

博士学位論文

一酸化窒素による難吸収性薬物の腸管吸収促進効果
に関する研究

平成 28 年 3 月

岸本 久直

東京薬科大学

Study of the intestinal absorption-enhancing effect of
nitric oxide on the absorption of poorly absorbed drugs

March, 2016

Hisanao Kishimoto

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

目次

略語一覧	001
序論	002
結果及び考察	005
第 1 章 難吸収性水溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす SNP の影響	005
第 1 節 SNP の腸管粘膜に及ぼす影響	005
1-1-1 SNP 投与による NO 放出量	
1-1-2 SNP 投与による腸管粘膜障害性の評価	
1-1-3 小括	
第 2 節 SNP による吸収促進効果	009
1-2-1 SNP 併用時における薬物の吸収量変化	
1-2-2 Claudin family のタンパク質発現量に対する SNP の影響	
1-2-3 SNP 前処理時における吸収促進効果の有無	
1-2-4 SNP 前処理時における細胞膜電気抵抗 (R _m)	
1-2-5 小括	
第 2 章 難溶解性脂溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす NO の影響	018
第 1 節 受動拡散に対する NO の影響	019
2-1-1 難溶解性脂溶性薬物の膜透過性に対する NO の影響(腸管部位特異性)	
2-1-2 NO の膜透過性亢進作用に対する薬物物性 (脂溶性) の関与	
2-1-3 NO の膜透過性亢進作用に対する非攪拌水層の関与	
2-1-4 ラット十二指腸吸収に対する NO の影響	
2-1-5 難溶解性脂溶性薬物の膜透過性に対する SNP 前処理による影響	
2-1-6 小括	
第 2 節 P-glycoprotein (P-gp) に対する NO 供与体の影響	033
2-2-1 P-gp 機能に対する SNP の影響	
2-2-2 SNP 前処理時における吸収促進効果の有無	
2-2-3 小括	
総括	038
実験の部	041
掲載論文	065
謝辞	066
引用文献	067

略語一覽

略語	名称
ABC	ATP binding cassette
AUC	Area under the curve
BA	Bioavailability
BBM	Brush border membrane
BCRP	Breast cancer resistance protein
BCS	Biopharmaceutics Classification System
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CL	Clearance
DTT	Dithiothreitol
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FDA	U.S. Food and Drug Administration
HPLC	High performance liquid chromatography
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LDH	Lactate dehydrogenase
MDR	Multidrug resistance
NO	Nitric oxide
NOC7	1-Hydroxy-2-oxo-3-(<i>N</i> -methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene
NOC12	1-Hydroxy-2-oxo-3-(<i>N</i> -ethyl-2-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene
NOS	Nitric oxide synthase
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
P _{app}	Apparent permeability coefficients
PBS	Phosphate-buffered saline
P-gp	P-glycoprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Rho123	Rhodamine123
SFC	Sodium ferrocyanide
SNP	Sodium nitroprusside
T _{1/2}	Terminal half-life
TER	Tansepithelial electric resistance
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

序論

医薬品とは生体の構造又は生理機能に影響を与え、疾病の治療或は予防に用いる物質の総称である。医薬品化合物は様々な物理化学的性質を有しており、医薬品化合物が原薬のままの形で生体に投与されることは殆ど無い。通常は特定の剤形に加工され医薬品製剤として生体に投与されるが、剤形の性質は投与後の薬物体内動態に大きな影響を及ぼす重要な因子である。また投与された医薬品製剤の薬理効果は作用部位への到達性によって決まるため、薬物自体の体内動態特性に加えて投与経路によっても影響を受ける。したがって、薬理作用が効率的に発現される適切な投与経路を選択する必要がある。医薬品の研究開発プロセスにおいて投与剤形や投与経路の選択は、開発初期の段階で決定し、それぞれの開発戦略に従って研究開発を進めていく。

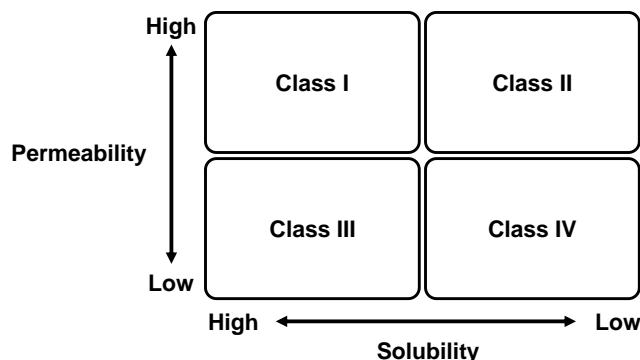
各種医薬品製剤の中でも経口投与製剤は、投与経路が非侵襲的であり利便性に優れた投与剤形であり、全医薬品製剤の約 60%を占めていることから、基本剤形として汎用性が高い¹⁾。さらに、臨床において患者の **quality of life (QOL)** やアドヒアランスの向上が望める点で、薬物療法の面でも極めて重要度の高い投与剤形であることから、経口投与製剤は製薬企業において開発優先度の高い投与剤形である。

一方、近年の医薬品候補化合物探索の高速化や自動化といった医薬品開発技術の発展により²⁻⁴⁾、*in vitro* 又は *in silico* の評価系において、目的の薬効標的に対して高い生理活性を有する化合物を短期間で選択することが可能となった。しかし、これらの高生理活性物質は、従来の高膜透過性低分子化合物に対して難吸収性や難溶解性、高分子量となる傾向がある。したがって探索研究段階の *in vitro* 評価系において優れた薬効を示す化合物であっても、その吸収性や溶解性の乏しさから、*in vivo* において十分な経口バイオアベイラビリティ (BA) が得られず、結果として有効性が認められない場合がある。このため、経口投与製剤としての開発が困難となり、前臨床研究段階で開発を断念もしくは剤形変更するケースが多く存在する。したがって、これらの化合物を経口投与製剤として開発するためには、それらの経口 BA を改善する方法論の確立が急務である。薬物の経口 BA は消化管からの吸収率、消化管壁及び肝臓における初回通過代謝率によって支配され、このうち消化管からの吸収率は、薬物の体内移行への第 1 ステップであることから非常に重要な因子である。

一般に、経口投与された薬物の消化管からの吸収過程は、消化管上皮細胞の密着結合 (**tight junction**) から側方細胞間腔を透過する細胞間隙経路 (**paracellular route**) と、刷子縁膜から上皮細胞内を透過する細胞内経路 (**transcellular route**) の 2 つに大別される⁵⁾。さらに、**transcellular route** を介した膜透過機構には、細胞内外の濃度勾配を駆動力とし、エネルギーを必要としない受動輸送と、細胞内

外の濃度勾配に逆らい、エネルギー及びトランスポーターを必要とする能動輸送がある。薬物の腸管吸収における膜透過の経路は、分子サイズや脂溶性 ($\log P$)、 pK_a 、電荷、分子内水素結合の数等の薬物固有の物理化学的要因によって異なることが知られており、水溶性薬物は主に **paracellular route** を、脂溶性薬物は主に **transcellular route** を透過すると考えられている。その一方で、腸管粘膜表面に存在する水溶性の粘液層である非攪拌水層や、上皮細胞膜に局在する排出型トランスポーターなどの生理学的要因によっても薬物の消化管吸収は制御されており、非常に複雑な過程である。

このように、消化管からの吸収率の決定要因は様々であるが、中でも薬物の溶解性と膜透過性は非常に重要な因子として挙げられ、製薬企業各社で溶解性及び膜透過性を創薬初期の段階からスクリーニング評価を行っている⁶⁻¹⁰⁾。また最近では、溶解性と膜透過性の高低によって医薬品化合物を4つのクラスに分類する **Biopharmaceutics Classification System (BCS)** 分類を、医薬品開発戦略に取り入れようとする試みがある (Scheme 1)¹¹⁻¹³⁾。この BCS 分類では4つのクラス分けによって大局的な消化管吸収挙動を把握することが可能となり、各クラス別に消化管吸収における問題点を考察し、開発戦略を構築するための理論的基盤が構築できる。Class I に分類される化合物は溶解性と膜透過性に優れ、良好な消化管吸収性が期待できるため、Class I に属する候補化合物を選択することが望ましい。しかし、創薬の現場で頻繁に選ばれる候補化合物は、主に Class II に分類される難溶解性化合物又は Class III に分類される難膜透過性化合物である。



Scheme 1 Biopharmaceutics Classification System (BCS) as defined by the US FDA

溶解性に問題のある Class II 化合物の場合、消化管内での溶解過程が消化管吸収の律速段階となるため、原薬の粒子径改善（微粒子化）や過飽和化などの製剤戦略を選択することになる¹⁴⁻¹⁶⁾。これらの戦略については多くの研究がなされており、医薬品開発の現場においても確立された方法論の選択が可能である。一方、膜透過性に問題のある Class III 化合物の場合は、受動拡散による膜透過率が減少し、消化管における吸収部位差等に起因して個体間及び固体内変動が大きくなる

ことが予測される。このため、膜透過性を改善するためには化学構造修飾（プロドラッグ化）¹⁷⁾や剤形修飾（リポソームやエマルジョン化）¹⁸⁻²⁰⁾が選択肢として挙げられるが、これらの方法論は適応可能な化合物構造が限られることや研究開発期間の延長やコスト増大など多くの問題点がある。これに対して、薬物の腸管粘膜透過性を上昇させる吸収促進剤を利用する試みがある²¹⁻³⁸⁾。この吸収促進剤を用いる方法論は、すべての化合物に対して適応可能な汎用性の高い手段として古くから研究課題とされてきたが、未だ確立されていない。したがって吸収促進剤による吸収改善策の確立は、Class III 化合物の開発戦略となるだけでなく、溶解性と膜透過性の両者に問題のある Class IV 化合物にも適用可能な方法論となり、経口剤開発の可能性を拡大させるものと考えられる。

以上のように、医薬品開発の観点から難吸収性薬物の腸管吸収の改善は古くからの重要な研究課題とされてきた。これまでに、腸管吸収改善の試みは数多くなされており、代表的なものには脂肪酸類、キレート類、胆汁酸塩、界面活性剤などがあげられ、様々な吸収促進機構が報告されている²¹⁻²⁶⁾。しかし、これら吸収促進剤の多くは細胞膜障害性が高く、不可逆的な消化管膜の機能障害を惹起するため、臨床応用された例はごくわずかに限られる^{24, 34, 35)}。そのような中、近年、有効濃度域において粘膜障害性が低く、さらに従来の吸収促進剤に比べて部位特異性の低い、一酸化窒素（NO）供与体を吸収促進剤として利用する試みが注目を集めている。これまでに NO 供与体と水溶性高分子化合物やペプチド性医薬品などを併用投与することで、腸管からの吸収率が增大することが報告されている²⁷⁻³³⁾。この NO による吸収促進効果は、消化管上皮細胞の tight junction 開口を介した paracellular route の透過性の上昇と考えられ、主に難吸収性水溶性薬物の膜透過性改善に対する効果と応用が期待されている²⁷⁻³³⁾。しかし、詳細な吸収促進機構は未だ明らかにされておらず、実用化に至っていない。また、NO による吸収促進効果に関する研究は、paracellular route を介した薬物吸収においてのみ展開されてきている一方、transcellular route を介した薬物吸収への影響は検討されていないのが現状である。

そこで本研究では、paracellular route 及び transcellular route の両腸管粘膜透過経路に対する NO の吸収促進効果について検討を行い、NO の吸収促進剤として有用性拡大の可能性を検討した。

第 1 章では、NO 供与体として sodium nitroprusside (SNP) を選択し、難吸収性水溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす SNP の影響を評価することで、吸収促進剤としての実用化の可能性を検討した。

第 2 章では、ラット摘出腸管を用いた *in vitro* の評価系において、transcellular route を介した薬物吸収に対する NO の影響を明らかにするために、難溶解性脂溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす NO の影響を検討した。特に、受動拡散及び排出型トランスポーターに対する影響を評価した。

第 1 章 難吸収性水溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす SNP の影響

医薬品開発の観点から難吸収性薬物の腸管吸収の改善は古くからの重要な研究課題とされてきた。これまでの取り組みの中で、その改善方法の一つとして、薬物の消化管粘膜透過性を上昇させる吸収促進剤の利用がある。しかし、吸収促進剤の多くは細胞膜障害性が高く、不可逆的な消化管膜の機能障害を惹起するため^{24, 34, 35)}、臨床応用された例はごくわずかに限られる。しかし近年、有効濃度域において粘膜障害性が低く、さらに従来の吸収促進剤に比べて部位特異性の低い、一酸化窒素 (NO) 供与体を吸収促進剤として利用する試みが注目を集めており、これまでに NOC 類、NOR 類、SNAP、SIN-1、NONOate などの NO 供与体による吸収促進効果が報告されている²⁷⁻³³⁾。この NO による吸収促進効果は、消化管上皮細胞の tight junction 開口を介した側方細胞間腔経路 (paracellular route) の透過性の上昇と考えられ、主に難吸収性水溶性薬物の膜透過性改善に対する効果と応用が期待されている。しかし、詳細な吸収促進機構は未だ明らかにされておらず、実用化に至っていない。

以上の背景のもと、本研究では NO の吸収促進効果を検討するため、本邦のみならず米国においてもニトロ系血管拡張薬として古くから臨床で用いられている、sodium nitroprusside (SNP) を NO 供与体として選択し (Fig. 1)、SNP による吸収促進効果を評価することで、実用化の可能性を検討した。

第 1 節 SNP の腸管粘膜に及ぼす影響

SNP は NO が配位したシアン化鉄錯体であり、その構造上、NO 遊離に伴いシアン化物 (CN⁻) を遊離することが知られている。通常、SNP は静脈内投与で用いられるため、生体内で SNP より遊離したシアンは、肝臓のロダナーゼによる代謝を経て、大部分が無毒化される。しかし、消化管で CN⁻が遊離した場合、その腸管粘膜に対する影響は不明である。

そこで、本節では、SNP の吸収促進効果を検討する前段階として、SNP が腸管粘膜に及ぼす影響について、ラットを用いて生化学的及び組織学的な検討を行った。

1-1-1 SNP 投与による NO 放出量

腸管 loop 内で SNP が放出する NO 量を定量するため、ラット回腸部に腸管 loop を作製した後、腸管 loop 内を SNP 溶液で満たし、120 分後までに溶液中へ放出された NO₂ 量を測定した。さらに SNP 構造類似薬物である sodium ferrocyanide (SFC) と比較検討した (Fig. 1)。

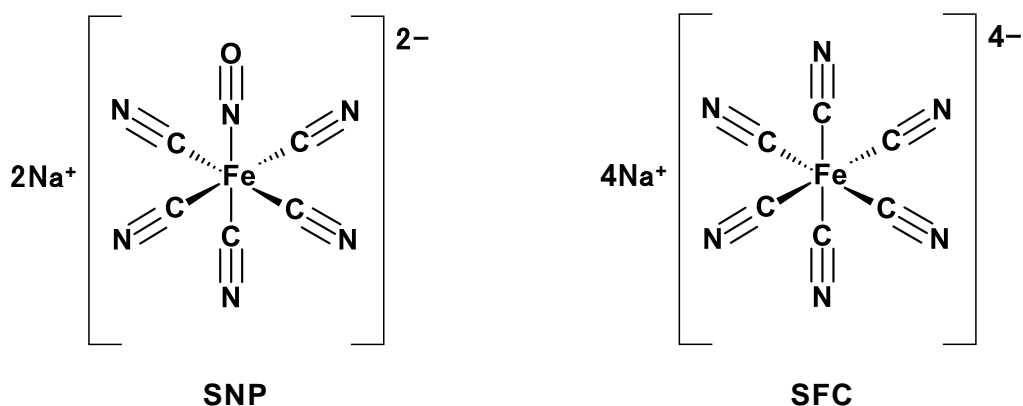


Fig. 1 Structure of sodium nitroprusside (SNP) and sodium ferrocyanide (SFC)

SNP の回腸 loop 内への投与により、NO の放出量は投与量依存的に増加した。また、SNP 10 mg/kg 及び 100 mg/kg 投与群において、それぞれ約 6 nmol/loop 及び約 9 nmol/loop の NO₂⁻ が生成し、CTRL 群での値 (2 nmol/loop) に対して有意な放出量の増加を示した。一方、SFC 投与群においては、いずれの投与量においても、CTRL 群と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 2)。

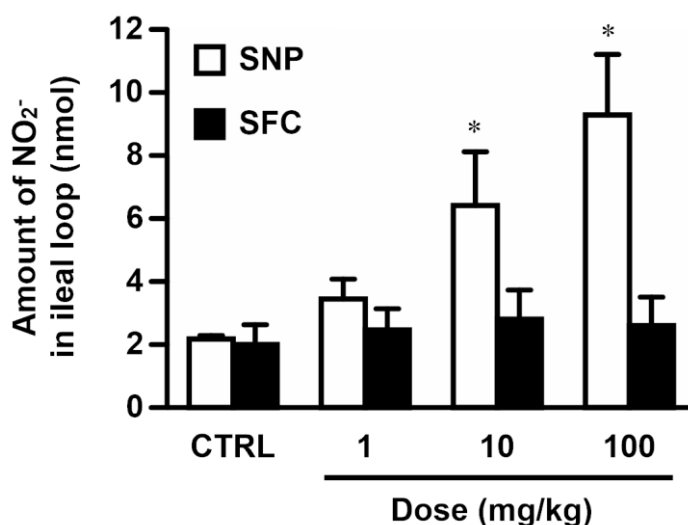


Fig. 2 Effect of SNP or SFC on amount of generated NO₂⁻ in the ileal perfusate. Results are presented as the mean ± S.E. (n = 8-10). *P < 0.05 compared with control condition.

以上より、本検討で用いた SNP の投与範囲において、SNP が NO を用量依存的に放出することが示された。また、構造類似物質である SFC 投与群との比較により、検出された NO は SNP に由来することが示された。

1-1-2 SNP 投与による腸管粘膜障害性の評価

SNP による腸管粘膜障害性惹起の可能性を検討するために、SNP 投与後における腸管粘膜構造の変化、腸管粘膜中の総タンパク含量及び腸管粘膜からのリン脂質脱落量を評価した。ラット回腸 loop を作成後、腸管 loop 内を SNP 溶液で満たし、120 分後に各種サンプルを採取し検討を行った。

ラット回腸部における腸管粘膜構造は、SNP 1 mg/kg 投与及び 10 mg/kg 投与条件において、絨毛構造の変化は認められなかった。一方、SNP 100 mg/kg 投与条件においては、CTRL 条件と比較して絨毛先端部の形が崩れ、全体的な粘膜構造に異常が認められた (Fig. 3)。

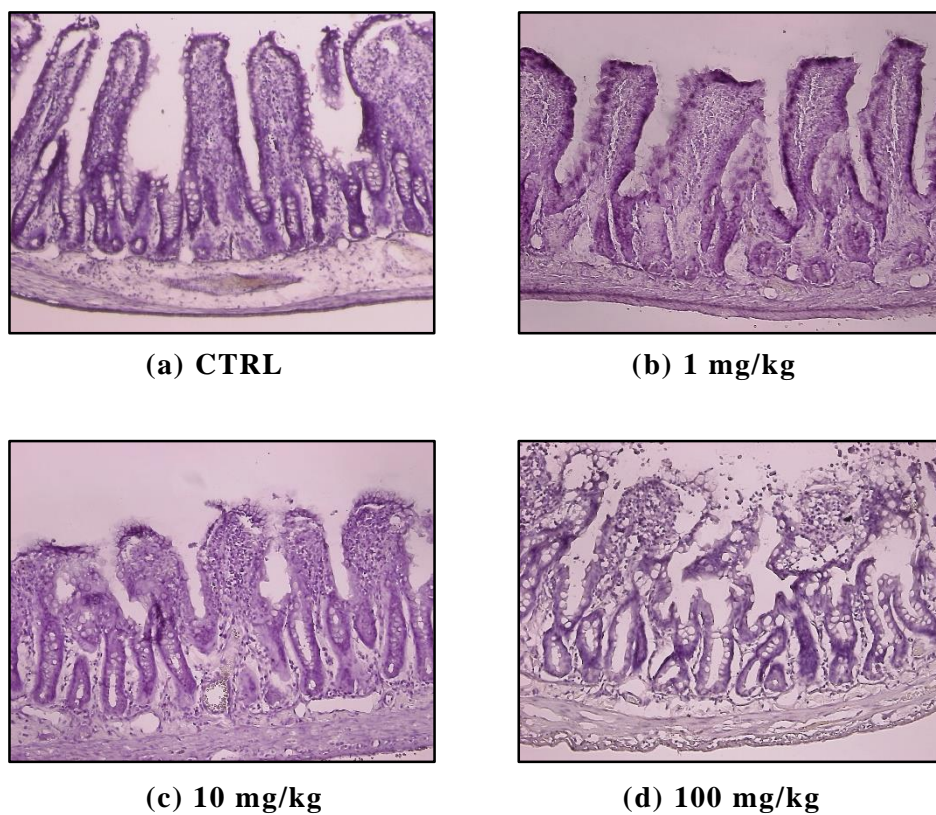


Fig. 3 Effects of SNP on histological changes in ileal lumen. Alteration of the mucosal surfaces structure at 2 hr after administration was evaluated by Mayer's Hematoxylin staining. Each image was taken at $\times 400$ magnification.

ラット回腸部における粘膜中の総タンパク量は、SNP 及び SFC 投与により変化せず、本検討で用いた SNP 投与範囲では回腸粘膜中のタンパク含量に対して影響を与えないことが示された (Fig. 4)。

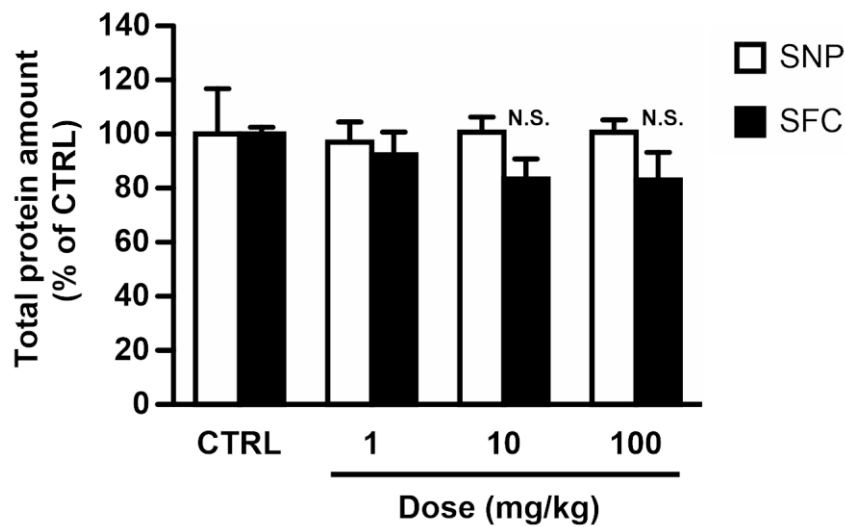


Fig. 4 Effect of SNP or SFC on total protein level in ileal mucosa. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 4-6). N.S. : not significant.

ラット回腸部における粘膜からのリン脂質脱落量は、SNP 1 mg/kg 投与及び 10 mg/kg 投与条件では変化は認められなかった。一方、SNP 100 mg/kg 投与条件では CTRL 条件の約 8 倍となる有意なリン脂質の脱落増加が認められた。また、SFC 投与群においては、いずれの投与条件においても有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

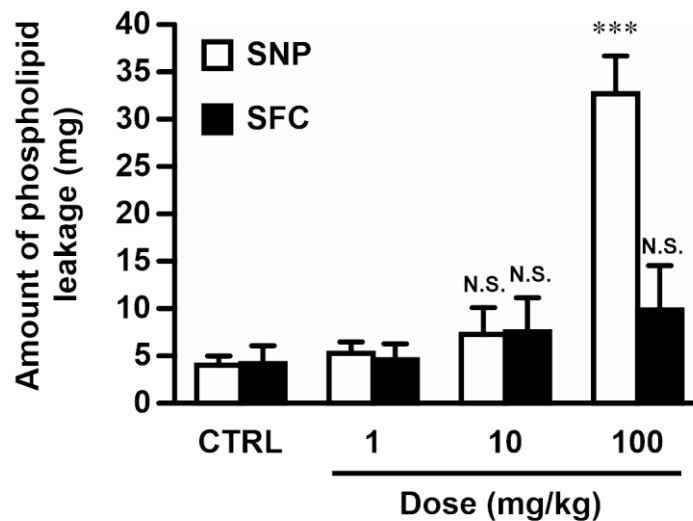


Fig. 5 Effects of SNP on amount of leaked phospholipid in ileal perfusate. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 5-8). *** P < 0.001 compared with control condition. N.S. : not significant.

以上の結果から、SNP 100 mg/kg 投与条件において生成する NO は、腸管粘膜中のタンパク量に対して顕著な影響は無いものの、粘膜構造の変化及びリン脂質の漏出を伴う粘膜障害を引き起こすことが示された。

したがって、以後の検討においては、薬物の腸管粘膜透過性に対する SNP の影響を明らかにするため、生体に対して障害性の低い SNP 量 (1 mg/kg 及び 10 mg/kg) に限定して行うこととした。

1-1-3 小括

第 1 節では、NO 供与体である SNP が腸管 loop 内へ放出する NO 量を定量し、SNP が NO を用量依存的に放出することが示された。また、SNP 投与による腸管粘膜障害性惹起の可能性を検討した結果、SNP は 1 mg/kg 及び 10 mg/kg の用量では有意な粘膜障害性が認められなかったが、100 mg/kg の高用量において、粘膜中の総タンパク含量の有意な減少は無いものの、粘膜構造の変化及びリン脂質の脱落増加を伴う粘膜障害が示された。

第 2 節 SNP による吸収促進効果

これまでに、難吸収性水溶性薬物に対する SNP の吸収促進効果は、小腸上皮細胞のモデル細胞株である Caco-2 細胞を用いた単層培養系において認められているものの²⁷⁾、動物腸管組織については検討されていないのが現状である。そこで、本章では、paracellular route を介した薬物の腸管膜透過性に対する SNP 併用による効果を検討した。なお SNP の使用濃度は、生体に対して障害性の低い SNP 量 (1 mg/kg 及び 10 mg/kg) を選択した。

1-2-1 SNP 併用時における薬物の吸収量変化

SNP による吸収促進効果を明らかにするため、SNP 併用時における薬物の吸収量変化を *in situ* closed loop 法にて検討した。本検討で用いるモデル薬物は、paracellular marker として一般的に用いられている fluorescein isothiocyanate-dextran 4000 (FD-4) 及び 5(6)-carboxyfluorescein (5-CF) を選択した。まず、ラット回腸部に作製した loop に FD-4 (12 mg/kg) と SNP (1 mg/kg 或は 10 mg/kg) を含む薬液を添加し、投与直後からの血中濃度推移及び AUC を算出し、吸収量の変化を評価した。

投与直後からの FD-4 の血漿中濃度は、SNP の投与により投与量依存的に有意な増加を認めた (Fig. 6)。この結果から、SNP との同時投与により FD-4 の吸収量が増加することが示された。したがって、SNP は回腸部において paracellular route を介した薬物吸収に対して促進効果を有する可能性が示唆された。

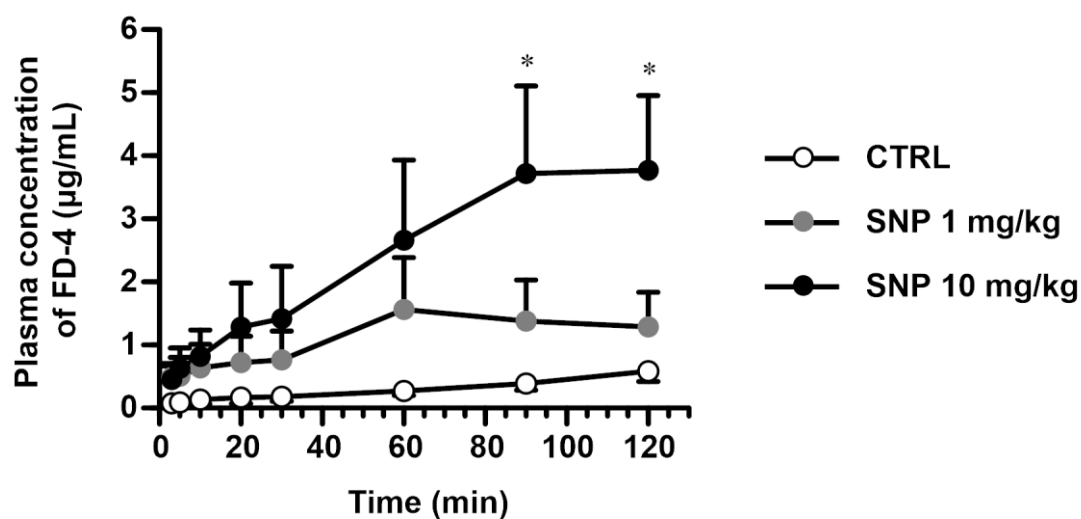


Fig. 6 Effect of SNP on plasma concentration of FD-4 after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 8–12). * P < 0.05 compared with control condition.

続いて、FD-4の血漿中濃度推移よりAUC₀₋₆₀を算出し、SNPの効果を検証するとともに、同様の検討をSNPの構造類似物であるSFCについても行った。

FD-4のAUC₀₋₆₀は、SNP投与群において投与量依存的に有意な増加を示した。一方、SFC投与群ではいずれの投与条件においても変化は認められなかった (Fig. 7)。

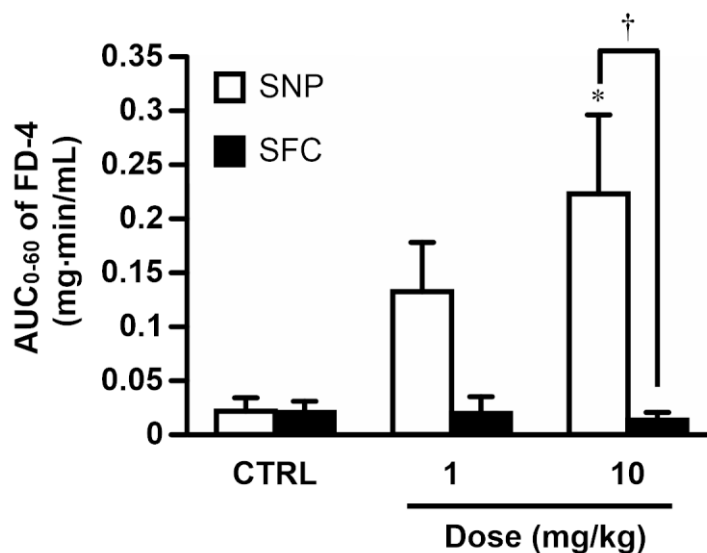


Fig. 7 Effect of SNP or SFC on AUC₀₋₆₀ of FD-4 after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 7–12). * P < 0.05 compared with control condition. † P < 0.05 compared with SFC treatment condition.

SNP投与によるFD-4のAUC₀₋₆₀の変化は、Fig. 2（第1節参照）で得られたSNPによるNO放出量の結果と同様の傾向を示した。SNPに対してSFCはNO放出量の増加を認めないことから、SNPの併用によって認められたFD-4に対する吸収促進効果は、SNPにより放出されたNOに起因すると推察された。

以上の結果をより明確にするために、FD-4と同様にparacellular markerとして広範に用いられている5-CFの腸管吸収に対するSNP併用効果を検討した。

FD-4と同様に、回腸部に作成した腸管loop内へ投与した後の血漿中濃度推移より算出した5-CFのAUC₀₋₆₀は、SNP非投与条件と比較して、SNP投与量依存的に有意な増加を示した（Fig. 8）。

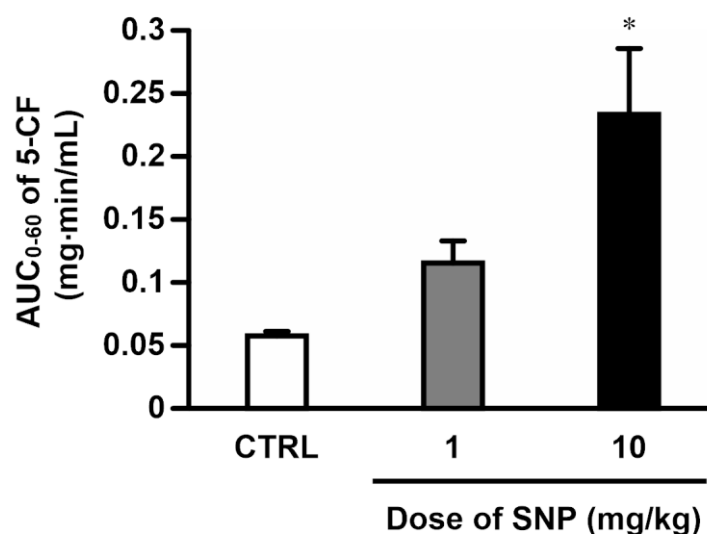


Fig. 8 Effect of SNP on AUC₀₋₆₀ of 5-CF after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 6–12). * $P < 0.05$ compared with control condition.

さらに、他のNO供与体と吸収促進効果を比較するため、粘膜障害性が低く、腸管において吸収促進効果があると報告されている1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-ethyl-2-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene (NOC12)^{29, 33)}を選択し、FD-4の腸管吸収に対する同様の検討を行った。

NOC12を用いた検討において、FD-4のAUC₀₋₁₂₀はNOC12の投与量依存的に有意な増加が認められた（Fig. 9）。これらの結果より、SNP併用によってFD-4と同様に5-CFに対する吸収促進効果が認められ、さらに他のNO供与体であるNOC12併用時においてもFD-4の吸収促進効果が同様に観察されたことから、SNP併用による吸収促進効果の機構は、NO放出を介したparacellular routeの膜透過性亢進である可能性が高いと考えられた。

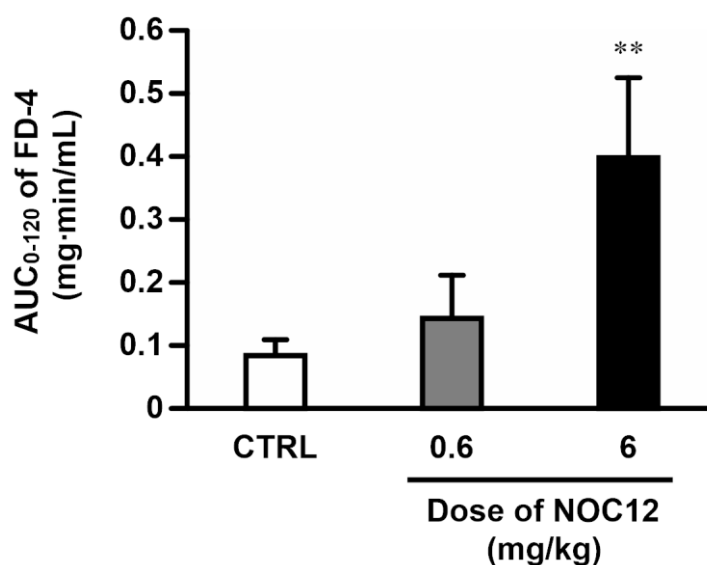


Fig. 9 Effect of NOC12 on AUC₀₋₁₂₀ of FD-4 after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 6–10). ** $P < 0.01$ compared with control condition.

これまでに、NOC類（NOC5, 7, 12）やSNAPなどのNO供与体がラット腸管に対して難吸収性水溶性薬物の吸収促進作用を有することが報告されており、その効果は唯一臨床応用されているカプリン酸ナトリウム及び既存の吸収促進剤に比較して高いことが報告されている^{29, 33)}。また、これらのNO供与体による吸収促進効果は、腸管部位差を示さず、空腸、回腸、結腸のいずれの部位においても同等であることが報告されている²⁹⁾。NOによる吸収促進効果の機構について詳細は未解明であるものの、ラット腸管粘膜層及びCaco-2細胞単層培養系におけるNOC系NO供与体の吸収促進効果は、経上皮電気抵抗（transepithelial electric resistance: TER）の低下を伴うため、細胞間の接着に参与するtight junctionの開口機構が関与するものと考えられている³³⁾。

以上のように、本研究で用いたSNPがこれまでに報告されているNO供与体と同様に、tight junctionの開口を介したparacellular routeの膜透過性亢進作用を有することが示され、難吸収性水溶性薬物に対する吸収促進剤として有用であることが示唆された。

1-2-2 Claudin family のタンパク質発現量に対する SNP の影響

SNP 投与 (120 分作用) による tight junction 構造への影響を明らかにするため、tight junction 構成タンパクである claudin family³⁹⁻⁴⁶⁾のタンパク質発現量に対する SNP の影響を検討した。claudin の中でも、経上皮電気抵抗の獲得、形成、維持、制御と密接に関係しているとされる claudin-1, -2, -4 に加え、ラット小腸に発現が多いと報告されている claudin-7 を評価対象とした。

SNP 投与により、claudin-1, -2 及び -4 のタンパク質発現量は、SNP の投与量依存的な増加傾向を示したが、有意な変化は認められなかった (Fig. 10a, b, c)。これに対して claudin-7 のタンパク質発現量に顕著な変化は認められなかった (Fig. 10d)。

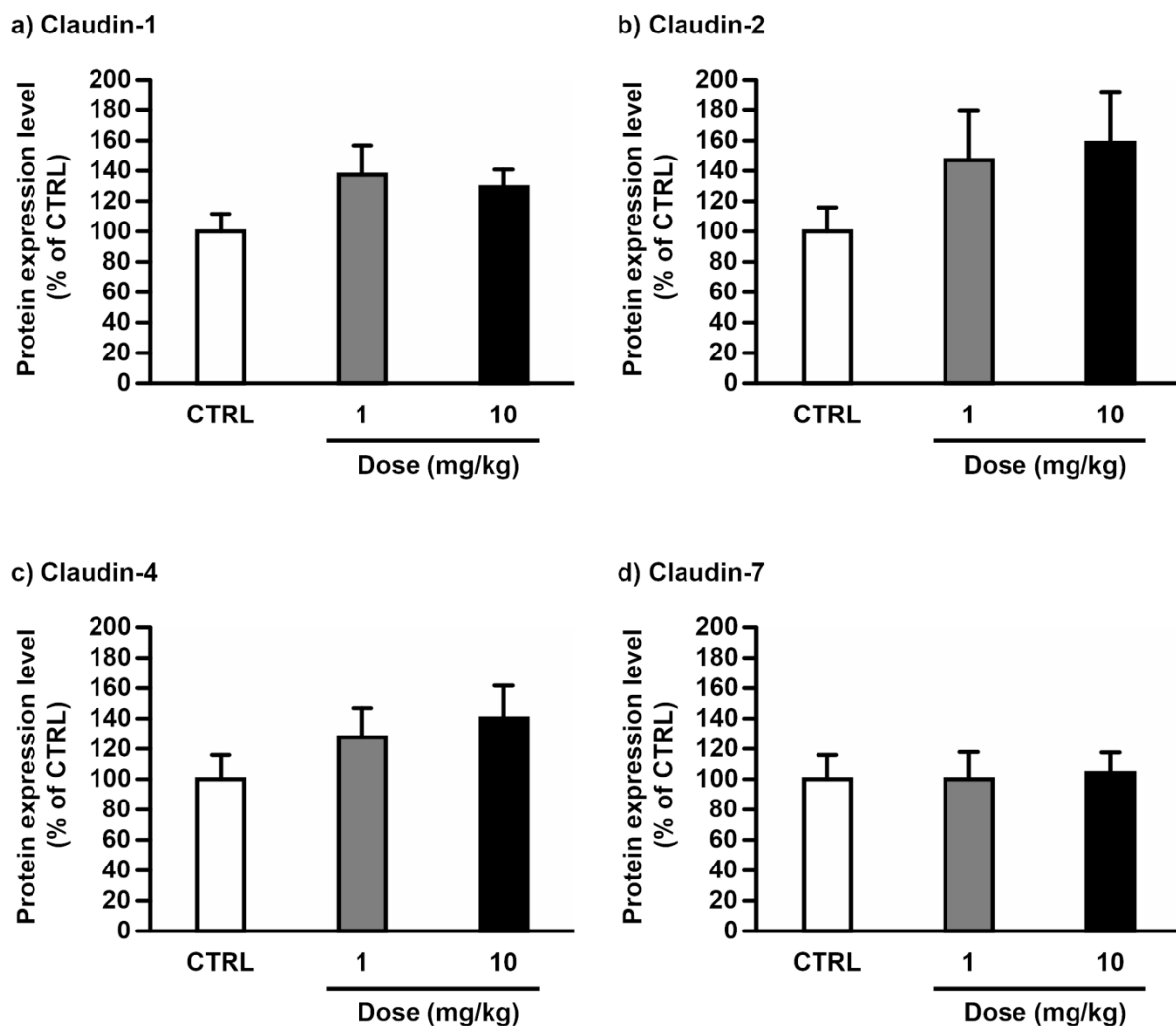


Fig. 10 Effect of SNP on protein expression levels of claudin-1 (a), -2 (b), -4(c), and -7 (d) in ileum 120 min after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 5-6).

Tight junctionはclaudin等の構成タンパク質同士が共重合しストランド構造を形成することで構築される^{39, 40)}。特にclaudin-1、-2や-4については、tight junctionの形成に対して重要な役割を持つと考えられている^{39, 41, 44)}。すなわち、claudinタンパク質の発現量低下を介した吸収促進機構も十分に考えうるが、本検討結果から、SNPによるparacellular routeの吸収促進効果は、tight junction構成タンパク質の直接的な発現低下によるものではないことが示された。

これまでに、多くの物質が吸収促進剤として報告されており、代表的なものには脂肪酸類、キレート類、胆汁酸塩、界面活性剤などがあげられ、様々な吸収促進機構が報告されている²¹⁻²⁶⁾。例えば、唯一臨床応用されているカプリン酸ナトリウムは脂肪酸の一種であり、細胞膜上の phospholipase C (PLC) を活性化する作用を有する。活性化された PLC は inositol trisphosphate (IP3) の生成促進を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、細胞骨格系を担う myosin と actin の重合を促進し、結果的に tight junction 構成因子の一種である cadherin を細胞内へ内在化させることで tight junction を開口させる²⁴⁾。一方、オレイン酸などの不飽和脂肪酸は、脂質二重膜の流動性を亢進することで吸収を促進し²²⁾、キレート類の一種である EDTA は細胞接着部位の Ca^{2+} を捕捉することで、細胞間隙を拡大させることが報告されている²²⁾。以上のように、吸収促進機構は物理的機構だけでなく、細胞内イベントを介するものと、多岐にわたる。さらに、近年、tight junction 構成タンパク質である claudin を標的とした、新しいタイプの吸収促進剤に関する検討も行われている³⁵⁻³⁸⁾。

一方、NO は細胞膜電位の低下を伴って、難吸収性薬物の膜透過性を亢進させることは明らかにされているが、分子機構の詳細は未だ解明されていない。細胞内の可溶性 guanylate cyclase/cGMP 経路の活性化に起因するシグナル伝達が関与し、細胞内へのタンパク質の内在化を介して tight junction が開口していることが推測されるが、実証された例はない。本検討では、細胞内 Ca^{2+} 濃度に関する検討やタンパク質の細胞内局在に関する検討は行っていないため、さらなる検討が必要であると考えられる。

1-2-3 SNP 前処理時における吸収促進効果の有無

一般的に、paracellular routeの膜透過性亢進は、tight junction開口により腸管粘膜のバリアー機能の低下を誘発し、腸内細菌等の生体外異物の体内浸潤による粘膜障害性惹起の可能性を有している^{34, 35)}。したがって、paracellular routeを標的とした吸収促進剤の場合、その吸収促進作用が十分に発揮された後に、速やかに促進作用を消失することが理想的と考えられている。

そこで、これまでに認められたSNP併用による吸収促進効果が、SNP前処理条件下においても示されるか否かについて検証するために、SNP前処理後での薬物の吸収量変化を*in situ* closed loop法にて検討した。モデル薬物は前節同様、paracellular markerとして一般的に用いられているFD-4 (12 mg/kg) を選択した。ラット回腸部に作製した腸管loopに対してSNPを120分間作用させ、loop内を洗浄した後、FD-4溶液をloop内に投与し、吸収量の変化を測定した。

SNP前処理後から60分間の吸収実験 (SNP投与後120~180分の間) によって得られたFD-4の血中濃度推移より算出したAUC₁₂₀₋₁₈₀は、CTRL群と比較して投与量依存的に増加傾向を示したが、有意な変化は認められなかった (Fig. 11)。さらに、Fig. 7で得られたSNP併用時におけるFD-4のAUC₀₋₆₀と比較して急激に低下したことから、SNP除去後、paracellular routeの膜透過性は回復することが示された。このことから、SNPによる吸収促進作用は可逆的かつ短期的な作用であると考えられた。NOC 7 の吸収促進作用においても可逆性が認められているという報告があり³¹⁾、本検討の結果と一致することが確認できた。

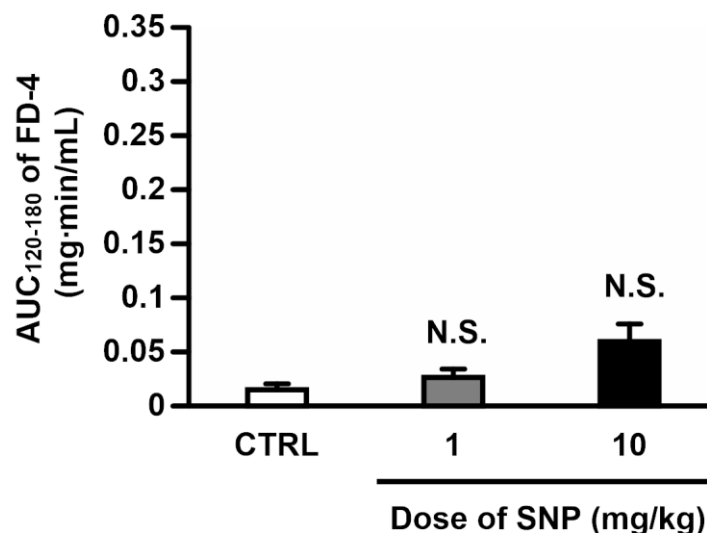


Fig. 11 Effect of SNP on AUC₁₂₀₋₁₈₀ of FD-4 examined by removal of SNP 120 min after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 6–8). N.S.: not significant.

1-2-4 SNP 前処理時における細胞膜電気抵抗 (R_m)

NOC12 等の NO 供与体処理により、ラット小腸での経上皮電気抵抗 (TER) が低下することは既に報告されているが³³⁾、吸収促進作用の可逆性の観点から、NO 供与体除去後での TER に関する情報は少ないのが現状である。

そこで、SNP 除去後における tight junction の状態を確認するために、tight junction の指標として細胞膜電気抵抗値 (membrane resistance: R_m) を電気生理学的手法より測定した。

SNP 除去条件下における回腸粘膜の膜抵抗値は、SNP 非投与群と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 12)。したがって、SNP 除去後は細胞膜電気抵抗に影響が見られないことから、tight junction への影響は無いと考えられた。

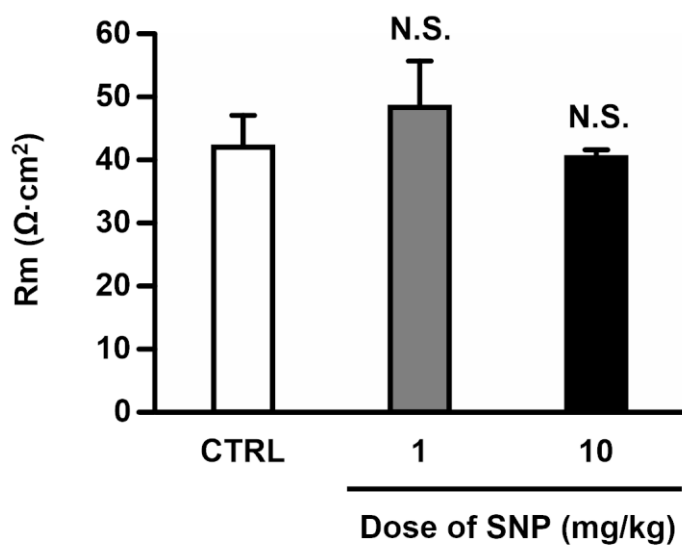


Fig. 12 Effect of SNP on TER in ileum 120 min after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. ($n = 6-7$). N.S.: not significant.

1-2-5 小括

本節では、SNP による吸収促進効果を明らかにするため、SNP 併用時における薬物の吸収量変化を検討したところ、FD-4 及び 5-CF の吸収は、SNP 併用によって増大することが示された。この効果は、吸収促進効果があると報告されている NOC12 併用時においても同様に観察された。さらに SFC 投与群との比較により、SNP 併用による吸収促進効果は、NO を介した paracellular route の透過性亢進に起因すると考えられた。また、western blotting によるタンパク質発現量解析の結果、NO の効果は tight junction 構成タンパク質の直接的な発現低下によるものではないことが示された。

一方、SNP の吸収促進作用の可逆性を検証したところ、FD-4 の $AUC_{120-180}$ は SNP 併用時に比較して、SNP 除去によって急激に低下したことから、SNP の吸収促進作用は速やかに減弱することが示された。

さらに、SNP 除去後は細胞膜電気抵抗に影響がなく、tight junction への影響は無いことが示され、SNP による吸収促進作用は可逆的かつ短期的な作用であることが示唆された。

以上の結果から、本章では、SNP が他の NO 供与体と同様に、paracellular route の膜透過性を亢進する作用を有し、さらにその効果が可逆的であることが示された。これまでに界面活性剤、胆汁酸塩、脂肪酸塩など数多くの物質が吸収促進剤としての有用性が評価されてきたが、対象薬物が十分に薬理効果を発揮するまで吸収促進剤を添加すると、大半の促進剤が腸管粘膜上皮細胞に対し不可逆的な障害を与えるため、製剤開発の過程で断念されてきた。こうした背景からも SNP の可逆的な吸収促進作用は、安全性が高く、吸収促進剤として有用性が高いと考えられた。

第 2 章 難溶解性脂溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす NO の影響

Transcellular route を介した薬物の腸管粘膜透過機構には、細胞膜内外の濃度勾配を駆動力としエネルギーを必要としない受動拡散（受動輸送）と、細胞膜内外の濃度勾配に逆らいエネルギー及びトランスポーターを必要とする能動輸送がある。一般に、開発された医薬品化合物の多くは脂溶性が高く、その腸管粘膜透過機構は腸管上皮細胞の細胞膜を横切る膜輸送形式、即ち transcellular route を介した受動拡散によるものと考えられている。この受動拡散はさらに、腸管上皮細胞の細胞膜を透過する膜透過律速と、消化管粘膜表面に存在する非攪拌水層の拡散過程における拡散律速の 2 段階の律速過程に分けられる。

細胞膜の透過機構は、薬物の膜透過速度が細胞内外の濃度勾配に比例するという Fick の法則と、薬物の脂溶性 ($\log P$) と pK_a により膜透過性が規定される pH 分配理論の 2 つの普遍的物理化学的法則により支配されている。その一方で、非攪拌水層や上皮細胞膜に局在する排出型トランスポーターなどの生理学的要因によっても支配されている。この中でも非攪拌水層は、分子サイズや $\log P$ 、 pK_a 、電荷等の薬物固有の物理化学的要因に作用し得る重要な吸収制御因子として考えられており⁴⁷⁻⁵⁵⁾、その組成は水溶性の粘液層で構築されていることから、難溶解性脂溶性薬物については吸収障壁となることが知られている。また、その分子実体として mucin が同定されているが、その生理学的及び薬剤学的役割は不明である^{48, 56)}。

一方、消化管の上皮細胞膜上には、異物排泄に関わる排出型のトランスポーターが発現していることが知られている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。薬物の中には、脂溶性が高く良好な物性を有しているにも関わらず、排出型トランスポーターの基質となることで、期待された消化管吸収性を得られない例が存在する。特に、P-glycoprotein (P-gp) は基質認識性が広く、多くの薬物を輸送基質とすることから、消化管吸収において非常に重要性の高い吸収制御因子の一つである。近年、P-gp の機能阻害を目的とした吸収促進剤に関する検討が複数報告されていることから、吸収改善の標的分子として期待されている⁶⁰⁻⁶³⁾。

近年、NO 供与体が安全性の高い吸収促進剤となりうることが報告されているが、NO の吸収促進効果に関する研究は、paracellular route を介した薬物吸収においてのみ進んでいる一方で、transcellular route を介した薬物吸収については検討がなされていないのが現状である。

以上の背景のもと、本研究では、transcellular route を介した薬物吸収に対する NO の影響を明らかにし、NO による吸収促進作用の機構解明を目指す。特に、受動拡散及び排出型トランスポーターに対する影響に焦点を置きながら、吸収促進剤として有用性拡大の可能性を探る。

第 1 節 受動拡散に対する NO の影響

受動拡散に対する NO の影響を明らかにするために、transcellular route のモデル薬物として、脂溶性及び膜透過性が高く、BCS 分類において Class II に分類される griseofulvin ($\log P = 2.18$)^{11, 64-66)} を選択し、griseofulvin の腸管膜透過性に対する NO 供与体処理の影響及び効果の腸管部位特異性を検討した。

なお、これまではラット whole body を用いた *in situ* の評価系で検討を進めてきたが、本検討ではラット摘出腸管を用いた *in vitro* sac 法により検討を行う。これは、NO が生体内で血管拡張作用を示し、血流量の増大による薬物吸収の亢進を防ぎ、さらにラットの個体間差を減らすために本法を採用した。

また、transcellular route に対する影響をより明確に評価するために、paracellular route に対する NO 供与体の吸収促進効果が可逆的であることを利用し³²⁾、transcellular route に対する検討では NO 供与体の前処理条件を選択することで、両吸収経路の差別化を図った。さらに前処理条件で検討を行う際に、腸管粘膜に対して可能な限り短時間で大量の NO を作用させるために、NO 放出半減期が最短である 1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene (NOC7, $T_{1/2} = 5$ min) を選択し、前処理時間を 30 min とした。

2-1-1 難溶解性脂溶性薬物の膜透過性に対する NO の影響（腸管部位特異性）

NOC7 の濃度は、paracellular route に対する影響が報告されている 5 mM を検討条件として選択した³²⁾。また、使用部位は十二指腸部、空腸部、回腸部、結腸部の 4 部位を選択した。なお、膜透過性の変化は、*in vitro* sac 法にて得られた膜透過量から、 AUC_{0-120} 及び膜透過係数 (P_{app}) を算出し評価した。

十二指腸部における griseofulvin の膜透過量は、NOC7 前処理群で有意に増加したが、空腸部より下部では変化は認められなかった (Fig. 13)。また、得られた griseofulvin 膜透過量から、 AUC_{0-120} 及び膜透過係数 (P_{app}) を算出し評価したところ、十二指腸部でのみ NOC7 前処理による影響を受け、 P_{app} の変化率は 1.9 倍となった。一方、空腸部より下部では NOC7 前処理による影響は認められなかった (Table 1)。

これまでに、paracellular route の膜透過性亢進を目的として検討された吸収促進剤のうち、界面活性剤、胆汁酸塩、キレート剤などの既存の吸収促進剤は下部腸管（結腸及び直腸）で作用を示すのに対し、NOC7 を含む NO 供与体による吸収促進効果には部位差が認められないことが報告されている^{29, 32)}。これに対し、本節で得られた griseofulvin の膜透過性に対する NO の効果は、腸管上部、特に十二指腸部で特異的であった。この NO による膜透過性亢進効果の相違は、膜透過基質の物性が異なることに起因することから、paracellular route に対する作用機序と transcellular route に対する作用機序が異なることが示唆された。

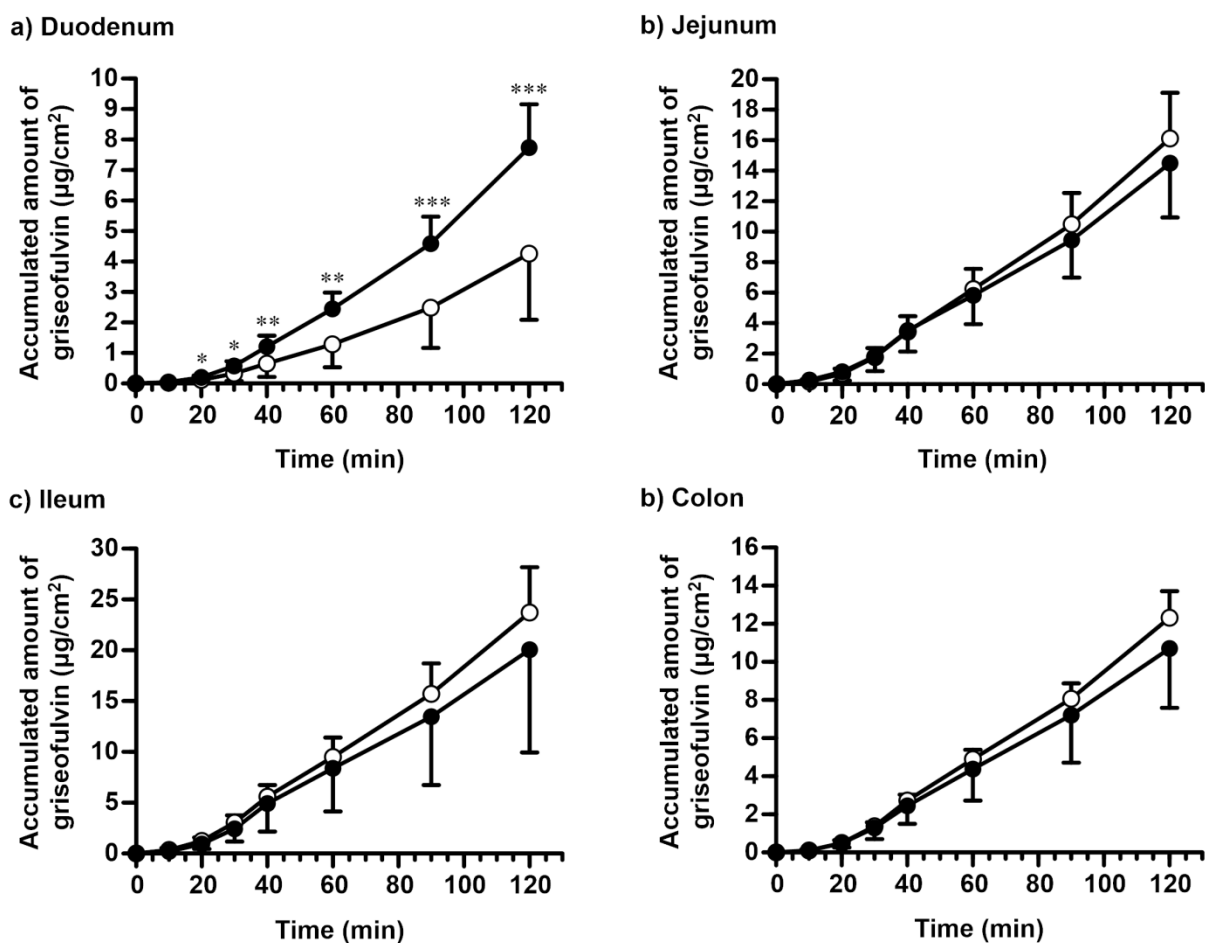


Fig. 13 Effect of NOC7 on the intestinal permeation of griseofulvin in rat gastrointestinal sacs, which were prepared from (a) duodenum, (b) jejunum, (c) ileum, and (d) colon. Key: (○) control (non-treated); (●) NOC7 5 mM (pretreated for 30 min). Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 5–14). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared with control condition.

Table 1 Effect of NOC7 on the AUC₀₋₁₂₀ and P_{app} of griseofulvin.

		AUC ₀₋₁₂₀		P _{app}	
		µg·min/mL	Ratio	10 ⁻⁵ cm/s	Ratio
Duodenum	CTRL	2.16 ± 1.08	-	0.78 ± 0.29	-
	NOC7 5 mM	3.94 ± 0.73 ***	1.8	1.47 ± 0.32 ***	1.9
Jejunum	CTRL	8.11 ± 1.62	-	3.52 ± 0.76	-
	NOC7 5 mM	7.14 ± 1.60	0.9	3.15 ± 0.84	0.9
Ileum	CTRL	11.81 ± 2.20	-	5.08 ± 1.10	-
	NOC7 5 mM	9.98 ± 5.02	0.9	4.69 ± 2.43	0.9
Colon	CTRL	6.18 ± 0.71	-	2.77 ± 0.30	-
	NOC7 5 mM	5.40 ± 1.59	0.9	2.43 ± 0.84	0.9

Results are presented as the mean ± S.D. (n = 5–14). ****P* < 0.001 compared with control condition. Ratio: fold increase in the value in the pretreated condition compared with that in control condition.

2-1-2 NO の膜透過性亢進作用に対する薬物物性（脂溶性）の関与

NO が難溶解性脂溶性薬物である griseofulvin の膜透過性に対して亢進作用を有することが示された。そこで、NO による脂溶性薬物の膜透過性亢進作用について詳細に検討するために、脂溶性の異なる薬物をさらに 3 種選択し、NO の効果を検討した。なお、以降は NO による効果が顕著に認められた十二指腸部を検討部位とした。

脂溶性の異なる薬物として、本検討では theophylline ($\log P = -0.02$)、antipyrene ($\log P = 0.38$)、diclofenac ($\log P = 1.13$) を選択し、いずれも検討濃度を 200 µM とした。また膜透過性の変化は、これまでと同様に *in vitro* sac 法により行い、得られた膜透過量から、AUC₀₋₁₂₀ を算出し評価した。

選択した薬物のうち diclofenac のみが、NOC7 前処理により膜透過量及び AUC₀₋₁₂₀ が上昇した (Fig. 14、Table 2)。

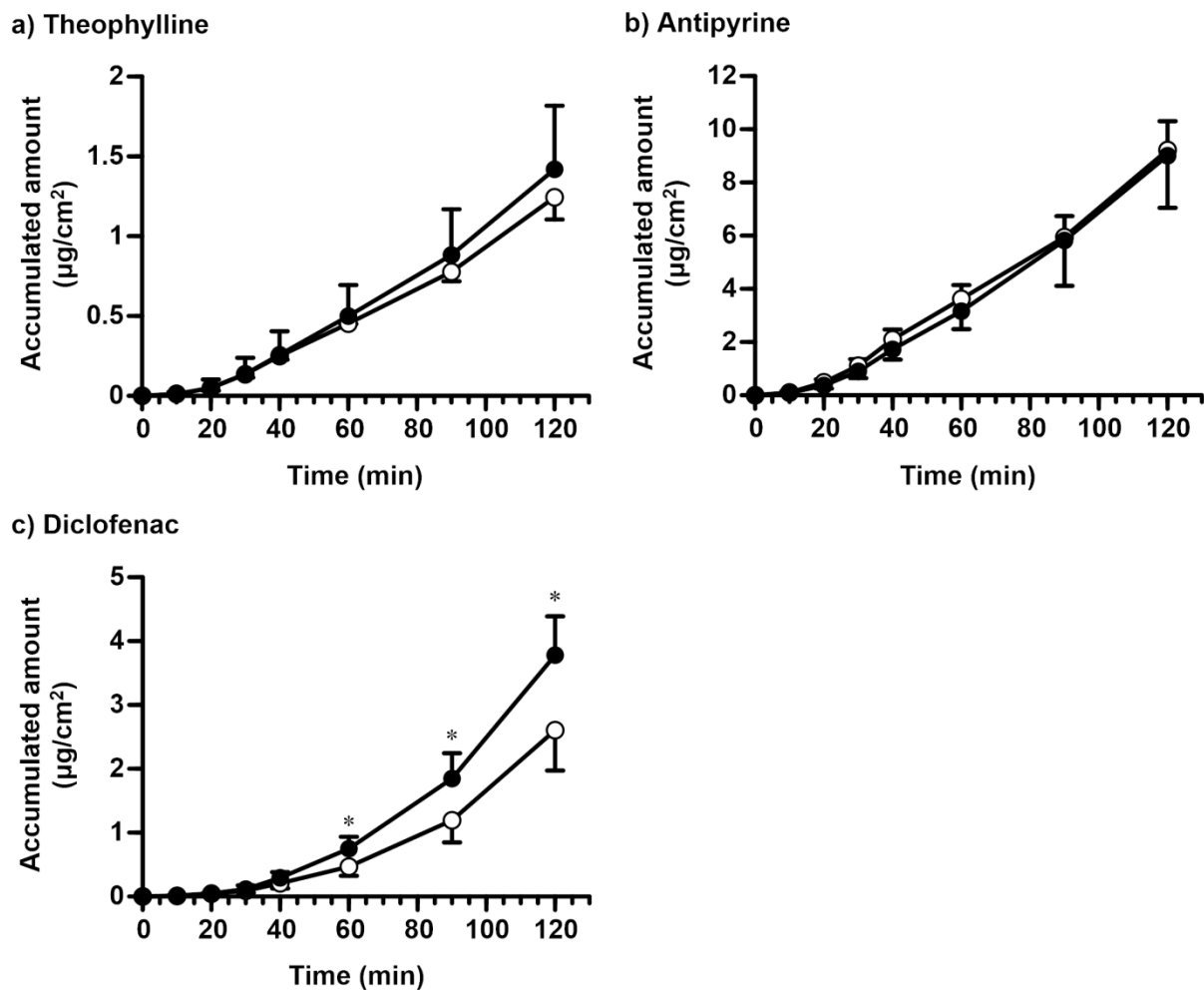


Fig. 14 Effect of NOC7 on the membrane permeation of theophylline (a), antipyrine (b), and diclofenac (c) in rat duodenum. Key: (○) control (non-treated); (●) NOC7 5 mM (pretreated for 30 min). Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 3–6). * $P < 0.05$ compared with control condition.

Table 2 Effect of NOC7 on the AUC_{0-120} of hydrophobic drugs.

		AUC_{0-120} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	Ratio
Theophylline	CTRL	0.62 ± 0.08	-
	NOC7 5 mM	0.72 ± 0.18	1.1
Antipyrine	CTRL	4.57 ± 0.51	-
	NOC7 5 mM	4.62 ± 1.23	0.9
Diclofenac	CTRL	1.30 ± 0.33	-
	NOC7 5 mM	1.93 ± 0.36 *	1.5

Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 3–6). *** $P < 0.001$ compared with control condition. Ratio: fold increase compared with control condition.

次に、本節で得られた結果から算出した膜透過係数 (P_{app}) 及び先の検討で得られた griseofulvin の P_{app} について比較した (Fig. 15)。

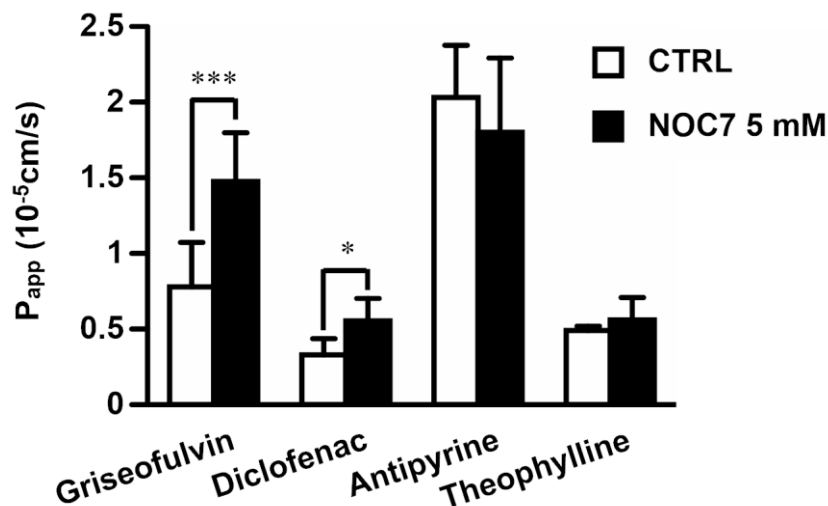


Fig. 15 Effect of NOC7 on the membrane permeation of griseofulvin, diclofenac, antipyrine, and theophylline in rat duodenum. Keys: (□) control (non-treated); (■) NOC7 5 mM (pretreated for 30 min). Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 3–12). * P < 0.05, *** P < 0.001 compared with control condition.

NOC7 非投与群 (CTRL 群) に対し脂溶性と膜透過性について比較したところ、その P_{app} は antipyrine > griseofulvin > theophylline > diclofenac の順となり、 $\log P$ の大小関係から推測される順序とは異なる結果が得られた。

一般に、脂質二重膜を介した腸管膜透過は、pH 分配理論によって支配され、薬物の脂溶性 ($\log P$) と膜透過との間には良好な相関が認められる。但し、その関係は、すべての範囲で直線的ではなく、非攪拌水層や細胞間隙経路の存在により、ある値以上又は極めて低い $\log P$ を有する薬物はずれることが以前から知られている^{67, 68)}。実際、ラット小腸における膜透過性が $\log P$ の大小関係とは異なることやヒトでの吸収性と相関しないことが報告されている⁶⁹⁻⁷¹⁾。したがって、これらの報告及び本検討結果からも、単に $\log P$ の値のみでは正確な薬物の膜透過性を予測できないことを示していることが示された。

一方で、NOC7 前処理による膜透過性の変化について着目すると、griseofulvin 及び diclofenac において、CTRL 群に比較して有意な P_{app} の増加が認められ、その変化率はそれぞれ約 2 倍、1.7 倍を示したのに対し、theophylline 及び antipyrine では変化が認められなかった。また、NOC7 前処理による膜透過性の変化率は、

griseofulvin > diclofenac > antipyrine > theophylline となり、 $\log P$ の大小関係と相関した結果となった。このことは、脂溶性が高い薬物ほど NO による膜透過性亢進作用を受け易いことを示唆するものであり、脂溶性の大きさに応じて効果が変化するのであれば、NO は transcellular route を介した受動拡散による腸管膜透過を制御する何らかの因子に対して影響を及ぼしている可能性が考えられた。特に、今回用いた griseofulvin は、 $\log P$ が 2.18 と脂溶性が高く、人工脂質膜透過試験 (parallel artificial membrane permeability assay : PAMPA) の結果からも高膜透過性を示すことから⁷²⁾、主に受動拡散によって膜透過していると考えられる。したがって、脂溶性薬物の膜透過性に対して非攪拌水層の拡散が律速段階となると考えられることから、NO は非攪拌水層に対して影響を及ぼしている可能性が考えられた。

さらに、溶解性と膜透過性に基づいて医薬品化合物を 4 つのクラスに分類する BCS 分類に基づいて選択した薬物を考察すると、NO により膜透過性に変化が認められた griseofulvin 及び diclofenac は Class II に分類され、変化が認められなかった theophylline 及び antipyrine は Class I に分類される^{11, 64)}。これらは共に膜透過性が高いクラスに分類されるが、溶解性の違いにより異なる分類となる。この BCS 分類の違いと、NO による影響の違いに相関性が認められるならば、今後の医薬品開発において非常に興味深い情報となることが推察される。しかし、 $\log P$ が高いにも関わらず Class I に分類される薬物や、低いのも関わらず Class II に分類される薬物も存在することから、単純な結果とならないことが予想される。したがって、今後、多くの薬物に対して NO の効果を評価していく必要がある。

2-1-3 NO の膜透過性亢進作用に対する非攪拌水層の関与

前述のように、transcellular route を介した薬物の腸管粘膜透過機構のうち受動拡散には、非攪拌水層の拡散律速と腸管上皮細胞の膜透過律速の 2 段階の律速過程が存在することが知られており、水溶性の粘液層で構成される非攪拌水層が、脂溶性薬物の膜透過に対して制御因子となることが報告されている⁴⁷⁻⁵⁵⁾。また非攪拌水層は、主な構成成分である糖タンパク質によって、粘性の網目構造を形成することが知られており、その粘度や厚みなどの物性が脂溶性薬物の吸収制御因子となることが報告されている^{50, 54, 73)}。以上より、NO は非攪拌水層に対して影響を及ぼすことで、難溶解性脂溶性薬物の膜透過性を変化させていると推測した。一方、これまでに、NO は paracellular route に対して吸収促進効果を有することが報告されており、本検討では促進効果の可逆性を利用して、NO 供与体前処理条件で検討している。しかし、NO による吸収促進効果は、NO 供与体除去により著しく低下するものの、効果が消失してはいないため、paracellular route への影響も考慮する必要があると考えられる。

そこで、NO が受動拡散に対して膜透過性亢進効果を有することを明確にし、

その効果に対する非攪拌水層の関与を検証する。

まず、paracellular route のモデル薬物として FD-4 を選択し、FD-4 の膜透過性に対する NOC7 及び DTT 前処理による影響を、*in vitro* sac 法により検討した。

ラット十二指腸部における FD-4 の膜透過性に対し、NOC7 前処理 (5 mM、30 min) 及び非攪拌水層除去剤 (粘液除去剤) である dithiothreitol (DTT) 前処理 (10、20 mM、10 min) による影響は認められなかった (Fig. 16)。この結果から、本検討で用いた NOC7 及び DTT 前処理条件では、paracellular route に対して影響を与えないことが示唆された。

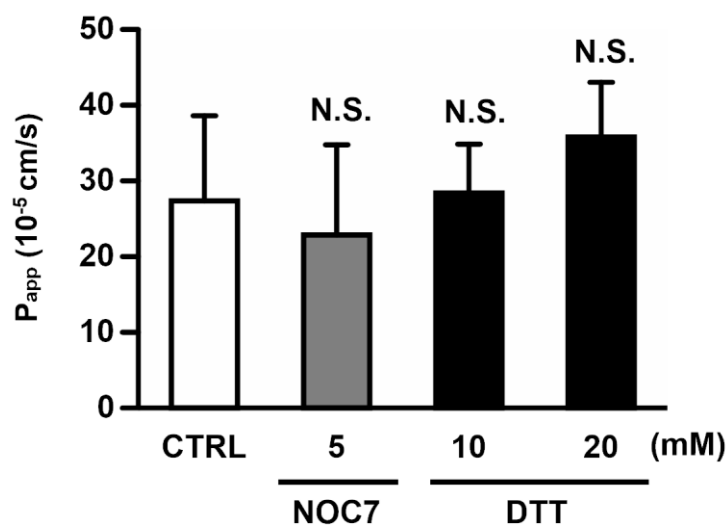


Fig. 16 Effects of NOC7 or DTT on the membrane permeation of FD-4 in rat duodenum. Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 5–6). N.S.: not significant.

次に、transcellular route のモデル薬物として griseofulvin を選択し、非攪拌水層除去剤である DTT の濃度依存性について検討した。

ラット十二指腸部に対して、DTT (10 mM 及び 20 mM) 前処理により、griseofulvin の膜透過性は有意に上昇したが、検討した濃度である 10 mM と 20 mM の間には有意な差は認められなかった (Fig. 17)。以上の結果より、DTT 前処理によって griseofulvin の膜透過性が上昇したことから、griseofulvin の膜透過性に対して非攪拌水層の関与が認められ、非攪拌水層の除去により難溶解性脂溶性薬物の膜透過性が上昇することが示された。また、ラット十二指腸部に対する DTT の非攪拌水層除去効果は、10 mM 処理で十分であることが示された。

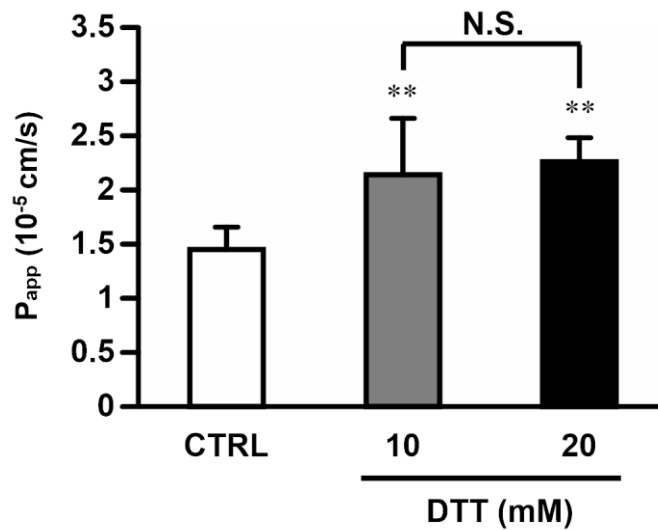


Fig. 17 Effects of NOC7 or DTT on the membrane permeation of griseofulvin in rat duodenum. Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 3–10). ** P < 0.01 compared with control condition. N.S.: not significant.

続いて NO が非攪拌水層に対して影響を及ぼしているか否かについて検証するために、griseofulvin の膜透過性に対する NOC7 (5 mM) と DTT (10 mM) の併用前処理による影響を検討した。なお、検討は非前処理群 (CTRL 群)、NOC7 又は DTT 単独前処理群、及び DTT・NOC7 併用前処理 (DTT を 10 min 処理に続き NOC7 を 30 min 処理した) の 4 条件で行った。

ラット十二指腸部における griseofulvin の膜透過量及び膜透過係数 (P_{app}) は、NOC7 又は DTT 単独前処理により、CTRL 群に比較して有意に上昇し、その変化の程度は同等であった (Fig. 18a, b)。一方で、DTT・NOC7 併用前処理においては、それぞれの単独前処理時と比較して、わずかな上昇傾向が認められるものの有意な差は無く、併用前処理による相加効果は認められなかった (Fig. 18b)。

以上の結果より、DTT が非攪拌水層を除去することにより griseofulvin の膜透過性を亢進したことから、NO と DTT の作用点が共に非攪拌水層であることが示唆された。したがって、NO は非攪拌水層に対して影響を与えることで、ラット十二指腸部における griseofulvin の膜透過性を上昇させたことが示唆された。

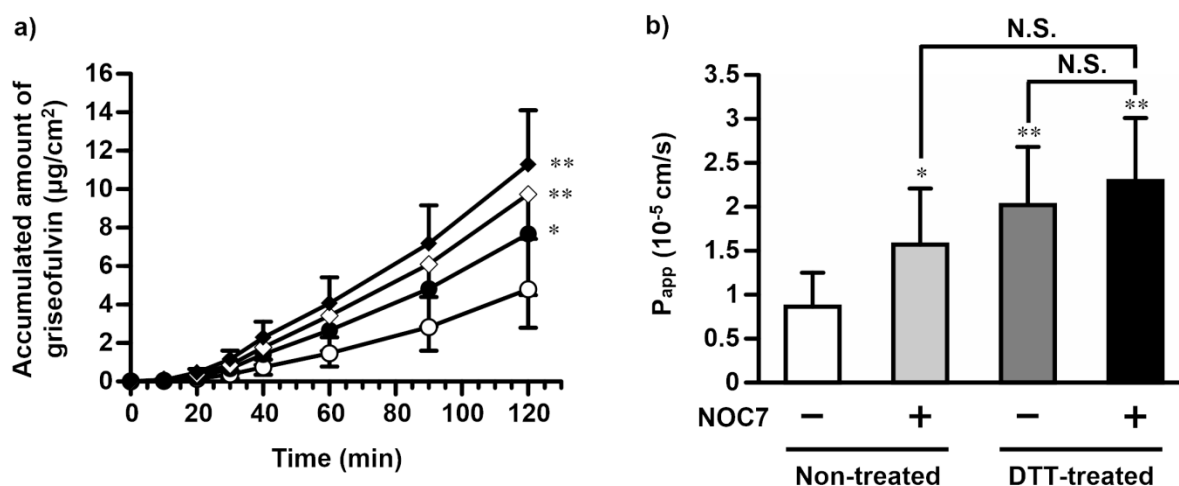


Fig. 18 Effects of NOC7 or DTT on the apparent permeability coefficients (P_{app}) of griseofulvin in rat duodenum. Key: (○) control (non-treated); (●) NOC7 5 mM (pretreated for 30 min); (□) DTT 10 mM (pretreated for 10 min); (■) NOC7 5 mM (pretreated for 30 min) after DTT 10 mM (pretreated for 10 min). Results are presented as the mean \pm S.D. ($n = 6-14$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control condition, N.S.: not significant.

さらに、NOC7の効果とDTTの効果について、両者の腸管部位特異性を比較するために、腸管各部位（十二指腸部、空腸部、回腸部及び結腸部）を用いた *in vitro* sac 法により、griseofulvinの膜透過性に対するDTTの効果を検討した。なおDTTの検討濃度として10 mMを選択し、10 minの前処理条件にて検討した。

DTT前処理によりgriseofulvinの膜透過性は、十二指腸及び空腸部で有意に上昇したのに対し、回腸及び結腸部では変化は認められなかった（Table 3）。以上より、空腸部に対する効果には差があるものの、NOC7とDTT共に腸管上部ほど影響が顕著であることが示された。

難溶解性脂溶性薬物は、その大半が上部腸管において吸収されるが、水溶性薬物は下部腸管でも吸収が継続していると報告されている⁷⁴⁾。また非攪拌水層は、その厚みが腸管部位によって異なることが知られており、柔毛構造が豊富な上部腸管では厚く、下部腸管では比較的薄いことが報告されている⁷⁵⁻⁷⁸⁾。本検討で得られたNO及びDTTによる作用の部位特異性の結果を支持していると考えられた。

したがって、DTTが非攪拌水層除去能を有することに加えて、効果の腸管部位特異性が認められ、さらにその傾向がNOによる効果と同様に、腸管上部で特異的であることから、NOが非攪拌水層を標的とする考察をさらに支持する結果が得られたといえる。

Table 3 Effect of DTT on the AUC₀₋₁₂₀ and P_{app} of griseofulvin.

		AUC ₀₋₁₂₀		P _{app}	
		µg·min/mL	Ratio	10 ⁻⁵ cm/s	Ratio
Duodenum	CTRL	2.16 ± 1.08	-	0.78 ± 0.29	-
	DTT 10 mM	4.96 ± 1.18 ***	2.3	2.02 ± 0.66 ***	2.6
Jejunum	CTRL	8.11 ± 1.62	-	3.52 ± 0.76	-
	DTT 10 mM	11.70 ± 2.90 *	1.4	4.96 ± 1.46 *	1.4
Ileum	CTRL	11.80 ± 2.20	-	5.08 ± 1.10	-
	DTT 10 mM	13.16 ± 2.20	1.1	5.77 ± 1.12	1.1
Colon	CTRL	6.18 ± 0.71	-	2.77 ± 0.30	-
	DTT 10 mM	6.88 ± 0.85	1.1	3.06 ± 0.51	1.1

Results are presented as the mean ± S.D. (n = 5–15). **P* < 0.05, ****P* < 0.001 compared with control condition. Ratio: Ratio: fold increase in the value in the pretreated condition compared with that in control condition.

非攪拌水層の主要な構成タンパク質は、ムコ多糖タンパク質の mucin であることが知られている^{48, 49)}。ヒトでは約 20 種類がこれまでに同定されており、消化管においては、腺細胞などが産生する分泌型 mucin (MUC2, 5AC, 5B, 6) と、疎水性の膜貫通部位を持ち細胞膜に結合した状態で、主に上皮細胞に存在する膜結合型 mucin (MUC1, 3A, 3B, 4, 12, 17) が存在する⁵⁰⁾。特に、MUC2, 5AC, 6 等の分泌型 mucin は、消化管粘膜表面においてゲル状の網目構造を形成することで、生体外異物に対するバリアシステムとして機能すると考えられており、薬物吸収への関与も報告されている^{50, 54, 73)}。さらに、MUC 遺伝子の発現量は消化管部位に特異的であることも報告されている⁷⁸⁾。非攪拌水層除去剤である DTT は、ジスルフィド結合を還元することにより mucin を含む粘液を除去することが可能であるが、mucin 分子の発現部位差に起因して、その効果に腸管部位特異性が認められた可能性が考えられた。

一方、NO は可溶性 guanylate cyclase や NF-κB 等の細胞内タンパク質と直接的に相互作用する事が知られており、細胞外タンパク質に対する反応性を有している可能性も考えられる。DTT による効果と NO の効果に同様の傾向が認められたことから、NO が腸管においてバリアー機能を担う分泌型 mucin を分子標的とし、非攪拌水層の厚さ又は流動性に対して影響を与える可能性は十分に考えられる。しかし、今回の検討では NO の非攪拌水層に対する作用の分子機構の解明までには至らなかった。DTT はタンパク質のジスルフィド結合を還元する非常に強い還元剤であるのに対し、NO は活性酸素の一種であり、酸化剤としての作用を有す

る。したがって、NO が非攪拌水層に対して影響することは、本検討で明らかとなったが、詳細な分子機構については異なることが予想された。NO と mucin との相互作用について明らかにするために、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

2-1-4 ラット十二指腸吸収に対する NO の影響

本節では、これまでに *in vitro* の評価系において認められた NO による膜透過性亢進効果が、ラット whole body を用いた *in situ* の評価系においても認められるか否かについて検証した。検討は *in situ* closed loop 法にて実施し、ラット十二指腸部に作成した腸管 loop に対して NOC7 (5 mM) を前処理後、腸管 loop へ投与した griseofulvin (20 μ M) 及び FD-4 (250 μ M) の吸収量(血漿中濃度推移及び AUC₀₋₆₀) を評価した。

ラット十二指腸部へ投与した griseofulvin の血漿中濃度及び AUC₀₋₆₀ は、NOC7 前処理により CTRL 群に比較して有意に上昇し、NOC7 前処理によって吸収量が増加したことが示された (Fig. 19a, Table 4)。また、投与後初期 (2.5 min 後) における griseofulvin の血漿中濃度が、NOC7 前処理により有意に上昇したことから、吸収量の増大だけでなく、吸収速度も上昇したことが示された (Table 4)。一方、FD-4 の血漿中濃度については、NOC7 前処理による影響は認められなかった (Fig. 19b)。

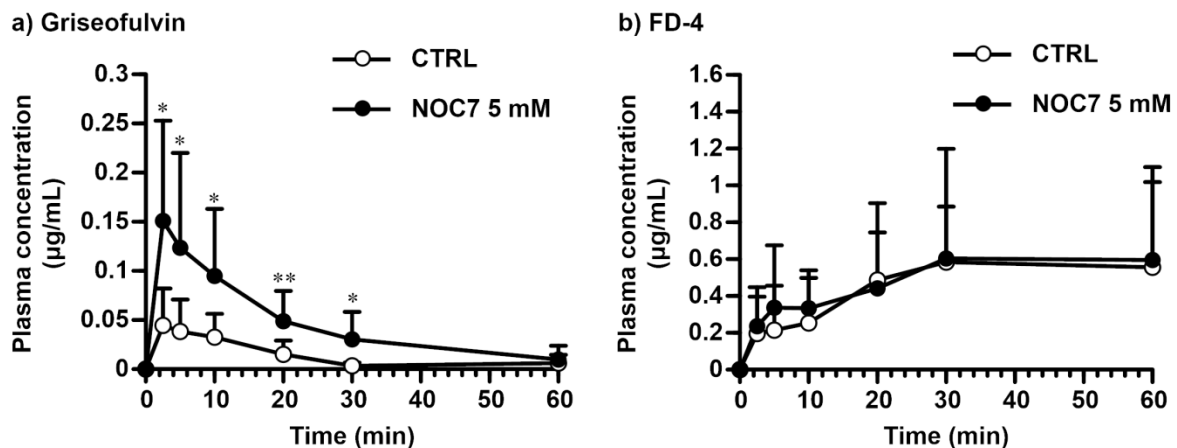


Fig. 19 Effect of NOC7 on the plasma concentrations of (a) griseofulvin and (b) FD-4 after administration to the rat duodenal loop. Keys: (○) control (non-treated); (●) NOC7 5 mM (pretreatment for 30 min). Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 8-14). * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control rats.

Table 4 Pharmacokinetic parameters in the duodenal absorption of griseofulvin

	AUC ₀₋₆₀ (μg·min/ml)	C _{2.5 min} (μg/mL)
CTRL	0.80 ± 0.32	0.04 ± 0.03
NOC7 5 mM	2.79 ± 1.68 **	0.15 ± 0.10 **

Results are presented as the mean ± S.D. (n = 8–13). ***P* < 0.01 compared with control condition.

以上より、NOC7 前処理条件においては、NO は paracellular route に対して影響を与えることなく、griseofulvin の吸収量及び吸収速度を上昇させる効果を有することが示唆され、*in vitro* 評価系で得られた知見と一致する結果となった。したがって、NO は paracellular route だけでなく、transcellular route を介した受動拡散による薬物吸収に対しても、吸収促進効果を有することが明らかとなった。

2-1-5 難溶解性脂溶性薬物の膜透過性に対する SNP 前処理による影響

NOC7 と同様に、SNP 前処理による影響を検討した。難溶解性脂溶性薬物のモデル薬物として griseofulvin を選択し、ラット十二指腸を用いた *in vitro* sac 法により吸収量の変化を評価した。なお、SNP は先の検討において粘膜に対する障害性が低く、同時併用による膜透過亢進作用が高い 3 mM の条件のみを採用し、NO の放出半減期が十数分であることから、前処理時間を 60 min に設定した。

ラット十二指腸部における griseofulvin の膜透過係数 (P_{app}) は、NOC7 又は SNP 前処理により、CTRL 群に比較して有意に上昇した (Fig. 20)。

以上より、SNP についても、NOC7 と同様に受動拡散による薬物吸収に対して促進効果を有することが明らかとなった。さらに、SNP 前処理条件で検討した結果から、paracellular route を介した薬物吸収に対する促進効果には可逆性が認められたが、transcellular route に対する促進効果に可逆性は認められず、本検討で行った条件においては持続的な効果であることが示された。

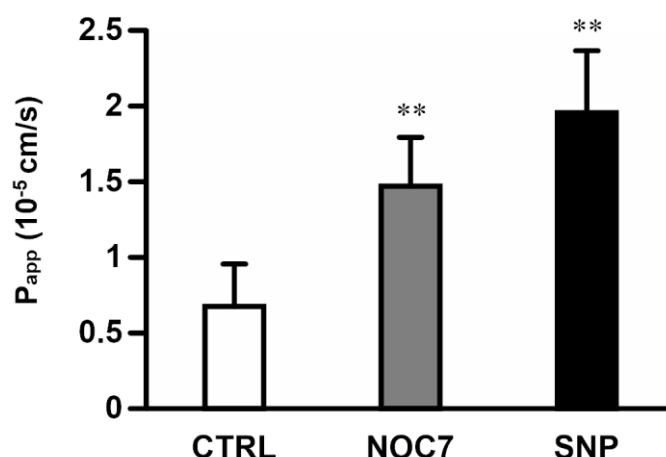


Fig. 20 Effects of NOC7 5 mM (pretreatment for 30 min) or SNP 3 mM (pretreatment for 60 min) on the membrane permeation of griseofulvin in rat duodenum. Results are presented as the mean \pm S.D. (n = 4–13). ** P < 0.01 compared with control condition.

2-1-6 小括

本節では、griseofulvin の腸管膜透過性に対する NO 供与体処理の影響及び腸管部位特異性を検討したところ、NO が難溶解性脂溶性薬物の膜透過性に対して影響を与える可能性が示され、その効果は十二指腸部で特異的であることが示された。また、NO の膜透過性亢進作用に対する薬物物性（脂溶性）の関与を明らかにするため、脂溶性の異なる 3 種の薬物（theophylline、antipyrine、diclofenac）に対して NO の効果を検討した。NOC7 前処理による膜透過性の変化率は、griseofulvin > diclofenac > antipyrine > theophylline となり、log P の大小関係と相関した結果となった。したがってこの結果から、脂溶性が高い薬物ほど NO による膜透過性亢進作用を受け易いことが示唆された。

さらに、NO が受動拡散に対して膜透過性亢進効果を有することを明確にし、その効果に対する非攪拌水層の関与を検証した。まず、paracellular route のモデル薬物である FD-4 の膜透過性に対し、NOC7 及び DTT 前処理による影響を検討したところ、変化は認められず、paracellular route に対して影響を与えないことが示唆された。次に、griseofulvin の膜透過性に対する NOC7 と DTT の併用前処理による影響を検討したところ、それぞれの単独前処理時において認められた膜透過性の上昇の程度に比較してわずかな上昇傾向が認められるものの、併用前処理による相加効果は認められなかった。したがって、DTT が非攪拌水層除去能を有することから、NO と DTT の作用点が共に非攪拌水層であることが示唆された。さらに、griseofulvin の膜透過性に対する DTT の腸管部位特異性を検討したところ、

十二指腸及び空腸部で効果を示したのに対し、回腸及び結腸部では影響が認められなかった。したがって以上より、DTT が非攪拌水層除去能を有することに加えて、効果の腸管部位特異性が認められ、さらにその傾向が NO による効果と同様に、腸管上部で特異的であることから、NO が非攪拌水層を標的とする考察をさらに支持する結果が得られた。

ラット whole body を用いた *in situ* の評価系において、griseofulvin 及び FD-4 の十二指腸吸収に対する NO の効果を検証したところ、NO は paracellular route に対して影響を与えることなく、griseofulvin の吸収量及び吸収速度を上昇させる効果を有することが示され、*in vitro* 評価系で得られた知見と一致する結果となった。したがって、NO は paracellular route だけでなく、transcellular route を介した受動拡散による薬物吸収に対しても、吸収促進効果を有することが示された。

難溶解性脂溶性薬物の膜透過性に対して、SNP 前処理による影響を *in vitro* 評価系にて検討したところ、SNP についても、NOC7 と同様に受動拡散による薬物吸収に対して促進効果を有することが明らかとなり、SNP による効果は NO に由来することが示された。さらに、transcellular route に対する促進効果は、本検討で行った条件においては持続的な効果であることが示され、可逆性は認められなかった。

以上の結果から、本章では、NO が非攪拌水層に対して影響を与えることによって、transcellular route を介した難溶解性脂溶性薬物の膜透過性を増大させることが示唆された。また、非攪拌水層の透過性を制御することで部位特異的な吸収促進効果が望めるという新たな知見を見出すことができた。

このように本検討で得られた知見は、非攪拌水層の拡散律速により腸管粘膜透過性が制限されている難溶解性脂溶性薬物に対し、その粘膜透過性を向上させることができる新規の吸収促進コンセプトとして非常に重要な情報を提供すると共に、吸収促進技術の発展及び有用性拡大に有益な情報となると考えられた。しかし、NO による非攪拌水層に対する作用の詳細な分子機構については未だ未解明であるため、さらなる検討が必要である。

第2節 P-glycoprotein (P-gp) に対する NO 供与体の影響

P-glycoprotein (P-gp) は、ABC (ATP-binding cassette) スーパーファミリーに属し、ATP の加水分解エネルギーを駆動力とする薬剤排出ランスポーターである。P-gp は脳、肝臓、腎臓、消化管など様々な臓器に発現し、抗腫瘍薬のみならず、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤であるシクロスポリンやタクロリムス、さらにカルシウム拮抗薬であるベラパミル、心不全治療薬であるジゴキシンも輸送するなど、基質認識性が極めて広範であることから、薬物の体内動態において非常に重要な役割を持つ。特に消化管において P-gp は、腸管上皮細胞刷子縁膜上に局在し、細胞内に取り込まれた薬物を管腔側へと排泄する役割を担っているため、薬物の経口バイオアベイラビリティ (BA) を支配する因子として重要性は極めて高い。最近の研究では、P-gp 等の排出型ランスポーターを阻害する物質が多く見出され、それらを製剤添加剤として用いることで、難吸収性薬物の経口吸収改善策とする試みがなされている⁶⁰⁻⁶³⁾。

一方、P-gp は様々な病態時に、その機能や発現量に変動することが報告されている。内因性の NO の生理的役割については前述したが、炎症サイトカインや細菌毒素等の刺激によって、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を介して一時的に大量産生される NO は、炎症反応や免疫反応などの生体防御反応を担うと同時に、生体に対して障害因子として作用することが知られている。特に、虚血再灌流障害などの病態時において誘導される NO に起因して、小腸粘膜上皮細胞上の P-gp の活性低下だけでなく発現量及び細胞内局在が変動することが報告されている⁷⁹⁻⁸⁵⁾。しかし、腸管 P-gp に対する外因性 NO の影響は十分に検討がなされていないのが現状である。

以上の背景のもと、本章では、代表的な ABC トランスポーターである P-gp に着目し、本研究で用いた NO 供与体である SNP が腸管 P-gp に対して影響を及ぼす可能性を検討した。

2-2-1 P-gp 機能に対する SNP の影響

本節では、腸管 P-gp の輸送活性に対する SNP の影響を検討するために、P-gp の基質として rhodamine 123 (Rho123, 5.7 $\mu\text{g/kg}$) を選択し、SNP 併用時における Rho123 の膜透過性を評価することで、P-gp 機能への影響を評価した。なお、Rho123 の膜透過性の評価は、ラット回腸部を用いた *in situ* closed loop 法（吸収方向）及び *in situ* single pass perfusion 法（腸管管腔側への排泄方向）にて行った。また、P-gp 阻害剤として verapamil を用いて、阻害剤存在下・非存在下における Rho123 の吸収量及び排泄量の変化から P-gp の相対活性を算出し、P-gp 機能を定量的に評価した。

まず、*in situ* closed loop 法により SNP 併用時における Rho123 の吸収量変化を検討した。吸収量の変化は、ラット回腸 loop 内へ Rho123 を投与し、投与直後からの Rho123 の血漿中濃度推移より AUC_{0-120} を算出することで評価した。また、verapamil 添加による P-gp 阻害条件下でも同様の検討を行い、P-gp 阻害時においても、Rho123 の吸収量に対する SNP の影響を評価した (Fig. 21)。

阻害剤非存在下における Rho123 の AUC_{0-120} は、SNP の投与量依存的に増加傾向を示し、SNP 10 mg/kg 投与時は有意に増加した。

また、P-gp 阻害条件下における Rho123 の AUC_{0-120} は、SNP の投与量依存的に増加し、その増加の程度は P-gp 阻害時・非阻害時に関わらず、SNP 1 mg/kg 投与時は約 1.5 倍、SNP 10 mg/kg 投与時は約 2.4 倍となった。

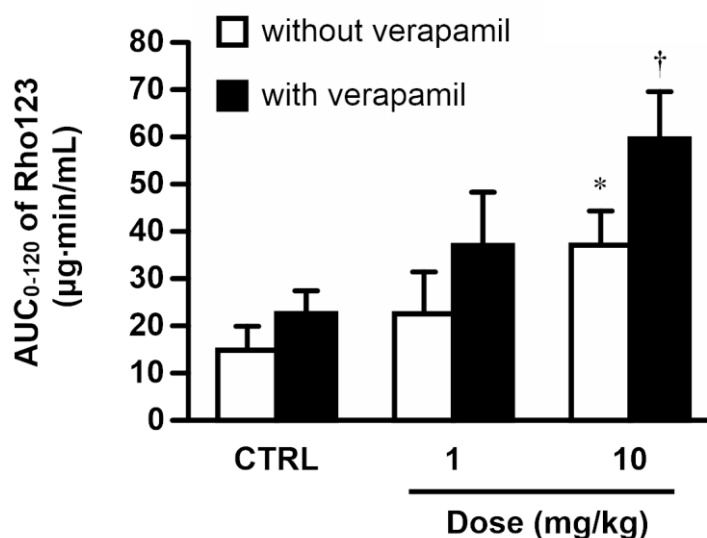


Fig. 21 Effect of SNP on $\text{AUC}_{0\rightarrow 120}$ of Rho123 after administration to the ileal loop. Results are presented as the mean \pm S.E. ($n = 8-9$). * $P < 0.05$, † $P < 0.05$ compared with control condition.

次に、*in situ* single pass perfusion法により SNP作用時における Rho123の腸管腔内への排泄量変化を検討した。排泄量の変化は、ラット回腸loopにSNPを作用させ、Rho123静脈内投与後のラット回腸管腔側への排泄量から、回腸への排泄クリアランス (CL_{ileum}) を算出することで評価した。また、回腸loop内への verapamil添加による P-gp阻害条件下でも同様の検討を行い、P-gp阻害時においても、Rho123の排泄クリアランスに対するSNPの影響を評価した (Fig. 22)。

Rho123 静脈内投与後の回腸管腔側への排泄クリアランス CL_{ileum} は、SNP の投与量依存的に有意な上昇を認めた。また、P-gp 阻害条件下における Rho123 の CL_{ileum} は、SNP の投与量依存的に上昇が認められ、その上昇の程度は P-gp 阻害時・非阻害時に関わらず、SNP 1 mg/kg 投与時は約 1.7 倍、SNP 10 mg/kg 投与時は約 2.3 倍となることが示された。

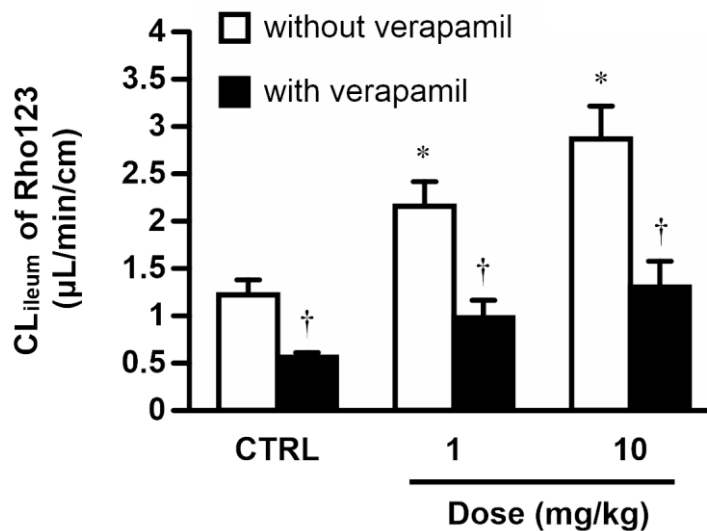


Fig. 22 Effect of SNP on CL_{ileum} of Rho123 after i.v. administration. Results are presented as the mean \pm S.E. ($n = 6-7$). * $P < 0.05$ compared with control condition (without verapamil). † $P < 0.05$ compared with control condition (with verapamil).

以上の Fig. 21 及び Fig 22 で得られた結果を用いて、P-gp の相対活性値⁷⁹⁾を算出し、P-gp 機能を定量的に評価した (Table 5)。SNP 投与条件下における P-gp の相対活性値は、吸収方向及び排泄方向ともに SNP 投与による変化は無く、この結果から、SNP は P-gp 機能に対して影響を及ぼさないことが示された。したがって、SNP 投与による Rho123 の膜透過亢進作用は P-gp 非依存的であり、P-gp 以外の要因が関与していることが示唆された。

Table 5 Relative activity of ileal P-gp

	Relative activity of Ileal P-glycoprotein	
	Absorption (M to S)* ¹	Excretion (S to M)* ²
CTRL	0.39	1.17
SNP 1 mg/kg	0.39	1.20
SNP 10 mg/kg	0.38	1.20

*1 Relative activities of P-gp (absorption: M to S) = $(AUC_{app} - AUC_{pass}) / (AUC_{pass})$

AUC_{pass} : AUC of Rho123 with verapamil

AUC_{app} : AUC of Rho123 without verapamil

*2 Relative activities of P-gp (excretion: S to M) = $(P_{app} - P_{pass}) / (P_{pass})$

P_{pass} : Ileal excretion clearance of Rho123 with verapamil

P_{app} : Ileal excretion clearance of Rho123 without verapamil

Rho123 は P-gp 基質として広範に用いられているが、その腸管膜透過性については様々な見解がある。一般的には、transcellular route (受動拡散) を介して細胞外から細胞内に取り込まれた後に、P-gp によって細胞外へと汲み出されるが、その一方で、Rho123 が paracellular route を主な膜透過経路とする報告があることから^{86, 87)}、Rho123 の腸管膜透過機構は主に transcellular route を介し、一部 paracellular route が関与していると考えるのが妥当である。いずれにせよ、SNP は Rho123 の膜透過経路に対して影響を及ぼし、膜透過性を亢進させるが、その効果は P-gp 非依存的であることが明らかとなった。

これまでに腸管上皮細胞において、NO が細胞膜の流動性を促進させるという報告がある⁸⁸⁾。このことから、SNP 投与により放出された NO 或は SNP 自体が上皮細胞膜の流動性を変化させ、Rho123 の膜透過性を変化させた可能性が考えられる。しかしながら、本検討だけでは SNP がどのような影響を与えたかを明らかにするには十分でなく、更なる検討が必要であると考えられる。

2-2-2 SNP 前処理時における吸収促進効果の有無

本節では、前節で認められたRho123に対するSNPの膜透過性亢進作用が、SNP前処理条件下においても示されるか否かについて検証するために、SNP併用時に加えて120分間のSNP作用後におけるRho123の吸収量変化を*in situ* closed loop法にて検討した。

SNP併用時におけるRho123のAUC₀₋₆₀は、SNPの投与量依存的に増加したが（Fig. 23a）、SNP前処理後から行った吸収実験により得られたRho123のAUC₁₂₀₋₁₈₀は、わずかな増加傾向を示したが有意な変化は認められず、併用時に比較して急激に低下した（Fig. 23b）。このことから、Rho123に対するSNPの吸収促進作用も可逆性を有することが認められた。

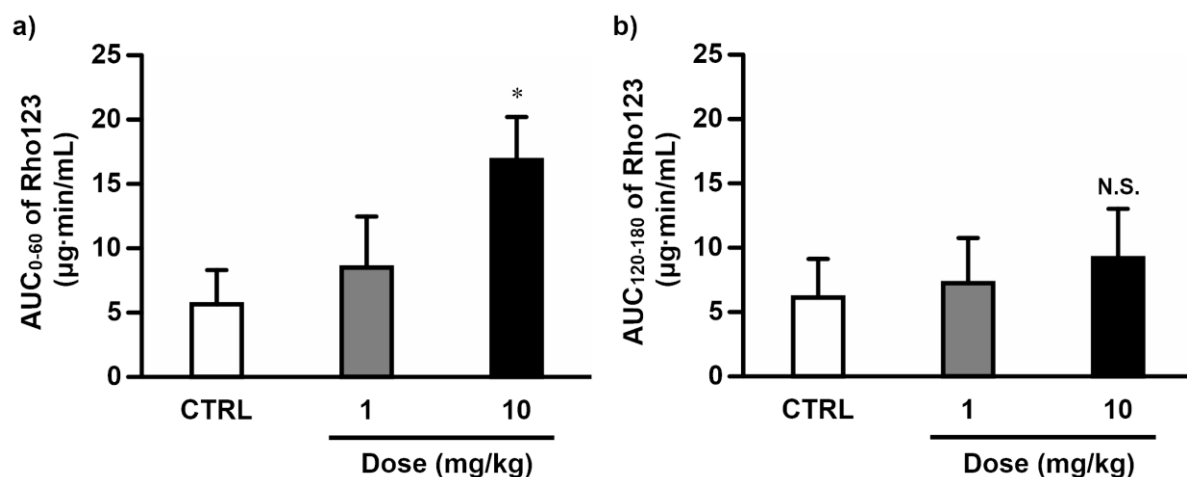


Fig. 23 Effect of SNP on AUC₀₋₆₀ and AUC₁₂₀₋₁₈₀ of Rho123 upon removal of SNP 120 min after administration. Results are presented as the mean \pm S.E. (n = 5–8). * P < 0.05 compared with control condition. N.S.: not significant.

2-2-3 小括

本節では、腸管 P-gp の輸送活性に対する SNP の影響を検討するために、SNP 併用時における Rho123 の膜透過性を評価したところ、SNP は P-gp 機能に対して影響を及ぼさないことが示され、P-gp 非依存的に Rho123 に対して膜透過亢進作用を有することが示された。また、SNP による吸収促進作用は可逆的であることが示された。

総括

医薬品開発の観点から難吸収性薬物の腸管吸収の改善は古くからの重要な研究課題とされてきた。これまでの取り組みの中で、その改善方法の一つとして、薬物の消化管粘膜透過性を上昇させる吸収促進剤の利用がある。しかし、吸収促進剤の多くは細胞膜障害性が高く、不可逆的な消化管膜の機能障害を惹起するため、臨床応用された例はごくわずかに限られる。しかし近年、有効濃度域において粘膜障害性が低く、さらに従来の吸収促進剤に比べて部位特異性の低い、一酸化窒素 (NO) 供与体を吸収促進剤として利用する試みが注目を集めている。これまでに NO 供与体と水溶性高分子化合物やペプチド性医薬品などを併用投与することで、腸管からの吸収率が増大することが報告されている。この NO による吸収促進効果は、消化管上皮細胞の密着結合 (tight junction) 開口を介した細胞間隙経路 (paracellular route) の透過性の上昇と考えられ、主に難吸収性水溶性薬物の膜透過性改善に対しての効果と応用が期待されている。しかし、詳細な吸収促進機構は未だ明らかにされておらず、実用化に至っていない。また、NO による吸収促進に関する研究は、paracellular route を介した薬物吸収においてのみ展開されてきている一方、細胞内経路 (transcellular route) を介した薬物吸収への影響は検討されていないのが現状である。

そこで本研究では、paracellular route 及び transcellular route の両腸管粘膜透過経路に対する NO の吸収促進効果について検討を行い、NO の吸収促進剤として有用性拡大の可能性を検討した。

第1章: Paracellular route に対する NO の吸収促進効果について検討を行うため、NO 供与体として sodium nitroprusside (SNP) を選択し、難吸収性水溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす SNP の影響を評価した。

まず、SNP の吸収促進効果を検討する前段階として、SNP が腸管粘膜に及ぼす影響について、ラットを用いて生化学的及び組織学的な検討を行った。腸管 loop 内へ投与された SNP は、用量依存的に NO を放出することが示され、構造類似物質である SFC 投与群との比較により、検出された NO は SNP に由来することが示された。SNP は 1 mg/kg 及び 10 mg/kg の用量では有意な粘膜障害性が認められなかったが、100 mg/kg の高用量において、粘膜中の総タンパク含量の有意な減少は無いものの、粘膜構造の変化及びリン脂質の脱落増加を伴う粘膜障害が示された。

次に、SNP による吸収促進効果を明らかにするため、SNP 併用時における薬物の吸収量変化を検討した。FD-4 及び 5-CF の吸収は、SNP 併用によって増大することが示された。この効果は、吸収促進効果があると報告されている NOC12 併用時においても FD-4 の吸収促進効果が同様に観察され、さらに構造類似物質で

ある SFC 投与群との比較により、NO を介した paracellular route の透過性亢進に起因すると考えられた。また、Western blotting によるタンパク質発現量解析の結果、NO の効果は tight junction 構成タンパク質の直接的な発現低下によるものではないことが示された。

一方で、SNP 除去後は細胞膜電気抵抗に影響がなく、吸収促進効果が速やかに減弱することが示され、SNP による吸収促進作用は可逆的かつ短期的な作用であることが示唆された。以上より、SNP の可逆的な吸収促進作用は安全性が高く、吸収促進剤として有用性が高いと考えられた。

第2章：Transcellular route を介した薬物吸収に対する NO の影響を明らかにするために、難溶解性脂溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす NO の影響を検討した。特に、受動拡散及び排出型トランスポーターに対する影響に焦点を置きながら、吸収促進剤として有用性拡大の可能性を検討した。

まず、NO 供与体として NOC7 を、transcellular route のモデル薬物として脂溶性及び膜透過性が高い griseofulvin を選択し、*in vitro* の評価系を用いて難溶解性脂溶性薬物の腸管膜透過性に対する NO 供与体処理の影響を検討した。Griseofulvin の膜透過性に対する NO の影響は、十二指腸部で特異的であることが示され、paracellular route に対する作用機序と transcellular route に対する作用機序が異なることが示唆された。続いて、十二指腸部を用いて脂溶性の異なる各種化合物に対する NO の効果を検討したところ、脂溶性が高い薬物ほど NO による膜透過性亢進作用を受け易いことが示唆された（膜透過性の変化率：griseofulvin > diclofenac > antipyrine > theophylline）。このように、脂溶性の大きさに応じて効果が強くなることから、NO は transcellular route を介した受動拡散による腸管膜透過を制御する何らかの因子に対して影響を及ぼしていることが示唆された。

一方、paracellular route のモデル薬物である FD-4 の膜透過性に対し、NOC7 前処理による影響は認められず、paracellular route に対して影響を与えないことが示唆された。さらに、非攪拌水層除去剤である DTT 単独前処理により、griseofulvin の膜透過性は NOC7 単独前処理時と同程度上昇したのに対し、NOC7 と DTT の併用前処理時においては、併用による相加効果は認められなかった。DTT による効果も、NO による効果と同様に腸管上部で特異的である傾向を示し、DTT が非攪拌水層除去能を有することから、NO と DTT の作用点が共に非攪拌水層であることが示唆された。

また、griseofulvin 及び FD-4 の十二指腸吸収に対する NOC7 前処理による効果は、ラット whole body を用いた *in situ* の評価系においても同様に認められ、NO は transcellular route を介した受動拡散による薬物吸収に対しても、吸収促進効果を有することが示された。これらの吸収促進効果は、SNP 前処理でも認められ、NOC7 と同様に受動拡散による薬物吸収に対して促進効果を有することが明らか

となった。さらに、transcellular route に対する促進効果は、本検討で行った条件においては持続的な効果であることが示され、可逆性は認められなかった。

以上の結果から、NO は非攪拌水層に対して影響を与えることによって、transcellular route を介した難溶解性脂溶性薬物の膜透過性を増大させることが示唆された。また、非攪拌水層の透過性を制御することで部位特異的な吸収促進効果が望めるという新たな知見を見出すことができた。

一方、排出型トランスポーターに対しては、腸管 P-glycoprotein (P-gp) の輸送活性に対する SNP の影響を検討した。P-gp 基質である Rho123 の膜透過性に対する SNP 併用の影響を評価したところ、P-gp 非依存的に膜透過亢進作用を有することが示されたことから、SNP は P-gp 機能に対して影響を及ぼさないことが示された。

以上、本研究では難吸収性水溶性薬物の腸管粘膜透過に対して、SNP が吸収促進効果を示し、その効果は NO に起因する paracellular route の透過性亢進であることが明らかとなった。さらに、その効果は可逆的かつ短期的な作用であることが示されたことから、吸収促進剤としての実用化の可能性を示した。また、NO は paracellular route だけでなく、transcellular route による薬物吸収に対しても吸収促進効果を有することが明らかとなった。特に、非攪拌水層の拡散律速により腸管粘膜透過性が制限されている難溶解性脂溶性薬物に対し、その粘膜透過性を向上させることができる新規の吸収促進作用を見出した。以上、本検討で得られた成果は、新規吸収促進技術の発展及び有用性拡大に有益な情報となると考えられ、今後、新薬開発における経口投与製剤開発の可能性をさらに拡大させるものと期待される。

実験の部

1. 実験材料

- 1-1. 実験動物
- 1-2. 使用器具・試薬
- 1-3. 使用機器

2. 緩衝液 (buffer) の組成と調製法

3. *In situ* 実験方法

3-1. *In situ* closed loop 法を用いた吸収実験

- 3-1-1. 腸管 loop の作製
- 3-1-2. 吸収実験
- 3-1-3. 血中濃度時間曲線下面積 (AUC) の算出

3-2. *In situ* single pass perfusion 法

- 3-2-1. 実験方法
- 3-2-2. 排泄実験
- 3-2-3. 腸管 P-glycoprotein (P-gp) 機能評価
- 3-2-4. Rhodamine123 の血中濃度推移解析

4. *In vitro* 実験方法

4-1. *In vitro* sac 法

- 4-1-1. 腸管 sac の作製
- 4-1-2. 膜透過実験
- 4-1-3. 膜透過係数 (P_{app}) の算出

4-2. 膜電位測定

- 4-2-1. 実験装置
- 4-2-2. 測定方法・膜抵抗値の算出

5. タンパク質発現量解析 (Western blot 法)

- 5-1. サンプル調整法・タンパク定量法
- 5-2. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)
- 5-3. Western blotting
- 5-4. 抗原抗体反応
- 5-5. 化学発光の検出

6. 組織切片実験法

6-1. 凍結切片の作成方法

6-2. Hematoxylin による核染色方法

7. 一酸化窒素量測定法（diaminonaphthalene 法）

7-1. 実験方法及び測定方法

8. リン脂質脱落量測定（コリンオキシダーゼ・DASO 法）

8-1. 実験方法及び測定方法

9. サンプルの調製法及び定量法

9-1. 高速液体クロマトグラフ法（HPLC）

9-1-1. HPLC サンプルの調製 HPLC 測定条件

9-1-2. HPLC 測定条件

9-2. 蛍光強度測定法

9-2-1. 蛍光物質サンプルの調製

9-2-2. 蛍光物質測定条件

10. 統計処理

1. 実験材料

1-1. 実験動物

本実験では、7~8 週齢の Wistar/ST 系雄性ラット（日本 SLC）及び 7~8 週齢の Wister 系雄性ラット（東京実験動物株式会社）を用いた。飼料と水は自由に与え、恒温（ $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）、恒湿（ $55 \pm 5\%$ ）、定時照明（12 時間明所 7:00 ~ 19:00、12 時間暗所 19:00 ~ 7:00）の人工環境下で飼育した。動物の飼育、実験操作は「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号）」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和 55 年 3 月 総理府公示第 6 号）」及び「東京薬科大学動物実験規程（平成 22 年 東京薬科大学学長）」に則って行った。

1-2. 使用器具・試薬

使用薬物

Sodium nitropurusside dihydrate	SIGMA
Sodium ferrocyanide decahydrate	WAKO
Dithiothreitol (DTT)	WAKO
NOC7	DOJINDO
NOC12	DOJINDO
Fluorescein isothiocyanate–dextran 4,000	SIGMA
Rhodamine123 (Rho123)	SIGMA
Verapamil hydrochloride	WAKO
5(6)-Carboxyfluorescein (5-CF)	SIGMA
Griseofulvin	WAKO
Antipyrine	SIGMA
Diclofenac	WAKO
Theophylline	WAKO

In situ 実験

Phosphoric acid (H_3PO_4)	WAKO
Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4)	WAKO
Sodium chloride (NaCl)	WAKO
D(+)-Glucose	WAKO
Calcium chloride, anhydrous (CaCl_2)	WAKO
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)	WAKO
Disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	WAKO
Sodium dehydrogenphosphate dehydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	WAKO
Somnopentyl® (pentobarbital)	共立製薬
L 字型ガラスカニューレ	尾崎理化
縫合針	IGARASHI
絹製縫合糸 (黒軟質 3 号)	シラカワ
三方活栓	TERUMO
テルモシリンジ(1 mL)	TERUMO
Heparin sodium	LifeTechnologies
テルモ注射針 ネオラス (23G)	TERUMO
テルモ注射針 ネオラス (26G)	TERUMO
シラスコン医療チューブ	KANEKA
ポリエチレンチューブ (SP10)	夏目製作所
ポリエチレンチューブ (SP45)	夏目製作所
スイトール	イシバシ
Fluoro nunc plate	NUNC

In vitro 実験

Phosphoric acid (H_3PO_4)	WAKO
Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4)	WAKO
D(+)-Glucose	WAKO
Sodium chloride (NaCl)	WAKO
Calcium chloride, anhydrous (CaCl_2)	WAKO

Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)	WAKO
Disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	WAKO
Sodium dehydrogenphosphate dehydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	WAKO
95% O_2 -5% CO_2 混合ガス	太陽日酸
Fluoro nunc plate	NUNC
L 字型ガラスカニューレ	尾崎理化
絹製縫合糸（黒軟質 3 号）	シラカワ
テルモシリンジ（10 mL）	TERUMO
テルモシリンジ（1 mL）	TERUMO
テルモ注射針 ネオラス（26G）	TERUMO
200 mL ビーカー	IWAKI
Somnopentyl® (pentobarbital)	共立製薬

Western blotting

Tris	WAKO
Glycine	WAKO
D-Mannitol	WAKO
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	WAKO
Methanol	WAKO
Tween 20	フナコシ
Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid (EGTA)	SIGMA
Phenylmethylsulfonyl fluoride	WAKO
Potassium chloride (KCl)	WAKO
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	WAKO
Sodium chloride (NaCl)	WAKO
Sodium hydrogen carbonate (Na_2HPO_4)	WAKO
Triton X-100	SIGMA
Pierce BCA protein assay kit	Thermo Scientific
Microwell plate	NUNC

Ready Gel J (5-15%)	BIO-RAD
ECL™ blocking agent	GE Healthcare
ECL™ prime western blotting detection reagent	GE Healthcare
Sample buffer (Laemmli 2×concentrate)	SIGMA
ハイブリバック	コスモバイオ
Absorbent paper	ATTO
Nitrocellulose membrane (0.45 μm 11.5×16 cm)	BIO-RAD
Anti-β-actin (c4)	コスモバイオ
Monoclonal antibody to P-glycoprotein (C219)	Alexis
Monoclonal antibody to Claudin (Claudin antibody sampler pack)	Invitrogen
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	GE Healthcare
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	GE Healthcare

組織切片実験法

4% Paraformaldehyde phosphate buffer solution	WAKO
Neg50 compound	TERUMO
O.T.C. compound	SAKURA
Microtome blade (C35)	FEATHER
Micro slide glass (MAS-GP)	MATSUNAMI
Micro cover glass (18×18 mm)	MATSUNAMI
Mayer's hematoxylin	LAB VISION
Xylene	WAKO
Entellan new	MERCK

一酸化窒素量測定法 (diaminonaphthalene 法)

2,3-Diaminonaphthalene	DOJINDO
1 mol/L Hydrochloric acid	WAKO

リン脂質脱落量測定 (コリンオキシダーゼ・DASO 法)

リン脂質 C-テストワコー	WAKO
---------------	------

Microwell plate

NUNC

HPLC 移動相

Acetonitrile (HPLC 用)

関東化学

Phosphoric acid (H_3PO_4)

WAKO

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

WAKO

Methanol

WAKO

その他の試薬は全て市販特級品を使用した。

1-3. 使用機器

名称	型式	メーカー
セミミクロ化学天秤	1601-MP-8	Sartorius
ミクロ化学天秤	4508-MP-8	Sartorius
ミクロ化学天秤	SE-2	Sartorius
上皿天びん	PB153-S	METTLER TOLEDO
pH メーター	HM-25R	DKK-TOA
分光光度計	UV-VISIBLE SPECTRO PHOTOMETER UV-2450	SHIMAZU
マルチスペクトロプレート リーダー	Varioskan TM Flash2.4 FP-6500	Thermo
恒温装置	THERMO MINDER Mini-80	TAITEC
恒温装置	THERMO MINDER 50	TAITEC
ハンディーマイクロ ホモジナイザー	NS-310E-III	MICROTEC
ヒスコトロン		日音医理化機械
ホモジナイザー	AM-3	NIHONSEIKI
遠心機	KN-70	KUBOTA
遠心機	Centrifuge 5415R	eppendorf
超遠心機	CP80-β	HITACHI
ローター(超遠心機用)	RP50T2-206	HITACHI
ディープフリーザー	ULTRALOW	SANYO
ディープフリーザー	CLN-30U	日本フリーザー
ペリスタリックポンプ	SJ-1211	ATTO
短絡電流測定装置	CEZ-9100	NIHON KOHDEN
サーモバス	CB-500TS	RIKO
クリオスタット	MICROM HM550	MICRO-EDGE
蛍光顕微鏡	Biozero BZ-8000	KEYENCE

HPLC システム

システムコントローラー	LC-Net II/ADC	日本分光
-------------	---------------	------

ポンプ	PU-2080 Plus	日本分光
カラムオーブン	CO-2060 Plus	日本分光
UV-VIS 検出器	MD-2010 Plus	日本分光
蛍光 検出器	FP-2025 Plus	日本分光
オートサンプラー	AS-2057 Plus	日本分光
HPLC column	5C ₁₈ -AR-II (4.6×150 mm)	Nacalai tesque
コントロールソフトウェア	ChromNAV Chromatography Data Station Ver.1.1A	日本分光

Western blotting 関連装置

ミニプロテイン Tetra セル		BIO-RAD
ミニトランスブロットセル		BIO-RAD
パワーサプライ	POWER-PAC300	BIO-RAD
振とう機	INCUPET SHAKER ISP-310	Iuchi
振とう機	Micro Mixer E-36	TAITEC
ルミノイメーリアナライザー	LAS-3000 plus	FUJIFILM

PCR 関連装置

サーマルサイクラー	GeneAmp 322/325	ASTEL
PCR 装置	GeneAmp9600	ABI
電気泳動装置	i-Mupid	ADVANCE
電気泳動装置	Mupid	TAKARA
リアルタイム PCR	PRISM7000	ABI

2. 緩衝液 (buffer) の組成と調製法

Modified-Krebs Henselite Bicarbonate Buffer

(KHB buffer)

	Final concentration
A solution	
KCl	5 mM
NaHCO ₃	3.5 mM
B solution	
Na ₂ HPO ₄	0.95 mM
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	4.85 mM
C solution	
CaCl ₂	1.4 mM
NaCl	126 mM
Glucose	2 g/L

A solution、B solution、C solution はあらかじめ 20 倍濃縮液を調製した。すべての試薬を同時に混合すると白色沈殿を生じるため、C solution 以外を精製水で適量に希釈し、95% O₂-5% CO₂ で 30 分間バブリングし、十分に酸素を飽和させた後、C solution を加え所定の体積にメスアップした。以上のように調製した Modified-KHB buffer を 1N HCl 及び 1N NaOH にて pH 6.5 に調整した。なお、C solution は *in vitro* 実験のみで用いた。

Homogenate buffer

Final concentration
Mannitol
60.0 mM
Tris
2.4 mM
EGTA
1.0 mM

Membrane buffer

Final concentration
Mannitol
300 mM
HEPES
20 mM
Tris
10 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O
5 mM

Running buffer

Final concentration
Tris
25 mM
Glycine
192 mM
SDS
0.1%

Transfer buffer	Final concentration
Tris	25 mM
Glycine	192 mM
Methanol	20%

PBS-T	Final concentration
10×PBS	1×
Tween 20	0.1%

3. *In situ* 実験方法

3-1. *in situ* closed loop 法（吸収実験）

3-1-1 腸管 loop の作製

In situ 吸収実験は、Doluisio 法を改良して行った。

前日より絶食させた 7~8 週齢 Wistar/ST 系雄性ラット又は 7~8 週齢の Wister 系雄性ラットを、Somnopentyl® (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて全身麻酔を施した。腹部正中線に沿って開腹し、開腹した線に沿って穴の開いたガーゼ（スイトール）を置き 37℃ に加温した生理食塩水を浸し、ラットの脇腹を押し当てガーゼに腸管を出した。胆管を結紮した後、腸管 loop 作製の始点（十二指腸は胃幽門部、回腸は盲腸上端より上方へ 12 cm）及び終点（十二指腸は Treitz ligament 上部、回腸は盲腸上端より 5 cm）に先曲がりピンセットを用いて腸と血管の間に縫合糸を通し、切り込みを入れ、L 字型ガラスカニューレを挿入し、縫合糸で腸管の上から 2 回結紮し固定した。始点のガラスカニューレより生理食塩水を噴射することにより腸管内を洗浄し、その後空気を噴射し腸管内に残存した生理食塩水を除去した。作製した loop の上に他の部位の腸管が重ならないように腸管を腹腔内に戻し、ガラスカニューレの口が腹腔外に出るように、必要に応じて縫合針と縫合糸を用いて開腹部を縫い合わせた。腸管 loop の始点及び終点のガラスカニューレに胴体部分に穴をあけた 10 mL のシリンジ又は三方活栓を取り付けた。

腸管 loop 作製後、頸静脈又は門脈より血管カニューレ（ポリエチレンチューブとシラスコンチューブを連結し、先端を鋭角にカットしたもの）を挿入した。血管カニューレはヘパリンを添加した生理食塩水で満たした。手術部の乾燥及び体温低下を防ぐために、生理食塩水で浸したスイトールガーゼとアルミホイルをかぶせ、その上から白熱灯ランプを照射した。

3-1-2. 吸収実験

同時投与の場合：KHB buffer (pH 6.5) で調製した各種薬液（NO 供与体として SNP：0.3、3 mM、NOC12：0.4、4 mM：又は NOC7：5 mM，膜透過基質として FD-4：250 µM、5-CF：250 µM，rhodamine123：5 µM 又は griseofulvin：20 µM）3 mL を腸管 loop に取り付けた三方活栓より投与し、投与後 0、2.5、5、10、20、30、60 分に 300 µL ずつ血管カニューレより血液をサンプリングした。血液サンプルは 12,000 rpm にて 10 分間遠心分離を行い、上清を分取することで血漿サンプルを得た。

プレ処置の場合：KHB buffer (pH 6.5) で調製した NOC7 溶液（5 mM）を腸管 loop に取り付けたシリンジより投与し、それぞれ 30 分間作用させた後に、薬液を取り除き、KHB buffer (pH 6.5) で washout した。シリンジを取り外し、三方活栓から loop 内に griseofulvin 及び FD-4 を投与し、投与後 0、2.5、5、10、20、30、60 分に 300 µL ずつ血管カニューレより血液をサンプリングした。血液サンプルは

12,000 rpm にて 10 分間遠心分離を行い、上清を分取することで血漿サンプルを得た。

3-1-3. 血中濃度時間曲線下面積（AUC）の算出

基質薬物の吸収量変化は、血中濃度推移及び AUC を算出することにより評価した。AUC は実験開始（0 分）から実験終了（60 分）における血漿中濃度から台形法にて AUC_{0-60} を算出した。

3-2. *in situ* single pass perfusion 法（排泄実験）

3-2-1. 実験方法

前日より絶食させた 7~8 週齢 Wistar/ST 系雄性ラット又は 7~8 週齢の Wistar 系雄性ラットを、Somnopentyl®（50 mg/kg, 腹腔内投与）にて全身麻酔を施した。頸静脈より、血管カニューレ（ポリエチレンチューブとシラスコンチューブを連結し、先端を鋭角にカットしたもの）を挿入した。血管カニューレはヘパリンを添加した生理食塩水で満たした。

頸静脈カニューレ挿入後、正中線に沿って開腹した。盲腸上端より 12 cm の部位を開き、ガラス製のカニューレを挿入した。次に、切開部より下部 7 cm の部位を開き、上部に挿入したカニューレから生理食塩水を噴射し内容物を除去した。その後、下部の切開部分にガラス製のカニューレを挿入した。また、それぞれのカニューレは、絹製縫合糸で縛ることで固定した。開腹部を縫合した後、上部のカニューレにペリスタリックポンプを接続し、下部のカニューレにはゴム管を装着した。ペリスタポンプから酸素過飽和にし、pH 7.4 に調整した KHB buffer を、流速 1 mL/min で 10 分間灌流した後、検討に用いた。また、実験中はラットに白熱灯ランプを照射することにより、ラットの体温低下を防いだ。

3-2-2. 排泄実験

頸部の血管カニューレより血液を採取後、生理食塩水で溶解した Rhodamine123 (5 μ M) 1 mL を頸静脈より投与した。投与後、ペリスタポンプを稼働させた。以降、腸管灌流液を 10 分毎に 60 分まで採取し、血液は 1.5, 3, 5, 10, 20, 30, 60 分に 300 μ L ずつ血管カニューレより血液をサンプリングした。血液サンプルは 12,000 rpm にて 10 分間遠心分離を行い、上清を分取することで血漿サンプルを得た。

3-2-3. 腸管 P-glycoprotein (P-gp) 機能評価

灌流液中 Rho123 濃度より、腸管 1 cm 当たりの Rho123 の累積排泄量を算出した。また、累積排泄量を時間に対してプロットし、10 分から 30 分における直線の傾きを求めることで Rho123 の排出速度を求めた。この排出速度を後述する 2-コンパートメントモデル解析より得られた血液中の初濃度で除することにより、

腸管への Rho123 排出クリアランス (CL_{ileum}) を算出し、P-gp 機能を評価した。

3-2-4. Rhodamine123 の血中濃度推移解析

血中濃度の対数値を時間に対してプロットした場合、Rho123 は二相性を示す。従って 2-コンパートメント理論を適用し、 $C=Aexp(-\alpha t)+Bexp(-\beta t)$ の式から非線形最小二乗法により各種パラメーター A, B, α, β を算出した。血中濃度時間曲線下面積 (AUC) 及び全身クリアランス (CL_{tot}) を用いて Rho123 の血中濃度推移を評価した。なお、非線形最小二乗法は <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byoyaku/kinetics/download.html> よりダウンロードした解析ソフト MULTI を用いて解析した。

上記の式 $C=Aexp(-\alpha t)+Bexp(-\beta t)$ において、 A, B, α, β はそれぞれ分布相の y 軸切片、分布相の傾き、消失相の y 軸切片、分布相の傾きに対応している。この 4 つの値を用いて各種薬物動態的パラメーターを算出することができる。以下に求め方を示す

$$\begin{array}{llll} C_0=A+B & V_1=D/(A+B) & k_{21}=(A\beta+B\alpha)/(A+B) & k_e=\alpha\beta/k_{21} \\ k_{12}=\alpha+\beta-k_{21}-k_e & AUC=A/\alpha+B/\beta & CL_{tot}=D/AUC & V_2=V_1k_{12}/k_{21} \end{array}$$

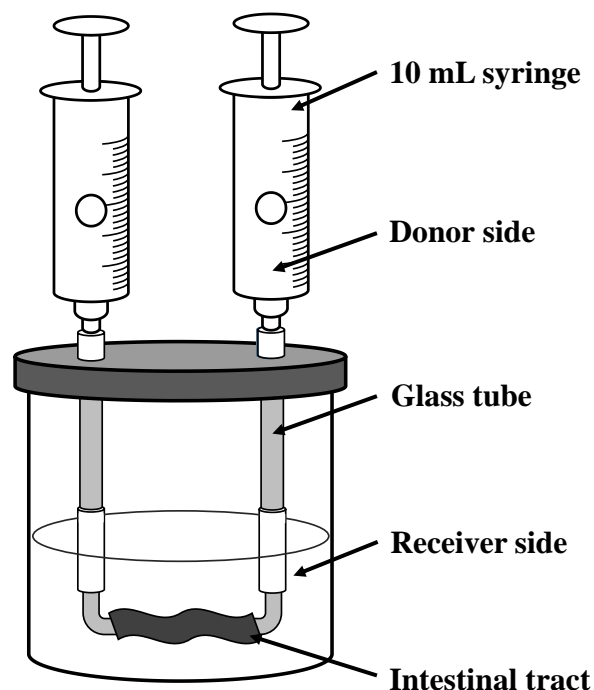
C_0 は血漿中初濃度、 V_1 は compartment-1 の分布容積、 k_{21} は compartment-2 から compartment-1 への速度定数、 k_e は消失速度定数、 k_{12} は compartment-1 から compartment-2 への速度定数、 AUC は血中濃度時間曲線下面積、 CL_{tot} は全身クリアランス、 D は薬物投与濃度、 V_2 は compartment-2 の分布容積をそれぞれ示している。

4. *In vitro* 実験方法

4-1. *In vitro* sac 法を用いた膜透過実験

4-1-1. 腸管 sac の作製

前日より絶食させた 7~8 週齢 Wistar/ST 系雄性ラット又は 7~8 週齢の Wister 系雄性ラットを、Somnopentyl® (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて全身麻酔を施した。腹部正中線に沿って開腹し、ラットの脇腹を押して腸管を出した。消化管上部から、十二指腸、空腸 (Treitz ligament より下方へ 5 cm から)、回腸 (盲腸上端より上方へ 12cm から)、結腸 (盲腸下端から) をそれぞれ約 4, 6, 6, 4 cm 摘出し、氷冷した生理食塩水に浸した。氷冷シャーレ上で腸管に付着している脂肪組織を取り除いた後、腸管の始点及び終点に L 字型ガラスカニューレを挿入し、縫合糸で腸管の上から 2 回結紮し固定した。始点のガラスカニューレより生理食塩水を噴射することにより腸管内を洗浄し、その後空気を噴射し腸管内に残存した生理食塩水を除去した。腸管が乾かないよう、素早く実験装置 (Scheme 2) を組み立て、donor 側 (粘膜側: シリンジ内) に 5 mL、及び receiver 側 (漿膜側: ビーカー内) に 40 mL の KHB buffer (pH 6.5) を添加し、腸管に穴が無いことを確かめた。



Scheme 2 *in vitro* sac method

4-1-2. 膜透過実験

前述の方法に準じ消化管各部位を用いて sac を作製した。まず donor 側の KHB buffer (pH 6.5) を取り除き、donor 側に NOC7 (5 mM) を 4.5 mL 添加し 30 分間、SNP (3 mM) を 5 mL 添加し 60 分間又は DTT (10, 20 mM) を 5 mL 添加し 10 分間の前処理をした。前処理後、溶液を取り除き、Donor 側を KHB buffer で washout した。さらに receiver 側の KHB buffer を除き、新たな KHB buffer を 40 mL 添加し、直ちに receiver 側から 1 mL サンプルングし、0 分サンプルとした。続いて donor 側へ KHB buffer (pH 6.5) で調製したモデル薬物溶液 (theophylline、antipyrine、diclofenac、griseofulvin は 200 μ M、FD-4 は 250 μ M) を添加し、添加後 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 分に receiver 側より 1 mL ずつ採取した (サンプルング後は新たな KHB buffer を 1 mL 補液した)。透過実験終了後、腸管を実験装置から取り外し、腸管を縦に切開してシート状にし、面積を測定した。なお、実験は 37°C 条件下で実施し、溶液はすべて 37°C に加温して用いた。また、実験中は腸管への酸素供給及び溶液を攪拌する目的で、receiver 側に 95% O₂ - 5% CO₂ を吸気し続けた。

4-1-3. 膜透過係数 (P_{app}) の算出

Receiver 側への薬物の膜透過速度から、次式を用いて膜透過係数を算出した。

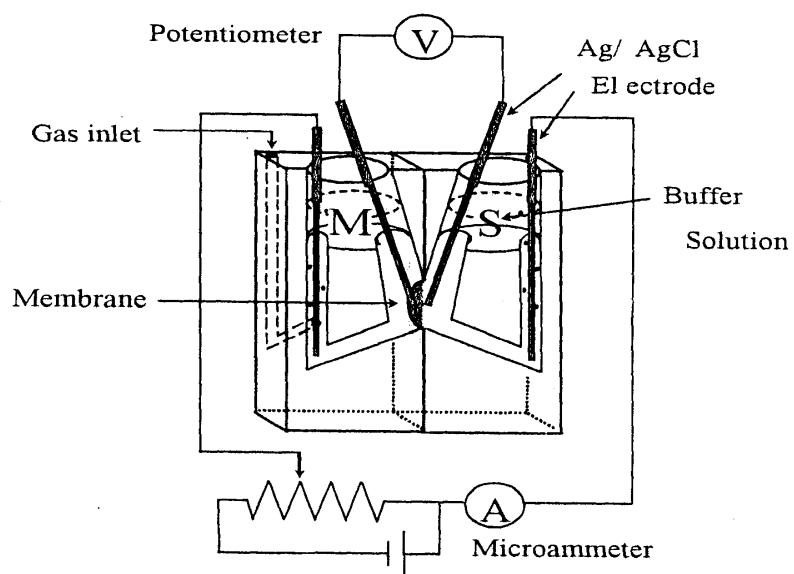
$$\text{膜透過係数 } P_{app} \text{ (cm/s)} = dX/dt / C_0 \times 1 / S$$

dX/dt : 透過速度、 C_0 : 初濃度、 S : 腸管面積 (実験後に測定した面積値)

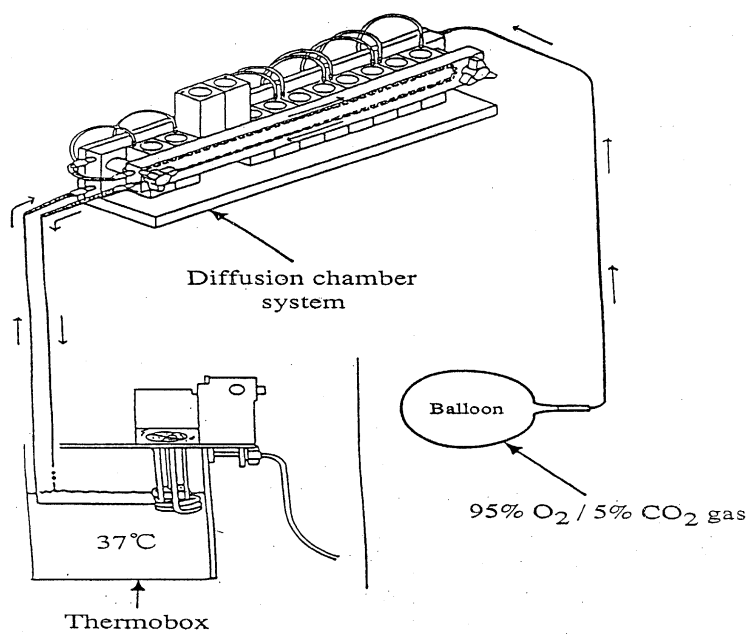
4-2. 膜電位測定⁸⁹⁾

4-2-1. 実験装置

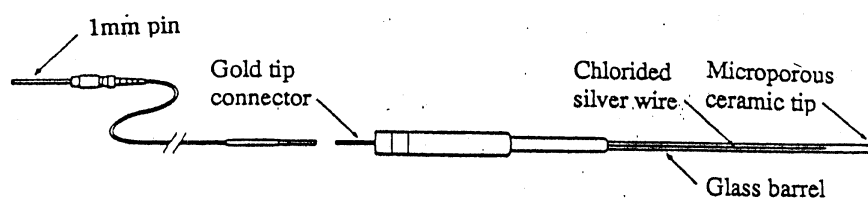
Scheme 3 及び Scheme 4 で示した diffusion chamber system を用いることにより、細胞膜電位 (membrane resistance: R_m) を測定した。Chamber はアクリル製で左右一対から成り、その中央に腸管膜を挟み、O-ring により固定した後、ヒートブロックにセットした (ヒートブロックの外側を 37°C に温度制御された温水が循環し、chamber が 37°C に保たれる)。またガスマニフォールドから chamber にガスが送り込み、腸管膜に対してラミナフローを起こすことで攪拌されていない境界層を少なくした (ガスマニフォールドは各 chamber で独立してガスの強さをコントロールできるように設計されている)。基準電極管として Scheme 5 に示した glass barrel micro-reference electrode (Precision Instrument Design 製) を用いた。電極内部は銀-塩化銀電極で構成されており、AgCl 飽和の 3 M KCl 溶液を充填されている。電極は電流を供給できる short-circuit-current-amplifier に接続することにより細胞膜電位を測定した。



Scheme 3 Schematic diagram of vertical diffusion chamber⁸⁹⁾



Scheme 4 Apparatus of vertical diffusion chamber system⁸⁹⁾



Scheme 5 Diffusion chamber electrode⁸⁹⁾

4-2-2. 測定方法・膜抵抗値の算出

実際には以下のように測定を行った。腸管粘膜を chamber に装着後 buffer のみを加え、銀・塩化銀電極を装着した。実験開始後、0、10、20、30、60、90、120f 分に一定の外部電流 (0.01 mA, 0.1 mA) を 2 秒間流した時のそれぞれの膜電位 ($PD_{0.01}$, $PD_{0.1}$) を測定し、オームの法則に従って以下の式を用いることにより膜抵抗値 (R_m) を算出した。

$$R_m (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (PD_{0.1} - PD_{0.01}) / (0.1 - 0.01)$$

5. タンパク質発現量解析 (Western blot 法)

5-1. サンプル調整法・タンパク定量法

ラット腸管刷子縁膜画分 (brush-border membrane fraction) の調製は、 Mg^{2+} 沈殿法を一部改良して行った。

前日より絶食させた 7~8 週齢 Wistar/ST 系雄性ラット又は 7~8 週齢の Wistar 系雄性ラットを、Somnopentyl® (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて全身麻酔を施した。腹部正中線にそって開腹し、回腸 (十二指腸下端より盲腸上端までの全長の 5 分の 3) を摘出した。氷冷した生理食塩水を噴射し管腔内を洗浄し、腸管を 0.05mg/mL phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 含有氷冷生理食塩水に浸した。PMSF は予め ethanol 溶液 (50 mg/mL) として調製した。氷冷したシャーレに濾紙を敷き、0.05 mg/mL PMSF 含有氷冷生理食塩水を浸しその上で腸管外部に付着している脂肪組織などを丁寧に取り除き、切り開いてシート状とし、内容物を除去した。スライドガラスを粘膜面に水平に軽く押し当てて、一端から擦過し、上皮細胞を採取した。擦過物を 0.05 mg/mL PMSF を含む pH 7.1 に調製した homogenate buffer 60 mL 中に入れ、12,000 rpm で 2 分間ホモジナイズした。ホモジナイズ後、1 M $MgCl_2$ 溶液を 10 mM となるように加え、液をピペット中に出し入れすることで 5 分間攪拌してから 10 分間放置した。放置後 3,000×g で 10 分間冷却遠心分離し、上清を 42,000×g で 30 分間冷却遠心分離した。沈殿を pH 7.4 に調整した membrane buffer 600 μ L に懸濁し、刷子縁膜画分を得た。サンプル中のタンパク濃度は、Micro BCA protein assay reagent kit を用いて定量した。検量線は BSA を 1×PBS で希釈し、0~40 μ g/mL の濃度範囲で作成し用いた。

5-2. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli 法⁶⁹⁾を参考に行った。

腸管上皮刷子縁膜画分を 1×PBS で希釈し、各サンプル間のタンパク濃度を均一にした。刷子縁膜画分サンプルと 2×sample buffer を 1 : 1 (volume : volume) の割合で混合後、5 分間煮沸処理することによりタンパクの可溶化と共に変性させた。タンパク変性後のサンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルの各レーンに添加した。ゲルは予め running buffer 1L で満たした電気泳動槽にセットしておいたものを用いた。ゲルの上方が陰極、下方が陽極となるように電極をセットし、160V で 1 時間 (又は 200V で 30 分間)、定電圧で電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを transfer buffer 中で 10 分間室温にて振盪し、running buffer を洗浄した。

5-3. Western Blotting

氷冷した transfer buffer 中で、黒板を下にしたサンドイッチ板に、下から、スポンジシート→4 枚重ねの濾紙→ゲル→nitrocellulose membrane→4 枚重ねの濾紙→スポンジシートの順に重ね、サンドイッチ板を閉じた。氷冷した transfer buffer

で満たした転写用の容器にサンドイッチ板の黒板を陰極、透明板を陽極にして迅速に移し替えた。容器のフタを閉め、100V で 90 分間（又は 100V で 30 分間）通電した。容器の内側及び外側から氷水を作用させ、容器中の transfer buffer の温度上昇を防いだ。

5-4. 抗原抗体反応

転写後の nitrocellulose membrane をブロッキング溶液(5% blocking agent in PBS-T)に浸し、室温で 1 時間振盪した。ブロッキング溶液除去後、PBS-T を用いて nitrocellulose membrane を洗浄した（15 分×1 回、5 分×2 回）。洗浄 PBS-T を除去後、PBS-T で 500~1000 倍に希釈調製した一次抗体中で nitrocellulose membrane を室温で 1 時間又は 4℃で一晩振盪した。一次抗体除去後、PBS-T を用いて nitrocellulose membrane を洗浄した（15 分×1 回、5 分×2 回）。洗浄 PBS-T を除去後、PBS-T で 5000 倍に希釈調製した二次抗体（anti-mouse IgG 又は anti-rabbit IgG）中で nitrocellulose membrane を室温で 1 時間振盪した。二次抗体除去後、PBS-T を用いて nitrocellulose membrane を洗浄した（15 分×1 回、5 分×2 回）。

5-5. 化学発光の検出

ECL plus western blotting detection solution A と B を 40 : 1 (2 mL : 50 μ L)で混合し、検出溶液を調整した。洗浄後の nitrocellulose membrane をハイブリバッグ中に挟み込み、調製した検出溶液を加え、室温で 5 分間反応させた。検出溶液と気泡をハイブリバッグから流し出し、nitrocellulose membrane をルミノイメーリアナライザーのトレイの中央に固定した後、Dark Box 中で 3 分間露光させ、化学発光を撮影した。

6. 組織切片実験法

6-1. 凍結切片の作成方法

前日より絶食した7~8週齢 Wistar/ST 系及び Wister 系雄性ラットを1匹用いた。Somnopentyl® (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて麻酔後、正中線にそって開腹し、回腸を摘出した (SNP 投与群は前述した方法に準じ回腸 loop 内に薬液を投与してから120 分後の loop 部分を摘出した)。摘出した組織を生理食塩水で軽く洗い、組織の固定を固定するため 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (PFA) 中に組織を入れ、4℃で一晩 (又は時間) 固定した。固定後、sucrose phosphate buffer solution (10% 4 時間 → 20% 4 時間 → 30% over night の順) により組織を洗浄した。PFA 固定・sucrose 洗浄後、アルミの箱 (約 1.5 cm×約 2 cm) に Neg50 Compound (又は O.T.C compound) を入れ組織を包埋した。ドライアイスで凍結後、使用までディープフリーザー中 (-80℃) にて保存した。

Neg50 compound に包埋した凍結臓器からクリオスタットにて 7 µm の厚さの凍結組織切片を作製し、MAS-GP がコーティングされたスライドガラス上に貼付した。風乾により 30 分~3 時間室温で乾燥させた後、PBS-T 溶液中で 30 分間洗浄した。

6-2. Hematoxylin による核染色法

Mayer's Hematoxylin で 1 分間核染色後、20 分間以上流水中で洗浄し色出しをする。70% ethanol (30 秒) → 100% ethanol (2 分) → 100% ethanol (2 分) → 100% ethanol (2 分) の順序で脱水後、xylene に 2 分・2 回浸し、透徹する。Entellan New を切片に滴下し、カバーガラス (18×18 mm) にて封入する。

7. 一酸化窒素量測定法 (diaminonaphthalene 法)

7-1. 実験方法及び測定方法

NO の簡便な測定法として Griess 法がよく用いられているが、本法はこの Griess 法を高感度化かつ簡便化した方法である。

前日より絶食させた 7~8 週齢 Wistar/ST 系雄性ラット及び Wister 系雄性ラットを、Somnopentyl® (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて全身麻酔を施した。前述した方法に準じて、回腸部に 10 cm の loop を作成した後、中央に穴を開けた 10 mL のシリンジをシリコンチューブに取り付けた。予め pH 7.4 に調製した PBS (CTRL 群) 又は SNP 含有 PBS に対して、2,3-diaminonaphthalene (2,3-DAN) 試薬を 10 µL 加えた後、上部のシリンジより 1.8 mL 添加した。添加後 0, 120 分に loop 内の PBS を全量採取し、再び 2,3-DAN 試薬含有 PBS を 1.8 mL 添加した。採取した PBS を 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 220 µL を新しいプラスチックチューブに加え、そこに 2.8 M NaOH を 10 µL 加え、ボルテックスミキサーにて十分に攪拌した。なお、SNP の投与量は 1, 10, 100 mg/kg の範囲で設定し、SFC については SNP とモル比率で当量となる容量を用いて検討した。

また、検量線用の標準物質として 1 mM の NaNO₂ を使用した。精製水で NaNO₂ を希釈し、0~20 mM をそれぞれ 100 µL とり 2,3-DAN 試薬 10 µL 加え、室温で 10~15 分間インキュベートし、2.8 M NaOH を 5 µL 加え、さらに 40 倍希釈して測定に使用した。

それぞれの蛍光強度を分光蛍光光度計 (Ex : 365 nm, Em : 450 nm) にて測定した。

2,3-DAN 試薬	Final concentration
2,3-Diaminonaphthalene	50 µg/mL
HCl	0.62 N

8. リン脂質脱落量測定 (コリンオキシダーゼ・DASO 法)

8-1. 実験方法及び測定方法

In situ closed loop 法 (3-1) にて得られた loop 内液を測定サンプルとして用いた。採取した測定サンプルは 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清をリン脂質 C-テストワコーを使用してリン脂質量を定量した。

9. サンプルの調製法及び定量法

9-1. 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC)

10-1-1. HPLC サンプルの調製

In situ closed loop 法 (3-1) にて得られた血漿サンプルは、有機溶媒を用いた除タンパク法により血中のタンパク質を除去した。血漿サンプル 100 μ L に対し 100 % acetonitrile を 900 μ L 加え、ボルテックスミキサーにて攪拌した。4℃で 15 分間静置し、13,000 rpm で 15 分間遠心分離した。この上清 400 μ L を水/acetonitrile 混液(1:1) 400 μ L と混合し、HPLC 用バイアルに充填し HPLC サンプルとした。

In vitro sac 法 (4-1) にて得られた receiver 側のサンプルは、希釈せずに HPLC 用バイアルに約 800 μ L 充填し、HPLC サンプルとした。

9-1-2. HPLC 測定条件

	Mobile phase* ¹	Wave length	Injection volume	Temp.
Theophylline	1% acetic acid/methanol (4:1)	270 nm	80 μ L	40℃
Antipyrine	50 mM KH ₂ PO ₄ / Methanol (1:1)	254 nm	80 μ L	40℃
Diclofenac	methanol/0.10% phosphoric acid (3:1)	286 nm	80 μ L	40℃
Griseofulvin	water/acetonitrile (3:2)	Ex:295 nm Em:450 nm	80 μ L	30℃

*¹ 各移動相は 10 分間の超音波脱気を行う。

9-2. 蛍光強度測定法

9-2-1. 蛍光物質サンプルの調製

In situ closed loop 法 (3-1) にて得られた血漿サンプルは KHB buffer で 10 倍希釈し、*In vitro* sac 法 (4-1) にて得られた receiver 側のサンプルは希釈せずにプレートリーダーで蛍光強度を測定した。

9-2-2. 蛍光物質測定条件

		FD-4	Rho123	5-CF
Wave length	λ_{ex}	492 nm	485 nm	490 nm
	λ_{em}	515 nm	546 nm	520 nm

10. 統計処理

データは原則として平均値±標準偏差（Mean±S.D.）で表記した。統計解析は Microsoft Excel 2013 を用い、2 群間の比較には t-検定（Student's t-test）により行った。また多群間の比較には分散分析（ANOVA）の後に Dunnet's test を用いた。 $P<0.05$ を有意水準とした。

掲載論文

1. Yusuke Takizawa, Hisanao Kishimoto, Takuya Kitazato, Haruka Ishizaka, Naomi Kamiya, Yasuhiko Ito, Mikio Tomita, Masahiro Hayashi. Characteristics of reversible absorption-enhancing effect of sodium nitroprusside in rat small intestine. *Eur J Pharm Sci.* **49**, 664-670 (2013).
2. Yusuke Takizawa, Takuya Kitazato, Haruka Ishizaka, Naomi Kamiya, Yasuhiko Ito, Hisanao Kishimoto, Mikio Tomita, Masahiro Hayashi. Changes in absorption and excretion of rhodamine 123 by sodium nitroprusside. *Int J Pharm.* **450**, 31-35 (2013).
3. Hisanao Kishimoto, Kaori Miyazaki, Yusuke Takizawa, Yoshiyuki Shirasaka and Katsuhisa Inoue. Absorption-enhancing effect of nitric oxide on the absorption of hydrophobic drugs in rat duodenum. *J Pharm Sci.* **105**, 729-733 (2016).

謝辞

本研究に遂行するに際し、始終御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 薬物動態制御学教室 井上 勝央教授に深なる敬意を表します。

本研究に際し、種々の有益な御指導と御助言を賜りました東京薬科大学薬学部 薬物動態制御学教室 瀧沢 裕輔助教に厚く感謝の意を表します。

本研究に際し、広い視野から鋭く的確な御指導と御助言を賜りました東京薬科大学薬学部 薬物動態制御学教室 白坂善之講師に深謝致します。

研究に対する基本的な考え方をご教授戴き、有益かつ丁寧なご指導、ご助言を戴きました恩師 高崎健康福祉大学薬学部 林 正弘教授に尊敬の意を表すると共に心から感謝致します。

研究に対する基本的な考え方をご教授戴き、様々な面で御助言賜りました東北薬科大学薬学部 富田 幹雄教授に深謝いたします。

共同実験者であり、本論文作成に多大なる貢献をして下さいました北里 拓哉修士、石坂 遥学士、濱口 尚美学士、伊藤 保彦学士、宮崎 歌織学士に心から御礼申し上げます。

また、卒業生諸氏を含め歴代の東京薬科大学薬学部 薬物動態制御学教室各位に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. 橋田 充. 経口投与製剤の設計と評価. 薬業時報社, pp. 5-7 (1995).
2. Serrano P., Casa J., Zucco M., Emeric G., Egido-Gabàs M., Llebaria A., Delgado A. Combinatorial approach to N-substituted aminocyclitol libraries by solution-phase parallel synthesis and preliminary evaluation as glucocerebrosidase inhibitors. *J. Comb. Chem.*, **9**, 43-52 (2007).
3. Kerns EH. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1838-1858 (2001).
4. Pereira DA., Williams JA. Origin and evaluation of high throughput screening. *Br. J. Pharmacol.*, **152**, 53-61 (2007).
5. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.*, **241**, G275-G288 (1981).
6. Bard B., Martel S., Carrupt PA. High throughput UV method for the estimation of thermodynamic solubility and the determination of the solubility in biorelevant media. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **33**, 230-240 (2008).
7. Galia E., Nicolaides E., Hörter D., Löbenberg R., Reppas C., Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm. Res.*, **15**, 698-705 (1998).
8. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 880-885 (1991).
9. Kansy M., Senner F., Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.*, **41**, 1007-1010 (1998).
10. 矢野 浩志. 創薬における物性評価と薬物吸収. 日薬理誌. **133**, 270-273 (2009).

11. Food and Drug Administration. Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. (2015).
12. Amidon GL., Lennernäs H., Shah VP., Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, **12**, 413–420 (1995).
13. 高木 敏英. 創薬から開発までを見通した BCS 戦略. *日薬理誌*. **134**, 24-27 (2009).
14. Serajuddin AT. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1058-1066 (1999).
15. Sethia S., Squillante E. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier. Syst.*, **20**, 215-247 (2003).
16. Merisko-Liversidge E., Liversidge GG., Cooper ER. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **18**, 113-120 (2003).
17. Imai T., Ohura K. The role of intestinal carboxylesterase in the oral absorption of prodrugs. *Curr. Drug Metab.*, **11**, 793-805 (2010).
18. Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 39-54 (2001).
19. Sakuma S., Hayashi M., Akashi M. Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 21-37 (2001).
20. Sako K., Nakashima H., Sawada T., Fukui M. Relationship between gelation rate of controlled-release acetaminophen tablets containing polyethylene oxide and colonic drug release in dogs. *Pharm. Res.*, **13**, 594-598 (1996).

21. Lee V.H., Yamamoto A. 1990. Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **4**, 171-207 (1990).
22. Lee V.H., Yamamoto A., Kompella U.B. Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **8**, 91-192 (1991).
23. Anderberg EK., Artursson. Epithelial transport of drugs in cell culture. VIII: Effects of sodium dodecyl sulfate on cell membrane and tight junction permeability in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 392-398 (1993).
24. Tomita M., Hayashi M., Awazu S. Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739-743 (1995).
25. Nishihata T., Takahagi H., Higuchi T. Enhanced small intestinal absorption of cefmetazole and cefoxitin in rats in the presence of non-surfactant adjuvants. *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 124-125 (1983).
26. Aungst BJ., Rogers NJ., Shefter E. Comparison of nasal, rectal, buccal, sublingual and intramuscular insulin efficacy and the effects of a bile salt absorption promoter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 23-27 (1988).
27. Salzman AL., Menconi MJ., Unno N., Ezzell RM., Casey DM., Gonzalez PK., Fink MP., Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am. J. Physiol.*, **268**, G361-G373 (1995).
28. Fetih G., Habi, F., Okada N., Fujita T., Attia M., Yamamoto A., Nitric oxide donors can enhance the intestinal transport and absorption of insulin and [Asu(1,7)]-eel calcitonin in rats. *J. Control Release*, **106**, 287-297 (2005).
29. Fetih G., Habib F., Katsumi H., Okada N., Fujita T., Attia M., Yamamoto A., Excellent absorption enhancing characteristics of NO donors for improving the intestinal absorption of poorly absorbable compound compared with conventional absorption enhancers. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 222-229 (2006).

30. Menconi MJ., Unno N., Smith M., Aguirre DE., Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1425**, 189-203 (1998).
31. Utoguchi N., Watanabe Y., Shida T., Matsumoto M. Nitric oxide donors enhance rectal absorption of macromolecules in rabbits. *Pharm. Res.*, **15**, 870-876 (1998).
32. Numata N., Takahashi K., Mizuno N., Utoguchi N., Watanabe Y., Matsumoto M., Mayumi T. Improvement of intestinal absorption of macromolecules by nitric oxide donor. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1296-1304 (2000).
33. Yamamoto A., Tatsumi H., Maruyama M., Uchiyama T., Okada N., Fujita T. Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors: implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 84-90 (2001).
34. Swenson ES., Curatolo WJ. Means to enhance penetration (2) Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: Mechanisms and potential toxicity. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **8**, 39-92 (1992).
35. Kondoh M. Claudin as a novel target for drug delivery system. *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**, 711-721 (2006).
36. Kondoh M., Takahashi A., Fujii M., Yagi K., Watanabe Y. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1783-1789 (2006).
37. Kondoh M., Masuyama A., Takahashi A., Asano N., Mizuguchi H., Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y, Watanbe Y. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749-56 (2005).
38. Sugibayashi K., Onuki Y., Takayama K. Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **36**, 246-253. (2009).

39. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, **141**, 1539-50 (1998).
40. Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A., Tsukita S. Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.*, **9**, 1035-8 (1999).
41. Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K., 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).
42. Wilcox ER., Burton QL., Naz S., Riazuddin S., Smith TN., Ploplis B., Belyantseva I., Ben-Yosef T., Liburd NA., Morell RJ., Kachar B., Wu DK., Griffith AJ., Riazuddin S., Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, **104**, 165-172 (2001)
43. Morita K., Furuse M., Fujimoto K., 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).
44. Fujita H., Chiba H., Yokozaki H., Sakai N., Sugimoto K., Wada T., Kojima T., Yamashita T., Sawada N., Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13 and -15 along the mouse intestine. *J. Histochem. Cytochem.*, **54**, 933-944. (2006).
45. Rahner C., Mitic LL., Anderson JM. 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).
46. Kinugasa T., Sakaguchi T., Gu X., Reinecker H.C. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*, **118**, 1001-1011 (2000).
47. Lai SK., Wang YY., Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 158-171 (2009).

48. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 75-85 (2009).
49. Yeap YY., Trevaskis NL., Porter CJ. Lipid absorption triggers drug supersaturation at the intestinal unstirred water layer and promotes drug absorption from mixed micelles. *Pharm. Res.*, **30**, 3045-3058 (2013).
50. Sugano K. Possible reduction of effective thickness of intestinal unstirred water layer by particle drifting effect. *Int. J. Pharm.*, **387**, 103-109 (2010).
51. Nimmerfall F., Rosenthaler J. Significance of the goblet-cell mucin layer, the outermost luminal barrier to passage through the gut wall. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 960-966 (1980).
52. Smithson KW., Millar DB., Jacobs LR., Gray GM. Intestinal diffusion barrier: unstirred water layer or membrane surface mucous coat? *Science*, **214**, 1241-1244 (1981).
53. Ensign LM., Cone R., Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 557-570 (2012).
54. Boegh M., Baldursdóttir SG., Müllertz A., Nielsen HM. Property profiling of biosimilar mucus in a novel mucus-containing in vitro model for assessment of intestinal drug absorption. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **87**, 227-235 (2014).
55. Boegh M., Nielsen HM. Mucus as a barrier to drug delivery – understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **116**, 179-186 (2015).
56. Hoorens PR., Rinaldi M., Li RW., Goddeeris B., Claerebout E., Vercruysse J., Geldhof P. Genome wide analysis of the bovine mucin genes and their gastrointestinal transcription profile. *BMC Genomics*, **12**, 140-147 (2011).
57. Hunter J., Hirst BH. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, 129-157 (1997).

58. Lo YL., Hsu LR., Song CL. 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).
59. 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).
60. Shono Y., Nishihara H., Matsuda Y., Furukawa S., Okada N., Fujita T., Yamamoto A. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by cremophor EL and other surfactants by an in vitro diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 877-885 (2004).
61. Batrakova EV., Li S., Li Y., Alakhov VY., Kabanov AV. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. *Pharm. Res.*, **21**, 2226-2233 (2004).
62. Tayrouz Y., Ding R., Burhenne J., Riedel KD., Weiss J., Hoppe-Tichy T., Haefeli WE., Mikus G. Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH40. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73**, 397-405 (2003).
63. Bogman K., Zysset Y., Degen L., Hopfgartner G., Gutmann H., Alsenz J., Drewe J. P-glycoprotein and surfactants: effect on intestinal talinolol absorption. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **77**, 24-32 (2005).
64. Wu CY., Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.*, **22**, 11-23 (2005).
65. Fujioka Y., Kadono K., Fujie Y., Metsugi Y., Ogawara K., Higaki K., Kimura T. Prediction of oral absorption of griseofulvin, a BCS class II drug, based on GITA model: utilization of a more suitable medium for in-vitro dissolution study. *J. Control Release*, **119**, 222-228 (2007).
66. Lindenberg M., Kopp S., Dressman JB, Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to

- the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 265-278 (2004).
67. Terao T., Hisanaga E., Sai Y., Tamai I., Tsuji A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1083-1089 (1996).
68. Lennernäs H. Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 627-638 (1997).
69. Amidon GL., Sinko PJ., Fleisher D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm. Res.*, **5**, 651-654 (1988).
70. Ungell AL., Nylander S., Bergstrand S., Sjöberg A., Lennernäs H. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 360-366 (1998).
71. Chen ML., Yu L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Mol. Pharmacol.*, **6**, 74-81 (2009).
72. Galinis-Luciani D., Nguyen L., Yazdanian M. Is PAMPA a useful tool for discovery? *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2886-2892 (2007).
73. Lai SK., O'Hanlon DE., Harrold S., Man ST., Wang YY., Cone R., Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 1482-1487 (2007).
74. Masaoka Y., Tanaka Y., Kataoka M., Sakuma S., Yamashita S. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**, 240-250 (2006).
75. Corfield AP., Carroll D., Myerscough N., Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front. Biosci.*, **6**, D1321- D1357 (2001).

76. Szentkuti L., Lorenz K. The thickness of the mucus layer in different segments of the rat intestine. *Histochem J.*, **27**, 466-472 (1995).
77. Jass JR., Robertson AM. Colorectal mucin histochemistry in health and disease: a critical review. *Pathol. Int.*, **44**, 487-504 (1994).
78. Audie JP., Janin A., Porchet N., Copin MC., Gosselin B., Aubert JP. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**, 1479-1485 (1993).
79. Tomita M., Takizawa Y., Kishimoto H., Hayashi M. Assessment of ileal epithelial P-glycoprotein dysfunction induced by ischemia/reperfusion using in vivo animal model. *Drug Metab. Pharmacokin.*, **23**, 356-363 (2008).
80. Lowenstein CJ. Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.*, **75**, 240-246 (2007).
81. Skinn AC., MacNaughton WK. Nitric oxide inhibits cAMP-dependent CFTR trafficking in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**, G739-G744 (2005).
82. Takizawa Y., Kishimoto H., Kitazato T., Tomita M., Hayashi M. Effects of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **42**, 246-252 (2011).
83. Takizawa Y., Kishimoto H., Kitazato T., Tomita M., Hayashi M. Changes in the localization of ileal P-glycoprotein induced by intestinal ischemia/reperfusion. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 408-414 (2011).
84. Bridges CC., Ola MS., Prasad PD., El-Sherbeny A., Ganapathy V., Smith SB. Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, C1825-C1836 (2001).
85. Maeng HJ., Kim MH., Jin HE., Shin SM., Tsuruo T., Kim SG., Kim DD., Shim CK., Chung S.J. Functional induction of P-glycoprotein in the blood-brain barrier of streptozotocin-induced diabetic rats: evidence for the involvement of nuclear

- factor-kappaB, a nitrosative stress-sensitive transcription factor, in the regulation. *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1996-2005 (2007).
86. Troutman MD., Thakker DR. Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells. *Pharm. Res.*, **20**, 1192-1199 (2003).
87. Troutman MD., Thakker DR. Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.*, **20**, 1200-1209 (2003).
88. Lugea A., Salas A., Guarner F., Malagelada JR. Adaptive cytoprotection of the rat duodenum is not dependent on nitric oxide-induced changes in blood flow. *Am. J. Physiol.*, **264**, G994-G1000 (1993).
89. 土井信幸, アシルカルニチンの吸収促進作用の機構解明および安全性評価. (博士論文), 東京薬科大学(2011).