

《若手研究者紹介》



難水溶性薬物の消化管吸収に及ぼす過飽和溶解の影響とその評価法に関する研究

東 野 晴 輝* Haruki Higashino

摂南大学 薬学部 薬剤学研究室

1. はじめに

まず、筆者と薬剤学研究室との出会いについて述べたい。その後、当研究室での研究について紹介させていただきたい。筆者が学部学生の頃の摂南大学薬学部では、研究室配属は3年生後期に行われる。当時から薬剤学研究室は、人気のある研究室の一つであった。配属システムはいわゆる抽選(くじ引き)である。希望者が多ければ成績の良し悪しにかかわらず、くじを引く。結果は、見事に「はずれ」であった。当時の抽選会場では笑いが起きたことを今でも覚えている。というわけで、学部4年生は、衛生分析・生化学系の研究室で生活した。振り返るとこの頃に得た知識や手技は今でも役立っており、有意義な生活を過ごせたと思っている。大学院博士前期課程から、当時 准教授であった佐久間 信至先生(現薬物送達学研究室 教授)の指導の下、大腸癌早期発見を目的としたナノスフェアの開発を目指したDDS研究に従事した¹⁾。その後、博士後期課程で教授である山下伸二先生の指導の下、難水溶性薬物の消化管吸収に及ぼす過飽和溶解の影響とその評価法に関する研究に従事した^{2,3)}。本編では、主としてその内容

について紹介したい。

2. 難水溶性薬物の経口剤開発における問題点および吸収の律速過程

現在の医薬品の研究開発では、生理活性ペプチドや抗体、核酸などのバイオ医薬品を除き、多くの低分子医薬品は経口剤としての開発が進められる。しかしながら、治療のターゲットとなる受容体や酵素に対して高い親和性を持った化合物が優先的に合成/選択されるため、候補化合物の多くは、水に対する溶解性が低く、また代謝的に不安定であるなどの理由から経口吸収性に乏しく、その後の開発が困難となるケースが報告されている。BCS (Biopharmaceutics Classification System) class 2 に分類される溶解性の低い薬物を経口投与した場合、十分な血中曝露が得られない(消化管からの吸収率(F_a)が小さい)理由として、以下の2つの①溶解速度、②溶解度が主な原因・律速過程と考えられる。

- ①固体からの溶解速度が膜透過速度よりも遅く、そのため溶解した薬物は速やかに吸収されるものの、溶解速度が吸収全体の律速となり小腸滞留時間内には吸収が完了しない。膜透過性の高いClass 2薬物に多く認められるケースで、微粉化などの簡易な製剤学的手法によって溶解速度を速めることにより、比較的簡単に吸収改善が可能である。
- ②薬物自体の溶解度が低く、溶解飽和のために消化管内での薬物濃度が吸収に必要な濃度まで達しないことから吸収が不完全となる。これらの薬物は、溶解速度を改善しても吸収改善効果は

*2011.3. 摂南大学大学院薬学研究科博士前期課程修了, 修士(薬学)取得。2014.3. 摂南大学大学院薬学研究科博士後期課程修了, 博士(薬学)取得。2014.4. 日本薬学会第29年会最優秀発表者賞。2016.9. 日本薬学会英語セミナー発表者賞。研究テーマ: 難水溶性薬物の経口吸収, Lipid-based formulationに関する研究。趣味: プロ野球, バイクレース観戦。連絡先: 〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町45-1 E-mail: h-higash@pharm.setsunan.ac.jp

小さく、十分な血中曝露を得ることは難しい。また、同じ化合物でも低用量では溶解速度律速であった場合でも、用量増加に伴って溶解度律速へと変化していくため、毒性試験や用量比例性の予測を試みる際にも溶解度律速は大きな問題となっている。

②のように、経口投与後の吸収が溶解度律速となる薬物の場合、消化管からの吸収率を改善するためには、溶解度そのものを改善する必要がある。近年では、過飽和製剤技術が広く利用されている。消化管内で過飽和溶解を起こすためには、固形製剤として経口投与された薬物が一度、その飽和溶解度以上の濃度まで溶解させる必要がある。その代表的な製剤学的手法として、塩や共結晶、非晶質固体分散体製剤がある。また、Lipid-based formulationも消化管内溶液中への分散や酵素による脂質消化、胆汁酸成分との相互作用などによって過飽和溶解を起こす製剤技術である。しかしながら、*in silico*によるsimulation技術が進歩しているものの、経口投与後の過飽和溶解の影響を精度よく定量的に予測する手法は未だ構築されていないのが現状である。本研究では、まず*in vitro*において難溶解性薬物の過飽和溶解過程を詳細に検討し、経口吸収後の吸収改善効果を定量的に評価するためのパラメータを算出した²⁾。

3. *In vitro* 薬物溶解濃度推移に及ぼす過飽和溶解の影響

モデル薬物としては、BCS Class 2に分類されるアルベンダゾール、ジピリダモール、ゲフィチニブ、ケトコナゾールを用いた。4種類の薬物とも脂溶性の指標となるlogP値が3以上であり、薬物分子自体は極めて脂溶性が高く、水に対する溶解性は低い。これら4種の薬物をDMSOに高濃度に溶解させたstock solutionを絶食時ヒト小腸モデル液(Fasted State Simulated Intestinal Fluid, FaSSIF pH 6.5)中に添加することによって、各々の過飽和溶液を調製した。過飽和溶液からの溶質の析出速度は、溶液の過飽和度(過飽和状態で溶解している溶質濃度と飽和溶解度の比)に依存して変化することから、本研究では、出来るだけヒト消化管内の薬物濃度に近い濃度の溶液を調製した。それぞれの薬物の臨床投与量を、薬物服用時の飲水量で除した値を臨床投与

濃度と考え、その濃度の過飽和溶液を調製した。薬物の臨床投与濃度の算出に用いた飲水量としては、アメリカ食品医薬品局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)で定められた臨床試験時の飲水量250 mLを用いた。アルベンダゾールの場合、臨床投与量は200 mgであることから、臨床投与濃度は $0.8 \text{ mg/mL} = 800 \text{ }\mu\text{g/mL}$ となる。同様にジピリダモール、ゲフィチニブ、ケトコナゾールの濃度は200, 1,000, $800 \text{ }\mu\text{g/mL}$ とした。図1に、solvent shift法で調製した過飽和溶液中の溶解薬物濃度の時間推移を示した。また、対照としてそれぞれの薬物の原末をFaSSIFに直接添加して調製した懸濁液中の薬物濃度をおよそのヒト消化管内の滞留時間である4時間まで測定した。その結果、4種類全ての薬物において、solvent shift法で調製した過飽和溶液は、懸濁液よりも高い溶解濃度を示した。また、過飽和溶液からの析出パターンは、薬物によって大きく異なっており、以下の3パターンに分類された。

1) アルベンダゾール

初濃度は $800 \text{ }\mu\text{g/mL}$ として調製したものの、実験開始5分後に溶解していた濃度は $4 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 程度まで急激に低下した。この時の濃度は、懸濁液中の濃度に比べて約3倍高く、かつ4時間までほぼ一定の値を示したことから、アルベンダゾールの過飽和溶液では、過飽和度は低いものの過飽和状態が長時間維持された。

2) ジピリダモール

過飽和溶液中では、実験開始から30分間程度はほぼ100%の薬物が溶解した状態で存在し、その後、時間の経過とともに溶解濃度が減少した。2時間後の溶解濃度は約 $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ であり、その後、徐々に濃度が低下し、実験終了時においても過飽和溶液中の溶解濃度は、懸濁液中濃度よりも有意に高い値であった。

3) ゲフィチニブおよびケトコナゾール

ゲフィチニブでは、実験開始5分後に約90%の薬物が溶解していたものの、その後、時間経過とともに溶解濃度は減少し3時間後には、懸濁液中濃度とほぼ同じ値になった。ケトコナゾールでは、5分後の溶解濃度は初期濃度の約50%程度であったが、その後の濃度推移はゲフィチニブとほぼ同様であり、2時間後には懸濁液中濃度とほぼ同程度となった。

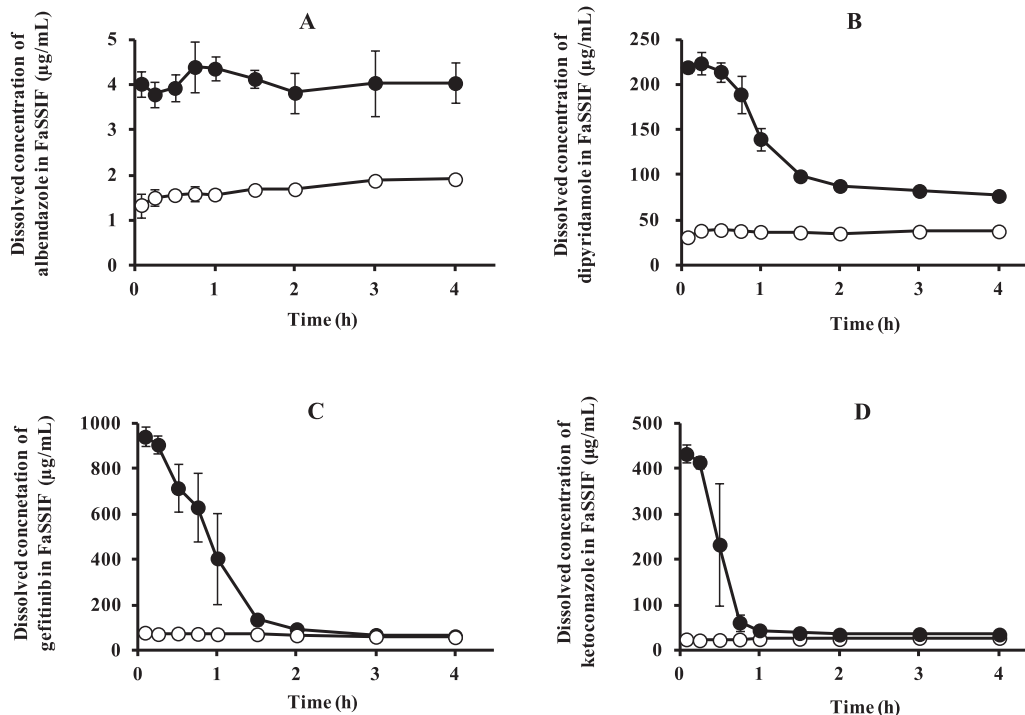


図1 *In vitro* 溶解濃度推移
 アルベンダゾール (A), ジピリダモール (B), ゲフィチニブ (C), ケトコナゾール (D).
 懸濁液 (○), 過飽和溶液 (●).

表1 *In vitro* 懸濁液および過飽和溶液の溶解濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{dissolved}$) とその比 (過飽和溶液/懸濁液)

	$AUC_{dissolved}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)		$AUC_{dissolved}$ 比 (過飽和溶液/懸濁液)
	懸濁液	過飽和溶液	
アルベンダゾール	7 ± 0.4	16 ± 2^a	2.3
ジピリダモール	145 ± 1	454 ± 6^a	3.1
ゲフィチニブ	263 ± 10	997 ± 124^a	3.8
ケトコナゾール	100 ± 7	311 ± 36^a	3.1

^a $p < 0.01$, vs 懸濁液.

過飽和による溶解改善の指標として各薬物の溶解濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{dissolved}$) および $AUC_{dissolved}$ 比 (過飽和溶液/懸濁液) を算出し, 表1にまとめた. その結果, 過飽和溶液とすることで *in vitro* における薬物溶解量が2~4倍程度増大することが明らかとなった.

4. 過飽和溶液からの析出物の結晶形評価

次に, 過飽和溶液からの薬物の析出過程に明確な違いが認められ, その原因を明らかにすることを目的として, 過飽和溶液から析出物について示差走

査熱量測定 (Differential scanning calorimetry, DSC) を行い, その融点やガラス転移温度を原薬と比較することにより, 過飽和溶液の濃度推移に対する薬物の結晶形の影響に関して考察した. 図2にアルベンダゾール, ジピリダモール, ケトコナゾールについて, それぞれ原末および過飽和溶液中析出物のDSCパターンを示した. *In vitro* での検討で過飽和状態が実験終了時まで維持されたアルベンダゾールおよびジピリダモールでは, 明確なガラス転移温度は観察されなかったものの, 析出物では原末と比べて明らかに低い温度に吸熱ピークが観察された.

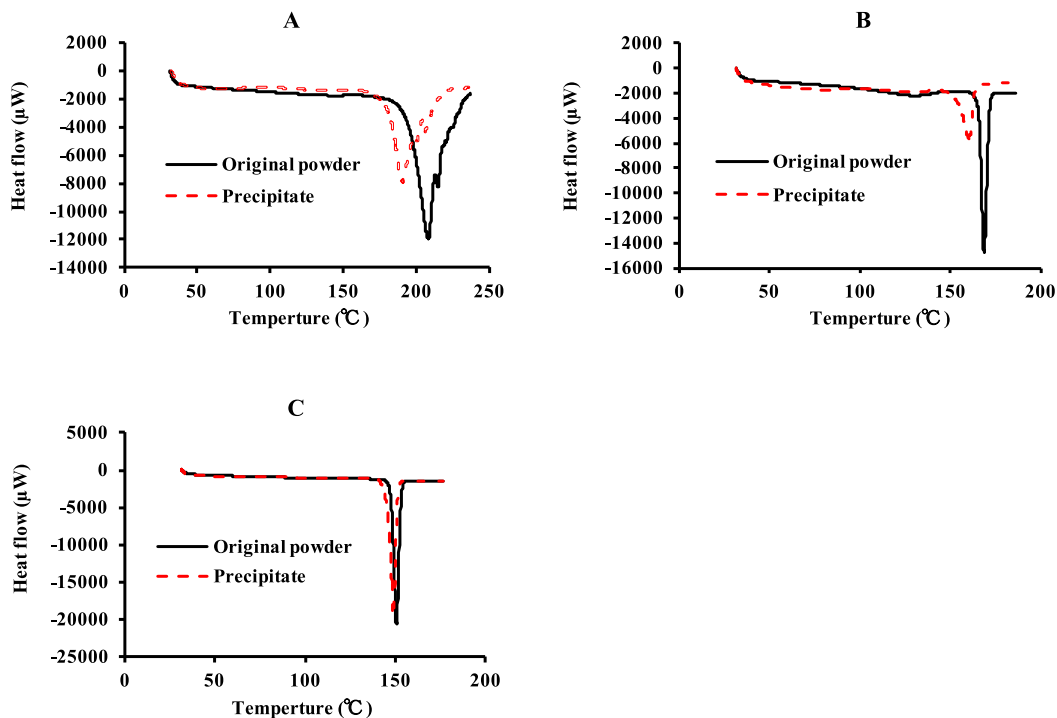


図2 原薬および析出物のDSC測定結果
 アルベンダゾール (A), ジピリダモール (B), ケトコナゾール (C).
 懸濁液 (実線), 過飽和溶液からの析出物 (点線).

一方、過飽和現象が1時間程度で消失したケトコナゾールの場合には、吸熱ピークは析出物、原末ともほぼ同じ温度に認められた。また、いずれの薬物についても、その原末に認められた吸熱ピークの温度は、薬物固有の融点とほぼ一致した。一般に、同一薬物では融点の高い結晶形が熱力学的に安定であると考えられることから、アルベンダゾールおよびジピリダモールの過飽和溶液からの析出物は原末よりも不安定な結晶多形を含んでいることが示唆された。したがって、アルベンダゾールおよびジピリダモールで過飽和状態が実験終了時まで持続した理由として、薬物が熱力学的に不安定な結晶形として析出し、原末薬物の飽和溶解度よりも高い濃度が維持されたものと推察された。一方、ケトコナゾールは原末と同じ安定晶として析出したため、溶解薬物濃度は速やかに飽和溶解度まで低下したものと考えられた。ゲフィチニブについては十分量の析出物試料が調製出来なかったためDSC測定は実施しなかったものの、その過飽和濃度推移から、ケトコナゾールと同様に安定晶の薬物が析出したものと思われる。以上の結果より、過飽和溶液中で溶解している薬物濃度の推移を精度良く評価するためには、析出

物の結晶形の検討が重要であることが考えられた。

5. *In vivo* 消化管吸収に及ぼす過飽和溶液の影響

最後に、過飽和溶解の *in vivo* 吸収に及ぼす影響について検討した。図3に、各薬物小腸内投与後の血漿中濃度の時間推移を4時間まで観察した結果を示した。いずれの薬物においても、過飽和溶液投与後の血漿中濃度は、懸濁液投与群よりも高く、過飽和による溶解濃度の上昇が *in vivo* での吸収率増加に寄与することが明らかとなった。それぞれの薬物について、図1に示した *in vitro* での溶解濃度の時間推移と図3のラット血漿中濃度推移を比較すると、過飽和溶液中で一定の溶解濃度が4時間まで維持されたアルベンダゾールでは、血漿中濃度もほぼ一定となり、実験終了時まで吸収が継続したものと推察された。一方、ジピリダモールおよびケトコナゾールでは、過飽和溶液中の濃度の低下に伴って吸収速度が低下したものと考えられた。しかし、ゲフィチニブでは、*in vitro* では過飽和液中の濃度は速やかに低下したものの、血漿中濃度はほぼ一定の値が維持された。これは、ゲフィチニブの体内半減期が極めて長い(ラット、イヌにおいて3~6時間、ヒト

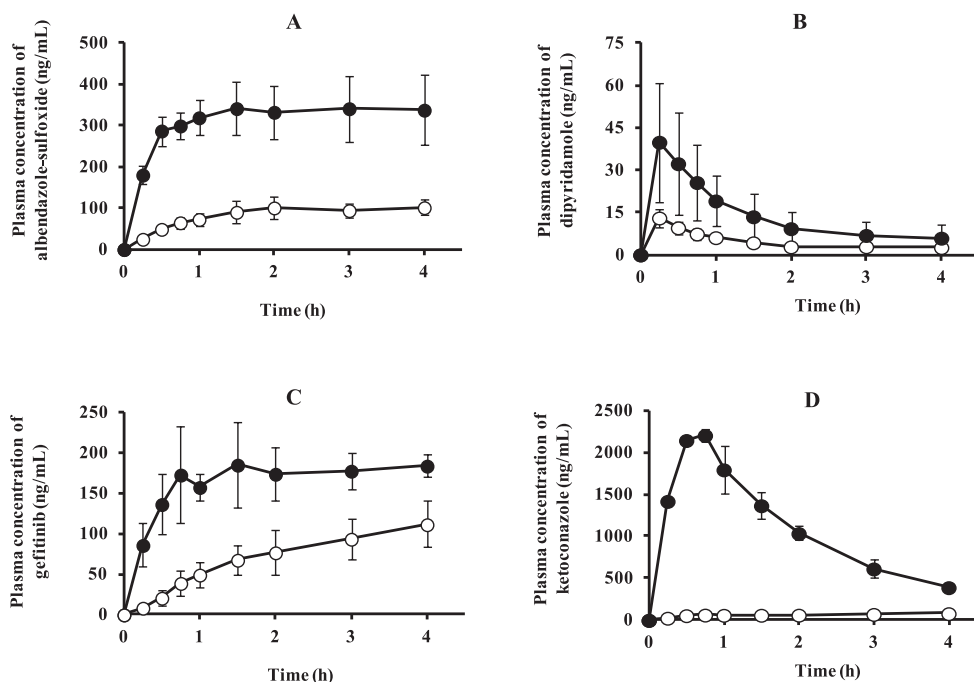


図3 *In vivo* 血漿中濃度推移
 アルベンダゾール代謝物 (A), ジピリダモール (B), ゲフィチニブ (C), ケトコナゾール (D).
 懸濁液 (○), 過飽和溶液 (●).

表2 *In vivo* 懸濁液および過飽和溶液の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{plasma}) とその比 (過飽和溶液/懸濁液)

	AUC_{plasma} (ng · h/mL)		AUC_{plasma} 比 (過飽和溶液/懸濁液)
	懸濁液	過飽和溶液	
アルベンダゾール代謝物	327 ± 68	1,240 ± 236 ^a	3.8
ジピリダモール	18 ± 2	55 ± 29	3.0
ゲフィチニブ	276 ± 73	651 ± 104 ^a	2.4
ケトコナゾール	247 ± 128	4,389 ± 187 ^a	17.8
ケトコナゾール+ABT	1,718 ± 615	7,225 ± 538 ^a	4.2

^a $p < 0.01$, vs 懸濁液投与群.

において14~48時間)ため、吸収された薬物は長時間血漿中に滞留し、今回の実験時間内では消失相が検出されなかったものと考えられた。各薬物について、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{plasma})、および過飽和溶解による吸収改善効果の指標として AUC_{plasma} 比 (過飽和溶液/懸濁液) を算出し、表2に示した。 AUC_{plasma} 比より、過飽和溶液投与群では、アルベンダゾール、ジピリダモール、ゲフィチニブ、ケトコナゾールの吸収量は、懸濁液投与群に比べ3.8, 3.0, 2.4, 17.8倍大きくなることが示された。この値は、ケトコナゾールを除いた3種の薬物では、 $AUC_{dissolved}$ 比(それぞれ2.3, 3.1, 3.8)と

同程度であり、*in vitro*での溶解量の増加が*in vivo*での吸収量の増加に反映されたものと考えられた。しかしながら、ケトコナゾールの AUC_{plasma} 比は、 $AUC_{dissolved}$ 比 (=3.1) に比べて顕著に大きな値となったことから、最後にその原因について検討した。

6. 過飽和溶液による消化管、肝代謝への影響

ケトコナゾールはCYP (Cytochrome P450) の基質となるため、過飽和溶解による消化管、肝代謝への影響が示唆される。そこで、本項では代謝酵素の影響を除外した条件で過飽和による吸収改善効果を評価した。CYP阻害剤として1-アミノベンゾトリア

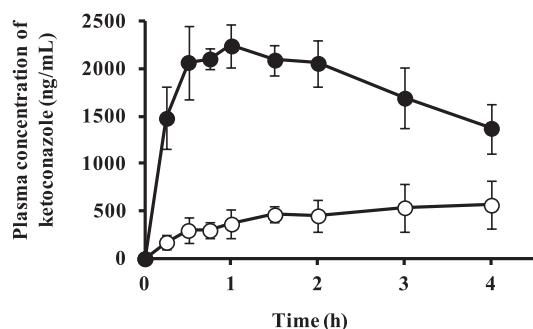


図4 *In vivo* ABT全処理ラットにケトコナゾール投与後の血漿中濃度推移
懸濁液 (○), 過飽和溶液 (●).

ゾール (ABT)⁴⁾によって前処理したラットに対してケトコナゾールの過飽和溶液, または懸濁液を投与し, 血漿中濃度推移, AUC_{plasma} 値を観察した. 図4に示すように, 図3Dの結果と比べて, 懸濁液投与後の血漿中濃度が有意に高くなった. AUC_{plasma} 値の比較においても, 過飽和溶液投与ではABT前処理群は非処理群の1.6倍, 懸濁液投与では7倍高くなり, その結果, ケトコナゾールの AUC_{plasma} 比は4.2に減少した(表2). この値はABT未処理群での値である17.8に比べて顕著に低く, また *in vitro* での $AUC_{\text{dissolved}}$ 比3.1に近い値であった. 以上の結果より, ケトコナゾールを懸濁液として投与した場合には, 消化管あるいは肝臓のCYP3Aによって初回代謝を受け, 全身循環血中への吸収が制限されていたのに対し, 過飽和溶液投与ではCYP3Aが飽和し, 全身血中への吸収率が過飽和による溶解度上昇の効果以上に大きくなっていったものと推察された.

7. 終わりに

以上, *in vitro* での溶解・析出過程と *in vivo* ラット消化管吸収率の変化を解析することによって, 難溶解性薬物の消化管吸収に及ぼす過飽和溶解の影響を定量的に予測できることを明らかとした. また, 過飽和溶解によって消化管や肝代謝が影響を受ける可能性も示された.

現在, 医薬品候補として開発・選択される難水溶性化合物の数は増加しており, 今後も本研究成果は有用であると考えられる. 一方, 中分子や高分子バイオ医薬品の開発も急速に進んでおり, 今後もその開発は, 加速するものと考えられる. その中で, 薬剤学分野の研究者としてどのように展開していくべきかしっかり考えていきたい.

終わりに臨み, これまでの研究に際してご指導, ご鞭撻賜りました摂南大学薬学部薬剤学研究室 山下伸二教授, 薬物送達学研究室 佐久間信至教授, 薬剤学研究室 片岡誠准教授, 政岡祥江元助手, 南景子助教, 元摂南大学薬学部毒性学研究室 藤森廣幸教授をはじめ多くの先生方, ならびに公私ともに日々の研究やレジャーなど苦楽を共にした多くの卒業生, 在校生に深甚なる謝意を表します.

引用文献

- 1) S. Sakuma, H. Higashino, H. Oshitani, Y. Masaoka, M. Kataoka, S. Yamashita, K. Hiwatari, H. Tachikawa, R. Kimura, K. Nakamura, H. Kumagai, J. C. Gore, W. Pham, Essence of affinity and specificity of peanut agglutinin-immobilized fluorescent nanospheres with surface poly(N-vinylacetamide) chains for colorectal cancer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **79** (3), 537–543 (2011).
- 2) S. Yamashita, M. Kataoka, H. Higashino, S. Sakuma, T. Sakamoto, H. Uchimarui, H. Tsukikawa, M. Shiramoto, H. Uchiyama, H. Tachiki, S. Irie, Measurement of drug concentration in the stomach after intragastric administration of drug solution to healthy volunteers: Analysis of intragastric fluid dynamics and drug absorption, *Pharm. Res.*, **30** (4), 951–958 (2013).
- 3) H. Higashino, T. Hasegawa, M. Yamamoto, R. Matsui, Y. Masaoka, M. Kataoka, S. Sakuma, S. Yamashita, *In vitro-in vivo* correlation in the effect of supersaturation on intestinal absorption of BCS class 2 drugs, *Mol. Pharm.*, **11** (3), 746–754 (2014).
- 4) T. Hasegawa, S. Nakanishi, K. Minami, H. Higashino, M. Kataoka, Y. Shitara, S. Yamashita, Increase in the systemic exposure of primary metabolites of Midazolam in rat arising from CYP inhibition or hepatic dysfunction, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **32** (1), 69–76 (2017).