

# 日本薬物動態学会学会賞受賞講演

## 「薬物の腸管膜透過に関する機構論的解析」

2005年10月22日

(マウイにて)

東京薬科大学薬学部

薬物動態制御学教室

林 正弘

# 薬物腸管吸収研究に取り組んで30年

## 薬物吸収機構研究

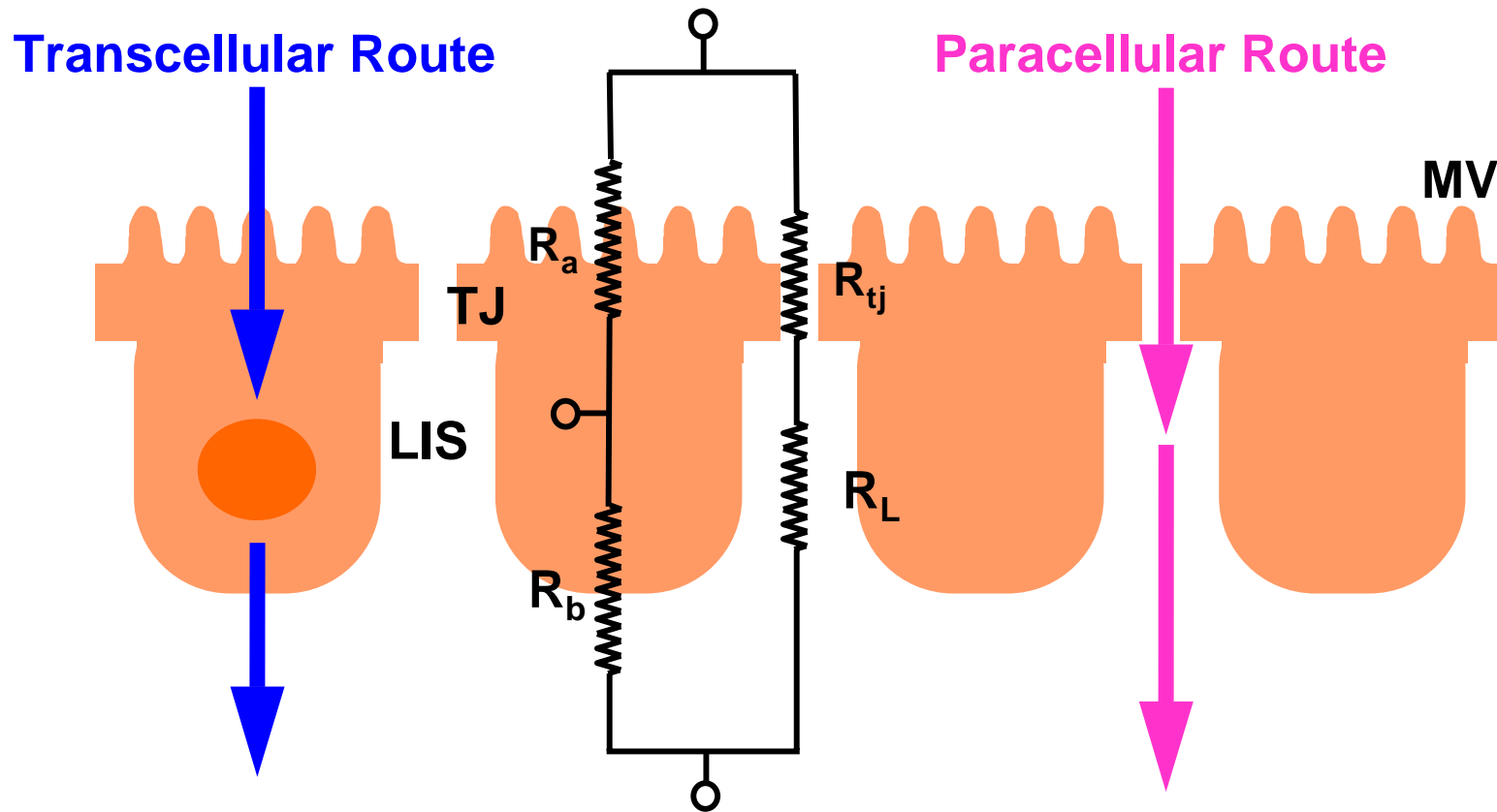
- ・ Paracellular Routeとの出会い
- ・ 吸収促進剤の作用機構研究の始まり
- ・ Paracellular Routeの変化に関する生理学的機構
- ・ 忘れてはいけない Transcellular Routeの変化
- ・ トランスポーターと吸収促進剤
- ・ 病態時における Paracellular Routeと  
Transcellular Route透過性の変化

# Paracellular Routeとの出会い

## 膜透過ルートとその解析法

- ・電気生理学の重要性
- ・Voltage Clamp法
  - Pm vs.  $\xi$
- ・Impedance解析
  - Impedance vs. Frequency
- ・透過ルートの寄与率を評価可能
- ・吸収促進剤による透過ルートの変化を定量化

# Two Permeation Routes and Electric Resistances in Intestinal Epithelium



MV: Microvilli

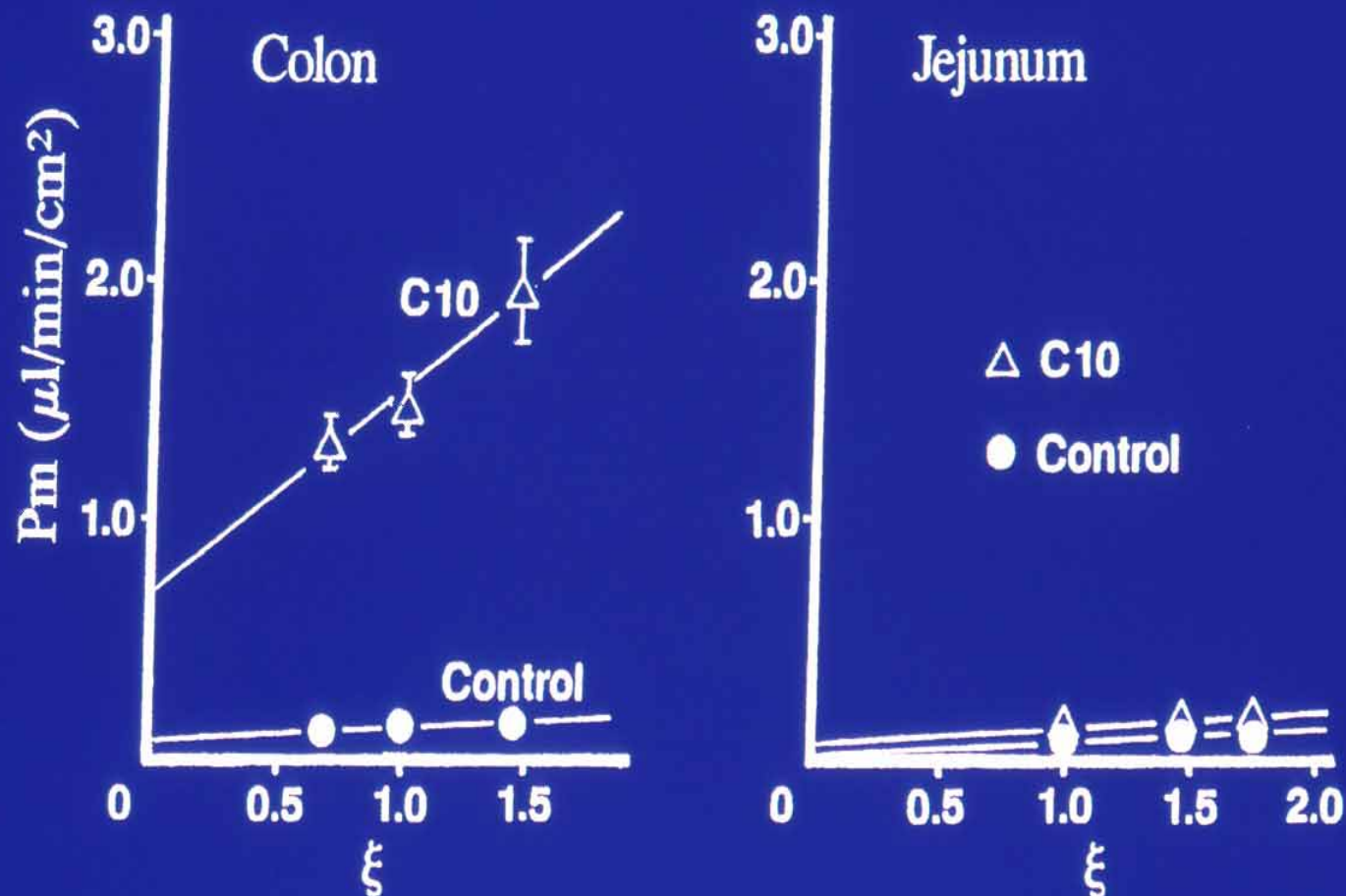
TJ: Tight Junction

LIS: Lateral intercellular space

$R_a, R_b$ : Mucosal and serosal resistances

$R_{tj}, R_L$ : Junctional and intercellular resistances

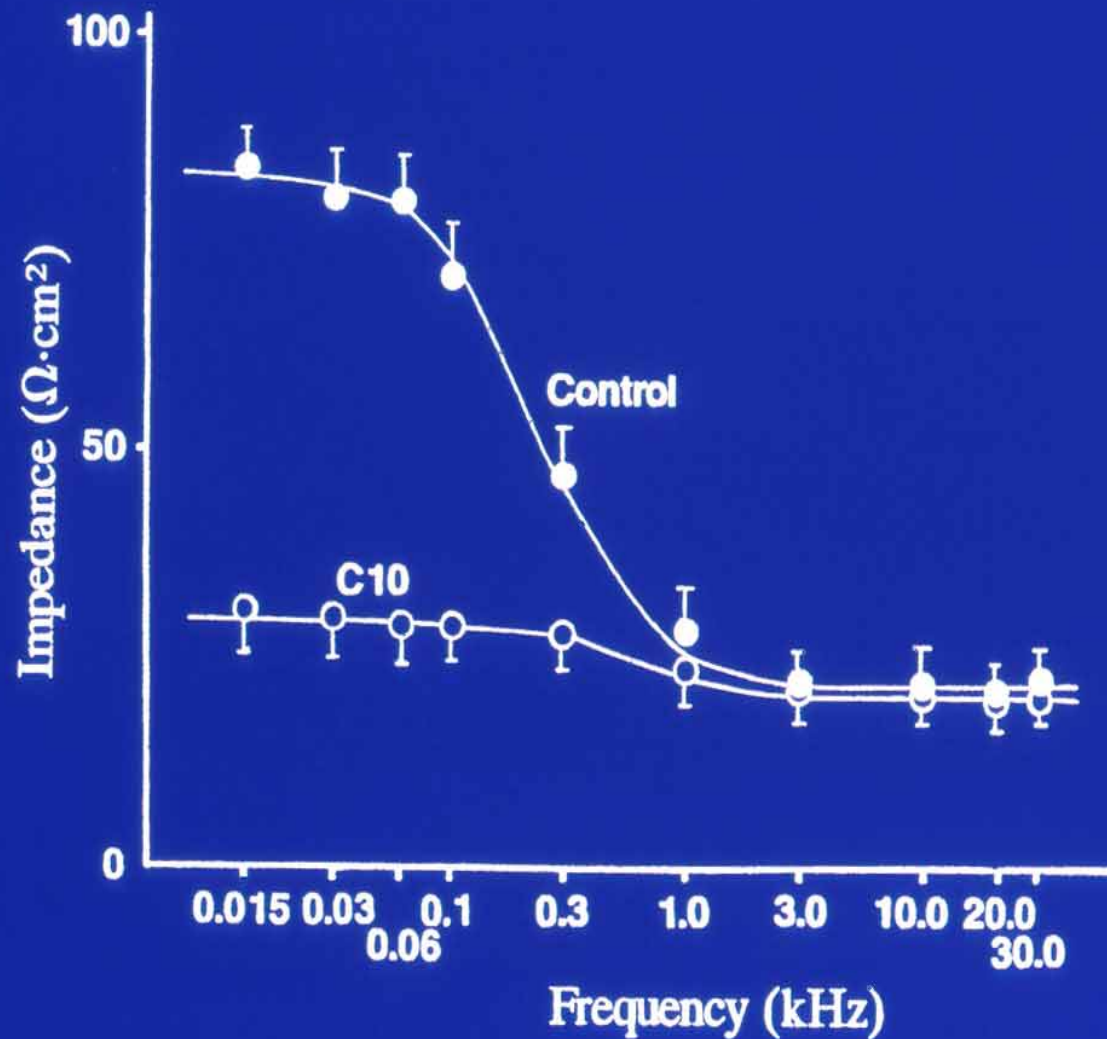
## Effects of Potential Difference( $\Delta PD$ ) on Permeability of CMZ Obtained by Voltage Clamp Technique



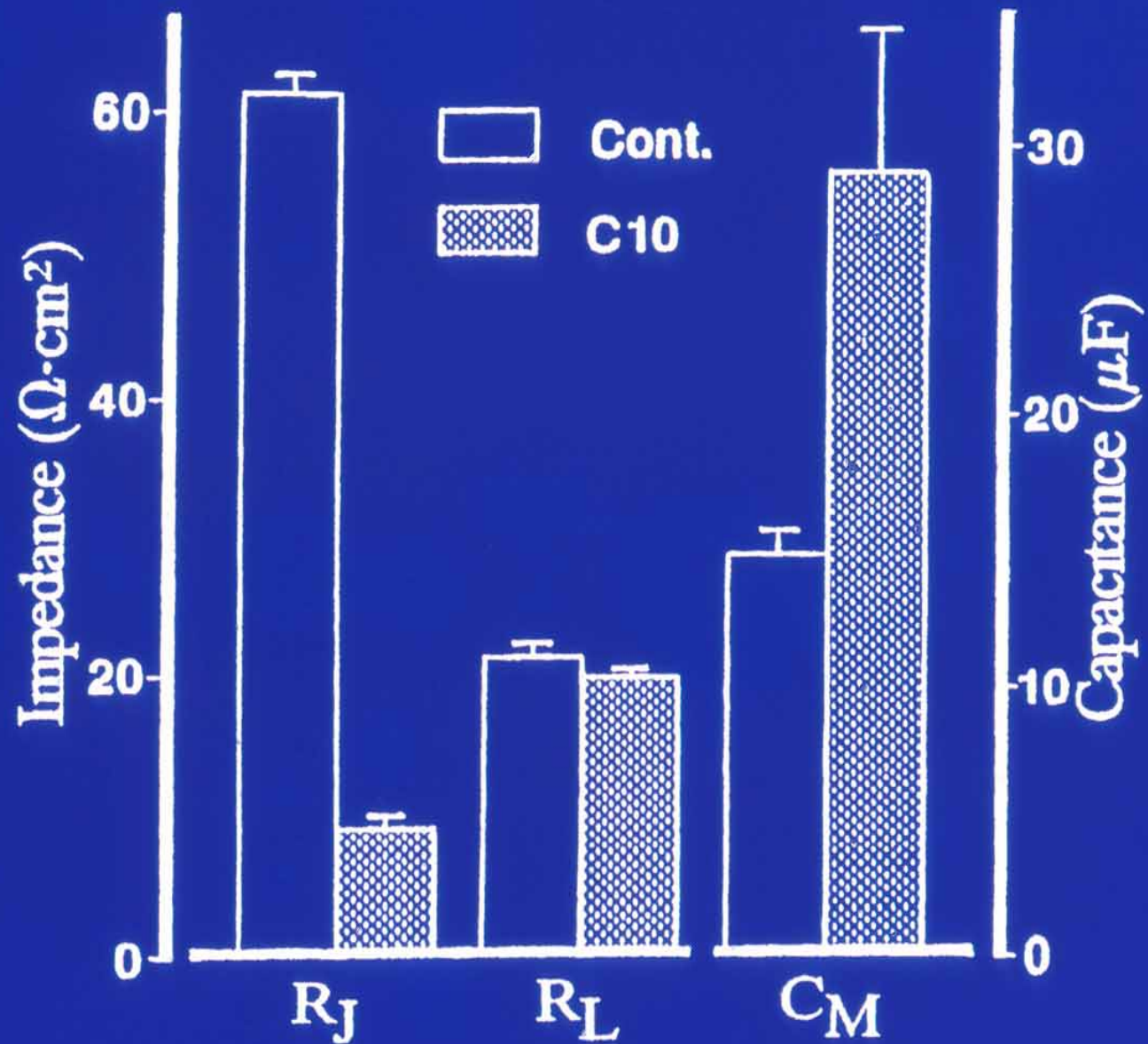
$$P_m = (P_m)_{\text{trans}} + {}_0(P_m)_{\text{para}} \cdot \xi$$

$$\xi = \exp(-Z \cdot F \cdot \Delta PD / 2RT)$$

**Steady-state impedances as a function of frequency  
in the presence of C10 and its absence (control)  
in the mucosal sides**



## Effect of C10 on Transepithelial Resistance and Capacitance



# 吸収促進剤の生理学的作用機構

- ・ Paracellular Routeへの作用機構

Tight Junctionの開口

- ・ 吸収促進剤

Caprate (C10)

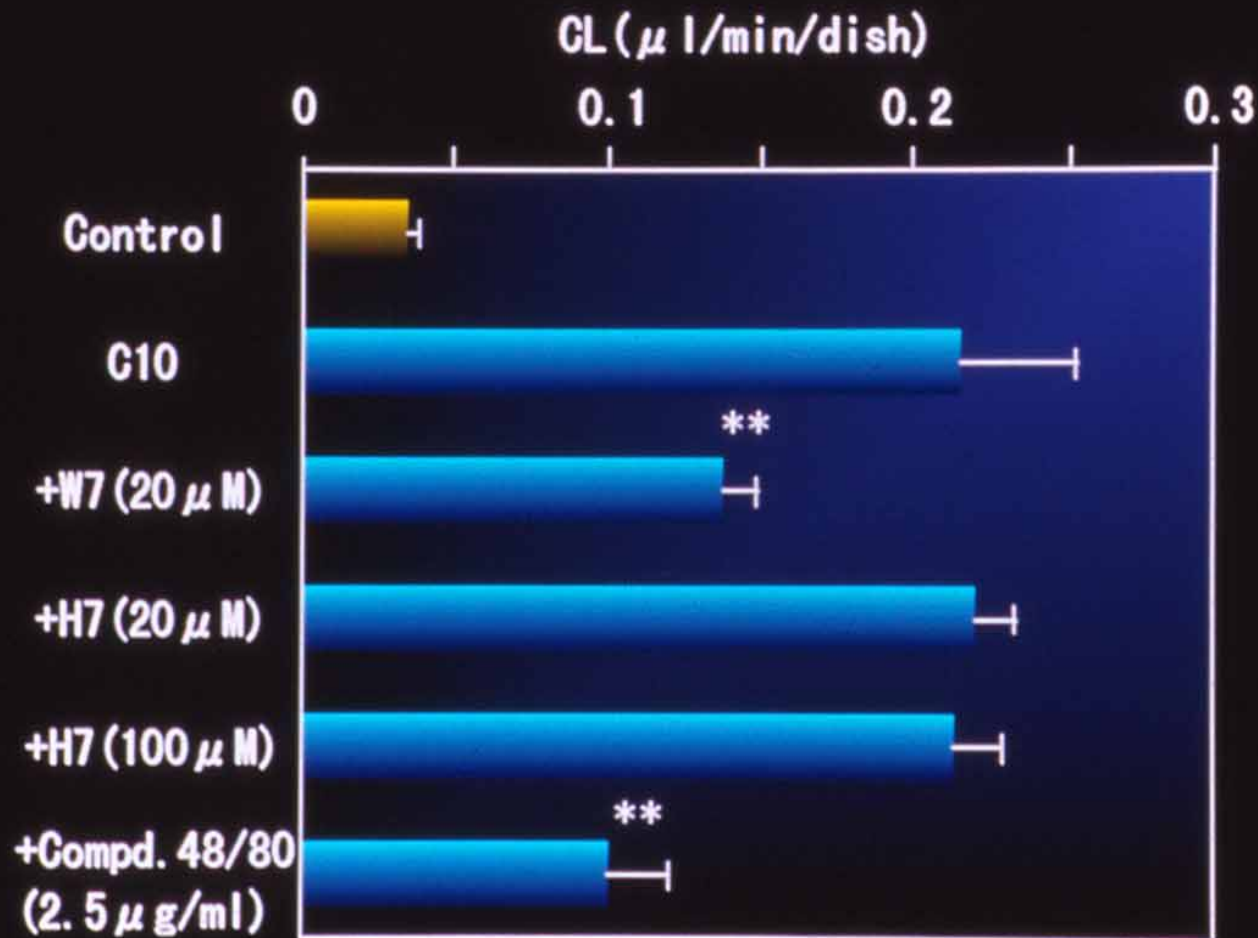
Decanoylcarnitine (DC)

Tartaric Acid (TA)

- ・ Caco-2細胞とラット腸管膜

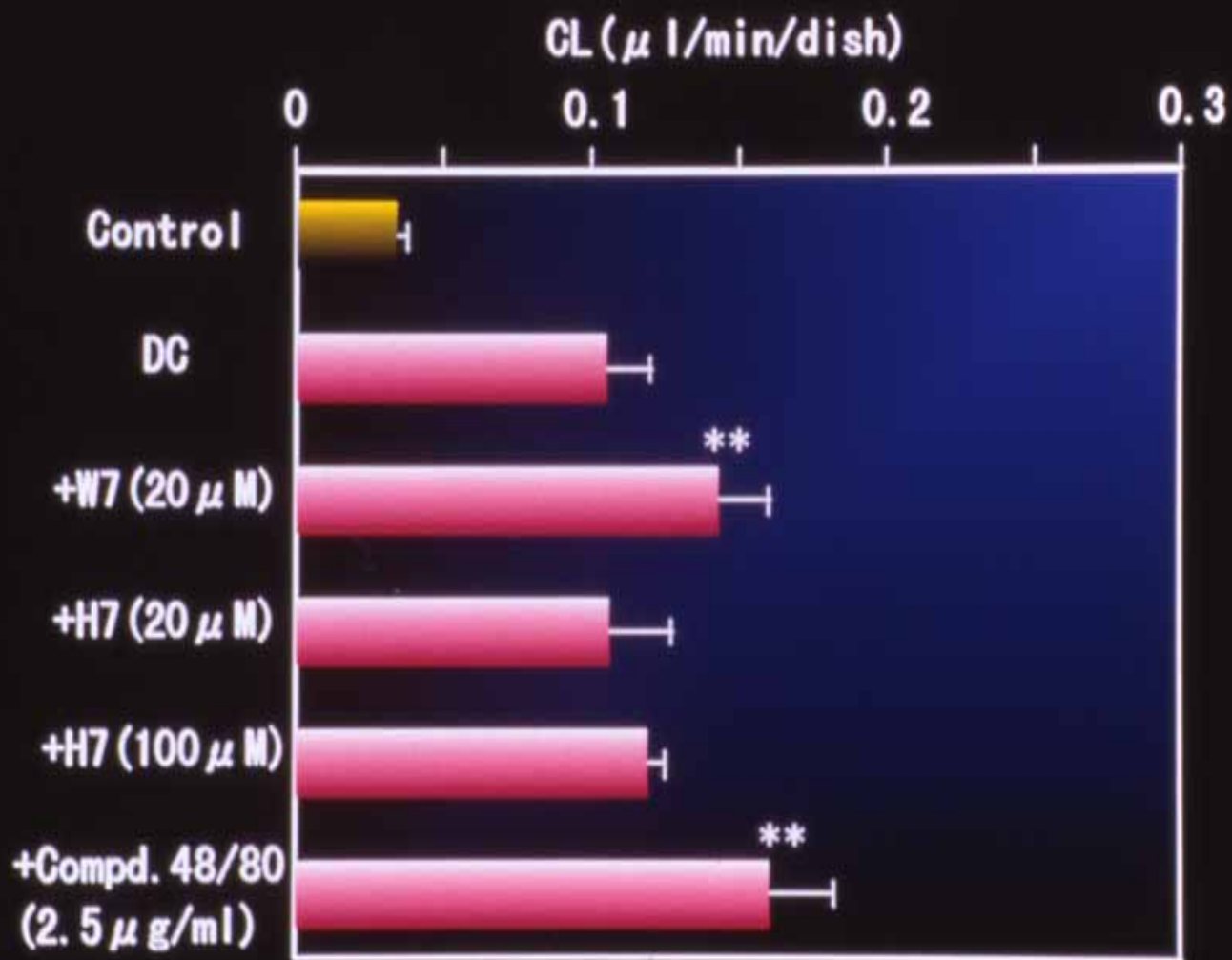


# Effects of W7, H7 and Compound 48/80 on Enhancing Action by C10 for Permeation Clearance (GL) of FD-4 in Gaco-2 Cells

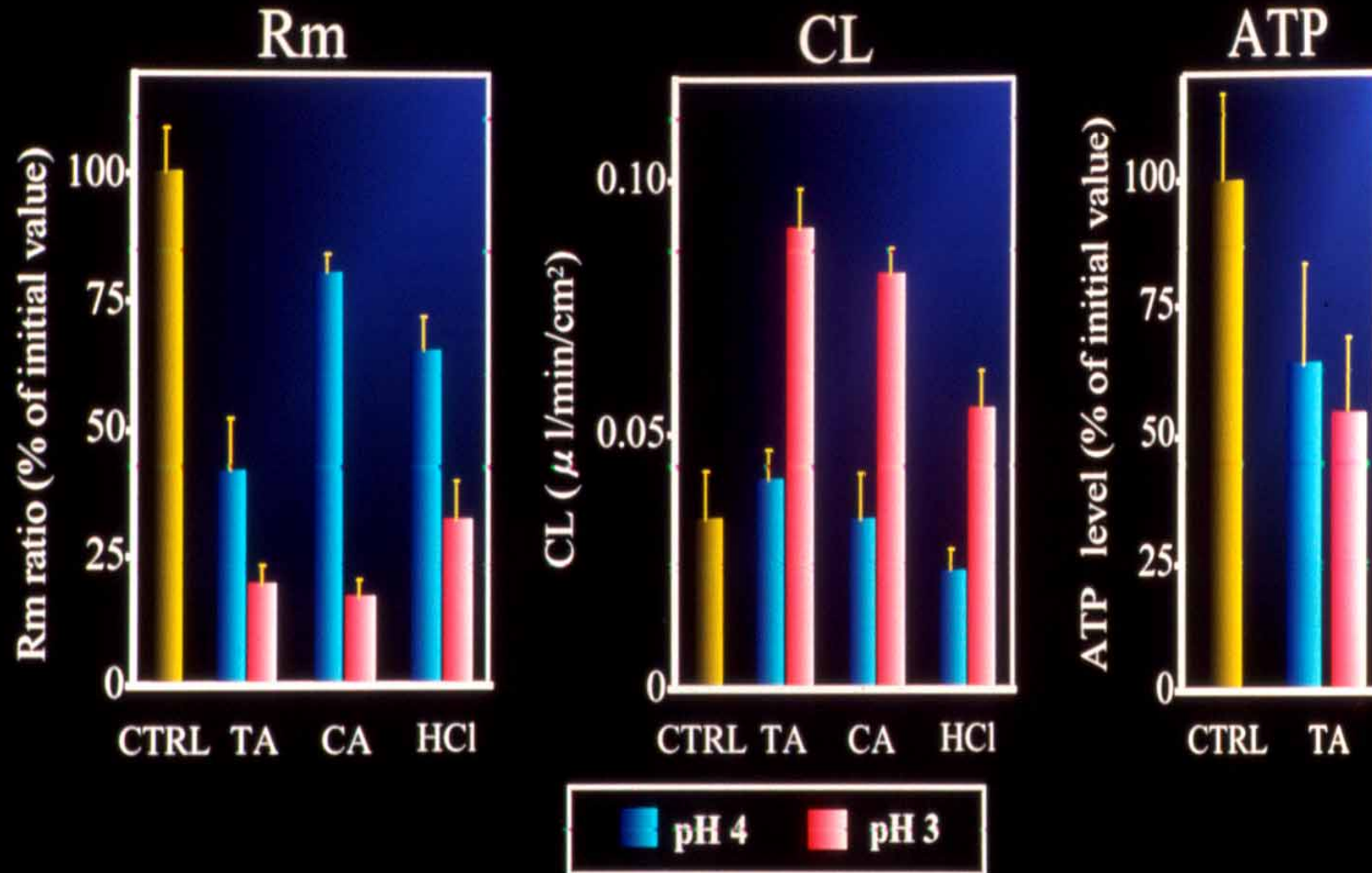


(Mean  $\pm$  S. E., \*\* $p$  < 0.01 vs the control value)

# Effects of W7, H7 and Compound 48/80 on Enhancing Action by DC for Permeation Clearance (GL) of FD-4 in Caco-2 Cells

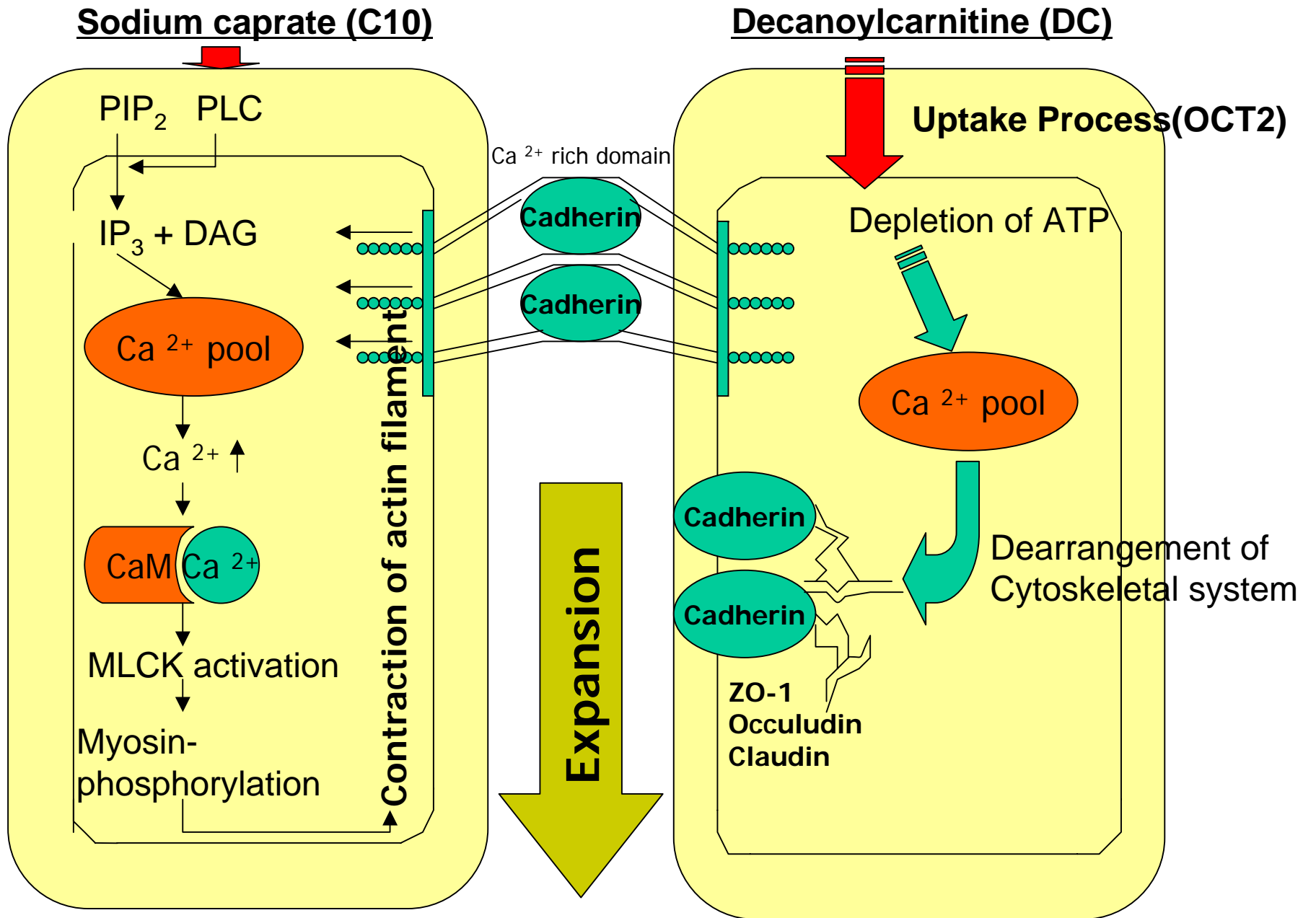


(Mean  $\pm$  S.E., \*\* $p$  < 0.01 vs the control value)

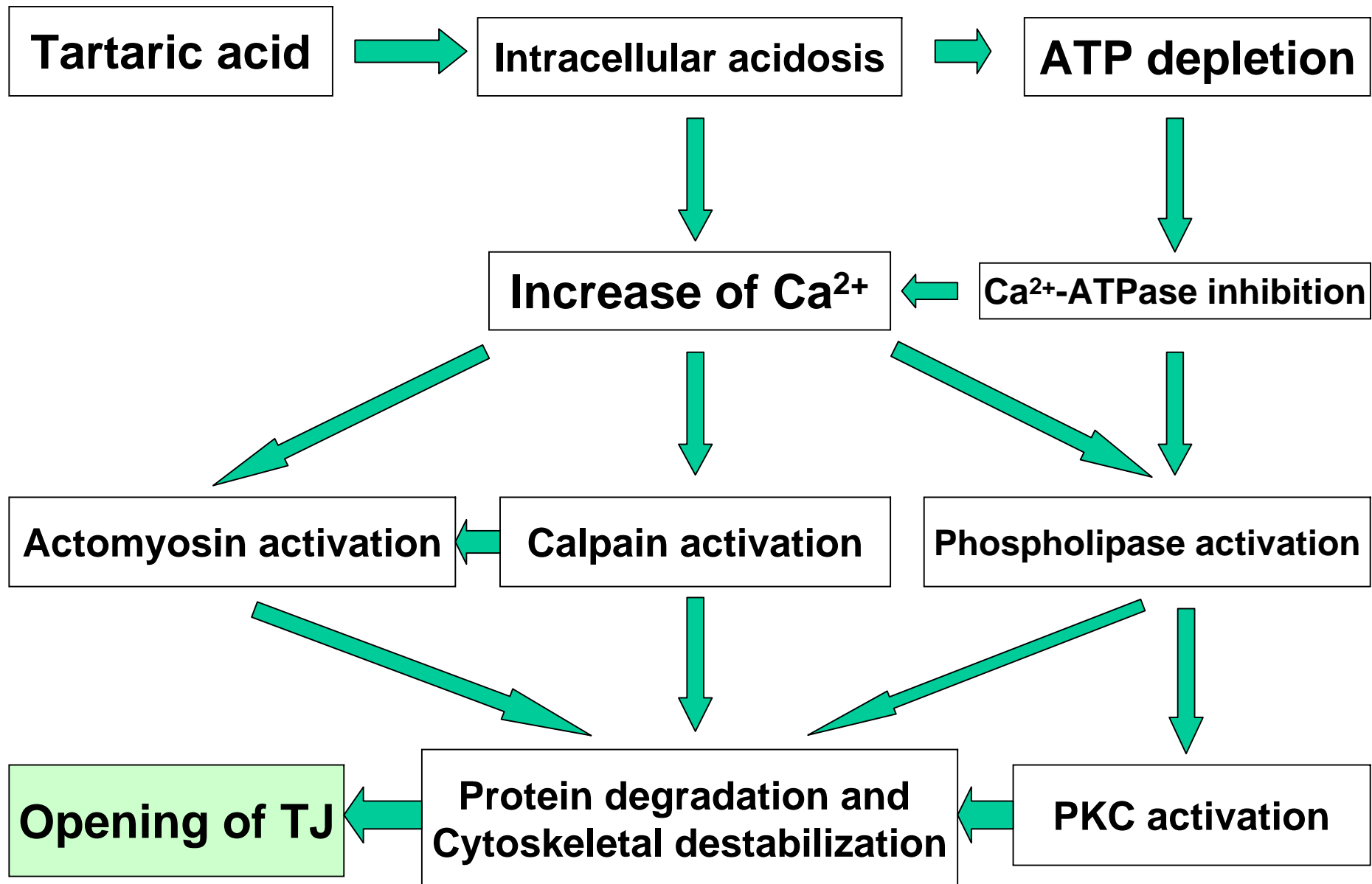


Effect of tartaric acid (TA), citric acid (CA) and HCl at pH 3 or pH 4 on Rm and CL of FD-4. (means  $\pm$  S.E., n=4)

# C10とDCのTJ開口機構



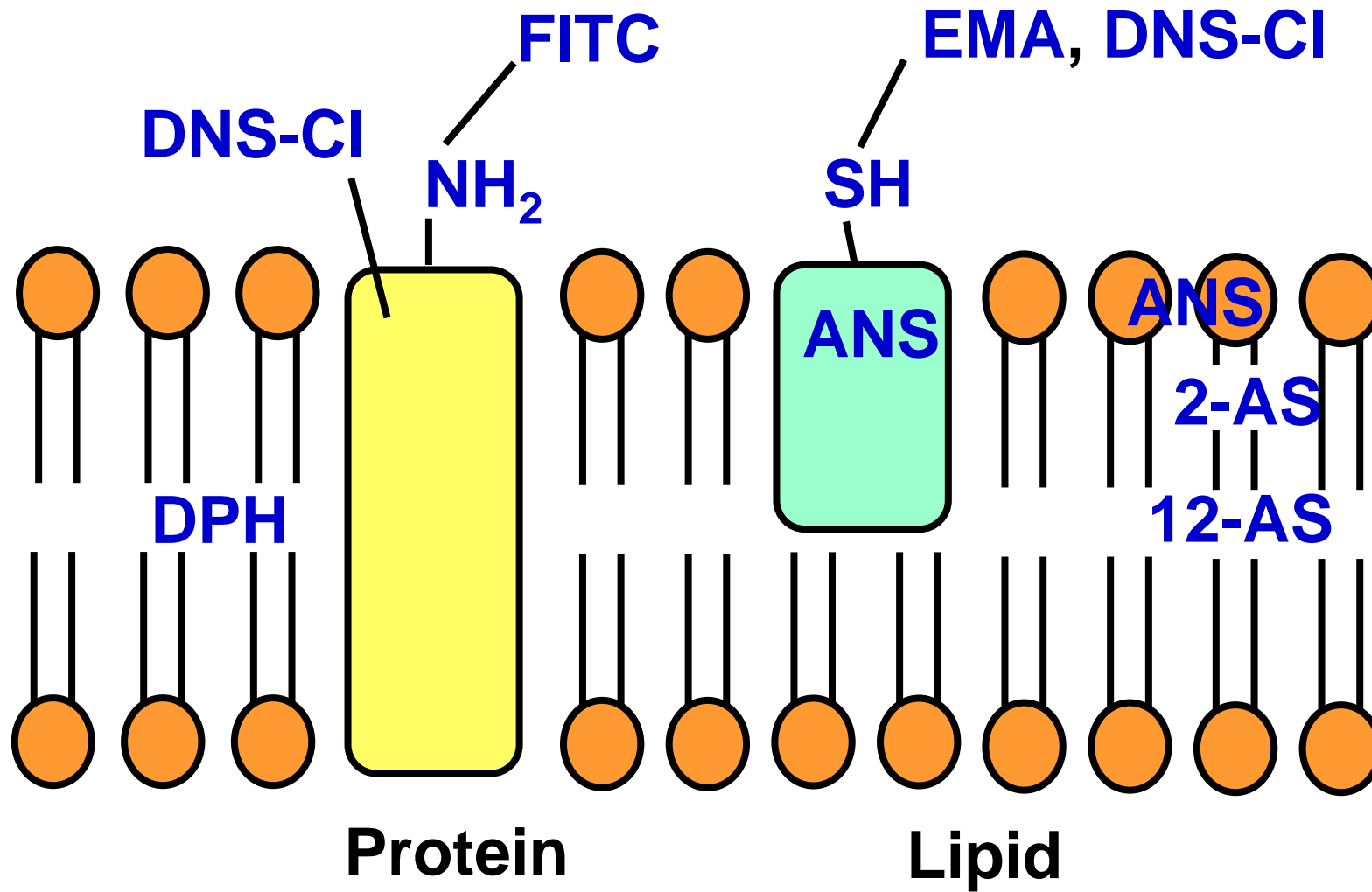
## 酒石酸 (Tartaric acid)のTJ開口機構



# 吸収促進剤の生理学的作用機構

- ・ Transcellular Routeの変化  
膜Perturbation
- ・ 吸収促進剤  
Caprate (C10)
- ・ B B Mを蛍光ラベル(膜タンパクと脂質部分)  
蛍光偏光度 (P value)測定  
膜Perturbation

# Sites Labelled by Fluorescent Probes



## Membrane Perturbation Induced by Caprate(C10)





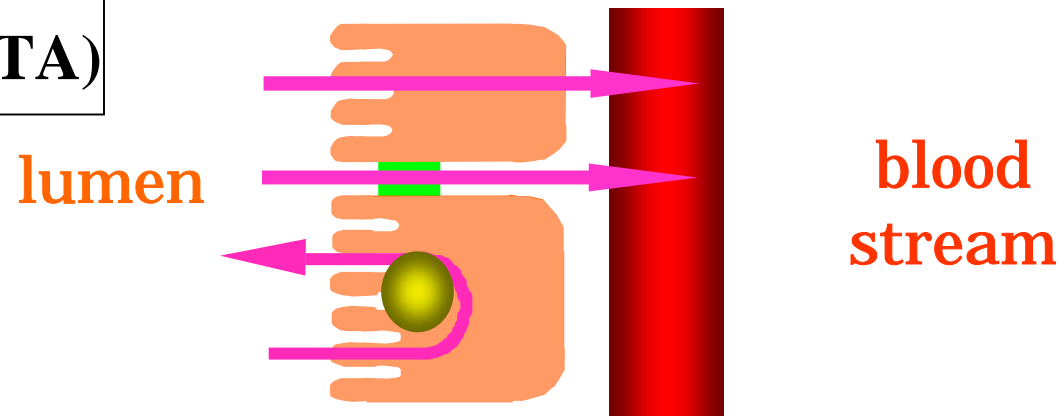
# 吸収促進剤と P-Glycoprotein (P-gp)

Paracellular Routeの変化 : Tight Junction (TJ) の開口

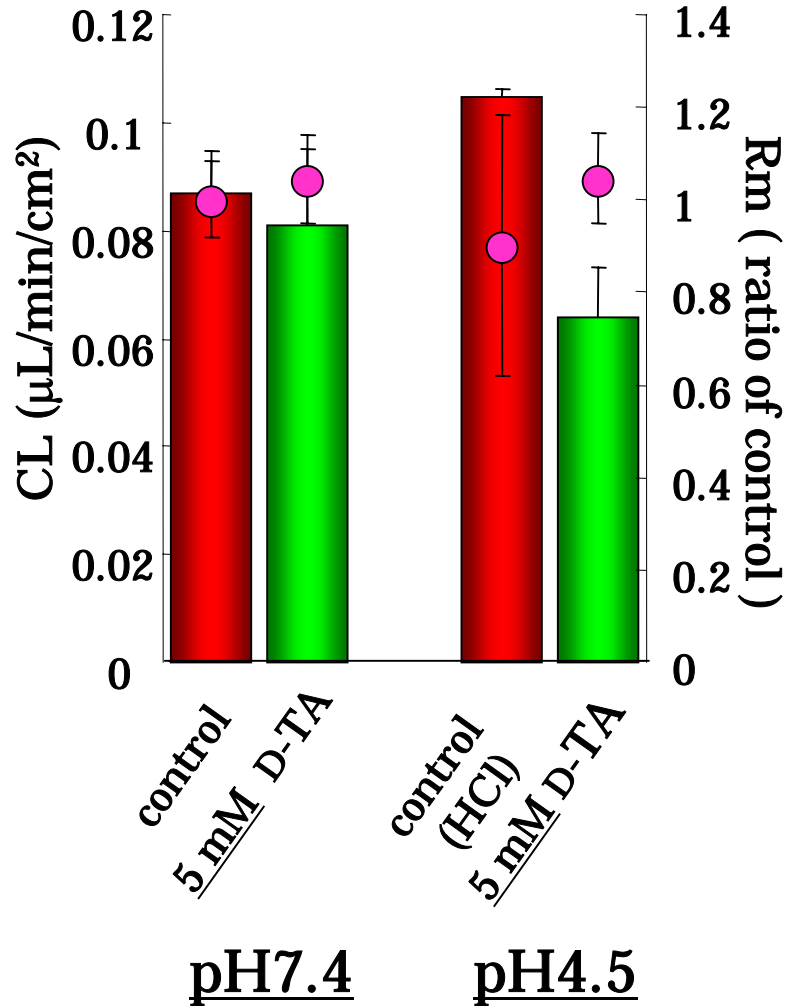
Transcellular Routeの変化 :

P-glycoprotein (P-gp) : Drug excretion pump function  
の変化

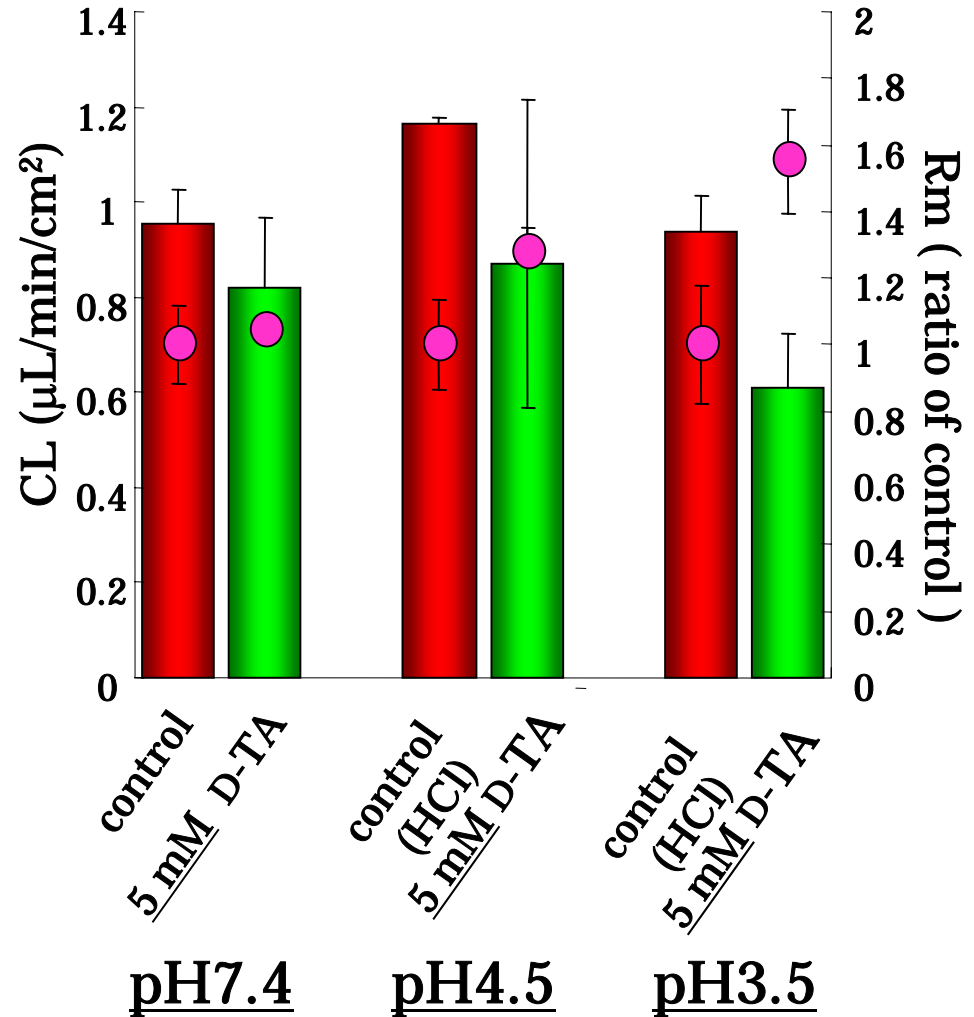
促進剤:  
Tartaric Acid (TA)



## Rat Colon



## Rabbit Colon

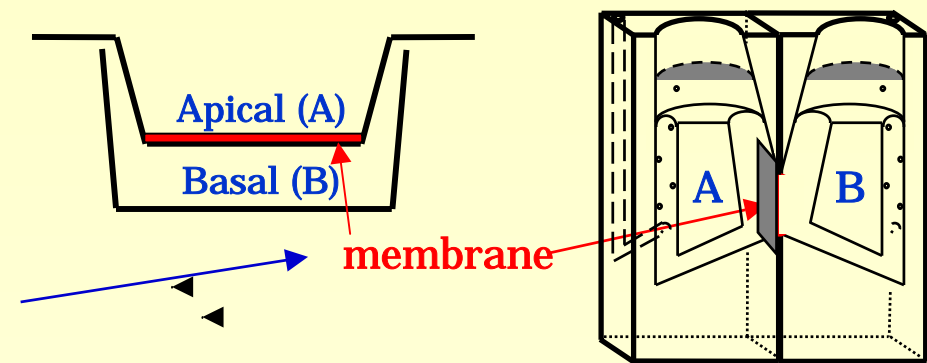


pH dependent effects of tartaric acid on permeation clearance (CL) of Rhodamine123 in the serosal (S) to mucosal (M) direction and Rm

# Tartaric Acid (TA) の作用機構

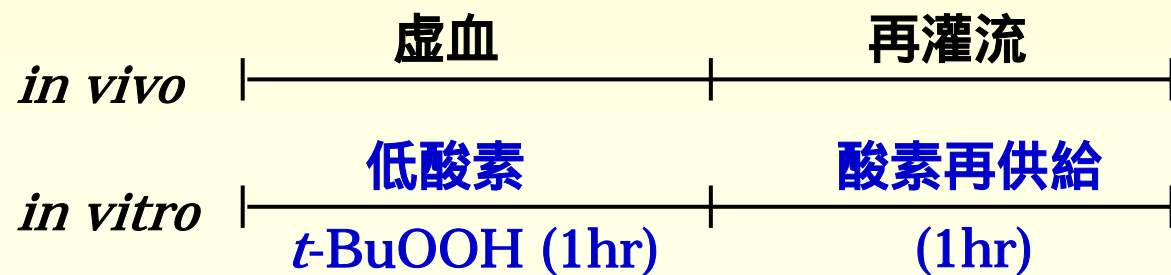
- ・高濃度(20mM)のTAはTight Junction開口作用を持つが、低濃度(5mM)のTAはP-gp機能の抑制を示した。このP-gpへの作用は、pH依存性を有しており、細胞内アシドーシスが関係している可能性が示された
- ・上記のP-gpへの作用は、他の促進剤ピロチオデカンにも見出された。

# 虚血再灌流障害モデル

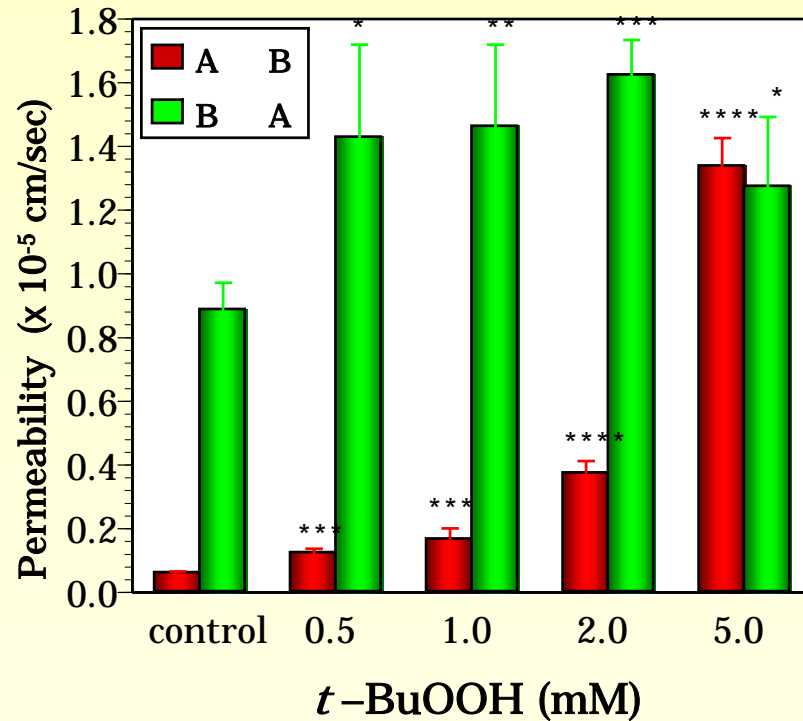
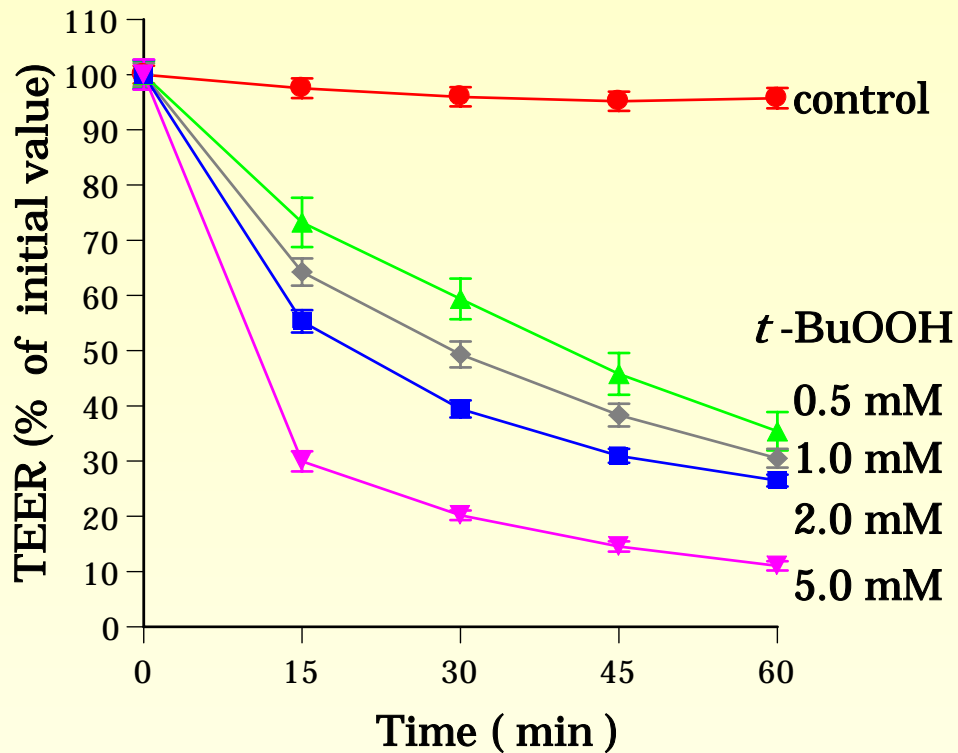


- ・ 細胞系 : Caco-2 cell monolayers
- ・ 評価系 : *in vitro* 拡散チャンバー
- ・ 脂質過酸化剤 : *tertiary*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH)

・ *in vitro* 障害モデル :



- ・ Paracellular route の評価 : Tight Junctionにおける膜抵抗 (TEER)
- ・ Transcellular route の評価 : P-gp 基質である Rhodamine123 の膜透過性

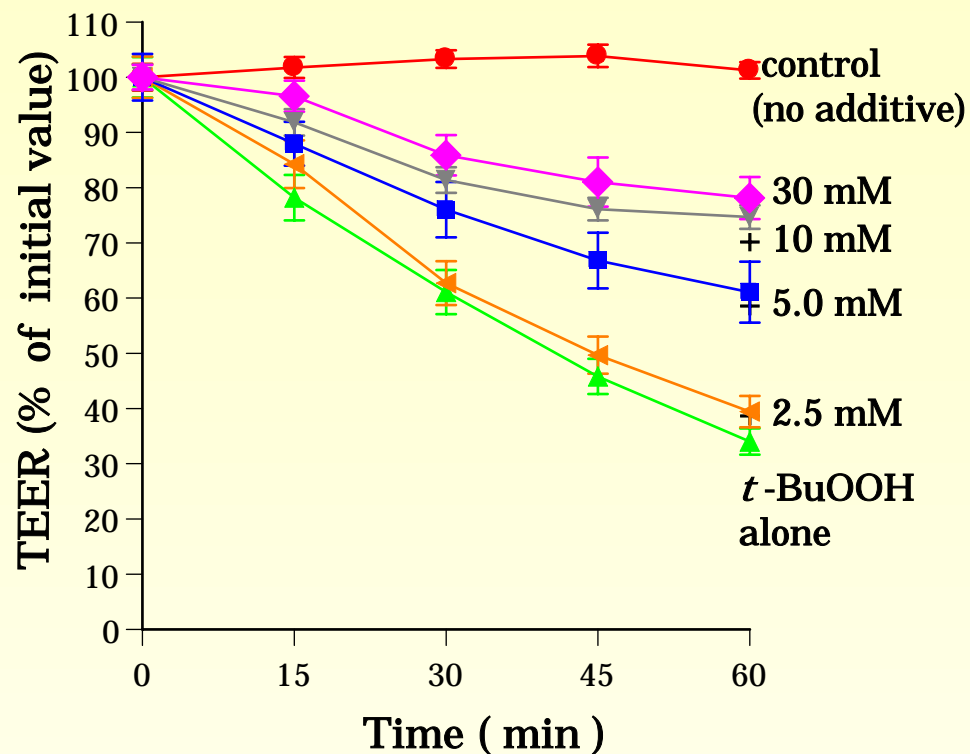


Effects of *t*-BuOOH on TEER (% of initial value) and permeability of Rhodamine 123 in Caco-2 cell monolayers.

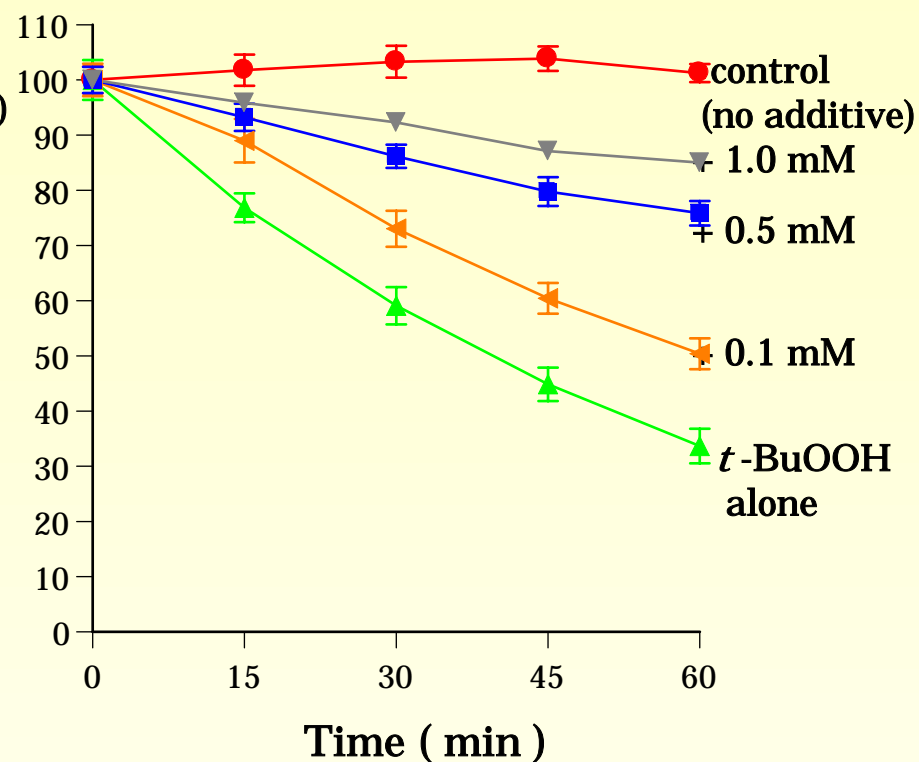
Results represent means and S.E.

\* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  compared with control conditions.

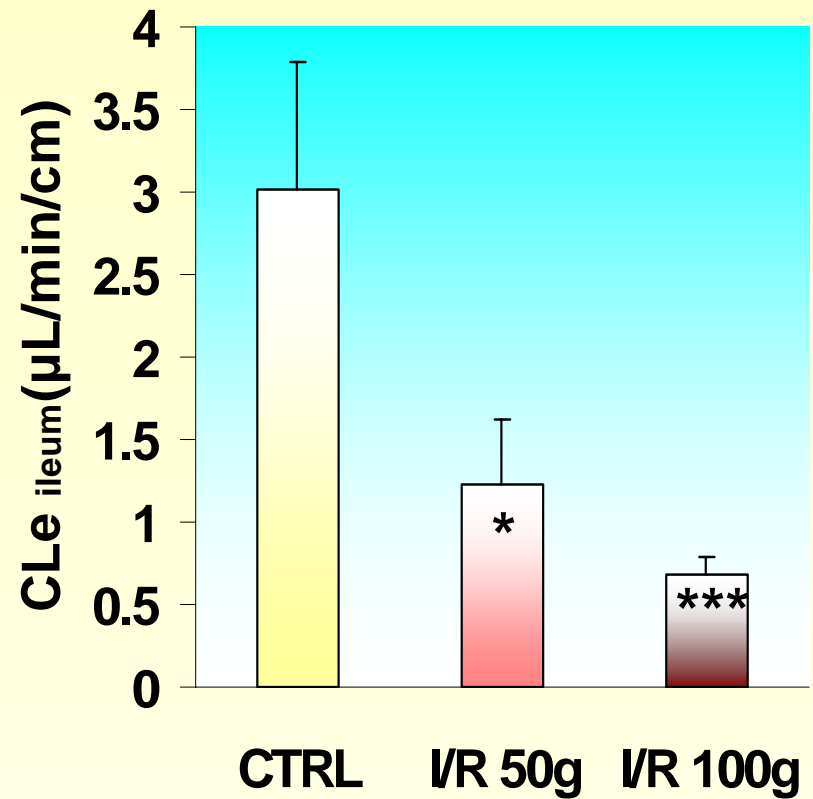
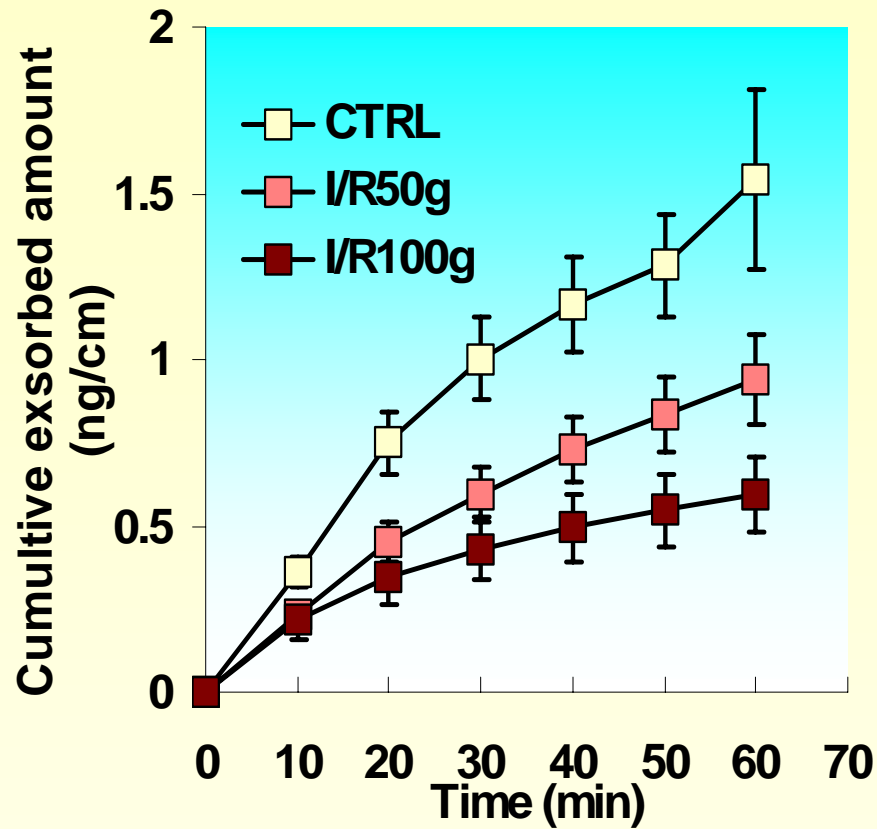
(A) Tiron ( $O_2$  - scavenger)



(B) DFO (iron ion chelater)



Effects of [Tiron \(A\)](#) and [DFO \(B\)](#) on TEER reduction caused by 0.5 mM *t*-BuOOH in Caco-2 cell monolayers.  
Results represent means and S.E.



## Effects of *in situ* ischemia-reperfusion treatment on exsorption of Rhodamine 123 in rat ileum

Data represents mean  $\pm$  S.E. (n=6~10 for each condition).

(\*p<0.05, \*\*\*<0.001 compared with control)

# 虚血再灌流障害のまとめ

## In vitro障害モデル

- ・脂質過酸化により、Tight Junctionが開口する
- ・上記機構には、スーパーオキシドや鉄イオンが関与している
- ・脂質過酸化の程度が増大すると、Tight Junction開口に加えて、P-Glycoprotein機能も低下する

## In situ障害モデル

- ・P-Glycoproteinの機能低下は、in situモデルにより、確認された



# 感染症モデル

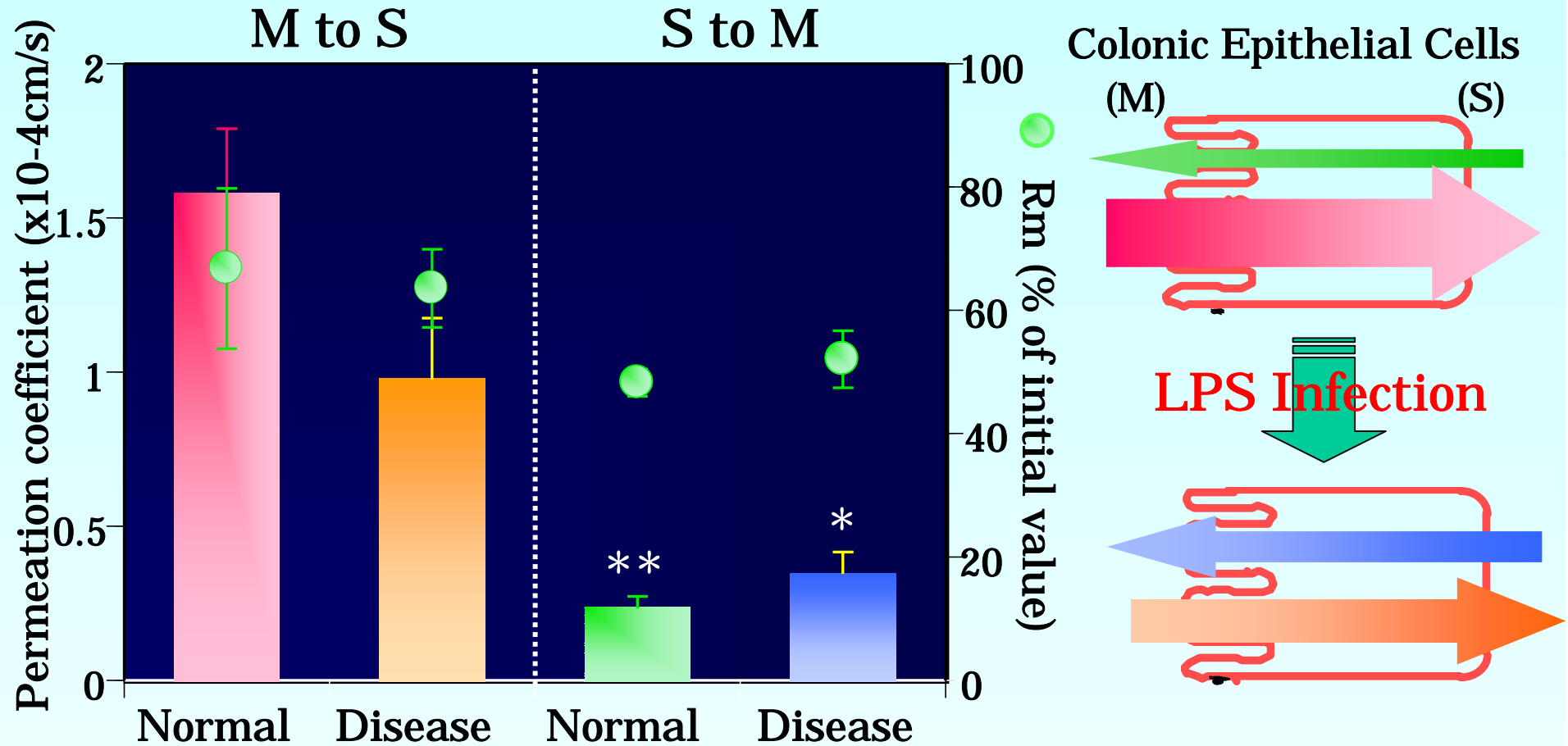
## 正常ラット結腸では

(背景) 水溶性高分子Lipopolysaccharide (LPS)は、Paracellular routeでわずかに透過可能 敗血症時には腸管由来のLPSが血中に出現 Paracellular route以外にも Transcellular routeを介した能動的な透過機構の存在の可能性

## 実際に得られた結果

- ・ 粘膜側および漿膜側からLPSの構造認識を介したFITC-LPSの取り込み過程が存在し、さらにCD14およびTLR4やScavenger receptorも関与している
- ・ 細胞内へ取り込まれたFITC-LPSはP-gpおよびmrpによって粘膜側へ排泄される

# FITC-LPS Permeability through Rat Colonic Epithelial Cells in Normal and Disease Conditions



Normal: Saline i.p.

Disease: Unlabeled-LPS (O111: B4) 10mg/kg i.p

4時間後に結腸部を摘出

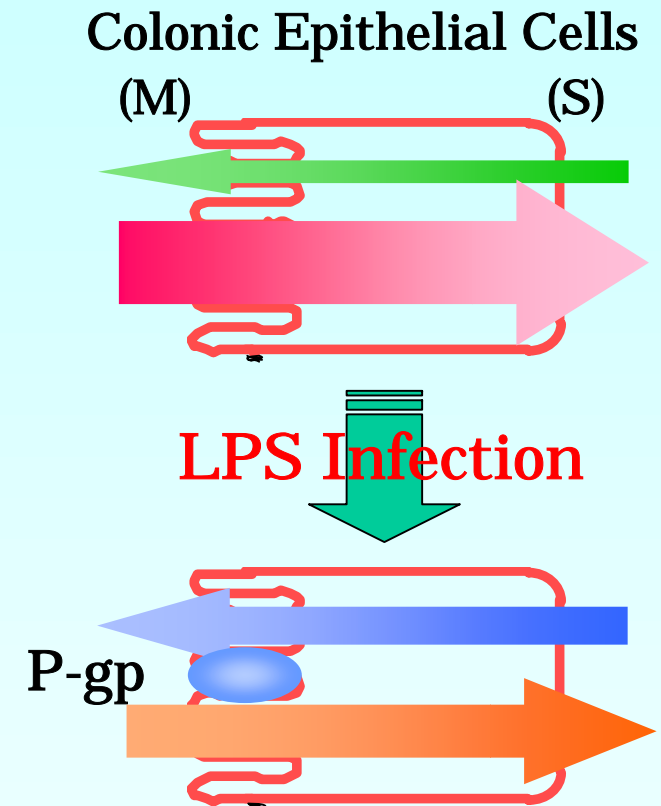
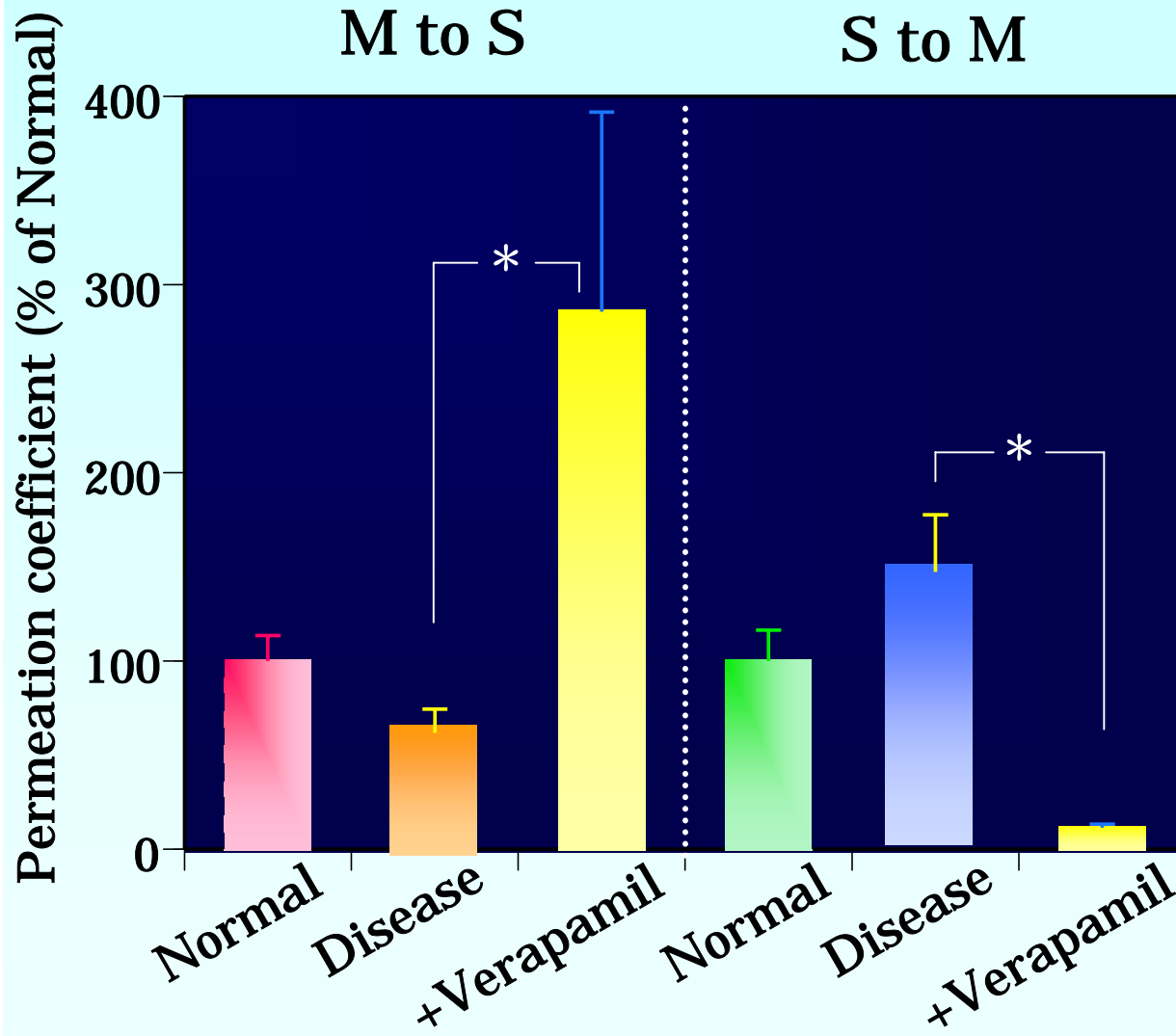
透過実験

FITC-LPS:  $0.5 \mu\text{g/mL}$

n: 7-15 \*P<0.01,

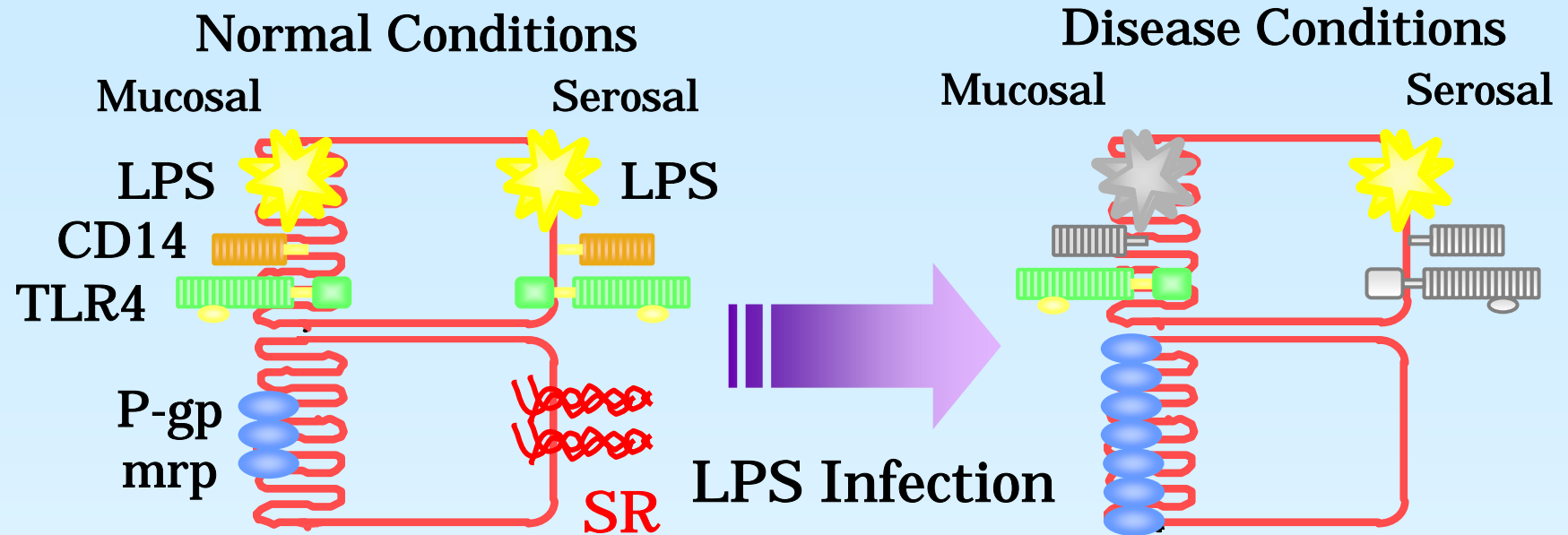
\*\*P<0.005 vs. Normal

# The Effect of Verapamil on the FITC-LPS Permeability through Rat Colonic Epithelial Cells in Disease Conditions



FITC-LPS: 0.5mg/mL  
Verapamil: 1mM  
n: 3-15, \*P<0.005

## 感染症におけるLPSの腸管膜透過のまとめ



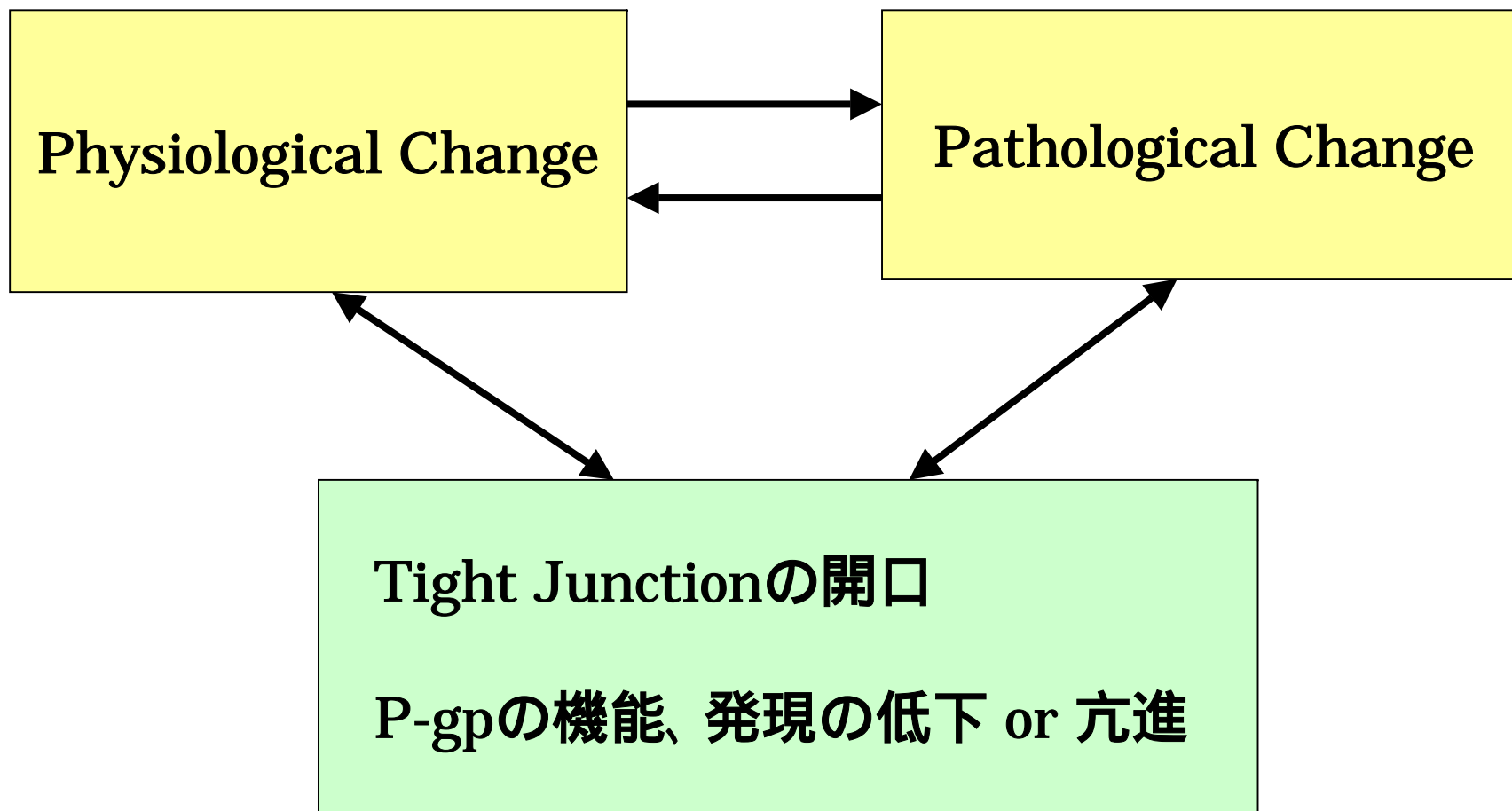
感染症時において、LPSの透過性は変動し、その機構には、Receptorによる取り込み機構の低下(粘膜側)、消失(漿膜側)および排泄型Transporterの発現レベルもしくは機能の亢進が関与する

腸管からのLPSの解毒・排泄を介した感染症の新たな治療および予防法の確立へと繋がる重要な基礎情報となり得る

## 吸収促進剤投与時および 病態時の吸収制御因子の変動

- **酒石酸:** P-gp機能低下 濃度 で TJの開口
- **虚血再灌流障害:** TJの開口 障害 で P-gp機能低下
- **感染症:** ReceptorおよびTransporterの発現  
レベルの変動 LPSの透過性変動
- **潰瘍性大腸炎:** TJの開口 炎症 でP-gp機能低下

# 薬物吸収を制御する腸管膜の変化機構



# 謝辞

・栗津荘司  
(東京薬科大学名誉教授)

\*\*\*\*\*

・東京薬科大学薬学部  
堀江利治(千葉大学教授)  
水間 俊(助教授)  
富田幹雄(講師)  
柳樂眞友子(助手)  
・東京理科大学薬学部  
芳賀 信(助教授)  
奥平和穂(東邦大学講師)  
海保房夫(講師)

\*\*\*\*\*

・東京薬科大学大学院生

・花野 学  
(東京大学名誉教授)

\*\*\*\*\*

## 電気生理学

・山下伸二  
(摂南大学教授)  
・高村喜代子  
(東京薬科大学名誉教授)  
・楠 文代  
(東京薬科大学教授)

・東京理科大学大学院生