

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

目次

緒言1
第1章 酢酸胃漿膜適用ラットモデルの作製および各種評価5
第1節 実験方法	
1-1. 実験材料6
1-2. ラットへの酢酸胃漿膜適用処理7
1-3. モルヒネの経口投与実験9
1-4. モルヒネの <i>in vitro</i> 胃粘膜透過実験9
1-5. モルヒネ及びフルオレセインの <i>in situ</i> 胃吸収実験10
1-6. ラット胃組織の観察10
1-7. ラットの全身状態の観察11
1-8. 酢酸胃漿膜適用部位へのエバンスブルーの分布の比較11
1-9. ラット消化管の運動機能の評価11
1-10. ラット胃内の pH の評価12
1-11. 試料中モルヒネ濃度の定量13
1-12. データ解析14
第2節 酢酸 15 秒適用処理ラットを用いた予備的検討15
第3節 酢酸の胃漿膜適用によるラットの全身状態の変化20
第4節 酢酸の胃漿膜適用によるラット胃組織の変化22
第5節 酢酸の胃漿膜適用によるラット消化管の生理的機能の変化24
第6節 小括28

第2章 酢酸胃漿膜適用ラットモデルにおけるアセトアミノフェンの消化管吸収の 化	……30
第1節 実験方法	
2-1. 実験材料	……31
2-2. 実験動物	……31
2-3. アセトアミノフェンの静脈内投与実験	……31
2-4. アセトアミノフェンの経口投与実験	……32
2-5. 血漿中アセトアミノフェン濃度の定量	……32
2-6. データ解析	……32
第2節 酢酸胃漿膜適用ラットモデルにおけるアセトアミノフェンの体内動 態	……33
第3節 酢酸胃漿膜適用ラットモデルにおけるアセトアミノフェンの消化管吸収の 化	……35
第4節 小括	……37
第3章 消化管吸収シミュレーション <i>in vitro</i> モデルを用いた薬物吸収と pH 変化の関係 に関する検証	……38
第1節 実験方法	
3-1. 実験材料	……41
3-2. 消化管吸収シミュレーション <i>in vitro</i> モデルにおける流路内 pH 設 定	……41
3-3. 消化管吸収シミュレーション <i>in vitro</i> モデルへのアルベンダゾール適用実 験	……42
3-4. アルベンダゾール定量条件	……43
3-5. データ解析	……44
第2節 消化管吸収シミュレーション <i>in vitro</i> モデルにおける流路内 pH 変化とアルベ ンダゾールの過飽和溶解	……45
第3節 モデル胃内 pH 変化におけるアルベンダゾールの吸収性の変 化	……47
第4節 小括	……49
結論	……51
謝辞	……55
参考文献	……56

本論文で使用した略語一覧

ABZ: アルベンダゾール

APAP: アセトアミノフェン

AUC: 血中濃度一時間曲面下面積

BSA: ウシ血清アルブミン

CL_{tot} : 全身クリアランス

EB: エバンスブルー

F : バイオアベイラビリティ

HPLC: 高速液体クロマトグラフィー

k_{el} : 排泄速度定数

LC-MS/MS: 高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析器

MAT: 平均吸収時間

MOR: モルヒネ

MRM: 多重反応モニタリング

MRT: 平均滞留時間

NSAIDs: 非ステロイド性抗炎症薬

PBS: 等張リン酸緩衝液

PFA: パラホルムアルデヒド

QOL: クオリティー・オブ・ライフ

V_d : 分布容積

緒言

胃は、上部消化管として食物の消化分解において重要な役割を果たしている。咀嚼された食物は胃内で滞留し、消化され、小腸へ排出されて吸収される。壁細胞より分泌される酸および、消化酵素を含む分泌液は、胃内 pH を下げ、食物を消化・分解する。胃の強力な蠕動運動は食物に機械的刺激を与えて分泌液と食物を混合して消化・分解を促進し、小腸へ内容物を排出する。しかし、薬物の吸収においては、小腸に比較して強固なバリア能を有し、有効面積が小さいため、直接的な薬物吸収への寄与は小さいと考えられている。

一方、こうした胃の生理的機能は薬物の吸収過程において大きく影響する。胃酸の分泌による低い胃内 pH 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塩基性薬物の場合、胃の薬物吸収への寄与は大きい¹⁾。また、薬物を食後に投与する指示は、多くのケースでなされるが、投与された薬剤の体内動態は、先に摂取された食物の影響を受け、胃内容物が胃から排出されるタイミングが、薬物吸収の初期に影響する。すなわち、薬物が、薬物吸収性が低い胃から、薬物吸収が高い小腸上部に移動することで主要な吸収プロセスが開始されるので、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^{2,3)}。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。

胃に疾患を有する患者は多く、胃炎、胃潰瘍など患者の QOL への影響は大きい。また、リウマチやがん性疼痛の治療に伴い、長期間 NSAIDs を使用する患者の半数以上では胃の炎症または、潰瘍等の病変が生じている^{4,5)}。Fukui⁶⁾ は胃潰瘍が生じている患者では胃排出および、酸分泌が低下し、逆にしばしば胃潰瘍と同時に生じる十二指腸潰瘍が生じている患者では胃排出、酸分泌能が亢進する事を報告している。Kanaizumi⁷⁾ は胃潰瘍が存在している時、試験食を摂取した後の患者の胃の蠕動運動が低下すること、特に潰瘍が幽門前庭部に存在している時に低下することを報告しており、胃内で潰瘍が生じている位置により胃の生理的機能に対する影響が異なることを示唆している。Watanabe⁸⁾ は胃癌または、胃潰瘍を有する患者の血中ガストリン値を調べ、胃体部及び、噴門部では、胃の他の部位と比較して腫瘍、潰瘍が生じている時の血中ガストリン値が高値を示していることを示し、胃障害が生じている部位がガストリン分泌能及び、分泌後のネガティブフィードバック機構破綻へ与える影響が異なると考察している。

これらの胃の生理的機能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、複数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。そのため、生じた胃障害が薬物の吸収性に与える影響について系統だった詳細な研究はまだ十分になされていない。よって、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、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。

ラットに胃潰瘍を発症させる実験系は様々な方法が考案されてきたが、胃障害が薬物吸収性に与える影響を評価する用途での使用に対して不相当だと考えられる方法が多い。代表的な胃障害モデルとしては、水浸拘束ストレスモデル⁹⁾の他、アルコール、塩酸を経口投与する方法¹⁰⁾ ヒスタミンを投与する方法¹¹⁾、インドメタシンなどの消化管に副作用を有する薬物を使用した薬剤性の潰瘍モデル¹²⁾などが作製されている。しかし、水浸拘束ストレスモデルでは、類似の強制水泳試験がマウスのうつ病モデル¹³⁾として使用されていることから、動物に対する負担も大きく、胃の障害以外に多様な症状を惹起する可能性があるため、適当ではない。アルコール、塩酸を経口投与する方法は、簡便ではあるが、胃の管腔内全体を傷害するため、潰瘍の発生位置が制御困難であり、潰瘍が生じていなかった場合においても粘膜に何らかの傷害が生じている可能性があり、適当ではない。ヒスタミンを投与する方法はヒスタミンそれ自体が生理的機能である胃酸の分泌を刺激するため、適当ではない。いずれの方法であっても胃内で病変が生じる箇所の限定が困難であり、胃のみならず、小腸など消化管の他の部位に病変が生じる可能性が否定できない^{14,15)}。

胃障害の実験モデルとして、ラット胃漿膜酢酸適用処理モデル¹⁶⁾が考案されている。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ですが、刺激のコントロールにより、病変部位を特定の箇所に限定できること、障害の程度を制御しやすいこと¹⁷⁾が利点として挙げられ、薬物吸収への胃障害の影響を試験するモデルとして適切と考えた。このモデルは、潰瘍の形成から組織の修復過程における組織学的変化の評価¹⁸⁾、炎症性サイトカイン発現変化の評価、上皮成長因子発現変化の評価¹⁹⁾、粘膜下層の微小血管の影響評価等の病態の理解のために用いられている。さらに、プロトンポンプ阻害剤、H₂受容体阻害薬等の各種胃潰瘍治療薬の潰瘍縮小効果の評価に使用^{20,21)}されている。しかし、薬物吸収と胃障害の関係を解析するためにはほとんど用いられていない。本モデルを用いて胃の生理的機能の変化が生じた時の薬物吸収性への影響を明らかにすることは意義深いと考えられる。

消化管の機能については、動物間の種差が大きく、実験動物を用いる研究には限界

がある。また、動物実験を適正に行うとともに可能な限りその数を抑制するという社会のニーズに応える必要がある。それらの状況から、薬物の消化管からの吸収を *in vitro* の実験系で評価する試みがある²²⁻²⁴⁾。しかし、その多くは、粘膜上皮細胞の薬物透過性を評価することに着目したものであり、胃での薬剤からの溶出や消化管内の移動のプロセスをも組み込んだ実験モデルはほとんど存在していない。このようなモデルは、胃の生理的機能やその状態の変化と薬物吸収の関係を考察するうえで、有用なものになると期待できる。

そこで本研究では、まず第1章にて、胃障害のモデルとしてラット胃漿膜酢酸適用処理モデルを用い、酢酸で処理することによる胃の生理的機能やその状態の変化を評価し、第2章において、この胃障害ラットモデルを用いて、アセトアミノフェンの消化管吸収に及ぼす影響を調査した。さらに、第3章において、薬物の消化管からの吸収の影響要因を *in vitro* で評価可能な実験系を用い、胃酸分泌能が低下した、もしくは治療のため胃酸分泌を低下させた条件を再現して、難溶解性塩基性薬物の消化管吸収への影響を考察した。Figure 1 に、本研究で着目する胃の機能と薬物吸収との関係を模式的に示す。

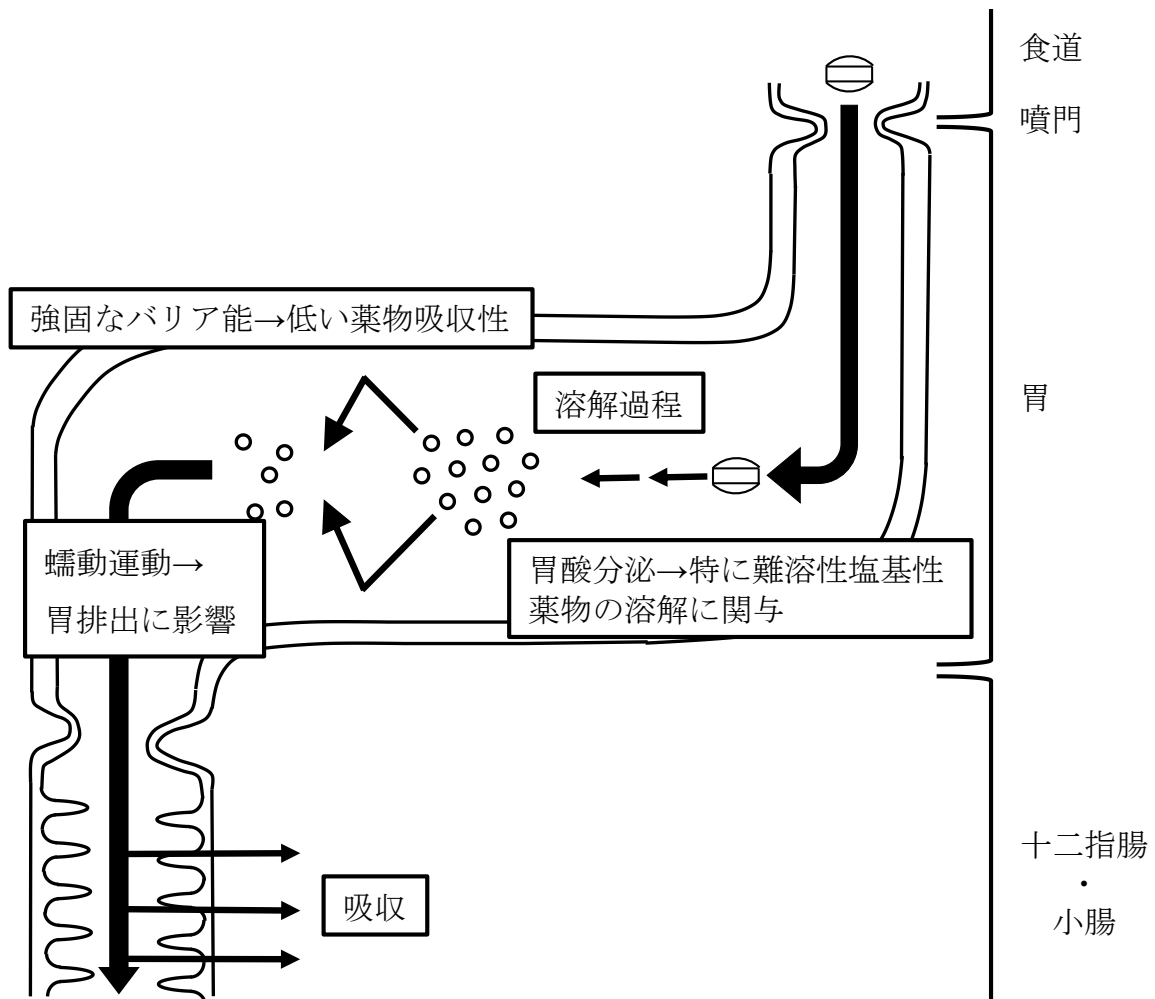


Fig. 1 代表的な胃の機能と薬物吸収との関係に関する模式図

第1章 酢酸胃漿膜適用ラットモデルの作製

酢酸胃漿膜適用ラットモデルではラットを一度開腹し、胃の漿膜表面を酢酸で処理して胃粘膜に潰瘍を誘発するモデルであり、閉腹後しばらく経過した後に実験に使用する。本モデルでの潰瘍形成に関するメカニズムとして考案者の Okabe ら²⁵⁾が、適用した酢酸が漿膜から組織へ浸透し、直接組織を傷害する他に、浸透した酢酸が、組織を維持する微小血管網の血液に含まれるタンパクを変性、凝固させることにより微小血流網を閉塞し、血流を喪失させることによって上皮粘膜組織が維持できなくなり、潰瘍が生じると考察している。そこで、酢酸の接触時間を変化させれば、粘膜上皮組織への傷害が限定的な状態から、潰瘍、更に組織全層を喪失する重症例のラットモデルが作製できるのではないかと考えた。

本章では、薬物消化管吸収に対する胃障害の影響を試験するモデルとして、ラット胃漿膜酢酸適用処理モデルの適合性を評価し、その実験系の確立を試みた。まず、予備検討として処理時間を15秒に固定し、モデル薬物として、水溶性の塩基性難吸収性薬物であり、消化管のバリア機能の低下が吸収性の変化に大きく影響を与えられられるモルヒネ (MOR) を選択し、MOR の吸収性や粘膜透過性を試験するとともに、組織の状態を顕微鏡で観察した。続いて、酢酸適用処理時間を変更し、ラットの全身状態への影響、胃粘膜組織への影響、胃排出能と胃酸分泌能を評価した。

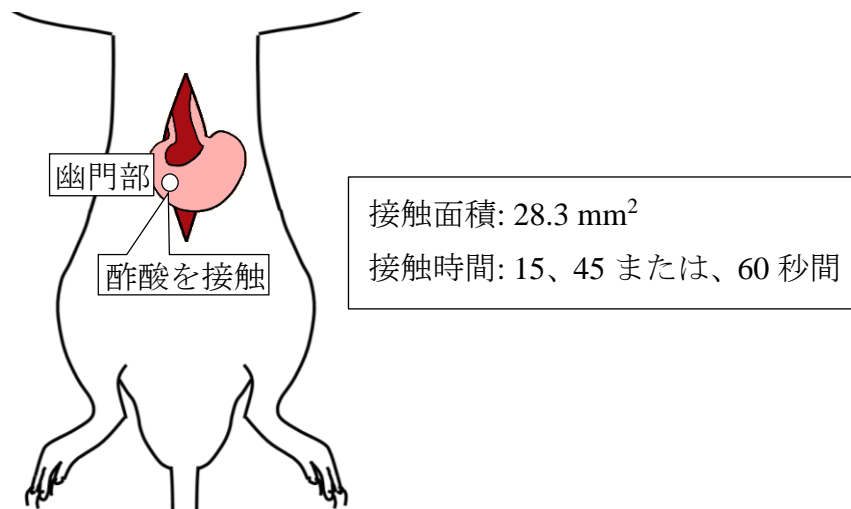
第1節 実験方法

1-1. 実験材料

酢酸 (99.9%)、カバミド酸エチル (1 級)、ギ酸 (LC-MC 用)、酢酸エチル (特級)、水酸化ナトリウム (特級)、フルオレセインナトリウム (特級)、エタノール (特級)、ジメチルスルホキシド (特級)、エタノール (特級)、トラマドール (特級) パラホルムアルデヒド (特級) 及びエバンスブルー (特級) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。メタノール (LC-MS 用)、アセトニトリル (LC-MS 用) は関東化学株式会社 (東京) より購入した。イソフルラン麻酔液はファイザー株式会社 (東京) より購入した。モルヒネ塩酸塩水和物は武田薬品工業株式会社 (大阪) より購入した。マイヤー・ヘマトキシリン液及びエオジン Y (1%) 液は武藤化学株式会社 (東京) より購入した。エオジン Y 液 (1%) はエタノールで 0.25% に希釈して用いた。ゼラチンカプセルは TORPAC Inc. (Fairfield) より購入した。ジルコニアビーズ (直径 0.8 -1.0 mm) はアズワン株式会社 (大阪) より購入した。カゼイン分解物は Bacto™ Tryptone を日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 (東京) より購入した。pH 試験紙は MColorpHast™ pH-indicator strips pH 2.5-4.5 を MERCK 株式会社 (Darmstadt) より購入した。

1-2. ラットへの酢酸胃漿膜適用処理

Wistar 系ラット (SLC:Wistar/ST、雄性、6 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京) より購入し、約 10 日間自由摂食および、自由飲水下で馴化飼育した。酢酸胃漿膜適用ラットモデルの作成は Okabe らの方法¹⁶⁾を参考にした。イソフルラン麻酔下で Wistar 系雄性ラットを開腹し、胃を露出させた。脱脂綿で胃の漿膜側表面の水分を除去してから酢酸を内径 6 mm (接触面積:28.3 mm²) のプラスチック製の筒を押し当て、接触面が円形となるように筒内に酢酸を約 0.2 mL 適用し、15、45 または、60 秒間処理した (Fig. 1e-1)。接触後は、筒内の酢酸を吸引、除去し、更に漿膜表面に残存する酢酸を除去するために生理食塩液で接触部位を洗浄し、閉腹した。なお、処理時間が 45 または 60 秒間であった場合は、閉腹時に肝臓と胃の間にシリコーン製フィルム (40 × 20 mm、膜厚 0.1 mm) を癒着防止のために挿入した。その後 24 時間は自由摂食および、自由飲水とし、処理後 48 時間後に実験に供した。なお、本章で本ラットモデルを用いた実験は事前に城西大学全学動物実験委員会の承認 (承認番号: H25037、H26014、H27012、H28014) を受けたものであり、承認時の計画通りに動物実験を実施し



た。

Fig. 1e-1 ラット胃漿膜の酢酸適用処理の概要図

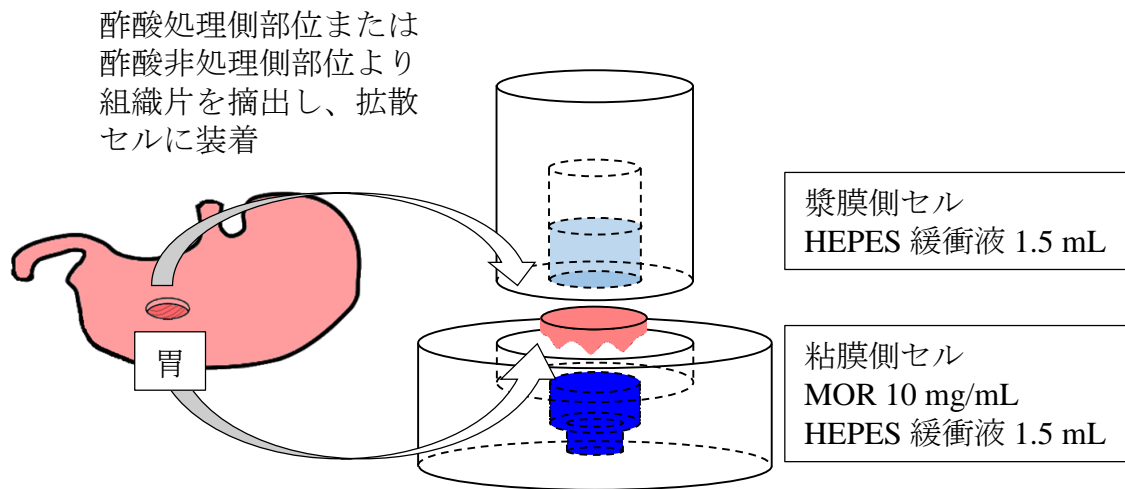


Fig. 1e-2 ラット摘出胃粘膜の透過実験法概要図

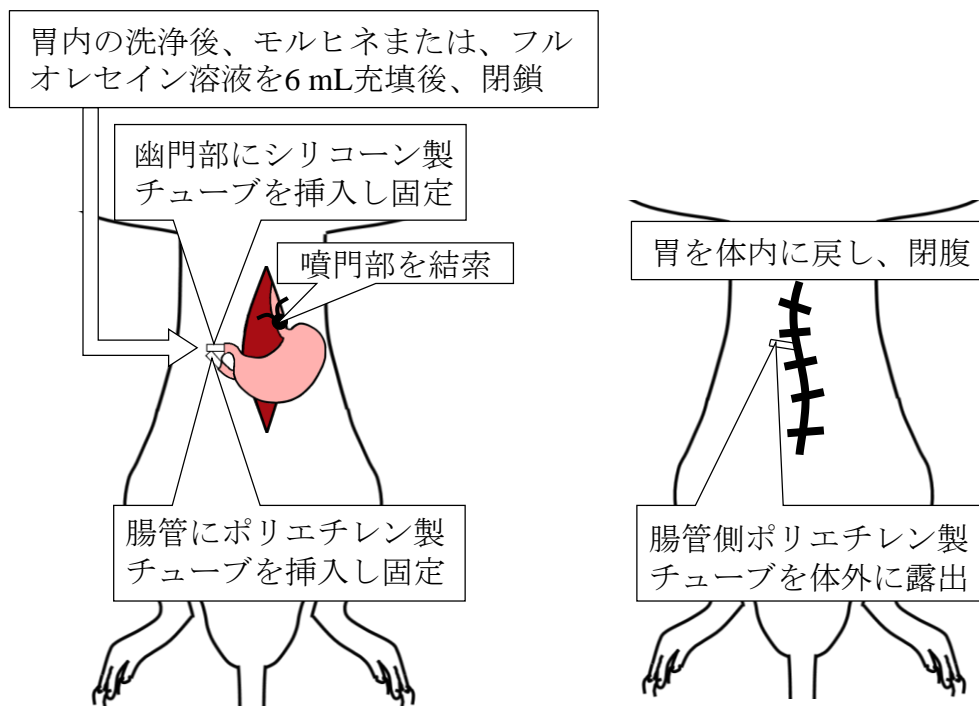


Fig. 1e-3 ラット *in situ* 胃吸収実験法概要図

1-3. モルヒネの経口投与実験

ラットは 1-2.に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。実験の 24 時間前より絶食とした。カルバミド酸エチル麻酔下で MOR 溶液 (10 mg/kg in 150 mmol/L NaCl aq.) を経口投与し、その後、頸静脈より経時的に (0、15、30、45、60、90、120、180、240、360 分) に採血 (200 μ L) を行った。得られた血液試料は遠心分離を行い (21500 g、5 分、4°C) 上清より血漿試料を得た。血漿試料は-20°Cで MOR の測定まで凍結保存した。血漿試料中の MOR 濃度は 1-11.の方法にて定量した。

1-4. モルヒネの *in vitro* 胃粘膜透過実験

ラットは 1-2.に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。アクリル製縦型拡散セルに円形に摘出した胃の組織片を装着した。組織漿膜側セルに HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を、粘膜側セルに MOR 溶液 (10 mg/mL in HEPES 緩衝液) を適用した (Fig. 1e-2)。その後経時的に漿膜側セルより 200 μ L サンプリングを行った。毎回サンプリングを行った直後に薬物を含まない HEPES 緩衝液 200 μ L を漿膜側セルに補充した。得られたサンプルは遠心分離を行い (21500 G、5 分、4°C)、上清を採取した。1-11.の方法で MOR 濃度を測定し、累積透過量を求めた。同様の手順で胃の酢酸非処理部位を用いて透過実験を行い、MOR の累積透過量を求め、比較に用いた。無処理ラットの酢酸適応処理相当部位での MOR 累積透過量を同様に求め、比較した。

1-5. モルヒネ及びフルオレセインの *in situ* 胃吸収実験

ラットは 1-2. に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。実験の 24 時間前より絶食とした。Schanker ら²⁶⁾の方法で *in situ* 胃吸収実験を行った。すなわち、カルバミド酸エチル麻酔下で開腹し、食道の最下部を結索した。胃幽門部より約 2 cm 下部の腸管に切れ込みを作り、胃側にはシリコーン製チューブ（外径 2 mm）を挿入し、手術糸で幽門部に結索し、固定した。腸管側にはポリエチレン製チューブ（外径 2.5 mm）を挿入し、手術糸で結索し、固定した。37°C に温めた生理食塩液 4 mL で胃内を洗浄した。洗浄は生理食塩液の懸濁が認められなくなるまで繰り返した。MOR 溶液（5 mg/mL in 150 mmol/L NaCl aq.）または、フルオレセイン溶液（0.1 mg/mL in 150 mmol/L NaCl aq.）を胃内に 6 mL 充填した後、胃側シリコーン製チューブをジッフェンバッハクレンメで閉鎖し胃を腹腔内に戻し、閉腹した（Fig. 1e-3）。その後、経時的に採血（200 μ L）を頸静脈より行った。血漿中の MOR 濃度は 1-11. の方法で血漿試料を処理し、測定した。血漿試料中のフルオレセイン濃度は試料を等張リン酸緩衝液（PBS、pH 7.4）で適宜希釈し、蛍光分光光度計 RF-5300PC（株式会社 島津製作所、京都、励起波長 491 nm、蛍光波長 513 nm）を用いて測定した。

1-6. ラット胃組織の観察

ラットは 1-2. に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。処理 48 時間後に PBS で 10 分間心還流脱血を行い、続けてパラホルムアルデヒド（PFA、4%）溶液で灌流固定を行った。酢酸適用処理を行ったラット及び、無処理ラットの胃組織を摘出し、OCT コンパウンドに包埋した。組織を 16 μ m に薄切し、スライドガラスに張り付け、HE 染色を行った。すなわち、薄切試料にマイヤー・ヘマトキシリン液を 8 分間浸漬した。続いて流水下に静置し、8 分間発色を行ったその後、エオジン Y 液に 1 分間浸漬して染色を行った。その後エタノール、キシレンで各 2 回脱水・透徹し、封入し、顕微鏡下で観察した。

1-7. ラットの全身状態の観察

ラットを代謝ケージ内で、自由摂食・飲水下で飼育した。24 時間毎に、残存飼料量、残存飲用水量および、体重を測定した。24 時間の摂食量、飲水量は質量変化から求めた。酢酸適用処理前後での食餌量等の変化量を比較した。

1-8. 酢酸胃漿膜適用部位へのエバンスブルーの分布の比較

エバンスブルー溶液 (2% in 150 mmol/L NaCl aq.) を 0.5 mL 静脈内投与した。30 分後にイソフルラン麻酔下で 1-2.に記載した方法で酢酸適用処置を行った。処理 48 時間後に PBS で 10 分間心還流脱血を行い、続けて PFA (4%) 溶液で灌流固定を行った。酢酸適用部位を摘出し (直径 6 mm)、湿重量を量った。ポリプロピレン製サンプリングチューブ (1.5 mL) にジメチルスルホキシド 1.5 mL 及び摘出した組織を入れて遮光し、室温で 16 時間振盪した。その後、分光光度計 U-3000 (株式会社日立製作所、東京) を用いて 639 nm の波長で胃組織からジメチルスルホキシド中に抽出されたエバンスブルー濃度を測定した。

1-9. ラット消化管の運動機能の評価

1) ラット胃からの内容物排出能の評価

ラットは 1-2.に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。実験の 24 時間前より絶食とした。Miyata らの方法²⁷⁾を参考にして、胃の内容物排出能の評価を行った。

ジルコニアビーズ (直径 0.8-1.0 mm) を、20 個ゼラチン製カプセル (size 9) に封入した。無処理のラット及び酢酸適用処理 48 時間後のラットに対して、カプセル及び精製水 0.5 mL を経口投与後、ボールマンケージ (株式会社夏目製作所、東京) でラットを 3 時間拘束した。3 時間後、ラットを頸椎脱臼で屠殺し直ちに開腹し、氷冷下で胃、小腸、盲腸を摘出した。小腸腸間膜を切除した後に、噴門、幽門、小腸を 5 cm 間隔、盲腸直前を結索した。その後、摘出した消化管内のビーズを回収し、計数した (Fig. 1e-4)。

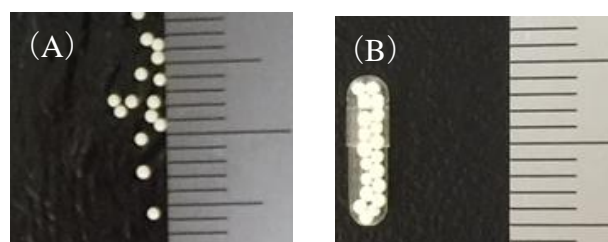


Fig. 1e-4 胃排出の評価法に用いたジルコニアビーズ外観
 (A) ジルコニアビーズ外観、(B) ジルコニアビーズ 20 個を充填したゼラチンカプセル外観、図内の目盛りは 1 mm を示す。

2) ラット小腸蠕動運動の評価

ラットは 1-2.に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。実験の 24 時間前より絶食とした。Suzuki らの方法²⁸⁾を参考にしてラットに生理食塩液で希釈した墨汁を 0.5 mL 経口投与し、ボールマンケージで 30 分間拘束し、頸椎脱臼にて屠殺した。屠殺後直ちに開腹し、氷冷下で小腸を摘出した。小腸腸間膜を切除した後、小腸全長及び墨汁の胃側末端からの到達距離を計測した。墨汁移動距離は、式 1 を用いて求めた。

$$\frac{\text{小腸全長 (cm)}}{\text{墨汁の到達距離 (cm)}} \times 100 = \text{墨汁移動距離 (\%)} \quad (1)$$

1-10. ラット胃内 pH の評価

ラットは 1-2.に記載した方法で胃漿膜酢酸適用処理を行った。実験の 24 時間前より絶食とした。ゼラチンカプセルにカゼイン分解物を 13 mg 充填した。ラットにこのカプセルと精製水 1 mL を経口投与した。投与後ボールマンケージでラットを拘束し、15 分後に頸椎脱臼にて屠殺した。屠殺後直ちに開腹し、胃の噴門、幽門部を手術糸で結索した。噴門部に手術用メスを用いて切り込みを作り、pH 試験紙を挿入して胃内側面 pH を測定した。

1-11. 試料中モルヒネ濃度の定量

ポリプロピレン製サンプリングチューブ (1.5 mL) に試料 50 μ L、水酸化ナトリウム水溶液 (1 mol/L) 10 μ L、メタノール水溶液 (50%、v/v) 10 μ L、内部標準物質 (トラマドール塩酸塩) 含有酢酸エチル (200 ng/mL) 600 μ L を混合した。その後、15 分間激しく混和した。その後、遠心分離 (21500 g、5 分、4°C) を行い上層の酢酸エチル層 400 μ L を別のポリプロピレン製サンプリングチューブ (0.6 mL) に移した。有機層を移した後、溶媒を窒素気流下で留去した。溶媒を留去したサンプリングチューブに移動相 (メタノール/アセトニトリル/超純水、70/10/20、v/v/v、0.1%となるようにギ酸を加えて調製) 移動相を 200 μ L 分注、攪拌し、測定に用いた。

測定は LC-MS/MS を用いて行った。用いた LC-MS/MS 機器構成はシステムコントローラー CBM-20A (株式会社 島津製作所、京都)、送液ユニット LC-20A (株式会社 島津製作所、京都)、オートインジェクタ SIL-20AC (株式会社 島津製作所、京都)、カラムオープン CTO-20AC (株式会社 島津製作所京都) に API 4000 QTRAP (株式会社エービー・サイエックス、東京) を接続して用いた。操作及び、測定は Analyst[®]1.5.1 (株式会社エービー・サイエックス、東京) を用いた。カラムは Kinetex[®]EVO C18 (150 mm \times 2.1 mm、5 μ m、Phenomenex Inc.、California) に Mightysil[®]RP-18GP (関東化学株式会社、東京、2.0 \times 5.0 mm、5 μ m) ガードカラムを接続し、50°C に保って用いた。移動相は 0.2 mL/min で送液した。MS/MS は、ポジティブイオンモード及び、MRM モードで使用した。定量に用いたプロダクトイオン及びプリカーサーイオンの質量電荷比 (m/z) は、MOR では 286.122 \rightarrow 152.100、トラマドールでは 265.139 \rightarrow 58.000 のイオンをそれぞれ選択した。MS/MS のチューニングパラメーターは、MOR のプロダクトイオン及び、プリカーサーイオンの検出に最適化し、Table 1 の数値とした。

Table 1 タンデム型質量分析装置部の MOR 測定条件設定値

Curtain gas	20 psi
Collision gas	8 psi
Ion spray voltage	5500 V
Temperature	500 °C
Ion source 1 gas	30 psi
Ion source 2 gas	40 psi
Declustering potential	76 eV
Entrance potential	10 eV
Collision cell potential	10 eV

1-12. データ解析

データは、平均値±標準誤差で表記した。対応のない 2 群間では student *t* 検定を行った。対応のある 2 群間比較では paired *t* 検定を行った。3 群間での比較では、無処理群に対する Dunnett 検定を行った。いずれの検定においても $p < 0.05$ をもって有意差があるものとした。

酢酸適用処理が摂食量、飲水量及び、体重推移に与える影響は、酢酸適用処理を行った日より過去 5 日分のそれぞれの推移より平均値及び、95%信頼区間を求め、酢酸適用処理を行った翌日以降の摂食量、飲水量及び、体重推移と比較した。

第2節 酢酸 15 秒適用処理ラットを用いた予備的検討

実験全体を推進するのに先立ち、予備的な検討として、酢酸適用処理時間を 15 秒に固定し、モデル薬物として MOR を選択してその吸収性や粘膜透過性を試験するとともに、組織の状態を顕微鏡で観察した。

MOR の経口投与実験は、カルバミド酸エチル麻酔下での実験とした(実験方法 1-3.)。Figure 2 に無処理のラットと酢酸 15 秒適用処理ラットでの経口投与後の MOR の血中濃度推移を示す。胃障害ラットモデルでは、初期の血中濃度は同等であったものの、血中濃度は全体として低く推移した。その原因については、胃の蠕動運動による胃排出の低下が考えられたが、これは麻酔の影響を受けることが考えられるため、以後の検討では、可能な範囲で無麻酔下での試験を行った。

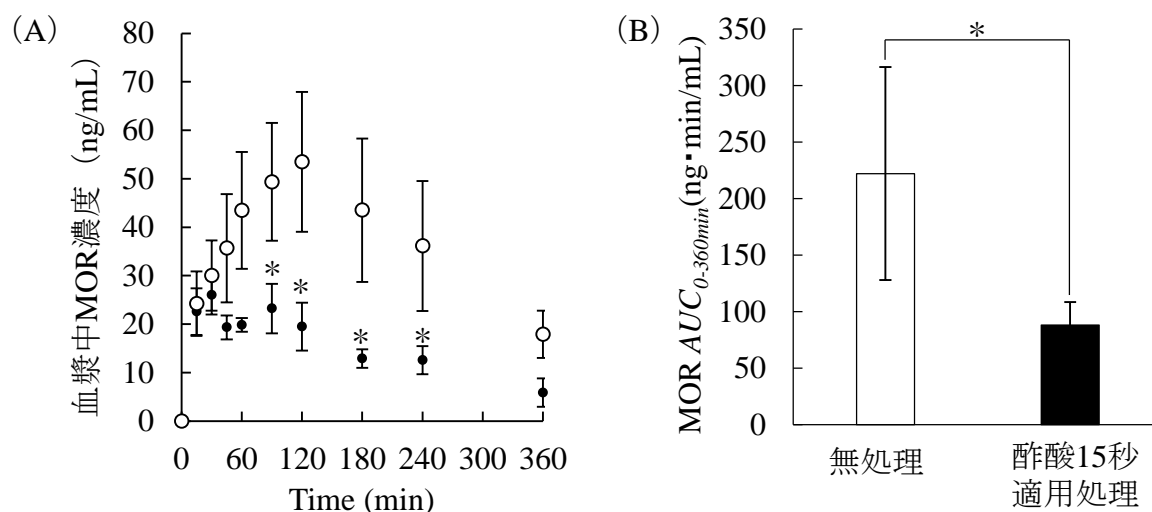


Fig. 2 ラットの MOR 経口投与後の吸収性に対する酢酸 15 秒適用処理の影響
(A) MOR 経口投与後の血漿中濃度推移、○、無処理ラット (n=4)；●、酢酸 15 秒適用処理ラット (n=3)、(B) MOR AUC_{0-360h} の比較、* $p < 0.05$ 、student's t 検定

酢酸 15 秒適用処理ラットでの胃の粘膜自体のバリア能変化を評価する目的で、摘出胃粘膜を用いた *in vitro* 透過実験を行った (実験方法 1-4.)。実験に際し、無処理のラットと酢酸適用処理したラットを使用し、処理部位 (無処理の場合対応する部位) の MOR 透過性と、その反対側の粘膜の透過性を比較した。その結果を Fig. 3 に示す。無処理のラットの場合、各ラットの胃の部位間で MOR の透過性に有意な違いは認められなかったが、酢酸適用処理ラットでは、処理を行った障害がある部位で透過が高く、非適用処理部と比較して、有意な差が認められた。

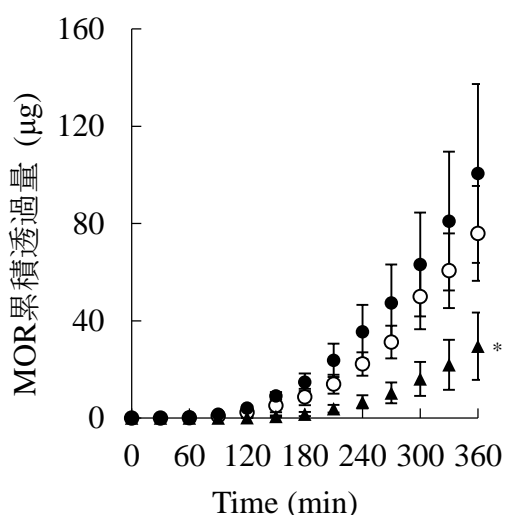


Fig. 3 摘出胃粘膜を用いた MOR の *in vitro* 透過性における酢酸 15 秒適用処理の影響

○、無処理ラット酢酸適用処理相当部位 (n = 3) ; ●、酢酸 15 秒適用処理部位 (n = 3) ; ▲、酢酸 15 秒非適用処理部 (n = 3)

平均±S.E.、* $p < 0.05$ 、Dunnett 検定 (無処理群に対して)

MOR 吸収に対する胃の血流などの影響も考慮するため、胃からの *in situ* 吸収実験を行った (実験方法 1-5.)。 *In situ* 実験において、血中濃度推移で結果を評価する場合、胃障害に伴う全身状態の変動なども結果に組み込まれるため、代謝機能の影響を排除するため、モデル薬物として、フルオレセインを加えた。 MOR での *in situ* 吸収実験の結果を Fig. 4 に、フルオレセインでの結果を Fig. 5 にそれぞれ示す。 MOR の吸収の場合、酢酸適用処理ラットにおいて血中濃度が高く、 *in vitro* での結果を考慮すると、バリア能の低下が吸収増加につながったように考えられるが、フルオレセインの結果では差がなく、この MOR での酢酸適用処理での血中濃度の上昇傾向は、代謝機能の変化など他の要因によることが考えられる。 その為、 *in vitro* では関わらない要因、例えば障害による血流の低下なども吸収に関わることが推察された。

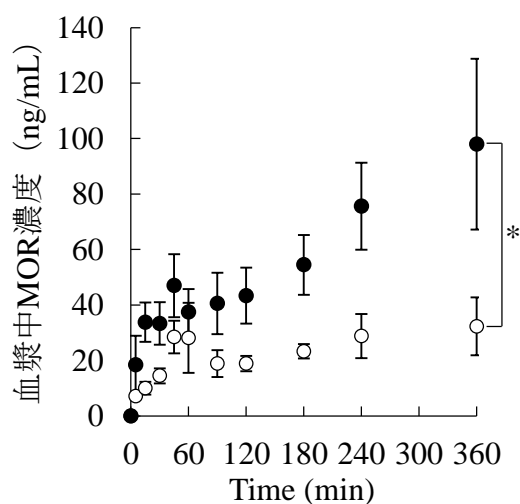


Fig. 4 MOR の *in situ* 吸収実験における酢酸 15 秒適用処理の影響

○、無処理ラット (n=4) ; ●、酢酸 15 秒適用処理ラット (n=5)、
平均±S.E.、* $p < 0.05$ 、Student's *t* 検定

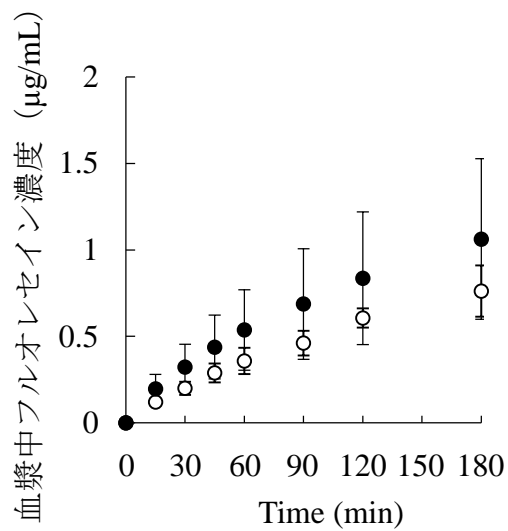
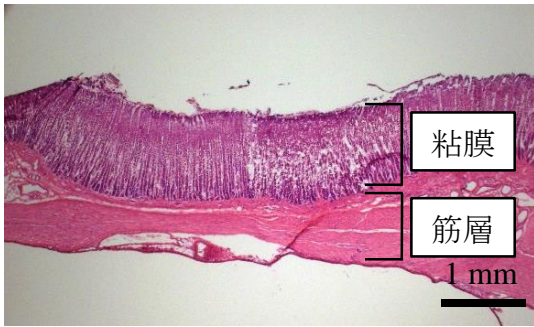


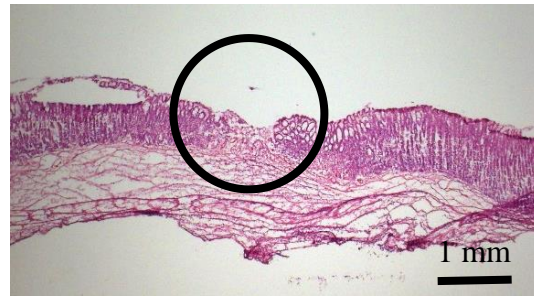
Fig. 5 フルオレセインの *in situ* 吸収実験における 15 秒間胃漿膜酢酸前処理の影響

○、無処理ラット (n=3) : ●、酢酸 15 秒適用処理ラット (n=4)、
平均±S.E.

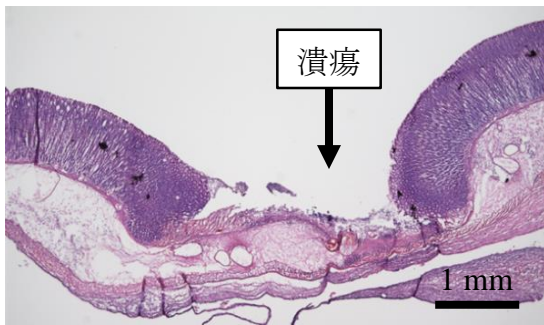
予備検討におけるこれまでの結果を考えた時、酢酸 15 秒適用処理において実際にどの程度の組織障害が生じているか評価することが不可欠と考えた。そこで、酢酸適用処理ラットについて、処理 48 時間後の組織の状態を観察した (実験方法 1-6.)。その結果を Fig. 6 に示す。酢酸を胃漿膜に 15 秒間処理し、その 48 時間後の胃粘膜組織を観察した結果、胃組織の筋層が消失し、粘膜下層に浮腫が生じていたが、その障害の程度が、潰瘍を生じるには至らず、軽微であることが確認できた。



生理食塩液15秒適用処理



酢酸15秒適用処理



酢酸45秒適用処理

Fig. 6 酢酸を胃漿膜に 15 または、45 秒間適用処理し、その後 48 時間経過したラット胃粘膜組織
 図中黒色円は酢酸適用処理の結果、粘膜上皮に生じた障害の発生を示す。

これまでの結果から、a) 酢酸 15 秒適用処理は強い障害を引き起こさないこと、b) 麻酔は消化管機能に影響を与えることが懸念されること、c) 胃の障害は多様な変化を引き起こすことから可能な限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。そこで以後の検討では、酢酸の適用処理時間を変化させ、酢酸適用処理時を除き、可能な範囲で無麻酔下の実験を行うこととした。

第3節 酢酸の胃漿膜適用処理によるラットの全身状態の変化

予備検討の結果から、酢酸の適用処理時間を 15 秒から 60 秒に変化させ、その影響をラットの全身的な状況変化を観察することにより評価した。すなわち、適用処理後のラットの摂食量、飲水量、体重の経時的変化を比較した（実験方法 1-7.）。その結果を Fig. 7 に示す。酢酸適用処理時間が 15 秒では、摂食量と飲水量が処理翌日有意に低下したが ($p < 0.05$)、その後回復し、体重の明確な低下は認められなかった。一方、酢酸の適用処理時間が 60 秒では、摂食量と飲水量がより長い期間低下した。しかし、酢酸適用処理時間 60 秒のラットでは、体重が低下し続け、実験途中で死亡した個体もあったことから、以降の検討においては、15 秒と 60 秒の間の 45 秒間の酢酸適用処理も条件として加えて比較することとした。

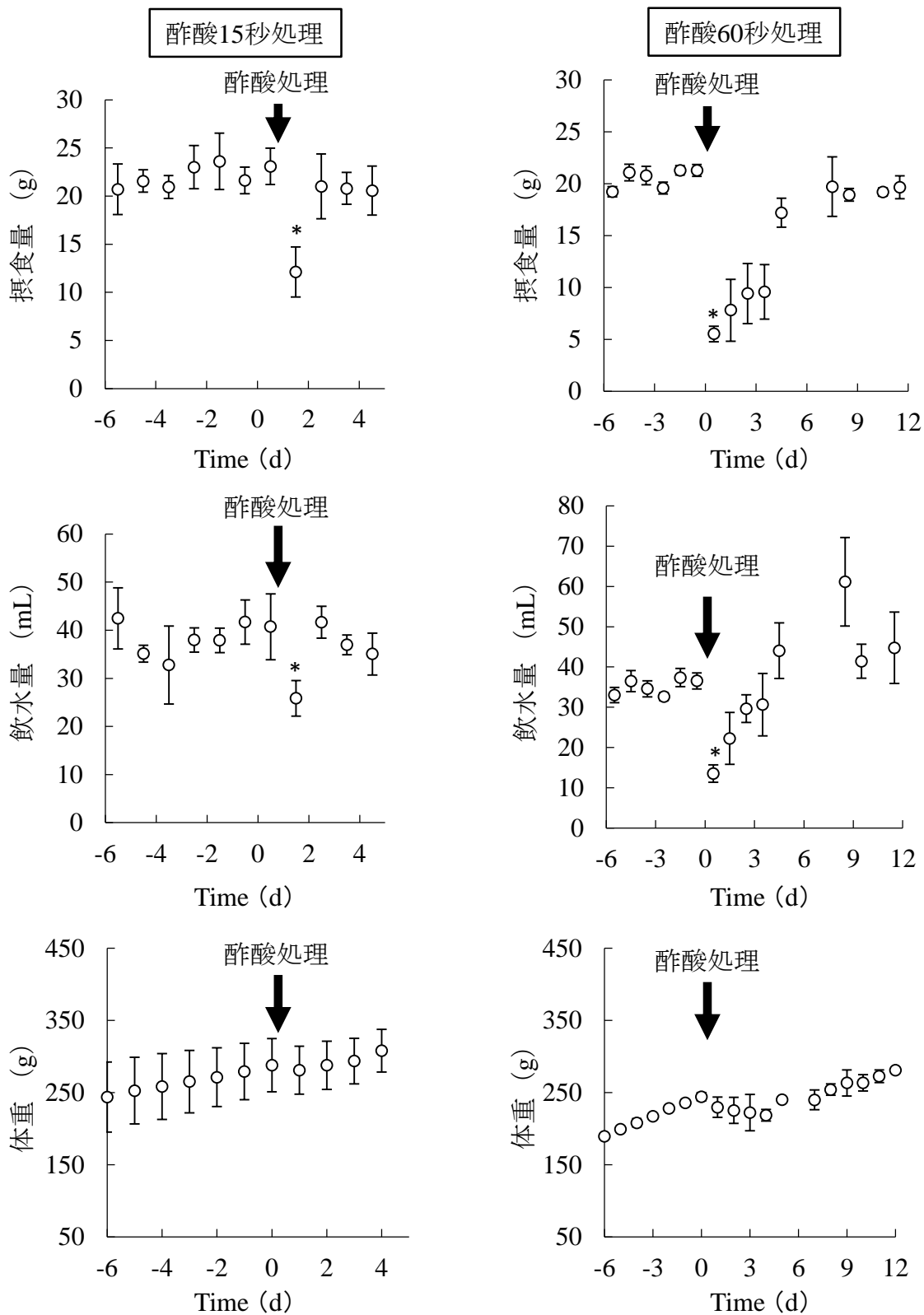


Fig. 7 酢酸 15 秒適用処理または 60 秒適用処理後のラットの摂食量、
 飲水量、体重の経時的変化
 n = 3-4、平均±S.E、* $p < 0.05$

第4節 酢酸の胃漿膜適用処理によるラット胃組織の変化

予備検討での 15 秒適用処理と同様の操作法で、ラット胃漿膜の酢酸で適用処理時間を 45 および、60 秒間とし、その後 48 時間経過後の組織を観察した。その結果を Fig. 8 に示す。酢酸 45 秒適用処理では、粘膜に潰瘍が生じていることが確認できた (Fig. 6)。一方、酢酸 60 秒処理では粘膜に穿孔が生じることが確認できた。前節での 60 秒適用処理での死亡例なども、この胃穿孔によると考えられた。

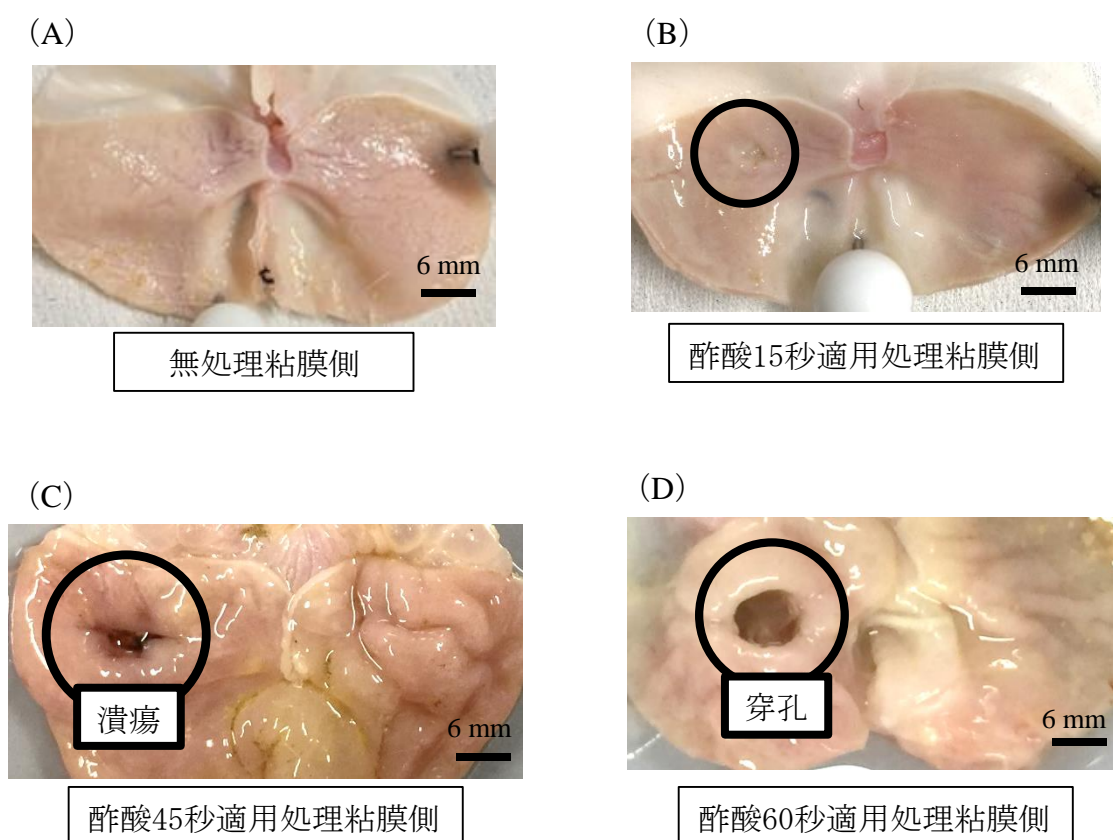


Fig. 8 ラットの胃漿膜に酢酸を 15 (B)、45 (C)、または 60 秒適用処理 (D) した 48 時間経過後の胃粘膜外観変化
図中黒色円で示した部位の漿膜側より酢酸を接触した。

血中に投与されたエバンスブルー (EB) はアルブミンとほぼ全てが結合し、血管外組織に分布しないため、組織中のエバンスブルー量は血管透過性を反映する^{29,30)}。その為、ラットの胃漿膜酢酸適用処理の血管透過性に対する影響を定量的の評価に用いた (実験方法 1-8.)。

その結果を Fig. 9 に示す。処理時間は、15 秒、45 秒、60 秒とした。15 秒適用処理群では、無処理群と比較しエバンスブルーの胃障害部位組織の分布量は 1.6 倍程度に増加し、45 秒適用処理では 10 倍以上のさらに高いエバンスブルーの分布が確認された ($p < 0.05$)。酢酸適用処理により、炎症が生じ、その過程で血管透過性の亢進が生じたと考えられる。一方、60 秒適用処理では 45 秒適用処理と比べると低い分布となったが、これは過度な傷害による組織血管構造の喪失もしくは組織の脱落がもたらしたと考えられた。処理時間の違いにより、組織障害が多様に変化することを、組織観察とエバンスブルーの分布実験で明確にすることが可能であることが示された。

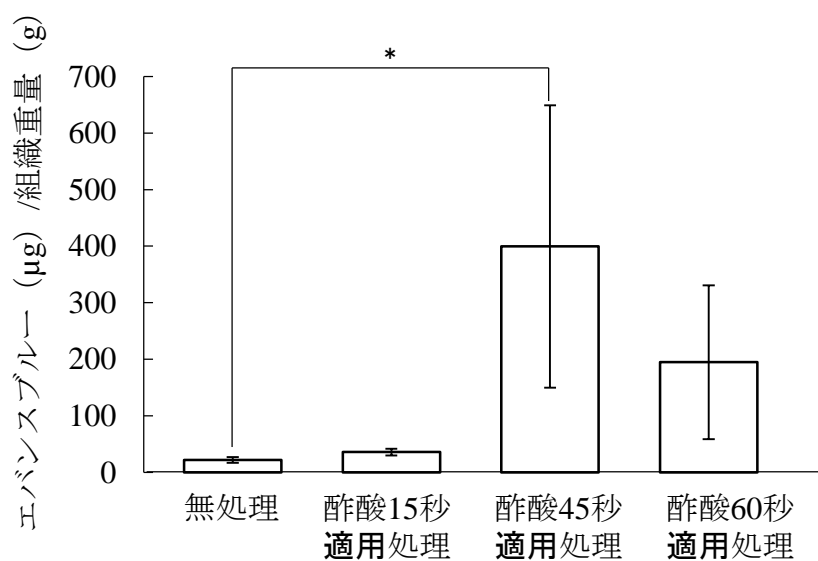


Fig. 9 ラットの胃漿膜を酢酸で 15、45 および、60 秒適用処理後 48 時間経過時点の損傷部位胃粘膜組織へのエバンスブルーの分布への影響
n = 3、平均±S.E、* $p < 0.05$ 、Dunnett 検定 (無処理群に対して)

第5節 酢酸の胃漿膜適用処理によるラット消化管の生理的機能の変化

胃の生理的機能として、内容物排出機能と胃酸分泌機能に着目し、それらに及ぼす酢酸胃漿膜適用処理の影響を評価した。

内容物の胃排出能の評価として、まず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（実験方法 1-9.-1）。その結果を Fig. 10 に示す。無処理のラットの場合、ジルコニアビーズの胃内での残存数は少なく、その多くは、小腸内や盲腸まで輸送されていた。一方、酢酸適用処理したラットにおいては、胃内でのビーズの残存数が多く、胃排出が低下していることが示唆された。興味深いことに、酢酸適用処理群で胃排出されたビーズは、無処理のラットと同様に小腸内を移動していた。この結果は、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る。以上のことから、酢酸適用処理を行ったラットでの胃排出の変化が、局所性の障害に基づく機能低下であることが示唆された。

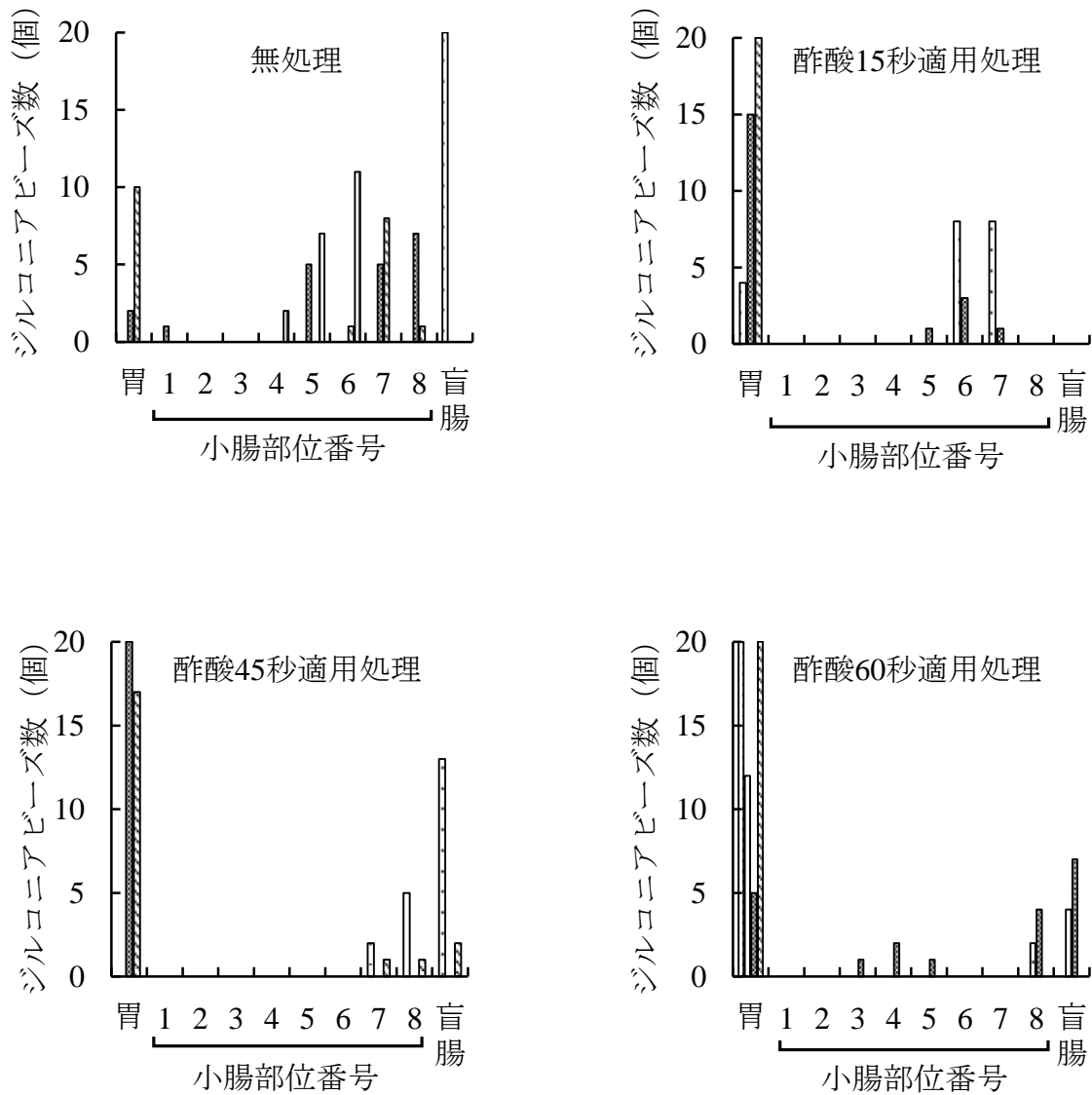


Fig. 10 胃内ジルコニアビーズの排出能に対する酢酸適用処理時間の影響
 小腸内ジルコニアビーズは小腸を 5 cm 間隔で分割し、分割した部位のビーズ数で評価した。小腸部位番号は胃に最も近い部位を 1 とし、以後は順番に割り振った。

胃漿膜酢酸適用処理による小腸の蠕動運動の変化の有無を確認するため、酢酸適用処理 15 秒のラットを用いて、墨汁の小腸内移動を比較した（実験方法 1-9-2）。墨汁は液体として振る舞い、胃排出が直ちになされるため、墨汁の移動距離が小腸蠕動運動の活動性を反映すると考えた。その結果を Fig. 11 に示す。酢酸適用処理による墨汁の消化管移動において、無処理群と有意な差は認められなかった。小腸の蠕動運動は、酢酸適用処理ラットで変化しておらず、胃の酢酸適用処理による胃排出の低下が、局所的な作用によることがこの結果からも支持された。

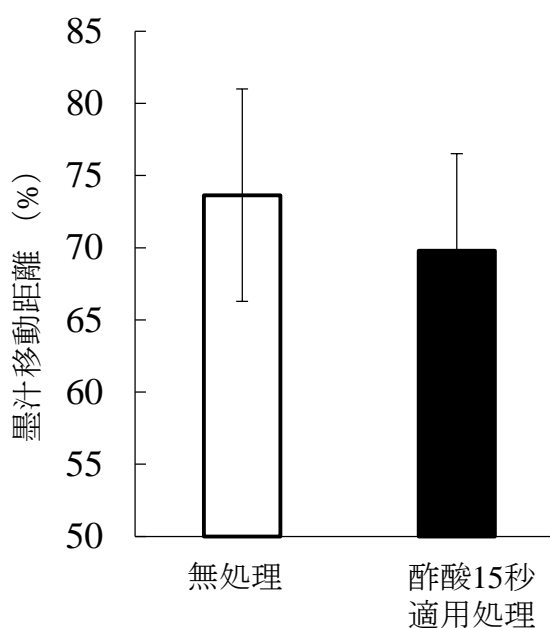


Fig. 11 小腸の墨汁移動距離に対する酢酸 15 秒処理の影響
n = 3、平均±S.E

胃酸分泌機能については、pH 試験紙を用いた試験を行った (実験方法 1-9.)。胃は組織に機械的刺激が加わったり、タンパク質投与されると胃壁の G 細胞よりガストリンが分泌され、胃酸分泌の促進が行われる^{8,31,32)}。その為、タンパク源としてカゼイン分解物を投与した後、胃内容物の pH を直接測定、比較することにより、酸分泌能を評価することができると考えた。その結果を Fig. 12 に示す。無処理ラットの胃内 pH は、 2.7 ± 0.2 (S.E.) であったが、酢酸適用処理の時間の延長に伴い、測定値は上昇し、酢酸 15 秒適用処理ラットでは 3.7 ± 0.1 、酢酸 45 秒適用処理ラットでは 4.2 ± 0.1 となった。酢酸適用処理による胃の機能障害により、酸分泌能が低下していると考えられた。

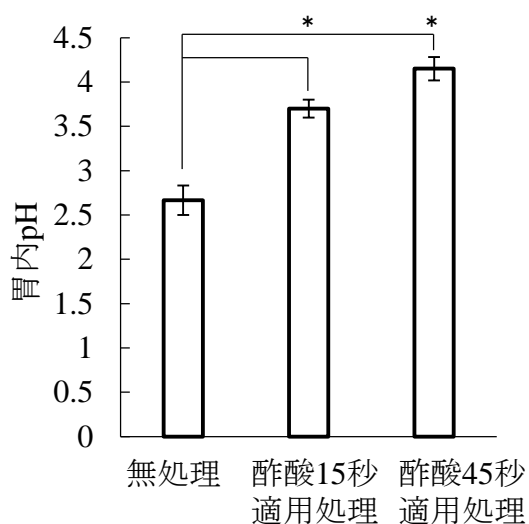


Fig. 12 胃漿膜の酢酸処理が胃内 pH に与える影響
n = 3、平均±S.E.、* $p < 0.05$ 、Dunnett 検定 (無処理群に対して)

第6節 小括

本章ではラットの胃漿膜に酢酸を適用するモデルについて検討を行った。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が容易であり、例えば病変部位を特定な箇所限定できること、適用時間によって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。本章では、まず、予備検討として処理時間を15秒に固定し、MORの吸収性や粘膜透過性を試験するとともに、組織の状態を顕微鏡で観察した。

まず予備的な検討として、MORの血中濃度推移を比較した。酢酸15秒適用処理ラットでは、血中濃度は全体として低く推移した。そこで更なる検討として、胃粘膜自体の透過性もしくは胃からの吸収の変化を*in vitro*実験系と*in situ*実験系を用いて評価した。これらの結果から、障害により、酢酸適用処理部位でのバリア機能は低下し、MOR透過性は亢進し胃での吸収性は増大していたが、フルオレセインの胃での吸収性に変化はなく、血流の低下などの吸収を低下させる要因も同様に生じていると考えられた。そのため、消化管全体に及ぶ影響について試験していくためには、実験条件を精査する必要があると考えられた。また、予備検討として選択した15秒処理の条件は、比較的緩和であり、潰瘍の影響などを調べるためには、処理条件を変更する必要があることも示された。

上述の予備検討の結果から、a) 酢酸適用処理時間の延長が必要なこと、b) 麻酔は消化管機能に影響を与えることが懸念されることから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と考えた。

ラットの全身状態への影響を試験した。酢酸の処理時間が15秒と比較して、酢酸の処理時間が60秒では、摂食量と飲水量がより長い期間低下し、体重の変化も認められた。

酢酸適用処理時間の延長により、組織の障害の程度は重症化し、45秒適用処理では潰瘍が、60秒処理では一部の例で穿孔が生じることが確認された。炎症の指標であるエバンスブルーの分布量は、最大値は45秒処理で観察され、60秒適用処理では逆に低下した。60秒適用処理では酢酸適用部位に穿孔が生じており、酢酸適用処理によって組織の脱落が生じた結果、エバンスブルーの分布が低下したと考えられた。

酢酸適用処理による胃の機能変化を、胃排出能と胃酸分泌能を試験することによって評価した。内容物の小腸への排出機能の評価するため、無処理のラットの場合、小腸内とさらに遠方の盲腸などに輸送されていたのに対して、酢酸適用処理したラット

においては、胃排出能が低下していることが示唆された。小腸の蠕動運動を比較した時、無処理のラットおよび酢酸適用処理を行ったラットでは差は生じなかった。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、そのことから、胃排出の変化が、局所性の障害に基づく機能低下であることが示唆された。

酢酸適用処理による胃のもう一つの機能変化として、胃酸分泌能を試験した。その結果、酢酸適用処理による胃酸分泌能の低下が示された。

以上、ラット胃漿膜酢酸適用処理モデルについて検討を行った結果、酢酸 45 秒処理とその後の 48 時間の飼育によって、潰瘍を生じさせることができること、その病態において、胃の酸分泌能を抑制し、また胃の蠕動運動のみを抑制し、胃排出能が低下した。

第2章 酢酸胃漿膜適用ラットモデルにおけるアセトアミノフェンの消化管吸収の変化

前章において、ラット胃漿膜酢酸適用モデルを確立し、その特徴づけを行った。アセトアミノフェン (APAP) は、解熱鎮痛剤として汎用されている薬剤であるが、胃でほとんど吸収されず、小腸で速やかに吸収されるため³³⁾、胃内容物の排出速度を評価する試験薬としても一般に用いられている³⁴⁻³⁶⁾。本研究での胃障害モデルでは、前章に示した通り、胃排出が遅延しており、その影響が APAP の経口投与後の血中濃度推移に現れると考えられる。

本章では、このラットモデルを用いて、APAP (Fig. 13) の消化管吸収に及ぼす胃障害の影響を調査した。胃漿膜を 45 秒酢酸で処理したラットについて、APAP 静脈投与後の体内動態を無処理のラットと比較した。さらに、無処理ラットと酢酸 45 秒適用処理ラットに対して APAP をカプセルに充填し、経口投与して、その血中濃度プロファイルから吸収過程を速度論的に解析した。

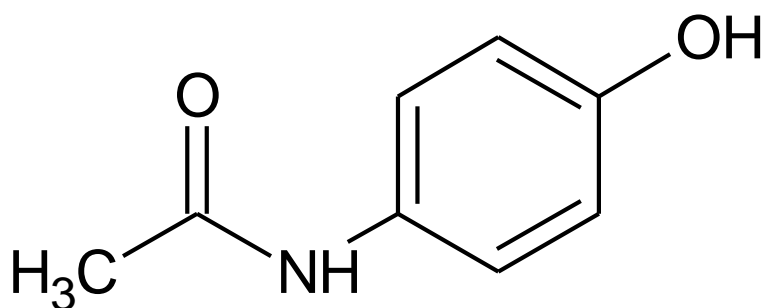


Fig. 13 APAP の化学構造

第1節 実験方法

2-1. 実験材料

APAP 原末はピリナジン末®を日本ジェネリック株式会社（東京）より購入した。カフェイン（特級）は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。ゼラチンカプセルは TORPAC Inc.（size 9、Fairfield）より購入した。

2-2. 実験動物

Wistar 系ラット（SLC:Wistar/ST、雄性、6 週齢）を三協ラボサービス株式会社（東京）より購入し、約 10 日間自由摂食、飲水下で馴化飼育した。イソフルラン麻酔下で、ラットを開腹し、胃を露出させた。脱脂綿で胃の漿膜側表面の水分を除去してから酢酸を内径 6 mm（接触面積 28.3 mm²）のプラスチック製の筒を押し当て、接触面が円形となるように筒内に酢酸を適用し、45 秒間処理した。処理後は、生理食塩液で酢酸適用処理部位を洗浄し、閉腹した。その後 24 時間は、自由摂食とし、処理後 48 時間後に実験に供した。実験 24 時間前に頸静脈にカニューレを設置し、絶食を行った。

なお、本章で本ラットモデルを用いた実験は、事前に城西大学全学動物実験委員会の承認（承認番号：H28014）を受け、承認時の計画通りに、実施した。

2-3. アセトアミノフェンの静脈内投与実験

ラットをボールマニケージで拘束し、APAP 水溶液（0.5 mg/body, 1 mg/mL）をカニューレより投与した。その後、経時的（0、15、30、45、60 分）に採血（500 μL）を行った。得られた血液試料は遠心分離を行い（21500 g、5 分、4°C）、上清より血漿試料を得た。2-5.に記載した方法で HPLC を用いて血漿試料中の APAP 濃度を測定した。

2-4. アセトアミノフェンの経口投与実験

ゼラチン製カプセルにピリナジン末を 5 mg 封入した。カプセル及び精製水 0.5 mL を経口投与後、ボールマンケージでラットを拘束した。その後、経時的 (0、15、60、120、300 分) にカニューレより採血 (500 μ L) を行った。得られた血液試料は遠心分離を行い (21500 g、5 分、4°C)、上清より血漿試料を得た。

2-5. 血漿中アセトアミノフェン濃度の定量

ポリプロピレン製サンプリングチューブ (0.6 mL) に血漿試料 100 μ L、内部標準物質 (カフェイン) 含有アセトニトリル (25 μ g/mL) 100 μ L を混合した。その後、5 分間激しく混和した。混和した後、遠心分離 (21500 G、5 分、4°C) を行い上清 100 μ L を別のポリプロピレン製サンプリングチューブ (0.6 mL) に移した。上清を移した後、精製水を 100 μ L 加えて攪拌し、測定に用いた。

測定は HPLC を用いて行った。用いた HPLC 機器構成はシステムコントローラー CBM-10A (株式会社 島津製作所、京都)、送液ユニット LC-10A (株式会社 島津製作所、京都)、オートインジェクタ SIL-10Avp (株式会社 島津製作所、京都)、カラムオーブン CTO-10A (株式会社 島津製作所、京都) 及び、紫外可視吸光度検出器には SPD-10A (株式会社 島津製作所、京都) を波長 254 nm に設定して用いた。記録、分析には Smart Chrom (株式会社 ケーワイエーテクノロジー、東京) を用いた。

カラムは、Mightysil[®] RP-18GP (250 mm \times 4.6 mm、5 μ m、関東化学株式会社、東京) に Mightysil[®] RP-18GP (5 μ m、関東化学株式会社、東京) ガードカラムを接続し、50°C に保って用いた。移動相はメタノール/リン酸緩衝液 (pH 6、50 mmol/L) (1/4、v/v) を 1.0 mL/min で送液した。

2-6. データ解析

データは、平均値 \pm 標準誤差で表記した。2 群間比較では student's *t* 検定を行った。 $p < 0.05$ で有意差があるものとした。

第2節 酢酸胃漿膜適用ラットモデルにおけるアセトアミノフェンの体内動態

酢酸で胃の漿膜を処理したラットは、翌日の摂食量が減少するなど影響を受ける。処置後 48 時間経過後では、摂食量は回復するが、薬物の処理能力や分布特性において、影響が懸念される。そこで、胃漿膜を 45 秒酢酸で処理したラットについて、静脈内投与後の体内動態を無処理のラットと比較した（実験方法 2-1.）。

胃漿膜を 45 秒酢酸で処理したラットと無処理のラットに APAP を急速静脈内投与した後の APAP の血漿中濃度推移を Fig. 14 に示す。酢酸適用処理したラットと無処理のラットで、APAP の血漿中濃度推移に有意な差はなく、酢酸適用処理が APAP の分布特性や消失特性に、影響しないことが確認できた。全身クリアランス (CL_{tot})、分布容積 (V_d)、消失速度定数 (k_{el}) の値をそれぞれ Table 1 に示す。

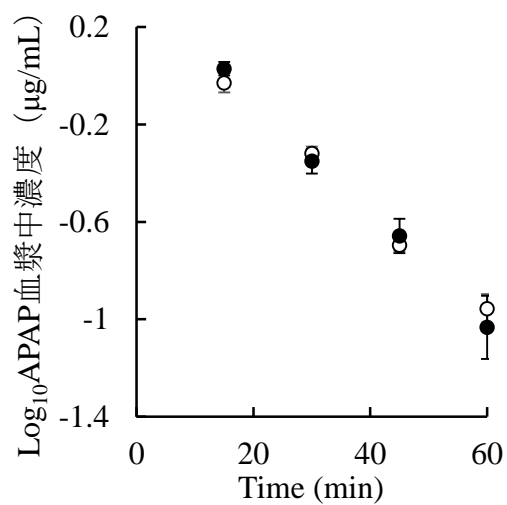


Fig. 14 APAP をラットに急速静脈内投与した後の血漿中濃度推移に対する酢酸 45 秒適用処理の影響

○、無処理ラット (n = 3) ; ●、酢酸処理ラット (n = 3)、 \log_{10} 平均 \pm mean

Table 1 静脈内投与後の血漿中濃度推移より求めたラットの APAP の体内動態パラメータ

(n=3)			
	V_d (mL)	CL_{tot} (mL/min)	K_{el} (min^{-1})
	平均 \pm S.E.	平均 \pm S.E.	平均 \pm S.E.
無処理	257.1 \pm 26.3	12.64 \pm 1.62	0.049 \pm 0.002
酢酸適用処理	213.5 \pm 14.0	11.24 \pm 0.84	0.0536 \pm 0.009

第3節 酢酸胃漿膜適用ラットモデルにおけるアセトアミノフェンの消化管吸収の変化

酢酸で胃の漿膜を処理したラットは、胃内容物の排出能が低下していることを前章で明らかにした。そこで、APAPのカプセル剤を調製し、胃漿膜を45秒酢酸で処理したラットに対して、経口投与実験を行い、無処理のラットと比較した(実験方法2-2.)。

胃漿膜を酢酸で処理したラットと無処理のラットにAPAPを経口投与した後のAPAPの血漿中濃度推移をFig. 15に示す。酢酸適用処理したラットで、APAPの上昇の遅延が観察された。この血漿中濃度推移について、モーメント解析により、定量的評価を行った。その結果をTable 2に示す。酢酸適用処理により、 F は変化しなかったが、 MRT の延長が確認され、計算した MAT は3倍近く延長した。これらのことから、酢酸適用処理したラットにAPAPを経口投与した血漿中濃度上昇の遅延は、胃排出速度の低下により生じることが示された。

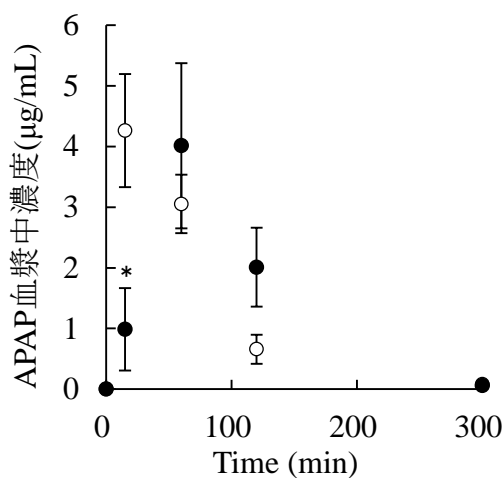


Fig. 15 APAP カプセル剤をラットに経口投与した後の APAP 血漿中濃度推移に対する酢酸処理の影響

○、無処理ラット (n = 3) ; ●、酢酸適用処理ラット (n = 3)

(n = 3 平均±S.E. * $p < 0.05$ 、Student's t 検定)

Table 2 APAP を経口投与時のラットの APAP 薬物動態パラメータに対する酢酸
45 秒処理の影響

投与経路	投与量 (mg)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$) mean \pm S.E.	F (%) mean \pm S.E.	MRT (min) mean \pm S.E.	MAT (min) mean \pm S.E.	
無処理	<i>i.v.</i>	0.5	41.9 \pm 2.88	-	25.6 \pm 0.068	-
無処理	<i>p.o.</i>	5	402.8 \pm 50.1	100.8 \pm 12.0	45.8 \pm 3.0	21.4 \pm 2.6
酢酸処理	<i>i.v.</i>	0.5	44.6 \pm 1.84	-	24.6 \pm 0.772	-
酢酸処理	<i>p.o.</i>	5	486.9 \pm 129	109.2 \pm 28.9	76.2 \pm 8.59	52.1 \pm 8.49

(n=3、* $p < 0.05$ 、Student's t 検定)

第4節 小括

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一般に用いられている³⁶⁾。前章において、このモデルでは胃排出の低下が生じていることを明らかにした。そこで本章では、APAP の経口投与実験を行った。

胃漿膜を45秒酢酸で処理したラットについて、静脈注射後の体内動態を無処理のラットと比較した。APAP を急速静脈内投与した後の血漿中濃度推移には有意な差はなく、酢酸適用処理がAPAP の消失特性や分布特性において、影響しないことが確認できた。しかし、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、APAP の吸収の遅延が観察された。さらに、モーメント解析によりMATが延長し、酢酸適用処理により吸収過程が遅延していることが確認できた。これらのことから、酢酸適用処理したラットでは、胃排出過程が遅延することが示された。

第3章 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルを用いた薬物吸収と pH 変化の関係に関する検証

薬物の消化管吸収に関して、生理的機能の変動、病態の変化、併用薬の影響など様々な要因がその変動に関わると考えられる。しかし、それらの多様な要因は、相互に複雑に影響し合い、個別の要因について、その影響の大きさや効果を調べることは困難である。胃潰瘍が生じた場合の薬物吸収の変動を例としても、潰瘍があること自体の胃粘膜のバリア機能の変化、胃における酸分泌能や胃内容物排出能の低下にとどまらず、全身的な栄養状態の悪化に起因する血流の低下や薬物吸収に関連するタンパク質の発現低下、神経や液性因子を介した炎症に関連した情報の体内遠隔部への伝播など、多くの因子が吸収の変動に関わる可能性がある。またそれらは、相互に関係し、特定の因子のみに対して実験的に介入することは不可能である。よって、*in vivo* の条件で、各因子の影響を個別に明らかにしていくことは、介入実験を巧みに設計した場合でも、動物実験の結果の解釈には限界があるため、不可能に近い。それに加えて、今日の実験動物使用に関する 3R の考え方から、動物を用いない代替実験法の要求は大きく、そのようなニーズに適う実験方法の開発と使用は、重要なテーマとなる。

本論文第 1 章において、ラットの胃漿膜に酢酸を適用するモデルについて検討を行った結果、胃潰瘍を発生させることができ、その病態において、胃排出能の低下と胃酸分泌能の低下が生じていることを明らかにした。一方で、このモデルにおいて、他の未知の要因がどのように変化しているかは明らかではない。そのため、胃内 pH の変動により消化管吸収が変動すると予測される薬物を経口投与し、その血漿中濃度推移の変化を評価する実験を行い、変化が観察された場合でも、その結果が胃酸分泌機能の低下に起因すると証明したことにはならない。

そこで本章では、胃障害時に生じる胃酸分泌能の低下や、胃障害時に投与される制酸剤の使用を念頭に置き、胃内 pH の上昇が薬物吸収にどのような影響をもたらすかを *in vitro* で試験する実験系³⁷⁾を用い、考察した。モデルの概要を Fig. 16 に示す。このモデルでは、モデル胃に薬剤が投与され、そこからモデル腸管内を薬物が移動する過程で、モデル唾液の混入により、液性が胃内の酸性から中性付近に変化する。その先に設置した膜透過部には、モデル小腸粘膜を挟み込み、モデル小腸内からの薬物吸収性が評価できる。胃内 pH の変動は、モデル胃内に導入する溶液の pH を生理的状态である pH1.2 から変化させることや、薬剤の投与と同時に制酸剤などを併用投与することで再現される。

本章で用いるモデル薬物としては、アルベンダゾールを選択した。アルベンダゾールは、塩基性の難水溶性薬物であり³⁸⁾、胃内の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。過飽和とは溶質が飽和溶解度以上の濃度で溶媒に溶解している状態であり、過飽和状態で溶解している溶質分子は熱力学的に不安定な状態である。胃で溶解したアルベンダゾールが、小腸に移動した時、pHの変化に対して溶解度に従うなら固体が析出することになるが、実際は、溶解状態が過飽和状態で維持されており、その過飽和の状態が、アルベンダゾールの比較的高い消化管吸収性の理由と考えられている^{38,39)}。しかし、このような現象は、胃内のpHの変動に大きく影響を受けると考えられる。その確認のため、胃内pHを変動させるプロトンポンプインヒビター、H₂受容体阻害薬の併用効果などが試験されているが^{1,39,40)}、一連の現象の完全な理解にはさらなる検討が求められている。

本章では、胃内pHの上昇が薬物吸収にどのような影響をもたらすかを *in vitro* で試験する実験系を用い、アルベンダゾールの吸収性に及ぼす胃内pHの変動の影響の考察を試みた。

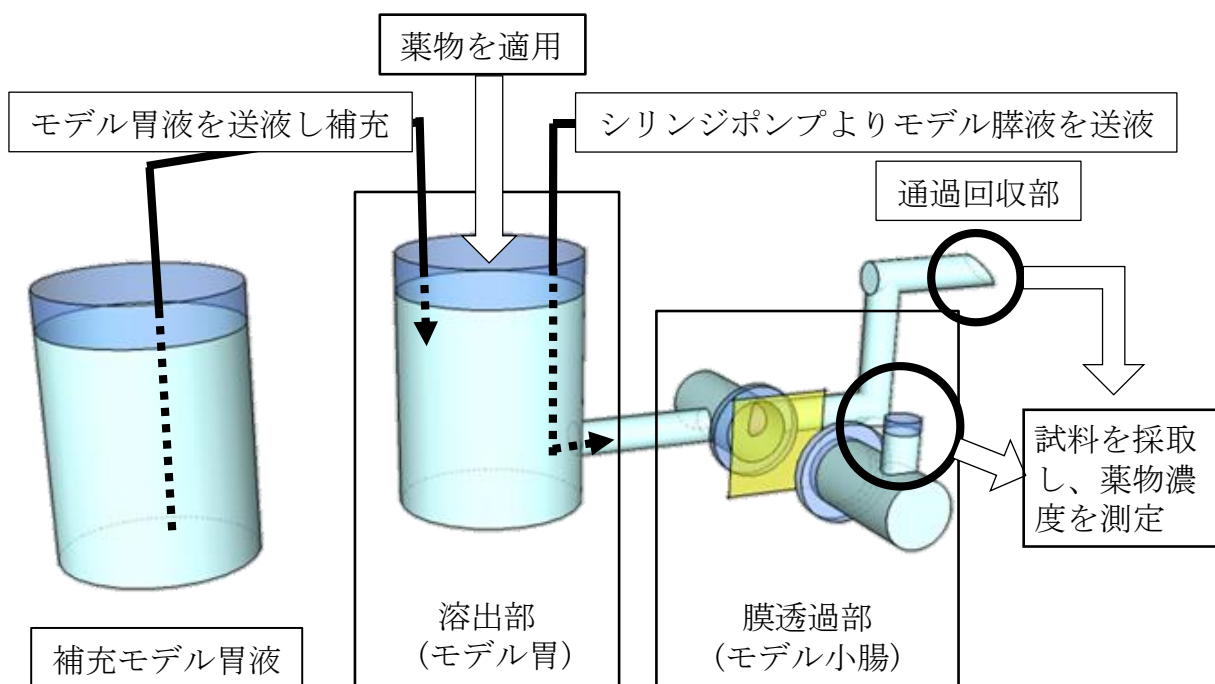


Fig. 16 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルの概要図

図中の黄色四角はモデル小腸粘膜として使用したシリコーン膜を示す。

第1節 実験方法

3-1. 実験材料

アルベンダゾール (>98.0%)、フェナセチン (>98.0%)、4-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ヘプチル (東京化成特級) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。水酸化ナトリウム (特級)、牛血清由来アルブミン (BSA、和光 1 級)、塩化ナトリウム (特級)、塩酸 (特級、35.0-37.0%) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。HEPES は Oakwood products, Inc. (columbia, USA) より購入した。シリコーン膜 (膜厚 50 μm) は株式会社コクゴ (東京) より購入した。シリンジフィルターはエキクロディスク[®] (フィルター材質 アクリル共重合体、フィルター径 3 mm、孔径 0.45 μm) を日本ポール株式会社 (東京) より購入して使用した。

3-2. 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルにおける流路内 pH 設定

pH 6.5 の緩衝液は、日本薬局方溶出試験第 1 液と HEPES 緩衝液を混和し、pH 6.5 となるように調製した。HEPES 緩衝液は、3.0 mol/L (pH 8.0) となるように、精製水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mol/L) を加えて調整した。

溶出部溶液を補充する送液ポンプは、ヒトの胃液分泌量⁴¹⁾を参考にして 5 mL/min とした。膵液モデルとしての HEPES 緩衝液 (pH 8.0、3.0 mol/L) は、同様にヒトでの膵液分泌量⁴¹⁾を参考にして 0.8 mL/min とした。3 つの実験条件にてアルベンダゾールを適用した。(Table 3e-1)。

ジメチルスルホキシドに溶解したアルベンダゾール溶液 (50 mg/mL) を消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルの溶出部に添加 (128 μL) 後、経時的 (6、24、40、50、60、90、120 分) に通過回収部より溶液を採取した。採取した溶液は直ちに遠心分離 (21500 g、5 分) を行い、上清を採取し、シリンジフィルターを用いて濾過した。濾過した溶液は pH を測定し、LC-MS/MS を用いて試料中のアルベンダゾール濃度を測定した。実験中のすべての操作は室温で行った。

3-3. 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルへのアルベンダゾール適用実験

胃障害時のモデル胃液として日本薬局方溶出試験第1液を1000倍希釈してpH 4に調製した。同様にモデル腸液のHEPES緩衝液も1000倍希釈した。モデル内の膜透過部にモデル膜としてシリコーン膜（厚さ50 μm）を設置した。膜透過部薬物受容体セルにはモデル血漿としてのBSA（4.5 w/v%）を溶解したHEPES緩衝液（pH 6.5）を満たした。

pHの変化によって生じた過飽和現象がアルベンダゾール吸収性に与える影響及び胃障害時に上昇したpHがアルベンダゾールの吸収性に与える影響を明らかにするために、3つの条件にてアルベンダゾールを適用した。（Table 3e-2）

ジメチルスルホキシドに溶解したアルベンダゾール（50 mg/mL）を消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルの溶出部に適用（128 μL）した。適用2時間後に膜透過部の薬物受容体性セル溶液を回収し、LC-MS/MSにて溶液中のアルベンダゾール濃度を測定し、累積透過量を求めて比較した。実験中の全ての作業は室温で行った。

Table 3e-1 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデル内組成及びpH条件設定

実験条件	溶出部溶液	溶出部設定pH	シリンジポンプ動作	通過回収部pH
pH 1.2-1.2	薬局方溶出試験1液	1.2	-	1.2
pH 6.5-6.5	HEPES緩衝液（pH 6.5）	6.5	-	6.5
pH 1.2-6.5	薬局方溶出試験1液	1.2	0.8 mL/min	6.5

Table 3e-2 消化管シミュレーションモデル *in vitro* モデル溶出部pH設定

実験条件	溶出部溶液	溶出部設定pH	シリンジポンプ動作	通過回収部pH
pH 1.2-1.2	薬局方溶出試験1液	1.2	-	1.2
pH 1.2-6.5	薬局方溶出試験1液	1.2	0.8 mL/min	6.5
pH 4.0-6.5	胃障害時モデル胃液	4	0.8 mL/min	6.5

3-4. アルベンダゾール定量条件

遠心分離（21500 G、5分）を行った試料を適宜メタノールで希釈した。希釈した溶液 100 μ L を分取し、内標準物質としてフェナセチンを含むメタノール溶液（200 ng/mL）を 100 μ L 混合して攪拌して測定に用いた。

測定は LC-MS/MS を用いて行った。用いた LC-MS/MS 機器構成はシステムコントロールラー CBM-20A（株式会社 島津製作所、京都）、液相ユニット LC-20A（株式会社 島津製作所、京都）、オートインジェクタ SIL-20AC（株式会社 島津製作所、京都）、カラムオーブン CTO-20AC（株式会社 島津製作所、京都）に API 4000 QTRAP（株式会社 エービー・サイエックス、東京）を接続して用いた。操作及び、測定は Analyst[®]1.5.1（株式会社 エービー・サイエックス、東京）を用いた。カラムは Mightysil[®] RP-18GP（150 \times 2.0 mm、3 μ m、関東化学株式会社、東京）に Mightysil[®] RP-18GP（5 \times 2.0 mm、3 μ m、関東化学株式会社、東京）ガードカラムを接続し、40 $^{\circ}$ C に保って用いた。移動相はメタノール/酢酸アンモニウム水溶液（pH 6、10 mmol/L）（85/15、v/v）を用い、0.4 mL/min で送液した。タンデム型質量分析器は、ポジティブイオンモード及び、MRM モードで使用した。定量に用いたプロダクトイオン及びプリカーサーイオンの質量電荷比（m/z）には、アルベンダゾールでは 266.206 \rightarrow 234.100、フェナセチンでは 180.204 \rightarrow 110.000 をそれぞれ選択した。タンデム型質量分析器のチューニングパラメーターは、アルベンダゾールのプロダクトイオン及び、プリカーサーイオンの検出に最適化し、Table 3e-3 の数値とした。

Table 3e-3 タンデム型質量分析装置部のアルベンダジュール測定条件設定値

Curtain gas	30 psi
Collision gas	4 psi
Ion spray voltage	5500 V
Temperature	300 °C
Ion source 1 gas	50 psi
Ion source 2 gas	80 psi
Declustering potential	31 eV
Entrance potential	17 eV
Collision cell potential	20 eV

3-5. データ解析

データは、平均値±標準偏差で表記した。2群間では student *t* 検定を行った。3群間での比較では Dunnet 検定を行った。いずれの検定においても $p < 0.05$ で有意差があるものとした。

第2節 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルにおける流路内 pH 変化とアルベンダゾールの過飽和溶解

アルベンダゾールは、難溶解性の塩基性薬物であり、その溶解度は、pH により大きく変動する。アルベンダゾールの溶解度を Table 3 に示す。

Table 3 アルベンダゾールの水中での飽和溶解度
(n=3)

	飽和溶解度 ($\mu\text{g/mL}$)
	平均 \pm S.D.
pH 1.2	657.1 \pm 149.6
pH 6.5	0.807 \pm 0.057

消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルにアルベンダゾールを適用し、通過回収部の溶液を採取し、アルベンダゾールの濃度を測定した (実験方法 3-2.)。その結果を Fig. 17 に示す。通常の過程を想定した pH 1.2-6.5 の条件において、pH 6.5 の溶解度よりはるかに高いアルベンダゾールの濃度が観察され、pH 変化に伴う過飽和がモデルにおいて再現された。

Table 4 通過回収部サンプルの平均 pH
(n = 3)、

実験条件	通過回収部実測pH (0-120分間) 平均 ± S.E.
pH 1.2-1.2	1.22 ± 0.02
pH 6.5-6.5	6.5 ± 0.03
pH 1.2-6.5	6.78 ± 0.02

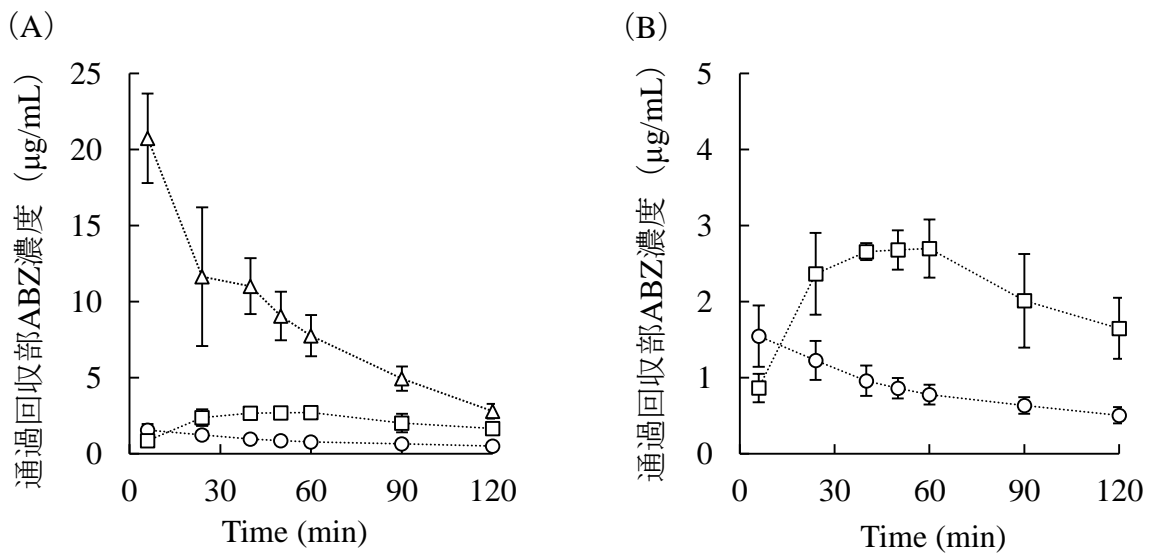


Fig. 17 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデル中の ABZ 溶出挙動に対するモデル内 pH の影響

(A) 実験条件 pH 1.2-1.2、pH 6.5-6.5 および、pH 1.2-6.5 での ABZ 溶出挙動、△、pH 1.2-1.2；○、pH 6.5-6.5；□ pH 1.2-6.5

(B) (A) を拡大し、実験条件 pH 6.5-6.5 および、pH 1.2-6.5 での ABZ 溶出挙動を示した。n = 3、平均±S.D.

第3節 モデル胃内 pH 変化におけるアルベンダゾールの吸収性の変化

胃内の pH 変化が、アルベンダゾールの吸収にどのような影響をもたらすかを調べるため、pH 1.2-1.2、pH 4.0-6.5、pH 1.2-6.5 の3つの条件を設定し、消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルにおける膜透過部に設置したシリコーン膜の透過性の変化を比較した（実験方法 3-3.）。その結果を Fig. 18 に示す。pH 分配仮説^{42,43)}に従えば、イオン型として溶解している薬物がシリコーン膜を透過することはほとんどない。アルベンダゾールの pKa (pKa₁ 2.68、pKa₂ 11.83)³⁸⁾及び溶解度を考慮すると pH 1.2-1.2 ではシリコーン膜近傍では、溶解しているアルベンダゾールはほとんどイオン型として存在しており、pH 6.5-6.5 ではほとんど溶解しないためシリコーン膜を透過することはないと考えられる。

pH 1.2-6.5 の条件では、薬物は全て溶解しているが、pH 1.2-1.2 の条件と比較して膜透過量は 100 倍以上高く、モデル小腸内で生じた過飽和が、高い膜透過の要因となっていると考えられた。

薬物分子は pH 変化前の薬物濃度と変化後薬物飽和溶解度の差が大きいほど、過飽和状態の薬物分子の量は増加する^{44,45)}。胃の機能障害やそれに伴う制酸剤などの投与を想定した pH 4.0-6.5 の条件では、膜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、pH の変化によって大きく影響を受けることが示唆された。

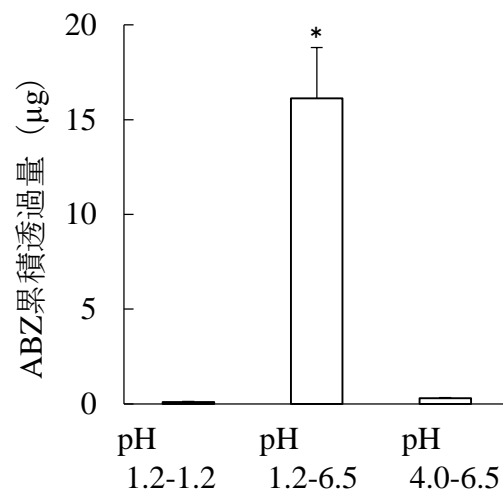


Fig. 18 消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルにおける ABZ の膜透過量に及ぼす pH 設定条件の影響

n = 3、平均±S.D.、* $p < 0.05$ 、Dunnett 検定 (pH 1.2-1.2 に対して)

第4節 小括

薬物の消化管吸収に関して、生理機能の変動、病態の変化、併用薬の影響、など様々な要因がその変動にかかわると考えられるが、それらの多様な要因は、相互に複雑に影響し合い、個別の要因について、その影響の大きさや効果を、実際に薬物吸収が生じている *in vivo* の条件で明らかにしていくことは、不可能に近い。また、*in vivo* 条件での介入実験を巧みに設計した場合でも、消化管吸収の種差は非常に大きいため、動物実験の結果の解釈には限界があり、今日の実験動物使用に関する 3R の考え方からも動物を用いない代替実験法の要求は大きい。

本研究第 1 章において、酢酸 45 秒処理とその後の 48 時間の飼育によって、胃潰瘍を発症させることができること、その病態において、胃酸分泌能に低下が生じていることを明らかにした。そこで本章では、胃障害時に生じる胃酸分泌能の低下、もしくは胃障害時に投与される胃の酸性度を緩和する薬剤の使用を念頭に置き、それによる胃内 pH の上昇が薬物吸収にどのような影響をもたらすかを *in vitro* で試験する実験系を用い、考察を行った。

本章で用いたモデル薬物であるアルベンダゾールは、塩基性の難水溶性薬物であり、胃内の酸性条件ではよく溶解するが、中性条件での溶解度は低く、胃で溶解したアルベンダゾールが、小腸に移動した時、過飽和状態となり、この過程が消化管吸収性の重要な要因となると考えられている。

消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルにアルベンダゾールを適用し、通過回収部のアルベンダゾールの濃度を測定した結果、通常のプロセスを想定した pH 1.2-6.5 の条件において、pH 6.5 の溶解度よりはるかに高いアルベンダゾールの濃度が観察され、*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モデルにおいて再現された。

胃内の pH 変化が、アルベンダゾールの吸収にどのような影響をもたらすかを調べるため、pH 1.2-1.2、pH 4.0-6.5、pH 1.2-6.5 の 3 つの条件を設定し、消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルを用いた検討を行った。膜透過部に設置したシリコーン膜の透過性の変化を比較した結果、pH 1.2-6.5 の条件では、薬物は全て溶解しているが、それがイオン形である pH 1.2-1.2 の条件と比較して、膜透過量は遥かに高く、管内で生じた過飽和が、高い膜透過の要因となっていることが示された。一方、胃の機能障害やそれに伴う制酸剤などの投与を想定した pH 4.0-6.5 の条件では、膜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、これらの要因によって大きく影響を受けることが示唆された。

過飽和状態は、平衡に至る途中の非平衡な状態にあり、一般に不安定である。そし

てその持続時間は、製剤に含まれる水溶性高分子⁴⁶⁻⁴⁸⁾や食事に含まれる成分など、共存する物質によっても大きく影響を受ける。今後は食事の各種成分や併用される製剤を含めた共存する賦形剤などとの相互作用を検討し、それら共存物質が、アルベンダゾールの過飽和状態の安定にどのような影響をもたらす、その影響の程度が胃での pH 値とどのような関係があるのか、詳しく調査することで、関連する薬物相互作用の理解と解析が進むものと考えている。本章で示した消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルは、そのような研究に有用なツールとなる。

結論

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、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きることはできない。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、第1章と第2章において、酢酸漿膜処理ラットモデルを用いた検討を行い、第3章では、薬物の消化管吸収の *in vitro* 実験系を用いて評価することを試みた。以下、その結果を要約する。

第1章

ラットの胃漿膜に酢酸を適用するモデルについて検討を行った。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、病変部位を特定の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。

酢酸を用いて実験48時間前に胃漿膜を酢酸15秒適用処理する予備検討の結果から、a) 胃潰瘍の状態を得るには酢酸適用処理時間の延長が必要なこと、b) 麻酔は消化管機能に影響を与えることが懸念されることから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。

そこで本検討では、酢酸適用処理時間を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、酢酸適用処理時間60秒では、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、酢酸 60 秒処理は刺激が過剰であり、酢酸 45 秒処理が、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。また、酢酸適用処理による胃内 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も確認された。

これらの検討の結果、酢酸の接触時間を調節し、潰瘍が生じた時、胃の固有の生理的機能である胃酸分泌能を抑制し、また胃、小腸共通の生理的機能である蠕動運動について胃の蠕動運動のみを抑制し、胃排出能が低下した。これらの点について酢酸漿膜適用潰瘍ラットモデルは、薬物吸収性に対して胃障害の影響を評価できることが明らかになった。

第 2 章

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一般に用いられている。そこで、胃漿膜酢酸 45 秒処理による胃排出速度に及ぼす影響を、APAP の経口投与後の体内動態によって評価した。

酢酸で胃の漿膜を 45 秒処理したラットは、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無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 秒酢酸で処理したラットと無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、APAP の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3章

薬物の消化管吸収に関して、生理機能の変動、病態の変化、併用薬の影響、など様々な要因がその変動にかかわると考えられが、それらの多様な要因は、相互に複雑に影響し合い、個別の要因について、その影響の大きさや効果を、実際に薬物吸収が生じている *in vivo* の条件で明らかにしていくことは、不可能に近い。そこで、塩基性の難水溶性薬物であり、胃内の酸性条件ではよく溶解するが、中性条件での溶解度は低く、小腸において過飽和状態となると考えられているアルベンダゾールをモデル薬物として、消化管吸収シミュレーション *in vitro* モデルに適用し、過飽和過程を含むアルベンダゾールの消化管吸収における胃内 pH 変動の影響について考察した。

通過回収部のアルベンダゾールの濃度を測定した結果、通常のプロセスを想定した pH 1.2-6.5 (胃内→小腸内) の条件において、pH 6.5 の溶解度よりはるかに高いアルベンダゾールの濃度がモデル小腸内で観察され、*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 変化が、アルベンダゾールの吸収にどのような影響をもたらすかを調べるため、pH 4.0-6.5 の条件でも実験を行い、膜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、膜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、*in vivo* 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。

胃障害により胃の生理的機能が変化する時、小腸で吸収性が良好な塩基性薬物は胃排出低下の影響を受け、薬物投与直後の血中濃度上昇が遅延すると考えられる。難溶性塩基性薬物では、胃から小腸に移行する際に生じる過飽和現象が吸収に寄与していると考えられる。胃障害または、胃障害に伴う薬物治療により胃内 pH の上昇が胃内での薬物の溶解を低下させることにより小腸に移行した際に生じる過飽和現象を抑制すると考えられる (Fig. 19)。

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する。

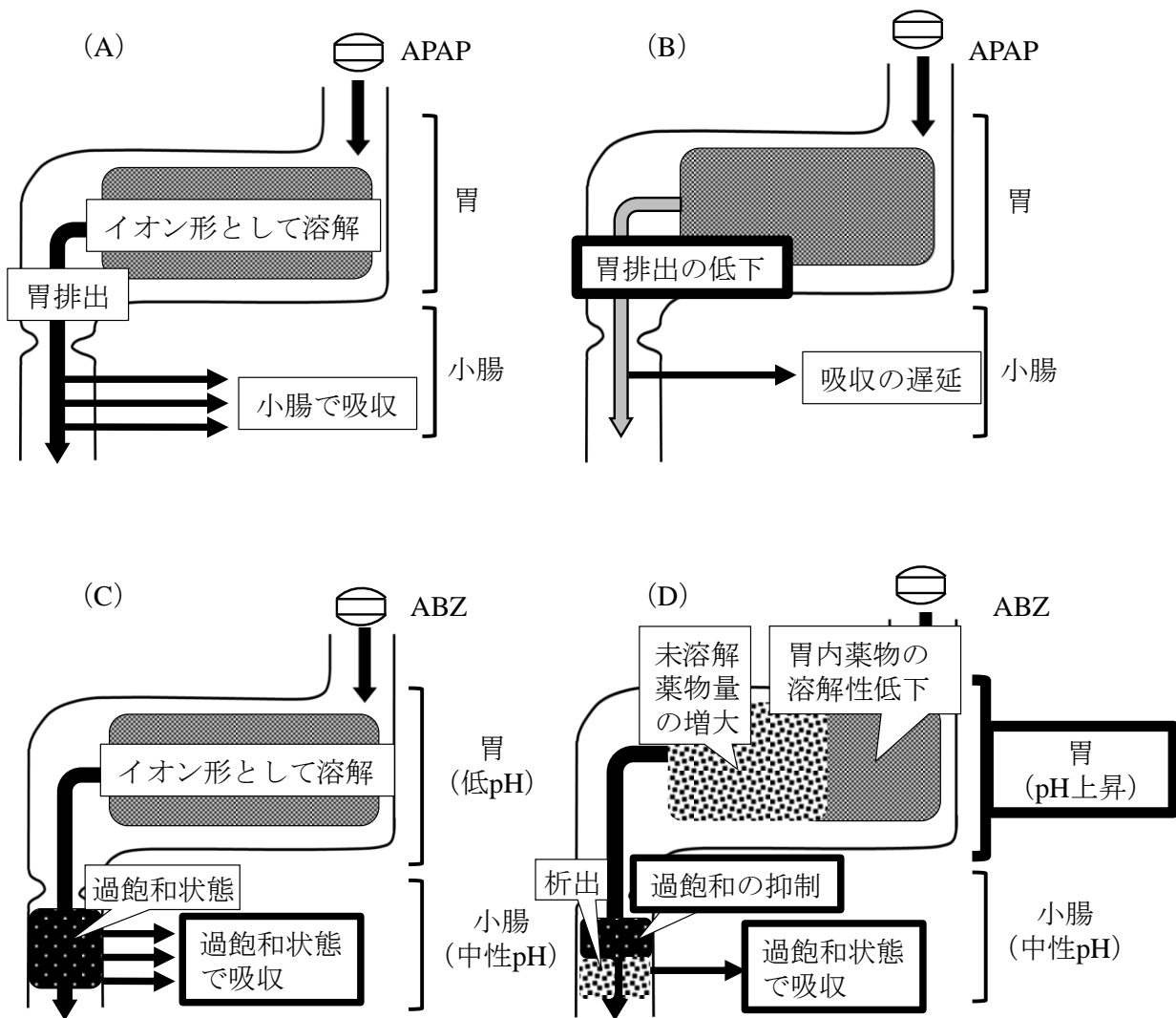


Fig. 19 APAP、ABZ の吸収過程の模式図

(A) 生理的状态での APAP 吸収過程、(B) 胃障害により胃排出が変化した時の APAP 吸収過程

(C) 生理的な状态での ABZ 吸収過程、(D) 胃障害により胃内 pH が上昇した時の ABZ 吸収過程

謝辞

本研究の遂行にあたり、温かい激励と御指導、御鞭撻を賜りました、城西大学薬学部教授 従二和彦先生に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行し、まとめるにあたり、短い期間でしたが温かい激励と御指導、御鞭撻を賜りました、城西大学薬学部薬剤学講座教授 関俊暢先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導並びに御助言を賜りました城西大学薬学部薬剤学講座准教授 細谷治先生並びに城西大学薬学部薬剤学講座助手 杉野雅浩先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益な御意見並びに御助言を賜りました城西大学薬学部薬品物理化学講座助手 三木涼太郎先生に篤く御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたりまして、査読を引き受けて頂き、さらに御助言と御教授まで頂きました城西大学薬学部食品機能学講座教授 真野博先生、城西大学薬学部生体防御学講座教授 日比野康英先生並びに城西大学薬学部医薬品安全性学講座教授 金本郁男先生に深謝の意を表します。

最後に本研究の実施にご協力を賜りました城西大学薬学部薬剤学講座 田中諒 学士、松永秀春 学士、片岸光平 君、大野雅斗 君、塩谷勇登 君を始めとする関係諸氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Van Der Meer J. W. M., Keuning J. J., Scheijgrond H. W., Heykants J., Van Cutsem J., Brugmans J., *J. Antimicrob. Chemother.*, **6**, 552–554 (1980).
- 2) Manara A., Shelly M., Quinn K., Park G., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **25**, 518–521 (1988).
- 3) Toothaker R. D., Welling P. G., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 173–199 (1980).
- 4) Yajima H., Yamao J., Miyauchi Y., Ono H., Akiyama K., *Ther. Res.*, **27**, 1211–1217 (2006).
- 5) Sun D. C., Roth S. H., Mitchell C. S., Englund D. W., *Am. J. Dig. Dis.*, **19**, 405–10 (1974).
- 6) Fukui M., *J. Japanese Soc. Gastroenterol.*, **66**, 1404–1413 (1969).
- 7) Kanaizumi T., Nakano H., Matsui T., Tatsumi H., Ishikawa H., Kuramoto H., Shimizu R., Shiratori T., *Tohoku J. Exp. Med.*, **158**, 133–140 (1989).
- 8) Watanabe H., Kinoshita Masato, Kondo T., Kushida T., Miyamoto H., Konishi M., Niki K., Kano Y., Kuwashima T., Komi N., Minato Y., Morimoto Y., *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, **74**, 432–440 (1977).
- 9) Takagi K., Kasuya Y., Watanabe K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **12**, 465–472 (1964).
- 10) Robert A., Nezamis J., Lancaster C., Hanchar A., *Gastroenterology*, **77**, 433–43 (1979).
- 11) Hosoda S., Ikedo H., Saito T., *Gastroenterology*, **80**, 16–21 (1981).
- 12) Satoh H., Inada I., Hirata T., Maki Y., *Gastroenterology*, **81**, 719–725 (1981).
- 13) Porsolt R. D., Le Pichon M., Jalfre M., *Nature*, **266**, 730–732 (1977).
- 14) Watanabe T., Higuchi K., Kobata A., Nishio H., Tanigawa T., Shiba M., Tominaga K., Fujiwara Y., Oshitani N., Asahara T., Nomoto K., Takeuchi K., Arakawa T., *Gut*, **57**, 181–187 (2008).
- 15) Anthony A., Dhillon A. P., Nygard G., Hudson M., Piasecki C., Strong P., Trevethick M. A., Clayton N. M., Jordan C. C., Pounder R. E., Wakefield A. J., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **7**, 29–40 (2007).
- 16) Okabe S., Roth J. L. a., Pfeiffer C. J., *Am. J. Dig. Dis.*, **16**, 277–284 (1971).
- 17) Masatoyo K., Terue S., Shizuo K., Hideyo S., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **32**, 209–214 (1994).
- 18) Tarnawski A., Hollander D., Stachura J., Krause W., Eltorai M., Dabros W., Gergely H., *J. Clin. Gastroenterol.*, **12**, S148-57 (1990).
- 19) Konturek J. W., Hengst K., Konturek S. J., Domschke W., *Scand. J. Gastroenterol.*, **32**, 980–984 (1997).

- 20) Kuwayama H., Matsuo Y., Eastwood G. L., *Am. J. Med.*, **91**, S15–S19 (1991).
- 21) Kobayashi T., Ohta Y., Yoshino J., Nakazawa S., *Pharmacol. Res.*, **43**, 23–30 (2001).
- 22) Fredlund L., Winiwarter S., Hilgendorf C., *Mol. Pharm.*, **14**, 1601–1609 (2017).
- 23) Larregieu C. A., Benet L. Z., *Mol. Pharm.*, **11**, 1335–1344 (2014).
- 24) Andreas C. J., Pepin X., Markopoulos C., Vertzoni M., Reppas C., Dressman J. B., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, 284–298 (2017).
- 25) Okabe S., Amagase K., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **122**, 73–92 (2003).
- 26) Schanker L. S., Shore P. A., Brodie B. B., Hogben C. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **120**, 528–39 (1957).
- 27) Miyata K., Yamano M., Kamato T., Akuzawa S., *Jpn. J. Pharmacol.*, **69**, 205–214 (1995).
- 28) Suzki T., Hashikawa T., Takano S., Hayashi A., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **71**, 109–122 (1975).
- 29) Harada S., Dannenberg A. M. J., Kajik A., Higuchi K., Tanaka F., Pula P. J., *Am. J. Pathol.*, **121**, 28–38 (1985).
- 30) Lange S., Delbro D. S., Jennische E., *Scand. J. Gastroenterol.*, **29**, 38–46 (1994).
- 31) Walsh J. H., Yalow R. S., Berson S. A., *Gastroenterology*, **60**, 16–21 (1971).
- 32) Korman M. G., Soveny C., Hansky J., *Gut*, **12**, 619–624 (1971).
- 33) Clements J. A., Heading R. C., Nimmo W. S., Prescott L. F., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **24**, 420–431 (1978).
- 34) Hatanaka S., Kondoh M., Kawarabayashi K., Furuhashi K., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **31**, 161–165 (1994).
- 35) Nimmo J., Heading R. C., Tothill P., Prescott L. F., *Br Med J*, **1**, 587–589 (1973).
- 36) Shirasa D., Masaaki K., Aoyama N., *japan Soc. smooth muscle Res.*, j-107 (2002).
- 37) Miki R., Kobayashi Y., Nakamura Y., Asaka T., Imai N., Hiyayama Y., Hosoya O., Egawa Y., Seki T., *AATEX*, **21**, 1–13 (2016).
- 38) Sugawara M., Kadomura S., He X., Takekuma Y., Kohri N., Miyazaki K., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **26**, 1–8 (2005).
- 39) Adachi M., Hinatsu Y., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Nakatani M., Wada K., Yamamoto A., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **76**, 225–230 (2015).
- 40) Kolawole J. A., Mustapha A., Abudu-Aguye I., Ochekepe N., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**, 165–70 (2000).
- 41) Dressman J. B., Amidon G. L., Reppas C., Shah V. P., *Pharm. Res.*, **15**, 11–22 (1998).

- 42) Carlert S., Pålsson A., Hanisch G., Von Corswant C., Nilsson C., Lindfors L., Lennernäs H., Abrahamsson B., *Pharm. Res.*, **27**, 2119–2130 (2010).
- 43) Lubach J. W., Chen J. Z., Hau J., Imperio J., Coraggio M., Liu L., Wong H., *Mol. Pharm.*, **10**, 3997–4004 (2013).
- 44) Brouwers J., Brewster M. E., Augustijns P., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 2549–2572 (2009).
- 45) Williams H. D., Trevaskis N. L., Charman S. A., Shanker R. M., Charman W. N., Pouton C. W., Porter C. J. H., *Pharmacol. Rev.*, **65**, 315–499 (2013).
- 46) Ueda K., Higashi K., Yamamoto K., Moribe K., *Int. J. Pharm.*, **464**, 205–213 (2014).
- 47) Abu-Diak O. A., Jones D. S., Andrews G. P., *Mol. Pharm.*, **8**, 1362–1371 (2011).
- 48) Jung J. Y., Yoo S. D., Lee S. H., Kim K. H., Yoon D. S., Lee K. H., *Int. J. Pharm.*, **187**, 209–218 (1999).