

2016 年度 課程博士学位論文

各種ポリオキシエチレンアルキルエーテルを用いた
P-糖タンパク質の基質となる薬物の消化管吸収性の改善及び
P-糖タンパク質の機能抑制機構の解明

京都薬科大学大学院

【薬科学】・薬剤学分野

趙 婉廷

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Wanting Zhao, Sachiyo Uehara, Keiichiro Tanaka, Shuhei Tadokoro, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane and Akira Yamamoto: Effects of polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123: A P-glycoprotein substrate by *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016). [第 1 章、第 2 章、第 3 章]
- 2) Wanting Zhao, Tammam Alama, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane and Akira Yamamoto: Effects of 2 polyoxyethylene alkyl Ethers on the function of intestinal P-glycoprotein and their inhibitory mechanisms. *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016). [第 1 章、第 2 章、第 3 章]

目 次

略語一覧.....	1
要旨.....	3
序論.....	5
本論	
第一章 <i>In vitro</i> 法における各種 Brij's 併用時の P-gp 機能の評価	
第 1 節 <i>In vitro</i> diffusion chamber 法における各種 Brij's 併用時の P-gp 機能の評価.....	9
1-1-1 緒言	9
1-1-2 実験方法	11
1-1-3 実験結果	
1-1-3-1 Rhodamine123 の消化管粘膜透過性に及ぼす cyclosporin A の影響	14
1-1-3-2 各種 Brij's 存在下における rhodamine123 の消化管粘膜透過性	14
1-1-3-3 各種 Brij's 存在下における quinidine 及び prednisolone の消化管粘膜透過性	18
第 2 節 <i>In vitro</i> Caco-2 細胞透過実験における各種 Brij's 併用時の P-gp 機能の評価.....	22
1-2-1 緒言	22
1-2-2 実験方法	23
1-2-3 実験結果	
1-2-3-1 Rhodamine123 の Caco-2 細胞単層膜透過性に及ぼす各種 Brij's の影響.....	26
1-2-3-2 Quinidine の Caco-2 細胞単層膜透過性に及ぼす各種 Brij's の影響.....	27
第 3 節 考察.....	30
第 4 節 小括.....	33
第二章 <i>In vivo</i> 法における各種 Brij's 併用時の P-gp 機能の評価	
第 1 節 <i>In situ</i> closed loop 法における P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性の検討 ...	34
2-1-1 緒言	34
2-1-2 実験方法	35
2-1-3 実験結果	

2-1-3-1	<i>In situ</i> closed loop 法における rhodamine 123 の消化管吸収性の検討	37
2-1-3-2	<i>In situ</i> closed loop 法における rhodamine 110 の消化管吸収性の検討	39
2-1-3-3	<i>In situ</i> closed loop 法における prednisolone の消化管吸収性の検討	40
第 2 節	各種 Brij's 併用時の消化管粘膜障害性の評価	42
2-2-1	緒言	42
2-2-2	実験方法	43
2-2-3	実験結果	
2-2-3-1	各種 Brij's 併用時の小腸粘膜障害性の評価	45
第 3 節	考察	48
第 4 節	小括	50
第三章 各種 Brij's による P-gp 阻害機構の解明		
第 1 節	<i>In vitro</i> 法における各種 Brij's の吸収促進機構の評価	51
3-1-1	緒言	51
3-1-2	実験方法	53
3-1-3	実験結果	
3-1-3-1	5(6)-carboxyfluorescein の消化管粘膜透過性に及ぼす各種 Brij's の影響	54
3-1-3-2	Caco-2 細胞透過実験における膜抵抗値に及ぼす各種 Brij's の影響	56
第 2 節	各種 Brij's による P-gp 阻害機構の解明	57
3-2-1	緒言	57
3-2-2	実験方法	60
3-2-3	実験結果	
3-2-3-1	膜流動性に及ぼす各種 Brij's の影響	63
3-2-3-2	P-gp ATPase の活性値に及ぼす各種 Brij's の影響	65
第 3 節	考察	67
第 4 節	小括	70
総括		71
引用文献		73
謝辞		79
付録		

略語一覽

A-B	From apical to basolateral side
ABC	ATP-binding cassette
AP	Apical side
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adenosine triphosphatase
AUC	Area under the curve
B12H	Bis-(12)-hupyrindone
B-A	From basolateral to apical side
BA	Bioavailability
BBMV	Brush border membrane vesicle
BCRP	Breast cancer resistance protein
BL	Basolateral side
BL-9EX	Polyoxyethylene 9-lauryl ether
Brij30	Polyoxyethylene lauryl ether
Brij35	Polyoxyethyleneglycol dodecyl ether
Brij58	Polyoxyethylene 20-cetyl ether
Brij72	Polyoxyethylene 2-stearyl ether
Brij78	Polyoxyethylene 20-stearyl ether
Brij92	Polyoxyethylene 2-oleyl ether
Brij97	Polyoxyethylene 10-oleyl ether
Brij98	Polyoxyethylene 20-oleyl ether
Brijs	Polyoxyethylene alkyl ethers
BSA	Bovine serum albumin
C ₀	The initial concentration
Caco-2	Human colon adenocarcinoma-2
CF	5(6)-carboxyfluorescein
C _{max}	The peak concentration
CMC	Critical micelle concentration
CyA	CyclosporinA
CYP	Cytochrome P450
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS-CL	Dansyl chloride
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid

ER/EfR	Efflux ratio
EhR	Absorption enhancement ratio
FBS	Fetal bovine serum
Flux	The slope of linear portion of cumulative transport amount to time at the steady state
HBS	Hank's balanced salt
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HLB	Hydrophile lipophile balance
HPLC	High performance liquid chromatography
i.v.	Intravenous
KRBB	Krebs-ringer bicarbonate buffer
LDH	Lactate dehydrogenase
MDR	Multidrug resistance
MRP	Multidrug resistance protein
M-S	From mucosal to serosal side
Papp	Apparent permeability coefficients
PBS	Phosphate buffered saline
PEGs	Polyethylene glycols
P-gp	P-glycoprotein
Rho.110	Rhodamine110
Rho.123	Rhodamine123
S-M	From serosal to mucosal side
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T _{1/2}	half time
TEER	Transepithelial electrical resistance
Tma-DPH	1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-p-toluenesulfonate
Tmax	The time to reach the peak concentration
TPGS	α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV	Ultraviolet

要 旨

はじめに

近年、消化管上皮細胞には P-糖タンパク質 (P-gp) などの排出型トランスポーターが発現しており、一旦細胞内に取り込まれた P-gp の基質となる薬物を ATP 依存的に細胞外へ排出することが知られている。このため、P-gp の基質となる薬物は、薬物の脂溶性が高いにもかかわらず、消化管からの吸収性が低いものが見られ、P-gp が薬物の消化管吸収性を抑制する重要な要因の一つであることが明らかになっている。したがって、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性を改善するためには、P-gp modulators などの併用により、消化管に発現している P-gp の機能を低下させることが重要である。

現在までに P-gp modulators として様々な製剤添加物が用いており、代表的なものには Cremophor EL、polyethylene glycols (PEGs)、Labrasol などが報告されているが、有効かつ安全な製剤添加物を利用して、P-gp の機能を阻害し、薬物の消化管吸収性を改善する方法が注目を集めている。

一般に、促進作用が強い吸収促進剤は、同時に障害性を発現するものが多いため、有効かつ安全性の高い製剤添加物の開発が重要となっている。一方、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (Brijs) は非イオン性界面活性剤であり、既に乳化剤や可溶化剤として利用されている製剤添加物である。従来から Brijs の一部には P-gp の機能を抑制する作用が報告されているが、Brijs の種類の違いによる P-gp の機能抑制作用の差異について検討した例はほとんどない。

そこで本研究では各種 Brijs による P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性の改善及びその P-gp 阻害機構の解明について検討を行った。

第 1 章 *In vitro* 法における各種 Brijs 併用時の P-gp 機能の評価

本章では、*in vitro* diffusion chamber 法及び *in vitro* Caco-2 細胞透過実験を用いて、各種 Brijs による P-gp の基質となる薬物の消化管透過性を検討した。まず、*in vitro* diffusion chamber 法において、P-gp の基質となるモデル薬物である rhodamine123 の吸収方向の透過性は、すべての Brijs の併用により 1.3-2.2 倍に上昇したのに対し、rhodamine123 の排出方向の透過性は 3/5-1/2 に低下されることが認められた。また、rhodamine123 の吸収方向の Papp はすべての Brijs の併用によりコントロールに比べ増加するのに対して、排出方向の Papp は減少することが認められた。また、本研究で用いた Brijs のうち、polyoxyethylene 9-lauryl ether (BL-9EX) 及び polyoxyethylene 10-oleyl ether (Brij97) が efflux ratio (ER) を約 1/4 まで減少させ、方向性の消失傾向が確認されたことより、P-gp 阻害効果が最も強いことが示唆された。そのため、Brij97 及び BL-9EX を用いて、他の P-gp の基質となる薬物である quinidine 及び prednisolone の透過性に及ぼすこれら添加物の影響について検討した。その結果、0.05% Brij97 または BL-9EX の併用により、quinidine 及び prednisolone の両薬物の吸収方向の透過性が増大し、prednisolone の排出方向の透過性が減少することが認められた。

一方、Caco-2 細胞には P-gp が発現していることから、P-gp の機能を評価するモデル生体膜として使用されている。そこで本研究では Caco-2 細胞を用いて、rhodamine123 の透過性に及ぼ

す各種 Brij's の影響について検討した。その結果、各種 Brij's 併用時において rhodamine123 の吸収方向の Papp が増加し、排出方向の Papp が低下し、ER が低下し、*in vitro* diffusion chamber 法と同じ結果を見られた。以上のことから、各種 Brij's は P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性を改善できることが示唆された。

第 2 章 *In vivo* 法における各種 Brij's 併用時の P-gp 機能の評価

第一章において、各種 Brij's は、P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性を顕著に改善することが明らかとなった。しかしながら、Brij's が rhodamine123 の小腸吸収性を改善できるか否かについては不明である。そこで本章では、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収に及ぼす各種 Brij's の影響について、*in situ* closed loop 法を用いて系統的な評価を行った。小腸において各種 Brij's を併用投与した際、rhodamine123 の消化管吸収性における AUC 及び Cmax は、コントロールに比べ顕著に増大することが認められた。また、rhodamine123 の代謝物である rhodamine110 の消化管吸収性は各種 Brij's を併用投与しても、コントロールに比べほとんど変わらないことが認められた。さらに、これら Brij's の中で、BL-9EX 及び Brij97 による吸収促進作用が最大となったことから、Brij97 及び BL-9EX を用いて、prednisolone の小腸吸収性も検討した。その結果、prednisolone の消化管吸収性は 0.05% Brij97 または BL-9EX の併用により、増大することが認められた。また、Brij's が消化管粘膜障害性を惹起する可能性があることから、消化管障害性実験を行った。その結果、各種 Brij's の併用時における LDH 活性値は、コントロールと比べ有意な差は認められなかった。したがって、Brij's の併用は、消化管粘膜障害性に起因するものではないことが示唆された。以上のことから、各種 Brij's を併用投与により、P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善できることが認められた。

第 3 章 P-gp 阻害機構の解明

Brij's の吸収促進機構には細胞間経路を介した薬物の透過性上昇の可能性が考えられる。そこで、*in vitro* diffusion chamber 法において、P-gp の基質ではない 5(6)-carboxyfluorescein (CF) を用いて、CF の累積透過量に及ぼす各種 Brij's の影響を評価したところ、CF の Papp は各種 Brij's を併用してもコントロールとほとんど変わらないことが認められた。また、Caco-2 細胞透過実験において各種 Brij's を併用しても、膜抵抗値 (TEER) の低下が認められなかった。したがって、Brij's の吸収促進機構には細胞間経路を介した薬物の透過性上昇は寄与していないことが示唆された。次に、Brij's による P-gp の機能抑制機構を検討したところ、脂質膜内部、脂質膜外部及び膜中のタンパク質の流動性が Brij's の併用により、有意に増大することが認められた。また、Brij's の併用時における P-gp ATPase の活性値は、コントロールと比べ顕著に低下していることが示された。

総括

以上の結果より、各種 Brij's は P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善できる優れた製剤添加物であることが認められた。また、各種 Brij's は膜流動性及び P-gp ATPase の活性を変化させ、P-gp の機能を抑制することが示唆された。これらの知見は、製剤添加物により P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善する上で有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

序 論

一般に、経口投与は、種々の疾患の薬物治療に際して最も汎用される投与経路である。しかしながら、多くの薬物は、薬物自体の低溶解度、低透過性、または体内の高い代謝のため、経口投与をしても十分な吸収率が得られないことが知られている^{1,2)}。様々な研究より、バイオアベイラビリティ (BA) に影響を与える多数の因子の中で、消化管に存在している排出型トランスポーターである P-糖タンパク質 (P-gp)、多剤耐性関連タンパク質 (MRP)、乳癌耐性タンパク質 (BCRP) などは、薬物を細胞外へ排出できることから、薬物の BA を減少させる重要な要因の一つであることが明らかになっている³⁻⁶⁾ (Fig. 1)。また、その排出型トランスポーターの中で、P-gp は最も注目されているトランスポーターの一つである⁷⁾。

P-gp は腫瘍細胞、肝臓、消化管上皮細胞、腎臓、脳などに発現しており、ATP 依存的トランスポーターのスーパーファミリーに属する約 170KD の細胞膜糖タンパク質である。P-gp はエネルギー依存性の薬物トランスポーターであり、トランスタンパクー

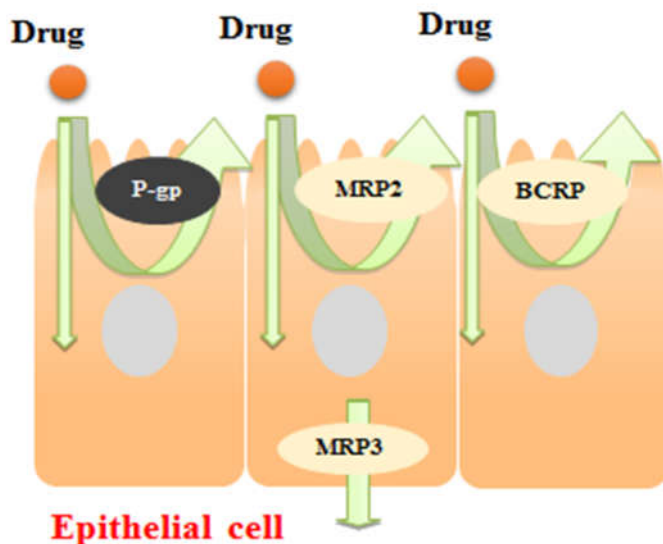


Fig. 1 Efflux of drugs by intestinal transporters

通路-受容体複合体を形成し、ATP の生成を調節することができる⁸⁾。このことから、P-gp は ATP 加水分解によるエネルギーを用いて、脂溶性の高い薬物を細胞外へ排出することができる。このため、P-gp の基質となる薬物である digoxin、vinca alkaloids、 β -adrenergic agonists などの薬物は、薬物の脂溶性が高いにもかかわらず、吸収性が低いものが見られ、低い BA を示すことが知られていることから⁹⁾、P-gp が薬物の消

化管吸収性を抑制する重要な要因の一つであることが明らかになっている。

このため、P-gp の機能を抑制することにより、薬物の経口 BA を増大させる研究が数多くなされており、様々な P-gp 阻害剤が見出されている。例えば、cyclosporin A、valspodar (PSC833) 及び LY335979 などの P-gp 阻害剤が P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性を改善できることが報告されている¹⁰⁻¹⁶⁾。しかしながら、吸収促進作用が強い P-gp 阻害剤は、同時に障害性を発現するものが多いことが知られている¹³⁾。すなわち、従来の P-gp 阻害剤は以下のいくつかの欠点があることが知られている。

第一世代の P-gp 阻害剤 (verapamil、cyclosporin A、タモキシフェンおよび一部カルモジュリン拮抗薬など) は P-gp の機能のみを特異的に阻害せず、BCRP 及び MRP1 の機能も阻害する^{14,15)}。また、verapamil は心臓毒性、cyclosporin A は免疫抑制作用を有するとともに腎毒性などの重篤な副作用を有する^{16,17)}。一方、第二世代の P-gp 阻害剤 (dexverapamil、dexniguldipine、PSC833、

biricodar (VX-710)など) は CYP3A4 の機能を抑制することによって、CYP3A4 による薬物の代謝が阻害され、毒性が生じることが知られている。また、P-gp の機能を阻害すると同時に、他のトランスポータータンパク質と結合し、特に肝臓、腎臓、胃腸管に存在する ABC トランスポーターファミリーに属する外来タンパク質の機能も抑制することが報告されている¹⁸⁾。

これらのことから、高い P-gp 特異性を有し、薬理作用を持たない有効性及び安全性が高い P-gp modulators の開発はきわめて重要な課題である。

近年、P-gp modulators として様々な製剤添加物が *in vitro* 及び *in vivo* 実験法において、P-gp の基質となる薬物の吸収を増加させ、P-gp の機能を阻害できることが実証されている。これら製剤添加物の例としては、polyethylene glycols (PEGs)、非イオン性界面活性剤、胆汁酸塩、脂肪酸など¹⁹⁻²⁹⁾ が知られている。特に、Cremophor EL、Tween80、Labrasol などの製剤添加物は、P-gp の機能を特異的に阻害し、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性を改善することが報告されている^{9,19-27)}。

一方、これら製剤添加物の中で、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (Brijs) は、優れた非イオン性界面活性剤であり、既に乳化剤や可溶化剤として広く利用されている製剤添加物である。従来から Brijs は腸粘膜の表面疎水性を減少させることにより、一部の溶解性及び吸収性が低い薬物の消化管吸収性を改善できることが報告されている³⁰⁾。しかしながら、P-gp を含めて排出型トランスポーターの機能に及ぼす Brijs の影響に関するの研究は少ないのが現状である。以前の研究では、polyoxyethylene lauryl ether (Brij30) 及び polyoxyethyleneglycol dodecyl ether (Brij35) は human colon adenocarcinoma-2 (Caco-2) 細胞における薬物の透過性を増加させる^{31,32)}ことが報告された。また、polyoxyethylene 20-stearyl ether (Brij78) 及び polyoxyethylene 10-oleyl ether (Brij97) は multidrug resistance (MDR) 細胞における細胞内 P-gp ATPase の量を低下させることから、Brij78 及び Brij97 は P-gp 機能を抑制する作用を有することが報告されている^{33,34)}。さらに、Brijs の構造には長さの異なる PEG 鎖からなる極性部群、及びアルキル鎖からなる疎水性部を含んでいることが知られており^{24,32-36)}、Brijs の種類の違いによる P-gp の機能抑制作用に差異を生じる可能性が考えられる。本研究では、Brijs の化学構造、分子量、及び hydrophilic-lipophilic balance (HLB) の異なる、7 種類の Brijs を選択した (Table 1)。この中で、Brij58 が最も高い HLB 値を有している。また、Brij72 が Brij78 と同じステアリルエーテルの構造を有しており、Brij92、Brij97 及び Brij98 がオレイルエーテルの構造を含んでいる。さらに、BL-9EX は P-gp の阻害機能を有する Brij35 と同じラウリルエーテルの構造を有している。

そこで、本研究では Brijs の種類の違いによる P-gp の機能抑制作用の差異及びその P-gp の機能抑制機構について検討を行った。

まず、P-gp の基質となるモデル薬物である rhodamine123 (Rho.123) を選択し、*in vitro* diffusion chamber 法、*in vitro* Caco-2 細胞透過実験及び *in situ* closed loop 法において、Rho.123 の消化管透過性及び消化管吸収性に及ぼす各種 Brijs の影響について検討した。しかしながら、典型的な P-gp の基質となる Rho.123 が P-gp を介した輸送だけではなく、細胞間経路を介して輸送される可能性があることから³⁶⁾、モデル薬物として Rho.123 のみを用いた場合に P-gp の機能を正し

く評価できない可能性が考えられる。

Table 1 Structures, composition and HLB values of various types of polyoxyethylene alkyl ethers (Brijs) surfactants

Trade name	Structures	M	HLB	n	m
Brij58	$C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_{20}OH$	1124	15.7	20	16
Brij72	$C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_2OH$	359	8.0	2	18
Brij78	$C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_{20}OH$	1151	15.3	20	18
Brij92	$C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_2OH$	357	7.5	2	18
Brij97	$C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_{10}OH$	709	12.4	10	18
Brij98	$C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_{20}OH$	1150	15	20	18
BL-9EX	$C_{12}H_{23}(OCH_2CH_2)_9OH$	583	14.5	9	12

M: molecular weight of Brij molecules; HLB: hydrophilic-lipophilic balance of Brij molecules;

n: number of hydrophilic repeating units; m: number of hydrophobic repeating units.

([#]J. Pharm. Sci., **105**, 1526-1534 (2016); Table 1)

一方、prednisolone は慢性関節リウマチ及び潰瘍性大腸炎の治療に効果を有する P-gp の基質となる薬物である³⁷⁾。また、quinidine はクラス 1A 抗不整脈薬であり、P-gp の基質及び P-gp の阻害剤となる薬物である³⁸⁾。本研究では、7種類の Brijs の中で、P-gp 阻害効果が最も強い Brij を選択して、*in vitro* 及び *in vivo* 両実験系における prednisolone 及び quinidine の消化管吸収性の改善に及ぼす Brijs の影響を検討した。

次に、Brijs の吸収促進機構には tight junction 開口などの細胞間経路を介した薬物の透過性上昇の可能性があることから、*in vitro* diffusion chamber 法において、P-gp の基質ではない 5(6)-carboxyfluorescein (CF) を用いて、CF の消化管透過性に及ぼす各種 Brijs の影響を評価した。また、各種 Brijs 存在下における Caco-2 細胞の膜抵抗値 (TEER) の変化を評価した。さらに、Brijs が消化管粘膜障害性を惹起する可能性があることから、消化管障害性実験も行った。

一方、現在までに知られている P-gp 阻害剤による P-gp の機能を阻害させる主要なメカニズムは、P-gp 基質と P-gp 薬物結合ドメインへの結合に競合的または非競合的に遮断する³⁹⁾ことであることから、これらの阻害剤は高い薬理学的な活性を持っている。このため、低い薬理活性を有する P-gp modulators を開発することが重要である。以前の研究より、非イオン性界面活性剤

による P-gp の阻害機構は、典型的 P-gp 阻害剤と違い、P-gp ATPase 活性の低下、細胞内 ATP 量の減少、細胞膜流動性の変化及び P-gp の発現の低下などにより、P-gp の機能を阻害する^{23,40,41)}ことが報告されている。また、Tang らは各種 Brij's により細胞内 ATP 量が増加することについて報告している³³⁾。しかしながら、多くの非イオン性界面活性剤が細胞膜流動性を変化することが知られているが、各種 Brij's の存在下における細胞膜流動性の研究はほとんど見られない。このことから、細胞内の P-gp ATPase 活性及び細胞膜流動性に及ぼす各種 Brij's の影響を検討した。

以上のように本研究では、3つの P-gp の基質となる薬物を用いて *in vitro* 及び *in vivo* 両実験系における各種 Brij's の併用時の P-gp 機能を評価した。また、*in vitro* 実験系における細胞間経路を介した薬物の透過性上昇の可能性について検討し、*in situ* closed loop 法において、各種 Brij's による消化管粘膜障害性を評価した。最後に、細胞膜流動性及び P-gp ATPase 活性に及ぼす各種 Brij's の影響を検討した。

以下、得られた結果を3章にわたり論述する。

本 論

第一章 *In vitro* 法における各種 Brij の併用時の P-gp 機能の評価

第 1 節 *In vitro* diffusion chamber 法における各種 Brij の併用時の P-gp 機能の評価

1-1-1 緒言

Brij は、優れた非イオン性界面活性剤であり、既に乳化剤や可溶化剤として広く利用されている製剤添加物である。従来から一部の Brij には P-gp の機能を抑制する作用が報告されているが、Brij の種類の違いによる P-gp の機能抑制作用と吸収促進効果の差異については、系統的に評価した例はみられない。

そこで本節では、まず、P-gp の基質となるモデル薬物として、Rho.123 (Fig. 2A) を選択し、Rho.123 の消化管粘膜透過性に及ぼす各種 Brij の影響について *in vitro* diffusion chamber 法を用いて系統的な評価を行った。しかしながら、Rho.123 は細胞内経路を介して薬物の透過を上昇させるのみならず、細胞間経路を介した薬物の透過性を上昇させる可能性³⁶⁾が報告されたことから、他の P-gp の基質となる薬物の消化管透過性についての検討も重要である。

そのため、7 種類の Brij の中で、P-gp の阻害効果が最も強い Brij を選択し、他の P-gp の基質となる薬物であり、強力な抗炎症効果を有する prednisolone (Fig. 2B) 及び抗不整脈薬である quinidine (Fig. 2C) の消化管粘膜透過性を検討し、消化管における P-gp の機能に及ぼす Brij の影響について評価した。

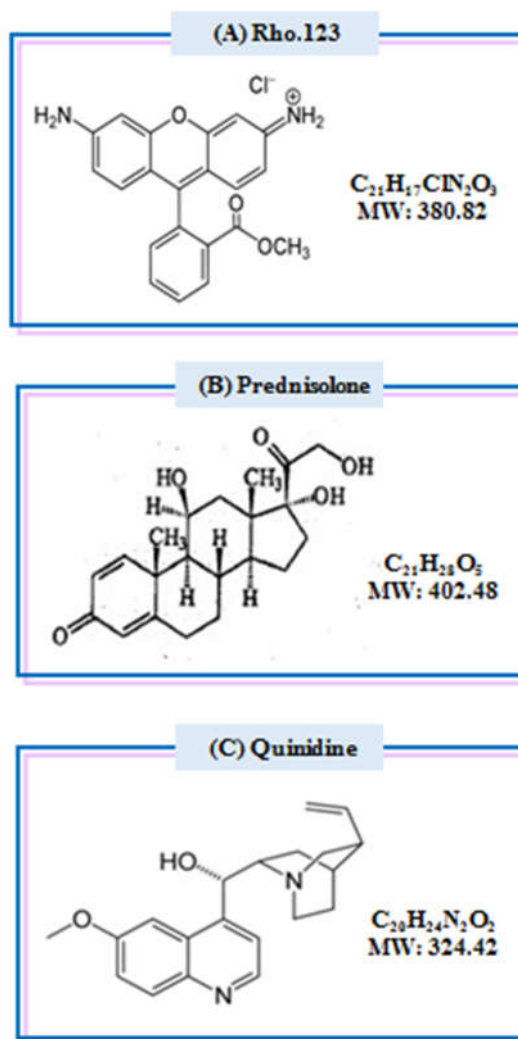


Fig. 2 Chemical structures of model drugs.

1-1-2 実験方法

【試薬】

Rho.123、prednisolone 及び quinidine は和光純薬工業株式会社（大阪）より、Brijs は日光ケミカルズ会社より、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) は株式会社同仁化学研究所（熊本）より、それぞれ購入した。その他の試薬についてはすべて市販の特級試薬を用いた。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット（8 週齢、240～270 g）は清水実験材料株式会社（京都）から購入した。実験動物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従って実施した。

【Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBB) の調製】

118.1 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.2 mM KH_2PO_4 、2.5 mM CaCl_2 及び 1.2 mM MgCl_2 を精製水に溶解した。さらに、25 mM NaHCO_3 及び 11.5 mM D-glucose を溶解して 95 % O_2 / 5 % CO_2 混合ガスで 10 分間バブリングして、pH 7.4 に調整した。

【HEPES buffer の調製】

25 mM HEPES、140 mM NaCl、5.4 mM KCl 及び 5 mM D-glucose を精製水に溶解して 95 % O_2 / 5 % CO_2 混合ガスで 10 分間バブリングして、pH 7.4 に調整した。

【投与液の調製】

In vitro diffusion chamber 法による消化管粘膜透過実験に用いた投与液は、Rho.123 は KRBB で 10 μM となるように調製し、prednisolone 及び quinidine は HEPES buffer でそれぞれ 0.2 mM、0.1 mM となるように調製した。また、P-gp modulators である各種 Brijs の濃度はそれぞれ 0.01 %、0.025 %、0.05 %、0.1 % となるように KRBB (pH 7.4) または HEPES buffer (pH 7.4) に溶解した。

【消化管粘膜透過実験】

消化管粘膜透過実験は、*in vitro* diffusion chamber 法を用いて行った。16～18 時間絶食した Wistar 系雄性ラット（体重 250 g）を使用し、腹腔内 pentobarbital sodium (32 mg/kg) 麻酔下、固定台に背位固定した後、開腹手術を行った。小腸の腸管腔内容物は、10 mL の pH 7.4 の phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄除去し、洗浄後空気を送り込むことにより腸管内の PBS を除去した。洗浄後、下肢大動脈から脱血を行うことにより脱血死させ、素早く腸管を摘出した。摘出した腸管を氷冷した KRBB または HEPES buffer につけ、空腸及び回腸を切り取り、筋層を剥離後、腸管を diffusion chamber に装着した。その後、排出方向を検討する場合には donor 側に Brij を、receiver 側に P-gp の基質となる薬物を添加し、吸収方向を検討する場合には donor 側に Brij 及び P-gp の基質となる薬物を添加した (Fig. 3)。また、Brij と P-gp の基質となる薬物

は donor 側と receiver 側両方に、7 mL KRBB (pH 7.4) または HEPES buffer (pH 7.4) で溶解した投与液を加えた。

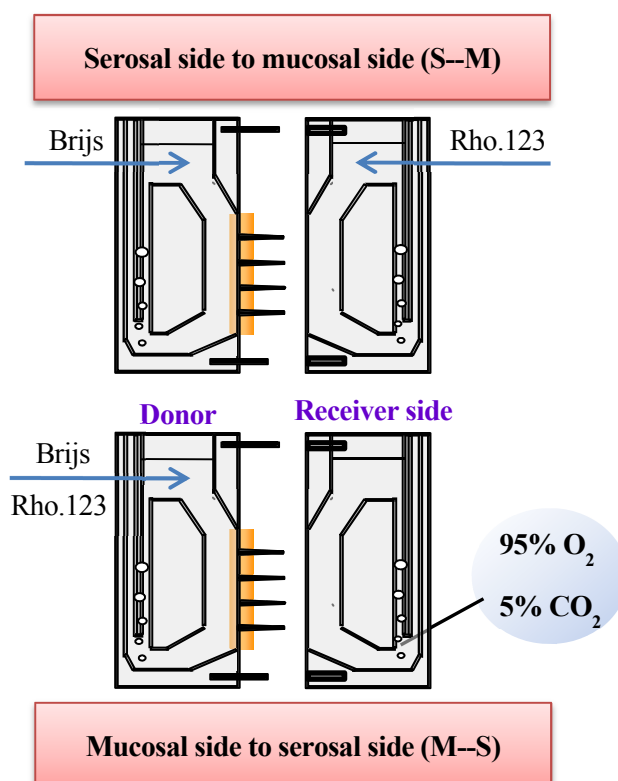


Fig. 3 *In vitro* diffusion chamber study for the transport of drugs

次に、これら投与液を 95 % O₂ / 5 % CO₂ 混合ガスでバブリングし、P-gp の基質となる薬物を添加した側と反対側より経時的にサンプリング (150 μ L) を行い、サンプリング後直ちに等量の KRBB または HEPES buffer を加えた。透過実験終了後、得られたサンプルのうち 100 μ L を定量し、その後、P-gp の基質となる薬物の累積透過量と透過係数 (P_{app}) を算出した。

【分析条件】

1. Rho.123 の分析条件

使用機器 : Multi-Detection Microplate Reader (POWERSCAN[®] HT、USA)
 検出波長 : Ex. 485 nm
 Em.528 nm

2. Prednisolone の分析条件

使用機器 : Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module
 カラム : Cosmosil 5C₁₈-AR- II (4.6 \times 150 mm, particle size 5 μ m)
 移動相 : Acetonitrile : 10 mM potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄, pH 5.0) = 30:70
 流速 : 1.0 mL / min
 検出器 : UV detector (Shimadzu LC-10)

検出波長 : 242 nm
カラム槽温度 : 35°C

3. Quinidine の分析条件

使用機器 : Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module
カラム : Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 × 150 mm, particle size 5 μm)
移動相 : Acetonitrile : 0.4% triethylamine (pH 3.0) = 15:85
流速 : 1.0 mL / min
検出器 : Shimadzu Fluorescence Detecor
検出波長 : Ex. 485 nm
 Em.528 nm
カラム槽温度 : 35°C

【データ解析】

薬物の透過性は、薬物の累積透過量—時間曲線から見かけの P_{app} を次式 [1] にしたがって、算出することにより評価した。

$$P_{app} = \frac{\text{Flux}}{\text{Area} \cdot C_0 \cdot 60} \quad [1]$$

ここで、 P_{app} (cm/sec) は透過性の見かけのパラメータであり、flux (pmol/min) は定常状態での時間に対する累積透過量の直線部分の傾きを表し、area は diffusion chamber の面積 (1.78 cm²) であり、 C_0 (pmol / mL) は薬物の初濃度を表す。

また、本研究では、P-gp の機能は efflux ratio (ER) において評価した^{6,8,9,32}。ER は、次式 [2] で算出した。

$$ER = \frac{P_{app}S - M}{P_{app}M - S} \quad [2]$$

この式で、 $P_{app}S-M$ は漿膜から粘膜側への薬物の透過係数を示し、 $P_{app}M-S$ は粘膜から漿膜側への薬物の透過係数を示す。

さらに、有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Student-Newman-Keuls 法により行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判断した。

1-1-3 実験結果

1-1-3-1 Rhodamine123 の消化管粘膜透過性に及ぼす cyclosporin A の影響

Fig. 4 では、代表的な P-gp の基質である Rho.123 の消化管粘膜透過性に及ぼす cyclosporin A (CyA) の影響について検討したものである。

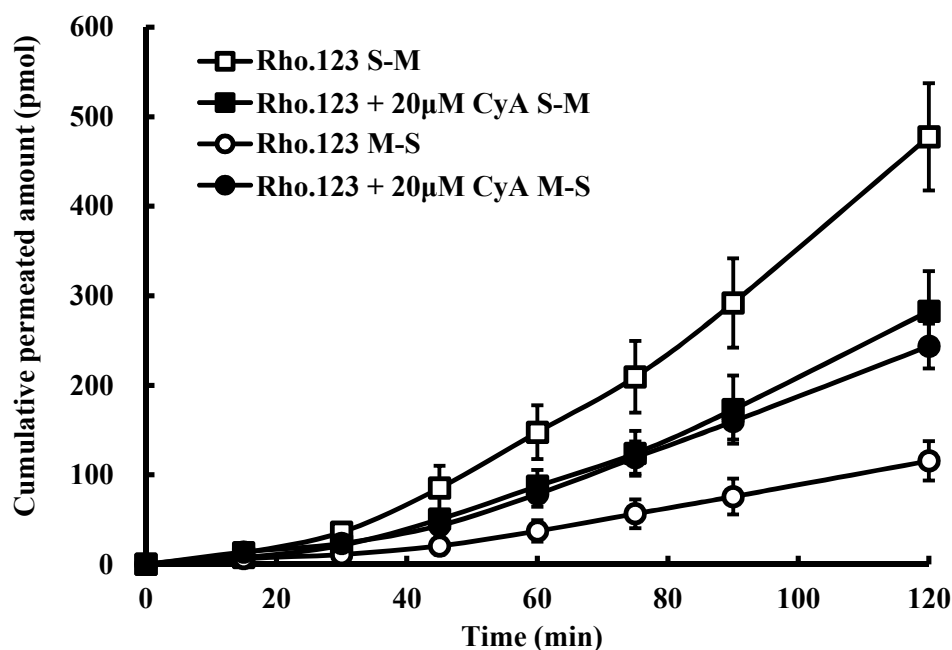


Fig. 4 Effects of 20 μ M CyA on the transport of Rho.123 (10 μ M) across the rat small intestine by an *in vitro* diffusion chamber method. Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments.

まず、Rho.123 単独での消化管粘膜透過性を評価したところ、Rho.123 の排出方向の透過性は、吸収方向の透過性に比べ顕著に増大したことから、ラットの小腸における Rho.123 の輸送は主に排出方向であることが認められた。次に、典型的な P-gp の阻害剤として知られている CyA を併用した場合、Rho.123 の排出方向の透過性が抑制され、吸収方向の透過性は増大することが明らかとなった。

したがって、本実験系により、消化管における P-gp の機能を精度良く評価できることが確認された。

1-1-3-2 各種 Brij's 存在下における rhodamine123 の消化管粘膜透過性

Fig. 5 は、*in vitro* diffusion chamber 法における P-gp modulators として各種 0.025 % Brij's を投与した時の Rho.123 の吸収方向と排出方向の累積透過量を検討したものである。

その結果、すべての Brij's の併用により Rho.123 の吸収方向の透過が上昇し、中でも BL-9EX

の併用により最も増加し、その比は 1.96 倍になった。一方、排出方向ではすべての Brij97 の併用により Rho.123 の透過が抑制され、中でも Brij97 の併用により約 1/2 に減少する結果となった。

また、Table 2 は、*in vitro* diffusion chamber 法における各種濃度の Brij97 と Rho.123 併用時の Rho.123 の P_{app} をまとめたものである。本節では 7 種類の Brij97 の濃度は同じ 0.01 %、0.025 %、0.05 % の濃度にした。

その結果、吸収方向の Rho.123 の透過性はすべての Brij97 の併用によりコントロールに比べ増加した。中でも、BL-9EX の併用時において Rho.123 の透過性が最も増大することが見られた。一方、排出方向に関しては、すべての Brij97 の併用により Rho.123 の透過性がコントロールよりも減少した。中でも Brij97 と BL-9EX の併用時は最も減少し、その比は 2 倍になった。また、Table 2 では ER がすべての Brij97 の併用により、コントロールに比較して顕著に減少することが見られた。用いた Brij97 のうちで、BL-9EX 及び Brij97 の併用時における ER 値は、典型的な P-gp 阻害剤である CyA における ER 値とほぼ同等であったことから、Brij97 及び BL-9EX が最も強い P-gp 阻害効果が有することが認められた。

したがって、Brij97 が消化管に発現している P-gp を抑制することより、薬物の消化管吸収性を改善する可能性があることが示唆された。次に、これら 7 種類の Brij97 の中で、Brij97 及び BL-9EX が P-gp 阻害効果が最も強いことから、他の P-gp の基質となる薬物である prednisolone 及び quinidine の消化管透過性に及ぼす Brij97 及び BL-9EX の影響について検討した。

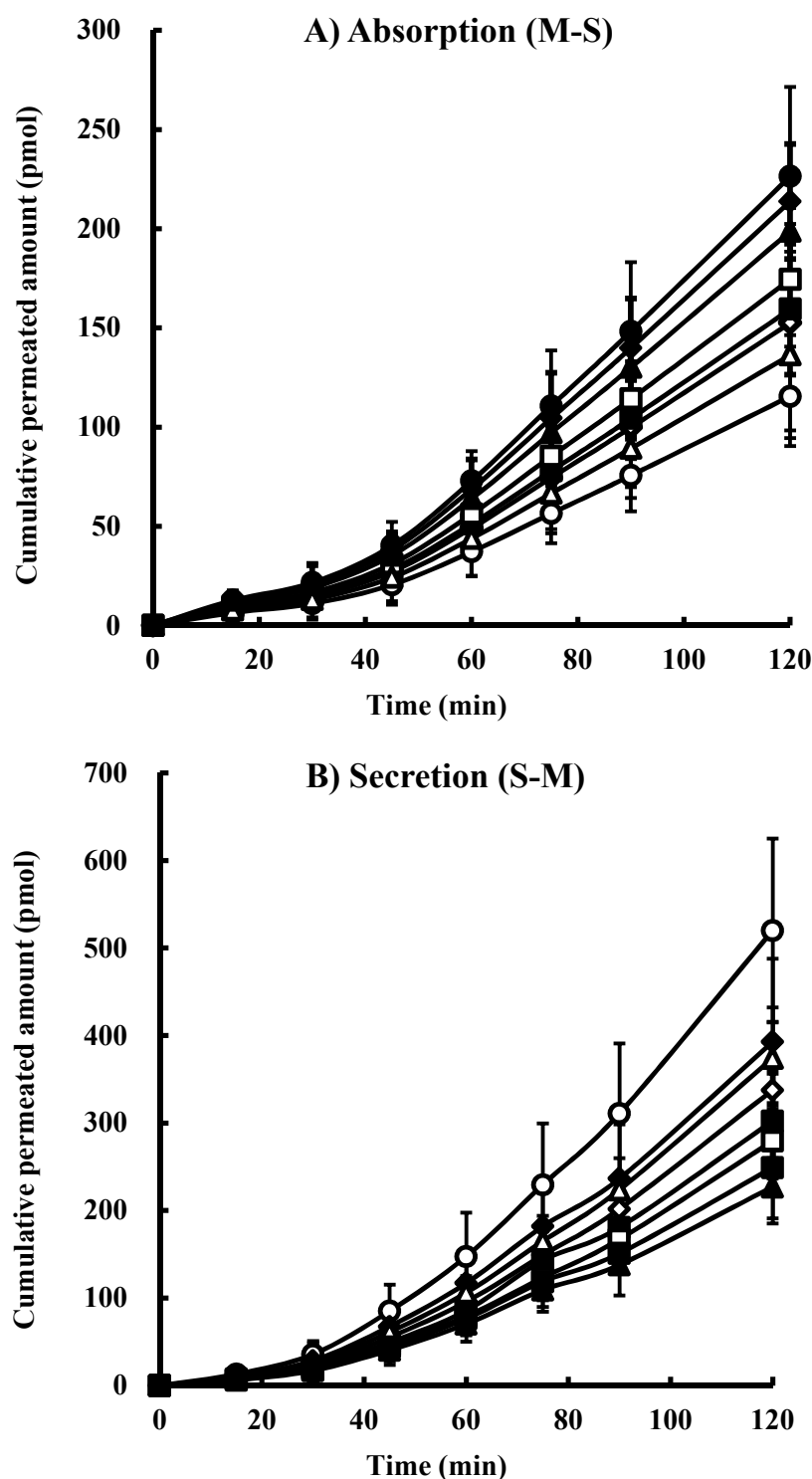


Fig. 5 Time course of absorptive (M to S) and secretory (S to M) transport of Rho.123 and effects of 0.025% Brij surfactants on the transport of Rho.123 across the rat jejunal membrane.

Keys: A) M—S (○) Rho.123; (◆) Brij58 (0.025%); (◇) Brij72 (0.025%); (■) Brij78 (0.025%); (□) Brij92 (0.025%); (▲) Brij97 (0.025%); (△) Brij98 (0.025%); (●) BL-9EX (0.025%); B) S—M (○) Rho.123; (◆) Brij58 (0.025%); (◇) Brij72 (0.025%); (■) Brij78 (0.025%); (□) Brij92 (0.025%); (▲) Brij97 (0.025%); (△) Brij98 (0.025%); (●) BL-9EX (0.025%). Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Fig. 1)

Table 2 Apparent permeability coefficients (Papp) of rhodamine123 in the presence of various types of Brij by an *in vitro* diffusion chamber method

		Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s)		ER
		M-S	S-M	
Control		0.48 \pm 0.08	3.30 \pm 0.01	6.88
Brij58	0.01%	0.60 \pm 0.02	1.86 \pm 0.06*	3.05
(w/v)	0.025%	0.86 \pm 0.11*	2.24 \pm 0.09	2.60
	0.05%	0.73 \pm 0.01	1.93 \pm 0.31*	2.64
Brij72	0.01%	0.75 \pm 0.18	1.92 \pm 0.14*	2.56
(w/v)	0.025%	0.72 \pm 0.50	1.96 \pm 0.19*	2.73
	0.05%	0.97 \pm 0.01*	2.03 \pm 0.01	2.09
Brij78	0.01%	0.81 \pm 0.19*	2.13 \pm 0.08	2.62
(w/v)	0.025%	0.61 \pm 0.01	1.80 \pm 0.18*	2.95
	0.05%	0.63 \pm 0.02	1.91 \pm 0.33*	3.03
Brij92	0.01%	0.83 \pm 0.14*	1.83 \pm 0.09*	2.20
(v/v)	0.025%	0.82 \pm 0.17*	1.85 \pm 0.26*	2.26
	0.05%	0.88 \pm 0.07*	1.81 \pm 0.28*	2.06
Brij97	0.01%	0.82 \pm 0.06*	1.83 \pm 0.19*	2.22
(v/v)	0.025%	1.04 \pm 0.06**	1.75 \pm 0.23**	1.70
	0.05%	0.85 \pm 0.32*	1.71 \pm 0.23**	2.02
Brij98	0.01%	0.75 \pm 0.02	2.08 \pm 0.21	2.76
(w/v)	0.025%	0.85 \pm 0.01*	1.92 \pm 0.15*	2.26
	0.05%	0.73 \pm 0.09	1.89 \pm 0.08*	2.58
BL-9EX	0.01%	0.93 \pm 0.32*	1.98 \pm 0.24	2.14
(v/v)	0.025%	1.02 \pm 0.09**	1.90 \pm 0.19*	1.85
	0.05%	1.05 \pm 0.09**	1.78 \pm 0.11**	1.69
CyA	20 μ M	1.08 \pm 0.11**	1.73 \pm 0.29**	1.60

Effects of Brij on apparent permeability of Rho.123 across rat intestinal membranes determined by an *in vitro* diffusion chamber method were examined. The samples were collected at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min. The concentrations of Rho.123 were measured by fluorescence spectrophotometer. Data are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, N.S.: no significant difference, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Table 2)

1-1-3-3 各種 Brij97 存在下における prednisolone 及び quinidine の消化管粘膜透過性

Fig. 6 及び Fig. 7 は、それぞれ *in vitro* diffusion chamber 法において、P-gp の基質となる薬物である prednisolone 及び quinidine の吸収方向と排出方向の累積透過量に及ぼす 0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の影響について検討したものである。

これらのグラフより、prednisolone 及び quinidine 単独時の吸収方向の累積透過量は prednisolone 及び quinidine の排出方向の累積透過量に比べ、きわめて低いことが見られた。その結果は Rho.123 単独投与時の累積透過量の結果と同様の傾向を示した。このことから、これら 2 種類の P-gp の基質となる薬物は Rho.123 と同様に、主に排出方向に輸送されていることが認められた。

また、0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX を併用時における prednisolone 及び quinidine の吸収方向の累積透過量は prednisolone 及び quinidine 単独投与時における吸収方向の累積透過量に比較して、有意に上昇する結果となった。特に、BL-9EX の併用時における quinidine の吸収方法の累積透過量が 3 倍以上に増加した。一方、prednisolone 及び quinidine の排出方向の累積透過量は 0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用により低下した。

Table 3 は、各種濃度の Brij97 及び BL-9EX の併用時における prednisolone 及び quinidine の P_{app} をまとめたものである。Brij97 及び BL-9EX の濃度は同じ 0.025 %、0.05 %、0.1 % の濃度にした。

まず、典型的な P-gp 阻害剤である CyA の併用時における prednisolone 及び quinidine の吸収方向の P_{app} はコントロールに比較して増大したのに対して、排出方向の P_{app} が低下した。この結果は、以前の研究と同じである⁶⁾ことから、本研究においても本実験系が P-gp の機能を精度良く評価できると考えられる。また、3 つの濃度の Brij97 と BL-9EX の併用を問わず、吸収方向の prednisolone 及び quinidine の P_{app} はコントロールに比べ顕著に増加した。一方、排出方向に関しては、Brij97 及び BL-9EX の併用により prednisolone の P_{app} は、コントロールに比べ有意に減少したが、quinidine の排出方向の P_{app} は 0.1 % (v/v) BL-9EX を併用する時のみ、有意な結果が見られた。さらに、Table 3 では prednisolone 及び quinidine 単独投与における ER 値がそれぞれ 2.13、3.92 になったが、Brij97 及び BL-9EX の併用により、顕著に減少することが見られた。中でも、0.05 % (v/v) BL-9EX 及び Brij97 の併用時における prednisolone の ER 値は、CyA における ER 値とほぼ同じであることから、Brij97 及び BL-9EX が典型的な P-gp 阻害剤と同様の強い P-gp 阻害効果を有する可能性が示唆された。

したがって、Brij97 が P-gp 阻害剤と同様に、P-gp の機能を抑制することより、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性を改善する可能性を有することが示唆された。

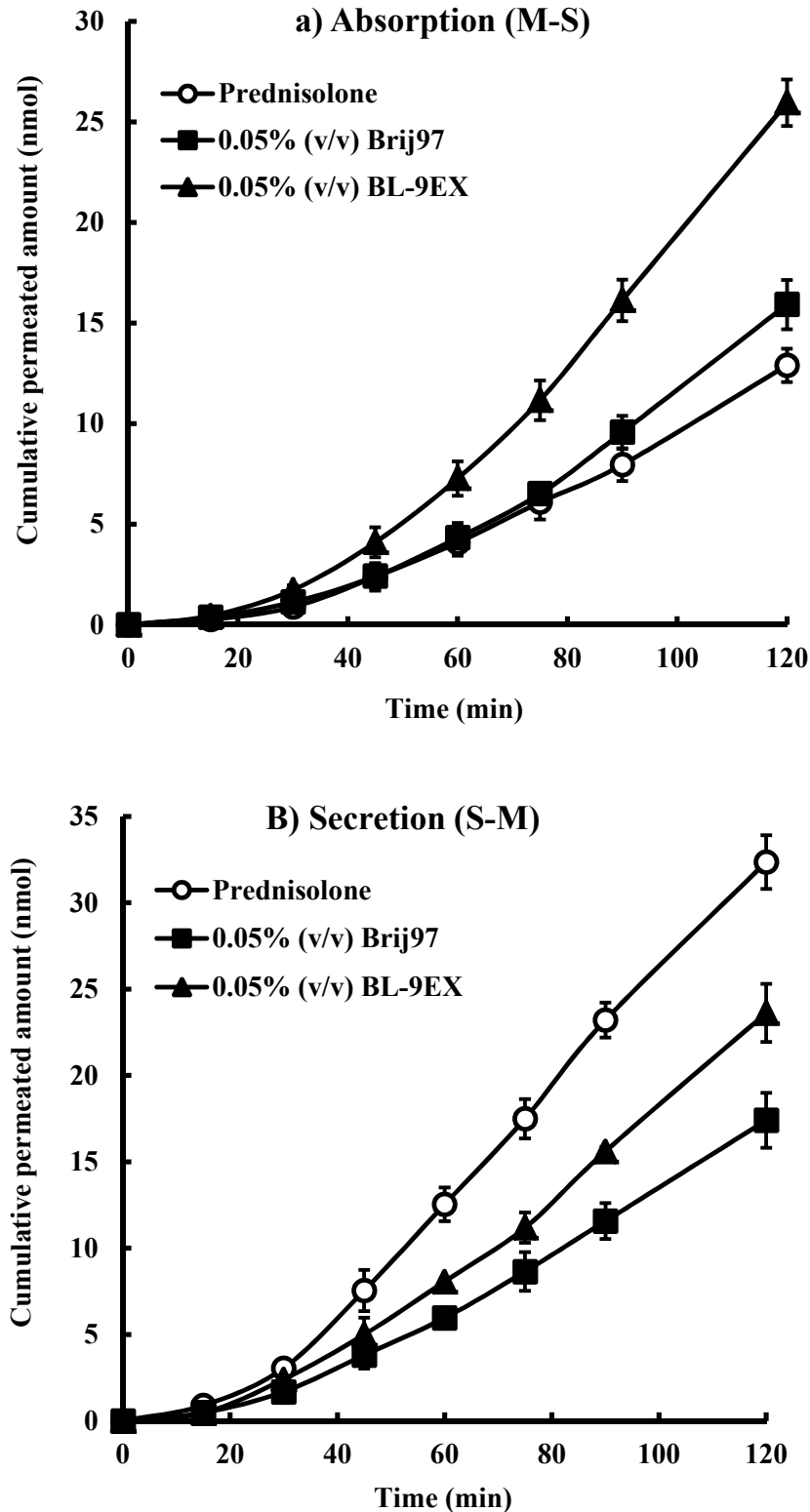


Fig. 6 Time course of absorptive transport (M-S) (A) and secretory transport (S-M) (B) of prednisolone across the rat jejunal membrane in the absence or presence of 0.05% Brij97 and BL-9EX

Keys: (○) Prednisolone control; (■) 0.05% Brij97; (Δ) 0.05% BL-9EX. Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments. (*J. Pharm .Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Fig. 2)

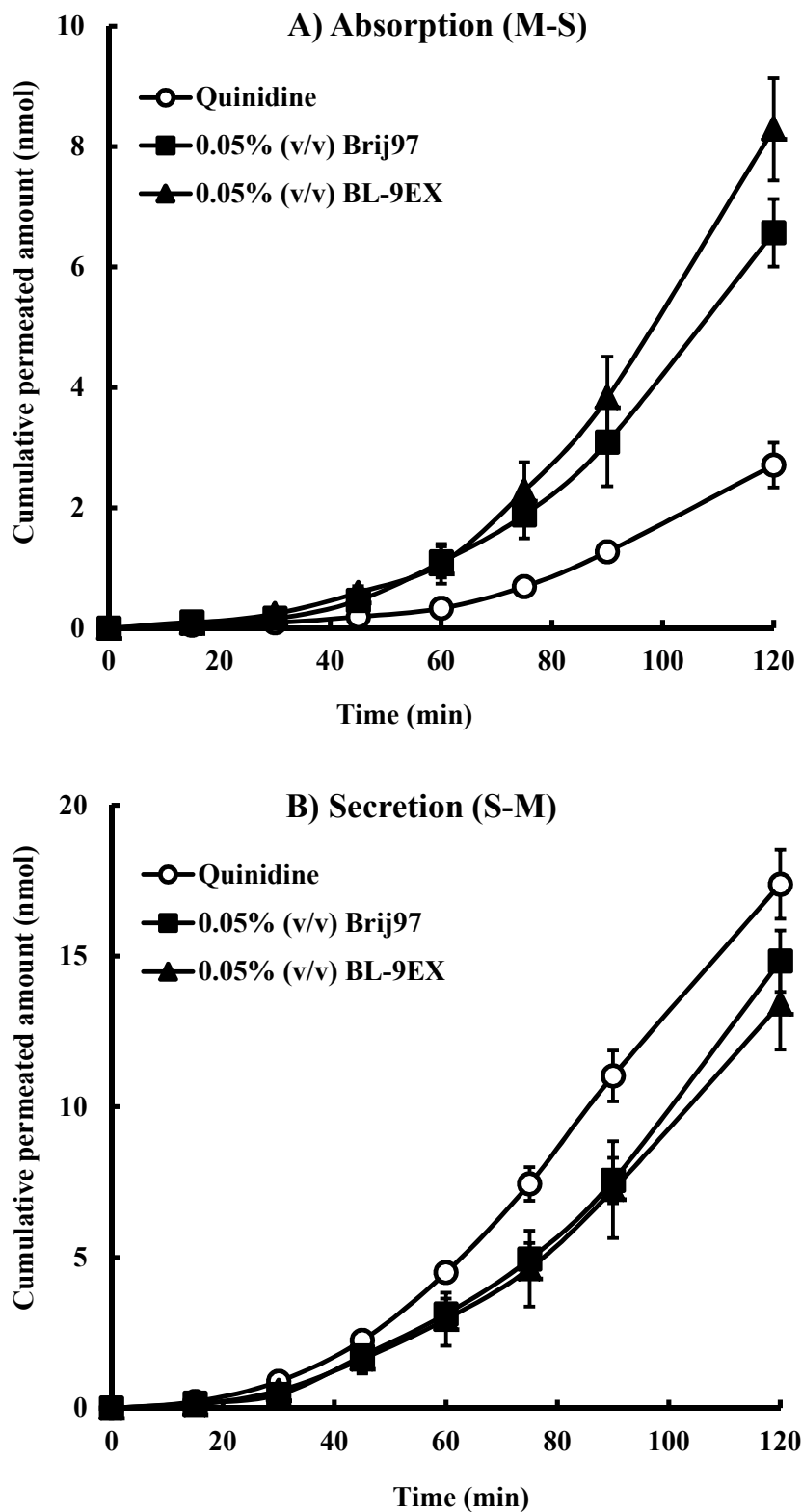


Fig. 7 Time course of absorptive transport (M-S) (A) and secretory transport (S-M) (B) of quinidine across the rat jejunal membrane in the absence or presence of 0.05% Brij97 and BL-9EX

Keys: (○) Quinidine control; (■) 0.05% Brij97; (△) 0.05% BL-9EX. Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Fig. 1)

Table 3 Effects of Brij97 and BL-9EX on the permeability of quinidine and prednisolone across rat intestinal membranes

Drug	Excipient		Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)		ER
			M-S	S-M	
Quinidine (0.1 mM)	Control		5.25 \pm 0.38	20.6 \pm 1.70	3.92
	BL-9EX	0.025%	11.9 \pm 0.90*	16.1 \pm 0.72	1.94
	(v/v)	0.05%	12.7 \pm 0.65**	15.8 \pm 0.42	1.49
		0.1%	14.2 \pm 0.82**	14.6 \pm 0.46*	0.92
	Brij 97	0.025%	10.9 \pm 0.74*	20.8 \pm 0.40	1.91
	(v/v)	0.05%	11.0 \pm 0.88*	17.6 \pm 0.99	1.59
		0.1%	15.9 \pm 1.82**	15.4 \pm 1.43	0.97
	Cyclosporin A	20 μ M	17.0 \pm 1.12**	14.2 \pm 0.55*	0.84
	Control		7.17 \pm 0.28	15.3 \pm 1.78	2.13
	BL-9EX	0.025%	12.9 \pm 0.61**	13.2 \pm 0.72	1.02
Prednisolone (0.2 mM)	(v/v)	0.05%	15.4 \pm 0.55**	11.8 \pm 0.90*	0.76
		0.1%	12.6 \pm 0.69**	10.8 \pm 0.61*	0.86
	Brij 97	0.025%	9.49 \pm 0.50	11.8 \pm 1.08	1.25
	(v/v)	0.05%	9.99 \pm 0.44*	8.75 \pm 1.27**	0.88
		0.1%	10.1 \pm 0.39*	10.4 \pm 0.29*	1.03
	Cyclosporin A	20 μ M	10.5 \pm 0.72*	7.54 \pm 0.38**	0.72
	Control		7.17 \pm 0.28	15.3 \pm 1.78	2.13

Effects of Brij97 (polyoxyethylene 10 oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on apparent permeability of quinidine and prednisolone across rat intestinal membranes were determined by an *in vitro* diffusion chamber method. The samples were collected at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min. The concentrations of quinidine and prednisolone were measured by HPLC. Data are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, N.S.: no significant difference, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Table 1)

第 2 節 *In vitro* Caco-2 細胞透過実験における各種 Brij 併用時の P-gp 機能の評価

1-2-1 緒言

第一節では、*in vitro* diffusion chamber 法において、各種 Brij は P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性を改善し、吸収促進効果を有する可能性が高いことが認められた。しかしながら、従来の P-gp の機能の研究は、がん細胞や MDR 細胞などの細胞を用いて、製剤添加物による P-gp の基質となる薬物の細胞膜透過性について検討した例が多い。例えば、MDR1-MDCK 細胞を用いて、P-gp の阻害剤の併用により bestatin の細胞透過性が増加したことが報告されている⁴²⁾。このため、細胞透過実験において、P-gp modulators 併用時の P-gp の機能の評価することも重要である。

一方、ヒト結腸癌由来細胞である 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ので、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⁴³⁻⁴⁵⁾。また、Caco-2 細胞は、tight junction 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^{46,47)}。

Caco-2 細胞には P-gp が発現していることから、様々な P-gp の機能の評価するモデル生体膜として使用されている研究が報告されている。Zhang らは、Caco-2 細胞において、adriamycin の細胞内累積量が HZ08 の併用により増大したこと⁴⁸⁾を示している。また、Peceol[®] 及び Gelucire[®]44/14 の併用により、Caco-2 細胞における Rho.123 の排出方向が有意に減少したことが報告されている⁴¹⁾。さらに、Yu らは Caco-2 細胞において、Bis-(12)-hupyrindone (B12H) の細胞透過性が Brij35 の併用により顕著に上昇したことを明らかにしている³²⁾。このように Caco-2 細胞を用いて薬物の膜透過性を測定することにより、各種 Brij 併用時の P-gp 機能の評価をできると考えられる。

そこで本節では、*in vitro* Caco-2 細胞透過実験において、Rho.123 及び quinidine の Caco-2 細胞膜透過性に及ぼす各種 Brij の影響について検討した。

1-2-2 実験方法

【試薬】

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、10 mM MEM non-essential amino acids solution、fetal bovine serum (FBS) は Life Technologies Corporation (Carlsbad、CA、USA) より、antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10000 U/ml penicillin、10 mg/ml streptomycin、25 mg/ml amphotericin B、0.85 % 食塩水含有)、0.25 % trypsin / 1 mM EDTA solution は株式会社同仁化学研究所 (熊本) より、Hanks' Balanced Salts (HBS) は Sigma-Aldrich よりそれぞれ購入した。培養フラスコは Corning Inc. (Corning、NY、USA) 及び Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham、MA、USA) より、Polycarbonate Membrane Transwell® Inserts (12 well、12 mm in diameter、0.4 μ m pore size、sterile) は Corning Inc. (Corning、NY、USA) よりそれぞれ購入した。その他の試薬については前章の実験材料に準じた。なお、本研究において使用した FBS はすべて 56 °C、30 分間の非働化处理を行った。

【培養細胞】

Caco-2 細胞は大日本住友製薬株式会社 (大阪) より購入した。

【細胞培養】

Caco-2 細胞を 10 % FBS、1 % antibiotic-antimycotic mixed solution、100 μ M MEM non-essential amino acids solution 含有 DMEM 培地を用い、37 °C、5 % CO₂ 存在下、培養フラスコ中で培養し、継代はおおよそ 7 日毎に行った。Subconfluent に達した Caco-2 細胞を 0.05 % trypsin / 0.02 % EDTA を用いて剥離後、 1×10^5 cells / 0.5 mL/well で 12 well Transwell® に播種した。培地交換は 2 日毎に行い、passage number[#]49~52 の Caco-2 細胞を、播種後 37 °C、5 % CO₂ 存在下で、18~21 日間培養したものを実験に供した。なお、本研究に用いた Caco-2 細胞単層膜は、膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance ; TEER) が 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上となったものののみを実験に用いた。

【Hanks' balanced Salts Solution (HBSS) の調製】

10 mM HEPES、5.5 mM D-glucose および 9.7 g / L HBS を超純水に溶解して、pH 7.4 に調整し、1M HCl により pH 6.0 に調整した。

【投与液の調製】

In vitro Caco-2 細胞透過実験による消化管粘膜透過実験に用いた投与液は、Rho.123 及び quinidine の場合 HBSS で 10 μ M となるように調製した。また、各種 Brij's の濃度はそれぞれ 0.0025 %、0.01 % となるように HBSS (pH 7.4 または pH 6.0) に溶解した。

【*In vitro* Caco-2 細胞透過実験】

Caco-2 細胞単層膜を HBSS (pH 7.4) で 1 回洗浄後、apical 側に 0.5 mL の HBSS (pH 6.0)、basolateral 側に 1.5 mL の HBSS (pH 7.4) を加え、37 °C 恒温槽上で 30 分間プレインキュベーション

ョン後、apical 側または basolateral 側を各種 Brij's 及び Rho.123 または quinidine を含有した HBSS 溶液で置換し実験を始めた。

これらの溶液は 10 μ M Rho.123 または quinidine を調製し、各種 Brij's はいずれの透過性をみる場合も apical 側に添加した。

その後、実験開始から 2 時間 または 6 時間まで経時的に receptor 側が basolateral 側の場合 120 μ L、apical 側の場合 80 μ L ずつ採取した後、等量の HBSS を receptor 側に加えた。

Caco-2 細胞透過実験において、得られたサンプルのうち 70 μ L を定量測定することにより、apical 側から basolateral 側への吸収方向への透過性 (PappA-B)、basolateral 側から apical 側への排出方向への透過性 (PappB-A) を求めた。

【分析条件】

1. Rho.123 の分析条件

使用機器 : Multi-Detection Microplate Reader (POWERSCAN[®] HT, USA)

検出波長 : Ex. 485 nm

Em.528 nm

2. Quinidine の分析条件

使用機器 : Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module

カラム : Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 \times 150 mm, particle size 5 μ m)

移動相 : Acetonitrile : 0.4% triethylamine (pH 3.0) = 15:85

流速 : 1.0 mL/min

検出器 : Shimadzu Fluorescence Detector

検出波長 : Ex. 485 nm

Em.528 nm

カラム槽温度 : 35 $^{\circ}$ C

【データ解析】

P-gp の基質となる薬物の透過性は、累積薬物透過量-時間曲線から以下の式 [3] により、みかけの透過係数 Papp を算出することにより評価した。

$$P_{app} = \frac{\text{Flux}}{\text{Area} \cdot C_0 \cdot 60} \quad [3]$$

ここで、Flux (nmol/min) は定常状態における曲線の傾きを表し、Area (cm²) はみかけの透過面積 (1.12 cm²)、C₀ は apical 側の薬物の初濃度 (nmol/mL) を表す。

また、本研究では、P-gp の機能は efflux ratio (EfR) において評価した。EfR は、次式 [4] で算出した。

$$\text{EfR} = \frac{P_{\text{app}}B - A}{P_{\text{app}}A - B} \quad [4]$$

この式において、 $P_{\text{app}}B-A$ は basolateral 側から apical 側への薬物の透過係数を示し、 $P_{\text{app}}A-B$ は apical 側から basolateral 側への薬物の透過係数を示す。

有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Dunnett 法により行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判断した。

1-2-3 実験結果

1-2-3-1 Rhodamine123 の Caco-2 細胞単層膜透過性に及ぼす各種 Brij の影響

Caco-2 細胞において各種 0.0025 % Brij を併用した際の Rho.123 の Papp を Table 4 に示した。

Table 4 Apparent permeability coefficients (Papp) of Rho.123 in the presence of various types of Brij (0.0025%) by an *in vitro* Caco-2 cell permeability experiment

Groups	Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s)		EfR
	A-B	B-A	
Control	1.61 \pm 0.25	13.26 \pm 0.23	8.23
CyA (10 μ M)	3.81 \pm 0.34*	4.38 \pm 0.19**	1.15
Brij58	3.45 \pm 0.38*	10.22 \pm 0.11	2.96
Brij72	2.10 \pm 0.41	9.26 \pm 0.16*	2.99
Brij78	3.21 \pm 0.33*	8.24 \pm 0.19**	2.67
Brij92	3.35 \pm 0.21*	8.64 \pm 0.33*	2.58
Brij97	3.54 \pm 0.29*	8.14 \pm 0.34**	2.29
Brij98	2.88 \pm 0.26	9.55 \pm 0.12	3.32
BL-9EX	3.52 \pm 0.33*	7.69 \pm 0.15**	2.18

Effects of Brij on apparent permeability coefficients (Papp) for apical to basolateral and basolateral to apical transfer of Rho.123 across Caco-2 cell monolayer were examined. The samples were collected at 30, 60, 120, 240, 360 min. The concentrations of Rho.123 were measured by fluorescence spectrophotometer. Data are expressed the mean \pm S.E. of at least three experiments. (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Table 4)

その結果、Rho.123 単独投与時における排出方向の Papp は吸収方向の Papp に比べ高く、EfR 値は 8.23 となり、*in vitro* diffusion chamber 法における結果と同様の結果となった。このことから、Caco-2 細胞における Rho.123 の細胞膜透過性も *in vitro* diffusion chamber 法と同様に排出方向優位であることが実証された。

また、Rho.123 の吸収方向の Papp はすべての 0.0025 % Brij の併用により、コントロールに

比較して、1.78 - 2.29 倍に増大した。中でも、BL-9EX の併用時における吸収方向の Papp が P-gp 阻害剤である 10 μ M CyA の併用時における Papp とほぼ同じであることが認められた。一方、排出方向の Rho.123 の透過性は 0.0025 % Brij97 の併用により、コントロールに比べ有意に減少した。

さらに、Table 4 では Brij97 の併用時における EfR がコントロールに比べ顕著に低下することが認められた、中でも、0.0025 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX を併用した時、EfR 値がそれぞれ 2.29、2.18 になり、CyA の併用時における EfR 値とより近い値になることが明らかになった。

したがって、*in vitro* Caco-2 細胞透過実験における結果は、*in vitro* diffusion chamber 法における結果と同様、Brij97 が P-gp の基質となる薬物の細胞膜透過性を増加させる可能性を示唆している。しかしながら、Rho.123 は細胞内経路を介した上皮細胞層を透過するのみならず、細胞間経路を介した透過性の寄与も存在することが報告されている³⁶⁾。Caco-2 細胞は、tight junction や微絨毛を形成することも知られていることから、P-gp の基質となる他の薬物を用いて、Caco-2 細胞における Brij97 併用時の P-gp の機能を評価することが重要である。

次に、7 種類の Brij97 の中で、Brij97 及び BL-9EX が P-gp 阻害効果が強いことから、P-gp の基質となる薬物である quinidine を選択し、quinidine の消化管透過性に及ぼす Brij97 及び BL-9EX の影響についても検討することとした。

1-2-3-2 Quinidine の Caco-2 細胞単層膜透過性に及ぼす各種 Brij97 の影響

Fig. 8 及び Table 5 は、Caco-2 細胞を用いて、P-gp の基質となる薬物である quinidine の膜透過性に及ぼす 0.01 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の影響について検討した結果を示している。これら図表で、quinidine を単独で投与した場合、quinidine の排出方向の透過性は吸収方向の透過性に比べ顕著に高く、quinidine の EfR 値は 16.8 となることが明らかとなった。この結果は Anand らの研究³⁸⁾と一致していることから、quinidine の Caco-2 細胞膜透過性は *in vitro* diffusion chamber 法と同様に、主に排出方向優位であることが認められた。

また、Fig. 8A 及び Fig. 8B より、0.01 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用のいずれにおいても、吸収方向の quinidine の累積透過量は対照群と比較して増加したのに対して、排出方向の quinidine の累積透過量は顕著に減少した。

さらに、Table 5 に結果を示すように、0.01% (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用時における PappA-B は quinidine 単独投与における PappA-B に比べて、有意に増加した。一方、quinidine の PappB-A は Brij97 及び BL-9EX の併用により、*in vitro* diffusion chamber 法における結果と異なり、大幅に減少した。

最後に、0.01 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用時における EfR 値はコントロールの約 1/2、すなわちそれぞれ 7.90、6.95 に低下することが認められた。

したがって、Brij97 は Caco-2 細胞に存在する P-gp の機能を阻害することより、P-gp の基質となる薬物の消化管透過性を改善する可能性が示唆された。

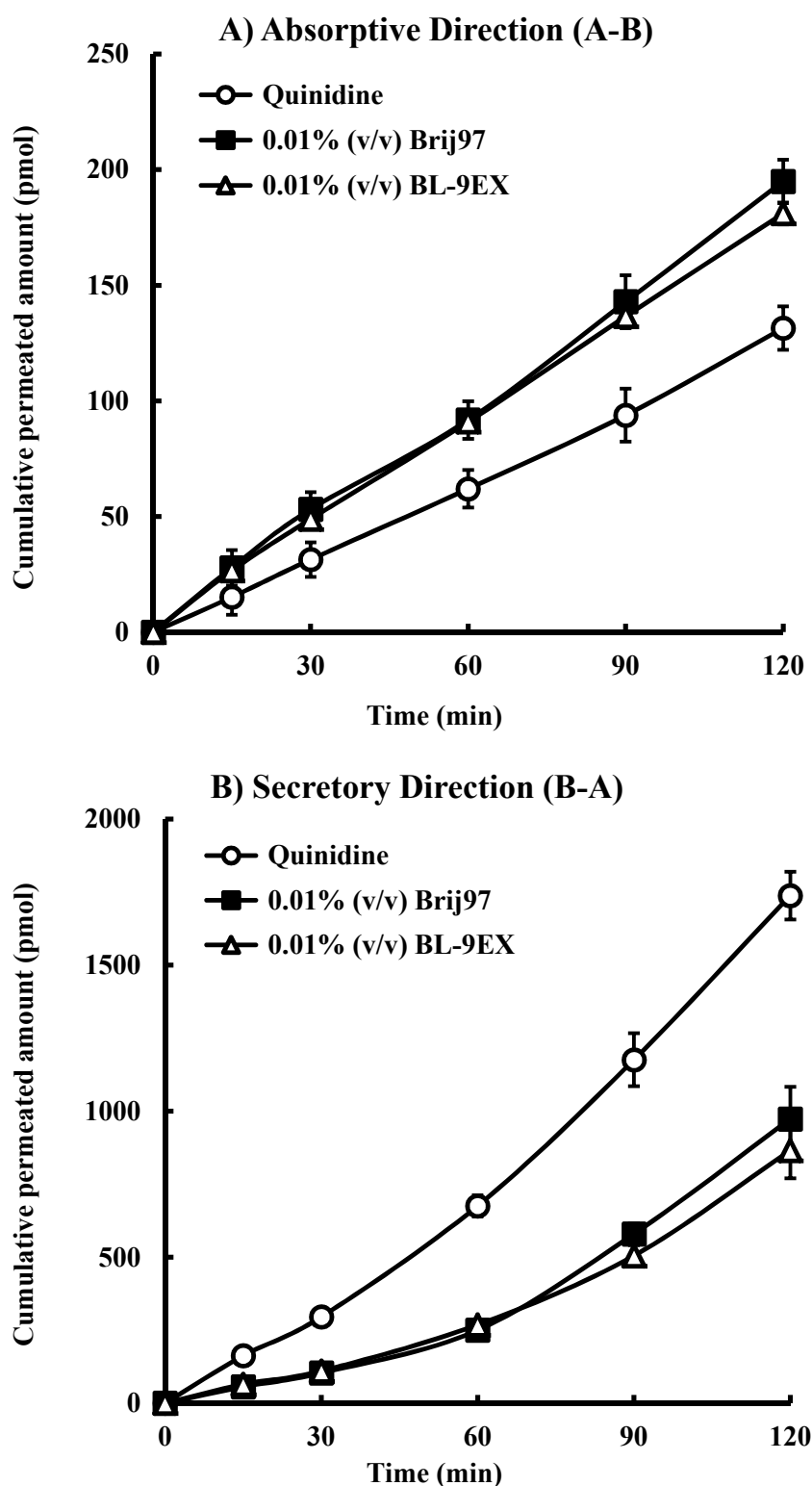


Fig. 8 Time course of quinidine transport across Caco-2 cell monolayers in the absorptive directions (A-B) (A) and secretory directions (B-A) (B) of in the absence or presence of 0.01% Brij97 and BL-9EX

Keys: (○) Quinidine control; (■) 0.01% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether); (Δ) 0.01% BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Fig. 3)

Table 5 Effects of Brij97 and BL-9EX on the permeability of quinidine across Caco-2 cell monolayers

Drug	Excipient		Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s)		EfR
			A→B	B→A	
Quinidine	Control		1.57 ± 0.19	26.6 ± 0.83	16.8
(10 μ M)	Brij97	0.01% (v/v)	2.27 ± 0.65*	17.9 ± 1.92*	7.90
	BL-9EX	0.01% (v/v)	2.14 ± 0.35*	14.8 ± 1.65**	6.92

Effects of Brij97 (polyoxyethylene 10 oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on apparent permeability coefficients (Papp) of quinidine across Caco-2 cell monolayer were examined. The samples were collected at 15, 30, 60, 90, 120 min and the concentrations of quinidine were measured by HPLC. Results are expressed the mean \pm S.E. of at least three experiments. (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, compared with the control. ([#]*J. Pharm. Sci.*, 105, 3668-3679 (2016); Table 2)

第 3 節 考察

本章では、*in vitro* 実験系において P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性に及ぼす各種 Brij の影響を検討してきた。

まず、本研究で選択した P-gp の基質であるモデル薬物として Rho.123 は、以前の研究より、分析がしやすく、広く臨床や腫瘍治療で P-gp の機能が評価できる特徴を持っている脂溶性薬物であり^{50,51)}、製剤添加物が消化管に発現している P-gp を効果的に阻害するか否かについて評価できる化合物である⁸⁾。

Fig. 4 より、*in vitro* diffusion chamber において、Rho.123 の排出方向の累積透過量は吸収方向の透過量に比べて高くなったことから、Rho.123 の消化管における輸送は主に排出方向優位であると考えられる。また、典型的な P-gp の阻害剤として知られている CyA (20 μ M) を用いると、Rho.123 の排出方向の透過量が抑制されるのに対し、吸収方向の透過量は増大する結果を示した。さらに、以前の研究より、典型的な P-gp の阻害剤として CyA (20 μ M) および verapamil (0.3mM) を併用投与した場合、Rho.123 において ER (PappS-M/PappM-S) は顕著に低下することが知られている^{6,8,27)}。したがって、*in vitro* diffusion chamber 法により、P-gp の機能と P-gp modulators の作用を精度良く評価できることが確認された。

従来から多くの薬物は P-gp のような消化管に存在している排出型トランスポーターにより細胞外へ排出されるため、低い消化管吸収性を示すことが知られている⁵²⁾。第一世代 P-gp の阻害剤である CyA 及び verapamil、第二世代 P-gp の阻害剤である PSC833 など P-gp 阻害剤は P-gp の機能を抑制することにより薬物の経口 BA を増加できる³⁻⁵⁾ が、これら阻害剤自体が薬理活性を有することから、重篤な副作用を引き起こすことが報告されている^{16,17)}。このことから、高い P-gp 特異性を有し、薬理作用を持たない、有効性及び安全性の高い P-gp 阻害剤の開発はきわめて重要な課題である。

一方、Brij は、優れた非イオン性界面活性剤であり、既に乳化剤や可溶化剤として広く利用されている製剤添加物であり、一部の難吸収性薬物の消化管吸収性を改善できることが証明されている³⁰⁻³⁴⁾。そこで本研究では、Brij の P-gp 機能抑制作用について検討した。

Fig. 5、Table 2 に示したように、各種 Brij が存在した場合、吸収方向の Rho.123 の透過性は増加し、排出方向の透過性は減少することが見られた。また、各種 Brij の併用における Rho.123 の ER (PappS-M/PappM-S) は CyA (20 μ M) の併用時と同じように、対照群に比較し低下することが認められた。また、Shen らは *in vitro* diffusion chamber 法において PEGs を併用することより、Rho.123 の消化管粘膜透過性が増加したことを明らかにした²⁸⁾。Lin らも chamber 法において、Rho.123 の粘膜透過性が labrasol の併用により上昇することを確認している⁹⁾。これらのことから、P-gp modulators としての製剤添加物は *in vitro* diffusion chamber 法において、消化管に存在する P-gp の機能を評価できることが認められた。

本実験において消化管各部位のうち、空腸及び回腸を選択した原因は、消化管における P-gp の発現量ならびに P-gp の機能に部位差が見られることによる。すなわち Paine らは P-gp の発現が消化管の部位によって異なることを報告した⁵³⁾。以前の研究で、Lin、Shono らの十二指腸、空腸、回腸の部位差による検討^{9,29)}より、回腸において Rho.123 の ER 比が最大であることを明

らかにしている。一方、Yumoto らは Rho.123 の輸送が十二指腸及び空腸に比べ、回腸において顕著に優位であることを確認している⁵⁴⁾。これらの研究では排出方向優位な Rho.123 の透過性が明確に観察されたため、本研究では空腸及び回腸を用いて、*in vitro* diffusion chamber 法を行った。

Table 2 の検討より、BL-9EX において P-gp の機能抑制作用に濃度依存性が見られたのに対し、他の Brij's では濃度依存性を見られなかった。この原因の詳細については不明であるが、臨界ミセル濃度 (CMC) の影響がその原因の一つであると考えられる。多数の界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤は CMC 以下の濃度で P-gp の抑制効果を有する。この原因は、非イオン性界面活性剤は CMC 以下の濃度で、モノマーの形で存在して、細胞膜を通過し易くなる。一方、CMC 以上の濃度の場合、非イオン性界面活性剤が溶液中でミセルを形成して、細胞膜を通過することが難しいだけでなく、P-gp の基質となる薬物をミセル内に包含し、遊離薬物の量を減らすことから、吸収を抑制することが認められている。このことから、高濃度の Brij's を併用する時、Rho.123 がミセルに取り込まれることより、Rho.123 の輸送に及ぼす Brij's の影響が飽和したことから、濃度依存性が見られなかったものと思われる。また、BL-9EX の CMC を測定した結果 (データは示していない) では、BL-9EX が 0.1% を超える時、ミセルを形成したことから、0.01-0.05 % BL-9EX を併用する時は Rho.123 がミセルに組み込まれず、濃度依存性を示したものと考えられる。

本研究では、7 種類の Brij's において、Brij97 及び BL-9EX が最も強い P-gp の抑制効果を有することが認められた。この効果の差異は Brij's の種類により HLB が異なることから、Brij's の水溶性または脂溶性が効果の差異に関連している可能性がある³¹⁾。Brij97 及び BL-9EX の HLB はそれぞれ 12.4、14.5 であり、溶解性が良好であることから、濃度が高くなれば、効果がより強くなったと考えられる。また、Table 1 及び Table 2 では、分子量が 300-700 の各種 Brij's は、P-gp の抑制効果が強い傾向が見られ、Brij's の CMC 及び構造の差異が、小腸に存在する P-gp の機能を阻害する作用に影響したと考えられる。

しかしながら、典型的な P-gp の基質である Rho.123 は P-gp を介した排出輸送のみならず、細胞間経路を介した膜透過性を有する可能性もあることから³⁶⁾、Rho.123 を用いるのみでは、Brij's の併用による P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性についての検討が不十分であると考えられる。このため、最も強い P-gp の抑制効果を有する Brij97 及び BL-9EX を用いて、*in vitro* diffusion chamber 法において、臨床で用いられている P-gp の基質となる薬物である prednisolone 及び quinidine の消化管粘膜透過性を検討した。

Table 3 より、prednisolone 及び quinidine 単独投与時における ER はそれぞれ 2.13、3.92 であり、Rho.123 単独投与時における ER と同様であることから、prednisolone 及び quinidine を用いることにより Rho.123 と同様に、*in vitro* diffusion chamber 法において P-gp の機能を評価できることが確認された。

また、Fig. 6、Fig. 7 及び Table 3 の検討で、Brij97 及び BL-9EX の併用時における prednisolone 及び quinidine の小腸粘膜透過性は増加し、ER は低下することが認められたことから、Brij97 及び BL-9EX は消化管に存在する P-gp の機能を抑制することが示唆された。また、以前の研究より、PEGs は *in vitro* diffusion chamber 法において、prednisolone 及び quinidine の ER 値が低下

すること⁶⁾があり、Brijs は PEGs と同様に、P-gp の基質となるモデル薬物だけではなくて、他の P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜性を改善でき、P-gp の機能を阻害する効果を有することが認められた。

さらに、本研究では *in vitro* Caco-2 細胞実験も行った。*In vitro* diffusion chamber 法と違い、Caco-2 細胞には絨毛がなく、微絨毛のみ発現しており、平面の膜を形成することから、透過係数の算出が容易であるなどの点があることから、*in vitro* Caco-2 細胞実験において P-gp の基質となる薬物の膜透過性に及ぼす各種 Brijs の影響を検討した。

Table 4 の検討で、Rho.123 単独投与時の EfR (PappB-A/PappA-B) は 8.23 であり、*in vitro* diffusion chamber 法における ER 値と同様であることから、*in vitro* Caco-2 細胞実験は P-gp の機能を評価できる系であることが確認された。各種 Brijs 併用時において Rho.123 の PappA-B が増加し、PappB-A が減少し、EfR が低下した。また、用いた Brijs のうちで、Brij97 及び BL-9EX の併用時における EfR がより低いことから、これらの P-gp modulators を用いて、quinidine の膜透過性を評価した。Fig. 8、Table 5 より、quinidine の吸収方向の透過性は Brij97 及び BL-9EX の併用により有意に上昇し、排出方向の透過性の低下が認められた。また、Brij97 及び BL-9EX の併用時における quinidine の EfR はコントロール群に比べ、約 1/2 に減少した。

さらに、Lo らは Caco-2 細胞において Brij30 が P-gp の機能を阻害することより、epirubicin の細胞累積量が増加した³¹⁾ことを報告している、同様に Caco-2 細胞において Brij35 の併用による B12H の細胞透過性が有意に上昇することも報告されている³²⁾。また、Brij97 は P-gp 過剰発現している MDR 細胞において、³H-PTX の細胞累積量を増大させる⁵⁵⁾ことが報告され、Collnot らは Caco-2 細胞において PEG 鎖の長さの違いにより、Rho.123 の透過性の影響が大きく異なることを証明している⁵⁶⁾。

以上のことから、各種 Brijs は *in vitro* diffusion chamber 法と同じように、*in vitro* Caco-2 細胞実験において、小腸に存在する P-gp の機能を抑制することより、P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性を改善する可能性が示唆された。

第 4 節 小括

本章では、*in vitro* diffusion chamber 法において各種 Brij の併用により、Rho.123 の吸収方向の消化管粘膜透過性は増大し、排出方向の透過性は減少することが示された。また、用いた Brij のうち、P-gp 阻害効果が強い BL-9EX 及び Brij97 をそれぞれ併用することにより、prednisolone の吸収方向の消化管粘膜透過性は増大し、排出方向の透過性が減少することが示された。さらに、*in vitro* Caco-2 細胞透過実験においても各種 Brij が、Rho.123 及び quinidine の吸収方向の消化管粘膜透過性を増大させることが認められた。

以上のことから、Brij が消化管に発現している P-gp の機能を抑制することより、薬物の消化管粘膜透過性を改善する可能性が確認された。

第二章 *In vivo* 法における各種 Brij 併用時の P-gp 機能の評価

第 1 節 *In situ* closed loop 法における P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性の検討

2-1-1 緒言

第一章では、*in vitro* 実験系において、各種 Brij は P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性を顕著に改善することが明らかとなった。しかしながら、Brij が Rho.123 の小腸吸収性を改善できるか否かについては不明である。また、従来から吸収促進剤や P-gp modulators の併用時による薬物の消化管吸収性の影響については *in situ* closed loop 法を用いて評価する^{6,9,57,58)}ことが多く、P-gp は小腸などの消化管に発現することが知られている。そこで本節では、Rho.123 の消化管吸収性に及ぼす各種 Brij の影響について *in situ* closed loop 法を用いて系統的な評価を行った。

一方、Rho.123 を経口投与後、消化管等に存在するエステラーゼにより代謝されて生じる Rho.110 が血漿中に多く存在することが知られている。したがって、Rho.123 の消化管投与後の血中濃度は代謝物である Rho.110 への変換によっても大きく左右されと考えられる¹⁶⁾。そこで、本節では Rho.123 を消化管内に投与した後の Rho.110 の血漿中濃度に及ぼす各種 Brij の影響についても評価を行った。

また、Rho.123 は蛍光染料であり、細胞内経路を介した上皮細胞層の透過のみならず、細胞間経路を介した透過性の寄与も存在する³⁶⁾ことが報告されたことから、臨床応用されている prednisolone を選択し、用いた Brij の中で、最も吸収促進効果が高い Brij を選び、*in situ* closed loop 法において、prednisolone の消化管吸収性に及ぼす Brij の影響を検討した。

2-1-2 実験方法

【試薬】

Rhodamine 110 (Rho.110) は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。その他の試薬については前章の実験材料に準じた。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、220~260 g) は前章と同様に、清水実験材料株式会社 (京都) から購入した。

【投与液の調製】

In situ closed loop 法による消化管吸収実験に用いた投与液は、P-gp の基質となる薬物である Rho.123 及び prednisolone を 5 mg / kg となるようにし、P-gp modulators として各種 Brij's をそれぞれ 0.05 % の濃度で用いた。投与量については、小腸においては 3 mL / rat とし、pH 7.4 の PBS を用いて調製した。各種薬液は pH 7.4 となるように、NaOH もしくは HCl を用いて調整した。

【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。16~18 時間絶食した Wistar 系雄性ラット (230~260 g) を使用し、腹腔内 pentobarbital sodium (32 mg / kg) 麻酔下、固定台に背位固定した後、開腹手術を行った。小腸ループは、十二指腸上部にカニューレを挿入して結紮し、胆汁の影響を除外するために胆管も結紮した。また、回盲接合部より上部 2 cm の回腸部位にもカニューレを挿入し、結紮することで小腸ループとした。小腸の腸管腔内容物は、10 mL の pH 7.4 の PBS で 2 回洗浄除去し、洗浄後空気を送り込むことにより腸管内の PBS を除去した。あらかじめ頸静脈より blank 用の採血を行った後、薬物と Brij's を混合した薬液を小腸ループ内に投与し、各カニューレをペアンで留めた。その後、4 時間まで経時的に頸静脈から 0.3 mL ずつ採血を行い、ただちに 12000 r.p.m.、5 分間遠心分離することで得た血漿 100 μ L を用い、Rho.123、Rho.110 及び prednisolone それぞれの血漿中濃度を定量した。血漿試料は分析時まで -30 $^{\circ}$ C で保存した。

【薬物の定量】

Rho.123、Rho.110 の定量は、採血により得た 100 μ L のサンプルを 500 μ L の酢酸エチルで除タンパク後、遠心分離 (15,000 r.p.m.、5 min) した。その後、上清を 500 μ L 回収し、試験管に移し、60 $^{\circ}$ C 減圧下で 45 min 間エバポレーションした。さらに、サンプルは 100 μ L 移動相 acetonitrile : 1% triethylamine (pH=3) = 28 : 72 で再溶解し、HPLC 用 96 穴プレートに入れ、蛍光-逆相-HPLC により測定した。

Prednisolone の定量はサンプル 100 μ L を 1000 μ L のアセトニトリルで除タンパク後、遠心分

離 (15000 r.p.m. 5 min) することにより行った。得られた上清を 1000 μ L 回収し、試験管に移し、60 $^{\circ}$ C 減圧下でエバポレーションした。さらに、サンプルは移動相 acetonitrile : 10mM KH_2PO_4 (pH=5) = 30 : 70 で再溶解し、HPLC 用 96 穴プレートに入れ、UV-逆相-HPLC により測定した。

【分析条件】

1. Rho.123 及び Rho.110 の HPLC の分析条件。

使用機器 : Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module
カラム : Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 \times 150 mm, particle size 5 μ m)
移動相 : Acetonitrile : 1% triethylamine (pH = 3, phosphoric acid) = 28 : 72
流速 : 1.0 mL/min
検出器 : Shimadzu Fluorescence Detecor
検出波長 : Ex. 485 nm
Em.528 nm
カラム槽温度 : 40 $^{\circ}$ C

2. Prednisolone の分析条件

使用機器 : Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module
カラム : Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 \times 150 mm, particle size 5 μ m)
移動相 : Acetonitrile : 10 mM KH_2PO_4 (pH 5.0) = 30:70
流速 : 1.0 mL/min
検出器 : UV detector (Shimadzu LC-10)
検出波長 : 242 nm
カラム槽温度 : 35 $^{\circ}$ C

【データ解析】

得られた血漿中濃度推移から、モデル非依存的解析法である Moment 解析により、血漿中薬物-時間曲線から薬物の動態学的パラメーターである AUC を算出した。また、吸収促進比は以下の式 [5] から計算した。

$$\text{EhR} = \frac{\text{AUC}_{\text{Brij}}}{\text{AUC}_{\text{control}}} \quad [5]$$

有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Student-Newman-Keuls 法により行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判断した。

2-1-3 実験結果

2-1-3-1 *In situ* closed loop 法における rhodamine123 の消化管吸収性の検討

In situ closed loop 法において P-gp modulator として各種 Brij を併用投与した際の P-gp の基質となるモデル薬物である Rho.123 の血漿中濃度プロファイルを図 9 に示した。また、得られた血漿中濃度から、薬物動態学的パラメーターを算出し、Table 6 にまとめた。

その結果、Fig. 9 に示すように、Rho.123 と各種 Brij を併用投与した場合の Rho.123 の血漿中濃度は、いずれの Brij を併用した場合においても、コントロールに比べ顕著に増大することが確認された。また、Table 6 より、各種 Brij の併用時において、コントロールと各種 Brij の存在下における AUC の比より算出した EhR は、1.85 - 2.54 倍に増大し、Rho.123 の消化管吸収が有意に改善できることが認められた。これら Brij s の中で、BL-9EX 及び Brij97 による吸収促進作用が最大となったことから、用いた Brij s のうち、BL-9EX 及び Brij97 の P-gp 抑制作用が最も強いことが示唆された。

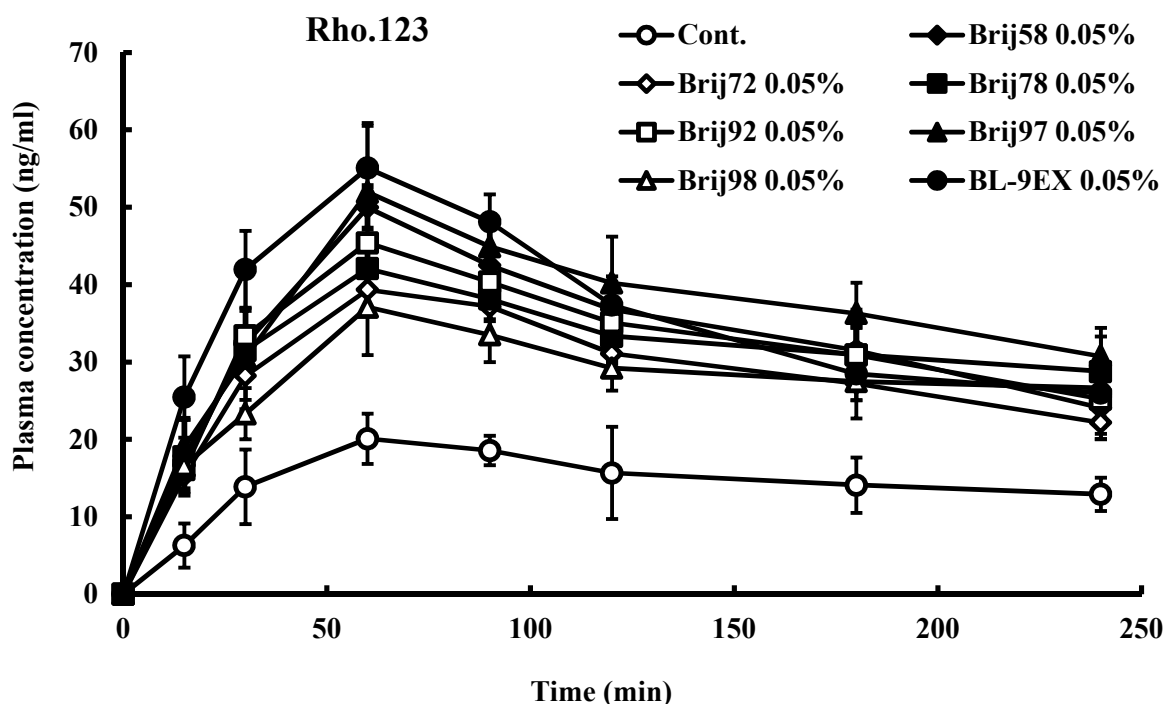


Fig. 9 Effects of 0.05% Brij s on plasma concentration-time profiles of Rho.123 (5 mg/kg) in rat small intestine by an *in situ* closed loop study.

Keys: (○) Cont.; (◆) Brij58 (0.05%); (◇) Brij72 (0.05%); (■) Brij78 (0.05%); (□) Brij92 (0.05%); (▲) Brij97 (0.05%); (Δ) Brij98 (0.05%); (●) BL-9EX (0.05%). Results are expressed as the mean ± S.E. of at least 3 experiments. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Fig. 3A)

Table 6 Pharmacokinetic parameters of Rho.123 after its administration into intestine with or without various types of Brijs (0.05%) *in situ* closed loop method

Groups	Cmax (ng/ml)	Tmax (min)	AUC _{0-240min} (ng · ml ⁻¹ · min)	EhR
Control	21.21 ± 1.79	60.0 ± 10.0	3581 ± 364	--
Brij58	49.97 ± 3.13**	60.0 ± 10.0 ^{N.S.}	8050 ± 460**	2.24
Brij72	39.35 ± 2.67*	60.0 ± 10.0 ^{N.S.}	6737 ± 427*	1.87
Brij78	42.07 ± 1.32**	60.0 ± 10.0 ^{N.S.}	7598 ± 481**	2.11
Brij92	45.41 ± 3.25*	50.0 ± 10.0 ^{N.S.}	7753 ± 397**	2.15
Brij97	51.93 ± 5.21**	70.0 ± 10.0 ^{N.S.}	8787 ± 393**	2.44
Brij98	38.09 ± 4.99*	80.0 ± 10.0 ^{N.S.}	6653 ± 369*	1.85
BL-9EX	55.06 ± 7.44**	70.0 ± 10.0 ^{N.S.}	9193 ± 481**	2.54

The pharmacokinetic parameters of Rho.123 after its administration into intestine were examined by an *in situ* closed-loop method. Rho.123 was enterally administered to rats at the dose of 5 mg/kg and the blood samples were collected at 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min after administration. The concentrations of Rho.123 were measured by HPLC. Data are expressed as the mean ± S.E. of at least 3 rats. (**) P < 0.01, (*) P < 0.05, N.S., no significant difference, compared with the control. ([#]*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Table 5)

2-1-3-2 *In situ* closed loop 法における rhodamine110 の消化管吸収性の検討

In situ closed loop 法において Rho.123 及び各種 Brij を併用投与した際、代謝物である Rho.110 の血漿中濃度プロファイルを図 10 に示した。また、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ーを図 7 にまとめた。

その結果、図 10 の検討で、Rho.110 の血漿中濃度は、各種 Brij を併用しても、コントロールに比べて有意な差が見られなかった。また、図 7 より、各種 Brij の併用時において、コントロールと各種 Brij の存在下における C_{max} 及び AUC も、ほとんど変わらないことが認められた。このことから、各種 Brij は Rho.110 の血中濃度を変化させなかったことから、Rho.123 の代謝に影響しないことが示唆された。

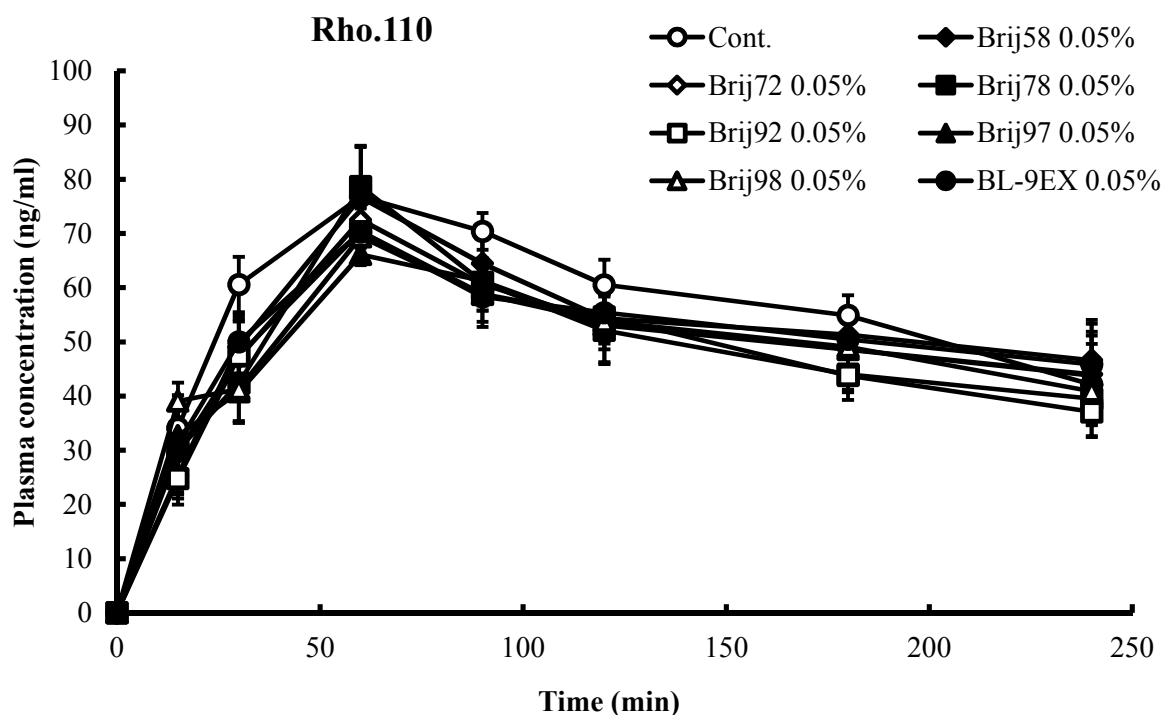


Fig. 10 Effects of 0.05% Brij s on plasma concentration-time profiles of Rho.110 after administration of Rho.123 to rat small intestine by an *in situ* closed loop study.

Keys: (○) Control; (◆) Brij58 (0.05%); (◇) Brij72 (0.05%); (■) Brij78 (0.05%); (□) Brij92 (0.05%); (▲) Brij97 (0.05%); (△) Brij98 (0.05%); (●) BL-9EX (0.05%). Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Fig. 3B)

Table 7 Pharmacokinetic parameters of Rho.110 after administration of Rho.123 (5mg/kg) into intestine with or without various types of Brij's by an *in situ* closed loop method

Groups	Cmax (ng/ml)	Tmax (min)	AUC _{0-240min} (ng · ml ⁻¹ · min)
Control	76.81 ± 3.05	60.0 ± 10.0	14249 ± 280
Brij58	76.65 ± 3.47 ^{N.S.}	60.0 ± 10.0 ^{N.S.}	12647 ± 302 ^{N.S.}
Brij72	72.51 ± 4.20 ^{N.S.}	60.0 ± 10.0 ^{N.S.}	12284 ± 409 ^{N.S.}
Brij78	78.62 ± 7.45 ^{N.S.}	60.0 ± 10.0 ^{N.S.}	11779 ± 580 ^{N.S.}
Brij92	70.35 ± 4.54 ^{N.S.}	50.0 ± 10.0 ^{N.S.}	11489 ± 533 ^{N.S.}
Brij97	66.10 ± 5.48 ^{N.S.}	70.0 ± 10.0 ^{N.S.}	11843 ± 683 ^{N.S.}
Brij98	69.40 ± 4.48 ^{N.S.}	50.0 ± 10.0 ^{N.S.}	12175 ± 402 ^{N.S.}
BL-9EX	70.29 ± 5.52 ^{N.S.}	80.0 ± 10.0 ^{N.S.}	12344 ± 512 ^{N.S.}

The pharmacokinetic parameters of of Rho.110 after administration of Rho.123 (5mg/kg) into intestine were examined by an *in situ* closed-loop method. Rho.123 was enterally administered to rats at the dose of 5 mg/kg and the blood samples were collected at 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min after administration. The concentrations of Rho.110 were measured by HPLC. Data are expressed as the mean ± S.E. of at least 3 rats. N.S., no significant difference, compared with the control.

([#]J. Pharm. Sci., **105**, 1526-1534 (2016); Table 6)

2-1-3-3 *In situ* closed loop 法における prednisolone の消化管吸収性の検討

Fig. 11 及び Table 8 は *in situ* closed loop 法において 0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX 併用時における P-gp の基質である prednisolone の消化管吸収性を検討したものである。

その結果、Fig. 11 より、prednisolone の血漿中濃度は、0.05 % (v/v) Brij97 または BL-9EX の併用により、コントロール群に比べ有意に増加することが認められた。また、得られた血漿中濃度から、薬物動態学的パラメーターを Table 8 にまとめた。0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用時における Cmax はコントロールと比較して、それぞれ 3.38、3.85 倍に増大し、EhR は 2.4 倍以上に上昇することが認められた。

また、本節では、*in situ* closed loop 法における Brij97 及び BL-9EX を併用時による quinidine の消化管吸収性も検討した (データを示していない)。0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の存在下における EhR は、コントロールと比べ、それぞれ 2.48、2.50 倍に増大したことが確認された。

したがって、Brij's は P-gp の基質となるモデル薬物である Rho.123 の消化管吸収性のみならず、臨床で応用されている P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性も改善することが認められた。

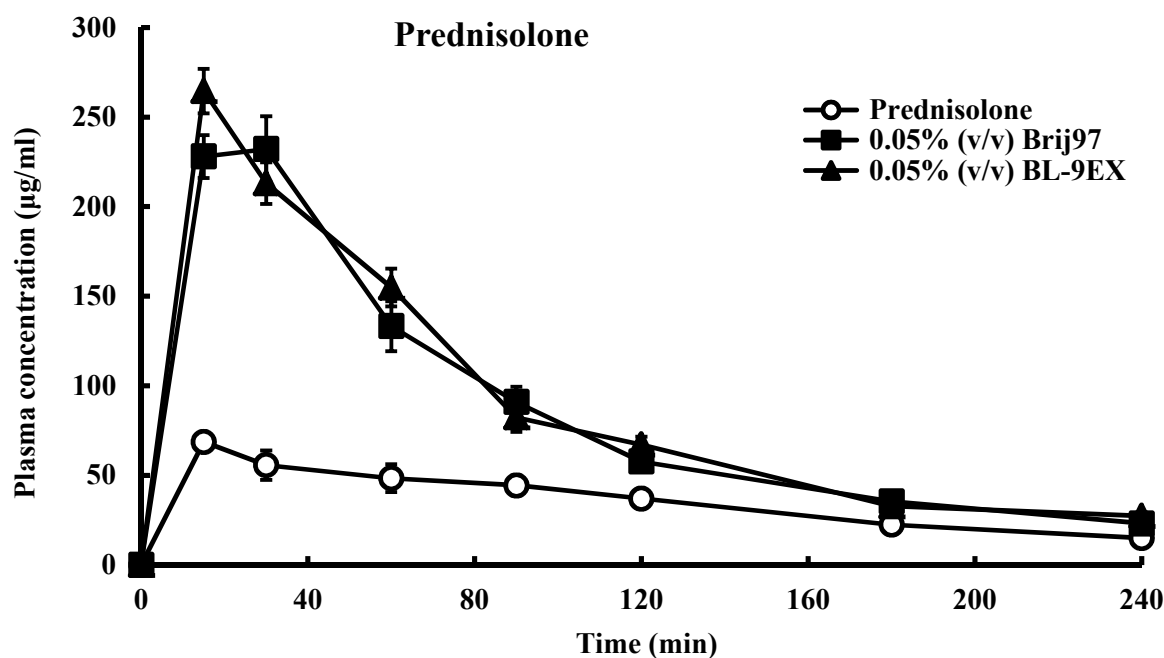


Fig. 11 Effects of 0.05% (v/v) Brij97 and BL-9EX on plasma concentration-time profiles of prednisolone (5 mg/kg) in rat small intestine in an *in situ* closed-loop study.

Keys: (○) Prednisolone control; (■) 0.05% Brij97; (Δ) 0.05% BL-9EX. Results are expressed as the mean ± S.E. of at least 3 experiments. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Fig. 4)

Table 8 Effects of Brij97 and BL-9EX on the pharmacokinetic parameters of prednisolone after its administration into intestine by an *in situ* closed-loop method

Groups		C _{max} (ng/ml)	T _{max} (min)	AUC _{0-240min} (ng · ml ⁻¹ · min)	EhR
Prednisolone		68.7 ± 9.67	15.0 ± 5.0	8580 ± 649	--
Brij97	0.05% (v/v)	232.1 ± 18.6**	30.0 ± 10.0 ^{N.S.}	20800 ± 691**	2.42
BL-9EX	0.05% (v/v)	264.5 ± 12.4**	15.0 ± 5.0 ^{N.S.}	21700 ± 730**	2.53

Effects of Brij97 and BL-9EX on the intestinal absorption of prednisolone were examined by an *in situ* closed-loop method. Prednisolone was administered at a dose of 5 mg/kg to the rat intestinal loop and the blood samples were collected at 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min after administration. The concentrations of prednisolone were measured by HPLC. Results are expressed as the mean ± S.E. of at least 3 rats.

(**) P < 0.01, N.S., no significant difference, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Table 3)

第 2 節 各種 Brij の併用時の消化管粘膜障害性の評価

2-2-1 緒言

本章第一節では、*in situ* closed loop 法を用いて、各種 Brij を併用投与することにより、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性を改善できることが確認された。しかしながら、Brij の併用投与により小腸粘膜障害性が惹起され、薬物の吸収方向の透過性が増加する可能性があると考えられる。また、第一章では、*in vitro* 実験系において、各種 Brij の併用時における各種 P-gp の基質となる薬物の消化管粘膜透過性を増加することが認められたため、*in situ* closed loop 法のみならず、*in vitro* diffusion chamber 法においても、Brij による小腸粘膜障害性を評価することが必要である。

一方、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) は分子量の 130-140 KDa の糖分解酵素である。LDH は、ほとんど全身の細胞の細胞質に存在するが、添加物の毒性により消化管上皮細胞膜が破壊されると、細胞質に存在する LDH が消化管管腔内に遊離し、LDH 活性が増加することが知られている。また、タンパク質も消化管上皮細胞膜の構成成分であるが、添加物の作用により上皮細胞が障害されると、その構成成分であるタンパク質が遊離することが知られている。以前の研究より、*in situ* closed loop 法及び *in vitro* diffusion chamber 法において、タンパク質の漏出量を測定することにより、製剤添加物による消化管粘膜障害性を評価できることが報告されている^{8,9)}。

そこで、本節では *in situ* closed loop 法及び *in vitro* diffusion chamber 法において、LDH 活性及びタンパク質の漏出量を測定し、各種 Brij 併用時の消化管粘膜障害性について評価を行った。

2-2-2 実験方法

【試薬】

CBB G-25、bovine serum albumin (BSA)、LDH CII – assay は和光純薬工業株式会社 (大阪) より、Triton[®] X-100 はナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。その他の試薬については前章の実験材料に準じた。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、220~260 g) は前章と同様に、清水実験材料株式会社 (京都) から購入した。

【KRBB の調製】

前節に準じて調製した。

【投与液の調製】

前節に準じて調製した。

【粘膜障害性実験】

消化管粘膜障害性の評価は *in vitro* diffusion chamber 法及び *in situ* closed loop 法において LDH 活性値とタンパク質の放出を指標にして行った。

In vitro diffusion chamber 法を用いた粘膜障害性の評価実験では、脱血死させたラットから小腸を摘出し、その中から空腸を切り取り、筋層を剥離後 diffusion chamber に装着した。その後、donor 側に 7 mL KRBB (pH 7.4) で溶解した Brijs の投与液を添加し、receiver 側に 7 mL KRBB (pH 7.4) だけを加えた。そして、95 % O₂ / 5 % CO₂ 混合ガスでバブリングし、2 時間後、donor 側よりサンプリング (500 µL) を行った。得られたサンプルは、遠心分離 (15,000 r.p.m.、5 min) し、その上清を用いて、消化管より漏出した LDH 活性値とタンパク質の量を測定した。

In situ closed loop 法における消化管粘膜障害性は、消化管吸収実験 (4 時間) 終了後、小腸ループ内を pH 7.4 の PBS を用いて消化管を洗浄し、消化管管腔液を回収することにより評価した。得られた管腔液は、4 °C、200 G にて 7 分間遠心分離し、その上清を用いて、消化管より漏出した LDH 活性値とタンパク質の量を測定した。

【薬物の定量】

LDH 活性値は、以下の方法により測定した。すなわち、上清を 10 µL 取り、990 µL PBS (pH 7.4) を添加し、100 倍希釈溶液を調製した。続いて、50 µL 希釈溶液を用いて、LDH CII – assay を添加して、室温、光を避けて、45 分間反応させた後、マイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader、POWERSCAN[®] HT、USA) を用いて 590 nm の波長にて吸光度を測定することにより算出した。

漏出したタンパク質の定量は、以下の方法により行った。すなわち、上清を 100 µL 取り、900

μL PBS (pH 7.4) を添加し、10 倍希釈溶液を調製した。続いて、20 μL 希釈溶液を用いて、Bradford 法において試薬 (CBB G-25 10% (w/v)) 200 μL を添加して、室温で 30 分間反応させた後、595 nm の波長にて吸光度を測定することにより算出した。

【データ解析】

LDH 活性値 は SigmaPlot[®] 10.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) の Sigmoidal regression により算出した。有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Student-Newman-Keuls 法により行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判断した。

2-2-3 実験結果

2-2-3-1 各種 Brij's の併用時の小腸粘膜障害性の評価

P-gp modulators として各種 Brij's を併用投与した際による小腸粘膜障害性を Fig. 12 及び Fig. 13 に示した。Fig. 12 では、*in vitro* diffusion chamber 法を用いて、Fig. 13 では、*in situ* closed loop 法を用いて各種 Brij's の消化管粘膜障害性を検討した。

その結果、Fig. 12A 及び Fig. 13A より、*in vitro* と *in vivo* 両実験系において、各種 Brij's の併用時における LDH 活性値は、コントロールと比べ有意な差は認められなかった。一方、positive control として 3 % (v/v) Triton X-100 の LDH 活性値はきわめて高い値を示し、コントロールに比べ有意に増大したのに対し、各種 Brij's 存在下の LDH 活性値はきわめて低いことが明らかになった。

また、Fig. 12B 及び Fig. 13B の検討で、*in vitro* と *in vivo* 両実験系において、Brij's の併用を投与した場合の漏出タンパク質の量は、コントロールに比べてほとんど変わらず、また、3 % (v/v) Triton X-100 併用時におけるタンパク質の量に比べ有意に低い値を示すことが認められた。

このことから、Brij's は比較的安全性の高い製剤添加物であることが明らかとなった。

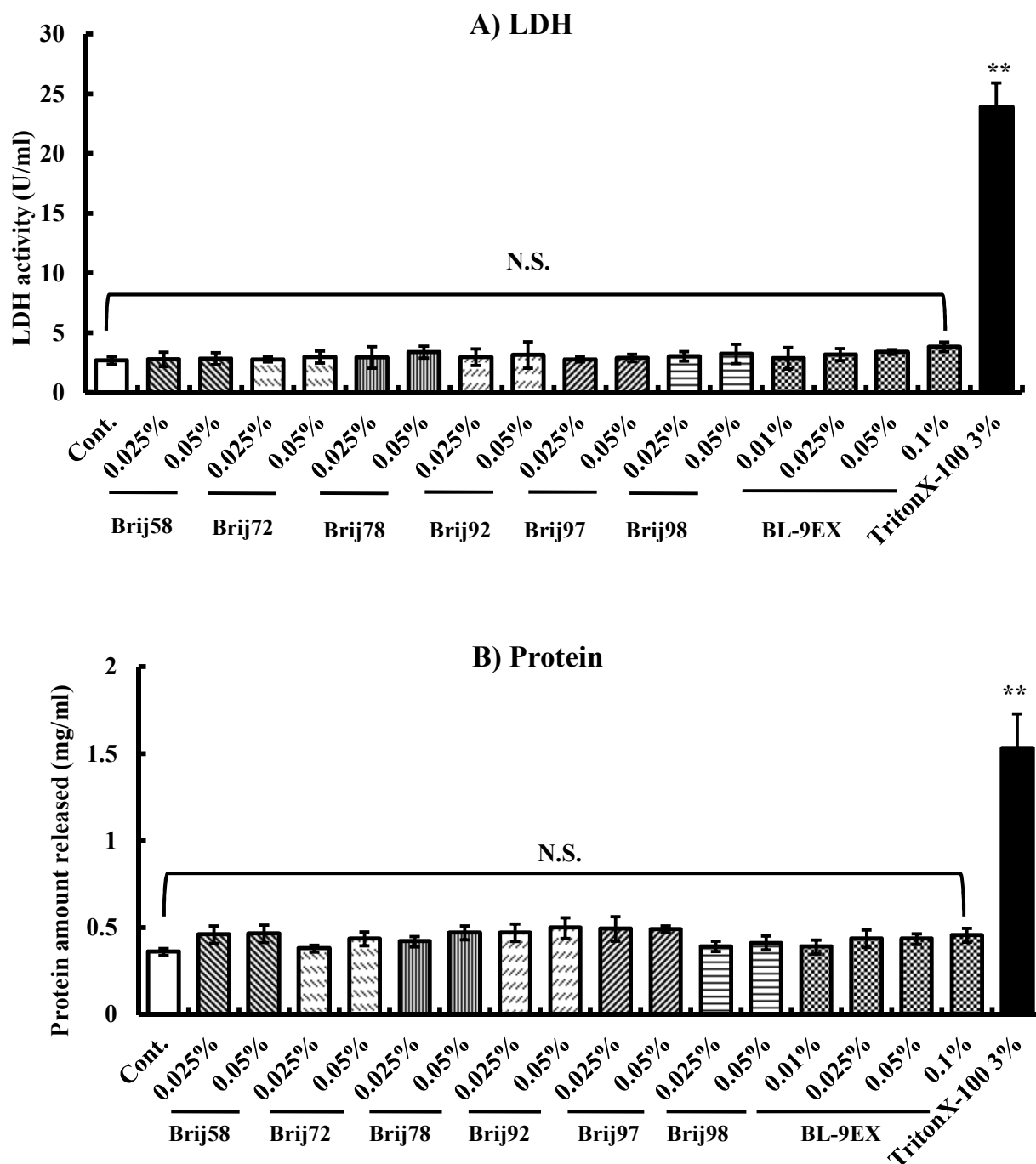


Fig. 12 Membrane toxicity of various Brij surfactants in the rat small intestine by an *in vitro* diffusion chamber method.

(A) The membrane damage was determined by measuring the activities of LDH. (B) The membrane damage was determined by measuring the amount of protein from the small intestinal membranes. Each result represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. (**) $P < 0.01$, N.S., no significant difference, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Fig. 4)

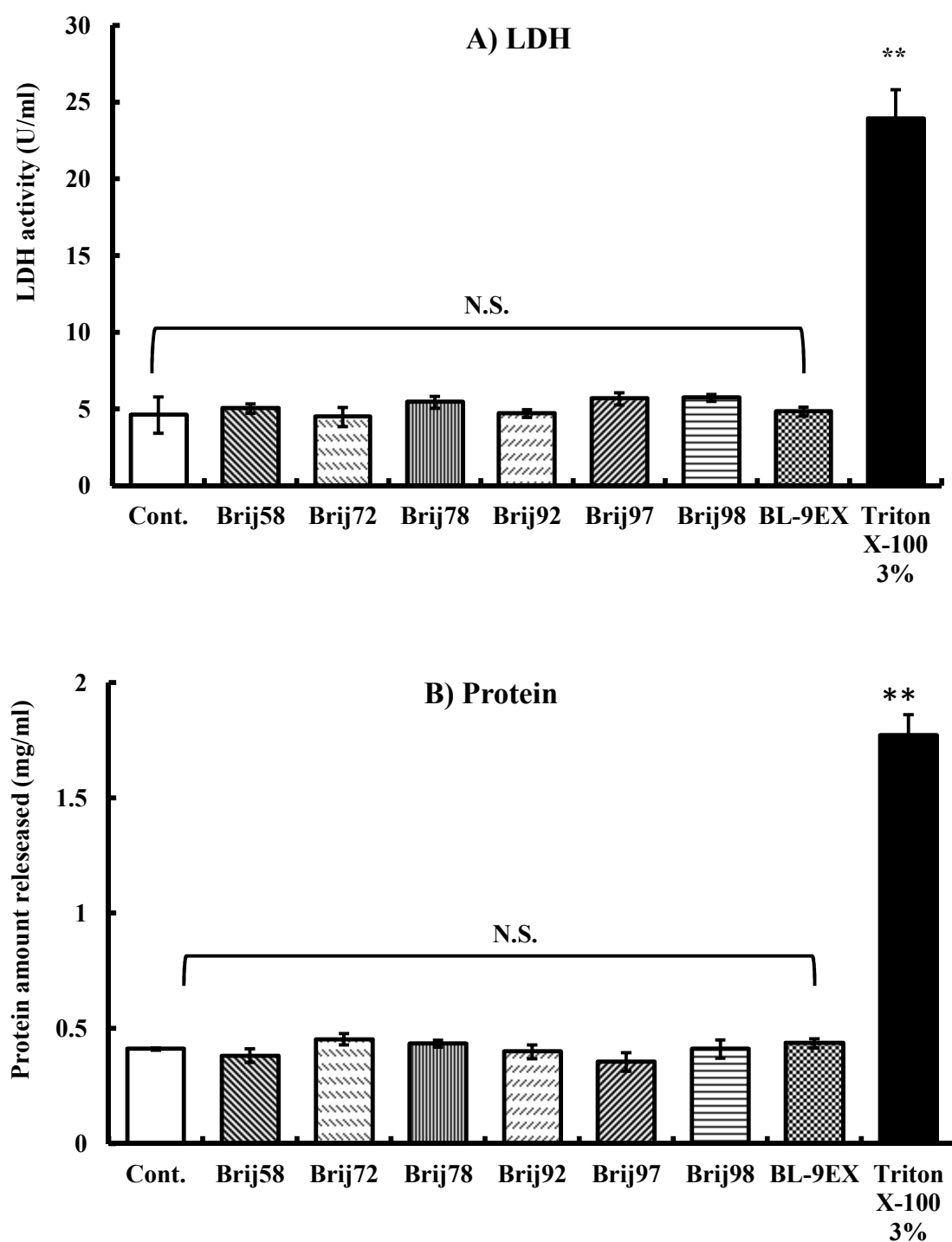


Fig. 13 Membrane toxicity of various Brijs in the rat small intestine by an *in situ* closed loop study. The concentration of Brij was 0.05%. (A) The membrane damage was determined by measuring the activities of LDH. (B) The membrane damage was determined by measuring the amount of protein from the small intestinal membranes. Each result represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. (**) $P < 0.01$, N.S., no significant difference, compared with the control. (*J. Pharm. Sci.*, **105**, 1526-1534 (2016); Fig. 5)

第 3 節 考察

本章では、まず、*in situ* 実験系において P-gp の基質となるモデル薬物である Rho.123 の消化管吸収性に及ぼす各種 Brij の影響を検討するとともに、これら Brij 及び Rho.123 を消化管に併用投与した際、Rho.123 の代謝物である Rho.110 の血中濃度を評価してきた。

Fig. 9 及び Table 6 の検討で、各種 Brij は Rho.123 における AUC 及び Cmax を増加させることが認められた。また、Lin らは *in situ* closed loop 法において典型的 P-gp 阻害剤として verapamil (0.3 mM) を併用投与した場合、Rho.123 の小腸吸収性が増加することを報告した⁹⁾。さらに、以前の研究より、P-gp modulators として Labrasol 及び PEGs が Rho.123 の小腸吸収性が改善できること^{9,28)}が確認された。このことから、Brij は他の製剤添加物と同様に、*in situ* closed loop 法において P-gp の機能を阻害することにより、P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を増加させることが示唆された。用いた Brij の中で、0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX は Rho.123 の EhR をそれぞれ 2.44、2.54 倍増大させたことから、Brij97 及び BL-9EX の P-gp 抑制効果が最も強いことが示唆された (Table 6)。

一方、Rho.123 を投与した後、代謝物である Rho.110 の血漿中濃度及び薬物動態学的パラメーターは各種 Brij を併用しても、有意な差が見られなかった。このことから、Brij を併用した場合 Rho.123 の代謝には影響が認められず、Brij は Rho.123 の消化管吸収過程にのみに影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、Rho.123 が蛍光色素であり、臨床応用している薬物ではないので、臨床で用いられている P-gp の基質である prednisolone 及び quinidine^{59,60)}を選択し、強い P-gp の抑制効果を有する Brij97 及び BL-9EX を用いて、同じように *in situ* closed loop 法において、prednisolone 及び quinidine の消化管吸収性も検討した。その結果、0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用時により、prednisolone 及び quinidine の EhR は 2.4 - 2.5 倍に増加する (Table 8) が認められた。

以上の結果より、各種 Brij を併用投与することにより、P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善することが認められた。また、Brij の HLB、分子量、CMC 及び構造がそれぞれ異なるが、*in vivo* 実験系における結果は *in vitro* 実験系における結果と同様であり、適当な分子量 (300-700) や HLB (12-15) を有して、PEG 鎖を持つ^{32, 33)} Brij の併用により、小腸に存在する P-gp の機能を阻害できることが認められた。

しかしながら、一般に、Brij をはじめとする界面活性剤を高濃度で消化管粘膜に投与すると、消化管粘膜を可溶化し、粘膜障害性を惹起することが知られている。したがって、P-gp の基質である薬物に各種 Brij を併用投与した場合、P-gp の機能抑制作用ではなく、粘膜障害性により、これら薬物の消化管粘膜透過性や吸収性が増大する可能性がある。このため、各種 Brij を併用投与した場合の小腸粘膜障害性を評価することが重要である。従来から、製剤添加物や吸収促進剤の粘膜障害性は、生物学的マーカーとして消化管粘膜から遊離したタンパク質や LDH の量を測定することにより評価されている⁶¹⁾。LDH は元来細胞質内に存在する乳酸脱水素酵素であり、またタンパク質は生体膜の構成成分である。したがって、消化管管腔液中に存在する LDH 量とタンパク質は一般に細胞膜障害性の指標となる。

そこで本章では、*in situ* closed loop 法だけではなく、*in vitro* diffusion chamber 法にもおいて、

各種 Brij を併用投与した際に漏出した LDH 活性値とタンパク質の量を測定することにより、各種 Brij の小腸粘膜障害性を評価した。その結果、*in vitro* と *in vivo* 両実験系において、各種 Brij の併用時の LDH 活性値とタンパク質の量は、対照群に比べ有意な差が認められなかった (Fig. 12, Fig. 13)。一方、positive control である Triton X-100 (3%, v/v) と比較した場合、各種 Brij 存在下における LDH 活性値とタンパク質の量はきわめて低いことが明らかになった (Fig. 12, Fig. 13)。これらの結果より、Brij の併用により P-gp の基質である薬物の吸収方向の透過性の増加は、消化管粘膜障害性に起因するものではないことが示唆され、低い濃度の Brij は有効かつ安全性の高い製剤添加物であることが認められた。

しかしながら、Brij がどのような機構で消化管上皮細胞膜に存在する P-gp の機能を抑制し、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収性を増大させるかについて不明である。現在までに知られているいくつかの P-gp 機能の阻害の抑制メカニズムは、P-gp の ATPase の競合的または非競合的に阻害すること⁶²⁾、P-gp の発現をダウンレギュレーションすること⁶³⁾、細胞膜流動性の変化により P-gp のコンフォメーションを変化させ⁶⁴⁾、立体的に基質結合を妨げること⁶⁵⁾、共有結合的に P-gp のヌクレオチド結合ドメインに不可欠なシステインを修飾すること⁶⁶⁾などが報告されている。このため、Brij による P-gp の阻害機構を詳しく検討することが重要である。そこで第三章では、各種 Brij を併用投与した場合の P-gp の阻害機構について論述する。

第 4 節 小括

本章では、*in situ* closed loop 法において、Rho.123 の消化管吸収性は各種 Brij の併用により有意に増加したの対し、その代謝物である Rho.110 の消化管吸収性は Brij を併用してもほとんど変化しなかったことが認められた。また、他の P-gp の基質となる薬物である prednisolone の消化管吸収性は、用いた Brij の中で最も高い吸収促進効果を有する BL-9EX 及び Brij97 の併用により有意に増加した。さらに、*in vitro* 及び *in vivo* 両実験系において、小腸粘膜から遊離した LDH 活性値及びタンパク質漏出量は、各種 Brij を併用投与してもコントロールと比べて有意な差は見られないことが確認された。

以上のことから、Brij は P-gp 基質となる薬物の消化管吸収性を改善できる有効かつ安全性が高い製剤添加物であることが認められた。

第三章 各種 Brij's による P-gp 阻害機構の解明

第 1 節 *In vitro* 法における各種 Brij's の吸収促進機構の評価

3-1-1 緒言

第一章及び第二章では、*in vitro* 及び *in vivo* 実験系において、各種 Brij's は P-gp の基質である Rho.123 などの薬物の消化管吸収性を改善し、吸収促進効果を有する可能性が高いことが認められた。一般に薬物の細胞膜透過経路は、細胞間経路または細胞内経路の二つに大別される (Fig. 14)。細胞内経路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り、吸収促進剤などが脂質二重膜を変化させ、その流動性を変えることにより難吸収薬物の吸収性が改善できる。一方、細胞間経路は上皮細胞層及び内皮細胞層における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り、隣接する細胞同士の接着分子構造として **tight junction** に制御されることより、薬物の透過性が増大することが知られている^{46,68)}。前章まで示したように、各種 Brij's の併用により主に細胞内経路を介して膜透過する化合物である Rho.123 の消化管吸収性は改善されたものの、Brij's の吸収促進機構を解明するためにはさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

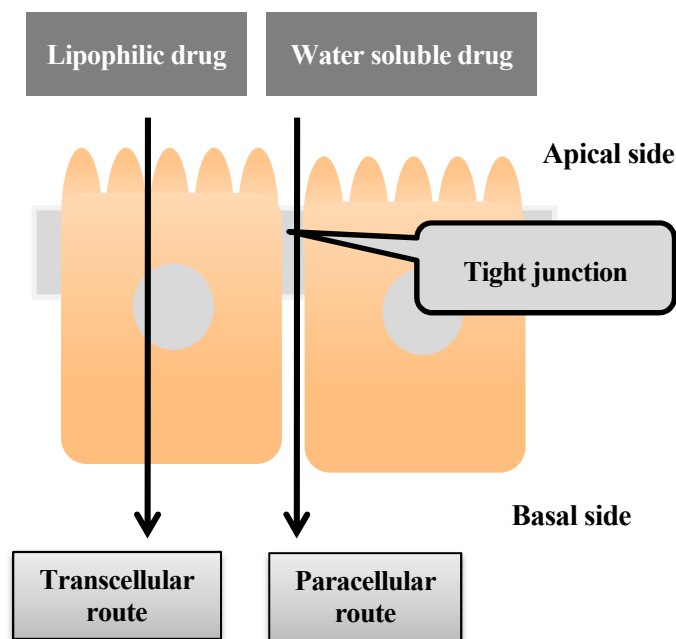


Fig. 14 Scheme of transport routes of drugs across the epithelial cells

5(6)-carboxyfluorescein (CF) は細胞間経路を介して吸収輸送されるモデル薬物であり、また P-gp の基質ではないことが知られている^{9,67)}。また、Caco-2 細胞は、tight junction 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、Caco-2 細胞を用いて膜抵抗値を経時的に測定することにより、Brij's の吸収促進機構を評価することができると考えられる。

そこで本節では、Brijs の吸収促進メカニズムに *tight junction* の開口に伴う細胞間経路を介した薬物の透過性増大作用が関与しているか否かについて評価するため、*in vitro* diffusion chamber 法において、CF の粘膜透過性を評価し、*in vitro* Caco-2 細胞を用いて膜抵抗値 (TEER) に及ぼす各種 Brijs の影響について検討した。

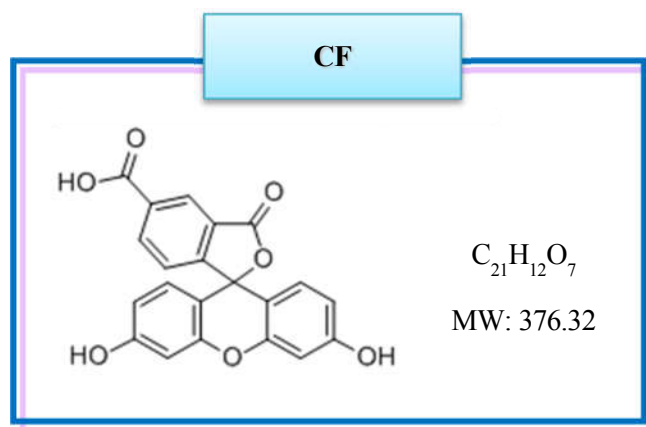


Fig. 15 The chemical structure of 5(6)-carboxyfluorescein (CF)

3-1-2 実験方法

【試薬】

CF は Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA) より、供与して頂きた。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、220~260 g) は前章と同様に、清水実験材料株式会社 (京都) から購入した。

【KRBB 及び HBSS の調製】

第一章に準じて調製した。

【投与液の調製】

In vitro diffusion chamber 法による消化管粘膜透過実験に用いた投与液は、CF を 10 μ M となるように調製した、また、各種 Brij's の濃度は 0.05 % となるように KRBB (pH7.4) に溶解した。

【消化管粘膜透過実験】

消化管粘膜透過実験は、第一章に準じて、*in vitro* diffusion chamber 法を用いて行った。透過実験終了後、得られたサンプルのうち 100 μ L をマイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader、POWERSCAN[®] HT、USA) を用いて Ex. 485 nm、Em. 528 nm の波長にて蛍光強度を測定した。その後、CF の累積透過量と Papp を算出した。

【TEER の評価】

Caco-2 細胞透過実験を行った同時に、Caco-2 細胞単層膜の TEER 値の変化は Millicell[®]-ERS meter (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて 6 時間まで経時的に測定した。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。

【データ解析】

Papp 及び ER は第一章に準じて計算した。

さらに、有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Student-Newman-Keuls 法により行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判断した。

3-1-3 実験結果

3-1-3-1 5 (6) - carboxyfluorescein の消化管粘膜透過性に及ぼす各種 Brij's の影響

水溶性薬物である CF は主に 細胞間経路 を介して消化管上皮細胞を透過し、P-gp の基質ではないことが知られている^{9,67)}。Fig. 16 及び Table 9 では *in vitro* diffusion chamber 法において、CF の消化管粘膜透過性に及ぼす各種 Brij's の影響について検討した。

その結果、Fig. 16 より、CF の吸収方向および排出方向の累積透過量は 0.05 % (v/v) BL-9EX を併用しても、コントロールと比べ有意な差が認められなかった。また、Table 9 より、CF の P_{app} は各種 Brij's を併用してもコントロールとほとんど変わらないことが認められた。したがって、Brij's により Rho.123 など P-gp の基質である薬物の吸収方向の透過性が増大する原因として Brij's の吸収促進効果は関与せず、消化管に発現する P-gp の機能を抑制する可能性が高いことが示された。

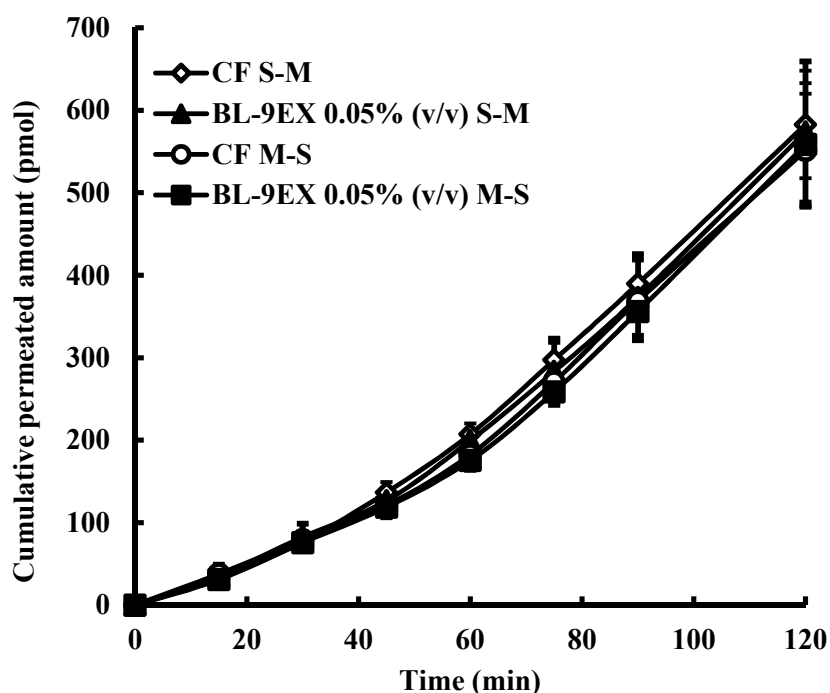


Fig. 16 Time course of absorptive transport (M-S) and secretory transport (S-M) (B) of 5 (6) - carboxyfluorescein (CF) across the rat jejunal membrane in the absence or presence of 0.05% (v/v) BL-9EX Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least three experiments.

Table 9 Apparent permeability coefficients (Papp) of CF in the presence of various types of Brijs (0.05%) by an *in vitro* diffusion chamber method

Groups	Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s)		ER
	M-S	S-M	
Control	5.49 \pm 0.43	6.55 \pm 0.23	1.19
Brij58	5.95 \pm 0.11 ^{N.S.}	6.73 \pm 0.11 ^{N.S.}	1.13
Brij72	5.96 \pm 0.21 ^{N.S.}	6.48 \pm 0.16 ^{N.S.}	1.08
Brij78	5.57 \pm 0.09 ^{N.S.}	6.76 \pm 0.19 ^{N.S.}	1.21
Brij92	5.93 \pm 0.07 ^{N.S.}	6.69 \pm 0.33 ^{N.S.}	1.12
Brij97	5.87 \pm 0.21 ^{N.S.}	6.42 \pm 0.34 ^{N.S.}	1.09
Brij98	5.46 \pm 0.13 ^{N.S.}	6.54 \pm 0.10 ^{N.S.}	1.17
BL-9EX	5.57 \pm 0.24 ^{N.S.}	6.59 \pm 0.15 ^{N.S.}	1.18

Effects of Brijs on apparent permeability of CF across rat intestinal membranes were determined by an *in vitro* diffusion chamber method. The samples were collected at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min. The concentrations of CF were measured by fluorescence spectrophotometer. Data are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. N.S.: no significant difference, compared with the control. ([#]*J. Pharm. Sci.*, 105, 1526-1534 (2016); Table 3)

3-1-3-2 Caco-2 細胞透過実験における膜抵抗値に及ぼす各種 Brij の影響

Fig. 17 は 0.0025 % Brij を併用した際の TEER (A-B) を評価したものである。Tight junction を開口すると、TEER が低下することが知られている。その結果、0.0025 % Brij の併用時における TEER はコントロール群に比較して、ほとんど変化が見られなかった。したがって、各種 Brij の吸収促進機構には細胞間経路の tight junction の開口が関与していないことから、Brij は消化管に発現する P-gp 機能を抑制することにより、薬物の消化管粘膜透過性を改善する可能性が示唆された。

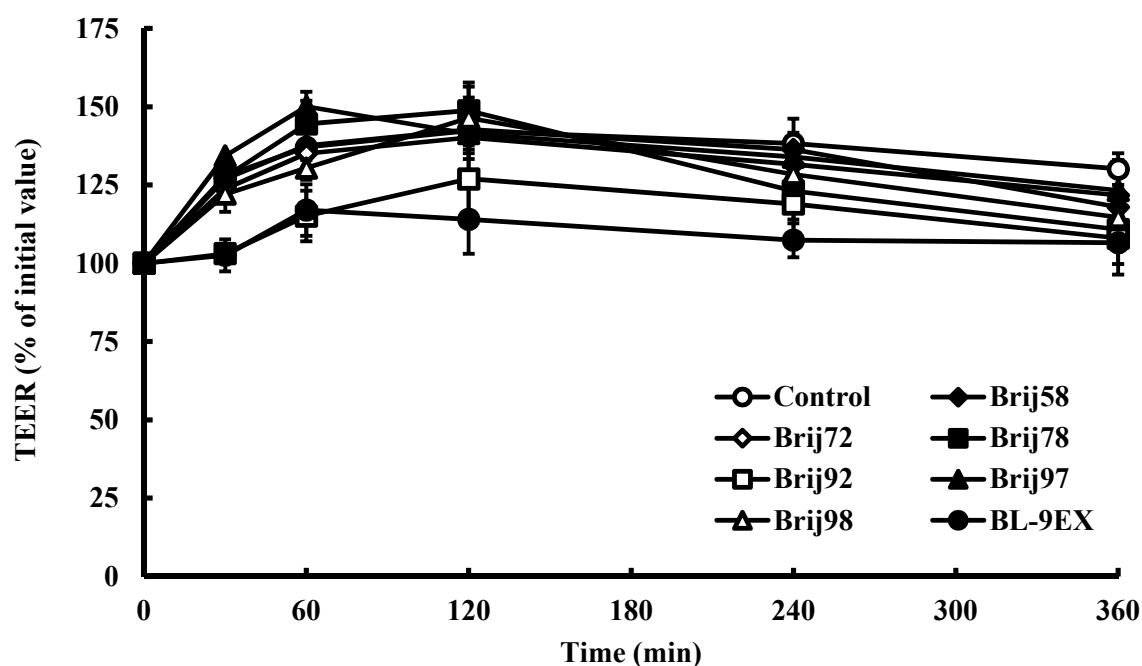


Fig. 17 Effect of Brij (0.0025%) on TEER in an *in vitro* Caco-2 cell permeability experiment.

The dose of rhodamine 123 was 10 μ M. Keys: (○) Control; (◆) Brij58 (0.0025%); (◇) Brij72 (0.0025%); (■) Brij78 (0.0025%); (□) Brij92 (0.0025%); (▲) Brij97 (0.0025%); (△) Brij98 (0.0025%); (●) BL-9EX (0.0025%). Results are expressed as the mean \pm S.E. of at least 3 experiments. ([#]*J. Pharm. Sci.*, 105, 1526-1534 (2016); Fig. 2)

第 2 節 各種 Brij's による P-gp 阻害機構の解明

3-2-1 緒言

本章前節では、Brij's の吸収促進機構には 細胞間経路 を介した薬物の透過性上昇は寄与していないことが示唆された。また、第二章では Brij's の併用により薬物の消化管吸収性の増加は、粘膜障害性に起因するものではないことが認められた。このことから、Brij's は P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善できる機構は、P-gp の機能を直接抑制する可能性が高いと考えられ、Brij's による P-gp の阻害機構を解明することが重要である。

P-gp は ATP 酵素の一種類であり、分子量が約 170 KDa であり、膜結合 ABC トランスポーター (ATP-binding cassette transporter) スーパーファミリーに属する。P-gp は 1280 個のアミノ酸を有する一本鎖で構成されており、2 回の繰り返し構造部分がそれぞれ、6 つの膜貫通 (transmembrane, TM) ドメインと 1 つのヌクレオチド結合 (nucleotide-binding, NB) ドメインを有する (Fig. 18)。

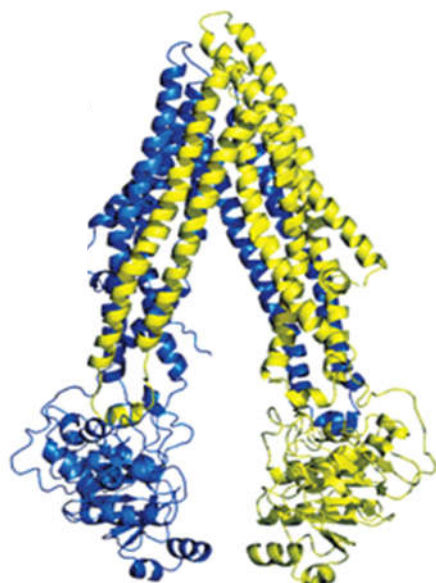


Fig. 18 The crystal structure of P-gp

また、TM ドメインが基質に認識及び結合されること、NB ドメインは ATP と結合されること、これら二つの部分は線形ポリペプチドの可変領域によって分離されることが知られている⁶⁹⁾。

従来の verapamil のような P-gp 阻害剤の P-gp 阻害機構として、P-gp の基質となる薬物が競合的に各々の薬物透過を阻害する機構⁶²⁾、及び P-gp のタンパク質発現が低下する機構⁶³⁾が知られている。最近の研究では、P-gp modulators として Pluronic、Tween、Labrasol などの非イオン性界面活性剤が P-gp の阻害効果を有することが示された^{27,61,64)}。また、従来の P-gp 阻害剤と異なり、主に膜流動性の変化^{27,61,64)}、P-gp の ATPase 活性の阻害あるいは細胞内 ATP レベルの低下^{33,64,70)}によって、P-gp の機能に影響する物質も見出されている。

また、現在までに見い出されている P-gp 阻害効果を有する界面活性剤のうち、ほとんどすべての非イオン性界面活性剤が膜流動性を変化（増加また減少）させることから、膜流動性の変化は重要な P-gp の阻害機構の一つであることが認められている。また、P-gp の基質は主に疎水性物質であり、その脂質--水分配係数 (lipid/water partition coefficient) が高いので、細胞内の水相から細胞膜の脂質内に分散することが容易である。一旦細胞の膜流動性が変化すると、細胞膜の脂質の変化により脂質--水分配係数を低下させることから、細胞膜内に取り込まれる P-gp の基質を減少させ、輸送速度を抑制できることが認められている (Fig. 19)。以前の研究では、Rege らは Tween 80 及び Cremophor EL は、細胞膜の流動性を増加させるが、vitamin E TPGS は膜流動性を低下させることを報告している²⁷⁾。また、Pluronic P85 は膜流動性の増加により P-gp のコンフォメーションを変化させることから、P-gp が ATP と結合する能力を低下させることが認められ

ている⁶⁴⁾。以上のことから、本節では、Brijs の P-gp 阻害メカニズムに膜流動性変化による P-gp の立体構造変化を介した薬物の透過性増大が関与しているか否かについて評価するため、膜流動性に及ぼす Brijs の影響について検討した。なお、膜流動性変化の評価には、一般的に蛍光偏光解消法が用いられており、本研究では脂質内部、脂質外部や膜タンパク部分に各種蛍光プローブとして DPH (Fig. 20A)、tma-DPH (Fig. 20B)、DNS-CL (Fig. 20C) でラベル化したラット小腸の brush border membrane vesicles (BBMV) を用い、蛍光偏光度に及ぼす Brijs の影響について検討を行った。

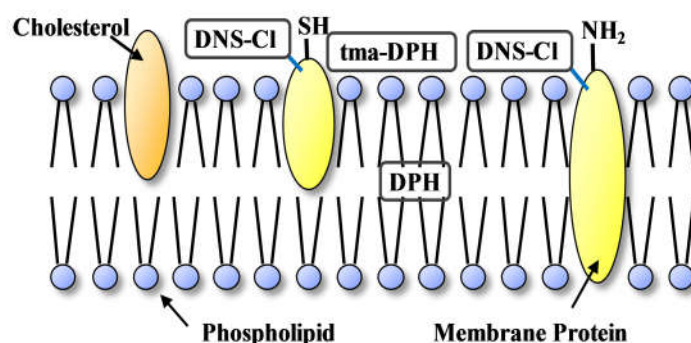


Fig. 19 Evaluation of membrane fluidity of lipid membrane.

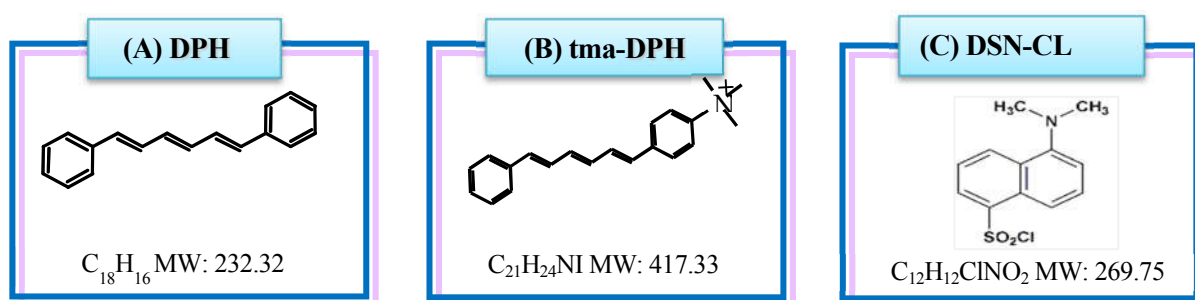


Fig. 20 Chemical structures of fluorescent probes.

さらに、P-gp 自身は、ATP 酵素の一種であるため、このように ATP 酵素の活性を阻害することにより、直接、P-gp 排出機能に影響を与えることが明らかになっている。従来の研究から、いくつかの非イオン性界面活性剤は P-gp の基質となる薬物の排出を減少させるとともに、ATPase の活性も抑制させることが報告されている^{64,70,71)}。そこで、本研究では ATP が ADP 及びリン酸に反応する際の P-gp 由来のリン酸を定量することにより、P-gp 由来の ATP 活性を算出した。また、本実験方法ではオルソバナジンは、ABC トランスポーターの ATPase 活性を阻害するため、オルソバナジン未添加状態の ATPase 活性から、オルソバナジン添加状態の ATPase 活性を差し引いて P-gp に由来する ATPase を測定した (Fig. 21) ことより、Brijs 併用時における P-gp ATPase の活性の影響を評価した。

また、第一章及び第二章では、本研究で用いた Brijs の中で、Brij97 及び BL-9EX が最も強い P-gp 阻害効果を有することが確認されたため、本節ではこれらの製剤添加物を用いて、Brij97 及び BL-9EX による膜流動性及び P-gp ATPase の活性の影響について検討した。

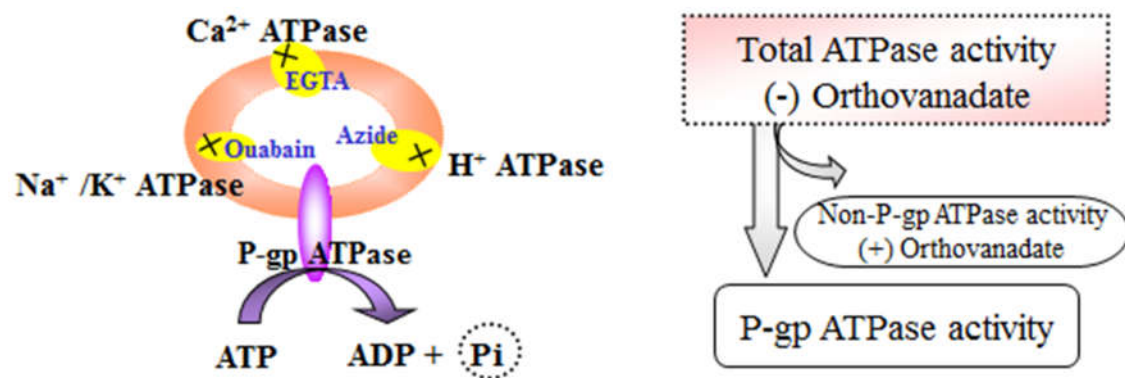


Fig. 21 The measurement of P-gp ATPase activity.

3-2-2 実験方法

【試薬】

[N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride] (W-71-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-p-toluenesulfonate (tma-DPH)、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol 999 (Tris) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) より、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA)、dansyl chloride (DNS-Cl) はナカライテスク株式会社 (京都、日本) より、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA) よりそれぞれ購入した。また、Human MDR1 (ABCB1) Membranes 及び ABC transporter ATPase kit を GenoMembrane Inc., (神奈川、日本) より購入した。他の試薬が前章に準じて調製した。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、240~260 g) は前章と同様に、清水実験材料株式会社 (京都) から購入した。

【投与液の調整】

Brij97 及び BL-9EX をそれぞれ、0.01 – 0.1 % (v/v) の濃度を用いた。

【ラット小腸 BBMV の調製】

Brush border membrane vesicles (BBMV) は Prabhu らの方法に準じ、 Mg^{2+} 沈殿法により調製した⁷²⁾。16 ~ 18 時間絶食した Wistar 系雄性ラットを使用し、腹腔内 pentobarbital sodium (32 mg/kg) 麻酔下、小腸管腔内容物を氷冷した生理食塩水で洗浄後、脱血死させた。その後、小腸を摘出して氷冷した生理食塩水で洗浄後、スライドガラスを用いて小腸粘膜を剥ぎ取り、集めた粘膜を homogenizing buffer (12 mM Tris, 5 mM EGTA, 300 mM mannitol, pH 7.4 by 1 M HEPES) で 10 g / 100 mL となるように調整後、Polytron tissue grinder を用いて 90 s (30 s × 3 回) ホモジナイズした。上記の懸濁液に 1 M $MgCl_2$ stock solution を添加し、最終濃度が 10 mM $MgCl_2$ となるようにした。この懸濁液を 1 min 攪拌したあと、4 °C で 15 min 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 (3000 g, 10 min, 4 °C) し、沈殿物を除去後、上清を再度遠心分離 (32000 g, 30 min, 4 °C) した。上清を除去後、brush border membrane を含む沈殿物を homogenizing buffer 中で 27 G の針を用いて再懸濁した。タンパク濃度は bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて定量し、最終タンパク濃度が 0.1 mg/mL となるように、使用時に HEPES-Tris buffer を用いて調製した。BBMV サンプルは使用時まで -80 °C で保存した。

【蛍光偏光解消法】

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-2000 (株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京、日本) を用いて測定した。HEPES-Tris buffer を用いて調製した BBMV (0.1 mg protein/mL) は各種蛍光プローブを用いてラベル化した。ラベル化は、DPH (1 μ M)、DNS-Cl (5 μ M) を用いた際には 30 min、37 $^{\circ}$ C、また tma-DPH (0.5 μ M) を用いた際には 3 min、37 $^{\circ}$ C でそれぞれインキュベートすることにより行った。その後、ラベル化した BBMV に Brij97 または BL-9EX をそれぞれ混合し、2 枚の polarizer を 90 度ずつ回転させて 4 種類の蛍光強度を 37 $^{\circ}$ C で測定した。なお、DPH、tma-DPH については 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。偏光の傾き具合を表す指標である蛍光異方性 γ (fluorescence anisotropy) は以下の式 [6] により算出した。

$$\gamma = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + G \cdot 2 \cdot I_{vh}} \quad [6-1]$$

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad [6-2]$$

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、h は水平 (horizontal)、v は垂直 (vertical) 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。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。

粘性の高い溶媒中の物質から発する蛍光は、一般に偏光性を持つと知られている。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、その運動性を司っている媒質の運動性を知る方法である。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ーが蛍光異方性 γ として求められ、本研究では γ を膜流動性の指標として用いた。もし蛍光分子が激しく回転ブラウン運動していれば γ は小さくなり (これが偏光解消である)、この γ の値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。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、蛍光物質の回転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、細胞内経路を介した薬物透過性が増大することが知られている。本研究では、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^{73,74,75)}、これらのプローブでラベル化したラット小腸の BBMV を用いて検討を行った。

【P-gp ATPase 活性の測定】

P-gp ATPase 活性の測定は以前の研究より評価した^{33,64,71,76)}。先に、20 μ g human MDR1 membranes を含む 10 μ L reaction buffer (50 mM MOPS-Tris, 5 mM sodium azide, 2 mM dithiothreitol, 1 mM ouabain, 0.1 mM EGTA and 50 mM KCl.) を 96 穴透明プレートに添加し、その後 20 μ L 0.15%

Brijs または 150 μ M verapamil (PBS または 0.1mM quinidine に調製した) が加えた。また、同一の反応混合物に 10 μ L 3mM sodium orthovanadate を含む溶液を添加して、3 分間プレインキュベーションした。その後、20 μ L 12mM MgATP を加えて同時に反応させた。その時、Brijs 及び verapamil の濃度は 0.05 %、50 μ M になった。30 分間プレインキュベーションした後で、反応停止液として、10 % の SDS の 30 μ L を加え、15 mM zinc acetate、10 % ascorbic acid を 1:4 になるように調整した溶液に 35 mM ammonium molybdate 溶液 200 μ L を各々のサンプルに加えた。これらすべてを 30 min、37 °C で反応させ、無機リン酸塩量を 630 nm の波長でマイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。ATPase 活性値は以下の式 [7] から計算するより評価した。

$$\text{P-gp ATPase activity} = \text{Total ATPase activity (without orthovanadate)} - \text{non-P-gp ATPase activity (with orthovanadate)} \quad [7]$$

Orthovanadate は、ABC トランスポーターの ATPase 活性を阻害するため、orthovanadate 未添加状態の ATPase 活性から、orthovanadate 添加状態の ATPase 活性を差し引いた活性 (orthovanadate-sensitive ATPase activity) が MDR1 に由来する ATPase 活性となる。

【データ解析】

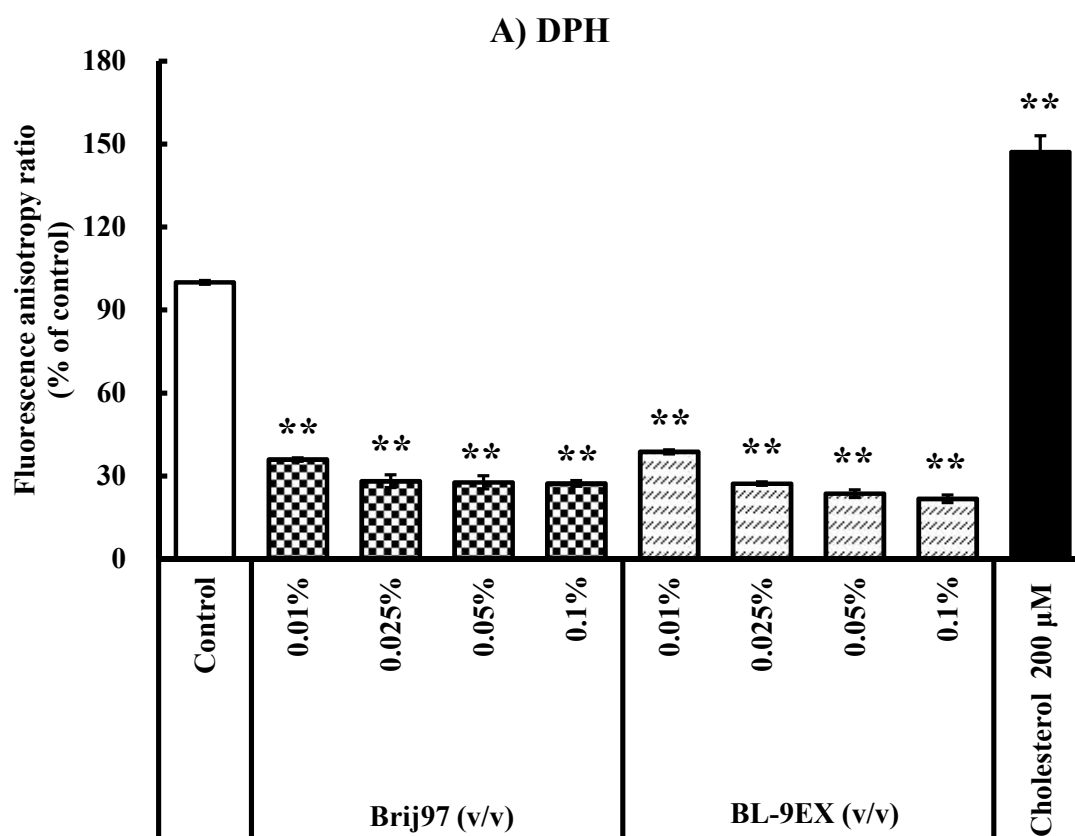
膜流動性 及び P-gp ATPase 活性の解析は前に説明に準じて計算した。

さらに、有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Student-Newman-Keuls 法により行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判断した。

3-2-3 実験結果

3-2-3-1 膜の流動性に及ぼす各種 Brij の影響

Fig. 22 は蛍光プローブとして DPH、tma-DPH、DNS-CL を用いて、ラット小腸の BBMV における、各種濃度の Brij97 及び BL-9EX を併用時の膜流動性を検討したものである。なお、DPH は内部脂質二重層の疎水性コアの流動性を測定する蛍光プローブであり⁶⁴⁾、tma-DPH は外側脂質二重層の極性部領域の流動性を評価する蛍光プローブであり²⁷⁾、DNS-CL は膜中のタンパク質の流動性を評価する蛍光プローブである⁷⁷⁾。また、Fig. 22 の縦軸には対照群を 100 % とした際の蛍光異方性比 (fluorescence anisotropy ratio) 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ということが示唆される⁷³⁻⁷⁵⁾。その結果、0.01 - 0.1 % Brij97 及び BL-9EX を添加した場合、これら 3 つの蛍光プローブの蛍光異方性比は、コントロールと比べ有意に減少することが確認された。特に、Brij97 及び BL-9EX を併用時における DPH の蛍光異方性比は、他の蛍光プローブの蛍光異方性に比較して低下することが見られた。一方、positive control として 200 μ M cholesterol の DPH、tma-DPH 及び DNS-CL の蛍光異方性比はきわめて高い値を示し、コントロールに比べ有意に増大したのに対し、各種 Brij 存在下のこれらの蛍光プローブはきわめて低いことが明らかになった。以上の結果より、Brij は脂質外部及び膜中のタンパク質の流動性を増大させ、特に脂質内部の膜流動性を顕著に増加させることにより、P-gp 機能を阻害する可能性が示唆された。



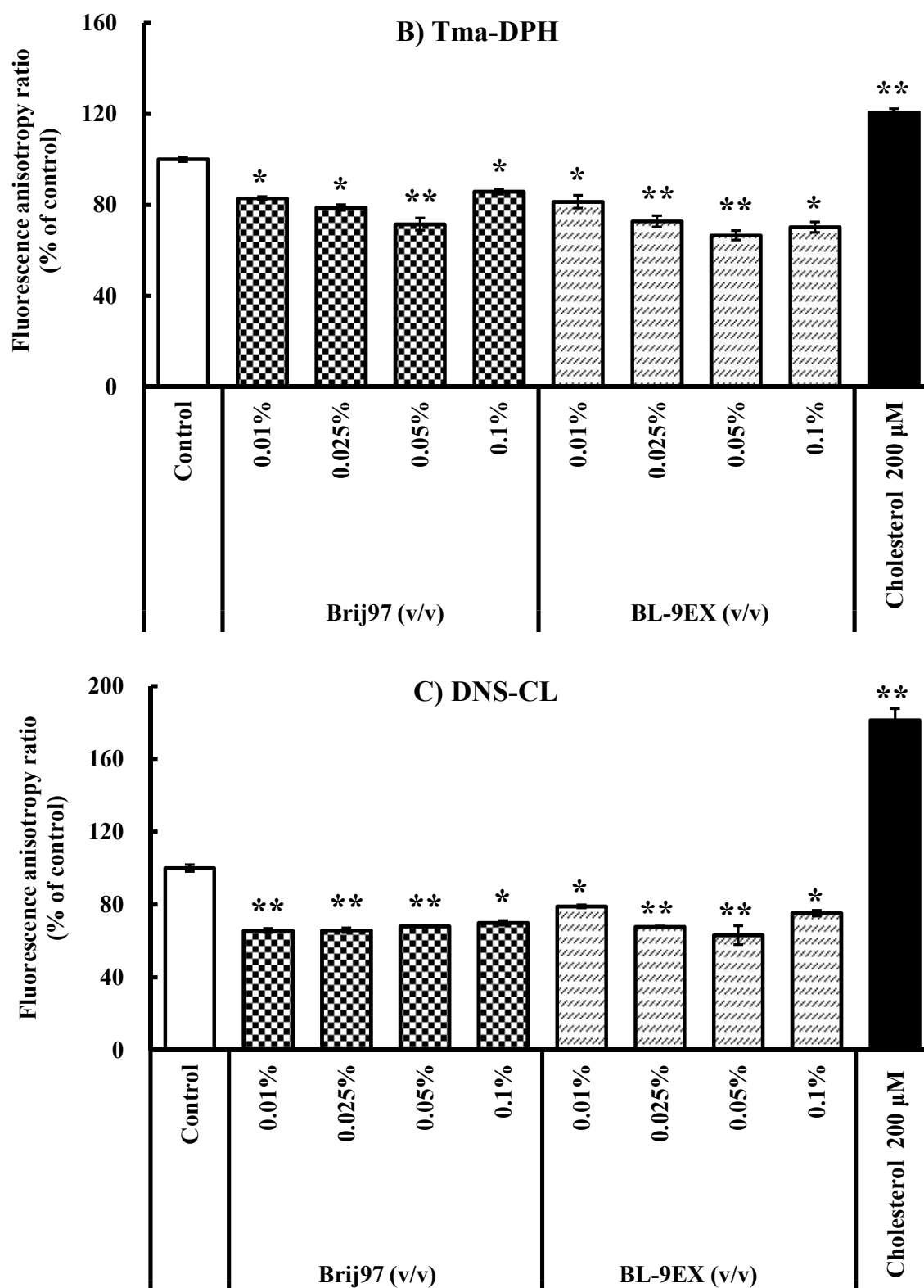
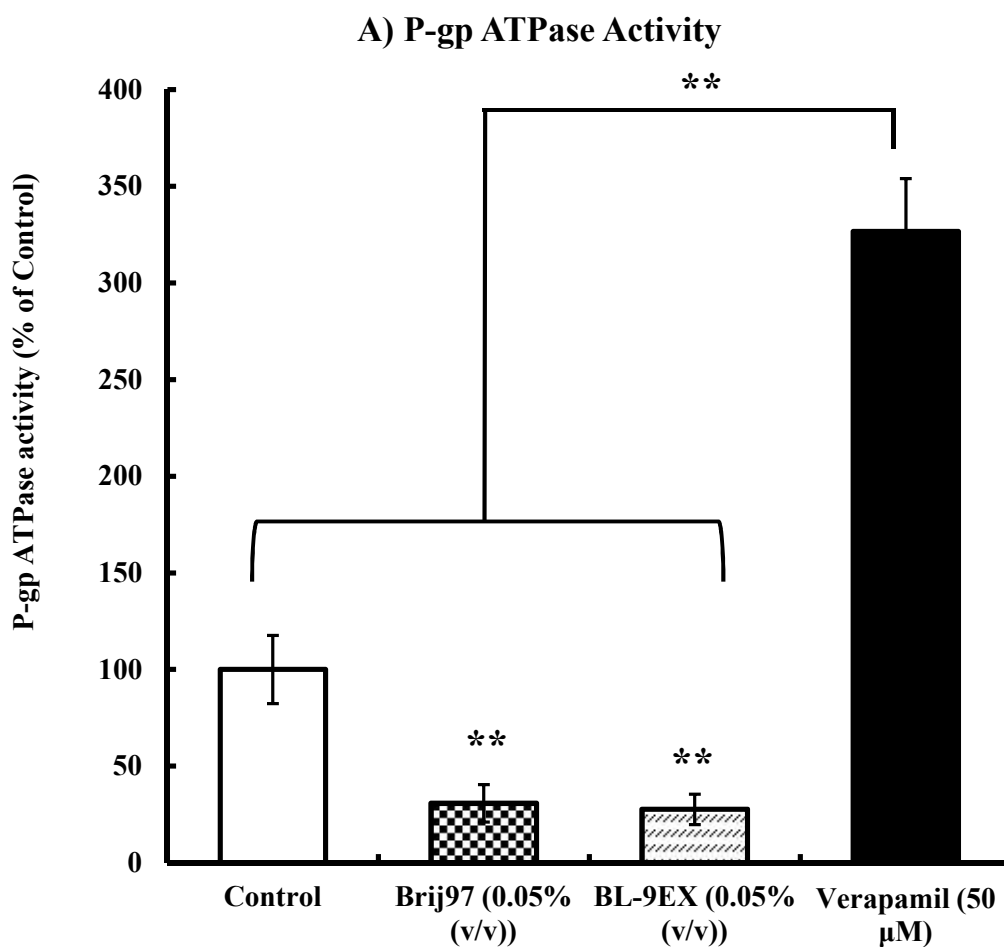


Fig. 22 Effects of different concentrations of Brij97 and BL-9EX on BBMV intestinal membrane fluidity. (A) Fluorescence anisotropy of the intestinal membrane labeled with DPH as a probe. (B) Fluorescence anisotropy of the intestinal membrane labeled with Tma-DPH as a probe. (C) Fluorescence anisotropy of the intestinal membrane labeled with DNS-CL as a probe. Each result represents the mean \pm S.E. of 4 experiments. (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, compared with the control. ([#]*J. Pharm. Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Fig. 6)

3-2-3-2 P-gp ATPase 活性に及ぼす各種 Brij の影響

P-gp は ATP 依存的なトランスポーターであり、ATPase 活性で得られるエネルギーを駆動力として輸送を行うため、ATPase 活性が P-gp の輸送活性に影響を及ぼすことが報告されている^{33,71,64}。Fig. 23 は各種 Brij の添加時における P-gp ATPase 活性を検討したものである。まず、Fig. 23A より、ATPase 活性値は 0.05% (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用により、PBS の対照群に比べ有意に低下することが見られたが、P-gp の基質及び P-gp の阻害剤である verapamil は ATPase 活性値が顕著に上昇することが認められた。また、Brij が P-gp の基質となる薬物が引き起こす ATPase 活性値に影響させるかどうか確認するため、Fig. 23B は P-gp の基質である quinidine 及び各種 Brij の存在下における ATPase 活性を検討した。その結果、0.05% (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用時における ATPase 活性は、有意に減少することが示された。以上のことから、Brij は ATPase 活性を顕著に低下させることにより、P-gp 機能を阻害する可能性が示唆された。



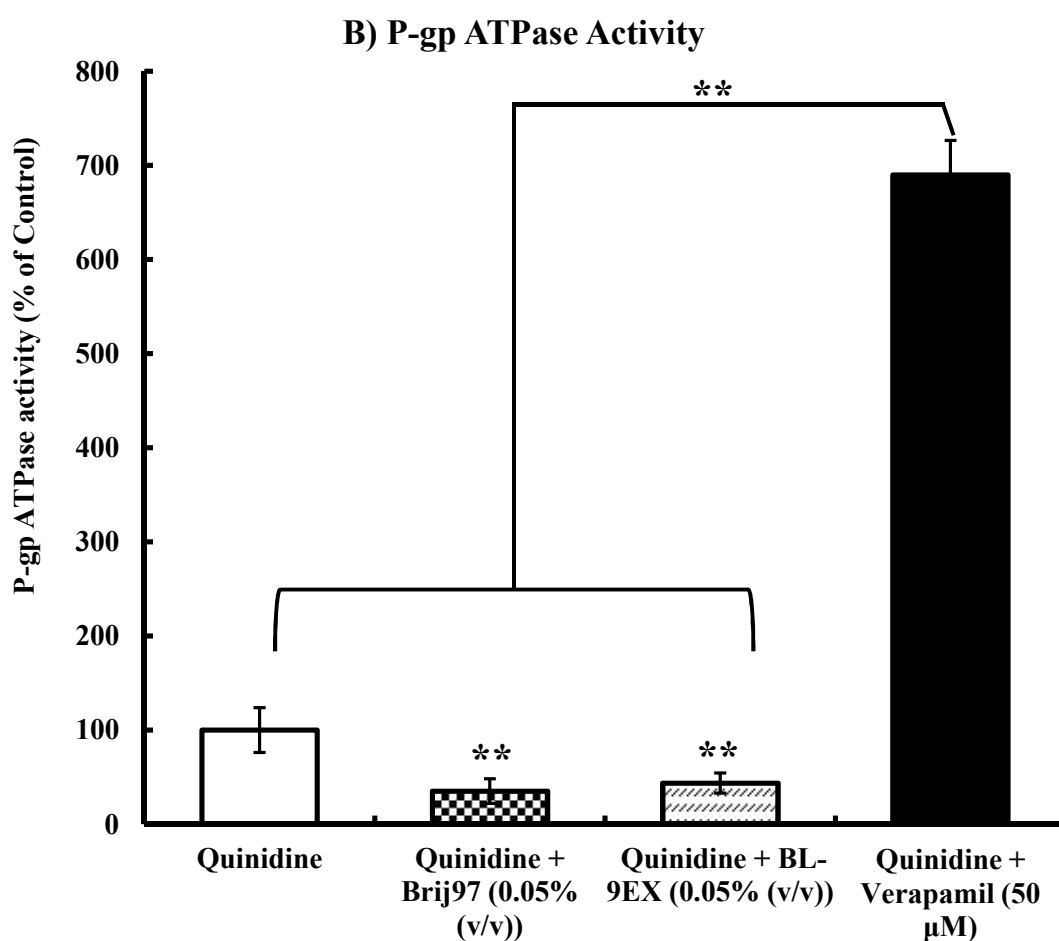


Fig. 23 Effects of 0.05% Brij97 and BL-9EX on P-gp ATPase activity in human MDR1 membranes. (A) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10 oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) were dissolved in PBS. (B) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10 oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) were dissolved in 0.1mM quinidine. Each result represents the mean \pm S.E. of 4 experiments. (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, compared with the control. (*J.Pharm.Sci.*, **105**, 3668-3679 (2016); Fig. 7)

第 3 節 考察

本章では前章までとは異なり、*in vitro* 実験において CF の消化管粘膜透過性及び TEER、ならびに膜流動性及び P-gp ATPase に及ぼす各種 Brij's の影響を検討することより、Brij's の吸収促進機構ならびに P-gp の阻害機構を解明することを目的とした。

一般に、細胞間経路は主に水溶性薬物の透過経路であり、細胞内経路は主に脂溶性薬物の透過経路であることが知られ (Fig. 14)、従来までの吸収促進剤は細胞間経路あるいは細胞内経路を介して薬物の透過を上昇させることが認められている。このことから、Brij's の吸収促進機構には P-gp の機能を抑制することだけではなく、細胞間経路を介した薬物の透過性を増大する可能性があると考えられる。第一章及び第二章では、脂溶性薬物である Rho.123 の消化管吸収性を改善することが確認されたため、本章では細胞間経路を介した水溶性薬物及び P-gp の基質ではない薬物である CF の消化管吸収性を検討した。

In vitro diffusion chamber 法において、各種 Brij's が存在した場合、CF の吸収方向及び排出方向の累積透過量は有意な差が認められず、ER も変化しなかった (Fig. 16, Table 9) ことから、Brij's は CF の消化管粘膜透過性には影響しないことが示された。また、*in situ* closed loop 法において、0.05 % (v/v) BL-9EX の併用における $AUC_{0-240min}$ は $6536 \pm 514 \text{ ng} \cdot \text{min} / \text{mL}$ であり、コントロール群 (CF $5436 \pm 414 \text{ ng} \cdot \text{min} / \text{mL}$) に比べ、有意な差が見られなかったことから、Brij's は CF の消化管吸収性にも影響しないことが認められた。

また、細胞間経路を介した薬物の透過性は *tight junction* によって制御されている。以前の研究より、界面活性剤は *tight junction* を開口させ薬物の透過性を上昇させることが報告されている。例えば、EDTA はキレート作用により細胞間隙の *tight junction* 部分から Ca^{2+} を奪い、細胞間経路を広げることにより薬物の透過性を上昇させるが、同時に粘膜障害性が高いことが知られている⁷⁸⁾。胆汁酸塩類の sodium glycocholate (NaGC) は細胞内 Ca^{2+} 濃度調節に関与し、低濃度では *tight junction* を開口させ薬物の透過性を上昇させることが報告されているが⁷⁹⁾、高濃度ではその吸収促進作用は障害性と直接結びついている。N-dodecyl- β -D-maltopyranoside (LM) は中鎖アルキルサッカライドの一つで、水溶性が高く非イオン性で緩和な界面活性作用を有しており、その吸収促進機構にも *tight junction* の開口に関与しているとされている⁸⁰⁾。本研究では、細胞間経路に存在する *tight junction* の開口に及ぼす各種 Brij's の影響について検討するため、*in vitro* Caco-2 細胞透過実験において Brij's の存在下の膜抵抗値を測定した。Fig. 19 の検討で、いずれの種類の Brij's の併用時においても、膜抵抗値の低下が認められなかった。

以上のことより、*in vitro* 実験系において *tight junction* の開口に伴う細胞間経路を介した CF の透過性及び TEER は Brij's の併用時においても、ほとんど変わらないことが示唆されたことから、Brij's が Rho.123 などの P-gp の基質である薬物の消化管透過性を改善した原因は、*tight junction* 開口作用などの細胞間経路を介した薬物の透過性上昇ではなく、P-gp の機能を抑制することに起因する可能性が示唆された。そこで、本章では P-gp の機能を阻害する機構を検討した。

従来までの P-gp modulators として非イオン界面活性剤は P-gp の機能を阻害するメカニズムの一つは膜流動性を増加また減少させることから、本研究では膜流動性の変化に及ぼす各種 Brij's の影響について評価した。

Fig. 22A、22B 及び 22C に示したように、蛍光プローブとして DPH、tma-DPH 及び DNS-CL の蛍光異方性比は 0.01-0.1 % Brij97 及び BL-9EX の併用により、対照群に比較して、いずれも有意に減少することが見られた。特に、Brij97 及び BL-9EX の併用時における DPH の蛍光異方性比はきわめて低くなったことから、Brijs 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。また、以前の研究より、他の非イオン性界面活性剤である Tween、Cremophor EL、Pluronic 85 は DPH 及び tma-DPH の蛍光異方性比に低下させることから、膜流動性を増加させることが確認された^{27,64)}。これらの結果から、Brijs は膜脂質内部、脂質外部及び膜タンパク質の流動性を増大することより、P-gp の機能を阻害する可能性が示された。

一方、以前の研究から、いくつかの非イオン性界面活性剤は P-gp の基質となる薬物の排出を減少させるとともに、ATPase の活性も抑制することが報告されている。Batrakova らは低濃度の Pluronic P85 (0.001 %, w/v) を添加することにより、本来細胞内に存在する ATPase 活性及び P-gp の基質となる verapamil により誘導された ATPase 活性は、コントロール群に比べて有意に減少することを報告している⁶⁴⁾。また、Tang らは Brij78 及び Brij97 の存在下において verapamil により誘導された ATPase 活性は、対照群に比較して有意に抑制されることを明らかにした³³⁾。そこで、本章では human MDR1 membrane において、0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用時における P-gp ATPase 活性を評価した。Fig. 23A 及び Fig. 23B の結果から、細胞内に存在する ATPase 活性及び P-gp の基質となる quinidine により誘導された ATPase 活性は、0.05 % (v/v) Brij97 及び BL-9EX の併用により、コントロールに比較して、顕著に低下したのに対して、positive control として verapamil 存在下における P-gp ATPase 活性はきわめて高いことが認められた。

また、多くの界面活性剤及び ATPase 酵素との相互作用は、一般的に膜流動性の変化に関連することが認められた。界面活性剤は一般的に P-gp の基質ではないため、P-gp 基質と P-gp の結合部位に結合できないことから、他の細胞膜における P-gp のタンパク質構造と移動に影響を与えるか、他の非貫通輸送によってアロステリック調節 (allosteric modulation) を生成するか、または高分子ポリマーの立体障害を有することにより、P-gp 基質と P-gp の結合を抑制すると考えられた。Tween、Pluronic P85、labrasol 及び Cremophor EL の併用投与により、細胞の膜流動性が増加するとともに、ATP の酵素活性が低下することを明らかにした^{27,44,61,64)} ことから、膜流動性と ATP の酵素活性の相関性を明確に確認している。したがって、ATP の酵素活性は P-gp の機能を影響させる重要な要因の一つであることが認められたため、Brijs は細胞内に存在する P-gp ATPase 活性を抑制することより、P-gp の機能を阻害する可能性が示された。

さらに、P-gp はエネルギー依存性のトランスポーターであることから、細胞内 ATP のレベルが P-gp の機能を制御する重要な要因であることが認められている。Pluronic P85、Brij78 及び Brij97 は細胞内 ATP のレベルを有意に低下させることが認められている^{33,64)}。また、Tang らは Brij78 及び Brij97 の併用投与における P-gp の発現量が、対照群に比較してほとんど変化しないことを明らかにしている³³⁾ が、Peceol 及び Gelucire44/14 の存在下における細胞内の P-gp の発現量が減少する結果が報告された⁴¹⁾。以上のことより、非イオン性界面活性剤として Brijs が細胞内 ATP のレベル及び P-gp の発現量を低下するか否かについてはさらなる研究が必要であると思われる。

また、多数の非イオン性界面活性剤は「親水性部分－親油性部分」構造あるいは「親水性部分

「一連結部分－親油性部分」構造を形成する。Batrakova ら及び Rege らはポリオキシプロピレン基を有する Pluronic、ポリオキシエチレン基を有する Tween と Cremophor EL などの非イオン性界面活性剤が膜流動性の変化または細胞内の ATP レベルの低下により、P-gp の機能を抑制する^{27,73-77)}ことが示唆されたことから、ポリオキシプロピレン基及びポリオキシエチレン基は P-gp の阻害効果に重要な影響を与えられると思われる。Brijs はポリオキシエチレン基を有するので、Brijs は膜流動性及び P-gp ATPase 活性を変化させ、P-gp の機能を阻害することにより、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収を改善できることが示唆された。

第 4 節 小括

In vitro 実験において、Brijs の吸収促進機構には細胞間経路を介した薬物の透過性上昇は寄与していないことが示唆された。また、P-gp の機能阻害機構を検討したところ、各種 Brijs は脂質膜内部、脂質膜外部及び膜タンパク質の流動性を増大させることから、Brijs は膜流動性を変化させる可能性が示唆された。さらに、Brijs は、P-gp ATPase 活性を低下させることが認められた。

以上のことから、Brijs による P-gp の基質となる薬物の吸収性改善の機構は、細胞間経路を介した薬物の透過性増大作用や消化管粘膜障害性ではなく、P-gp の機能を抑制することに基づくものと考えられた。

総 括

本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* 両実験系において、P-gp の基質である Rho.123、prednisolone 及び quinidine を用いて、これら薬物の消化管粘膜透過性及び消化管吸収性に及ぼす各種 Brij's の影響ならびに各種 Brij's による P-gp の阻害機構について検討し、以下の結論を得た。

第一章では：

1. *In vitro* diffusion chamber 法において各種 Brij's の併用時における P-gp の機能を検討した結果、各種 Brij's の併用投与により、Rho.123、quinidine 及び prednisolone の吸収方向の消化管粘膜透過性が増大したのに対し、排出方向の透過性は減少し、これら P-gp の基質となる薬物の ER が顕著に低下したことから、Brij's は消化管に存在している P-gp の機能を抑制する作用を有することが示唆された。
2. *In vitro* Caco-2 細胞透過性に関する検討の結果、Rho.123 及び quinidine の吸収方向の消化管粘膜透過性は、各種 Brij's の併用により増大したことから、Brij's は優れた P-gp 抑制効果を有することが示唆された。

第二章では：

1. *In situ* closed loop 法における Rho.123 及び prednisolone の消化管吸収性は各種 Brij's の併用により有意に増加したのに対し、Rho.123 の代謝物である Rho.110 の消化管吸収性は Brij's を併用してもほとんど変化しなかったことから、Brij's は P-gp 基質となる薬物の消化管吸収を改善する製剤添加物であることが示唆された。
2. *In vitro* 及び *in vivo* 両実験系において各種 Brij's を併用投与した場合、小腸粘膜から遊離した LDH 活性値とタンパク質の放出量は、コントロールと比べて有意な差が認められなかったことから、Brij's は安全性の高い P-gp modulator であることが示唆された。

第三章では：

1. *In vitro* diffusion chamber 法において、P-gp の基質ではない CF の消化管透過性は各種 Brij's を併用してもコントロールとほとんど変わらないことが認められた。また、Caco-2 細胞透過実験において、各種 Brij's を併用しても、TEER の低下は認められなかった。したがって、Brij's の吸収促進機構に細胞間経路を介した薬物の透過性上昇は寄与していないことが示唆された。
2. Brij's による P-gp の機能抑制機構について検討したところ、蛍光偏光解消法において、Brij's の併用により、脂質膜内部、脂質膜外部及び膜中のタンパク質の流動性が有意に増大することが認められた。また、Brij's の併用時における P-gp ATPase の活性値は、コントロールと比べて顕著に低下していることが示された。

以上の結果より、各種 Brij は P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善できる優れた製剤添加物であると考えられた。また、各種 Brij は膜流動性及び P-gp ATPase の活性を変化させ、P-gp の機能を抑制することが示唆された。

これらの知見は、製剤添加物により P-gp の基質である薬物の消化管吸収性を改善する上で有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

引用文献

- 1) Wacher V.J., Silverman J.A., Zhang Y., Benet L.Z.: Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1322-1330 (1998).
- 2) Toyobuku H., Tamai I., Ueno K., Tsuji A.: Limited influence of P-glycoprotein on small-intestinal absorption of cilostazol, a high absorptive permeability drug. *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2249-2259 (2003).
- 3) Sababi M., Borga O., Hultkvist-Bengtsson U.: The role of P-glycoprotein in limiting intestinal regional absorption of digoxin in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 21-27 (2001).
- 4) van Asperen J., van Tellingen O., van der Valk M.A., Beijnen J.H.: Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A. *Clin. Cancer Res.*, **4**, 2293-2297 (1998).
- 5) Mariana B., Adrian L., Guillermo V., Juan S., Laura M., Carlos L.: Gender-related differences on P-glycoprotein-mediated drug intestinal transport in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**, 619-626 (2011).
- 6) Shen Q., Li W., Lin Y., Katsumi H., Okada N., Sakane T., Fujita T., Yamamoto A.: Modulating effect of polyethylene glycol on the intestinal transport and absorption of prednisolone, methylprednisolone and quinidine in rats by *in-vitro* and *in-situ* absorption studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 1633-1641 (2008).
- 7) Hunter J., Hirst B.H.: Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **25**, 129-157 (1997).
- 8) He H., Shen Q., Li J.: Effects of borneol on the intestinal transport and absorption of two P-glycoprotein substrates in rats. *Arch. Pharm. Res.*, **34**, 1161-1170 (2011).
- 9) Lin Y., Shen Q., Katsumi H., Okada N., Fujita T., Jiang X., Yamamoto A.: Effects of labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1301-1307 (2007).
- 10) Dantzig A.H., Law K.L., Cao J., Starling J.J.: Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 39-50 (2001).
- 11) Malingre M.M., Richel D.J., Beijnen J.H., Rosing H., Koopman F.J., Ten Bokkel Huinink W.W., Scot M.E., Schellens J.H.: Coadministration of cyclosporine strongly enhances the oral bioavailability of docetaxel. *J. Clin. Oncol.*, **19**, 1160-1166 (2001).
- 12) Nakagami T., Yasui-Furukori, N., Saito M., Tateishi T., Kaneo S.: Effect of verapamil on pharmacokinetics and pharmacodynamics of risperidone: *in vivo* evidence of involvement of P-glycoprotein in risperidone disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **78**, 43-51 (2005).
- 13) Wagner D., Spahn-Langguth H., Hanafy A., Koggel A., Langguth P.: Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv. Drug Del. Rev.*, **50**, S13-S31 (2001).

- 14) Robert J, Jarry C.: Multidrug resistance reversal agents. *J. Med. Chem.*, **46**, 4805-4817 (2003).
- 15) Zastre J, Jackson J.K., Wong W., Burt H.M.: Methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers reduce P-glycoprotein efflux in the absence of a membrane fluidization effect while stimulating P-glycoprotein ATPase activity. *J. Pharm. Sci.*, **96**, 864-875 (2007).
- 16) Cornaire G., Woodley J., Hermann P., Cloarec A., Arellano,C., Houin G.: Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, **278**, 119-131 (2004).
- 17) van Asperen J., van Tellingen O., Sparreboom A., Schinkel A.H., Borst P., Nooijen W.J., Beijnen J.H.: Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833. *Br. J. Cancer*, **76**, 1181-1183 (1997).
- 18) Bunting K.D.: ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*, **20**, 11-20 (2002).
- 19) Arima H., Yunomae K., Hirayama F., Uekama K.: Contribution of P-glycoprotein on the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin in oral bioavailability of tacrolimus. *J. Pharmacol. Exp.Ther.*, **297**, 547-555 (2001).
- 20) Hugger E.D., Audus K.L., Borchardt R.T.: Effect of poly (ethylene glycol) on efflux transporter activity in Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1980-1990 (2002).
- 21) Hugger E.D., Novak B.L., Burton P.S., Audus K.L., Borchardt R.T.: A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity *in vitro*. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1991-2002 (2002).
- 22) Hugger E.D., Cole C.J., Raub T.J., Burton P.S., Borchardt R.T.: Automated analysis of polyethylene glycol-induced inhibition of P-glycoprotein activity *in vitro*. *J. Pharm. Sci.*, **92**, 21-26 (2003).
- 23) Johnson B.M, Charman W.N., Porter C.J.: An *in vitro* examination fo the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine. *AAPS. Pharm. Sci.*, **4**, E40 (2002).
- 24) Lo Y. L., Huang J.D.: Effects of sodium deoxycholate and sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 665-672 (2000).
- 25) Nerurkar M.M., Burton P.S., Borchardt R.T.: The use of surfactants to enhance the permeability of peptide through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharm. Res.*, **13**, 528-534 (1996).
- 26) Nerurkar M.M., Ho N.F., Burton P.S., Vidmar T.J., Borchardt R.T.: Mechanistic roles of neutral surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 813-821 (1997).
- 27) Rege B.D., Kao J.P., Polli J.E.: Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in

- Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16**, 237-246 (2002).
- 28) Shen Q., Lin Y., Handa T., Doi M., Sugie M., Wakayama K., Okada N., Fujita T., Yamamoto A.: Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by *in vitro* transport and *in situ* absorption studies. *Int. J. Pharm.*, **313**, 49-56 (2006).
 - 29) Shono Y., Nishihara H., Matsuda Y., Furukawa S., Okada N., Fujita T., Yamamoto A.: Modulation of intestinal P-glycoprotein function by cremophor EL and other surfactants by an *in vitro* diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 877-885 (2004).
 - 30) Lugea A., Salas A., Casalot J., Guarner F., Malagelada J.R.: Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut.*, **46**, 515-521 (2000).
 - 31) Lo Y. L.: Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines. *J. Control. Release*, **90**, 37-48 (2003).
 - 32) Yu H., Hu Y.Q., Ip F.C., Zou Z., Han Y.F., Ip N.Y.: Intestinal transport of bis(12)-hupyrindone in Caco-2 cells and its improved permeability by the surfactant Brij-35. *Biopharm. Drug Dispos.*, **32**, 140-150 (2011).
 - 33) Tang J., Wang Y., Wang D., Wang Y., Xu Z., Racette K., Liu F.: Key structure of brij for overcoming multidrug resistance in cancer. *Biomacromolecules*, **14**, 424-430 (2013).
 - 34) Dong X., Mattingly C. A., Tseng M. T., Cho M. J., Liu Y., Adams V. R., Mumper R. J.: Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. *Cancer Res.*, **69**, 3918-3926 (2009).
 - 35) Zhang H., Yao M., Morrison R.A., Chong S.: Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 768-772 (2003).
 - 36) Troutman M.D., Thakker D.R.: Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.*, **20**, 1200-1209 (2003).
 - 37) Onishi H., Isoda Y., Matsuyama M.: *In vivo* evaluation of chondroitin sulfate-glycyl-prednisolone for anti-arthritis effectiveness and pharmacokinetic characteristics. *Int. J. Pharm.*, **456**, 113-120 (2013).
 - 38) Dudeja P.K., Anderson K.M., Harris J.S., Buckingham L., Coon J.S.: Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 309-315 (1995).
 - 39) Ayesh S., Shao Y.M., Stein W.D.: Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1316**, 8-18 (1996).
 - 40) Maeng H.J., Yoo H.J., Kim I.W., Song I.S., Chung S.J., Shim C.K.: P-glycoprotein-mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 2614-2621 (2002).

- 41) Sachs-Barrable K., Thamboo A., Lee S.D., Wasan K.M.: Lipid excipients Peceol and Gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.*, **10**, 319-331 (2007).
- 42) Huo K., Liu Q., Wang C., Meng Q., Sun H., Peng J., Ma X., Liu K.: Enhancement effect of P-gp inhibitors on the intestinal absorption and antiproliferative activity of bestatin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **50**, 420–428 (2013).
- 43) Hidalgo I.J., Raub T.J., and Borchardt R.T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **96**, 736-749 (1989).
- 44) Hunter J., Hirst B.H., Simmons N.L.: Transepithelial secretion, cellular accumulation, and cytotoxicity of vinblastine in defined MDCK cell strains. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1179**, 1-10 (1993).
- 45) Wils P., Phung-Ba V., Warnery A., Lechardeur D., Raeissi S., Hidalgo I.J., Scherman D.: Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1528-1530 (1994).
- 46) Hu Y.J., Wang Y.D., Tan F.Q., Yang W.Y.: Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Mol. Biol. Rep.*, **40**, 6123-6142 (2013).
- 47) Yee S.: *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm. Res.*, **14**, 763-766 (1997).
- 48) Zhang Y., Hu Y., Feng Y., Kodithuwakku N. D., Fang W., Li Y., Huang W.: The inhibitory and combinative mechanism of HZ08 with P-glycoprotein expressed on the membrane of Caco-2 cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **274**, 232–239 (2014).
- 49) Patil A.G., Reddy D., D'Souza R., Damre A.: Development and validation of RP-HPLC-fluorescence method for quantitative determination of quinidine, a probe substrate for P-glycoprotein inhibition assay using Caco-2 cell monolayer. *Biomed. Chromatogr.*, **24**, 620–625 (2010).
- 50) Tamura S., Tokunaga Y., Ibuki R., Amidon G.L., Sezaki H., Yamashita S.: The site-specific transport and metabolism of tacrolimus in rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 310-316 (2003).
- 51) Fontaine M., Elmquist W.F., Miller D.W.: Use of rhodamine123 to examine the functional activity of P-glycoprotein in primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers. *Life Sci.*, **59**, 1521-1531 (1996).
- 52) Yang Z., Wang J.R., Niu T., Gao S., Yin T., You M., Jiang Z.H., Hu M.: Inhibition of P-glycoprotein leads to improved oral bioavailability of compound K, an anticancer metabolite of red ginseng extract produced by gut microflora. *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1538-1544 (2012).
- 53) Mouly S., Paine M.F.: P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm. Res.*, **20**, 1595-1599 (2003).
- 54) Yumoto R., Murakami T., Nakamoto Y., Hasegawa R., Nagai J., Takano M. Transport of

- rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 149-155 (1999).
- 55) Lo Y.L.: Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines. *J. Control. Release*, **90**, 37-48 (2003).
 - 56) Collnot E.M., Baldes C., Wempe M.F., Hyatt J., Navarro L., Edgar K.J., Schaefer U.F., Lehr C.M.: Influence of vitamin E TPGS poly (ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J. Control. Release*, **111**, 35-40 (2006).
 - 57) Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyu 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).
 - 58) 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).
 - 59) Ferry J.J., Horvath A.M., Bekersky I., Heath E.C., Ryan C.F., Colburn W.A.: Relative and absolute bioavailability of prednisone and prednisolone after separate oral and intravenous doses. *J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 81-87 (1988).
 - 60) Ueda C.T., Williamson B.J., Dzindzio B.S.: Absolute quinidine bioavailability. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **20**, 260-265 (1976).
 - 61) Lin Y.: Modulation of intestinal P-glycoprotein function by pharmaceutical excipients and their inhibitory mechanisms. *Ph. D. thesis* (2008).
 - 62) Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M.: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 361-398 (1999).
 - 63) Limtrakul P., Anuchapreeda S., Buddhasukh D.: Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. *BMC. Cancer*, **4**, 13 (2004).
 - 64) Batrakova E.V., Li S., Vinogradov S.V., Alakhov V.Y., Miller D.W., Kabanov A.V.: Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 483-493 (2001).
 - 65) Batrakova E.V., Li S., Li Y., Alakho V.Y., Kabanov A.V.: Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. *Pharm. Res.*, **21**, 2226-2233 (2004).
 - 66) Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M.: Disulfiram metabolites permanently inactivate the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Mol. Pharm.*, **1**, 426-433 (2004).
 - 67) Takizawa Y., Kishimoto H., Nakagawa M., Sakamoto N., Tobe Y., Furuya T., Tomita M., Hayashi M.: Effects of pharmaceutical excipients on membrane permeability in rat small intestine. *Int. J. Pharm.*, **453**, 363-370 (2013).
 - 68) Zhang G.H., Wu L.L., Yu G.Y.: Tight junctions and paracellular fluid and ion transport in

- salivary glands. *Clin. J. Dent. Res.*, **16**, 13-46 (2013).
- 69) Rosenberg M.F., Kamis A.B., Callaghan R., Higgins C.F., Ford R.C.: Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8294–8299 (2003).
 - 70) Regev R., Assaraf Y.G., Eytan G.D.: Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur. J. Biochem.*, **259**, 18–24 (1999).
 - 71) Li W., Li X., Gao Y., Zhou Y., Ma S., Zhao Y., Li J., Liu Y., Wang X., Yin D.: Inhibition mechanism of P-glycoprotein mediated efflux by mPEG-PLA and influence of PLA chain length on P-glycoprotein inhibition activity. *Mol. Pharm.*, **11**, 71-80 (2014).
 - 72) 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).
 - 73) de Laat S.W., van der Saag P.T., Shinitzky M.: Microviscosity modulation during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 4458-4461 (1977).
 - 74) 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).
 - 75) 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).
 - 76) Batrakova E.V., Li S., Elmquist W.F., Miller D.W., Alakhov V.Y., Kabanov A.V.: Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Brit. J. Cancer*, **85**, 1987-1997 (2001).
 - 77) Kajii H., Horie T., Hayashi M., Awazu S.: Effects of salicylic acid on the permeability of the plasma membrane of the small intestine of the rat: a fluorescence spectroscopic approach to elucidate the mechanism of promoted drug absorption. *J. Pharm. Sci.*, **75**, 475-478 (1986).
 - 78) 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).
 - 79) Fasano A., Budillon G., Guandalini S., Cuomo R., Parrilli G., Cangiotti A.M., Morroni M., Rubino A.: Bile acids reversible effects on small intestinal permeability. An *in vitro* study in the rabbit. *Dig. Dis. Sci.*, **35**, 801-808 (1990).
 - 80) Sasaki I., Tozaki H., Matsumoto K., Ito Y., Fujita T., Murakami M., Muranishi S., Yamamoto A.: Development of an oral formulation of azetirelin, a new thyrotropin- releasing hormone (TRH) analogue, using n-lauryl- β -D-maltopyranoside as an absorption enhancer. *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 611-615 (1999).

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えてくださり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、京都薬科大学 薬剤学分野 教授 山本 昌先生に深甚なる敬意を表します。

本研究を遂行するにあたり、種々の貴重な御助言ならびに御指導を賜りました、元・京都薬科大学 薬剤学分野 現在・神戸薬科大学 製剤学分野 教授 坂根 稔康先生に心より感謝致します。

本研究に関する直接の御指導、有益な御助言、御激励を賜り、日々の論議を通じて研究に対する姿勢を御ました、京都薬科大学 薬剤学分野 准教授 勝見 英正先生に衷心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、種々の貴重な御助言、御激励ならびに御指導を賜りました、京都薬科大学 薬剤学分野 助教 草森 浩輔先生に心より感謝致します。

本論文を審査して頂き、有益なご助言を賜りました、京都薬科大学 薬物動態学分野 教授 栄田 敏之先生、ならびに京都薬科大学 臨床薬学分野 教授 西口 工司先生に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験に御協力を頂きました、京都薬科大学 薬剤学分野 卒業生 田中 圭一郎氏、田所 修平氏、上原 左知代氏に深く感謝致します。さらに、彼らをはじめとし、研究室生活において、多大なる御協力、御支援、御激励を頂きました、京都薬科大学 薬剤学分野の諸氏に心より御礼申し上げます。

日々の研究生生活を共にし、終始暖かい御支援を頂きました、中矢 有華博士、Tammam Alama 博士、Li Xinpeng 修士、Sawangrat Kasirawat 修士に心より感謝致します。

2015 年度から、京都薬科大学 留学生奨学金に頂き、生活面での経済的支援を賜りました、京都薬科大学に深く感謝致します。

最後に、研究に専心できる環境、時間を与えてくださり、長年の研究生生活を終始温かく見守り、経済的にも精神的にも支え続けてくださった、父 趙 植森、母 卒 志欣をはじめとする家族に心より感謝致します。

2017 年 2 月

趙 婉廷

付 録



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.jpharmsci.org

Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism

Effects of Polyoxyethylene Alkyl Ethers on the Intestinal Transport and Absorption of Rhodamine 123: A P-glycoprotein Substrate by *In Vitro* and *In Vivo* Studies

Wanting Zhao, Sachiyo Uehera, Keiichiro Tanaka, Shuhei Tadokoro, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto*

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2015
 Revised 6 January 2016
 Accepted 20 January 2016
 Available online 8 March 2016

Keywords:

intestinal absorption
 P-glycoprotein
 rhodamine 123
 polyoxyethylene alkyl ether
 pharmaceutical excipient

ABSTRACT

We examined the effects of polyoxyethylene alkyl ethers (Brijs) on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123, a P-glycoprotein (P-gp) substrate, by *in vitro* and *in vivo* studies. Brijs increased the absorptive transport of rhodamine 123 and decreased its secretory transport in the *in vitro* diffusion chamber method. However, Brijs did not change the transport of 5(6)-carboxyfluorescein, a non-P-gp substrate, indicating that the effect of Brijs on the transport of drugs was P-gp substrate-specific. The effects of Brijs on rhodamine 123 transport across Caco-2 cell monolayers were also examined. Secretory transport of rhodamine 123 was enhanced and its absorptive transport was significantly reduced in the presence of Brijs. Furthermore, in the *in vivo* studies, Brijs also enhanced the intestinal absorption of rhodamine 123 in rats. The intestinal membrane damage produced by Brijs was also evaluated by measuring the activity of lactate dehydrogenase and the release of protein. We found almost no intestinal damage in the presence of various Brijs. These findings suggest that Brijs might inhibit the function of intestinal P-gp, thereby increasing the intestinal transport and absorption of P-gp substrates without serious intestinal membrane damage.

© 2016 American Pharmacists Association®. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Oral administration is one of the most popular drug delivery routes because it is convenient and painless for both doctors and patients. However, this route of administration faces various challenges due to certain features in the body, like the protective barrier in humans, or certain characteristics of the drugs themselves, like their low solubility, low permeability, and high metabolism.^{1,2} Several studies have demonstrated that the active efflux of drugs by transporters is one of the most important factors to be considered to optimize oral bioavailability and to decrease variability at the absorption site.^{3–5}

The drug efflux transporters that exist on epithelial cells in humans include P-glycoprotein (P-gp), which is a plasma membrane glycoprotein of about 170 kDa and belongs to the superfamily of adenosine triphosphate (ATP)–binding cassette transporters.

P-gp is expressed in various normal tissues, including the intestinal brush border membranes, brain, liver, kidney, testis, and adrenal glands, and is also extensively expressed in tumor cells. It can actively pump a wide range of drugs such as digoxin, vinca alkaloids, and β -adrenergic agonists out of cells and thus reduce the oral bioavailability of these drugs.^{6,7} Therefore, the intestinal P-gp, an ATP-dependent multidrug efflux pump, can affect the absorption, distribution, and elimination of its substrates.^{8,9} In order to overcome this problem, it has been demonstrated that some P-gp inhibitors could enhance the oral bioavailability of the drugs by inhibiting the function of P-gp in the intestinal membrane.^{10,11} Nevertheless, it is well known that these P-gp inhibitors themselves, such as verapamil and cyclosporin A (CyA), have relatively high pharmacologic activities, which make them a poor choice.^{12–14} Therefore, it is more important to find out other P-gp inhibitors, which have lower pharmacological activities.

It has been reported that a number of excipients, including nonionic surfactants and polyethylene glycols (PEGs), can inhibit the function of P-gp in the intestine, thereby increasing the intestinal absorption of P-gp substrates.^{10,15,16} Among these excipients, polyoxyethylene alkyl ethers (Brijs), which belong to the category of

* Correspondence to: Akira Yamamoto (Telephone: +81-75-595-4662; Fax: +81-75-595-4674).

E-mail address: yamamoto@mb.kyoto-phu.ac.jp (A. Yamamoto).

nonionic surfactants, are widely used in pharmaceutical formulations as solubilizers and emulsifiers to improve the dissolution and absorption of poorly soluble drugs. However, few studies have examined the effects of Brij on the function of efflux transporters including P-gp. Among the previous studies, one study indicated that Brij30 significantly increased the intestinal absorption of epirubicin in rats¹⁷ and similarly another study showed that Brij35 effectively enhanced the transport of bis(12)-hupyrindone (B12H) in Caco-2 cells.¹⁸ Tang et al.¹⁹ focused on the effects of Brij for overcoming P-gp-mediated multidrug resistance and demonstrated that Brij78 and Brij97 decreased intracellular ATP levels and inhibited verapamil-induced ATPase activity of P-gp in multidrug-resistant cells. Furthermore, the structures of all Brij molecules contain a polar head group consisting of PEG chains with different length and a hydrophobic tail consisting of an alkyl chain; some exhibit the ability to inhibit the function of P-gp while others do not affect the function of P-gp.^{17–19}

Based on these findings, we hypothesized that Brij molecules with different structures, composition, and hydrophilic-lipophilic balance (HLB) (Table 1) might inhibit the function of P-gp in the intestine, like other excipients. The reason for the selection of these Brij in this study is to see the relationship between the P-gp inhibitory function of Brij and their physicochemical characteristics with different chemical structures, HLB values, molecular weight, and so on. Brij58 has the highest HLB value of these compounds used in this study. We have also chosen Brij72 and Brij78, which have the structure of stearyl ether. On the other hand, Brij92, Brij97, and Brij98 with the structure of oleyl ether were selected. Moreover, BL-9EX with the structure of lauryl ether, as well as Brij35, was also selected. In this study, therefore, the effects of different Brij on the intestinal transport of a P-gp substrate, rhodamine 123, were examined using an *in vitro* diffusion chamber system and Caco-2 cell monolayers. We also examined the effects of Brij on the intestinal absorption of rhodamine 123, by an *in situ* closed loop method.

Materials and Methods

Chemicals and Drugs

Rhodamine 123 (MW 380.8), lactate dehydrogenase (LDH)-Cytotoxic Test kit, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Brij were obtained from Nikko Chemicals Company Ltd. (Osaka, Japan). 5(6)-carboxyfluorescein (CF) were purchased from Eastman Kodak Company (Rochester, NY). For cell culture, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and MEM nonessential amino acid solution were purchased from Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA). Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid, and antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10,000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 mg/mL amphotericin B, and 0.85% saline) were prepared by Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). Hank's balanced salt (HBS) and CyA were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company Ltd. (St. Louis, MO). All other reagents were of analytical grade.

Table 1
Structures, Composition, and HLB Values of Various Types of Brij Surfactants

Trade name	Structures	M	HLB	n	m
Brij58	C ₁₆ H ₃₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂₀ OH	1124	15.7	20	16
Brij72	C ₁₈ H ₃₇ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OH	359	8.0	2	18
Brij78	C ₁₈ H ₃₅ (OCH ₂ CH ₂) ₂₀ OH	1151	15.3	20	18
Brij92	C ₁₈ H ₃₅ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OH	357	7.5	2	18
Brij97	C ₁₈ H ₃₅ (OCH ₂ CH ₂) ₁₀ OH	709	12.4	10	18
Brij98	C ₁₈ H ₃₅ (OCH ₂ CH ₂) ₂₀ OH	1150	15	20	18
BL-9EX	C ₁₂ H ₂₃ (OCH ₂ CH ₂) ₉ OH	583	14.5	9	12

Preparation of Drug Solution

Rhodamine 123 and CF were dissolved in Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution (KRBB) at pH 7.4 to yield a final concentration of 10 μM. Varying concentrations of Brij (0.0025%–0.5%) were added to the drug solution as excipients.

Cell Culture

Caco-2 cells (passage 49–52) (Dainippon Sumitomo Pharma Company, Ltd.) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution, and 100 μM MEM nonessential amino acid solution in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. For transport experiments, 1 × 10⁵ cells were seeded on polycarbonate inserts (Transwells, 12 mm in diameter, 0.4 μm pores, area; Corning, Corning, NY) and cultured for 21 days prior to experiments. The medium was changed every 2 days. The integrity of the cell monolayers was evaluated by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) value at 37°C with a Millicell-ERS voltammeter (Millipore). Only those Caco-2 monolayers with a TEER value above 500 Ω·cm² were employed in transport experiments.

Transport of Rhodamine 123 Across the Intestinal Membrane by an In Vitro Diffusion Chamber System

The transport of P-gp substrate across the rat intestinal membrane was studied with the diffusion chamber (Corning Costar Corporation).^{15,20} Male Wistar rats, weighing 230–260 g, were fasted overnight and anesthetized with Somnopenyl® (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) (sodium pentobarbital 32 mg/kg body weight i.p.). The studies examined in this article have been carried out in accordance with the guidelines of the Animal Ethics Committee at Kyoto Pharmaceutical University. The intestine was exposed through a midline abdominal incision, removed, and washed in ice-cold PBS. Intestinal segments, excluding Peyer's patches, were isolated and defined as described below. Segments were cut open and the muscle layer was stripped and immersed in ice-cold KRBB solution. The intestinal sheets were then mounted on the pins of the cell and the half-cells were clamped together. Drug solution (7 mL) was added to the donor site, whereas the same volume of drug-free buffer was added to the opposite site. The temperature of intestinal membranes was maintained at 37°C with a water bath, and both fluids were circulated by gas lift with 95% O₂/5% CO₂. During the transport studies, 0.15 mL aliquots were taken from the receptor chamber at predetermined time intervals up to 120 min. The receptor chamber samples were replaced with an equal volume of buffer solution. The amount of drugs was assayed by fluorescence spectrophotometer. The apparent permeability coefficients (P_{app}) of drugs were calculated using the following equation:

$$P_{app} = \text{Flux} / (\text{Area} \times 60 \times C_0)$$

where P_{app} is the apparent parameter of permeability (cm/s), flux is the slope of linear portion of cumulative transport amount to time at steady state (pmol/min), area is the diffusion area (1.78 cm²), and C₀ is the initial concentration of drug (pmol/mL).

Efflux ratio (ER) was used to evaluate the function of P-gp.²¹ The calculation was performed using the following equation:

$$ER = P_{appsm} / P_{appms}$$

where P_{appsm} is the average of the permeability coefficients from serosal to mucosal side and P_{appms} is the average of the permeability coefficients from mucosal to serosal side.

The viability of the intestinal membrane during the test period was monitored by measuring the transport of trypan blue dye and electrophysiological parameters. There was no transport of the dye and no remarkable change in the electrophysiological parameters, confirming that the viability of the intestinal membrane was maintained during the transport experiments. The TEER values of rat jejunal membranes are about $50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ and these intestinal membranes were employed in the experiments.

Measurement of TEER and the Transport of Rhodamine 123 Through Caco-2 Monolayers

The transport of P-gp substrate across the rat Caco-2 monolayers was performed as described previously.²² Briefly, Caco-2 cell monolayers were rinsed twice with warm HBS solution (HBSS) and then equilibrated with HBSS buffer at 37°C for 10 min. In the bidirectional transport study, rhodamine 123 (10 μM) in HBSS buffer was loaded on to the apical (AP) (0.5 mL of transport buffer) or basolateral (BL) (1.5 mL of transport buffer) side, that is, donor side. Brij's were present in the donor chamber with rhodamine 123 (10 μM) and the receiver chamber at the same concentrations as stated above. Aliquots of 80- μL samples were taken from the receiver side at different time points (30, 60, 120, 240, and 360 min) during the experiment. An equal volume of fresh buffer was added back to the receiver chamber after each sampling. The amount of drugs was assayed by fluorescence spectrophotometer. The P_{app} of rhodamine 123 in the Caco-2 cell model was calculated as per the following equation:

$$P_{\text{app}} = \frac{\text{Flux}}{\text{Area} \cdot C_0} \times \frac{1}{60}$$

where P_{app} is the apparent parameter of permeability (cm/s), flux is the rate of rhodamine 123 appearance in the receiver side (nmol/min), area is the membrane surface area (1.12 cm^2), and C_0 is the initial concentration of rhodamine 123 (nmol/mL).

The efflux ratio (Efr) was expressed as the ratio of P_{app} value from BL-to-AP to that from AP-to-BL using the following equation:

$$\text{Efr} = \frac{P_{\text{app}}(\text{B} - \text{A})}{P_{\text{app}}(\text{A} - \text{B})}$$

where $P_{\text{app}}(\text{B} - \text{A})$ and $P_{\text{app}}(\text{A} - \text{B})$ represent the average of the permeability coefficients from secretory and absorption directions, respectively.

The TEER of cultured cells on Transwell® inserts was monitored before and after each permeation experiment with a Millicell-ERS Epithelial Voltammeter (Millipore). Before the experiment, the Caco-2 monolayer was washed with HBSS twice and incubated with transport media for 10 min at 37°C before the TEER measurement. Physiologically and morphologically well-developed, confluent Caco-2 monolayers with TEER values typically above $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ were employed in the experiments.

Intestinal Absorption of Rhodamine 123 by an In Situ Closed Loop Method

Intestinal absorption of rhodamine 123 was examined by an *in situ* closed loop method.^{23,24} Male Wistar rats, 250–300 g, were anesthetized with Somnopentyl® (Kyoritsu Seiyaku Corporation) (sodium pentobarbital 32 mg/kg body weight i.p.). Animals were fasted for approximately 16 h before the experiments but water was freely available. The intestine was exposed through the midline abdominal incision. After ligating the bile duct, a segment of ileum (about 20 cm long) was isolated and washed with PBS, then tied off

at both ends to form a closed loop. The jugular vein was separated to collect the blood samples. Rhodamine 123 was dissolved in PBS at pH 7.4 to yield a final dose of 5 mg/kg. Brij's were added to the dosing solutions. The drug solution was warmed to 37°C and 3 mL of drug solution was injected into the jejunum loop. Blood samples (approximately 0.3 mL) were collected at predetermined time intervals up to 240 min, centrifuged at 12,000 rpm for 5 min and stored at –40°C until analysis. Then, rhodamine 123 and its metabolite rhodamine 110 were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The peak concentration (C_{max}) and the time to reach the peak concentration (T_{max}) were determined directly from the plasma concentration-time curves. The area under the curve (AUC) was calculated by the trapezoidal method from zero to the final sampling time (240 min). The absorption enhancement ratio (EhR) of drugs with or without Brij's was calculated as follows:

$$\text{EhR} = \frac{\text{AUC}_{\text{Brij}}}{\text{AUC}_{\text{control}}}$$

Assessment of Intestinal Membrane Damage

To evaluate small intestinal membrane damage, the release of protein and the activity of LDH were measured by an *in vitro* diffusion chamber system and an *in situ* closed loop method. In the *in vitro* diffusion chamber system study, 0.01%–0.1% Brij solution (7 mL) or 3% (vol/vol) Triton X-100 (as a positive control) was added to the mucosal side, whereas the same volume of KRBB buffer was added to the serosal side. Two hours later, 0.5 mL aliquots were taken from the mucosal side. In addition, in an *in situ* closed loop method, rats were left for 4 h after administration and at the end of the experiment, the perfusate in the intestine was washed with PBS for the determination of the released amount of protein and the activity of LDH. The amount of protein released from the intestinal membranes was measured with BSA as a standard using Bradford Protein Assay Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). The activity of LDH was determined using the LDH CII Assay Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Determination (Assay) of Drugs

The fluorescence intensity of rhodamine 123 and CF in the *in vitro* method was determined with a fluorescence spectrophotometer (Multi-Detection Microplate Reader, POWERSCAN® HT USA) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm, respectively. When rhodamine 123 in plasma was analyzed in the *in situ* closed loop method, it was found to be metabolized to rhodamine 110 by esterase in the plasma. Therefore, rhodamine 123 and rhodamine 110 were separately measured by HPLC (Shimadzu CBM-20A System) method, using Cosmosil reverse phase column (150 \times 4.6 mm, particle size 5 μm) with a fluorescence spectrophotometer (Shimadzu RF-10A) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 546 nm, respectively. The mobile phase was acetonitrile: 1% triethylamine (pH 3.0) = 28:72. The flow rate was 1.0 mL/min, and run at a rate of 1.0 mL/min. Ethyl acetate (0.5 mL) was added to 0.1 mL of the plasma samples and mixed for 20 s and centrifuged at 15,000 rpm for 5 min. The organic layer (5 mL) was transferred to a clean test tube and evaporated in a centrifugal evaporator at 40°C, the residue was then dissolved in a solution (acetonitrile : 1% triethylamine = 28:72), and the solution (80 μL) was injected into the HPLC system. The standard curve showed a good linearity over a concentration range of 5–500 ng/mL for rhodamine 123 and 10–200 ng/mL for rhodamine 110, respectively.

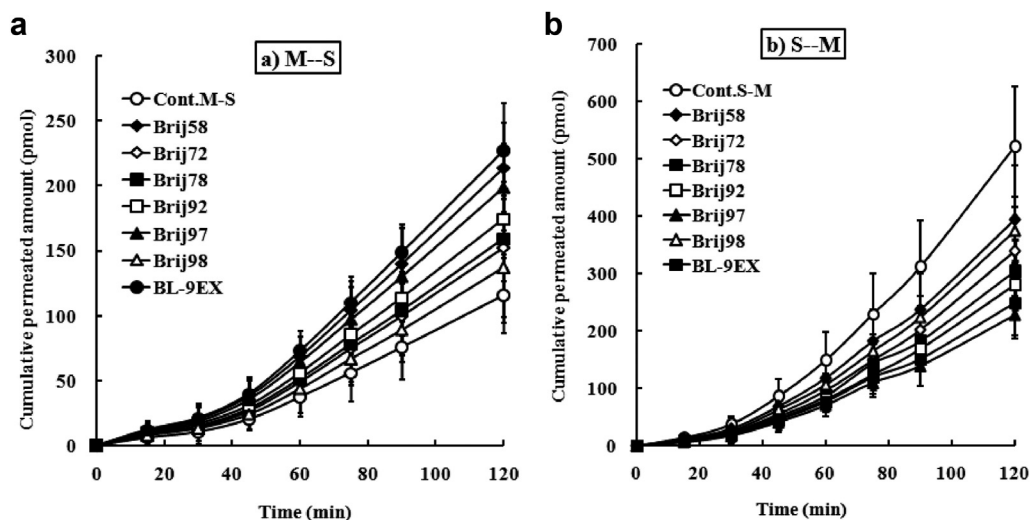


Figure 1. Time course of absorptive (M to S) and secretory (S to M) transport of rhodamine 123 and effects of 0.025% Brijs on the transport of rhodamine 123 across the rat jejunal membrane. Keys: (a) M to S: (○) Control, (◆) Brij58 (0.025%), (◇) Brij72 (0.025%), (■) Brij78 (0.025%), (□) Brij92 (0.025%), (▲) Brij97 (0.025%), (△) Brij98 (0.025%), and (●) BL-9EX (0.025%); (b) S to M: (○) Control, (◆) Brij58 (0.025%), (◇) Brij72 (0.025%), (■) Brij78 (0.025%), (□) Brij92 (0.025%), (▲) Brij97 (0.025%), (△) Brij98 (0.025%), and (●) BL-9EX (0.025%). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

Statistical Analysis

Each value was expressed as the mean \pm standard error and statistical analysis was performed by the analysis of variance with a one-way layout for comparisons with $p < 0.05$ as the minimum levels of significance.

Results

Effect of Brijs on the Transport of Rhodamine 123 Across the Intestinal Membranes by the In Vitro Diffusion Chamber System

Figure 1 shows the time course of absorptive (mucosal to serosal) and secretory (serosal to mucosal) transport of rhodamine 123 across the stripped jejunal epithelium in the presence or absence of various Brijs (0.025%). As shown in the figure, in the absence of Brijs, rhodamine 123 was much more permeable in the secretory direction than in the absorptive direction, and the secretory transport (P_{appsm}) of rhodamine 123 was 6-fold greater than its absorptive transport (P_{appms}), indicating that the net movement of rhodamine 123 across the rat jejunum was preferentially in the secretory direction. When 0.025% Brij was added to the mucosal side, the secretory transport of rhodamine 123 was significantly reduced, whereas the absorption transport was slightly enhanced.

In the previous studies, we found that the absorptive transport of rhodamine 123 was increased and its secretory transport was decreased in the presence of 0.3 mM verapamil and 20 μ M CyA, the typical P-gp substrates, using the *in vitro* transport model.^{10,15} Therefore, we confirmed that the effect of some additives on the function of P-gp can be evaluated using this transport system.

Table 2 shows the effects of various Brijs with different concentrations on the transport of rhodamine 123 across the stripped jejunal epithelium. First, we examined the effects of CyA (20 μ M) on the transport of rhodamine 123. The absorptive and secretory transport of rhodamine 123 were significantly enhanced and reduced in the presence of CyA (20 μ M) as compared to the control group, respectively. Therefore, we confirmed that the diffusion chamber system and Caco-2 cell experiment could be useful to evaluate the effects of Brijs on the function of P-gp in the intestine.

The absorptive transport of rhodamine 123 was enhanced more than 2-fold in the presence of Brij97 (0.025%, vol/vol) and BL-9EX (0.025%, vol/vol), and other Brijs resulted in less than 2-fold increase compared with the control group. On the other hand, the secretory transport of rhodamine 123 was significantly reduced in the presence of these Brijs.

Table 2 also indicates the ER of rhodamine 123 in the presence of various Brijs. The ER was remarkably reduced in the presence of Brijs and about 4-fold in the case of BL-9EX (0.025%, vol/vol) and Brij97 (0.025%, vol/vol) as compared with control. Overall, various Brijs at their low concentrations could reduce the ER of rhodamine

Table 2

Apparent Permeability Coefficients of Rhodamine 123 in the Presence of Various Types of Brijs by an *In Vitro* Diffusion Chamber Method

Group	Concentrations	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		ER
		M-S	S-M	
Control		0.48 ± 0.08	3.30 ± 0.01	6.88
Brij58 (wt/vol)	0.01%	0.60 ± 0.02	$1.86 \pm 0.06^*$	3.05
	0.025%	$0.86 \pm 0.11^*$	2.24 ± 0.09	2.60
	0.05%	0.73 ± 0.01	$1.93 \pm 0.31^*$	2.64
Brij72 (wt/vol)	0.01%	0.75 ± 0.18	$1.92 \pm 0.14^*$	2.56
	0.025%	0.72 ± 0.50	$1.96 \pm 0.19^*$	2.73
	0.05%	$0.97 \pm 0.01^*$	2.03 ± 0.01	2.09
Brij78 (wt/vol)	0.01%	$0.81 \pm 0.19^*$	2.13 ± 0.08	2.62
	0.025%	0.61 ± 0.01	$1.80 \pm 0.18^*$	2.95
	0.05%	0.63 ± 0.02	$1.91 \pm 0.33^*$	3.03
Brij92 (vol/vol)	0.01%	$0.83 \pm 0.14^*$	$1.83 \pm 0.09^*$	2.20
	0.025%	$0.82 \pm 0.17^*$	$1.85 \pm 0.26^*$	2.26
	0.05%	$0.88 \pm 0.07^*$	$1.81 \pm 0.28^*$	2.06
Brij97 (vol/vol)	0.01%	$0.82 \pm 0.06^*$	$1.83 \pm 0.19^*$	2.22
	0.025%	$1.04 \pm 0.06^{**}$	$1.75 \pm 0.23^{**}$	1.70
	0.05%	$0.85 \pm 0.32^*$	$1.71 \pm 0.23^{**}$	2.02
Brij98 (wt/vol)	0.01%	0.75 ± 0.02	2.08 ± 0.21	2.76
	0.025%	$0.85 \pm 0.01^*$	$1.92 \pm 0.15^*$	2.26
	0.05%	0.73 ± 0.09	$1.89 \pm 0.08^*$	2.58
BL-9EX (vol/vol)	0.01%	$0.93 \pm 0.32^*$	1.98 ± 0.24	2.14
	0.025%	$1.02 \pm 0.09^{**}$	$1.90 \pm 0.19^*$	1.85
	0.05%	$1.05 \pm 0.09^{**}$	$1.78 \pm 0.11^{**}$	1.69
CyA	20 μ M	$1.08 \pm 0.11^{**}$	$1.73 \pm 0.29^{**}$	1.60

Data are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared with the control.

Table 3

Apparent Permeability Coefficients of CF in the Presence of Various Types of Brijs (0.05%) by an *In Vitro* Diffusion Chamber Method

Group	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		Efr
	M-S	S-M	
Control	5.49 \pm 0.43	6.55 \pm 0.23	1.19
Brij58	5.95 \pm 0.11 ^{N.S.}	6.73 \pm 0.11 ^{N.S.}	1.13
Brij72	5.96 \pm 0.21 ^{N.S.}	6.48 \pm 0.16 ^{N.S.}	1.08
Brij78	5.57 \pm 0.09 ^{N.S.}	6.76 \pm 0.19 ^{N.S.}	1.21
Brij92	5.93 \pm 0.07 ^{N.S.}	6.69 \pm 0.33 ^{N.S.}	1.12
Brij97	5.87 \pm 0.21 ^{N.S.}	6.42 \pm 0.34 ^{N.S.}	1.09
Brij98	5.46 \pm 0.13 ^{N.S.}	6.54 \pm 0.10 ^{N.S.}	1.17
BL-9EX	5.57 \pm 0.24 ^{N.S.}	6.59 \pm 0.15 ^{N.S.}	1.18

The results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments. N.S., no significant difference, compared with the control.

123, and among these Brijs, BL-9EX and Brij97 were the most effective excipients for reducing the Efr of rhodamine 123, which might be due to the inhibition of P-gp function in the intestine.

Effects of Brijs on the Transport of CF Across the Intestinal Membranes by the *In Vitro* Diffusion Chamber System

Table 3 shows the effects of various 0.05% Brijs on the transport of CF across the stripped jejunal epithelium. CF, which is transported by a passive diffusion via a paracellular pathway, is used as a model of non-P-gp substrate and can confirm whether the effects of Brijs on the intestinal transport of drugs were specific for the substrates of P-gp. As shown in Table 3, we found almost no significant differences in the absorptive and secretory transport of CF with or without 0.05% Brijs in jejunal membranes. In addition, the Efr of CF was not changed by the addition of Brijs. Taken together, these findings suggest that Brijs did not change the transport of non-P-gp substrates including CF and they can specifically affect the intestinal transport of rhodamine 123, a substrate of P-gp.

Effects of Brijs on TEER and the Transport of Rhodamine 123 in *Caco-2* Cell Monolayers

Table 4 shows the transport of rhodamine 123 in *Caco-2* cell monolayers. The transport of rhodamine 123 from the BL to the AP side was higher than transport in the AP to the BL side. In addition, the Efr was 8.23, indicating that the transport of rhodamine 123 in *Caco-2* cell monolayers was preferentially in the secretory direction.

Table 4 also shows the effects of various Brijs (0.0025%) on the transport of rhodamine 123 in *Caco-2* cell monolayers. The $P_{app}(A-B)$ values were 1.78- to 2.29-fold enhanced in the

Table 4

Apparent Permeability Coefficients of Rhodamine 123 in the Presence of Various Types of Brijs (0.0025%) by an *In Vitro* *Caco-2* Cell Permeability Experiment

Group	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		Efr
	A-B	B-A	
Control	1.61 \pm 0.25	13.26 \pm 0.23	8.23
CyA (10 μ M)	3.81 \pm 0.34*	4.38 \pm 0.19**	1.15
Brij58	3.45 \pm 0.38*	10.22 \pm 0.11	2.96
Brij72	2.10 \pm 0.41	9.26 \pm 0.16*	2.99
Brij78	3.21 \pm 0.33*	8.24 \pm 0.19**	2.67
Brij92	3.35 \pm 0.21*	8.64 \pm 0.33*	2.58
Brij97	3.54 \pm 0.29*	8.14 \pm 0.34**	2.29
Brij98	2.88 \pm 0.26	9.55 \pm 0.12	3.32
BL-9EX	3.52 \pm 0.33*	7.69 \pm 0.15**	2.18

Data are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared with the control.

presence of these Brijs, and the $P_{app}(B-A)$ values were significantly reduced. In addition, the Efr of rhodamine 123 was remarkably reduced in the presence of Brijs, especially 3.59- and 3.77-fold decreased in the case of Brij97 and BL-9EX, respectively, as compared with the Efr of control. And the Efr values BL-9EX and Brij97 were almost similar to the value of CyA (10 μ M). Therefore, these findings suggested that Brijs might reduce the function of P-gp in the *Caco-2* cell membranes as well as the intact rat intestines.

In this study, we also used *Caco-2* cell monolayers to examine the possibility of involvement of tight junctions in the absorption. As shown in Figure 2, the TEER values were not significantly changed by the Brijs. Therefore, these findings suggest that Brijs might not loosen the tight junctions of the intestinal membranes and hence the transport of drugs via a paracellular pathway.

Effects of Brijs on the Intestinal Absorption of Rhodamine 123 by the *In Situ* Loop Method

We next examined the effects of Brijs on the intestinal absorption of rhodamine 123 by an *in situ* loop method to find whether Brijs might also affect the intestinal absorption of rhodamine 123 in *in vivo* studies as well as *in vitro* studies. Figure 3a and Table 5 show plasma concentration-time profiles and pharmacokinetic parameters of rhodamine 123 in the presence or absence of 0.05% Brijs. As shown in Figure 3a, Brijs increased the plasma concentrations of rhodamine 123 remarkably. We observed a significant increase in the $AUC_{0-240 \text{ min}}$ values in the presence of Brijs, and the maximal absorption enhancing effect was seen in the presence of BL-9EX (0.05%, vol/vol) with $AUC_{0-240 \text{ min}}$ 2.54 times more than the $AUC_{0-240 \text{ min}}$ of the control, as shown in Table 5.

We also evaluated the effects of BL-9EX on intestinal absorption of CF, a non-P-gp substrate and a paracellular compound (data not shown). The $AUC_{0-240 \text{ min}}$ value of CF in the presence of BL-9EX (0.05%, vol/vol) was 6536 \pm 514 ng·min/mL, which was not significantly different from the AUC value (5436 \pm 414 ng·min/mL) of CF in the control. Therefore, the intestinal absorption of CF with BL-9EX was not significantly changed as compared with CF alone as the control and BL-9EX at this low concentration might not loosen the tight junction of the intestinal epithelium and might not increase the intestinal absorption of rhodamine 123 via a paracellular pathway.

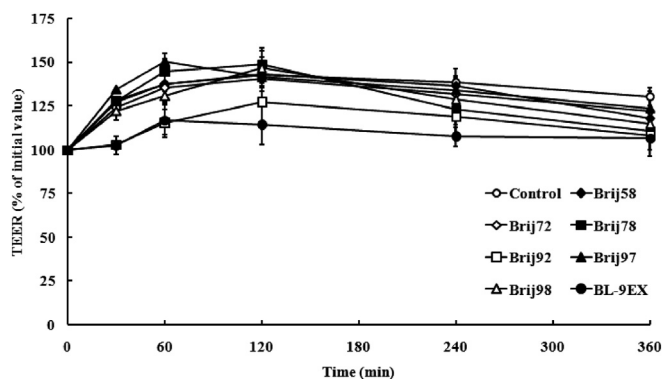


Figure 2. Effect of Brij (0.0025%) on TEER in an *in vitro* *Caco-2* cell permeability experiment. The dose of rhodamine 123 was 10 μ M. Keys: (○) Control, (◆) Brij58 (0.0025%), (◇) Brij72 (0.0025%), (■) Brij78 (0.0025%), (□) Brij92 (0.0025%), (▲) Brij97 (0.0025%), (△) Brij98 (0.0025%), and (●) BL-9EX (0.0025%). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

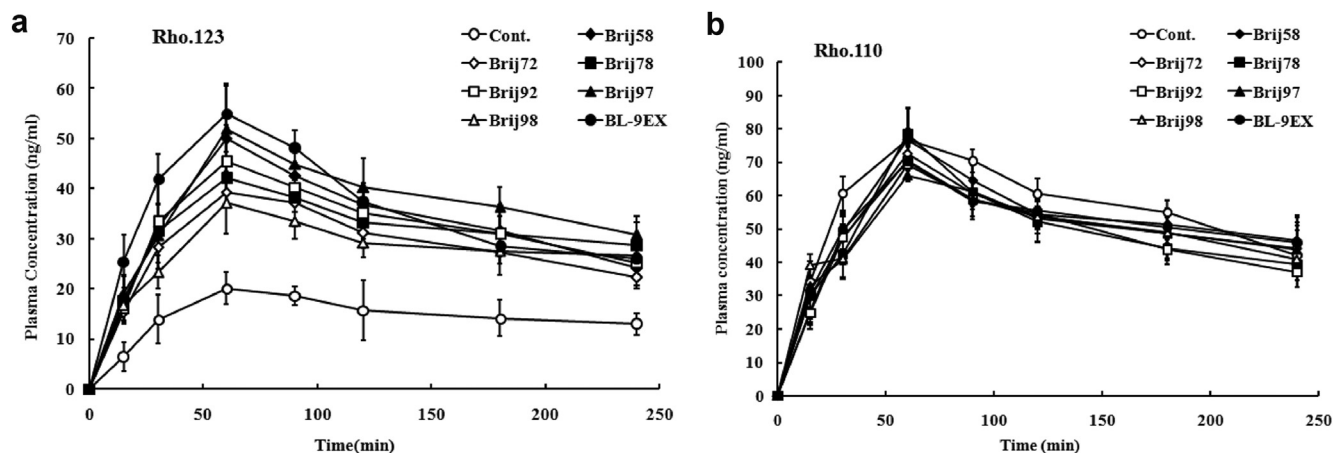


Figure 3. (a) Effects of 0.05% Brij surfactants on plasma concentration-time profiles of rhodamine 123 (5 mg/kg) in rat small intestine by an *in situ* closed loop study. Keys: (○) Control, (◆) Brij58 (0.05%), (◇) Brij72 (0.05%), (■) Brij78 (0.05%), (□) Brij92 (0.05%), (▲) Brij97 (0.05%), (△) Brij98 (0.05%), and (●) BL-9EX (0.05%). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments. (b) Effects of 0.05% Brij surfactants on plasma concentration-time profiles of rhodamine 110 after administration of rhodamine 123 to rat small intestine by an *in situ* closed loop study. Keys: (○) Control, (◆) Brij58 (0.05%), (◇) Brij72 (0.05%), (■) Brij78 (0.05%), (□) Brij92 (0.05%), (▲) Brij97 (0.05%), (△) Brij98 (0.05%), and (●) BL-9EX (0.05%). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

On the other hand, we also examined the plasma concentration of rhodamine 110, a metabolite of rhodamine 123, after intestinal administration of rhodamine 123 in rats. As shown in Figure 3b and Table 6, the plasma concentration of rhodamine 110 was not significantly changed by the addition of Brij surfactants, and the pharmacokinetic parameters of rhodamine 110 were also not remarkably changed as compared with the control.

Effects of Brij surfactants on the Small Intestinal Membrane Damage Determined by Measuring the Release of LDH and Protein

Finally, we evaluated the small intestinal membrane damage in the presence of Brij surfactants. The amount of activity of LDH and the amount of protein released from the small intestinal membranes were measured by an *in vitro* diffusion chamber system and an *in situ* closed loop method.

As shown in Figures 4a, 4b, 5a, and 5b, the amount of activity of LDH and the protein released from the intestinal membranes were not significantly increased when compared with the control in both *in vitro* and *in vivo* studies, while 3% (vol/vol) Triton X-100, a positive control, significantly increased the release of these 2 markers from the intestinal membranes. These findings suggest that Brij surfactants might not cause serious membrane damages and the enhanced intestinal absorption of rhodamine 123 was not due to the intestinal membrane damage caused by Brij surfactants.

Table 5
Pharmacokinetic Parameters of Rhodamine 123 After Its Administration Into Intestine With or Without Various Types of Brij surfactants (0.05%) *In Situ* Closed Loop Method

Parameters	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0-240 \text{ min}}$ (ng·mL/min)	EhR
Control	21.21 \pm 1.79	60.0 \pm 10.0	3581 \pm 364	—
Brij58	49.97 \pm 3.13**	60.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	8050 \pm 460**	2.24
Brij72	39.35 \pm 2.67*	60.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	6737 \pm 427*	1.87
Brij78	42.07 \pm 1.32**	60.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	7598 \pm 481**	2.11
Brij92	45.41 \pm 3.25*	50.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	7753 \pm 397**	2.15
Brij97	51.93 \pm 5.21**	70.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	8787 \pm 393**	2.44
Brij98	38.09 \pm 4.99*	80.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	6653 \pm 369*	1.85
BL-9EX	55.06 \pm 7.44**	70.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	9193 \pm 481**	2.54

The dose of rhodamine 123 was 5 mg/kg. The results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 rats.

N.S., no significant difference, compared with the control.

** p < 0.01, * p < 0.05.

Discussion

Previous studies have showed that various nonionic surfactants and PEGs inhibited the secretory directed transport of rhodamine 123. In this study, we demonstrated that Brij surfactants improved the intestinal transport and absorption of rhodamine 123, which might be due to the inhibition of P-gp function in the intestine, in spite of no direct evidence to support this speculation. We used rhodamine 123, which is a well-known P-gp substrate, because this compound is easily assayed and is widely used for evaluating the function of P-gp in the field of cancer chemotherapy as well as biopharmaceutics.²⁵

As shown in Figure 1, in the absence of Brij surfactants, the secretory transport (S to M) of rhodamine 123 across the intestinal membranes was much greater than its absorptive transport (M to S), indicating that the intestinal transport of rhodamine 123 was preferentially in the secretory direction. The secretion of rhodamine 123 was reduced and its absorption was enhanced at the same time in the presence of Brij surfactants. In addition, Table 2 also illustrates that the absorptive transport was clearly increased, while the secretory transport was decreased by Brij surfactants as compared with the control. In addition, the P_{appSM}/P_{appMS} ratio was significantly decreased in the presence of Brij surfactants. Our previous studies confirmed that the P_{appSM}/P_{appMS} ratio of rhodamine 123 was decreased by the most extensively characterized P-gp inhibitors, such as verapamil and CyA. Moreover, our previous studies indicated that PEGs and their

Table 6
Pharmacokinetic Parameters of Rhodamine 110 After Administration of Rhodamine 123 (5 mg/kg) Into Intestine With or Without Various Types of Brij surfactants by an *In Situ* Closed Loop Method

Parameters	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0-240 \text{ min}}$ (ng·mL/min)
Control	76.81 \pm 3.05	60.0 \pm 10.0	14,249 \pm 280
Brij58	76.65 \pm 3.47 ^{N.S.}	60.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	12,647 \pm 302 ^{N.S.}
Brij72	72.51 \pm 4.20 ^{N.S.}	60.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	12,284 \pm 409 ^{N.S.}
Brij78	78.62 \pm 7.45 ^{N.S.}	60.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	11,779 \pm 580 ^{N.S.}
Brij92	70.35 \pm 4.54 ^{N.S.}	50.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	11,489 \pm 533 ^{N.S.}
Brij97	66.10 \pm 5.48 ^{N.S.}	70.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	11,843 \pm 683 ^{N.S.}
Brij98	69.40 \pm 4.48 ^{N.S.}	50.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	12,175 \pm 402 ^{N.S.}
BL-9EX	70.29 \pm 5.52 ^{N.S.}	80.0 \pm 10.0 ^{N.S.}	12,344 \pm 512 ^{N.S.}

The results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments. N.S., no significant difference, compared with the control.

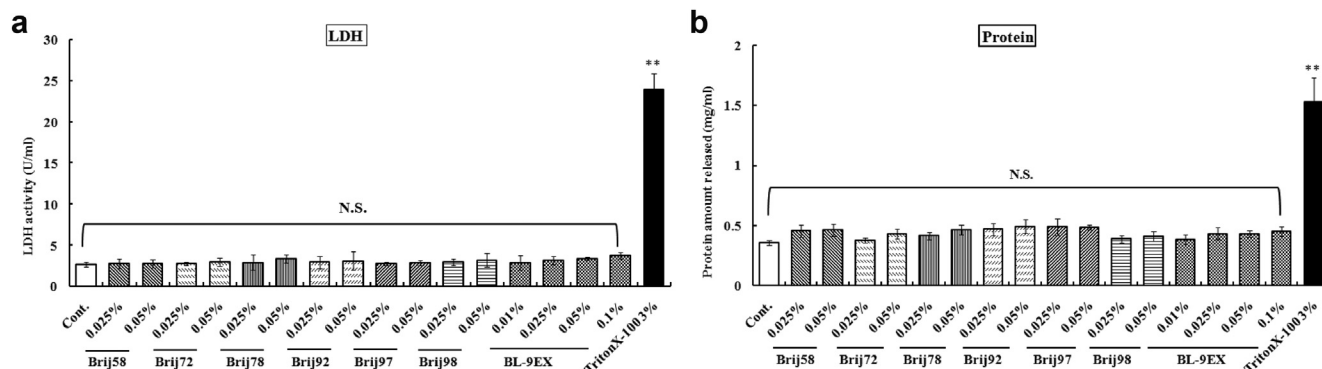


Figure 4. Membrane toxicity of various Brij surfactants in the rat small intestine by an *in vitro* diffusion chamber method. (a) The membrane damage was determined by measuring the activities of LDH. (b) The membrane damage was determined by measuring the amount of protein from the small intestinal membranes. Each result represents the mean \pm standard error of 3–4 experiments. ** $p < 0.01$, N.S., no significant difference, compared with the control.

derivatives could reduce the EfR of rhodamine 123 and other P-gp substrates, such as prednisolone in the small intestine.^{10,26} Therefore, we could confirm to evaluate the effect of pharmaceutical excipients and P-gp inhibitors on the function of P-gp in the intestine using this *in vitro* diffusion chamber system. In addition, these findings suggested that Brij surfactants might inhibit the function of P-gp, thereby reducing the EfR of rhodamine 123 in the intestine, although we do not have direct evidence to support this speculation at present.

In this study, among various types of Brij surfactants, Brij 97 and BL-9EX were the most effective to reduce the EfR of rhodamine 123 in the intestine compared with other types of Brij surfactants. The reason for the enhanced effect of Brij97 and BL-9EX is not fully understood. Because the physicochemical properties of these Brij surfactants were different with each other, probably some physicochemical properties such as solubility, molecular weight, HLB value, critical micelle concentration (CMC), and so on of Brij surfactants might inhibit the function of P-gp in the intestine, thereby affecting the transport and absorption of rhodamine 123.

We used jejunal intestine for estimating the transport of rhodamine 123 in this study. Previously, some studies reported that the expression level of P-gp in the intestine was dependent on the region of the intestine and P-gp expression increased from the

proximal to distal regions of the small intestine. Moreover, our previous studies also indicated a regional difference in the transport of rhodamine 123, and it was found to be the highest in the ileum.²¹ Furthermore, Yumoto et al.²⁷ reported that the transport of rhodamine 123 was remarkably observed in the upper and lower ileum rather than duodenum and jejunum. However, in these previous papers, the secretory preferential transport of rhodamine 123 was still clearly observed in the jejunum and therefore jejunum was used for the transport studies in this article.

We observed a concentration-dependent effect of BL-9EX on the intestinal transport of rhodamine 123 (Table 2). Generally, surfactants can form a micelle above CMC and rhodamine 123 might be incorporated into the micelles. In this case, it was considered that the effect of surfactants on the transport of rhodamine 123 was not concentration-dependent, because rhodamine 123 was incorporated into micelles of surfactants at higher concentrations and the effects of surfactants on the transport of rhodamine 123 were saturated. However, in this study, overall, Brij surfactants decreased the ER of rhodamine 123 in a concentration-dependent manner. Therefore, the contribution of micelle of BL-9EX for the transport of rhodamine 123 can be ignored in this study. Indeed, our preliminary studies indicated that BL-9EX above 0.1% (vol/vol) could form a micelle and this surfactant interacted and entrapped rhodamine

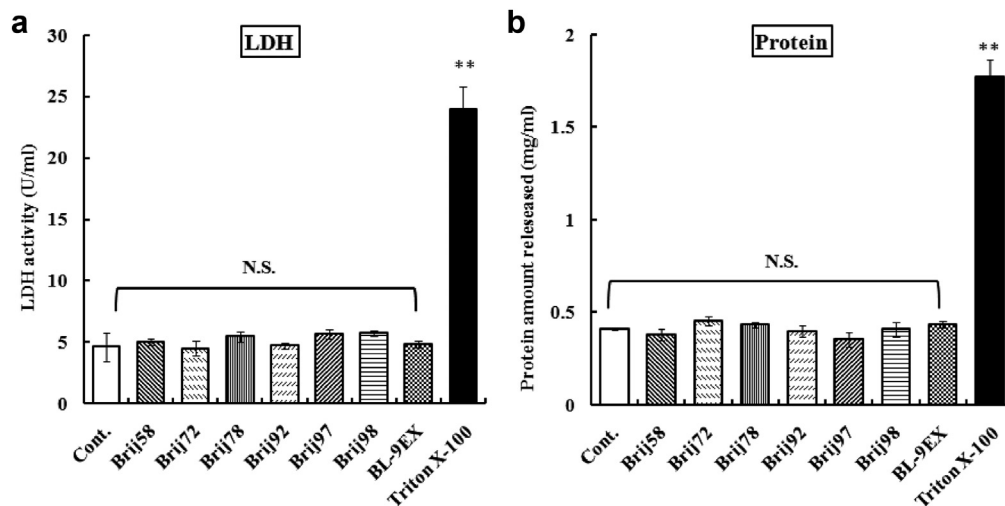


Figure 5. Membrane toxicity of various Brij surfactants in the rat small intestine by an *in situ* closed loop study. The concentration of Brij surfactant was 0.05%. (a) The membrane damage was determined by measuring the activities of LDH. (b) The membrane damage was determined by measuring the amount of protein from the small intestinal membranes. Each result represents the mean \pm standard error of 3–4 experiments. ** $p < 0.01$, N.S., no significant difference, compared with the control.

123 above a concentration of 0.1% (vol/vol), which was higher than that (0.01%–0.05%, vol/vol) used in this transport studies and there was almost no interaction of rhodamine 123 with the micelles of BL-9EX below the concentration of 0.1% (vol/vol).

As shown in Table 3, we found almost no significant effect of Brijis on the transport of CF, a model drug for non-P-gp substrate, which is transported by passive diffusion in both absorptive and secretory directions. In addition, Brijis did not change the Efr of CF in the small intestine. Consequently, the effects of these Brijis on the intestinal transport of drugs were specific for rhodamine 123, a P-gp substrate. Moreover, CF, a water soluble compound, is known to be generally transported via a paracellular pathway. Therefore, these Brijis might not affect the structure of tight junctions, thereby affecting the transport of drugs via a paracellular pathway.

From the previous publications, it is known that drug transporters are expressed in Caco-2. Among these transporters, MRP-2 and P-gp are localized in the AP side thus catalyzing the efflux compounds to the intestinal luminal side,²⁸ while other MRPs are located on the BL side thus catalyzing the influx of compounds to the serosal side.²⁹ Therefore, the effects of Brijis on the intestinal absorption of drugs were examined by the Caco-2 cell monolayers in this study. As shown in Table 4, the secretory transport (B to A) of rhodamine 123 across the Caco-2 monolayers was decreased and the absorptive transport (A to B) of rhodamine 123 was increased in the presence of Brijis. In addition, Table 4 also illustrates that the $P_{app}(B-A)/P_{app}(A-B)$ ratio was significantly reduced in the presence of Brijis when compared with the control. Moreover, other studies confirmed that Brij35, which also belongs to the family of Brijis, could facilitate the absorptive transport of B12H in Caco-2 cells by modulating P-gp-mediated drug efflux.¹⁸ Collnot et al.³⁰ revealed that the permeation of rhodamine 123 through monolayers of Caco-2 cells was strongly influenced by the length of PEG chains. Therefore, these findings suggested that Brijis could be applied as an effective enhancer to improve intestinal transport of rhodamine 123 by inhibiting the function of P-gp. On the other hand, we studied the effects of Brijis on TEER in Caco-2 cell monolayers. It is known that TEER usually decreased when the tight junctions between the adjacent cells are opened. As shown in Figure 2, the values of TEER were not significantly decreased by Brijis. Thus, Brijis might not change the structure of tight junctions of the intestinal membranes, thereby increasing the intestinal transport of drugs via a paracellular pathway. Probably, because Brijis did not affect the transport of drugs via a paracellular pathway, it is possible that Brijis might affect the intestinal absorption of drugs by inhibiting the function of P-gp.

We next studied the significance and role of P-gp in the intestinal absorption of P-gp substrates, using the *in situ* closed loop method. Our previous studies demonstrated that Labrasol could increase the intestinal absorption of rhodamine 123, although this absorption-enhancing effect was less than the effect of verapamil.²¹ In addition, other studies indicated that PEG 20000 could not only enhance the intestinal absorption of rhodamine 123 but also increase the absorption of quinidine, another P-gp substrate.²⁶ In this study, we compared the intestinal absorption after the administration of rhodamine 123 and coadministration of Brijis using the *in situ* closed loop method. We found that the AUC_{0–240 min} of rhodamine 123 with 0.05% Brijis was greater than that of rhodamine 123 alone (Table 5), which suggests that Brijis, like Labrasol and PEG 20000, might enhance the absorption of rhodamine 123 from the small intestine and inhibit the function of the intestinal P-gp, like other excipients. On the other hand, it is of great importance to investigate the pharmacokinetic parameters of rhodamine 110, which is metabolized by esterases after the oral administration of rhodamine 123. As shown in Figure 3b and Table 6, no significant difference in the plasma concentration of rhodamine 110 and its

pharmacokinetic parameters was seen after the oral administration of rhodamine 123 with or without Brijis, indicating that Brijis might not affect the metabolic process of rhodamine 123 in the intestine.

In this study, one possible reason for the increased absorptive transport by Brijis in the small intestine could be the intestinal epithelium membrane damage caused by Brijis, thereby increasing the transport and absorption of P-gp substrates via a transcellular pathway. Thus, it is important to evaluate the intestinal membrane toxicity with or without Brijis by measuring the activity of LDH and the release of protein. LDH is a cytosolic enzyme and its presence in the luminal fluid is generally regarded as the evidence for cell membrane damage. Protein is also an index of membrane damage, because protein is one of a major component of biological membranes and is released if the biomembrane was damaged.^{31,32} However, as shown in Figures 4a, 4b, 5a, and 5b, Brijis did not enhance the activities of LDH or the amount of protein released from the rat intestinal membranes as evidenced by the *in vitro* and *in vivo* studies, suggesting that Brijis did not cause any membrane damage to the intestinal epithelium. Therefore, they are considered to be a safe excipient for drugs administered via the gastrointestinal tract.

The mechanisms by which Brijis could inhibit the function of P-gp in the intestine were not fully studied in this article. However, several inhibitory mechanisms of P-gp function have been proposed for these agents, including competitive or noncompetitive inhibition of P-gp ATPase,³³ alteration of the conformation by changing cell membrane fluidity,³⁴ downregulation of P-gp expression,³⁵ steric hindrance due to substrate binding,³⁶ and covalent modification of essential cysteines in the nucleotide-binding domains of P-gp.³⁷ Our preliminary studies demonstrated that Cremophor EL, which belongs to the category of nonionic surfactants, could inhibit the function of P-gp by the alteration of membrane fluidity in the intestine. Moreover, our pilot studies also suggested that PEGs might inhibit P-gp ATPase activity and reduce the P-gp function, thereby improving the intestinal absorption of P-gp substrates. Furthermore, Brij78 and Brij97 decreased intracellular ATPase activity of P-gp in multidrug-resistant cells.¹⁹ Therefore, it may be plausible that Brijis that contain the PEG chains might reduce the function of P-gp in the intestine by such mechanisms, although we do not have any direct evidence to support these mechanisms at present.

Conclusion

This study demonstrated that Brijis, which have the suitable HLB values and the structure of a linear PEG chain as their hydrophilic region, were effective to inhibit the P-gp-mediated efflux system, thereby improving the intestinal absorption of drugs in the rat intestine. Moreover, *in vitro* and *in vivo* studies showed that Brijis might be useful excipients for increasing the intestinal transport and absorption of P-gp substrates by reducing the function of the intestinal P-gp and not by intestinal membrane damage. Therefore, Brijis might be used for synthesizing or screening new P-gp inhibitors.

References

- Schwarz UI, Gramatte T, Krappweis J, Oertel R, Kirch W. P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000;38:161–167.
- Tian XJ, Yang XW, Yang X, Wang K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *Int J Pharm.* 2009;367:58–64.
- Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs: the role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;25:129–157.
- Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y, Benet LZ. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci.* 1998;87:1322–1330.

5. Toyobuku H, Tamai I, Ueno K, Tsuji A. Limited influence of P-glycoprotein on small-intestinal absorption of cilostazol, a high absorptive permeability drug. *J Pharm Sci*. 2003;92:2249–2259.
6. Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol*. 1996;48:1083–1089.
7. Emi Y, Tsunashima D, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Role of P-glycoprotein as a secretory mechanism in quinidine absorption from rat small intestine. *J Pharm Sci*. 1998;87:295–299.
8. Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity *in vitro*. *J Pharm Sci*. 2002;91:1991–2002.
9. Wang Y, Hao D, Stein WD, Yang L. A kinetic study of Rhodamine 123 pumping by P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:1671–1676.
10. Shen Q, Lin Y, Handa T, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by *in vitro* transport and *in situ* absorption studies. *Int J Pharm*. 2006;313:49–56.
11. He HJ, Shen Q, Li J. Effects of Borneol on the intestinal transport and absorption of two P-glycoprotein substrates in rats. *Arch Pharm Res*. 2011;34:1161–1170.
12. Cornaire G, Woodley J, Hermann P, Cloarec A, Arellano C, Houin G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates *in vitro* and *in vivo*. *Int J Pharm*. 2004;278:119–131.
13. Twentyman PR, Wright KA, Fox NE. Characterization of a mouse tumor cell line with *in vitro* derived resistance to verapamil. *Br J Cancer*. 1990;61:279–284.
14. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*. 2002;20:11–20.
15. Shono Y, Nishihara H, Matsuda Y, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by cremophor EL and other surfactants by an *in vitro* diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *J Pharm Sci*. 2004;93:877–885.
16. Bogman K, Zysset Y, Degen L, et al. P-glycoprotein and surfactants: effect on intestinal talinolol absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77:24–32.
17. Lo YL, Huang JD. Effects of sodium deoxycholate and sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:665–672.
18. Yu H, Hu YQ, Ip FC, Zou Z, Han YF, Ip NY. Intestinal transport of bis(12)-hupyrindone in Caco-2 cells and its improved permeability by the surfactant Brij-35. *Biopharm Drug Dispos*. 2011;32:140–150.
19. Tang J, Wang Y, Wang D, et al. Key structure of brij for overcoming multidrug resistance in cancer. *Biomacromolecules*. 2013;14:424–430.
20. Grass GM, Sweetana SA. *In vitro* measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharm Res*. 1998;5:372–376.
21. Lin Y, Shen Q, Katsumi H, et al. Effects of labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:1301–1307.
22. Maeng HJ, Yoo HJ, Kim IW, Song IS, Chung SJ, Shim CK. P-glycoprotein-mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci*. 2002;91:2614–2621.
23. Asada H, Douen T, Waki M, et al. Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. *J Pharm Sci*. 1995;84:682–687.
24. Tozaki H, Odoriba T, Iseki T, et al. Use of protease inhibitors to improve calcitonin absorption from the small and large intestine in rats. *J Pharm Pharmacol*. 1998;50:913–920.
25. Fontaine M, Elmquist WF, Miller DW. Use of rhodamine 123 to examine the functional activity of P-glycoprotein in primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers. *Life Sci*. 1996;59:1521–1531.
26. Shen Q, Li W, Lin Y, et al. Modulating effect of polyethylene glycol on the intestinal transport and absorption of prednisolone, methylprednisolone and quinidine in rats by *in vitro* and *in situ* absorption studies. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60:1633–1641.
27. Yumoto R, Murakami T, Nakamoto Y, Hasegawa R, Nagai J, Takano M. Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289:149–155.
28. Takano M, Yumoto R, Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther*. 2006;109:137–161.
29. Prime-Chapman HM, Fearn RA, Cooper AE, Moore V, Hirst BH. Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:476–484.
30. Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, et al. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J Control Release*. 2006;111:35–40.
31. Uchiyama T, Sugiyama T, Quan YS, et al. 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*. 1999;51:1241–1250.
32. Yamamoto A, Uchiyama T, Nishikawa R, Fujita T, Muranishi S. Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the rat small intestine: effects of absorption enhancers on the intestinal absorption of phenol red and the release of protein and phospholipids from the intestinal membrane. *J Pharm Pharmacol*. 1996;48:1285–1289.
33. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361–398.
34. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci*. 2002;16:237–246.
35. Donmez Y, Akhmetova L, Iseri OD, Kars MD, Gunduz U. Effect of MDR modulators verapamil and promethazine on gene expression levels of MDR1 and MRP1 in doxorubicin-resistant MCF-7 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67:823–828.
36. Batrakova EV, Li S, Li Y, Alakho VY, Kabanov AV. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. *Pharm Res*. 2004;21:2226–2233.
37. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Disulfiram metabolites permanently inactivate the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Mol Pharm*. 2004;1:426–433.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.jpharmsci.org

Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism

Effects of 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers on the Function of Intestinal P-glycoprotein and Their Inhibitory Mechanisms



Wanting Zhao, Tammam Alama, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto*

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2016

Revised 13 August 2016

Accepted 1 September 2016

Available online 19 October 2016

Keywords:

intestinal absorption

P-glycoprotein

polyoxyethylene alkyl ethers

membrane fluidity

ATPase activity

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, 2 polyoxyethylene alkyl ethers, on the transport and absorption of 2 P-glycoprotein (P-gp) substrates, quinidine and prednisolone, across the intestinal membrane and to elucidate the inhibitory mechanisms of intestinal P-gp by these polyoxyethylene alkyl ethers. For *in vitro* studies, we used a diffusion chamber method and the Caco-2 cell model. An *in situ* closed-loop method was used for *in vivo* study. The 2 polyoxyethylene alkyl ethers, nonionic surfactants, increased the intestinal absorptive transport of quinidine and prednisolone in the diffusion chamber studies, and absorptive permeability was enhanced in the *in vitro* Caco-2 cell study. Furthermore, these surfactants enhanced the rat intestinal absorption of prednisolone, and we observed no intestinal membrane damage in the presence of these surfactants. Furthermore, these surfactants increased membrane fluidity in intestinal brush border membranes and inhibited P-gp ATPase activity. For *in vitro* and *in vivo* studies, these surfactants enhanced the intestinal absorption of quinidine and prednisolone, 2 P-gp substrates. The alteration in intestinal membrane fluidity and the inhibition of P-gp ATPase activity by these 2 polyoxyethylene alkyl ethers may be confirmed as mechanisms of P-gp inhibition.

© 2016 American Pharmacists Association®. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

One major reason for failure of cancer therapy is multidrug resistance (MDR). MDR is inherent in some types of tumors, whereas it is usually acquired in others. MDR decreases the intracellular concentration of anticancer drugs.^{1,2} The overexpression of membrane transporter proteins, including P-glycoprotein (P-gp) and the multidrug resistance proteins which belong to the ATP-binding cassette transporter family, is confirmed as one of the mechanisms of MDR.³

P-gp, which is an ATP-dependent membrane glycoprotein of 170 kDa, is expressed not only in MDR tumor cells, such as adenocarcinoma cells and leukemia cells,^{4,5} but also in various normal tissues, including brain, the intestinal brush border membranes, liver, kidney, testes, and adrenal glands.^{6,7} In the intestine, P-gp regulates

the intestinal absorption of drugs and other xenobiotics, thus affecting the oral bioavailability of drugs.⁸ In order to overcome the activity of the P-gp efflux transporter and improve the bioavailability of anticancer drugs or P-gp substrates, many pharmacological modulators have been found to inhibit the function of P-gp efflux transport.⁹ However, P-gp modulators such as verapamil and cyclosporin A have marked pharmacological activities. Moreover, these modulators not only inhibit the activity of P-gp but also reduce the function of breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 1.^{10,11} The competitive or noncompetitive blocking of the binding of a substrate to the P-gp drug-binding domain was confirmed as the primary mechanisms of inhibition of P-gp by these inhibitors.¹² Therefore, P-gp modulators which have lower pharmacological activities are important to discover.

Other pharmaceutical excipients, including fatty acids and bile salts such as Labrasol and sodium deoxycholate, could inhibit the function of P-gp, thereby enhancing the absorption of drugs such as P-gp substrates, in *in vitro* and *in vivo* studies.¹³ In recent years, many studies have focused on the effects of the nonionic surfactants such as Pluronic 85, Tween 80, and polyethylene glycols (PEGs) on intracellular accumulation and intestinal absorption of P-gp substrates,^{14–16} which have been determined in the everted

Current address for Sakane: Department of Pharmaceutical Technology, Kobe Pharmaceutical University.

* Correspondence to: Akira Yamamoto (Telephone: (+81)75-595-4661; Fax: (+81) 75-595-4761).

E-mail address: yamamoto@mb.kyoto-phu.ac.jp (A. Yamamoto).

gut sacs of rat jejunum and ileum and the human colon adenocarcinoma (Caco-2) cell line.

Polyoxyethylene alkyl ethers, which belong to the category of nonionic surfactants, are widely used as emulsifying, solubilizing, and wetting agents in topical and cosmetic formulations to improve the dissolution and absorption of poorly soluble drugs.^{17,18} Yu et al.¹⁹ demonstrated that polyoxyethylene glycol dodecyl ether effectively enhanced the absorptive direction of bis-(12)-hupyrindone (B12H) in Caco-2 cells, and Lo¹⁷ found that polyoxyethylene lauryl ether significantly increased the intestinal absorption of epirubicin in rats. Another study indicated that both doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles containing polyoxyethylene 20-stearyl ether were able to overcome P-gp-mediated drug resistance.²⁰ However, these studies did not examine the effects of various polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal transport and absorption of P-gp substrates in both *in vitro* and *in vivo* studies. In our previous reports, polyoxyethylene alkyl ethers increased the intestinal transport and absorption of rhodamine 123 in both *in vitro* and *in vivo* studies.²¹ In that study, polyoxyethylene 10-oleyl ether (Brij97) and polyoxyethylene 9-lauryl ether (BL-9EX) with the structure of the oleyl ether and lauryl ether had greater effects on the absorption of rhodamine 123 than other polyoxyethylene alkyl ethers without these structures in the intestine. However, it has been reported that rhodamine 123, a typical P-gp substrate, might be primarily transported by the paracellular pathway rather than P-gp-mediated efflux absorptive transport.²² Therefore, effects of polyoxyethylene alkyl ethers and other P-gp modulators on the intestinal absorptive transport of rhodamine 123 could not be observed clearly. On the other hand, quinidine, a class IA antiarrhythmic drug, is a well-known P-gp substrate as well as a P-gp inhibitor,²³ and prednisolone, which is effective for the treatment of rheumatoid arthritis and ulcerative colitis, is used as a P-gp substrate.²⁴ In the present study, therefore, we evaluated the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on the intestinal absorption of quinidine and prednisolone via *in vitro* and *in vivo* studies.

On the other hand, little is known about the P-gp inhibitory mechanisms of nonionic surfactants including polyoxyethylene alkyl ethers. Unlike the competitive inhibition exhibited by traditional inhibitors, the inhibitory actions of nonionic surfactants on P-gp function may be attributed to downregulation of P-gp expression, inhibition of P-gp ATPase, depletion of intracellular ATP, or alteration in membrane fluidity.^{25–29} Recently, Tang et al.¹⁸ demonstrated that polyoxyethylene 20-stearyl ether and polyoxyethylene 10-oleyl ether reduced verapamil-induced P-gp ATPase activity and intracellular ATP levels in resistant human lung cancer cells. However, this study did not evaluate the effects of polyoxyethylene alkyl ethers on membrane fluidity, although many nonionic surfactants that inhibit P-gp are known to affect membrane fluidity. Thus, it is important to evaluate the effects of polyoxyethylene alkyl ethers on membrane fluidity if they affect the function of P-gp.

In the present study, the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on the intestinal absorption of 2 P-gp substrates, quinidine and prednisolone, were investigated in *in vitro* and *in vivo* studies. In addition, to determine whether these 2 polyoxyethylene alkyl ethers could enhance intestinal absorptive permeability of P-gp substrates via intestinal membrane damage, intestinal membrane damage was examined by surveying the release of protein and the activity of lactate dehydrogenase (LDH). Finally, we evaluated the inhibitory mechanisms of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers on the P-gp efflux transport function by measuring P-gp ATPase activity and membrane fluidity.

Materials and Methods

Materials

Quinidine, prednisolone, bovine serum albumin (BSA), and LDH-Cytotoxic Test Wako were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether were obtained from Nikko Chemicals Company Ltd. (Osaka, Japan). For cell culture, MEM nonessential amino acid solution, fetal bovine serum, and Dulbecco's modified Eagle's medium were purchased from Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA). Trypsin-EDTA, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES), and antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10,000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 mg/mL amphotericin B, 0.85% saline) were prepared by Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) was purchased from Eastman Kodak Company (Rochester, NY). 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), cyclosporin A, and Hank's balanced salt were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO). Dansyl chloride (DNS-CL) and 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-*p*-toluenesulfonate (Tma-DPH) were supplied by Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX). Human MDR1 membranes and ATPase assay reagent kit were supplied by GenoMembrane Inc. (Kanagawa, Japan). All other reagents were of analytical grade.

Preparation of Drug Solutions

Quinidine, prednisolone, and CF were dissolved in HEPES buffer (pH 7.4) containing 25 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 140 mM NaCl, and 5 mM glucose. Excipients, including 0.01%–0.05% (v/v) polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether and 20 μ M cyclosporin A, were added to the drug solution. In a diffusion chamber experiment, 0.1 mM quinidine, 0.2 mM prednisolone, and 10 μ M CF were used, whereas in the Caco-2 cell experiment, 10 μ M quinidine was used. In the *in vivo* absorption study, 5 mg/kg of prednisolone or quinidine was used, respectively. The concentrations of 2 polyoxyethylene alkyl ethers and these drugs were selected in line with the previous studies.²¹

Cell Culture

Caco-2 cells with passage 48–54 (Dainippon Sumitomo Pharma Company, Ltd.) were grown in 1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution, 100 μ M MEM nonessential amino acid solution, and Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were seeded in density 1×10^5 on polycarbonate inserts (Transwells, 12 mm in diameter, 0.4- μ m pores; Corning Inc., New York, NY) and cultured in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. Every 2 days, the growth medium was changed. The transepithelial electrical resistance (TEER) was measured at 37°C with a Millicell®-ERS Epithelial Volt-Ohm Meter (Millipore, Billerica, MA) to evaluate the integrity of the cell monolayers. After 21 days, the TEER values of Caco-2 monolayers were above 500 Ω ·cm² that were employed in transport experiments.

Transport of Drugs Across the Intestinal Membrane by an In Vitro Diffusion Chamber System

Transport of drugs across the intestinal membrane was examined by a diffusion chamber system (Corning Coster Corporation).^{16,21} Male Wistar rats (230–260 g) were anesthetized with Somnopentyl® (sodium pentobarbital, 32 mg/kg body weight

intraperitoneally; Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) after fasting overnight. The studies were carried out in accordance with the guidelines of the Animal Ethics Committee at Kyoto Pharmaceutical University. The intestine was exposed through a midline abdominal incision, removed, and washed in PBS. Intestinal segments, excluding Peyer's patches, were isolated and immersed in ice-cold Tris-HEPES buffer solution. Segments were then cut open, the muscle layer was stripped, intestinal sheets were mounted on the pins of the cell, and the half-cells were clamped together. Drug solution (7 mL) was added to the donor side, and the same volume of drug-free buffer was added to the opposite side. The temperature of the intestinal membrane was maintained at 37°C with a water bath, and solutions from both sides of the cells were circulated by gas lift (95% O₂/5% CO₂). During the transport studies, 0.15-mL aliquots were taken from the receptor chamber at predetermined times up to 120 min and replaced with an equal volume of buffer solution. The amount of drugs was assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Apparent permeability coefficients (P_{app}) of drugs were calculated using Equation 1:

$$P_{app} = \frac{\text{Flux}}{\text{Area} \cdot C_0 \cdot 60} \quad (1)$$

P_{app} is the apparent parameter of permeability (cm/s), flux is the slope of the linear portion of cumulative transport amount to time at the steady state (pmol/min), area is the area of the diffusion chamber for transport (1.78 cm²), and C_0 is the initial concentration of drug (pmol/mL).

Efflux ratio (ER) was used to evaluate the function of P-gp^{30,31} in this study. The calculation was performed using Equation 2:

$$ER = \frac{P_{appS} - m}{P_{appm} - s} \quad (2)$$

$P_{appS} - m$ is the average of the permeability coefficient from the serosal to the mucosal side and $P_{appm} - s$ is the average of the permeability coefficient from the mucosal to the serosal side.

Transport of Quinidine in the Presence of 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers by Caco-2 Cell Monolayers

The transport study of quinidine by Caco-2 cells was carried out as described previously.²³ Briefly, Caco-2 cells grown in 12-well plates were rinsed twice with warm Hank's balanced salt solution (HBSS) and then equilibrated with HBSS buffer at 37°C for 30 min. In the bidirectional transport study, quinidine (10 μM) in HBSS buffer without polyoxyethylene alkyl ethers, which was used as the control for permeability transport, was loaded on the apical (AP) side (0.5 mL of transport buffer) or basolateral (BL) side (1.5 mL of transport buffer), that is, the donor side. To evaluate the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on membrane transport, 0.01% polyoxyethylene alkyl ether was present on the AP side with quinidine (10 μM) and the BL side at the same concentrations as stated previously. Aliquots of 80-μL or 120-μL samples were taken from the AP or BL side, respectively, at different time points (15, 30, 60, 90, and 120 min) during the experiment. An equal volume of fresh buffer was replaced in the receiver chamber after each sampling. The concentrations of drugs were assayed by HPLC. The P_{app} of quinidine in the Caco-2 cell model was calculated using Equation 3:

$$P_{app} = \frac{\text{Flux}}{\text{Area} \cdot C_0 \cdot 60} \quad (3)$$

P_{app} is the apparent parameter of permeability (cm/s), flux is the rate of quinidine appearance in the receiver side (nmol/min), area is

the membrane surface area (1.12 cm²), and C_0 is the initial concentration of quinidine (nmol/mL).

The efflux ratio (ER) was expressed as the P_{app} value of BL-to-AP transport to that of AP-to-BL transport using Equation 4:

$$ER = \frac{P_{appB} - A}{P_{appA} - B} \quad (4)$$

$P_{appB} - A$ and $P_{appA} - B$ are the average of the permeability coefficients for secretory and absorptive transport, respectively.

Intestinal Absorption of Prednisolone and Quinidine by an In Situ Closed-Loop Model

Intestinal absorption of prednisolone and quinidine was examined by an *in situ* closed-loop method.³² Male Wistar rats weighing 240–280 g were anesthetized with Somnopentyl® (sodium pentobarbital, 32 mg/kg body weight intraperitoneally). Animals were fasted for approximately 16–18 h before the experiments but were allowed water. The intestine was exposed through midline abdominal incision. After ligating the bile duct, a segment of ileum (about 20 cm long) was isolated and washed with PBS and then tied off at both ends to form a closed loop. The jugular vein was separated to collect the blood samples. Prednisolone or quinidine was dissolved in PBS at pH 7.4 to yield a final dose of 5 mg/kg. Polyoxyethylene alkyl ether was added to the dosing solutions. The drug solution was warmed to 37°C, and 3 mL was injected into the jejunum loop. Blood samples (approximately 0.3 mL) were collected at predetermined time intervals up to 240 min, centrifuged at 12,000 rpm for 5 min, and stored at –40°C until analysis. Then, prednisolone and quinidine were analyzed by HPLC. The peak concentration (C_{max}) and the time to reach the peak concentration (T_{max}) were determined directly from the plasma concentration-time curves. The area under the curve (AUC) was calculated by the trapezoidal method from 0 to the final sampling time (240 min). The absorption enhancement ratio (EhR) of drugs with or without polyoxyethylene alkyl ether was calculated using Equation 5:

$$EhR = \frac{AUC_{\text{polyoxyethylene alkyl ether}}}{AUC_{\text{control}}} \quad (5)$$

Assessment of Intestinal Membrane Damage

The release of protein and the activity of LDH in small intestinal membranes were used to evaluate small intestinal membrane damage in the presence of surfactants using an *in situ* closed-loop method. Two polyoxyethylene alkyl ethers (0.05% v/v) or Triton X-100 (3% v/v) were administered into the intestinal loop. Rats were left for 4 h after administration, and at the end of the experiment, the luminal solution was washed with PBS for the determination of the amount of protein released and the activity of LDH. The concentrations of protein released from the intestinal membranes were measured with BSA as a standard using the Bradford Protein Assay Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). The activities of LDH were determined using the LDH CII Assay Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Assessment of the Effect of 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers on Intestinal Membrane Fluidity

Preparation of the Rat Intestinal Brush Border Membrane Vesicles

Brush border membrane vesicles (BBMVs) were prepared by the divalent cation precipitation method using MgCl₂ in the presence of ethylenedis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA), as described previously.³³ In brief, male Wistar rats weighing

240–280 g were fasted for approximately 16–18 h. An *in situ* small intestinal loop was prepared in each rat, and the small intestine was excised and washed with cold PBS. The small intestine was divided into segments, and the mucosa was scraped with a slide glass and homogenized in 10 volumes of buffer (5 mM EGTA, 12 mM Tris, 300 mM mannitol; pH 7.4 by 1 M HEPES) with a tissue homogenizer. A stock solution of 1 M MgCl_2 was added to the homogenate to give a final concentration of 10 mM MgCl_2 . The mixture was gently stirred for 1 min and allowed to stand at 4°C for 15 min. Then, the suspension was centrifuged at 3000 g for 15 min. The pellets were discarded, and the supernatant was centrifuged again at 32,000 g for 30 min. The pellets containing BBMV were resuspended by 27-gauge needle in the homogenizing buffer. The protein concentrations were determined by Bradford Protein Assay Kit using BSA as a standard, and the final concentration was adjusted to 1 mg/mL in each tube. The samples were frozen by liquid N_2 and kept at -80°C until use.

Measurement of Membrane Fluidity by Fluorescence Polarization

Fluorescence polarization techniques were used to evaluate the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on small intestinal membrane fluidity using the fluorescence probes DPH,³⁴ Tma-DPH,³⁵ and DNS-CL.³⁶ BBMV suspensions (protein concentration, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were incubated with 1 μM DPH or 5 μM DNS-CL for 30 min or with 0.5 μM Tma-DPH for 5 min in Tris-HEPES buffer (25 mM HEPES, 5 mM glucose, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 ; pH 7.4 with 1 M Tris). Polyoxyethylene alkyl ether or 200 μM cholesterol as a positive control was added. Then, the fluorescence intensities and steady-state polarization were determined using a Hitachi F2000 spectrophotometer (Hitachi, Yokohama, Japan) equipped with a polarizer set. The fluorescence polarization (γ) was calculated according to Equation 6:

$$\gamma = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot 2 \cdot I_{\perp}} \quad (6)$$

where I_{\parallel} and I_{\perp} represent the fluorescent intensities of the parallel and perpendicular polarized excitation, respectively. G is the equipment parameter. The excitation and emission wavelengths were 360 nm and 430 nm, respectively, for DPH and Tma-DPH and 380 nm and 480 nm, respectively, for DNS-CL.

Assay of P-gp ATPase Activity

The effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on P-gp ATPase activity were evaluated according to previous reports.^{37–39} In brief, 60 μL of reaction mixture containing 20 μg of human MDR1 membranes and 20 μL of reaction buffer, with or without 2 polyoxyethylene alkyl ethers which were dissolved in PBS or 0.1 mM quinidine, was added to the buffer solution containing 4 mM MgATP, 50 mM Tris-MOPS, 0.1 mM EGTA, 50 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 5 mM sodium azide, and 1 mM ouabain. Then, an identical reaction mixture with or without 500 μM sodium orthovanadate was assayed in parallel for the incubation at 37°C for 30 min. Orthovanadate inhibits P-gp by trapping MgADP in the nucleotide-binding site. Thus, ATPase activity measured in the presence of orthovanadate represents non-P-gp ATPase activity and can be subtracted from the activity measured in the various samples to yield P-gp ATPase activity. The reaction was stopped by addition of 30 μL of 10% sodium dodecyl sulfate. An aliquot (200 μL) of 35 mM ammonium molybdate in a mixture of 15 mM zinc acetate and 10% ascorbic acid (1:4 v/v) was added to each sample and incubated for an additional 20 min at 37°C. The liberated inorganic phosphate was determined by its absorbance at 630 nm according to a phosphate standard curve.³⁹

Drug Assays

Quinidine and prednisolone were separately measured by HPLC (Shimadzu CBM-20A System) method, using a Cosmosil reverse-phase column (150 \times 4.6 mm, particle size 5 μm) with a Shimadzu RF-10A or LC-10 detector.

For the *in vitro* diffusion chamber and Caco-2 cell experiments, the mobile phase for quinidine was acetonitrile:0.4% triethylamine (pH 3.0) = 15:85. The samples were run at a flow rate of 1.0 mL/min at 35°C. The concentrations of quinidine were determined using a fluorescence detector (Shimadzu RF-10A) with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm. The mobile phase of prednisolone was acetonitrile:10 mM potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4 , pH 5.0) = 30:70. The samples were run at a flow rate of 1.0 mL/min at 40°C. The concentrations of prednisolone were determined using a UV detector (Shimadzu LC-10) at 242 nm wavelength.

Then, in the *in situ* closed-loop method, the plasma concentrations of prednisolone and quinidine were determined as follows. Briefly, 1 mL acetonitrile was added to 0.1 mL of the plasma samples and vortexed for 40 s. Then, it was centrifuged at 15,000 rpm for 5 min. The supernatant (1 mL) of prednisolone was transferred to a clean test tube and evaporated in a centrifugal evaporator for 45 min at 60°C, and the supernatant (1 mL) of quinidine was transferred to a clean test tube and evaporated in a centrifugal evaporator for 120 min at room temperature. The residue of prednisolone was then dissolved in a solution (acetonitrile:10 mM KH_2PO_4 = 30:70), and the residue of quinidine was dissolved in a solution (acetonitrile:1.0% triethylamine [pH 3.0] = 15:85). Then, the solution (50 μL) was injected into the HPLC system. The standard curve showed a good linearity over a concentration range of 25–500 ng/mL for prednisolone and quinidine, respectively.

Statistics

All data were expressed as the mean \pm standard error unless noted otherwise. The statistical analysis was performed by the analysis of variance with a 1-way layout for comparisons, with $p < 0.05$ as the minimum level of significance.

Results

Effects of Polyoxyethylene 10-Oleyl Ether and Polyoxyethylene 9-Lauryl Ether on the Transport of P-gp Substrates Across Intestinal Membranes by an In Vitro Diffusion Chamber System

Effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on small intestinal absorption of quinidine and prednisolone, 2 P-gp substrates, were evaluated by an *in vitro* chamber system. Figures 1 and 2 illustrated the time course of mucosal-to-serosal (absorptive) and serosal-to-mucosal (secretory) transport of quinidine and prednisolone across the rat jejunal membranes in the presence or absence of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether (0.05% v/v). In control studies without 2 polyoxyethylene alkyl ethers, the secretory transport of either quinidine or prednisolone was much more permeable than the absorptive direction of P-gp substrates, indicating that quinidine and prednisolone were preferentially transported in the secretory direction. The absorptive transport of the 2 P-gp substrates was markedly increased by the addition of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, especially in the case of quinidine, for which the absorptive transport was more than 3-fold enhanced in the presence of polyoxyethylene 9-lauryl ether compared with the control (Fig. 1a). In contrast, the secretory transport of quinidine and prednisolone

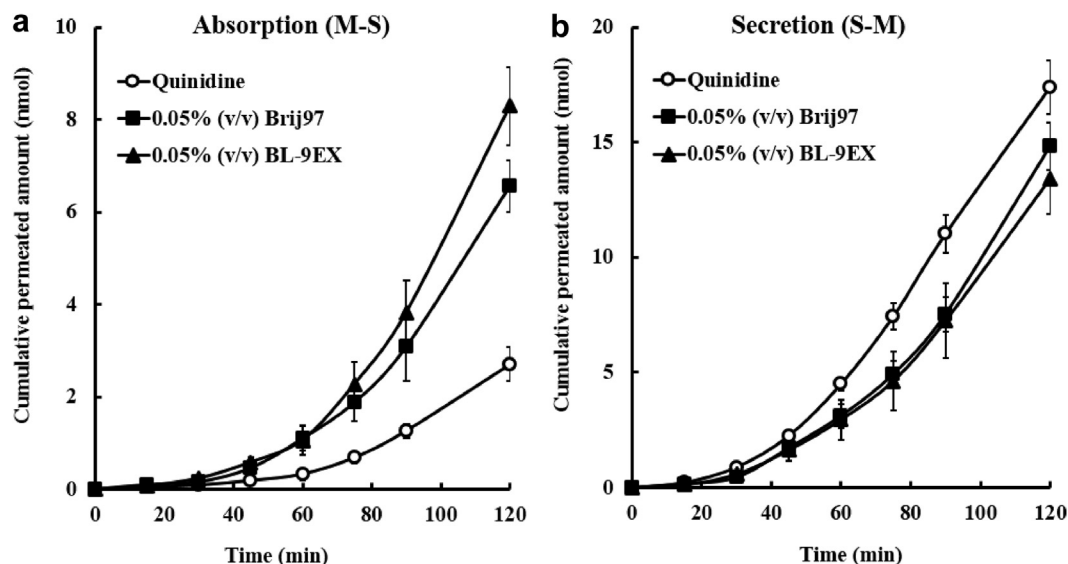


Figure 1. Time course of absorptive transport (M-S) (a) and secretory transport (S-M) (b) of quinidine across the rat jejunal membrane in the absence or presence of 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Keys: (○) quinidine control; (■) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether); (▲) 0.05% BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

decreased in the presence of 2 polyoxyethylene alkyl ethers (Figs. 1b and 2b).

Table 1 shows the effects of 3 concentrations of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers on the permeability of quinidine and prednisolone across the rat jejunal membranes. As shown in this table, we firstly used cyclosporin A, a typical P-gp inhibitor, as a positive control to confirm whether this system was suitable to evaluate the effects of adjuvants on the intestinal transport of P-gp substrates. The absorptive transport (P_{appm-s}) of quinidine and prednisolone was significantly enhanced in the presence of 20 μ M cyclosporin A, whereas the secretory transport (P_{appS-m}) of these P-gp substrates was reduced. These results suggested that the effects of pharmaceutical excipients on the function of P-gp could be examined by the *in vitro* diffusion chamber system. The P_{appm-s} values of quinidine and prednisolone significantly

increased in the presence of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether. On the other hand, only 0.1% (v/v) polyoxyethylene 9-lauryl ether significantly reduced P_{appS-m} values of quinidine, whereas P_{appS-m} of prednisolone decreased at 2 different concentrations of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether compared to the control group.

Table 1 also shows the ER of the 2 P-gp substrates in the presence or absence of 2 polyoxyethylene alkyl ethers. In the control studies, the ERs of quinidine and prednisolone were 3.92 and 2.13, respectively. In the presence of 2 polyoxyethylene alkyl ethers, the ERs of the 2 P-gp substrates decreased to less than two-thirds of the control values.

Next, in order to confirm whether the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal transport of drugs was

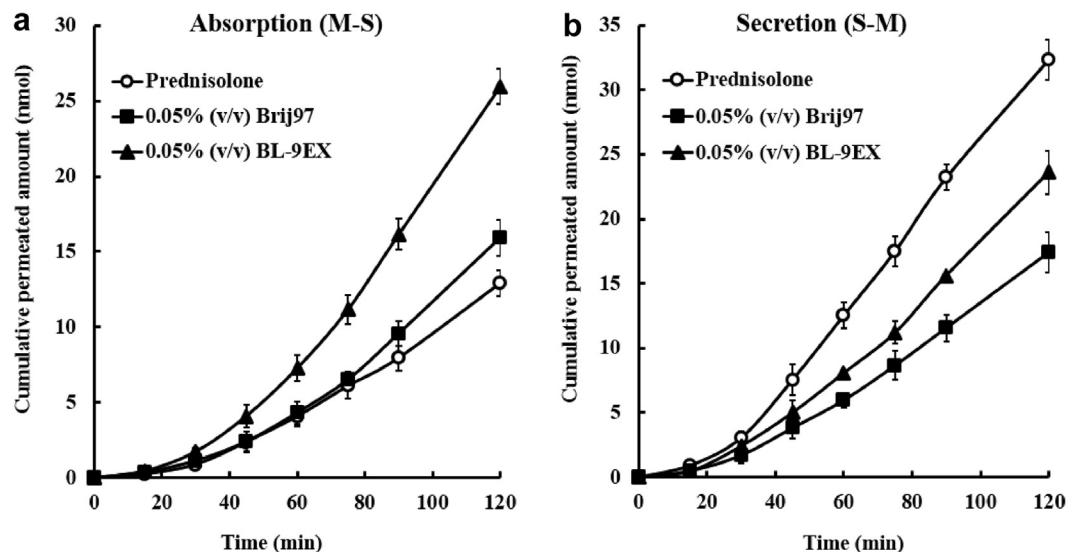


Figure 2. Time course of absorptive transport (M-S) (a) and secretory transport (S-M) (b) of prednisolone across the rat jejunal membrane in the absence or presence of 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Keys: (○) prednisolone control; (■) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether); (▲) 0.05% BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

Table 1Effects of Brij97 (Polyoxyethylene 10-Oleyl Ether) and BL-9EX (Polyoxyethylene 9-Lauryl Ether) on the Permeability of Quinidine and Prednisolone Across Rat Intestinal Membranes^a

Drug	Excipient		$P_{app} \times 10^{-6} \text{ cm/s}^b$		ER
			M-S	S-M	
Quinidine (0.1 mM)	Control		5.25 ± 0.38	20.6 ± 1.7	3.92
	BL-9EX (v/v)	0.025%	11.9 ± 0.9*	16.1 ± 0.7	1.94
		0.05%	12.7 ± 0.7**	15.8 ± 0.4	1.49
		0.1%	14.2 ± 0.8**	14.6 ± 0.5*	0.92
	Brij97 (v/v)	0.025%	10.9 ± 0.7*	20.8 ± 0.4	1.91
		0.05%	11.0 ± 0.9*	17.6 ± 1.0	1.59
		0.1%	15.9 ± 1.8**	15.4 ± 1.4	0.97
	Cyclosporin A	20 μM	17.0 ± 1.1**	14.2 ± 0.6*	0.84
	Control		7.17 ± 0.28	15.3 ± 1.8	2.13
Prednisolone (0.2 mM)	BL-9EX (v/v)	0.025%	12.9 ± 0.6**	13.2 ± 0.7	1.02
		0.05%	15.4 ± 0.6**	11.8 ± 0.9*	0.76
		0.1%	12.6 ± 0.7**	10.8 ± 0.6*	0.86
	Brij97 (v/v)	0.025%	9.49 ± 0.50	11.8 ± 1.1	1.25
		0.05%	9.99 ± 0.44*	8.75 ± 1.27**	0.88
		0.1%	10.1 ± 0.4*	10.4 ± 0.3*	1.03
	Cyclosporin A	20 μM	10.5 ± 0.72*	7.54 ± 0.38**	0.72
	Control		5.93 ± 0.61	6.45 ± 0.83	1.08
	BL-9EX	0.1% (v/v)	5.57 ± 0.24 ^{N.S.}	5.95 ± 0.55 ^{N.S.}	1.06
CF	Brij97	0.1% (v/v)	5.33 ± 0.37 ^{N.S.}	5.78 ± 0.73 ^{N.S.}	1.08

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, compared with the control.

N.S., no significant difference.

^a Effects of Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on apparent permeability of quinidine and prednisolone across rat intestinal membranes were determined by an *in vitro* diffusion chamber method. The samples were collected at 15, 30, 45, 60, 75, 90, and 120 min. The concentrations of quinidine and prednisolone were measured by HPLC.^b Results are expressed as the mean ± standard error of at least 3 experiments.

specific for the substrates of P-gp, we examined the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal transport of CF, a non-P-gp substrate that was used as a negative control and a model of the paracellular marker compound. As shown in Table 1, the absorptive and secretory transport of CF was not significantly enhanced or reduced by the presence of 2 polyoxyethylene alkyl ethers in jejunal membranes. Moreover, the ER of CF was similar with and without the addition of 2 polyoxyethylene alkyl ethers. Therefore, these results suggest that the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal transport of drugs were specific to P-gp substrates. Overall, these findings indicate that these specific surfactants can decrease in ERs of P-gp substrates in the rat intestine, due to the inhibition of P-gp activity in this study.

Effects of Polyoxyethylene 10-Oleyl Ether and Polyoxyethylene 9-Lauryl Ether on the Permeability of Quinidine in Caco-2 Cell Monolayers

Figure 3 and Table 2 show the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on the transport of quinidine in Caco-2 cell monolayers. Figures 3a and 3b show that for quinidine alone, the basolateral-to-apical (B-A) transport was higher than the apical-to-basolateral (A-B) transport, with an ER of 16.79 (Table 2). These results indicate that the transport of quinidine across Caco-2 cell monolayers had a similar tendency as in the *in vitro* diffusion chamber system, in which quinidine was preferentially transported in the secretory direction.

Figures 3a and 3b also show that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether at 0.01% (v/v) decreased the B-A transport of quinidine compared with the control group, whereas they increased the A-B transport of quinidine. In addition, the P_{app} values calculated for this transport study are shown in Table 2. When these 2 polyoxyethylene alkyl ethers were applied to both sides of Caco-2 cell monolayers, the $P_{app}(A - B)$ values of quinidine

significantly increased and the $P_{app}(B - A)$ values remarkably decreased. The ER of quinidine decreased to 7.90 and 6.95 in the presence of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, respectively, compared with the ER of the control group. Thus, these findings suggest that the 2 polyoxyethylene alkyl ethers might reduce the function of P-gp in Caco-2 cell membranes as well as the rat small intestinal membrane.

Effects of 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers on the Intestinal Absorption of Prednisolone by an In Situ Closed-Loop Study

In order to evaluate whether polyoxyethylene alkyl ethers could also enhance the *in vivo* intestinal absorption of P-gp substrates in rats, we examined the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on the intestinal absorption of prednisolone by an *in situ* closed-loop method. As shown in Figure 4, the plasma concentrations of prednisolone were markedly increased by the addition of 0.05% (v/v) polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether. The relevant pharmacokinetic parameters of prednisolone in the presence or absence of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers are indicated in Table 3. The C_{max} of prednisolone with polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether was 3.38- and 3.85-fold higher, respectively, than that of the control group. Moreover, the $AUC_{0-240 \text{ min}}$ increased by 2.42- and 2.53-fold in the presence of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers, respectively, compared with that of the control group. We also evaluated the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on intestinal absorption of quinidine (data not shown). The $AUC_{0-240 \text{ min}}$ values of quinidine in the presence of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether (0.05%, v/v) were $50,600 \pm 874 \text{ ng} \cdot \text{min/mL}$ and $50,100 \pm 774 \text{ ng} \cdot \text{min/mL}$, respectively, which were much higher than the AUC value of quinidine in the control ($20,200 \pm 344 \text{ ng} \cdot \text{min/mL}$). Therefore, the improvement of small intestinal absorption of P-gp substrates, in the presence of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers in *in vivo* and

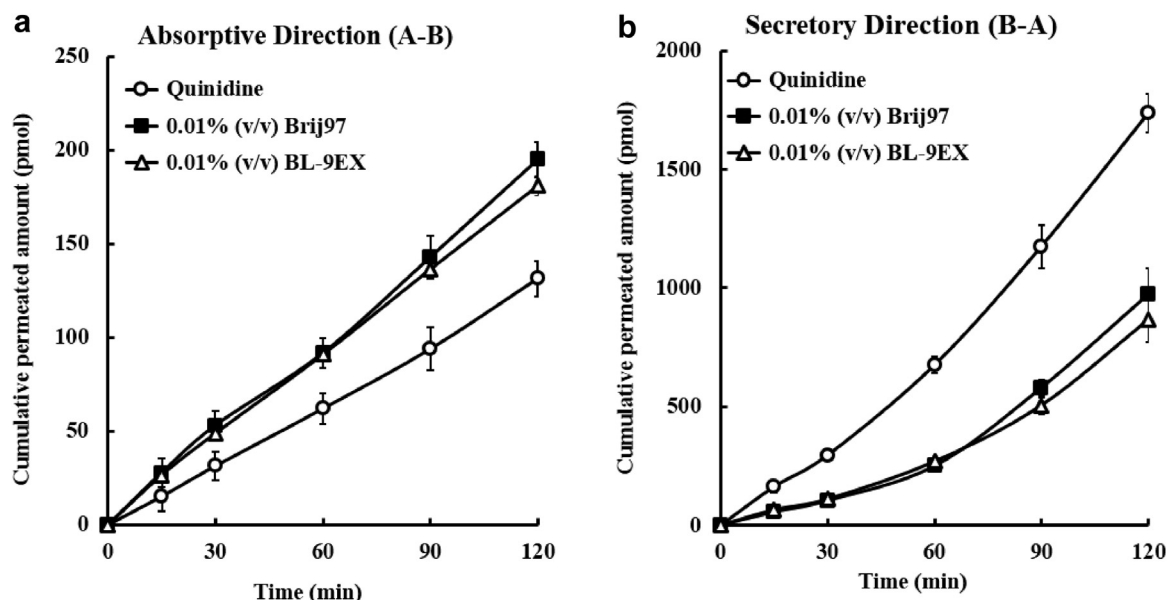


Figure 3. Time course of quinidine transport across Caco-2 cell monolayers in the absorptive directions (A-B) (a) and secretory directions (B-A) (b) in the absence or presence of 0.01% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Keys: (○) quinidine control; (■) 0.01% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether); (△) 0.01% BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

in vitro studies, may be attributed to the inhibition of the function of P-gp efflux transport.

Membrane Damage by 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers in the Rat Small Intestine

Assays for LDH and the release of protein were performed to evaluate membrane damage by polyoxyethylene alkyl ethers in the small intestine by an *in situ* closed-loop experiment. We used 0.05% (v/v) polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether for membrane damage studies because this concentration was used for the *in vitro* and *in vivo* intestinal absorption studies as described previously. As shown in Figures 5a and 5b, the activity of LDH and the amount of protein released were not significantly different compared with the control. In contrast, these biological parameters significantly increased in the presence of 3% (v/v) Triton X-100, a positive control, compared with the control and 2 polyoxyethylene alkyl ether groups. These findings indicate that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might not cause intestinal membrane damage, implying that the enhancement of intestinal absorption of P-gp substrates was probably due to the reduction of the P-gp function

by polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether.

Effects of 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers on Intestinal Membrane Fluidity

To elucidate the mechanisms of P-gp inhibition by 2 polyoxyethylene alkyl ethers, intestinal membrane fluidity was measured by fluorescence polarization. P-gp is sensitive to the lipid environment and might be involved in lipid trafficking and metabolism.³⁹ In this study, we used the fluorescent probes DPH, Tma-DPH, and DNS-CL, which label specific parts of membrane bilayers, to evaluate the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on the intestinal membrane

Table 2
Effects of Brij97 (Polyoxyethylene 10-Oleyle Ether) and BL-9EX (Polyoxyethylene 9-Lauryl Ether) on the Permeability of Quinidine Across Caco-2 Cell Monolayers^a

Drug	Excipient	$P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})^b$		Efr
		A-B	B-A	
Quinidine (10 μM)	Control	1.57 ± 0.19	26.6 ± 0.83	16.8
	Brij97 0.01% (v/v)	$2.27 \pm 0.65^*$	$17.9 \pm 1.92^*$	7.90
	BL-9EX 0.01% (v/v)	$2.14 \pm 0.35^*$	$14.8 \pm 1.65^{**}$	6.92

^{**} $p < 0.01$; ^{*} $p < 0.05$, compared with the control.

^a Effects of Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on apparent permeability coefficients (P_{app}) of quinidine across Caco-2 cell monolayer were examined. The samples were collected at 15, 30, 60, 90, and 120 min, and the concentrations of quinidine were measured by HPLC.

^b Results are expressed the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

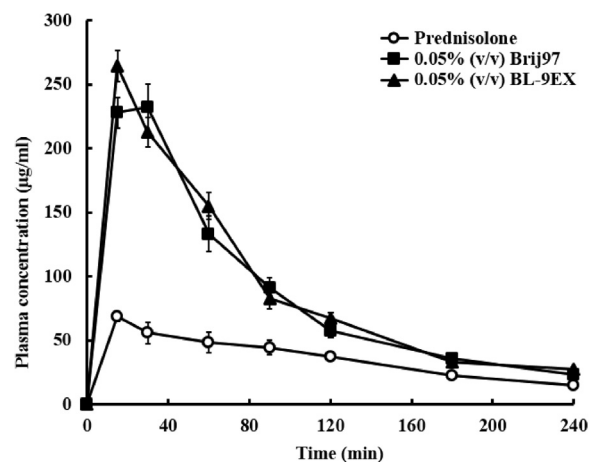


Figure 4. Effects of 0.05% of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on plasma concentration-time profiles of prednisolone (5 mg/kg) in rat small intestine by an *in situ* closed-loop study. Keys: (○) prednisolone control; (■) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether); (▲) 0.05% BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether). Results are expressed as the mean \pm standard error of at least 3 experiments.

Table 3

Effects of Brij97 (Polyoxyethylene 10-Oleyl Ether) and BL-9EX (Polyoxyethylene 9-Lauryl Ether) on the Pharmacokinetic Parameters of Prednisolone After Its Administration Into Intestine by an *In Situ* Closed-Loop Method^a

Group		C _{max} (ng/mL) ^b	T _{max} (min) ^b	AUC _{0-240min} (ng·mL ⁻¹ ·min) ^b	EhR
Prednisolone		68.7 ± 9.67	15.0 ± 5.0	8580 ± 649	—
Brij97	0.05% (v/v)	232.1 ± 18.6**	30.0 ± 10.0 ^{N.S.}	20,800 ± 691**	2.42
BL-9EX	0.05% (v/v)	264.5 ± 12.4**	15.0 ± 5.0 ^{N.S.}	21,700 ± 730**	2.53

***p* < 0.01; **p* < 0.05, compared with the control.

N.S., no significant difference.

^a Effects of Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on the intestinal absorption of prednisolone were examined by an *in situ* closed-loop method. Prednisolone was administered at a dose of 5 mg/kg to the rat intestinal loop and the blood samples were collected at 15, 30, 60, 90, 120, 180, and 240 min after administration. The concentrations of prednisolone were measured by HPLC.

^b Results are expressed as the mean ± standard error of at least 3 rats.

fluidity of BBMVs. DPH is a fluorescent probe to measure the fluidity of the hydrophobic core of the inner lipid bilayer, Tma-DPH probes the fluidity of the polar head group region of the outer lipid bilayer,⁴⁰ and DNS-CL was used as a fluorescent probe to access the protein in the membrane.⁴¹ As shown in Figures 6a, 6b, and 6c, we firstly used cholesterol, which is a well-known membrane rigidizer, as a positive control to confirm whether this system was suitable for evaluating the membrane fluidity of BBMVs. The fluorescence polarization of DPH, Tma-DPH, and DNS-CL was markedly increased by 200 μM cholesterol, reflecting a decrease in membrane fluidity. These results indicate that the effects of pharmaceutical excipients on intestinal membrane fluidity of BBMVs could be evaluated by this system. We also observed that the polarization of these 3 fluorescence probes was significantly decreased by the addition of different concentrations (0.01–0.1%, v/v) of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers, compared with that of control group. The polarization of DPH was especially reduced in the presence of these polyoxyethylene alkyl ethers. These findings suggest that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might increase the membrane fluidity of lipid bilayers and the protein portion of the membrane, especially the fluidity of the hydrophobic core of the inner lipid bilayers.

Effects of 2 Polyoxyethylene Alkyl Ethers on P-gp ATPase Activity

The other mechanism of P-gp inhibition by polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether examined in this

study was reduction of P-gp ATPase activity. It is well known that P-gp transport is ATP dependent, so the reduction of P-gp ATPase activity might inhibit P-gp function. We used human MDR1 membranes in an inorganic phosphate assay to evaluate the effects of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers on P-gp ATPase activity. As shown in Figure 7a, the activity of P-gp ATPase decreased in the presence of 0.05% (v/v) polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, compared with the control groups (PBS). On the other hand, the P-gp ATPase activity increased in the presence of 50 μM verapamil, a positive control, compared with the control group and 2 polyoxyethylene alkyl ethers groups. Furthermore, in order to determine the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether in the presence of P-gp substrate on the P-gp ATPase activity, we also evaluated the effects of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers with quinidine, a P-gp substrate, on the P-gp ATPase activity. As shown in Figure 7b, we observed polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether significantly reduced P-gp ATPase activity as well as in Figure 7a, indicating that these surfactants could also reduce the P-gp ATPase activity in the presence of P-gp substrate. These results indicate that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether were able to reduce the activity of P-gp ATPase, thereby inhibiting the function of P-gp.

Discussion

In the present study, we evaluated the effects of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether on the

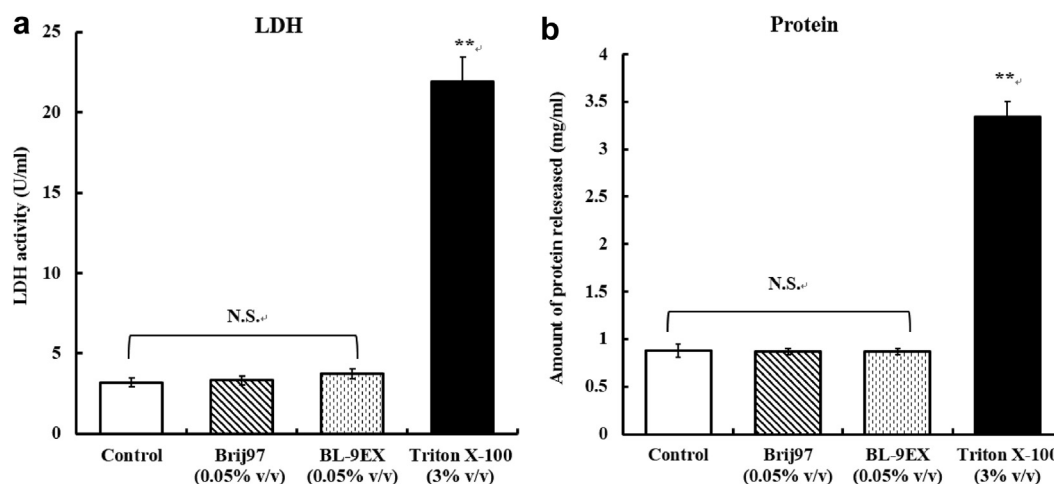


Figure 5. Membrane toxicity of 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) in the rat small intestine by an *in situ* closed-loop study. (a) The membrane damage was determined by measuring LDH assay. (b) The membrane damage was determined by measuring the amount of protein released from the small intestinal membranes. Each result represents the mean ± standard error of 3–4 experiments. ***p* < 0.01; N.S., no significant difference compared with the control.

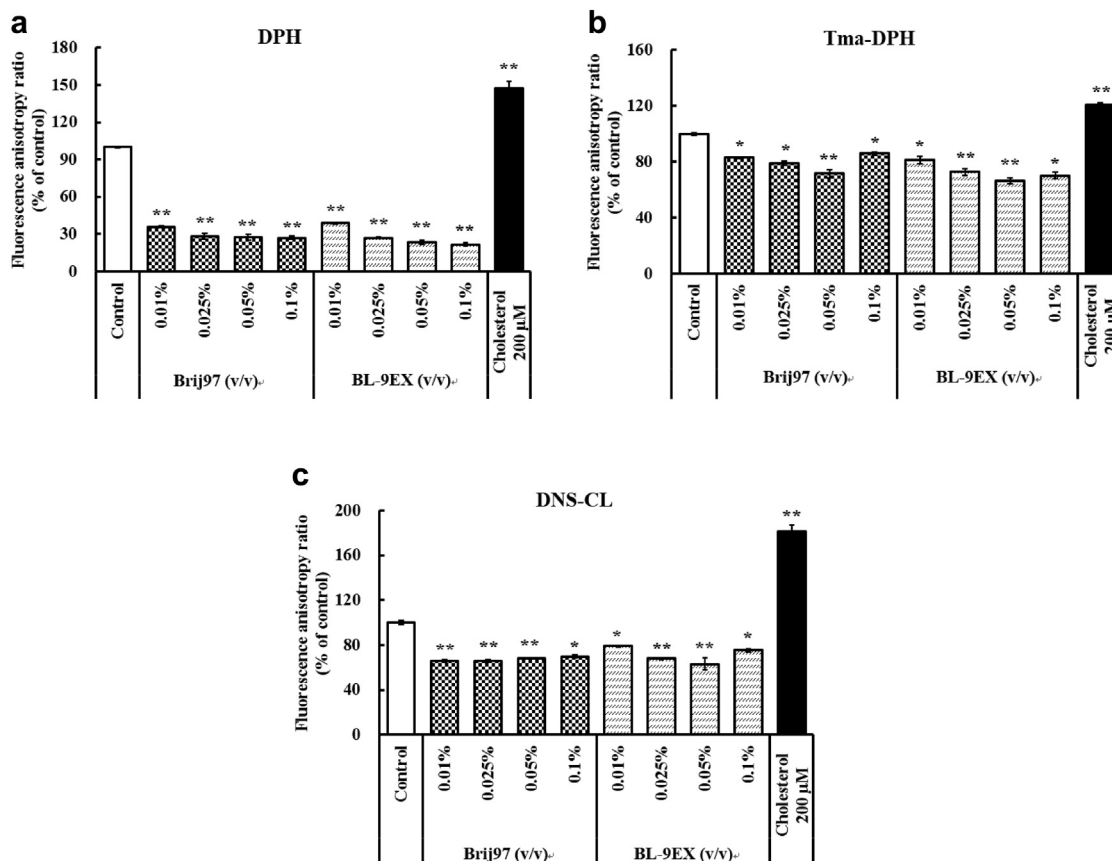


Figure 6. Effects of different concentrations of Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on BBMV intestinal membrane fluidity. (a) Fluorescence anisotropy of the intestinal membrane labeled with DPH as a probe. (b) Fluorescence anisotropy of the intestinal membrane labeled with Tma-DPH as a probe. (c) Fluorescence anisotropy of the intestinal membrane labeled with DNS-CL as a probe. Each result represents the mean \pm standard error of 4 experiments. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, compared with the control.

intestinal absorption of quinidine and prednisolone via *in vitro* and *in vivo* studies. We found that these surfactants increased the absorptive transport of quinidine and prednisolone and decreased their secretory transport by an *in vitro* diffusion chamber system. As

shown in Table 1, the efflux ratios of quinidine and prednisolone in the control studies are 3.92 and 2.13, which are almost similar to the efflux ratio of rhodamine 123 estimated in the previous studies.²¹ Therefore, these findings suggested that quinidine and

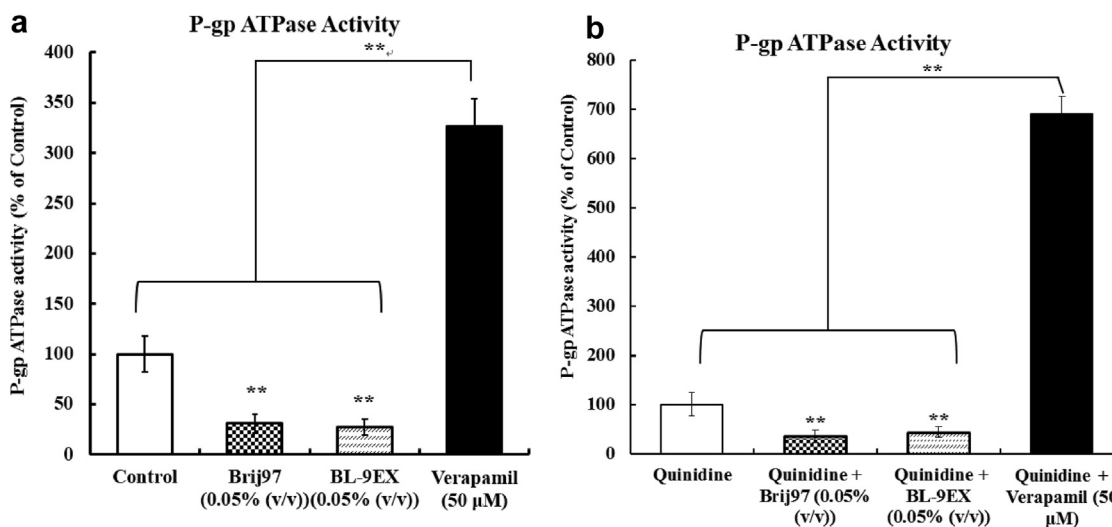


Figure 7. Effects of 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) on P-gp ATPase activity in human MDR1 membranes. (a) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) were dissolved in PBS. (b) 0.05% Brij97 (polyoxyethylene 10-oleyl ether) and BL-9EX (polyoxyethylene 9-lauryl ether) were dissolved in 0.1 mM quinidine. Each result represents the mean \pm standard error of 4 experiments. ** $p < 0.01$ compared with the control.

prednisolone, which are also P-gp substrates, might be transported via a P-gp-mediated transport system as well as rhodamine123 in the diffusion chamber experiment. Furthermore, we found that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether could decrease the efflux ratio of quinidine and prednisolone, as shown in Table 1. In our previous report, we already confirmed that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether could decrease the efflux ratio of rhodamine123 in the diffusion chamber studies.²¹ Therefore, these findings suggested that these 2 polyoxyethylene alkyl ethers might inhibit the function of P-gp in the intestine, thereby reducing the efflux ratios of quinidine and prednisolone as well as rhodamine 123.

Moreover, in our previous studies, PEGs could reduce the efflux ratios of quinidine and prednisolone in the intestine.³² Namely, Shen et al. reported that the efflux ratio of quinidine in the control was 2.50 but was significantly reduced to 1.14 in the presence of 0.1% PEG 20,000. Similar results were also observed in the efflux ratio of prednisolone (control; 1.90, with 0.1% PEG 20,000: 1.17). Based on these findings, these 2 polyoxyethylene alkyl ethers have similar inhibitory actions of P-gp function in the intestine as well as PEGs.

Furthermore, through the Caco-2 cell monolayer experiment, in the presence of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, B-A transport of quinidine decreased, whereas A-B transport increased, and the EfR values of quinidine were reduced from 16.79 to 7.90 and 6.92, respectively (Fig. 3 and Table 2). In previous reports, polyoxyethylene glycol dodecyl ether facilitated the absorptive transport of B12H in Caco-2 cells by modulating P-gp-mediated drug efflux,¹⁹ and polyoxyethylene lauryl ether increased the intracellular accumulation and trans-epithelial flux of epirubicin in Caco-2 cells via the inhibition of intestinal P-gp.¹⁷ In addition, polyoxyethylene 10-oleyl ether enhanced the accumulation of ³H-PTX in P-gp-overexpressed MDR cells.¹⁸ Therefore, polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, which has a similar structure to polyoxyethylene glycol dodecyl ether and polyoxyethylene lauryl ether, might enhance the intracellular concentration of P-gp substrates in Caco-2 cells via inhibition of the P-gp transport function.

We also investigated the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal absorption of P-gp substrates in *in vivo* studies and *in vitro* studies, to confirm that they could have the contribution for the clinical use. It was reported previously that the average absolute bioavailability of quinidine and prednisolone was about 72% and 70% in humans, respectively.^{42,43} However, in the presence of polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether, the C_{max} and $AUC_{0-240\ min}$ of prednisolone (Fig. 4 and Table 3) and quinidine (data not shown) were significantly increased. Moreover, in the previous studies, polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether could enhance the intestinal absorption of rhodamine 123.²¹ Therefore, these findings suggest that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might enhance the intestinal absorption of P-gp substrates in *in vivo* study and in *in vitro* study.

Moreover, in the previous studies, we found that polyoxyethylene 9-lauryl ether (hydrophile lipophilic balance [HLB] 14.5), polyoxyethylene glycol dodecyl ether (HLB 16), and polyoxyethylene 10-oleyl ether (HLB 12.4) could increase the intestinal transport of rhodamine 123 and might significantly inhibit the function of P-gp in the intestine.^{19,21} Moreover, our previous studies also showed that the molecular weights of polyoxyethylene alkyl ethers might be one of the important factors affecting the intestinal absorption of rhodamine 123. Thus, we considered the relationship between the molecular weights of polyoxyethylene alkyl ethers and their inhibitory effects on the function of P-gp, suggesting that the molecular weights between 300 and 700 might affect the function of P-gp.²¹ Therefore,

polyoxyethylene alkyl ethers, which have the HLB values between 12 and 16 and the molecular weights between 300 and 700, might be suitable to inhibit the function of P-gp in the intestine. On the other hand, it was previously reported that polyoxyethylene alkyl ethers with a linear PEG chain as their hydrophilic region could inhibit the function of P-gp.^{18,19} Based on these findings, we concluded that polyoxyethylene alkyl ethers, which have the suitable HLB values, the molecular weights and the structure of a linear PEG chain as their hydrophilic region, might inhibit the function of P-gp in the intestine.

One possible mechanism for the absorption-enhancing effects of these 2 polyoxyethylene alkyl ethers is that these surfactants might increase the intestinal transport of P-gp substrates via a paracellular pathway. In order to confirm this possibility, we used CF, a well-known non-P-gp substrate and a paracellular marker compound in this study. As shown in Table 1, the P_{app} and ER values of CF were not changed in the presence of 2 polyoxyethylene alkyl ethers, suggesting that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might not affect the intestinal transport of CF. Additionally, in our previous studies, polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether did not reduce TEER, as an index of opening the tight junction of the intestinal epithelium.²¹ Moreover, the intestinal absorption of CF with BL-9EX was not significantly changed by *in situ* intestinal absorption studies.²¹ These results suggest that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether at this concentration might not loosen the tight junction of the intestinal epithelium and might not increase the intestinal absorption of quinidine and prednisolone via a paracellular pathway. Therefore, these 2 polyoxyethylene alkyl ethers might inhibit the function of P-gp in the intestine, thereby increasing the intestinal transport of P-gp substrates.

Alternatively, it is possible that 2 polyoxyethylene alkyl ethers may cause the intestinal membrane damage and enhance intestinal absorption of P-gp substrates. However, polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether had no effect on the activities of LDH and the amount of protein compared to the control group, although these toxicological markers increased in the presence of 3% (v/v) Triton X-100, a positive control (Fig. 5). These results indicate that the enhancement of intestinal absorption of P-gp substrates by polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might not be caused by intestinal membrane damage. Thus, polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether at a low concentration could be considered to be safe P-gp modulators to increase the intestinal absorption of P-gp substrates.

Furthermore, the mechanisms of P-gp inhibition by these 2 polyoxyethylene alkyl ethers were also investigated in this study. Most nonionic surfactants that inhibit P-gp change membrane fluidity.^{25,26} In previous studies, Tween 80, Cremophor EL, vitamin E α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, and Pluronic P85 were found to affect membrane fluidity.^{38,40} However, few studies have examined the effect of polyoxyethylene alkyl ethers on membrane fluidity in the intestine. Additionally, it is well known that P-gp is an ATP-dependent transporter and that the amount of intracellular ATP and ATPase activity can affect the function of P-gp. Batrakova et al.³⁷ suggested that Pluronic P85 reduces intracellular ATP, and Tang et al.¹⁸ determined that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 20-stearyl ether could induce a significant decrease in ATP in drug-resistant cells and inhibit verapamil-induced ATPase activity. Therefore, the effects of 2 polyoxyethylene alkyl ethers on membrane fluidity and P-gp ATPase activity were examined in this present study.

As shown in Figures 6a, 6b, and 6c, we observed that in the presence of different concentrations of 2 polyoxyethylene alkyl

ethers, the fluorescence polarization of DPH, Tma-DPH, and DNS-CL was markedly reduced compared with that of the control groups. These results suggest that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might increase the membrane fluidity of lipid bilayers and the protein portion of the membrane, especially the fluidity of the hydrophobic core of the inner lipid bilayers, because the maximal reducing effect was observed in the fluorescence polarization of DPH, a probe of the inner lipid bilayers.

However, we did not observe concentration-dependent reduction of intestinal membrane fluidity with 2 polyoxyethylene alkyl ethers. The reason for this observation may be related to critical micelle concentration, because surfactants can form micelles that interact with and entrap drugs. Indeed, our preliminary studies suggest that polyoxyethylene 9-lauryl ether and polyoxyethylene 10-oleyl ether at concentrations above 0.1% can form micelles, and the probes might be incorporated into micelles, affecting fluorescence anisotropy. Moreover, the effects of polyoxyethylene 9-lauryl ether and polyoxyethylene 10-oleyl ether on P-gp ATPase activity are also important which could affect the concentration-dependent membrane fluidity. Therefore, P-gp ATPase activity was examined in the present study.

As shown in Figures 7a and 7b, polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether markedly reduced P-gp ATPase activity in human MDR1 membranes, with or without quinidine. These findings suggest that 2 polyoxyethylene alkyl ethers can reduce the activity of P-gp ATPase in the intestinal membranes irrespective of the existence of P-gp substrate. Regev et al.²⁷ found that the inhibition of P-gp ATPase activity was associated with enhancement of membrane fluidization. Li et al.⁴⁴ indicated the alteration in P-gp ATPase activity has been related to the nature of the membrane fluidity change which resulted in a conformation change and an allosteric modulation of the P-gp or steric blocking of substrate binding. This was further confirmed by the present findings that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether had effects on both membrane fluidity (Fig. 6) and P-gp ATPase activity (Fig. 7). Thus, we suggest that these 2 polyoxyethylene alkyl ethers might increase intestinal membrane fluidity and decrease P-gp ATPase activity, which could regulate the intestinal transport of P-gp substrates.

Conclusions

Through *in vitro* and *in vivo* studies, we have demonstrated that polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether can affect the function of the P-gp efflux transporter, resulting in enhanced intestinal absorption of P-gp substrates. Moreover, the mechanisms of P-gp inhibition by polyoxyethylene 10-oleyl ether and polyoxyethylene 9-lauryl ether might be due to the alteration in intestinal membrane fluidity and the inhibition of P-gp ATPase activity.

References

- Aouali N, Btaouri EIH, Dumontet C, et al. Accumulation of lactosylceramide and overexpression of a PSC833-resistant P-glycoprotein in multidrug-resistant human sarcoma cells. *Oncol Rep.* 2011;25:1161–1167.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385–427.
- Kvackajova-Kisucka J, Barancik M, Breier A. Drug transporters and their role in multidrug resistance of neoplastic cells. *Gen Physiol Biophys.* 2001;20:215–237.
- Bello-Reuss E, Ernest S, Holland OB, Hellmich MR. Role of multidrug resistance P-glycoprotein in the secretion of aldosterone by human adrenal NCI-H295 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C1256–C1265.
- Holmes JA, West RR. The effect of MDR-1 gene expression on outcome in acute myeloblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 1994;69:382–384.
- Ballinger JR, Hua HA, Berry BW, Firby P, Boxen I. 99Tcm-sestamibi as an agent for imaging P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance: *in vitro* and *in vivo* studied in a rat breast tumour cell line and its doxorubicin-resistant variant. *Nucl Med Commun.* 1995;16:253–257.
- Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M, Beliveau R. Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett.* 1999;422:208–214.
- Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:1083–1089.
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, et al. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* 1994;54:5902–5910.
- Robert J, Jarry C. Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem.* 2003;46:4805–4817.
- Zastre J, Jackson JK, Wong W, Burt HM. Methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers reduce P-glycoprotein efflux in the absence of a membrane fluidization effect while stimulating P-glycoprotein ATPase activity. *J Pharm Sci.* 2007;96:864–875.
- Ayesh S, Shao YM, Stein WD. Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1316:8–18.
- Lo YL, Huang JD. Effects of sodium deoxycholate and sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:665–672.
- Zhang H, Yao M, Morrison RA, Chong S. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Arch Pharm Res.* 2003;26:768–772.
- Batrakova EV, Miller DW, Li S, Alakhov VY, Kabanov AV, Elmquist WF. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296:551–557.
- Shen Q, Lin Y, Handa T, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by *in vitro* transport and *in situ* absorption studies. *Int J Pharm.* 2006;313:49–56.
- Lo YL. Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines. *J Control Release.* 2003;90:37–48.
- Tang J, Wang Y, Wang D, et al. Key structure of Brij for overcoming multidrug resistance in cancer. *Biomacromolecules.* 2013;14:424–430.
- Yu H, Hu YQ, Ip FC, Zou Z, Han YF, Ip NY. Intestinal transport of bis(12)-huprydione in Caco-2 cells and its improved permeability by the surfactant Brij-35. *Biopharm Drug Dispos.* 2011;32:140–150.
- Dong X, Mattingly CA, Tseng MT, et al. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. *Cancer Res.* 2009;69:3918–3926.
- Zhao W, Uehara S, Tanaka K, et al. Effects of polyoxyethylene alkyl ethers on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123: a P-glycoprotein substrate by *in vitro* and *in vivo* studies. *J Pharm Sci.* 2016;105:1526–1534.
- Troutman MD, Thakker DR. Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res.* 2003;20:1200–1209.
- Patil AG, Reddy D, D'souza R, Damre A. Development and validation of RP-HPLC-fluorescence method for quantitative determination of quinidine, a probe substrate for P-glycoprotein inhibition assay using Caco-2 cell monolayer. *Biomed Chromatogr.* 2010;24:620–625.
- Onishi H, Isoda Y, Matsuyama M. *In vivo* evaluation of chondroitin sulfate-glycyl-prednisolone for anti-arthritis effectiveness and pharmacokinetic characteristics. *Int J Pharm.* 2013;456:113–120.
- Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity *in vitro*. *J Pharm Sci.* 2002;91:1991–2002.
- Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, Buckingham L, Coon JS. Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity. *Arch Biochem Biophys.* 1995;319:309–315.
- Regev R, Assaraf YG, Eytan GD. Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur J Biochem.* 1999;259:18–24.
- Johnson BM, Charman WN, Porter CJ. An *in vitro* examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine. *AAPS PharmSci.* 2002;4:E40.
- Sachs-Barrable K, Thamboo A, Lee SD, Wasan KM. Lipid excipients Peceol and Gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 cells. *J Pharm Pharm Sci.* 2007;10:319–331.
- Lin Y, Shen Q, Katsumi H, et al. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:1301–1307.
- He H, Shen Q, Li J. Effects of borneol on the intestinal transport and absorption of two P-glycoprotein substrates in rats. *Arch Pharm Res.* 2011;34:1161–1170.
- Shen Q, Li W, Lin Y, et al. Modulating effect of polyethylene glycol on the intestinal transport and absorption of prednisolone, methylprednisolone and

- quinidine in rats by *in-vitro* and *in-situ* absorption studies. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60:1633–1641.
33. Prabhu R, Balasubramanian KA. A novel method of preparation of small intestinal brush border membrane vesicles by polyethylene glycol precipitation. *Anal Biochem*. 2001;289:157–161.
34. de Laat SW, van der Saag PT, Shinitzky M. Microviscosity modulation during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:4458–4461.
35. Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. 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*. 2003;304:845–854.
36. Giordano PA, Wyroba E, Bottiroli G. Internalization of cycloheptaamylose-dansyl chloride complex during labelling of surface membrane in living *Paramecium aurelia* cells. *Basic Appl Histochem*. 1985;29:121–133.
37. Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: selective energy depletion. *Br J Cancer*. 2001;85:1987–1997.
38. Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299:483–493.
39. Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem*. 2000;267:277–294.
40. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci*. 2002;16:237–246.
41. Kajii H, Horie T, Hayashi M, Awazu S. Effects of salicylic acid on the permeability of the plasma membrane of the small intestine of the rat: a fluorescence spectroscopic approach to elucidate the mechanism of promoted drug absorption. *J Pharm Sci*. 1986;75:475–478.
42. Ferry JJ, Horvath AM, Bekersky I, Heath EC, Ryan CF, Colburn WA. Relative and absolute bioavailability of prednisone and prednisolone after separate oral and intravenous doses. *J Clin Pharmacol*. 1988;28:81–87.
43. Ueda CT, Williamson BJ, Dzindzio BS. Absolute quinidine bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*. 1976;20:260–265.
44. Li W, Li X, Gao Y, et al. Inhibition mechanism of P-glycoprotein mediated efflux by mPEG-PLA and influence of PLA chain length on P-glycoprotein inhibition activity. *Mol Pharm*. 2014;11:71–80.