

氏名 (生年月日) 木村 峻輔 (1982年8月1日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博薬 第217号

学位授与の日付 2019年9月30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 非晶質固体粒子が関与する難水溶性化合物の新規生体膜透過現象の発見

論文審査委員 (主査) 教授 山本 昌  
(副査) 教授 安井 裕之  
(副査) 教授 斎藤 博幸

## 論文内容の要旨

### 緒言

一般に、受動輸送に基づく化合物の生体膜透過は溶解した薬物の濃度に依存し、難水溶性薬物の消化管吸収を確保するためには、溶解性の改善が必須と考えられている。近年の新規医薬品候補化合物の多くは難水溶性であるため、その消化管吸収性を確保するために、難水溶性化合物の溶解性を改善する研究が活発に行われている。本研究では、難水溶性モデル化合物として汎用される curcumin (CUR) の吸収性改善を目的として、微粒子化と非晶質化の両者を実現した製剤を調製した。それらの影響を評価するために、種々の検討を行ったところ、CUR の非晶質固体粒子が直接関与する新規生体膜透過機構が存在する可能性を見出した。本透過機構の詳細を明らかにするために、細胞層を用いた CUR の *in vitro* 生体膜透過、*in vivo* における CUR の消化管吸収に関する詳細な検討を行った。さらに、透過機構の一般性を確認するために、同様の機構で膜透過する薬物として furosemide (FUR) に注目し、同様の検討を行った。

### 第1章：非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構：培養細胞層を用いた *in vitro* 透過性評価

CUR の吸収性改善を目的として、マイクロリアクターによる晶析を行うことで、非晶質で、微粒子化された CUR 製剤 (amorphous nanoparticles of curcumin, ANC) を調製した。ANC からの CUR の溶出を評価したところ、CUR の溶解度は結晶性 CUR (crystal curcumin, CC) に比べて、約 300 倍改善されることが明らかとなった。MDCK 細胞単層膜を用いて *in vitro* 細胞層透過性を評価したところ、ANC 飽和溶液からの細胞層透過量は定量限界以下であったが、ANC 懸濁液からの透過は顕著に増大した。さらに、透過量の増大は懸濁液濃度すなわち未溶解固体量に依存することが明らかとなった。懸濁液中の溶解した CUR 濃度は一定と考えられるため、本知見は従来の膜透過に関する概念と明らかに矛盾する。未溶解固体量に比例した透過が観察されたことから、CUR の細胞層透過に懸濁液中の固体粒子が関与する可能性が示された。その後、種々の検討・考察を行ったところ、未溶解固体粒子と細胞層との接触が重要である可能性が推察された。そこで CUR の透過の方向性を検討した。一般的な実験の透過方向 (細胞層の上部から下部への方向、固体粒子と細胞層が接触可能) の透過は良

好であったが、逆方向（細胞層の下部から上部への方向、固体粒子と細胞層は接触不可能）の透過量は低いことが明らかとなった。さらに、より効率的に固体粒子が細胞層表面と接触可能な実験系として、細胞層表面を空気に接触させた *air-interface condition* (AIC) 条件下で透過を測定した。CC、ANC を細胞層表面に噴霧したところ、ANC において最も高い透過量が得られた。また、一部結晶化した非晶質製剤を用いたところ、非晶質の程度に応じた CUR の透過が観察された。以上の知見より、新規生体膜透過機構に基づく CUR の膜透過は固体粒子と生体膜との接触を通じて起こり、結晶性固体に比べて、非晶質固体からの透過が優位であることが明らかとなった。

## 第 2 章：非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構：動物実験による *in vivo* 吸収性評価

*In vitro* で観察された新規透過機構を CUR の吸収改善に応用するためには、*in vivo* 吸収性の評価が重要である。消化管や気道粘膜（鼻腔、肺）などの薬物投与粘膜の表面には粘液層が存在する。この粘液層が固体粒子との接触を阻害し、吸収改善が望めない可能性が懸念される。そこで、まず消化管粘膜表面の粘液層の影響を評価するために、予め粘液溶解剤（10 mM DTT）により粘液層を除去した条件で CUR 消化管吸収性を評価した。粘液層の有無に関わらず、ANC 懸濁液投与後の CUR の消化管吸収性に顕著な相違は観察されず、表面粘液層の影響はきわめて小さいことが明らかとなった。次に、系統的に CUR の消化管吸収性を評価した。CC 懸濁液を十二指腸内に投与した後の生物学的利用率 (BA) は約 0.4% であり、過去の報告と同程度の低い値であった。次に、濃度の異なる 3 種類の ANC 懸濁液を投与したところ、CUR の血中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、懸濁液濃度すなわち未溶解の固体量に依存して増大した。本知見は、*in vitro* 細胞層透過実験の結果と一致しており、CUR の *in vivo* 消化管吸収においても、新規生体膜透過機構が機能することが明らかとなった。次に、固体粒子がより効率よく吸収粘膜表面と接触可能な投与部位として、肺に注目した。製剤粉末を肺内に噴霧することによって、多くの固体粒子が粘膜表面に到達し、接触が可能である。ANC の肺内噴霧投与後の AUC は消化管吸収と同様、固体量依存的に増大し、BA は CC 懸濁液からの消化管吸収性と比べて、約 100 倍に改善された。*In vivo* 実験を通じて得られた CUR の消化管吸収、経肺吸収に関する知見は、すべての ANC 固体粒子と粘膜表面との接触の量および程度と関連しており、新規生体膜透過機構に基づいて、CUR が吸収されることを示唆する結果と考えられる。本透過機構を上手く利用することで、簡便で効率的な CUR 吸収性改善が期待できることが明らかとなった。

## 第 3 章：新規生体膜透過機構により輸送される薬物例：フロセミドに関する検討

これまでの検討では、CUR をモデルとして検討を行い、種々の興味深い知見を得ることができた。しかし、新規生体膜透過機構が CUR 固有の機構である場合、本透過機構の応用の可能性は限定的である。すなわち、応用を考える上で、本透過機構が CUR 以外の薬物でも観察される一般的な透過機構であるか否かを確認することはきわめて重要である。そこで、水溶性・膜透過性ともに低い薬物を中心に、検索・予備検討を行ったところ、FUR が候補薬物であることが示唆された。そこで、FUR を用いて、CUR と同様の検討を行った。FUR の非晶質製剤 (FUR-K12) は、非晶質安定化剤として高分子ポリマー (PVP-K12) と FUR 原末を混合し、ボール粉砕することにより調製した。*In vitro* MDCK 細胞層透過性実験の結果、FUR 溶液からの透過に比べて、AIC 条件下、FUR-K12 からの細胞層透過量が顕著に増大した。しかし、CUR の場合とは異なり、結晶性 FUR からも高い透過が観察された。FUR の溶解度が中性 pH 付近で良好であることから、膜近傍で固体が溶解することで、細胞層透過

が促進された可能性が考えられた。そこで、水分の影響を排除可能な脂質人工膜（20 w/v% レシチン含有ドデカン溶液）を用いて、同様の検討を行ったところ、細胞層透過と同様の結果が得られた。次に、FUR の *in vivo* 吸収性を検討した。*In vivo* 経肺吸収に関しては、CUR と同様、FUR-K12 からの吸収が良好であり、吸収率はほぼ 100 % であることが明らかとなった。FUR に関する *in vitro* 膜透過特性や *in vivo* 吸収特性は CUR ほどクリアではないが、溶解した薬物濃度で膜透過性、吸収性の増大を定量的に説明することは不可能であり、FUR が新規膜透過機構に基づいて膜透過・吸収される可能性が示唆された。すなわち、本透過機構は CUR のみで観察される特殊な透過機構ではなく、ある条件を満たす薬物で観察される一般的な現象である可能性が示された。

## 総括

本研究では、固体粒子が直接関与する CUR、FUR に関する新規生体膜透過機構を見出した。未溶解の非晶質固体に焦点を当てることによって見出された本生体膜透過機構は、溶解した薬物のみが吸収・膜透過に関与するという従来の理論とは本質的に異なり、膜透過に関する概念を拡張するものと期待される。低い溶解性と膜透過性を示す一部の薬物の吸収改善にきわめて有用な方法論となる可能性がある。本研究で得られた知見は次世代の医薬品開発に向けた重要な基礎的情報と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

### 緒言

一般に、受動輸送に基づく化合物の生体膜透過は溶解した薬物の濃度に依存し、難水溶性薬物の消化管吸収を確保するためには、溶解性の改善が必須と考えられている。近年、新規医薬品候補化合物の多くは難水溶性であるため、その消化管吸収性を確保するために、難水溶性化合物の溶解性を改善する研究が活発に行われている。こうした背景から、本研究では、難水溶性モデル化合物として汎用される curcumin (CUR) 及び furosemide (FUR) の吸収性改善を目的として、微粒子化と非晶質化の両者を実現した製剤を調製し、これら難水溶性化合物の消化管吸収改善を達成した。また、これら化合物の固体分子が関与する新たな生体膜透過現象を見出した。

### 第 1 章 非晶質ナノ粒子製剤化 CUR に関する新規生体膜透過機構：培養細胞層を用いた *in vitro* 透過性の評価

非晶質で微粒子化された CUR 製剤 (amorphous nanoparticles of curcumin) は、マイクロリアクターによる晶析を行うことにより調製した。最初に、CUR の溶解度を測定したところ、非晶質ナノ粒子 CUR の溶解度は、結晶性 CUR に比べて約 300 倍改善されることが認められた。また、非晶質ナノ粒子 CUR 飽和溶液における CUR の *in vitro* 細胞層透過量は定量限界以下であったが、非晶質ナノ粒子 CUR 懸濁液における CUR の透過は顕著に増大した。さらに、CUR の透過量の増大は懸濁液濃度すなわち未溶解固体量に依存することが明らかとなった。懸濁液中の溶解した CUR 濃度は一定と考えられるため、本知見は従来の膜透過に関する概念と明らかに矛盾した。以上のように、CUR の未溶解固体量に比例した透過が観察されたことから、CUR の細胞層透過に懸濁液中の固体粒子が関与する可能性が示された。

## 第2章 非晶質ナノ粒子製剤化 CUR に関する新規生体膜透過機構：動物実験による *in vivo* 吸収性の評価

次に *in vitro* で観察された CUR の新規透過機構が、*in vivo* 系においても観察されるか否かを検討するため、CUR の *in vivo* 吸収性を評価した。結晶性 CUR 懸濁液を十二指腸内に投与した後の生物学的利用率 (BA) は低い値を示したが、濃度の異なる 3 種類の非晶質ナノ粒子 CUR 懸濁液を投与した場合、血中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、懸濁液濃度すなわち未溶解の固体量に依存して増大した。以上のことから、本知見は *in vitro* 細胞層透過実験の結果と一致しており、CUR の *in vivo* 消化管吸収においても、新規生体膜透過現象がみられることが明らかとなった。

## 第3章 新規生体膜透過現象により輸送される薬物例：FUR に関する検討

本透過現象が CUR 以外の薬物でも観察される一般的な透過現象であるかどうかを確認するため、水溶性、膜透過性ともに低い薬物である FUR を候補薬物として用いて、CUR と同様の検討を行った。*In vitro* 細胞層透過性実験の結果、非晶質製剤における FUR の細胞層透過量は、FUR 溶液からの透過に比べて顕著に増大した。また、FUR においても溶解した薬物濃度で膜透過性、吸収性の増大を定量的に説明できないことが認められ、FUR も CUR と同様の新規膜透過現象に基づいて膜透過、吸収される可能性が示唆された。

## 結論

本研究では、固体粒子が直接関与する CUR 及び FUR に関する新規生体膜透過現象を見出した。未溶解の非晶質固体粒子が膜透過性に関与するこうした生体膜透過現象は、溶解した薬物のみが吸収、膜透過に関与するという従来の理論とは本質的に異なり、膜透過に関する概念を拡張するものと期待される。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士 (薬学) の学位論文としての価値を有するものと判断する。