

《若手研究者紹介》



難溶解性薬物のヒト経口吸収性評価システムの構築とその有用性

片 岡 誠* Makoto Kataoka

摂南大学薬学部薬剤学研究室

1. はじめに

筆者の研究紹介の前に、まず筆者と薬剤学との出会いと研究の始まりについて少し触れさせて頂きたい。薬剤学との出会いは、研究室配属決定時に遡ること約 15 年前になる。当時、摂南大学薬学部薬剤学研究室には、灘井種一教授（摂南大学名誉教授）、故 瀬崎仁教授（京都大学名誉教授）、山下伸二助教授（現、摂南大学薬学部薬剤学研究室教授）、坂根稔康助手（現、京都薬科大学薬剤学分野准教授）並びに高木陽子研究員がおられ、その研究室に配属されたことが筆者の進路を決定づけたと言っても過言ではない。筆者は、配属決定後 4 年生時のお花見（飲み会）で山下先生から、「大学院に進学しないか？」と誘われるがまま同大学院に進学した。山下先生は、既に当時から多くの製薬企業で抱えている経口投与製剤開発における問題点に着目されており、筆者が研究室に配属された頃に「難水溶性薬物の経口吸収性評価に関する研究」がスタートしたと記憶している。以下、筆者が大学院生時代から現在まで一貫して行っている「難溶解性薬物のヒト吸収性評価システムの構築」を中心に筆者の研究を紹介させて頂きたい。

2. 薬物の消化管吸収の速度論的モデル

経口投与された薬物の消化管からの吸収性に関する速度論的な考えを図 1 に示した。この過程において薬物の吸収速度は消化管内溶液中に溶解している薬物濃度 ($C_{\text{intestine}}$) とその薬物の消化管上皮粘膜に対する膜透過クリアランス (CL_{perm}) との積で表すことができる。さらに全体の吸収量 ($Fa \times D$) は $C_{\text{intestine}}$ の時間推移を表す曲線の消化管内滞留時間 (t) までの曲線下面積 ($AUC_{0 \rightarrow t}$) と CL_{perm} との積として算出することができる。精密な Fa や血中濃度推移を予測するためには各部位での膜透過性や溶解性の違いなど種々の要因を考慮する必要があるが、基本的に Fa は薬物の溶解性と膜透過性に関するパラメータから推定可能である。しかしながら、実際の消化管内液中には内因性、外因性の様々な成分が存在しており、特に胆汁酸やレシチンなどの脂質は混合ミセルを形成し、脂溶性薬物をミセル中に取り込むことによってその溶出や溶解速度に大きな影響を及ぼすことが知られている。さらに、薬物の消化管膜透過速度は、基本的には消化管内で free として存在している薬物（ミセル等に取り込まれていない薬物）の濃度に依存すると考えられることから、単にそのようなミセルを含む溶液中で測定した total な溶解度を用いた場合、吸収率の予測に大きな誤差が生じる可能性が考えられる。さらに、難溶解性薬物の吸収改善を目的とした製剤のうち、界面活性剤やシクロデキストリンのような可溶性添加剤を用いた製剤、あるいは自己乳化型製剤 (SEDDS) などの脂質分散型製剤からの吸収を予測する場合にも、同

*1998 年摂南大学薬学部卒、同大学院を経て 2001 年より摂南大学薬学部薬剤学研究室助手 (2007 年より助教)、博士 (薬学)、受賞歴：日本薬学会第 18 年会最優秀発表者賞 (2003 年)、日本薬学会近畿支部奨励賞 (2012 年)、趣味：ドライブ、スポーツ (全般、ただし水泳除く)。連絡先：〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町 45-1 E-mail: makoto@pharm.setsunan.ac.jp

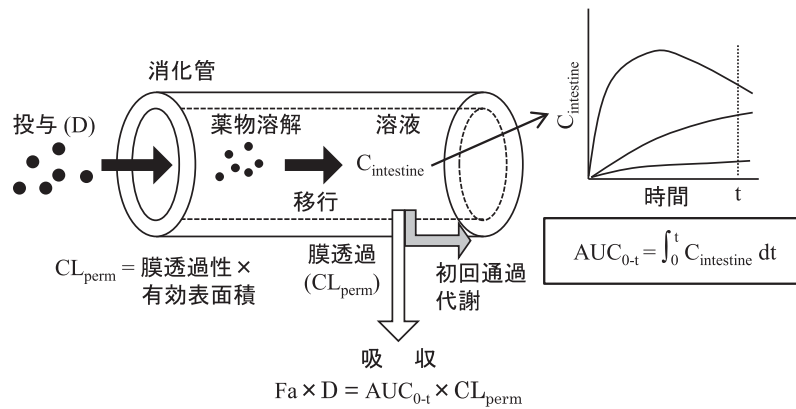


図1 消化管からの薬物吸収過程の模式図

様な考察が必要となる。すなわち、製剤成分によって形成されたミセルやエマルジョンなどによる薬物の見かけの溶解度の上昇と、溶液中の free 薬物の濃度の関係を正確に評価することが重要と考えられる。最近では固体分散体やアモルファスなどを利用した製剤化技術によって、溶液中で過飽和状態を作り出し、難溶性薬物の吸収を改善する試みが盛んに行われている。この場合には、薬物は熱力学的な溶解度よりも高い濃度で消化管内に溶解していると考えられることから、その吸収率予測には溶解の経時変化を考慮する必要があると考えられる。

3. Dissolution/permeation system

筆者らは図1で示した経口投与された医薬品の吸収率の速度論的な考えに基づき、*in vitro* 経口吸収性評価システム (dissolution/permeation system, D/P システム) を構築した¹⁾。D/P システムは図2に示したように、管腔側と漿膜側の2相からなり、その間に消化管上皮細胞のモデルとして Caco-2 単層膜などを装着し実験に用いる。薬物を D/P システムの管腔側に添加した後、一定時間後に漿膜側に透過する薬物量は、図1で示した消化管から吸収された薬物量に相当するものと考えられるため、D/P システムでの薬物添加量に対する膜透過量の割合である膜透過率 (%) はヒト経口吸収率 (Fa) に対応するものと考えられる。また、特に難溶性薬物の場合、管腔側への薬物添加量は漿膜側に透過する薬物の割合 (膜透過率) に大きく影響を与えるため、管腔側溶液量 (8 mL) とヒト消化管内液量 (500~1,000 mL) との関係から、D/P システムへの薬物添加量は臨床投与量の 1/100 量と設定している。さらに管腔側溶液として、絶食時および摂食時のタウロコール酸

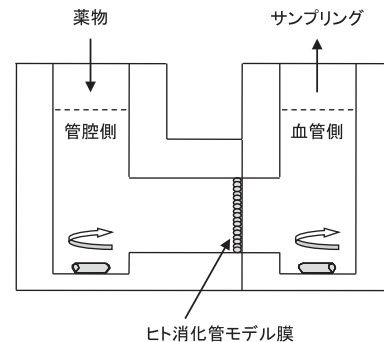


図2 D/P システムの模式図

溶液量：8 mL (管腔側)，5.5 mL (血管側)；溶液 pH：6.5 (管腔側)，7.4 (血管側)；攪拌速度：200 rpm；ヒト消化管モデル膜面積：1.77 cm²。

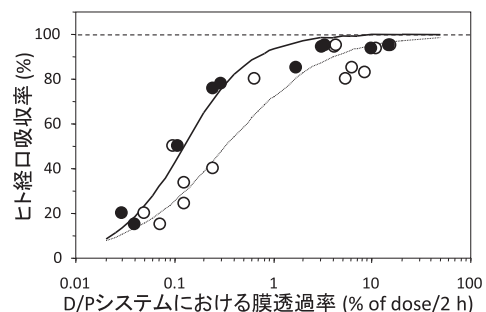


図3 D/P システムにおける膜透過率とヒト吸収率との相関

○：絶食時，●：摂食時。

とレシチンを添加した消化管モデル液 (FaSSIF_{mod}, FeSSIF_{mod6.5}) を適用し、絶食時と摂食時の消化管内における薬物溶解を再現している。一方、漿膜側溶液としてウシ血清アルブミンを 4.5 w/v% の濃度で添加した生理的緩衝液 (pH=7.4) を用い、薬物とタンパクとの結合を利用して漿膜側溶液中での溶解度を確保する (sink 条件の維持) とともに、実験器具や膜への薬物の吸着を防止している。様々な経口吸収特性を示す薬物をモデルとして D/P システムで得られた膜透過率 (% of dose/2 h) とヒト経口吸

収率 (Fa%) には図 3 に示したように絶食および摂食条件下共に良好な相関関係が認められており、この関係から化合物のヒト経口吸収率を評価することが可能となっている²⁾。

4. 難溶解性薬物の経口吸収に及ぼす食事と投与量の影響

Biopharmaceutics classification system の class 2 に分類されるような水に対する溶解性が極めて低いものの、膜透過性が良好な化合物の多くは、摂食の状態や投与量によってその経口吸収性が大きく変化することが知られている。そこで図 3 に示した相関関係を用いて、難溶解性薬物の経口吸収に及ぼす食事の影響の評価を行った。食事によって吸収性 (AUC) が約 4 倍に上昇することが報告されている albendazole の絶食時および摂食時での吸収率はそれぞれ 14% および 49% と予測された²⁾。また他の難溶解性薬物についても同様の予測を行ったところ、図 4 に示すようにヒト経口吸収率に及ぼす食事の影響 (AUC の増加率) と D/P システムから予測された増加率との間には良好な相関関係が認められている³⁾。さらに、難溶解性薬物である cilostazol をモデルとして投与量の変化に及ぼす経口吸収率の変動予測を行った結果、50 mg 投与したときの経口吸収率 (絶食条件下) は約 53% となり、投与された 50 mg のうち 27 mg が吸収されると予測された。また、同様に 100 mg および 200 mg 投与したときに吸収される薬物量はそれぞれ 41 mg および 62 mg と予測された。したがって cilostazol の経口吸収は、投与量の増大とともに吸収される薬物量は増加するものの、その関係は非線形性を示すと予測された。この予測と臨床で報告されている cilostazol の経口

吸収挙動との間には極めて良好な関係が認められており、さらに他の薬物についても同様な予測結果が得られている³⁾。

5. 製剤化による難溶解性薬物の吸収性改善の評価

難溶解性薬物の消化管吸収に関する律速過程を考えた場合、①溶解度と②溶解速度の二つの過程が考えられる。溶解度律速とは、溶解度自体が極めて低いため消化管内での薬物濃度が十分に上昇しないことで、また、溶解速度律速とは、消化管内での製剤からの溶解速度が膜透過速度よりも遅いことである。一般的に、溶解度律速の薬物の場合には、界面活性剤、シクロデキストリン、エマルジョンの利用や SEDDS などの手法が、また、溶解速度律速の薬物の場合には、微粉化、固体分散体、ナノクリスタルなどの手法が有効と考えられる。製剤処方最適化を図るためには、*in vitro* 溶出試験や実験動物を用いた *in vivo* 経口投与試験による評価が必要である。しかしながら先に述べた律速過程は、薬物の溶解度、製剤からの溶出速度や投与量および消化管内溶液量などに影響されるため、実験動物種や試験条件によって律速過程がシフトすることが考えられる。したがって、効率的な製剤開発を行うためには、ヒト消化管からの吸収における薬物の溶解と膜透過の関係を反映させた *in vitro* システムを用いることが望ましいと考えられる。筆者らが考案した D/P システムは経口吸収率評価だけでなく製剤化による吸収改善効果の評価にも適用可能と考えられるため、難溶解性薬物の種々の製剤化による吸収改善効果の評価を行った。

微粉化した fenofibrate 製剤 (200 mg) と未微粉化製剤 (300 mg) 投与後 (ともに摂食時) の血中濃度推移は投与量が異なるものの同等であることが知られている。これは未微粉化製剤投与時の吸収率と比較すると、微粉化によって 1.5 倍に吸収率が上昇していることを意味している。そこで D/P システムを用いて fenofibrate の経口吸収に及ぼす微粉化の影響について評価した。その結果、300 mg の fenofibrate (未微粉化) を摂食時のヒトに投与したときの吸収率は 19%、また、微粉化製剤として 200 mg 投与したときの吸収率は 29% と評価され、臨床で報告されている微粉化による吸収改善効果と一致した。現在本邦では、fenofibrate の固体分散体制剤 (投与量: 160

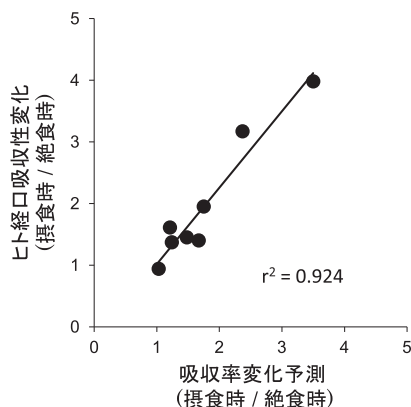


図 4 経口吸収性に及ぼす食事の影響

mg) が新たに上市されており, その吸収改善効果の評価に関しては現在検討中である。

近年, 難溶解性薬物の経口吸収改善を目的として, 過飽和の利用が数多く報告されている。過飽和とは, 溶質の飽和溶解度以上で溶質が溶媒に対して溶解している状態のことで, この状態は熱力学的に不安定であり, 時間と共に飽和溶解度にまで低下する。しかしながら, この状態を経口投与後に消化管内で作成することによって難溶解性薬物の経口吸収改善が可能である。そこで筆者らは, danazol をモデル薬物として, SEDDS 製剤および polyethylene glycol 400 を用いた可溶化製剤 (co-solvent) を, また各製剤に水溶性高分子である hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) または hydroxypropyl cellulose (HPC) を添加した製剤も併せて調製し, 実験に用いた。その結果, SEDDS 製剤とした場合, D/P システムの管腔側での 2 時間後の溶解率では水溶性高分子添加による顕著な過飽和は確認されなかったものの, 膜透過率には顕著な増加が認められた⁴⁾。一方, 可溶化

製剤とした場合, 水溶性高分子を添加することによって, 2 時間後の溶解率・膜透過率ともに顕著に上昇しており, これらのことは, 可溶化製剤添加後の danazol の析出の抑制すなわち過飽和状態がより長く水溶性高分子によって持続されていたものと推察された⁴⁾。そこで, D/P システムで認められたこれら製剤による経口吸収改善効果の予測性を検証するために, ラットを用いて各製剤および原末 (メチルセルロース懸濁液, MC suspension) からの danazol の経口吸収性について検討した結果, 図 5 に示すように両者の間には良好な関係が得られた⁴⁾。

6. P-gp 基質薬物の吸収性評価

消化管上皮細胞に発現している P 糖タンパク質 (P-gp) はその基質薬物の吸収性に大きな影響を与えており, さらに併用する薬物によっては薬物間相互作用を引き起こし, 著しい血中曝露量の増加をもたらすことが知られている。P-gp 基質薬物の消化管上皮細胞膜透過量は, P-gp との親和性や上皮細胞における発現レベルおよび消化管内で溶液として存在している薬物濃度によって決定すると考えられる。そこで消化管内での薬物溶解と膜透過を同時に評価することができる D/P システムに最適な P-gp 発現レベルを有した Caco-2 単層膜を適用することで, P-gp 基質薬物の消化管からの吸収性評価が可能と考えられる。RNAi 技術や P-gp 誘導剤を用いて P-gp 発現レベルを調整した 3 種の Caco-2 単層膜を D/P システムに適用し, 代表的な P-gp 基質薬物である fexofenadine をモデルとして膜透過率を測定したところ, P-gp の発現レベルに応じて膜透過率が顕著に変化したものの, 経口投与後の BA が良好な quini-dine を用いて同様な検討を行った結果, P-gp 発現

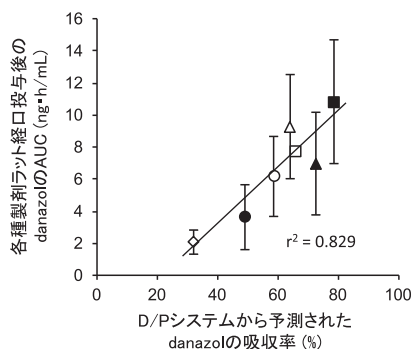


図 5 各種製剤による danazol の *in vivo* 経口吸収改善効果と D/P システムを用いた予測との関係

薬物添加量: 1 mg (danazol として), ○: SEDDS, □: S-SEDDS/HPMC, △: S-SEDDS/HPC, ●: Co-solvent, ■: S-Co-solvent/HPMC, ▲: S-Co-solvent/HPC, ◇: MC suspension.

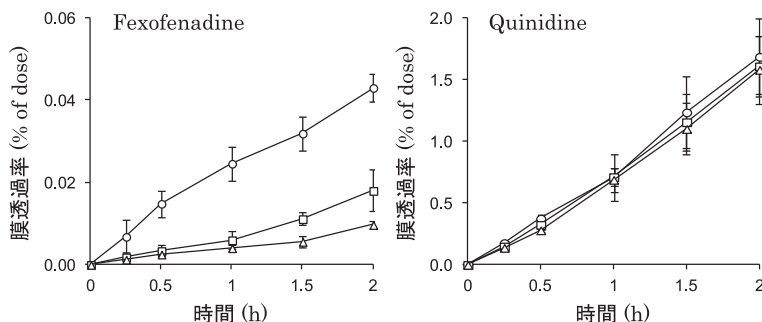


図 6 D/P システムにおける P-gp 基質薬物の膜透過に及ぼす Caco-2 単層膜 P-gp 発現レベルの影響

薬物添加量: 1.2 mg (fexofenadine), 1 mg (quinidine); P-gp 発現レベル: ○: 低, □: 中, △: 高.

レベルにかかわらず高い膜透過率が観察された (図6)⁵⁾. また, 臨床で報告されている fexofenadine および talinolol の吸収性に及ぼす erythromycin 併用の影響を評価した結果, 実験に用いた3種の Caco-2 単層膜のうち, P-gp 発現レベルが中程度の単層膜より得られた評価が最も臨床データと対応することが示された⁵⁾. さらに Cremophor EL (医薬品添加物) による saquinavir の吸収性変化の評価を行ったところ, Cremophor EL による溶解性の改善と P-gp の阻害による膜透過性の向上が関与していることが示され, さらに図3の相関関係から予測された Cremophor EL 併用による saquinavir の吸収性変動は臨床での報告と対応していた⁵⁾.

7. お わ り に

以上, D/P システムの構築から本システムを用いた難溶性薬物の経口吸収性評価に関する知見を紹介した. 上記の知見は, 筆者らが考案した D/P システムの評価手法 (消化管内での薬物の溶解と膜透過を平行に評価すること) の妥当性を示すものと考えられる. 現在, 国内外問わず多くの製薬企業において本システムを用いた経口吸収性評価の有用性が確認され, 医薬品開発への導入が検討されている. 今後, 本システムが実際の医薬品開発の効率化に大きく貢献することを願っている.

最後に本研究を遂行するにあたり, ご指導・ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部教授・山下伸二先生,

岡山大学名誉教授・木村聰城郎先生, 摂南大学薬学部教授・佐久間信至先生を始め多くの先生方, 並びに企業の研究者の方々に深く感謝します. また, 研究にご協力頂きました摂南大学薬学部薬剤学研究室の修了生・卒業生の方々に感謝の意を表します.

引 用 文 献

- 1) M. Kataoka, Y. Masaoka, Y. Yamazaki, T. Sakane, H. Sezaki, S. Yamashita, *In vitro* system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs, *Pharm. Res.*, **20**, 1674–1680 (2003).
- 2) M. Kataoka, Y. Masaoka, S. Sakuma, S. Yamashita, Effect of food intake on the oral absorption of poorly water-soluble drugs: *in vitro* assessment of drug dissolution and permeation assay system, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2051–2061 (2006).
- 3) M. Kataoka, S. Itsubata, Y. Masaoka, S. Sakuma, S. Yamashita, *In vitro* dissolution/permeation system to predict the oral absorption of poorly water-soluble drugs: effect of food and dose strength on it, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 401–407 (2011).
- 4) M. Kataoka, K. Sugano, C. da Costa Mathews, J. W. Wong, K. L. Jones, Y. Masaoka, S. Sakuma, S. Yamashita, Application of dissolution/permeation system for evaluation of formulation effect on oral absorption of poorly water-soluble drugs in drug development, *Pharm. Res.*, **29**, 1485–1494 (2012).
- 5) M. Kataoka, T. Yokoyama, Y. Masaoka, S. Sakuma, S. Yamashita, Estimation of P-glycoprotein-mediated efflux in the oral absorption of P-gp substrate drugs from simultaneous analysis of drug dissolution and permeation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **44**, 544–551 (2011).