

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06794

研究課題名(和文)薬物の溶解状態の動的変化を組み込んだ消化管吸収シミュレーションシステムの研究

研究課題名(英文)A gastrointestinal absorption simulation system that incorporates dynamic changes in the dissolution state of drugs

研究代表者

関 俊暢 (Seki, Toshinobu)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：60196946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬物の溶解状態の動的変化を組み込んだ消化管吸収シミュレーションシステムについて、それを評価する新規実験装置についてと、それに適用する新規メンブランについて検討を行った。その新規実験装置は、モデル胃部分とモデル小腸部分を有し、顆粒剤の胃排出の過程を再現するとともに、その過程でのpH変化を再現可能である。このpH変化は、難水溶性塩基性薬物の過飽和状態を生じさせ、それが吸収の促進につながる機構の解析に利用可能であることを示した。

また、実験での時間分解能の向上のため、ナノメンブランの調製を行なった。用いる高分子材料の混合は、薬物の膜透過性の修飾に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトの消化管内で生じている現象を、物理的に組み立てられた実験装置により再現するもので、複雑な現象を詳細に検討することができる。実験条件を自由に設定できることもこの実験方法の利点として挙げられる。本来、視覚的に確認しにくい体内での出来事を、肉眼的に観察しながら調査でき、データの解析も容易である。体内での現象の調査には、動物実験を適用することが多いが、動物愛護の点で問題がある。本実験は、動物実験代替法としての意味も大きく、その意味でも本研究の社会的意義は大きい。安全で有効な薬物治療の確立、新規製剤の開発につながるという点でも大きな意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：We investigated a gastrointestinal absorption simulation system that incorporates dynamic changes in the dissolution state of drugs, a new experimental device to evaluate it, and a new membrane to be applied to it. The new experimental device has a model stomach part and a model small intestine part, and can reproduce the process of gastric emptying of granules and the pH change in the process. It has been shown that this pH change causes a supersaturated state of the poorly water-soluble basic drug, which can be used to analyze the mechanism leading to the promotion of absorption.

In addition, in order to improve the time resolution in the experiment, nanomembran was prepared. We have found that the mixing of polymer materials used is effective in modifying the membrane permeability of drugs.

研究分野：薬剤学

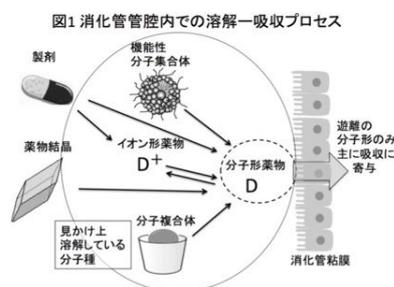
キーワード：モデル消化管 吸収予測 ナノメンブラン

1. 研究開始当初の背景

経口投与された薬物の消化管からの吸収は、生理的变化や食事成分の共存など、いろいろな要因で変動する可能性があり、場合によっては効果の減弱や副作用の発現につながる。そのような影響の回避や現象の解析には、in vitroでそれを再現できるシミュレーションシステムが有効である。本研究では、消化管での膵液や胆汁の分泌によるpHや胆汁酸の濃度変化、共存物質との分子間相互作用などを、動的環境下再現可能な実験系を確立する。本実験系では、薬剤は共存物質とともに管内を移動し、その過程で液性などの外的環境が変化していく。管内の途中に異なった選択性を有する検出プローブを複数設置することで、pH、見かけの薬物濃度、分子形薬物濃度、分散状態の薬物濃度などを測定していく。実際の消化管内での現象は、多成分が共存し、時間と位置の関数であることから、解析が困難であり、本実験系を用いて得られる知見は、安全有効な薬物療法実現のための有用な情報となる。

2. 研究の目的

本研究では、経口投与された薬物の消化管からの吸収が、生理的变化や食事成分の共存など、いろいろな要因で変動する現象について、in vitroで再現できるシミュレーションシステムを確立する。このシステムにおいて、評価される製剤は流路中を移動し、その過程で模擬膵液や模擬胆汁の流入により、pH変化や胆汁酸ミセルなどの生成が生じ、薬物の状態は動的に変化していく(図1)。他の医薬品製剤の添加剤や食品成分などは、試験製剤と同様に、胃モデルに適用され、製剤とともに流路内を移動して、その過程で様々な分子間相互作用が生じる。このような過程は、実際のヒトにおいて日常的に生じていることであるが、それを患者において実験的に評価することは困難であるし、また、動物実験では消化管の機能と構造の種差や食事の内容の差異から満足が得られる結果は得られない。本研究は、消化管内で生じる通常の実験方法では評価が困難な複雑な現象を明らかにする新しい実験方法を提供することを目的としている。研究の対象としては、主に、胃内で酸性条件下、溶解した難水溶性塩基性薬物が、小腸内で過飽和状態になり、それにより吸収が促進される現象に注目して解析を進める。



これを患者において実験的に評価することは困難であるし、また、動物実験では消化管の機能と構造の種差や食事の内容の差異から満足が得られる結果は得られない。本研究は、消化管内で生じる通常の実験方法では評価が困難な複雑な現象を明らかにする新しい実験方法を提供することを目的としている。研究の対象としては、主に、胃内で酸性条件下、溶解した難水溶性塩基性薬物が、小腸内で過飽和状態になり、それにより吸収が促進される現象に注目して解析を進める。

本研究ではさらに、消化管内での現象が時間と共に変化し、その詳細な解析には、時間分解能が高い評価方法の適用が求められる。そこで、それに用いる新しい材料として、高分子材料を組み合わせるナノメンブレンの調製を行うことも本研究の目的とした。

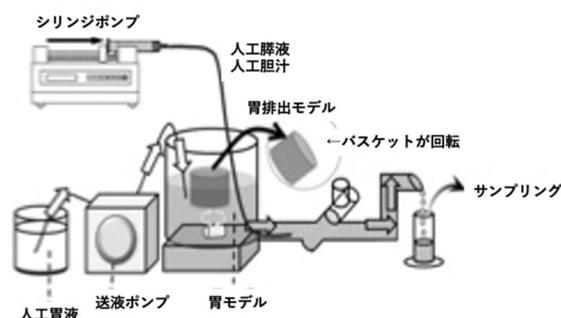


図2 消化管内移動再現in vitroモデル

3. 研究の方法

消化管シミュレーションモデル：

本実験法の概要は、図2に示すものであり、それは独自性及び創造性において高いものである。具体的には、薬物の消化管吸収をin vitroで再現するため、胃再現部分と小腸再現部分を有する。そして、胃再現部位には、内部にバスケットを設置し、それを転倒させる事で、任意のタイミングで内容薬剤を胃排出させることができる。薬剤はその後小腸再現部位を移動し、その一連の過程

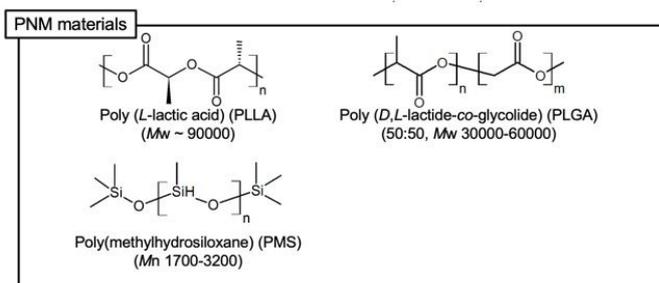


図3 PNMの調製材料

において内容する薬物は放出される。本システムは、複数のサンプリングポートを有し、pHの時間的变化や状態が異なる薬物のそれぞれの濃度を同時的に評価可能である。特に難水溶性塩基性薬物が、胃内から小腸に移行して過飽和状態になり、それにより吸収が促進される現象について、詳細な解析を行う。また、胃排出の機能の確認には、アデノシン三リン酸二ナトリウム(ATP)の腸溶性製剤であるアデホスコーク顆粒®10%を用いた。

ナノメンブラン(PNM)の調製と評価：

PNM については、ポリ L-乳酸をベースとして各種調製を行い、ポリマーをブレンドさせた場合の膜厚、結晶性等の膜特性評価を行なった。混合させるポリマーとしては、非晶質性を有するポリ D,L-乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA)、ポリ(メチルヒドロシロキサン) (PMS) を利用した(図 3)。PNM の調製にはスピコートを用い、それに水溶性の犠牲層を用いた犠牲膜法を組み合わせを行なった(図 4)。膜厚については、膜厚モニター (FE-300) を用いた非接触膜厚測定により基板上にコーティングされた PNM の膜厚を測定した。結晶性評価は自立型 PNM 調製後、PNM の塊を作成し、X 線回折装置 (Mini Flex II) を用いた X 線結晶構造回折 (XRD) 法により評価した。各種 PNM、及びシリコーン膜の薬物透過性を評価した。モデル薬物としては、フルルピプロフェン (FP, pK_a 3.73) 及びケトコナゾール (KCZ, pK_{a1} 3.6、 pK_{a2} 6.9) を利用し、懸濁溶液を対象として薬物透過性を評価して、平衡状態における膜透過パラメータの算出を行うことで、ポリマーの混合比率の変化が膜透過性に与える影響を評価した(図 5)。



図4 スピコート法によるPNMの調製



図5 透過実験装置

加えて、pH 変化によりイオン形及び分子形濃度を变化させた FP 懸濁溶液 (pH 2.0-6.8) を調製し、適用した際の各種 PNM 及びモデル膜のイオン形及び分子形の薬物透過性を評価することで、イオン形及び分子形薬物の透過性に与える影響や、ポリマー比率変化に由来した薬物透過性変化と相関する膜透過パラメータを調査した。過飽和状態の作成はバイアル中でも行い、酸性及び塩基性の難水溶性薬物である FP 及び KCZ の pH 変化による過飽和形成法 (pH-shift 法) による過飽和の形成について、結晶化速度、薬物濃厚相が形成する相分離濃度といった膜透過影響因子を調査した。加えて、過飽和持続時間等に影響を与えるとされる、抗核化ポリマー共存時の相分離濃度変化、薬物濃厚相の粒子径、結晶成長抑制作用に関する評価も行なった。

4. 研究成果

4-1. 胃排出の機能を付与した消化管模倣システムの評価

モデル薬物として腸溶性の ATP 製剤を用い、30 分後に胃排出捜査を行なって、その操作に引き続いての ATP の放出が認められるか、試験を行った。その結果を図 6 に示す。作成したシステムは、薬剤が胃から小腸内に移行する過程を再現する目的に適用することが確認された。

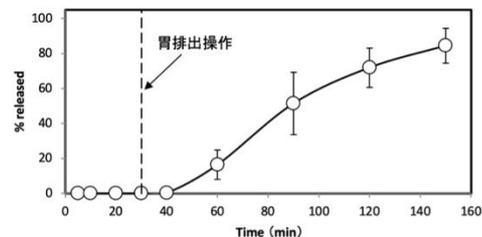


図6 胃排出に伴うアデホスコーフ顆粒 ϕ 10%からのATPの放出

4-2. FP, KCZ の過飽和状態の評価

過飽和の状態は、pH シフト法により生じさせた。図 7 に FP と KCZ の過飽和溶液中での薬物濃厚相形成濃度の調査結果を示す。両薬物とも 70~100 $\mu\text{g/mL}$ 程度の濃度以上で薬物濃厚相の形成が確認された。表 1 には、両薬物の分子形の溶解度と求められた濃厚相形成濃度を示す。FP と KCZ の分子形溶解度は、12.7 $\mu\text{g/mL}$ 2.58 $\mu\text{g/mL}$ であり、この濃度と濃厚相形成濃度の間において、薬物は分子状態で溶液中に過飽和として溶解していると考えられる。

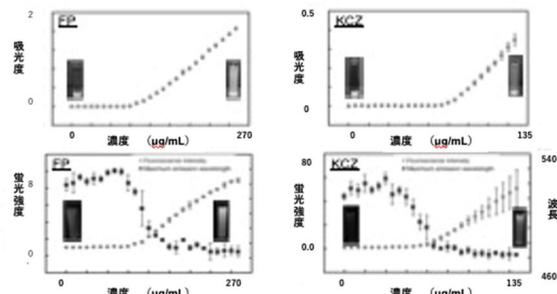


図7 UV/Vis法、蛍光法によるLLPS/GLPSの評価

KCZ については、水溶性高分子の添加の影響も検討した。ポリビニルアルコール (PVA)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) について調べた結果、分子形の溶解度については、PVA は効果がなく、HPMC と HPC には可溶化効果があったが、いずれも薬物濃厚相形成濃度には影響を与えなかった(表 1)。

また、遠心分離により、薬物濃厚相を取り除いた場合の溶解している薬物濃度の時間変化を評価した

表1 UV/Vis法、蛍光法によるLLPS/GLPSの値

薬物	高分子	分子形 平衡溶解度 ($\mu\text{g/mL}$)	LLPS/GLPS	
			UV/Vis 法 ($\mu\text{g/mL}$)	蛍光法 ($\mu\text{g/mL}$)
FP	-	12.68 \pm 0.70	102.8 \pm 1.41	93.96 \pm 2.84
	-	2.58 \pm 0.43	75.71 \pm 1.11	61.02 \pm 5.21
KCZ	1 mg/mL PVA	2.24 \pm 0.12	77.55 \pm 2.19	57.83 \pm 1.41
	1 mg/mL HPMC	8.36 \pm 0.87	79.32 \pm 2.46	56.50 \pm 1.34
	1 mg/mL HPC	10.56 \pm 2.11	72.87 \pm 0.27	54.80 \pm 3.57

結果、FP では、速やかに分子形溶解度の 2 倍程度まで低下したのに対し、KCZ では、濃度低下はなく、長時間薬物濃厚相形成濃度に近い濃度が維持された。

4-3. 高分子の混合による PNM 中への親水性透過経路の形成

PLLA を主成分とし、それに PLGA もしくは PMS を添加して、PNM を調製した。そして、FP 懸濁液を用いて、それらの薬物透過性を比較した。PLGA、PMS のどちらの場合もその添加量の全体に示す割合の増加に依存して FP 透過性（見かけの透過係数 P_{app} ）は増加していた（図 8）。PLLA は疎水性の結晶性高分子であるが、PLGA と

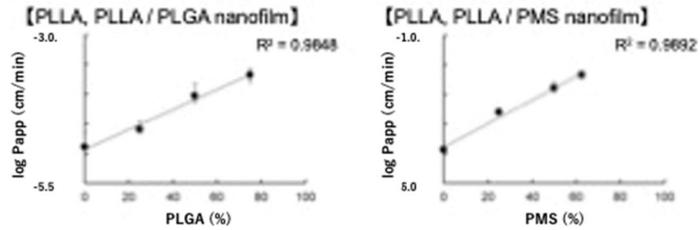


図8 PNMの組成変化によるFP透過性変化

PMS は、相分離を促し、その結果として薬物易透過性の部分が、膜内に生じたと考えられた。

PLGA や PMS を添加したことにより生じた相分離部分が、親水性の透過経路として機能しているとの仮定のもと、pH を変化させることによる分子形とイオン形の濃度比を変化させる条件で、それぞれの透過係数の評価を試みた。その基礎となる並列透過経路モデルを図 9 に示す。解析の結果、PLLA 単独でも、疎水性経路とイオン形薬物も透過可能な親水性経路の両方が存在し、それらは PLLA の非晶質部分や結晶構造間の隙間などに対応することが予想されるが、PLGA と PMS は、それぞれ効果が異なり、PLGA は親水性経路の増加に、PMS は疎水性経路の増加に、それぞれ寄与することが示された（図 10）。

$$Flux = P_u \times C_u + P_i \times C_i$$

$$\frac{Flux}{C_u} = P_u \cdot \text{conc. cal.}$$

$$= P_u + P_i \times \frac{C_i}{C_u}$$

P_u conc. cal. と C_i/C_u のグラフの傾き、切片から P_u 、 P_i を算出

図 9 pH 変化に基づく、透過速度と P_u 、 P_i の関係

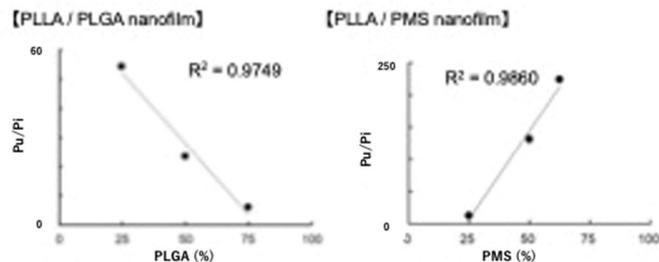


図10 PNMの組成変化によるPu/Pi 変化

4-4. KCZ の過飽和状態からのシリコーン膜透過性の評価

4-3.における検討から、PNM において消化管粘膜に存在する細胞間隙ルートのような親水性の透過経路が再現できることが示されたが、過飽和と膜透過性の関係の基本的な部分を調査するため、疎水性の透過経路のみを持つシリコーン膜を用いて、まず検討を行なった。その結果を図 11 にまとめて示す。薬物濃厚相の有無に関わらず、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは KCZ の添加濃度に依存して、KCZ 累積透過量、初期透過速度は増加し、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では僅かにそれらは低下した。また、同時に測定した薬物適用側に分子状態で溶解している薬物濃度の時間変化は、各条件で異なっており、その値の時間変化に関する下面積（AUC）は、KCZ の累積透過量の傾向と類似していた。そこで、その AUC と KCZ の累積透過量の関係をグラフ化した（図 12）。結果より、明確な直線関係が確認でき、KCZ の透過量は、適用側で分子状態として溶解している KCZ の濃度に依存しており、言い換えれば、

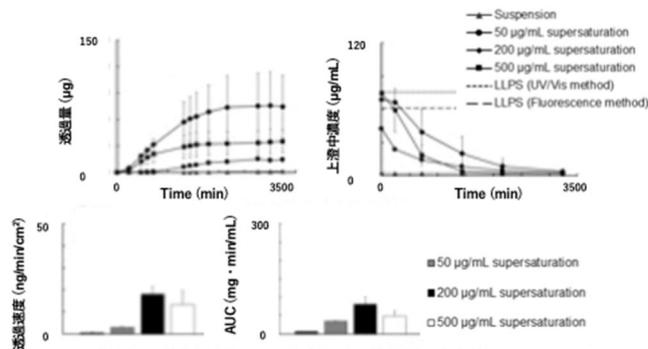


図11 KCZの過飽和によるシリコーン膜透過促進

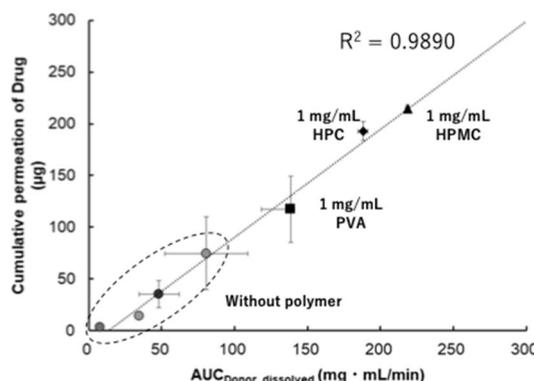


図12 KCZ 累積透過量（3240 min）とドナー側溶解 KCZ の AUC の相関図

薬物濃厚相は透過に直接的には寄与しておらず、さらに、過飽和の状態でも溶解している KCZ は均質であると考えられることが明らかとなった。そこで、過飽和の状態の長時間維持に有効であった水溶性高分子（4-2、PVA、HPMC、HPC）について、抗核化剤としての効果を確認した（図 12）。その結果、抗核化剤の有無に関わらず、全て同一直線上にプロットされることが示された。すなわち、抗核化剤は、KCZ と直接相互作用して可溶化しているのではなく、過飽和状態を結晶化を防ぐことで安定化し、透過を促進させていることが確認できた。HPMC と HPC には KCZ 可溶化効果が確認されているが（表 1）、その影響はわずかであると考えられる。抗核化剤の中では、HPMC が最も過飽和持続効果が大きく、透過促進作用も高いことから、過飽和現象を利用した透過促進における添加剤として有用であると考えられる。

4-5. FP の過飽和状態からの PNM 透過性の評価

シリコーン膜と比較して、親水性の透過経路を有する点で、消化管粘膜や皮膚に類似していることが期待できる PNM について、FP をモデル薬物として選択し、過飽和条件での透過実験を行った。PNM としては、PLLA と PMS が 1 : 1 のものを用いた。この膜は、分子形の FP がイオン形 FP の 150 倍透過性が高いものである。実験の結果、KCZ についてシリコーン膜で評価した場合と異なり、薬物濃厚相形成濃度以下の濃度で、過飽和にも関わらず通常の懸濁液適用より低い透過が観察され、薬物濃厚相が多く形成されている 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において最も高い透過が観察された（図 13 左）。そこで、ヘアレスラット皮膚を用いても同様の実験を行った（図 13 右）。過飽和にも関わらず 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において促進効果が観察されないこと、薬物濃厚相が多く形成されている 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において最も高い透過が観察されることなど、PNM とラット皮膚の傾向は類似しており、シリコーン膜のようなシンプルな結果は示されなかった。この結果が、FP の特殊性によるものなのか、親水性透過経路を有する膜において観察される現象なのか、現時点では不明である。今後、多様な条件での比較検討が必要と考えられる。

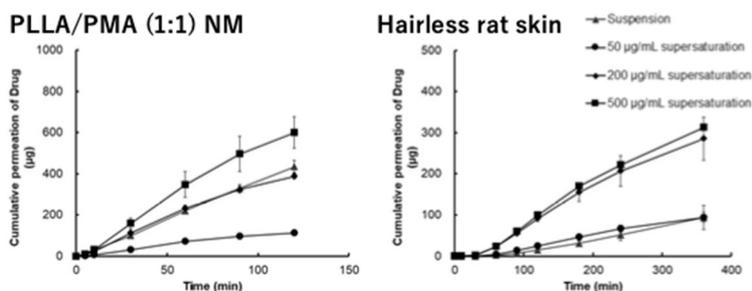


図13 FPの過飽和による透過促進効果：PNMとラット皮膚の比較

4-6. 総括

本研究では、消化管における薬物の移動過程を考慮した *in vitro* 実験系の確立を目的とし、特に難水溶性塩基性薬物の過飽和現象の吸収促進効果を評価することを目標として、以下の3点について成果を得た。

- 1) 胃排出のタイミングを任意で設定可能な *in vitro* 消化管モデルを作成し、腸溶性製剤の溶出試験に応用可能であることを示した。
- 2) FP と KCZ をモデル薬物として、その過飽和状態を pH シフト法により生じさせ、膜透過促進作用に関して有用な知見を得た。
- 3) PNM を高分子材料を組み合わせで作成し、その配合比により、親水性と疎水性の透過ルート の両方を含む膜を、その構成比を任意に設定して作成可能であることを示した。

これらの成果を統合して、完成されたシステムとしての評価系を完成するまでには至らなかったが、個々の実験結果は、薬物の膜透過性とそれを評価するための材料を作成していく上で極めて重要な知見であり、今後の医薬品開発や製品評価において、その発展に寄与するものと確信する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 翔太、大野 由依、関 智宏、小島 裕、三木 涼太郎、江川 裕哉、細谷 治、関 俊暢
2. 発表標題 In vitro 消化管モデルを用いた過飽和過程を含むケトコナゾールの薬物吸収への影響要因の調査
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 貴大、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 過飽和を利用した難水溶性薬物の経皮吸収促進に関する基礎的研究
3. 学会等名 第140回日本薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 俊暢、塚越 良太、秋元 祐佳里、大野 由依、細谷 治
2. 発表標題 製剤の胃排出の制御が可能なin vitro消化管モデルの設計
3. 学会等名 第139回日本薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 雄貴、大野 由依、細谷 治、関 俊暢
2. 発表標題 皮下投与での水の移動を考慮可能なin vitro実験系の検討
3. 学会等名 第139回日本薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 貴大、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 種々のポリマーを用いて調製したナノフィルムの薬物透過性評価
3. 学会等名 第35年会日本薬剤学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 貴大、織田 ひかる、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 経皮吸収促進に有効な過飽和形成条件の検討
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------