

## 総 説

# ドラッグデリバリーシステムにおける粘膜透過性改善の重要性

富田 幹雄

## Impact of Intestinal Drug Absorption Enhancement in Drug Delivery System

Mikio TOMITA

(Received November 20, 2012)

### はじめに

薬物の投与経路のうち、経口投与は低侵襲性や服用の自由度が高いなどの理由から、最も汎用されている投与経路である。薬物の性質として低分子で脂溶性が高い場合、比較的消化管吸収が良好であるため、有用な投与経路として利用されている。しかしながら、薬物の中には水溶性が高く低脂溶性物質や高分子薬物も多く、これらは消化管粘膜透過性が非常に低いため吸収性が悪いことが知られている。このような消化管からの吸収が悪い薬物の例として、従来から、抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬などが報告されている。また、バイオテクノロジーの進展とともに高分子薬物を医薬品として利用する場合が増加しており、その代表例としてペプチド、タンパク性薬物が挙げられるが、これらの薬物は経口投与後、消化管内の消化酵素やタンパク分解酵素により速やかに分解を受け、極めて不安定なことや高い水溶性かつ高分子であるために、消化管粘膜を透過し難いことが知られている。また、最近ではコンビナトリアルケミストリー<sup>1)</sup>やハイスループットスクリーニング<sup>2)</sup>などを利用した新規医薬品候補化合物の検索、選択が行われているが、こうした新規医薬品候補化合物の開発段階で、経口投与時に難吸収性や難水溶性を示す化合物が急増しているのが現状である。したがって、これら医薬品の消化管吸収を改善する方法を新たに確立し臨床応用することは、経口投与製剤を開発する上で極めて重要な課題の一つであると考えられる。

しかしながら、多様化および迅速化が進む医薬品候補化合物の創製と比較すると、薬物の吸収促進に対する戦略的な構築は立ち遅れているのが現状である。

### 難吸収性化合物を臨床適応する際の問題点

上記候補医薬品の投与方法のほとんどが筋肉や皮下投与による注射剤などの侵襲的な方法に限られている点が挙げられ、慢性疾患患者の薬物治療におけるアドヒアランスや Quality of life (QOL) の低下の原因となっている。<sup>3)</sup> その具体例として、免疫性疾患であるリウマチにおいて疾患早期からの抗体医薬品導入の妨げとなっており、このような薬物治療導入の遅れにより生ずる疾患寛解率の低下は医療費の増大を招くばかりではなく、患者 QOL を著しく低下させ、疾患の寛解までの期間を延長させてしまうことが大きな問題となっている。<sup>4)</sup> このような視点からも、臨床において非侵襲的な投与経路である経口投与製剤開発の意義は非常に高い。

### 吸収ルート (Transcellular route と Paracellular route)

我々ヒトに代表されるように、多細胞生物は文字通り多くの細胞からなる生物であり、細胞間基質や接着分子を介して細胞が集合することにより、組織、器官が構築され個体の恒常性が維持されている。多細胞生物では肝臓、腎臓、血管、内耳等の組織は固有の内部環境を有しており、この組織固有の内部環境は組織を覆う上皮細胞からなる細胞層における物質透過の制御によって維持されている。上皮細胞層における物質透過経路は細胞内経路 (Transcellular route) と、細胞間隙経路 (Paracellular route) に大別される。<sup>5)</sup>

経口投与後の薬物の腸管吸収は、粘膜透過性が薬効発現の最初の関門となり、薬物の消化管吸収は、薬物自身の物理化学的特性、特に分子サイズや脂溶性、電荷、分子内水素結合の数等に依存した単純拡散によって支配されると考えられてきた。

### Transcellular route の研究

細胞内経路は1990年代に入り、生体膜の輸送に関する研究技術の進歩によって、薬物の細胞内取り込みや細胞外排泄に輸送担体（トランスポーター）を介した輸送系の関与が証明され、薬物の細胞膜輸送におけるトランスポーターの重要性が強く認識されるようになった。事実、多数の薬物トランスポーターが消化管上皮細胞に局在すること、トランスポーター遺伝子欠損マウスで薬物吸収に変化の見られることなど、数多くの薬物で消化管吸収にトランスポーターの関与するケースが報告されている。それらの中で消化管における働きが明確となりつつあるトランスポーター分子は現在のところ P-glycoprotein/Multidrug resistance 1 (P-gp/MDR1)<sup>6-12)</sup> や Breast cancer resistance protein (BCRP: ABCG2)<sup>13-15)</sup> など排泄型トランスポーターであり、ATP binding cassette (ABC) トランスポーターに分類されるものが中心である。その一方で、吸収方向に働く可能性のある Solute Carrier (SLC) トランスポーターも重要性が認識されているが、その役割の解明ははるかに遅れ、わずかに Organic cation transporter (OCTN) 2 (SLC22A5)<sup>16-21)</sup> 欠損マウスにおけるカルニチンの管腔側からの取り込みが影響を受けるという報告が見られるのみにとどまっていた。しかしながら、薬物トランスポーターは種々の組織に発現し、薬物動態に重要な役割を果たすことが明らかになりつつあり、医薬品開発の面においても、トランスポーターの輸送メカニズムを制御することにより、理想的な動態特性をもつ薬の開発につながるものと期待されている。また、最近の研究により、薬物間相互作用、遺伝子多型に基づく薬物動態特性の個人間変動に薬物代謝酵素のみならず薬物トランスポーターの関わる例が増えつつあり、医薬品探索・開発を行う企業、さらには治療を行っている臨床医や薬剤師からも注目されている。

### Paracellular route の研究

一方、1980年代には細胞間隙経路を介した薬物送達方法の開発研究が進展した。薬物の細胞間隙経路の透過性を高める戦略の代表例として、吸収促進剤との同時投与が挙げられる。特に Tight Junction (TJ) の開口機構として提唱されている代表的なものには Protein kinase A<sup>22)</sup> 依存的、Protein kinase C<sup>23)</sup> 依存的あるいは Cytochalasin D<sup>24)</sup> やカ

プリン酸ナトリウム (Sodium Caprate)<sup>25)</sup> に代表される Myosin light chain kinase 依存的な Myosin light chain リン酸化機構などが提唱されている。しかしながら、現在、臨床応用されているのは脂肪酸の一種であるカプリン酸ナトリウムをアンピシリンやセフゾキシムの小児坐剤に適用した例のみにとどまっている。その理由に、これら促進剤には吸収促進効果に特異性が低いこと、組織障害性を伴う場合が多いこと、TJ 開口に起因し、薬物以外の物質（腸内細菌やバクテリア等）吸収を引き起こし予期せぬ副作用を惹起する危険性、いわゆる Paracellular dilemma<sup>5)</sup> が存在している。

すなわち、細胞間隙利用には吸収促進剤による局所および全身毒性を最小限に抑えた形での TJ の可逆的な開口が理想である。さらに TJ は生体に必須な栄養物質の積極的な取り込みと異物の体内侵入の制限を担う極性を維持した上皮バリアーの役割を担っている。言い換えれば、この TJ により調節されている細胞間隙の抵抗が、高分子・水溶性薬物の透過性の低さを導いている。

近年の分子生物学の進歩により細胞間隙の細胞生物学が進展した。その中で、TJ は細胞極性を担うため、数多くのシグナルタンパク質により調節されていることが明らかとなった。1993年には TJ 構成タンパク質である Occludin が月田グループにより同定された。しかし、ES (embryonic stem) 細胞において Occludin の遺伝子を knock-out したその上皮細胞で、予想外なことに、Occludin を発現しない上皮細胞でも TJ ストランドのネットワークが形成された。<sup>27)</sup> この事実は、文字通り Occludin が存在しなくても TJ ストランドが形成されるということの意味している。その後、1998年には TJ 構成タンパク質である Claudin が同定された。<sup>28)</sup> Claudin-1 または Claudin-2 を TJ を持たないマウス L 線維芽細胞に強制発現させると、いずれの場合も、もともと細胞間接着活性を示さない L 細胞が互いに強固に接着するようになり、さらに、細胞間に巨大な TJ ストランドネットワークが形成された。<sup>29)</sup> Occludin を L 細胞に発現させてもこのようなネットワークは形成されないが、Claudin と同時に導入すると、Claudin によって形成されたストランドに Occludin が組み込まれた。<sup>30)</sup> これらは、Claudin は TJ バリアー機能を担う分子であることを意味している。その後の研究により現在までに Claudin は 24 種類のファミリーを形成しているこ

とが明らかとなっている。<sup>31-33)</sup> さらに興味深いことに、Claudin の発現およびバリアー機能には組織特異性が認められている。このことは、Claudin のバリアー機能を family 特異的に制御するシステムを構築することができれば、組織特異的な薬物送達方法の構築へとつながる可能性を示唆している。現在、Claudin のバリアー機能を阻害する分子としては、*Clostridium perfringens enterotoxin* (CPE) の C 末断片 (C-CPE) が Claudin-4 のバリアー機能を阻害する分子として唯一報告されている。C-CPE は可逆的に Claudin-4 に作用し TJ バリアー機能を低下させる。<sup>34)</sup>

また、細胞間には隣接する 2 細胞間の他に 3 細胞の交点である Tricellular junction が存在しており、この Tricellular junction における物質透過制御は上皮細胞層による組織のコンパートメント化に必須である。2005 年に Tricellular junction において物質の漏れを防ぐバリアー機能を担う分子として Tricellulin が同定された。<sup>35)</sup> Tricellulin は、分子量約 64 kDa の 4 回膜貫通タンパク質で、発現は Tricellular junction に局在している。Tricellulin を RNA 干渉によりノックダウンすると細胞層のバリアー機能が低下したことから、Tricellulin は Tricellular junction における物質透過性を通じて組織の内部環境維持に関与しているものと推察される。

このように、Occludin, Claudin, Tricellulin と Tight junction 構成タンパクの同定が進み、これらの物質の詳細な性質を検討することにより、吸収促進剤の Paracellular route をより特異的かつ選択的に標的部位として利用できる可能性が大きく広がった。

### Drug Delivery System の 3 本柱の一つである粘膜透過性の改善

しかしながら、いかなる投与経路においても、医薬品が薬効を示すには各粘膜の上皮細胞層や表皮を透過することにより体循環に移行し、血管内皮細胞層を透過することにより標的部位に移行し

なければならない。前述のように上皮細胞層および内皮細胞層における物質透過は Transcellular route と Paracellular route に大別され、両経路を利用した薬物透過促進方法が多方面より研究されているが、経口投与製剤への臨床応用には至っていないのが現状である。

今回は、消化管における難吸収性薬物に対し、吸収促進剤との同時投与することにより吸収性を改善するという我々の得た例を紹介する。また、吸収促進剤の臨床適応上の問題点の一つである、繰り返し投与による消化管における Paracellular dilemma の克服を念頭に置き、Acylcarnitine である Lauroylcarnitine (LC) と Palmitoylcarnitine (PC) を吸収促進剤として選択した場合の安全性にも触れる。特にこれまでの促進剤は mM オーダーによる作用が多く報告されているが、本総説では  $\mu$ M オーダーにおける有効性の事例を紹介する。

### Acylcarnitine の安全性 (Rat *in situ*)

多くの研究者は、ヒト由来の Caco-2 単層膜による *in vitro* における検討を行ってきた。これまでに数多く報告されている吸収促進剤の濃度は mM オーダーであったが、我々の研究ではこの Caco-2 単層膜を用いた場合でも  $\mu$ M オーダーの濃度領域において有用性が示されている。

現在までに、多くの物質が吸収促進剤として利用されており、その代表的なものには界面活性剤、胆汁酸、キレート剤、脂肪酸などがあげられる (Table 1)。しかしながら、一般的には促進効果が強い吸収促進剤は、同時に粘膜障害性や刺激性の見られるものが多く、臨床応用された吸収促進剤は脂肪酸の一種であるカプリン酸ナトリウムをアンピシリンやセフチゾキシムの小児用坐剤に適用した例のみにとどまっている。

このような背景から、促進効果が強く、粘膜障害性の少ない、臨床適応可能な吸収促進剤の開発が期待されている。

Table 1. Absorption enhancers

Detergent	Tween 80, Polyxyethylene-9-laurylether, n-lauryl- $\beta$ -D-maltopyranoside, etc.
Chelator	Ethylene diamine tetra acetate (EDTA), Sodium salicylate, etc.
Bile acid	Sodium glycocholate, Sodium deoxycholate, Sodium taurocholate, etc.
Fatty acid	Sodium caprate, Sodium caprylate, Oleic acid, Linoleic acid, etc.



### Acylcarnitine 添加による LDH 漏出量 (Caco-2 単層膜, *In situ* との比較)

そこで Caco-2 単層膜 *in vitro* 条件下からのスケールアップを行い, *in vivo* でも同様に吸収促進効果が得られるかについて, ラットを用いた *in situ* closed loop 法により検討を行った. まず, 臨床応用に向けた安全性に着目し, 両吸収促進剤による組織障害性について LDH の漏出量より評価を行った. Caco-2 単層膜における LC 添加による有意な LDH の漏出は Control と比較して 1,000  $\mu\text{M}$  まで見られなかった (Fig. 1a). 一方, PC では 100  $\mu\text{M}$  から Control と比較して有意な LDH の漏出が見られた (Fig. 1b).

一方, 空腸における LC 添加による LDH の漏出は 1,000  $\mu\text{M}$  添加において見られた (Fig. 2a). PC 添加では 200  $\mu\text{M}$  添加より有意な LDH の漏出が見られた (Fig. 2b).

以上, LC, PC 1~100  $\mu\text{M}$  オーダーの濃度領域に

おける細胞および組織障害性は低いことが示された. また, 両吸収促進剤添加による LDH の漏出は空腸と比較して Caco-2 単層膜の方がより低い濃度からの漏出が見られた. これは Caco-2 単層膜では, ムチン層などの消化管における防御機構が空腸と比べて乏しいためと考えられる. また, Caco-2 細胞による検討より, LC, PC の cmc 付近の濃度における LDH の漏出が見られることから, 吸収促進剤を用いる腸管の部位によっては, cmc を越えない濃度による使用が Paracellular dilemma 回避および臨床における使用上重要であることが本検討結果から示唆された.

### Acylcarnitine の腸管各部位における吸収促進効果の検討 (Methyl- $\beta$ -CD との比較)

LC, PC の空腸存在下, 静脈内投与した Lucifer yellow (投与量: 137.0  $\mu\text{g}$ ) の血漿中からの消失が

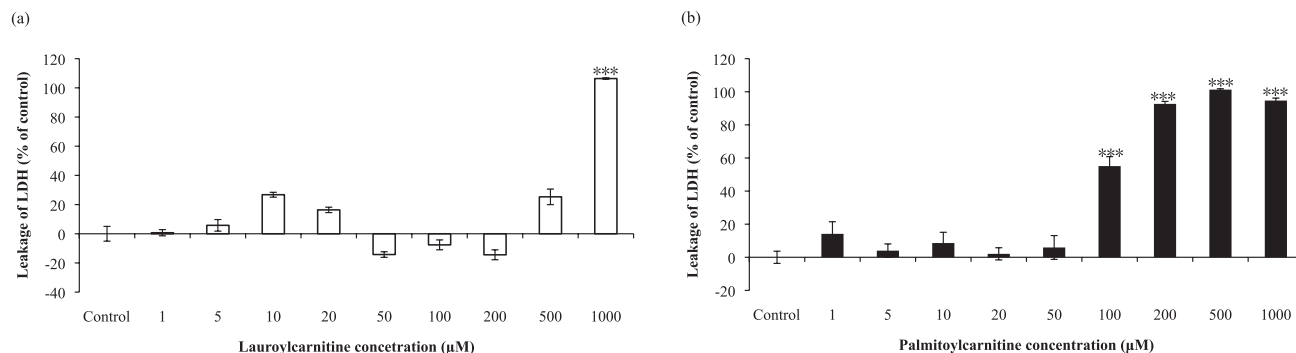


Fig. 1. Effects of lauroylcarnitine (a) and palmitoylcarnitine (b) on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in Caco-2 cell monolayers. LDH leakage at 1 hr after Caco-2 cell monolayers treated with 2% triton X 100 was regarded as 100% values, maximum value of leakage.

Data represent means and S.E. ( $n=6\sim 8$  for each condition). \*\*\* $P<0.001$  compared with control.

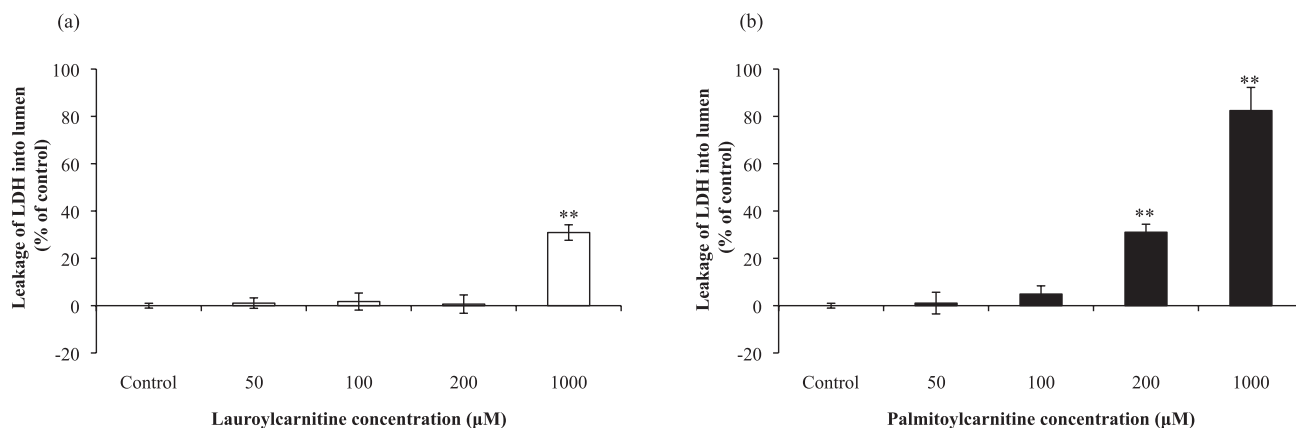


Fig. 2. Effects of lauroylcarnitine (a) and palmitoylcarnitine (b) on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) into lumen. LDH leakage at 1 hr after rat jejunum treated with 2% triton X 100 was regarded as 100% values, maximum value of leakage.

Data represent means and S.E. ( $n=6\sim 8$  for each condition). \*\* $P<0.01$  compared with control.

影響を受けるかについて検討を行った。その結果、ControlとLC、PC空腸存在下におけるLucifer yellowの血漿中濃度推移は全く同様の挙動を示した (Fig. 3)。台形法より求めた  $AUC_{0 \rightarrow \infty iv}$  について

も Controlと比較して100  $\mu$ M LC、PC添加による有意な変化はみられなかった (Table 2)。

以上の結果より、空腸へのLC、PC投与はLucifer yellowの血漿中からの消失に変化を与え

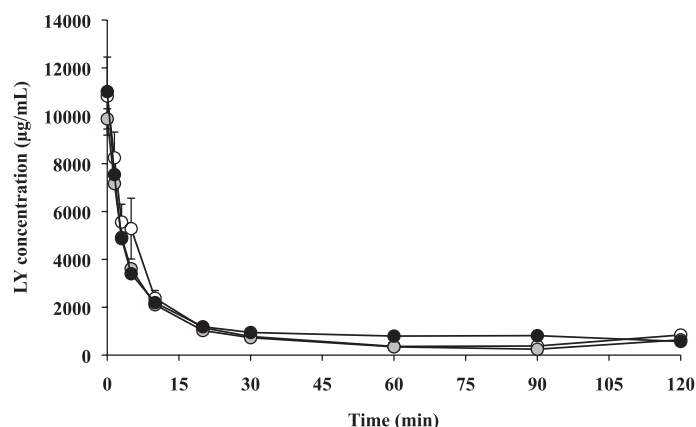


Fig. 3. Effects of acylcarnitine on plasma concentration of lucifer yellow after *iv* administration. Results represent means and S.E. (n=6 for each condition) (○); Control, (●); LC 100  $\mu$ M, (●); PC 100  $\mu$ M.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of LY administered intravenously to acylcarnitine-treated rats.

	Control	LC 100 $\mu$ M	PC 100 $\mu$ M
$AUC_{0 \rightarrow \infty iv}$ ( $mg \cdot mL^{-1} \cdot min$ )	129 $\pm$ 15.1	107 $\pm$ 5.44	144 $\pm$ 47.9
$MRT_{iv}$ (min)	3.28 $\pm$ 0.92	3.11 $\pm$ 0.52	3.98 $\pm$ 1.22

$AUC_{0 \rightarrow \infty iv}$  was calculated by the trapezoidal method. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 6 determinations.

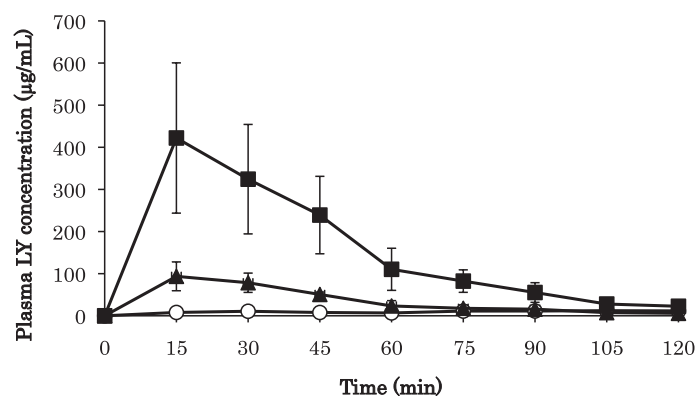


Fig. 4. Plasma concentration-time profiles of lucifer yellow in the presence or absence of acylcarnitine following administration to the rat jejunal loop. (○); Control, (▲); LC 100  $\mu$ M, (■); PC 100  $\mu$ M. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 8-10 experiments.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of LY administered to the jejunal loop in the control, LC or PC-treated rats.

Parameters	Control rats	LC-treated rats	PC-treated rats
$AUC_{0 \rightarrow \infty loop}$ ( $mg \cdot mL^{-1} \cdot min$ )	1.14 $\pm$ 0.17	4.60 $\pm$ 0.86*	18.9 $\pm$ 4.78*†
F (%)	0.89 $\pm$ 0.11	4.29 $\pm$ 0.69*	13.2 $\pm$ 3.24*†
$MRT_{loop}$ (min)	17.2 $\pm$ 5.71	12.2 $\pm$ 1.2	11.3 $\pm$ 2.04
MAT (min)	13.9 $\pm$ 4.62	9.13 $\pm$ 1.00**	7.3 $\pm$ 1.70**†

$AUC_{0 \rightarrow \infty loop}$  was calculated by the trapezoidal method. F was obtained using  $AUC_{0 \rightarrow \infty loop} / AUC_{0 \rightarrow \infty iv}$ .

MAT was obtained as the difference between  $MRT_{loop}$  and  $MRT_{iv}$  (listed in Table 6).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-10 determinations. \*\*P<0.01, \*P<0.05 vs control. †P<0.05 vs LC-treated rats.

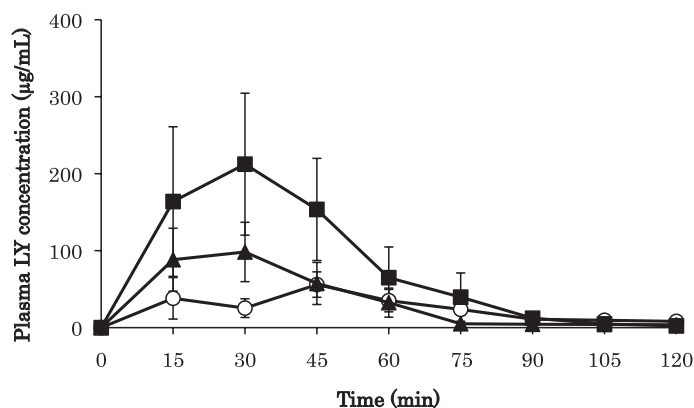


Fig. 5. Plasma concentration-time profiles of lucifer yellow in the presence or absence of acylcarnitine following administration to the rat ileal loop.

(○); Control, (▲); LC 100  $\mu\text{M}$ , (■); PC 100  $\mu\text{M}$ . Each point represents the mean  $\pm$  SE of 8-10 experiments.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of LY administered to the ileal loop in the control, LC or PC -treated rats.

Parameters	Control rats	LC-treated rats	PC-treated rats
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$ )	$3.19 \pm 1.30$	$4.45 \pm 1.99$	$9.83 \pm 2.17^*$
F (%)	$2.48 \pm 0.99$	$4.14 \pm 1.81$	$6.82 \pm 1.47^*$
$\text{MRT}_{\text{loop}}$ (min)	$19.5 \pm 1.68$	$16.8 \pm 3.24$	$15.5 \pm 2.64$
MAT (min)	$16.2 \pm 1.40$	$13.7 \pm 2.70^*$	$11.5 \pm 2.20^*$

$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$  was calculated by the trapezoidal method. F was obtained using  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}} / \text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ iv}}$ .

MAT was obtained as the difference between  $\text{MRT}_{\text{loop}}$  and  $\text{MRT}_{\text{iv}}$  (listed in Table 6).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-10 determinations. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs control.

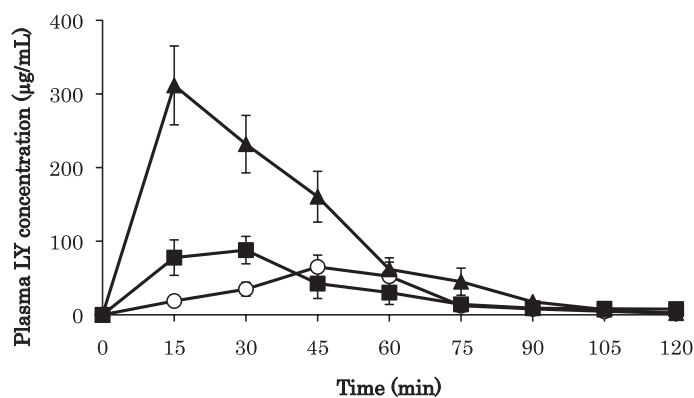


Fig. 6. Plasma concentration-time profiles of lucifer yellow in the presence or absence of acylcarnitine following administration to the rat colonic loop.

(○); Control, (▲); LC 100  $\mu\text{M}$ , (■); PC 100  $\mu\text{M}$ . Each point represents the mean  $\pm$  SE of 8-10 experiments.

Table 5. Pharmacokinetic parameters of LY administered to the colonic in the control, LC or PC- treated rats.

Parameters	Control rats	LC-treated rats	PC-treated rats
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$ )	$2.99 \pm 0.73$	$12.6 \pm 3.77^*$	$4.25 \pm 1.09$
F (%)	$2.33 \pm 0.55$	$11.7 \pm 3.44^*$	$2.95 \pm 0.73$
$\text{MRT}_{\text{loop}}$ (min)	$14.9 \pm 0.96$	$12.7 \pm 5.82$	$16.5 \pm 1.32$
MAT (min)	$11.6 \pm 0.8$	$9.6 \pm 5.0$	$12.5 \pm 1.1$

$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$  was calculated by the trapezoidal method. F was obtained using  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}} / \text{AUC}_{0 \rightarrow \infty \text{ iv}}$ .

MAT was obtained as the difference between  $\text{MRT}_{\text{loop}}$  and  $\text{MRT}_{\text{iv}}$  (listed in Table 6).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-10 determinations. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs control.

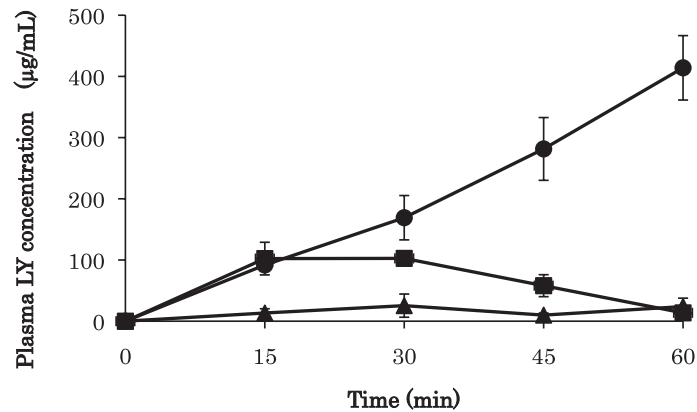


Fig. 7. Plasma concentration-time profiles of lucifer yellow in the presence or absence of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (100 mM) following administration to the rat jejunum, ileum and colon. (●); Jejunum, (▲); Ileum, (■); Colon. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 8-10 experiments.

Table 6. Pharmacokinetic parameters of LY administrated to the jejunal, ileal and colonic loop in the methyl- $\beta$ -cyclodextrin (100 mM) treated rats.

Parameters	Jejunum	Ileum	Colon
$AUC_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$ )	$11.2 \pm 1.76^{**}$	$1.07 \pm 0.22$	$4.05 \pm 0.92$
F (%)	$12.5 \pm 2.00^{**}$	$1.20 \pm 0.25$	$4.51 \pm 1.04$
$MRT_{\text{loop}}$ (min)	$15.1 \pm 3.48$	$19.1 \pm 0.48$	$13.7 \pm 1.8$
MAT (min)	$11.8 \pm 2.9$	$15.8 \pm 0.4$	$10.4 \pm 1.5^{**}$

$AUC_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$  was calculated by the trapezoidal method. F was obtained using  $AUC_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}/AUC_{0 \rightarrow \infty \text{ iv}}$ . MAT was obtained as the difference between  $MRT_{\text{loop}}$  and  $MRT_{\text{iv}}$  (Control) (listed in Table 6). Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-10 determinations.  $^{**}P < 0.01$ ,  $^*P < 0.05$  vs control (Table 3, 4, 5).

ず、Lucifer yellow の体内消失動態には影響しないことが示された。

### 空腸での検討

空腸において、Lucifer yellow (投与量: 137.0  $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$ ) と 100  $\mu\text{M}$  LC, PC を同時投与した場合、Control と比較して有意な Lucifer yellow の血漿中濃度の増大が見られた (Fig. 4)。Fig. 4 より  $AUC_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$ , F,  $MRT_{\text{loop}}$ , MAT を求めた結果、Table 3 で示されたように空腸における吸収促進効果は、吸収率 F を Control と比較した場合、PC で LC の約 3 倍であった。また、MAT は促進剤処理により有意に短縮されることが示された。

### 回腸での検討

同様に回腸において、Lucifer yellow (投与量: 137.0  $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$ ) と 100  $\mu\text{M}$  LC, PC を同時投与することにより Control と比較して Lucifer yellow の有意な血漿中濃度の増大が見られた (Fig. 5)。Table 4 で示されたように、回腸における吸収促進効果は Control の F 値と比較して PC で LC の約 1.5 倍で

あった。また、MAT は促進剤処理により有意に短縮されることが示された。

### 結腸での検討

結腸においては、Lucifer yellow (投与量: 137.0  $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$ ) と 100  $\mu\text{M}$  LC の同時投与により、血漿中 Lucifer yellow 濃度の増大が見られた。一方、100  $\mu\text{M}$  PC 添加群では Control と同様の血漿中 Lucifer yellow 濃度であった (Fig. 6)。Fig. 6 より解析した結果、結腸への 100  $\mu\text{M}$  LC 添加による吸収促進効果は F 値から約 5 倍であり、PC においては F 値から吸収促進傾向が見られたが、 $AUC_{0 \rightarrow \infty \text{ loop}}$  の値は Control と同程度であった。また、LC 処理により MAT の短縮がみられたが、PC 処理では見られなかった (Table 5)。

### Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ CD) の場合

腸管各部位における Lucifer yellow (投与量: 137.0  $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$ ) と 100 mM Methyl- $\beta$ -CD の同時投与により、血漿中 Lucifer yellow 濃度の変化に部位差が見られた (Fig. 7)。Fig. 7 より解析を行った結果、

各部位の Control の F 値 (Table 3, 4, 5 の平均値, 空腸  $0.89 \pm 0.11$ , 回腸  $2.48 \pm 0.99$ , 結腸  $2.33 \pm 0.55$   $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$ ) と比較して, Methyl- $\beta$ -CD の吸収促進効果は空腸が最も高く, 次は結腸であった. 回腸においては有意な吸収促進効果は見られなかった. 同様に Table 3, 5 における MAT の Control 値 (空腸  $13.9 \pm 4.6$ , 結腸  $11.6 \pm 0.8$ ) に比して, 空腸, 結腸では MAT が短縮する傾向が示された (Table 6). (M- $\beta$ CD と比較してアシルカルニチンは  $1/1000$  の濃度 ( $\mu\text{M}$  オーダー) で同程度の有効性を示し, 安全性の高い極めて優れた吸収促進剤であることが示された.

#### 空腸における Acylcarnitine 添加による Claudin-4 および P-gp タンパク発現量への影響

空腸において  $100 \mu\text{M}$  LC, PC 添加による Claudin-4 タンパク発現レベルの変化は見られなかったが,  $100 \text{ mM}$  Methyl- $\beta$ -CD による有意なタンパク発現レベルの低下が示された (Fig. 8). P-gp のタンパク発現レベルについては,  $100 \mu\text{M}$  PC,  $100 \text{ mM}$  Methyl- $\beta$ -CD により, 有意な発現量の低下

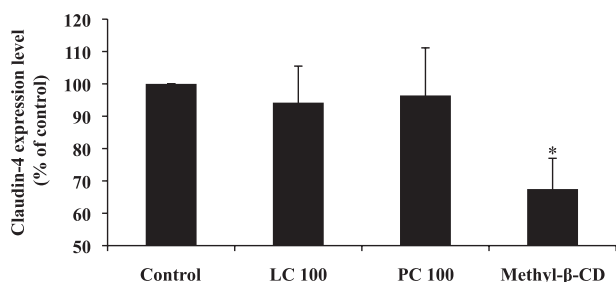


Fig. 8. Effects of lauroylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ), palmitoylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ) and methyl- $\beta$ -CD ( $100 \text{ mM}$ ) on the expression level of claudin-4 protein in rat jejunal BBM.

Results represent mean % of the control and S.E. ( $n = 3-4$  for each condition). \* $P < 0.05$  compared with the control.

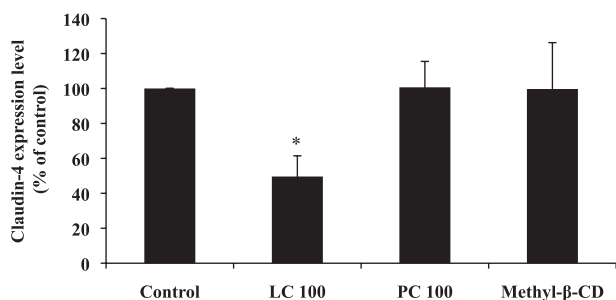


Fig. 10. Effects of lauroylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ), palmitoylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ) and methyl- $\beta$ -CD ( $100 \text{ mM}$ ) on the expression level of claudin-4 protein in rat colonic BBM.

Results represent mean % of the control and S.E. ( $n = 3-4$  for each condition). \* $P < 0.05$  compared with the control.

が見られた (Fig. 9). 吸収促進効果との関連性から, PC による吸収促進と P-gp タンパクレベルの低下に関連性が認められた.

#### 結腸における Acylcarnitine 添加による Claudin-4 および P-gp タンパク発現量への影響

結腸において  $100 \mu\text{M}$  LC 添加による Claudin-4 タンパク発現レベルの有意な低下が見られ,  $100 \mu\text{M}$  PC,  $100 \text{ mM}$  Methyl- $\beta$ -CD によるタンパク発現レベルへの影響は見られなかった (Fig. 10). P-gp のタンパク発現レベルについては,  $100 \mu\text{M}$  PC,  $100 \text{ mM}$  Methyl- $\beta$ -CD により, 有意な発現量の低下が見いだされ, 空腸と同様の傾向が示された (Fig. 11). 吸収促進との関連性から捉えてみると, LC の吸収促進効果は Claudin-4 のタンパクレベルの低下と相関することが認められた.

#### 結論

経口投与による薬物の Bioavailability 改善を目的とした LC, PC を吸収促進剤として利用する戦略において,  $\mu\text{M}$  オーダーに濃度設定することにより,

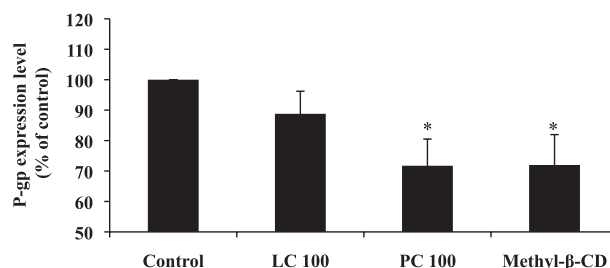


Fig. 9. Effects of lauroylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ), palmitoylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ) and methyl- $\beta$ -CD ( $100 \text{ mM}$ ) on the expression level of P-gp protein in rat jejunal BBM.

Results represent mean % of the control and S.E. ( $n = 3-4$  for each condition). \* $P < 0.05$  compared with the control.

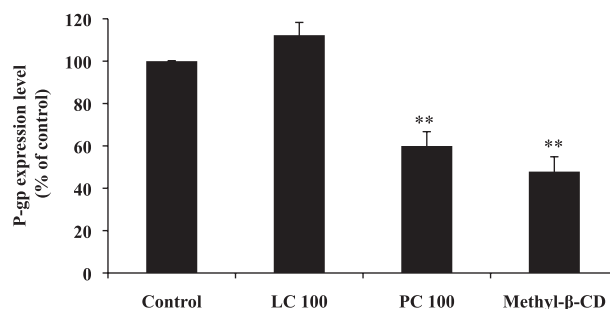


Fig. 11. Effects of lauroylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ), palmitoylcarnitine ( $100 \mu\text{M}$ ) and methyl- $\beta$ -CD ( $100 \text{ mM}$ ) on the expression level of P-gp protein in rat colonic BBM.

Results represent mean % of the control and S.E. ( $n = 3-4$  for each condition). \*\* $P < 0.01$  compared with the control.



Paracellular, Transcellular の両ルート可逆的に制御するという安全な促進効果を得ることが可能であることが示された。また、TJ を介した Paracellular route の制御においては、Claudin-4 に対する直接作用と OCTN2 を介した両吸収促進剤の細胞内への取り込みによる Signaling pathway による促進剤の作用機序が明らかとなり、Transcellular route の制御には Efflux transporter である P-gp に対する作用機序が明らかとなった。さらに、LC, PC には吸収促進効果に部位差のあることが明らかとなり、経口投与製剤としての実用性、すなわち臨床応用を考慮した場合、空腸においては P-gp の機能修飾が可能な PC の利用、結腸においては Claudin-4 の機能修飾のできる LC の使用が有効であることが示された。

### おわりに

多くの疾患の治療において、新たな作用機序を有する医薬品が導入されており、現在も数多く開発されようとしている。しかしながら、消化管における吸収性の悪さから臨床適応に至らない薬物や注射や点滴などの侵襲を伴う投与方法でしか臨床適応されない薬物が存在し、有効な治療薬の開発を待ち続けなければならない患者や注射や点滴しか投与方法がないなどの理由から頻繁な通院を余儀なくされる患者も多く存在する。このような頻繁な医療機関への通院は、仕事や日常生活に影響を与え、患者 QOL の低下やアドヒアランスの低下を招き、さらには、余命が限られる疾患では患者の自由な時間を拘束し QOL を大きく損ねてしまう。このような視点からも、経口投与可能な医薬品の開発は現在の医療において重要な意義を有しているといえる。

本研究の成果より、吸収促進剤による薬物の腸管吸収の可逆的な制御が示され、多くの経口投与製剤を開発する上での重要なアプローチの一つとなるものと考えられる。

今後、LC, PC を用いることによる腸内細菌や異物の体内侵入に対する安全性の評価や、各種難吸収性薬物を用いた吸収促進効果のさらなる検討を加え、患者 QOL を改善することが可能となる非侵襲的な医薬品の開発につながることを期待される。

### REFERENCES

1) Serrano P., Casa J., Zucco M., Emeric G., Egado-Gabàs M., Llebaria A. and Delgado A. Combinatorial

approach to N-substituted aminocyclitol libraries by solution-phase parallel synthesis and preliminary evaluation as glucoerebrosidase inhibitors. *J. Comb. Chem.*, **9**: 43–52 (2007).

- 2) Pereira D. A. and Williams J. A. Origin and evaluation of high throughput screening. *Br. J. Pharmacol.*, **152**: 53–61 (2007).
- 3) Lawrence D. C. Improving management of patients with advanced cancer. *Patient Prefer. Adherence*, **4**: 415–424 (2010).
- 4) Takeuchi T., Yamanaka H., Inoue E., Nagasawa H., Nawata M., Ikari K., Saito K., Sekiguchi N., Sato E., Kameda H., Iwata S., Mochizuki T., Amano K. and Tanaka Y. Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in a rheumatoid arthritis management group in Japan: one-year outcome of joint destruction (RECONFIRM-2J). *Mod. Rheumatol.*, **18**: 447–454 (2008).
- 5) Kondoh M. Claudin as a novel target for drug delivery system. *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**: 711–721 (2006).
- 6) Ogihara T., Kamiya M., Ozawa M., Fujita T., Yamamoto A., Yamashita S., Ohnishi S. and Isomura Y. What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil with vinblastine. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**: 238–244 (2006).
- 7) Brady J. M., Cherrington N. J., Hartley D. P., Buist S. C., Li N. and Klaassen C. D. Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **30**: 838–844 (2002).
- 8) Fojo A. T., Ueda K., Slamon D. J., Poplack D. G., Gottesman M. M. and Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 265–269 (1987).
- 9) Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J. L., Melamed M. R. and Bertino J. R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 695–698 (1989).
- 10) Lum B. L. and Gosland M. P. MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. *Hematol.*

- Oncol. Clin. North. Am.*, **9**: 319–336 (1995).
- 11) Leu B. L. and Huang J. D. Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on etoside absorption. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**: 432–436 (1996).
  - 12) Lo Y. L., Hsu L. R. and Song C. L. Use of Cremphor EL as a MDR reversing agent to enhance intestinal of epirubicin in everted gut sacs of rats and human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Chia. Nan. Annu. Bull.*, **24**: 142–149 (1998).
  - 13) Doyle A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. and Ross D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 15665–15670 (1998).
  - 14) Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greeberger L., Dean M., Fojo T. and Bats S. E. Overexpression of the ATP-binding Cassette Half-Transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in Flavopiridol-resistant Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*, **59**: 8–13 (1999).
  - 15) Allikmets R., Schriml L. M., Hutchison A., Romano-Spica V. and Dean M. A. Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (**ABCP**) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. *Cancer Res.*, **58**: 5337–5339 (1998).
  - 16) Tuji A. Biopharmaceutical Studies on Molecular Mechanism of Membrane Transport. *YAKUGAKU ZASSHI*, **122**: 1037–1058 (2002).
  - 17) Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Yabuuchi H., Oku A., Shimane M., Sai Y. and Tsuji A. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.*, **273**: 20378–20382 (1998).
  - 18) Nezu J., Tamai I., Oku A., Ohashi R., Yabuuchi H., Hashimoto N., Nikaido H., Sai Y., Koizumi A., Shoji Y., Takada G., Matsuishi T., Yoshino M., Kato H., Ohura T., Tsujimoto G., Hayakawa J., Shimane M. and Tsuji A. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat. Genet.*, **21**: 91–94 (1999).
  - 19) Yokogawa K., Higashi Y., Tamai I., Nomura M., Hashimoto N., Nikaido H., Hayakawa J., Miyamoto K. and Tsuji A. Decreased tissue distribution of L-carnitine in juvenile visceral steatosis mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**: 224–230 (1999).
  - 20) Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Sai Y., Kobayashi D., Oku A., Shimane M. and Tsuji A. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.*, **275**: 40064–40072 (2000).
  - 21) Ohashi R., Tamai I., Nezu J., Nikaido H., Hashimoto N., Oku A., Sai Y., Shimane M. and Tsuji A. Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol. Pharmacol.*, **59**: 358–366 (2001).
  - 22) Marano C. W., Laughlin K. V., Russo L. M., Short T. H. and Mullin J. M. cAMP modulates transepithelial resistance response of LLC-PK1 renal epithelia to tumor necrosis factor. *Am. J. Physiol.*, **268**: 315–322 (1995).
  - 23) Tsukita S., Tsukita S., Nagafuchi A. and Yonemura S. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**: 834–839 (1992).
  - 24) Madara J. L., Moore R. and Carlson S. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am. J. Physiol.*, **253**: 854–861 (1987).
  - 25) Tomita M., Hayashi M. and Awazu S. Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**: 739–743 (1995).
  - 26) Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. and Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, **123**: 1777–1788 (1993).
  - 27) Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T. and Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.*, **141**: 397–408 (1998).
  - 28) Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K. and Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, **141**: 1539–1550 (1998).
  - 29) Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A. and Tsukita S. Ca<sup>2+</sup>-independent cell-

- adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.*, **9**: 1035 – 1038 (1999).
- 30) Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K. and Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **143**: 391 – 401 (1998).
- 31) Wilcox E. R., Burton Q. L., Naz S., Riazuddin S., Smith T. N., Ploplis B., Belyantseva I., Ben-Yosef T., Liburd N. A., Morell R. J., Kachar B., Wu D. K., Griffith A. J., Riazuddin S. and Friedman T. B. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, **104**: 165 – 172 (2001).
- 32) Morita K., Furuse M., Fujimoto K. and Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 511-516 (1999).
- 33) Rahner C., Mitic L. L. and Anderson J. M. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, **120**: 411 – 422 (2001).
- 34) Uchida H., Kondoh M., Hanada T., Takahashi A., Hamakubo T. and Yagi K. A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem. Pharmacol.*, **79**: 1437 – 1444 (2010).
- 35) Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S. and Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **171**: 939 – 945 (2005).