

医薬品の消化管吸収性改善と予測に関する研究

三宅正晃

Improvement and Prediction of Intestinal Drug Absorption

Masateru Miyake

Bioavailability Research Project, Formulation Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.;
Ebisuno 224-18, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0182, Japan.

(Received May 29, 2013)

The suppository preparation, which can improve the absorption of poorly absorbable drugs safer than commercially available suppositories, was developed by utilizing sodium laurate and taurine. Additionally, the novel oral absorption-improving system was also established by utilizing polyamines and bile acids. Furthermore, to evaluate the efficacy of these new formulations and estimate the absorbability of new drug candidates in humans, the *in vitro* prediction system utilizing an isolated human intestinal tissues was developed and successfully predicted the fraction of dose absorbed for several model drugs. These findings would contribute to the development of new dosage forms and new drugs for oral administration.

Key words—drug absorption; absorption improvement; cytoprotection; polyamine; prediction; human tissues

1. はじめに

近年の医薬品開発においては、優れた薬理活性を有するものの、溶解性に乏しい、膜透過性が不良であるなどの理由により、経口製剤化が困難となる新薬候補化合物が少なくない。したがって、製剤的な工夫により、薬物の溶解性ととも膜透過性を改善できれば、その意義は極めて大きい。プロドラッグ化による膜透過性改善も1つの方法ではあるが、薬理活性そのもの自体が変動する可能性があるほか、個々の化合物に対する対応が必要となるため汎用性には欠けると考えられる。薬物の吸収改善については、添加剤などを利用した様々な研究が行われているものの、いずれも局所における粘膜障害等の安全性に問題が指摘されており、¹⁾ 実用化に至ったのはカプリン酸ナトリウム (C10) を用いたアンピシリン坐剤のみである。^{2,3)} そこで筆者らは、このアンピシリン坐剤よりも、さらに安全で、かつ高い吸収改善を可能とする処方について検討を進めた。その結

果、タウリンやL-グルタミンを元とする数種のアミノ酸が粘膜保護効果を示すこと、そのアミノ酸を併用することにより、ラウリン酸 (C12) による粘膜障害を有意に軽減し、かつC12の吸収改善効果を十分に維持できることを見出した。

その他、安全性の高い吸収改善を可能とする新規添加剤として、生体に必須の内因性ポリアミンであるスペルミン (spermine; SPM) に着目した。このポリアミンはアミノ酸から生合成されるが、食物からも摂取されることが知られている。またDNAやRNA及びリン脂質等の安定化に寄与すること、小腸の integrity の維持に必要であること、マクロファージの活性化を抑制することにより抗炎症作用を示すこと、が知られており、安全性は高いものと推察された。ポリアミンを薬物と経口投与しても、吸収改善効果は認められたが、タウロコール酸ナトリウム (sodium taurocholate; STC) などの胆汁酸塩類との併用により、さらに顕著な吸収改善効果が得られることを見出し、病理組織学的にも安全性が高いことを確認できた。

さらに、上記に見出した新規処方のヒトにおける経口吸収改善効果の確認、また開発候補化合物のヒトにおける経口吸収性を、開発の初期段階におい

The author declares no conflict of interest.

大塚製薬株式会社 徳島市川内町平石 夷野 224-18)

e-mail: Miyake.Masateru@otsuka.jp

本総説は、平成24年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

て推定できるような評価系を作製することを目的として、ヒト組織を用いた Ussing Chamber による *in vitro* 薬物透過試験を行い、ヒト経口吸収評価系の構築を目指した。

2. C12 を用いた薬物吸収改善とアミノ酸の持つ粘膜保護効果に関する検討

単に吸収改善剤と言っても様々な種類が存在するが、C10 や C12、そして中鎖脂肪酸グリセリドなどの中鎖脂肪酸関連の油脂は、以前より吸収改善機構の解明が精力的に行われている。²⁻⁴⁾ またこれらの油脂は、肝・膵機能の障害などによる胆汁やりパーゼの分泌低下による高級脂肪酸の消化管吸収不全患者に対する脂肪性栄養剤として経口利用されており、⁵⁻⁷⁾ 安全面からも有望な添加剤であると考えられる。これまでに、難吸収性色素である phenol red (PR) の吸収改善効果を指標とし、脂肪酸類の吸収改善効果を比較検討したところ、C12 が脂肪酸類では最も強力な吸収改善剤として選択された。⁸⁾ 粘膜障害性のマーカーとしては、生化学的手法として、リン脂質、タンパク質、乳酸脱水素酵素 (LDH) の粘膜からの漏出を指標とし評価が行われた。⁹⁾ 次に、Biopharmaceutics Classification System (BCS) の Class IV に分類される Rebamipide (大塚製薬株) をモデル化合物に使用し、実用化を目指した検討を行った。C12 の添加によって Rebamipide の吸収は大幅に改善されることが、ラット大腸 loop 試験より明らかとなったが、有意なタンパク質の漏出が認められた (Fig. 1)。これに対しアミノ酸としてタウリン (Tau) を併用、又は L-グルタミン (L-Gln) を前処理後併用することによって、吸収改善効果がある程度維持した状態で、タンパク質の漏出をコントロールレベルまで低下させることが明らかとなった (Fig. 1)。¹⁰⁾ さらに実用化を見据え、病理組織学的な検討を行ったところ、C12 単独時の病理変化に対して、Tau や L-Gln 添加によって、病理組織学的にもその安全性を確認することができた (Fig. 2 and Table 1)。¹⁰⁾

3. アミノ酸による粘膜保護機構

前項において、アミノ酸添加による粘膜保護作用が確認された。その効果をより効率的に利用するためには、その保護機構を明らかにする必要があると考えられる。種々検討を行ったところ、まず細胞内カルシウムイオン $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の関与が示唆され

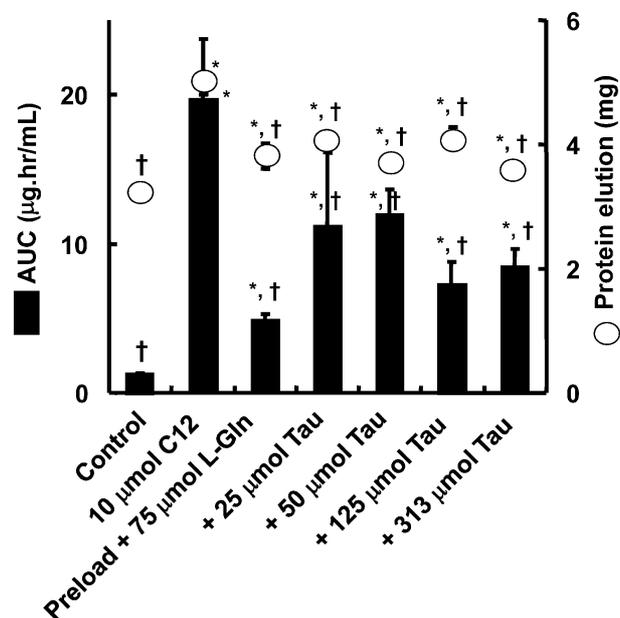


Fig. 1. Effect of Combinatorial Use of C12 and Amino Acids on Absorption of Rebamipide in *In Situ* Colon Loop Study

C12 was administered at a dose of 10 μ mol. 75 μ mol L-Gln was preloaded 1 h before dosing of rebamipide and was also coadministered with C12. Tau was applied at 25, 50, 125 or 313 μ mol. Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of three or four experiments. * $p < 0.05$ compared with control; † $p < 0.05$ compared with C12; Keys: ■, rebamipide absorption; ○, protein elution.

た。中鎖脂肪酸を元とする吸収促進剤は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に伴う tight junction の開口が吸収改善機構の 1 つとして知られている。¹¹⁾ しかしながら、 $[Ca^{2+}]_i$ の過度な上昇は、細胞の機能不全、あるいは細胞死につながるということが知られている。¹²⁾ Figure 3 にも示しているように、アミノ酸は C12 添加による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を有意に抑制することが明らかとなった。⁹⁾ また粘膜障害と炎症性メディエーターとの関連性について検討を行い、代表的なメディエーターであるヒスタミンに着目した。ヒスタミンは腸クロム親和性細胞や肥満細胞に貯蔵されているが、IgE 受容体を介した抗原抗体反応や、非免疫学



三宅正晃

1994 年岡山大学薬学部卒業。1996 年岡山大学自然科学研究科修士課程修了。同年大塚製薬株入社、製剤研究所に勤務。2003 年岡山大学自然科学研究科 (木村聡城郎 教授) 博士後期課程修了 (博士 (薬学))。2006 年 9 月～2008 年 3 月スウェーデン ウプサラ大学薬学部 (Per Artursson 教授) に留学。2008 年 7 月～2013 年 5 月慶応大学医学部消化器内科 (日比紀文 教授) 特別研究員。現在に至る。

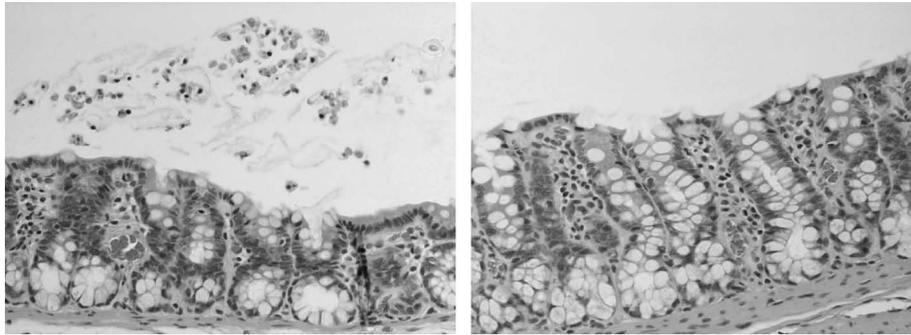


Fig. 2. Histopathologic Observation of Cytoprotective Action by Tau after 6-h *in Situ* Colon Loop Study with 10-μmol C12

Light micrographs were taken after 6-h *in situ* colon loop study (A) without Tau and (B) with 125 μmol Tau, respectively (93×magnification). [Reproduced from ref. 10] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

Table 1. Cytoprotective Action by L-Gln and Tau after 1.5-h *in Situ* Colonic Loop Study for Rebamipide with 10-μmol C12

Findings for epithelial cells	Control					C12 only					C12+125-μmol L-Gln					C12+Preload ^{a)} 75-μmol L-Gln					C12+125-μmol Tau				
	1	2	3	4	mean	1	2	3	4	mean	1	2	3	4	mean	1	2	3	4	mean	1	2	3	4	mean
Shrinkage	0	0	0	0	0.00	2	2	2	1	1.75	2	1	2	1	1.50	1	0	1	1	0.75	1	1	1	2	1.25
Exfoliation	0	0	0	0	0.00	2	2	2	2	2.00	1	2	2	2	1.75	0	0	0	1	0.25	0	1	2	1	1.00
Coagulation necrosis	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00

[Score] 0, no change; 1, very slight; 2, slight; 3, moderate; 4, severe; ×, unable to estimate

Doses of rebamipide and C12 were 5 mg and 10 μmol, respectively. Histopathological examination was performed by an experienced veterinary histopathologist according to the procedure described in ref. 10). ^{a)} 75-μmol L-Gln was preloaded 1 h before dosing of rebamipide and was also co-administered with C12. [Reproduced from ref. 10] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

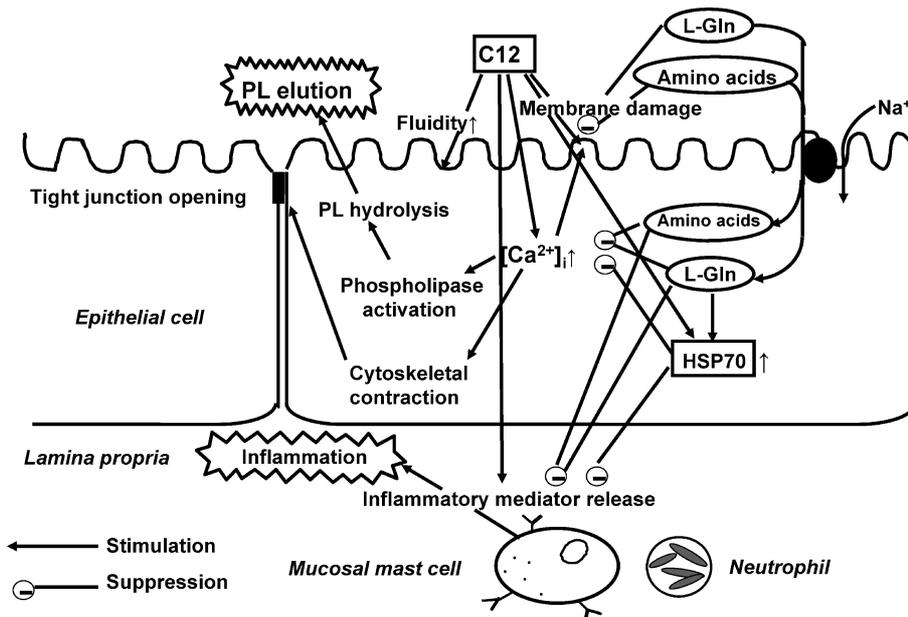


Fig. 3. Scheme of Possible Mechanisms by Which Amino Acids Protect the Epithelial Cells [Reproduced from ref. 9] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

的な様々な刺激により放出されることが知られている。¹³⁾ C12の影響によりヒスタミン遊離が有意に増大したものの、これらはアミノ酸添加によって有意に抑制されることが明らかとなった (Fig. 3).⁹⁾ さらにL-Glnの場合は、heat shock protein 70 (HSP70)の関与が示唆された。このHSP70は、熱刺激、酸化的ストレス、炎症時やアルコールなどの化学物質による刺激により発現誘導され、細胞内タンパク質の変性や凝集を抑制していることから、¹⁴⁾ 粘膜障害に対して保護効果を発揮しているものと考えられた (Fig. 3).

4. アミノ酸含有坐剤製剤の検討

前項では水溶液を用いた検討であったが、実用化を目指し坐剤を調製し、その吸収改善効果、粘膜への安全性について検討を行った。動物実験にはラット及びウサギを使用した。ラットの検討で水性基剤と油脂性基剤について検討を行い、ウサギでは油脂性基剤について検討を行った。

4-1. ラット用坐剤製剤 ラット用坐剤の作製には、PEG1000あるいはPEG6000を基剤とした水溶性坐剤と、Witepsol H-15を基剤とした油脂性坐剤を調製した。これら調製した坐剤を、ラット直腸に挿入後、経時的に採血を行い、血清中濃度を測定したところ、両基剤ともC12添加による吸収改善効果が期待されたが、特に油脂性基剤においてコン

トロール坐剤に対する吸収改善効果が約7倍と大きかったため (Fig. 4),¹⁵⁾ 油脂性基剤を中心に検討を行うことにした。このC12単独坐剤に対し、アミノ酸であるTauやL-Glnを製剤中に添加することにより、C12-Tau坐剤で約4倍の吸収改善効果を維持できたものの、C12-L-Gln坐剤では約2倍に留まった。

次に、アミノ酸併用による粘膜保護作用を確認するため、各種坐剤投与後におけるタンパク漏出量について測定を行ったところ、C12含有水溶性及び油脂性坐剤は、コントロール坐剤と比して有意なタンパク質の漏出が確認されたが、これらはTauやL-Glnの併用によって、Controlレベルまで有意に低下した (Fig. 5).¹⁵⁾ さらに、アミノ酸による粘膜保護作用に関して病理組織学的検討を行った。得られた結果から、C12-Tau坐剤、C12-L-Gln坐剤とも、C12単独坐剤よりも直腸粘膜への刺激性が小さく、コントロール坐剤と遜色のない安全性を有することが明らかとなった (Fig. 6).¹⁵⁾

4-2. ウサギ用坐剤製剤 ウサギ用坐剤の作製は、前項のラット用坐剤の結果から、油脂性坐剤に絞り検討を行った。ヒトへの応用を念頭に、坐剤のスケールアップを行った。ここでは市販されているC10坐剤との比較も行ったが、C12 (20 mg)-Tau (30 mg)を含む油脂性坐剤は、C10 (25 mg)坐剤

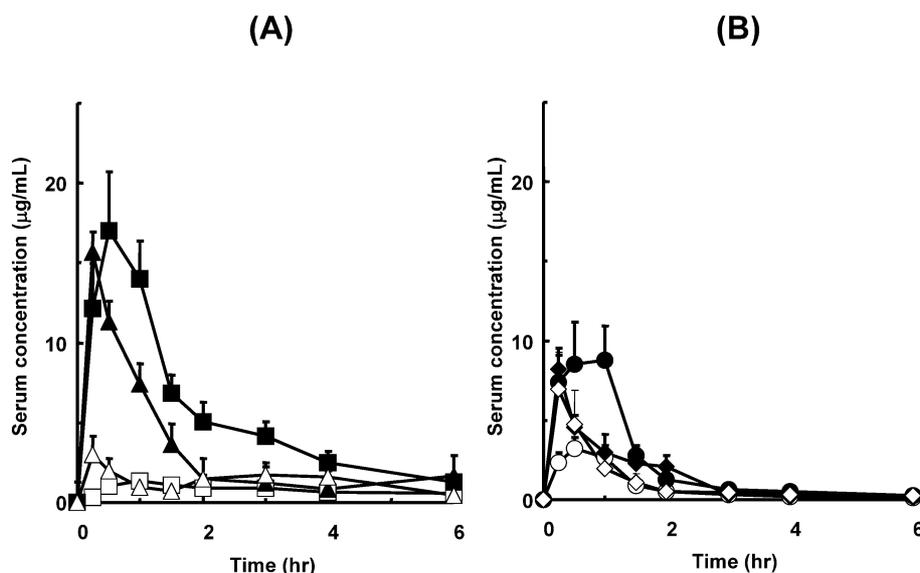


Fig. 4. Serum Concentration of Rebamipide after Rectal Administration of FB (A) or WB (B) Suppository Containing C12 and L-Gln or Tau

Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. value from three to five experiments. Keys: (A) □, control; ■, C12; △, C12+preload L-Gln; ▲, C12+Tau. (B) ○, control; ●, C12; ◇, C12+preload L-Gln; ◆, C12+Tau. [Reproduced from ref. 15] with permission from Elsevier.]

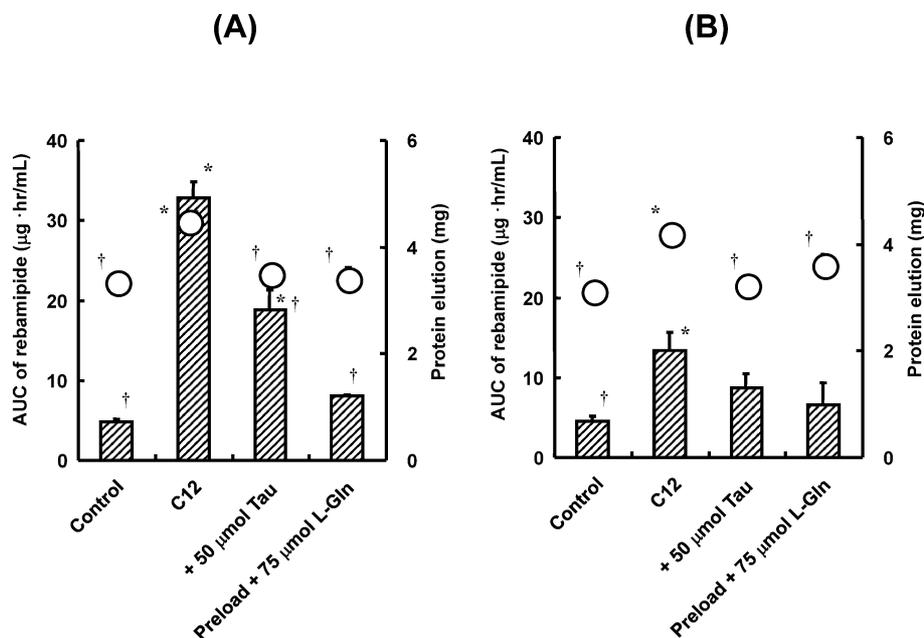


Fig. 5. Effect of Tau and L-Gln in Absorption Enhancement and Local Toxicity after Administration of Fatty Base (FB) (A) or Water-soluble Base (WB) (B) Suppository Containing C12 in Rat Rectum

Doses of rebamipide and C12 were 5 and 2 mg (10 μmol), respectively. Rectal administration study was performed for 6 h. L-Gln was preloaded and coadministered at 75 μmol . Tau was applied at 50 μmol . Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of more than three experiments. * $p < 0.05$ compared with control; † $p < 0.05$ compared with C12; Keys: Rebamipide absorption, closed square; \circ , protein elution.

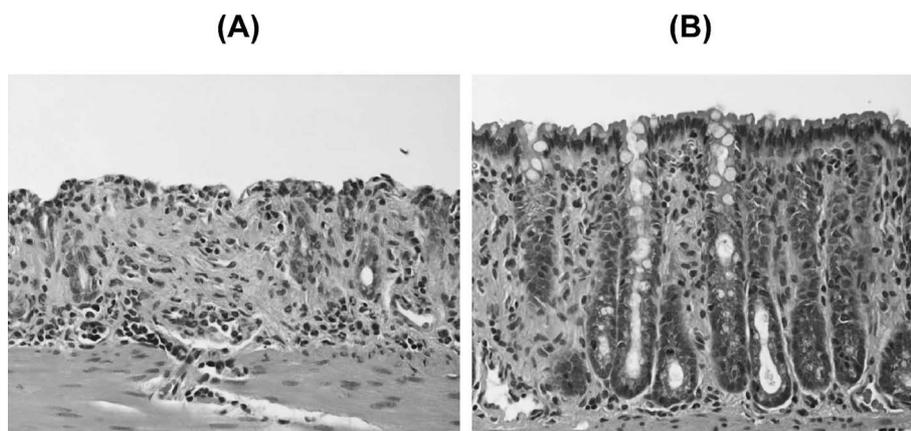


Fig. 6. Histopathological Observation of Cytoprotective Action by Tau at 6 h after Rectal Administration of Fatty Base Suppository Containing Rebamipide and C12 without or with Tau

Light micrographs were taken at 6 h after rectal administration of fatty base suppository (A) without Tau and (B), with 50 μmol Tau, respectively (155 \times magnification). [Reproduced from ref. 15) with permission from Elsevier.]

よりも、また C12 (10 mg)-Tau (30 mg) を含む油脂性坐剤は、C10 (15 mg) 坐剤よりも、Rebamipide の吸収改善、ウサギ直腸刺激性の観点から、より優れていることが明らかとなり (Fig. 7 and Table 2)、安全性の高い吸収改善坐剤製剤の開発の可能性が示唆された。¹⁶⁾

5. ポリアミンを用いた経口吸収改善とその安全性

ポリアミン (polyamine; PA) は生体内にユビキタスに存在し、細胞の分裂、分化、成長に関与することが知られている。^{17,18)} また、DNA, RNA, リン脂質等の安定化に関与すること、¹⁹⁾ マクロファージの活性化を抑制することにより、抗炎症作用を示すことが知られている。²⁰⁾ さらに、生体内でアミノ酸

から生合成され、¹⁹⁾ 食物からも摂取されることから、安全面についても有望な添加剤と考えられる。そこで筆者は、PA の中でもスペルミン (SPM) 及

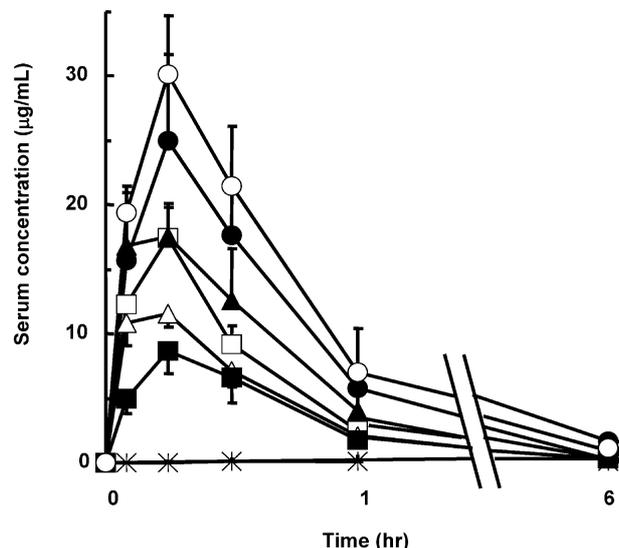


Fig. 7. Serum Concentration of Rebamipide after Rectal Administration of Suppositories Containing C10 or C12 with or without Tau

Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of three to five experiments. Keys: ×, Control suppository; ○, 20 mg C12 suppository; ●, 20 mg C12+30 mg Tau suppository; △, 15 mg C10 suppository; ▲, 25 mg C10 suppository; □, 10 mg C12 suppository; ■, 10 mg C12+30 mg Tau suppository. [Reproduced from ref. 16] with permission from The Pharmaceutical Society of Japan.]

びスペルミジン (spermidine; SPD) に着目し、経口吸収改善の可能性について検討を行った。モデル化合物には Rebamipide を使用し、ラットに経口投与試験を実施した。コントロールである溶液投与に比して、SPM 添加で約 2.5 倍、SPD 添加で約 1.5 倍の AUC を示し、吸収改善効果としては SPM > SPD であった。さらに経口投与後、消化管内に残存する胆汁酸との相互作用を受ける可能性が考えられたため、SPM や SPD に胆汁酸を添加することで、その吸収改善効果に対する影響を検討した。胆汁酸には胆汁中のメイン物質として含まれているタウロコール酸ナトリウム (STC) を使用したところ、コントロール溶液と比して、SPM+STC では約 7 倍、SPD+STC では約 3 倍の吸収改善効果を示し、新規経口吸収改善処方としての可能性が示唆された (Fig. 8).²¹⁾ またここには示していないが、STC 以外にグリココール酸ナトリウムについても同様に併用し、評価を行ったところ、STC と同様に、併用による吸収改善増強効果を確認できた。

次に、安全面について病理組織学的な検討を行った。評価部位としては、経口投与時に最も高濃度 PA が存在する胃と、最も高濃度 PA と胆汁酸が存在する十二指腸を選択し、経口投与後 1.5 時間後と 8 時間後における消化管粘膜について評価を行った

Table 2. Pharmacokinetic Parameters and Histopathological Scores of Tissue Irritation after Rectal Administration of Rebamipide Suppositories into Rabbits

Suppositories	Pharmacokinetic parameters			Histopathological scores		
	AUC (µg·h/mL)	C _{max} (µg/mL)	BA (%)	Median	Mean ± S.E.	Classification of irritation
Sham operation	—	—	—	0.1	0.1 ± 0.1	A
Control	0.51 ± 0.14 ^{b,c}	0.12 ± 0.03 ^{b,c}	1.3 ± 0.4 ^{b,c}	0.0	0.0 ± 0.0	A
a (15 mg C10)	9.28 ± 0.98 ^{a,c}	12.74 ± 0.95 ^{a,b,c}	33.8 ± 3.4 ^{a,c}	2.0	1.7 ± 0.1	C
b (25 mg C10)	15.11 ± 4.07 ^{a,b,c}	19.09 ± 3.00 ^{a,c}	53.3 ± 13.8 ^{a,b,c}	2.5	2.1 ± 0.1	C-D
c (2 mg C12)	1.04 ± 0.16 ^{b,c}	1.45 ± 0.22 ^{b,c}	3.7 ± 0.6 ^{b,c}	0.5	0.6 ± 0.1	B
d (5 mg C12)	3.59 ± 0.44 ^{a,b,c}	6.37 ± 0.55 ^{a,b,c}	12.4 ± 1.6 ^{a,b,c}	1.0	1.4 ± 0.2	B
e (10 mg C12)	11.54 ± 1.51 ^{a,c}	17.45 ± 2.73 ^{a,c}	34.7 ± 3.3 ^{a,c}	1.5	1.8 ± 0.3	C
f (20 mg C12)	23.84 ± 5.41 ^{a,b}	31.05 ± 3.94 ^{a,b}	73.3 ± 17.0 ^{a,b}	3.0	2.1 ± 0.3	C-D
g (10 mg C12 + 15 mg Tau)	9.25 ± 1.10 ^{a,c}	15.79 ± 1.73 ^{a,c}	28.0 ± 2.9 ^{a,c}	2.0	1.8 ± 0.5	C
h (10 mg C12 + 30 mg Tau)	6.68 ± 1.65 ^{a,b,c}	8.83 ± 1.61 ^{a,b,c}	20.8 ± 6.1 ^{a,b,c}	1.0	1.4 ± 0.5	B
i (10 mg C12 + 60 mg Tau)	3.61 ± 0.44 ^{a,b,c}	4.48 ± 0.48 ^{a,b,c}	10.8 ± 1.4 ^{a,b,c}	1.0	1.2 ± 0.4	B
j (20 mg C12 + 30 mg Tau)	20.88 ± 4.18 ^{a,b,c}	25.00 ± 6.71 ^{a,b,c}	66.7 ± 10.3 ^{a,b}	2.0	1.8 ± 0.2	C

Dose of rebamipide was 5 mg. AUC is the area under the serum concentration–time curve, which was calculated from 0 to 6 h following the trapezoidal rule. C_{max} means the maximum serum concentration of rebamipide. BA means the absolute bioavailability calculated based on the AUC after intravenous administration of rebamipide at a dose of 1.15 mg/kg. Each value represents the mean ± S.E. of more than three experiments. Histopathological scoring was performed by following the methods described in ref. 16). ^a $p < 0.05$, compared with control. ^b $p < 0.05$ compared with 10 mg C12. ^c $p < 0.05$ compared with 20 mg C12. [Reproduced from ref. 16] with permission from The Pharmaceutical Society of Japan.]

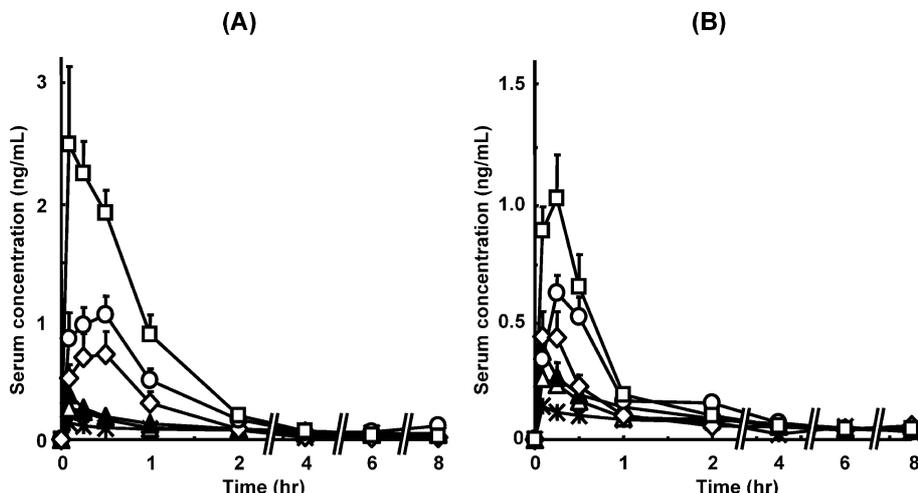


Fig. 8. Effect of Polyamines or Their Combinatorial Use with STC on Rebamipide Absorption after Oral Administration to Rats
 Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of three to four experiments. Keys: (A) ×, Control; △, 5 mM STC; ▲, 25 mM STC; ◇, 10 mM SPM; ○, 10 mM SPM+5 mM STC; □, 10 mM SPM+25 mM STC. (B) ×, Control; △, 5 mM STC; ▲, 25 mM STC; ◇, 10 mM SPD; ○, 10 mM SPD+5 mM STC; □, 10 mM SPD+25 mM STC. [Reproduced from ref. 21) with permission from Elsevier.]

Table 3. Histopathological Examination of GI Segments after Oral Administration of 10 mM SPM and 25 mM STC

Findings	Fore-stomach		Glandular Stomach		Duodenum	
	1.5 h	8 h	1.5 h	8 h	1.5 h	8 h
Exfoliation of epithelial cells	—	—	0.25	0.00	0.00	0.00
Shrinkage of epithelial cells	—	—	0.00	0.00	0.00	0.00
Coagulation necrosis of epithelial cells	—	—	—	—	0.00	0.00
Erosion	—	—	0.00	0.25	0.00	0.00
Inflammatory cell infiltration	0.00	0.00	—	—	0.00	0.00
Villus atrophy	—	—	—	—	0.00	0.00
Degeneration/necrosis of epithelial cells	0.00	0.25	—	—	—	—
Edema in lamina propria	0.00	0.25	—	—	—	—

Dose of rebamipide was 5 mg. [score] 0, no change; 1, very slight; 2, slight; 3, moderate; 4, severe. Results were shown as the mean of four experiments. Histopathological examination was performed by an experienced veterinary histopathologist. [Reproduced from ref. 21) with permission from Elsevier.]

ところ、PA 単独において、また PA と胆汁酸併用時においても、病理的な変化は認められないことが明らかとなり (Table 3), 安全性の高い経口吸収改善処方である可能性が示唆された。²¹⁾

6. アニマルスケールアップと胆汁酸の必要性

引き続きヒトへの応用を念頭に、アニマルスケールアップ実験を行った。ビーグル犬に SPM を投与し、コントロール溶液との比較を行ったところ、吸

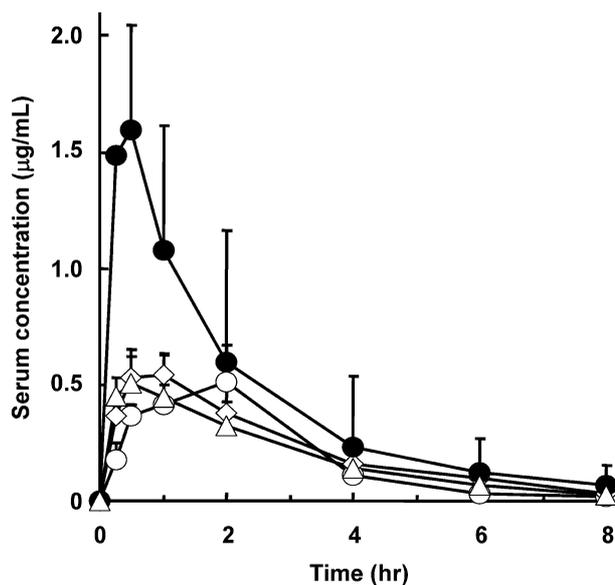


Fig. 9. Effect of Novel Formulation Containing SPM and STC on Rebamipide Absorption after Oral Administration to Beagle Dogs

Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of four experiments. Keys: ○, Control; △, 25 mM STC; ◇, 25 mM SPM; ●, 25 mM SPM+25 mM STC. [Reproduced from ref. 22) with permission from Elsevier.]

収改善効果は認められず、それは SPM+STC の併用とすることで、2 倍以上の AUC を示すことが明らかとなり、新規経口吸収改善剤としての可能性が示唆された (Fig. 9).²²⁾

またラットでは、SPM 単独でも吸収改善効果が認められたものの、ビーグル犬では認められなかつ

た理由として、両動物間における胆汁酸分泌能の違いに起因するものと考えられた。つまり、ラットの場合は、胆汁酸が消化管に対して常時分泌されていることから、SPM 単独でも内因性の胆汁酸と反応し、吸収改善効果が認められたものと推察された。そこで胆管結紮ラットを用いて、SPM 単独、SPM +STC の比較を行ったところ、SPM 単独では吸収改善効果が消失し、ポリアミンと胆汁酸との併用によって、コントロール溶液と比して約4倍の吸収改善効果が認められたことから、ポリアミンを用いた経口吸収改善には胆汁酸は必須であることが示唆された (Fig. 10).²²⁾

7. ポリアミンによる吸収改善効果の機構

前述のSPM とSTC の併用による吸収改善効果の機構解析を行うことは、さらに強力な吸収改善処方を作る意味でも重要であることから、その機構解析を行った。Caco-2 単層膜を使った試験結果から、SPM 及びSTC 濃度の上昇によって、膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance; TEER) は低下傾向を示した。したがって、薬物吸収改善機構の1つに、tight junction 開口に伴う細胞間隙輸送の改善が関与していることが明らかとなった。また

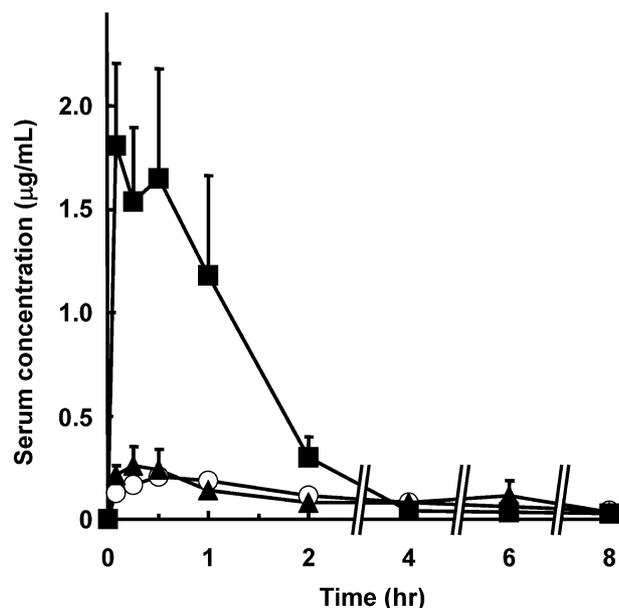


Fig. 10. Effect of Novel Formulation Containing SPM and STC on Rebamipide Absorption after Oral Administration to BDL Rats

Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of more than four experiments. Keys: ○, Control; ▲, 10 mM SPM; ■, 10 mM SPM + 25 mM STC. [Reproduced from ref. 22) with permission from Elsevier.]

SPM とSTC 併用後に認められたTEER 値の低下は、STC とSPM を除去・洗浄後、上昇していき、1060分の時点では、Control と同程度に回復することが明らかとなった (Fig. 11).²³⁾ 一方で、細胞障害性の positive control として用いた50%エタノールでは、除去・洗浄後も、低下したTEER は回復しなかった。以上のことから、SPM とSTC の併用処方による膜透過性改善効果に伴うTEER の低下は、可逆的な作用であり、かつ速やかに回復することから、吸収改善剤に適した安全な膜透過改善作用を示すことが明らかとなった。

さらに、経細胞輸送を介する透過性に関して、Caco-2 細胞の脂質膜の疎水基部分を認識する蛍光プローブとして、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を、極性基部分を標識する蛍光プローブとして8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid ammonium salt (ANS) を用いて、蛍光偏光解消法により膜流動性の変化を評価した。その結果、SPM とSTC 併用により、細胞膜の疎水性、極性いずれの部位も有意な偏光度 p 値の低下、すなわち、膜流動性の上昇が確認され、特にSTC による影響が大きいことが明らかとなった。以上のことから、SPM とSTC の併用処方による膜透過性改善効果の作用経路として、経細胞輸送の改善も関与していることが明らかとなった。

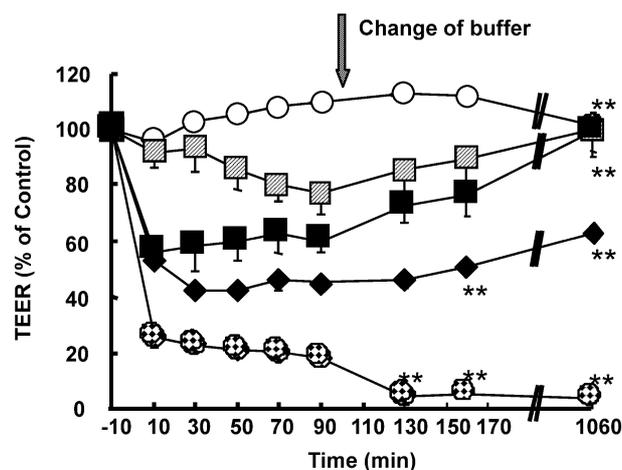


Fig. 11. Reversibility of TEER Lowering Effect by SPM and STC in Caco-2 Cell Monolayers

The treatment solution was changed to fresh Ringer's solution without any adjuvant. Keys: ○, control; ■, 3 mM SPM + 7 mM STC; ▲, 3 mM SPM + 10 mM STC; ◆, 4 mM SPM + 10 mM STC; ●, 50% ethanol. Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. of three to four experiments. ** $p < 0.01$, compared with the corresponding values at 90 min. [Reproduced from ref. 23) with permission from Elsevier.]

8. ヒト組織を用いた新規 *in vitro* 薬物透過性試験法の開発

筆者はまた、上記のように新規性のある、また従来処方よりも安全性を高めた吸収改善処方のヒトにおける効果、新規開発候補化合物のヒトにおける吸収性を、開発の比較的早期において推定できることが重要であると考え、ヒト消化管組織を用いた *in vitro* 実験系と、その結果からヒトにおける吸収性を推定する評価システムの構築を試みた。

実験には、Mini-Ussing Chamber 法を使用した。ヒト組織はヘルシンキ宣言に則り、患者から同意を得、施設内倫理委員会にて承認されたものを使用した。使用したヒト組織は、潰瘍性大腸炎患者 (UC) の大腸部、若しくはクローン病患者 (CD) の小腸

部及び大腸部から得られた、非炎症部を使用した。実験の妥当性、再現性を確認するため、モデル化合物には、吸収性の異なる FD-4 (非透過性)、アテノロール (低透過性)、メトプロロール (高透過性) について評価を行ったところ、従来から膜透過性評価時の指標とされている P_{app} 値を用いて比較を行うと、 $FD-4 < \text{メトプロロール} < \text{アテノロール}$ と、これまでに報告されているヒト組織を用いた結果と異なるものであった [Fig. 12 (A)].²⁴⁾ それゆえ、われわれは透過した薬物量 (X^{corr}) に加えて、組織内に蓄積している薬物量 (T^{corr})、さらにはドナー側の薬物の溶解性の経時的な変化を考慮した評価法 (transport index; TI (%)) にて評価を行うことで (Fig. 13), $FD-4 < \text{アテノロール} < \text{メトプロロール}$

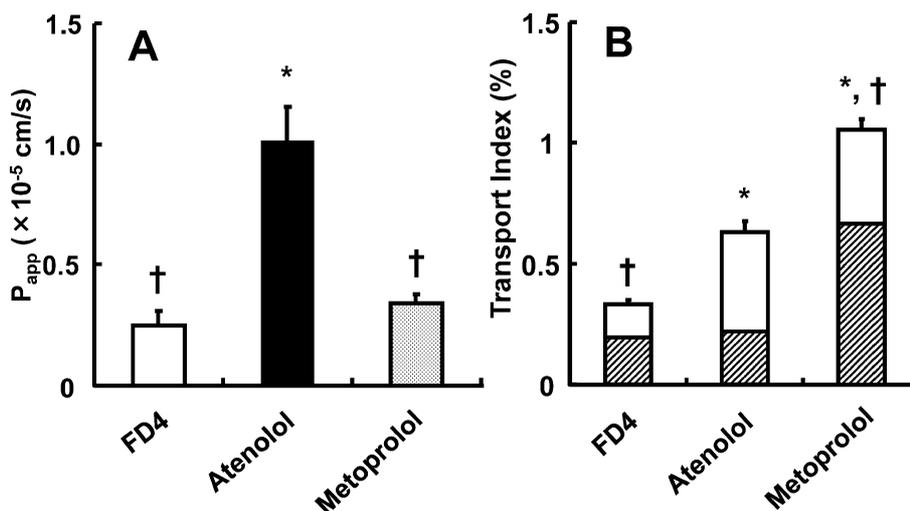


Fig. 12. Apparent Permeability (P_{app}) and Transport Index (TI) of FD-4, Atenolol and Metoprolol Across Human Intestinal Tissues (A) Human small intestinal tissues (ileum) from CD patients were mounted in a mini-Ussing chamber. P_{app} was calculated by the standard equation described in ref. 25). (B) TI, X^{corr} and T^{corr} were calculated by ref. 25), respectively. Each value of TI is the mean with S.E. of twelve experiments. * $p < 0.05$ compared with FD-4, † $p < 0.05$ compared with atenolol. Keys: □, X^{corr} ; ▨, T^{corr} . [Reproduced from ref. 25) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

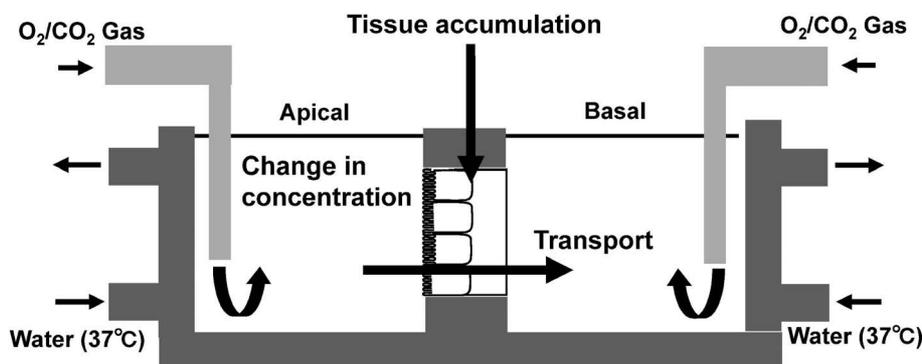


Fig. 13. Schematic Illustration of a Mini-Ussing Chamber System Utilizing Human Intestinal Tissue

Human intestinal tissues were mounted between the apical and basolateral chambers. Both sides were filled with transport buffer (apical and basolateral side; pH=7.2, volume=1.35 mL). [Reproduced from ref. 25) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

の関係を再現することができた [Fig. 12 (B)]. 評価に用いた式を下記する.

$$TI = X^{corr} + T^{corr} \quad (1)$$

Equation (1)を用いた評価法の再現性を確認したところ、17名の患者から60個のサンプルを利用しても、FD-4、アテノロール、メトプロロールのTI値の順位付けは変わらなかったことから、非常に再現性にも優れた評価法であることが確認できた (Fig. 14).²⁵⁾

9. ヒト組織を用いた薬物透過性予測の検討

TI値を用いた新しい薬物透過性評価法は、再現性にも優れていることを確認できたことから、次に、ケトプロフェン、ナプロキセン、プロプラノロールをモデル薬物に加えてそれぞれについてTI値を算出し、薬物透過予測の検討を行った。予測には下記の式を利用した。

$$Fa \text{ in humans (\%)} = 100 \cdot (1 - e^{-f \cdot (TI - \alpha)}) \quad (2)$$

fは係数、 α はラグファクターとした。非直線最小二乗回帰プログラム MULTI²⁶⁾にて計算され、 2.347 ± 0.230 , 0.314 ± 0.002 に確定した。Figure 15で示されているように、TI値とヒトFaとの関係は、非常に良好な相関性が確認された。また、予測式Eq. (2)に基づいたモデル化合物6種のヒトFa値は、文献値に非常に近い値を示した。²⁴⁾さらに、予測式Eq. (2)の妥当性及び適応性を確認するために、異なる吸収性を示すアセブトロール、ナドロール、シロスタゾールの3つの試験化合物を利用し、TI値を算出することで、ヒトFa値の予測を試みた

ところ、回帰直線から得られたヒトFa値は、ナドロールで38.2%、アセブトロールで66.4%、シロスタゾールで99%であった。これらの値は文献値である、ナドロール35%、²⁷⁾アセブトロール70%、²⁷⁾シロスタゾール100%^{28,29)}に非常に近い値を示したことから、TI値を用いたヒト消化管吸収の予測が十分可能であると考えられた。

10. おわりに

本研究により、既存の市販坐剤処方よりも、安全性に優れた吸収改善坐剤処方を確立することができ

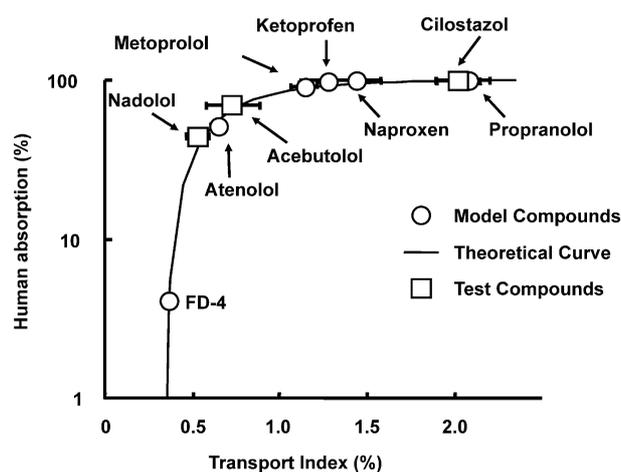


Fig. 15. Relationship between Transport Index (TI) and Fraction of Dose Absorbed (Fa) in Human for Drugs with Different Characteristics

Fa values of drugs cited from references were plotted against TI values. Theoretical fitting line was obtained for six model compounds using Eq. (2), and f and α were obtained as 2.347 ± 0.230 and 0.314 ± 0.002 , respectively. [Reproduced from ref. 25) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

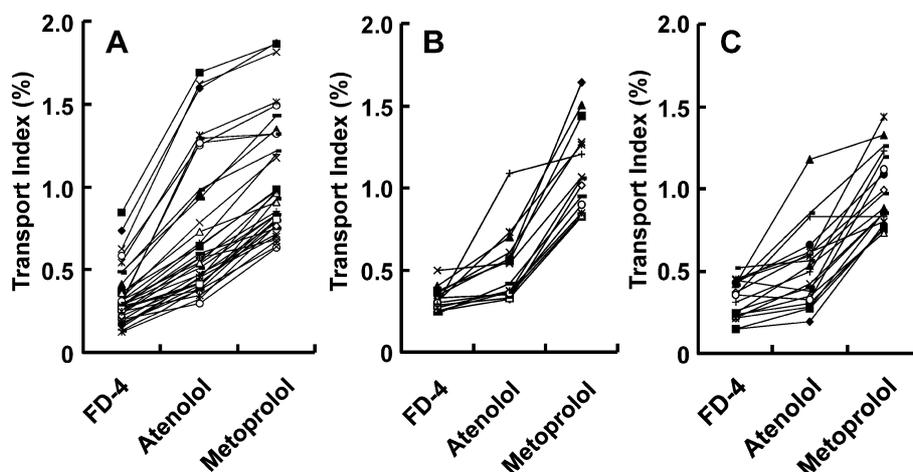


Fig. 14. Individual Value of Transport Index (TI) of FD-4, Atenolol and Metoprolol Across Human Intestinal Tissues

(A) Large intestine from UC patients ($n=35$ from 7 patients). (B) Small intestine (ileum) from CD patients ($n=12$ from 4 patients). (C) Large intestine from CD patients ($n=16$ from 6 patients). TI was calculated by Eq. (1). [Reproduced from ref. 25) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

た。また、ポリアミンと胆汁酸を用いた吸収改善を可能とする新しい経口製剤処方確立することができた。さらに、これらの新処方の有効性を含め、新規開発候補化合物のヒトにおける経口吸収性を推定可能とする、ヒト組織を用いた *in vitro* 評価システムの構築に成功した。これらの成果は、今後の新薬開発に少なからず寄与するものと考えている。

謝辞 本稿を終えるに当たり、薬剤学を1から御教授頂きました岡山大学名誉教授 木村聰城郎先生、岡山大学薬学部教授 檜垣和孝先生に深甚なる謝意を表します。また終始有益なご助言を頂きました大塚製薬㈱製剤研究所 戸口 始 顧問、小富正昭顧問、向井正志 前所長、西林 徹 所長、毒性研究部 南 孝則 前室長、岡山大学薬学部准教授 大河原賢一先生に衷心より感謝申し上げます。さらに、多くの実験に協力して頂きました岡山大学薬学部薬剤学教室の皆様、大塚製薬㈱製剤研究所の皆様にご心より感謝申し上げます。

REFERENCES

- Swenson E. S., Curatolo W., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **8**, 39–92 (1992).
- Lindmark T., Kimura Y., Artursson P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 362–369 (1998).
- Lindmark T., Söderholm J. D., Olaison G., Alván G., Ocklind G., Artursson P., *Pharm. Res.*, **14**, 930–935 (1997).
- Higaki K., Takeuchi N., Kato M., Hashida M., Sezaki H., *J. Pharm. Sci.*, **79**, 334–338 (1990).
- Matsunaga F., Shimoyama T., Kikuchi H., Itoh T., Sakamoto Y., Tomita S., Satomi M., Hosaka T., *Shokuhin to Kagaku*, **10**, 75–80 (1968).
- Naitoh M., *Clin. Nutr.*, **37**, 635–642 (1970).
- Mashima Y., *Clin Nutr.*, **54**, 214–224 (1979).
- Higaki K., Yata T., Sone M., Ogawara K., Kimura T., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **109**, 231–240 (2001).
- Endo Y., Hanada K., Miyake M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Pharm. Sci.*, **91**, 730–743 (2002).
- Miyake M., Oka Y., Minami T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 911–921 (2003).
- Tomita M., Hayashi M., Awazu S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739–743 (1995).
- Cano-Abad M. F., Villarroya M., Garcia A. G., Gabilan N. H., Lopez M. G., *J. Biol. Chem.*, **276**, 39695–39704 (2001).
- Babe K. S. Jr., Serafin W. E., “Goodman & Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics,” New York, McGraw-Hill, 1995, pp. 581–600.
- Kiang J. G., Tsokos G. C., *Pharmacol. Ther.*, **80**, 183–201 (1998).
- Miyake M., Kamada N., Oka Y., Mukai T., Minami T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Control. Release*, **99**, 63–71 (2004).
- Miyake M., Minami T., Oka Y., Kamada N., Yamazaki H., Kato Y., Mukai T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 330–335 (2006).
- Russel D. H., Mevicker T. A., *Biochem. Biophys. Acta*, **259**, 247–258 (1972).
- McCormack S. A., Johnson L. R., *Am. J. Physiol.*, **260**, G795–G806 (1991).
- Zhang M., Wang H., Tracey K. J., *Crit. Care Med.*, **28** (Suppl. 4), N60–N66 (2000).
- Zhang M., Borovikova L. V., Wang H., Metz C., Tracey K. J., *Mol. Med.*, **5**, 595–605 (1999).
- Miyake M., Minami T., Hirota M., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Control. Release*, **111**, 27–34 (2006).
- Miyake M., Minami T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Control. Release*, **115**, 130–133 (2006).
- Mukaizawa F., Taniguchi K., Miyake M., Ogawara K., Odomi M., Higaki K., Kimura T., *Int. J. Pharm.*, **367**, 103–108 (2009).
- Fagerholm U., Johansson M., Lennernäs H., *Pharm. Res.*, **13**, 1336–1342 (1996).
- Miyake M., Toguchi H., Nishibayashi T., Higaki K., Sugita A., Koganei K., Kamada N., Kitazume M. T., Hisamatsu T., Sato T., Okamoto S., Kanai T., Hibi T., *J. Pharm. Sci.*, **102**, 2564–2571 (2013).
- Yamaoka K., Tanigawara Y., Tanaka H., Uno T., *J. Pharmacobiodyn.*, **4**, 879–885 (1981).

-
- 27) Balimane P. V., Han Y. H., Chong S., *AAPS J.*, **8**, E1–E13 (2006).
28) Kamada N., Yamada K., Odomi M., Mukai T., Nishibayashi T., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., *Xenobiotica*, **41**, 903–913 (2011).
29) Toyobuku H., Tamai I., Ueno K., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2249–2259 (2003).