

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05495

研究課題名(和文) 食用油脂による低膜透過性化合物の消化管吸収促進機構の解明とその評価法の構築

研究課題名(英文) Effect of dietary intake of medium chain triglycerides on intestinal absorption of poorly-permeable compounds

研究代表者

片岡 誠 (Kataoka, Makoto)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：00340860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、日常的に摂取する可能性が高い中鎖脂肪酸トリグリセリド(MCT)が消化管からの吸収性が極めて低い化合物の吸収性に及ぼす影響を明らかにすることで、MCTの安全性を精査することである。モデル動物を用いて一定の条件下でMCTと低吸収性化合物を併用した場合、低吸収性化合物の全身曝露量が優位に増加した。またリパーゼ阻害剤を併用することによって吸収性への影響は低下した。したがってこの影響はMCTの消化によって生じた遊離脂肪酸に起因したものと考えられた。また、本現象をin vitroにて評価しうる実験系を構築した。本研究成果はMCTの安全性などを考える上で極めて有益な情報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

本研究では、中鎖脂肪酸トリグリセリド(MCT)による化合物の消化管吸収への影響を明らかにすることを目的として種々の検討を行った。消化酵素によるMCTの分解より生じた遊離脂肪酸が、難吸収性化合物の消化管吸収性を著しく向上させる可能性が明らかとなった。本研究成果は、近年、健康増進を主眼としたMCT摂取が注目されている中で、MCTの過剰摂取によって健康被害が生じる可能性を示唆するものであり、学術的・社会的に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the effect of medium-chain triglyceride (MCT) on the intestinal absorption of poorly-permeable compounds. Emulsified MCT with surfactants ingested to the small intestine of rats significantly enhanced the intestinal absorption of poorly-permeable compounds but not highly-permeable compounds. This effect by MCT lipolysis was transient (disappeared within 30 min) and molecular mass-dependent. The threshold of molecular size was found as between 10,000 and 20,000. These effects were significantly reduced by the presence of a lipolysis inhibitor. These results indicated that free fatty acids such as caprylic acid (C8) and capric acid (C10) released from MCT by lipolysis in the small intestine of rats enhanced the intestinal absorption of poorly-permeable compounds. An in vitro system was established to evaluate this effect. These findings were useful information for considering the safety of MCT on the intestinal absorption of xenobiotics.

研究分野：薬剤学

キーワード：中鎖脂肪酸トリグリセリド 経口吸収 低膜透過性化合物 脂質消化

1. 研究開始当初の背景

近年、日本国民の健康志向の高まりにより、様々な健康管理方法が注目されている。特に、健康増進法や食品衛生法などで定められた特定保健用食品や栄養機能食品の普及がその例である。中鎖脂肪酸トリグリセリド(以下、MCT)から遊離した中鎖脂肪酸は体内に蓄積することが少なく速やかにエネルギーとして利用されるため、MCTの経口摂取によるダイエット法が報告されている。他方、長きに渡り消化管内での安定性と生体膜透過性が極めて乏しいため経口投与後の吸収性が不十分であるインスリンやGLP-1等の高分子医薬品の経口吸収性を改善するために吸収促進剤を利用した経口製剤開発が盛んに行われている。この吸収促進メカニズムの一つとして、吸収促進剤が消化管上皮細胞の密着接合を開口させることによって、水溶性高分子医薬品の吸収を促進させることが知られている。しかしながら消化管上皮細胞は、様々な生体異物の体内への侵入を防ぐバリアーとしても機能している。したがって、不必要に密着接合を開口させることは、アレルゲンなどの生体異物を体内に侵入させてしまう可能性が考えられる。中鎖脂肪酸から構成されるMCTが消化管内で分解されると、カプリン酸などの脂肪酸が遊離される。この中鎖脂肪酸は上皮粘膜に対する低膜透過性化合物の膜透過性を上昇させることから、経口投与されたMCTの消化によっても同様の現象が生じる可能性が推察される。また報告者は、これまでに他の吸収促進剤(マルトシド)を用いた低膜透過性化合物の消化管吸収改善効果は消化管内環境に強く依存することを海外研究者らとともに明らかにしている。このような背景から、MCT摂取による低膜透過性化合物の消化管吸収への影響を精査することは極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MCTの消化と生成した中鎖脂肪酸による化合物の消化管吸収促進作用の関係を詳細に解析するとともに、吸収促進作用を有する化合物の簡便な評価手法を構築することである。経口的に摂取したMCTは、消化管内に存在する消化酵素(リパーゼ)によってモノグリセリドと2分子の遊離脂肪酸に分解される(図1)。この消化によって遊離した脂肪酸が、消化管上皮細胞のバリアー機能に及ぼす影響を明らかにするとともに、その影響を*in vitro*で簡便に評価できるシステムの構築を目的としている。

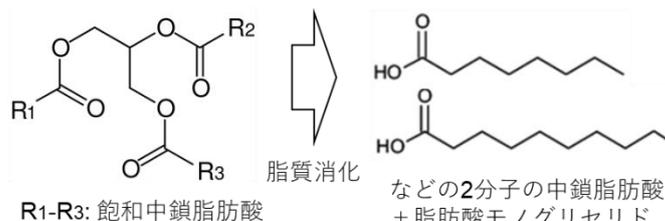


図1 中鎖脂肪酸トリグリセリド(1分子)の消化による生成物組成

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用したMCTとモデル動物および投与溶液

MCTは市販品を使用した。MCT中に含まれる脂肪酸の組成は表1の通りである。ラット(SD系, 雄, 250-300g)をモデル動物として使用した。なおすべての動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」の元、摂南大学動物実験に関する規定を遵守し遂行した。本研究で用いた投与溶液の組成を表2に示した。なお低膜透過性化合物のモデルであるFluorescein isothiocyanate-dextranの分子量が4000(以下、FD-4)、10,000(FD-10)、20,000(FD-20)、40,000(FD-40)を、また低分子化合物のモデルとしてatenolol, metoprolol, propranololを使用した。さらに基本溶液としてヒト絶食時の消化管内モデル液(以下、FaSSIF)を使用した(溶液#1-11)。トリグリセリドの分散性を向上させるために界面活性剤等(Cremophor EL, Capmul MCM C8)を添加しFaSSIF中で乳化させたものを使用した(溶液#2-9)。

表1 本研究で使用したトリグリセリドの組成

トリグリセリド	脂肪酸組成 (%)								分子量
	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	その他	
ココナードML	1.9	37.6	33.9	20.2	3.9	1.5	0.4	0.6	550.2
ココナードRK	0.5	97.3	2.2	-	-	-	-	-	471.4
コーン油	-	-	-	-	-	11.3	87.8	0.9	873.2

(2) MCTの消化と遊離した中鎖脂肪酸による吸収促進作用の検証

① ラット小腸を用いた吸収促進効果の検証

実験前日夕刻より絶食(自由飲水)したラットをイソフルラン麻酔下にて開腹し、小腸上部に表2に示した溶液(#1-11, FD-4添加濃度4mg/mL)を投与(0.5mL)した。その後、経時的(0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240分)に頸静脈より採血(0.25mL)し、遠心分離により血漿(0.1mL)を得た。

表2 投与溶液の組成

投与溶液				
溶液#	添加物 in FaSSiF (Sol. #1-11)		トリグリセリド (25 mg/mL)	前処理条件
	添加物	添加濃度		
#1	添加物なし	-	-	-
#2	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	-	-
#3	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	ココナードML	-
#4	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	ココナードRK	-
#5	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	コーン油	-
#6	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	-	リパーゼ処理
#7	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	ココナードML	リパーゼ処理
#8	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	ココナードML	リパーゼ添加
#9	Cremonophor® EL/Capmul® MCM C8	25 mg/mL each	ココナードML	Cetilistat添加
#10	カプリン酸	30.8 mM	-	-
#11	カプリル酸/カプリン酸	34.2/30.8 mM	-	-
#12	添加物なし in soy milk	-	ココナードML	-
#13	添加物なし in soy milk	-	コーン油	-

② リパーゼによる MCT の *in vitro* 消化性試験

表 2 に示した溶液 3 および 4 (36 mL) にブタ由来腓リパーゼ溶液を 4 mL 添加し、自動滴定装置を用いて滴下した NaOH のモル数から遊離した脂肪酸の物質量を測定した。用いた MCT から理論上遊離すると考えられる脂肪酸量を 100% として、MCT のリパーゼによる消化率の時間推移を算出した。

(3) MCT による吸収促進作用の検証

① 吸収促進作用に対する化合物物性の影響

MCT による吸収促進作用の分子量依存性を検証するために、様々な分子量の Fluorescein isothiocyanate-dextran および低分子化合物を用いて (2) ①と同様の手法でラット消化管からの吸収性を評価した。また、MCT の時間依存性を明らかにするために、FD-4 を含まない溶液#3 を小腸内に投与した後、30 分および 60 分後に FD-4 溶液を同じ部位に投与し、経時的に採血を行った。

② 通常摂取条件を考慮した検証

小腸内投与溶液として、FD-4 を 4 mg/mL 添加した溶液#12 および#13 (表 2) を用いて (2) ①と同様の手法で通常摂取条件を考慮した評価を行った。また、ラットに表 2 に示した溶液 (#3, 4, FD-4 添加濃度 4 mg/mL) を覚醒条件下で経口投与 (0.5 mL) し、血漿中 FD-4 の濃度時間推移を評価した。

(4) 低膜透過性化合物の消化管吸収性に及ぼす吸収促進作用を有する化合物の影響定量的評価法の構築

報告者らが考案した *in vitro* システム (Dissolution/permeation system, D/P システム) を用いて実験条件の検討を行った。Caco-2 単層膜は通常の培養法により 21 日間培養により得たものを使用した。D/P システムの管腔側溶液 (FaSSiF) に MCT およびリパーゼを種々の濃度 (0, 0.02, 0.04, 0.1 g/mL) を添加し、FD-4 と metoprolol の膜透過性と用いた培養細胞膜 (Caco-2 単層膜) の膜抵抗値への影響を精査した。なお膜抵抗値の時間推移は、実験開始前 (リパーゼ添加前) に対する各測定時間の値の割合として表した。

(5) 定量法

① FD-4, FD-10, FD-20, FD-40

各血漿サンプルを pH6.8 の緩衝液と混合 (体積比 1:1) し、蛍光プレートリーダーにて蛍光強度 (励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nm) を測定した。別途作成した検量線の蛍光強度より、血漿中化合物濃度を算出した。

② 低分子化合物

低分子化合物を含む血漿サンプルは、アセトニトリルで除タンパクした後、ロータリーエバポレーターにて蒸発乾固させた。その後、少量の溶液で再溶解し、LC/MSMS を用いて定量した。In vitro 試験により得られたサンプルは、移動相溶媒で適宜希釈した後、LC/MSMS を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) MCT の消化と遊離した中鎖脂肪酸による吸収促進作用の検証

低膜透過性化合物のモデルである FD-4 のラット小腸からの吸収性は、乳化した MCT 共存下において著しく上昇した(図 2)。またその影響は構成する脂肪酸の組成によらず同程度であった。一方長鎖脂肪酸トリグリセリドのモデルとしてコーン油を適用した場合、トリグリセリドを含まない溶液投与時と同程度であった。以上のことから MCT 依存的に FD-4 の消化管吸収性が変化したものと推察された。MCT 消化による影響を明らかにするために、溶液#3 に様々な処理を施した後、ラット小腸に投与した。その結果、リパーゼ処理した溶液および投与前にリパーゼを添加した溶液において極めて速やか

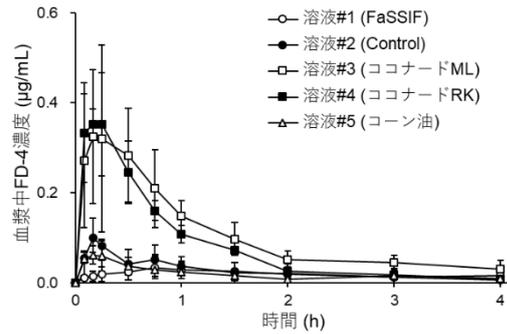


図2 FD-4の消化管吸収性に及ぼすトリグリセリドの影響

な FD-4 の血漿中濃度の上昇が認められ、その程度 (AUC) は溶液#3 投与時と同程度であった。リパーゼ阻害剤である cetilistat を添加した場合、FD-4 の血漿中濃度推移はコントロール (溶液#2) と同程度であった(図 3)。本研究で使用した MCT から遊離すると考えられる脂肪酸の物質量を反映させた溶液 (#10, 11) を用いて同様の検討を行った結果、濃度と組成に依存した影響が観察された(図 4)。また MCT のリパーゼによる消化性について検討した結果、用いた MCT は極めて速やかにほぼ完全に消化されることが明らかとなった。これらの結果より、観察された FD-4 の血漿中濃度推移の上昇は、MCT の消化によって生じた

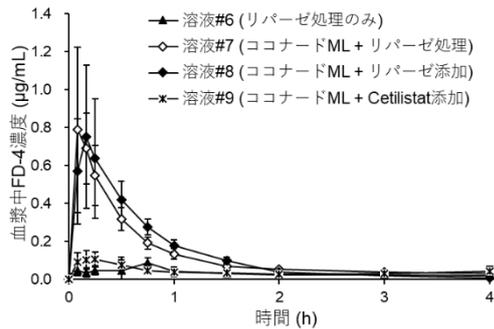


図3 FD-4の消化管吸収性に及ぼすMCT消化の影響

遊離脂肪酸によるものと結論付けられた。

(2) MCT による吸収促進作用の検証

MCT による低膜透過性化合物の消化管吸収性への影響を詳細に精査することを目的として、分子量の影響と低分子化合物への影響および時間依存性を調査した。低膜透過性化合物の消化管吸収に及ぼす MCT の分子量依存性を精査した。分子量が 10,000 (FD-10) では血漿中濃度の上昇が観察されたものの分子量 20,000 以上では有意な変化は認められなかった(表 3)。また膜透過性の異なる低分子化合物をモデルとして MCT の影響を調査

表3 MCTによる吸収促進効果の分子量依存性

	平均分子量	AUC (µg·h/mL)	
		溶液#2	溶液#3
FD-4	4,000	0.105 ± 0.054	0.429 ± 0.147
FD-10	10,000	0.078 ± 0.028	0.377 ± 0.201
FD-20	20,000	0.082 ± 0.077	0.048 ± 0.013
FD-40	40,000	0.020 ± 0.014	0.012 ± 0.009

した結果、いずれの化合物においても顕著な変化は観察されなかった。したがって、MCT による消化管吸収性への影響に対する分子量依存性の閾値は 10,000~20,000 の間にあり、また低分子化合物では MCT の影響を受けにくいと考えられた。さらに MCT の時間依存性を検討した結果、図 5 に示すように MCT 投与 30 分に同じ部位に FD-4 を投与しても血漿中 FD-4 濃度の上昇は観察されなかった。これらのことから、MCT 消化によって生成した中鎖脂肪酸による低膜透過性化合物 (分子量の閾値:10,000~20,000) の消化管吸収性への影響は一過性でありおよそ 30 分以内には消失することが明らかとなった。

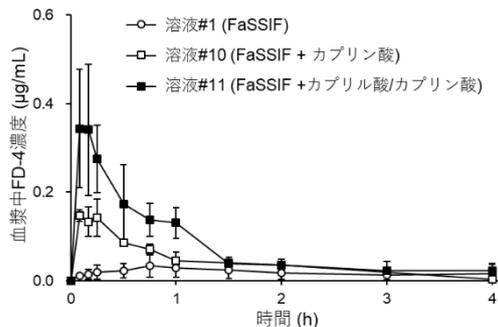


図4 FD-4の消化管吸収性に及ぼす中鎖遊離脂肪酸の影響

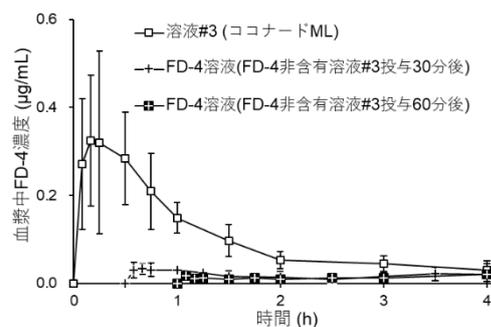


図5 FD-4の消化管吸収性に及ぼすMCTの時間依存性

Soy milk と混合して小腸に投与した MCT によっても FD-4 の血漿中濃度の上昇が観察されたも

この個体間差が大きかった(図6)。しかしながら AUC には大きな個体間差は認められなかったことから、消化管内での MCT の消化速度に個体間差があったものと考えられた。さらに覚醒下で経口投与した場合においても MCT による FD-4 の吸収性増大効果は確認されたものの先の検討と同様に個体間差が大きかった(図7)。しかしながら本結果は、MCT 摂取によって低膜透過性化合物の消化管吸収挙動が変化することを意味しており、今後さらに詳細な検証が必要であると考えられた。

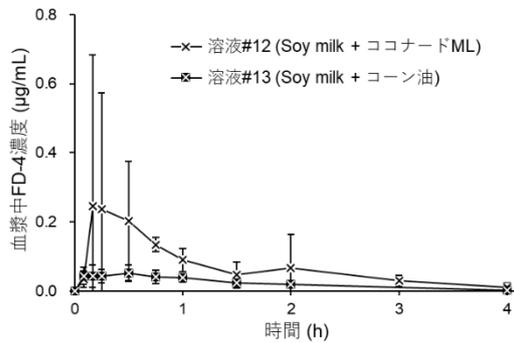


図6 通常摂取条件を考慮した検討①

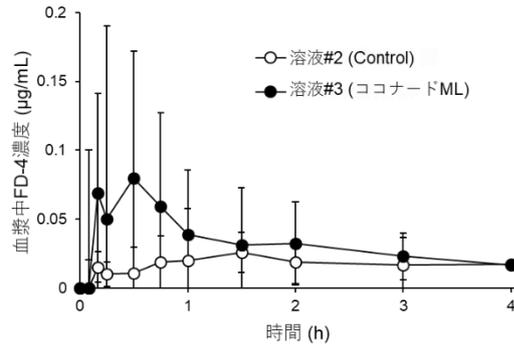


図7 通常摂取条件を考慮した検討②

(3) 低膜透過性化合物の消化管吸収性に及ぼす吸収促進作用を有する化合物の影響定量的評価法の構築

本研究で用いた *in vitro* システム(D/P システム)の概略図を図8(左上)に示した。D/P システムの管腔側溶液として FaSSIF を、血管側溶液として生理的緩衝液を適用した。また、D/P システムの中央には培養細胞としてヒト大腸がん由来の Caco-2 単層膜を適用した。MCT や FD-4 (1 mg/mL) や他の低分子化合物 (10 µM) を含有した FaSSIF を管腔側に適用すると同時にリパーゼを様々な濃度で含んだ FaSSIF を添加した。その後、経時的に Caco-2 単層膜の膜抵抗値を測定するとともに、各化合物の血管側への透過挙動を評価した。その結果、リパーゼを添加することによって時間依存的に Caco-2 単層膜の膜抵抗値が低下したのに対して FD-4 の膜透過性は上昇した。さらにこの影響はリパーゼの添加量依存的であった。しかしながら主にその膜透過が経細胞経路である metoprolol の膜透過はリパーゼ添加の影響を受けなかった。これらのことから、リパーゼによって MCT から遊離された中鎖脂肪酸が Caco-2 単層膜の密着接合を開口させた結果、細胞間隙を透過する FD-4 の膜透過性の上昇と膜抵抗値の低下が観察されたものの、経細胞経路に対する影響はないものと考えられた。これは *in vivo* で観察された MCT 投与による低膜透過性薬物と低分子化合物への影響を反映していると考えられたことから、本評価系を用いることで MCT の消化による化合物の消化管吸収への影響や他の吸収促進剤の効果を評価できるものと考えられた。

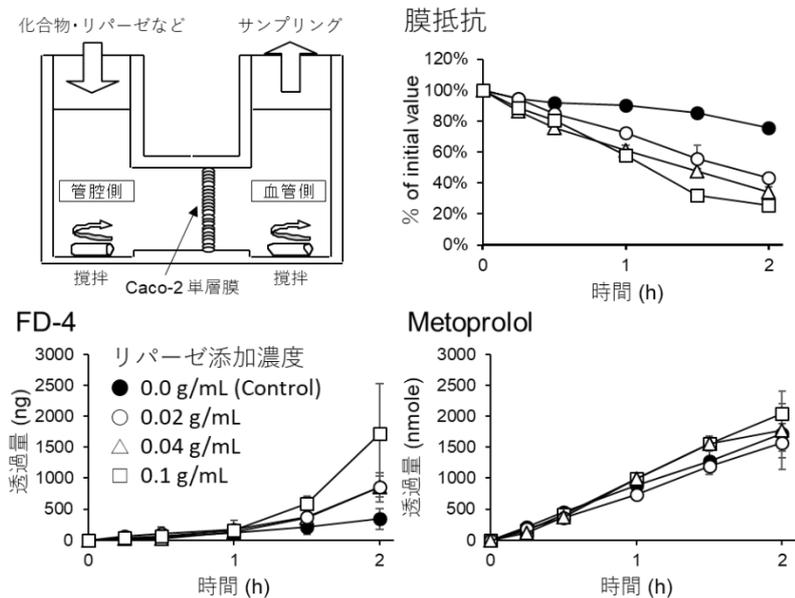


図8 D/Pシステムとリパーゼ添加による膜抵抗値と化合物の膜透過性変化

以上のことから、MCT から遊離された中鎖脂肪酸が低膜透過性化合物の消化管吸収性を上昇させる可能性が示唆された。また本効果や他の吸収促進剤による影響を評価しうる *in vitro* システムを構築した。これらの成果は、MCT の安全性を考える上で極めて重要であると考えられる。

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 Kataoka Makoto, Ohi Yuriko, Sakanoue Kana, Minami Keiko, Higashino Haruki, Yamashita Shinji	4. 巻 17
2. 論文標題 Impact of Dietary Intake of Medium-Chain Triacylglycerides on the Intestinal Absorption of Poorly Permeable Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 212 ~ 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00900	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂ノ上加奈、片岡誠、南景子、東野晴輝、山下伸二
2. 発表標題 消化管のバリアー機能に及ぼす中鎖脂肪酸トリグリセリドの影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018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
研究協力者	坂ノ上 加奈 (Sakanoue Kana)		
研究協力者	谷口 勇気 (Taniguchi Yuki)		

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
---------	---------