、PCB や tetrachlorobenzyltoluenes などの環境毒素の PBPK 解析も報告されている (42, 50)。本研究では TAK-357 について、その体内動態を表現するための最小構成の PBPK モデルを構築し、TAK-357 の血漿中濃度上昇について評価した。

3.2 実験材料と方法

3.2.1 被験物質, 試薬

TAK-357 は武田薬品工業株式会社、製薬研究所で合成されたものを用いた。その他の試薬と試液は分析グレードのものを購入した。

3.2.2 動物

雄性ビーグル犬 (13, 19 ヶ月齢, 投与開始時 10.5, 11.8 kg) は北山ラベスより入手した。イヌはステンレスケージで飼育し, 1 日 1 回ペレット状の餌 Certificate canine diet #5007 (PMI Nutrition International, カンザス) が給餌され, 水は自由摂水とした。試験期間中正常であった個体を No.1 とし, 最終投与 2 週間後より体重低下が認められた個体を No.2 とした。

3.2.3 動物試験

前述した血漿中濃度上昇は予備的な TK および安全性評価のために行われた試験の結果であり, 実験方法は以下の通りである。TAK-357 は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した。TAK-357 は 1 日 1 回で 15 日間 2 頭のイヌに 1000 mg/kg の用量で経口投与した。コントロール群には投与媒体を投与した。食餌は投与 2 時間後に給餌した。TAK-357 血漿中濃度測定用の採血は, 初回投与 1, 2, 4, 8, 24 時間後, 15 回目投与の投与前, 投与 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 時間後および 15 回目投与の 7, 14, 21, 28 日後に実施した。体重測定は Day 0 (投与開始日) から Day 42 まで 1 週間に 1 回行った。全ての動物試験は武田薬品工業株式会社 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) にて評価, 承認された。

3.2.4 血漿中 TAK-357 の定量

血漿試料中の TAK-357 は HPLC を用いて定量下限 0.025 µg/mL の定量法で測定した。血漿試料はメタノールで除蛋白し, 遠心上清を 20 mmol/L の酢酸アンモニウム水溶液で希釈した後, 40°C に設定した ACQUITY UPLC HSS T3 カラム (1.8 µm, 2.1 × 100 mm, Waters) を接続した HPLC に注入した。検出には蛍光検出器を用い, 励起波長が 290 nm, 検出波長が 760 nm で測定した。アセトニトリル/メタノール/20 mmol/L 酢酸アンモニウムが 9:9:2 (v/v/v) の均一濃度の移動相で 3 分間かけて流速 0.5 mL/min でクロマトグラフ分離を行った。

3.2.5 PBPK モデリング

第2章で報告した TAK-357 をラットへ 0.3, 1, 3 mg/kg の用量で経口投与又は 1 mg/kg の用量で静脈内投与およびイヌへ 3 mg/kg の用量で経口投与, 1 mg/kg の用量で静脈内投与した後の血漿中濃度推移を PBPK モデル構築に用いた (27)。モデリングには NONMEM VI (ICON Development Solution, メリーランド) の First-order Conditional Estimation (FOCE) with interaction 法を用いた。パラメータ推定の収束基準としては有効数字 3 桁を用いた。Compaq Digital Fortran Version 6.1 を NONMEM を実行するためのコンパイラーとして用いた。シミュレーションには Berkeley Madonna Ver 8.3.8 (University of California, カルフォルニア) を用いた。わずかな個体間差推定の偏りがデータフィッティングに不適切な効果を与えるため、本解析では個体間変動を評価しなかった。残差評価には下記の相対誤差モデルを用いた (式 3-1)。

$$Y_{obs,ij} = Y_{pred,ij} \times (1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{式 3-1}$$

ここで、 $Y_{obs,ij}$ は i 番の個体の j 番目の実測値、 $Y_{pred,ij}$ はモデルから計算された予測値、 ε_{ij} は予測値と実測値の残差を表す。 ε_{ij} は平均 0, 分散 σ^2 の正規分布を仮定した。モデル選択は goodness-of-fit plot, パラメータ推定の精度, 最小目的関数値 (MVOF) を基に実施した。

Fig. 3-1 に最終的に構築した PBPK モデル図を示す。モデルは 4 つの組織コンパートメントと血液コンパートメントにて構成され, TAK-357 の血漿中 PK をよく記述可能であった。皮膚コンパートメントと残組織コンパートメントの基本の微分式は以下のとおりである (式 3-2, 3-3)。

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = \left(C_{blood} - \frac{C_{tissue}}{P_{tissue}} \right) \times Q_{tissue} \quad \text{式 3-2}$$

$$C_{tissue} = \frac{A_{tissue}}{V_{tissue}} \quad \text{式 3-3}$$

ここで C_{tissue} , C_{blood} , P_{tissue} , Q_{tissue} , V_{tissue} および A_{tissue} は, それぞれ組織中 TAK-357 濃度, 血液中 TAK-357 濃度, 組織/血液分配係数, 局所的血流速度, 組織体積および組織中 TAK-357 量を表す。血漿中 TAK-357 濃度 (C_{plasma}) は式 3-4 のように計算した。

$$C_{plasma} = \frac{C_{blood}}{R_b} \quad \text{式 3-4}$$

ここで R_b は血液/血漿濃度比を表し、この値は第2章で算出した値を用いた。

第2章で実施した ADME 特性評価の結果から本解析においては TAK-357 の消失は肝臓での代謝によるものと仮定し、肝臓コンパートメントは式 3-5 のように記述した。

$$\frac{dA_{liver}}{dt} = \left(C_{blood} - \frac{C_{liver}}{P_{liver}} \right) \times Q_{liver} - CL_{int} \times \frac{C_{liver}}{P_{liver}} + K_a \times A_{dose} \times F \quad \text{式 3-5}$$

ここで、 A_{dose} は TAK-357 の投与量、 CL_{int} は肝固有クリアランス (非結合型分率および R_b 含む)、 K_a は吸収速度定数、 F はアベイラビリティを示す。 K_a 、 CL_{int} および F はフィッティングにより推定した。

脂肪組織では下記の式を用いた (式 3-6, 3-7)。

$$\frac{dA_{vf}}{dt} = (C_{blood} - C_{vf}) \times Q_{fat} - DIF \times Q_{fat} \times \left(C_{vf} - \frac{C_{fat}}{P_{fat}} \right) \quad \text{式 3-6}$$

$$\frac{dA_{fat}}{dt} = DIF \times Q_{fat} \times \left(C_{vf} - \frac{C_{fat}}{P_{fat}} \right) \quad \text{式 3-7}$$

脂肪組織においては拡散律速を考慮した。式 3-6 における DIF は拡散速度定数 (Q_{fat} に対する比として算出)、 C_{vf} は脂肪組織の微小血管中 TAK-357 濃度を表す。ラットの DIF はフィッティングによって推定した。イヌにおいては DIF はモデリングの過程で大きい値と推定されたため 10 に固定した。生理学的パラメータ (組織体積および血流速度) は文献値を引用した (15, 56)。ラットの組織/血液分配係数の初期値は脂溶性からの推定値を用いた。肝臓および皮膚における組織/血液分配係数はラットにおける実測の組織、血液中 AUC の比から算出した値に固定した。脂肪組織と残組織の組織/血液分配係数はフィッティングから推定した。肝臓や腎臓などの消失臓器における組織/血液分配係数は理論的には非抽出率 (F_h 等) で補正する必要がある。しかしながら、TAK-357 は非常に低いクリアランスを示すため、肝臓における抽出率は非常に低いと推察される。よって実測の AUC 比をそのまま肝臓の組織/血液分配係数として用いた。組織/血液分配係数は薬物の物理化学的性質に依存するため、イヌ PBPK モデルにおける組織/血液分配係数はラットの値と同じものを用いた。

3.2.6 シミュレーション

構築した PBPK モデルを用いて著しい体重低下後のイヌ TK をシミュレートした。F と K_a は低溶解性の薬物特性と高用量の試験であることから、初回投与時および試験期間中正常状態であった No.1 のイヌの 15 回目投与時の血漿中濃度推移に合うように調整した。また、No.1 のイヌの高用量における血漿中濃度時間推移を表現するために、脂肪への濃度依存的な飽和特性をシミュレーション用の P_{fat} ($P_{fat,sim}$) に式 3-8 のように追加した条件と、 P_{fat} の飽和を仮定しない条件においてシミュレーションを実施した。

$$P_{fat,sim} = \frac{P_{f,max}}{1 + \frac{C_{plasma}}{P_{f,50}}} \quad \text{式 3-8}$$

ここで $P_{f,max}$ は P_{fat} の最大値、 $P_{f,50}$ は $P_{fat,sim}$ が 50% 低下するときの TAK-357 血漿中濃度を表す。

今回設定した全てのパラメータについて変化を考慮しないシミュレーションをコントロールと表記する。体重低下を仮定した状態変化を Table 3-1 に示す。脂肪組織および筋肉 (PBPK モデルでは残組織として説明した部分) 重量の低下または筋肉重量のみの低下が、No.2 のイヌで認められた体重低下時で最も可能性の高いシナリオと考えられた。そこでシナリオ 1 では、最大の脂肪重量低下として 3 週間間に 90% の脂肪組織重量が低下し、25% の筋肉重量が低下した場合の TAK-357 血漿中濃度推移をシミュレートした。一方でシナリオ 2 では、筋肉のみが 58% 重量低下を示した場合を仮定した。これらの 2 つのシナリオに加えてクリアランス (シナリオ 3)、心拍出量 (シナリオ 4)、脂肪組織/血液分配係数 (シナリオ 5) 等その他のパラメータ変化時の感度分析もおこなった。シナリオ 3 では CL_{int} はコントロールの 10% に、シナリオ 4 では心拍出量はコントロールの 2 倍に体重低下開始時点で即時変化させた。シナリオ 5 では $P_{fat,sim}$ を 3 週間かけて体重低下開始時点の 30% にまで低下させた。

3.3 結果

3.3.1 動物実験

TAK-357を1000 mg/kgの用量でイヌ2匹へ15日間反復投与後の血漿中濃度推移をFig. 3-2に示す。2頭のイヌは共に反復投与により血漿中濃度が上昇した。2頭のうち最終投与2週間後に血漿中濃度が上昇したNo.2のイヌは体重が12.2 kg(最終投与1週間後) から9.4 kg(最終投与4週間後) まで23%低下した (Fig. 3-3)。このNo.2のイヌの剖検時の心臓、肺、肝臓の組織重量はそれぞれ126.0, 80.4 および372.8 gであり、媒体投与のコントロール群の組織重量81.8, 63.7 および201.9gと比較して重かった。

3.3.2 PBPK モデリング

PBPKモデルはPK過程に重要な最小数のコンパートメントでデータを適切に表現できるモデルを構築した。最終のPBPKモデルは血液、肝臓、脂肪組織、皮膚および残組織コンパートメントで構成されている (Fig. 3-1)。生理学的パラメータおよび薬物特異的パラメータをTable 3-2に示す。全てのパラメータは相対標準誤差が小さく正確に推定された。体重補正をした CL_{int} (L/h/kg) はイヌにおいてラットより低かった。Well-stirredモデルを用いて算出したイヌの肝クリアランスは25 mL/h/kgであり、第2章でノンコンパートメントモデル解析で算出した値 (24 mL/h/kg) と同等であった。フィッティング結果はFig. 3-4に示す。構築した最小のPBPKモデルは試験用量範囲におけるラットおよびイヌのPKデータを適切に記述した。

3.3.3 シミュレーション

No.1のイヌの血漿中濃度時間推移は高用量に調整したPBPKモデルで適切にシミュレートできた。 K_a および F はそれぞれ0.1 および0.027に設定した。 P_{int} の飽和を仮定したシミュレーションにおいては $P_{f,max}$ はPBPKモデリングの結果から495に設定し、 P_{i50} は10 $\mu\text{g/mL}$ とした。方法の項に記載したように組織重量変化の2つの仮定のもとシミュレーションを行った。それは認められた体重変化時

に最も可能性のある要因として脂肪組織および筋肉重量が低下した条件 (シナリオ 1) および筋肉重量のみが低下した条件 (シナリオ 2) である。シナリオ 1 においては 90%の脂肪組織と 25%の残組織容積が 3 週間かけて低下した条件にてシミュレートした (Fig 3-5)。その結果、実際に認められた TAK-357 の血漿中濃度をシミュレートすることに成功した (Fig.3-6)。一方で筋肉組織のみが低下したと仮定したシナリオ 2 では No.2 のイヌの血漿中濃度推移を再現することはできなかった (コントロールシミュレーションの結果と一致するために Fig.3-6 には未記載)。CL_{int} の低下 (シナリオ 3) はコントロールシミュレーションと比較して若干高いのみであった。心拍出量変化 (シナリオ 4) はコントロールシミュレーションとほぼ一致した (Fig.3-6 には未記載)。脂肪組織/血液分配係数 (P_{fat,sim}) の低下 (シナリオ 5) は TAK-357 の血漿中濃度を上昇させた。

3.4 考察

2 週間反復投与安全性試験において、急激な体重低下と共に異常な TAK-357 血漿中濃度の上昇が認められた (Figs. 3-2 および 3-3)。血漿中濃度の二峰性は通常、腸肝循環又は不連続な吸収部位が影響する場合に認められる。一方で、本試験における血漿中濃度上昇は最終投与後のかなり遅い消失相に認められた。腸肝循環や遅い吸収部位による影響は「時間」から「日」の時間単位で認められるため、本試験で認められた血漿中濃度上昇の「週」の時間単位とは大きく異なる。そのため、これらの腸肝循環等は今回の現象のメカニズムとは考えにくい。もう一つの可能性のある要因は脂肪組織容積の減少による脂肪組織中の TAK-357 の血漿中への再分布である。文献報告では高脂溶性物質の PK は体組成によって影響され、飢餓により血漿中濃度が上昇することが報告されている (37, 64, 65)。脂肪組織中 TAK-357 濃度は肝臓、腎臓、肺等の組織中濃度と比較してかなり高く、ラットやイヌにおいて脂肪組織が TAK-357 の貯蔵庫として働いているため (27)、脂肪組織から血漿中への再分布が異常な血漿中濃度上昇に関わっている可能性が考えられた。本研究では異常な血漿中濃度上昇が脂肪組織重量現象で説明できるか否かを現存データを用いた PBPK 解析で検証した。PBPK モデル解析は

ある特定の組織の薬物濃度を定量的に予測可能であり、それは脂肪組織重量変化の PK に与える影響を評価するのに有用である。

PBPK モデルの構築は成功し、パラメータ値が推定された (Table 3-2, Fig 3-3)。推定された非常に高い脂肪組織/血中分配係数は、以前に報告されている高い脂溶性と脂肪組織/血中分配係数の関係性と矛盾のないものであった (22, 56)。この高い分配係数は TAK-357 が非常に長く脂肪組織中に残存する原因と考えられる。No.2 のイヌの最終時点における主要臓器 (脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓および脾臓) 重量はコントロールのイヌと同等もしくは重かったため、体重低下の主な要素は脂肪組織および筋肉重量の低下によるものと仮定した。体重低下の影響をシミュレートする前に、体重低下の認められなかった No.1 のイヌの血漿中濃度推移を適切に記述するように、 F , K_a および P_{fat} のパラメータ値を最適化した。TAK-357 の溶解度は低いため高用量における血漿中暴露量は用量比以下の上昇を示し、吸収も遅くなることが想定される。そのため、 F や K_a は低用量で推定された値よりも低い値を設定した。 F や K_a の最適化後も最終投与後の血漿中濃度時間推移の予測値と実測値の間には若干の解離が残った。この解離を解消するために TAK-357 の脂肪組織への移行 ($P_{fat, sim}$) の飽和についても考慮した。モデルから推定した TAK-357 の脂肪組織中濃度は非常に高かったため (1000 $\mu\text{g/g}$ 以上)、飽和の可能性は十分あると考えられた。一方で、その他のパラメータ (CL_{int} 等) に与えた変化では実測値の濃度推移を記述するのに有効ではなかった。これらの最適化したパラメータを用いた条件および $P_{fat, sim}$ の飽和を仮定しない条件で体重低下の影響を評価した。脂肪組織および筋肉重量変化の劇的な変化例を仮定して (Fig 3-5)、TAK-357 の血漿中濃度をシミュレートした結果、実測値と同様の血漿中濃度上昇をシミュレートをすることができた (Fig 3-6, シナリオ 1)。一方で筋肉重量のみを低下させた場合には薬物濃度の上昇は認められなかった (シナリオ 2)。この傾向は $P_{fat, sim}$ の飽和を仮定してもしなくても同様であった。これらのシミュレーションは TAK-357 の血漿中濃度が脂肪組織重量の変化に対しては影響を受けるが、筋肉重量の変化に対しては影響を受けないことを示している。No.2 のイヌは日和見感染症の影響で異常な生理学的な状態であったため、体重や組織重量以外の要素も変化していた可能性は否定できない。しかしながら、心拍出量、代謝活性 (CL_{int})、脂肪組織への

移行比率 (P_{fat}) などの変化を評価できる実験データはなかった。そこでこれらの要素の TAK-357 の血漿中濃度推移に与える影響を評価するために感度分析を行った (シナリオ 3-5)。 CL_{int} の低下を仮定したシナリオ 3 では消失が非常に遅くなるものの、濃度上昇はシミュレートされなかった。心拍出量変化時はコントロールの血漿中濃度推移と一致した (シナリオ 4)。 P_{fat} の低下を仮定したシナリオ 5 においては血漿中濃度が上昇した。シナリオ 1 およびシナリオ 5 はどちらも脂肪組織中の TAK-357 が血漿中へと放出されていることを表している。以上のことから、イヌ TK 試験で認められた TAK-357 の異常な血漿中濃度上昇が主に体重低下に起因した脂肪組織中から血漿中への再分布で説明可能であることが示唆された。したがって、TAK-357 以外の高脂溶性薬物の PK も短期間の脂肪組織重量低下によって影響を受けることも考えられる。

今回の PBPK モデルからのシミュレーションでは、血漿と脂肪組織以外の組織における TAK-357 濃度が血漿中濃度上昇の 2 次的な影響として上昇することが予測される。もし、TAK-357 のみならず他の高脂溶性薬物の臨床治療中に急激な体重低下が起きた際には、血漿中や標的組織中の濃度上昇が起る可能性が考えられる。さらに、これらの薬物の治療濃度域が狭い場合、急な濃度上昇により安全性上の問題が発生する可能性もある。Geyer らは脂肪組織が血中濃度を低下させることにより、毒物から感受性の高い組織を守る役割を担っていると示唆している (26)。よって、脂肪重量が増加させることにより、高脂溶性薬物の血漿中濃度が低下し、薬物の安全性を高めることが可能かもしれない。しかしながら一方で、ヒトや動物で脂肪組織が多い場合には薬物の体内からの総排泄は遅くなると考えられる。これは体重変化に起因する安全性や薬理効果の変化を評価する上で重要なポイントである。以上のことから、非常に高脂溶性の薬物の安全性評価には、単純に血液中濃度の低下で安全性が確保されるという考えを提案するのみでなく、組織分布という観点から血中濃度低下に伴って一部の組織内濃度は高くなる可能性もあることから、その薬物に固有の ADME 特性を熟知した柔軟かつ適切な薬物濃度変動への考察が必要であると考えられた。

3.5 小括

本章の解析では, 非常に高脂溶性で脂肪組織へ高濃度分布する薬物の PK は脂肪組織重量の急激な変化によって影響を受けることが示唆された。

第4章 高濃度脂肪へ分布する薬物の動態に与える体脂肪変化の影響

4.1 はじめに

組織分布は薬物の動態に寄与する重要な過程の一つである。薬物の分布は主に脂溶性, pKa, 薬物特異的な蛋白質やその他成分への結合などによって特徴付けられる (30, 51)。そして, 組織分布の程度は結果として血漿中濃度やその半減期, 体内における残存, 総排泄速度などに影響する。前章までに報告したように, 環境毒物である PCB や PCDD は脂肪組織に蓄積し, 脂肪組織の重量変化によるその動態が影響を受け, 脂肪組織から血漿中へ再分布し, 排泄が加速されることが報告されている (34, 37, 64, 65)。もし, 薬物濃度が体重, 体組成 (body mass index 等) や除脂肪重量等によって変化するのであれば, 薬理作用や安全性特性が変化する可能性がある。臨床で使用されているいくつかの薬物においては, 体重および体組成による投与量調整が推奨されている (12, 23)。肥満状態における薬物動態については最近の総説にまとめられているものの (41), 脂肪組織へ高濃度分布する薬物と肥満との関係についての報告は少ない。本章では体組成の違いまたは体組成の変化が高脂溶性薬物の体内動態に与える影響を TAK-357 を代表薬物として用いて評価した。第3章において TAK-357 は急激な脂肪重量変化によって血漿中濃度が変動することを示した。しかしながら, これらの急激な体重変化が臨床で起きる可能性は低い。臨床においては, 反復投与期間中の定常状態において比較的緩やかな体重変化が起りやすいシナリオと考えられる。本研究で肥満動物と正常動物における TAK-357 の体内動態を比較したうえ, 高脂溶性薬物の体内動態に与える体組成の緩やかな体重変化が与える影響を PBPK モデル解析で評価した。

4.2 実験材料と方法

4.2.1 被験物質, 試薬

TAK-357 (含量:100%) は武田薬品工業株式会社, 製薬研究所で合成されたものを用いた。
[¹⁴C]TAK-357 (放射科学的純度>97%) はビオブリッジ株式会社で合成されたものを用いた。その他の試薬と試液は和光純薬工業株式会社もしくは Perkin Elmer より入手した。

4.2.2 動物

使用した肥満型糖尿病モデルラットである Wistar fatty ラットおよびその対照動物 Wistar lean ラットは武田ラビックス (大阪) より購入した。ラットは雄性で投与開始時 16 週齢で 1 群 4 匹で使用した。全ての動物はステンレスケージで飼育し、飲水および食餌としての CR-LPF は自由摂取とした。

4.2.3 動物実験

[¹⁴C]TAK-357 はジメチルアセトアミド:1,3-ブタンジオールの 1:1 の混液に溶解し、Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットに静脈内投与した。ラットは尿や糞を回収するために 7 日間代謝ケージ内で飼育した。投与 7 日後から 30 日後までは飼育ケージ内で飼育し、糞を 1 週間に 2 回回収した。血液試料は投与後 5, 15, 30 分, 1, 4, 8, 24 時間, 2, 4, 8, 11, 15, 18, 21, 24, 28 および 30 日後に尾静脈から採取した。投与 30 日後にラットをイソフルランを用いた麻酔下において放血致死させ、白色脂肪組織および褐色脂肪組織を採取した。

TAK-357 は 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットに単回もしくは 1 日 1 回反復経口投与をした。単回投与群では投与後 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間, 2, 4, 8, 11, 15, 18, 21, 24, 28 および 31 日後に採血した。反復投与群は Day 0 (初回投与日), Day 13 および Day 17 では投与後 0.5, 1, 2, 4, 8 および 24 時間に採血し, Day 6, 9, 13, 19, 22, 27 には投与前に 1 回のみ採血した。血漿試料は血液を 9,000×g, 4°C で 5 分間遠心分離することにより得た。

Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットの体組成は EchoMRITM 900 (EchoMRI, テキサス) を用いて 1 週間に 1 回評価し、同時に体重も測定した。体脂肪率は式 4-1 の計算式を用いて計算した。

$$\text{体脂肪率 (\%)} = \frac{\text{総脂肪重量 (g)}}{\text{体重 (g)}} \times 100 \quad \text{式 4-1}$$

全ての動物試験は武田薬品工業株式会社 IACUC にて評価、承認された。

4.2.4 血漿蛋白結合

Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラット血漿中の $[^{14}\text{C}]$ TAK-357 の 0.1 および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における蛋白結合率は *in vitro* で超遠心法によって評価した。ブランク血漿は余剰ラットから採取した。

4.2.5 濃度測定法

TAK-357 を経口投与後の血漿中 TAK-357 濃度は定量下限 2 ng/mL の LC/MS/MS (API-4000, Applied Biosystems/MDS SCIEX) を用いて定量した。血漿中の TAK-357 はメタノールで除蛋白することにより抽出した。遠心後に上清を移動相で希釈し、LC/MS/MS に注入した。カラムには Shim-pack XR-ODS カラム(2.2 μm , 2.0 \times 30 mm, 島津製作所)を用い、50°C に維持した。移動相 A には 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液/ギ酸 (100:0.2, v/v) を、移動相 B にはメタノールを用いた。流速は 0.5 mL/min に設定し、グラジエントは下記の通りとした。0.2 分間 10% B で維持し、その後 0.8 分までに直線的に 95% B まで上昇させ、1.5 分間維持させた。その後 0.01 分で 10% B まで低下させ、残り 0.59 分をかけて平衡化した。1 注入の総サイクル時間は 3.1 分間であった。TAK-357 は MRM モードで検出し、その m/z は 381 \rightarrow 191 とした。この分析法の正確性および精度はそれぞれ 16.0-3.6% および 3.8-10.0% であった。

血漿、脂肪組織、尿および糞中の放射能は LSC で測定した。 $[^{14}\text{C}]$ TAK-357 を静脈内投与後の血漿中代謝物組成分析では放射性成分をアセトニトリルまたはアセトニトリル/イソプロパノール(1:2, v/v)で抽出した。遠心後に上清は窒素気流下で乾固し、移動相で再構築した後にオンライン放射能測定器を接続した HPLC に注入した。カラムには L-Column ODS column (5 μm , 250 $\text{mm} \times$ 4.6 mm , 化学物質評価研究機構)を用い、40°C に維持した。移動相 A には 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/アセトニトリルの 9:1 混液を、移動相 B には 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/アセトニトリル 1:9 混液を用い、流量を 1 mL/min とした。グラジエントプログラムとして 50%移動相 B から開始し、10 分までに 100% 移動相 B に直線的に上昇させた。15 分間 100%移動相 B を維持後に 50%移動相 B に 0.1 分間で戻し、10.9 分間かけて再平衡化した。1 注入毎の総サイクル時間は 36 分である。

4.2.6 薬物動態解析

モデリングにはNONMEM VIのFOCE with interaction法を用いた。PBPKモデルは第3章でSDラットおよびイヌのPKデータを用いて構築したものを基本とし、体重、週齢、体組成などを参考に実測の組織重量や報告値などから最適化した(15, 28, 56)。時間に依存した体組成の変化や体重増加も考慮した。最終的なPBPKモデルはFig. 4-1に記載した。

ALAGは経口投与から消化管吸収が始まるまでのラグタイムを表している。Wistar leanラットの組織/血液分配係数(P_x 値)は第3章で推定したSDラットの値を用いた。Wistar fattyラットにおいてはWistar leanラット等の正常動物と同じ P_x 値では実測の血漿中濃度推移を記述することができなかつたため、脂肪組織、肝臓およびその他の組織における分配係数はモデルフィッティングにより最適化した。その他のパラメータの不安定な推定を避けるため、Wistar fattyラットの P_x 値は最適化後は固定した。反復経口投与群の1回目の血漿中曝露がその他の投与時(単回および反復投与群の2回目以降)と比較して低かつたため、バイオアベイラビリティ(F)はその他の投与時とは別に推定した。

体組成分析計で測定した除脂肪重量はWistar fattyラットとWistar leanラットで同等であったため、体重の差は脂肪重量の差のみで説明できると考えられた。そこで、脂肪組織以外のWistar fattyラット組織重量はWistar leanラットと同じとみなし、式4-2, 4-3を用いて計算した。

Wistar fattyラットの個体別組織重量 =

$$\text{Wistar leanラット平均組織重量} \times \frac{\text{Wistar fatty個体別体重}}{\text{Wistar fattyラット平均体重}} \quad \text{式4-2}$$

Wistar fattyラットの脂肪組織重量は下記のように算出した。

$$\text{Wistar fattyラット}V_{fc} = \text{Wistar leanラット}V_{fc} \times \frac{\text{Wistar fattyラット体脂肪率}}{\text{Wistar leanラット体脂肪率}} \quad \text{式4-3}$$

心拍出量は式44のようにアロメトリーに従い計算した(15)。

$$\text{心拍出量(L/h)} = 60 \times 0.235 \times (\text{体重(kg)})^{0.75} \quad \text{式4-4}$$

Wistar lean ラット血漿中の代謝物データおよび両系統の排泄データについても、マスバランスに矛盾が無いことを確認するためにモデル化して解析した。記述的なコンパートメントモデルを代謝物および排泄モデルに用いた。結果の項に記載の通り、Wistar fatty ラットの血漿中放射能成分のほぼ全てが未変化体であったため、このモデル解析では総放射能濃度を未変化体濃度とみなした。

4.2.7 シミュレーション

シミュレーションには Berkeley Madonna Ver. 8.3.8 を用いた。第一の条件として TAK-357 のように低 CL_{int} (0.08 L/h) において、肥満状態と正常状態における 1 日 1 回、1 週間に 1 回および 4 週間に 1 回反復投与での血漿中濃度を比較した。一方、 CL_{int} が高脂溶性薬物の血中濃度推移に与える影響を推測するために、高 CL_{int} 条件 (5 L/h) で 1 日 1 回反復投与した際の血漿中濃度比較も実施した。本解析では脂肪組織重量の違いが PK に与える影響を評価することが主目的であるため、 CL_{int} が肥満状態と正常状態いずれにおいてもシミュレートの期間中一定の値と設定した。肥満状態および正常状態の生理学的パラメータはそれぞれ Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットと基本的に同等の値を用いた。一方で低 CL_{int} 条件において肥満状態で反復経口投与後に定常状態に達した 4 ヶ月後以降に体脂肪が 40% から 20% まで低下したときの血漿中濃度についても比較した。体脂肪の低下は 1 日、1 ヶ月、6 ヶ月かけて低下した場合を比較した。この時、その他の組織の重量はシミュレートの期間中固定した。また、この時 P_x 値は Wistar fatty ラットで推定された値から Wistar lean ラットで推定された値まで体脂肪の低下と比例して上昇させた。

4.3 結果

4.3.1 実験データ

Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットの体重および体脂肪率を Table 4-1 に示した。Wistar fatty ラットの体重は4週間の試験期間を通じて Wistar lean ラットの体重よりも重く、体脂肪率も高かった。Wistar lean ラットの体脂肪率は4週間にわずかに増加した。0.1 および 1 $\mu\text{g/mL}$ における ^{14}C TAK-357 の血漿蛋白結合率は Wistar fatty ラットで 96.4% および 94.8% であり、Wistar lean ラットでは 97.3% および 97.5% であった。 ^{14}C TAK-357 を Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットへ 2 mg/kg の用量で静脈内投与した後の血漿中総放射能濃度は、720 時間に渡って持続した (Fig. 4-2)。Wistar fatty ラットの血漿中総放射能濃度は、Wistar lean ラットの血漿中濃度と比較して投与後 24 時間までおよび 360 時間以降は高かった。一方で投与後 48 時間から 264 時間までは Wistar fatty ラットの血漿中濃度が Wistar lean ラットと比較して低かった。代謝物分析の結果から、Wistar fatty ラットの血漿中の主成分は試験期間通じて TAK-357 未変化体であった (Table 4-2)。Wistar lean ラット血漿中では時間経過に伴い未変化体比率は低下した。放射能の排泄は Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラット共に投与後 720 時間までに完了しなかった。排泄速度は Wistar fatty ラットよりも Wistar lean ラットで速かった (Fig. 4-3)。いずれのラットにおいても、累積排泄率は糞の方が尿よりも高かった。白色脂肪組織および褐色脂肪組織中の平均総放射能濃度は Wistar fatty ラットでそれぞれ 2.519 および 2.104 $\mu\text{g equivalent/g}$ であり、Wistar lean ラットでそれぞれ 3.726 および 2.247 $\mu\text{g equivalent/g}$ であった。

TAK-357 を Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットへ 3 mg/kg の用量で経口投与した後の血漿中放射能濃度は 720 時間まで持続した (Fig. 4-4)。Wistar fatty ラットの C_{max} は Wistar lean ラットの C_{max} より高く、終末相の半減期は Wistar fatty ラットの方が長かった。TAK-357 の C_{max} およびトラフ濃度 (C_{trough}) は反復経口投与により上昇し、4 週間で両ラット共に定常状態に達しなかった (Fig. 4-4, Table 4-3)。

4.3.2 PBPK モデリング

PBPK モデルは最小限のコンパートメントにより適切に実測データを記述することが可能であった (Figs. 4-2~4)。最終的な PBPK モデルは血液, 肝臓, 脂肪組織, 皮膚および残組織のコンパートメントで構成された (Fig. 4-1)。生理学的パラメータや薬物特異的パラメータは文献からの引用もしくはフィッティングにより推定した (Table 4-4)。推定値の相対誤差は小さかった。Wistar fatty ラットの CL_{int} は Wistar lean ラットと比較して低かった。また Wistar fatty ラットの組織/血液分配係数は Wistar lean ラットや SD ラットと比較して低かった。Wistar lean ラットにおける血漿中代謝物濃度についてもコンパートメントモデルで記述可能であった。

4.3.3 シミュレーション

1日1回反復経口投与中のシミュレーションでは定常状態に達するまでの時間は肥満ラットで長かったものの、定常状態における平均, 最高, トラフ血漿中濃度は肥満ラットおよび正常ラットで同程度であった (Fig. 4-5A)。また, 投与間隔を1週間に1回または4週間に1回にした場合も血漿中濃度に大きな差は認められなかった (Fig. 4-5B, C)。更に, 高 CL_{int} の条件において1日1回反復投与中の血漿中濃度推移においても最高/トラフ血漿中濃度比は低 CL_{int} 条件時と比較して大きいものの傾向は同じであった (Fig. 4-5D)。また, 脂肪重量を1日, 1ヶ月又は6ヶ月の間に50%低下させた際の血漿中濃度シミュレーションにおける血漿中濃度変化はコントロールシミュレーションの2倍以内であった (Fig. 4-6)。

4.4 考察

第3章の PBPK モデリング&シミュレーションの結果から, 脂肪に高濃度分布する薬物の血漿中濃度は, 急激な体重低下により上昇することが示唆された (28)。しかしながら第3章で示したような急激な体重変化が起る可能性は少ない。一方で体重や体組成に依存した用量調整が必要であるか否かは重要な問題である。そこで本章では比較的緩やかな体重変化や脂肪重量の違いによる高脂溶性薬物

の体内動態に与える影響を TAK-357 をツール薬物として利用し、実験データと共に評価した。肥満型 Wistar fatty ラット (体脂肪率 45%) と正常型 Wistar lean ラット (体脂肪率 13%) を非臨床モデル動物として用いた (Table 4-1)。本章では第 3 章で構築したモデルを基本に、本章で得られた血漿中動態および排泄動態の結果にあわせて最適化した。その結果、本章で用いた PBPK モデルは Wistar fatty ラットおよび Wistar lean ラットの血漿中動態および排泄動態を記述することができた (Figs. 4-2~4)。また、Wistar lean ラットの血漿中濃度をある程度記述することができた。このことから両系統における体内動態は、いくつかのパラメーターだけが異なる同じモデルで特徴付けることが可能であることが示唆された。反復投与群の初回投与 24 時間後までの血漿中濃度推移は静脈内投与後と比較して若干早い濃度低下を示した。この原因は不明であるが、このことがシミュレーションがトラフ濃度を若干 over prediction している理由と考えられる。しかしながら、今回の PBPK モデルが基本的に実測値をよく反映しており、本解析の目的の上で十分な正確性を持っていると考えられた。

両系統のラットにおいて最も明白な違いは脂肪組織重量 (V_f) である。また、分配係数 P_x および固有クリアランス CL_{int} についても両系統で異なると推定され、血漿中濃度に大きく影響していると考えられた。基本的に成長に伴う体重増加の過程で、体脂肪率は増加すると考えられる(15)。よって、第 3 章で用いた 8 週齢の SD ラットの V_f と本章で用いた 16 週齢の Wistar lean ラットの V_f に異なる値を用いることは問題ないとする。また、モデル上で推定された Wistar fatty ラットの V_f は 0.38 であったが、これは体脂肪率の約 85% である。体脂肪率は脂肪組織の重量のみでなく、血液やその他の組織中の脂質成分も含めた比率と考えられるため、この体脂肪率の 85% という値は尤もらしい推定値であると考えられた。血漿中濃度においては体脂肪率が Wistar fatty ラットと Wistar lean ラットで約 4 倍も違うのにもかかわらず、実測された血漿中濃度の違いは 2 倍の範囲内であった。これは脂肪重量の血漿中薬物濃度に与える影響がその他の因子によってある程度相殺されているためであることが示唆された。実際には Wistar fatty ラットにおいて、Wistar lean ラットよりも低い組織/血液分配係数 (P_{fat} , P_{liver} および $P_{R,tissue}$) が関係していると推察される。この低い分配係数は肥満動物における高い血中脂質成分が原因となっていると考えられた。高脂血症は低い組織/血液分配係数を誘導す

ることが示唆されている (55)。分配係数 P_x の違いについての仮説をFig. 4-7に記載した。理論的には、二つの成分間の分配は物質の物理化学的性質 (脂溶性および電離度) および二成分 (例えば血液と組織) における脂質含有量に依存する。Wistar fatty ラットにおいては血漿中総コレステロールおよびトリグリセリド濃度が高いことが報告されている (36)。したがって、肥満動物における組織/血液分配係数の違いは、血漿中と組織中の脂質成分の比によって説明できると考えられる。Wistar fatty ラットの脂肪組織の容積は明らかに Wistar lean ラットと比較して多いが、生化学的な脂肪組織の成分は同じ脂質成分であると考えられる。更に、筋肉組織においても高脂質な筋肉という組織は考えにくいので、その成分は肥満状態および正常状態で差はないと考えられる。よって、Wistar fatty ラットにおける高脂血症は脂肪組織およびその他の組織(主に筋肉)における組織/血液分配係数 (P_{fat} および $P_{R,tissue}$) の低下を導いたと考えられる (Fig. 4-7A, 7B)。この Wistar fatty ラットにおける低い P_{fat} は $[^{14}C]$ TAK-357 の静脈内投与 720 時間後における総放射能の実測した脂肪組織/血漿濃度比が、Wistar lean ラットと比較して 50-60%と低かったことと矛盾のない結果であった。この組織/血液分配係数の低下は、脂肪組織重量増加による脂溶性薬物の血漿中動態および脂肪組織への分布への影響を一部相殺していると考えられる。今回の TAK-357 の場合では、脂肪組織容量が 4 倍に増加することにより約 2 倍の量を蓄積している計算となる。さらに、Wistar fatty ラットは脂肪肝の症状を示すため、肝臓中脂質量も P_{liver} に影響すると考えられる (Fig. 4-6C)。モデル解析の結果、Wistar fatty ラットの P_{liver} においても Wistar lean ラットよりも低いと推定された。また、Wistar fatty ラットの CL_{int} も Wistar lean ラットよりも低いと推定された (Table 4-4)。高脂血症もしくは肥満は、ラットの CYP 発現量若しくはヒトの CYP3A4 活性を低下させるという報告がある (11, 58)。よって、本試験で認められた Wistar fatty ラットにおける低い代謝速度は妥当な結果と考えられる。この低い代謝能 (CL_{int}) も脂肪組織への蓄積と同様に Wistar fatty ラットにおける遅い排泄にある程度関係していると考えられるので Wistar fatty ラットと Wistar lean ラットにおける直接的な動態の比較は脂肪組織重量を含めた体組成の違いと代謝能の違いの両方の影響を受ける。よって肥満が薬物動態に与える影響を評価する際には、複数の影響を加味する必要がある。しかしながら、複数の要因の中から単一要素の変動が薬物動態に与える影響を考察

する必要がある際には、モデルベースのシミュレーションは有用な手法と考えられる。本解析では代謝能を一定として、脂肪に高濃度分布する薬物の動態に与える脂肪組織重量の影響に特化して評価した。

TAK-357 の脂肪組織/血液分配係数は非常に高いため、TAK-357 をモデル薬物として用いたシミュレーションはその他様々な薬物の動態に与える最大の影響を評価していると考えられる。CL_{int}が低く、TAK-357 と同様に非常に半減期が長い薬物の場合、シミュレーションによる1日1回反復投与期間中の血漿中濃度 (平均, 最大, トラフ濃度) は肥満状態と正常状態で同程度であった(Fig. 4-5)。この傾向は、長い投与間隔や高 CL_{int} 条件で半減期が短い場合も同様の結果であった。また、途中で体組成が変化した場合も、血漿中濃度変化は最大でも2倍程度の違いしかシミュレートされなかった(Fig. 4-6)。これらのシミュレーションから、非常に高濃度で脂肪組織に分布する薬物であっても、体組成の違いや緩やかな体組成変化は定常状態における血漿中動態にあまり影響を与えないことが示唆された。一方で、肥満状態の体内に残存した TAK-357 の量は正常状態よりも2倍以上高いと考えられる (4倍の脂肪組織容量を持つ場合, Fig. 4-7A)。また、これは投与した薬物およびその代謝物の体内からの排泄が遅くなることを意味している。組織/血液分配係数は物質の物理化学的性質と組織および血液の組成に依存していることから、体組成の体内動態に与える影響は他の高脂溶性薬物、他の動物種においても同様の傾向を示すと推察される。すなわち、高脂溶性薬物の終末相における半減期は肥満状態と正常状態で異なるが、定常状態の血漿中濃度に大きな差がないものと推察される。以上を考察すると高脂溶性の薬物であっても非常に治療濃度域が狭い薬物以外は脂肪重量の違いによる投与量調整は必要ないと考えられる。

4.5 小括

本章の結果より、高脂溶性薬物においても脂肪容量の違いによる薬物動態に与える影響は限られていると考えられた。

第5章 総合考察およびまとめ

武田薬品工業株式会社において見出された新規アルツハイマー治療候補薬 TAK-357 は、脂溶性が高い薬物である。この TAK-357 の 4 週間反復期間評価も併せたイヌ 1 日 1 回 2 週間反復経口投与 TK 試験において、2 匹の雄性イヌのうち 1 匹において最終投与 2 週間後から、血漿中濃度上昇が認められた。臨床上で同様の急な血漿中濃度上昇が起る際には濃度依存的な副作用が発現する安全性上の懸念がある。この原因を推定することは TAK-357 の開発のみならずその他の高脂溶性薬物の体内動態把握および用量調整等の適正使用に有用な情報となりえる。そこで本研究では TAK-357 で認められた血漿中濃度上昇の原因を推察し、更に発展的に高脂溶性薬物の体内動態に与える脂肪重量の影響について調査した。

5.1 TAK-357 のラットおよびイヌにおける薬物動態学的特徴および血漿中濃度上昇に対する定性的推定

標識薬物を用いた TAK-357 の ADME 評価では、ラットおよびイヌで良好な BA で吸収された後、非常に長い血漿中半減期を持ち、非常に遅い排泄速度を示すことにより単回投与 4 週間後においても排泄が終了しなかった。また、吸収された TAK-357 は代謝を受けてから主に糞排泄されると推察された。更に組織分布試験では放射活性がラットおよびイヌの脂肪組織に高濃度分布することが明らかとなった。投与 4 週間後の 300-500 倍という脂肪組織/血漿中濃度比は他の組織と比較して非常に高かった。この濃度比は他の一般的薬物(最大 100-200)と比較しても高いものであった (22, 35)。3 mg/kg の用量では経口投与 4 週間後においても脂肪組織中濃度はラットで 1 $\mu\text{g equiv./g}$ 以上、イヌで 10 $\mu\text{g equiv./g}$ 以上と高濃度であった。ラットおよびイヌにおける TAK-357 およびその代謝物の残存量は脂肪組織中で最も高く、他の組織と比較しても 50-100 倍以上高かった。また、イヌでは投与量の約 50%が脂肪組織中に残存していることが示された。さらに、脂肪組織中の組成分析の結果、主成分は未変化体であり、脂肪組織中の成分に共有結合していないことが示唆された。つまり、未変化体が脂肪中に蓄積することにより、体内に残存していることが示唆された。共有結合でないことや脂

肪組織への分布においてトランスポーターの関与の報告が少ないことから、TAK-357が脂肪組織に高濃度分布する要因は非常に高い脂溶性であることが推察できる。

一般的に、血漿中濃度の二峰性は腸肝循環または不連続な吸収部位が影響する場合に限って認められる。一方で、イヌ TK 試験で認められた血漿中濃度上昇は最終投与後のかなり遅い消失相に認められた。腸肝循環や遅い吸収部位による影響は「時間」から「日」の単位で認められるため、本試験で認められた血漿中濃度上昇の「週」の単位とは大きく異なる。これらの可能性の有無および TAK-357 が脂肪組織内に高濃度存在していることから定性的に考察すると、イヌ TK 試験で認められた血漿中濃度上昇は脂肪組織に蓄積した薬物が体重低下に伴う脂肪重量減少により血漿中へ再分布した可能性が示唆された。

5.2 イヌ TK 試験時に認められた血漿中濃度上昇の定量的原因推定

ADME 評価から、定性的に脂肪組織中から血漿中への再分布が TK 試験時に認められた血漿中濃度上昇の原因であることが示唆されたが、定量的にこの血漿中濃度上昇が説明可能かを PBPK モデル解析を用いて評価した。薬効用量における ADME 評価時の血漿中濃度データから PBPK モデルを構築し、TK 試験用量である 1000 mg/kg でのシミュレーションに用いた。その結果、脂肪組織重量を急激に減少させた場合には TK 試験時に認められたような血漿中濃度上昇が再現された。一方で、大きな組織重量を持つ筋肉を減少させた条件では血漿中濃度上昇はシミュレートされなかった。また、その他の因子が関与する可能性を評価するために感度分析を行ったところ、代謝能や心拍出量に変化しても、血漿中濃度上昇は説明できないことが示された。一方で脂肪組織/血液分配係数が低下した場合にもある程度の血漿中濃度上昇はシミュレートされた。脂肪組織重量低下および脂肪組織/血液分配係数の低下いずれにおいても、脂肪組織中に蓄積した TAK-357 が血漿中に再分布していることを示唆しており、再分布がイヌ TK 試験時に認められた血漿中濃度上昇の原因として定量的にも説明可能であった。

5.3 脂肪量変化が高脂溶性薬物の体内動態に与える影響および投与量調整の必要性

高濃度脂肪組織に分布する高脂溶性薬物が急激な体重変化により血漿中濃度が変動することが示唆された。そのため、高脂溶性薬物が体重や体組成に依存した用量調整が必要であるか否かは重要な問題である。そこでTAK-357を肥満のモデル動物であるWistar fatty ラットと正常動物であるWistar lean ラットの血漿中動態および排泄動態を比較した上、PBPKモデルによるシミュレーションを用いて高脂溶性薬物の体内動態に与える脂肪重量の影響について評価した。その結果、両系統で血漿中濃度の差は小さかった。一方で排泄速度にはWistar fatty ラットと比較してWistar lean ラットの方が約4倍速かった。PBPKモデル解析の結果、両系統間で主要な差は脂肪組織重量、組織/血液分配係数および代謝能(CL_{int})であった。Wistar fatty ラットの脂肪組織重量はWistar lean ラットの4倍であった。しかしながら、肥満状態による血中脂質の増加が脂肪組織/血液分配係数を低下させることにより、脂肪組織中に蓄積している薬物量は約2倍程度に収まることが示された。Wistar fatty ラットとWistar lean ラットにおいて代謝能も異なったことから、両系統における直接的な動態は脂肪組織重量を含めた体組成の違いと代謝能の違いの両方の影響を受ける。肥満が薬物動態に与える影響を評価する際に、複数の影響を混同しないために、本研究では代謝能を一定として血漿中濃度をシミュレートすることにより高脂溶性薬物の動態に与える脂肪組織重量の影響に焦点を当て評価した。肥満状態と正常状態における血漿中濃度比較を半減期の長短や投与間隔を1週間や4週間にするなど、様々な条件のもとでシミュレーションした。その結果、定常状態に達するまでの時間は異なるものの、血漿中濃度はいずれの条件においても肥満状態と正常状態で同程度であった。また、途中で体組成が変化した場合も同様に血漿中濃度変化は最大でも2倍程度の違いしかシミュレートされなかった。以上のことから、非常に高濃度で脂肪組織に分布する薬物であっても、体組成の違いや緩やかな体組成変化は定常状態における血漿中濃度は同程度であることが示唆された。一方で肥満状態の体内に残存した薬物量は正常状態よりも高く、体内からの排泄が遅くなると推察された。体内残存量が異なることに注意は必要であるが、薬理効果や副作用は一般的に定常状態の血漿中濃度に依存するとも考えられる。よって、高脂溶性の薬物であっても非常に治療濃度域が狭い薬物以外は脂肪重量の違いのみによる投与量調

整は必要ないと考えられた。このことはヒトで高分布容積を示すハロペリドール(21.4 L/kg, (18)), パロキセチン (17 L/kg, (48)), アミオダロン (10 L/kg 以上, (46)), イミプラミン(10 L/kg 以上, (29)) などが、臨床使用上で体重やBMIによって用量調整を必要としていないことと矛盾しなかった (1-4)。一方で、高脂血症もしくは肥満はラットの CYP 発現量若しくはヒトの CYP3A4 活性を低下させるという報告がある (11, 58)。さらに肥満患者においては CYP3A4 の基質であるミダゾラムの CL が健常人と比較して低いという報告がある (13, 14)。よって体組成や体重による投与量調整の必要性は分布過程のみでなく、代謝能についても注意が必要と考えられる。

5.4 まとめ

1. TAK-357 のイヌ反復 TK 試験最終投与 2 週間後に体重低下を伴う血漿中濃度上昇が認められた。
2. ラットおよびイヌにおける ADME 評価から TAK-357 は高濃度脂肪組織に分布することにより排泄が非常に遅くなり、脂肪組織に蓄積した薬物が血漿中へ再分布した可能性が定性的に示唆された。
3. PBPK モデル解析からイヌ TK 試験で認められた血漿中濃度上昇が急激な脂肪重量低下によるものであることが定量的に示唆された。
4. 肥満動物を用いた動態評価および PBPK モデル解析から、定常状態における血漿中濃度に大きな差はないと考えられるため、脂肪重量の違いのみによる投与量調整は必要ないと推測した。

本研究では高脂溶性薬物の薬物動態への脂肪重量変化の影響を明らかにした。医薬品開発において薬効および安全性の指標としての薬物動態学の重要性は増加し続けている。本研究の成果が様々な複合的な要因から成り立つ薬物動態に対する研究の一助となることを期待する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京農工大学農学部共同獣医学科獣医薬理学研究室 下田実教授に深く感謝いたします。また、論文の執筆に際し、多くのご助言と貴重なご示唆を賜りました、帯広畜産大学 石井利明教授、岩手大学 佐藤洋教授、東京農工大学 渋谷淳教授、佐々木一昭准教授、岐阜大学 海野年弘教授に、心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導をならびにご鞭撻を賜りました Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 薬物動態分析リサーチマネージャー 田川吉彦博士に心より御礼を申し上げます。また、本研究の機会を与えてくださり、ご高配を賜りました Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 薬物動態分析ヘッド 朝日知博士ならびに武田薬品工業株式会社 薬物動態研究所所長 森脇俊哉博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、ご指導ならびにご鞭撻を賜りました武田薬品工業株式会社 薬物動態研究所主席研究員 守屋優博士、同主任研究員 佐藤翔博士、同社ファーマシューティカルサイエンス主席部員 近藤孝浩博士、同社ニューロサイエンス創薬ユニット主任研究員 若林健志博士、Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 薬物動態分析 山本将己氏、同社非臨床安全性研究 古川義之氏および株式会社三洋化学研究所 塚本徹哉氏に心から感謝いたします。

また、本研究の解析に関しまして多くのご助言を頂きました、Leiden Advanced Pharmacokinetics & Pharmacodynamics (LAP&P) Consultant の Joost DeJongh 博士ならびに Tamara van Steeg 博士に心から感謝申し上げます。

最後に、終始支援と安らぎを与えてくださいました家族に心より感謝いたします。

引用文献

1. アンカロン錠 添付文書 (第 22 版).
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780069_2129010F1022_2_29
2. セレネース錠 添付文書 (第 18 版).
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/400093_1179020C1191_1_14
3. トフラニール錠 添付文書 (第 4 版).
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/530258_1174006F1078_3_06
4. パキシル錠 添付文書 (第 28 版).
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/340278_1179041F1025_2_34
5. CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS REVIEW(S) of simeprevir.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/205123Orig1s000ClinPharmR.pdf
6. Alzheimer's Disease International. (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia.
7. Benet LZ. (2013). The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. *J Pharm Sci.* 102 (1), 34-42.
8. Benet LZ, Broccatelli F and Oprea TI. (2011). BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J.* 13 (4), 519-547.
9. Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R and Figg WD. (2007). CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci.* 96 (9), 2224-2231.
10. Borgstrom L, Johansson CG, Larsson H and Lenander R. (1981). Pharmacokinetics of propranolol. *J Pharmacokinet Biopharm.* 9 (4), 419-429.
11. Brill MJ, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker JN and Knibbe CA. (2012). Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clin Pharmacokinet.* 51

- (5), 277-304.
12. Brill MJ, Houwink AP, Schmidt S, Van Dongen EP, Hazebroek EJ, van Ramshorst B, Deneer VH, Mouton JW and Knibbe CA. (2014). Reduced subcutaneous tissue distribution of cefazolin in morbidly obese versus non-obese patients determined using clinical microdialysis. *J Antimicrob Chemother.* 69 (3), 715-723.
 13. Brill MJ, Valitalo PA, Darwich AS, van Ramshorst B, van Dongen HP, Rostami-Hodjegan A, Danhof M and Knibbe CA. (2016). Semiphysiologically based pharmacokinetic model for midazolam and CYP3A mediated metabolite 1-OH-midazolam in morbidly obese and weight loss surgery patients. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 5 (1), 20-30.
 14. Brill MJ, van Rongen A, van Dongen EP, van Ramshorst B, Hazebroek EJ, Darwich AS, Rostami-Hodjegan A and Knibbe CA. (2015). The Pharmacokinetics of the CYP3A Substrate Midazolam in Morbidly Obese Patients Before and One Year After Bariatric Surgery. *Pharm Res.* 32 (12), 3927-3936.
 15. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR and Beliles RP. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health.* 13 (4), 407-484.
 16. Catterson ML and Preskorn SH. (1996). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance. *Pharmacol Toxicol.* 78 (4), 203-208.
 17. Cebers G, Alexander RC, Haeberlein SB, Han D, Goldwater R, Ereshefsky L, Olsson T, Ye N, Rosen L, Russell M, Maltby J, Eketjall S and Kugler AR. (2017). AZD3293: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects in Healthy Subjects and Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 55 (3), 1039-1053.
 18. Chang WH, Lam YW, Jann MW and Chen H. (1992). Pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol in Chinese schizophrenic patients after intravenous and oral administration of haloperidol. *Psychopharmacology (Berl).* 106 (4), 517-522.

19. Citron M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov.* 9 (5), 387-398.
20. Copeland RA, Pompliano DL and Meek TD. (2006). Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov.* 5 (9), 730-739.
21. Dave RA and Morris ME. (2016). A quantitative threshold for high/low extent of urinary excretion of compounds in humans. *Biopharm Drug Dispos.* 37 (5), 287-309.
22. DeJongh J, Verhaar HJ and Hermens JL. (1997). A quantitative property-property relationship (QPPR) approach to estimate in vitro tissue-blood partition coefficients of organic chemicals in rats and humans. *Arch Toxicol.* 72 (1), 17-25.
23. Diepstraten J, Hackeng CM, van Kralingen S, Zapletal J, van Dongen EP, Wiezer RJ, van Ramshorst B and Knibbe CA. (2012). Anti-Xa Levels 4 h After Subcutaneous Administration of 5,700 IU Nadroparin Strongly Correlate with Lean Body Weight in Morbidly Obese Patients. *Obes Surg.* 22 (5), 791-796.
24. Edginton AN, Theil FP, Schmitt W and Willmann S. (2008). Whole body physiologically-based pharmacokinetic models: their use in clinical drug development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4 (9), 1143-1152.
25. Galimberti D and Scarpini E. (2016). Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 25 (10), 1181-1187.
26. Geyer HJ, Scheunert I, Rapp K, Gebefugi I, Steinberg C and Kettrup A. (1993). The relevance of fat content in toxicity of lipophilic chemicals to terrestrial animals with special reference to dieldrin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Ecotoxicol Environ Saf.* 26 (1), 45-60.
27. Goto A, Moriya Y, Mandai T, Wakabayashi T, Tsukamoto T, Tagawa Y, Kondo T and Asahi S. (2017). Disposition of the Highly Fat Distributed Compound 1-(4-Methoxyphenyl)-4-(2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-Dihydro-1-Benzofuran-5-yl)Piperazine (TAK-357) in Rats and Dogs. *Drug Res (Stuttg).* 67 (1),

38-45.

28. Goto A, Tagawa Y, Moriya Y, Sato S, Furukawa Y, Wakabayashi T, Tsukamoto T, DeJongh J, van Steeg TJ, Moriwaki T and Asahi S. (2017). Impact of acute fat mobilization on the pharmacokinetics of the highly fat distributed compound TAK-357, investigated by physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation. *Biopharm Drug Dispos.*
29. Gram LF. (1988). Imipramine: a model substance in pharmacokinetic research. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 345, 81-84.
30. Grover A and Benet LZ. (2009). Effects of drug transporters on volume of distribution. *AAPS J.* 11 (2), 250-261.
31. Homma A, Takeda M, Imai Y, Udaka F, Hasegawa K, Kameyama M and Nishimura T. (2000). Clinical efficacy and safety of donepezil on cognitive and global function in patients with Alzheimer's disease. A 24-week, multicenter, double-blind, placebo-controlled study in Japan. E2020 Study Group. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 11 (6), 299-313.
32. Igari Y, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T and Hanano M. (1983). Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *J Pharmacokinet Biopharm.* 11 (6), 577-593.
33. Imbimbo BP and Giardina GA. (2011). gamma-secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem.* 11 (12), 1555-1570.
34. Jandacek RJ and Tso P. (2001). Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. *Lipids.* 36 (12), 1289-1305.
35. Jansson R, Bredberg U and Ashton M. (2008). Prediction of drug tissue to plasma concentration ratios using a measured volume of distribution in combination with lipophilicity. *J Pharm Sci.* 97 (6), 2324-2339.
36. Jiao S, Matsuzawa Y, Matsubara K, Kubo M, Tokunaga K, Odaka H, Ikeda H, Matsuo T and Tarui S.

- (1991). Abnormalities of plasma lipoproteins in a new genetically obese rat with non-insulin-dependent diabetes mellitus (Wistar fatty rat). *Int J Obes*. 15 (7), 487-495.
37. Jondorf WR, Wyss PA, Muhlebach S and Bickel MH. (1983). Disposition of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) in rats with decreasing adipose tissue mass. II. Effects of restricting food intake before and after 6-CB administration. *Drug Metab Dispos*. 11 (6), 597-601.
38. Kakehi M, Tagawa Y, Goto A, Kondo T and Asahi S. (2016). The effects of the concentration-dependent erythrocyte distribution of TAK-802, a potent acetylcholinesterase inhibitor, on rat pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos*. 37 (8), 467-478.
39. Kato M, Shitara Y, Sato H, Yoshisue K, Hirano M, Ikeda T and Sugiyama Y. (2008). The quantitative prediction of CYP-mediated drug interaction by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Pharm Res*. 25 (8), 1891-1901.
40. Kimko H and Pinheiro J. (2015). Model-based clinical drug development in the past, present and future: a commentary. *Br J Clin Pharmacol*. 79 (1), 108-116.
41. Knibbe CA, Brill MJ, van Rongen A, Diepstraten J, van der Graaf PH and Danhof M. (2015). Drug disposition in obesity: toward evidence-based dosing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 55, 149-167.
42. Kramer HJ, Drenth H, vandenBerg M, Seinen W and DeJongh J. (2001). Physiologically based pharmacokinetic model for tetrachlorobenzyltoluenes in rat: comparison of in vitro and in vivo metabolic rates. *Toxicol Sci*. 63 (1), 22-28.
43. Kunze A, Huwyler J, Camenisch G and Poller B. (2014). Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. *Drug Metab Dispos*. 42 (9), 1514-1521.
44. Kurz A and Grimmer T. (2014). Efficacy of memantine hydrochloride once-daily in Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 15 (13), 1955-1960.
45. Lambracht-Washington D and Rosenberg RN. (2013). Advances in the development of vaccines for

- Alzheimer's disease. *Discov Med*. 15 (84), 319-326.
46. Latini R, Tognoni G and Kates RE. (1984). Clinical pharmacokinetics of amiodarone. *Clin Pharmacokinet*. 9 (2), 136-156.
47. Levitt DG. (2010). Quantitative relationship between the octanol/water partition coefficient and the diffusion limitation of the exchange between adipose and blood. *BMC Clin Pharmacol*. 10, 1.
48. Lewis RJ, Kemp PM and Johnson RD. Distribution of Paroxetine in Postmortem Fluids and Tissues. https://www.faa.gov/data_research/research/med_humanfacs/oamtechreports/2010s/media/201511.pdf
49. Lipscomb JC, Haddad S, Poet T and Krishnan K. (2012). Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models in toxicity testing and risk assessment. *Adv Exp Med Biol*. 745, 76-95.
50. Lutz RJ, Dedrick RL, Tuey D, Sipes IG, Anderson MW and Matthews HB. (1984). Comparison of the pharmacokinetics of several polychlorinated biphenyls in mouse, rat, dog, and monkey by means of a physiological pharmacokinetic model. *Drug Metab Dispos*. 12 (5), 527-535.
51. Mager DE. (2006). Target-mediated drug disposition and dynamics. *Biochem Pharmacol*. 72 (1), 1-10.
52. Martinez MN and Amidon GL. (2002). A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol*. 42 (6), 620-643.
53. Mauro VF. (1993). Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. *Clin Pharmacokinet*. 24 (3), 195-202.
54. Muhlebach S and Bickel MH. (1981). Pharmacokinetics in rats of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl, an unmetabolizable lipophilic model compound. *Xenobiotica*. 11 (4), 249-257.
55. Patel JP, Fleischer JG, Wasan KM and Brocks DR. (2009). The effect of experimental hyperlipidemia on the stereoselective tissue distribution, lipoprotein association and microsomal metabolism of (+/-)-halofantrine. *J Pharm Sci*. 98 (7), 2516-2528.

56. Poulin P and Theil FP. (2002). Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J Pharm Sci.* 91 (5), 1358-1370.
57. Roffey SJ, Obach RS, Gedge JI and Smith DA. (2007). What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug Metab Rev.* 39 (1), 17-43.
58. Shayeganpour A, Korashy H, Patel JP, El-Kadi AO and Brocks DR. (2008). The impact of experimental hyperlipidemia on the distribution and metabolism of amiodarone in rat. *Int J Pharm.* 361 (1-2), 78-86.
59. Shitara Y, Horie T and Sugiyama Y. (2006). Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci.* 27 (5), 425-446.
60. Singh BN. (1999). Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 37 (3), 213-255.
61. Thies W and Bleiler L. (2013). 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 9 (2), 208-245.
62. Toutain PL and Bousquet-Melou A. (2004). Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther.* 27 (6), 441-453.
63. Wakabayashi T, Tokunaga N, Tokumaru K, Ohra T, Koyama N, Hayashi S, Yamada R, Shirasaki M, Inui Y and Tsukamoto T. (2016). Discovery of Benzofuran Derivatives that Collaborate with Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) to Promote Neuroprotection. *J Med Chem.* 59 (10), 5109-5114.
64. Wyss PA, Muhlebach S and Bickel MH. (1982). Pharmacokinetics of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) in rats with decreasing adipose tissue mass. I. Effects of restricting food intake two weeks after administration of 6-CB. *Drug Metab Dispos.* 10 (6), 657-661.
65. Wyss PA, Muhlebach S and Bickel MH. (1986). Long-term pharmacokinetics of

- 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) in rats with constant adipose tissue mass. *Drug Metab Dispos.* 14 (3), 361-365.
66. Yamazaki S, Shen Z, Jiang Y, Smith BJ and Vicini P. (2013). Application of target-mediated drug disposition model to small molecule heat shock protein 90 inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 41 (6), 1285-1294.
67. Zanghi BM, Cupp CJ, Pan Y, Tissot-Favre DG, Milgram NW, Nagy TR and Dobson H. (2013). Noninvasive measurements of body composition and body water via quantitative magnetic resonance, deuterium water, and dual-energy x-ray absorptiometry in awake and sedated dogs. *Am J Vet Res.* 74 (5), 733-743.
68. 加藤隆一, 鎌瀧哲也. (2000). 薬物代謝学 第2版。 1-8.
69. 岩永終永, 西道隆臣. (2010). アルツハイマー病の謎を解く。 211-248.

图 (第 1 章)

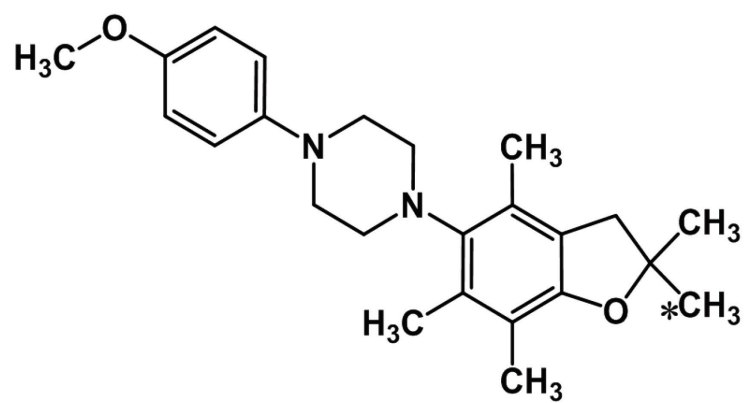


Fig. 1-1 Chemical structure of [^{14}C]TAK-357.

Asterisk denotes the ^{14}C -labeled position.

图表 (第 2 章)

Table 2-1 Pharmacokinetics of TAK-357 after iv and oral administration to rats and dogs.

Parameter	Rat				Dog	
	Intravenous	Oral			Intravenous	Oral
	1 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg
C _{max} (ng/mL)	-	42 ± 6	134 ± 22	316 ± 19	-	662 ± 9
T _{max} (h)	-	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	-	3.0 ± 1.2
t _{1/2} (h)	211 ± 14	98.4 ± 30.5	177 ± 35	135 ± 35	1980 ± 460	1420 ± 350
AUC _{inf} (ng·h/kg)	5620 ± 680	944 ± 122	3480 ± 170	9980 ± 1090	49500 ± 21200	98800 ± 53400
CL _p (L/h/kg)	0.180 ± 0.023	-	-	-	0.0237 ± 0.0110	-
V _{ss} (L/kg)	33.5 ± 3.3	-	-	-	60.3 ± 26.9	-
F (%)	-	56.0	62.0	59.2	-	66.6

Each value shows mean ± S.D. (rats; n=3, dogs; n=4)

Table 2-2 Erythrocyte distribution of [¹⁴C]TAK-357 in rats, dogs and humans (in vitro).

Concentration (µg/mL)	Erythrocyte distribution ratio (%)		
	Rats	Dogs	Humans
0.1	15.1 ± 2.3	23.8 ± 1.4	10.7 ± 1.6
1	14.3 ± 1.8	25.5 ± 0.7	11.8 ± 1.8
10	14.3 ± 3.2	24.3 ± 1.7	9.9 ± 0.6

Each value shows mean ± S.D. (n=3)

Table 2-3 Protein binding of [¹⁴C]TAK-357 in plasma of mice, rats, dogs and humans, and human serum protein solutions (in vitro).

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Protein binding (%)						
	Mice	Rats	Dogs	Humans	4% HSA solution	0.05% AGP solution	0.05%AGP/ 4% HSA mixture
0.1	97.7 \pm 0.3	98.3 \pm 0.1	98.9 \pm 0.2	97.4 \pm 0.1	99.1 \pm 0.0	96.6 \pm 0.1	99.4 \pm 0.1
1	98.0 \pm 0.1	98.4 \pm 0.1	99.1 \pm 0.1	97.3 \pm 0.1	99.3 \pm 0.0	97.5 \pm 0.1	99.4 \pm 0.0
10	97.8 \pm 0.1	98.5 \pm 0.0	99.2 \pm 0.1	97.1 \pm 0.1	98.7 \pm 0.1	98.6 \pm 0.1	99.4 \pm 0.1

Each value shows mean \pm S.D. (n=3)

Table 2-4 Cumulative excretion of total radioactivity into the urine and feces of rats and dogs after an oral administration of [¹⁴C]TAK-357.

Species	Time (h)	Cumulative excretion (% of dose)		
		Urine	Feces	Total
Rats	24	5.2 ± 0.3	21.3 ± 2.1	26.5 ± 2.0
	48	6.8 ± 0.5	31.5 ± 1.5	38.3 ± 1.1
	72	7.6 ± 0.5	34.9 ± 1.5	42.5 ± 1.0
	120	8.7 ± 0.6	39.7 ± 1.0	48.4 ± 0.5
	168	9.6 ± 0.6	43.3 ± 0.8	52.9 ± 0.4
	240	10.5 ± 0.6	47.3 ± 0.7	57.8 ± 0.5
	312	11.1 ± 0.7	50.5 ± 0.7	61.6 ± 0.8
	384	11.7 ± 0.8	53.0 ± 0.8	64.6 ± 1.0
	456	12.0 ± 0.8	55.1 ± 0.9	67.2 ± 1.2
	528	12.2 ± 0.9	56.9 ± 1.0	69.2 ± 1.3
	600	12.5 ± 0.9	58.6 ± 1.1	71.0 ± 1.5
672	12.6 ± 1.0	60.1 ± 1.3	72.7 ± 1.8	
Dogs	24	1.4 ± 0.1	13.5 ± 7.5	14.9 ± 7.5
	48	1.7 ± 0.1	21.8 ± 2.3	23.5 ± 2.3
	72	1.9 ± 0.1	23.1 ± 2.3	25.0 ± 2.3
	96	2.0 ± 0.1	24.1 ± 2.2	26.1 ± 2.2
	120	2.2 ± 0.1	24.9 ± 2.5	27.0 ± 2.5
	144	2.3 ± 0.1	25.8 ± 2.2	28.0 ± 2.2
	168	2.4 ± 0.1	26.6 ± 2.3	28.9 ± 2.3

Dose; 3 mg/kg.

Each value shows mean ± S.D. (rats; n=3, dogs; n=4)

24.3% of the dosed radioactivity was detected in the carcass at 672 h after administration.

Table 2-5 Metabolite profiles in rats and dogs excreta after oral administration of [¹⁴C]TAK-357.

Component	Excretion (% of dose)			
	Rats		Dogs	
	Urine	Feces	Urine	Feces
Total radioactivity	9.6 ± 0.6 (100.0)	43.3 ± 0.8 (100.0)	2.4 ± 0.1 (100.0)	26.6 ± 2.3 (100.0)
TAK-357	N.D.	18.6 ± 2.3 (43.0)	N.D.	16.1 ± 2.1 (60.5)
Others	9.6 ± 0.6 (100.0)	24.7 ± 1.6 (57.0)	2.4 ± 0.1 (100.0)	10.5 ± 0.8 (39.5)

Dose; 3 mg/kg. samples during 0-168 h.

Each value shows mean ± S.D. (rats; n=3, dogs; n=4).

Figures in parentheses represent % of the total radioactivity.

N.D: not detected

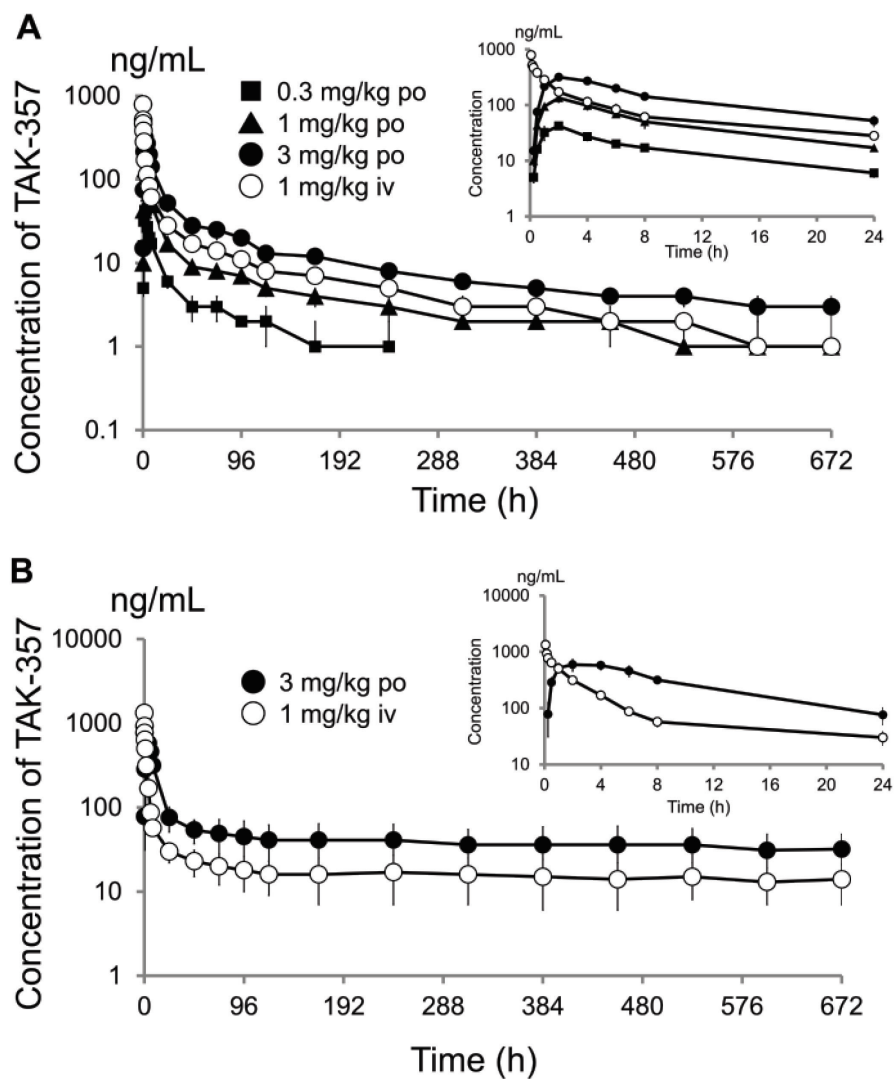


Figure 2-1 Concentrations of the TAK-357 in plasma of rats (A) and dogs (B) after a single iv and oral administration of TAK-357.

Each value shows mean \pm S.D. (n=3 for rats, n=4 for dogs).

Inset graph shows the concentration-time curve from 0 to 24 h.

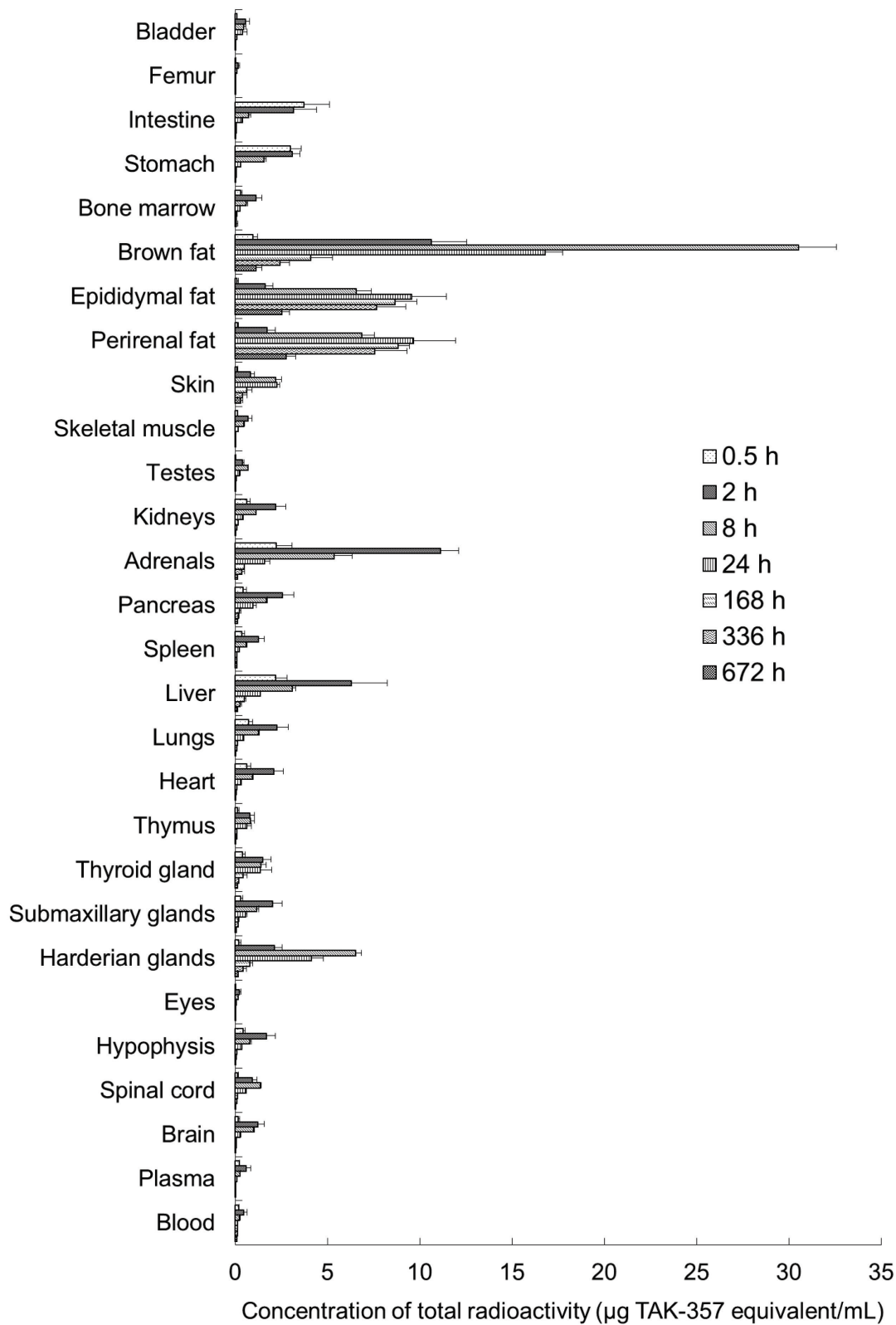


Figure 2-2 Concentrations of the total radioactivity in tissues of rats after a single oral administration of [¹⁴C]TAK-357.

Dose: 3 mg/kg. Mean ± S.D. (n=3).

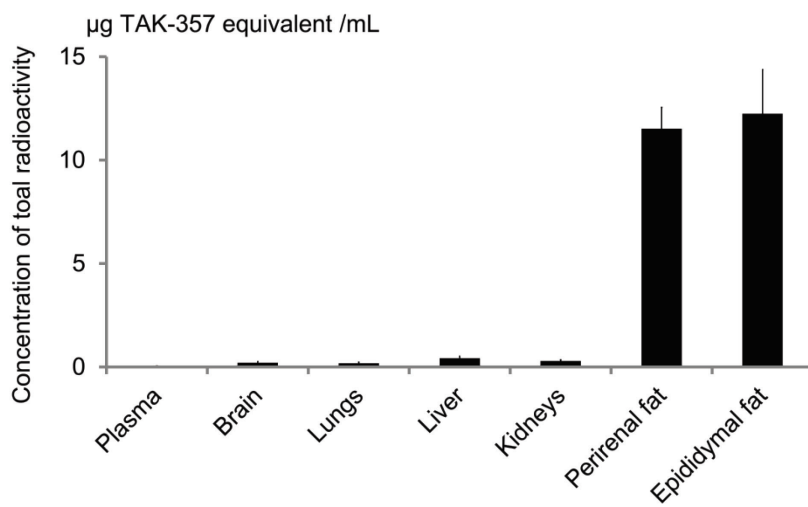


Figure 2-3 Concentration of the total radioactivity in tissues of dogs 672 h after a single oral administration of [¹⁴C]TAK-357.

Dose: 3 mg/kg.

Each value shows mean values ± S.D. (n=4).

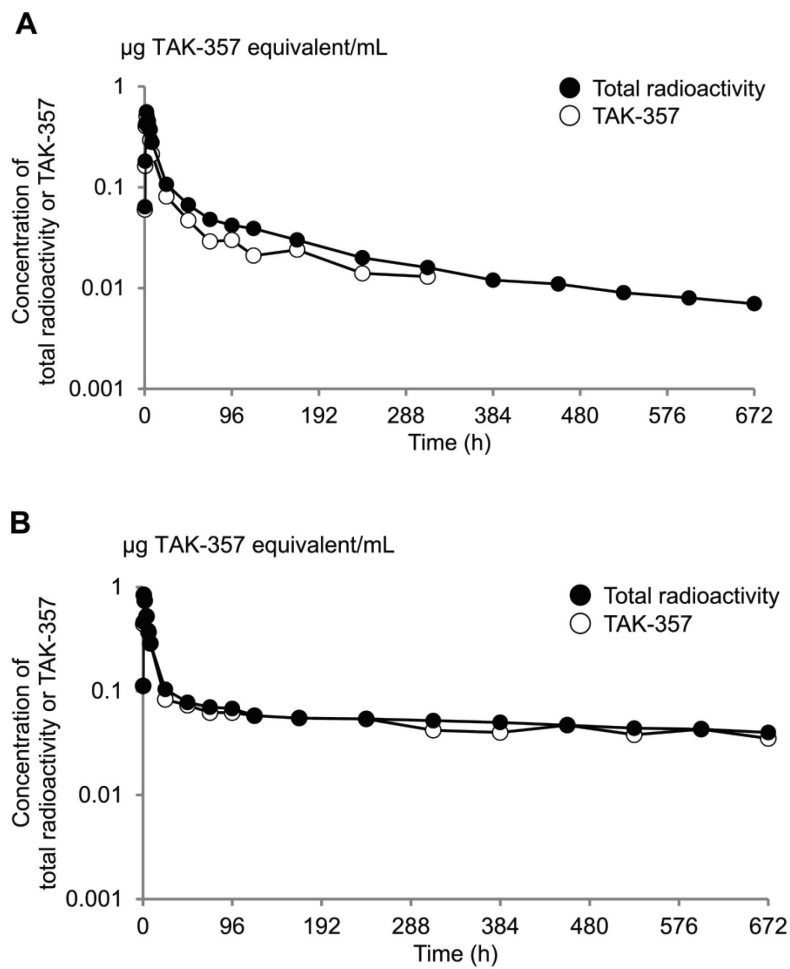


Figure 2-4 Concentrations of the total radioactivity and TAK-357 in plasma of rats (A) and dogs (B) after a single oral administration of [¹⁴C]TAK-357 at a dose of 3 mg/kg.

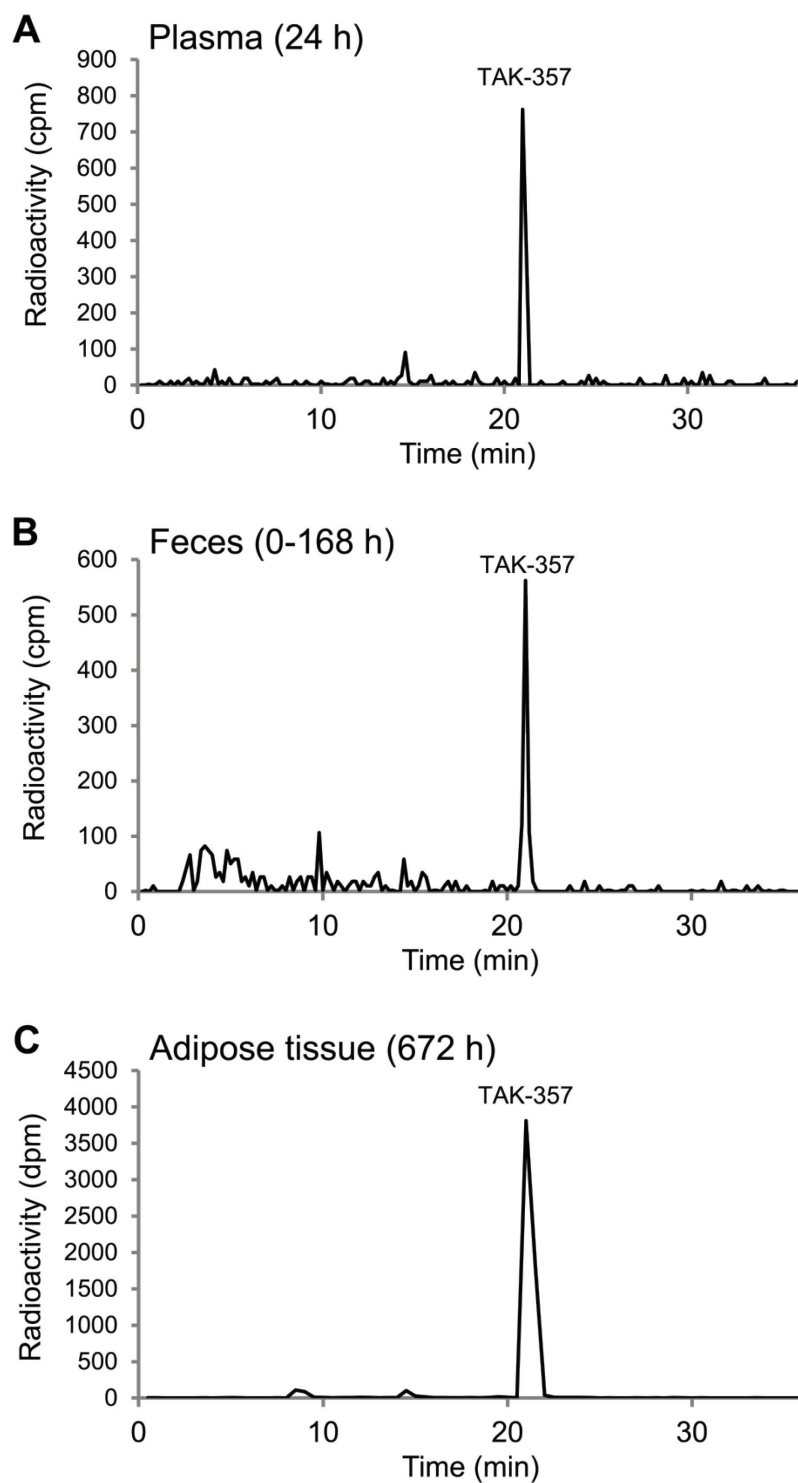


Figure 2-5 Typical radiochromatograms of metabolite profiling in rat plasma (A), feces (B) and adipose tissues (C) after a single oral administration of [^{14}C]TAK-357 at a dose of 3 mg/kg.

Detection method in plasma and feces: on-line radioisotope detector (0.2 min/detection).

Detection method in adipose tissue: fraction collecting (0.5 min/sample).

图表 (第3章)

Table 3-1. Assumed condition change for simulation after start of body weight decrease

Scenario	Variable 1	Extent	Variable 2	Type of change
1	V_{fat}	90% decrease	$V_{R,tissue}$ 25% decrease	gradually across 3 weeks
2	V_{fat}	No change	$V_{R,tissue}$ 58% decrease	gradually across 3 weeks
3	CL_{int}	10% of control		instantly
4	Cardiac output	200% of control		instantly
5	$P_{fat,sm}$	70% decrease		gradually across 3 weeks

Table 3-2 Physiological and PK parameters of TAK-357 in rats and dogs

Physiological parameters ^a		Rat		Dog	
Body weight	kg		0.285		10.9
V_{bc}			0.08		0.082
V_{lc}			0.0366		0.033
V_{fc}			0.076		0.15
V_{fblc}			0.05		0.05
V_{sc}			0.19		0.16
Cardiac output	L/h		5.5		90
Q_{lc}			0.175		0.297
Q_{fc}			0.07		0.07
Q_{sc}			0.058		0.06
Drug specific parameters		Rat		Dog	
		Mean	RSE (%)	Mean	RSE (%)
Rb^b		0.7	(fixed)	0.65	(fixed)
P_{liver}^c		23	(fixed)	23	(fixed)
P_{fat}		495	8.2	495	(fixed)
P_{skin}		33	(fixed)	33	(fixed)
$P_{R.tissue}$		2.88	4.2	2.88	(fixed)
DIF_c		0.359	15.8	10	(fixed)
K_a	1/h	0.39	9.3	0.375	22.8
CL_{int}	L/h	0.0792	6.9	0.271	(fixed)
F		0.642	6.9	0.799	19
Residual error					
Proportional	%	24.5	12.3	44.3	16.1
Additive	ng/mL	0.111	44.8	NA	

RSE, relative standard error; NA, not applicable

^aOrgan volume and blood flow rate were expressed as a fraction of body weight and cardiac output, respectively.

Physiological parameters (organ volume and blood flows) were obtained from the literature (15, 56).

^b Rb was fixed as previously determined by an in vitro study (27).

^c P_{liver} and P_{skin} values in rat were fixed to the observed AUC ratios of these tissues to blood (27). Same P_x values with rats were used for dogs.

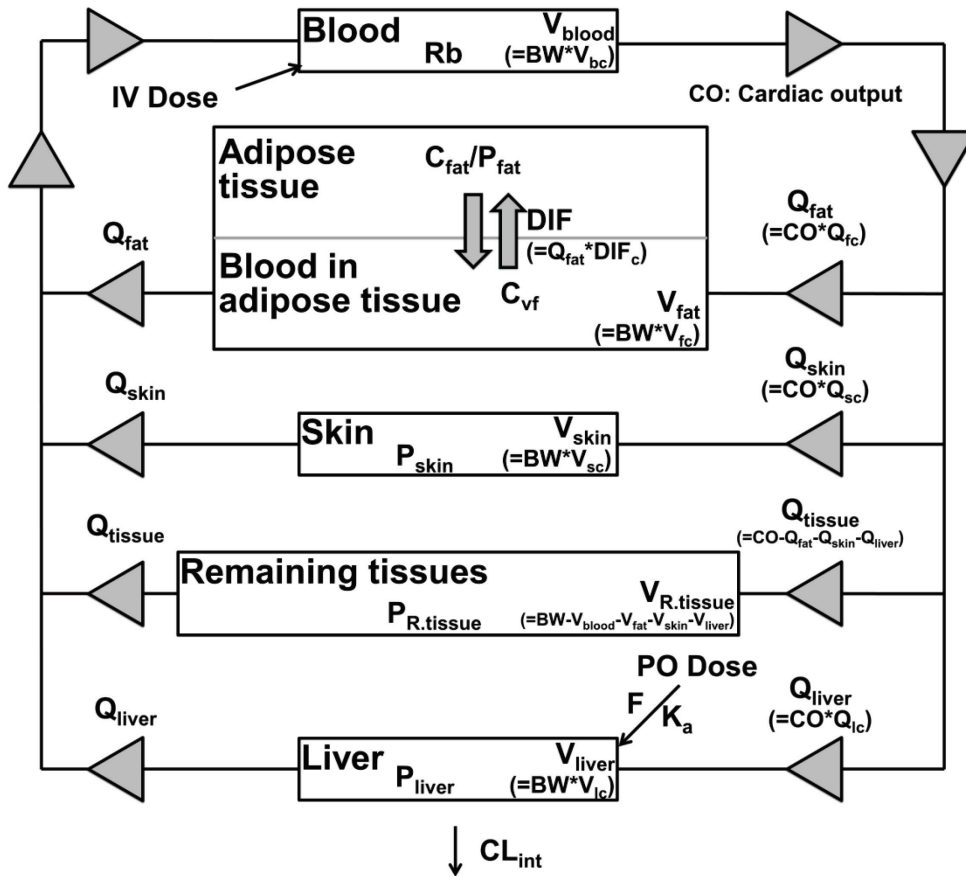


Figure 3-1 Constructed PBPK model. CL_{int} is the intrinsic clearance (including unbound fraction in plasma and blood).

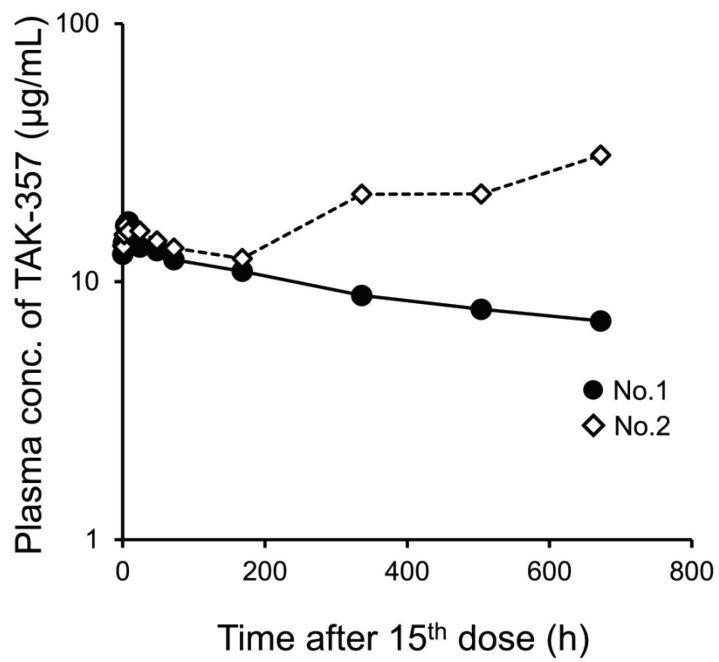


Figure 3-2 Observed plasma concentrations of TAK-357 after 15 days repeated oral administration of TAK-357 to dogs at a dose of 1000 mg/kg.

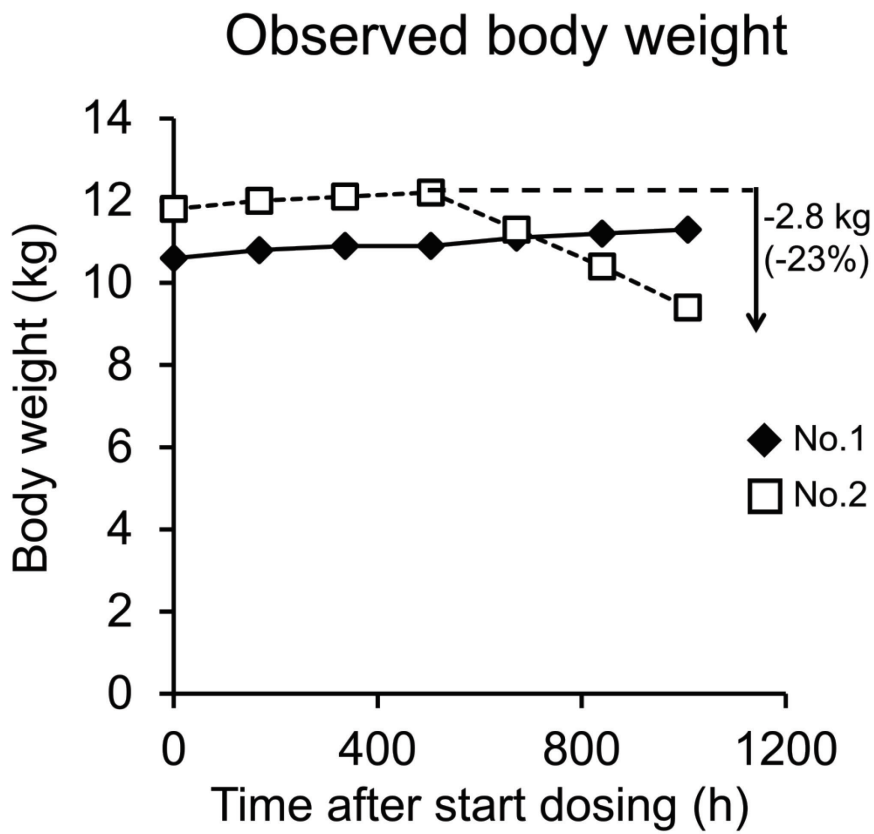


Fig. 3-3 Observed body weight-time profile of dogs.

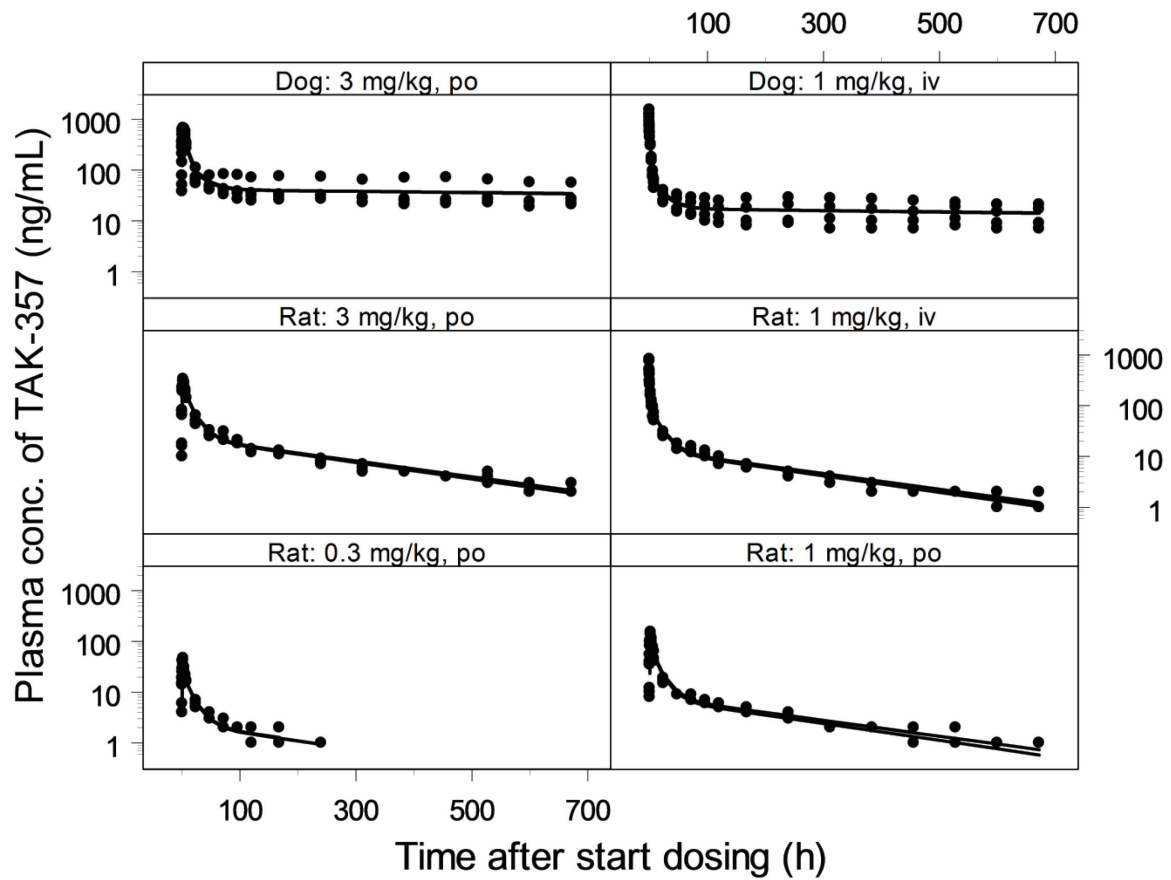


Figure 3-4 Observed and model-predicted plasma concentration of TAK-357 after single oral and intravenous administration of TAK-357 to rats and dogs. Symbols represent observed individual TAK-357 concentration (rats: n=3, dogs: n=4), and lines are model-predicted TAK-357 concentrations.

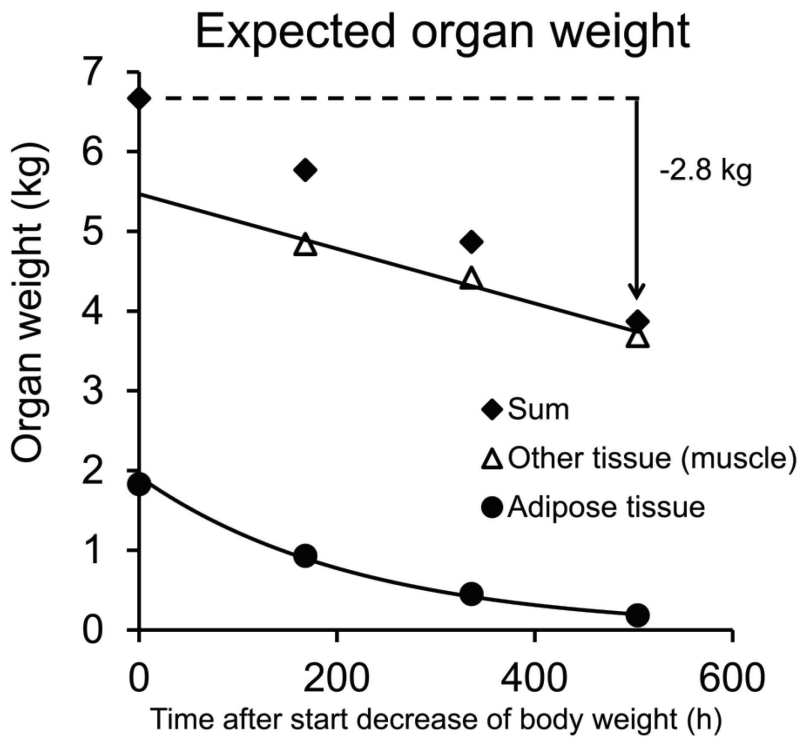


Fig. 3-5 Expected adipose tissues and muscle weight time profiles for the simulation Scenario 1. Sum represents summation of the weights of the adipose tissues and other tissue (muscle).

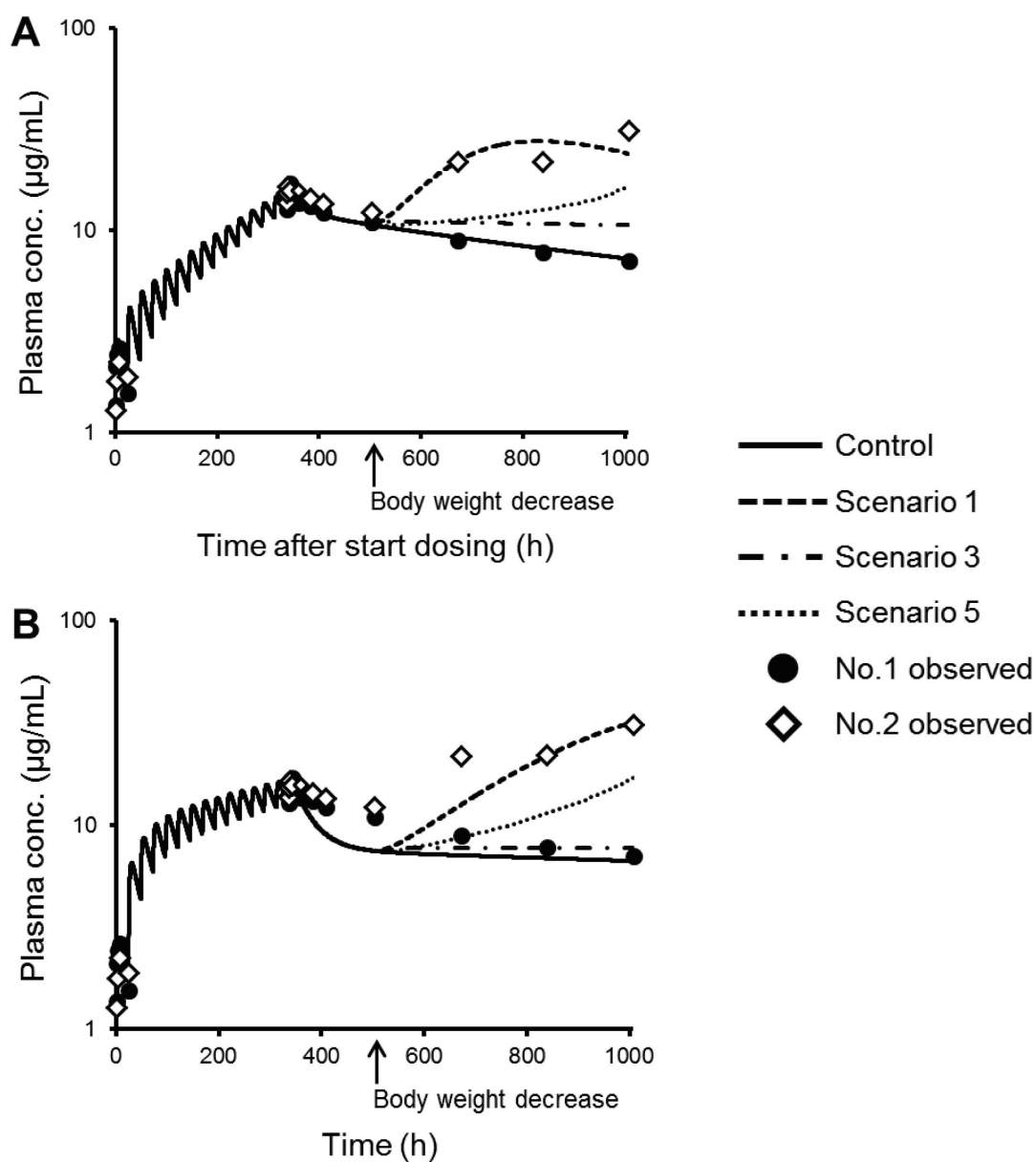


Figure 3-6 Simulated plasma concentration of TAK-357 in case of no change (control), body weight change (Scenario 1), clearance decrease (Scenario 3) and partition to adipose tissue decrease (Scenario 5) with (A) and without (B) assumption of P_{fat} saturation for control simulation. The observed concentrations after 15th dosing were same data with those in Fig. 3-2. Because the simulation of Scenarios 2 and 4 was almost identical to that in control, the line was not shown in this figure.

图表 (第 4 章)

Table 4-1

Body weight and body fat percentages of Wistar fatty and Wistar lean rats.

	Body weight (g)		Body fat (%)	
	Wistar fatty	Wistar lean	Wistar fatty	Wistar lean
week 1	543.2 ± 21.4	405.1 ± 31.2	44.9 ± 2.8	12.9 ± 1.2
week 2	555.6 ± 24.9	416.1 ± 31.2	44.5 ± 3.3	13.2 ± 1.2
week 3	573.3 ± 20.1	425.5 ± 30.9	45.0 ± 2.8	13.8 ± 1.3
week 4	584.1 ± 22.3	433.5 ± 30.7	45.1 ± 2.8	14.2 ± 1.8
week 5	591.3 ± 13.2	440.7 ± 28.8	45.3 ± 2.9	14.0 ± 1.0

Data represent mean ± SD (n=4).

Table 4-2

Plasma metabolite profiles in Wistar fatty and Wistar lean rats.

Component	Wistar fatty			Wistar lean		
	1 h	24 h	720 h	1 h	24 h	720 h
Total radioactivity	0.912 (100.0)	0.122 (100.0)	0.015 (100.0)	0.550 (100.0)	0.077 (100.0)	0.009 (100.0)
TAK-357	0.898 (98.5)	0.117 (95.9)	0.014 (93.3)	0.546 (99.3)	0.055 (71.4)	0.005 (55.6)
Others	0.014 (1.5)	0.005 (4.1)	0.001 (6.7)	0.004 (0.7)	0.022 (28.6)	0.004 (44.4)

Figures in parentheses represent the fraction (%) of the total radioactivity at each time point..

Others is unidentified metabolites.

Table 4-3 C_{\max} and C_{trough} (ng/mL) during repeated administration of TAK-357

	Wistar fatty		Wistar lean	
	C_{\max}	C_{trough}	C_{\max}	C_{trough}
1 st	351 (1.0)	22.2 (1.0)	135 (1.0)	24.3 (1.0)
14 th	909 (2.6)	250 (11.3)	476 (3.5)	232 (9.5)
28 th	1220 (3.5)	465 (20.9)	808 (6.0)	343 (14.1)

Figures in parentheses represent the fold change from 1st dosing.

Table 4-4 Physiological and PK parameters of TAK-357 in Wistar fatty and Wistar lean rats.

Physiological parameters ^a		Wistar fatty		Wistar lean	
Body weight	kg	0.543		0.405	
V_{bc}		0.06		0.08	
V_{lc}		0.042		0.0329	
V_{fc}		0.38		0.11	
V_{fbic}		0.05		0.05	
V_{sc}		0.14		0.19	
Cardiac output	L/h	8.92		7.16	
Q_{lc}		0.174		0.174	
Q_{fc}		0.07		0.07	
Q_{sc}		0.045		0.058	
Drug specific parameters		Wistar fatty		Wistar lean	
		Mean	RSE (%)	Mean	RSE (%)
Rb		0.7	fixed 1 ^b	0.7	fixed 1
P_{liver}		8.85	fixed 2 ^c	23	fixed 1
P_{fat}		307	fixed 2	495	fixed 1
P_{skin}		33	fixed 1	33	fixed 1
P_{tissue}		0.982	fixed 2	2.88	fixed 1
DIF_c		0.451	10.2	0.698	0.8
K_a	1/h	0.458	9.3	0.323	9.1
CL_{int}	L/h	0.0139	7.3	0.0744	0.9
F for 1 st of repeated dose		0.296	17.1	0.314	6.8
F for other dose		0.448	6.8	0.45	fixed 1
ALAG	h	0.33	3.7	NA	
K_{ef}	1/h	0.0882	10.8	0.0505	5.5
K_{eu}	1/h	0.0246	5.8	0.0122	6.6
V_{metab}	L	1.28	NC	1.83	7.3
K_{ab}	1/h	0.346	NC	0.032	15.3
K_{ba}	1/h	0.0709	NC	0.000717	29.0
Residual error					
cold po	%	39.9	11.3	21.4	17.3
hot iv, TAK-357	%	20.6	20.5	2.5	29.1
hot iv, metabolite		NA		70.8	8.0
fecal excretion	%	21.9	16.0	8.6	25.7
urinary excretion	%	13.1	13.9	12.4	38.1

RSE, relative standard error; NA, not applicable; cold, non-radiolabelled; hot, radiolabelled.

^aOrgan volumes and blood flow rates were expressed as fractions of body weight and cardiac output, respectively.

Physiological parameters (organ volume and blood flow rates) were obtained from the literature (15, 56) or calculated as described in method section. The body weight data in Table 1 was used to calculate the organ volume.

Cardiac output was calculated allometrically as eq 6.

^bfixed 1: fixed as previously determined value (27, 28).

^cfixed 2: fixed to optimized parameters to avoid the unstable minimization step.

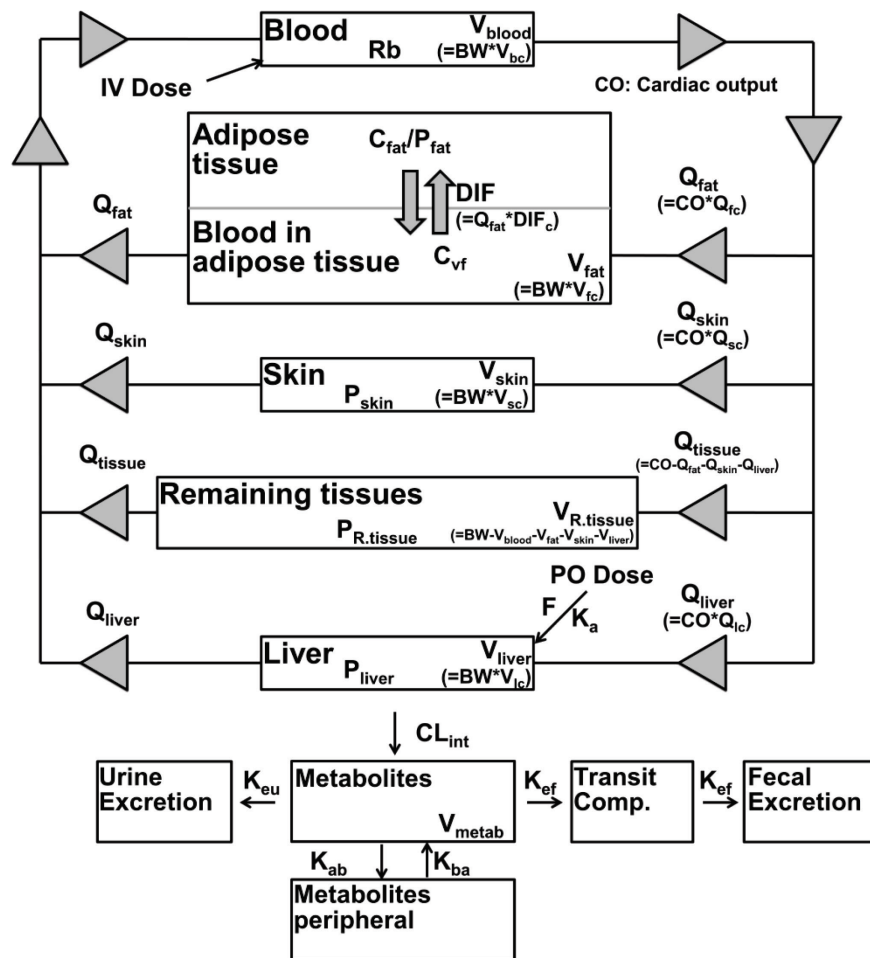


Figure 4-1 Constructed PBPK model. CL_{int} is the intrinsic clearance (including the correction by unbound fraction in plasma and blood to plasma concentration ratio (R_b)), DIF is the diffusion rate constant, K_a is the absorption rate constant, F is the absorbed fraction to the dose, K_{ab} is the rate constant from central to peripheral of metabolites, K_{ba} is the rate constant from peripheral to central of metabolite, K_{eu} is the rate constant excreted to urine and K_{ef} is the rate constant excreted to feces. C_x , P_x , Q_x , and V_x are the concentration of TAK-357, tissue-blood partition coefficients, regional blood flow rates, and tissue or blood volumes of each compartment. C_{vf} is the TAK-357 concentration in the blood in adipose tissue.

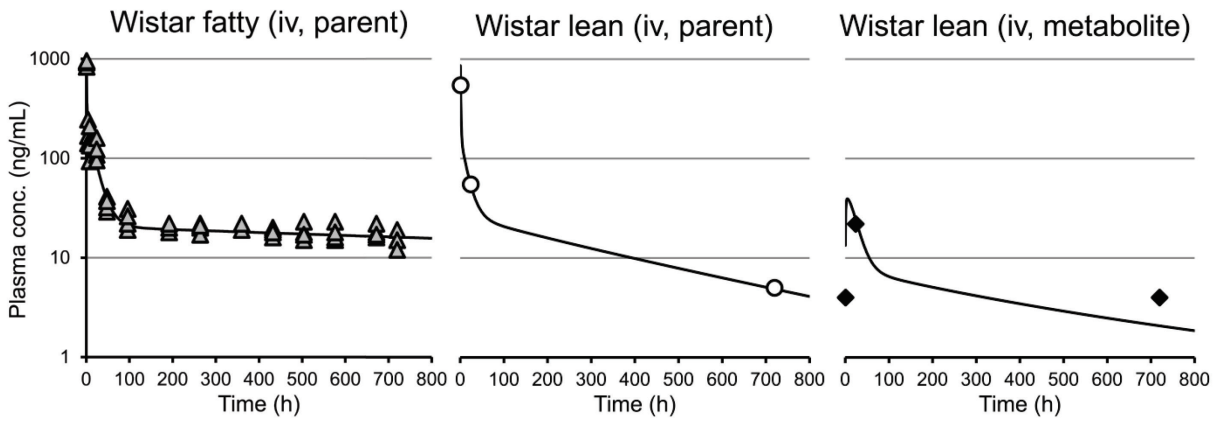


Figure 4-2. Observed and model-predicted mean plasma concentration of TAK-357 and metabolite after intravenous administration of [^{14}C]TAK-357 to Wistar fatty rats and Wistar lean rats. Symbols represent observed individual total radioactivity (assumed as TAK-357 in Wistar fatty rat plasma, n=4), pooled TAK-357 or metabolite concentration, and lines are model-predicted TAK-357 or metabolite concentration.

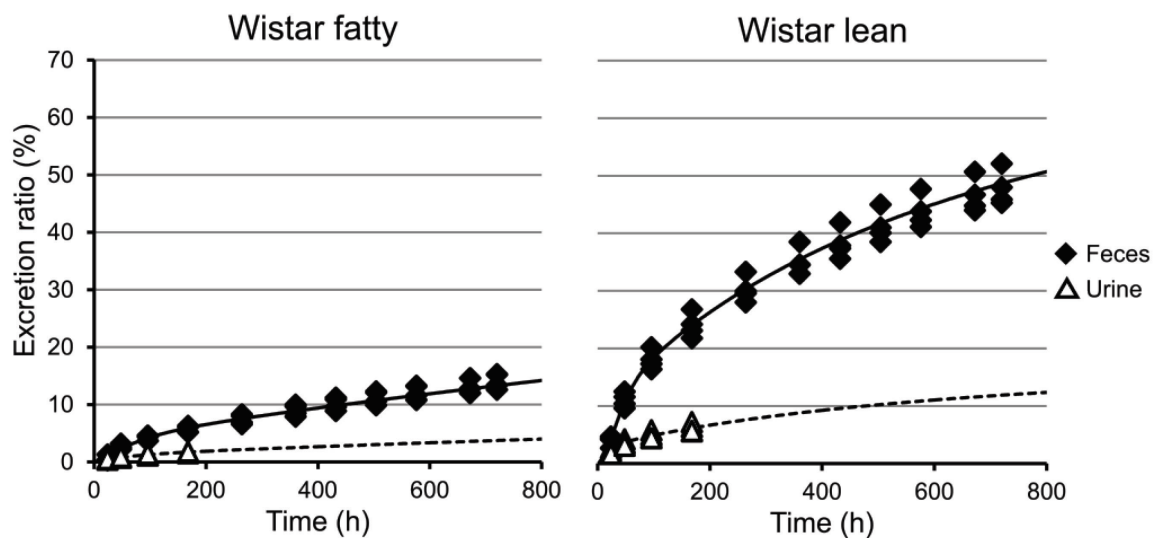


Figure 4-3 Observed and model-predicted mean excretion ratios to feces and urine of after intravenous administration of [¹⁴C]TAK-357 to Wistar fatty rats and Wistar lean rats. Symbols represent observed individual excretion ratio (n=4) and lines are model-predicted excretion ratio.

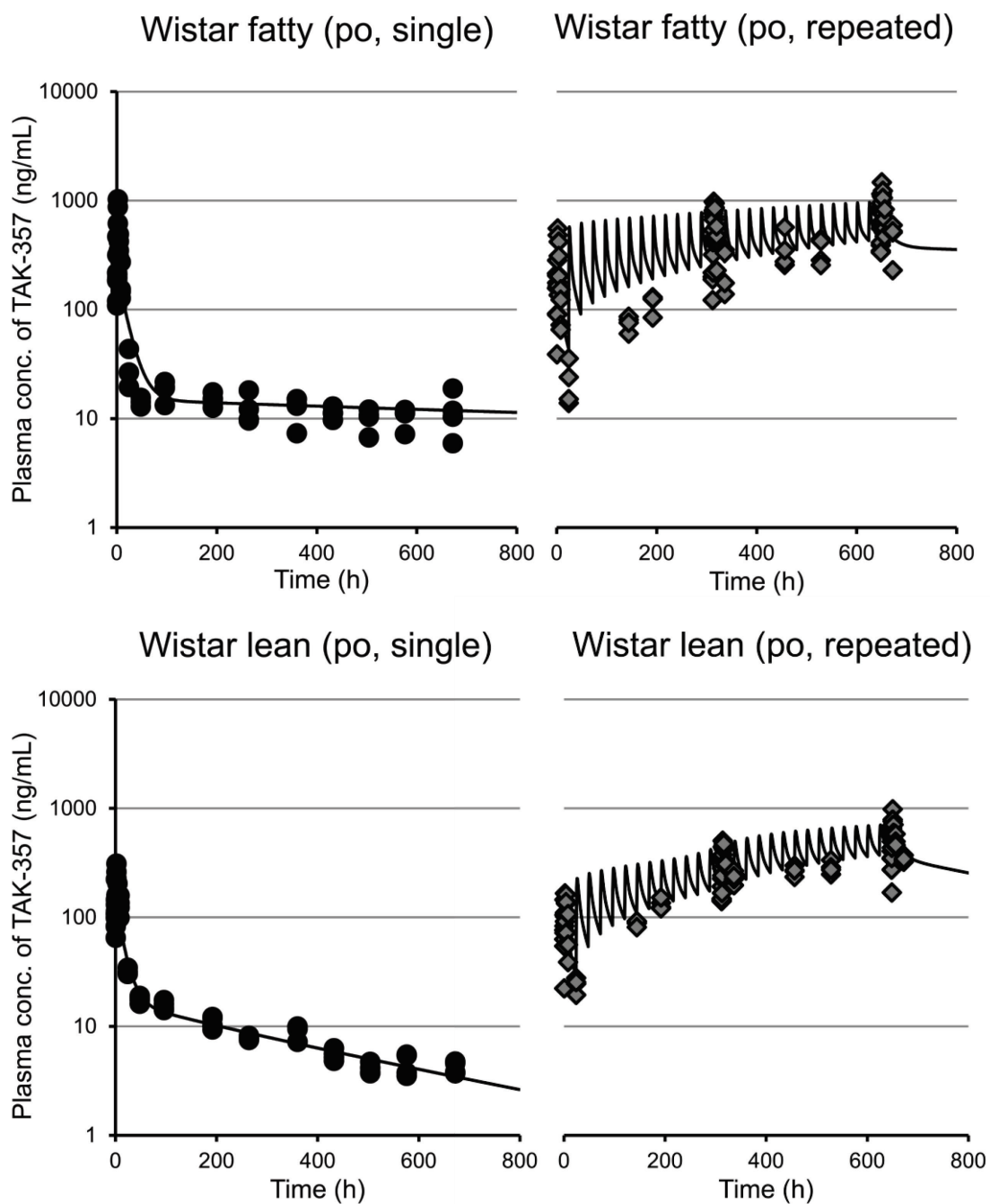


Figure 4-4. Observed and model-predicted mean plasma concentration of TAK-357 after single and repeated oral administration of TAK-357 to Wistar fatty rats and Wistar lean rats. Symbols represent observed individual TAK-357 concentrations (n=4) and lines are model-predicted TAK-357 concentrations.

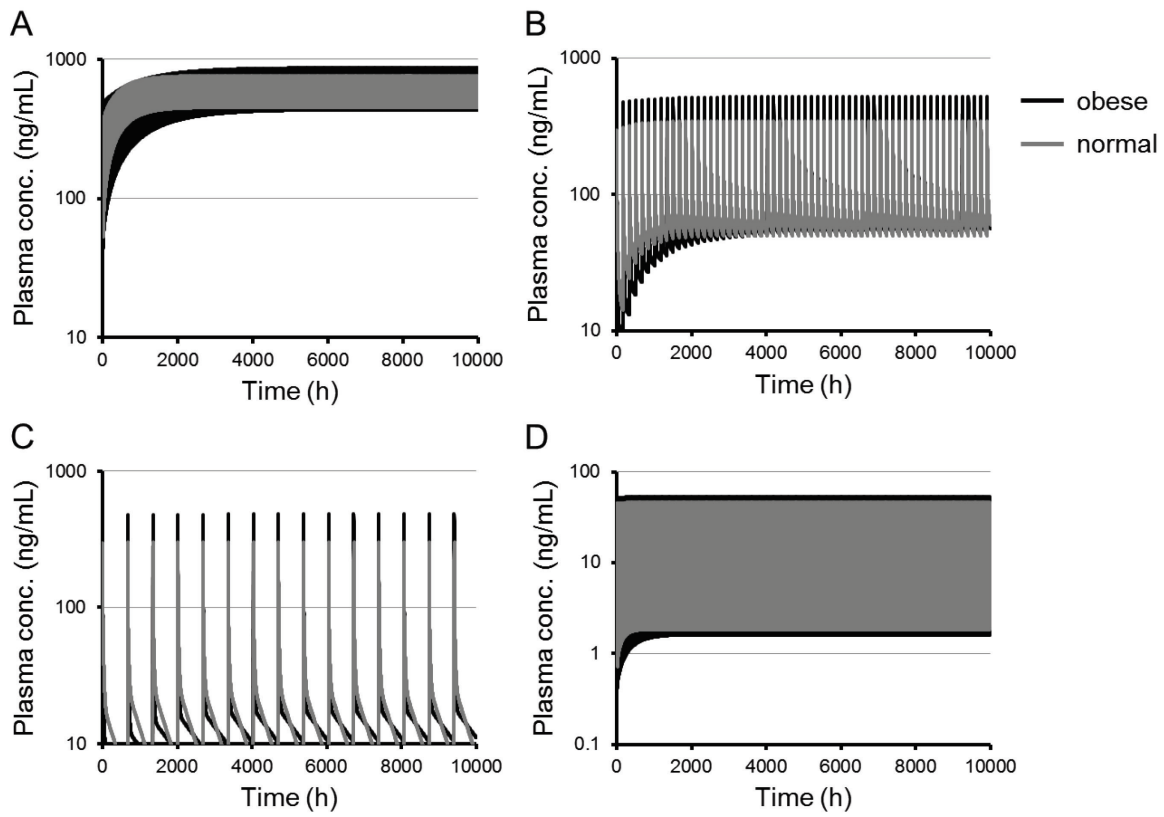


Figure 4-5. Simulated plasma concentration of TAK-357 during repeated dosing at high body fat and normal condition.

Clearance: A, B and C, low; D, high

Dose interval: A and D, once a day; B, once a week; C: once 4 weeks

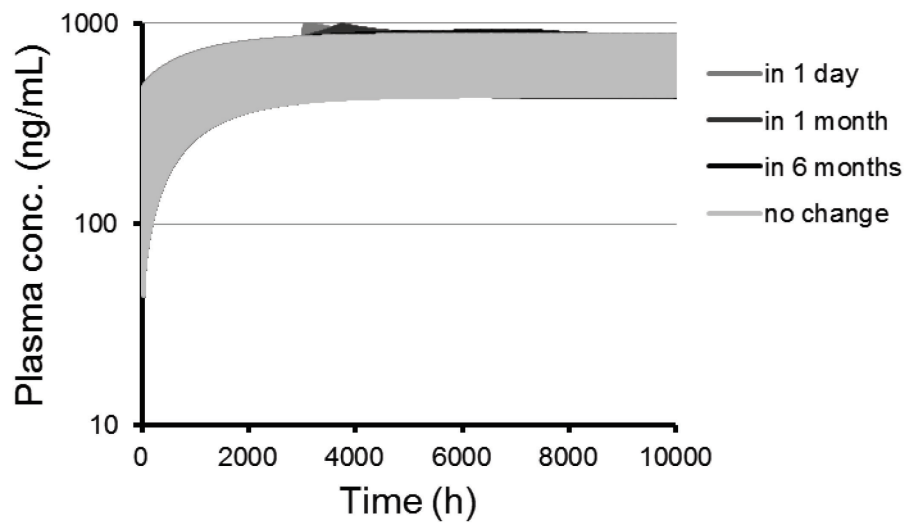


Figure 4-6 Simulated plasma concentration of TAK-357 during repeated dosing in case of 50% adipose tissues volume loss in 1-day, 1-month and -6-months.

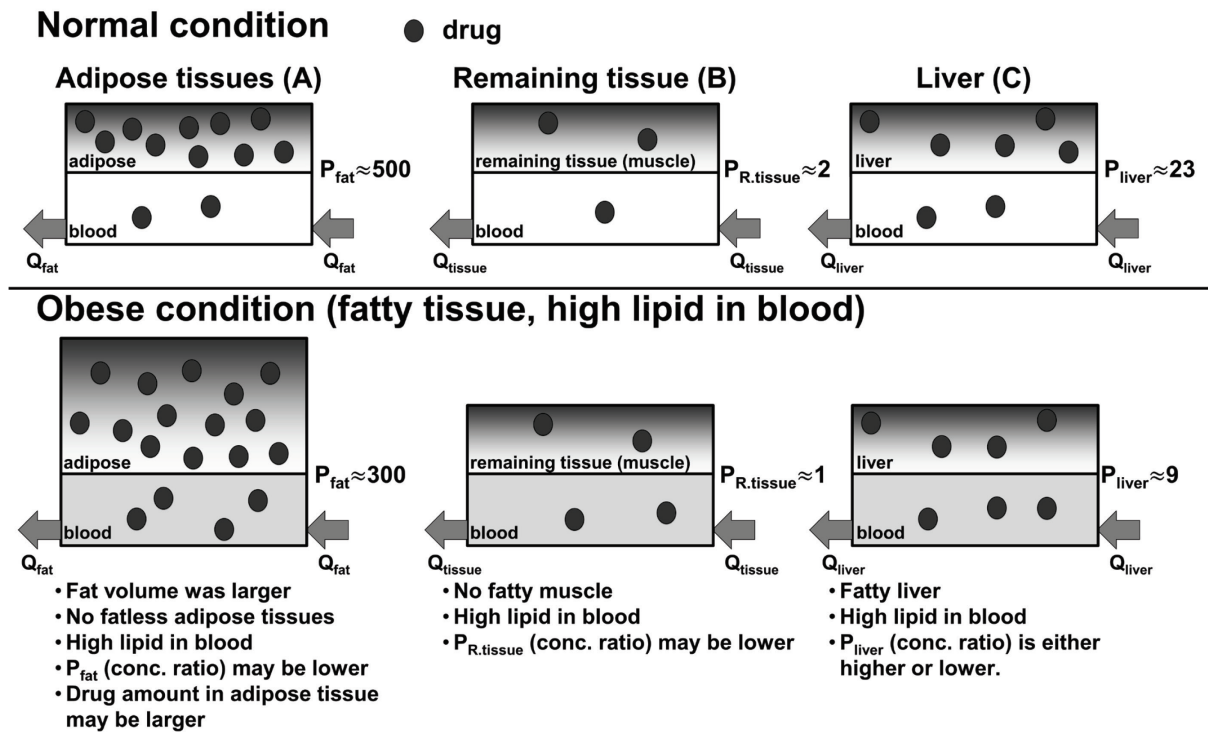


Figure 4-7. Schematic interpretation of partition coefficient (P_x) in the high body fat condition.