

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460197

研究課題名(和文)セロトニン異常が関与する消化管疾患時における薬物吸収挙動の解析

研究課題名(英文) Analysis of drug absorption behavior under gastrointestinal diseases related with abnormal metabolism of serotonin

研究代表者

檜垣 和孝 (Higaki, Kazutaka)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60284080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：消化管の機能制御に深く関わっているセロトニン(5-HT)は、過敏性腸症候群などの重篤な消化器疾患との関わりも深い。5-HTの欠乏が有機アニオン系薬物の経口吸収性に及ぼす影響を検討した結果、その経口吸収挙動への影響には、低投与量時には有意な吸収性の低下が、高投与量時には、吸収性の増大傾向が認められた。その要因としては、Mrp2、BCRP等の発現誘導による消化管内への分泌の増大とその飽和、および受動拡散による吸収性の変動が関与しているものと考えられた。また、5-HT枯渇により、消化管上部では移行性の上昇が、下部では低下が認められ、消化管運動性の上部から下部への運動性が失われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that 5-HT regulating the gastrointestinal (GI) motility and function is deeply related with several serious GI diseases such as irritable bowel syndrome. In this study, we examined the effect of 5-HT depletion on oral absorption of an organic anion drug by utilizing phenol red (PR) as a model drug. 5-HT depletion significantly decreased PR absorption at low dose of PR, but tended to increase it at its high dose. The enhancement of luminal secretion by Mrp2 and BCRP induced by 5-HT depletion and its functional saturation, and the change in permeability via passive diffusion would be responsible for the dose-dependent difference for the effect of 5-HT depletion on PR absorption. Furthermore, 5-HT depletion accelerated GI-transit at upper segments, but suppressed it at lower segments, suggesting that the sequential propagation of GI-motility from proximal to distal segments was disordered.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腸神経系 セロトニン枯渇 経口吸収挙動 有機アニオン系化合物 消化管内移行速度 bioavailability 非線形性 GITA model

## 1. 研究開始当初の背景

小腸を含む消化管の運動機能は、CNS と ENS による二重支配を受けているが、ENS は、CNS による自律神経系を介した制御を修飾するだけではなく、ENS 自体が、効果器である消化管組織に直接作用することにより、消化管の運動機能を高度に制御している。このように高度に発達した神経系を持つ臓器は他になく、そのため ENS は第二の脳とも称されている。ENS は、組織学的には 2 つの叢、即ち、小腸の最も外側に位置する外縦走筋と内輪状筋間に分布する筋層間神経叢と、粘膜下組織に分布する粘膜下神経叢から成っている。前者は、主に小腸の蠕動運動や分節運動の制御を担っているのに対し、後者は、小腸上皮細胞の機能や血流を制御している。また、この筋層間神経叢と粘膜下神経叢の間には密接な線維連絡があり、機能的にも相互に影響を及ぼし、機能制御が行われていると考えられている。また、ENS はアドレナリン作動性、コリン作動性ニューロンを主体としているが、これらに分類されないセロトニン(5-HT)などの神経伝達物質により制御されている非アドレナリン作動性 - 非コリン作動性ニューロンも重要な役割を果たしている。これら神経系の小腸機能に対する影響は、筋肉弛緩・緊張、蠕動運動、水や電解質の吸収・分泌について研究されている。しかし、受動拡散、促進拡散、能動輸送等、様々な機構により起こる薬物の消化管吸収に及ぼす ENS の影響については、依然として、検討例が極めて少ない。また近年では、様々な消化器疾患に ENS が関与していることが報告されており、病理学的、薬理的観点からも、ENS とこれら消化器疾患との関連性の解明が重要視されている。特に、ENS における神経伝達物質として、また消化管ホルモンとして小腸機能に深く関わっている 5-HT は、セリアック病、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、クローン病など、多くの消化

管疾患との関連性が指摘されており、薬物治療の観点からも ENS が関与する疾患時の薬物吸収挙動の変化とその機構解明は極めて重要となる。

## 2. 研究の目的

ENS が薬物吸収に及ぼす影響について検討した例は、国の内外を問わず、極めて少ないのが現状であり、様々な吸収特性を持つ薬物について、ENS の影響を系統的に検討・評価・総括することは、学問的に極めて有意義であるばかりでなく、得られた結果は、生理的条件の変化、特に病態時に見られる生理学的な変化に伴う薬物の吸収特性の変動を理解するための重要な情報となる。申請者は、これまでにアドレナリン作動性神経、コリン作動性神経の受動拡散による薬物吸収、オリゴペプチド輸送担体 PepT1 を介した薬物吸収、更には P-glycoprotein (P-gp)による消化管内への薬物分泌への影響について検討を進めてきた。また、腸神経系が関与する消化管疾患時における吸収挙動の変動については、消化管の機能制御に深く関わっている 5-HT の関与に焦点をあてた検討を進め、5-HT の慢性的な枯渇により P-gp 活性が亢進すること、有機アニオン性色素 phenol red の分泌方向の輸送が増大しており、それが Mrp2 および BCRP の発現亢進によることを見出している。本研究では、これらの結果を踏まえ、ENS 異常、特に 5-HT の代謝異常の関与が示唆されている疾患時における薬物吸収挙動を把握し、その機構的な詳細を明らかにすることを目的とし、既に構築した 5-HT 枯渇ラットを用い、有機アニオン系薬物に焦点を絞り、その経口吸収挙動に及ぼす 5-HT の影響を評価・解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 5-HT 枯渇ラットの作製：5-HT 枯渇ラットの作製は、Weber らの方法に準じて行った。

即ち、*p*-chloro-phenylalanine (PCPA)を1% Tween 80を含む生理食塩水に懸濁し、ラットに400 mg/kg/day、連続4日間、腹腔内投与を行った。対照群には等量の1% Tween 80を含む生理食塩水を同様の条件で投与した。

(2) 経口および静脈内投与実験：12時間絶食させたラットをエーテル麻酔下で、頸静脈にシリコンチューブ (i.d., 0.5 mm; o.d., 1.0 mm; 夏目製作所) を挿入し、チューブの他方をラット首後部より出す手術を行った。12時間回復後、1日絶食条件下で両実験を行った。経口投与実験は、フェノールレッド溶液を、経口ゾンデを用い、1.9 mg/5 ml/kg 経口投与した。静脈内投与実験は、フェノールレッドの投与量を0.03 mg/ml/kgに設定し、ラット尾静脈より軽度のエーテル麻酔下で投与を行った。両実験とも採血は施したカニューレより行った。

(3) 消化管内移行性測定実験：ガラスビーズとフェノールレッドを混合し、それぞれ3.33 g/1.4 mL/kg、150 mg/5 mL/kgの投与量で経口ゾンデを用いて24時間絶食させたラットに投与した。一定時間後、ラットを頸動脈切断により脱血死させて開腹後、噴門部、幽門部、Treitz部、回盲部、盲腸出口を結紮し、胃から肛門までを取り出した。シャーレ上で摘出した消化管を以下のように分割した。胃は全体、十二指腸は幽門部からTreitz部まで、そしてTreitz部から回盲部までを4つ等分割した(空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部：各約20 cm)。盲腸は全体とし、盲腸出口以下を結腸および直腸とした。分割後、消化管各部位をシート状に切り開き、内容物を水により洗浄して回収した。

(4) フェノールレッドの吸収速度定数評価：消化管各部位におけるフェノールレッドの吸収速度定数は *in situ* closed loop 法により求めた。24時間絶食させたラットを、ペントバルビタール麻酔下で背位に固定し、腹部正中線に沿って開腹した。消化管各部位(十二指腸、空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部)の上部と下部に、シリコンチューブ (i.d., 3.0 mm; o.d., 5.0 mm, 夏目製作所) を挿入し、内部を生理食塩水で洗浄後、pH6.5の等張リン酸緩衝液に溶解させたPhenol Red溶液を、0.5 mL/10 cm (但し、十二指腸は6 cm)の容量で投与した。投与30分または60分後に、各ループ内薬物を生理食塩液で20 mLメスフラスコに回収した。

腸、空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部)の上部と下部に、シリコンチューブ (i.d., 3.0 mm; o.d., 5.0 mm, 夏目製作所) を挿入し、内部を生理食塩水で洗浄後、pH6.5の等張リン酸緩衝液に溶解させたPhenol Red溶液を、0.5 mL/10 cm (但し、十二指腸は6 cm)の容量で投与した。投与30分または60分後に、各ループ内薬物を生理食塩液で20 mLメスフラスコに回収した。

(5) フェノールレッドの定量：HPLCによる定量；経口投与および静脈内投与実験および、ラット小腸 *in vitro* 膜透過実験の一部で得られたサンプルの定量は、HPLCを用いて行った。ただし、血液サンプルについては測定の前に以下の処理を行った。得られた血液サンプルを直ちに遠心分離し、血漿100  $\mu$ lを採取する。得られた血漿に除タンパクのため血漿の3倍量のメタノールを加え、遠心分離した上清を測定用サンプルとした。

HPLC測定条件は以下の通りである。  
カラム, Synergi 4u Fusion-RP 80, 150 $\times$ 4.6 mm (Phenomenex); 移動相, 50 mM phosphoric acid : acetonitrile = 80 : 20;  
検出波長 : 432 nm.

マイクロプレートリーダーによる定量；消化管内移行性実験、*in situ* closed loop 実験で得られたサンプルの定量は、マイクロプレートリーダーを用いて行った。得られたサンプルを2:1の割合で1 N NaOH溶液と混和し、直ちにマイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad Laboratories) により吸光波長570 nmで吸光度を測定した。

(6) 消化管内移行性、各部位における吸収性を考慮した経口吸収挙動の予測および解析：フェノールレッドの経口投与後の吸収挙動は、経口投与後の胃排出、小腸内移行性、および各消化管部位における吸収性を吸収変動因子として組み込むことが可能とした、申請者らが構築した Gastro-Intestinal-Transit-Absorption model (GITA model)

により行った。

#### 4. 研究成果

(1) 5-HT 枯渇ラットにおけるフェノールレッドの経口吸収挙動評価 (低投与量時): 有機アニオン系薬物のモデルとしてフェノールレッドを用い、その経口投与後の吸収性を評価し、コントロールラットの結果と比較を試みた。Bioavailability を算出、比較するために、まず静脈内投与後の体内動態を評価した (投与量 0.03 mg/kg)。その結果、5-HT 枯渇ラット群、コントロールラット群共に、フェノールレッドの血漿中濃度推移は 2-コンパートメントモデルにより良好に記述できることが示され、血漿中濃度推移には大きな違いは認められなかった。5-HT 枯渇ラット群において、ややβ相における消失に遅延傾向が見られたものの全身クリアランス (CL<sub>total</sub>) に有意な差は認められなかった。経口投与 (投与量 1.9 mg/5 mL/kg, 1 mM) 後の血漿中濃度推移については、5-HT 枯渇ラット群において、若干、T<sub>max</sub> が早い傾向が見られたが、終始、顕著に低い血漿中濃度推移が認められた。C<sub>max</sub> はコントロール群の約 70%、AUC は約 45%、bioavailability も約 40%と有意な低下が認められた。平均滞留時間 MRT には低下傾向が見られた。これらの結果は、5-HT 枯渇時に有機アニオン系化合物の経口吸収性が有意に低下することを示している。申請者らは、既に、5-HT 枯渇時には、有機アニオン系化合物の分泌を担う Mrp2 及び BCRP の小腸上皮細胞の刷子縁膜上の発現亢進と、機能亢進を明らかにしており、このことが、今回明らかとなったフェノールレッドの経口吸収性低下の要因の一つであると考えられた。

(2) 5-HT 枯渇ラットにおける経口投与後の薬物消化管内移行性の評価: フェノールレッドの吸収性低下の要因を解明するため、経口投与後の消化管内移行性の評価を行った。胃排

出特性はフェノールレッド (非吸収性マーカーとして使用) の胃内残存率経時変化より、小腸内移行性は glass beads (粒子径 63 – 88 μm) の移行性より評価し、それぞれの部位における平均滞留時間を算出した。その結果、5-HT 枯渇ラット群ではコントロール群に比して、胃内滞留時間が約 60% に減少することが示され、胃排出が促進されることが示唆された。十二指腸では、胃と同様に、平均滞留時間がコントロール群の約 46% となり、移行性が亢進していることが示された。一方、空腸上部以下では、回腸下部に至るまで、コントロール群に比して平均滞留時間に延長が見られた。それぞれコントロール群に対する比は、空腸上部で 2.8 倍、下部で 3.5 倍、回腸上部で 1.4 倍、下部で 1.6 倍となり、5-HT 枯渇により薬物の小腸内滞留性が増大することが明らかとなった。

一般に、胃排出は、経口投与後の吸収開始時間と初期の吸収速度に大きく影響する。5-HT 枯渇ラット群で、若干ではあるが、T<sub>max</sub> が早くなっており、これは胃排出促進の影響であると考えられた。小腸滞留性の増大は、一般に、難吸収性薬物にとっては吸収時間の延長につながることから吸収率の増大につながると考えられるが、先に示したように、5-HT 枯渇ラット群では、フェノールレッドの bioavailability に低下が見られている。これらのことから、フェノールレッドの場合、小腸滞留性の増大は、受動拡散による吸収性増大よりも、Mrp2 や BCRP を介した分泌をより強める方向に影響したものと推察された。

5-HT の消化管運動性への関与については、種々、報告がある。5-HT<sub>1</sub> 受容体、5-HT<sub>3</sub> 受容体の刺激は胃排出を遅延させることが報告されている。5-HT 枯渇による胃排出促進は、これら受容体を介した 5-HT の胃排出抑制的効果の減弱が関与している可能性が考えられた。また、小腸においては、5-HT<sub>3</sub> 受容体アゴニストは消化管運動性を亢進させること、アン

タゴニストは消化管移行性を低下させること、5-HT<sub>4</sub>受容体アゴニストが小腸・大腸運動性を増大させることが報告されている。これらのことから、5-HT枯渇状態では、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>4</sub>受容体への作用が減弱し、消化管内移行性が低下したものと考えられた。一般に、消化管の運動性は胃のMMC (Migration Motor Complex) 制御が、消化管下部へ伝搬していくことで、小腸の運動性も制御されている。しかし、5-HT枯渇ラット群では、胃、十二指腸の運動性は促進される一方で、空腸以下では運動抑制が見られており、胃から小腸下部への運動性の正常な伝搬が見られていない。5-HT作動性神経を破壊したラットでは、MMCが消失することが報告されており、5-HT枯渇状態においても、それに近い現象が起こっているものと考えられた。

(3) 5-HT枯渇ラットにおけるフェノールレッドの経口吸収挙動の評価 (高投与量時): 先にフェノールレッドの経口bioavailabilityは、5-HT枯渇状態で有意に低下し、その一因として機能亢進したMrp2及びBCRPによるフェノールレッドの小腸管腔内への分泌増大の影響が示唆された。この現象は、フェノールレッドの経口吸収挙動が非線形性を示す可能性を示していた。そこで、フェノールレッドの経口吸収挙動を高投与量にて検討した。その結果、フェノールレッドのAUCは高投与量時 (50 mg/5 mL/kg) にはむしろ有意に増大することが、bio-availabilityも増加傾向を示すことが明らかとなった。ラット小腸粘膜を用いたin vitro透過試験では、フェノールレッド低濃度時には分泌方向優位かつ5-HT枯渇により吸収方向の透過性低下と分泌方向の透過性亢進が確認されていたが、高濃度時では5-HT枯渇により吸収方向の透過に若干の増加傾向はあったものの顕著な変化は認められなかった。これはMrp2とBCRPは発現亢進しているもののフェノールレッドが高濃度であるため分泌は飽和し分泌亢進の影響が小さくなった

こと、またparacellular routeの開口などにより受動拡散による輸送亢進が起こったため、見掛け上、変動が見られなかったものと考えられた。しかし、一方でin situ closed loop法により吸収性を評価した結果、5-HT枯渇により吸収速度定数kaはいずれの部位においても、有意に増大することが示され、in vivo経口投与実験の結果を支持するものとなった。このin vitro膜透過実験の結果とin situ closed loop法による結果の相違については、更なる検討が必要と考えている。いずれにしても、経口投与後のフェノールレッドのbioavailabilityは高投与量では増大していることから、やはり吸収方向の透過は増加傾向にあるものと推察している。また、このbioavailabilityの増大には、5-HT枯渇時に観察された空腸上部以下の部位での滞留性増大が寄与していると考えられた。

次いで、GITA modelを用いてフェノールレッドの経口投与後の吸収挙動を解析した。Fg (小腸利用率)とFh (肝利用率) を共に1と仮定して算出した血漿中濃度曲線を基にFa (吸収率) を求め、経口投与、静脈内投与で得られた結果を利用することで、Fg x Fh を推定した。その結果、Fg x Fh 値は、コントロールラット群では0.37であったのに対し、5-HT枯渇ラット群では、0.18と見積もられた。フェノールレッドは、小腸及び肝臓においてグルクロン酸抱合を受けることが知られている。特に肝臓の寄与が大きく、抱合代謝後、胆汁中へ排泄されることが知られており、今回の結果は、5-HT枯渇により、小腸及び肝臓におけるフェノールレッドの抱合代謝及び胆汁中排泄が亢進している可能性を示唆するものと考えられた。

以上、5-HT枯渇ラットを用いて、有機アニオン系薬物の経口吸収挙動に及ぼす5-HTの影響を検討した。消化管管腔内への分泌を受ける有機アニオン系薬物は、5-HTの欠乏によ

り、管腔中への分泌亢進や消化管内移行性の変動、更には小腸、肝臓における代謝、胆汁中排泄に至るまで影響を受けること、また投与量(濃度)により、膜透過性、bioavailabilityなどに対する影響が異なるなど、複雑な影響を受けることが示唆された。

今後は、膜透過性における非線形性、抱合代謝、胆汁中排泄等との関係性についても明らかにすることで、有機アニオン系薬物の経口吸収挙動の及ぼす5-HTの影響について整理していきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1)若森 浩貴、坡山 幸恵、大河原 賢一、檜垣 和孝: 薬物の腸上皮細胞膜透過性に及ぼすセロトニンの影響に関する基礎的検討: 日本薬剤学会第31年会(2016.5.19 - 5.21, 長良川国際ホテル、岐阜都ホテル、岐阜).

(2) 坡山 幸恵、中島 駿、大河原 賢一、檜垣 和孝: セロトニン症候群発症時における薬物の経口吸収挙動に関する基礎的検討: 日本薬剤学会第29年会(2014.5.20 - 5.22, 大宮ソニックビル、埼玉).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/department/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

檜垣 和孝 (HIGAKI, Kazutaka)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 60284080

(2)研究分担者

大河原 賢一 (OOGAWARA, Kenichi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 30291470