

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460052

研究課題名(和文) 両親媒性包接化合物サイクリックビスデスモシドの生物薬剤学的有用性の解析

研究課題名(英文) Evaluation of biopharmaceutical usefulness of cyclic-bis-desmosides, an amphiphilic inclusion compound

研究代表者

村上 照夫 (Murakami, Teruo)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20136055

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)：植物から抽出したサイクリックビスデスモシド(T-1)は両親媒性で環状構造を有しており、シクロデキストリン(CD)と同様に、包接化合物としての利用が期待できる。本研究では、水虫の経口投与治療薬として用いられているイトラコナゾールを用い、イトラコナゾールの消化管吸収に及ぼす影響をT-1とハイドロキシプロピル-β-CD(HP-β-CD)間で比較。T-1の溶解度改善は約9倍強いものの、吸収促進作用は劣ることが分かった。その理由として、T-1は消化管内で代謝されることが認められたが、化学構造を変えることにより、安定性や脂溶性を変えることは可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cyclic-bis-desmoside extracted from plants (T-1) is an amphiphilic compound having cyclic structure, indicating that T-1 is used as an inclusion compound, as well as the cases of various cyclodextrins (CD). In this study, itraconazole, orally administered medicine for the treatment of onychomycosis, was used as a model compound with poorly water soluble, and hydroxypropyl-β-CD (HP-β-CD) was used as a clinically used potent inclusion compound for comparison. T-1 increased the water solubility of itraconazole approximately 9-fold of HP-β-CD. In contrast, however, the enhancing effect of T-1 on intestinal absorption of itraconazole was weaker than that of HP-β-CD. As one of reasons, the metabolism of T-1 in the intestine was observed. By chemical modification of T-1, more potent, safer and stable inclusion compound is expected.

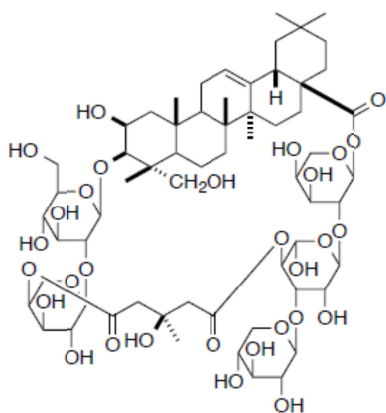
研究分野：生物薬剤学

キーワード：サイクリックビスデスモシド 難水溶性化合物 包接複合体 溶解度改善 吸収改善 シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

水溶性の包接化合物であるシクロデキストリン (CD) は、難水溶性薬物と包接複合体を形成することで薬物の溶解度を上昇させることが知られている。一方、包接複合体は水溶性であり、分子サイズが大きいことから生体膜は透過し得ないとされている。

今回使用するサイクリックビスデスモシド (Tubeimoside, T-1, 下図) は土貝母の根茎から単離された両親媒性の環状化合物である。^{1,2)} そのため、サイクリックビスデスモシドは従来の包接化合物とは異なる生物学的特性を示すと考えられる。



2. 研究の目的

サイクリックビスデスモシド, T-1 の生物薬剤学的有用性を評価するため、難水溶性薬物イトラコナゾール (ITCZ) を用い、T-1 の可溶化能を検討した。また、ラットを用いて ITCZ の消化管吸収に及ぼす影響や T-1 の安定性、Caco-2 細胞を用いて T-1 の細胞毒性、粘膜透過性等を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) ITCZ の血中濃度推移に及ぼす包接化合物の影響: T-1 および HP-β-CD に懸濁した ITCZ を、一夜絶食した SD 系雄性ラット (8~9 週齢) に経口投与 (10 mg/kg) し、血中濃度を測定した。また T-1 および HP-β-CD で溶解した ITCZ を静注投与 (0.5 mg/kg) し、同じく血中濃度を測定した。

(2) T-1 の消化管吸収・安定性評価: ラットの十二指腸、空腸、回腸部にループ (10 cm) を作成し、T-1 500 µg/ml を投与した後、1 時間後にループ内に残存する T-1 量を測定した。

(3) T-1 の化学的・酵素学的安定性評価: ラット十二指腸、空腸、回腸の 10% ホモジネートより、S9 画分を得た。S9 のタンパク濃度を 1 mg/mL に調整した後、T-1 を 100 µg/mL の濃度で添加し、経時的に T-1 濃度を測定した。別途、酸性及び中性 pH 緩衝液中での T-1 の安定性も測定した。

(4) T-1 の細胞毒性試験: Caco-2 細胞をプレートに播種し種々の濃度で T-1 を添加した。培養 1 及び 24 時間後の Caco-2 生存細胞数を計測した。

(5) T-1 の膜透過性: Transwell® 上で Caco-2 細胞膜を作成し、T-1 自身の膜透過性を評価した。また、水溶性高分子化合物 FITC-dextran 4000 (FD-4) の細胞間隙透過に及ぼす T-1 の影響を評価した。

(6) 定量法: ITCZ は HPLC で分離定量した。検出は、UV 260 nm で行った。T-1 は、LC-MS で定量した (m/z 1341.9)。FD-4 は蛍光光度計で定量した (Ex. 490 nm, Em. 535 nm)。

4. 研究成果

ITCZ の溶解度に及ぼす T-1 および HP-β-CD の影響: ITCZ の溶解度は 10% HP-β-CD 存在時 0.72 mg/mL であり、10% T-1 共存時は 6.5 mg/mL であった。即ち T-1 は HP-β-CD に比べ約 9 倍強い可溶化能を示した。HP-β-CD は、可溶化能の高い包接化合物として知られており、ITCZ と HP-β-CD の包接複合体が臨床用の経口投与製剤に用いられている。

ITCZ の消化管および静脈内投与後の血中濃度推移に及ぼす HP-β-CD と T-1 の影響: ITCZ を 10% T-1 または 10% HP-β-CD 溶液に懸濁したものを経口投与 (10 mg/kg) し、また、T-1 や HP-β-CD で ITCZ の溶液としたものを静注投与 (0.5 mg/kg) した後、経時的に ITCZ の血漿中濃度を測定した。経口投与の場合、ITCZ の生理食塩水懸濁液に比べ、T-1 添加懸濁液は ITCZ の血中濃度を有意に増加したが、HP-β-CD に比べると、血中濃度は低いものであった。T-1 は両親媒性であり、静脈投与時、ITCZ の組織分布容積を増やすものと期待したが、組織分布はむしろ減少した。また、この実験において、ラットの溶血や稀に死亡などが観察され、T-1 には細胞毒性があることが認められた。

消化管における T-1 の安定性試験: T-1 をラット消化管 (十二指腸、空腸、回腸) ループに投与し、1 時間後に回収したところ、いずれの部位においても、回収率は 40% 程度であった。生体膜の透過は殆ど検出されず、代謝分解による消失が考えられた。

T-1 の化学的・酵素学的安定性試験: T-1 の化学的な安定性について、pH 0.7, pH 7.4 および蒸留水を用いて検討した。T-1 は酸性条件下では不安定で、また蒸留水や pH 7.4 においても、わずかに分解することが観察された。また、酵素的な分解については、ラット十二指腸、空腸、回腸ホモジネートの S9 画分を用い、検討した。ラット消化管のいずれの部位においても、培養 1 時間で 40 から 60% の消失が観察され、T-1 は酵素的に不安定であることが認められた。

Caco-2 細胞に対するサイクリックビスデスモシ

ド (T-1, T-2, T-3) の細胞毒性: 大腸がん由来の Caco-2 細胞を用い、T-1, T-2, T-3 の細胞毒性を調べた。Caco-2 細胞と T-1, T-2, T-3 の接触 (培養) は、1 時間及び 24 時間の両方で検討した。1 時間培養の場合、Caco-2 細胞の半分を死滅させる濃度 (IC_{50}) は、T-1 で 146.8 μ M, T-2 で 179.4 μ M, および T-3 で 89.2 μ M であった。また、24 時間培養の場合の IC_{50} は、T-1 で 47.7 μ M, T-2 で 40.7 μ M, および T-3 で 33.5 μ M であり、いずれも細胞毒性がかなり高いことが認められた。

T-1 自身の細胞膜透過性: サイクリックビスデスモシドは両親媒性の化合物であり、水にも溶け、メタノールやエタノールにも一部溶解する。^{1,2)} このような性質から、T-1 自身の膜透過性を Caco-2 細胞膜を用い検討した。T-1 の粘膜から漿膜側への移行に比べ、漿膜から粘膜への移行は、8 倍以上の有意に高いものであった。これらより、T-1 は異物排出ポンプである P-糖タンパク質などの基質となる可能性が考えられた。さらなる検討が必要である。

FD-4 の膜透過性に及ぼす T-1 の影響: FD-4 は分子量 4000 の水溶性高分子化合物である。経細胞膜透過は不可能であり、僅かに細胞間隙経路の膜透過が考えられる。サイクリックビスデスモシドには包接能とともに、可溶化能もあることから、FD-4 の Caco-2 細胞膜透過に及ぼす T-1 の影響について検討した。T-1 10 μ M において FD-4 の膜透過は、生理食塩水と同様に極めてわずかであったが、30 μ M においては、僅かに但し有意に、亢進した。これら T-1 30 μ M 共存時の FD-4 透過において、粘膜から漿膜側透過とその逆方向の透過は同程度であり、極性のある透過は観察されなかった。

まとめ：サイクリックビスデスモシドである T-1 は ITCZ の溶解度を著しく上昇させ、10%の濃度においては臨床用医薬品に使用されている HP-β-CD と比較して溶解度は 8.6 倍有意に高い結果となった。一方、10% T-1 で懸濁させた状態で ITCZ をラットに経口投与した場合、ITCZ の血漿中濃度は生理食塩水で投与した時と比較して有意に高かったが、10% HP-β-CD と比較すると効果は弱いことが認められた。可溶化作用が強いかかわらず、膜透過促進作用が低い理由を検討するため、次に T-1 を消化管ループ内に投与し、ループ内からの消失について検討した。その結果、60 分後には全ての消化管部位において T-1 は 50%以上消失することが明らかとなった。T-1 の消失メカニズムをさらに明らかにするため、T-1 の安定性について検討したところ、T-1 は中性緩衝液中ではかなり安定であるのに対し、日本薬局方「第 1 液」中や消化管の S9 画分中においては代謝分解されることが示された。

また、Caco-2 細胞を用いた検討により、サイクリックビスデスモシドは細胞毒性を示した。毒性をほとんど示さない濃度において T-1 の透過実験を行ったところ、時間依存的な T-1 の膜透過が観察され、さらに T-1 は FD-4 の膜透過を有意に上昇させた。このように、サイクリックビスデスモシドの作用は、現在医薬品製剤などに配合されている各種シクロデキストリンとはかなり異なったものであり、それ自身が、膜透過し、細胞毒性を示すなど、薬理活性を有していることが認められた。今後、サイクリックビスデスモシドの P-糖タンパク質への基質認識性や、細胞毒性を軽減するための化学的修飾などの検討が必要であるが、膜透過型の包接複合体として、例えば経皮吸収製剤への応用など、新規有用性が期待されると考えている。

<引用文献>

- 1) 笠井良次：ウリ科植物成分に関する研究 YAKUGAKU ZASSHI;128(10),1369-1382(2008)。
- 2) Kasai R, Miyakoshi M, Matsumoto K, Nie RL, Zhou J, Morita T, Tanaka O. : Tubeimoside I, a new cyclic bisdesmoside from Chinese cucurbitaceous folk medicine "tu bei mu", a tuber of *Bolbostemma paniculatum*. Chem Pharm Bull(Tokyo):34(9),3974-3977(1986)。

5 . 主な発表論文等

{学会発表} (計 2 件)

- (1) 小田啓祐、森信博、猪山陽輔、村上照夫、難水溶性薬物の溶解・核酸に及ぼす両親媒性包接化合物サイクリックビスデスモシドの影響、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜 (横浜市みなとみらい)
- (2) 小田啓祐、金城拓也、石岡朋子、山田千晴、森信博、村上照夫、ABC トランスポーター基質の消化管吸収に及ぼすポリフェノール含有飲料水の影響、日本薬剤学会第 30 年会、2015 年 5 月 23 日、長崎ブリックホール(長崎市・茂里町)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村上 照夫 (MURAKAMI, Teruo)
広島国際大学・薬学部・教授
研究者番号：20136055

(2) 研究分担者

小田 啓祐 (ODA, Keisuke)
広島国際大学・薬学部・助教
研究者番号：60712594

(3) 研究分担者

森 信博 (MORI Nobuhiro)
広島国際大学・医療栄養学部・教授
研究者番号：70412351