

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590144

研究課題名（和文）

小腸粘膜における初回通過効果の解析とその薬物経口吸収挙動の予測への応用

研究課題名（英文）

Analysis of first-pass effect in small intestinal mucosa and its application to prediction of drug absorption behavior after oral administration

研究代表者

木村 聡城郎（KIMURA TOSHIKIRO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10025710

研究成果の概要：

経口投与後の薬物に対する初回通過効果におけるP-gp及びCYP3Aの寄与について、quinidineをモデル薬物として検討した結果、P-gp、CYP3A活性の強さに関わらず、quinidineの小腸からの吸収クリアランスはほぼ一定であること、一方で、肝抽出率、小腸抽出率は、testosteroneの肝、小腸代謝固有クリアランスとそれぞれ良好に相関することが明らかとなった。難溶性薬物griseofulvinの経口吸収挙動の大きな個体差は、小腸内移行速度の個体差に依存したin vivo溶解挙動の個体差によるものと考えられた。更に、輸送担体を介して吸収される薬物の吸収挙動の予測を目的とし、オリゴペプチドの輸送系であるPEPT1を対象とし、その代表的な基質であるcephalexinの吸収について検討し、cephalexinの吸収挙動を良好に描写することに成功したほか、cephalexinの吸収に対するPEPT1、受動拡散の寄与を定量的に評価することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学、消化管吸収、P-glycoprotein、Cytochrome P450 3A、PEPT1

1. 研究開始当初の背景

疾病の薬物療法は、その利便性からも、依然として経口製剤によるところが大きい。しかしながら、経口製剤が投与されて、実際に薬

物が、その主な吸収部位である小腸から吸収されるまでの経路は複雑で、薬物の吸収動態に影響を及ぼす様々な生理学的要因が存在している。近年では、特に、難溶性化合物が

新薬候補化合物となる場合が多く、その吸収挙動に大きなバラツキが伴うことから、国の内外を問わず、難溶解性薬物の吸収挙動の解析、予測の必要性が高まっている。また、消化管粘膜における代謝、分泌は、近年、肝臓以外の初回通過効果の要因として注目されており、Cytochrome P450 (CYP)による酸化的代謝、P-glycoprotein (P-gp)による管腔内への分泌によるbioavailability (BA)低下の可能性が指摘されている。特に、CYP3AとP-gpが協奏的に働くことにより効率的な代謝が起こり、経口投与された薬物のBAを低下させているとの仮説がだされているが、この仮説に関しては、現在も、国際的に議論の只中であり、明確な結論は得られていない。また、近年、多くの薬物の消化管吸収に、輸送担体が関与していることが指摘されている。しかしながら、実際に経口投与後の吸収に対する輸送担体の寄与について定量的に評価した例はない。このような薬物の経口吸収挙動を左右する重要な要因について解析を行い、経口吸収性の予測につなげることは、学問的にも、社会的にも極めて大きな意義を持つ。

2. 研究の目的

小腸粘膜における初回通過効果を定量的に解析し、得られた結果を薬物の経口吸収挙動の予測へとつなげることが本研究の最終的な目標である。まず、消化管粘膜におけるCYP3Aによる代謝およびP-gpによる分泌を、小腸・肝臓同時灌流法を中心に定量的に評価・解析することを目指す。同実験法で得られる吸収クリアランス、小腸抽出率などのパラメータと、P-gp、CYP3A活性、或いは両タンパク質の発現量との関係を解析することにより、quinidineなどのモデル薬物の吸収、小腸における代謝に対するP-gp、CYP3Aの寄与について定量的に評価する。また、固形製剤投与後の

吸収動態、特に、難溶解性、易吸収性薬物の吸収動態を詳細に解析し、その吸収挙動における大きな個体差の原因解明を試み、個体差の小さい、安定した吸収挙動、安定した薬理効果に結びつく製剤への応用を目指す。更には、輸送担体を介して吸収される薬物の吸収挙動の解析を試み、様々な性質を有する薬物の経口吸収予測性の拡大を検討する。

3. 研究の方法

(1) Quinidine の初回通過効果に対する P-gp 及び CYP3A の寄与の定量的評価: P-gp、CYP3A の基質であり、かつ良好な吸収性を示す quinidine をモデル薬物とした。

① P-gp、CYP3A 高発現ラットの作製と活性の評価: Dexamethasone を、投与量 25 mg/kg/day ~ 100 mg/kg/day、投与日数 2 ~ 4 日程度の条件で経口投与することで、両タンパクの高発現ラットを作製した。それぞれの投与条件で、P-gp、CYP3A の発現誘導の程度を活性により評価した。P-gp に関しては、P-gp の特異的な基質であり、かつ CYP3A による代謝を受けない rhodamine123 の分泌方向輸送を、単離したラット小腸を用いた in vitro 透過実験により評価する。CYP3A に関しては、CYP3A により特異的な代謝を受ける testosterone を基質として、microsome を用いた代謝実験を行い、主代謝生成物である 6 β -hydroxyl- testosterone を定量することにより活性を評価した。

② P-gp、CYP3A 高発現ラットを用いた小腸・肝臓同時灌流実験による quinidine の bioavailability (BA) 評価: 吸収時における小腸及び肝臓の初回通過効果に対する寄与を同時に評価し、更に、小腸における吸収、代謝に対する P-gp、CYP3A の関与を明らかにするために、両タンパク質高発現ラットを用いて、小腸・肝臓同時灌流実験を行ない、吸

収クリアランス、小腸、肝臓抽出率等のパラメータを算出した。

(2) 難水溶性固形製剤の *in vivo* 溶解挙動の解析と吸収動態予測への応用: 難溶解性、易吸収性である griseofulvin をモデル薬物とし、その経口投与後の血漿中濃度推移における大きな個体差の原因の解明を試みた。

① *In vivo* 溶解挙動の評価: (i) *In vivo* 経口投与実験による *in vivo* 溶解動態の評価: Griseofulvin の吸収は溶解律速であるため、deconvolution 法の適用により、吸収速度-時間曲線を求めれば、それは溶解速度-時間曲線に、ほぼ等しいと考えることができる。この手法により、griseofulvin の粉末製剤投与後の *in vivo* 溶解挙動を解析・評価した。(ii) 胃排出、及び小腸内移行性の同時評価: (i) の実験を行う際に、胃排出のマーカースとして得る theophylline、また盲腸到達時間を算出することで小腸内移行性を見積もるために sulfasalazine を同時投与し、個体毎の胃排出、小腸内移行性を併せて評価し、griseofulvin の *in vivo* 溶解挙動との関連性を分析した。

(3) 輸送担体を介して吸収される薬物の吸収挙動の予測: 代表的な輸送担体として PEPT1 に着目し、その代表的な基質 cephalixin の吸収に関して検討を行った。

① 受動拡散による吸収の評価: 十二指腸から回腸下部にかけて、大過剰の glycyl-proline 共存下で吸収実験 (*in situ* closed loop法) を行い、受動拡散による吸収速度定数を求めた。一方、cephalixin の吸収に関する濃度依存性を解析することにより PEPT1 による吸収特性を評価した。

② 上記検討に基き得られた pharmacokinetic parameter を利用し、GITA model による解析、予測を行うことにより、cephalixin 経口投与後の吸収における PEPT1 の寄与を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) Quinidine の初回通過効果に対する P-gp 及び CYP3A の寄与の定量的評価: 対照ラットを含めて、異なる 4 つのレベルで P-gp、CYP3A を発現するラット群を用い、quinidine の初回通過効果に対する小腸及び肝臓の寄与を定量的に評価した。小腸・肝臓同時灌流実験を行ったところ、P-gp、CYP3A の発現レベルに関わらず、quinidine の小腸からの吸収クリアランスは、ほぼ一定であることが示された。一方、肝抽出率は、*in vitro* 代謝実験で評価した testosterone の肝代謝固有クリアランスと良好な相関性を示した。また、小腸抽出率も同様に評価した testosterone の小腸固有クリアランス、また rhodamine 123 の透過より算出した *in vitro* P-gp 活性との間に有意な相関性が見出された。そこで次に、これまでに得られた結果を重回帰分析したところ、quinidine の初回通過効果における肝臓、小腸の寄与は、ほぼ 2 対 1 であることが明らかとなった。また、小腸における初回通過効果、即ち、小腸抽出率に対する P-gp と CYP3A の寄与については、CYP3A の寄与が大きいものと推定された。今後は、実際に灌流実験を行ったラットより単離した小腸粘膜中に発現している P-gp、CYP3A 量を定量し、小腸抽出率、吸収クリアランス等との関係を検討して行く。

(2) 難水溶性固形製剤の *in vivo* 溶解挙動の解析と吸収動態予測への応用: Griseofulvin をモデル薬物として用い、難水溶性薬物に見られる吸収挙動の大きな個体内、個体間変動について焦点を絞り検討を加えた。Griseofulvin のような難水溶性、易吸収性の薬物の場合、その吸収挙動を律速するのは、その溶解挙動、あるいは胃排出挙動となると考えられたため、胃排出のマーカースとして theophylline を、また胃排出後の小腸内移行性のマーカースとして sulfasalazine を同時に

経口投与し、胃排出、小腸内移行性と griseofulvin の吸収挙動との関連性を分析した。その結果、胃排出はいずれの個体においても比較的速やかであり、その個体差も、griseofulvin の吸収挙動において観察された個体差と比較して小さなものであった。一方、deconvolution法により評価した griseofulvin の *in vivo* 溶解挙動は、griseofulvin の吸収挙動を良く反映したものであり、*in vivo* 溶解挙動の個体差が griseofulvin の吸収挙動の個体差の原因であることが明らかとなった。この *in vivo* 溶解挙動と胃排出挙動を示す胃排出速度定数との間には相関性は認められず、*in vivo* 溶解挙動と胃排出挙動の間には関連性がないものと考えられた。一方、sulfasalazine が盲腸付近に到達した際に、腸内細菌の持つ azoreductase により分解され生成する sulfapyridine の血中出現時間より見積もった盲腸到達時間と griseofulvin の *in vivo* 総溶解量、AUC は有意な相関性を示した (Fig. 1)。このことから、

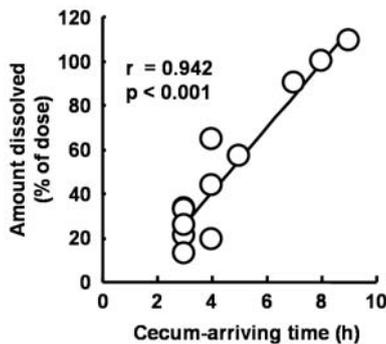


Fig. 1 Significant correlation between *in vivo* dissolution and cecum-arriving time

griseofulvin の *in vivo* 溶解挙動は、その小腸内移行性の変動との間に有意な相関関係が有ることが明らかとなり、小腸内移行性の変化が griseofulvin の溶解挙動に影響していることが示唆された。今後は、得られた結果をもとに、個々のラットについての詳細な吸収挙動の描写を試みるとともに、吸収挙動

の大きなバラツキの原因であることが明らかとなった *in vivo* 溶解挙動を改善し得る製剤の検討を行う予定である。

(3) 輸送担体を介して吸収される薬物の吸収挙動の予測：代表的な輸送担体として PEPT1 に着目し、その代表的基質のひとつである cephalexin をモデル薬物として、その経口吸収における PEPT1 の寄与の定量的評価を試みた。ここでは、消化管各部位において cephalexin に対する PEPT1 輸送活性と受動拡散による吸収性を評価し、かつ経口投与後の消化管内移行性を考慮することにより、経口投与後の cephalexin の消化管吸収における PEPT1 の寄与の定量的評価を目指した。消化管各部における cephalexin の吸収性の評価には *in situ* closed loop 法を用い、生理的条件下での PEPT1 の寄与を評価するために、実際の消化管内の環境を模した条件として、小腸上部と下部において異なる管腔内 pH を設定した。PEPT1 輸送特性、受動拡散による吸収特性は、cephalexin の吸収に対する濃度依存性及び Glycyl- proline による競合阻害の影響などを見積もることにより評価した。その結果、cephalexin の吸収性は部位により異なり、回腸下部を除いて飽和性を示すことが明らかとなった。PEPT1 を介した吸収性の指標である見掛けの吸収速度定数 ka^{PEPT} は、空腸上部付近で最も大きく、受動拡散による吸収性を示す速度定数 ka^{pass} に対する比も最大値を示し、cephalexin の吸収に対する PEPT1 輸送活性の寄与が高いことが示された。一方、回腸における ka^{PEPT} は小さく、 ka^{pass} に対する比も他の部位と比べ小さくなく、PEPT1 輸送活性の寄与が相対的に小さいことが明らかとなった。次に、これらの結果に加え、*in vivo* 経口投与時に薬物の吸収挙動に大きな影響を与える要因である消化管内移行性を考慮に入れるため、当研究室で構築した

GI-Transit-Absorption model (GITA model) を用いることで、経口投与後のcephalexinの吸収挙動の予測を試みたところ、cephalexinの血漿中濃度-時間推移を極めて良好に予測することに成功した(Fig. 2)。引き続き、GITA modelによるsimulation結果と *in situ*

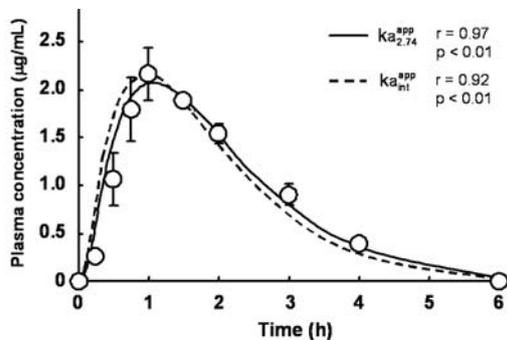


Fig. 2 Prediction of plasma concentration-time profile of cephalexin after oral administration.

closed loop法により評価したPEPT1或いは受動拡散による吸収性を示す見掛けの吸収速度定数を用いることにより、経口投与後のcephalexinの吸収におけるPEPT1の寄与を評価した。その結果、PEPT1を介した吸収は、全体の60%程度であり、PEPT1の寄与は小腸上部のほうが大きく、下部ではむしろ受動拡散による吸収の方が大きい傾向にあると推定された(Fig. 3)。また、経口投与後のPEPT1の寄与は、その輸送活性が最も高い空腸上部ではなく、空腸下部で最も大きいものと推定された(Fig. 3)。このことは、経口投与後の薬物の吸収にとって、小腸各部位における吸収性は重要ではあるものの、各部位における

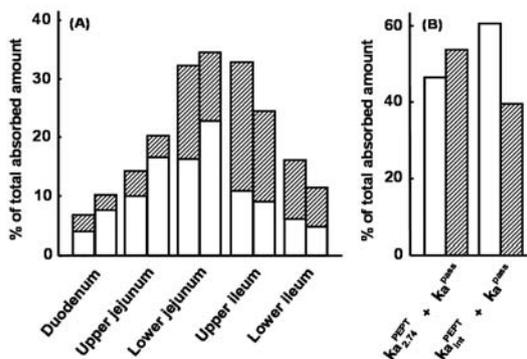


Fig. 3 Contribution of PEPT1 and passive diffusion to cephalexin absorption in each intestinal segment after oral administration. (A) Left or right bar in each segment represents the contribution calculated with k_a^{PEPT} and k_a^{pass} or k_a^{PEPT} and k_a^{int} , respectively. (B) Contribution of PEPT1 and passive diffusion in whole small intestine. □, PEPT1; ▨, passive diffusion.

薬物の滞留性が、実質的な吸収速度、吸収量に大きな影響を及ぼすことを示している。さらに、本解析法を用い、PEPT1が機能せず、cephalexinの吸収が受動拡散のみで起こるものと仮定した場合の経口吸収挙動を推定したところ、吸収挙動の詳細は異なるものの、得られるbioavailabilityは、実測値と大きな違いがないものと推定され、cephalexinの吸収に対するPEPT1の役割は、受動拡散によって十分補えるものであることが示唆された。今後は、今回の結果を基に、他のPEPT1基質についても経口投与後の吸収に対するPEPT1の寄与の推定を可能にすることを目指す。

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2件)

- (1) T. Hironaka, S. Itokawa, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura: Quantitative evaluation of PEPT1 contribution to oral absorption of cephalexin in rats. *Pharm. Res.*, 査読有, 26 (1) 40-50 (2009).
- (2) Y. Fujioka, Y. Metsugi, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura: Evaluation of *in-vivo* dissolution behavior and GI transit of griseofulvin, a BCS class II drug. *Int. J. Pharm.*, 査読有, 352 (1-2) 36-43 (2008).

[学会発表] (計7件)

- (1) 檜垣 和孝: Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) による難溶性薬物の吸収挙動の改善: 第14回創剤フォーラム若手研究会 2008年12月13日 (岡山大学薬学部).
- (2) 飯田浩之: 小腸初回通過効果におけるP-糖タンパク質及びCYP3Aの寄与の定量的評価: 日本薬物動態学会第23年会 2008年10

月 30 日 (熊本市市民会館ほか).

(3) 越智紀喜: GITA model に基く P-糖タンパク質基質の吸収挙動評価: 日本薬物動態学会第 23 年会 2008 年 10 月 30 日 (熊本市市民会館ほか).

(4) 弘中貴成: 消化管内移行性及び消化管各部位での輸送活性に基いたセファレキシンの消化管吸収における PEPT1 の寄与に関する定量的評価: 日本薬剤学会第 23 年会 2008 年 5 月 20 日 (札幌コンベンションセンター).

(5) T. Kimura: Improvement of oral absorption behavior of poorly water-soluble drug using SMEDDS: Pharmacokinetic analysis and prediction based on GITA model. 34th Annual meeting and exposition of the controlled release society. 2007 年 7 月 7-11 日 (Long Beach, California, USA).

(6) K. Higaki: Improvement of oral absorption behavior of griseofulvin, a BCS class II drug, by SMEDDS and prediction of absorption kinetics based on GITA model. 4th World conference on drug absorption, transport and delivery. 2007 年 6 月 20-22 日 (金沢エクセルホテル東急).

(7) Y. Fujioka: Pharmacokinetic analysis and prediction of absorption behavior of griseofulvin, a BCS class II drug, after oral administration based on GITA model. 4th Pharmaceutical sciences world congress. 2007 年 4 月 22-25 日 (RAI congress center, Amsterdam, Netherlands).

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 聰城郎 (KIMURA TOSHIKIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 10025710

(2) 研究分担者

檜垣 和孝 (HIGAKI KAZUTAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 60284080

大河原 賢一 (OOGAWARA KENICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 30291470

(3) 連携研究者

川井 恵一 (KAWAI KEIICHI)

金沢大学・医学部・教授

研究者番号: 30204663