

学位論文要旨

胃潰瘍による薬物吸収の変化とその要因を検証するための *in vivo* 及び *in vitro* 実験系を用いた研究
原 裕一

胃は、小腸に比較して機能の面でも、有効面積の面でも、ともに吸収部位として適しておらず、経口投与後の薬物吸収への直接的な寄与は小さいと考えられているが、胃の酸性の条件は、特に塩基性の薬物の溶解において役割が大きく、溶解過程が吸収の律速段階となるような難溶解性の薬物の場合、胃の薬物吸収への寄与は大変重要になる。また、胃内容物が胃から排出されるタイミングが、薬物吸収の開始に影響するので、胃排出が遅延した場合には、血中薬物濃度の上昇に遅れが生じる原因となりえる。これらのことを総合的に考えた場合、胃の生理的機能やその状態は、薬物の消化管吸収において重要な影響因子と言える。

胃の生理的機能やその状態が正常でない患者における薬物吸収については、当然変動することが予想できるが、大変多くの要因が関わるため、一概に上昇する、もしくは低下すると言い切ることはできない。それらの現象を明らかにするためには、胃に障害がある場合の胃の生理的機能やその状態を可能なかぎり定量的に取り扱い、それと薬物吸収速度との関係を詳しく検証していくことが必要と考えられる。

そこで本研究では、胃障害が薬物吸収性に与える影響を明らかにするために、胃障害が生じている時の胃障害ラットモデルを作製し、胃の生理的機能の変化を評価した。モデルラットを使用する *in vivo* に加え、*in vitro* 実験系を構築し胃の生理的機能変化が薬物吸収性に与える影響を評価した。

第1章では胃障害ラットモデルとして酢酸胃漿膜適用潰瘍モデルラットを作製し、胃の生理的機能を評価した。このモデルは、事前の開腹処理が必要な点でラットへの負担が大きいが、刺激のコントロールにより、病変部位を特定な箇所限定できること、障害の程度を制御しやすいことなどが利点として挙げられる。

予備検討の結果から、a) 酢酸 15 秒適用処理は強い障害を引き起こさないため、適用処理時間の延長が必要であること、b) 麻酔は消化管の機能に影響を与える懸念があり、可能な限り無麻酔条件での実験が望ましいこと、c) 胃の障害は多様な変化を引き起こすことから可能なかぎり変動要因を絞って個別の影響を検証していくことが望ましいことなどが考えられた。

そこで、適用処理時間を 60 秒まで延長し、ラットの全身状態への影響、ラット胃の適用処理部位の組織状態、ラット胃の機能として、胃内容物排出能と胃酸分泌能に絞って評価を行った。その結果、60 秒適用処理時間では、摂食量と飲水量のより長い時間の低下と、体重の一時的な減少が認められ、胃粘膜組織観察とエバンスブルー分布量の評価からも、60 秒適用処理は刺激が過剰であり、45 秒適用処理が、胃潰瘍の状態を得る条件として適切であることが明らかとなった。

酢酸適用処理による胃排出能の評価を目的として、ジルコニアビーズをカプセルに封入し、それを投与したのちの消化管内分布を比較した。その結果、酢酸適用処理したラットにおいて胃内でのビーズの残存数が多く、胃排出能が低下していることが示された。酢酸適用処理群で胃排出されたビーズは、小腸に留まらず、さらに遠方に運ばれていたことから、酢酸適用処理は胃排出には影響を与えるが、小腸の蠕動運動には影響を与えないと考えられた。胃内 pH を測定した結果、酢酸適用処理により胃酸分泌能の低下による pH の上昇も確認された。

第2章では酢酸漿膜適用処理モデルラットに薬物を投与し、胃障害時の胃排出の変化が薬物吸収に与える影響を評価した。アセトアミノフェン (APAP) は、その血中濃度推移が胃排出の過程に影響されることが知られており、胃内容物の排出速度の試験薬としても多く用いられている。そこで、胃漿膜酢酸45秒適用処理による胃排出遅延の、APAPの経口投与後の吸収過程への影響を評価した。

酢酸で胃の漿膜を45秒適用処理したラットは、その処置時のダメージにより、翌日の摂食量が減少するなど影響を受ける。そこで、胃漿膜を45秒酢酸適用処理したラットにおいて、APAPの体内動態が変化するかを静脈内投与実験により調査した。その結果、急速静脈内投与した後のAPAPの血漿中濃度推移には未適用処理ラットとの有意差はなく、酢酸適用処理がAPAPの消失特性や分布特性に影響しないことが確認できた。

胃漿膜を45秒酢酸で適用処理したラットと未適用処理のラットについて、APAPのカプセル剤を経口投与した後のAPAPの血漿中濃度推移を比較した結果、酢酸適用処理したラットで、投与直後の血漿中APAP濃度が低下し、平均吸収時間の延長が観察された。酢酸適用処理により胃潰瘍を発症したラットでは、APAPを経口投与した場合の吸収が、胃排出過程の遅延により、遅れることが示された。

第三章では胃障害時のpHの変化が薬物の吸収性に与える影響の評価を試みた。難溶性塩基性薬物は投与された時、胃内の低いpH環境で溶解し、小腸の中性pH環境で析出する。しかし、小腸で析出する過程で過飽和現象が生じ、薬物の吸収に影響することが知られている。胃障害が生じた場合、胃内pHが上昇することにより胃内での薬物溶解性が低下し、小腸での薬物吸収性が変化すると考えられるが、本研究で作製した胃障害モデルラットでは、酸分泌の低下に伴うpH上昇が胃排出の低下とともに認められるため、*in vivo* 実験では胃内pH上昇の薬物吸収性への影響を明らかにすることは困難である。

そこで本章では消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルを作製し、上昇した胃内pHの薬物吸収性への影響を考察した。モデル胃としてのガラス製ビーカー、モデル小腸としてビーカーに側面に接続したガラス製拡散セル、拡散セル内にモデル胃液を中和するモデル膵液を注入するシリンジポンプより構成される。モデル薬物は塩基性の難水溶性薬物であり、酸性条件ではよく溶解するが、中性条件での溶解度は低いアルベンダゾール (ABZ) を選択した。

本モデルを用いて消化管モデル内でのABZ溶解挙動を調べた結果、通常のプロセスを想定したpH 1.2-6.5 (胃内pH-小腸内pH) の条件において、pH 6.5での飽和溶解度よりはるかに高いABZの濃度がモデル内で観察され、*in vivo* で生じていると予想されているpH変化に伴う過飽和が本モデルにおいて再現された。

胃内のpH上昇がABZの吸収にどのような影響をもたらすかを調べるため、モデル小腸でのABZの透過性の変化を比較した。その結果、pH 4.0-6.5の条件では、pH 1.2-6.5と比較してABZ透過量は大きく減少し、アルベンダゾールの経口投与後の吸収が、胃内pH環境の変化によって大きく影響を受けることが示唆された。

以上、胃に障害がある場合の薬物吸収の変動について、ラット胃漿膜酢酸適用モデルと消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルを用いて検討を行った。得られた結果は、胃に障害がある、もしくはそれが疑われる患者における、より安全な薬物治療のための有用な情報となり得るだけでなく、用いた両実験法は、さらなる研究のための有用なツールとなり得るものと考えられる。

Thesis Abstract

Studies to evaluate the effect of gastric ulcer on gastrointestinal drug absorption by using *in vivo* and *in vitro* experiments

Yuuichi Hara

The stomach, as an organ, has limited ability to absorb drugs than the small intestine. The effective area of the stomach are not suitable for absorption as compared with the small intestine, and it is considered that the stomach does not directly contribute to drug absorption after oral administration.

However, the physiological functions of the stomach are known to be important factors that influence the efficiency of drug absorption. Stomach acidity does have an important role in the rapid dissolution of basic drugs and in, the case of poorly soluble drugs, the dissolution process is the rate-limiting step of drug absorption. In the case of these drugs, the contribution of the stomach to drug absorption becomes a very important factor. In addition, as the timing at which gastric contents are discharged from the stomach affects the initiation of drug absorption, if gastric emptying is delayed, this may cause a delay in achieving the desired drug concentration in the blood.

Drug absorption in patients with gastric disease can be expected to fluctuate. Gastric disease disturb stomach physiological functions and, change the drug absorption in the gastrointestinal tract. However, the influence on drug absorption of these functional changes is complicated and unknown.

The aim of this study was to evaluate the influence of disease on gastric physiological function and drug absorption. In Chapter 1, I made rat model of acetic acid-induced gastric ulcer, and evaluate some stomach physiological function. In Chapter 2, I used this rat model, administered acetaminophen (APAP) orally and evaluated the influence of gastric ulcer on APAP blood concentrate. And in Chapter 3, I used *in vitro* changeable pH dissolution/permeation system, applied albendazole (ABZ), poorly soluble basic drug, and evaluated the influence of stomach acidity on ABZ absorption.

In Chapter 1, I evaluated changes in the physiological function of the stomach using rats in which acetic-acids had been previously applied to the gastric serosa to induce gastric ulcers. The results of my preliminary experiments in which I treated the gastric serosa with acetic acid for 15 seconds, 48hours before beginning our experiments, indicated the following: a) it is necessary to prolong the acetic acid treatment time in order to induce an ulcer, b) it is desirable to conduct experiments avoid anesthesia, because of its side-effect through autonomic nerve, c) it is desirable to verify individual functions by narrowing down on factors as much as possible.

Therefore, in subsequent experiments, I extended the acetic acid treatment time to 60 seconds. I also evaluated, the effect of the treatment on the general condition of the rat, the condition of the tissue at the treatment site in the rat stomach, the functioning of the rat stomach, and the gastric emptying and the stomach acid-secretion abilities of the stomach.

Using an acetic acid treatment time of 60 seconds resulted in the reduction in food intake and drinking water as well as temporary decrease in body weight. Analysis of gastric mucosal tissue and the amount of Evans blue distribution revealed the stimulation was too strong to obtain a state of gastric ulcer.

In order to evaluate the gastric emptying ability following acetic acid treatment, were administered and he

distribution of beads present in the digestive tract before and after administration of encapsulated zirconia beads was compared. The results demonstrate that a higher number of beads were retained in acetic acid-treated rats than in untreated rats, indicating that gastric emptying was reduced in the acetic-acid treated rats. Furthermore, measurement of pH in the stomach confirmed that gastric acid secretion ability was decreased by acetic acid treatment.

In Chapter 2, the influence of changes in gastric emptying when there is gastric ulcer on drug absorption was evaluated. APAP is a drug widely used as an antipyretic analgesic agent. While it is poorly absorbed in the stomach, APAP is quickly absorbed in the small intestine. Therefore, it is often used as a test agent when evaluating the efficiency of the gastric emptying.

APAP was intravenously administered to untreated rats and acetic-acid treated rats. Plasma APAP concentration was compared untreated rats and acetic-acid treated rats. It was showed no significant difference and suggested that acetic-acid treatment does not affect distribution and elimination of APAP.

APAP contained in gelatin capsules was orally administered to untreated rats and acetic-acid treated rats. Plasma APAP concentration was compared untreated rats and acetic-acid treated rats. Plasma APAP concentration early after administration of acetic-acid treated rats was lower than in untreated rats. Pharmacokinetics analysis showed the mean absorption time (*MAT*) was significantly extended, and suggested that acetic-acid treatment prolongs retention APAP in stomach.

In Chapter 3, the influence of changes in gastric pH on drug absorption was evaluated *in vitro* experiments. Not only gastric emptying but various factors (other gastric physiological functions, influence of concomitant medication) are affected to drug absorption. In this rat model of acetic acid-induced gastric ulcer, the increase gastric pH and reduction in gastric emptying were observed simultaneously.

Therefore, *In vitro* changeable pH dissolution/permeation system was fabricated and used to evaluate the influence of changes in gastric pH on drug absorption. As albendazole (ABZ), which is known to be a basic, poorly water-soluble drug, has high solubility in acidic conditions, but low solubility under neutral conditions, was used as the model drug in this study.

The solubility test in the *in vitro* changeable pH dissolution/permeation system showed that the solubility of ABZ under condition of pH 1.2-6.5 (gastric pH-intestinal pH) was higher than the solubility of under condition of pH 6.5. This result suggested supersaturation arise from the pH change.

In order to investigate how pH changes in the stomach may affect the permeation of ABZ, experiments were also carried out under pH 1.2-6.5 and pH 4.0-6.5 and changes in membrane permeability were compared. Using a pH range of 4.0-6.5 membrane permeation was found to be significantly decreased, suggesting that drug absorption following oral administration of ABZ was significantly affected by changes in pH environment in the stomach

In this study, I analyzed variations in physiological function of the stomach injury in a rat model of acetic acid induced gastric ulcer, and influence on drug absorption. The results obtained may aid the development of safer drug treatment in patients with impaired stomach function.

論文審査の結果の要旨

胃は、上部消化管として食物の消化分解における重要な役割を果たす一方、薬物の吸収においては、表面積が小さく強固なバリア能を有するため、直接的な寄与は小さいと考えられている。胃酸の分泌による低い胃内 pH は、塩基性薬物の溶解に大きく寄与するが、潰瘍などの胃障害、胃内 pH に影響を及ぼす薬物治療、飲食物、加齢などによる pH の上昇は、経口投与した薬物の溶解性が変化し、その吸収速度や吸収率に大きな影響を及ぼすことがある。また、潰瘍によってバリア能が低下すれば、胃粘膜透過性が増大する可能性がある。さらに、胃内容物が胃から排出される速度は、初期の薬物吸収過程に影響を及ぼし、体内動態を変化させるため、有効血中濃度域にコントロールすべき薬物の治療においては、胃潰瘍時の生理機能の変化に留意しなければならない。

胃に疾患を有する患者は多い上、ヘリコバクター・ピロリの感染や長期間にわたる非ステロイド性抗炎症薬の使用に伴う胃の炎症や潰瘍病変を有する患者も多い。これら胃の粘膜組織や生理機能が異常な患者における薬物吸収には複数の因子が関与するため、薬物の体内動態を予測することが難しく、胃障害が薬物の吸収性に与える影響について系統立てて詳細に検討した研究は、十分になされていない。

そこで本論文では、第 1 章と第 2 章において、胃潰瘍時の薬物吸収に関わる要因を明らかにする実験モデルとしてラット胃漿膜酢酸処理モデルに着目し、ヒトで生じる胃潰瘍と類似した組織像を示す胃潰瘍モデルをつくる条件設定を見出し、潰瘍状態での胃粘膜バリア機能の変化、胃内 pH の変化、胃排出能と小腸蠕動運動の変化について検討した。第 3 章では、胃潰瘍モデルラットを使うことなく、*in vivo* では評価することが難しい胃内 pH の変化に伴う薬物吸収性の変化について、胃および小腸に見立てたコンパートメントを任意の pH にコントロールして薬物吸収性を評価することが可能な *in vitro* 実験系を確立し、モデル薬物として塩基性の難水溶性薬物を使用して検討を行った。

第 1 章では、ラットの胃漿膜に酢酸を適用する胃潰瘍モデルについて検討を行った。酢酸の処理時間を 15 秒に固定し、モルヒネの吸収性を *in vivo* 実験で検討したところ、胃粘膜のバリア能低下によって血中濃度が上昇するだろうとの予測に反してモルヒネの血中濃度は低く推移した。その原因を探るために胃粘膜の透過性と胃自体からの吸収性の変化を *in vitro* 実験系と *in situ* 実験系で評価したところ、15 秒の酢酸処理では潰瘍に至らず、胃潰瘍モデルとしては不十分であることが判明したため、酢酸処理時間を 60 秒まで変化させて全身状態への影響と組織学的な評価を行った。その結果、45 秒処理では潰瘍が、60 秒処理では穿孔が生じてしまうこと、また炎症による影響は 45 秒処理が最大であり、ヒトの胃潰瘍と類似した実験モデルを作製するための至適な胃漿膜酢酸処理時間は 45 秒であることを見いだした。その後は、ラット胃漿膜酢酸 45 秒処理モデルにおける胃排出能と胃酸分泌能を評価した。胃排出能の評価は、ジルコニアビーズをカプセルに封入して投与した後の消化管内分布を胃漿膜酢酸処理ラットと未処理ラットで比較したところ、胃漿膜酢酸処理ラットでは胃内におけるビーズ残存数が多く、胃排出能が低下していること、また小腸の蠕動運動には影響を及ぼさないことが判明した。投与した墨汁の消化管内移動を比較する実験の結果も小腸の蠕動運動には酢酸処理が影響しないことを支持した。胃酸分泌能は、ガストリン分泌を促すためのカゼイン分解物を投与してから胃内 pH を測定することによって評価したところ、胃漿膜酢酸処理では胃酸分泌能が低下することが示された。

以上、ラット胃漿膜酢酸処理モデルは、潰瘍の部位や粘膜障害の程度を制御しやすい *in vivo* 実験系で

あり、胃排出能が低下し、胃酸分泌能も低下しているヒトの胃潰瘍モデルとして薬理学的研究だけでなく、薬物の吸収過程を探る薬物動態学的研究に適したモデルであることを明らかにした。

第 2 章では、胃漿膜酢酸処理が、投与された薬物の体内分布や消失過程に影響を及ぼさず、吸収過程のみに影響することを確認するために、経口投与時に小腸のみで吸収されるアセトアミノフェンを使って静脈内投与実験と経口投与実験を行った。アセトアミノフェンを静脈内投与した後の血中薬物動態を酢酸処理と未処理のラットで比較検討したところ、いずれの薬物動態学的パラメータにも差がないことが確認された。アセトアミノフェンの経口投与実験を行ったところ、血中薬物濃度曲線下面積は変化せず、平均吸収時間のみ延長することが確認された。

以上、ラット胃漿膜酢酸処理モデルにおいては、胃排出能が低下することをアセトアミノフェン経口投与時の平均吸収時間の延長を確認することによって、証明することができた。

第 3 章では、胃潰瘍で胃内 pH が変化した場合、薬物の消化管吸収がどのような影響を受けるのか、胃内 pH および小腸内 pH を任意に設定して吸収性を評価できる *in vitro* 実験系を確立し、塩基性の難水溶性薬物を使って検討した。

胃内および小腸内を任意の pH に設定して薬物の吸収性を評価する場合、動物の胃潰瘍モデルで *in vivo* 実験を試みることは、様々な生体内因子を排除する必要があるため、きわめて困難である。また、動物を用いない代替実験法を確立することは、実験動物の倫理的側面からも強く望まれている。そこで、胃に見立てたコンパートメント（モデル胃）に導入するモデル胃液の pH を 1.2~4.0 まで変化させ、小腸に見立てたコンパートメント（モデル小腸）の pH を 1.2~6.5 までモデル膵液によって変化させた後、シリコーン膜を透過した薬物量を測定することによって薬物の消化管吸収を評価できるシステムを構築した。モデル薬物として塩基性で難水溶性のアルベンダゾールを使用して実験した結果、正常な消化管 pH の変化過程を想定した pH1.2→6.5（胃内→小腸内）の条件下では、pH6.5 におけるアルベンダゾールの溶解度よりもはるかに高いアルベンダゾール濃度がシリコーン膜透過回収部で観察され、*in vivo* で起こると想定される pH 変化に伴う過飽和を再現することができた。胃潰瘍時の薬物吸収を想定した pH4.0→6.5 の条件下では、アルベンダゾールの膜透過量は大きく減少したため、本実験結果を胃潰瘍患者にあてはめて考えると、アルベンダゾールを経口投与した時の生体内利用率は健常人よりも低下する可能性のあることが示唆された。

以上、消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルは、胃内 pH の変化に伴う薬物の吸収性がどのように変化するのかを生体内の他の影響因子を排除して検討することができる有用な実験系であることを示した。

以上、原 裕一氏は、本論文において、胃潰瘍時の薬物吸収性を評価するための *in vivo* 実験系として、潰瘍部位や粘膜傷害の程度を制御可能なラット胃漿膜酢酸処理モデルの至適条件を見だし、組織学的、生理学的特徴を明らかにした。さらに、胃潰瘍時の胃内 pH の変化によって薬物吸収性がどう変化するかを消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルを使って予測できることを示した。本研究の成果は、病態時の薬物体内動態の知見を薬物治療計画に生かすことが期待できるものであり、本論文は、薬学研究科課程による博士（薬学）論文に十分値すると判定した。