

## 調査・研究報告書

### 難水溶性薬物の乳剤化による経口吸収改善の可否を決定する因子の探索

北海道大学大学院薬学研究院 菅原 満

共同研究者：武隈 洋、佐藤夕紀

(〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目 TEL:011-706-3923)

#### 要旨

【目的】本研究は、低吸収性や吸収のバラツキが問題となる難溶性薬物の経口吸収改善の可否を決定する因子を、乳剤化による吸収増大および排出トランスポーターの影響に着目して明らかにすることを目的とした。

【方法】乳剤化および排出トランスポーターが薬物の消化管吸収性に与える影響は、ラットへ薬物を経口投与後、血液中の濃度推移を経時的に測定することで評価した。排出トランスポーター基質となる薬物の選別は、多孔性フィルター上に培養した Caco-2 細胞を用いた透過実験により行った。

【結果・考察】難溶性である BCS クラスⅣに属する薬物の消化管吸収改善の一つとして乳剤化が有用であることが明らかとなった。また、HLB 値の異なる 4 種の界面活性剤を用いて検討した結果、親水性の高い界面活性剤を用いる方が消化管吸収性の改善効果が高いことが示された。親水性の高い界面活性剤を用いて混合ミセルを形成させることにより、効率のかつ安定に非攪拌水層の透過を促進したものと考えられた。一方、排出トランスポーター基質のモデルとしてフロセミドの吸収を検討したところ、乳剤投与群の阻害剤による AUC 増大効果が原末の場合と比べて大きかったことから、排出トランスポーター基質となる薬物の乳剤化は潜在的に消化管吸収を増大させるが、排出トランスポーターによる排出でマスクングされ、必ずしも吸収改善につながらないことが示唆された。

#### 1、調査研究目的

経口投与後の消化管吸収性が悪い薬物は、体内に入る薬物量に個体間のバラツキが大きく、結果として薬効に差が生じることになる。したがって、薬物を医薬品として製剤化するためには、安定した高い吸収性を示すことが重要である。近年開発候補となる化合物は以前に比べて溶解度が極めて低いものの割合が高くなっており、40%以上の化合物が水溶性の低い部類に含まれるとの報告がある<sup>1,2)</sup>。これらの化合物の多くは BCS クラス 4 に属する。BCS 分類(Biopharmaceutics Classification System, Table 1)とは水への溶解性と消化管膜透過性の大小の組み合わせに基づく薬物分類として提唱された

概念である<sup>3,4)</sup>。BCSは製剤開発において被験者や製薬会社の負担を軽減することを目的としており、消化管吸収過程の律速段階の推定や製剤の生物学的同等性試験の効率化に活用されている<sup>5,6)</sup>。BCSクラス4に属する薬物は低溶解性・低膜透過性という特性を持つために消化管吸収性が悪く、一般的に製剤化が難しいのが現状である<sup>7)</sup>。

BCSクラス4に属するいくつかの薬物は乳剤化することで消化管吸収性が向上することが明らかとなっている。乳剤には水や油、乳化剤としての界面活性剤のほかに、より均一なエマルションを得るために補助界面活性剤や溶解補助剤が用いられることがあり<sup>8)</sup>、現在も様々な乳剤化手法の検討がなされている。薬物の乳剤化によるバイオアベイラビリティの改善には、薬物の溶解性の増大や放出の制御、小腸上皮細胞透過性の変化、加水分解および酸化からの保護などが関与するものと考えられる<sup>9,10)</sup>。

また、薬物の吸収性が低い原因のひとつには排出トランスポーターの関与が挙げられる<sup>11)</sup>。消化管に発現している代表的な排出トランスポーターには、ABC (ATP-binding cassette)トランスポーターであるP-glycoprotein (P-gp, MDR1: multidrug resistance protein 1)やBCRP (breast cancer resistance protein)がある。これらは消化管上皮細胞の刷子縁膜側に発現し、薬物を消化管上皮細胞から消化管内腔へ排出することで吸収を抑制する<sup>12,13)</sup>。排出トランスポーターに認識される薬物の場合、乳剤化による溶解性の改善などの工夫が必ずしも吸収改善につながらないこともあると考えられる。したがって、本研究ではBCSクラス4に属する薬物の消化管吸収に及ぼす乳剤化と排出トランスポーターの影響がどの程度であるか検討することにより、製剤化におけるトランスポーターの重要性を解明することは、吸収性が低い難溶性薬物であるBCSクラス4に属する薬物の製剤化の一助になると考えられる。

そこで、本研究では吸収性改善のための「乳剤化」に着目し、低吸収性や吸収のバラツキが問題となる難溶性薬物の経口吸収改善の可否を決定する因子を明らかにすることを目的とした。

## 2、調査研究方法

### 2-1 乳剤の調製

ガラス試験管に対象薬物を取り、oilとして用いたイソプロピルミリスチン酸 (IPM) に溶解した。さらに、Tween 80 (surfactant) と propylene glycol (co-surfactant) を加えて攪拌した。そこへ pH 7.4, 50 mM のリン酸緩衝液 (water) を加えて攪拌した。oil : surfactant + co-surfactant : water = 10.8 : 43.1 : 46.2 (wt%) の乳化した溶液 2 mL を調製した。ただし surfactant : cosurfactant = 50 : 50 (wt%) である。シクロスポリンについては、市販乳化製剤であるネオオーラル®を使用した。

### 2-2 ラットへの経口投与

Wistar系ラット(雄性、7-9週齢)を24時間絶食させ、diethyl etherで麻酔し、胃ゾ

ンデ法により 0.5% methyl cellulose 水溶液で懸濁した原末または調製した乳剤を経口投与した。Elacridar (P-糖蛋白質/BCRP 阻害剤) の影響を見るときには、薬物投与 10 分前に 0.5% methyl cellulose 水溶液で懸濁した Elacridar を 25 mg/kg weight となるように経口投与した。Control では 0.5% methyl cellulose 水溶液を投与した。投与量はそれぞれ、ルテインでは 0.5 mg/kg、コエンザイム Q<sub>10</sub> およびシクロスポリン A では 25 mg/kg、フロセミドでは 13 mg/kg とした。経時的に血液 0.3 mL を採取し、直ちに微量の heparin と混和し、シクロスポリン A の場合は全血を、その他の場合は 750×g で 10 分間遠心分離して 0.1 mL の血漿を得た。

### 2-3 体内動態パラメーターの算出

体内動態パラメーターの算出には Origin8.1J<sup>®</sup>を用い、2-コンパートメントモデルによって血中各薬物濃度を解析し、C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> および AUC の各パラメーターを得た。解析には以下の式を用いた。

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ie^{-k_{at}} \quad C = \text{血中各薬物濃度}$$

### 2-4 Caco-2 細胞を用いた薬物透過実験

Caco-2 細胞は、10% FBS、1% NEAA、2 mM L-glutamine、100 U/mL Penicillin-100 µg/mL Streptomycin を添加した DMEM をメディアウムに用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) で培養した。Caco-2 細胞をコラーゲンコートした Transwell 上に 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/well 播種し、16~34 日間培養し、Transepithelial electrical resistance (TEER) が 300 Ω · cm<sup>2</sup> 以上となったものを透過実験に使用した。Transwell から培養液を除去し、apical 側を 0.5 mL、basolateral 側を 1.5 mL の 37°C Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) で 2 回洗浄後、再び HBSS を加え、37°C で 10 分間プレインキュベーションした。TEER を測定し、300 Ω · cm<sup>2</sup> 以上であることを確認した後、HBSS を除去した。apical 側に HBSS 0.5 mL、basolateral 側に薬物溶液 1.5 mL を加えて 37°C でインキュベーションし、経時的に apical 側から 50 µL サンプリングし、同量の HBSS 50 µL を戻した。

見かけの透過係数 P<sub>app</sub> は、以下の式に従って算出した。

$$P_{app} = \frac{dA}{dt} \times \frac{1}{SC_0}$$

$\frac{dA}{dt}$  は薬物の細胞膜透過速度、S は細胞膜の表面積、C<sub>0</sub> は donor 側の薬物初濃度である。

### 2-5 定量法

薬物の定量はすべて HPLC 法を用いて行った。

### 3、調査研究成果

#### 3-1 各薬物の消化管吸収に及ぼす乳剤化の影響

本研究では、BCS クラスIVに属する薬物としてコエンザイム Q10 (CoQ10)、シクロスポリン A (CsA)、ルテイン (Lut) を用いた (Table 1)。Fig. 1 に CoQ10 および CsA の原末あるいは乳剤投与時の血漿中 (CoQ10) あるいは全血中 (CsA) 薬物濃度推移を示す。両薬物とも、原末投与時に比べて乳剤投与時において血中濃度は高く推移し、乳剤化による吸収性の増大が示唆された。そこで、ルテインを含め、各薬物の原末投与時および乳剤投与時の血中濃度曲線下面積 (AUC) を算出した。その結果を Fig. 2 に示す。いずれの薬物も乳剤化により AUC は増大した。

#### 3-2 乳剤の吸収性の界面活性剤成分による違い

乳剤化により BCS クラスIVに属する薬物の消化管吸収性を向上できることが示されたことから、次に、乳化に用いる基剤成分の一つである界面活性剤の影響を検討した。乳剤は主に水層、油層、界面活性剤により構成され、脂溶性物質の乳化には油層と界面活性剤とのバランスが重要であると考えられる。今回の検討では油層を Isopropyl myristate を用いて一定に保ち、HLB (Hydrophile Lipophile Balance、界面活性剤の親水性/親油性の定量的尺度、0-20 までの数値で表され数値が大きいほど親水性であることを示す) の異なる界面活性剤間で比較した。本検討で用いた界面活性剤を Fig. 3 に示す。CoQ10、CsA、Lut を用いた検討の結果、Fig. 4 に示すように、程度の違いがあるものの HLB 値の大きな (親水性の高い) 界面活性剤を使用した方が吸収性の高い乳剤が調製できた。

#### 3-3 排出トランスポーターの影響

薬物の消化管吸収性評価に汎用される Caco-2 細胞を用いた透過実験の結果、フロセミド (Fur) の側底膜側から頂側膜側への透過が P-糖蛋白質および BCRP の阻害剤である Eracridar の共存により阻害された (Fig. 5)。したがって、フロセミドは消化管において排出方向の輸送を受けることが示唆された。

そこで、ラットにフロセミドの原末および乳剤を経口投与し、吸収に及ぼす Eracridar の影響を検討した。その結果、Fig. 6 に示すように、フロセミドの吸収は原末と乳剤間ではほとんど差が認められなかった。しかしながら、Eracridar を併用した場合、原末、乳剤いずれを用いた場合においても吸収の増大が認められ、その増大効果は乳剤を用いた方が顕著だった。

### 4、考察

本研究において、難溶性である BCS クラスIVに属する薬物の消化管吸収改善の一つとして乳剤化が有用であることが明らかとなった。膜透過性の改善は問題として残るものの、油層の存在による薬物の溶解性改善と、ミセル形成により消化管表面に存在する非攪拌水層の透過を促進することがひとつの要因と考えられる。

HLB 値の異なる 4 種の界面活性剤を用いて検討した結果、Tween20 や Tween80 のような HLB 値の高いものを用いた場合に比較的高い AUC が得られた。すなわち親水性の高い界面活性剤を用いる方が消化管吸収性の改善効果が高いことが示された。一般に、脂溶性薬物の消化管吸収過程の律速段階は、非攪拌水層での拡散と言われていることから、このような差が得られた理由として、親水性の高い界面活性剤を用いて混合ミセルを形成させることにより、効率的かつ安定に非攪拌水層の透過を促進したことが考えられる。このメカニズムに関してはさらに詳細な検討が必要である。

最後に、薬物を乳剤化し、排出トランスポーター阻害剤と共にラットに経口投与することで、その基質の消化管吸収に及ぼす乳剤化と排出トランスポーターの影響について検討した。その結果、フロセミドの吸収は単独投与では原末と乳剤との間に差が認められなかったものの、阻害剤併用群において乳剤の AUC が高かったことから、乳剤化による吸収増大が示唆された。これは乳剤化により薬物の溶解性が増大し、消化管中でミセルとして存在することで、脂溶性薬物における膜透過の律速段階とされる非攪拌水層での拡散が容易になったためと考えられる。一方で、乳剤投与群の阻害剤による AUC 増大効果が原末の場合と比べて大きいことから、排出トランスポーターが機能している通常の状態ではこれらの乳剤は排出効果を受けやすいことが示唆された。結果として、フロセミドの乳剤化は潜在的に消化管吸収を増大させるが、排出トランスポーターによる排出でマスクされ、吸収改善につながらないことが示唆された。

## 5、まとめ

本研究結果より、難溶性薬物の消化管吸収改善に、乳剤化が有用な一手段であることが明らかとなった。また、HLB 値の高い（親水性の高い）界面活性剤を用いた方が HLB 値の低い界面活性剤に比べて改善効果が高いことが示された。一方、排出トランスポーターが関与する薬物においては必ずしも乳剤化が有用ではない場合があることが示唆された。

## 6、調査研究発表

1. 佐藤夕紀、鈴木里彩、武隈 洋、井関 健、菅原 満：機能性食品成分ルテインの乳化による消化管吸収の改善、医療薬学フォーラム 2011/第 19 回クリニカルファーマシーシンポジウム、旭川、2011 年 7 月
2. 佐藤夕紀、武隈 洋、井関 健、菅原 満：天然色素成分ルテインの乳化による消化管吸収改善、第 9 回日本機能性食品医用学会総会、大阪、2011 年 12 月

3. Sato Y., Mutoh H., Takekuma Y., Iseki K., Sugawara M. : Improvement of intestinal absorption of functional foods, lutein and coenzyme Q10, 8<sup>th</sup> World meeting on pharmaceutics, biopharmaceutics and pharmaceutical technology, Istanbul, March 2012

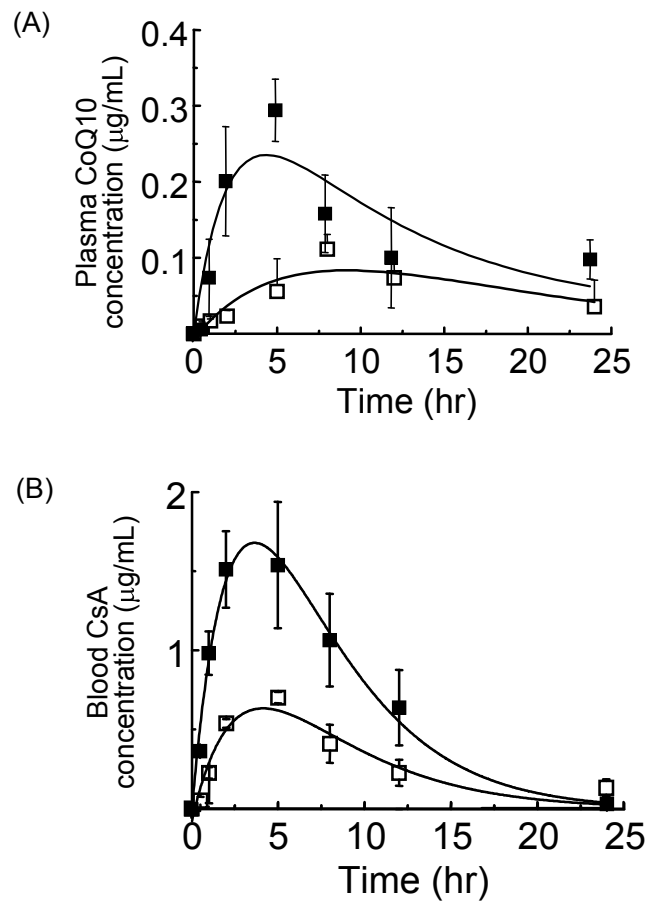
## 7、引用文献

1. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol.44, No.1, 235-249 (2000)
2. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol.58, 173-182 (2004)
3. Yu XL, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Shah VP, Lesko LJ, Chen ML, Lee VH, Hussain AS. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. Pharmaceutical Research, Vol. 19, No. 7, 921-925 (2002)
4. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical Research, Vol.12, No. 3, 413-420 (1995)
5. FDA. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for industry, FDA/CDER, Washington, DC (2000)
6. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. Molecular pharmaceutics, Vol.1, No.1, 85-96 (2004)
7. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol.29, 278-287 (2006)
8. Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. Nature Reviews Drug Discovery, Vol.6, 231-248 (2007)
9. Gareth Thomas. 製薬科学 メディシナルケミストのためのエッセンス (2002)  
116-122

10. Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, Setzer C, Quinkert RO, Martin F, Müller-Goymann C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharmaceutical Research*, Vol.27, 1469-86 (2010)
11. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport / absorption / elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research*, Vol.22, No.1, 11-23 (2005)
12. 澤田康文. 薬物動態・作用と遺伝子多型：薬物治療の患者個別化を目指した 21 世紀の新展開 (2001) 265-266
13. 杉山正康. 薬の相互作用と仕組み 第 8 版 (1997) 75-79, 356-361

**Table 1 BCS (Biopharmaceutics Classification System)**

	High Solubility	Low Solubility
High Permeability	<p><b>class 1 (Absorption Limit : Collapse)</b></p> <p>Diltiazem            Enalapril  Labetalol            Propranolol  Captopril            Metoprolol  Phenylalanine      Atropine</p>	<p><b>class 2 (Absorption limit : dissolution)</b></p> <p>Diclofenac            Ibuprofen  Phenytoin            Naproxen  Itraconazole            Indinavir  Desipramine            Digitoxin</p>
Low Permeability	<p><b>class 3 (Absorption limit : permeation)</b></p> <p>Famotidine            Ranitidine  Atenolol            Valsartan  Cimetidine            Metformin  Aciclovir            Pravastatin</p>	<p><b>class 4 (no in vitro-iv vivo correlation)</b></p> <p>Terfenadine            Colistin  Furosemide            Mebendazole  Ciclosporin            Albendazole  Acetazolamide            CoenzymeQ10</p>



**Fig. 1 Plasma CoQ10 (A) and blood CsA (B) concentration after oral administration of powder (□) or emulsion (■) in rats.**

Each point represents the mean  $\pm$  s.d. of 3 measurements.



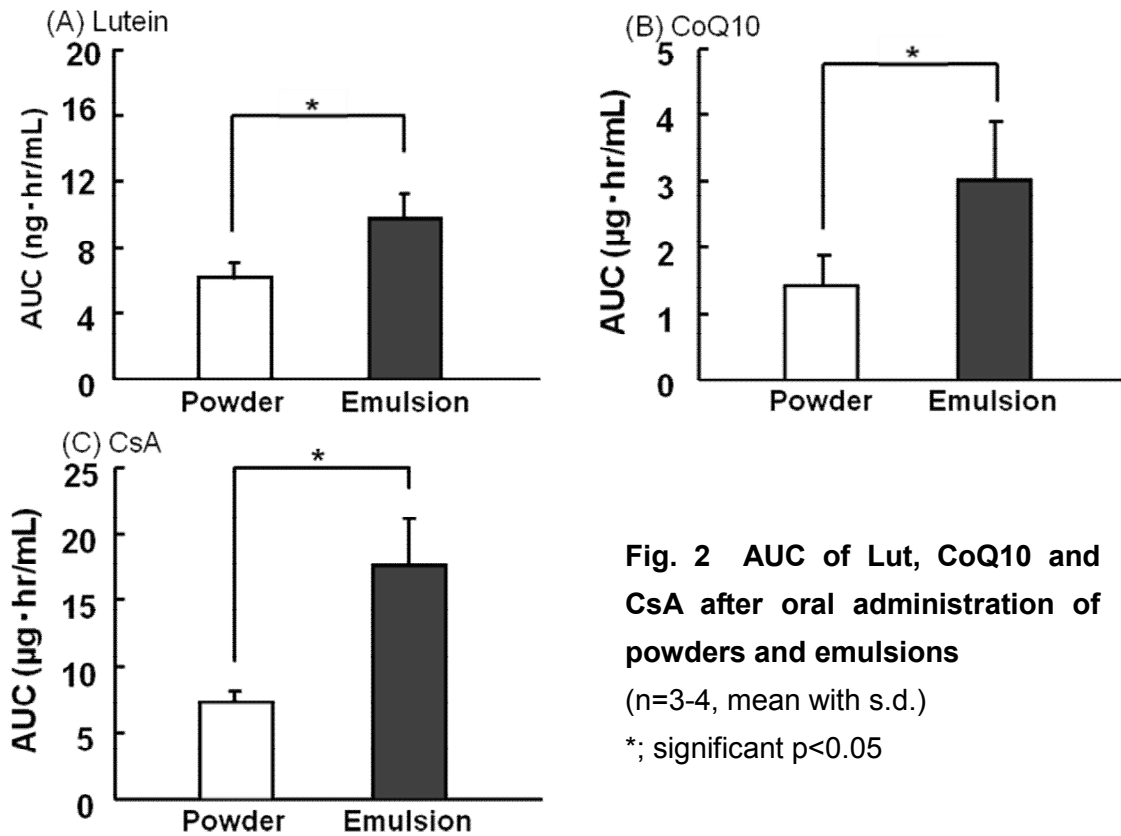


Fig. 2 AUC of Lut, CoQ10 and CsA after oral administration of powders and emulsions (n=3-4, mean with s.d.)  
\*; significant p<0.05

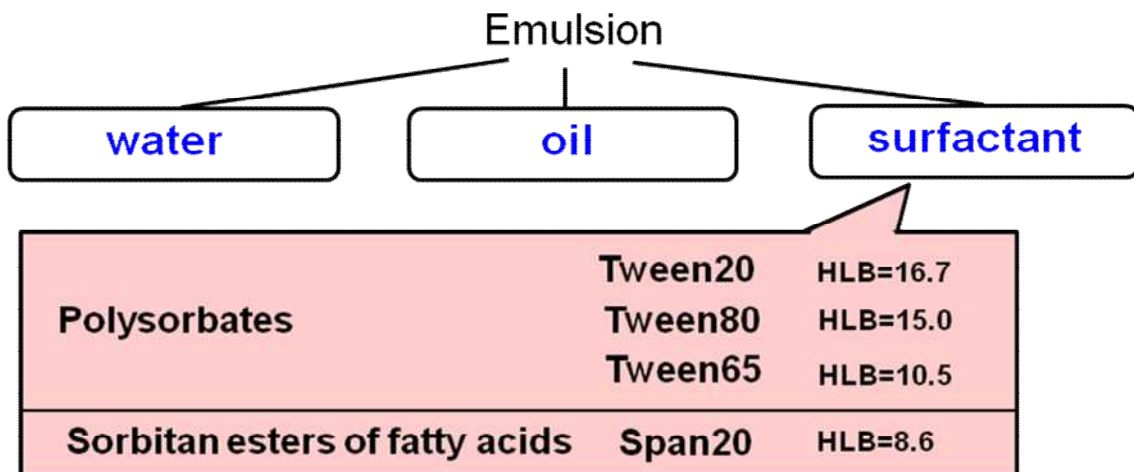
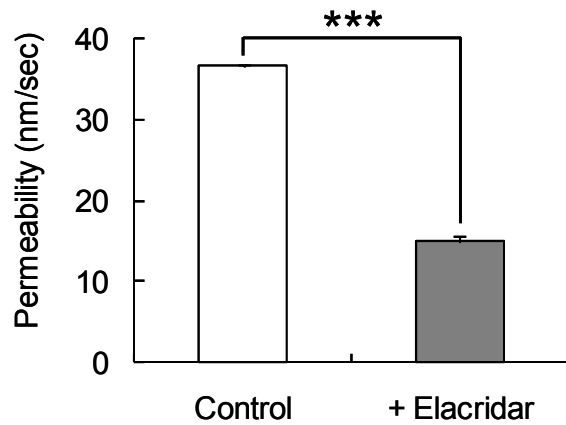
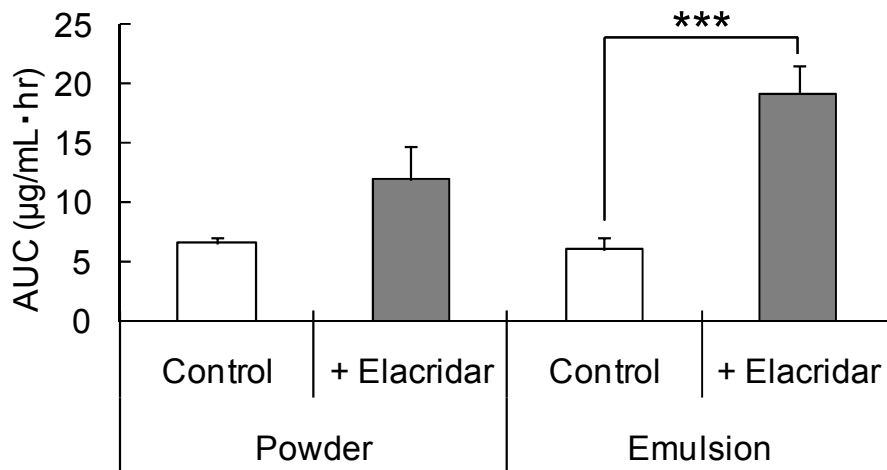


Fig. 3 Tested surfactant that have various HLB values





**Fig.5 Inhibitory effect of Elacridar (1  $\mu$  M) on the efflux (basolateral to apical) of furosemide (100  $\mu$  M) across Caco-2 cell monolayer**  
 Each column represents the mean with s.d. of 3 measurements.  
 \*\*\* ; significantly different at  $p < 0.001$ .



**Fig.6 Effect of elacridar on the absorption of furosemide after oral administration**  
 Each column represents the mean with s.d. of 3 measurements.  
 \*\*\* ; significantly different at  $p < 0.001$ .