

2020 年度  
博士学位論文

難吸収性薬物の消化管吸収改善作用を有する医薬品添加剤の評価  
—カプリン酸類似化合物及び Labrasol® 関連製剤の  
有用性と吸収促進機構の解析—

京都薬科大学

鵜飼 裕紀



本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Hiroki Ukai, Arisa Kawagoe, Erika Sato, Masaki Morishita, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto. Propylene glycol caprylate as a novel potential absorption enhancer for improving the intestinal absorption of insulin: Efficacy, safety, and absorption-enhancing mechanisms. *J. Pharm. Sci.* 2020, **109**, 1483-1492. [第 1 章]
- 2) Hiroki Ukai, Kazuki Iwasa, Takamasa Deguchi, Masaki Morishita, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto. Enhanced intestinal absorption of insulin by Capryol 90, a novel absorption enhancer in rats: Implications in oral insulin delivery. *Pharmaceutics* 2020, **12**, 462. [第 2 章]
- 3) Hiroki Ukai, Ayako Imanishi, Ayaka Kaneda, Erika Kimura, Miku Koyama, Masaki Morishita, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto. Absorption-enhancing mechanisms of Capryol 90, a novel absorption enhancer, for improving the intestinal absorption of poorly absorbed drugs: Contributions to trans- or para-cellular pathways. *Pharm. Res.* 2020, **37**, 248. [第 2 章]

# 目次

序論.....	1
本論.....	4
第 1 章 Insulin の消化管吸収性に及ぼすカプリン酸類似化合物の影響ならびに吸収促進機構に関する検討.....	4
第 1 節 カプリン酸及びその類似化合物による insulin の消化管吸収性の改善.....	4
【緒言】.....	4
【実験材料】.....	5
【実験方法】.....	6
【結果】.....	8
1. Insulin の小腸吸収性に及ぼすカプリン酸類似化合物の影響.....	8
2. カプリン酸類似化合物の吸収促進効果の消化管部位特異性.....	9
3. カプリン酸類似化合物の消化管粘膜障害性.....	11
4. Sefsol-218 による吸収促進効果の可逆性.....	12
【考察】.....	14
第 2 節 Sefsol-218 の吸収促進剤機構に関する検討.....	16
【緒言】.....	16
【実験材料】.....	17
【実験方法】.....	18
【結果】.....	23
1. Insulin の安定性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響.....	23
2. Insulin の会合性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響.....	24
3. 消化管粘膜の膜流動性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響.....	25
4. Caco-2 細胞透過性ならびに膜抵抗値に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響.....	27
5. TJ 関連タンパク質に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響.....	29
【考察】.....	31
第 2 章 Labrasol® 及びその関連製剤による難吸収性薬物の消化管吸収性改善ならびに吸収促進機構の解析.....	34

第 1 節 Labrasol® 及びその関連製剤による各種難吸収性薬物の消化管吸収性の改善 .....	34
【緒言】 .....	34
【実験材料】 .....	36
【実験方法】 .....	37
【結果】 .....	39
1. Insulin の小腸吸収性に及ぼす Labrasol® 及びその関連製剤の影響.....	39
2. CF ならびに ALN の小腸吸収性に及ぼす Labrasol® 及びその関連製剤の影響.....	41
3. Labrasol® 及びその関連製剤の小腸粘膜障害性の評価.....	44
4. Capryol 90 の吸収促進効果の分子量依存性.....	45
5. Capryol 90 の吸収促進効果の部位特異性.....	47
6. Capryol 90 の吸収促進効果の可逆性.....	49
7. Insulin に対する Capryol 90 の吸収促進効果に及ぼす pH の影響.....	50
【考察】 .....	51
第 2 節 Capryol 90 の吸収促進剤機構の解析 .....	54
【緒言】 .....	54
【実験材料】 .....	55
【実験方法】 .....	55
【結果】 .....	57
1. Insulin の会合性に及ぼす Capryol 90 ならびに溶液中 pH の影響.....	57
2. Insulin の安定性に及ぼす Capryol 90 及び pH の影響.....	57
3. BBMVs の膜流動性に及ぼす Capryol 90 の影響 .....	58
4. CF ならびに insulin の Caco-2 細胞透過性に及ぼす Capryol 90 の影響.....	59
5. 各種 TJ 関連タンパク質に及ぼす Capryol 90 の影響.....	61
6. 各製剤の Ca <sup>2+</sup> イオンに対する親和性と吸収促進効果との関連.....	63
【考察】 .....	65
結論.....	68
謝辞.....	70
引用文献.....	71

## 略語一覽

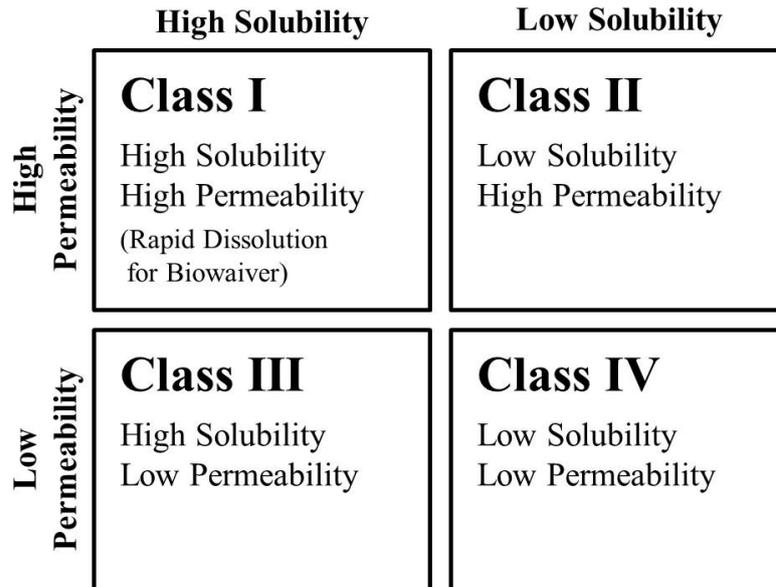
AAC	area above the curve
AJ	adherence junction
ALN	alendronate
AUC	area under the curve
BA	bioavailability
BBMV <sub>s</sub>	brush border membrane vesicles
BCS	biopharmaceutics classification system
BP	bisphosphonate
C10	capric acid
Caco-2	colon adenocarcinoma-2
CD	circular dichroism
CF	5(6)-carboxyfluorescein
C <sub>max</sub>	peak concentrations
CMC	critical micelle concentration
DAPI	4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNS-Cl	dansyl chloride
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGTA	ethylenebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid
ER	absorption enhancement ratios
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FD	fluorescein isothiocyanate-dextran
GOD	glucose oxidase
HBS	Hank's balanced salt
HCO-60	hydrogenated castor oil-60
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
LDH	lactate dehydrogenase
mHBSS	modified Hank's balanced salt solution
NEAA	non-essential amino acid solution

NOC7	1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene
PA	pharmacological availability
$P_{app}$	apparent permeability coefficient
PBS	phosphate buffered saline
PEG	polyethylene glycol
PKC	protein kinase C
PVDF	polyvinylidene difluoride
S.E.	standard error of mean
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNAC	sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino]caprylate
TBS	tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween 20
TCA	trichloroacetic acid
TEER	transepithelial electrical resistance
TFA	trifluoroacetic acid
TJ	tight junction
tma-DPH	1-(4-trimethyl-ammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene r-toluenesulfonate
$T_{max}$	time to reach the peak concentrations
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
ZO	zonula occludens

## 序論

医薬品の経口投与は、痛みを伴わないこと、利便性に優れ投与が簡便であること、消化管からの吸収効率が皮膚など他の経路よりも良好であること、注射剤よりも高容量の薬物の搭載が可能なることから、今日の薬物治療において最も汎用されている投与経路である<sup>1,2</sup>。現在、日本で薬価基準収載されている医薬品は、内用薬、注射薬、外用薬（軟膏、坐薬、吸入薬、うがい薬など）及び、歯科用薬剤に分類され、約 1 万 4 千程度ある品目のうち、内服薬に分類される医薬品は約 60%（約 9 千品目）と半数以上を占める<sup>3</sup>。一方、経口投与の欠点として、1) 消化管内の食物や他の薬物の存在によって、薬物の吸収量や吸収速度が左右されること、2) 消化管を刺激する薬剤があること、3) 幼児や意識のない患者等、すべての患者に適用できるわけではないこと、4) 吸収率に個人差があること、5) 消化管内は薬物が分解されやすい環境であること、6) 生物学的利用率 (bioavailability; BA) の低い薬物が存在することが挙げられる。消化管上皮細胞には細胞間接着構造 (e.g. adherence junction; AJ) や密着結合 (tight junction; TJ) に代表されるバリア機能が存在することから<sup>4,6</sup>、薬物を経口製剤化する際には、6) の理由により開発が困難となる場合が非常に多い。

一方、*in vitro* ならびに *in silico* の評価系においては近年の医薬品開発技術の発展により、目的の薬効標的に対して、高い生理活性を有する医薬品候補化合物を高速かつ自動で探索することが可能となりつつある<sup>7,8</sup>。これら高い生理活性を有する物質として、多糖類、核酸、ペプチド・タンパク質等が挙げられるが、これらは従来の低分子化合物と比較して、難吸収性、易分解性、難溶解性、高分子量となる傾向がある。特に、ペプチド・タンパク質性医薬品は多様な生理活性を有するものの、親水性高分子であるために膜透過性は極端に低く、酵素分解を受けるため生体内での安定性も著しく低い<sup>9,10</sup>。また、薬物の消化管吸収はトランスポーターが関与する一部の例外はあるものの、主に溶解性と膜透過性によって規定される。したがって、どの程度の溶解性や膜透過性を有すれば、十分な経口吸収性が見込まれるのか、または許容範囲と考えられるのかを十分に理解する必要がある。そこで、医薬品化合物の溶解性と膜透過性によって化合物を 4 つのクラスに分類する **biopharmaceutics classification system (BCS)** 分類を、医薬品開発戦略に取り入れようとする試みがある (Fig. 1)。実際、医薬品の候補化合物となるものは、Class II に分類される難溶解性化合物または Class III に分類される難膜透過性化合物となる場合が多い。溶解性の低い BCS Class II に分類される化合物の場合、消化管内での溶解過程が吸収の律速となる。これら化合物に対する製剤戦略としては、薬物の非晶質化、ナノ粒子化、固体分散体の利用といった製剤戦略が知られているが、これらのアプローチについては多くの研究とともに、方法論が確立されつつある。しかしながら、脂質膜の透過性に問題のある BCS Class III に分類される化合物の場合は、粘膜の損傷や消化管吸収部位差等に起因して、個体間及び個体内変動が大きくなること、受動拡散による膜透過性が減少することが問題視される。したがって、これら化合物の消化管吸収性改善技術を開発することが非常に重要である。



**Fig. 1** The biopharmaceutics classification system (BCS) as defined by the Food and Drug Administration (FDA)<sup>11</sup>.

水溶性難吸収性医薬品を経口製剤化することで、服薬アドヒアランスの向上が期待される。したがって、薬物の消化管吸収性の改善に関して、多様なアプローチの製剤研究が進められてきた。その例として、1) 吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤など製剤添加物の利用<sup>12-17</sup>、2) 薬物の化学構造の修飾<sup>18-20</sup>、3) 薬物の剤形修飾<sup>21-24</sup>等が検討されており、経口剤の製剤化戦略は多岐にわたる。これら方法論の中でも、1) 吸収促進剤等の医薬品添加剤の利用は、製剤に混合するだけで効果が期待できるという特徴を有する。すなわち、本法は利用が容易であり、幅広い薬物に適用できるという利点から、大量生産を想定した技術面やコスト面において、最も有望なアプローチであると考えられる<sup>25,26</sup>。現在までに、キレート剤<sup>27</sup>、胆汁酸<sup>28</sup>、界面活性剤<sup>29</sup>、及び脂肪酸<sup>30</sup>等の吸収促進剤の有用性について報告されているものの、有効性の高い吸収促進剤は粘膜に対して障害性を惹起することも多い。したがって、吸収促進剤の実用化例は ampicillin や ceftizoxime の小児用坐剤の添加物として適用される脂肪酸のカプリン酸 (C10)<sup>31</sup>、ならびに semaglutide の経口製剤に添加されている中鎖脂肪酸誘導体の sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino]caprylate (SNAC)<sup>25,32</sup>、の 2 例に留まっている。したがって、有効性が高いだけでなく、安全性の高い新規吸収促進剤の開発ならびに評価が非常に重要であると考えられる。

本研究では C10 が実用化されていることに注目し、著者は C10 の化学構造に類似した化合物は有効性や安全性の観点から実用化につながる可能性があると考えた。すなわち、第 1 章においては、代表的なペプチド性医薬品である insulin をモデル薬物として使用し、insulin の消化管吸収に及ぼす 3 種類の脂肪酸と 6 種類の脂肪酸エステルの吸収促進効果について検討した。また、一般的に経口投与された医薬品の上皮細胞層及び内皮細胞層における吸収過程は、脂溶性の高い薬物や能動輸送により輸送される薬物の透過経路である transcellular route と、水溶性の高い薬物や受動輸送で輸送される薬物の透過経路である paracellular route

に大別される。そこで第 1 章第 2 節においては、吸収促進剤の吸収促進機構におけるこれら透過過程の寄与に着目するとともに、安定性や会合性といった insulin の物性に対する影響を、既存の添加剤である C10 と比較しながら検討した。

さらに第 2 章では、新たな製剤群として Labrasol<sup>®</sup> の関連製剤に着目した。Labrasol<sup>®</sup> は、その構造に polyglycolysed C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> glycerides を含む製剤添加物であり、従来から溶解補助剤として microemulsion 等の処方に利用されている。第 1 章で検討したカプリン酸類似化合物は単一化合物である一方、Labrasol<sup>®</sup> は遊離 glyceride 等を含む混合製剤である。さらに近年、Labrasol<sup>®</sup> の作用として一部の難吸収性薬物に対する消化管吸収性改善作用も報告されていることから、注目を集めている添加剤の一つである。しかしながら、Labrasol<sup>®</sup> に類似した製剤の吸収促進効果の報告は少なく、その吸収促進機構に関しては未だ不明な点が多い。ここで、Labrasol<sup>®</sup> を単一な化合物として定義することは困難であるが、その成分の一部に中鎖脂肪酸エステルを含むことから、一種のカプリン酸類似化合物と考えることもできる。第 2 章では様々な親水性及び疎水性部位を有する製剤を選択し、これらの難吸収性薬物に対する吸収促進効果を比較した。すなわち、第 2 章第 1 節では、insulin、5(6)-carboxyfluorescein (CF)、fluorescein isothiocyanate-dextran (FD)、及び bisphosphonate (BP) の一つである alendronate sodium (sodium 4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonate trihydrate: ALN) を難吸収性モデル薬物として選択し、消化管における Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤の吸収促進効果を評価するとともに、第 2 章第 2 節ではその吸収促進機構について検討した。以下、得られた結果を 2 章にわたり論述する。

## 本論

### 第 1 章 **Insulin** の消化管吸収性に及ぼすカプリン酸類似化合物の影響 ならびに吸収促進機構に関する検討

#### 第 1 節 カプリン酸及びその類似化合物による **insulin** の消化管吸収性の改善

##### 【緒言】

近年、遺伝子組み換え技術等の科学技術の進歩に伴い、多くのペプチド・タンパク性医薬品が臨床応用されている<sup>33</sup>。これら医薬品は注射で投与されるのが一般的であるが<sup>34</sup>、服薬アドヒアランスを考慮すると経口投与製剤が望まれる<sup>10</sup>。しかしながら、**insulin** に代表されるペプチド・タンパク性医薬品の特性は経口投与には適していない。すなわち、これら医薬品は消化管内に存在するタンパク分解酵素などの種々の酵素によって分解されやすいことが消化管吸収性の悪い原因となっている。これら薬物の構造中に含まれるペプチド結合は、膵酵素である **chymotrypsin** や **trypsin** などの **proteases** によって分解されるため、これらの医薬品は消化管から吸収される前に消化管から消失することが知られている。また、一般的には分子量 500～600 程度が消化管において十分な吸収が得られる上限であると考えられているが、**insulin** の分子量は約 6000 と大きいことから消化管上皮細胞中の拡散速度が遅くなることも低い吸収性の一因である<sup>35</sup>。

一方、以前から脂肪酸類は難吸収性薬物の吸収を改善する添加剤（吸収促進剤）として着目されてきた。既に臨床で実用化されている吸収促進剤である **C10** や **SNAC** もその例外ではない。しかしながら、**C10** に類似した化合物については吸収促進効果を報告した例は少なく、吸収促進機構も不明な点が多い。すなわち、**C10** の化学構造に類似した化合物は、有効性や安全性の観点から実用化につながる可能性があると考えられる。そこで本章では、**C10** の化学構造に類似した 3 種類の脂肪酸と 6 種類の脂肪酸エステルを選択し、ペプチド性医薬品である **insulin** の消化管吸収性に及ぼすこれらカプリン酸類似化合物の吸収促進作用について評価するとともに、粘膜に対する障害性を評価することで、有効かつ安全な添加剤を見出すことを目的に系統的な検討を行った。

## 【実験材料】

### 1. 器具

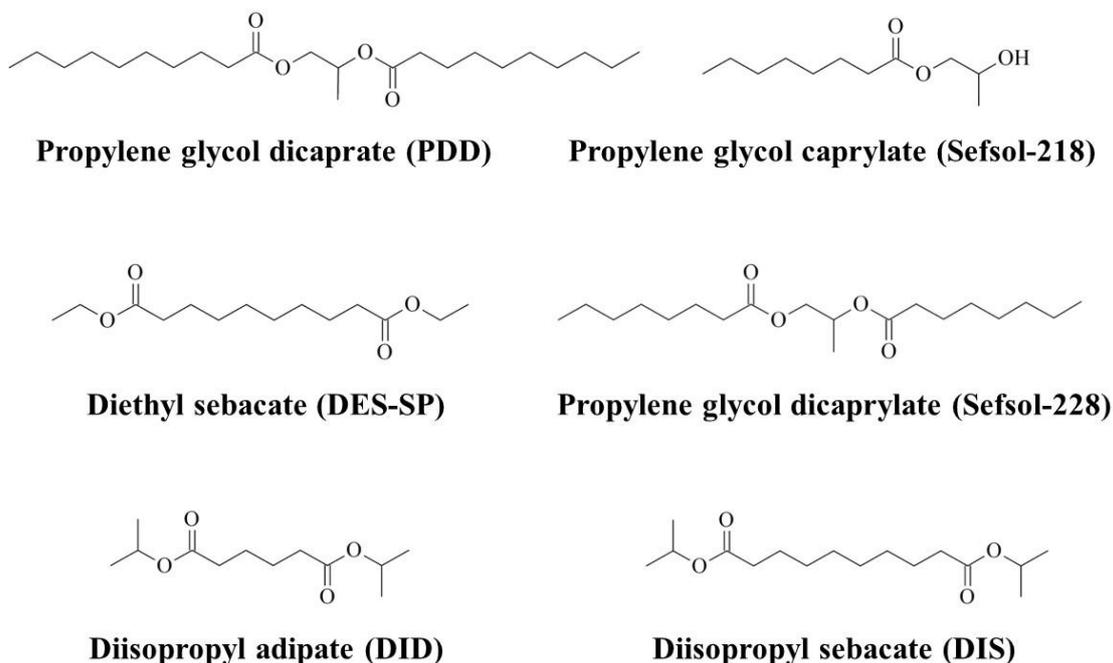
Silicon tube (SR-1554; internal diameter, 3 mm; outer diameter, 5 mm) は Tigers Polymer Co. (Osaka) より購入した。

### 2. 実験動物

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、220-260 g) は SLC, Inc. (Shizuoka) より購入した。動物実験はすべて京都薬科大学動物倫理委員会のガイドラインにしたがって実施した。

### 3. 試薬

Recombinant human insulin、glucose C2 test、lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity test kit は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。脂肪酸エステル (Propylene glycol dicaprate (PDD)、propylene glycol caprylate (Sefsol-218)、diethyl sebacate (DES-SP)、propylene glycol dicaprylate (Sefsol-228)、diisopropyl adipate (DID)、diisopropyl sebacate (DIS))、hydrogenated castor oil-60 (HCO-60) は Nikko Chemical Co., Ltd. (Osaka) より入手した。脂肪酸 (sodium caprylate (C8)、sodium caprate (C10)、sodium laurate (C12)) は Tokyo Chemical Industry (Tokyo) より購入した。Triton X-100 は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto) より購入した。なお、本節にて使用した各脂肪酸エステルの化学構造は Fig. 2 に示す。



**Fig. 2** The chemical structures of various fatty acid esters.  
(*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 1)

## 【実験方法】

### 1. 投与液の調製

Insulin の stock solution は 0.01 M HCl を用いて調製した。In situ closed loop 法による消化管吸収実験に用いた投与液は、phosphate buffered saline (PBS, pH 7) を用いて調製した。2 倍濃度の PBS に溶解補助剤として HCO-60 を最終濃度が 1.0 % (w/v) となるように加え、各種脂肪酸ならびに脂肪酸エステルを 5.0 % (v/v or w/v) の濃度となるよう添加し加温しながら溶解させた。pH を調整後、insulin solution を小腸に関しては 6.4 IU/mL (80 IU/kg)、大腸に関しては 19.2 IU/mL (80 IU/kg) となるように添加し、規定量まで milli Q でメスアップすることで最終的に PBS が 1 倍濃度となるよう調製した。

なお、本研究では各添加剤の溶解を補助する目的で HCO-60 を使用した。以前、当研究室では一般的な可溶化剤である HCO-60 は難吸収性薬物に対して吸収促進効果を発揮せず、粘膜損傷を惹起しないことを示している<sup>36</sup>。また、著者の予備検討において in situ closed loop 法により薬物 (CF, ALN, insulin) の消化管吸収に対する HCO-60 単独の効果を評価し、HCO-60 のみでは薬物の消化管吸収を変化させないことを確認している。本研究においては HCO-60 の吸収促進作用や溶解補助作用を完全に除外するために、control 群を含むすべての投与液に HCO-60 を添加し使用した。

### 2. 消化管吸収実験

消化管吸収実験は、in situ closed loop 法を用いて行った<sup>16</sup>。12 時間絶食した Wistar 系雄性ラットに pentobarbital (32 mg/kg) ならびに lidocaine (0.01 mg/kg) を腹腔内投与することで麻酔を施し、温水還流式の固定台に背位固定した。ラットの体温を一定に維持するため、37°C の温水で固定台を還流し、実験は加熱ランプの下で行った。腹部正中切開により小腸を露出させ、十二指腸上部に silicon tube を挿入し、胆汁の影響を除外するために胆管と共に結紮し、盲腸上部 2 cm の回腸部位を切開した。小腸の内容物を洗浄するため、30 mL PBS (pH 7.4) をゆっくりと注入し、洗浄後は空気により消化管内の PBS を除去した。その後、回腸の切開部位に silicon tube を挿入し、結紮することで小腸 loop とした。大腸吸収実験に関しては、盲腸下部の結腸部位ならびに肛門に silicon tube を挿入し、同様に大腸 loop を作成した。あらかじめ頸静脈より blank 用の採血を行った後、薬液を小腸 loop 内に 3 mL または大腸 loop 内に 1 mL 投与し、各カニューレをクリップで留めた。その後、血液サンプルを経時的 (15、30、60、90、120、180、240 分) に頸静脈より採取した。サンプルは血漿分画を得るために、直ちに 10,000 G、5 分間遠心分離を行い、これらの血漿サンプル中の glucose 濃度を測定した。

### 3. 消化管粘膜障害性評価

消化管粘膜障害性は LDH 活性値を指標として評価した<sup>14,16</sup>。各種吸収促進剤または 3% (v/v) の Triton X-100 を消化管 loop 内に投与し、4 時間後、小腸に関しては loop 内に 30 mL、大腸に関しては 15 mL の PBS (pH 7.4) を注入することで、腸管内管腔液を回収した。

得られた管腔液は、4 °C、200 G にて 7 分間遠心分離を行い、その上清を用いて、消化管より漏出した LDH 活性を測定した。LDH 活性値 は、LDH-Cytotoxicity Test kit を用いて反応させた後、マイクロプレートリーダー (Multi Detection Microplate Reader, POWERSCAN® HT, DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka) を用いて 490 nm の波長で吸光度を測定することにより算出した。

#### 4. 可逆性の評価

大腸における、Sefsol-218 の促進作用の可逆性を評価した。前処理群では 1.0 % (v/v) Sefsol-218 を大腸 loop 内に投与し、60 分間前処理を行った。前処理後、PBS (pH 7.4) を用いて大腸 loop 内を洗浄し、直ちに、吸収促進剤を含まない insulin 溶液を投与した。その後、血液サンプル (0.15 mL) を経時的 (15、30、60、90、120、180、240 分) に採取した。サンプルは血漿分画を得るために、10,000 G、5 分間遠心分離を行い、血漿サンプル中の glucose 濃度を測定した。

#### 5. データ解析

Insulin の消化管吸収性は、その血糖降下作用より評価した<sup>13,14,16</sup>。採血により得た血漿中 glucose 濃度を、glucose oxidase (GOD) 法に基づき、glucose C2 Test Kit を用いて測定した。5 μL の血漿サンプルに、調製した発色試薬 750 μL を加えて混合した後、マイクロプレートに 100 μL ずつ入れ、その後マイクロプレートリーダー (Multi Detection Microplate Reader, POWERSCAN® HT, DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka) を用いて 505 nm の波長にて吸光度を測定し、血漿中 glucose 濃度を算出した。Insulin 投与時の薬理効果の指標として、area above the curve (AAC)<sup>16</sup> を用いた。AAC は、初濃度を 100 とした時の血糖値変化を経時的にとり、血糖値が 100 を下回った時点での低下幅を台形面積として算出した値である。また、insulin の pharmacological availability (PA%) は AAC の値より、以下の式に基づいて算出した。

$$PA\% = \frac{AAC_{G.I.}}{AAC_{I.V.}} \times \frac{Dose_{I.V.}}{Dose_{G.I.}} \times 100$$

ここで、AAC<sub>G.I.</sub> は消化管 loop への insulin 投与後の AAC 値、AAC<sub>I.V.</sub> は静脈内への insulin 投与後の AAC 値を表す。また、Dose<sub>I.V.</sub> は insulin の静脈内への投与量 (1 IU/kg)、Dose<sub>G.I.</sub> は insulin の消化管 loop への投与量 (80 IU/kg) をそれぞれ表している。

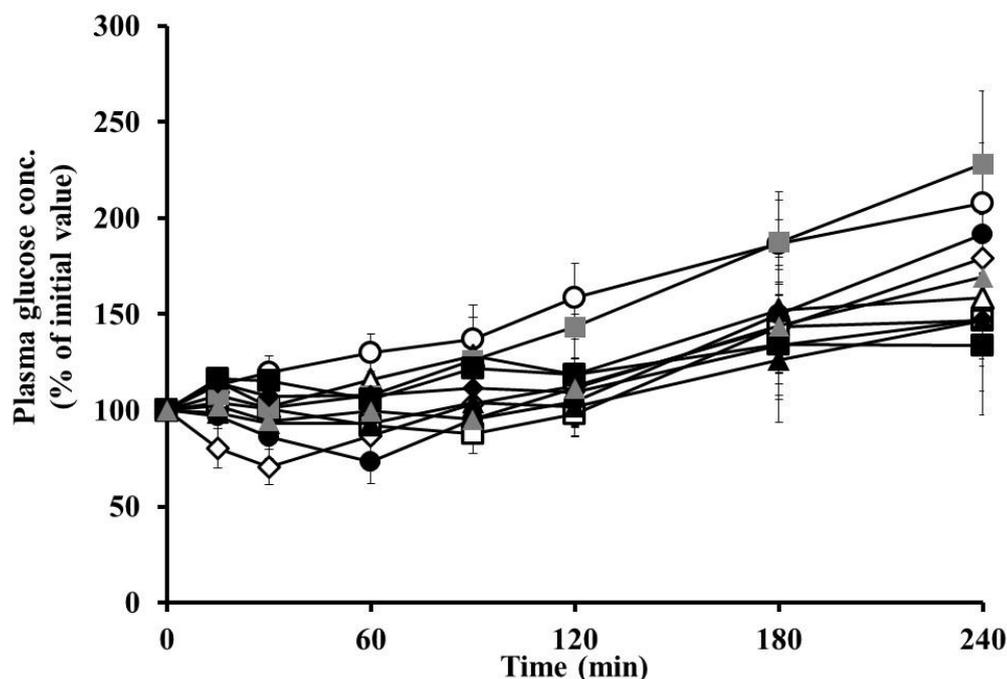
#### 6. 統計学的処理

すべてのデータは、平均値 ± 標準誤差 (S.E.) にて表示した。有意差検定は、多重比較 (Tukey-Kramer test) により行った。

## 【結果】

### 1. Insulin の小腸吸収性に及ぼすカプリン酸類似化合物の影響

小腸における insulin の吸収性を *in situ* closed loop 法により評価した。小腸投与時における各種化合物を併用した際の血漿中 glucose 濃度プロファイルを図 3 に示す。Insulin を小腸に投与した際、血糖降下作用はほとんど観察されず、脂肪酸ならびに脂肪酸エステルを insulin 溶液に添加した場合においても、control 群と比較して有意な血糖値の変化は見られなかった。したがって、小腸に投与した場合は、本検討で使用したいずれの化合物も insulin の吸収性をわずかに増大させるのみに留まることが示唆された。また、得られた血漿中 glucose プロファイルから insulin の薬力学的パラメータを算出し、Table 1 にまとめた。各種カプリン酸類似化合物存在下における insulin の小腸吸収性は control 群と比較して有意な差が見られないこと、ならびに既存の添加剤 (C10) と比べ著しく促進効果を示す脂肪酸エステルがないことが認められた。しかしながら、各種脂肪酸エステルを用いた際の AAC 値は、特に Sefsol-218 と DID を用いた場合に control 群と比較して増大し、これら化合物は insulin に対してある程度の吸収促進効果を有することが示唆された。この結果から、次に大腸における Sefsol-218 と DID の吸収促進効果の検討を行うことにした。



**Fig. 3** The effects of various fatty acids on plasma concentrations of glucose after small intestinal administration of insulin (80 IU/kg) using an *in situ* closed loop. Keys: (○) Control; (◇) C8 (5% w/v); (□) C10 (5% w/v); (△) C12 (5% w/v); (gray ■) PDD (5% v/v); (●) Sefsol-218 (5% v/v); (▲) Sefsol-228 (5% v/v); (◆) DES-SP (5% v/v); (■) DID (5% v/v); (gray ▲) DIS (5% v/v). Glucose concentrations were expressed as percentage values of initial concentration at time zero. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 3-4 rats.

(*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Figure s1)

**Table 1** Effects of various fatty acids on the small intestinal absorption of insulin

Fatty acids	Conc.	AAC (%·min)	PA %
<b>Control</b>	-	<b>130 ± 130</b>	<b>0.02 ± 0.02</b>
<b>C8</b>	<b>5% (w/v)</b>	<b>1640 ± 780</b>	<b>0.25 ± 0.12</b>
<b>C10</b>	<b>5% (w/v)</b>	<b>870 ± 490</b>	<b>0.13 ± 0.075</b>
<b>C12</b>	<b>5% (w/v)</b>	<b>2210 ± 2200</b>	<b>0.34 ± 0.34</b>
<b>PDD</b>	<b>5% (v/v)</b>	<b>76 ± 76</b>	<b>0.01 ± 0.01</b>
<b>Sefsol-218</b>	<b>5% (v/v)</b>	<b>1680 ± 1110</b>	<b>0.26 ± 0.17</b>
<b>Sefsol-228</b>	<b>5% (v/v)</b>	<b>440 ± 250</b>	<b>0.07 ± 0.04</b>
<b>DES-SP</b>	<b>5% (v/v)</b>	<b>920 ± 920</b>	<b>0.14 ± 0.14</b>
<b>DID</b>	<b>5% (v/v)</b>	<b>2410 ± 2410</b>	<b>0.37 ± 0.37</b>
<b>DIS</b>	<b>5% (v/v)</b>	<b>1080 ± 670</b>	<b>0.17 ± 0.10</b>

Pharmacological availability % =  $AAC_{G.I.} / AAC_{I.V.} \times Dose_{I.V.} / Dose_{G.I.} \times 100$

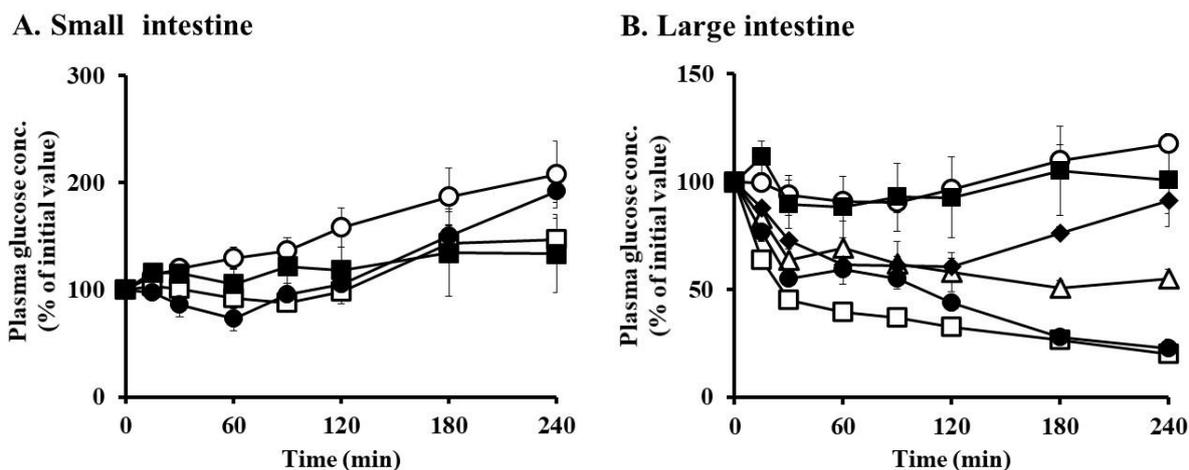
The results are expressed as the mean ± S.E. of 3-4 rats.

(*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Table s1)

## 2. カプリン酸類似化合物の吸収促進効果の消化管部位特異性

小腸において吸収促進効果が認められた Sefsol-218 と DID について、大腸における吸収促進効果の検討を行い、小腸の結果と併せて Fig. 4、Table 2 に示した。また、その吸収促進効果を、既存の吸収促進剤である C10 と比較した。小腸に投与した場合は対照的に、insulin 溶液を大腸に投与した際、C10 または Sefsol-218 の併用によって血漿中 glucose 濃度は顕著に低下した。したがって、C10 及び Sefsol-218 は insulin の大腸からの吸収性を顕著に増大させることが示唆された。

さらに、C10 と Sefsol-218 の大腸における吸収促進効果の濃度依存性について検討した。その結果、いずれの吸収促進剤に関しても、5% の添加時よりも 1% の添加時の方が、AAC ならびに PA が減少することが明らかになった。したがって、C10 ならびに Sefsol-218 の吸収促進効果は濃度依存的事であることが明らかになった。一方、1% の濃度で適用した場合においても control 群と比較して有意な AAC の変化が認められた。この結果から、C10 ならびに Sefsol-218 は、1% の濃度においても insulin の大腸吸収に対して優れた吸収促進効果を発現すること、ならびにこれら 2 つの化合物の吸収促進効果は同等であることが示唆された。



**Fig. 4** The effects of C10, Sefsol-218, and DID on absorption of insulin from rat small intestines (A), or large intestines (B) using an *in situ* closed loop. Insulin absorption following an 80 IU/kg dose was estimated by measuring plasma glucose levels in the plasma. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3-4). Keys: (○) Control; (△) C10 (1% w/v); (□) C10 (5% w/v); (◆) Sefsol-218 (1% v/v); (●) Sefsol-218 (5% v/v); (■) DID (5% v/v). (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 2)

**Table 2** Effects of various fatty acids on the small and large intestinal absorption of insulin

Fatty acids	Conc.	Small intestine		Large intestine	
		AAC (%·min)	PA (%)	AAC (%·min)	PA (%)
Control	-	130 $\pm$ 130	0.02 $\pm$ 0.02	1040 $\pm$ 600	0.16 $\pm$ 0.09
C10	1% (w/v)	-	-	9340 $\pm$ 1360**	1.43 $\pm$ 0.21
	5% (w/v)	870 $\pm$ 490	0.13 $\pm$ 0.075	15350 $\pm$ 130**	2.35 $\pm$ 0.02
Sefsol-218	1% (v/v)	-	-	7280 $\pm$ 430**	1.12 $\pm$ 0.07
	5% (v/v)	1680 $\pm$ 1110	0.26 $\pm$ 0.17	13130 $\pm$ 720**	2.01 $\pm$ 0.11
DID	5% (v/v)	2410 $\pm$ 2410	0.37 $\pm$ 0.37	3000 $\pm$ 1960	0.46 $\pm$ 0.30

Absorption of insulin (80 IU/kg) was estimated by measuring glucose levels in the plasma. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3-4).

AAC, area above the curve; PA, pharmacological availability compared with i.v.

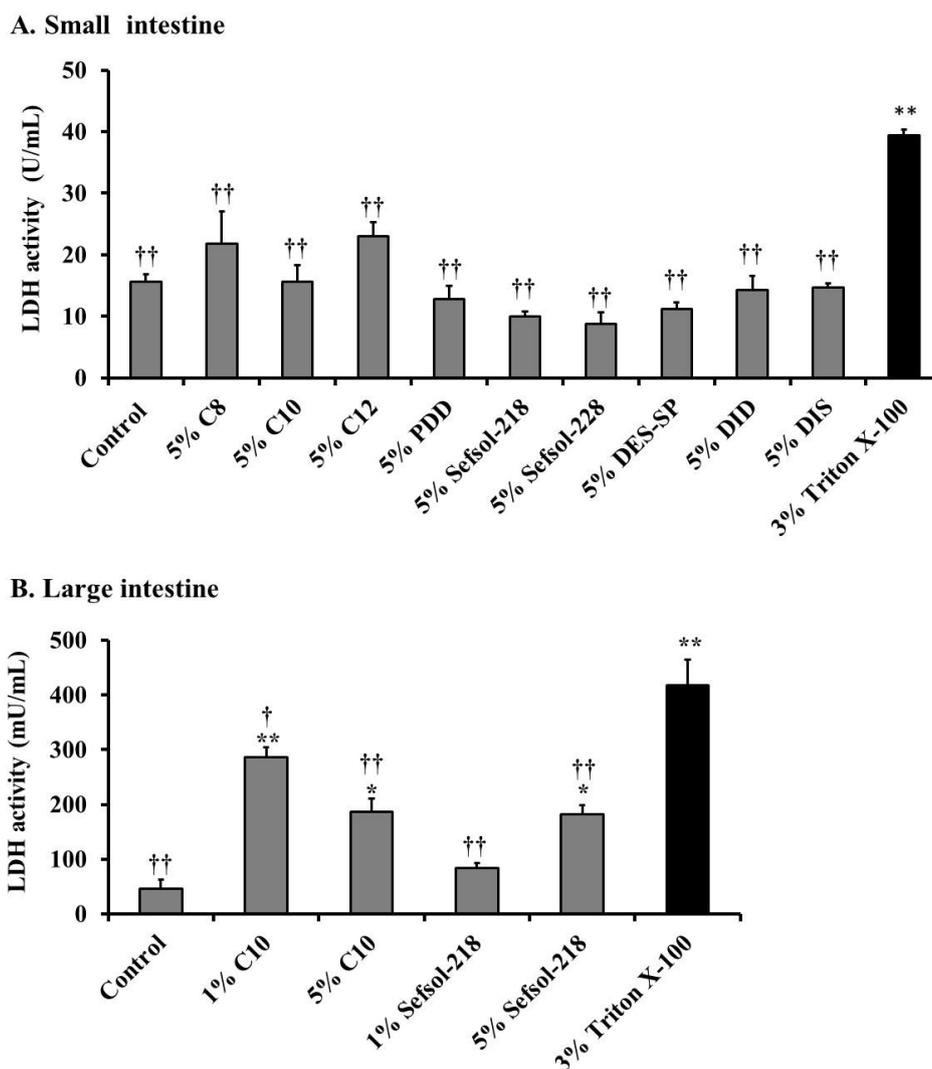
(\*\*) p < 0.01, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Table 1)

### 3. カプリン酸類似化合物の消化管粘膜障害性

既存の吸収促進剤は、高い吸収促進効果と同時に粘膜障害性を有している場合も多く、脂肪酸においても、消化管粘膜障害性を有する可能性があると考えられる。そこで、消化管吸収実験終了後に腸管内管腔に漏出した LDH 活性値を測定することにより、各種脂肪酸ならびに脂肪酸エステルによる消化管粘膜障害性を評価した (Fig. 5)。

その結果、小腸においては、いずれの化合物を併用した場合においても LDH 活性値は control 群と比較して有意な増大は認められなかった。また positive control 群として使用した 3% (v/v) Triton X-100 投与群と比較したところ、いずれの吸収促進剤併用群においても有意な増大が認められた。

さらに、大腸における Sefsol-218 及び C10 の粘膜障害性も同様に評価した。その結果、1% Sefsol-218 併用時の LDH 活性値は control 群と比べ有意な差は認められなかったが、5% Sefsol-218 においては有意に増大した。一方、1%、5% C10 併用時の LDH 活性値は control 群と比較して有意な増大が認められた。したがって、Sefsol-218 は既存の促進剤である C10 と同等の insulin に対する吸収促進効果を示し、かつ C10 と比較して安全性の高い吸収促進剤であることが示された。したがって、以降の実験では、1% の Sefsol-218 を最適な吸収促進剤として選択し、詳細な検討を行った。



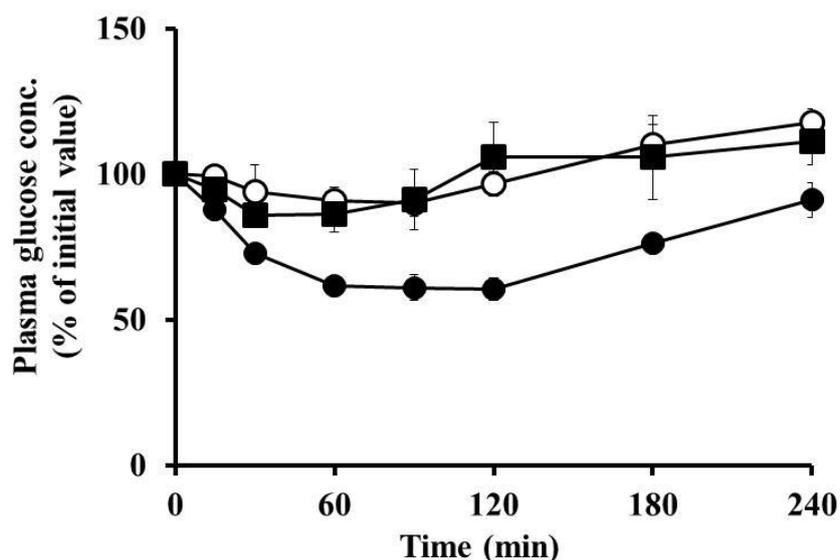
**Fig. 5** Lactate dehydrogenase (LDH) activity as a measure of (A) rat small intestine membrane damage in the presence of various fatty acids (5% w/v and v/v), (B) rat large intestine membrane damage in the presence of C10 and Sefsol-218 at concentrations of 1% and 5% (w/v and v/v). The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 3-4 rats. (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ , compared with the control, (††)  $p < 0.01$ , (†)  $p < 0.05$ , compared with the positive control group. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 3)

#### 4. Sefsol-218 による吸収促進効果の可逆性

前項において、脂肪酸ならびに脂肪酸エステルの中でも、1% Sefsol-218 は有効かつ安全な吸収促進剤であることが明らかとなった。しかしながら、連続的で不可逆的な吸収促進剤の作用は副作用を引き起こすことが懸念されるため、吸収促進作用の可逆性も安全性を評価する重要な要因の一つとなる。そこで Sefsol-218 併用による insulin の吸収改善効果の可逆性を検討した。

大腸における 1% Sefsol-218 併用時ならびに 1% Sefsol-218 前処置群の血漿中 glucose 濃度プロファイルを Fig. 6 に示した。さらに、insulin の薬力学的パラメータを算出し Table 3

にまとめた。その結果、1% Sefsol-218 と insulin の同時投与群においては、顕著な血糖降下作用がみられた。対照的に、1% Sefsol-218 前処置群における血漿中 glucose 濃度の低下はわずかであり、control 群と比較して有意な差は認められなかった。したがって、Sefsol-218 を大腸から除くことで Sefsol-218 の吸収促進効果が顕著に減少したことから、Sefsol-218 の吸収促進効果は可逆的であることが示唆された。



**Fig. 6** Effect of pretreatment with 1% (v/v) Sefsol-218 on absorption of insulin from the large intestine using an *in situ* closed loop. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3). Keys: (○) Control; (●) Sefsol-218 (1% v/v); (■) with Sefsol-218 (1% v/v) pretreatment. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Figure s2)

**Table 3** Effect of pretreatment with 1% Sefsol-218 on insulin absorption following administration to the rat large intestine using an *in situ* closed loop

	AAC (%·min)	PA %
<b>Control</b>	<b>1040 <math>\pm</math> 600</b>	<b>0.16 <math>\pm</math> 0.09</b>
<b>Sefsol-218 (1%, v/v)</b>	<b>7280 <math>\pm</math> 430**</b>	<b>1.12 <math>\pm</math> 0.07**</b>
<b>Pretreatment Sefsol-218 (1%, v/v) for 60 min</b>	<b>1690 <math>\pm</math> 720</b>	<b>0.26 <math>\pm</math> 0.11</b>

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

(\*\*)  $p < 0.01$ , compared with the control group. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Table s2.)

## 【考察】

本節では、*in situ closed loop* 法を用いて *insulin* の消化管吸収性に及ぼす各種脂肪酸ならびに脂肪酸エステルの影響を評価するとともに、化合物を併用した際の粘膜障害性及び吸収促進効果の可逆性を評価することで、より有効かつ安全性の高い *insulin* の投与形態の構築を考えた。本節では *insulin* の消化管吸収性をその血糖低下作用から評価したが、動物の血糖値は通常、様々な外的要因の影響を受ける。すなわち、一般に、ラットにストレスを与えると血糖値が上昇することが知られている。*In situ closed loop* 法では動物に麻酔を施すものの、一定時間後、ラットの覚醒が観察される場合がある。この場合、ラットはストレスを感じ、血糖値が徐々に上昇することが予測される。特に小腸吸収実験では、*insulin* がほとんど吸収されないことから、*insulin* の血糖降下作用が観察されず、動物のストレス状態のみが血糖値変化に反映されたため、血漿中 *glucose* 濃度が経時的に上昇したと考えられる。

脂肪酸エステルの一つである Sefsol-218 は *insulin* の消化管吸収性を改善し、特に大腸においては、C10 ならびに Sefsol-218 の併用によって *insulin* の吸収性が有意に増大することが明らかとなった。Sefsol-218 の吸収促進効果が他の脂肪酸エステルと比較して高かったことから、構造中に水酸基を有することが、吸収促進効果を左右する要因の一つになると考察している。また、非イオン性界面活性剤である *lauryl maltoside* も同様に大腸において吸収促進効果を発現することが報告されているが<sup>16</sup>、これら化合物による吸収促進効果が、小腸よりも大腸において顕著であった詳細な理由については、完全に解明されていない。小腸と大腸との形態的な相違点として 1) 上皮細胞の組成、2) 粘液層の厚み、3) TJ の強度、4) 消化酵素の活性、5) 腸内細菌叢の量などが挙げられる。これらの要因が互いに複雑に作用し、*insulin* の消化管内での安定性、薬物と添加剤の局在性、吸収促進剤の有効性等に影響する可能性が考えられる。また、吸収促進剤の吸収促進効果は、非攪拌水層の影響を受けることが報告されている。Kishimoto らは、一酸化窒素供与体の一つである 1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene (NOC7) の吸収促進効果が、粘液除去剤である dithiothreitol (DTT) の前処理により低下することを報告している<sup>37</sup>。また Aoki らは、非攪拌水層の影響に関して、粘液溶解剤の一つである *hyaluronidase* の処理により *insulin* の腸管吸収が促進されることを報告した<sup>38</sup>。これら *mucous/glycocalyx* 層における酵素活性等が、*insulin* の吸収性に対する消化管部位差を説明する一因になると考えられる。

また、医薬品添加剤を消化管吸収剤の処方として臨床使用する際、消化管粘膜に対する毒性を考慮する必要がある。逸脱酵素である LDH の活性は、一般的に細胞障害性の指標として利用されており、本章で用いた脂肪酸ならびに脂肪酸エステルは小腸上皮細胞の LDH 活性を増加させないことが認められた。一方、大腸においては、1% と 5% の C10、及び 5% の Sefsol-218 が LDH 活性を増大させることが明らかになった。Sefsol-218 は 1% の濃度においても *insulin* に対する吸収促進効果を示し、その効果は C10 と同等であったこと、また、同濃度の C10 は LDH 活性値を有意に増大させたことから、Sefsol-218 は、既に実用化されている C10 と比較した場合、安全性の面において優れていることが示唆された。さらに本節では、Sefsol-218 が安全な吸収促進剤であることを裏付ける情報の一つとして、大腸における

Sefsol-218 の吸収促進効果が持続的なものではなく可逆的であることを明らかにした。したがって、本節において見出した Sefsol-218 は、insulin の吸収を改善できる安全性の高い新規吸収促進剤となり得ることが示唆された。

## 第 2 節 Sefsol-218 の吸収促進剤機構に関する検討

### 【緒言】

第 1 章第 1 節において、Sefsol-218 はペプチド性医薬品である insulin の大腸からの吸収性を顕著に改善し、また、既存の吸収促進剤である C10 と比較して、粘膜障害性を惹起しない吸収促進剤であることが明らかとなった。しかしながら、脂肪酸及び脂肪酸エステルによる薬物の吸収に対する促進機構には未だ不明な点が多い。

Insulin の特徴として、ペプチド性医薬品であるため、消化管粘膜内の chymotrypsin や trypsin 等のタンパク分解酵素の作用によって分解される可能性が考えられる。また insulin は、亜鉛を中心として会合し 6 量体として存在していることが知られている<sup>39</sup>。しかしながら、生体内で 2 量体や単量体になることで見かけの分子量が減少し、腸管からの吸収が促進されている可能性がある。本節では、これら insulin の性質に着目し、insulin の消化管内における安定性ならびに会合性に及ぼす Sefsol-218 の影響を評価した。

また、細胞膜は細胞内外の溶質を隔離するとともに活発な物質交換を行っており、その流動性は種々の物質の透過や代謝活性を調節する基本的なパラメータといえる。一般に薬物の消化管からの吸収過程は、刷子縁膜から上皮細胞内を透過する transcellular route と、消化管上皮細胞の TJ から側方細胞間腔を透過する paracellular route に大別される。本節では、Sefsol-218 の吸収促進機構に transcellular route を介した薬物透過性増大作用が寄与しているか否かを評価するため、脂質二重層の膜流動性に及ぼす Sefsol-218 の影響について検討した。なお、本研究では細胞膜における脂質部分を各種蛍光プローブでラベル化した brush border membrane vesicles (BBMVs) を用い、蛍光偏光度を測定することで、膜流動性の変化を評価した。

消化管上皮細胞は主に栄養素の吸収だけでなく、食物や腸内細菌など抗原の侵入を物理的及び化学的に制御するためのバリアとして機能する。最も重要なバリア機能として、TJ によって形成される物理的バリアが知られ<sup>46</sup>、隣接する上皮細胞は TJ によって緻密に結合し、栄養素、イオン、水分の透過性を制御することで異物の侵入を防いでいる<sup>40</sup>。そこで、Sefsol-218 の吸収促進機構に TJ の開口を伴う paracellular route を介した薬物透過性増大作用が寄与しているか否かについて評価するため、Colon adenocarcinoma-2 (Caco-2) 細胞における insulin の膜透過性及び膜抵抗値に及ぼす添加剤の影響について評価した。また、TJ 構成タンパク質の量と TJ 開口には正の相関があることが報告されていることから<sup>41</sup>、Western blot 法ならびに免疫染色を用いて、これらタンパク質に及ぼす各吸収促進剤の影響を評価した。なお本節においても、Sefsol-218 の比較対象として、既に実用化されている C10 を用いて、これら化合物の吸収促進機構について検討した。

## 【実験材料】

### 1. 器具

Transwell® Inserts (membrane diameter: 12 mm, growth surface area: 1.12 cm<sup>2</sup>, pore size: 0.4 mm) は Corning Inc. (MA., USA) より購入した。8-well Lab-Tek Chamber Slide System は Nalge Nunc International (Naperville, IL, USA) より購入した。

### 2. 実験動物

前節の実験材料に準じた。

### 3. 試薬

Dansyl chloride (DNS-Cl)、sodium dodecyl sulfate (SDS) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。Hank's balanced salt (HBS)、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene *r*-toluenesulfonate (tma-DPH) は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX) より入手した。Ethylenebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)、trypsin - ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA)、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid (HEPES) は Dojindo Laboratories (Kumamoto) より購入した。High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、MEM non-essential amino acid solution (MEM-NEAA)、antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, and 25 µg/mL amphotericin B) は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto) より入手した。Fetal bovine serum (FBS) は Equitech-Bio, Inc. (Kerrville, TX, USA) より購入した。なお、本研究において使用した FBS はすべて 56°C で 30 分間、非働化処理したものを用いた。cComplete™ (EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets)、4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) は Roche Diagnostics GmbH (Germany) より購入した。その他の試薬については前節の実験材料に準じた。

### 4. 細胞培養

Colon adenocarcinoma-2 (Caco-2) 細胞は Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. (Osaka) より供与を受けた。Caco-2 細胞は 10% FBS、1% MEM-NEAA、1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution 含有 DMEM 培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下、培養フラスコ内で培養し、継代はおよそ 5 日おきに行った。Subconfluent に達した Caco-2 細胞を Trypsin-EDTA を用いて剥離後、2×10<sup>5</sup> cells/mL (1×10<sup>5</sup> cells/insert) で 12 well Transwell® に播種した。培地交換は 2 日毎に行い、播種後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養し、膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance ; TEER) を Millicell® ERS-2 Volt-Ohm Meter (Millipore Corporation, MA) で測定した。21-23 日間の培養後、TEER が 500 Ω·cm<sup>2</sup> 以上となったもののみを実験に使用した。

## 【実験方法】

### 1. ラット消化管粘膜ホモジネートの作製

一晩絶食させた Wistar 系雄性ラットを安楽死させ、消化管組織を摘出した。氷冷した PBS で洗浄後、スライドガラスを用いて小腸ならびに大腸粘膜を剥ぎ取り、集めた粘膜に PBS を 2-3 mL 加えた。その後、Polytron homogenizer (Kinematica, GmbH, Switzerland) を用いてホモジナイズし、懸濁液を遠心分離 (8,000 G、5 分間、4 °C) した後に上清を分注した。タンパク質濃度は Bradford 法を用いて定量し、タンパク濃度が 10 mg/mL となるように PBS を用いて調製し、液体窒素で凍結後、使用するまで -80 °C にて保存した。

### 2. Insulin の残存量評価

消化管粘膜ホモジネート 240 µL に、insulin 溶液 (0.02 mM) を 360 µL 加え 37 °C でインキュベートした。Insulin 溶液に C10 または Sefsol-218 (0.5%, w/v or v/v) ならびに溶解補助剤である HCO-60 (0.1%, w/v) を添加することで、粘膜中における insulin の安定性に及ぼすこれら化合物の影響を評価した。240 分まで経時的にサンプリングを行い、等量の acetonitrile を加えることで反応を停止させ、直ちに 2 回遠心分離 (9,000 G、5 分間、4 °C) した。Insulin の残存量は high performance liquid chromatography (HPLC) にて測定した。なお、insulin 溶液を、消化管粘膜ホモジネートの代わりに PBS と混合し、同様にインキュベートしたものを control 群とした。

### 3. 円二色性スペクトル (CD スペクトル) の測定

CD スペクトルは円二色性分散計 (J-1500-450STG, JASCO Co., Tokyo) を用いて測定した。Insulin を PBS 中に最終濃度が 0.02 mM となるよう溶解し、C10 または Sefsol-218 溶液を濃度が 0.5% (w/v or v/v) となるように添加した。それぞれの溶液は 1cm 四方の石英キュベット内で、3 回の連続スキャンを平均化した。300 nm から 250 nm の吸光度、走査速度 50 nm/min、25 °C にて CD スペクトルを測定し、以下の式にて分子楕円率を算出した。

$$[\theta]_{\lambda} = \theta_{\lambda} / (C \times l) \times 100$$

ここで、 $\theta_{\lambda}$  は  $\lambda$  の波長における CD スペクトルの測定値、C は insulin 濃度 (mol/L)、l は光路長を示している。

### 4. Brush border membrane vesicles (BBMVs) の抽出・精製

BBMVs は過去の定法に準じ調製した<sup>42-44</sup>。一晩絶食した Wistar 系雄性ラット (230~240 g) を使用し、腹腔内 pentobarbital sodium (32 mg/kg)、lidocaine (0.01 mg/kg) 麻酔下、小腸管腔内容物を PBS で洗浄後、脱血死させた。小腸を摘出し脂肪組織を取り除き、冷却 PBS に浸した。その後、スライドガラスを用いて小腸粘膜を剥ぎ取り、BBMVs を 2 価カチオン沈殿法にて、MgCl<sub>2</sub> と EGTA を使用し調製した<sup>42-45</sup>。すなわち、集めた粘膜を homogenizing buffer

(300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 12 mM Tris (pH 7.4 by 1 M HEPES) containing a protease inhibitor cocktail) で 10 g/100 mL となるように調製後、Polytron homogenizer (Kinematica, GmbH, Switzerland) を用いて氷上でホモジナイズした。上記の懸濁液に 1 M MgCl<sub>2</sub> stock solution を添加し、最終濃度が 10 mM MgCl<sub>2</sub> となるようにした。これを 4 °C で 15 分間攪拌しながら緩徐に反応させた。その後、懸濁液を遠心分離 (3,000 G、15 分間、4 °C) し、沈殿物を除去後、上清をさらに遠心分離 (32,000 G、40 分間、4 °C) した。上清を除去後、brush border membranes を含む沈殿物を homogenizing buffer で再懸濁し、タンパク濃度を Bradford 法を用いて定量した。調製した BBMVs は液体窒素で凍結後、使用時まで -80 °C で保存した。なお、大腸由来の colon apical membrane vesicles についても同様の方法で調製した。

## 5. 蛍光偏光解消法

BBMVs を解凍し、27 G の針を用いて再懸濁させた。BBMVs (200 µg/mL) は HEPES-Tris buffer (25 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 5 mM glucose, adjusted to pH 7.4 with 1 M Tris) 中にて 1 mM DPH, 0.5 mM tma-DPH、または 5 mM DNS-Cl を添加し、37 °C 遮光条件下でそれぞれ 30、3、30 分間反応させることでラベル化した。その後、ラベル化した BBMVs に各濃度の C10、Sefsol-218 または 200 µM cholesterol (positive control) をそれぞれ混合した。なお、DPH, tma-DPH, DNS-Cl の最終濃度はそれぞれ 1、0.5、5 µM とした。蛍光偏光度は、励起側と蛍光側に 2 枚の偏光フィルター (polarizer) を装着した fluorescence spectrophotometer F-2700 (Hitachi Co., Ltd., Tokyo) を用いて 42 °C で測定した。なお、DPH, tma-DPH 測定時には Ex. 360 nm/Em. 430 nm、DNS-Cl については Ex. 380 nm/Em. 430 nm の波長にてそれぞれ測定した。2 枚の polarizer を 90 度ずつ回転させて 4 種類の蛍光強度を測定し、蛍光異方性  $r$  (fluorescence anisotropy) を以下の式により算出した<sup>46</sup>。

$$r = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{vv} + G \times 2 \times I_{vh}}$$

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

ここで、 $I_{vv}$ 、 $I_{vh}$ 、 $I_{hv}$ 、 $I_{hh}$  は異なる偏光度を持った励起光、蛍光での蛍光強度を表し、添字の  $v$ 、 $h$  は偏光の角度を表す。すなわち、 $v$  は垂直 (vertical)、 $h$  は水平 (horizontal) 方向の偏光を示す。各添字のうち、先に書かれたものが、励起側の偏光の角度を示し、後に書かれたものは、蛍光側の角度を示す。つまり、例えば、 $I_{vh}$  とは、励起側の polarizer が垂直方向時の水平方向の偏光成分の示す蛍光強度を表す。なお、 $G$  は grating correction factor であり、装置固有の補正值である。

また、一般に粘性の高い溶媒中の物質から発する蛍光は、偏光性を持つことが知られる。蛍光偏光解消法とは、この偏光性が蛍光物質自身の回転運動により減少することを利用し、蛍光物質が分布し、その運動性を司る媒質の性質を知る方法である。蛍光物質が強く偏光していれば、入射光と平行な蛍光の偏光成分が強くなる。この偏光性の度合いを表すのに便利

なパラメータが蛍光異方性として求められる。もし蛍光分子が激しく回転ブラウン運動していれば蛍光異方性は小さくなり（これが偏光解消である）、この蛍光異方性を測定することにより蛍光分子の回転運動の度合いを評価することができる (Fig. 7)。このように細胞膜流動性の変化は蛍光偏光解消法で測定でき、蛍光物質の運動により偏光性が減少すると膜流動性が増大し、その結果、transcellular route を介した薬物透過性が増大することが知られている。

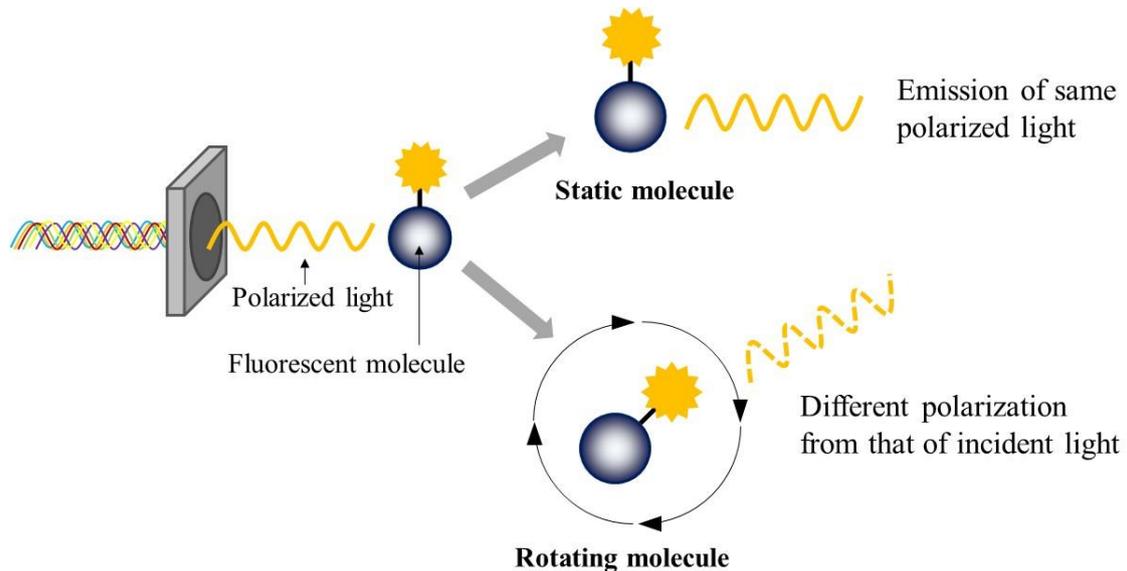


Fig. 7 Schematic illustration of fluorescence depolarization method.

## 6. Caco-2 細胞透過実験

12 well Transwell® に播種した Caco-2 細胞単層膜の培地を抜き取り、apical 側に 0.5 mL の modified HBS solution (mHBSS, containing 10 mM HEPES) (pH 6.5) を、basolateral 側に 1.5 mL の mHBSS (pH 7.4) を加え、37 °C 恒温槽中で 60 分間プレインキュベーションを行った。その後、apical 側に pH 6.5 に調整した insulin (0.04 mM) 及び C10 または Sefsol-218 (0.05%, 0.1%; w/v, v/v) を混合させた mHBSS 溶液を添加し、basolateral 側に 1.5 mL の mHBSS (pH 7.4) を加え実験を開始した。その後、実験開始 6 時間まで経時的 (30、60、120、240、360 分) に basolateral 側より 150 μL ずつサンプリングを行い、等量の insulin-free mHBSS (pH 7.4) を basolateral 側に添加するとともに、TEER を経時的に測定した。なお、実験開始時の TEER 値を 100 (% of initial value) として実験中の TEER 値を算出した。各サンプルに等量の acetonitrile を加え除タンパク後、遠心分離 (10,000 G、5 分間、4 °C) し、insulin 濃度を HPLC を用いて測定した。

Insulin の透過性は、累積薬物透過量-時間曲線から以下の式により、みかけの透過係数 (apparent permeability coefficient;  $P_{app}$ ) を算出することにより評価した。

$$P_{app} = \frac{\text{Flux}}{A \times C_0 \times 60}$$

ここで、 $P_{app}$  はみかけの透過係数 (cm/sec)、Flux は定常状態 (120, 240, 360 分) における曲線の傾き (nmol/min) を表し、 $A$  は透過面積 (1.12 cm<sup>2</sup>)、 $C_0$  は apical 側の薬物の初濃度 (nmol/mL) を表す。

## 7. Western blot 法

Wistar 系雄性ラットを control、treatment、pre-treatment 群の 3 群に分け、前節の方法に準じ、小腸ならびに大腸に closed loop を施した。Treatment 群では C10 (1%, w/v) または Sefsol-218 (1%, v/v) を loop 内に投与し、4 時間後に安楽死させた。なお、適用時間は前節の消化管吸収実験の実施時間に準じ、4 時間に設定した。Pre-treatment 群では 薬液投与から 4 時間後に腸管 loop 内を PBS を用いて洗浄し、洗浄からさらに 4 時間後にラットを安楽死させた。また、1% (w/v) HCO-60 を含む PBS を投与したラットを control とした。ラットの消化管を摘出後、BBMVs の抽出・精製を行い、最終タンパク濃度が 3 mg/mL となるように調製した。

サンプルを 2 x SDS sample buffer、DTT と混合し、これを SDS-PAGE のサンプルとした。調製したサンプルを 95 °C で 5 分間加熱処理後、8-12 % polyacrylamide slab gels 内へ添加し、電気泳動を行った。分離した gel 上のタンパクを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜をブロッキングバッファー (5% (w/v) skim milk in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T)) を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、TBS-T で洗浄した。その後、Can Get Signal Solution 1 (Toyobo Co., Ltd., Osaka) で希釈した一次抗体 (mouse anti-claudin-4, anti-zonula occluden-1 (ZO-1), anti-occludin; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) と反応させた。インキュベート後、TBS-T で 5 分洗浄を 3 回繰り返し、Can Get Signal Solution 2 (Toyobo Co., Ltd., Osaka) で希釈した二次抗体溶液 (rabbit anti-mouse IgG HRP-linked antibody, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中で PVDF 膜を室温で 1.5 時間振盪した。TBS-T での洗浄後、化学発光システムである Chemi-Lumi One Ultra Western blotting kit (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto) を用いて可視化し、化学発光を luminescence imaging system (Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS4000 System, Tokyo) を用いて検出し、バンド強度を Image J Software Program (NIH) で定量した。また、各 TJ タンパク質のピクセル強度は  $\beta$ -actin のピクセル強度で補正し、control 群と比較した場合の相対強度を算出した。

## 8. 免疫染色法

TJ タンパク質の免疫染色は Seth らの報告に準じた<sup>47</sup>。8-well Lab-Tek Chamber Slide System に Caco-2 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、21 日間培養した。Caco-2 細胞を mHBSS で 1 時間 37 °C でインキュベートを行った後、C10 または Sefsol-218 (0.1%, w/v or v/v) を含む mHBSS (pH 6.5) を添加した。2 時間インキュベートした後、mHBSS で洗浄し、10 % 中性緩衝ホルマリン液で 10 分間 4 °C で固定した。その後、ブロッキングバッファー (3% skim milk, 0.1% Tween 20, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) で 1 時間インキュベートし、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体 (mouse anti-claudin-4, anti-ZO-1, anti-occludin; Invitrogen, 1:250) を用いて 4 °C にて一晩インキュベートした。翌日、TBS-T で 2 回洗浄した後、ブロッキン

グバッファーで希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG, 1:500) を用いて、37 °C で 1 時間インキュベートを行った。TBS-T で 2 回洗浄し、2.0 µg/mL DAPI を添加後、37 °C で 20 分インキュベートした。TBS-T で洗浄した後、退色防止剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto) を添加し、共焦点レーザー顕微鏡 (A1R+; Nikon Co., Tokyo) にて蛍光を観察した。画像は Nikon NIS Elements AR 4.20.00 software (Nikon Co., Tokyo) を用いて保存した。

#### 9. Insulin の定量

安定性試験ならびに透過実験より採取したサンプル中の insulin 濃度は以下の HPLC 条件にて定量を行った。

HPLC system	: Shimadzu LC-20 HPLC system (Shimadzu, Kyoto)
Column	: COSMOSIL 5 C18-AR300 (4.6 x 150 mm Nacalai Tesque Inc., Kyoto)
Mobile phase	: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (mobile phase A) and 0.1% TFA in acetonitrile (mobile phase B). The gradient program was as follows: mobile phase B increased from 25% to 40% over 15 min, then was held at 25% for 5 min
Flow rate	: 1.0 mL/min
Detection	: Ultraviolet detection at 210 nm
Column temperature	: 40 °C

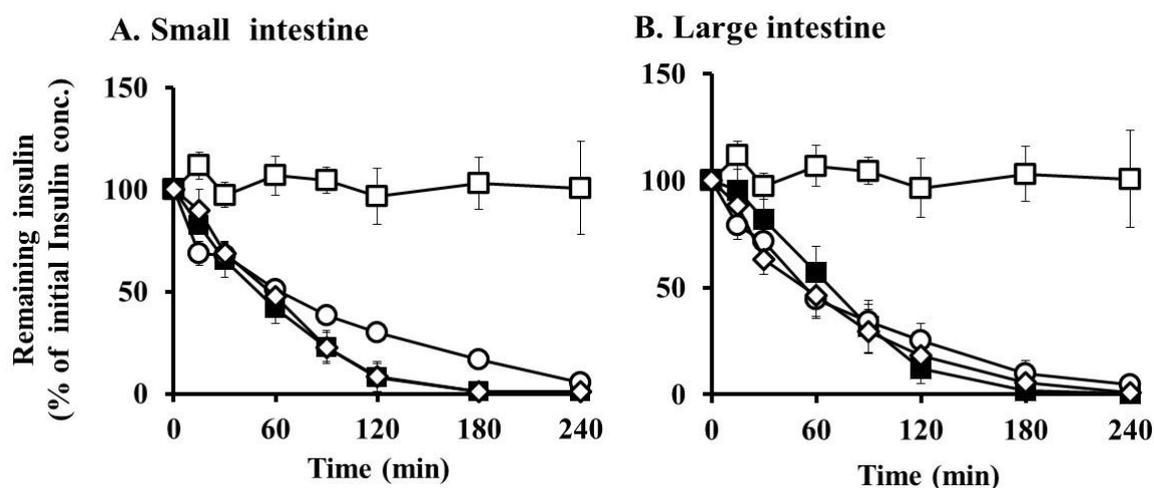
#### 10. 統計学的処理

すべてのデータは、平均値±標準誤差 (S.E.) にて表示した。有意差検定は、多重比較 (Tukey-Kramer test) により行い、 $p < 0.05$  以上を有意差ありと判断した。

## 【結果】

### 1. Insulin の安定性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響

ラットの消化管粘膜ホモジネート溶液に、insulin と PBS または各化合物 (C10, Sefsol-218) を含む溶液を混合し、経時的に insulin の残存量を測定した。Insulin の残存量変化を Fig. 8 に示す。なお、control 群は消化管粘膜ホモジネートを加えず、PBS に insulin を溶解させ、insulin の残存量変化を測定した。その結果、小腸ホモジネート中の insulin は実験開始 120 分後には 10% 以下にまで低下し、C10 または Sefsol-218 を加えた場合においても同様に insulin が分解された。また、大腸粘膜ホモジネートを用いた場合でも類似した結果となり、Sefsol-218 及び C10 の存在下においても insulin 残存量の顕著な低下が見られた。したがって、insulin は小腸ならびに大腸粘膜ホモジネート中で速やかに分解され、C10 ならびに Sefsol-218 は insulin を安定化する作用を有しないことが示唆された。

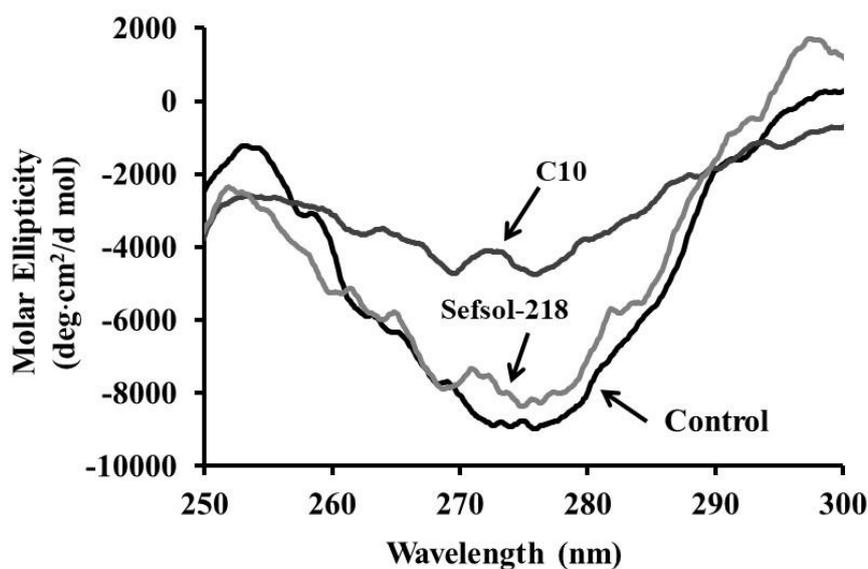


**Fig. 8** Effects of C10 and Sefsol-218 on degradation of insulin in (A) small and (B) large intestine homogenates at 37 °C. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 3). Keys: (□) Control (insulin: 0.02 mM); (■) with PBS; (◇) with Sefsol-218 (0.5% v/v); (○) with C10 (0.5% w/v) (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Figure s3)

## 2. Insulin の会合性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響

Insulin は、通常、生体内で亜鉛を中心として会合し、6 量体として存在していることが知られている<sup>39</sup>。しかしながら、生体内で 2 量体や単量体になることで見かけの分子量が減少し、腸管からの吸収が促進される可能性があると考えられる。本研究では、CD スペクトルを測定することにより、insulin の会合性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響について検討を行った(Fig. 9)。ここで、insulin の会合性の指標として 270 nm 付近での分子橢円率が用いられており、この波長の分子橢円率の値が 0 に近いほど、insulin の会合性が弱まっていることを示している。

その結果、C10 を併用した場合、270 nm 付近における insulin 分子橢円率の負の最大値が低下し、0 に近づいていることが示された。一方、Sefsol-218 を併用した場合の分子橢円率は、併用していない群と比較して大きな差は認められなかった。したがって、insulin の会合性に Sefsol-218 は大きな影響を及ぼさない一方、C10 は insulin の会合性を抑制することが示唆された。



**Fig. 9** Effects of C10 and Sefsol-218 on the circular dichroic spectra of 0.02 mM insulin. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Figure s4)

### 3. 消化管粘膜の膜流動性に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響

C10 及び Sefsol-218 の吸収促進機構に transcellular route が関与するか否かを検討するために、膜流動性に及ぼすこれら化合物の影響を評価した。DPH は脂質の内側部分に、tma-DPH は脂質の外側部分に、DNS-Cl は膜タンパク部分に分布する蛍光プローブとして知られており<sup>48-50</sup>、本研究ではこれらのプローブでラベル化したラット小腸の BBMVs を用いて検討を行った (Fig. 10)。BBMVs に C10、または Sefsol-218 を添加した際の蛍光異方性比 (fluorescence anisotropy ratio) を Fig. 11 に示す。縦軸には control 群を 100 % とした際の蛍光異方性比を示しており、この値が減少した場合、膜流動性が增大することを示している。Fig. 11A のグラフから、C10 ならびに Sefsol-218 は control 群と比較して、DPH の蛍光異方性比を顕著に減少させた。また、C10 と Sefsol-218 による蛍光異方性比への影響は濃度依存的であった。C10 に関しては、0.5% C10 を DPH に適用した場合を除き、DPH、tma-DPH、DNS-Cl すべての蛍光異方性比を有意に、かつ濃度依存的に減少させることが示された。一方、Sefsol-218 に関しては、Fig. 11B のグラフから、5% で適用した場合のみ有意に tma-DPH の蛍光異方性を低下させることが示された。DNS-Cl を用いて標識した場合についても同様に、5% Sefsol-218 は有意に蛍光異方性を低下させたが、0.5% と 1% の濃度では不十分であることが示された (Fig. 11C)。以上より、Sefsol-218 は主に脂質二重膜内部の脂質の流動性を増大させることにより、transcellular route を介して insulin の透過性を増大させることが示唆された。

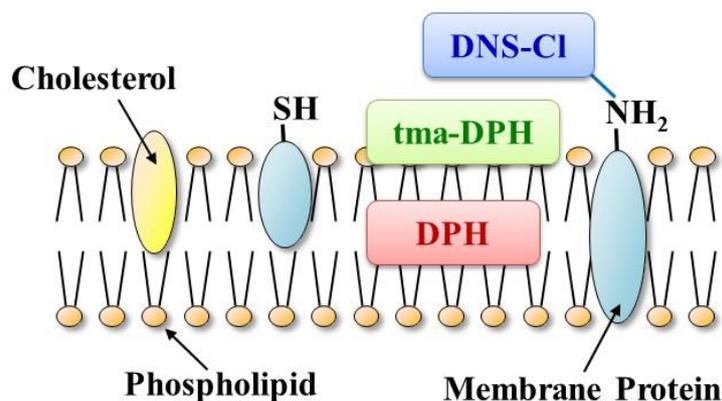
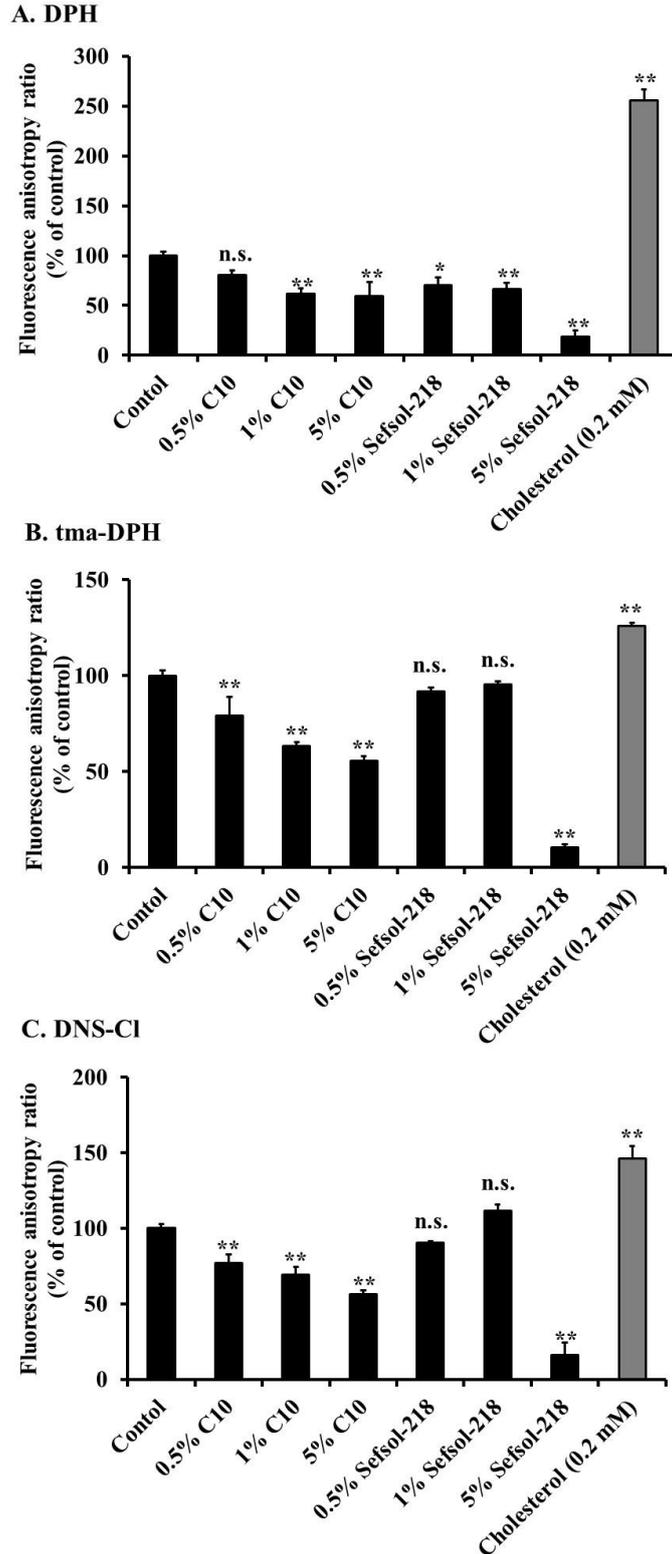


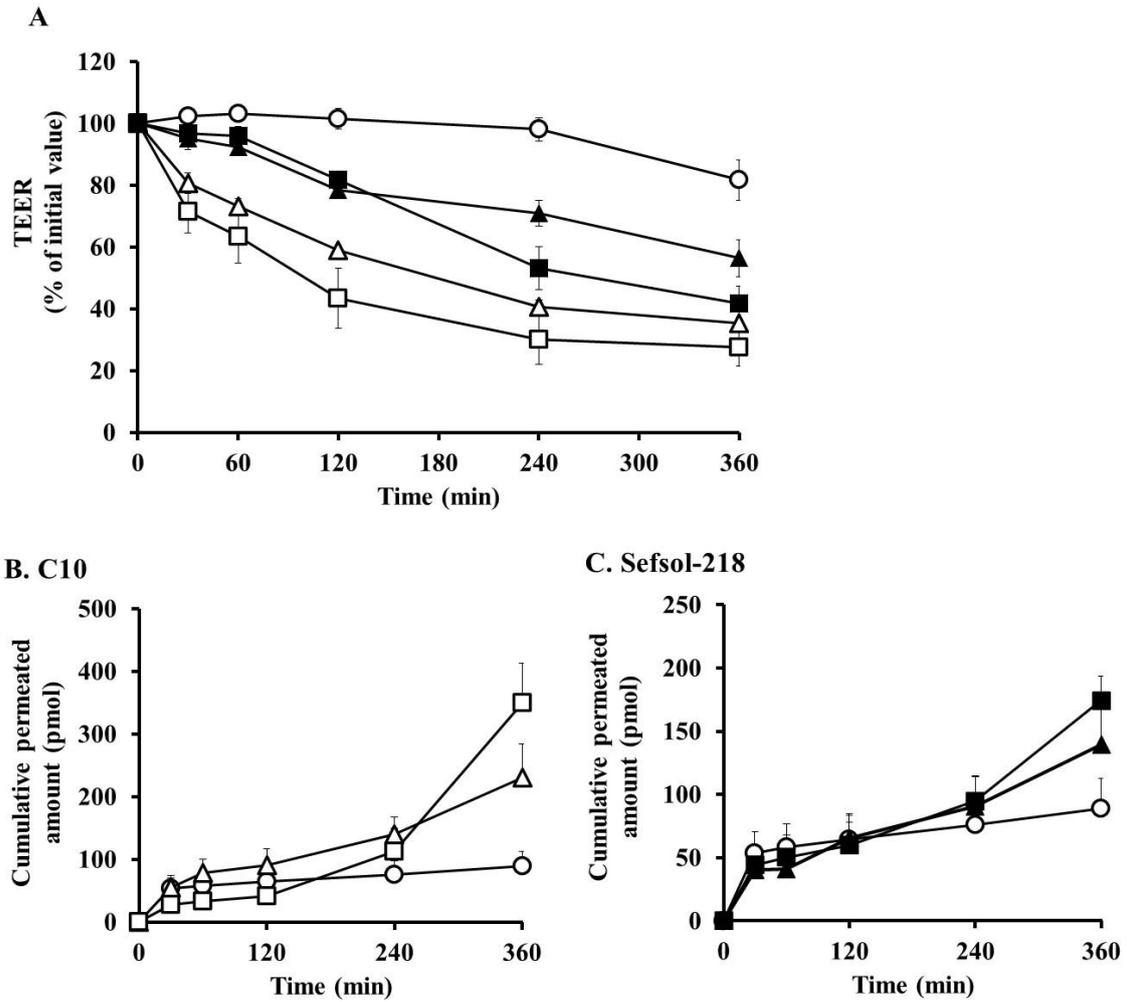
Fig. 10 Evaluation of membrane fluidity of lipid membranes.



**Fig. 11** Effects of C10 and Sefsol-218 on the fluorescence intensity of DPH, tma-DPH, and DNS-Cl. The final concentrations of DPH, tma-DPH, and DNS-Cl in samples were 1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , and 5  $\mu\text{M}$ , respectively. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3). (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ , n.s. not significantly different, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 4)

#### 4. Caco-2 細胞透過性ならびに膜抵抗値に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響

C10 及び Sefsol-218 の吸収促進機構に paracellular route が関与しているか否かを検討するため、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* における TEER 及び insulin の透過性に対するこれら化合物の影響について検討した。Fig. 12A のグラフより 0.05% ならびに 0.1% Sefsol-218 は TEER の値を、control 群と比較して約 40% 減少させた。なお、TEER に対する Sefsol-218 の作用は濃度依存的であり、特に 120 分以降の TEER 値においてその差がみられた。また、C10 についても同様に、TEER の値を濃度依存的に減少させた。さらに、insulin の Caco-2 細胞層透過性は C10 ならびに Sefsol-218 の存在下において増大することが示された (Fig. 12B, C)。Control 群の insulin の  $P_{app}$  値は  $0.4 \pm 0.1 \times 10^{-7}$  (cm/s) であったのに対し、0.05% ならびに 0.1% C10 は insulin の  $P_{app}$  を  $2.2 \pm 0.7 \times 10^{-7}$  (cm/s) ならびに  $8.0 \pm 1.9 \times 10^{-7}$  (cm/s) に増大させた。さらに、0.05% と 0.1% Sefsol-218 の適用によって insulin の  $P_{app}$  は  $1.2 \pm 0.3 \times 10^{-7}$  (cm/s) ならびに  $1.6 \pm 0.3 \times 10^{-7}$  (cm/s) に増大した。以上の結果より、C10 ならびに Sefsol-218 の吸収促進機構には、TJ 開口による paracellular route を介した insulin の透過性増大作用が関与している可能性が示唆された。



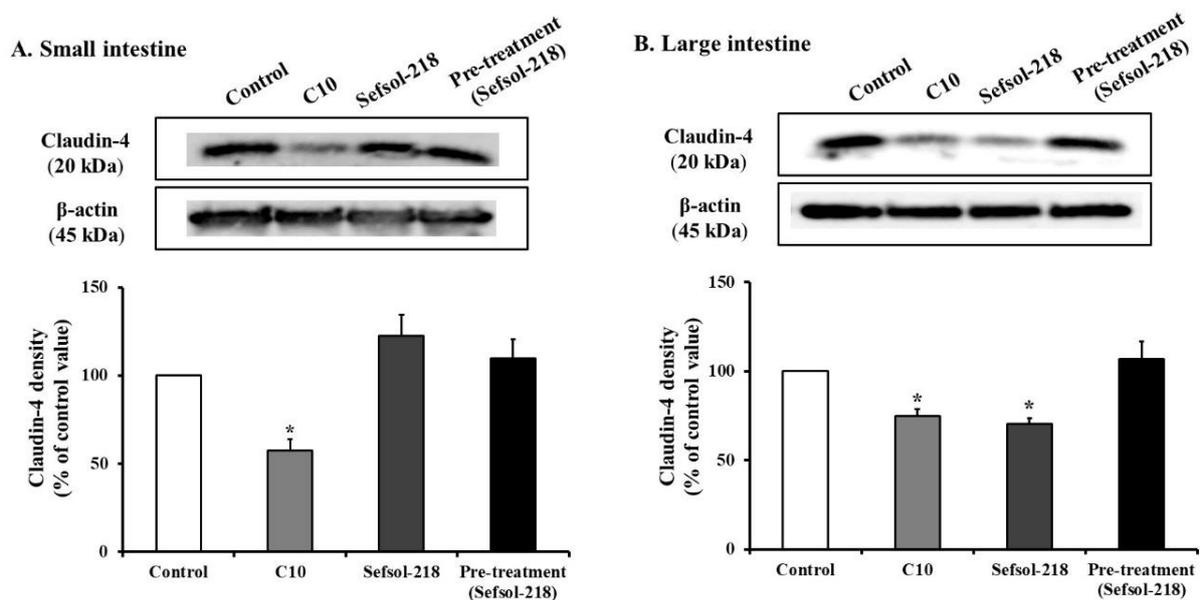
**Fig. 12** Effects of C10 and Sefsol-218 on the transepithelial electrical resistance (TEER) and permeation of insulin through Caco-2 cell monolayers. (A) TEER values (TEER % of initial value) with C10 or Sefsol-218. Cumulative permeated amount of insulin in the presence of (B) C10 or (C) Sefsol-218. Keys: (○) Control; (△) C10 (0.05% w/v); (□) C10 (0.1% w/v); (▲) Sefsol-218 (0.05% v/v); (■) Sefsol-218 (0.1% v/v)

(*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 5)

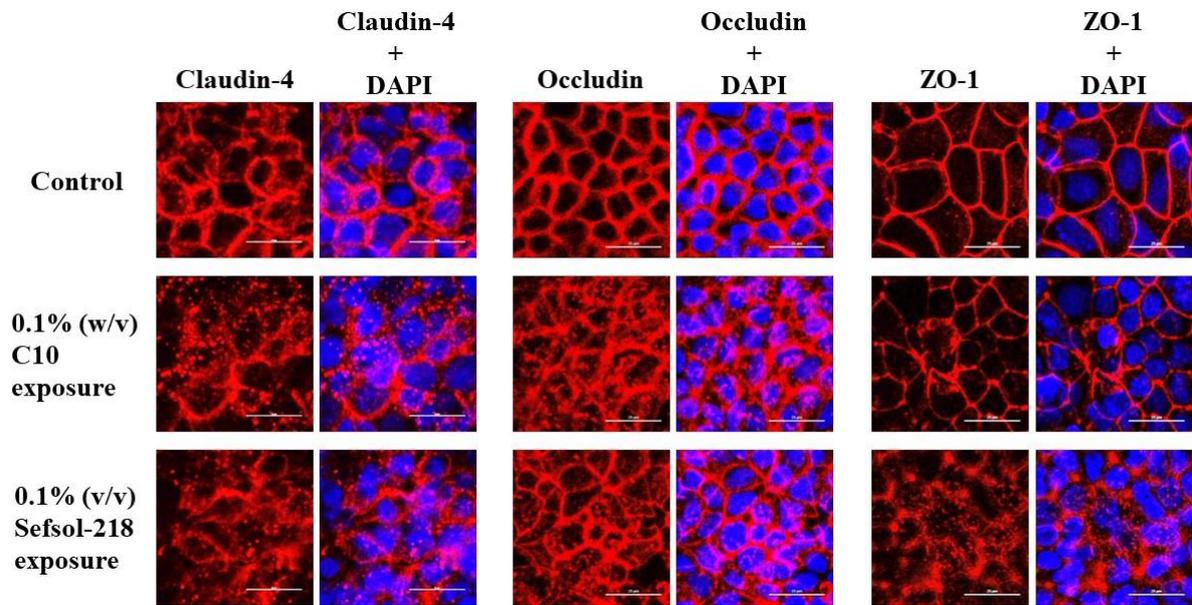
## 5. TJ 関連タンパク質に及ぼす Sefsol-218 及び C10 の影響

Fig. 12 の細胞実験で C10 ならびに Sefsol-218 の吸収促進機構には TJ 開口による paracellular route を介した薬物透過性増大作用が一部関与している可能性が示唆された。そこで、消化管において TJ を構成している claudin レベルに及ぼす C10 ならびに Sefsol-218 の影響を評価した。Fig. 13 には小腸と大腸における claudin-4 を Western blot 法を用いて測定した結果を示す。Fig. 13A で示すように、小腸においては、C10 の存在時に claudin-4 が control 群と比較して低下した。しかしながら、Sefsol-218 の投与によって claudin-4 の量に明らかな差は認められなかった。したがって、小腸においては、C10 は claudin-4 の減少を介して上皮細胞の TJ を開口するのに対し、Sefsol-218 は TJ の構造にほとんど影響しないことが示唆された。一方、大腸においては小腸の場合とは異なり、C10 と Sefsol-218 の投与によって claudin-4 の量が control 群と比較して有意に減少することが明らかとなった (Fig. 13B)。さらに、Sefsol-218 の前処置群においては claudin-4 の量が control 群と同程度まで回復することが認められた。したがって、C10 及び Sefsol-218 は claudin-4 レベルを減少させることで大腸の上皮細胞の TJ を開口すること、また、その作用は可逆的であることが示唆された。

類似の結果は Caco-2 細胞においても観察された。C10 または Sefsol-218 を適用した際の Caco-2 細胞における claudin-4、occludin、ZO-1 の免疫染色画像を Fig. 14 に示した。Control 群では claudin-4、occludin、ZO-1 は細胞の間隙に局在していた。一方、C10 または Sefsol-218 を 2 時間適用した後では細胞間隙におけるこれら TJ タンパク質の局在性が低下していることが認められた。



**Fig. 13** Western blot images of claudin-4. The expression levels of claudin-4 in rat (A) small and (B) large intestines were quantitatively calculated following treatment with C10 (1% w/v) or Sefsol-218 (1% v/v) for 4 h. After pretreatment with Sefsol-218 (1% v/v) for 4 h, proteins were extracted. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3). (\*)  $p < 0.05$ , when compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 6)



**Fig. 14** Localization of tight junction constituent proteins in Caco-2 cells were visualized using confocal laser scanning microscopy following incubation with C10 (0.1% w/v) and Sefsol-218 (0.1% v/v) for 120 min. (scale bars: 25  $\mu$ m) (*J. Pharm. Sci.*, **109**, 1483-1492 (2020); Fig. 7)

## 【考察】

本章では、生体適合性に優れた吸収促進剤として Sefsol-218 を選択し、その吸収促進機構を、従来の吸収促進剤である C10 と比較しながら検討した。Fig. 8 より、C10 ならびに Sefsol-218 のいずれも小腸及び大腸ホモジネートによる insulin 分解を抑制しなかったことから、C10 と Sefsol-218 の吸収促進機構には、消化管内における insulin に対する安定化作用は関与しないことが示唆された。一方、第 1 章第 1 節において、C10 と Sefsol-218 の insulin に対する吸収促進効果には、消化管部位差があることを明らかにしている。これらの結果から、消化管部位によるタンパク質分解酵素活性の相違が非常に重要であると考えられる。すなわち、小腸よりも大腸の方が、insulin の加水分解に寄与する消化酵素の活性が比較的低いことが<sup>51,52</sup>、小腸と大腸における吸収促進効果の差異を生む要因の一つになる可能性がある。

また insulin が消化管管腔内で二量体または単量体として存在する場合、見かけの分子量が減少し、insulin の吸収が増大する可能性がある。そこで CD スペクトルを利用して、C10 ならびに Sefsol-218 が insulin の会合を減少させるか否かを検討し、Fig. 9 では、insulin の会合が C10 の添加によって減衰する一方、Sefsol-218 は insulin の会合性にほとんど影響を及ぼさないことを示した。Insulin の会合性は溶液の pH、無機カチオン、溶液中のイオン種等によって変動することが知られており<sup>53-56</sup>、当研究室においても、脂肪酸による insulin のアシル修飾によって insulin の会合が減少することを報告している<sup>18</sup>。また、insulin オリゴマーの形成に関与するアミノ酸残基についても報告されているものの<sup>57</sup>、脂肪酸等の医薬品添加剤が及ぼす insulin の会合性への影響には不明な点も多い。著者は、Sefsol-218 はエステル化合物である一方、C10 は carboxyl 基を持つことから、carboxyl 基の負の電荷が insulin の会合に影響を与える可能性があり、添加剤自体の極性は insulin の高次構造を変動させる一つの要因になると考察している。しかし、insulin の会合性に対する Sefsol-218 と C10 の作用を完全に理解するためには、NMR による構造の解析等、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

さらに、本研究で用いた Sefsol-218 ならびに C10 の吸収促進機構に transcellular route を介した薬物の透過性増大作用の寄与があるか否かについて蛍光偏光解消法を用いて検討を行った。その結果、C10 ならびに Sefsol-218 の作用により、control 群に対する蛍光異方性比は減少し、脂質膜の流動性が増大することを示した。脂質膜に対する脂肪酸の影響として、sodium caprylate や sodium caprate が膜の流動性を高め薬物の吸収を高めることが報告されていることから<sup>58,59</sup>、本研究ではこれらの報告に類似した結果が得られた。また、蛍光プローブとして DPH を使用した場合、tma-DPH や DNS-Cl を使用した場合よりも、Sefsol-218 の添加に対応する蛍光異方性の減少が大きかった。すなわち、Sefsol-218 は内部脂質二重層の疎水性コアの流動性を変化させることが認められた。これらの結果から、C10 と Sefsol-218 の吸収促進機構には、一部ではあるものの、脂質膜の流動性増大による transcellular route を介した薬物透過性の増大が関与することが示唆された。

さらに、Caco-2 細胞を用いて、*in vitro* モデルにおける insulin 透過性に及ぼす C10 及び

Sefsol-218 の影響を評価した。ヒト結腸癌由来細胞である Caco-2 細胞は、TJ や微絨毛を形成し、ヒト小腸上皮細胞と同様の構造、機能を有することから、多くの製薬企業で創薬段階における薬物吸収評価の有用なツールとして広く利用されているモデル細胞である。Caco-2 細胞は、吸収上皮細胞だけを構成成分として単層膜を作り、*in vitro* で小腸の構造や機能を再現することができるため、精度の良い効率的な薬物の透過性評価が可能であり、細胞レベルにおけるより詳細な薬物の透過機構を検討するのに適していると考えられる<sup>60</sup>。なお、Caco-2 細胞からなる単層膜は、生体の腸管組織と比較して吸収促進剤による細胞毒性の影響を受けやすいため<sup>61,62</sup>、本検討においては低濃度の C10 ならびに Sefsol-218 (0.05, 0.1%) を利用した。その結果、C10 及び Sefsol-218 は Caco-2 細胞層の TEER を顕著に低下させると共に、insulin の  $P_{app}$  値を増大させることが明らかとなった。一般に、TEER の値は TJ の強固さの指標として知られており、吸収促進剤による TEER の減少は、TJ の開口を示す。したがって、C10 及び Sefsol-218 の吸収促進機構には、消化管粘膜上皮細胞における TJ の開口が寄与する可能性が考えられた。

また、TJ は隣接する上皮細胞を強固に接着するバリア機能の一つであり、消化管上皮においては上皮細胞頂端部の側底膜に局在している。TJ を構成するタンパク質として、ZO-1 や occludin、claudin などが知られているが、中でも claudin は tight junction strand 形成に必須の 4 回膜貫通蛋白質であり<sup>63</sup>、27 種類のサブタイプが存在し、組織特異的に発現している<sup>64,65</sup>。各組織の claudin ファミリーの分布に基づき<sup>66</sup>、本節では claudin-4 に着目し、ラット消化管上皮細胞の claudin-4 タンパク質量に及ぼす C10 及び Sefsol-218 の影響を評価した。その結果、小腸においては、Sefsol-218 は claudin-4 の量にほとんど影響を与えない一方、C10 の投与により claudin-4 量は control 群と比較して顕著に低下した。また、大腸においては C10 及び Sefsol-218 のいずれも、claudin-4 を有意に低下させることが明らかになった。これらの結果から、C10 が小腸と大腸いずれにおいても TJ を開口する可能性があるのに対し、Sefsol-218 は大腸の TJ を特異的に緩めることが示唆された。また免疫染色による Caco-2 細胞上の TJ タンパク質 (ZO-1、occludin、claudin-4) の可視化からも、C10 及び Sefsol-218 の作用を確認した。Del Vecchio らは、C10 が細胞間 claudin-5/claudin-5 相互作用ならびに接合部位近傍の actin の重合を減少させることで、一時的に TJ を開くことを報告している<sup>67</sup>。また Krug らは C10 が tricellulin を可逆的に除去することで、三細胞接合点における薬物の透過性を増加させることを示した<sup>68</sup>。これらの報告は本研究で得られた結果と相関し、C10 による TJ 開口メカニズムを一部説明できると考えられる。

ここで、興味深いことに、C10 は小腸と大腸の両方で TJ を開口する可能性があるにもかかわらず、C10 は大腸においてのみ、insulin に対して顕著な吸収促進効果を示した (第 1 章 第 1 節)。これらの矛盾は、消化管内における insulin の安定性の変動によって説明できると考察している。Fig. 8 に示すように、C10 は insulin の消化管粘膜中における分解を抑制しないことが明らかになった。この検討では、小腸と大腸由来のホモジネートに含まれるタンパク質量が等量となるように調製したが、本来の *in vivo* 環境は小腸と大腸で異なる。すなわち、小腸においては消化酵素の活性が比較的高いため、C10 によって誘発される TJ 開口作用よりも、insulin の分解速度の方が大きくなり、insulin の吸収が低下する可能性がある。一方、

タンパク分解酵素の活性が比較的低い大腸においては、insulin の分解が遅延するため、その間に C10 が作用し paracellular route を介した insulin の吸収が増大すると考えられる。また、Sefsol-218 による claudin-4 の低下は大腸においてのみ認められた。Sefsol-218 が小腸で効果がなく、大腸で効果が表れた要因の一つは、小腸と大腸における酵素量の違いであると考察している。すなわち、小腸は大腸に比べて酵素が多く存在しており、C10 は酵素に対して安定である一方、エステル化合物である Sefsol-218 は酵素による分解を受けやすい場合、Sefsol-218 は小腸で効果がなく大腸では効果を示した結果につながると考えられる。また、何らかの理由で Sefsol-218 の消化管からの消失が C10 よりも速かった場合、Sefsol-218 が、より安全な吸収促進剤となり得る可能性がある。しかし、Sefsol-218 が大腸においてのみ claudin-4 に影響を及ぼした要因の詳細は明らかとなっていない。これらの現象を完全に理解するためには、Sefsol-218 及び C10 が酵素に対して安定か否かについて検討する等、さらに研究を進めていく必要があると考えられる。

## 第 2 章 Labrasol® 及びその関連製剤による難吸収性薬物の消化管吸収性改善ならびに吸収促進機構の解析

### 第 1 節 Labrasol® 及びその関連製剤による各種難吸収性薬物の消化管吸収性の改善

#### 【緒言】

前章では、大腸における insulin の吸収に対して C10 ならびに Sefsol-218 が吸収促進効果を発現することを示した。しかしながら、薬物の消化管吸収性を効率良く改善するためには、消化管の中で広い表面積を有する小腸において強い促進効果を示す吸収促進剤が望ましい。現在までに報告されている吸収促進剤の多くが主に大腸においてその効果を発現することを踏まえると、小腸においても有効な吸収促進剤の開発が重要であると考えられる。そこで本章では新たな製剤群として、Labrasol® 及びその関連製剤に着目した。

Labrasol® は、その構造に polyglycolysed C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> glycerides を含む製剤添加物であり、従来から溶解補助剤として microemulsion 等の処方に利用されている。Labrasol® は mono、di、triglycerides、ならびに polyethylene glycol (PEG) のモノ、ジ、脂肪酸エステル、さらに free PEG-8 を含む混合製剤として知られている<sup>69,70</sup>。すなわち、その成分の一部に脂肪酸エステルを含むことから、前章で使用したカプリン酸類似化合物を含む製剤と考えることができる。また、self-microemulsion system の利点の一つは、製剤と腸液を混合し穏やかに攪拌するだけで、薬物と乳化剤から構成される microemulsion を形成できる点である。したがって、難吸収性薬物の消化管吸収に対する Labrasol® の吸収促進効果に対しても、近年注目が集まっている。例えば、Labrasol® は gentamicin と insulin の消化管からの吸収を改善することが報告されている<sup>71,72</sup>。また、Labrasol® はラット空腸からの低分子量 heparin の吸収を改善すること<sup>73</sup>、10% (v/v) Labrasol® が CF ならびに FD4 の消化管投与後の生物学的利用率を向上させることが明らかとなっている<sup>36</sup>。さらに、本添加剤の作用を解明する目的として、PEG エステル及び glyceride だけでなく、C8 及び C10 も重要な成分となること<sup>74</sup>、Labrasol® のジエチルエーテル画分が強力な吸収促進効果を示すことも示された<sup>75</sup>。また Labrasol® は、前立腺癌治療を目的としたアンドロゲン受容体阻害剤 enzalutamide (Xtandi®, アステラス製薬) の経口投与製剤の医薬品添加物として近年、米国、EU、及び日本にて承認されている<sup>76</sup>。

このように、Labrasol® の有用性については活発に議論されている。しかしながら、Labrasol® に類似した製剤の吸収促進効果についてはほとんど報告されていない。また、Labrasol® の用途は上記の enzalutamide のような BCS class II 医薬品の溶解性の改善に注視される一方、親水性薬物の消化管透過性に対する影響に関しては、限定的な情報に留まる。そこで著者は、Labrasol® に関連した製剤の吸収促進効果について、包括的に理解する必要があると考えた。本章では、insulin、CF、FD、及び ALN を難吸収性モデル薬物として使用し、これら薬物の消化管吸収性に及ぼす Labrasol® ならびにその関連製剤、計 7 種類 (Labrasol®, Capryol 90, Capryol PGMC, Lauroglycol 90, Lauroglycol FCC, Labrafil M 2125 CS、及び Maisine35-1) の吸収促進効果について検討した。なお、Labrasol® ならびにその関連製剤はモノエステルやジエ

ステル体、遊離 glyceride 等を含む混合製剤であることから、本来はこれらの化学構造を単純な化合物として表すことは困難である。しかしながら、これら製剤についてより明瞭にすること、また、構造活性相関等の考察を補助することを目的に、Labrasol® ならびにその関連製剤の構造式の概略図を Fig. 15 に示した。

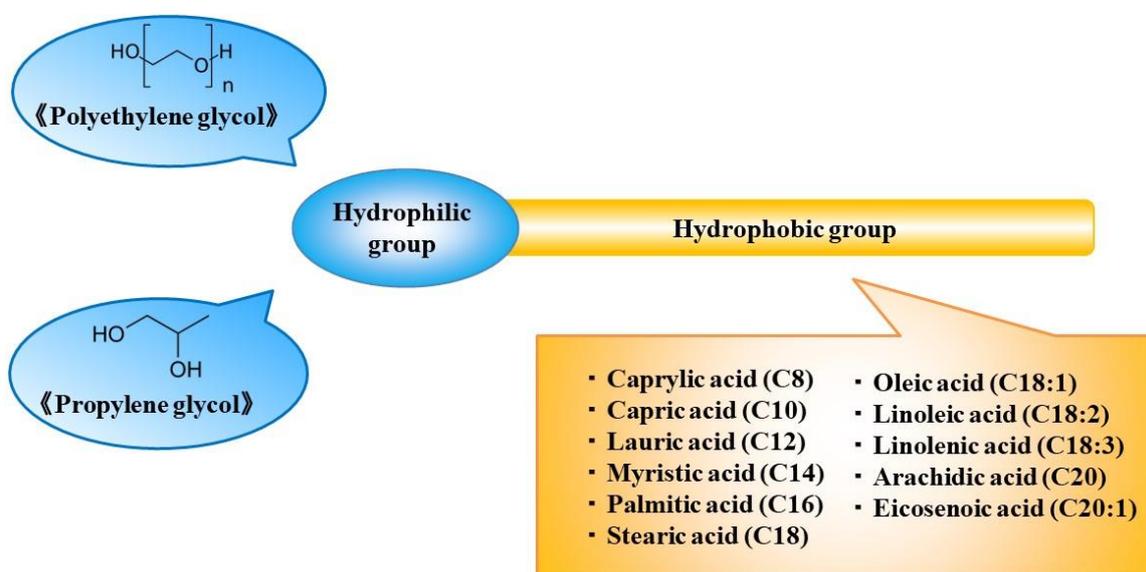


Fig. 15 Schematic illustration of Labrasol® and its related formulations.

## 【実験材料】

### 1. 器具、実験動物

前章の実験材料に準じた。

### 2. 試薬

Labrasol<sup>®</sup>、Capryol 90、Capryol PGMC、Lauroglycol 90、Lauroglycol FCC、Labrafil M 2125 CS ならびに Maisine 35-1 は Gattefossé (Saint Priest, France) より入手した。なお、各製剤の主な組成については Table 4 に示した。ALN は Tokyo Chemical Industry (Tokyo) より購入した。CF、FDs (平均分子量約 4,000 (FD4)、約 10,000 (FD10)、約 40,000 (FD40)、約 70,000 (FD70)) は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) より購入した。その他の試薬は前章の実験材料に準じた。

**Table 4** Compositions of Labrasol<sup>®</sup> and its related formulations

Product Name	Chemical Definition	Hydrophobic Group
Labrasol <sup>®</sup>	Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides Caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides	caproic acid ( $\leq 2.0\%$ ), caprylic acid (50–80%), capric acid (20.0–50.0%), lauric acid ( $\leq 3.0\%$ ), myristic acid ( $\leq 1.0\%$ )
Capryol 90	Propylene glycol monocaprylate (type ii)	caprylic acid ( $\geq 90\%$ ), capric acid ( $\leq 3.0\%$ ), lauric acid ( $\leq 3.0\%$ ), myristic acid ( $\leq 3.0\%$ ), palmitic acid ( $\leq 1.0\%$ )
Capryol PGMC	Propylene glycol monocaprylate (type i)	caprylic acid ( $\geq 99\%$ ), capric acid ( $\leq 3.0\%$ ), lauric acid ( $\leq 3.0\%$ )
Lauroglycol 90	Propylene glycol monolaurate (type ii)	caprylic acid ( $\leq 0.5\%$ ), capric acid ( $\leq 2.0\%$ ), lauric acid ( $\geq 95.0\%$ ), myristic acid ( $\leq 3.0\%$ ), palmitic acid ( $\leq 1.0\%$ )
Lauroglycol FCC	Propylene glycol monolaurate (type i)	caprylic acid ( $\leq 0.5\%$ ), capric acid ( $\leq 2.0\%$ ), lauric acid ( $\geq 95.0\%$ ), myristic acid ( $\leq 3.0\%$ ), palmitic acid ( $\leq 1.0\%$ )
Labrafil M 2125 CS	Linoleoyl macrogol-6 glycerides Linoleoyl polyoxyl-6 glycerides	palmitic acid (4.0–20.0%), stearic acid ( $\leq 6.0\%$ ), oleic acid (20.0–35.0%), linoleic acid (50.0–65.0%), linolenic acid ( $\leq 2.0\%$ ), arachidic acid ( $\leq 1.0\%$ ), eicosenoic acid ( $\leq 1.0\%$ )
Maisine 35-1	Glycerol monolinoleate Glyceryl monolinoleate	palmitic acid (4.0–20.0%), stearic acid ( $\leq 6.0\%$ ), oleic acid (10.0–35.0%), linoleic acid ( $\geq 50.0\%$ ), linolenic acid ( $\leq 2.0\%$ ), arachidic acid ( $\leq 1.0\%$ ), eicosenoic acid ( $\leq 1.0\%$ )

(*Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Table 1.)

## 【実験方法】

### 1. 投与液の調製

*In situ* closed loop 法による小腸吸収実験に用いた投与液は、PBS を用いて調製した。PBS に溶解補助剤として HCO-60 を最終濃度が 1.0% (w/v) となるように加え、Labrasol<sup>®</sup> ならびにその関連製剤を 10% (v/v) の濃度となるよう添加し加温しながら溶解させた。pH を調整後、insulin を 6.4 IU/mL (dose of 80 IU/kg)、CF を 0.04 mg/mL (dose of 0.5 mg/kg)、FDs を 0.64 mg/mL (dose of 8 mg/kg)、ALN を 0.83 mg/mL (dose of 10 mg/kg) となるようそれぞれ添加した。なお、大腸吸収実験に関しては insulin を 19.2 IU/mL (dose of 80 IU/kg)、CF を 0.12 mg/mL (dose of 0.5 mg/kg)、ALN を 2.49 mg/mL (dose of 10 mg/kg) となるようそれぞれ添加し、同様に調製した。

### 2. 消化管吸収実験

前章の実験方法に準じ、消化管 loop を作成した。各薬液を投与し、血液サンプルを経時的 (15、30、60、90、120、180、240 分) に頸静脈より採取した。サンプルは血漿分画を得るために、直ちに 10,000 G、5 分間遠心分離を行い、これらの血漿サンプル中の各薬物濃度を測定した。

### 3. 消化管粘膜障害性の評価

消化管粘膜障害性は LDH 活性値及びタンパク質放出量を指標として評価した。各種吸収促進剤または 3% (v/v) の Triton X-100 を消化管 loop 内に投与し、4 時間後小腸 loop 内に 30 mL PBS (pH 7.4) を注入することで、腸管内管腔液を回収した。得られた管腔液は、4 °C、200 G にて 7 分間遠心分離を行い、その上清を用いて、消化管より漏出した LDH 活性ならびにタンパク質濃度を測定した。LDH 活性値は前章の方法に準じ算出した。一方、腸管内に漏出したタンパク質濃度は、得られた上清を用いて Bradford 法により算出した。この際、標準物質として bovine serum albumin を用いた。

### 4. 可逆性の評価

小腸における吸収促進剤の促進作用の可逆性を評価した。前処理群では 10% (v/v) Capryol 90 を小腸 loop 内に投与し、60 分間前処理を行った。前処理後、PBS (pH 7.4) を用いて loop 内を洗浄し、直ちに、吸収促進剤を含まない insulin 溶液を投与した。その後、血液サンプル (0.15 mL) を経時的に (15、30、60、90、120、180、240 分) 採取した。サンプルは血漿分画を得るために、10,000 G、5 分間遠心分離を行い、これらの血漿サンプル中の glucose 濃度を測定した。

### 5. 薬物の定量

血漿中 CF、FDs の濃度は、マイクロプレートリーダー (Multi Detection Microplate Reader, POWERSCAN<sup>®</sup> HT, DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka) を用いて、Ex. 485 nm、Em. 535 nm

の波長にて蛍光強度を測定することにより算出した。

ALN の定量は、Wong らの報告<sup>77</sup>に従い、以下の手順で行った。サンプル 120  $\mu\text{L}$  を 500  $\mu\text{L}$  の超純水で希釈し、75  $\mu\text{L}$  の 5 M trichloroacetic acid (TCA) で除タンパク後、遠心分離 (13000 rpm、5 分間) した。上清をフィルター (0.45  $\mu\text{L}$ ) で濾過した後、回収した上清 600  $\mu\text{L}$  に 2  $\mu\text{L}$  の 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  及び 4  $\mu\text{L}$  の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を添加後、70  $\mu\text{L}$  の 6.25 M  $\text{NaOH}$  により pH 12 に調整することで共沈殿させた。遠心分離を行い、得られた沈殿物を 500  $\mu\text{L}$  の超純水で洗浄後、沈殿物に 10  $\mu\text{L}$  の 1 N  $\text{HCl}$  を添加し、再溶解後、100  $\mu\text{L}$  の 0.5 M  $\text{NaOH}$  の添加により再び共沈殿させた。さらに、遠心分離を行い、得られた沈殿物を 500  $\mu\text{L}$  の超純水で洗浄後、沈殿物に 130  $\mu\text{L}$  の 0.05 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (pH 10) を添加し、溶解させた。この溶解物に、30  $\mu\text{L}$  の 3 mg/mL fluorescamine / acetonitrile、100  $\mu\text{L}$  の dichloromethane を添加し、遠心分離により得られた上清のうち、30  $\mu\text{L}$  を injection volume として以下の条件に従い、蛍光-逆相-HPLC により測定した。

HPLC system	: Shimadzu LC-20AT HPLC system (Shimadzu, Kyoto)
Column	: COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -PAQ (4.6×150 mm Nacalai Tesque Inc., Kyoto)
Mobile phase	: 1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -methanol (pH 6.5) / acetonitrile = 98 / 2
Flow rate	: 1.0 mL/min
Detection	: Fluorescence detector (Ex.395 nm, Em.480 nm)
Column temperature	: 40 °C

## 6. データ解析

Insulin の消化管吸収性は前章と同様に評価した。

薬物の血漿ピーク濃度 ( $C_{\max}$ ) 及び血漿ピーク濃度に達するまでの時間 ( $T_{\max}$ ) は、血漿中薬物-時間曲線から決定した。また、得られた血漿中濃度推移から、area under the curve (AUC) を算出し、absorption enhancement ratios (ER) を以下の式により算出した。

$$\text{Absorption enhancement ratio (ER)} = \text{AUC}_{\text{with enhancer}} / \text{AUC}_{\text{control without enhancer}}$$

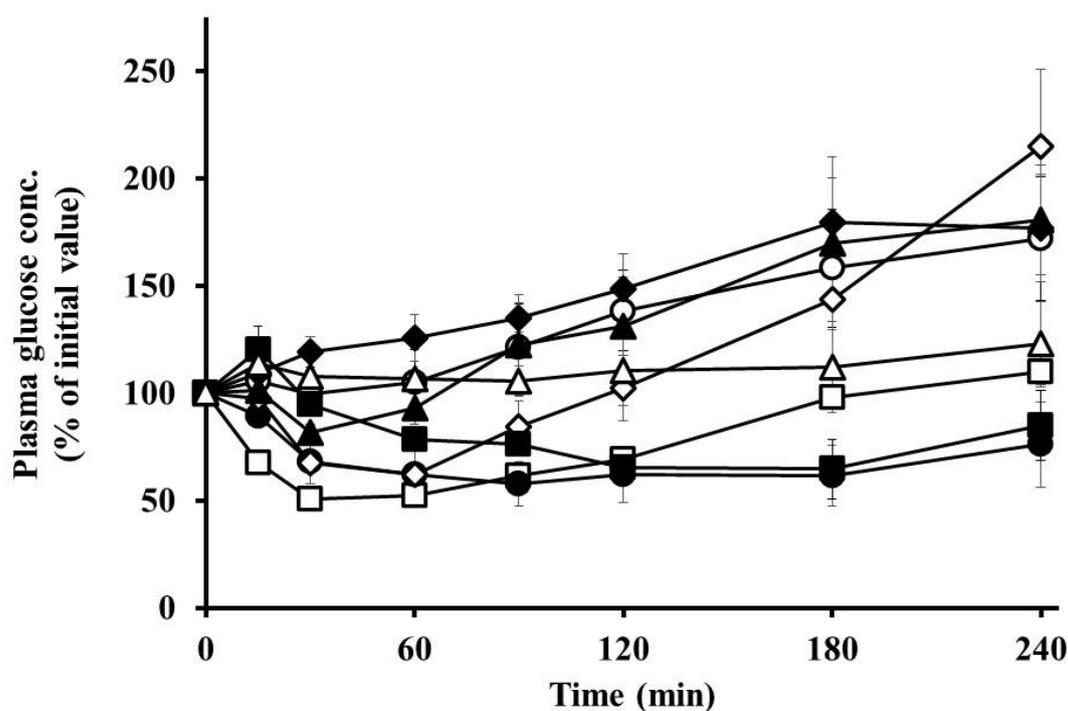
## 7. 統計学的処理

すべてのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差 (S.E.) にて表示した。有意差検定は、多重比較 (Tukey-Kramer test) により行った。

## 【結果】

### 1. Insulin の小腸吸収性に及ぼす Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤の影響

Insulin の小腸吸収性に及ぼす Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤の影響は前章と同様に *in situ* closed loop 法により評価した (Fig. 16、Table 5)。Insulin 単独投与群においては、血中 glucose 濃度の低下が見られなかったのに対し、Labrasol<sup>®</sup>、Capryol 90、Lauroglycol 90 併用時において、control 群と比較して有意な血糖降下作用が見られた。Insulin の AAC ならびに PA% の値は、Labrasol<sup>®</sup>、Capryol 90、Lauroglycol 90 によりそれぞれ約 9 倍、13 倍、9 倍に上昇し、特に Capryol 90 が insulin の小腸吸収性に対して最も高い有効性を示すことが明らかとなった。



**Fig. 16** The effects of Labrasol<sup>®</sup> and its related formulations on plasma concentrations of glucose after small intestinal administration of insulin (80 IU/kg) using an *in situ* closed loop. Glucose concentrations are expressed as a percentage of the initial concentration at time zero. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of three to four rats. Keys: (○) Control (Insulin: 80 IU/kg); (□) Labrasol<sup>®</sup> (10% v/v); (●) Capryol 90 (10% v/v); (◇) Capryol PGMC (10% v/v); (■) Lauroglycol 90 (10% v/v); (▲) Lauroglycol FCC (10% v/v); (◆) Labrafil M 2125 CS (10% v/v); (△) Maisine 35-1 (10% v/v).

(*Pharmaceutics*, 12, 462 (2020); Fig. 1)

**Table 5** Effects of various formulations on the small intestinal absorption of insulin

<b>Formulation</b>	<b>Conc.</b> <b>(% v/v)</b>	<b>AAC<sub>0→4h</sub></b> <b>(%·min)</b>	<b>PA%</b>	<b>Enhancement</b> <b>Ratio</b>
Control	-	636 ± 636	0.10 ± 0.10	-
+ Labrasol <sup>®</sup>	10	5700 ± 130 **	0.87 ± 0.02 **	9.0
+ Capryol 90	10	8050 ± 703 **	1.23 ± 0.11 **	12.7
	15	9870 ± 2740 **	1.51 ± 0.42 **	15.5
+ Capryol PGMC	10	2750 ± 1100	0.42 ± 0.17	4.3
+ Lauroglycol 90	10	5700 ± 1350 **	0.87 ± 0.21 **	9.0
+Lauroglycol FCC	10	844 ± 286	0.13 ± 0.04	1.3
+ Labrafil M 2125 CS	10	10 ± 10	0.002 ± 0.002	0.02
+ Maisine 35-1	10	1110 ± 1100	0.17 ± 0.17	1.7

The plasma glucose levels were measured after intestinal administration of insulin and various formulations and intestinal absorption of insulin (80 IU/kg) was evaluated in these formulations. Each value represents the mean ± S.E. (n=3–4). AAC means area above the curve and PA shows pharmacological availability of insulin, compared with intravenous administration. (\*\*) p < 0.01, compared with the control.

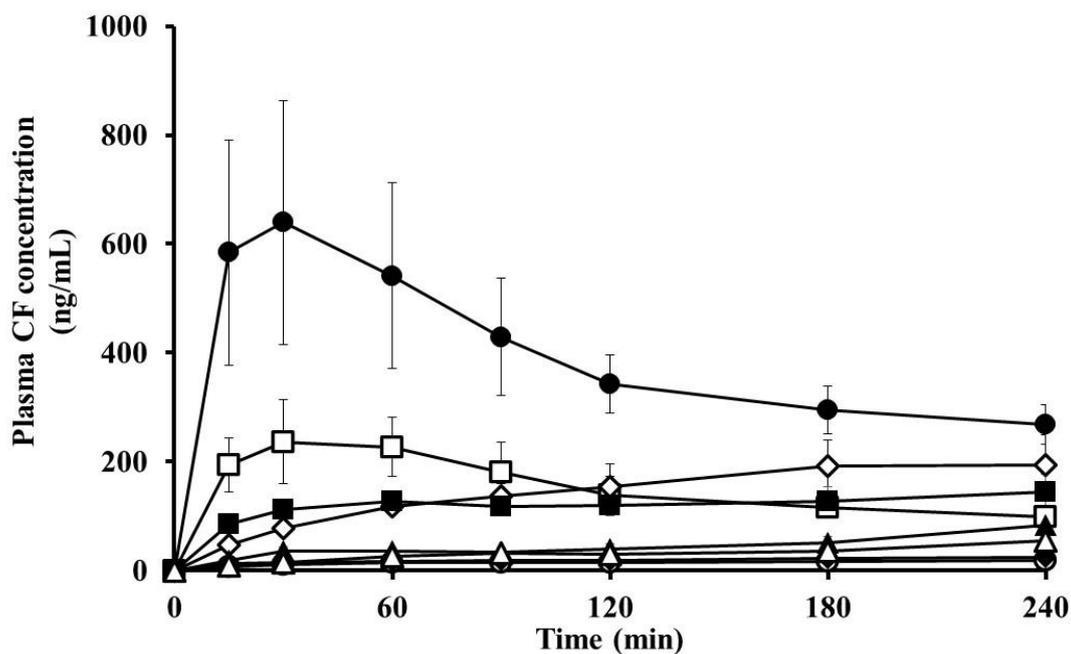
(*Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Table 2)

## 2. CF ならびに ALN の小腸吸収性に及ぼす Labrasol® 及びその関連製剤の影響

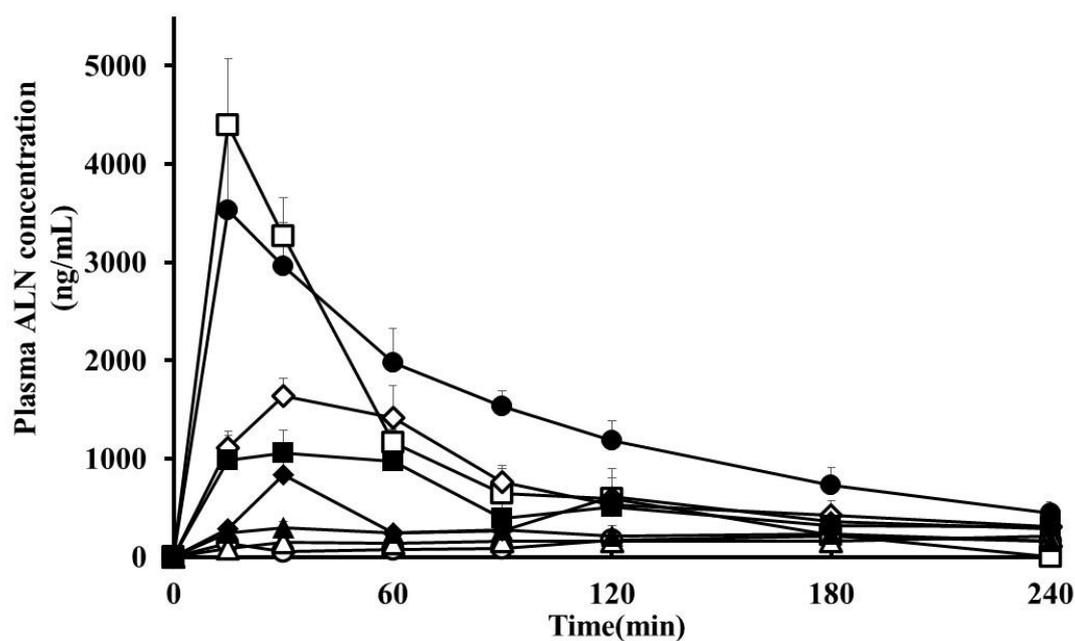
前項ではペプチド性医薬品に対する吸収促進効果が示された。そこで次に、性質の異なるモデル医薬品として CF ならびに ALN を選択し、これら薬物の小腸吸収性に及ぼす Labrasol® ならびにその関連製剤の影響について評価した。CF の血漿中濃度プロファイルを Fig. 17A に、また ALN の血漿中濃度プロファイルを Fig. 17B に示す。さらに、得られた血漿中濃度から、薬物動態学パラメータを算出し、Table 6 にまとめた。

Control 群である CF 0.5 mg/kg 単独の投与群における CF の  $C_{max}$  は  $25 \pm 5$  ng/mL、AUC は  $4.0 \pm 0.6$   $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$  と非常に低かった。一方、Labrasol® 及びその関連製剤の併用により、CF の消化管吸収性は増大した。特に、Labrasol®、Capryol 90、Capryol PGMC の存在下において CF の AUC は control 群と比較して有意に増大し、その中でも Capryol 90 併用時において、添加剤併用時と control の AUC から算出した吸収促進比 (ER) は 23.6 倍と最も高い値を示した。さらに、ALN の小腸からの吸収性に関しても Labrasol® 及びその関連化合物の併用により増大することが明らかとなった。また ALN を用いた場合においても、Capryol 90 が最も高い吸収促進効果を示した。吸収促進剤を併用しなかった control 群である ALN 10 mg/kg 投与群における AUC は  $34.1 \pm 28.5$   $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$  と非常に低かったのに対し、Capryol 90 併用群では  $335.1 \pm 39.9$   $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$  となり、ER は約 9.8 であった。したがって、7 種の Labrasol® 関連製剤のうち、Capryol 90 が CF と ALN の消化管吸収性を最も増大させることが明らかとなった。

A. CF



B. ALN



**Fig. 17** Effects of Labrasol<sup>®</sup> and its related formulations on the plasma concentrations of (A) CF and (B) ALN after small intestinal administration using an *in situ* closed loop method. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. of 3-4 rats. Keys: (○) Control (0.5 mg/kg for CF, 10 mg/kg for ALN); (□) Labrasol<sup>®</sup> (10% v/v); (●) Capryol 90 (10% v/v); (◇) Capryol PGMC (10% v/v); (■) Lauroglycol 90 (10% v/v); (▲) Lauroglycol FCC (10% v/v); (◆) Labrafil M 2125 CS (10% v/v); (△) Maisine 35-1 (10% v/v). (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 1)

**Table 6** Effects of Labrasol<sup>®</sup> and its related formulations on the small intestinal absorption of drugs in rats

	<b>C<sub>max</sub></b> <b>(ng/mL)</b>	<b>T<sub>max</sub></b> <b>(min)</b>	<b>AUC<sub>0→240 min</sub></b> <b>(µg·min/mL)</b>	<b>Enhancement</b> <b>Ratio</b>
<b>CF</b>				
Control	25 ± 5	195 ± 45	4.0 ± 0.6 †	-
+ Labrasol <sup>®</sup>	244 ± 49	45 ± 8	36.7 ± 6.0 *	9.3
+ Capryol 90	639 ± 183	30 ± 0	93.4 ± 20.6 **, ††	23.6
+ Capryol PGMC	218 ± 62	143 ± 36	34.5 ± 10.4 *	8.7
+ Lauroglycol 90	149 ± 19	158 ± 42	28.5 ± 3.8	7.2
+ Lauroglycol FCC	83 ± 16	240 ± 0	10.6 ± 2.2	2.7
+ Labrafil M 2125 CS	24 ± 4	240 ± 0	4.6 ± 0.9	1.2
+ Maisine 35-1	55 ± 11	190 ± 41	7.4 ± 0.9	1.9
<b>ALN</b>				
Control	220 ± 150	180 ± 55	34.1 ± 28.5 ††	-
+ Labrasol <sup>®</sup>	4390 ± 630	15 ± 0	234.3 ± 4.1 **	6.9
+ Capryol 90	3530 ± 1050	15 ± 0	335.1 ± 39.9 **	9.8
+ Capryol PGMC	1640 ± 160	30 ± 10	177.4 ± 13.2 *	5.2
+ Lauroglycol 90	1060 ± 260	30 ± 10	130.5 ± 46.5	3.8
+ Lauroglycol FCC	400 ± 20	100 ± 40	54.6 ± 10.2 ††	1.6
+ Labrafil M 2125 CS	840 ± 300	30 ± 30	96.8 ± 27.4 †	2.8
+ Maisine 35-1	230 ± 70	200 ± 30	37.1 ± 18.7 ††	1.1

The results are expressed as mean ± S.E. (n = 3-4).

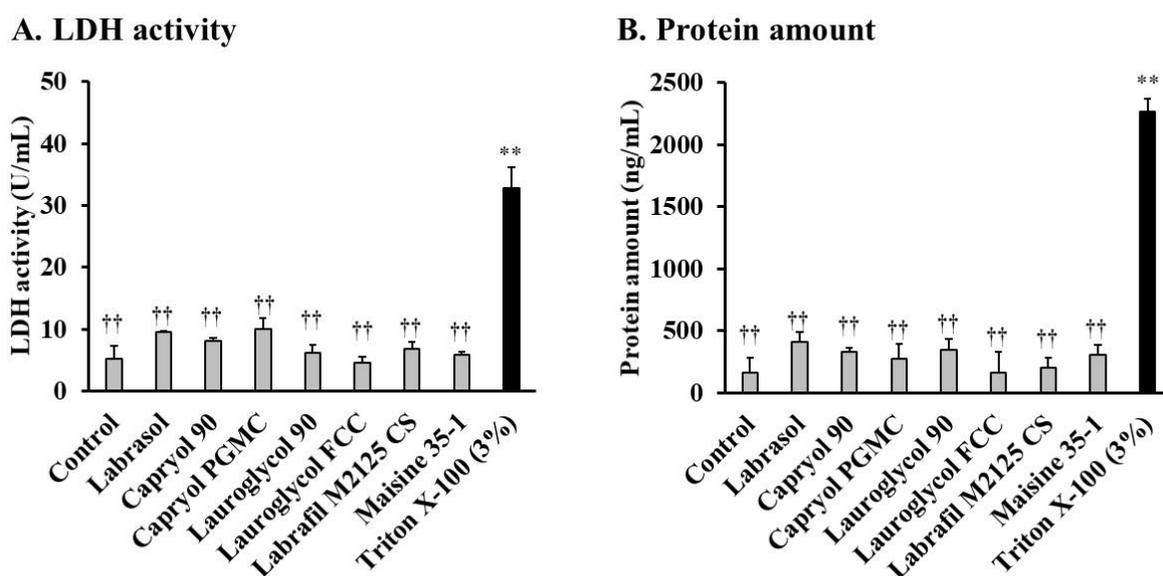
AUC, area under the curve; (\*\*\*) p < 0.01, (\*) p < 0.05, compared with the control. (††) p < 0.01, (†) p < 0.05, compared with the Labrasol<sup>®</sup> group.

(*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Table 1)

### 3. Labrasol® 及びその関連製剤の小腸粘膜障害性の評価

これまでの検討から、Labrasol® 関連製剤は各種難吸収性薬物の消化管吸収性を改善する有用な吸収促進剤であることが示唆された。しかしながら、既存の吸収促進剤は、高い吸収促進効果と同時に粘膜障害性を有している場合が多く、Labrasol® 関連製剤も安全性が懸念される。そこで、消化管吸収実験終了後に腸管 loop 内の LDH 活性値及び漏出したタンパク量を測定することにより、Labrasol® 関連製剤による小腸粘膜障害性を評価した (Fig. 18)。その結果、いずれの Labrasol® 関連製剤を併用した場合においても LDH 活性値、タンパク量は、control 群と比較して有意な増大は認められなかった。一方、positive control 群として用いた Triton X-100 併用時の LDH 活性値やタンパク量は、有意な増大がみられた。以上のことから、Labrasol® 関連製剤は比較的安全な吸収促進剤であることが示唆された。

また、本研究で用いた 7 種類の Labrasol® 関連製剤のうち有効性と安全性のバランスにおいて Capryol 90 が最も優れた吸収促進剤であることが示唆された。したがって、以降の研究では Capryol 90 を用いてその特性を詳細に検討した。

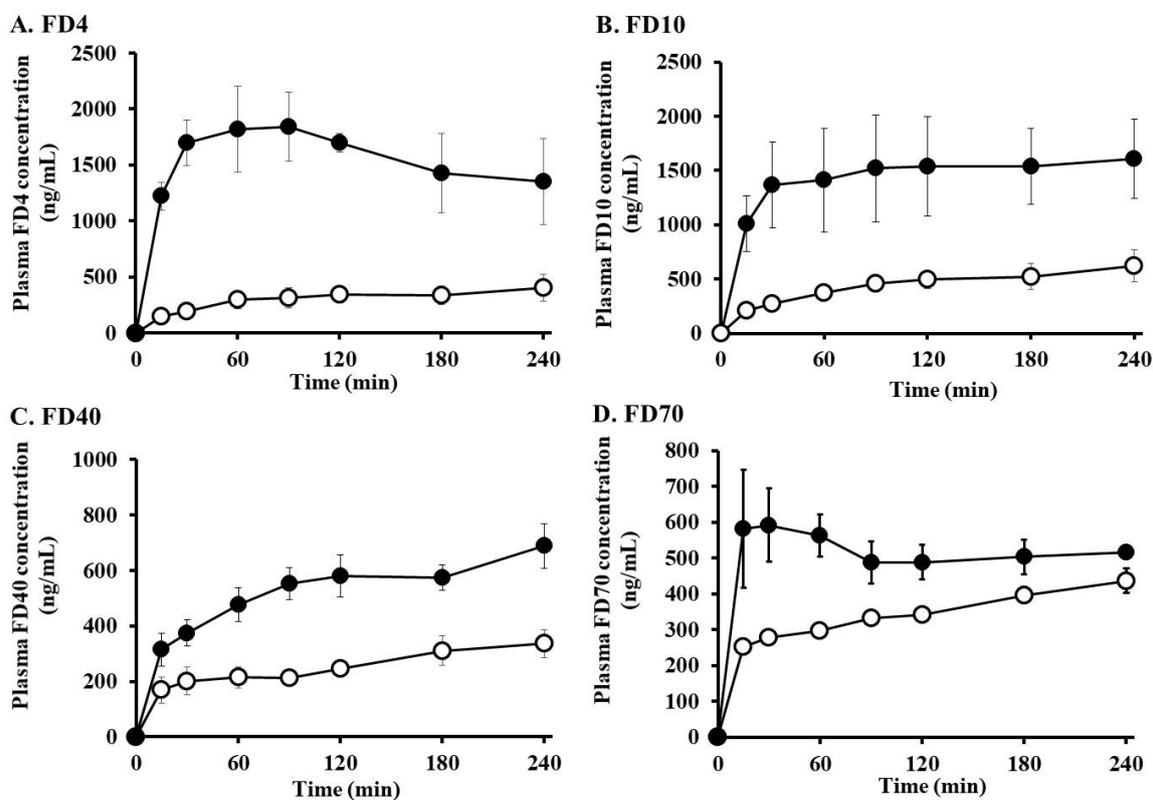


**Fig. 18** Effects of 10% (v/v) Labrasol® and its related formulations on the (A) lactate dehydrogenase (LDH) activity and (B) amount of protein released from rat small intestinal mucosa by an *in situ* closed-loop study. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three experiments. (\*\*)  $p < 0.01$ , compared with the control group. (††)  $p < 0.01$ , compared with the positive control group.

(*Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Fig. 2)

#### 4. Capryol 90 の吸収促進効果の分子量依存性

Capryol 90 の吸収促進効果が薬物の分子量に依存するか否かを評価するため、分子量の異なる FDs (FD4、FD10、FD40、FD70) を用いて、FDs の消化管吸収性に及ぼす Capryol 90 の影響について検討した。Capryol 90 存在下及び非存在下における FD4、FD10、FD40、FD70 の血漿中濃度プロファイルを図 19 に示し、得られた血漿中濃度から算出した薬物動態学的パラメータを Table 7 にまとめた。FD4 の小腸からの吸収は 10% (v/v) Capryol 90 により顕著に増大することが明らかとなった。さらに、FD10、FD40、FD70 の吸収性についても、Capryol 90 の併用により有意に増大した。一方、Table 7 に示す FD4、FD10、FD40、FD70 をモデル薬物として用いた場合の ER はそれぞれ 5.1、3.2、2.1、1.5 と、CF を用いた場合よりも低値を示した。すなわち、Capryol 90 の難吸収性薬物に対する吸収促進効果は、薬物の分子量の増大に伴い低下する傾向があることが明らかとなった。



**Fig. 19** Effects of Capryol 90 on the absorption of (A) FD4, (B) FD10, (C) FD40 and (D) FD70 from rat small intestine by an *in situ* closed loop method. The results are expressed as mean  $\pm$  S.E. of 3-4 rats.

Keys: (○) Control (8 mg/kg); (●) Capryol 90 (10% v/v).

(*Pharm. Res.*, 37, 248 (2020); Fig. 2)

**Table 7** Summary of the pharmacokinetic parameters of FD4, FD10, FD40 and FD70 after their co-administration with Capryol 90 into rat small intestines by an *in situ* closed-loop method

		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>T<sub>max</sub></b>	<b>AUC<sub>0→240 min</sub></b>	<b>Enhancement</b>
		<b>(ng/mL)</b>	<b>(min)</b>	<b>(µg·min/mL)</b>	<b>Ratio</b>
FD4	Control	417 ± 107	200 ± 40	72.7 ± 18.5	-
	Capryol 90	1844 ± 257	90 ± 46	369.0 ± 20.9 **	5.1
FD10	Control	621 ± 145	225 ± 15	106.3 ± 21.4	-
	Capryol 90	1795 ± 438	98 ± 50	343.5 ± 90.8 **	3.2
FD40	Control	348 ± 45	188 ± 53	59.7 ± 7.3	-
	Capryol 90	689 ± 81	240 ± 0	125.3 ± 13.3 **	2.1
FD70	Control	437 ± 35	240 ± 0	81.2 ± 2.7	-
	Capryol 90	663 ± 119	95 ± 73	121.3 ± 13.1 *	1.5

The results are expressed as the mean ± S.E. (n = 3-4).

(\*\*) p < 0.01, (\*) p < 0.05, compared with the control.

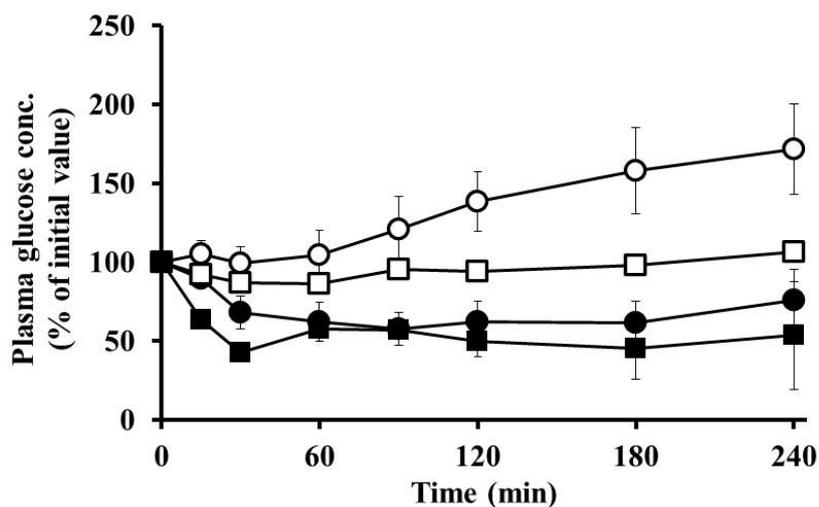
(*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Table 2)

## 5. Capryol 90 の吸収促進効果の部位特異性

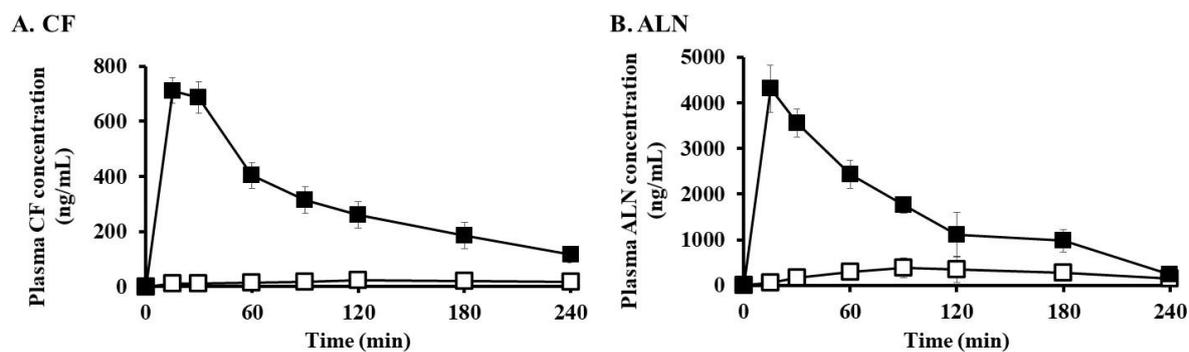
ここまでは、小腸における Capryol 90 の吸収促進効果について検討した。そこで次に、Capryol 90 の吸収促進効果に消化管部位差が認められるか否かについて評価するため、大腸においても同様に検討を行い、小腸における結果と比較した。

Insulin をモデル薬物として使用した場合の、大腸における Capryol 90 の吸収促進効果について Fig. 20 に示す。Capryol 90 が存在しない control 群においては、小腸投与時と比較すると僅かに高い血糖降下作用が観察されたものの、大腸投与の場合においてもほとんど血漿中 glucose 濃度に変化が見られなかった。一方、insulin に Capryol 90 を併用し大腸に投与した場合、顕著な血糖降下作用が観察された。Insulin 大腸投与時の AAC は  $1370 \pm 250 \% \cdot \text{min}$  ( $\text{PA}\% = 0.21 \pm 0.04$ ) から Capryol 90 の併用により  $11,490 \pm 2150 \% \cdot \text{min}$  ( $\text{PA}\% = 1.76 \pm 0.33$ ;  $p = 0.0009$ ) に上昇した。したがって、Capryol 90 は、小腸と大腸において insulin の吸収性に対する吸収促進効果を示すことが明らかとなった。

また、低分子医薬品 (CF、ALN) の大腸吸収性に及ぼす Capryol 90 の影響について、Fig. 21、Table 8 に示す。その結果、Capryol 90 は大腸においても CF ならびに ALN の吸収性を増大させることが明らかとなった。大腸において、Capryol 90 を用いた場合、CF の吸収は control 群に比べて顕著に増大することが確認され、ER は約 17.6 倍 ( $p = 0.0016$ ) に増大することが認められた。小腸における ER が 23.6 倍であったことから、小腸と大腸で若干の差はみられるものの、Capryol 90 の吸収促進効果の部位差はわずかであることが明らかとなった。ALN の吸収性に関しても、小腸投与ならびに大腸投与それぞれの場合、Capryol 90 により、その吸収性は 9.8 倍 ( $p = 0.0002$ ) ならびに 7.0 倍 ( $p = 0.0044$ ) に向上し、小腸と大腸において同程度の有効性を示した。



**Fig. 20** Regional differences in the effect of Capryol 90 on the intestinal absorption of insulin using an *in situ* closed loop. Insulin absorption following an 80 IU/kg dose was estimated by measuring plasma glucose levels. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Keys: (○) Control (Small intestine); (●) with 10% (v/v) Capryol 90 (Small intestine); (□) Control (Large intestine); (■) with 10% (v/v) Capryol 90 (Large intestine). (*Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Fig. 4)



**Fig. 21** Effects of Capryol 90 on the absorption of (A) CF and (B) ALN after large intestinal administration using an *in situ* closed loop method. The results are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n = 3-4 rats). Keys: (□) Control (0.5 mg/kg for CF, 10 mg/kg for ALN); (■) with 10% (v/v) Capryol 90. (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 3)

**Table 8** Effect of Capryol 90 on the small and large intestinal absorption of drugs in rats

		$C_{max}$ (ng/mL)	$T_{max}$ (min)	$AUC_{0 \rightarrow 240 \text{ min}}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$ )	Enhancement Ratio
CF					
Small intestine	Control	25 $\pm$ 5	195 $\pm$ 45	4.0 $\pm$ 0.6	-
	Capryol 90	639 $\pm$ 183	30 $\pm$ 0	93.4 $\pm$ 20.6 **	23.6
Large intestine	Control	24 $\pm$ 0.4	120 $\pm$ 40	4.2 $\pm$ 0.3	-
	Capryol 90	767 $\pm$ 20	20 $\pm$ 5	74.0 $\pm$ 9.2 **	17.6
ALN					
Small intestine	Control	220 $\pm$ 150	180 $\pm$ 55	34.1 $\pm$ 28.5	-
	Capryol 90	3530 $\pm$ 1050	15 $\pm$ 0	335.1 $\pm$ 39.9 **	9.8
Large intestine	Control	390 $\pm$ 200	90 $\pm$ 30	55.4 $\pm$ 29.7	-
	Capryol 90	4310 $\pm$ 520	15 $\pm$ 0	386.1 $\pm$ 65.9 **	7.0

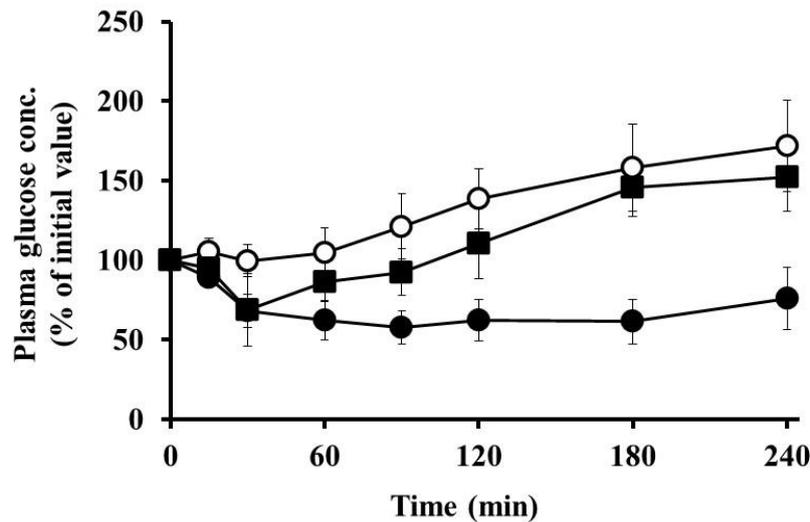
The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3-4).

(\*\*) p < 0.01, compared to the control.

(*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Table 3)

## 6. Capryol 90 の吸収促進効果の可逆性

Capryol 90 の insulin に対する吸収促進効果が可逆的か否かを検討するため、Capryol 90 にて 1 時間小腸を前処置した後に、Capryol 90 を含まない insulin 溶液を投与した。Insulin 溶液投与後の経時的な血漿中 glucose 濃度推移を Fig. 22 に示す。Insulin と Capryol 90 を同時に投与した場合、顕著な血糖降下作用が見られた。一方、Capryol 90 の前処置群においては、投与 30 分後まではわずかに血糖値が低下したものの、その後血糖値は上昇し、control 群とほとんど同等のプロファイルを示した。前処置群の insulin の AAC 値は  $2520 \pm 1300 \% \cdot \text{min}$  であり、control 群との間に有意な変化が見られなかったことから、Capryol 90 を消化管から除去することで、その吸収促進効果が顕著に低下することが明らかとなった。すなわち、Capryol 90 の吸収促進効果は可逆的であり、小腸に対して不可逆的かつ重篤な障害を惹起しない可能性が示唆された。



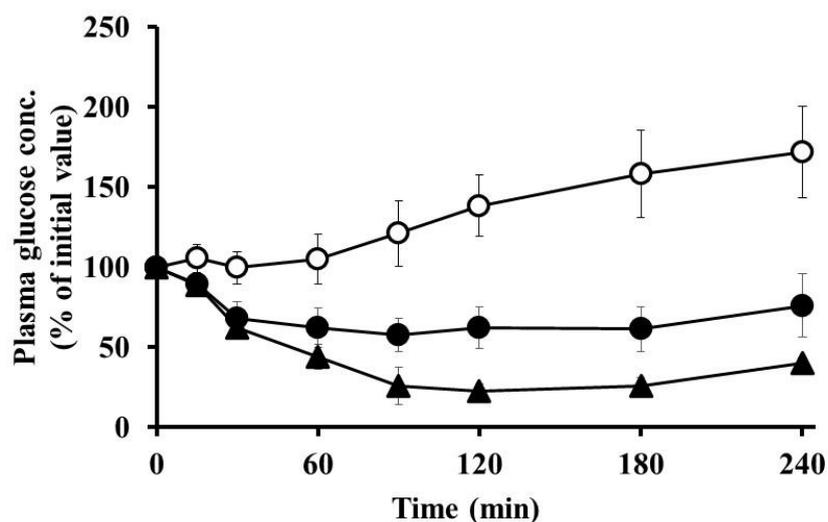
**Fig. 22** Effect of pretreatment with 10% (v/v) Capryol 90 on the absorption of insulin from the small intestine using an *in situ* closed loop. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Keys: (○) Control; (●) Capryol 90 (10% v/v); (■) pretreatment with Capryol 90 (10% v/v).

(*Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Fig. 3)

## 7. Insulin に対する Capryol 90 の吸収促進効果に及ぼす pH の影響

一般的に、タンパク分解酵素の活性や insulin の会合性は、消化管内または溶液中の pH の影響を受けることから、insulin の消化管吸収性は、異なる pH 条件により変化する可能性が考えられる。そこで、insulin 消化管吸収性に対する Capryol 90 の吸収促進効果に及ぼす pH の影響を評価するため、低 pH 条件にて消化管吸収実験を実施した。

Fig. 23 のグラフより、Capryol 90 併用 insulin 溶液の pH を 3.0 に変化させ、ラットに投与した場合、顕著な血糖降下作用が観察された。低 pH 溶液 (pH 3.0) 投与時の血糖値の低下は中性溶液 (pH 7.0) 投与時よりも増大し、pH を低下させることで AAC は  $8050 \pm 703 \text{ \%}\cdot\text{min}$  ( $\text{PA}\% = 1.23 \pm 0.11$ ) から  $14,700 \pm 917 \text{ \%}\cdot\text{min}$  ( $\text{PA}\% = 2.25 \pm 0.14$ ) へ増大することが明らかとなった。したがって、Capryol 90 の吸収促進効果は pH を 7.0 から 3.0 に変化させることで顕著に増大することが示唆された。



**Fig. 23** Effect of insulin solution pH on the intestinal absorption of insulin with Capryol 90. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Keys: (○) Control; (●) Capryol 90 (10% v/v; pH 7.0); (▲) Capryol 90 (10% v/v; pH 3.0).

(*Pharmaceutics*, 12, 462 (2020); Fig. 5)

## 【考察】

本章では、insulin、CF、FD ならびに ALN の消化管吸収性に対する Labrasol® 及びその関連製剤の吸収促進効果について検討した。ここで、本章でモデル薬物として選択した ALN は経口製剤化されている一方、代表的な難吸収性医薬品として知られている<sup>78,79</sup>。ALN は、骨粗鬆症患者の骨密度を増加させ<sup>80</sup>、股関節骨折を含む椎骨及び非椎骨骨折のリスクを低下させることが知られるものの<sup>81</sup>、経口投与後の消化管吸収はその高い水溶性のために制限される<sup>82,83</sup>。さらに ALN は、下痢、腹痛、炎症、上部消化管の潰瘍など重篤な胃腸の副作用を引き起こす可能性があるため<sup>84,85</sup>、ALN 服用後 30 分は薬物や食物を摂取することが制限される<sup>85,86</sup>。したがって、ALN の消化管吸収性を改善することで、経口製剤中に含まれる ALN の含量を減少させ、消化管障害の軽減につながると考えられる。このように、ALN の消化管吸収改善技術の開発は、コストの削減だけでなく、消化管障害の抑制やアドヒアランスの向上に貢献できると考えられる。

AAC 値及び AUC 値に基づく有効性の順序は、ペプチド性医薬品の insulin、低分子医薬品の CF、ALN で類似していた。したがって、これらの吸収促進剤は、多様な種類の薬物に対して、消化管吸収改善作用を発現することが期待される。さらに、第 1 章で検討したカプリン酸類似化合物は主に大腸においてのみその有効性が確認されたのに対し、本章で検討した Labrasol® 関連製剤は小腸においても吸収促進効果を示すことが明らかになった。これら 2 種類の添加剤間には組成の面で差異が存在する。すなわち、Labrasol® 関連製剤にはモノエステルやジエステル体、propylene glycol ならびに遊離脂肪酸が含有される。エステル体のみでは脂溶性が高いため、非攪拌水層のような小腸組織の影響によりその分散が抑制されるが、製剤中の含有物（不純物）により、製剤自体の分散が補助された可能性があると考えられている。しかしながら、小腸と大腸の吸収促進効果の違いについては、かつてから議論されているものの、未だ結論が出されていない。より正確に解明するためには、吸収促進剤自体を標識し挙動を追跡する等、詳細な検討が必要になると考えられる。

さらに、本研究では用いた Labrasol® 関連製剤間で吸収促進作用に大きな相違が認められた。その詳細な要因は不明であるが、吸収促進剤の作用は脂肪酸の場合、その炭素鎖の長さに依存することが報告されている。すなわち、中鎖脂肪酸は他の鎖長の脂肪酸と比較して、腸上皮細胞間にある TJ の機能を抑制する作用が大きいことが明らかとなっている<sup>87</sup>。この特徴は、現在臨床研究が実施されている GIPET® 等の技術にも共通している<sup>88,89</sup>。さらに、Capryol 90 と Capryol PGMC の化学的な添加剤の定義は一致しているにも関わらず、これら製剤の吸収促進作用の大きさには差異がみられた。この現象の要因として、製剤中のモノエステル体の比率が関与していると考えられている。Capryol 90 中に含まれるモノエステルの比率は、Capryol PGMC とは大幅に異なる。すなわち、モノエステルの割合が高い Capryol 90 (94%) は、モノエステルの割合が低い Capryol PGMC (64%) よりも高い吸収促進効果を示すことが明らかになった。したがって、他の製剤と比較して、中鎖脂肪酸由来のモノエステルの含有量が高いことが、薬物の吸収に対する Capryol 90 の吸収促進作用に重要な要因になると考えられる。

また、Labrasol<sup>®</sup> の臨界ミセル濃度 (CMC) は 0.01% 以下であることが報告されていることから<sup>90</sup>、本研究で使用した投与液中で Labrasol<sup>®</sup> はミセルを形成し、これは Capryol 90 においても同様であることが予測される。Capryol 90 の吸収促進効果が濃度依存的であったこと (Table 5)、低濃度の Capryol 90 の吸収促進効果がごくわずかであったこと (not shown) を踏まえると、Labrasol<sup>®</sup> 関連製剤の吸収促進効果にはミセルの形成が関与する可能性が考えられる。しかしながら、薬液の消化管への投与後、腸管内においては投与液が拡散するため、Labrasol<sup>®</sup> 関連製剤の局所濃度は徐々に低下し、CMC 以下になることが予測される。すなわち、ミセルの形成が吸収促進効果の発現に必須であるか否かについては不明である。しかしながら、製剤自体の存在状態も吸収促進効果を左右する因子になり得ると考察している。

吸収促進剤を臨床に適用する場合、消化管に対するこれら添加剤の局所刺激及び細胞毒性を考慮し評価する必要がある。本章においても前章と同様に、LDH の活性を障害性マーカーの一つとして使用した。その結果、いずれの Labrasol<sup>®</sup> 関連製剤も小腸の LDH 活性を増大させないことが明らかになった。また、タンパク質は生体膜の成分であり、一般に細胞膜が損傷すると多様なタンパク質が放出されることが知られる。そのため、本章においては LDH に加えて、消化管内のタンパク質の放出性を消化管粘膜障害の指標として評価した。その結果、小腸上皮細胞からのタンパク質の放出は、Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤の投与によって変化しないことが認められた。したがって、本章において使用した医薬品添加剤は小腸粘膜に対してほとんど毒性がないことが示唆された。これら有効性と安全性に関するスクリーニングの結果から、Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤の中でも、Capryol 90 が特に優れた吸収促進剤であると結論づけた。

Capryol 90 は、低分子量ならびに高分子量の水溶性薬物の消化管吸収性を有意に向上させたものの、その吸収促進作用は、モデル薬物の分子量の増大に依存して減少した (Fig. 19)。したがって、Capryol 90 は上皮細胞の TJ をある程度開口させることで、薬物の吸収を改善する可能性がある。一方、Capryol 90 は平均分子量約 7 万の FD70 の小腸吸収性を 1.5 倍程度しか上昇させなかったことから、この時の細胞間経路の細孔半径の拡大は、抗体等に代表される高分子医薬品の消化管吸収を改善するには不十分であることが予測される。言い換えれば、微生物など異物の吸収は比較的抑制される可能性があり、Capryol 90 は insulin など中分子量までの医薬品に対する吸収促進剤として優れていると考えられる。また、高分子量の薬物である FDs の  $T_{max}$  は、低分子量薬物である CF や ALN の  $T_{max}$  と比較して遅延することが明らかとなった。これは CF や ALN においては、これら薬物の血中からの消失が、血中薬物濃度-時間推移に反映されたためであると考察している。CF や ALN は、高分子の FDs と比較して、血中からの消失速度が速いことが知られている。したがって、本実験の実施時間 (4 時間) では、低分子量の薬物については吸収と消失過程、FDs については主に吸収過程が血中薬物濃度推移に反映されたことから、FDs の  $T_{max}$  が相対的に遅延したと考えられる。

また、Capryol 90 によって誘導される医薬品の消化管吸収促進作用には、消化管部位による顕著な差は認められなかった。多くの吸収促進剤は、小腸よりも大腸でより吸収促進作用を有することが知られる一方<sup>16,26</sup>、polyamidoamine dendrimer など主に小腸において吸収促進

効果を発現する添加剤も存在する<sup>15</sup>。対照的に、NOC7 は全ての消化管領域で FD4 の吸収を有意に改善すること<sup>91</sup>、さらに NO 供与体は insulin と calcitonin の吸収を消化管全体で促進することが報告されている<sup>13</sup>。このように様々なタイプの吸収促進剤が存在するが、本章で得られた結果は、NO 供与体のデータと同様に、Capryol 90 がすべての消化管適用部位において吸収促進効果を発現することを示した。したがって、幅広い種類の製剤への適用という面においては、Capryol 90 のように消化管の部位に関わらず作用する吸収促進剤は、有効な選択肢となり得ると考えられる。

次に、特徴的な Capryol 90 の性質として、insulin の消化管吸収性に対する Capryol 90 の吸収促進作用は、中性条件下と比較して低 pH 条件下で顕著に増大した。Insulin の経口送達技術への応用を考慮すると、この現象は興味深く、Capryol 90 がより機能的に作用する可能性があると考えられる。すなわち、酸性環境である胃を介する経口投与においては、Capryol 90 の高い吸収促進効果が期待される。また一般に、タンパク分解酵素の活性や insulin の会合性は、pH 条件の影響を受けることが知られていることから<sup>92,93</sup>、これら要因が Capryol 90 の insulin に対する吸収促進効果に影響を与える可能性があると考え、次節にて吸収促進機構について検討した。

## 第 2 節 Capryol 90 の吸収促進剤機構の解析

### 【緒言】

本節では、前節で見出した Capryol 90 を用いて、その吸収促進機構を検討した。また前節において、Capryol 90 の吸収促進効果が pH の影響を受けることが示唆されたことから、insulin の高次構造に対する Capryol 90 の影響だけでなく、pH 変化による会合性への影響についても評価した。前述の通り、insulin の消化管吸収性が悪い一因として、消化管に存在するタンパク分解酵素により insulin が分解されやすいことが知られているが、タンパク分解酵素にはその酵素が働きやすい至適 pH が存在する。そこで本節では、Capryol 90 または pH がタンパク分解酵素の働きを抑え、insulin の分解を抑制して吸収促進効果を示している可能性について検討を行った。すなわち、小腸粘膜ホモジネート中における insulin の経時的な分解を測定し、Capryol 90 ならびに pH による insulin の安定性への影響を評価した。

一方、細胞は TJ により細胞内外の環境を独立したものに保っているが、細胞間は常に同じ間隔であるわけではなく、actin や myosin などの TJ 裏打ちタンパクが収縮・弛緩を繰り返すことで流動的に間隔は変動するものと考えられている。その際に重要となるのが、収縮・弛緩のサインとなる各種細胞内シグナルである。TJ の開口に関与する細胞内シグナルについては様々なものが知られているが、それらシグナルの出発点の一つとしてカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が重要な因子であると言われている。過去の検討においても、EDTA などのキレート剤が  $\text{Ca}^{2+}$  とキレートすることで種々の細胞内シグナルを引き起こし、最終的に TJ が開口することが報告されている<sup>94</sup>。そこで Capryol 90 の吸収促進機構における transcellular ならびに paracellular route を介した薬物の透過性改善作用の寄与について、前章と同様に蛍光偏光解消法、Western blot、免疫染色を用いて評価するとともに、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性を測定することで、TJ 開口を制御する因子についても検討した。

## 【実験材料】

### 1. 器具、実験動物

前章の実験材料に準じた。

### 2. 試薬

Calcium chloride は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto) より購入した。その他試薬については、前節の実験材料に準じた。

### 3. 細胞培養

前章の実験材料に準じた。

## 【実験方法】

### 1. Insulin の残存量評価

消化管粘膜ホモジネート 240  $\mu\text{L}$  に、insulin 溶液 (0.02 mM) を 360  $\mu\text{L}$  加え 37 °C でインキュベートした。Insulin 溶液に Capryol 90 (0.5% v/v) ならびに溶解補助剤である HCO-60 (0.1%, w/v) を添加することで、粘膜中における insulin の安定性に及ぼす Capryol 90 の影響を評価した。240 分まで経時的にサンプリングを行い、等量の acetonitrile を加えることで反応を停止させ、直ちに 2 回遠心分離 (9,000 G、5 分間、4 °C) した。Insulin の残存量は HPLC にて測定した。なお、insulin 溶液を、消化管粘膜ホモジネートの代わりに PBS と混合し、同様にインキュベートしたものを control 群とした。

### 2. CD スペクトルの測定

CD スペクトルは円二色性分散計 (J-1500-450STG, JASCO Co., Tokyo) を用いて測定した。Insulin を pH が 3.0 または 7.0 の PBS 中に最終濃度が 0.02 mM となるよう溶解し、Capryol 90 溶液を濃度が 0.5% (v/v) となるように添加した。それぞれの溶液は 1cm 四方の石英キュベット内で、3 回の連続スキャンを平均化した。300 nm から 250 nm の吸光度、走査速度 50 nm/min、25 °C にて CD スペクトルを測定し、前章の式を用いて分子楕円率を算出した。

### 3. 蛍光偏光解消法

BBMV<sub>s</sub> (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を前章の実験方法に準じラベル化した。その後、ラベル化した BBMV<sub>s</sub> に各濃度の Capryol 90 または 200  $\mu\text{M}$  cholesterol (positive control) をそれぞれ混合した。4 種類の蛍光強度を測定し、蛍光異方性  $r$  (fluorescence anisotropy) を前章の実験方法に準じ算出した。

### 4. Caco-2 細胞透過実験

12 well Transwell<sup>®</sup> に播種した Caco-2 細胞単層膜の培地を抜き取り、apical 側に 0.5 mL の mHBSS (pH 6.5) を、basolateral 側に 1.5 mL の mHBSS (pH 7.4) を加え、37 °C 恒温槽中で

60 分間ブレインキュベートを行った。その後、apical 側に pH 6.5 に調整した insulin (0.04 mM) または CF (10  $\mu$ M) 及び Capryol 90 (0.05%, 0.1%, 0.25%; v/v) を混合させた mHBSS 溶液を添加し、basolateral 側に 1.5 mL の mHBSS (pH 7.4) を加え実験を開始した。その後、実験開始 6 時間まで経時的 (30、60、120、240、360 分) に basolateral 側よりサンプリングを行い、等量の blank- mHBSS (pH 7.4) を basolateral 側に添加すると共に、TEER を経時的に測定した。各 Sample 中の CF ならびに insulin 濃度を測定し、各薬物の  $P_{app}$  を前章の実験方法に準じ算出した。

## 5. Western blot 法

Wistar 系雄性ラットを control、treatment、pre-treatment 群の 3 群に分け、小腸に *in situ* closed loop を施した。Treatment 群では Capryol 90 (10%, v/v) を loop 内に投与し、4 時間後に安楽死させた。Pre-treatment 群では 薬液投与から 4 時間後に腸管 loop 内を PBS を用いて洗浄し、洗浄からさらに 4 時間後にラットを安楽死させた。また、1% (w/v) HCO-60 を含む PBS を投与したラットを control とした。ラット小腸における TJ 関連タンパク質 (claudin-4、ZO-1、occludin) 量は前章の実験方法に準じ測定した。

## 6. 免疫染色法

21 日間培養した Caco-2 細胞を mHBSS で 1 時間 37 °C でインキュベートを行った後、Capryol 90 (0.25% v/v) を含む mHBSS (pH 6.5) を添加した。2 時間インキュベートした後、mHBSS で洗浄し、前章の実験方法に準じ TJ 関連タンパク質 (claudin-4、ZO-1、occludin) の局在性を観察した。

## 7. カルシウム結合性の評価

TJ を制御する因子はいくつか報告されているが、その中でも重要なものの一つとして細胞近傍  $Ca^{2+}$  が挙げられる。そこで、 $Ca^{2+}$  に対する Labrasol<sup>®</sup> ならびにその関連製剤の親和性を評価した。50 mM HEPES buffer に、各種製剤 (5% v/v) ならびに HCO-60 (1% w/v) を添加し、NaOH を用いて溶液の pH を 6.5 に調製した。Calcium chloride 溶液を最終濃度が 5 mM となるよう添加し、室温でよく混合した後、非結合  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_{free}$ ) を  $Ca^{2+}$  電極 (Compact  $Ca^{2+}$  Meter B-751, Horiba, Kyoto) にて定量した。 $Ca^{2+}$  結合率 ( $[Ca^{2+}]_{bind}$ ) (%) は、次式に従って算出した。

$$[Ca^{2+}]_{bind}(\%) = 100 - \frac{[Ca^{2+}]_{free}}{[Ca^{2+}]_{total}} \times 100$$

ここで、 $[Ca^{2+}]_{total}$  は添加剤を含まない control における  $Ca^{2+}$  濃度を示す。

## 8. 統計学的処理

すべてのデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) にて表示した。有意差検定は、多重比較 (Tukey-Kramer test) により行った。

## 【結果】

### 1. Insulin の会合性に及ぼす Capryol 90 ならびに溶液中 pH の影響

Insulin の会合性に対する Capryol 90 の影響を CD スペクトルを用いて評価した。Fig. 24 のグラフより、pH 3.0 の溶液では 270 nm 付近の分子楕円率の負の最大値が、pH 7.0 と比較して抑制されることが明らかとなった。一方、Capryol 90 を添加した場合においては、insulin のみの場合と比較して、分子楕円率の値に顕著な変化が見られなかった。したがって、insulin の会合性は Capryol 90 によってはほとんど影響を受けない一方、低 pH 条件にすることでその会合性が抑制されることが示唆された。

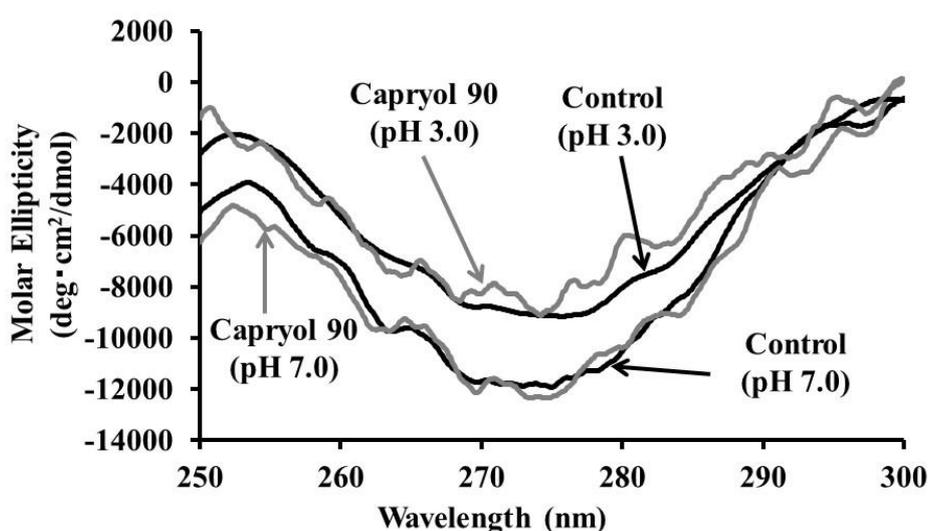
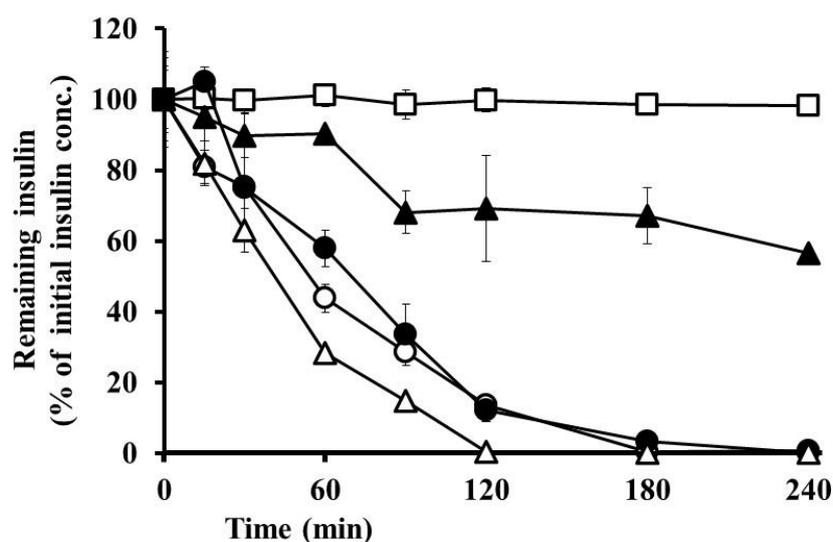


Fig. 24 Effects of Capryol 90 and pH on circular dichroic spectra of 0.02 mM insulin. (*Pharmaceutics*, 12, 462 (2020); Fig. 6)

### 2. Insulin の安定性に及ぼす Capryol 90 及び pH の影響

Insulin 溶液と小腸粘膜ホモジネートを混合し、経時的な insulin 残存量を測定することで、insulin の安定性に及ぼす Capryol 90 ならびに pH の影響を評価した。各条件の経時的な insulin 残存量変化について Fig. 25 に示す。

pH が 7.0 の溶液中では、Capryol 90 を添加した場合においても、Capryol 90 を添加していない群と同程度の速度で insulin が小腸ホモジネートにより分解された。対照的に、Capryol 90 を含む pH 3.0 の溶液中では 50% 以上の insulin が実験開始 120 分後も残存することが認められた。なお、insulin 分解の半減期は、Capryol 90 の非存在下と存在下それぞれにおいて、中性溶液では  $61.9 \pm 8.8$  ならびに  $64.8 \pm 11.0$  分であり、酸性溶液中では  $41.1 \pm 5.3$  ならびに  $150.2 \pm 19.1$  分であった。ここで、Capryol 90 を含まない pH 3.0 液中では insulin が顕著に分解されたことから、Capryol 90 自体が低 pH 条件において、insulin の安定性を向上させることが示唆された。

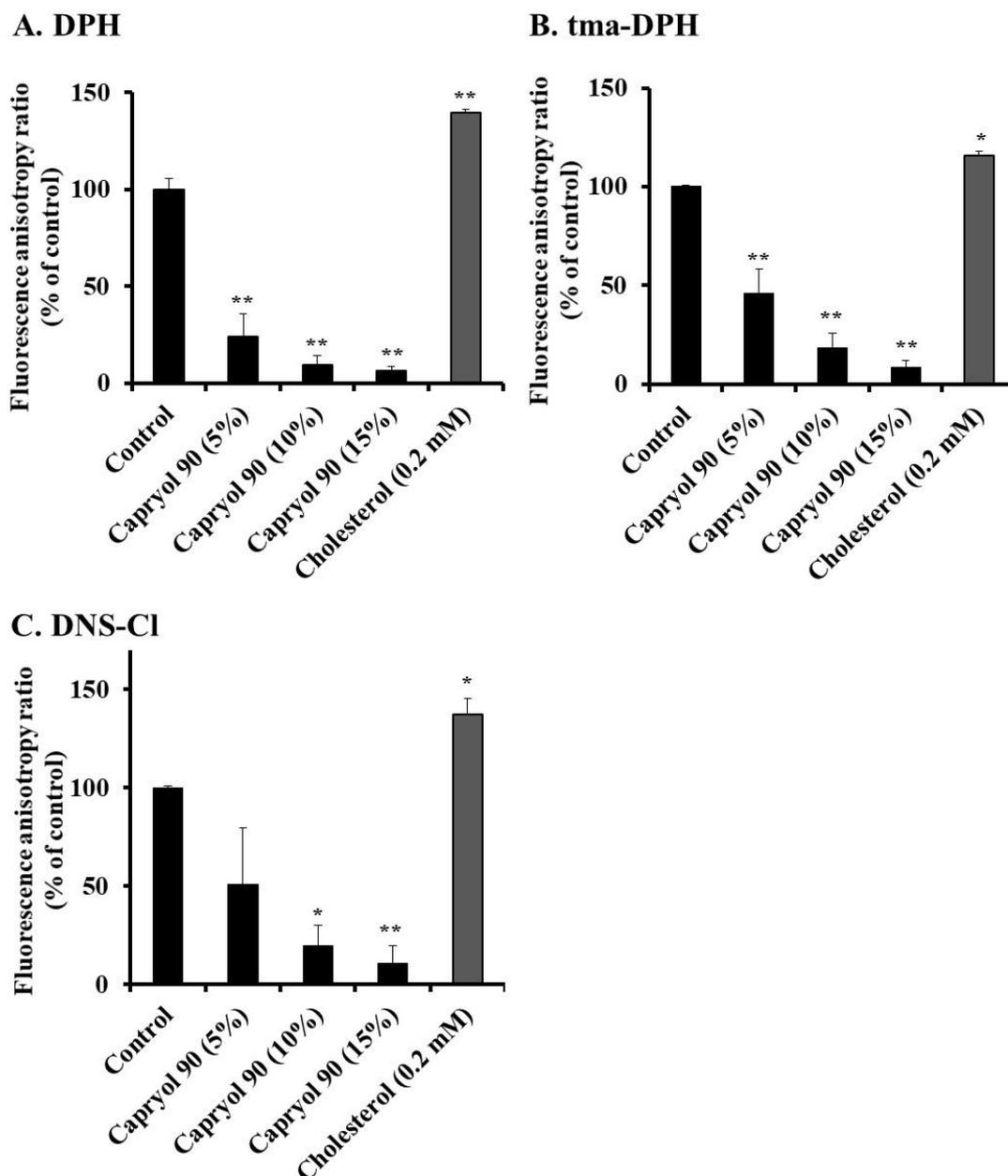


**Fig. 25** Effects of Capryol 90 and pH on the degradation of insulin in small intestine homogenates at 37 °C. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Keys: (□) Control (Insulin: 0.02 mM); (○) with PBS (pH 7.0); (●) with Capryol 90 (0.5%; pH 7.0); (△) with PBS (pH 3.0); (▲) with Capryol 90 (0.5%; pH 3.0). (*Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Fig. 7)

### 3. BBMVs の膜流動性に及ぼす Capryol 90 の影響

小腸上皮細胞の細胞膜流動性に及ぼす各濃度の Capryol 90 の影響を、蛍光偏光解消法を用いて評価し、その結果を Fig. 26 に示した。

Capryol 90 は脂質膜内部の蛍光プローブである DPH の蛍光異方性比を濃度依存的に低下させることが明らかとなった。また、脂質膜外部を標識する tma-DPH を蛍光プローブとして用いた場合においても、Capryol 90 による蛍光異方性比の有意な低下が観察された。DNS-Cl に関しては、適用濃度が 5% の場合のみ有意な変化が見られなかったものの、他のプローブと類似した蛍光異方性比の低下が認められた。これらの結果から、Capryol 90 は脂質膜内部、外部、及び膜タンパク質の流動性を増大させることで、細胞内経路を介した薬物の透過性を増大させることが示唆された。



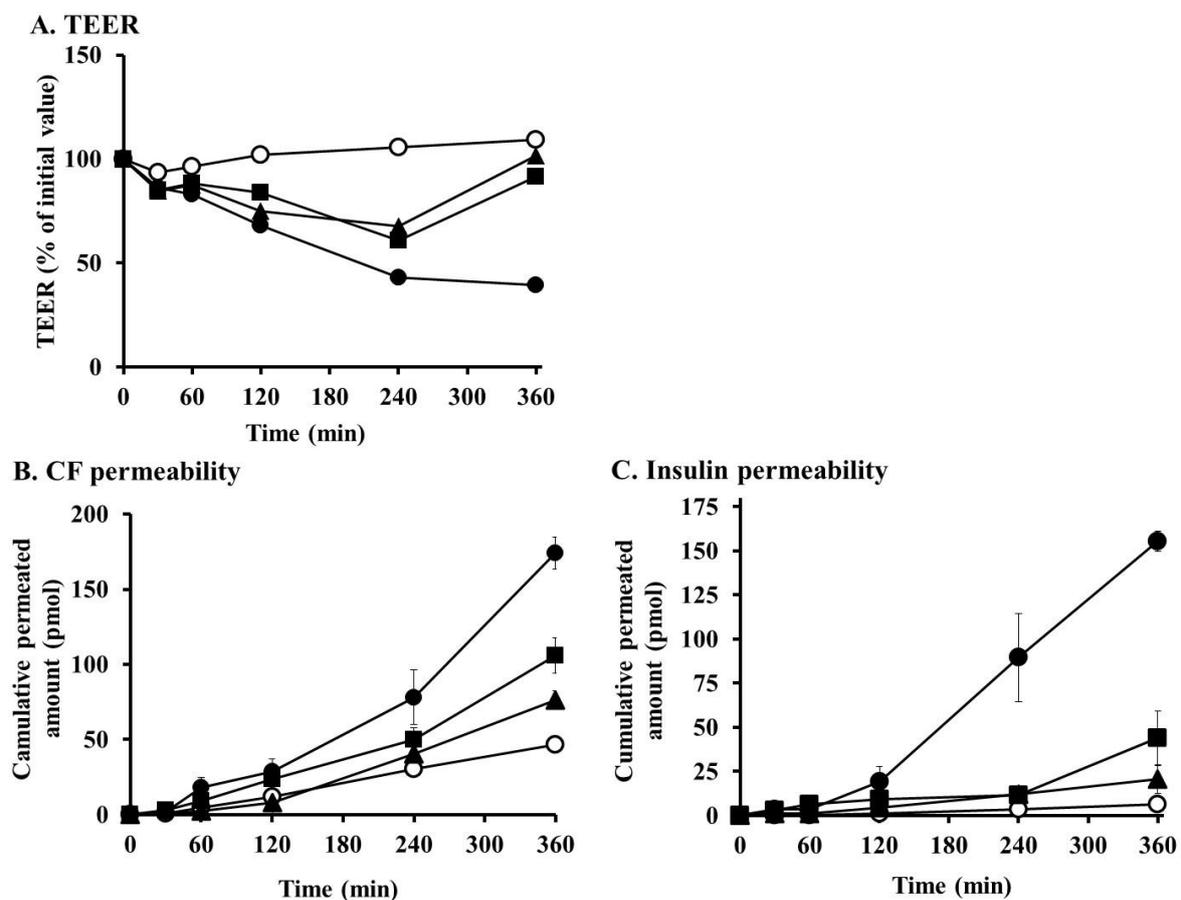
**Fig. 26** Effects of Capryol 90 on the fluorescence anisotropy of (A) DPH, (B) tma-DPH, and (C) DNS-Cl. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-4$ ). (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ , compared with the control. (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 4)

#### 4. CF ならびに insulin の Caco-2 細胞透過性に及ぼす Capryol 90 の影響

各濃度の Capryol 90 添加後の Caco-2 細胞単層膜の経時的な TEER 値ならびに薬物 (CF、insulin) の累積透過量を Fig. 27 に示す。

Fig. 27A の経時的な膜抵抗値のグラフから、すべての適用濃度において、Capryol 90 は Caco-2 細胞層の TEER を低下させた。0.05% と 0.1% の Capryol 90 添加後 240 分までは TEER が初期値の約 60% 程度まで低下し、その後回復傾向にあった。また、0.25% Capryol 90 に関しては、0.05%、0.1% の Capryol 90 添加時よりも TEER の低下幅が大きかったことか

ら、Capryol 90 は濃度依存的に Caco-2 細胞の TEER を低下させることが明らかとなった。さらに、Capryol 90 は CF の Caco-2 細胞単層に対する透過性を増大させ (Fig. 27B)、これに伴い CF の  $P_{app}$  値は  $2.15 \pm 0.27 \times 10^{-7}$  (cm/sec) から、0.05%、0.1%、0.25% Capryol 90 の併用によりそれぞれ  $4.25 \pm 0.8 \times 10^{-7}$  (cm/sec)、 $5.12 \pm 0.66 \times 10^{-7}$  (cm/sec)、 $9.00 \pm 0.41 \times 10^{-7}$  (cm/sec) へ増大した。また、Capryol 90 は低分子薬物だけでなく、ペプチド性医薬品である insulin の透過性も増大させ (Fig. 27C)、insulin の  $P_{app}$  値は  $0.24 \pm 0.1 \times 10^{-7}$  (cm/s) から、0.05%、0.1%、0.25% Capryol 90 併用によりそれぞれ  $0.68 \pm 0.3 \times 10^{-7}$  (cm/s)、 $1.45 \pm 0.6 \times 10^{-7}$  (cm/s)、 $5.67 \pm 0.6 \times 10^{-7}$  (cm/s) へと増大した。これらの結果から、Capryol 90 は消化管上皮細胞層の TJ を開口し、薬物の透過性を増大させる可能性が示唆された。



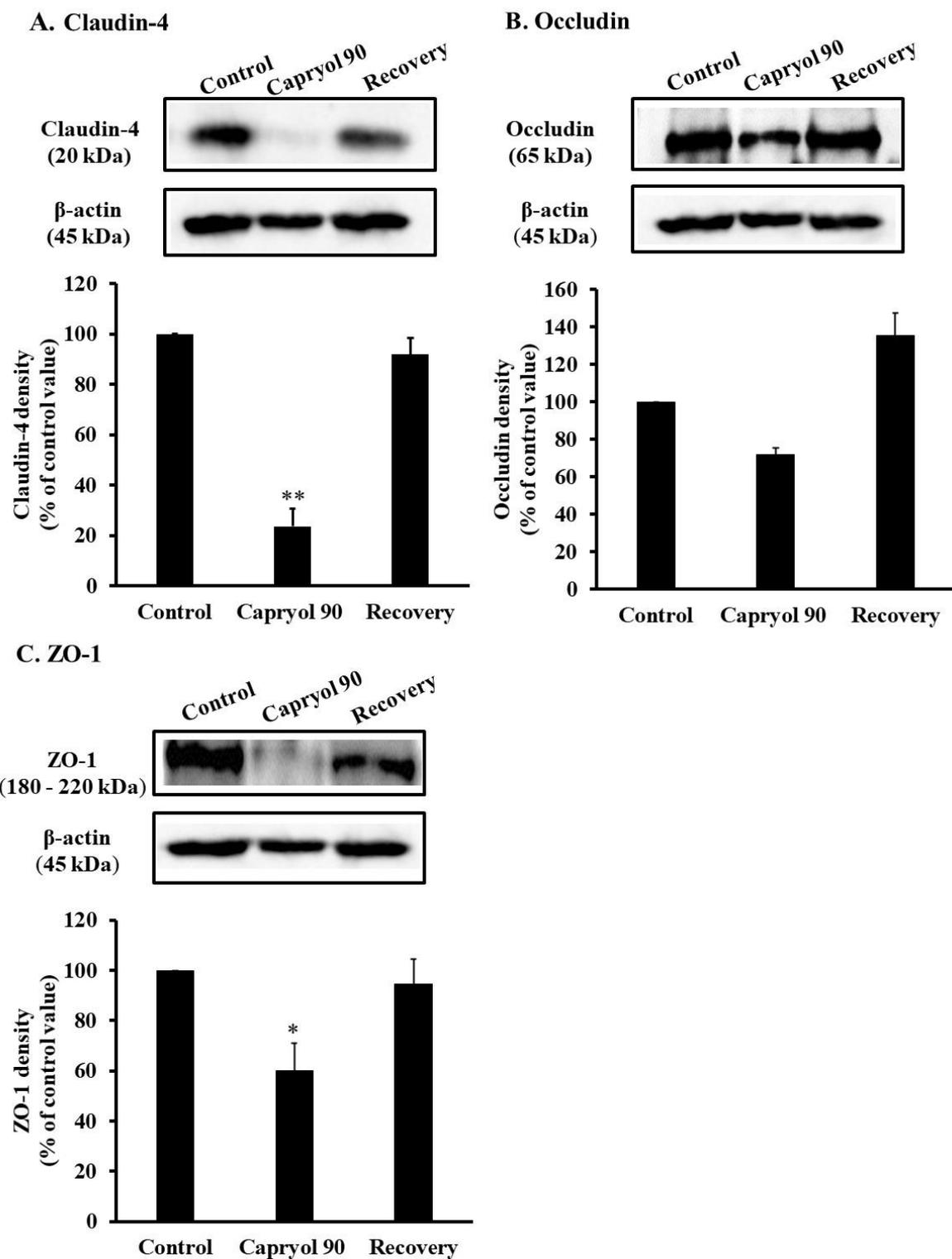
**Fig. 27** Effect of Capryol 90 with different concentrations on TEER and permeation of CF and insulin through Caco-2 cell monolayers. (A) TEER values (TEER % of initial value) with Capryol 90. (B) Cumulative permeated amount of CF in the presence of Capryol 90. (C) Cumulative permeated amount of insulin in the presence of Capryol 90. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-4$ ). Keys: (○) Control; (▲) Capryol 90 (0.05% v/v); (■) Capryol 90 (0.1% v/v); (●) Capryol 90 (0.25% v/v). (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 5, *Pharmaceutics*, **12**, 462 (2020); Fig. 8)

## 5. 各種 TJ 関連タンパク質に及ぼす Capryol 90 の影響

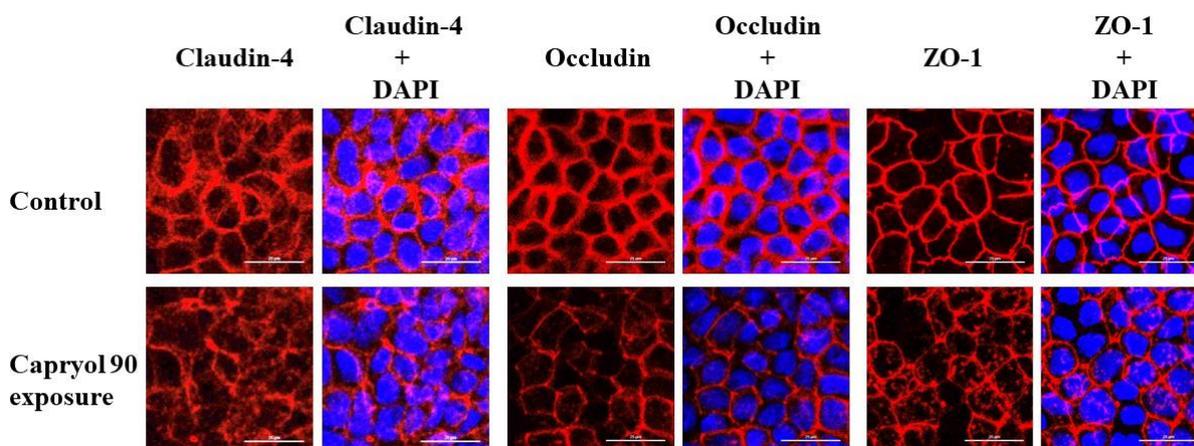
TJ タンパク質レベルの変化とその分布パターンはバリア機能と相関し<sup>95,96</sup>、TJ タンパク質が TJ の完全性に重要な役割を果たすことが知られている<sup>97</sup>。また、TJ 関連タンパク質の細胞間隙からの消失には、TJ 関連タンパク質の分解やエンドサイトーシスによる細胞内への内在化の寄与することが報告されている<sup>98</sup>。前項の検討において、Capryol 90 による TJ 開口作用が示唆されたため、TJ を構成するタンパク質に対する Capryol 90 の影響について検討した。Claudin-4、occludin、ならびに ZO-1 は代表的な TJ 関連タンパク質であり、TJ のバリア能を支配し腸内の細胞間経路を介した物質の輸送を調節することが知られている。

Fig. 28A のグラフより、claudin-4 レベルは Capryol 90 の投与により有意に減少し、化学発光から検出した値は control 群と比較して約 24% となった。さらに、Capryol 90 前処理においては、claudin-4 レベルが control と同程度にまで回復することが明らかとなった。また、occludin と ZO-1 についても同様の結果が観察された。Fig. 28B、C に示すように、Capryol 90 の存在下では、occludin の量は control の約 72% に減少し (not significant)、ZO-1 についても control 群の約 60% に低下することが認められた (\* $p < 0.05$ )。さらに、Capryol 90 の前処理実験の結果より、これらタンパク質の回復が観察されたことから、Capryol 90 は小腸において claudin-4、occludin、ならびに ZO-1 の量を低下させることにより、腸上皮の TJ を開口すること、また、その作用は可逆的であることが示唆された。

TJ 関連タンパク質の局在性に対する Capryol 90 の効果をさらに検討するために、免疫蛍光染色を使用し、Capryol 90 添加 120 分後における Caco-2 細胞上の TJ タンパク質を観察した。Fig. 29 に示すように、Capryol 90 非添加細胞では、claudin-4、occludin、ならびに ZO-1 は、原形質膜に沿って連続して局在していた。対照的に、Capryol 90 存在下では、二細胞接点における claudin-4、occludin、ならびに ZO-1 由来の蛍光が減弱またはまばらであり、膜における局在性が低下していることが観察された。これらの結果より、Capryol 90 は、細胞膜における TJ 関連タンパク質の局在に対して影響を及ぼすことが示唆された。



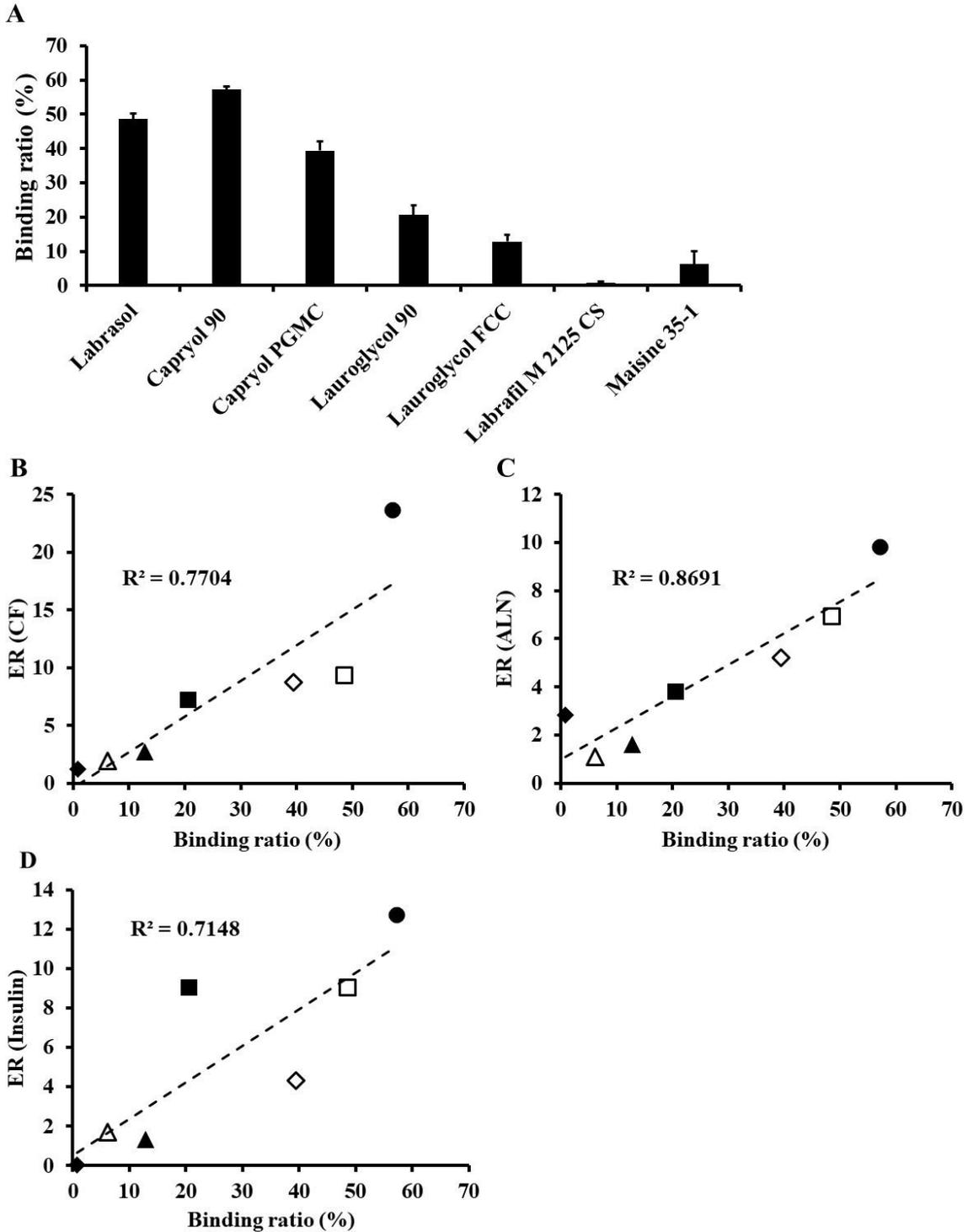
**Fig. 28** Western blot images of tight junction-associated proteins. The expression levels of (A) claudin-4, (B) occludin, and (C) ZO-1 in rat small intestines were quantitatively evaluated following treatment with Capryol 90 (10% v/v) for 4 h. After pretreatment with Capryol 90 (10% v/v) for 4 h, proteins were extracted. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n = 3-4). (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ , compared to the control. (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 6)



**Fig. 29** Effects of Capryol 90 on the localization of tight junction-associated proteins, using an immunofluorescence staining method. Localization of tight junction constituent proteins in Caco-2 cells were visualized using confocal laser scanning microscopy following incubation with Capryol 90 (0.25% v/v) for 120 min. (scale bars: 25  $\mu$ m) (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 7)

#### 6. 各製剤の $\text{Ca}^{2+}$ イオンに対する親和性と吸収促進効果との関連

$\text{Ca}^{2+}$  イオンは、TJ の開口を制御する重要な因子の一つであることが知られている。そのため、腸上皮細胞の TJ 付近において、吸収促進剤が  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを捕捉することで、TJ の機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで Fig. 30 では、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤の親和性を評価した。なお各製剤の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する結合は、非結合  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定することで算出した。Fig. 30A より、Labrasol<sup>®</sup>、Capryol 90、及び Capryol PGMC は、 $\text{Ca}^{2+}$  に対して高い親和性を示し、Lauroglycol 90 及び Lauroglycol FCC はわずかであるものの、溶液中で  $\text{Ca}^{2+}$  に結合することが認められた。一方、Labrafil M2125 CS と Maisine 35-1 に関しては  $\text{Ca}^{2+}$  にほとんど結合しなかったことから、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性について、各製剤間に差異が存在することが明らかとなった。また、Fig. 30B-D のグラフから、CF、ALN 及び insulin に対する吸収促進効果の大きさ (ER) と各製剤の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性との間に強い正の相関が認められた。



**Fig. 30** Binding of Labrasol<sup>®</sup> and its related formulations to Ca<sup>2+</sup> ions. The affinity of Labrasol<sup>®</sup> and its related formulations to Ca<sup>2+</sup> was determined by measuring the unbound Ca<sup>2+</sup> concentrations in the solution. (A) Binding ratio of each formulations to Ca<sup>2+</sup>. Correlation between binding ratio and ER of (B) CF, (C) ALN and (D) insulin. The results are expressed as mean ± S.E. of three samples. Binding ratio (%) = 100 - ([unbound Ca<sup>2+</sup> concentration of each sample] / [total Ca<sup>2+</sup> concentration]) × 100. Keys: (□) Labrasol<sup>®</sup>; (●) Capryol 90; (◇) Capryol PGMC; (■) Lauroglycol 90; (▲) Lauroglycol FCC; (◆) Labrafil M 2125 CS; (△) Maisine 35-1. (*Pharm. Res.*, **37**, 248 (2020); Fig. 8)

## 【考察】

難吸収性薬物の消化管吸収に対する Capryol 90 の吸収促進機構について系統的な検討を行った。まず、insulin の会合性に対する Capryol 90 ならびに pH の影響を、insulin の高次構造を反映すると言われる CD スペクトルを測定することで評価した。ここで、insulin が会合することで形成される antiparallel beta structure は、光学活性を示すことが知られている。270 nm 付近における負の CD スペクトルの吸収は、insulin の antiparallel beta structure の中でも B23-28 領域の phenylalanine 及び tyrosine 残基を表す。したがって、insulin の複合体が解離することで、270 nm の負の最大値は減衰し、これが insulin 会合性の指標になると考えられている<sup>99,100</sup>。本節における検討の結果、Capryol 90 の添加による、270 nm 付近の insulin 分子橢円率の変動は軽微であること、対照的に、溶液の pH を 7.0 から 3.0 に下げると insulin の負の分子橢円率が顕著に減衰することが示された。したがって、Capryol 90 自体は insulin の会合性にほとんど影響を与えないのに対し、insulin の会合は酸性条件下で顕著に抑制されることが認められた。Insulin の会合性は酸性条件において低下すること<sup>53</sup>、また、insulin 高次構造の酸安定化には、B 鎖 5 位における histidine (HB5) のプロトン化が関与することが知られている<sup>55</sup>。本研究で得られた結果は、これらの報告と一致するものの、Capryol 90 の吸収促進機構を直接説明できるものではないと考えられる。そこで、insulin の安定性に対する Capryol 90 ならびに pH の影響について評価した。

Insulin の安定性試験の結果、Capryol 90 は中性 pH 溶液中においては、小腸ホモジネートによる insulin の分解をほとんど抑制しないことが明らかになった。対照的に、低 pH 溶液 (pH 3.0) では、Capryol 90 は insulin の安定性を顕著に改善することが認められた。Capryol 90 を含まない酸性条件下においては insulin の安定性が全く向上しなかったことから、低 pH 溶液においてのみ、Capryol 90 自体が insulin 保護作用を発揮する、もしくは、消化酵素を不活性化すると考えられる。ここで上述の会合性評価から、insulin は低 pH 条件下で解離するため、酸性条件下においては insulin の見かけの分子量が低下することで、消化酵素による攻撃を受けやすくなると考えられる。したがってこの現象は、insulin の安定性に対して不利に作用すると当初予測していたが、逆に安定性が向上するという結果が得られた。その要因として、insulin の性質の変化が関与する可能性を考察している。すなわち、上述のように B23-28 領域の phenylalanine 及び tyrosine 残基は insulin の会合によって antiparallel beta structure を形成する。そのため、insulin の凝集が解離することで、これら芳香族アミノ酸残基が露出すると考えられる。これにより insulin の脂質への親和性が向上し、Capryol 90 から構成される粒子内に insulin が取り込まれる可能性が高くなる。したがって Capryol 90 は insulin を保護し、低 pH 条件においてのみ insulin の安定性が向上したと考察している。ここで、近年活発に開発されているナノシステム等の drug delivery system (DDS) 技術を考慮すると<sup>24</sup>、本研究で示された結果は、より簡便な薬物吸収促進技術の提供に貢献できる可能性がある。ナノキャリア、リポソーム等の技術を利用することは非常に有益であるものの、これら技術には複雑な製造工程が必要とされる<sup>101-104</sup>。一方、本研究で見出した Capryol 90 は、製剤に混合するだけで insulin の安定性と消化管吸収性を改善することが示唆された。した

がって、Capryol 90 はその利便性ならびに低コストという面において優れていると考えられる。しかしながら、insulin の会合性、安定性、消化管吸収に及ぼす Capryol 90 ならびに pH の影響については未だ不明な点も多く、さらに検討を進める必要がある。一方、前節において、Capryol 90 は中性溶液中においても顕著な吸収促進効果を示すことを明らかにした。したがって、Capryol 90 がその吸収促進効果を発現するためには、insulin の安定性に対する作用は必須条件とはならないと考えられる。

さらに本章においても前章と同様に、薬物の透過過程に対する Capryol 90 の影響について評価した。まず、蛍光偏光解消法を用いて、脂質膜の流動性に及ぼす Capryol 90 の影響を評価した。DPH、tma-DPH、及び DNS-Cl いずれの蛍光プローブを用いた場合においても、Capryol 90 が濃度依存的に流動性を増大させることが認められた。これまでに報告されている吸収促進剤の中には、腸上皮細胞の脂質二重層の流動性を制御し、薬物の吸収を促進するものが存在する<sup>105,106</sup>。また、cyclodextrins、Cremophor EL、Tween 20、さらに Labrasol® 等の製剤添加物が脂質膜の流動性を増大させることも明らかとなっている<sup>107,108</sup>。これら脂質二重層の流動性を制御する化合物の物理化学的な特性は未だ提唱されていないが、その共通点の一つとして両親媒性の特性が挙げられ、これは本研究で用いた Capryol 90 にも共通する。いずれにせよ、Capryol 90 は脂質二重層の内部、外部、膜タンパク質の流動性を増大させたことから、その吸収促進機構には transcellular route を介した薬物の透過性向上作用が寄与することが示唆された。

次に、Capryol 90 が paracellular route を介した薬物の消化管吸収を増加させるか否かを検討した。Claudin-4 は小腸において発現量が多く、小腸における TJ 制御因子として重要であることが知られていることから<sup>109,110</sup>、本節においても claudin-4 に焦点を当てた。その結果、Capryol 90 投与後のラット小腸内 claudin-4 の量は、control 群と比較して有意に減少することが認められた。さらに、別の膜貫通タンパク質ファミリーである occludin は、TJ 関連の膜貫通タンパク質として最初に発見されたタンパクであり、水溶性薬物の透過の制御において重要な役割を果たすことが知られている<sup>111,112</sup>。また、隣接細胞間で claudin 因子が接着する一方で、同一細胞内において線状に重合することでストランド上の構造体 (TJ ストランド) を形成し、TJ のバリア機能に重要な役割を担っている。そして、claudin のような膜貫通型タンパク質と TJ の膜直下に集積する膜裏打ちタンパク質が相互作用することで TJ の形成や制御が行われる。膜裏打ちタンパク質として ZO タンパク質等が知られており、TJ の形成制御に関わる。ZO-1 や ZO-2 などの膜裏打ちタンパク質は、occludin、actin、claudin などの他のタンパク質と相互作用すること、AJ 形成と TJ 形成をリンクすることが知られており、TJ の構成と安定化に重要であることから<sup>113,114</sup>、本章では claudin-4 に加えて、occludin、ZO-1 タンパク質のラット小腸における量についても評価した。その結果、occludin 及び ZO-1 いずれのレベルも Capryol 90 投与により control 群と比較して低下することが明らかになった。しかしながら、Capryol 90 による occludin 及び ZO-1 の低下割合は、claudin-4 低下の割合よりも少なかった。したがって、Capryol 90 は TJ 構成タンパク質を低下させること、その中でも特に claudin-4 タンパク質に影響することが示唆された。また、Capryol 90 除去後にこれら TJ 関連タンパク質が回復したことから、Capryol 90 の作用が可逆的で TJ が再構成され

た可能性を示唆している。なお、*in vitro* Caco-2 細胞における TJ タンパク質の分布からも、Capryol 90 により claudin-4、occludin 及び ZO-1 の局在が影響を受けることが認められた。

医薬品添加剤が TJ を開口する機構については、いくつかの報告が存在する。Hsu らは、カチオン性ポリマーである chitosan がインテグリンのクラスター化に伴う focal adhesion kinase (FAK) 及び Src tyrosine kinase のリン酸化を誘発することで、TJ を介した透過性を促進することを報告している<sup>115</sup>。また、Tomita らは EDTA がそのキレート作用により細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を枯渇させることで protein kinase C (PKC) を活性化し、paracellular route を介した薬物透過性を増大させることを明らかにした<sup>94</sup>。また、C10 は細胞膜と相互作用することによって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルを増加させ、 $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 依存性 actin microfilament を収縮させることで TJ を開口する<sup>94,116</sup>。これらの報告と同様に、Capryol 90 も  $\text{Ca}^{2+}$  に対して作用することで TJ の形成を制御している可能性がある。本節では、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性が高いほど、各製剤の吸収促進効果が大きくなることが示された。ここで、前節で示した通り、CF を用いた場合における Labrasol<sup>®</sup> 及びその関連製剤併用による吸収促進効果の大きさ (ER 値) は、分子量が同程度の ALN を用いた場合よりも大きかった。これは、ALN による  $\text{Ca}^{2+}$  キレートの形成が関与していると考察している。ALN 等の BP は、骨の主要な構成成分であるヒドロキシアパタイトに対して強い親和性を示す<sup>117,118</sup>。Capryol 90 は消化管上皮細胞近傍の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを捕捉し TJ を緩めることで、CF の消化管吸収性を増大させたと考えられるが、ALN の存在下においては Capryol 90 の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンへの結合が競合的に阻害された可能性がある。したがって、ALN 存在下においては Capryol 90 の吸収促進効果が低下したと考察している。しかしながら、TJ 開口機構に代表される Capryol 90 の吸収促進機構には未だ不明な点が多いのも事実である。例えば、各製剤の脂質への親和性と吸収促進効果の相関、TJ を開口する細胞内シグナル伝達因子、他の難吸収性薬物を用いた評価等はさらに検討すべき課題である。Capryol 90 による薬物の消化管吸収性改善に関する機構を解明するためには、さらなる検討が必要であると考えられる。

## 結論

本研究では、カプリン酸類似化合物である脂肪酸と脂肪酸エステルならびに、新たな製剤群として Labrasol® とその関連製剤に着目し、難吸収性モデル薬物の消化管吸収性に及ぼすこれら添加剤の影響と吸収促進機構について検討した。

### 第 1 章 Insulin の消化管吸収性に及ぼすカプリン酸類似化合物の影響ならびに吸収促進機構に関する検討

C10 とその類似化合物を用いて、insulin の消化管吸収の改善を試みた。小腸における各種脂肪酸及び脂肪酸エステルの吸収促進効果は弱い、大腸における insulin の吸収性は、Sefsol-218 及び C10 により顕著に改善された。また、1% Sefsol-218 併用時の LDH 活性値は control 群に比べ有意な差は認められなかったのに対し、同濃度の C10 は LDH 活性値を有意に増大させた。したがって、新規吸収促進剤である Sefsol-218 は、既に実用化されている C10 と比較した場合、安全性の面において優れていることが示唆された。

また、Sefsol-218 は insulin の会合性にはほとんど影響を与えない一方、C10 は会合性を低下させることが明らかになった。また、Sefsol-218 ならびに C10 の吸収促進機構には insulin の安定性に対する改善作用は関与しないことが示唆された。次に、消化管粘膜のバリア機能に対する影響を評価した。Sefsol-218 の吸収促進機構における transcellular route の寄与を評価するため、蛍光偏光解消法を用いて膜の流動性を測定したところ、Sefsol-218 は主に脂質内部層の膜流動性を増大させることが認められた。したがって、Sefsol-218 の吸収促進機構には一部 transcellular route を介した薬物の透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。一方、C10 及び Sefsol-218 は Caco-2 細胞の TEER 値を低下させると共に、大腸における claudin-4 レベルを低下させた。したがって、Sefsol-218 は TJ 開口作用により paracellular route を介した薬物の吸収ならびに透過性も増大させることが示唆された。

### 第 2 章 Labrasol® 及びその関連製剤による難吸収性薬物の消化管吸収性改善ならびに吸収促進機構の解析

新たな製剤群として、Labrasol® とその関連製剤 6 種類を選択し、難吸収性モデル薬物 (CF、ALN、insulin) の消化管吸収性に及ぼす影響を評価した。薬物の消化管からの吸収性は、Labrasol® 及びその関連製剤の併用により改善し、特に Capryol 90 が最も高い吸収促進作用を示した。一方、各種 Labrasol® 関連製剤併用群の LDH 活性及びタンパク質漏出量は control 群と比較して有意な差がみられなかったことから、これら製剤は比較的安全性が高いことが示された。これら小腸吸収性と粘膜障害性の評価より、Capryol 90 が最も有効かつ安全性の高い促進剤であると結論づけ、その吸収促進作用の特性について検討した。その結果、Capryol 90 の吸収促進効果は薬物の分子量に依存する傾向があり、Capryol 90 の吸収促進効果には消化管部位差がないことが示された。さらに、Capryol 90 の insulin に対する吸収促進効果は可逆的であること、また、酸性条件下において効果が増大する特性があることが明らかとなった。

安定性試験ならびに会合性評価から、低 pH 条件では insulin の会合性が抑制されること、Capryol 90 は酸性条件下においてのみ insulin の安定性を増大させることが認められ、先述の Capryol 90 の吸収促進効果が酸性条件下において高いという特性には、これら因子の関与が考えられた。さらに Capryol 90 は脂質膜内部、外部、及び膜タンパク質の流動性を増大させること、ラット小腸粘膜細胞の TJ 関連タンパク質 (claudin-4、occludin、ZO-1) の量を減少させることが示された。すなわち、Capryol 90 の吸収促進機構には transcellular route 及び paracellular route の両経路を介した薬物透過性増大作用が関与することが示唆された。また、各製剤の効果の大きさと  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性に正の相関がみられたことから、これら製剤は細胞近傍  $\text{Ca}^{2+}$  に作用することで TJ を開口する可能性が考えられた。

本研究では、Sefsol-218 ならびに Capryol 90 が難吸収性薬物の消化管吸収性を改善する新たな吸収促進剤となり得ることを示した。本知見は、経口投与製剤等の処方を設計する上で、有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

## 謝辞

本研究の実施にあたり終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、京都薬科大学薬剤学分野 山本 昌教授に新甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、種々の貴重な御指導、御助言を賜りました、神戸薬科大学製剤学研究室 坂根 稔康教授、京都薬科大学薬剤学分野 勝見 英正准教授、森下 将輝助教、東京理科大学生物薬剤学研究室 草森 浩助教に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、多大なる御協力、御助言を頂きました、今西 絢子学士、岩佐 一毅学士、金田 彩花学士、川越 有里小学士、佐藤 絵梨佳学士、出口 貴雅学士、木村 絵梨歌氏、小山 未来氏をはじめとする京都薬科大学薬剤学分野の諸氏に心より感謝致します。

最後に、研究に専心できる環境と時間を与えてくださり、研究生活を始終温かく見守ってくださった両親をはじめとする家族に心から感謝致します。

## 引用文献

1. Sastry S. V., Nyshadham J. R., Fix J. A. Recent technological advances in oral drug delivery - A review. *Pharm. Sci. Technol. Today* **3**, 138–145 (2000).
2. Drucker D. J. Advances in oral peptide therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 277–289 (2020).
3. 薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について（令和2年12月11日適用） | 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/topics/2020/04/tp20200401-01.html>.
4. Schneeberger E. E., Lynch R. D. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* **262**, L647–L661 (1992).
5. Gumbiner B. M. Breaking through the tight junction barrier. *J. Cell Biol.* **123**, 1631–1633 (1993).
6. Goodenough D. A. Plugging the leaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 319–321 (1999).
7. Deng H., Lei Q., Wu Y., He Y., Li W. Activity-based protein profiling: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **191**, 112151 (2020).
8. Shou W. Z. Current status and future directions of high-throughput ADME screening in drug discovery. *J. Pharm. Anal.* **10**, 201–208 (2020).
9. Kaur G., Arora M., Ravi Kumar M. N. V. Oral drug delivery technologies—a decade of developments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **370**, 529–543 (2019).
10. Sachdeva S., Lobo S., Goswami T. What is the future of noninvasive routes for protein- and peptide-based drugs? *Ther. Deliv.* **7**, 355–357 (2016).
11. Wu C. Y., Benet L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* **22**, 11–23 (2005).
12. Uchiyama T., Sugiyama T., Quan Y.-S., Kotani A., Okada N., Fujita T., Muranishi S., Yamamoto A. Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: Their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-Lauryl- $\beta$ -D-maltopyranoside. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 1241–1250 (1999).
13. Fetih G., Habib F., Okada N., Fujita T., Attia M., Yamamoto A. Nitric oxide donors can enhance the intestinal transport and absorption of insulin and [Asu<sup>1-7</sup>]-eel calcitonin in rats. *J. Control. Release* **106**, 287–297 (2005).
14. Gao Y., He L., Katsumi H., Sakane T., Fujita T., Yamamoto A. Improvement of intestinal absorption of water-soluble macromolecules by various polyamines: Intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of spermine. *Int. J. Pharm.* **354**, 126–134 (2008).
15. Lin Y., Fujimori T., Kawaguchi N., Tsujimoto Y., Nishimi M., Dong Z., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. Polyamidoamine dendrimers as novel potential absorption enhancers for improving the small intestinal absorption of poorly absorbable drugs in rats. *J. Control. Release* **149**, 21–28 (2011).
16. Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyuu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M., Muranishi S. Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats.

- Pharm. Res.* **11**, 1496–1500 (1994).
17. Uchiyama T., Kotani A., Kishida T., Tatsumi H., Okamoto A., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A. Effects of various protease inhibitors on the stability and permeability of [D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin in the rat intestine: Comparison with leucine enkephalin. *J. Pharm. Sci.* **87**, 448–452 (1998).
  18. Asada H., Douen T., Mizokoshi Y., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S. Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: Relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution. *Pharm. Res.* **11**, 1115–1120 (1994).
  19. Fujita T., Fujita T., Morikawa K., Tanaka H., Iemura O., Yamamoto A., Muranishi S. Improvement of intestinal absorption of human calcitonin by chemical modification with fatty acids: Synergistic effects of acylation and absorption enhancers. *Int. J. Pharm.* **134**, 47–57 (1996).
  20. Uchiyama T., Kotani A., Tatsumi H., Kishida T., Okamoto A., Okada N., Murakami M., Fujita T., Fujiwara Y., Kiso Y., Muranishi S., Yamamoto A. Development of novel lipophilic derivatives of DADLE (Leucine enkephalin analogue): Intestinal permeability characteristics of DADLE derivatives in rats. *Pharm. Res.* **17**, 1461–1467 (2000).
  21. Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A., Muranishi S. Chitosan capsule for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. *J. Pharm. Sci.* **86**, 1016–1021 (1997).
  22. Abramson A., Caffarel-Salvador E., Khang M., Dellal D., Silverstein D., Gao Y., Frederiksen M. R., Vegge A., Hubálek F., Water J. J., Friderichsen A. V., Fels J., Kirk R. K., Cleveland C., Collins J., Tamang S., Hayward A., Landh T., Buckley S. T., Roxhed N., Rahbek U., Langer R., Traverso G. An ingestible self-orienting system for oral delivery of macromolecules. *Science* **363**, 611–615 (2019).
  23. Gradauer K., Barthelmes J., Vonach C., Almer G., Mangge H., Teubl B., Roblegg E., Dünnhaupt S., Fröhlich E., Bernkop-Schnürch A., Prassl R. Liposomes coated with thiolated chitosan enhance oral peptide delivery to rats. *J. Control. Release* **172**, 872–878 (2013).
  24. Cao S. jun, Xu S., Wang H. ming, Ling Y., Dong J., Xia R. dong, Sun X. hong. Nanoparticles: Oral delivery for protein and peptide drugs. *AAPS PharmSciTech* **20**, 190 (2019).
  25. Aguirre T. A. S., Teijeiro-Osorio D., Rosa M., Coulter I. S., Alonso M. J., Brayden D. J. Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 223–241 (2016).
  26. Maher S., Casettari L., Illum L. Transmucosal absorption enhancers in the drug delivery field. *Pharmaceutics* **11**, 339 (2019).
  27. Cassidy M. M., Tidball C. S. Cellular mechanism of intestinal permeability alterations produced by chelation depletion. *J. Cell Biol.* **32**, 685–698 (1967).
  28. Gordon G. S., Moses A. C., Silver R. D., Flier J. S., Carey M. C. Nasal absorption of insulin: Enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7419–7423 (1985).
  29. Siegel I. A., Gordon H. P. Effects of surfactants on the permeability of canine oral mucosa in vitro. *Toxicol. Lett.* **26**, 153–158 (1985).

30. Ishizawa T., Hayashi M., Awazu S. Enhancement of jejunal and colonic absorption of fosfomycin by promoters in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **39**, 892–895 (1987).
31. Lindmark T., Söderholm J. D., Olaison G., Alván G., Ocklind G., Artursson P. Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate. *Pharm. Res.* **14**, 930–935 (1997).
32. Maher S., Mrsny R. J., Brayden D. J. Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 277–319 (2016).
33. Patil S., Vhora I., Amrutiya J., Lalani R., Misra A. Role of nanotechnology in delivery of protein and peptide drugs. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 4155–4173 (2015).
34. Agarwal P., Rupenthal I. D. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs. *Drug Discov. Today* **18**, 337–349 (2013).
35. Rekha M. R., Sharma C. P. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes-Future perspectives. *Int. J. Pharm.* **440**, 48–62 (2013).
36. Hamid K. A., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. The effects of common solubilizing agents on the intestinal membrane barrier functions and membrane toxicity in rats. *Int. J. Pharm.* **379**, 100–108 (2009).
37. Kishimoto H., Miyazaki K., Takizawa Y., Shirasaka Y., Inoue K. Absorption-enhancing effect of nitric oxide on the absorption of hydrophobic drugs in rat duodenum. *J. Pharm. Sci.* **105**, 729–733 (2016).
38. Aoki Y., Morishita M., Asai K., Akikusa B., Hosoda S., Takayama K. Region-dependent role of the mucous/glycocalyx layers in insulin permeation across rat small intestinal membrane. *Pharm. Res.* **22**, 1854–1862 (2005).
39. Dunn M. F. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - A review. *BioMetals* **18**, 295–303 (2005).
40. Turner J. R., Buschmann M. M., Romero-Calvo I., Sailer A., Shen L. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Sem. Cell Dev. Biol.* **36**, 204–212 (2014).
41. Doi N., Tomita M., Hayashi M. Absorption enhancement effect of acylcarnitines through changes in tight junction protein in Caco-2 cell Monolayers. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **26**, 162–170 (2011).
42. Bhor V. M., Sivakami S. Regional variations in intestinal brush border membrane fluidity and function during diabetes and the role of oxidative stress and non-enzymatic glycation. *Mol. Cell. Biochem.* **252**, 125–132 (2003).
43. Ganapathy V., Mendicino J. F., Leibach F. H. Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. *J. Biol. Chem.* **256**, 118–124 (1981).
44. Prabhu R., Balasubramanian K. A. A novel method of preparation of small intestinal brush border membrane vesicles by polyethylene glycol precipitation. *Anal. Biochem.* **289**, 157–161 (2001).
45. Stiger B., Murer H. Heterogeneity of brush-border-membrane vesicles from rat small intestine

- prepared by a precipitation method using Mg/EGTA. *Eur. J. Biochem.* **135**, 95–101 (1983).
46. Vázquez C. M., Zanetti R., Ruiz-Gutierrez V. Lipid composition and fluidity in the jejunal brush-border membrane of spontaneously hypertensive rats. Effects on activities of membrane-bound proteins. *Biosci. Rep.* **16**, 217–226 (1996).
  47. Seth A., Sheth P., Elias B. C., Rao R. Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *J. Biol. Chem.* **282**, 11487–11498 (2007).
  48. De Laat S., Van Der Saag P. T., Shinitzky M. Microviscosity modulation during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4458–4461 (1977).
  49. Batrakova E. V., Li S., Alakhov V. Y., Miller D. W., Kabanov A. V. Optimal structure requirements for Pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 845–854 (2003).
  50. Giordano P. A., Wyroba E., Bottiroli G. Internalization of cycloheptaamylose-dansyl chloride complex during labelling of surface membrane in living *Paramecium aurelia* cells. *Basic Appl. Histochem.* **29**, 121–133 (1985).
  51. Morishita M., Morishita I., Takayama K., Machida Y., Nagai T. Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. *Int. J. Pharm.* **78**, 1–7 (1992).
  52. Morishita I., Morishita M., Takayama K., Machida Y., Nagai T. Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. *Int. J. Pharm.* **78**, 9–16 (1992).
  53. Kadima W., Øgendal L., Bauer R., Kaarsholm N., Brodersen K., Hansen J. F., Porting P. The influence of ionic strength and pH on the aggregation properties of zinc-free insulin studied by static and dynamic laser light scattering. *Biopolymers* **33**, 1643–1657 (1993).
  54. Hua Q., Weiss M. A. Toward the solution structure of human insulin: Sequential 2D proton NMR assignment of a des-pentapeptide analogue and comparison with crystal structure. *Biochemistry* **29**, 10545–10555 (1990).
  55. Bryant C., Spencer D. B., Miller A., Bakaysa D. L., McCune K. S., Maple S. R., Pekar A. H., Brems D. N. Acid stabilization of insulin. *Biochemistry* **32**, 8075–8082 (1993).
  56. Nielsen L., Khurana R., Coats A., Frokjaer S., Brange J., Vyas S., Uversky V. N., Fink A. L. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* **40**, 6036–6046 (2001).
  57. Nielsen L., Frokjaer S., Brange J., Uversky V. N., Fink A. L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry* **40**, 8397–8409 (2001).
  58. Kajii H., Horie T., Hayashi M., Awazu S. Fluorescence study of the membrane-perturbing action of sodium caprylate as related to promotion of drug absorption. *J. Pharm. Sci.* **77**, 390–392 (1988).
  59. Yoon B. K., Jackman J. A., Kim M. C., Sut T. N., Cho N. J. Correlating membrane morphological

- responses with micellar aggregation behavior of capric acid and monocaprin. *Langmuir* **33**, 2750–2759 (2017).
60. Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H., Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **10**, 195–204 (2000).
  61. Chao A. C., Nguyen J. V., Broughall M., Griffin A., Fix J. A., Daddona P. E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of effects of sodium caprate on enteral peptide absorption and on mucosal morphology. *Int. J. Pharm.* **191**, 15–24 (1999).
  62. Aungst B. J. Intestinal permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.* **89** 429–442 (2000).
  63. Morita K., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 511–516 (1999).
  64. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* **141**, 1539–1550 (1998).
  65. Markov A. G., Veshnyakova A., Fromm M., Amasheh M., Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **180**, 591–598 (2010).
  66. Rahner C., Mitic L. L., Anderson J. M. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* **120**, 411–422 (2001).
  67. Del Vecchio G., Tscheik C., Tenz K., Helms H. C., Winkler L., Blasig R., Blasig I. E. Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Mol. Pharm.* **9**, 2523–2533 (2012).
  68. Krug S. M., Amasheh M., Dittmann I., Christoffel I., Fromm M., Amasheh S. Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* **34**, 275–282 (2013).
  69. Kreilgaard M., Pedersen E. J., Jaroszewski J. W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J. Control. Release* **69**, 421–433 (2000).
  70. Fernandez S., Jannin V., Chevrier S., Chavant Y., Demarne F., Carrière F. *In vitro* digestion of the self-emulsifying lipid excipient Labrasol<sup>®</sup> by gastrointestinal lipases and influence of its colloidal structure on lipolysis rate. *Pharm. Res.* **30**, 3077–3087 (2013).
  71. Eaimtrakarn S., Rama Prasad Y. V., Ohno T., Konishi T., Yoshikawa Y., Shibata N., Takada K. Absorption enhancing effect of Labrasol on the intestinal absorption of insulin in rats. *J. Drug Target.* **10**, 255–260 (2002).
  72. Hu Z., Tawa R., Konishi T., Shibata N., Takada K. A novel emulsifier, Labrasol, enhances gastrointestinal absorption of gentamicin. *Life Sci.* **69**, 2899–2910 (2001).
  73. Prasad Y. V. R., Minamimoto T., Yoshikawa Y., Shibata N., Mori S., Matsuura A., Takada K. *In situ* intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using Labrasol as

- absorption enhancer. *Int. J. Pharm.* **271**, 225–232 (2004).
74. McCartney F., Jannin V., Chevrier S., Boulghobra H., Hristov D. R., Ritter N., Miolane C., Chavant Y., Demarne F., Brayden D. J. Labrasol® is an efficacious intestinal permeation enhancer across rat intestine: *Ex vivo* and *in vivo* rat studies. *J. Control. Release* **310**, 115–126 (2019).
  75. Hu Z., Prasad YV R., Tawa R., Konishi T., Ishida M., Shibata N., Takada K. Diethyl ether fraction of Labrasol having a stronger absorption enhancing effect on gentamicin than Labrasol itself. *Int. J. Pharm.* **234**, 223–235 (2002).
  76. Ohtsu Y., Gibbons J. A., Suzuki K., Fitzsimmons M. E., Nozawa K., Arai H. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of the androgen receptor inhibitor enzalutamide in rats and dogs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **42**, 611–626 (2017).
  77. Wong J. A., Renton K. W., Crocker J. F. S., O'Regan P. A., Acott P. D. Determination of pamidronate in human whole blood and urine by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* **18**, 98–101 (2004).
  78. Drake M. T., Clarke B. L., Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 1032–1045 (2008).
  79. Eiken P., Vestergaard P. Treatment of osteoporosis after alendronate or risedronate. *Osteoporos. Int.* **27**, 1–12 (2016).
  80. Liberman U. A., Weiss S. R., Bröll J., Minne H. W., Quan H., Bell N. H., Rodriguez-Portales J., Downs R. W., Dequeker J., Favus M., Seeman E., Recker R. R., Capizzi T., Santora A. C., Lombardi A., Shah R. V., Hirsch L. J., Karpf D. B. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1437–1444 (1995).
  81. Fink H. A., MacDonald R., Forte M. L., Rosebush C. E., Ensrud K. E., Schousboe J. T., Nelson V. A., Ullman K., Butler M., Olson C. M., Taylor B. C., Brasure M., Wilt T. J. Long-term drug therapy and drug discontinuations and holidays for osteoporosis fracture prevention: A systematic review. *Ann. Intern. Med.* **171**, 37–50 (2019).
  82. Lin J. H., Duggan D. E., Chen I. W., Ellsworth R. L. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab. Dispos.* **19**, 926–932 (1991).
  83. Gertz B. J., Holland S. D., Kline W. F., Matuszewski B. K., Freeman A., Quan H., Lasseter K. C., Mucklow J. C., Porras A. G. Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin. Pharmacol. Ther.* **58**, 288–298 (1995).
  84. Lichtenberger L. M., Romero J. J., Gibson G. W., Blank M. A. Effect of bisphosphonates on surface hydrophobicity and phosphatidylcholine concentration of rodent gastric mucosa. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1792–1801 (2000).
  85. Naniwa T., Maeda T., Mizoshita T., Hayami Y., Watanabe M., Banno S., Ito R. Alendronate-induced esophagitis: Possible pathogenic role of hypersensitivity to alendronate. *Intern. Med.* **47**, 2083–2085 (2008).

86. Graham D. Y. What the gastroenterologist should know about the gastrointestinal safety profiles of bisphosphonates. *Dig. Dis. Sci.* **47**, 1665–1678 (2002).
87. Cano-Cebrian M., Zornoza T., Granero L., Polache A. Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: A target for drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* **2**, 9–22 (2005).
88. Walsh E. G., Adamczyk B. E., Chalasani K. B., Maher S., O’Toole E. B., Fox J. S., Leonard T. W., Brayden D. J. Oral delivery of macromolecules: Rationale underpinning Gastrointestinal Permeation Enhancement Technology (GIPET®). *Ther. Deliv.* **2**, 1595–1610 (2011).
89. AlSheyyab R. Y., Al-taani B. M., Obeidat R. M., Alsmadi M. M., Masaedeh R. K., Sabat R. N. Delivery of peptidic gonadotropin releasing hormone antagonists. *Curr. Drug Deliv.* **15**, 602–609 (2018).
90. Koga K., Kusawake Y., Ito Y., Sugioka N., Shibata N., Takada K. Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulfate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **64**, 82–91 (2006).
91. Numata N., Takahashi K., Mizuno N., Utoguchi N., Watanabe Y., Matsumoto M., Mayumi T. Improvement of intestinal absorption of macromolecules by nitric oxide donor. *J. Pharm. Sci.* **89**, 1296–1304 (2000).
92. Roberts I. M. Rat lingual lipase: Effect of proteases, bile, and pH on enzyme stability. *Am. J. Physiol.* **12**, G496-500 (1985).
93. Waizumi K., Eguchi T. Novel observation of nucleation and growth of insulin crystals via liquid droplets generated by liquid–liquid phase separation. *Chem. Lett.* **34**, 1654–1655 (2005).
94. Tomita M., Hayashi M., Awazu S. Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* **85**, 608–611 (1996).
95. Ma T. Y., Nguyen D., Bui V., Nguyen H., Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol.* **276**, G965–G974 (1999).
96. Madara J. L. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 143–159 (1998).
97. González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., Jaramillo B. E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**, 1–44 (2003).
98. Yamaki T., Ohtake K., Ichikawa K., Uchida M., Uchida H., Ohshima S., Juni K., Kobayashi J., Morimoto Y., Natsume H. Poly-l-arginine-induced internalization of tight junction proteins increases the paracellular permeability of the Caco-2 cell monolayer to hydrophilic macromolecules. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 432–441 (2013).
99. Ettinger M. J., Timasheff S. N., Strycharz G. D. Optical activity of insulin. I. On the nature of the circular dichroism bands. *Biochemistry* **10**, 824–831 (1971).
100. Goldman J., Carpenter F. H. Zinc binding, circular dichroism, and equilibrium sedimentation studies on insulin (bovine) and several of its derivatives. *Biochemistry* **13**, 4566–4574 (1974).
101. Liu C., Shan W., Liu M., Zhu X., Xu J., Xu Y., Huang Y. A novel ligand conjugated nanoparticles for oral insulin delivery. *Drug Deliv.* **23**, 2015–2025 (2016).

102. Zheng Y., Wu J., Shan W., Wu L., Zhou R., Liu M., Cui Y., Zhou M., Zhang Z., Huang Y. Multifunctional nanoparticles enable efficient oral delivery of biomacromolecules via improving payload stability and regulating the transcytosis pathway. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 34039–34049 (2018).
103. Ji N., Hong Y., Gu Z., Cheng L., Li Z., Li C. Chitosan coating of zein-carboxymethylated short-chain amylose nanocomposites improves oral bioavailability of insulin *in vitro* and *in vivo*. *J. Control. Release* **313**, 1–13 (2019).
104. Wu S., Bin W., Tu B., Li X., Wang W., Liao S., Sun C. A delivery system for oral administration of proteins/peptides through bile acid transport channels. *J. Pharm. Sci.* **108**, 2143–2152 (2019).
105. Alama T., Katayama H., Hirai S., Ono S., Kajiyama A., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. Enhanced oral delivery of alendronate by sucrose fatty acids esters in rats and their absorption-enhancing mechanisms. *Int. J. Pharm.* **515**, 476–489 (2016).
106. Nakaya Y., Takaya M., Hinatsu Y., Alama T., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. Enhanced oral delivery of bisphosphonate by novel absorption enhancers: Improvement of intestinal absorption of alendronate by *N*-acyl amino acids and *N*-acyl taurates and their absorption-enhancing mechanisms. *J. Pharm. Sci.* **105**, 3680–3690 (2016).
107. Li X., Uehara S., Sawangrat K., Morishita M., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. Improvement of intestinal absorption of curcumin by cyclodextrins and the mechanisms underlying absorption enhancement. *Int. J. Pharm.* **535**, 340–349 (2018).
108. Sawangrat K., Yamashita S., Tanaka A., Morishita M., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. Modulation of intestinal transport and absorption of topotecan, a BCRP substrate, by various pharmaceutical excipients and their inhibitory mechanisms of BCRP transporter. *J. Pharm. Sci.* **108**, 1315–1325 (2019).
109. Pinton P., Braicu C., Nougayrede J. P., Laffitte J., Taranu I., Oswald I. P. Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J. Nutr.* **140**, 1956–1962 (2010).
110. Uchida H., Kondoh M., Hanada T., Takahashi A., Hamakubo T., Yagi K. A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 1437–1444 (2010).
111. Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777–1788 (1993).
112. Rao R. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**, 62–68 (2009).
113. Tsukita S., Katsuno T., Yamazaki Y., Umeda K., Tamura A., Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**, 44–52 (2009).
114. Han X., Zhang E., Shi Y., Song B., Du H., Cao Z. Biomaterial-tight junction interaction and potential impacts. *J. Mater. Chem. B* **7**, 6310–6320 (2019).

115. Hsu L. W., Lee P. L., Chen C. T., Mi F. L., Juang J. H., Hwang S. M., Ho Y. C., Sung H. W. Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* **33**, 6254–6263 (2012).
116. González-Mariscal L., Tapia R., Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1778** 729–756 (2008).
117. Chen T., Berenson J., Vescio R., Swift R., Gilchick A., Goodin S., LoRusso P., Ma P., Ravera C., Deckert F., Schran H., Seaman J., Skerjanec A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J. Clin. Pharmacol.* **42**, 1228–1236 (2002).
118. Uludag H. Bisphosphonates as a foundation of drug delivery to bone. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1929–1944 (2002).