薬 剤 学, **69** (1), 34–39 (2009)

≪若手研究者紹介≫

ラクチュロースを利用した結腸特異的薬物放出製剤に関する研究

勝 眞 正 孝* Masataka Katsuma
アステラス製薬株式会社 製剤研究所 製剤企画グループ

1. は じ め に

筆者は，大学2回生のころ，所属クラブの先輩を訪ねた薬剤学教室の実験室で生物薬剤学という研究領域の存在を知った．薬物に何らかの製剤工夫を施し，動物実験でその性能を検証，その結果を元に次の研究を企画するプロセスを繰り返す先輩方の姿に強い憧れを持ち，4回生では迷うことなく薬剤学教室に進んだ．初めての研究テーマは，ポリアクリル酸，ヒドロキシプロピルセルロースといった水溶性高分子を利用した抗がん剤の徐放性坐剤に関する研究であった．その後，大学院（修士課程）ではシクロデキストリンを用いた油状薬物の経口吸収改善に取り組んだ．両テーマとも芳しい検討結果は得られなかったが，高分子を利用した製剤設計の面白さと，新しい知見を得るには評価方法の創意工夫が大切なことを学ばせていただいた．アステラス製薬（旧山之内製薬）に入社後も，製剤素材の機能に着目したDDS研究に従事した．形状記憶高分子を用いた胃内滞留製剤の研究が一段落した頃，予てよりSaffran先生の発表（1986年にScienceに発表されたアゾポリマーを利用した結腸特異的薬物放出製剤に関する研究）やその後の関連研究動向に刺激を受けていた我々は，結腸特異的薬物放出製剤が潰瘍性大腸炎等の局所疾患治療のQOL向上に有効なだけでなくペプチド等の経口吸収改善に応用可能なことから，次期テーマとして取り上げ研究に着手した．

*1987年3月岡山大学大学院薬学研究科修士課程修了．同年4月山之内製薬株式会社（現アステラス製薬）入社，製剤研究所新製剤研究室配属．DDS製剤の研究開発に従事．2005年岡山大学より博士号（薬学）取得．研究のモットー：Slow but steady．趣味：テニス，音楽鑑賞． 連絡先：〒425–0072 焼津市大住180
E-mail: masataka.katsuma@jp.astellas.com

2. 研 究 の 背 景

結腸部位での薬物放出には，服用後決められた時間に薬物を放出する時限放出製剤のほかに，消化管のpH変化を利用したシステム，腸内細菌が消化管下部，特に結腸に多く分布することを利用したシステム，結腸の内圧を利用したシステムが考案されている．結腸における腸内細菌叢およびその酵素活性の急激な増加は，摂食の有無，製剤の消化管内移動時間，管腔内のpHに影響されない消化管内の現象であることから，腸内細菌の作用を利用した手法は，時限放出製剤やpH感受性の高分子を被覆するといった手法と比較して，部位特異的な薬物放出を達成するためにより適したものと考えられる．これまでその製剤開発には，腸内細菌により分解されるアゾポリマーに代表される新規高分子等が多数考案されてきたが，分解物も含めた素材の安全性に問題が残されていた．一方，消化管上部で吸収されず安定であり，消化酵素等により分解されないペクチン，アミロース，ガラクトマンナン等のnonstarchポリサッカライドの利用が試みられているが，難溶性のため速やかな結腸特異的薬物放出が困難であった．

このような背景から，著者は新規な製剤素材を用いることなく，水溶性が高く安全性が確認されている既存の素材を有効利用し結腸特異的薬物放出製剤を設計することを目的に，腸内細菌によるラクチュロースの発酵に着目して研究を開始した．ラクチュロースはガラクトースとフルクトースからなる合成

二糖であり，高アンモニア血症等に薬剤として用いられている他，人口甘味料としても用いられる安全性の高い素材である．経口摂取されたラクチュロースは消化管上部ではほとんど吸収・分解されず，消化管下部，特に結腸に存在する *bifidobacteria* 等の腸内細菌により分解され，有機酸，主に酢酸を生成することが知られている．本稿ではこのラクチュロースが消化管下部で腸内細菌により発酵し生じる有機酸を利用した結腸特異的薬物放出製剤の基本設計とその薬物放出特性を検討した結果を報告させていただく．

3. ラクチュロースを利用した結腸特異的薬物放出製剤 CODES™ の基本設計 [1)]

まず，ラクチュロースの発酵試験を実施した．ラクチュロースは，*in vitro* においてラット盲腸内容物含有等張リン酸緩衝液（C-PBS）の pH を添加量に依存して経時的に低下させ，且つ *in vivo* においては，経口投与された際にラット盲腸内容物の pH を投与 4 時間以降 pH6 以下に低下させた．この結果，ラクチュロースが腸内細菌により分解され有機酸を生成し，消化管下部内容物の pH を低下させうることが示唆された．

ラクチュロースをヒトに投与し結腸内容物の pH を有意に低下させるには多量のラクチュロースを服用することが必要となることから，ラクチュロースを結腸特異的薬物放出の誘発物質として効率的に用いるため，ラクチュロースと薬物を含む錠剤を酸溶解性高分子でコートした後，さらに腸溶性高分子でコートした結腸特異的薬物放出製剤（CODES™）を考案した．Fig. 1 に CODES™ の結腸特異的薬物放出メカニズムを示した．経口投与された CODES™ は，腸溶性高分子で被覆されており，胃内（酸性条件下）で薬物を放出しない．CODES™ が小腸に到達すると最外層の腸溶性高分子は溶解するものの，薬物を含む核錠は酸溶解性高分子で被覆されており，小腸内でも薬物を放出しない．しかしながら，小腸移動中に消化管液が核錠内に徐々に浸入すると，非常に水溶性の高いラクチュロースは溶解し，一定時間後から酸溶解性皮膜を通して徐々に漏出し始める．そして，消化管下部に到達すると核錠から漏れだしたラクチュロースが錠剤近傍にて腸内細菌により分解されて有機酸が発生し，酸溶解性皮膜が溶解，薬物が放出されるというものである．

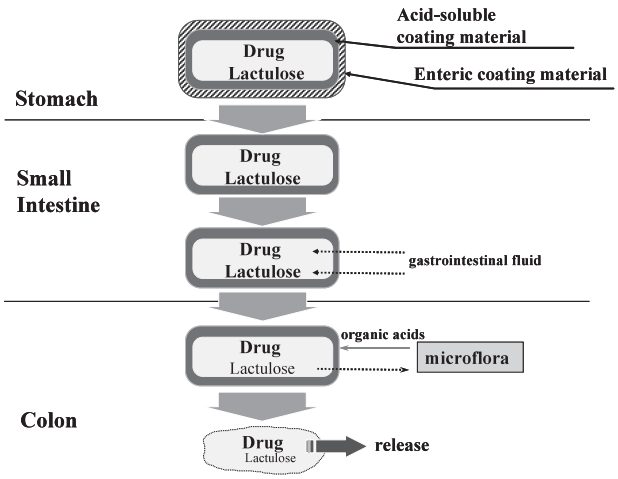

Fig. 1. The concept of a new colon-targeted delivery system (CODES™).

このコンセプトを検証するため，赤色色素を含有する CODES™ を調製し，ラット盲腸内での崩壊性及び色素の放出性を評価した．その結果，CODES は日局第 2 液（pH 6.8）中で 8 時間まで色素を放出しなかったが，腸内細菌の存在するラット盲腸内では速やかに色素を放出した．この際，盲腸内容物の pH 低下は認められなかった．さらに，水不溶性で pH 非依存性の放出制御基剤 Eudragit® RL100 で被覆したラクチュロース錠を調製し，C-PBS 中でインキュベーションした際の錠剤内部および外部（C-PBS）の pH 変化を測定することにより，ラクチュロース分解による有機酸発生が錠剤の内部で生じるかを検証した．試験開始 1 時間後には錠剤内部に水が浸入し内部のラクチュロースは溶解しており，錠剤内部の pH は 6.5 であった．その後，4 時間後においても錠剤内部の pH はほとんど変化しなかった．一方，錠剤近傍の pH 変化は不明であるが，錠剤外部の C-PBS の pH は若干低下した．ラクチュロースが含まれる錠剤内部で pH 変化が認められなかったことから，腸内細菌が放出制御膜を通過して錠剤内部に浸入し，ラクチュロースから有機酸を発生させるのではなく，錠剤内部から漏れだしたラクチュロースが外部に存在する腸内細菌により分解され，錠剤近傍で有機酸が発生するものと推察された．ラクチュロースは，腸内細菌の中でも特に *bifidobacteria* で分解され，その大きさは約 1 μm であると報告されている．また，著者は Eudragit® E100 で製した酸溶解性高分子皮膜を日局第 2 液（pH 6.8）中

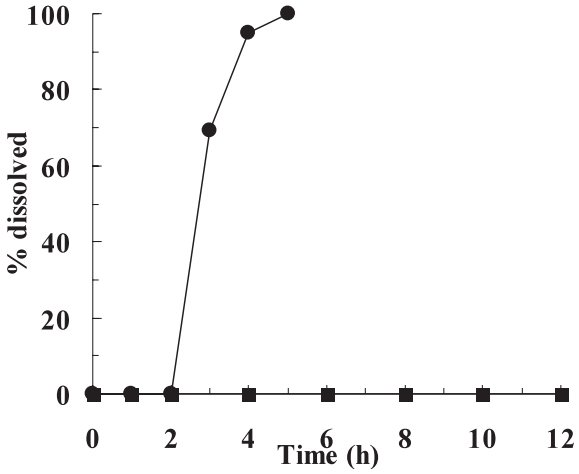

Fig. 2. Dissolution profiles of 5-ASA from 5-ASA-CODES tablets in PBS (pH 6.8) and C-PBS. Dissolution medium: (■) PBS (pH 6.8); (●) 1% (w/v) C-PBS.

に 24 時間浸漬しても，1 μm 以上の細孔は発生しないことを確認しており，このことからも，腸内細菌が酸溶解性高分子皮膜を通過して，錠剤内部でラクチュロースから有機酸を発生させることはないと考えられた．

次に，モデル薬物として 5–アミノサリチル酸（5-ASA）を含有する CODES™ を調製し，*in vitro* 薬物放出特性を評価した．CODES™ は日局第 2 液（pH 6.8）中では試験期間中（12 時間）に 5-ASA を放出しなかったが，1%（w/v）C-PBS 中では，2 時間のラグタイムの後，薬物放出が開始し，4 時間では 90% 以上の 5-ASA が放出された（Fig. 2）．

以上の結果から，CODES™ は腸内細菌存在下に特異的に薬物を放出する特徴を有し，ラクチュロースの発酵作用をトリガーとした製剤基本設計のコンセプトを検証できた．

4. CODES™ の薬物放出挙動に及ぼす支配要因 [2)]

腸内細菌による CODES™ からの薬物放出のタイミングは，用いられるラクチュロースの発酵速度と発酵に寄与可能なラクチュロース量に大きく依存する．分解性のポリサッカライドが結腸の腸内細菌に十分暴露される他の結腸特異的薬物放出製剤とは異なり，CODES™ ではラクチュロースが異なる高分子で被覆された核錠に含有されているため，ラクチュロースが薬物放出に関与するためには，高分子皮膜を拡散し，外部で腸内細菌に遭遇し分解される必要がある．即ち，発酵に関与できるラクチュロース量が CODES™ の *in vivo* での薬物放出挙動を決定する支配因子であると考えられる．そこで，酸溶解性高分子のコート量および核錠中のラクチュロース含量が異なる数種のアセトアミノフェン（AAP）含有 CODES™ 錠（AAP-CODES）を調製し，それらの *in vitro* 溶出挙動及び *in vivo* における薬物放出部位，薬物放出開始のタイミングをビーグル犬を用い評価した．

in vitro 溶出試験において，AAP-CODES からの AAP の溶出ラグタイムは酸溶解性高分子のコート量の増加とともに延長し，一方，溶出速度は減少した．また，ラクチュロースの溶出は AAP の溶出と同調することが確認されたが，その溶出速度は AAP よりも速やかであった．これは，ラクチュロースが比較的低分子であり非常に水溶性が高いためと考えられた．

AAP は経口投与後腸管から速やかに吸収されるため，AAP が最初に血漿中に出現した時間（Ti）は，「製剤の胃内滞留時間」あるいは「腸管での薬物放出開始時間」の間接評価に用いられる．そこで，AAP-CODES をビーグル犬に経口投与した際の PK プロファイルを腸溶性製剤と比較する事により，CODES™ の *in vivo* 薬物放出特性を間接的に評価した．その結果，腸溶性製剤の Ti は 1.5 ± 0.8 時間であったことから，腸溶性製剤ならびに AAP-CODES の胃内滞留時間は約 1.5 時間と推測された．一般に，イヌにおける錠剤の小腸通過時間は約 2 時間と報告されていることから，胃内滞留時間と小腸通過時間の和として表される AAP-CODES の結腸到達時間は投与後 3.5 時間と推測された．AAP-CODES の Ti は投与後 4.8 ± 1.0 時間であったことから，その薬物放出は結腸到達後に生じたことが示唆された．

Fig. 3 には，酸溶解性高分子 Eudragit® E のコート量が異なる 3 種の AAP-CODES を絶食下イヌに経口投与した際の PK プロファイルを示した．3 種の AAP-CODES の AUC，Cmax に統計的な有意差は認められず，酸溶解性高分子のコート量は，ラグタイム後の AAP 溶出挙動に影響を及ぼさないことが示唆された．酸溶解性高分子を 12% コートした AAP-CODES の Tmax ならびに Ti は，4%，8% コート製剤にくらべ遅延し，6 例中 2 例のイヌにおいて錠剤が原型を保ったまま糞中に回収された．これら

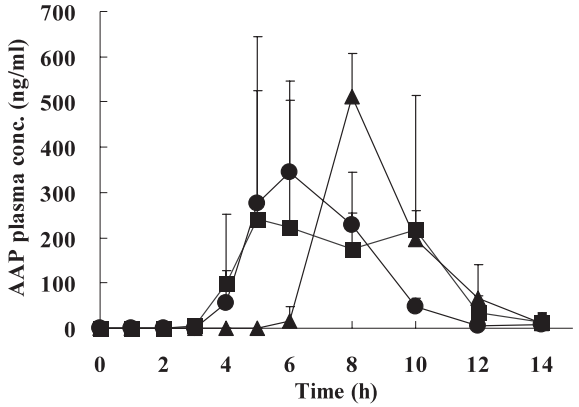

Fig. 3. Plasma concentration-time profiles of acetaminophen from CODES™ tablets with Eudragit® E coating levels of 4% (■, n = 6), 8% (●, n = 6), 12% (▲, n = 4) in dogs. Each point represents the mean ± SD.

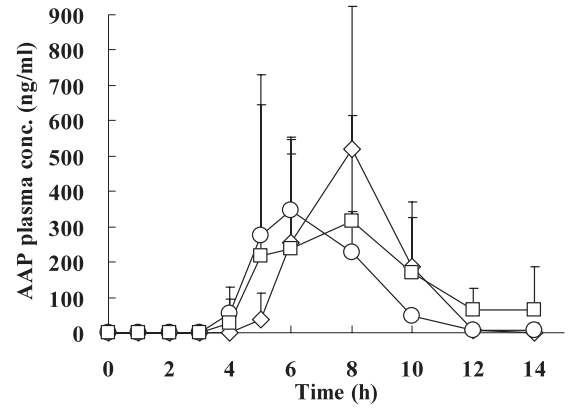

Fig. 4. Plasma concentration-time profiles of acetaminophen from CODES™ tablets with lactulose loading levels of 78% (□, *n* = 6), 58% (○, *n* = 6), 38% (◇, *n* = 4) in dogs. Each point represents the mean ± SD.

の遅延現象は，12% コート製剤の場合，消化管移動中にラクチュロースの十分な漏出·供給が起こらず，酸溶解性高分子皮膜を溶解するに必要な有機酸が生成されなかったことが原因と推察された．核錠中のラクチュロース含量が異なる 3 種の AAP-CODES の AUC，Cmax にも統計的な有意差は認められず，ラクチュロース含量はラグタイム後の AAP 溶出挙動に影響を及ぼさないことが示唆された．一方，38% および 58% ラクチュロース含有製剤の Ti ならびに Tmax は，78% 含有製剤に比べ遅延したことから，核錠中のラクチュロース含量の低下は，結腸で発酵に使用可能なラクチュロースの供給速度の低下を引き起し，酸溶解性高分子被膜の溶解に必要な有機酸量の蓄積を遅延させたと考えられた（Fig. 4）．

以上の結果から，CODES™ からの薬物放出はイヌの結腸で生じており，酸溶解性高分子のコート量および核錠中のラクチュロース含量が，結腸での薬物放出開始時間に影響を及ぼすことが明らかとなった．

5. γ–シンチグラフィーによるヒト消化管内挙動評価[3)]

一般に経口製剤の消化管内挙動に関する動物での結果は，その消化管組織構造の違いからヒトでの結果に直接反映しない．例えば，胃，小腸，大腸の大きさや長さ，食物や製剤の胃内滞留時間を含む消化管内移動時間，消化液分泌量などである．従って，ヒトにおける CODES™ の消化管内移動，およびその崩壊特性を確認すること，並びに，それらに及ぼす食事の影響を評価することは，本製剤を臨床応用する上で重要である．そこで，著者らは核錠中に ^{111}In で標識したイオン交換樹脂を含有する CODES™ プラセボ製剤を調製し，γ–シンチグラフィーにてその消化管内挙動特性を評価した．同様に，CODES™ と同じ素材で被覆されたラクチュロースを含有しないコントロール製剤（LFRF）を調製し，結腸特異的薬物放出に及ぼすラクチュロースの機能を検証した．

Table 1 に示すように，絶食下投与された CODES™ プラセボ製剤の胃内滞留時間（GET），小腸通過時間，結腸到達時間は，それぞれ 0.92 ± 0.48，5.24 ± 2.26，6.16 ± 2.18 時間であり，ラクチュロースを含有しない製剤 LFRF と有意な差は認められなかった．飽食下投与された CODES™ プラセボ製剤の GET は 2.60 ± 0.90 時間であり，絶食下投与時と比較し有意に延長した．以上の試験された製剤の消化管内移動は従来の報告と一致することが確認された．

絶食下投与された CODES™ プラセボ製剤の崩壊は，投与後 7.11 ± 2.01 時間（range: 4.63 ～ 11.00）に始まり，約 1 時間以内に完了した．その崩壊は，製剤間で変動したものの 8 例中 6 例で上行結腸，残りの 2 例では回盲接合部（ICJ）あるいは小腸下部で始まり，同じ部位で完了した．飽食下投与された CODES™ プラセボ製剤の崩壊開始は投与後 8.58 ± 2.28 時間（range: 5.31 ～ 11.98）に生じ，食事によっ

Table 1. GI-transit and disintegration time of CODES™ and LFRF

	CODES (fast)	CODES (fed)	LFRF (fast)
Gastric Emptying (h)	0.92 ± 0.48 $n = 8$	2.60 ± 0.90* $n = 7$	1.16 ± 0.82 $n = 7$[a)]
ICJ Arrival (h)	4.51 ± 1.76 $n = 5$	6.31 ± 1.39 $n = 6$	4.26 ± 0.10 $n = 4$
Colon Arrival (h)	6.16 ± 2.18 $n = 8$	6.45 ± 1.63 $n = 7$	7.01 ± 1.94 $n = 7$
Initial Disintegration (h)	7.11 ± 2.01 $n = 8$	8.58 ± 2.28*** $n = 7$	10.97 ± 1.62** $n = 8$
Complete Disintegration (h)	7.87 ± 2.17 $n = 8$	9.07 ± 2.37 $n = 7$	13.02 ± 3.37*** $n = 6$[b)]

*: $p < 0.001$, significantly different from CODES after a overnight fast.
**: $p < 0.01$, significantly different from CODES after a overnight fast.
***: $p < 0.05$, significantly different from CODES after a overnight fast.
a) : 1 subject excluded due to an extended gastric release.
b) : 2 subjects excluded because a disintegration was not completed within 24 h
Results are expressed as the mean ± SD.

て有意な遅れが認められたが（$p < 0.05$），その平均崩壊時間は 0.49 ± 0.38 時間であり，絶食下の場合（0.76 ± 0.58 時間）との間に有意な差は認められなかった．この崩壊開始の遅延は，食後投与時の GET の延長に基づく ICJ 到着時間の遅延とほぼ一致していた．崩壊開始部位は，4 例が上行結腸，残り 3 例が横行結腸であり，絶食時よりも遠位であったが，その崩壊は開始部位とほぼ同じ部位で完了する傾向にあることが確認された．以上のことから，CODES™ プラセボ製剤は，ヒトにおいて食事の影響を受けることなく，目標部位，結腸で速やかに崩壊することが確認された．

一方，絶食下投与されたラクチュロースを含有しない製剤 LFRF の崩壊開始は投与後 10.97 ± 1.62（range: 8.83 ～ 13.56）に生じ，CODES™ プラセボ製剤に比べ有意に遅延した（$p < 0.01$）．加えて，LFRF の平均崩壊時間は 2 時間以上と延長した．LFRF の崩壊開始部位は，1 例が ICJ，2 例が上行結腸，2 例が右結腸曲，2 例が下行結腸で観察され，CODES™ プラセボ製剤に比べ消化管内に拡がって認められた．崩壊完了部位は，3 例が上行結腸，2 例が右結腸曲，1 例が下行結腸で観察され，残りの 2 例においては崩壊の完了が認められなかった．これらの結果は，錠剤内部に含まれるラクチュロースが酸溶解性高分子皮膜の崩壊促進に機能し，結果として上行結腸で CODES™ の崩壊を引き起こすことを明確に実証した．

6. お わ り に

以上，ラクチュロースが結腸特異的薬物放出の誘発物質として応用可能なことを見出し，新規な結腸特異的薬物放出製剤 CODES™ を設計することが出来た．近年，数多くの結腸特異的薬物放出製剤が研究開発されてきたが，残念なことに実用化されたものはほとんどなく医療現場への貢献には至っていない．本稿で紹介した CODES™ においても，大腸の局所疾患の治療のみならず，消化管上部で分解・代謝されるペプチド等の経口製剤化への展開が期待されるが，今後，治療目的に合わせた最適化，さらなる工夫が必要である．例えば，著者らは CODES™ がインスリンの経口吸収改善に有用であることを確認したが，膜透過促進剤，タンパク分解酵素阻害剤の併用が必須であった．今後，ペプチドの経口吸収化を実現するためには，薬物特性に応じた可溶化技術，吸収促進技術などの併用技術の研究開発が必須である．また，発症部位が広範囲にわたる潰瘍性大腸炎の治療には，単一錠剤タイプよりも，大腸に広く分散可能なマルチプルタイプの製剤化が好ましいと考えられる．

最後に，本研究をまとめるに当たり終始懇切なご指導を賜りました岡山大学大学院医歯薬総合研究科　木村聰城郎教授に深謝するとともに，本研究に多くの助言と協力を頂きましたアステラス製薬（株）

製剤研究所の諸氏に感謝いたします.

引 用 文 献

1) M. Katsuma, S. Watanabe, H. Kawai, S. Takemura, Y. Masuda, M. Fukui, Studies on lactulose formulations for colon-specific drug delivery, *Int. J. Pharm*., **249**, 33–43 (2002).
2) L. Yang, S. Watanabe, J. Li, J. S. Chu, M. Katsuma, S. Yokohama, J. A. Fix, Effect of colonic lactulose availability on the timing of drug release onset *in vivo* from a unique Colon-Specific Drug Delivery System (CODES™), *Pharm. Res*., **20**, 429–434 (2003).
3) M. Katsuma, S. Watanabe, S. Takemura, K. Sako, T. Sawada, Y. Masuda, K. Nakamura, M. Fukui, A. L. Connor, I. R. Wilding, Scintigraphic evaluation of a novel Colon-targeted Delivery System (CODES™) in healthy volunteers, *J. Pharm. Sci*., **93**, 1287–1299 (2004).