

より安全なセルフメディケーションのための
吸収改善・効果改善を期待した製剤の開発

北海道大学大学院薬学研究院 助教

さとう ゆき
佐藤 夕紀

より安全なセルフメディケーションのための吸収改善・ 効果改善を期待した製剤の開発

北海道大学大学院薬学研究院 調査研究者 佐藤 夕紀

共同研究者 菅原 満

(〒 060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目 電話番号 011-706-3978)

要旨

一般に、経口吸収率の悪い成分は、体内に入る量に個体間のばらつきが大きく、効果に差が見られやすいことから、その製剤化のためには、安全性の観点からより低い投与量で安定した吸収性を示すことが重要である。本研究では、小腸コレステロールトランスポータ NPC1L1 をターゲットとして、低吸収性を示す成分をより細胞内に効率よく取り込む機構の解明とその機構を利用して新しい吸収改善のためのアプローチに着手した。その結果、本研究により NPC1L1 の基質を含む乳剤粒子は、粒子ごと細胞内へ取り込まれることが示された。また、その機構を利用して、難吸収性物質の吸収を改善できるかどうかをモデル物質として α -tocopherol を用いて検討した結果、コレステロールを含む乳剤粒子により α -tocopherol の細胞内取り込み量を改善することができた。また、NPC1L1 の基質である chol を加えたリポソームにより低吸収性・水溶性物質を吸収改善できるかをフルオレセインナトリウム、あるいは 5(6)-carboxyfluorescein を用いて検討した。その結果、リポソームに封入することで取り込み量が増大することが示されたものの、エゼチミブでの取り込み量に変化は見られず、細胞内への取り込みに乳剤とリポソームでは異なる機構が存在することが示唆された。

1、調査研究目的

近年、生活習慣病の増加、超高齢社会などの社会背景から、我が国の国民医療費は平成 25 年度に 40 兆円に到達し、今後もますます増大することが予想される¹⁾。その高騰する国民医療費の削減を期待して、医療機関を受診する前に自己で医薬品・サプリメント等を使用し健康管理する「セルフメディケーション」が推奨されている。セルフメディケーションにおいて重要な一般用医薬品(OTC)やサプリメント等の経口投与は、使用者の簡便性・安全性などから最も汎用されている投与形態である。この中で、難水溶性で脂溶性の高い成分が体内に吸収されるには、小腸で胆汁などにより乳化、ミセルを形成する必要がある。従来、コレステロール(chol)などの脂溶性の高い物質は、受動拡散により吸収されると考えられてきたが、小腸 chol トランスポータとして NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) の

関与が報告された²⁾。NPC1L1 は、chol のようなステロール骨格を持つ物質を認識して細胞内へ取り込むと考えられていたが、ステロール骨格を持たない α -トコフェロールやルテインなどの消化管吸収に NPC1L1 が関与していることが報告された^{3,4)}。当研究室はこれまでに、この NPC1L1 の基質である chol を乳剤中に含有させると、難水溶性物質である coenzyme Q10 (CoQ10) を吸収改善できることを明らかにしている⁵⁾。この手法が他の物質にも応用できるかについては更なる検討が必要である。

そこで本研究では、同様に NPC1L1 の基質を加えることで、CoQ10 だけでなく、難吸収性成分の吸収改善が可能かどうかを明らかにする。難吸収性成分は、必ずしも脂溶性物質だけでなく、水溶性物質も考えられる。そのため、剤形として乳剤だけではなく、リポソームも着目して検討を行うこととした。本研究により、これまでに低吸収性が問題となり製剤化しにくかった成分の新しいアプローチによる吸収改善法を提案し、製剤開発の一助とすることを目標とする。

2、調査研究方法

2-1 実験材料

コレステロール(非ラベル体)、および α -tocopherol は、北海道和光純薬株式会社より購入した。また、5(6)-carboxyfluorescein は、Sigma-Aldrich 社より入手した。その他、実験に用いる試薬は、試薬特級相当、また HPLC 級のものを用いた。

2-2 使用細胞

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターより購入し、継代数 45-60 のものを使用した。Caco-2 細胞の培養は 37°C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で行い、予め 56°C で 30 分間加熱処理することにより血清中の補体を非効化した 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum)、100 IU/mL ペニシリン-100 μg/mL ストレプトマイシン、0.1 mM NEAA (non essential amino acids)、4 mM L-グルタミンを含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を培養液とした。培養液を 1-2 日おきに交換し、播種 5-7 日後に継代を行った。継代は、滅菌 PBS で細胞を 2 回洗浄後、トリプシン-EDTA 溶液 (0.25% トリプシン、0.02% EDTA in PBS) により細胞を遊離させて行った。

2-3 Caco-2 細胞の NPC1L1 発現確認 (ウェスタンプロット法)

A) Cell lysate の調製

6 穴プレートに Caco-2 細胞を 4.0 × 10⁵ cells/well となるように播種し、コンフルエンスの状態に達してから使用した。培養液を吸引除去後、細胞を PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na₂PO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) で洗浄し、スクレイパーを用いて細胞を回収した。1,000 × g、3 分間、4°C で遠心分離し、溶解バッファー (Triton X-100 1.0%, SDS 0.1% in PBS) を 100 μL 添加し、氷上に 5 分間静置させた。その後、15 分間超音波処

理により、細胞を完全に溶解させ、 $21,500 \times g$ 、15分間、 $4^{\circ} C$ で遠心分離した。この上層を $30 \mu L$ ずつ分取し、cell lysateとした。抽出したタンパク質は、Lowry法^{⑥)}により、BSAを標準タンパク質として算出した。

B) SDS-PAGE

Table 1に示す組成でrunning gelを作製し、予め組み立てておいたゲル板流し込み、50%エタノールを重層した。ゲルが固まったことを確認し、50%エタノールを除去した。続いて、Table 2に示す組成でstacking gelを作製し、running gelの上に加えてコームを作成し、固まるまで静置した。

Table 1 Running gel の組成		Table 2 Stacking gel の組成	
30% acryl amide	4 mL	30% acrylamide	0.8 mL
Milli-Q water	3.4 mL	Milli-Q water	2.9 mL
1.5 M Tris (pH=8.8)	2.5 mL	0.5 M Tris (pH=6.8)	1.25 mL
10% SDS	0.1 mL	10% SDS	0.05 mL
Ammonium Peroxodisulfate (APS)	Approximately 27 mg	APS	Approximately 14 mg
TEMED	16 μL	TEMED	8 μL

ゲルのコームを抜いて電気泳動槽にセットし、泳動バッファー (Tris 50 mM, Glycine 0.38 M, SDS 0.1%) を注ぎ、サンプル(タンパク質 : $2 \times$ Sample Buffer = 1:1, 40 μg /lane)、マーカーを $5 \mu L$ 、最初は4 mA/枚で、Stacking gelに入った後は20 mA/枚で約1時間電気泳動した。Table 3に $2 \times$ Sample bufferの組成を示す。

Table 3 $2 \times$ sample buffer の組成	
成分	濃度
2-mercaptoethanol	10%
SDS	2%
Tris-HCl	0.0585 M
Glycerin	25%
Bromophenol Blue	0.04%

C) PVDF膜への転写

泳動後、ゲルを転写バッファー (Tris 25 mM, Glycine 0.19 M, メタノール 10%) に浸して5分間振盪し、セミドライ式転写装置を用いて、90 mA/枚、90分間の条件でPVDF膜に転写した。

D) 一次抗体反応、二次抗体反応および検出

転写後、PVDF 膜をブロッキング溶液 (5% skin milk powder in T-TBS) で 90 分間振盪した後、T-TBS (0.05% Tween 20, 20 mM Tris (pH 7.5), 137 mM NaCl) で 10 分間 × 5 回振盪洗浄し、1 次抗体溶液で、室温、オーバーナイトで振盪した。抗体溶液を捨て、T-TBS で 10 分間 × 5 回振盪洗浄し、二次抗体溶液で室温、1 時間振盪した。抗体溶液を捨て再度 T-TBS で 10 分間 × 5 回振盪洗浄した。膜 1 cm²当たり 0.125 mL の ImmunoStar Zeta® (1 液 : 2 液 = 1:1 (v/v)) を添加し、発光は Image Quant LAS4010 (GE ヘルスケアジャパン株式会社) を用いて測定した。NPC1L1 と α -tubulin の一次抗体溶液、二次抗体溶液の組成は Table 4 に示す通りである。

Table 4 NPC1L1 と α -tubulin 抗体溶液の組成

NPC1L1 (Cell Signaling: 49063)	
Primary Antibody Buffer	Goat polyclonal antibody against NPC1L1 diluted at 1:200 in Santa Cruz Biotechnology®
Secondary Antibody Buffer	HRP conjugated donkey anti-goat IgG diluted at 1:2000 in T-TBS
α -tubulin (SIGMA: T5168)	
Primary Antibody Buffer	Mouse polyclonal antibody against α -tubulin diluted at 1:2000 in T-TBS
Secondary Antibody Buffer	HRP conjugated goat anti-mouse IgG diluted at 1:1000 in T-TBS

2-4 乳剤の調製

Isopropyl myristate 中に主成分を溶解させ、界面活性剤成分としてタウロコール酸ナトリウムを終濃度が 500 μ M となるように添加し、10 秒間ボルテックスで攪拌した後、amplitude 40, Cycle 1 で 30 秒間超音波ホモジナイザーにより攪拌を行い、これを薬液(乳剤) (oil 成分として isopropyl myristate 1%、transport buffer 成分 99%)とした。Transport buffer の組成は Table 5 の通りである。

Table 5 Transport buffer の組成

成分	濃度
NaCl	140 mM
KCl	5.4 mM
CaCl ₂	1.8 mM
MgSO ₄	0.8 mM
D-Glucose	5 mM
Tris(pH 7.5/HEPES)	25 mM

2-5 リポソームの調製

卵黄ホスファチジルコリン 20 mg (26 μmol) と NPC1L1 の基質であるコレステロール 3.9 mg (10 μmol) を 50 mL 容すり付ナスフラスコに入れ、2 mL のクロロホルムを加えて溶解させた。その溶液をロータリーエバポレータで 1 時間減圧留去し薄膜形成させた。さらに 3 mL ジエチルエーテルと 0.5 mL のフルオレセインナトリウム溶液または、5(6)-carboxyfluorescein 溶液を加えて、浴槽型ソニケータで 4 °C、5 分間ソニケーションにより攪拌した。続いて、ロータリーエバポレータで 3 ~ 5 分間減圧留去し、transport buffer 2.5 mL を加えて 10 ~ 15 分間ボルテックスにより攪拌した。さらに、エーテル臭がなくなるまでロータリーエバポレータで減圧留去し、リポソーム溶液を得た。このリポソーム溶液を Sephadex G-50 カラムを用いてゲルfiltration し、リポソーム画分のみを実験に用いた。

2-6 取り込み実験および濃度測定

A) α -tocopherol

2-4 乳剤調製で調製した乳剤に、 α -tocopherol の終濃度が 5 μg/mL となるように添加した溶液を用いて α -tocopherol の取り込み実験を行った。メディウム吸引後に transport buffer 1 mL で 1 回洗浄し、1% DMSO (25 μM エゼチミブ有りまたは無し) を含む Transport buffer を添加し 1 時間プレインキュベーションした。その後 500 μL の薬液を添加して 0, 15, 30, 60, 90 分インキュベートした。時間経過後、薬液を吸引し氷冷した Transport buffer (1 mM タウロコール酸ナトリウム in 超純水) で 2 回洗浄した。測定は 50 mM リン酸バッファー 300 μL を加えたのちよく懸濁した後、-80 °C でインキュベートし細胞を破碎し、この溶液を細胞破碎液とした。Scheme 1 に従ってサンプルを調製し、Table 6 に示す条件で HPLC 法によって濃度を測定した。取り込み量は Lowry 法に準拠して BSA を標準タンパク質として算出されたタンパク質量で補正した。

Scheme 1 α -Tocopherol extraction method

Sample 100 μL

↓ Added to 100 μL of 0.1 M Na₂HPO₄

↓ Added to 200 μL of methanol

(containing 1 μg/mL δ-tocopherol (as an internal standard))

↓ Extracted with 1100 μL of Hexane/dichloromethane=4/1 (v/v)

↓ Mixed vigorously by a vortex mixer for 1.5 min

↓ Centrifugation 3000 rpm for 10 min at room temperature

900 μL of the organic phase

↓ Evaporated to dryness at 40°C

Residue

↓

reconstituted in 200 μL of HPLC mobile phase

Table 6 HPLC condition for α -tocopherol

Column	Inertsil® ODS-4
Eluent	Methanol/distilled water=98/2 (v/v)
Flow rate	0.4 mL/min
Light excitation	298 nm
Light emission	325 nm
Column temp.	30°C
Injection volume	15 μ L
Internal standard	δ -tocopherol

B) フルオレセインナトリウムおよび5(6)-carboxyfluorescein

メディウムを吸引後、37°Cに加温したtransport buffer 1mLで洗浄し、5(6)-carboxyfluoresceinを10 μ g/mLの濃度で含有するリポソーム、または10 μ g/mL 5(6)-carboxyfluorescein溶液を250 μ L添加して、0, 5, 15, 30, 60, 120分間インキュベートした。その後薬液を吸引し、氷冷したtransport buffer 750 μ Lで3回洗浄した。次に細胞に0.1N NaOH 250 μ Lを加えてよく懸濁した。この懸濁液200 μ Lを96穴BD Falcon blackプレートに加え、励起波長490 nm、測定波長520 nmとしてマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。取り込み量はLowry法に準拠してBSAを標準タンパク質として算出されたタンパク質量で補正した。

3、調査研究成果

3-1 Caco-2 細胞における NPC1L1 遺伝子の確認と条件検討

検討に先立ち、Caco-2細胞におけるNPC1L1発現確認を行った。その結果、Caco-2細胞においてタンパク質レベルでもNPC1L1遺伝子が発現していることが確認された(Fig. 1)(mRNAレベルでの発現も既に確認済み5))。

3-2 NPC1L1による難吸収性(脂溶性)物質の吸収改善

これまでの検討で、難水溶性物質の吸収改善のために乳剤中にNPC1L1の基質(chol)を加えると、CoQ10を吸収改善できることが示されている5)。そこで、この吸収改善の戦略が同様に他の物質の応用できるか否かを明らかにする目的で、サプリメント等で汎用されている α -tocopherolに着目した。

はじめに α -tocopherolのCaco-2細胞内への取り込みの経時的变化を検討したところ、 α -tocopherolの取り込みは60分までは直線性を保ち増大しているが、90分ではと取り込み量が減少することが示された(Fig. 2-A)。測定感度の観点などから以降は、 α -tocopherolの取り込み時間は30分とすることとした。また、 α -TocopherolはすでにNPC1L1の基質であることが報告されており、NPC1L1阻害剤であるエゼチミブにより取

り込みの抑制が観察されるかを確認した。これまでの我々の知見において、エゼチミブ 25 μM で chol の取り込みが有意に減少することを確認している。今回も同様にコントロールと比較して、 α -tocopherol もエゼチミブ 25 μM で取り込み量が減少することが確認された (Fig. 2-B)。さらに、これまででは chol を含まない乳剤で検討したが、chol を加えて吸収改善できるかを評価した。その結果、chol を含まない乳剤と比較して、chol を含む乳剤で α -tocopherol の細胞内取り込み量は有意に増大することが示された (Fig. 2-B)。

3-3 NPC1L1 による難吸収性(水溶性)物質の吸収改善

これまで、難吸収性(脂溶性)物質に関して検討を進めてきたが、ここで、NPC1L1 を介した水溶性物質の吸収改善が可能か否かを明らかにするため、chol を構成成分とするリポソーム内に評価が比較的容易であるフルオレセインナトリウムを封入し、Caco-2 細胞内への蛍光の取り込みを評価した。その結果、フルオレセインナトリウムのリポソーム非封入時と比較して、封入時では取り込み量は増大し、その効果はエゼチミブ 25 μM で抑制される傾向は示されたものの、明確な差は得られなかった (Fig. 3)。なお、ゲルろ過により、この時のリポソームへの封入率は 2.77% である。フルオレセインナトリウムを封入していないものでも取り込み量が大きかったことから、細胞膜をより透過しにくい性質の成分が望ましいと考えた。そこで、5(6)-carboxyfluorescein を選択し、まずリポソーム非封入、あるいは封入時の Caco-2 細胞内への取り込み量を観察した。その結果、非封入時あるいは封入時どちらの場合においても取り込み量は経時に増大することが示された (Fig. 4-A)。60 分以降で、この取り込み量の差が明確に見られたため、以降の検討は取り込み時間 60 分とした。続いて、エゼチミブを用いて 5(6)-carboxyfluorescein の取り込み量がどのように変動するかを評価した。その結果、非封入時と比較して封入時で取り込み量が増大することは確認されたものの、エゼチミブでの取り込み抑制は封入時、非封入時のいずれの場合においても確認されなかった (Fig. 4-B)。

4、考察

NPC1L1 は、小腸と肝臓に主に発現している取り込み系トランスポータであり、chol が NPC1L1 の基質となること、その選択的阻害剤であるエゼチミブが脂質異常症治療薬として汎用されていることなどから注目を集めている。我々はこれまでに乳剤中の chol はミセルごと細胞内へ取り込まれること、難水溶性物質の吸収改善のための乳剤中に NPC1L1 基質である chol を加えると、その細胞内取り込み量が増大することを明らかにしている⁵⁾。このことから、他の成分として α -tocopherol を同様の手法により吸収改善できるかを評価した。その結果、 α -tocopherol は chol を含まない乳剤と比較して、chol を含む乳剤において有意にその取り込み量が増大した。一方で、NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブにより有意に取り込み量は減少することが示された (Fig. 2-B)。 α -tocopherol は NPC1L1 の基質となりうることが示されており、chol と同様にエゼチミブでその取り込みが抑制された

ことが考えられる。また、我々の先の検討で CoQ10 の取り込み量は増大することが示されているが、CoQ10 は、現在までに NPC1L1 の基質となるか否かについては明らかになっていない。この CoQ10 が NPC1L1 の基質であるか否かについては NPC1L1 の siRNA、NPC1L1 の過剰発現細胞などを用いて詳細に検討するべきであると考えている。その点が明らかになれば、NPC1L1 の基質となる、あるいはならない物質でも乳剤中に NPC1L1 の基質を含有させることで吸収改善できる可能性がある。また、chol は本来吸収改善したい成分ではないため、将来的には NPC1L1 の基質として α -tocopherol を含め、CoQ10 のような物質を吸収改善できれば、本戦略が新しい吸収改善法の一つとして提唱できると考えている。

さらに、我々は水溶性物質をリポソームに封入して同様の吸収改善が可能か否かを検討した。本来ならば、実際に汎用されている医薬品成分等を用いるべきと考えたが、OTC 成分であるシメチジン、エピナステチン等の定量条件などは確立していたものの、その扱いなどが少々複雑な場合も多いことから、まずは測定のしやすさなどの観点より低吸収性を示す水溶性物質としてフルオレセインナトリウムを用いて検討した。その結果、フルオレセインナトリウムは、予想以上に細胞内に取り込まれており、リポソームに封入した場合の差が見づらい結果となった (Fig. 3)。そのため、新たな候補物質として 5(6)-carboxyfluorescein を用いて同様に検討した。その結果、リポソーム非封入時と比較して封入時の 5(6)-carboxyfluorescein 細胞内取り込み量は有意に増大することが示された (Fig. 4-B)。しかし、エゼチミブを加えてもその取り込み量はほぼ変化していなかった。これは、乳剤時における場合と傾向が大きく異なっており、リポソームと乳剤はともにコレステロールを含有していてもその細胞内への取り込みの機序は異なる機構が考えられ、同様の戦略で吸収改善を行うのは難しいことが示唆された。今後はこのメカニズムについて詳細に検討を進めてゆく予定である。

5、まとめ

本研究により、小腸コレステロルトランスポータである NPC1L1 の基質を含む乳剤粒子は、ミセル粒子ごと細胞内へ取り込まれること、この機構を利用して、難吸収性物質の吸収を改善できるかをモデル物質として α -tocopherol を選択して、検討した。その結果、chol を含む乳剤粒子により、 α -tocopherol の細胞内取り込み量を改善することができた。 α -tocopherol は NPC1L1 の基質であることから、エゼチミブによりその取り込み量は抑制されるが、今後は NPC1L1 の基質とならない物質でも同様に検討する予定である。また、水溶性物質であるフルオレセインナトリウム、あるいは 5(6)-carboxyfluorescein をリポソームに封入する際、chol を膜成分として組み込むとその細胞内取り込みが増大することが示されたものの、エゼチミブでの抑制効果は見られなかった。これらのことからリポソームと乳剤はともにコレステロールを含有していても、その細胞内への取り込みの機序は異なる可能性が示唆された。

謝辞 :

本研究にあたり、多大なる研究助成、御支援を賜りました公益財団法人 一般用医薬品セルフメディケーション振興財団、ならびに関係の皆様に深く感謝申し上げます。また、本研究において種々の検討にご協力いただいた北海道大学薬学部 篠原紹宏氏、八巻義朗氏、今井芽生氏に心から感謝いたします。

6、調査研究発表（口頭又は誌上発表）

1. 佐藤夕紀, 竹川悠人, 能登数馬, 武隈洋, 菅原満. 乳剤化によるコエンザイム Q10 の消化管吸収改善. 日本薬剤学会第 30 年会, 長崎, 2015.5.
2. 佐藤夕紀, 梨本俊亮, 武隈洋, 菅原満. α -トコフェロールの吸収動態に及ぼすエゼチミブの影響. 第 27 回ビタミン E 研究会. 高松, 2016.1.
3. 佐藤夕紀, 八巻義朗, 横山さや香, 竹川悠人, 鶩見正人, 武隈洋, 菅原満. 小腸コレステロールトランスポーター NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) を介した Coenzyme Q10 の消化管吸収改善. 第 13 回日本コエンザイム Q 協会研究会. 八王子, 2016.2.

7、引用文献

1. 厚生労働省 平成 25 年度国民医療費の概況 (平成 27 年 10 月)
2. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Lyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303, 1201-1204 (2004).
3. Narushima K, Takada T, Yamanashi Y, Suzuki H. Niemann-Pick C1-Like 1 Mediates α -tocopherol transport. *Mol. Pharmacol.*, 74, 42-49 (2008).
4. Sato Y, Suzuki R, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Noda T, Sugawara M, Iseki K. Involvement of cholesterol membrane transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the intestinal absorption of lutein. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 15, 256-264 (2012).
5. Takekawa Y, Sato Y, Yamaki Y, Imai M, Noto K, Sumi M, Takekuma Y, Iseki K, Sugawara M. An approach to improve intestinal absorption of poorly absorbed water-insoluble components via Niemann-Pick C1-Like 1. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 301-307 (2016).
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).

図

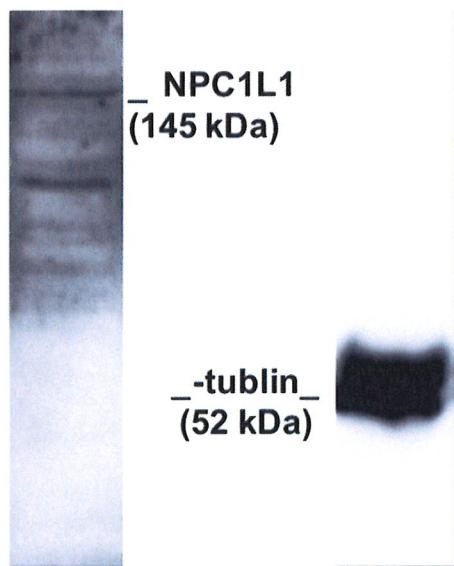


Fig. 1 Expression of NPC1L1 in Caco-2 cells

Total cell lysates (5 µg of protein) prepared from Caco-2 cells were resolved using SDS-PAGE. Western blotting was carried out with antibody of NPC1L1 and α -tubulin. This data is the typical result from 3 independent experiments.

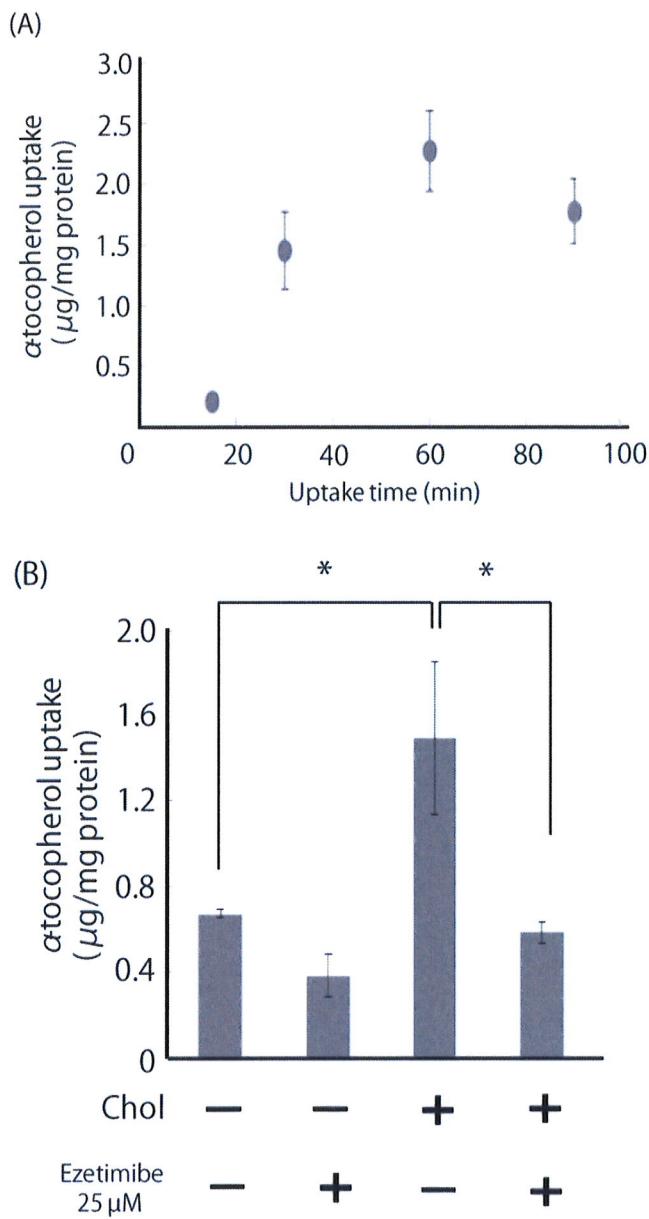


Fig. 2 Time course (A) and inhibitory effect of ezetimibe (B) on the uptake of α -tocopherol.

(A) The uptake of cholesterol by Caco-2 cells was examined at 37°C up to 90 min in a transport buffer containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of α -tocopherol. Each point represents the mean with S.D. of 3 measurements.

(B) The inhibitory effect of ezetimibe on the uptake of α -tocopherol was examined at 37°C for 30 min with 25 μM of ezetimibe. Each point represents the mean with S.D. of 3 measurements. *; significantly different from control at P<0.05.

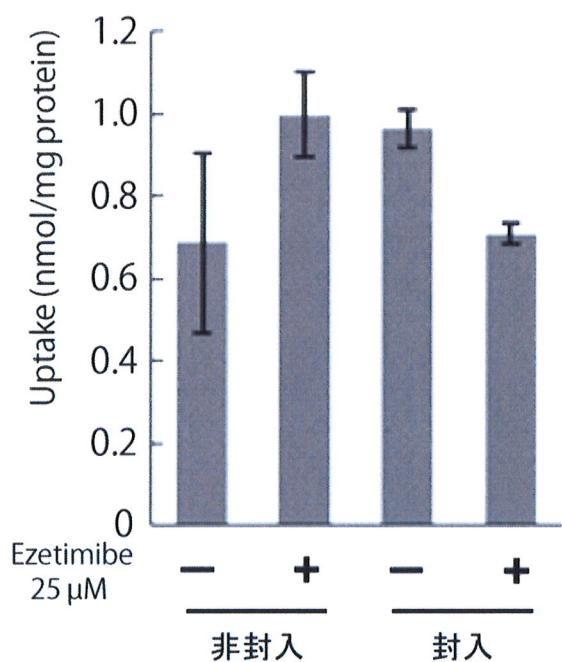


Fig. 3 Effect of cholesterol on the intracellular uptake of fluorescein into Caco-2 cells. The uptake of fluorescein (final concentration: 3.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by Caco-2 cells was examined at 37°C at 60 min in a liposome or solution. The inhibitory effect of ezetimibe (25 μM) on the uptake of cholesterol was examined at 37°C for 60 min. Each column represents the mean with S.D. of 3 measurements.

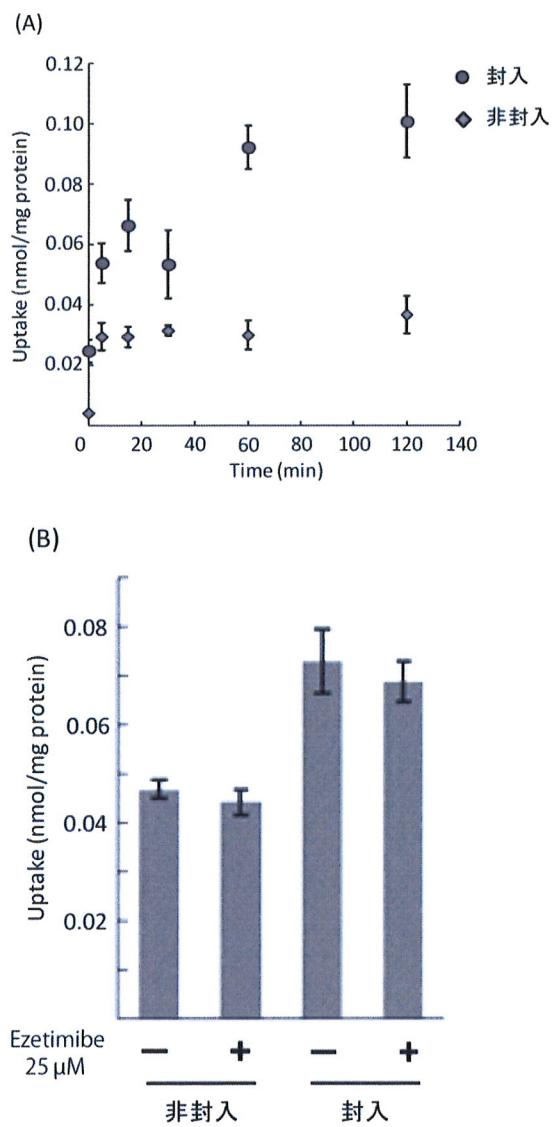


Fig. 4-A The difference of uptake of 5(6)-carboxyfluorescein into Caco-2 cells.

The uptake of 5(6)-carboxyfluorescein (final concentration: 10 $\mu\text{g/mL}$) by Caco-2 cells was examined at 37°C up to 120 min in a liposome or solution. Each point represents the mean with S.D. of 3 measurements.

Fig. 4-B Effect of cholesterol and ezetimibe on the intracellular uptake of CoQ10 into Caco-2 cells.

The uptake of 5(6)-carboxyfluorescein (final concentration: 10 $\mu\text{g/mL}$) by Caco-2 cells was examined at 37°C up to 60 min in a liposome or solution with or without 25 μM of ezetimibe. Each column represents the mean with S.D. of 3 measurements.