

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590158

研究課題名（和文）薬物の消化管内溶解挙動及び初回通過効果の解析とその経口吸収挙動予測への応用

研究課題名（英文）Analysis of dissolution kinetics and first-pass elimination of orally administered drugs and its application to prediction of 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・特命教授

研究者番号：10025710

研究成果の概要（和文）：難溶解性、易吸収性薬物 griseofulvin の経口吸収挙動を詳細に検討した結果、その吸収挙動の大きな変動は、小腸内滞留性の個体差に起因した溶解挙動の変動によるものと考えられた。個々の消化管内移行性と推定した *in vivo* 溶解性を利用し、個々の吸収挙動の描写に成功した。一方、SMEDDS 製剤化により、bioavailability の向上、個体間変動の軽減に成功した。Digoxin の小腸初回通過効果に対する CYP3A と P-gp の影響を検討したところ、小腸抽出率に対する関与が示唆されたが吸収クリアランスへの影響は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The large variability in absorption behavior of griseofulvin would be attributed to the large variability in *in vivo* dissolution behavior after oral administration. We successfully described the individual absorption behavior of griseofulvin based on the data of gastrointestinal transit and the estimated *in vivo* dissolution behavior. SMEDDS significantly increased the bioavailability and reduced the interindividual difference in absorption behavior of griseofulvin. Both CYP3A and P-gp significantly contributed to the intestinal extraction of digoxin, but neither would affect the absorption clearance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：消化管吸収、初回通過効果、難溶解性薬物、P-glycoprotein、Cytochrome P450 3A、自己乳化型マイクロエマルション製剤（SMEDDS）

1. 研究開始当初の背景

疾病の薬物療法には、その利便性から、依然として経口製剤が汎用されている。しかしながら、経口投与された薬物が、その主要な吸収部位である小腸から吸収されるまでの経

路は複雑であり、そのため安定した吸収率を得ることが困難となる場合がある。特に、難溶解性、易吸収性の薬物は、その吸収動態に大きな個体内、個体間変動が見られるため、臨床的にも大きな問題となっている。また、

近年では、難溶解性化合物が新薬候補化合物となる場合が多く、新薬開発においても、これら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。一方、消化管粘膜における代謝及び分泌が、肝臓以外の初回通過効果の要因として、近年、注目されている。中でも代表的な酸化的代謝酵素cytochrome P450 3A (CYP3A)と排泄系輸送担体P-glycoprotein (P-gp)の重要性が指摘されている。この両タンパク質は基質認識性が類似しており、特に、高脂溶性で、難溶解性を示す多くの薬物のbioavailability (BA)の決定に関与していると考えられているが、同時に、それら薬物のBAの大きな個体内、個体間変動の原因とも考えられている。この様に、難溶解性化合物の消化管吸収には、多くの解決すべき問題点があるのが現状であり、これらを克服し、安定した吸収動態、ひいては安定した薬理効果につながる製剤の開発、さらにはその予測が可能となれば、その学問的意義、社会的意義は、極めて大きい。

2. 研究の目的

前述した背景のもと、本研究では、経口吸収挙動が複雑な、難溶解性、易吸収性薬物に焦点を絞り、まず、既に一定の成果を得ているgriseofulvinについて、粉末製剤投与後の吸収動態を詳細に解析し、その結果に基づき、ラット個々の吸収挙動の描写を試みる。更に、個体内、個体間変動の小さい、安定した吸収挙動、薬理効果に結びつく製剤開発を目指す。申請者らは既に、薬物を水溶液として投与した場合、ラット、ヒトにおいて、薬物の経口吸収性の予測に成功している。固形製剤に関しても、theophyllin、griseofulvinについて成功しており、これらを基盤として、新たな製剤として投与した後の薬物吸収挙動の予測を目指す。次いで、小腸・血管同時灌流法を

中心に、小腸粘膜におけるCYP3Aによる代謝及びP-gpによる分泌を定量的に評価・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活性との関係を解析することにより、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ことを目指す。

3. 研究の方法

(1)難溶解性薬物の *in vivo* 溶解挙動の解析と吸収動態予測への応用: モデル薬物 griseofulvin の *in vivo* 溶解挙動と消化管内移行動態を詳細に解析し、個体差の原因解明と、*in vivo* 吸収動態の精密な予測への応用を試みた。

① *In vivo* 溶解挙動の評価: (i) 経口投与実験による *in vivo* 溶解動態の評価: Griseofulvin の吸収は溶解律速となるので、deconvolution 法により吸収速度-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、小腸内移行性の同時評価: 胃排出のマーカースとして theophylline を、小腸内移行性のマーカースとして 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。また、溶液の消化管内移行性、glass beads を用いて評価した粉末の消化管内移行性を利用し、ラット個々における griseofulvin の消化管内移行動態の詳細な描出を試みた。

② *In vivo* 吸収動態の描出: ①の検討結果に基づき、溶液、或いは粉末としての消化管内移行性を記述する速度定数の算出、及び消化管各部位での griseofulvin 溶解性の推定を試みる。また、*in situ closed loop* 法により、消化管各部位での吸収性を評価した。これらの結果を利用し、溶解過程を組み込んだ GITA

model を応用することにより、個々のラットにおける吸収動態の描出を試みた。

(2) 自己乳化型マイクロエマルジョン製剤による難溶解性薬物の吸収挙動改善: Griseofulvin の自己乳化型マイクロエマルジョン製剤 (Self-microemulsifying Drug Delivery System; SMEDDS) の調製は、oil、surfactant、cosurfactant 成分を用い、titration 法により pseudo-ternary phase diagram を作成することにより行なった。得られた SMEDDS 製剤をラットに経口投与後、griseofulvin の血漿中濃度推移を測定することにより、本製剤による吸収性改善について評価を行なった。

(3) P-gp、CYP3A 高発現ラットを用いた小腸・血管同時灌流実験による digoxin の小腸抽出率の評価: P-gp、CYP3A 高発現ラットは、dexamethasone を 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作製した。P-gp、CYP3A の発現の程度は、それぞれ、rhodamin123 の膜透過、testosterone の代謝により定量的に評価した。Digoxin の小腸における吸収、また小腸における初回通過効果の評価は、小腸・血管同時灌流実験により行なった。同実験により、以下のパラメータを算出した。(a)小腸における吸収クリアランス $CL_{abs} = Q_l \times (C_{in} - C_{out}) / C_{in}$; 小腸における抽出率 $E_{intestine} = 1 - Q_v \times C_{portal} / (Q_l \times (C_{in} - C_{out}))$ (Q_v , 血管側灌流速度; C_{portal} , 門脈回収液中濃度; C_{in} , 管腔側灌流液中初期濃度; C_{out} , 管腔側回収液中濃度)。これらパラメータにより、digoxin の小腸における吸収性、代謝による抽出率などを定量的に把握できる。得られた結果を総合して、P-gp と CYP3A の小腸よりの吸収、及び小腸抽出率への影響について考察した。

4. 研究成果

(1) 難溶解性薬物の in vivo 溶解挙動の解析と吸収動態予測への応用: Griseofulvin は、難溶

解性ではあるが吸収性には優れているため、その吸収動態は、自身の溶解挙動により律速されていると考えられた。そこで、個々のラットについて、griseofulvin の in vivo 溶解挙動を解析すると共に、同時投与した theophylline の吸収動態より胃排出挙動を、同じく同時投与した sulfasalazine の吸収動態(分解生成した sulfapyridine の吸収)より小腸内移行性(盲腸到達時間)を評価した。盲腸到達時間と消化管内平均滞留時間が比例関係にあるものと仮定し、glass beads の移行性より求めた標準消化管内平均滞留時間/盲腸到達時間比を利用し、各ラットにおける消化管内平均滞留時間を推定した。また、胃排出挙動、溶解挙動のデータを利用し、消化管各部位における in vivo 溶解速度定数の評価を試みた。その結果、得られた griseofulvin の in vivo 溶解速度定数には、大きな個体差、及び部位差が見られたが、平均値は十二指腸から回腸下部までほぼ同程度の値を示し、興味深いことに、その値は先に示した MREVID を溶媒として用いて得られた in vitro 溶解速度定数にほぼ一致していることが明らかとなった。次いで、ここまでの検討で得られた結果を利用し、GITA model を用いて、各個体の血漿中濃度推移の描写を試みた。その結果、bioavailability、胃排出挙動、及び小腸内移行性など、ラット間でかなり異なっているにも関わらず、ほとんどのラットにおいて実測値を良好に反映する理論曲線を得ることができた。このことは、薬物の消化管内移行性と in vivo 溶解挙動に関して、ある程度の情報が得られれば、難溶解性薬物の吸収挙動を推定できる可能性を示している。

(2) 自己乳化型マイクロエマルジョン製剤による難溶解性薬物の吸収挙動改善: ここまで示してきたように、griseofulvin の平均血漿中濃度推移の推定、解析的手法によるラットご

との吸収挙動の描写は可能となったが、粉末製剤経口投与後のin vivo溶解挙動の変動に起因した吸収挙動の大きな個体差は、依然として改善すべき大きな問題点である。そこで、この不安定な溶解性を改善する製剤的手法として、SMEDDSを選択し、griseofulvinの吸収挙動の改善を試みた。Titration法によりpseudo-ternary phase diagramを作成し、最適な成分とその比率を検討したところ、cremophor EL (surfactant)とcarbitol (co-surfactant)の混合比を1:1 (w/w)に固定し、capryol 90 (oil)とcremophor EL/carbitolの混合比が2:8 (製剤A)、3:7 (製剤B)、4:6 (製剤C)の場合に、水分含量の変動に対して比較的広いmicroemulsion形成領域を持つことが明らかとなった。次に、これらSMEDDS製剤をラットに経口投与した後のgriseofulvinの吸収挙動を検討したところ、いずれのSMEDDS製剤においても、投与後、比較的速やかにgriseofulvinの吸収が始まり、粉末投与の場合に比べ、顕著に高い血漿中濃度推移が得られた。中でも製剤Bは、最も高いbioavailabilityを示し、かつ個体間変動も小さいこと、更には、microemulsionとして投与した場合の吸収挙動との差がほとんど認められなかったことなどから、最も優れた製剤であると考えられた。一方、対照として行ったPEG400溶液投与群では、投与後、非常に速やかに吸収が起こり、高いC_{max}が得られたものの、個体間変動が大きく、bioavailabilityは粉末製剤を下回った。これは、投与後に、PEGが希釈されたため、griseofulvinが析出したことに起因するものと考えられた。SMEDDS製剤投与後は、希釈などによる析出も起こることなく、個体差の少ない、極めて良好な吸収挙動を示すことが明らかとなった。次いで、SMEDDS製剤を経口投与した後に、消化管内で生成したmicroemulsionからのgriseofulvin放出の機

構について、胆汁及び膵リパーゼの影響を検討した。その結果、胆汁及び膵リパーゼによりgriseofulvinの放出が促進されることが明らかとなった。また、膵リパーゼの添加はlipolysisを促進していることも示された。これらの結果は、in vivoにおける現象を定量的に説明できるものではなかったが、胆汁の界面活性作用と膵リパーゼによるlipolysisがmicroemulsionからの薬物放出に寄与していることを示唆するものであった。

(3) P-gp、CYP3A 高発現ラットを用いた小腸・血管同時灌流実験によるdigoxinの小腸抽出率の評価: 小腸での初回通過効果に対するP-gp及びCYP3Aの寄与を分離評価するために、CYP3Aの基質として知られるmidazolam (MDZ) をCYP3Aの競合的阻害剤として選択し、小腸・血管同時灌流実験を行い、吸収クリアランス、小腸抽出率を算出し、初回通過効果を評価した。その結果、MDZ添加時においてdigoxinの吸収クリアランスに顕著な変化は見られなかった。しかしながら、小腸抽出率に関しては、MDZ濃度依存的な有意な減少が認められた。一方、MDZがP-gpに及ぼす影響については未だ議論されているところである。そこで、Caco-2細胞を用いた透過実験を行ったところ、MDZはP-gp基質薬物であるrhodamine123及びdigoxinの膜透過を有意に抑制したことから、P-gpを阻害することが明らかとなった。そこで次にMDZがdigoxinの吸収に及ぼすP-gp及びCYP3A阻害の影響を、ラット空腸を用いたin vitro膜透過実験により評価した。P-gp活性の変動は、分泌方向と吸収方向のP_{app}の比として評価した。一方、CYP3A活性の変動は、分泌方向と吸収方向のP_{app} (実験値) を利用し、P-gpに依存する分泌クリアランスと共に定義した代謝クリアランスを算出し、評価した。その結果、P-gp活性、CYP3A活性共にMDZの添加により減少して

いることが示された。次に、digoxinについて、小腸・血管同時灌流実験により得られた吸収クリアランス、小腸抽出率と、*in vitro*実験で得られたP-gp及びCYP3A活性との相関性を単回帰分析により検討した。その結果、吸収クリアランスと、P-gp活性、CYP3A活性との間に相関性は認められなかったが、小腸抽出率と両タンパク質の活性との間には、それぞれ有意な相関性が認められた。現在のところ、両タンパク質の影響を定量的に分離評価するには至っていないが、今後、P-gpあるいはCYP3Aの特異的な阻害剤等を用いることで、両者の寄与の分離評価を目指したい。

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 4 件)

- ① N. Kamada, K. Yamada, M. Odomi, T. Mukai, T. Nishibayashi, K. Ogawara, T. Kimura and K. Higaki: Sex differences in pharmacokinetics of cilostazol in rats. *Xenobiotica*, 査読有, **41** (10) 903-913 (2011).
- ② 檜垣 和孝、木村聰城郎: 自己乳化型マイクロエマルション製剤: *J. Pharm. Sci. Technol. Japan*. (薬剤学), 査読無, **70** (1) 32-38 (2010).
- ③ 檜垣 和孝: 自己乳化型マイクロエマルション製剤による吸収改善: *Farumashia*, 査読無, **45** (12) 1213-1216 (2009).
- ④ 檜垣 和孝: オーラルメディケーションにおける胃排出の重要性: *Pharm Tech Japan*, 査読無, **25** (13) 48-52 (2009).

[学会発表] (計 17 件)

- ① Arata Kuroshima: Contribution of P-glycoprotein and Cytochrome P450 3A to intestinal first-pass disposition of

loperamide in rats: 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2011.11.26-27, 名古屋大学医学部附属病院).

- ② Masato Gomi: Development of simple system for predicting oral absorption of drugs based on Gastrointestinal-Transit-Absorption (GITA) model: 第 26 回薬物動態学会年会 (2011.11.16-18, 広島国際会議場).
- ③ Arata Kuroshima: Contribution of P-glycoprotein and Cytochrome P450 3A to intestinal first-pass disposition of loperamide in rats: 第 26 回薬物動態学会年会 (2011.11.16-18, 広島国際会議場).
- ④ Masato Gomi: Prediction of oral bioavailability of drugs based on gastrointestinal-transit absorption (GITA) model: International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products (2011.6.29- 7.1, Kobe International Conference Center).
- ⑤ Naoki Kamada: IVIVC for oral absorption of cilostazol, a BCS class II drug, based on GITA (GI-transit-absorption) model: FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress (4th PSWC) (2010.11.14-18, Ernest N. Morial convention center. New Orleans, LA, USA).
- ⑥ Kazutaka Higaki: Prediction of oral bioavailability of drugs based on Gastrointestinal-transit absorption (GITA) model: FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress (4th PSWC) (2010.11.14-18, Ernest N. Morial convention center. New Orleans, LA, USA).
- ⑦ Kensuke Horiuchi: Improvement of oral absorption behavior of digoxin by self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) formulation: 第 25 回日本薬物

動態学会年会 (2010.10.7-9, 大宮ソニック
シティ, 埼玉).

- ⑧ 五味 真人: 薬物の消化管内移行性に基づいた経口吸収予測システムの構築: 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5.12-14, あわぎんホール, 徳島).
- ⑨ 鎌田 直興: ラットでのシロスタゾールの体内動態及び代謝における性差の解析: 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5.12-14, あわぎんホール, 徳島).
- ⑩ 堀内 健佑: GI-Transit-Absorption Model (GITA Model) に基づく経口吸収動態の予測と解析: 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5.12-14, あわぎんホール, 徳島).
- ⑪ 春藤 亜衣子: SMEDDS によるグリセオフルビンの吸収挙動の改善と機構解析: 第 130 回日本薬学会 (2010.3.28-30, 岡山コンベンションセンター).
- ⑫ Shota Itokawa: Prediction of oral bioavailability of drugs based on Gastrointestinal-Transit Absorption (GITA) model: 第 24 回日本薬物動態学会年会 (2009.11.27-29, 京都国際会議場).
- ⑬ Kensuke Horiuchi: Pharmacokinetic evaluation of absorption behavior of P-glycoprotein substrates based on GI-transit absorption (GITA) model: 第 24 回日本薬物動態学会年会 (2009.11.27-29, 京都国際会議場).
- ⑭ Naoki Kamada: IVIVC for oral absorption of cilostazol, a BCS class II drug, based on GITA (GI-transit absorption) model: 第 24 回日本薬物動態学会年会 (2009.11.27-29, 京都国際会議場).
- ⑮ Hitomi Koide: Contribution of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A to intestinal first-pass disposition in rats: 第 24 回日本薬物動態学会年会 (2009.11.27-

29, 京都国際会議場).

- ⑯ Kazutaka Higaki: Importance of gastrointestinal transit for oral medication: Annual conference of the German Pharmaceutical Society 2009 (2009. 9.28-10.1, Freidrich-Schiller-Universität Jena, Germany).
- ⑰ 鎌田 直興: 雌性ラットにおけるシロスタゾールの吸収動態の解析: 日本薬剤学会第 24 年会 (2009.5.21-23, 静岡県コンベンションセンター).

[図書] (計 1 件)

- ① 檜垣 和孝, 他, シーエムシー出版、難水溶性薬物の物性評価と製剤設計の新展開、2010、第 4 章 担体を利用した難水溶性薬物の製剤化 1. 自己乳化型製剤 pp151 – 159.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[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・
特命教授
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・
教授
研究者番号: 60284080

大河原 賢一 (OGAWARA 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

(3) 連携研究者

なし