

氏 名 (生年月日) ちょう 趙 わん 婉 ていん 廷 (1986 年 11 月 20 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 科 学)

学 位 記 番 号 博薬科 第9号

学位授与の日付 2017 年 3 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 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

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 山 本 昌

(副査) 教 授 栄 田 敏 之

(副査) 教 授 西 口 工 司

## 論 文 内 容 の 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。

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キニジン及びブ

レドニゾロン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 BL-9EX の併用により、キニジン及びプレドニゾロンの両薬物の吸収方向の透過性が増大し、プレドニゾロン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 の影響について検討した。その結果、各種 Brij 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 が低下した。以上のことから、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できることが示唆された。

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

第一章において、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 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 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 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 1.8-2.5 倍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 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 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、プレドニゾロンの小腸吸収性も検討した。その結果、プレドニゾロンの消化管吸収性は 0.05% Brij97 また BL-9EX の併用により 2.4 倍に増大することが認められた。また、Brij 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 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 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 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 の吸収促進機構には paracellular route 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 の消化管透過性に及ぼす各種 Brij の影響を評価したところ、CF の Papp と ER 値は各種 Brij 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 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 の吸収促進機構には paracellular route 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 による P-gp の機能抑制機構を検討したところ、Brij 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 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 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 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。

## 審査の結果の要旨

一般に、P-糖タンパク質 (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 の機能を抑制する P-gp modulators を併用し、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。

一方、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (Brijs) は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が、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。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。

まず、*in vitro* diffusion chamber 法において、すべての Brijs の併用により、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上昇したのに対し、rhodamine123 の排出方向の透過性は抑制され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) を顕著に減少させたことから、P-gp 阻害効果が最も強いことが示唆された。同様の結果が、他の P-gp の基質となる薬物である quinidine 及び prednisolone においても認められた。一方、Caco-2 細胞においても *in vitro* diffusion chamber 法と同様の結果が得られた。

次に、*in situ* closed loop 法において、rhodamine123 の小腸吸収性は、各種 Brijs の併用により顕著に増大することが認められた。一方、各種 Brijs の併用時における乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase (LDH) 活性値は、コントロールと比べ有意な差は認められず、Brijs の併用による薬物透過性増大作用は、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。さらに、*in vitro* diffusion chamber 法において、P-gp の基質ではない 5(6)-carboxyfluorescein (CF) の消化管透過性は各種 Brijs を併用してもほとんど変わらないことが認められた。また、Caco-2 細胞において、各種 Brijs を併用しても、膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance, TEER) の変化はほとんど認められなかった。したがって、Brijs の吸収促進機構には paracellular route 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。

最後に、Brijs による P-gp の機能抑制機構を検討したところ、Brijs 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、Brijs 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することが示された。

以上の結果より、各種 Brijs 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 Brijs 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。

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