

| | |
|---------|---|
| 氏名（本籍） | 岸本 久直（神奈川県） |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 論博第 342 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 28 年 3 月 18 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学位論文題目 | 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 |
| 論文審査委員 | （主査） 教授 井上 勝央 教授 新槇 幸彦 教授 瀬田 康生 教授 藤原 泰之 |

論文内容の要旨

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、不可逆的な消化管粘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。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現状である。

以上の背景のもと、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、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 難吸収性水溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす SNP の影響

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、ラット腸管における難吸収性水

溶性薬物の腸管粘膜透過に及ぼす SNP の影響を評価した。

第 1 節 SNP の腸管粘膜に及ぼす影響： 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、ラット腸管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た。また、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。

第 2 節 SNP による吸収促進効果： 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 (Fig. 1)。Paracellular route を介して吸収される fluorescein isothiocyanate-dextran 4000 (FD-4) 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他の NO 供与体併用時においても同様に観察され、さらに sodium ferrocyanide (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、tight junction 構成タンパク質の一種である claudin の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。

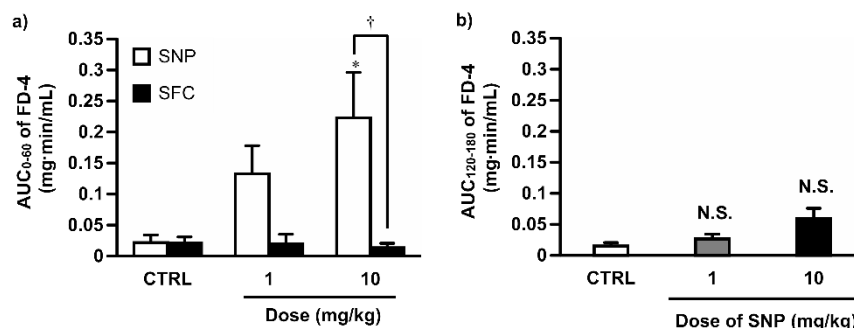


Fig. 1 Effect of SNP on AUC₀₋₆₀ (a) and AUC₁₂₀₋₁₈₀ (b) of

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

近年の医薬品開発の進展に伴い、開発された候補化合物の多くは難溶解性・高脂溶性を示す Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class II に分類される化合物が急増しているのが現状である。これら化合物の腸管粘膜透過機構は、一般に transcellular route を介した受動拡散によるものと考えられているが、吸収改善の方策は溶解速度の向上や微粒子化などの製剤的手法に限られる。そこで本研究では、transcellular route を介した薬物吸収に対する NO の影響を明らかにすることを目的とし、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。

第 1 節 受動拡散に対する NO の影響：NO 供与体として 1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene (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 ($\log P = 2.18$) 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 (Table 1)。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、NO による膜透過性の変化率は griseofulvin > diclofenac ($\log P = 1.13$) > antipyrine ($\log P = 0.38$) > theophylline ($\log P = -0.02$) の順となり、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された (Fig. 2)。一方、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。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された。

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

| | | 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 |

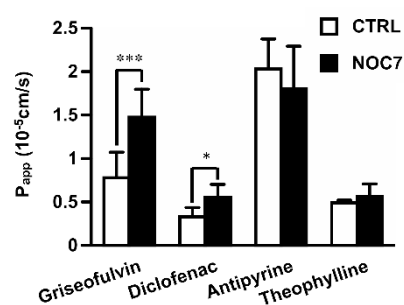


Fig. 2 Effect of NOC7 on the P_{app} of hydrophobic drugs in rat

腸管粘膜表面には水溶性の粘液層で構成される非攪拌水層の存在が知られており、難溶解性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。非攪拌水層除去剤である dithiothreitol (DTT) 単独前処理による griseofulvin の膜透過性は上昇し、その程度は NOC7 単独前処理時と同等であった。これに対し 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 (Fig. 3a)。さらに、FD-4 の膜透過性に対し、NOC7 及び DTT による影響は認められなかった (Fig. 3b)。DTT による griseofulvin の吸収促進効果は 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 が非攪拌水層を除去することにより薬物の膜透過性を亢進することから、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。

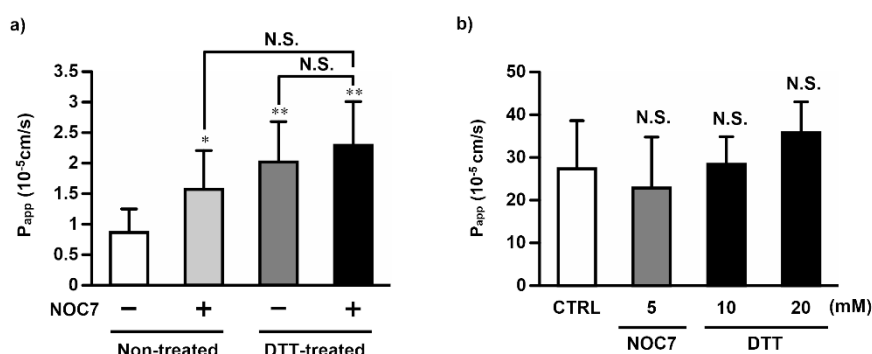


Fig. 3 Effect of NOC7 or DTT on the P_{app} of (a) griseofulvin and (b) FD-4 in rat duodenum.

十二指腸での griseofulvin の吸収に対する NOC7 前処理による吸収促進効果は、ラット whole body を用いた *in situ* の評価系においても認められた (Fig. 4)。

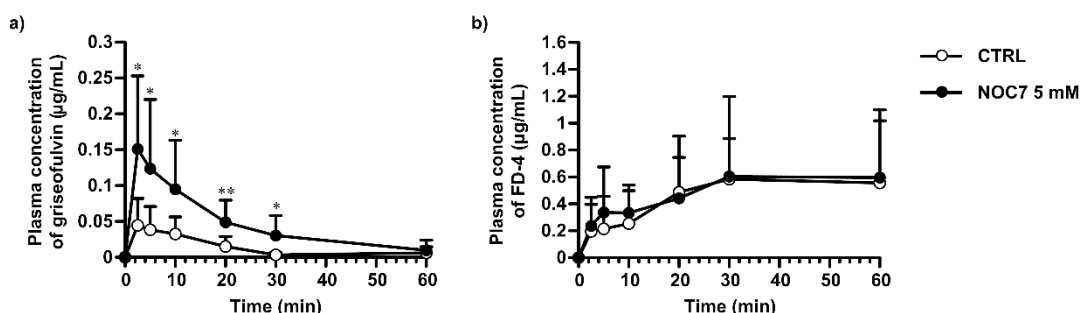


Fig. 4 Effect of NOC7 on the duodenal absorption of (a) griseofulvin and (b)

以上の結果より、NO は transcellular route を介した受動拡散による薬物吸収に対して吸収促進効果を有することが示された。さらに、その吸収促進機構として、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。

第2節 P-glycoprotein (P-gp) に対する NO 供与体の影響：排出型トランスポーターに対しては、腸管上皮細胞膜上に局在する P-gp の輸送活性に対する SNP の影響を検討した (Table 2)。P-gp 基質である rhodamine 123 (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。このことから、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。

Table 2 Relative activity of ileal

| | Absorption (M to S) | Excretion (S to M) |
|--------------|---------------------|--------------------|
| CTRL | 0.39 | 1.17 |
| SNP 1 mg/kg | 0.39 | 1.20 |
| SNP 10 mg/kg | 0.38 | 1.20 |

総括

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。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示した。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る。

【研究結果の掲載誌】

- 1) *Eur J Pharm Sci.* **49**:664-670 (2013)
- 2) *Int J Pharm.* **450**:31-35 (2013).
- 3) *J Pharm Sci.* **105**:729-733 (2016)

論文審査の結果の要旨

本論文は、難吸収性薬物の腸管吸収を改善することを目的として、細胞膜非透過性の水溶性薬物に対して吸収促進効果が認められている一酸化窒素（NO）の臨床応用の可能性ならびに細胞膜透過性の脂溶性薬物に対する新たな吸収促進剤としての有用性について検討したものである。

これまでの研究により、NO 供与体（NOC・NOR 類、SIN-1 など）は、腸管における上皮細胞層の細胞間隙経路（パラセルラールルート）を開口し、高分子ペプチドなどを含む水溶性化合物の吸収を促進することが示されている。NO 供与体を吸収促進剤として臨床応用できれば、様々な難吸収性水溶性薬物の腸管吸収を改善できると期待されるが、医薬品開発においてこれら NO 供与体は新規の添加剤あるいは効能を有する医薬品として取扱われるため、非臨床試験や臨床試験等において安全性・有効性評価を受ける必要があり、その臨床応用は困難であると考えられる。

第 1 章では、臨床応用可能な NO 供与体として、国内外の承認薬であるニトロプルシド（SNP；ニトロ系血管拡張薬）に着目し、その腸管粘膜に対する障害性、吸収促進剤としての効果について検討した。10 mg/kg の SNP をラット小腸ループ内に投与したとき、粘膜組織に対する有意な障害性は認められず、その投与部位における FD-4 及び 5-CF（細胞膜非透過性マーカー）の吸収は顕著に亢進することが示された。さらにこの SNP による吸収促進効果は腸管内の SNP を除去することで急激に低下した。これらの結果より、SNP は血管拡張薬としての作用だけでなく、他の NO 供与体で認められているパラセルラールルートを経した腸管吸収を促進する作用を有し、組織障害性が低いことから、安全性が高い吸収促進剤として臨床応用できる可能性が示された。

一方、経口投与製剤として開発された医薬品の多くは、難溶解性・脂溶性であるため、小腸上皮細胞を受動拡散により透過する細胞内経路（トランスセルラールルート）により吸収される。したがって、トランスセルラールルートを経した薬物の吸収性を最適化することは医薬品開発において重要な課題となっている。

第 2 章では、難溶解性脂溶性薬物のトランスセルラールルートを経した腸管吸収に対する NO の影響を検討した。NO 供与体である NOC7 を作用させたラット腸管を用いて、グリセオフルビンの腸管膜透過性を評価した結果、その透過性が NOC-7 処置した十二指腸においてのみ増大することを見出した。この NOC7 による膜透過性亢進作用は、脂溶性が高い薬物において顕著であり、その促進効果は腸管粘液層の除去により、見かけ上、消失することが明らかとなった。また、NO は脂溶性薬物の排出に関与する P-糖タンパク質の機能には影響を及ぼさないことが示された。したがって、NO によるトランスセルラールルートを経した吸収促進効果には非攪拌水層の機能変化が関与することが示唆された。これらの結果より、NO は、従来から認められていたパラセルラールルートに対する水溶性薬物の吸収促進効果に加え、トランスセルラールルートを経した脂溶性薬物の吸収促進効果を有することが明らかとなった。

以上の本研究成果は、難吸収性薬物の腸管吸収の改善に向けた新しい知見を提供するものであり、今後の新規吸収促進剤の開発や医薬品の吸収機構の解明に繋がるものと期待される。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。