

## 消化管吸収改善と予測に関する技術

大塚製薬株式会社  
三宅正晃



## 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、薬物の溶解性と共に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一つの方法ではあるが、薬理活性そのもの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<sup>1)</sup>、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及びセフォチゾキシム坐剤のみである<sup>2,3)</sup>。そこで筆者らは、このC10含有坐剤よりも、さらに安全で、且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(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事が知られており、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等、安全性は高いものと推察され、有望な添加剤と考え検討を進めた。

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. ラウリン酸ナトリウム(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

単に吸収促進剤と言っても様々な種類が存在する。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<sup>2~4)</sup>。またこれらの油脂は、肝・膵機能の障害

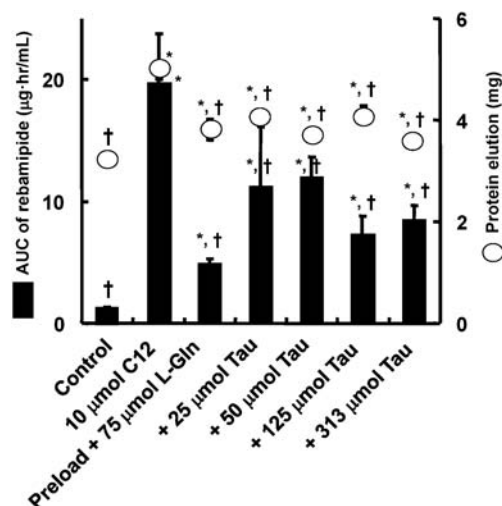


図1 C12による吸収改善効果とアミノ酸による粘膜保護作用(ラット大腸 Loop)

などによる胆汁やリ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<sup>5,6)</sup>、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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。次に、Biopharmaceutics Classification System (BCS)の Class IV に分類される Rebamipide (大塚製薬株式会社)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(図1)。これに対しアミノ酸としてタウリン(Tau)を併用、またはL-グルタミン(L-Gln)を前処理後併用することによって、吸収改善効果の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(図1)<sup>9)</sup>。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<sup>9)</sup>。

さらに、アミノ酸が有する粘膜保護効果についてその機構解明を行った。その結果、C12単独時に認められる細胞内カルシウムイオン[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>濃度上昇作用、及び炎症性メディエーターであるヒスタミン上昇作用を有意に抑制すること(図2)、またL-Glnにおいては、酸化ストレスによる細胞内タンパク質変性を抑制する Heat Shock Protein 70 (HSP70)の産生を促進することが明らかとなった(図2)<sup>8)</sup>。

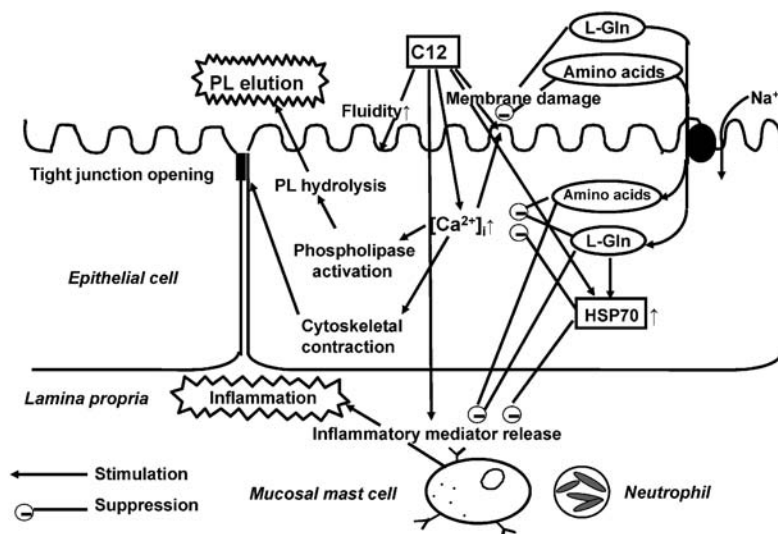


図2 アミノ酸による粘膜保護機構

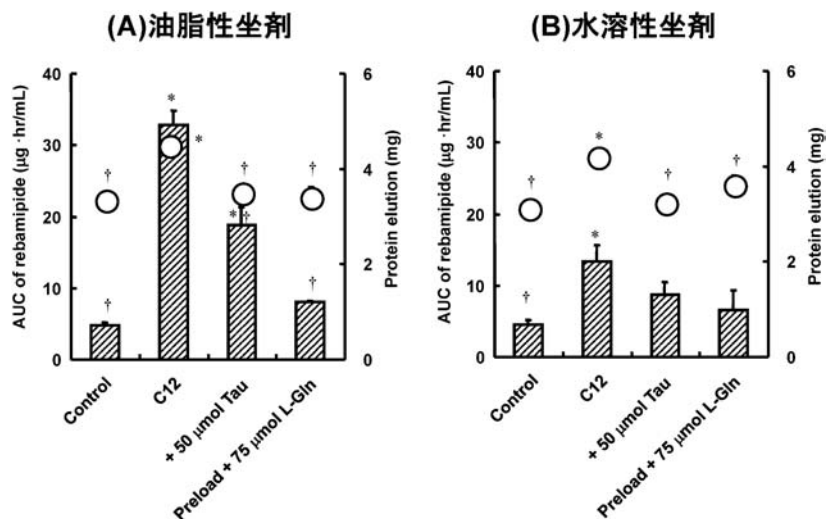


図3 坐剤製剤化によるC12の吸収改善効果とアミノ酸による粘膜保護作用(ラット)

### 3. アミノ酸含有坐剤製剤の検討

次に、上記C12とアミノ酸を含有した製剤処方の実用化を目指すため坐剤を調製し、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倍と大きかったことから(図

3)<sup>10</sup>)、以後は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(図3)<sup>10</sup>)。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<sup>10)</sup>。

ウサギ用坐剤の作製は、ヒトへの応用を念頭に、坐剤のスケールアップを行った。市販されているC10坐剤との比較を行ったところ、C12 (20 mg)-Tau (30 mg)を含む油脂性坐剤は、C10 (25 mg含有)坐剤よりも、またC12 (10 mg)-Tau (30 mg)を含む油脂性坐剤は、C10 (15 mg含有)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、安全性の高い吸収改善坐剤製剤開発の可能性が示唆された<sup>11)</sup>。

#### 4. 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(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<sup>12,13)</sup>。また、DNA, RNA, リン脂質等の安定化に関与すること<sup>14)</sup>、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<sup>15)</sup>。さらに、生体内でアミノ酸から生合成され<sup>14)</sup>、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。そこで著者は、PAの中でもスペルミン(SPM)及びスペルミジン(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、ラットに経口投与と試験を実施した。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(図4)。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(図4)<sup>16)</sup>。また本稿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。安全面についても検討を行ったところ、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時間後にける消化管粘膜について病理評価を行った。その結果、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、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<sup>16)</sup>。

#### 5. 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、新規経口吸収改善製剤としての可能性が示唆された(図5)<sup>17)</sup>。

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った理由として、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

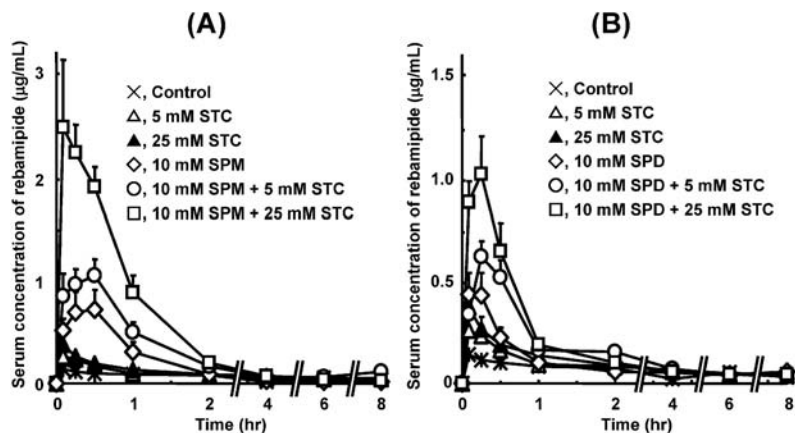


図4 ポリアミン及び胆汁酸併用時における吸収改善効果(ラット)

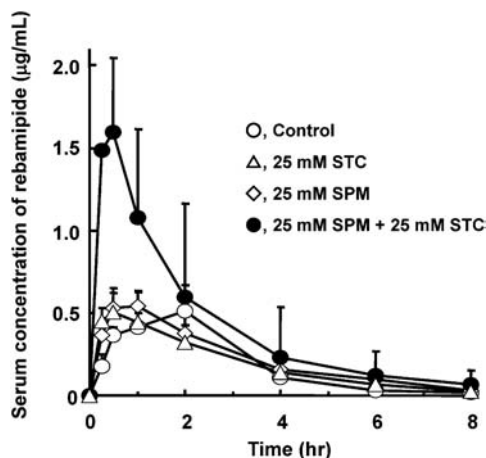


図5 ポリアミンを用いた吸収改善効果に及ぼす胆汁酸の影響 (ビーグル犬)

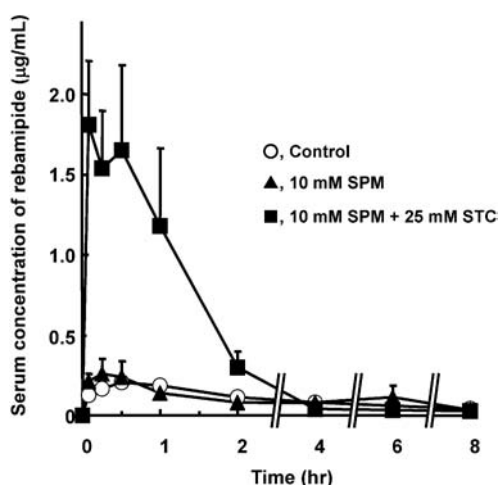


図6 ポリアミンを用いた吸収改善効果に及ぼす胆汁酸の影響 (ラット)

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(図6)<sup>17)</sup>。吸収改善機構としては、リバーシブルな Tight Junction 開口による paracellular route の寄与、また STC 併用による細胞膜流動性増加による transcellular route の寄与も関与していることを明らかにしている<sup>18)</sup>。

## 6. ヒト組織を用いた新規 *in-vitro* 薬物透過性試験法の開発

筆者らは、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へ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。使用したヒト組織は、潰瘍性大腸炎患者(UC)の大腸部、も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、吸収性の異なるフルオレセインデキストラン4000(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)について検討を行った。その結果、従来から膜透過性評価時の指標とされている  $P_{app}$  値を用いた評価では、 $FD-4 < \text{メトプロロール} < \text{アテノロール}$ 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(図7A)<sup>19)</sup>。それ故、筆者らは透過した薬物量を投与量で除した値( $X_{corr}$ )に加えて、組織内に蓄積している薬物量を投与量で除した値( $T_{corr}$ )、さらにはドナー側の薬物溶解度の経時的な変化を考慮に入れた評価法(Transport Index, TI (%))にて膜透過性の比較を行うことで(図8)、 $FD-4 < \text{アテノロール} <$

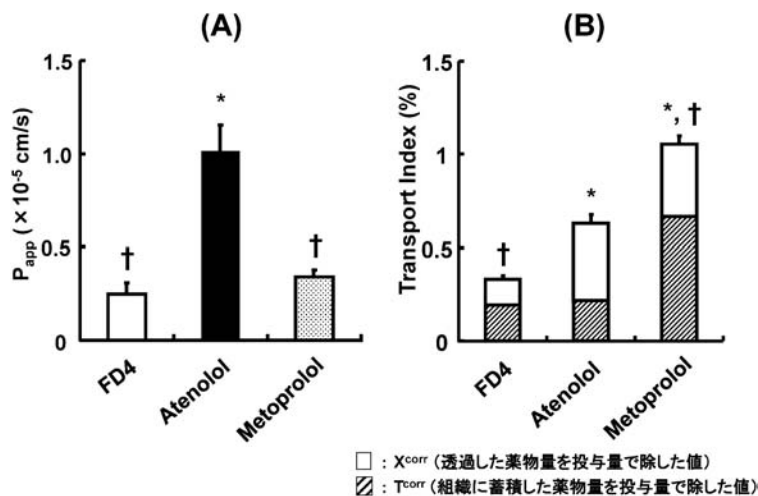


図7 ヒト組織を用いた際の膜透過率と Transport Index (TI)の比較

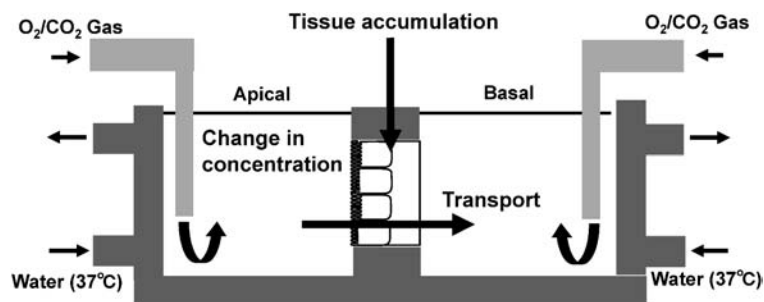


図8 Mini-Ussing チャンバーを用いた新規吸収評価系の概略図

メトプロロールの関係を再現することができた(図7B).  
評価に用いた式を下記する.

$$TI = X_{\text{corr}} + T_{\text{corr}}$$

この式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<sup>20)</sup>.

### 7. 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.

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

fは係数,  $\alpha$ 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MULTI<sup>21)</sup>にて計算され, fは $2.347 \pm 0.230$ ,  $\alpha$ は $0.314 \pm 0.002$ に確定した. 図9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, 上記予測式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<sup>19)</sup>. さらに, 上記予測式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プトロール, 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%, アセプトロールで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%<sup>22)</sup>, アセプトロール70%<sup>22)</sup>, シロスタゾール100%<sup>23,24)</sup>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.

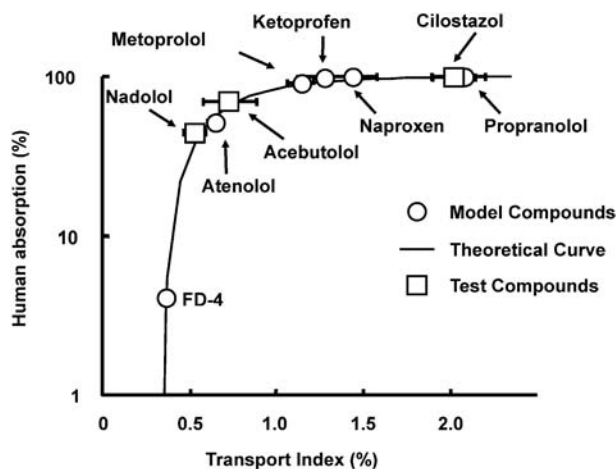


図9 Transport Index (TI)とヒト経口吸収率との相関

### 8. 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を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. これらの結果が, 今後の新薬開発に少なからず貢献できれば幸いである.

### 参考文献

- 1) Swenson, E. S. and Curatolo, W.: Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides, and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **8**: 39-92 (1992).
- 2) Lindmark, T., Kimura, Y. and Artursson, P.: Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**: 362-369 (1998).
- 3) Lindmark, T., Söderholm, J. D., Olaison, G., Alván, G.,

- Ocklind, G. and Artursson, P.: Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate. *Pharm. Res.*, **14**: 930–935 (1997).
- 4) Higaki, K., Takeuchi, N., Kato, M., Hashida, M. and Sezaki, H.: Effect of medium-chain glycerides on the intestinal absorption of phenol red: Studies on the mechanisms of the promoting effect. *J. Pharm. Sci.*, **79**: 334–338 (1990).
  - 5) Naitoh, M.: Characteristics and therapeutic application of MCT. *Clin. Nutr.*, **37**: 635–642 (1970).
  - 6) Mashima, Y.: Present situation of nutrition via tubing for patients. *Clin Nutr.*, **54**: 214–224 (1979).
  - 7) Higaki, K., Yata, T., Sone, M., Ogawara, K. and Kimura, T.: Estimation of absorption enhancement by medium-chain fatty acid in rat large intestine. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **109**: 231–240 (2001).
  - 8) Endo, Y., Hanada, K., Miyake, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Mechanisms of cytoprotective effect of amino acids on local toxicity caused by sodium laurate, a drug absorption enhancer, in intestinal epithelium. *J. Pharm. Sci.*, **91**: 730–743 (2002).
  - 9) Miyake, M., Oka, Y., Minami, T., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Combinatorial use of sodium laurate with taurine or L-glutamine enhances colonic absorption of rebamipide, poorly absorbable antiulcer drug, without any serious histopathological mucosal damages. *J. Pharm. Sci.*, **92**: 911–921 (2003).
  - 10) Miyake, M., Kamada, N., Oka, Y., Mukai, T., Minami, T., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Development of suppository formulation safely improving rectal absorption of rebamipide, a poorly absorbable drug, by utilizing sodium laurate and taurine. *J. Control. Release*, **99**: 63–71 (2004).
  - 11) Miyake, M., Minami, T., Oka, Y., Kamada, N., Yamazaki, H., Kato, Y., Mukai, T., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Optimization of suppository preparation containing sodium laurate and taurine that can safely improve rectal absorption of rebamipide. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**: 330–335 (2006).
  - 12) Russel, D. H. and Mcvicker, T. A.: Polyamines in the developing rat and in supportive tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **259**: 247–258 (1972).
  - 13) McCormack, S. A. and Johnson, L. R.: Role of polyamines in gastrointestinal mucosal growth. *Am. J. Physiol.*, **260**: G795–806 (1991).
  - 14) Zhang, M., Wang, H. and Tracey, K. J.: Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit. Care Med.*, **28S**: N60–N66 (2000).
  - 15) Zhang, M., Borovikova, L. V., Wang, H., Metz, C. and Tracey, K. J.: Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol. Med.*, **5**: 595–605 (1999).
  - 16) Miyake, M., Minami, T., Hirota, M., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Novel oral formulation safely improving intestinal absorption of poorly absorbable drugs: utilization of polyamines and bile acids. *J. Control. Release*, **111**: 27–34 (2006).
  - 17) Miyake, M., Minami, T., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Importance of bile acids for novel oral absorption system containing polyamines to improve intestinal absorption. *J. Control. Release*, **115**: 130–133 (2006).
  - 18) Mukaizawa, F., Taniguchi, K., Miyake, M., Ogawara, K., Odomi, M., Higaki, K. and Kimura, T.: Novel oral absorption system containing polyamines and bile salts enhances drug transport via both transcellular and paracellular pathways across Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, **367**: 103–108 (2009).
  - 19) Fagerholm, U., Johansson, M. and Lennernäs, H.: Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm. Res.*, **13**: 1336–1342 (1996).
  - 20) 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. and Hibi, T.: Establishment of novel prediction system of intestinal absorption in humans using human intestinal tissues. *J. Pharm. Sci.*, **102**: 2564–2571 (2013).
  - 21) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Tanaka, H. and Uno, T.: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.*, **4**: 879–885 (1981).
  - 22) Balimane, P. V., Han, Y. H. and Chong, S.: Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J.*, **8**: E1–E13 (2006).
  - 23) Kamada, N., Yamada, K., Odomi, M., Mukai, T., Nishibayashi, T., Ogawara, K., Kimura, T. and Higaki, K.: Sex differences in pharmacokinetics of cilostazol in rats. *Xenobiotica*, **41**: 903–913 (2011).
  - 24) Toyobuku, H., Tamai, I., Ueno, K. and Tsuji, A.: Limited influence of P-glycoprotein on small-intestinal absorption of Cilostazol, a high absorptive permeability drug. *J. Pharm. Sci.*, **92**: 2249–2259 (2003).