

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06658

研究課題名(和文) 脂質分散製剤からの薬物経口吸収性を予測するための新規in vitro試験法の開発

研究課題名(英文) Development of new in vitro digestion to predict oral absorption of drugs from lipid based formulations

研究代表者

田中 佑典 (Tanaka, Yusuke)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：10435068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、膜表面積/水分量(S/V)比を反映させたin vitro消化-in situ吸収モデルを構築し、LBFからのシンナリジン(CNZ)の経口吸収性予測を試みた。また、透析膜を装着したin vitro消化-膜透過モデルを用い、予測精度の比較を行った。in vitro消化-膜透過試験により得られたCNZの透過率はin vivo経口AUC(AUCoral)と関連しなかったが、in vitro消化-in situ吸収モデルにより評価したAUCloopとAUCoralの間には良好な相関が得られた。従って、実際のS/V比をモデルに反映させることは吸収性予測に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質分散製剤(LBF)は薬物の溶解性を改善する手法として極めて有用である。一方、LBFはその有用性が実証されているにもかかわらず、その市販医薬品に占める割合はごくわずかである。これは、LBFからの薬物吸収機構が十分に解明されておらず、消化管吸収性改善効果の予測が困難なため、可溶化技術としてLBFを選択しにくいことが原因である。本課題では実際の薬物吸収速度を再現したLBFからの薬物吸収性評価法を構築した。本研究により、LBF処方最適化が容易となり、難水溶性化合物の経口剤開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish and test an in vitro digestion-in situ absorption model that mimic in vivo drug flux by employing physiologically relevant value of membrane surface area (S)/volume (V) ratio for accurate prediction of performance of lipid-based formulations. A simultaneous in vitro digestion-permeation experiment was also performed using a side-by-side diffusion cell with a dialysis membrane having a low S/V value for comparison purpose. Cinarrizine (CNZ) was selected as a model for poorly water-soluble drug. In vitro drug fluxes across dialysis membrane differed depending on formulations investigated. The obtained in vitro data did not correlate with in vivo oral AUCs. On the other hand, new model successfully predicted in vivo oral absorption of CNZ. This study demonstrated the importance of mimicking the in vivo drug absorption rate in the predictive model.

研究分野：薬剤学

キーワード：消化管吸収 脂質製剤 過飽和溶解 経口剤 吸収予測

## 1. 研究開始当初の背景

現在の経口剤開発において、製薬企業で新規に合成される医薬品候補化合物の約 75% は水に難溶なため、投与後、消化管から十分に吸収されない。

脂質製剤(Lipid-Based formulation: LBF)は油脂、界面活性剤などから成る多成分系製剤で、薬物を LBF 中にあらかじめ溶解させておくことで、難水溶性薬物の吸収を改善する。しかし、LBF からの薬物吸収性予測法は十分に確立されておらず、LBF の開発は困難を極めている。これは、LBF からの薬物吸収機構が複雑で、実際の吸収挙動を予測モデルで十分に再現できていないことが原因と考えられる。

## 2. 研究の目的

薬物は小腸内水分と小腸粘膜が接している面から吸収される。そのため、小腸粘膜表面積/小腸内水分量(Surface area/Volume:  $S/V$ )比は薬物吸収速度を決定する重要なパラメータである。本課題では、ラットの小腸を用いて実際の  $S/V$  比を再現した *in vitro* 消化-*in situ* 吸収モデルを構築し、種々LBF からの難水溶性薬物 cinnarizine(CNZ)の吸収性予測を試みた。また、低い薬物透過速度を示す *in vitro* 消化-膜透過モデルを用い、予測精度の比較を行った。

## 3. 研究の方法

### 3.1. LBF の調製

モデル LBF には、Lipid Formulation Classification System に分類される Type A-MC、Type A-LC、Type を使用した(表 1)。Type A-MC および Type A-LC はそれぞれ中鎖脂肪酸油脂および長鎖脂肪酸油脂を含有し、水に分散後、o/w マイクロエマルジョンを形成する。Type は油脂を含まず、界面活性剤および溶剤のみで構成される。これらの LBF に CNZ をそれぞれの溶解度の 85% の濃度で溶解させた。

表 1. LBF の組成

LBF	組成(% w/w)	各LBFに対するCNZの溶解度 (mg/g)	各LBFのCNZ含有量 [溶解度の85% (mg/g)]
Type IIIA-MC	<u>Captex 300</u> : <u>Capmul MCM C8 EP/NF</u> : <u>Kolliphor EL</u> (35:35:30)	36.9 ± 4.14	31.4
Type IIIA-LC	Soybean oil : <u>Maisine CC</u> : <u>Kolliphor EL</u> (35:35:30)	27.2 ± 1.32	23.1
Type IV	Diethylene Glycol <u>Monoethyl Ether</u> : <u>Kolliphor EL</u> (70:30)	42.2 ± 2.38	35.8

### 3.2. 透析膜を用いた *in vitro* 消化-膜透過試験

透析膜(分画分子量 1000 Da)を装着した side-by-side 型拡散セルを用い、*in vitro* 消化-膜透過試験を行った。Donor 側の人工腸液(タウロコール酸及び卵黄レシチンを含む、

pH 6.5) 7.2mL に LBF および懸濁液を加え攪拌し ( 750rpm, 37 )、10 分後、豚パンクレアチン懸濁液 0.8mL を加えた。最終のドナー溶液中のタウロコール酸の濃度は 50 mM、卵黄レシチン濃度は 3.7 mM、LBF の濃度は 2.0% w/w である。また、CNZ の濃度は Type IIIA-MC : 0.63 mg/mL、Type IIIA-LC : 0.46 mg/mL、Type IV 及び懸濁液 : 0.72 mg/mL である。パンクレアチンの添加により、油脂が消化され、脂肪酸が遊離し溶媒の pH が低下するため、自動滴定装置により NaOH を滴下し、常に小腸の生理的 pH(6.5) となるよう設定した。消化開始後 10、30、60 分において Donor 側からサンプルを採取した。続いて、サンプルを遠心し、水相と固相に分離させ、各相における薬物量を測定することで、小腸内におけるシンナリジンの溶解状態を評価した。また、Acceptor 側(4.5%ウシ血清アルブミン溶液, 8.0mL)からも - 5、0、5、10、20、30、40、50、60 分後(パンクレアチン添加時=0 分)にサンプリングを行い、膜透過挙動を評価した。

### 3.3. *In vivo* 経口投与試験

CNZ を封入した各 LBF を 4 % w/w の濃度で水に分散させた製剤および懸濁液をラットにそれぞれ 1 mL 経口投与し、大腿動脈カニューラより経時的(0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5h)に採血を行った。各製剤における投与量は Type IIIA-MC:1.25 mg/rat、Type IIIA-LC : 0.93 mg/rat、Type IV 及び懸濁液 : 1.43 mg/rat である。次に、血液サンプルを 9,000 rpm で 5 分間遠心分離し血漿を得た。

### 3.4. *In vivo* 消化管内薬物濃度の評価

CNZ を封入した Type IIIA-MC、Type IV を 4 % w/w の濃度で水に分散させた製剤および懸濁液に非吸収性の FD-4 を 200  $\mu$ M の濃度で溶解させ、ラットにそれぞれ 1 mL 経口投与した。CNZ の投与量は 3.3.と同じである。続いて、小腸各部位から水分を採取し、水分中の FD-4 および CNZ 濃度を測定した。

### 3.5. *In vitro* 消化-*in situ* 吸収モデルによる検討

人工腸液 ( 13.5 mL ) に各 LBF を 2% w/w の濃度で添加し、10 分間攪拌した後、ベッセルに豚パンクレアチン懸濁液 ( 1.5 mL ) を添加した。この時の人工腸液中の CNZ 濃度は 3.2.と同様、Type IIIA-MC : 0.63 mg/mL、Type IIIA-LC : 0.46 mg/mL、Type IV 及び懸濁液 : 0.72 mg/mL である。また、豚パンクレアチン添加後は、NaOH を自動滴下し、小腸の生理的 pH 6.5 を維持した。10 分後、各サンプルをラットに注腸投与し、大腿動脈カニューラから経時的に採血を行った。投与液量は実際の *S/V* 比を再現するため、小腸表面積 27.1 cm<sup>2</sup> あたり(小腸の長さ 24 cm あたり)1 mL とした。また、実験終了後、管腔内の薬液を洗浄し、メプロロール(高膜透過性)およびアテノロール(低膜透過性)混液(それぞれ 50  $\mu$ g/mL)を 2.4 mL を注腸投与した。30 分後、薬液を回収し、各薬物の吸収量から以下の式により膜透過性を算出し、小腸細胞膜の障害性を評価した。

膜透過性 ( cm/sec ) = 薬物吸収速度/(薬物初濃度  $\cdot$  小腸表面積)

## 4 . 研究成果

### 4.1 *In vitro* 消化-膜透過試験

Donor 側において、懸濁液では、いずれの時間においても CNZ は 90%以上が固体状態で存在していた。これは CNZ が難水溶性であるため、人工腸液中では、ほとんど溶解しなかったためと考えられた。Type IIIA-MC、IIIA-LC では油相は全く確認されず、速やかに消化されていた。この時、CNZ は水相中にほぼ完全に溶解していた。一方、Type IV では、過飽和溶解を維持できず、40-50%程度析出が起きていた。透析膜を介した CNZ の Acceptor 側への透過率は Type IV で最も高かった。また、5 分において、CNZ の透過速度が低下しており、過飽和溶解からの析出が起きたと推察された。一方、Type IIIA-MC、Type IIIA-LC では、Donor 側で CNZ がほとんど溶解していたにもかかわらず、薬物透過率が低く、懸濁液の場合とほぼ同程度であった。これは、油脂の消化によって生じた消化産物が混合ミセルを形成し、フリー濃度が低下したためと考えられた。

#### 4.2. *In vivo* 経口吸収試験

各製剤をラットに経口投与した後の血漿中 CNZ 濃度-時間推移、および 0 から 5 h までの AUC (AUC<sub>oral</sub>)を算出した。また、血漿中濃度および AUC<sub>oral</sub> は投与量で補正した。LBF 投与後の血漿中濃度および AUC<sub>oral</sub> は、いずれの場合も懸濁液投与群と比較して顕著に増大していた。これは、LBF 化により消化管内での CNZ の溶解性が改善したためと考えられた。また、*in vitro* 消化-膜透過試験では、Type IIIA-MC および Type IIIA-LC における薬物透過率は Type IV より低かったが、AUC<sub>oral</sub> においては LBF 間で有意な差はなかった。また、*in vitro* 消化-膜透過試験で得られた 60 分における薬物膜透過率(%)と各製剤の AUC<sub>oral</sub> には相関が見られなかった( $R^2=0.087$ )。

#### 4.3. *In vivo* 消化管内薬物濃度の評価

Type IIIA-MC および Type IV 投与後、空腸上部の CNZ 濃度は非吸収性の FD-4 濃度よりも顕著に低い値となっていた(消化管内濃度はそれぞれの投与量で補正)。これは、投与された CNZ が空腸上部に到達するまでにほぼ吸収されたためと考えられた。また、回腸では CNZ はほとんど検出されず、LBF として投与した場合、CNZ はほぼ完全に吸収されたことが示された。一方、懸濁液投与群では、回腸において CNZ の濃度が高かったことから吸収不良を起こしていることが示された。

*In vitro* 透過試験では CNZ の透過率は高くてもわずか 0.015%程度であったが、実際の消化管では、空腸上部に到達するまでにほぼ CNZ の吸収が完了しており、吸収速度が顕著に高いことが示された。従って、*in vitro* での薬物透過率はドナー溶液中のフリー薬物濃度の影響を受けたが、*in vivo* では吸収速度が大きいため、フリー濃度に関係なく CNZ が完全に吸収されたものと考えられた。そのため、IVIVC が得られなかったと推察された。

#### 4.4. *In vitro* 消化-*in situ* 吸収モデルによる CNZ の吸収性評価

*In vitro* モデルで CNZ の吸収性を予測できなかった原因は、実際の薬物膜透過速度を *in vitro* モデルで正確に再現できなかったためと考えられた。そこで、実際の *S/V* 比を再現し、薬物吸収速度を向上させた *in vitro* 消化-*in situ* 吸収モデルを構築した。

懸濁液投与群では最も血漿中濃度が低く、次いで Type A-MC、Type A-LC で最も高くなった。また、血漿中 CNZ 濃度-時間推移および 0 から 3 h までの

AUC ( $AUC_{loop}$ )の大きさも同様の順となった。本モデルによる吸収性評価後の小腸細胞膜障害性をメトプロロールおよびアテノロールの膜透過性を測定することにより評価した。その結果、各薬物の膜透過性はいずれの群においてもコントロール群と比較して有意な変化はなかった。従って、小腸細胞膜に大きな傷害はなかったと考えられた。 $AUC_{loop}$ の値に対して  $AUC_{oral}$  をプロットしたところ、 $R^2$ 値は 0.71 であり、透析膜を用いた方法よりも予測精度の向上が見られた。Type における  $AUC_{loop}$  は  $AUC_{oral}$  よりも過小評価されていたが、これは注腸投与前の消化過程で CNZ が析出してしまったためと考えられた。

以上より、LBF からの薬物経口吸収性予測において、実際の薬物膜透過速度を予測モデルに反映させることが重要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka, Yusuke; Arai, Hinata; Hidaka, Aya; Noda, Saki; Imai, Ko; Tsujisawa, Fumiya; Yagi, Haruya; Sakuma, Shinji	4. 巻 -
2. 論文標題 In Vitro Digestion-In Situ Absorption Setup Employing Physiologically Relevant Value of Membrane Surface Area/Volume Ratio for Evaluating Performance of Lipid-Based Formulations: A Comparative Study with An In Vitro Digestion-Permeation Model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中佑典
2. 発表標題 脂質製剤からの薬物経口吸収性評価：薬物吸収挙動に及ぼす製剤の組成および消化の影響
3. 学会等名 日本薬剤学会 経口吸収FG/日本薬物動態学会 吸収DIS 合同研究討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中佑典、辻澤史也、今井滉、新井陽太、日高絢文、野田早希、八木晴也、佐久間信至
2. 発表標題 小腸表面積/水分量比を反映したin vitro消化-in situ吸収モデルによる脂質製剤からの薬物経口吸収性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第39年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------