

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06808

研究課題名(和文) 脂質分散製剤における新規薬物消化管吸収性予測法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel prediction method for oral absorption of drugs from lipid based formulation

研究代表者

田中 佑典 (Tanaka, Yusuke)

広島国際大学・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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では脂質分散製剤(LBF)における薬物経口吸収メカニズムを明らかにした。種々の薬物を含有させたLBFを調製し、消化試験を行った結果、薬物はLBFの組成に依存して異なる溶解挙動を示した。しかしながら、in vivo吸収試験では、消化試験からの予測とは異なる吸収パターンが認められた。さらに詳細な検討を行ったところ、この原因は消化の遅い製剤では薬物が残存した油脂中に取り込まれるため見かけの膜透過性が低下する、油脂の消化により薬物が非晶質として析出し再溶解速度が上昇する、消化産物の薬物溶解能が製剤の組成により異なるためであると考えられた。本知見はLBF開発において有用であると考えられる。

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。しかし、LBFからの薬物吸収機構は十分に解明されていないため、可溶化技術としてLBFを選択しにくいことが問題となっている。本課題ではLBFからの薬物吸収機構を明らかにした。これにより、LBFからの薬物吸収性を予測することが可能になるものと期待される。従って、これまで優れた薬効を有していたにもかかわらず、低溶解性のため開発途中でドロップアウトしていたような化合物を開発することができ、また、LBF処方最適化が容易となるため、優れたLBFの開発が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify absorption mechanisms after oral administration of drugs from various lipid-based formulations (LBFs). In in vitro digestion study, various solubilization behavior of drugs was observed depending on compositions of LBFs. However, the oral absorption of drugs in vivo were different than expectation from the results of in vitro digestion study. From a series of analysis, this discrepancy may be caused by lowered free concentration in the gastrointestinal tract owing to incorporation of drugs into the undigested lipid, improved re-solubilization of amorphous precipitate and different solubilization capacity of colloidal species composed of bile components and digestion products. The present study revealed detailed absorption mechanisms from LBFs with different compositions. Our findings may be useful for evaluation of drug absorption for from LBFs.

研究分野：薬剤学

キーワード：消化管吸収 過飽和溶解 脂質分散製剤 BCS IVIVC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質分散製剤 (Lipid Based Formulation: LBF) は油脂や界面活性剤から成る多成分系システムで、通常、薬物を予め製剤中に溶解しておくことで薬物吸収性を改善する。しかしながら、その吸収機構は極めて複雑であり、現在のところ、その評価/予測は極めて困難である。投与された LBF はまず消化管液に分散する。次に、LBF はリパーゼによる消化を受け、脂質の消化産物である脂肪酸と胆汁酸との混合ベシクルを形成する。さらに混合ベシクルは胆汁による希釈を受けミセルとなり、膜表面に到達したミセル中の脂肪酸は小腸から吸収される。この過程において、LBF の薬物可溶性は低下していくため、高濃度に LBF に溶解していた薬物が水相中に放出され、薬物が一時、過飽和状態となる。この時、水相中では薬物はコロイド中あるいはフリーの薬物として存在しているが、最終的にフリーの薬物が小腸上皮細胞膜から吸収される。一方、過飽和状態は熱力学的に不安定であるため、薬物が析出するリスクもある。さらに、薬物の消化管内での溶解状態は LBF の処方によっても大きく変わってくるのが予想される。

2. 研究の目的

本課題では、LBF からの薬物吸収性予測法の構築を最終的な目的として、様々な組成の LBF を調製し、各種 LBF からの薬物吸収機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) リトナビル(RTV)を用いた検討

LBF の調製

長鎖脂肪酸で構成される油脂 (LCT) を含む LBF (Type II-LC)、中鎖脂肪酸で構成される油脂 (MCT) を含む LBF (Type IIIA-MC、Type IIIB-MC) および界面活性剤と溶剤のみを含む LBF (Type IV) を調製した。そして、これらの LBF に RTV をそれぞれの溶解度の 85% の濃度で溶解させた。

In vitro 分散/消化試験

人工腸液に各 LBF を分散させ、10 分攪拌後、パンクレアチン (10000 TBU/mL) を添加し LBF を消化させた。Type IV に関しては油脂を含まないため分散のみ行った。経時的にサンプルを採取し、油相、水相、沈澱相中の薬物分布を評価した。また、一部のサンプルは in vitro 膜透過試験に使用した。

In vivo 経口吸収試験

各 LBF を 5% w/w の濃度で水に分散させ、ラットに 1mL 経口投与した。投与後、経時的に採血を行い、血漿中の薬物濃度を測定した。

In vitro 膜透過試験

透析膜 (MWCO: 1000 Da) を装着した拡散セルのドナー側に、in vitro 分散/消化試験で得られたサンプルを添加した。そして、アクセプター側から経時的にサンプルを採取し、サンプル中の薬物濃度を測定した。そして、得られた透過速度をドナー溶液中の溶解薬物濃度で除すことにより見かけの一次透過速度定数 (k_{app}) を算出した。

(2) サキナビル(SQV)を用いた検討

LCT を含む LBF (LCF)、MCT を含む LBF (MCF)、MCT および短鎖脂肪酸で構成される油脂 (SCT) を含む LBF (SMCF) を調製した。そして、これらの LBF に SQV をそれぞれ 26.7 mg/g の濃度で溶解させた。そして、各 LBF を用いて、in vitro 分散/消化試験、in vivo 経口吸収試験、in vitro 膜透過試験を行った。

4. 研究成果

(1) RTV を用いた検討

図 1 は in vitro 分散/消化試験開始 30、60 分後の各相における RTV の分布を示している。Type II-LC では試験後、大部分の薬物が油相に溶解していた。これは LCT の消化が MCT に比べ遅いためであると考えられた。一方、Type IIIA-MC では、ほとんどの RTV が水相に溶解していた。また、Type IIIB-MC および Type IV においては、分散/消化中に RTV が析出し、その程度は Type IV でより顕著であった。従って、Type IIIB-MC および Type

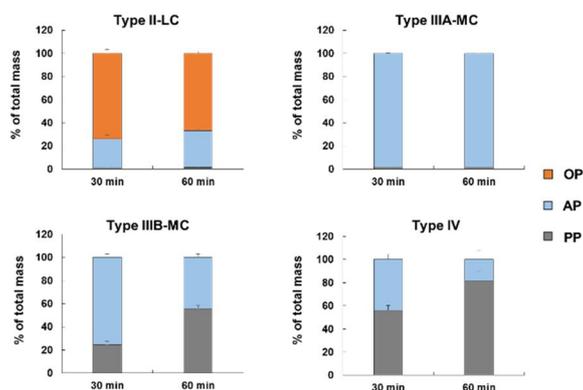


Fig. 1 In vitro 消化試験後の各相における薬物分布

IVでは(特にType IV)、LBF化による吸収改善が期待できないと予想された。続いて、各製剤をラットに経口投与し、消化管吸収性を評価した(RTV投与量: Type II-LC: 0.34 mg/rat, Type IIIA-MC: 0.72 mg/rat, Type IIIB-MC: 1.706 mg/rat, Type IV: 3.63 mg/rat, 懸濁液: 1.706 mg/rat)(図2)。また、RTVの投与量が製剤により異なるため、血漿中濃度をそれぞれの投与量で補正した値を示した(% dose/L)。本検討では吸収に及ぼす代謝の飽和現象の影響を排除するため、ラットに1-aminobenzotriazoleを事前投与した。Type IIIA-MC投与後の血漿中濃度は、懸濁液投与群と比較して顕著に増大していた。これは、Type IIIA-MCが消化されても、RTVの溶解が維持されたためと考えられた。一方、Type II-LCの場合、in vitro消化試験では薬物の溶解が維持されていたにもかかわらず、吸収改善は認められなかった。これはin vitro膜透過試験において(図3)、Type II-LCのk_{app}が各LBFの中で最も低かったことから、消化管内での見かけの透過性が低下したことが原因と考えられた。また、Type IIIB-MCおよびType IV投与群では、分散/消化中にRTVが析出したにもかかわらず、懸濁液投与群よりも大幅な吸収改善が見られた(図2)。そこで、析出物の粉末X線回折測定を行ったところ、RTVは非晶質として析出していることが明らかとなり、再溶解速度の上昇により、吸収が改善したものと考えられた。

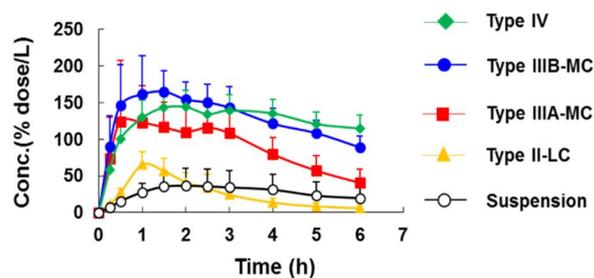


図2 各LBF経口投与後の血漿中RTV濃度-時間推移

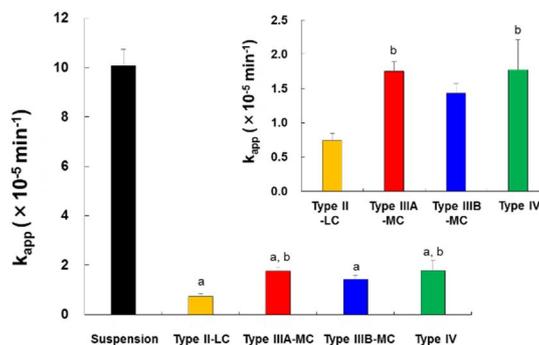


図3 ドナー溶液中の溶解薬物濃度を基に算出した見かけの一次透過速度定数(k_{app})。Results are expressed as mean values with vertical bars showing the S.D. of three experiments. ^aStatistically different when compared with the data of suspension ($p < 0.01$), and ^bstatistically different when compared with the data of Type II-LC ($p < 0.05$).

(2)SQVを用いた検討

図4は各LBFを3% w/wの濃度で水に分散させ、ラットに1 mL経口投与した後の血漿中濃度-時間推移を示している。またreferenceとしてSQVの懸濁液も投与した。SQVの投与量はすべての製剤で0.8 mg/ratである。SQVの経口吸収は2相性を示しており、First peakは製剤間で大きく変化していたが、second peakでは顕著な差は見られなかった。従って、LBFの組成はSQVの吸収初期に影響していると考えられた。そのため、Table 1には第1 C_{max}および0-1.5hまでのAUCの結果を記載した。SMCF投与群の第1C_{max}およびAUCの値は懸濁液投与群とほぼ同程度であった。一方、MCF投与群、LCF投与群では、C_{max}、AUCの値が懸濁液、SMCF投与群よりも低い値となっており、特にLCF投与群ではAUCがSMCF投与群の1/5以下まで低下していた。以上より、油脂を構成している脂肪酸の炭素数が長くなるほどSQVの吸収が低下するということが明らかとなった。

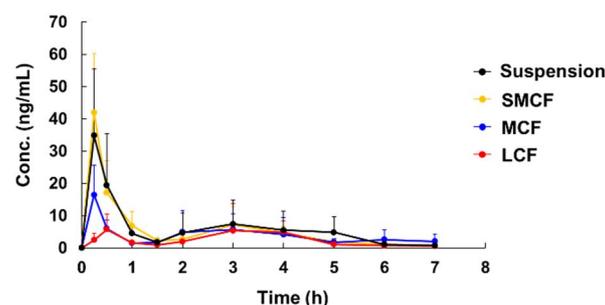


図4 各LBF経口投与後の血漿中RTV濃度-時間推移 (n=4)。Results are expressed as mean values with vertical bars showing the S.D. of four experiments.

Table 1 PK parameters

| | 懸濁液 | SMCF | MCF | LCF |
|--|-------------|-------------|------------|-----------|
| First C _{max} (ng/mL) | 34.8 ± 20.8 | 41.9 ± 18.2 | 17.1 ± 8.0 | 5.8 ± 4.6 |
| AUC _{0-1.5 h} (ng ^h /mL) | 18.7 ± 9.1 | 20.9 ± 7.3 | 7.6 ± 2.8 | 3.8 ± 2.5 |

Statistical significance: $p < 0.05$ for comparisons between Suspension and SMCF, and between MCF and LCF. $p < 0.01$ for comparisons between SMCF and LCF.

続いて、in vitro消化試験によりLBFを15分および30分消化させたときの各相におけるSQV分布を示した(図5)。

パンクレアチン添加後15分でSMCFはほぼ完全に消化され、油相が消失していることが示され

た。その結果、SMCF による薬物溶解能が低下したため、SQV は20-30%程度析出していた。しかしながら、析出は限定的であり、SQV はある程度、水相で溶解状態が維持されていた。また、SMCF 同様、MCF も15分で完全に消化され、15分時点ではほぼ100%水相に溶解していた。しかし、30分時点では20%程度薬物が析出していた。一方、LCF では、リパーゼによる消化が遅いため、

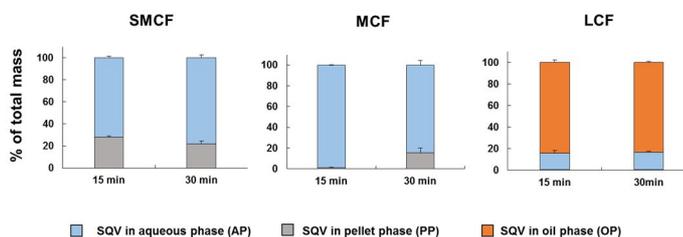


図5 LBF消化15、30分後の各相におけるSQV分布
Results are expressed as mean values with vertical bars showing the S.D. of three experiments.

30分時点においても油相が残存し、SQV はその大部分が油相中に分布していた。SQV の in vivo 経口吸収性は、SMCF で最も高く、次いで MCF, LCF と低下していたが、in vitro 消化試験の結果、いずれの LBF においても SQV はある程度、溶解状態が保たれており、LBF の消化に伴う析出は吸収の主要因ではないと考えられた。

次に in vitro 膜透過試験を行い、アクセプター側の SQV 濃度-時間推移から求めた透過速度を Donor 溶液中の総 SQV 濃度で除すことにより、みかけの1次透過速度定数(k_{app})を算出した(図6)。基本的にフリーの薬物のみが透析膜を透過できるため、 k_{app} はフリー薬物の1次透過速度定数に全薬物に対するフリー濃度の割合を乗じた値として表すことができる。従って、 k_{free} は donor 溶液にかかわらず一定と仮定すると、 k_{app} の変化はフリー薬物濃度の変化を反映している。

$$k_{app} (\text{min}^{-1}) = \frac{\text{透過速度} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})}{\text{Donor溶液中の総SQV濃度} (\mu\text{g}/\text{mL})}$$

$$k_{app} = f \cdot k_{free}$$

k_{free} : フリー薬物の1次透過速度定数

$$\text{フリー濃度の割合} (f) = \frac{\text{フリーSQV濃度}}{\text{総SQV濃度 (固体+水相+油相)}}$$

各 LBF の分散液では、 k_{app} の値もほぼ同程度となった。従って、各分散液中ではフリーの SQV 濃度は同じであったと考えられた。また、いずれの分散液においても、 k_{app} は懸濁液の値より60%程度まで低下しており、LBF 中への取り込みによって、フリー濃度が低下したためと考えられた。また、それぞれの LBF を消化させた場合では、 k_{app} は SMCF で最も高く、次に MCF、そして LCF では最も低い値となった。LCF で特にフリー濃度が低くなった理由は、SQV が未消化の油脂および遊離した長鎖脂肪酸ミセルへの取り込みによるものと考えられた。また、これらの結果は in vivo 経口吸収試験の結果と一致していたことから、各製剤からの SQV の吸収は消化管内のフリー濃度に依存していたものと考えられた。

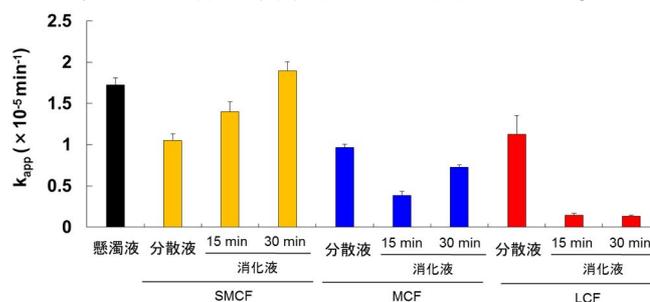


図6 Donor溶液中の総SQV濃度を基に算出したみかけの1次透過速度定数(k_{app})

以上、薬物の in vivo 吸収性は LBF の組成によって大きく変化することが明らかとなった。LBF からの薬物吸収性を評価するためには、LBF の消化過程における薬物の溶解挙動のみならず、析出物の再溶解過程や膜透過過程も併せて評価し、統合的に吸収性を予測する必要があると考えられた。

本課題で得られた知見は、LBF からの薬物吸収性予測法を構築するためには極めて重要であり、LBF の開発に大きく貢献できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yusuke Tanaka, Hiroataka Doi, Takeru Katano, Satoshi Kasaoka. | 4. 巻 157 |
| 2. 論文標題 Digestion and Drug Permeation/Re-Dissolution on Absorption of Orally Administered Ritonavir as Different Lipid-Based Formulations | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Eur J Pharm Sci. | 6. 最初と最後の頁 105604 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2020.105604 | 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 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Yusuke Tanaka, Tri-Hung Nguyen, Estelle J.A. Suys, Christopher J. H. Porter. | 4. 巻 In press |
| 2. 論文標題 Digestion of lipid-based formulations not only mediates changes to absorption of poorly soluble drugs due to differences in solubilisation, but also reflects changes to thermodynamic activity and permeability. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Mol. Pharm. | 6. 最初と最後の頁 In press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00015 | 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 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 田中佑典 |
| 2. 発表標題 消化管内における薬物のin vivo溶解挙動 |
| 3. 学会等名 溶出試験テクニカルセミナー2018（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田中佑典, Tri-Hung Nguyen, Christopher J. H. Porter |
| 2. 発表標題 脂質分散製剤の組成が薬物の小腸膜透過に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本薬剤学会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|