

N-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩による
骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの消化管吸収性の改善
及び吸収促進機構の解明

2016 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

中矢 有華

学位論文の基礎となる報文を以下に示す。

- 1) Yuka Nakaya, Mayu Takaya, Yuta Hinatsu, Tammam Alama, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane and Akira Yamamoto: Enhanced oral delivery of bisphosphonate by novel absorption enhancers: Improvement of intestinal absorption of alendronate by *N*-acyl amino acids and *N*-acyl taurates and their absorption-enhancing mechanisms. *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3680-3690 (2016).
〔第 1 章, 第 2 章〕

目次

略語一覧	1
要旨	3
序論	5
第1章 アレンドロネートの消化管吸収に及ぼす各種吸収促進剤の影響	
緒言	9
実験材料及び方法	
1. 試薬	11
2. 実験動物	11
3. 投与液の調製	11
4. 消化管吸収実験	11
5. 可逆性の評価	11
6. 消化管粘膜障害性評価	12
7. 薬物の定量	12
8. データ解析	13
9. 統計学的処理	13
実験結果	
1. アレンドロネートの小腸吸収に及ぼす各種吸収促進剤の影響	14
2. 各種吸収促進剤の小腸粘膜障害性の評価	19
3. 各種吸収促進剤併用時の有効性と安全性の関係	20
4. 各種吸収促進剤の吸収促進効果の可逆性	21
考察	24
第2章 各種吸収促進剤の吸収促進機構の解明に関する検討	
緒言	26
実験材料及び方法	
1. 試薬	27
2. 実験動物	27
3. ラット小腸 brush border membrane vesicles の抽出・精製	27
4. 蛍光偏光解消法	27
5. 細胞培養	28
6. Caco-2 細胞透過実験	28
7. 薬物の定量	29
8. データ解析	29

9. Western blot 法	29
10. 統計学的処理	30
実験結果	
1. 膜流動性に及ぼす各種吸収促進剤の影響.....	31
2. CF の膜透過性ならびに膜抵抗値に及ぼす各種吸収促進剤の影響	34
3. Claudin-1 及び claudin-4 の発現量に及ぼす各種吸収促進剤の影響.....	37
考察	40
総括	43
謝辞	45
引用文献	46
付録	

略語一覽

AUC	area under the plasma drug concentration - time curve
ALN	alendronate
BA %	bioavailability
BBMV	brush border membrane vesicle
BPs	bisphosphonates
Caco-2	colon adenocarcinoma-2
CF	5(6)-carboxyfluorescein
CMT	sodium methyl cocoyl taurate
C_{max}	maximum plasma drug concentration
CN	sodium cocoyl sarcosinate
DDS	drug delivery system
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS-Cl	dansyl chloride
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ER	enhancement ratio
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethane sulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
LDH	lactate dehydrogenase
LMT	sodium methyl lauroyl taurate
LN	sodium lauroyl sarcosinate
MMT	sodium methyl myristoyl taurate
MN	sodium myristoyl sarcosinate
ON	sodium oleoyl sarcosinate
PAMAM	polyamideamine
P_{app}	apparent permeability coefficient
PBS	phosphate buffered saline
PEG	polyethylene glycol
PMT	sodium methyl palmitoyl taurate
PN	sodium palmitoyl sarcosinate
QOL	quality of life
SMT	sodium methyl stearoyl taurate
TCA	trichloroacetic acid
TEER	transepithelial electrical resistance

Tma-DPH	N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TTBS	tris-buffered saline and Tween 20
T _{max}	time at which the maximum plasma drug concentration occurs
WHO	World Helth Organization
ZO	zonula occludens

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程：薬学専攻・博士課程

氏名（英字名）：中矢 有華 (Yuka Nakaya)

学位論文題目：N-アシルアミノ酸塩及びN-アシルタウリン塩による骨粗鬆症治療薬
アレンドロネートの消化管吸収性の改善及び吸収促進機構の解明

骨粗鬆症は加齢に伴い骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、相対的に骨吸収が優位となることから、骨折リスクが増大した状態である。わが国においては、人口の急速な老化に伴い骨粗鬆症の患者数が年々増加しつつあり、最も治療が望まれる疾患のうちの一つである。

現在、骨粗鬆症治療薬として様々な薬物が使用されているが、中でも bisphosphonates (BPs) は骨粗鬆症治療薬の第一選択薬として汎用されている。しかしながら、BPs の消化管吸収は非常に低く、バイオアベイラビリティ (BA) は 1~2% であり、また同時投与される薬剤や食物などによってさらに BA は低減される。一方、BPs の経口投与は上部消化管粘膜障害を惹起し、消化器症状を引き起こすことが知られている。このような背景から、BPs の消化管吸収を改善し、なおかつ粘膜傷害性を軽減した投与形態の開発が強く望まれている。

そこで本研究では、新規吸収促進剤である N-アシルアミノ酸塩及び N-アシルタウリン塩に着目した。また、モデル薬物として典型的な BPs の一種で臨床において汎用されているアレンドロネート (ALN) を選択し、これら吸収促進剤による ALN の消化管吸収改善を試みた。さらに、N-アシルアミノ酸塩及び N-アシルタウリン塩の吸収促進機構の解明を試みた。

第1章 ALN の消化管吸収に及ぼす N-アシルアミノ酸塩及び N-アシルタウリン塩の影響

N-アシルアミノ酸塩及び N-アシルタウリン塩には結合する脂肪酸により様々な性質の異なるタイプが存在する。本研究では *in situ* closed loop 法を用いて、ALN の消化管吸収性に及ぼすこれら吸収促進剤の影響を検討した。その結果、いずれの吸収促進剤も ALN の消化管吸収性を増大させ、中でも N-アシルアミノ酸塩の一種である sodium palmitoyl sarcosinate (PN) は ALN の吸収を 14 倍に、N-アシルタウリン塩の一種である sodium methyl cocoyl taurate (CMT) は 7.7 倍に増大させることが認められた。

しかしこの顕著な吸収促進効果が、粘膜障害性によるものでないことを確認する必要がある。そこで小腸における各種吸収促進剤の粘膜障害性を、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase、LDH) 活性値及びタンパク質放出量を指標として評価した。その結果、1% sodium myristoyl sarcosinate (MN) を除く吸収促進剤併用時の LDH 活性値及びタンパク質放出量は control 群に比べ有意な差は認められなかったのに対し、3% TritonX-100 投与群を positive control として用いた場合に有意な差が認められた。したがって、これら吸収促進剤は比較的安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

一方、連続的で不可逆的な吸収促進剤の作用は副作用を引き起こすため、吸収促進剤の可逆性も安全性を評価する重要な要因の一つとなる。そこで高い有効性及び安全性が認められた PN

及び CMT の吸収促進効果における可逆性を *in situ* closed loop 法を用いて検討した。その結果、PN 及び CMT の吸収促進効果は可逆的であることが示唆された。

以上のことから、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は ALN の消化管吸収を改善できる有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

第 2 章 *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構の解明

第 1 章で *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の有効性と安全性が明らかとなったが、吸収促進機構については未だ不明な点が多い。一般に、消化管における薬物の吸収経路としては細胞内経路 (transcellular route) ならびに細胞間経路 (paracellular route) が知られている。本研究では高い吸収促進効果及び安全性が認められた PN 及び CMT を選択し、まず細胞内経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を評価するため、蛍光偏光解消法を用いた膜流動性の変化について検討を行った。その結果、PN 及び CMT 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が示唆された。このことから、PN 及び CMT の吸収促進機構には一部、細胞内経路を介する薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。

さらに細胞間経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を検討するため、細胞間経路を介して透過することが知られている 5(6)-carboxyfluorescein (CF) をモデル薬物に選択し、Caco-2 細胞単層膜を用いた薬物透過実験ならびに膜抵抗値測定実験を行った。その結果、PN 及び CMT 併用により、膜抵抗値は濃度依存的に低下することが認められた。さらに、CF の見かけの透過係数は濃度依存的に増大することが明らかとなった。以上の結果より、PN 及び CMT の吸収促進機構には、一部 tight junction の開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。

Tight junction の形成は tight junction 構成タンパク質が重要な役割を果たしており、その中でも claudin family の発現により細胞間隙の物質の透過が制御されているとの報告がある。そこで claudin-1 及び claudin-4 の発現量に及ぼす PN 及び CMT の影響について Western blot 法を用いて検討した。その結果、PN を投与した際の claudin-4 発現量は顕著に減少したが、この現象は可逆的であることが示唆された。一方、CMT は claudin-1 及び claudin-4 いずれの発現量にも影響を与えなかった。

本研究により、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は、難吸収性薬物である ALN の消化管吸収性を顕著に増大する安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。中でも PN は ALN の吸収を 14 倍、CMT は 7.7 倍に増大させる優れた吸収促進剤であることが認められた。また吸収促進効果は可逆的であり、連続的で不可逆的な作用による毒性を生じないことが示唆された。さらに *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構は、脂質膜内部、脂質膜外部及び膜タンパク質の膜流動性を増大させることによる細胞内経路を介する薬物透過性増大作用が一部寄与している可能性が示唆された。さらに tight junction 開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用も一部寄与している可能性が示唆された。

本研究は BPs の消化管吸収を改善し、粘膜傷害性を軽減した投与形態を開発していく上で有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

序論

骨粗鬆症は加齢に伴い骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、相対的に骨吸収が優位となることから、骨の脆弱性を引き起こし骨折リスクが増大した状態である¹⁻³⁾。世界保健機関 (WHO) では「骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患である」と定義されている⁴⁾。わが国においては、人口の急速な老化に伴い骨粗鬆症の患者数が年々増加しつつあり、その数は現在 1280 万人とも推測されている^{5,6)}。骨粗鬆症患者は、大腿骨頸部、椎骨、橈骨、上腕骨などの部位で骨折を起こしやすいことが知られているが⁷⁾、特に大腿骨頸部骨折は、脳卒中、老衰と並び高齢者の寝たきりの原因の上位を占め、さらに高齢者が要介護となる原因疾患としても上位を占める骨折とその原因となる骨粗鬆症は大きな社会問題の一つである⁸⁾。さらに骨粗鬆症に起因する医療費は日本の医療財政において大きな負担となっており、年間の医療費及び介護に要する費用は最大約一兆円に及ぶと推計されている⁹⁾。さらに医療費の負担に加え患者の生活の質 (QOL) への影響も大きく、椎体骨折や股関節骨折の高齢者は余命が短縮され、また寝たきりになることも報告されている¹⁰⁾。また、近年では単純に長寿を目指すのではなく、人の寿命において「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」である健康寿命を延長することが課題であるとされており¹¹⁾、これらの観点からも、世界でも類を見ない超高齢社会を迎えているわが国において、骨粗鬆症は最も治療が望まれる疾患のうちの一つである。

現在、骨粗鬆症治療薬として bisphosphonates (BPs)、カルシウム製剤、女性ホルモン製剤、選択的エストロゲン受容体モジュレーター、活性型ビタミン D₃ 製剤、ビタミン K₂ 製剤、カルシトニン製剤、副甲状腺ホルモン製剤、デノスマブなどが挙げられる¹²⁾。中でも BPs は破骨細胞の活性化を抑制し強力な骨吸収抑制作用を示して骨密度を増加させ、骨粗鬆症による骨折を低下させることが報告されており、骨粗鬆症治療薬の第一選択薬として汎用されている¹³⁻¹⁶⁾。BPs は P-C-P 骨格を有する化合物の総称であり、Ca 代謝調節を行う無機ピロリン酸に類似した構造を持ち、生体内で安定な誘導体である¹⁷⁾ (Fig. 1)。BPs の中でも窒素原子含有 BPs は、破骨細胞内に取り込まれ、ファルネシル 2 リン酸シンターゼを阻害することにより破骨細胞内のゲラニルゲラニル 2 リン酸の濃度が減少し、低分子量 G タンパク質のプレニル化が抑制され、破骨細胞骨格の再構成や細胞内情報伝達が抑制される。その結果、破骨細胞の骨吸収が抑制されると考えられている¹⁸⁾ (Fig. 2)。BPs は一般的に、臨床で注射あるいは経口を介して投与されるが、注射は副作用が起きやすく痛みを伴うため患者の QOL 低下が問題となる。また、BPs の注入が速すぎると、血液中のカルシウムと複合体が形成され、複合体が腎臓に保持されて腎不全に至ることがある¹⁹⁾。さらに、皮下または筋肉内投与のような BPs の局所送達は、注射部位での組織刺激、炎症、疼痛及び壊死のリスクを増加させることが報告されている²⁰⁾。一方、経口投与は服用が簡便で安全に適用でき、現在最も汎用されている投与経路である。しかしながら、BPs の消化管吸収は非常に低く、bioavailability (BA) は 1~2% であり、同時投与される薬剤、食物及び服用時に用いる飲料水の硬度によっても BA は低減される²¹⁻²³⁾。さらに BPs の経口投与は上部消化管粘膜障害を惹起し、上部消化管における出血、炎症、潰瘍形成や吐き気、嘔吐、腹痛とい

った消化器症状を引き起こすことが知られている²⁴⁻²⁶。そのため BPs は朝起床時にコップ一杯の水で服用し、服用後少なくとも 30 分は横にならず、飲食ならびに他の薬剤の経口投与も避けることが推奨されている²⁷。このような背景から、BPs の消化管吸収を改善し、なおかつ粘膜傷害性を軽減した投与形態の開発が強く望まれている。

現在までに、BPs の吸収を高め、副作用を予防するために、様々な異なる投与経路が検討されてきた。当研究室ではこれまでにアレンドロネート (ALN) 新規経皮パッチを開発し、ALN の経皮透過及び薬理学的効果を維持しながら ALN 誘導皮膚障害をほぼ完全に抑制することに成功した²⁸。さらに、マイクロニードルを用いる新規経皮送達システムを用いて高い BA を達成することに成功した²⁹。また、ラットの経肺投与による ALN の吸収は、経口投与と比較して 16 倍高く、さらにスーパーオキシドジスムターゼと ALN との同時投与により ALN による粘膜損傷を抑制できることを報告している³⁰。さらに、polyethylene glycol (PEG) を ALN に修飾した PEG-ALN を経肺投与した場合、ALN による粘膜損傷を惹起することなく、ALN を経肺投与した際と同等の高い BA 及び薬理効果を発揮することも明らかにしてきた³¹。Sutton らは経鼻投与における ALN の吸収は経口投与よりも 25 倍高いことを明らかにしているが、鼻腔内滞留性や粘膜刺激性などの課題も残されている³²。このような Drug Delivery System (DDS) の開発により、ALN の BA が顕著に増大することが報告されている。また、BPs による上部消化管障害を回避するため、BPs 服用患者は BPs 服用から 30 分は座位をとる必要があるが、これは寝たきりの患者や高齢者には大きな負担となっている。このような背景からも、パッチ製剤やマイクロニードルなどの経皮投与や、経肺投与の有用性は大きいと言える。

一方、経口投与は、痛みを伴わず投与が簡便で副作用を発現しにくいといった利点を持ち、BPs において現在最も汎用されている投与経路であることから、経口投与における BPs の安全かつ有効性の高い投与形態の開発は重要な課題である。BPs の消化器症状の発生機序として、抗酸化機構の破綻が一部関与しており、胃粘膜保護作用を有するレバミピドは ALN の胃潰瘍形成を軽減することが報告されている^{33, 34}。さらに、BPs は用量依存的に損傷面積を増大させることも明らかとなっている³⁵。BPs の消化管吸収における以前の報告としては、Janner らが BPs の吸収を増加させるキレート剤として ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EDTA) を使用した。その結果、EDTA は BPs の消化管吸収を有意に促進したが、EDTA 必要量は臨床応用するには高すぎるという課題がある³⁶。そこで多くの研究者により BPs の消化管吸収を高め、副作用を予防するための研究が行われてきた。Ezra らは腸内のトランスポーター PEPT1 を標的にすることによって ALN の吸収を改善しようと試みた。彼らはジペプチドを ALN に結合させたプロドラッグを合成し、このプロドラッグがラットの経口投与後の薬物吸収を 3 倍増加させることを報告している³⁷。さらに Meng らは、正に帯電したマイクロエマルジョンを調製し、ALN の area under the curve (AUC) を 2.82 倍に増大させることに成功している³⁸。また、Han らは、キトサンをコーティングした ALN 含有リポソームを調製し、このキトサンコーティングリポソームが ALN のラット経口 BA を 2.6 倍に増加させることを明らかにしている³⁹。しかしながら、これらの吸収促進効果は不十分であり、より安全かつ有効性の高い投与形態の開発が依然として強く望まれている。

以上の背景より著者は、典型的な BPs の一種で臨床において使用されている ALN^{40, 41} をモ

デル薬物に選択し、安全性を高めた投与形態の構築を目的として、新規吸収促進剤である *N*-アシルアミノ酸塩および *N*-アシルタウリン塩を用いて ALN の消化管吸収改善を試みた。これら新規吸収促進剤を併用することで従来の薬理効果を維持したまま **BP**s の投与量を減少させることが可能となれば、**BP**s による粘膜障害性の軽減が可能となり、患者の負担を大きく軽減できると考えられる。

以下、得られた結果を 2 章にわたり論述する。

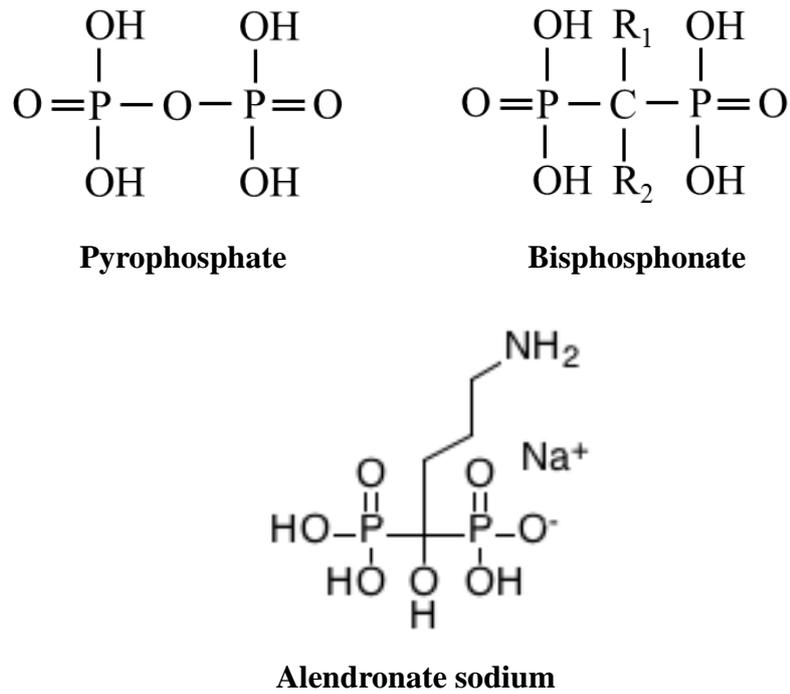


Fig. 1 The chemical structure of pyrophosphate, bisphosphonate and alendronate sodium.

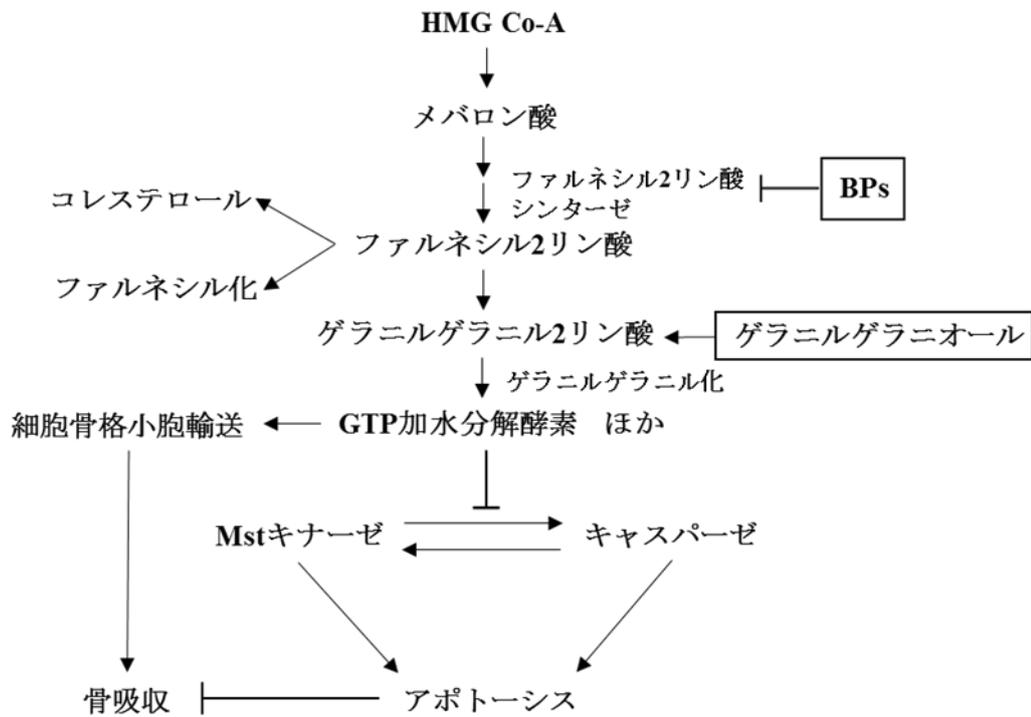


Fig. 2 Action mechanisms of bisphosphonates in mevalonic acid pathway.

第1章 アレンドロネートの消化管吸収に及ぼす *N*-アシルアミノ酸塩及び

N-アシルタウリンの影響

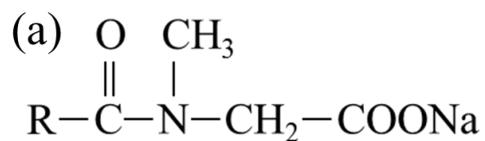
緒言

一般に、経口投与は投与が簡便で、種々の疾患の薬物治療に際して最も汎用されている投与経路である。しかしながら薬物の中には、高分子量のものや水溶性の高い薬物、分解しやすい薬物などは高い薬理効果を有するにも関わらず、吸収率が不十分なために十分に薬理効果を発揮できないものがある。そこで、これら難吸収性薬物の消化管吸収率を改善するため、様々な研究が試みられてきた。例えば、薬物の分子構造修飾^{42, 43)} や剤形修飾^{44, 45)} などの手段が挙げられるが、薬物の分子構造修飾は薬理活性が損なわれる可能性がある。薬物の剤形修飾においては、剤形の安定性などが課題となる。一方、酵素阻害剤や吸収促進剤などを添加する手段⁴⁶⁻⁴⁹⁾ は、個々の薬物に対する開発の必要がなく、多くの難吸収性薬物に応用可能であり、消化管吸収の改善に有用であると考えられる。

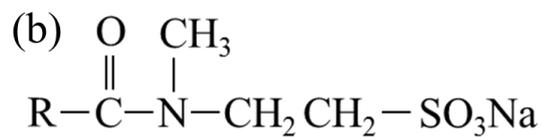
代表的な吸収促進剤として、界面活性剤⁵⁰⁾、キレート剤⁵¹⁾、胆汁酸⁵²⁾、脂肪酸⁵³⁾などが挙げられるが、一般的に有効性の高い吸収促進剤は粘膜障害性も高いことが多く、現在までに臨床応用されている吸収促進剤は *sodium caprate* の一種類だけである⁵⁴⁾。したがって、臨床応用に繋がる有効かつ安全性の高い吸収促進剤の開発が強く望まれている。

そこで本研究では、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩に着目した。*N*-アシルアミノ酸塩は *N*-メチルグリシンと食用油脂由来の脂肪酸からなるアニオン性界面活性剤である。一方、*N*-アシルタウリン塩は胆汁中に含まれる生体内界面活性剤であるタウロコール酸に類似した構造を持つアニオン性界面活性剤である。これらはいずれも生分解性に優れた物質で、結合する脂肪酸にもいくつか種類があるため、数多くの性質の異なるタイプが存在する。Fig. 3 にこれらの化学構造を示す。これらは化粧品やシャンプーなどの基剤としても用いられているが⁵⁵⁾、消化管における *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進効果を系統的に検討した例はほとんどみられない。

本章では、典型的な BPs の一種で臨床において汎用されている ALN をモデル薬物に選択し、*in situ closed loop* 法を用いて、*N*-アシルアミノ酸塩および *N*-アシルタウリン塩を併用投与した際の ALN の消化管吸収性を評価するとともに、各吸収促進剤を併用投与した際の消化管粘膜障害性を評価することにより、有効かつ安全性の高い吸収促進剤の探索を試みた。また、連続的で不可逆的な吸収促進剤の作用は副作用を引き起こすため、吸収促進剤の可逆性も安全性を評価する重要な要因の一つとなる⁵⁶⁾。そこで *N*-アシルアミノ酸塩および *N*-アシルタウリン塩併用による ALN の吸収促進効果の可逆性を *in situ closed loop* 法を用いて検討した。



R = C11, sodium lauroyl sarcosinate (LN)
 R = C13, sodium myristoyl sarcosinate (MN)
 R = C15, sodium palmitoyl sarcosinate (PN)
 R = C17, sodium oleoyl sarcosinate (ON)
 R = C7 ~ C17, sodium cocoyl sarcosinate (CN)



R = C11, sodium methyl lauroyl taurate (LMT)
 R = C13, sodium methyl myristoyl taurate (MMT)
 R = C15, sodium methyl palmitoyl taurate (PMT)
 R = C17, sodium methyl stearoyl taurate (SMT)
 R = C7 ~ C17, sodium methyl cocoyl taurate (CMT)

Fig. 3 The chemical structure of *N*-acyl amino acids (a) and *N*-acyl taurates (b).

This figure was cited from Fig. 1 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3681, 2016.

実験材料及び方法

1. 試薬

Alendronate sodium trihydrate は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。N-アシルアミノ酸塩及び N-アシルタウリン塩は Nikko Chemical Co. Ltd. (Osaka, Japan) より入手した。LDH (lactate dehydrogenase) 細胞毒性試験キットは、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。ウシ血清アルブミンは Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA) から購入した。

2. 実験動物

実験動物には Wistar 系雄性ラット (8 週齢, 230 ~ 250 g) は清水実験材料株式会社 (京都) から購入した。なお、本実験のプロトコールは京都薬科大学動物倫理委員会により承認され、動物実験はすべて京都薬科大学動物実験実施規程に従って行った。

3. 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、モデル薬物として ALN を 10 mg/kg となるようにし、吸収促進剤として各種 N-アシルアミノ酸塩をそれぞれ 0.5 ~ 1.0% (w/v) の濃度で、各種 N-アシルタウリン塩を 1.0% (w/v) の濃度で用いた。投与量については、3 mL/rat とし、pH 7.4 の phosphate buffered saline (PBS) を用いて調製した。

4. 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⁵⁷⁾。16 時間絶食した Wistar 系雄性ラット (230 ~ 250 g) を使用した。ラットに pentobarbital (32 mg/kg) を用いて麻酔し、固定台に背位固定した。ラットの体温を一定に維持するため、実験は加熱ランプの下で行った。腹部正中切開により小腸を露出させ、十二指腸上部にカニューレを挿入し、胆汁の影響を除外するために胆管と共に結紮し、盲腸上部 2 cm の回腸部位を切開した。小腸の内容物を洗浄するため、20 mL PBS (pH 7.4) をゆっくりと注入し、洗浄後は空気により小腸内の PBS を除去した。その後、回腸の切開部位にカニューレを挿入し、結紮することで小腸ループとした。あらかじめ頸静脈より blank 用の採血を行った後、薬液を小腸ループ内に投与し、各カニューレをクリップで留めた。その後、血液サンプル (0.35 mL) を経時的に (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 分) 採取した (Fig. 4 a)。サンプルは血漿分画を得るために、直ちに 12,000 rpm、5 分間遠心分離を行い、これらの血漿サンプル中の ALN 濃度を high performance liquid chromatography (HPLC) により測定した。

5. 可逆性の評価

吸収促進剤の促進効果の可逆性を評価するために、前処理群では 1.0% (w/v) PN, CMT を小腸ループ内に投与し、60 分間前処理を行った。前処理後、PBS (pH 7.4) を用いて小腸ループ内を洗浄し、ALN 溶液を投与した。その後、血液サンプル (0.35 mL) を経時的に (15, 30, 60, 90, 120,

180, 240 分) 採取した (Fig. 4b)。サンプルは血漿分画を得るために、直ちに 12,000 rpm、5 分間遠心分離を行い、これらの血漿サンプル中の ALN 濃度を HPLC により測定した。

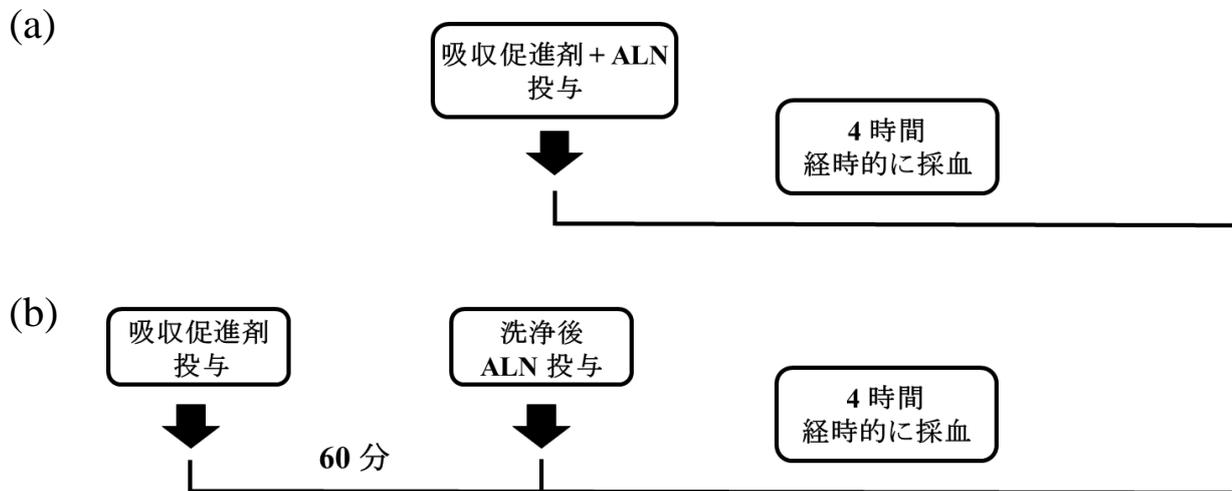


Fig. 4 The protocol of intestinal absorption of ALN using an *in situ* closed loop method, (a) Treatment (b) Pre-treatment.

6. 消化管粘膜障害性評価

消化管粘膜障害性は LDH 活性値及びタンパク質放出量を指標として評価した^{57,58)}。 *In situ* closed loop 法による消化管実験終了後、小腸ループ内を 20 mL PBS (pH 7.4) をゆっくりと注入し、腸管内管腔液を回収した。得られた管腔液は、4 °C、200 G にて 7 分間遠心分離を行い、その上清を用いて、消化管より漏出した LDH 活性を測定した。LDH 活性値は、LDH CII -assay Wako を用いて測定した。その後マイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader、POWERSCAN®HT、HITACHI) を用いて 490 nm の波長にて吸光度を測定することにより算出した。一方、腸管内に漏出したタンパク質濃度は、得られた上清を用いて Bradford 法により算出した。この際、標準物質としてウシ血清アルブミンを用いた。

7. 薬物の定量

ALN の定量は、Wong らの報告⁵⁹⁾ に従い、以下の手順で行った。血漿サンプル 120 μ L を 500 μ L の超純水で希釈し、75 μ L の 5 M trichloroacetic acid (TCA) で除タンパク後、13,000 rpm、5 分間遠心分離を行った。上清をフィルター (0.45 μ m) で濾過し、回収した上清から 600 μ L を採取し、2 μ L 2.5 M CaCl_2 及び 4 μ L 0.5 M NaH_2PO_4 を添加し、70 μ L 6.25 M NaOH を用いて pH 12 に調節することで共沈殿させた。遠心分離を行い、得られた沈殿物を 500 μ L の超純水で洗浄後、沈殿物に 10 μ L 1 N HCl を添加することで再溶解後、100 μ L 0.5 M NaOH を加えることで再び共沈殿させた。さらに遠心分離を行い、得られた沈殿物を 500 μ L の超純水で洗浄

し、沈殿物の 200 μ L 0.05 M Na₂EDTA を添加し、溶解させた。この溶解物に 30 μ L 3mg/mL fluorescamine / acetonitrile を添加した後、dichloromethane を添加し、遠心分離により得られた上清のうち 30 μ L を injection volume として以下の条件に従い、蛍光-逆相-HPLC により測定した。

カラム : COSMOSIL 5 C₁₈-PAQ (4.6×150 mm Nacalai Tesque)
移動相 : 1 mM Na₂EDTA-methanol ((97 : 3) pH 6.5 by 10 N NaOH) : methanol = 97 : 3
流速 : 1.0 mL / min
検出器 : Fluorescence detector (Ex. 395 nm Em. 480 nm)
カラム槽温度 : 40 °C

8. データ解析

血漿ピーク濃度 (C_{max}) 及び血漿ピーク濃度に達するまでの時間 (T_{max}) は血漿中薬物-時間曲線から決定した。また、得られた血漿中濃度推移から、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血中薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) を算出した。さらに吸収促進比 (ER) は以下の式により算出した。

Absorption enhancement ratio = $AUC_{0\rightarrow 4h}$ with enhancer / $AUC_{0\rightarrow 4h}$ control without enhancer.

9. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値±標準誤差 (S.E.) にて表示した。有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Dunnnett 法により行い、 $p < 0.05$ 以上を有意差ありと判断した。

実験結果

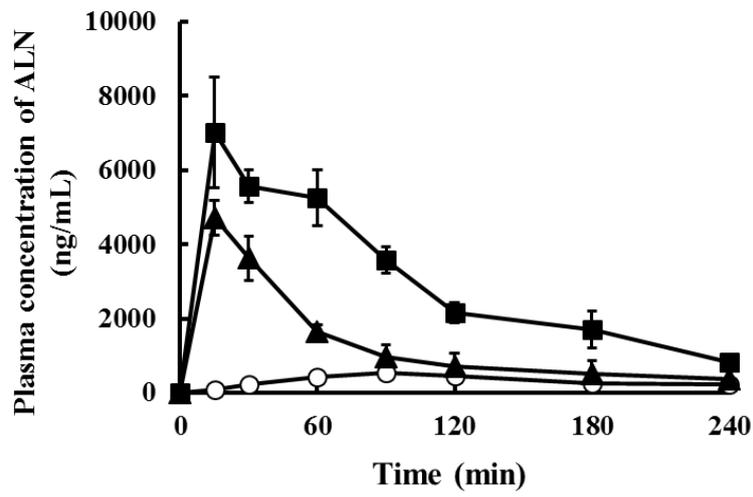
1. アレンドロネートの小腸吸収に及ぼす各種吸収促進剤の影響

小腸における各種 *N*-アシルアミノ酸塩を併用した際の ALN の血漿中濃度プロファイルを図 5 に、また *N*-アシルタウリン塩を併用した際の ALN の血漿中濃度プロファイルを図 6 に示した。さらに、得られた血漿中濃度から、薬物動態学パラメーターを算出し、Table 1、Table 2 にまとめた。

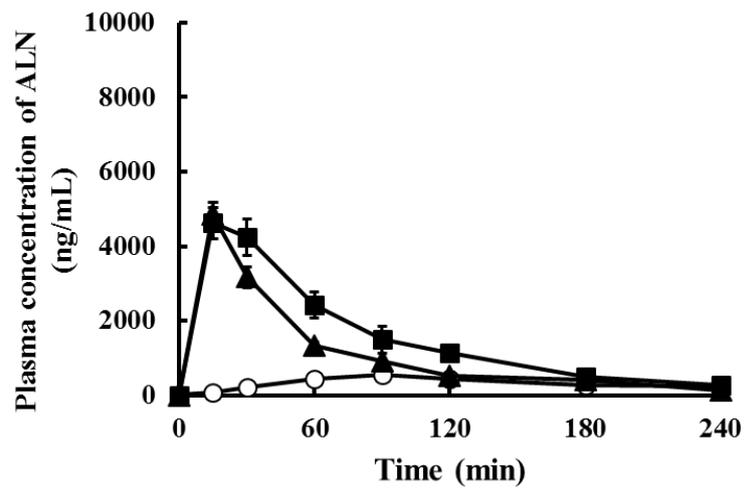
吸収促進剤を併用しなかった Control 群である ALN 10 mg/kg 投与群における C_{max} は 520 ng/mL、 AUC_{0-4h} は 860 ng・h/mL と非常に低かった。したがって、ALN はこれまでの報告通り、非常に吸収性が低い薬物であることが示された。一方、各種 *N*-アシルアミノ酸塩を併用した際には、ON を除くすべての *N*-アシルアミノ酸塩併用群において、ALN の消化管吸収性は、*N*-アシルアミノ酸塩の濃度依存的に有意に増大した。中でも、1.0% (w/v) PN を併用した際の AUC は 11990 ng・h/mL となり、ALN 10 mg/mL 投与群と比較して 14 倍に増大した (Table 1)。また、ALN 10 mg/kg 投与群では T_{max} が 90 min であったのに対し、各種 *N*-アシルアミノ酸塩併用群では T_{max} が 15~30 min と顕著に短くなっていた。以上より、各種 *N*-アシルアミノ酸塩は、速やかに ALN の消化管吸収性を増大させることが確認された。

また、いずれの *N*-アシルタウリン塩併用群においても、ALN の消化管吸収性は有意に増大した。中でも、1.0% (w/v) CMT 併用した際の AUC は 6660 ng・h/mL となり、ALN 10 mg/mL 投与群と比較して 7.7 倍に増大した (Table 2)。また、各種 *N*-アシルタウリン塩併用群では T_{max} が 19~40 min と顕著に短くなっていた。したがって、各種 *N*-アシルタウリン塩は、速やかに、ALN の消化管吸収性を増大させることが明らかとなった。

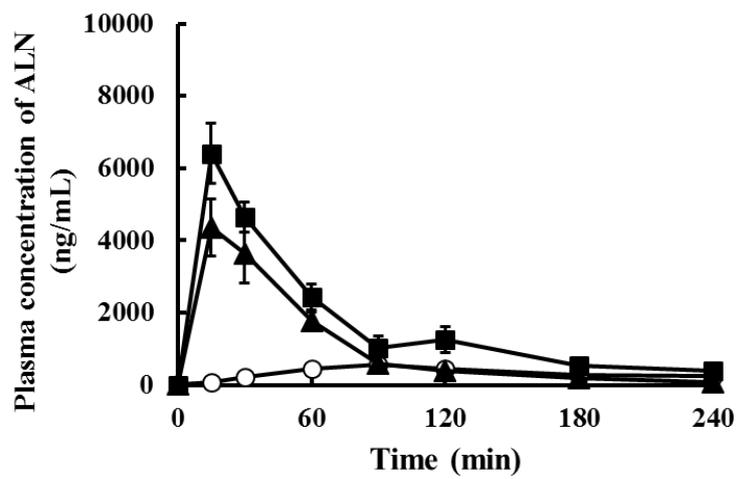
a) PN



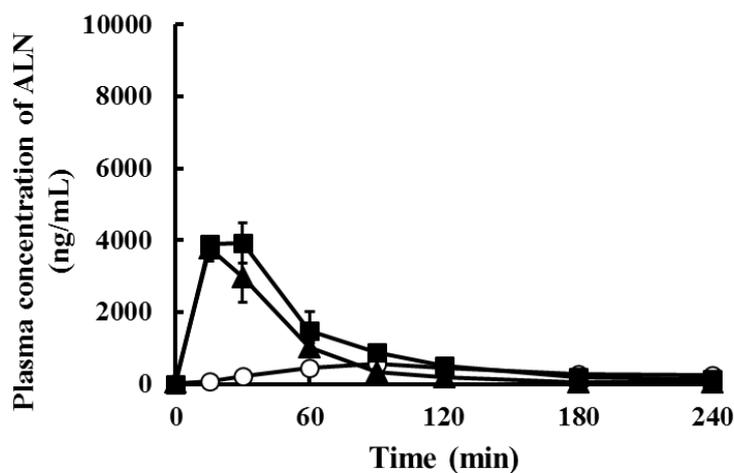
b) MN



c) LN



d) CN



e) ON

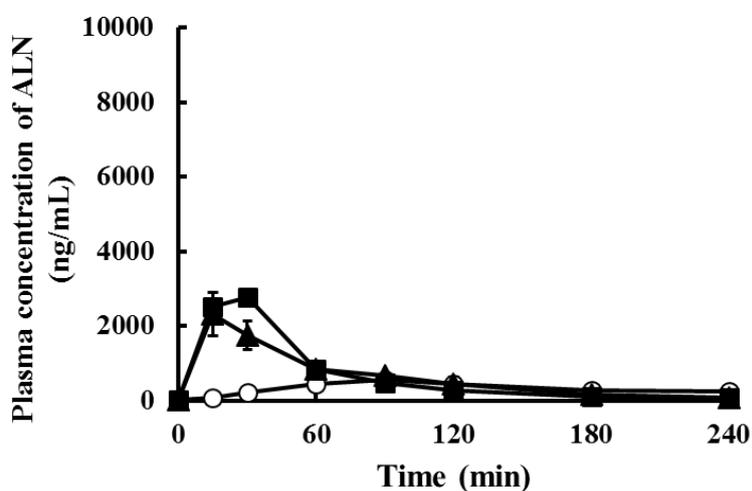


Fig. 5 Effects of various *N*-acyl amino acids on the plasma concentrations of ALN in rat small intestine by *in situ* closed loop study.

Keys: (○) alendronate (10 mg/kg) ; (▲) *N*-acylamino acid (0.5% w/v%) ; (■) *N*-acylamino acid (1.0% w/v%). Each value represents the mean ± S.E. of 3–4 experiments.

This figure was cited from Fig. 2 (a) in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3684, 2016.

Table 1 Pharmacokinetic parameters of ALN in the presence or absence of *N*-acyl amino acids following administration to the rat small intestine by an *in situ* closed loop study.

	Conc. (w/v%)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	AUC_{0→4} (ng · h/mL)	Enhancement Ratio
ALN 10 mg/kg		520 ± 70	90 ± 0	860 ± 130	—————
+ PN	0.5%	4720 ± 460	15 ± 0	5100 ± 620 **	5.9
	1.0%	7620 ± 1050	20 ± 5	11990 ± 520 **	14.0
+ MN	0.5%	4850 ± 330	15 ± 0	4470 ± 200 **	5.2
	1.0%	4620 ± 430	15 ± 0	6190 ± 740 **	7.2
+ CN	0.5%	3780 ± 350	19 ± 4	2980 ± 320 *	3.5
	1.0%	3910 ± 560	25 ± 5	4250 ± 910 **	5.0
+ LN	0.5%	4370 ± 790	19 ± 4	4150 ± 610 **	4.8
	1.0%	6590 ± 1140	15 ± 0	6760 ± 450 **	7.9
+ ON	0.5%	2320 ± 580	20 ± 5	2530 ± 250	3.0
	1.0%	2770 ± 190	30 ± 0	2670 ± 160	3.1

Each value represents mean ± S.E. of 3-4 experiments.

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

This table was cited from Table 1 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3685, 2016.

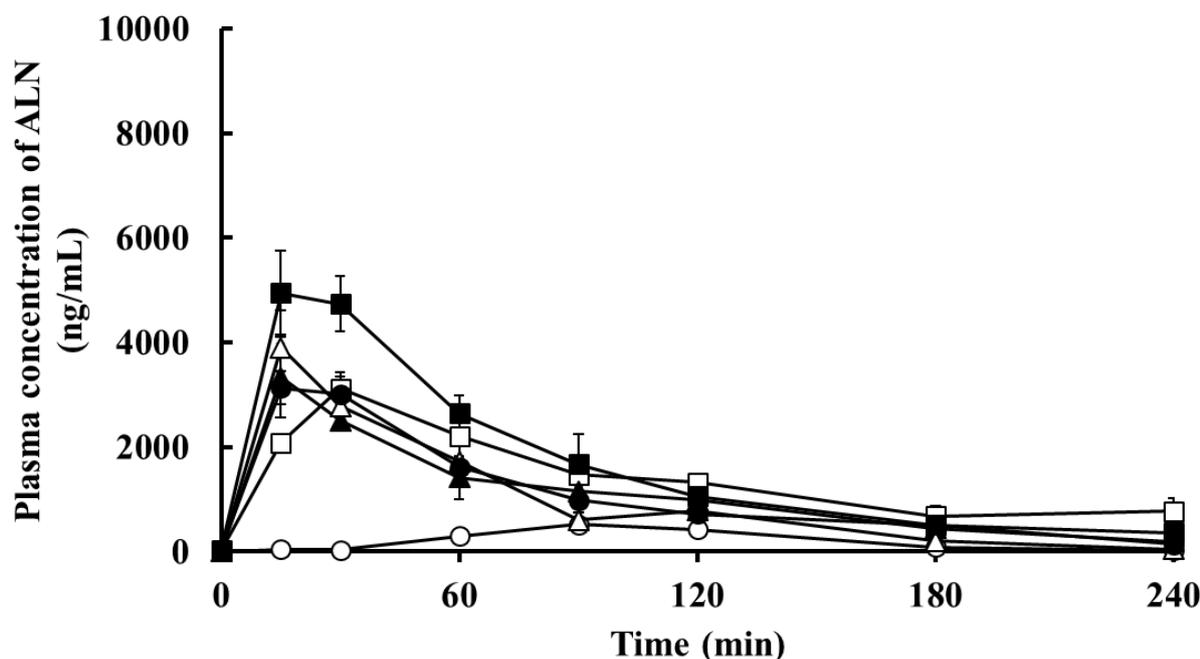


Fig. 6 Effect of various *N*-acyl taurates on the plasma concentrations of ALN in rat small intestine by *in situ* closed loop study.

Keys : (○) alendronate (10 mg/kg); (▲) with 1% (w/v) sodium methyl myristoyl taurate (MMT) ; (□) with 1 % (w/v) sodium methyl palmitoyl taurate (PMT) ; (●) with 1% (w/v) sodium methyl stearoyl taurate (SMT) ; (Δ) with 1% (w/v) sodium methyl lauroyl taurate (LMT) ; (■); 1% (w/v) sodium methyl cocoyl taurate (CMT). Each value represents the mean ± S.E. of 3–4 experiments.

This figure was cited from Fig. 2 (b) in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3684, 2016.

Table 1 Pharmacokinetic parameters of ALN in the presence or absence of *N*-acyl taurates following administration to the rat small intestine by an *in situ* closed loop study.

	Conc. (w/v%)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (min)	AUC _{0→4} (ng · h/mL)	Enhancement Ratio
ALN 10mg/kg		520 ± 70	90 ± 0	860 ± 130	—
+ MMT	1.0%	3460 ± 690	20 ± 5	4350 ± 840 *	5.0
+ PMT	1.0%	3170 ± 290	40 ± 10	5590 ± 510 **	6.5
+ CMT	1.0%	5540 ± 670	20 ± 5	6660 ± 1240 **	7.7
+ SMT	1.0%	3280 ± 260	19 ± 4	4350 ± 450 **	5.1
+ LMT	1.0%	3900 ± 710	20 ± 5	4000 ± 390 *	4.6

Results are expressed as the mean ± S.E. of 3-4 experiments.

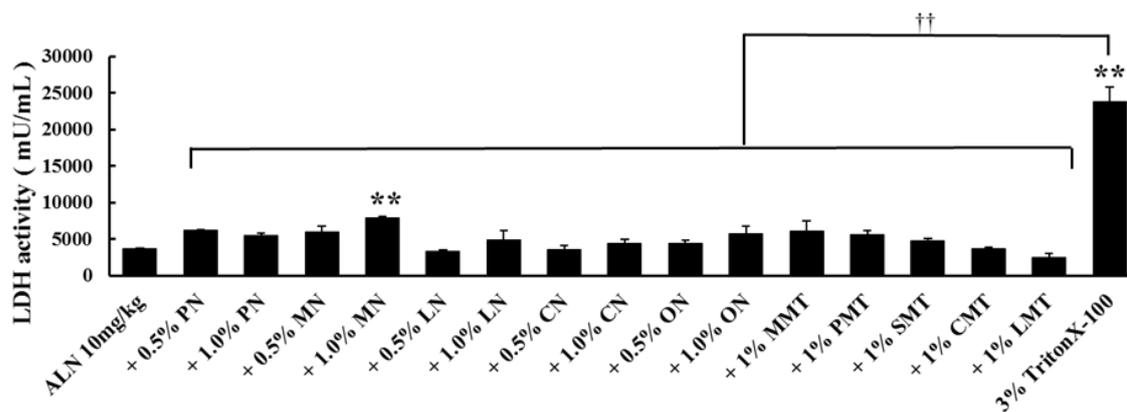
(**) p<0.01, (*) p<0.05, compared with the control group.

This table was cited from Table 1 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3685, 2016.

2. 各種吸収促進剤の小腸粘膜障害性の評価

前節において *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は ALN の消化管吸収性を顕著に改善できることが明らかとなった。しかしながら、これら各種吸収促進剤の顕著な吸収促進効果が、粘膜障害性によるものである可能性が考えられる。そこで、吸収実験終了後の腸管内管液腔液に漏出した LDH 活性値及びタンパク質量を測定することにより、各種吸収促進剤を併用した際の消化管粘膜障害性を評価した (Fig. 7)。その結果、1.0% (w/v) MN 併用時においてのみ Control 群と比較して LDH 活性値に有意な差が認められたものの、その他の吸収促進剤併用時には有意な差は認められなかった。さらに positive control 群として 3% (v/v) TritonX-100 投与群と比較したところ、いずれの吸収促進剤併用群においても有意な差が認められた。また、良好な吸収促進効果を発現した PN、CMT における LDH 活性値及びタンパク質放出量には Control 群と比較して有意な差は認められなかった。したがって、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は比較的安全性が高い吸収促進剤であることが示唆された。

(a)



(b)

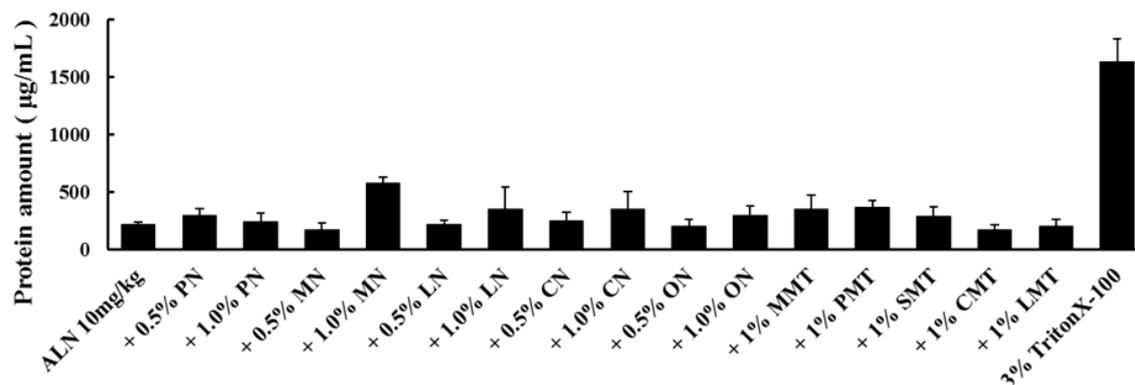


Fig. 7 Effects of *N*-acyl amino acids (PN, MN, CN, LN, ON) and *N*-acyl taurates (PMT, MMT, CMT, LMT, SMT) on the activity of lactate dehydrogenase (a) and the protein release (b) from the rat small-intestinal mucosa in an *in situ* closed-loop study. Each value represents the mean \pm S.E. of 3–4 experiments. (**) $p < 0.01$, compared with the alendronate group. (††) $p < 0.01$, compared with the positive control group. This figure was cited from Fig. 3 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3686, 2016.

3. 各種吸収促進剤併用時の有効性と安全性の関係

各種吸収促進剤の有効性と安全性の関係を明らかにすることにより、より有効かつ安全な促進剤の探索が可能となるため、吸収促進剤の有効性の指標である ER と、安全性の指標である LDH 活性ならびにタンパク質放出量をそれぞれ縦軸、横軸にとってプロットし、これら両者の関係性を示した (Fig. 8)。これらの図において左上に位置するほど、その吸収促進効果が粘膜障害性に比較して大きいこととなる。すなわち 1% (w/v) PN、1% (w/v) CMT が、その粘膜障害性に比較して高い吸収促進効果を有することが明らかとなった。以上より、1% (w/v) PN、1% (w/v) CMT は ALN の消化管吸収性を改善する有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが示唆された。

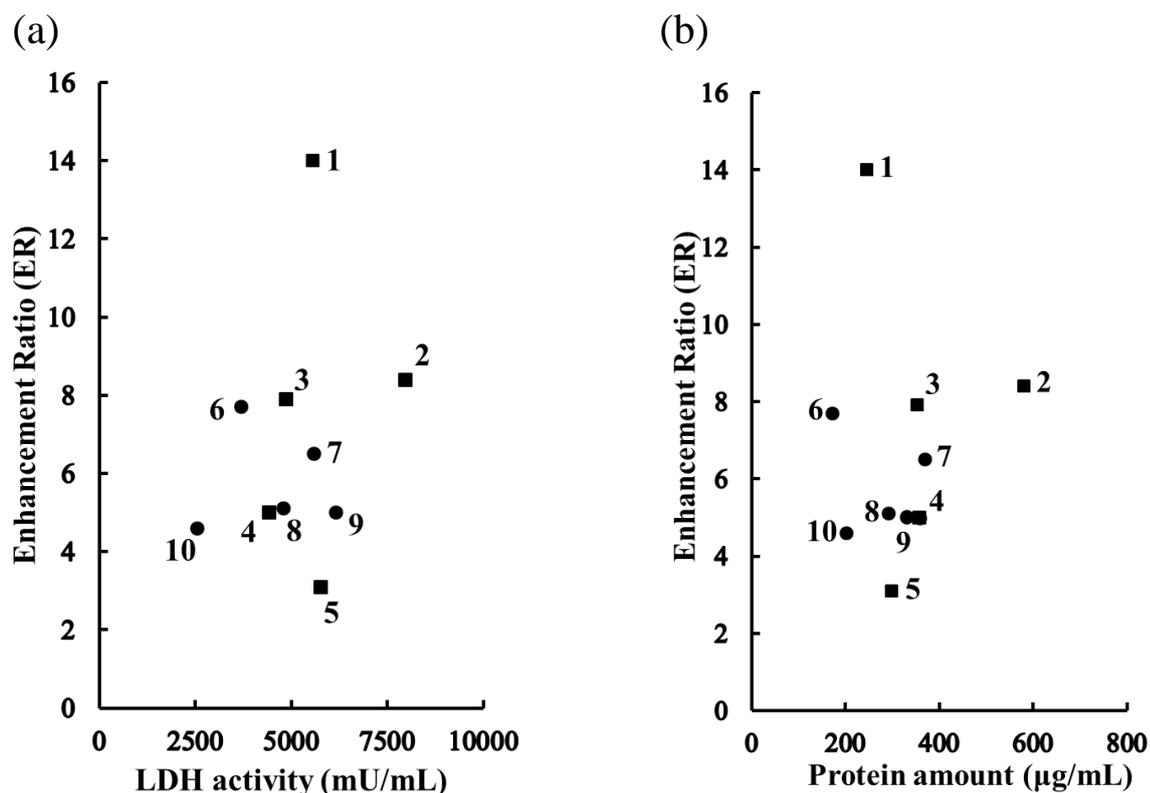


Fig. 8 Relationship between the effects of various absorption enhancers on the enhancement ratio of alendronate and their toxic effects, (a) the activity of lactate dehydrogenase (b) protein amount, in rat small intestine by an *in situ* closed loop study. Keys : 1, with 1% PN ; 2, with 1% MN ; 3, with 1% LN ; 4, with 1% CN ; 5, with 1% ON ; 6, with 1% CMT ; 7, with 1% PMT ; 8, with 1% SMT ; 9, with 1% MMT ; 10, 1% LMT.

4. 各種吸収促進剤の吸収促進効果の可逆性

連続的で不可逆的な吸収促進剤の作用は副作用を引き起こすため、吸収促進剤の可逆性も安全性を評価する重要な要因の一つとなる。そこで *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩併用による ALN の吸収促進効果の可逆性を検討した。

吸収促進剤は、有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった 1% PN 及び 1% (w/v) CMT を用いた。小腸における 1% (w/v) PN 併用群、1% (w/v) PN 60 分前処理群の ALN の血漿中濃度プロファイルを Fig. 9 に、また 1% (w/v) CMT 併用群、1% (w/v) CMT 60 分前処理群の ALN の血漿中濃度プロファイルを Fig. 10 に示した。さらに、得られた血漿中濃度から、薬物動態学パラメーターを算出し、Table 3、Table 4 にまとめた。

その結果、1% (w/v) PN 前処理群及び 1% (w/v) CMT 前処理群における血漿中 ALN 濃度は、1% (w/v) PN 併用群及び 1% (w/v) CMT 併用群と比較して顕著に低下することが認められた。1% (w/v) PN 前処理群及び 1% (w/v) CMT 前処理群における血漿中 ALN 濃度は、ALN 10 mg/kg 投与群と比較してわずかに増大する傾向が認められたが、ALN 投与群と比較して有意な差は認められなかった。したがって、1% (w/v) PN、1% (w/v) CMT の吸収促進効果は可逆的であることが示唆された。

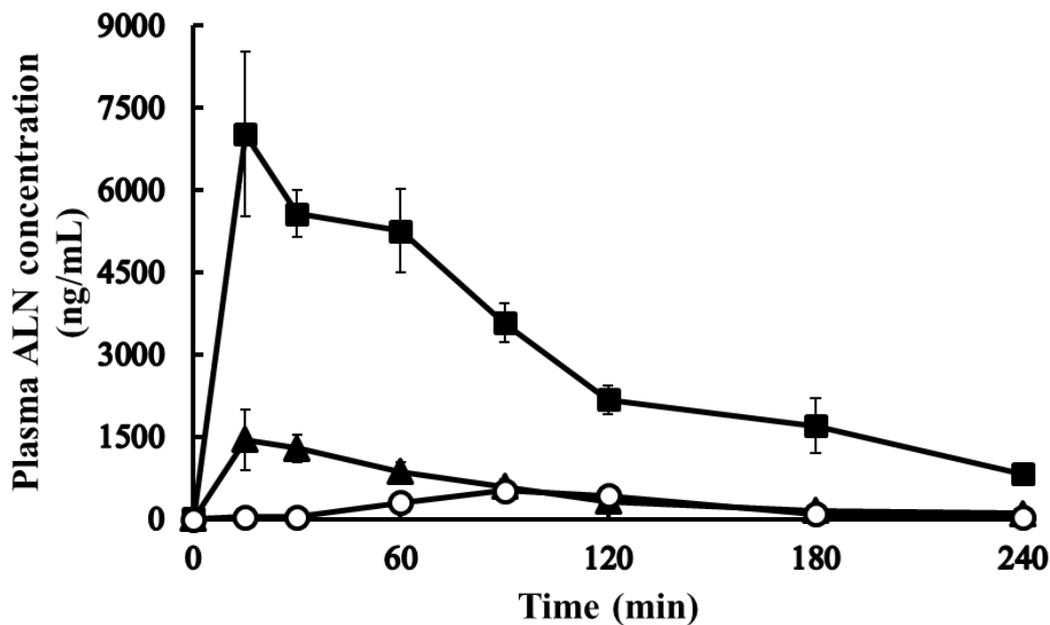


Fig. 9 Effects of pretreatment with 1% (w/v) PN on the absorption of alendronate from the small intestine using an *in situ* closed-loop method. Keys: (○) alendronate (10 mg/kg) ; (▲) with 1% PN (w/v) pretreatment ; (■) 1% (w/v) PN treatment. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. This figure was cited from Fig. 4 (a) in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3687, 2016.

Table 3 Effect of pretreatment with 1% PN on the pharmacokinetic parameters of ALN following administration to the rat small intestine by an *in situ* closed loop study.

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0 \rightarrow 4}$ (ng · h/mL)	Enhancement Ratio
ALN 10mg/kg	520 ± 70	90 ± 0	860 ± 130	—
ALN 10mg/kg + 1% PN	7620 ± 1050	20 ± 5	11990 ± 520 **	14.0
Pretreatment 1% PN for 60 min	1640 ± 500	26 ± 4	2020 ± 400	2.3

Results are expressed as the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. (**) $p < 0.01$, compared with the control group. This table was cited from Table 2 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3687, 2016.

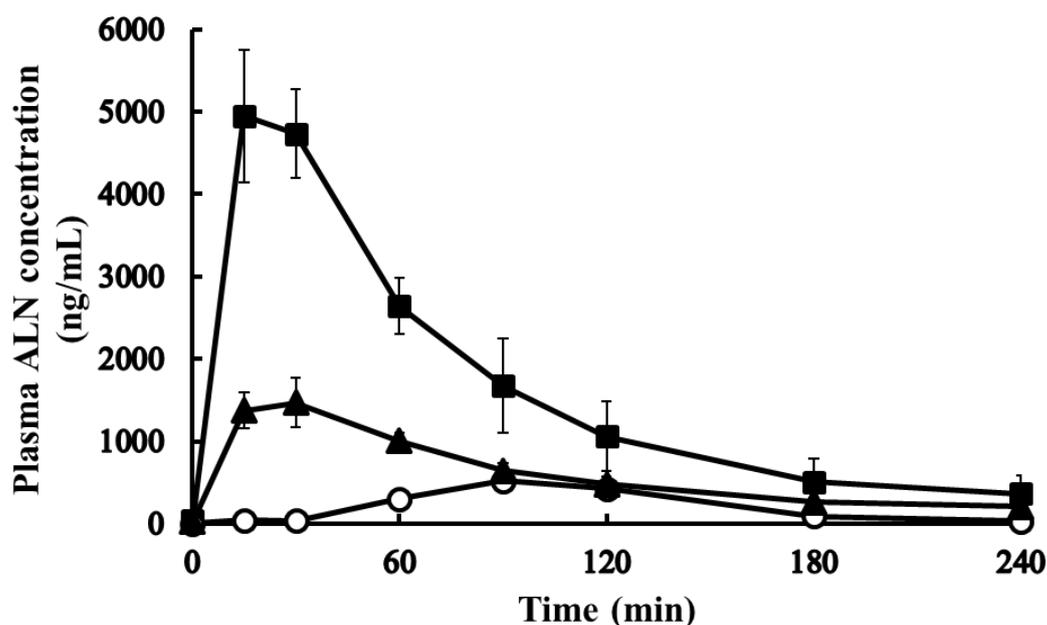


Fig. 10 Effects of pretreatment with 1% (w/v) CMT on the absorption of alendronate from the small intestine using an *in situ* closed-loop method. Keys: (○) alendronate (10 mg/kg) ; (▲) with 1% CMT (w/v) pretreatment ; (■) 1% (w/v) CMT treatment. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. This figure was cited from Fig. 4 (b) in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3687, 2016.

Table 4 Effect of pretreatment with 1% CMT on the pharmacokinetic parameters of ALN following administration to the rat small intestine by an *in situ* closed loop study.

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	$AUC_{0 \rightarrow 4}$ (ng · h/mL)	Enhancement Ratio
ALN 10mg/kg	520 \pm 70	90 \pm 0	860 \pm 130	—
ALN 10mg/kg + 1% CMT	5540 \pm 670	20 \pm 5	6660 \pm 1240 *	7.7
Pretreatment 1% CMT for 60 min	1500 \pm 270	25 \pm 5	2440 \pm 170	2.8

Results are expressed as the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. (*) $p < 0.05$, compared with the control group. This table was cited from Table 2 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3685, 2016.

考察

本章では *in situ closed loop* 法を用いて ALN の消化管吸収性に及ぼす各種吸収促進剤の影響を検討するとともに、吸収促進剤を併用した際の粘膜障害性及び吸収促進剤の可逆性を評価することで、より有効かつ安全性の高い ALN の投与形態の構築を試みた。

BPs はその水溶性の高さゆえに、消化管からの吸収率が悪く、これまで様々な研究者によって消化管吸収性の改善を試みられてきた³⁶⁻³⁹⁾。しかし、いずれもその吸収促進効果は不十分であった。一方、ALN の消化管吸収を改善するこれらの従来のアプローチとは異なり、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルリン塩は ALN の消化管吸収を有意に高めた (Fig. 5、Fig. 6)。特に 1% (w/v) PN は、ALN の消化管吸収性を 14 倍に増加させ (Fig. 5、Table 1)、1% (w/v) CMT は、ALN の消化管吸収性を 7.7 倍に増大させた (Fig. 6、Table 2)。1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT を用いたこれら吸収促進比は、これまでに報告されている他の吸収促進剤および剤形を使用する吸収促進比よりもはるかに大きく、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩を用いて ALN の腸内吸収を改善する有望な方法を確立することが出来た。

ALN の消化管吸収性は一般に非常に低く、4 時間の消化管吸収実験の終了時には、ALN の大部分はループ内に留まっており、ALN の血漿中濃度は吸収試験の間に増加し続けるはずであると考えられる。しかし、Fig. 5 及び Fig. 6 に示すように、いずれの場合においても C_{max} 及び T_{max} が明確に認められた。この理由は明確に解明されていない。しかし、これまでの研究で、ALN は骨組織の主要成分であるハイドロキシアパタイトとの高い親和性のために、骨に容易に分布することが知られている。したがって、 C_{max} が観察される 1 つの要因は、ALN が消化管吸収実験において、消化管吸収後に骨に迅速に分布することが考えられる。さらに、ALN は尿を介して容易に体内から排泄されることが知られている。Porrus らは、ALN は非常に安定で、体内で代謝されないにも関わらず、尿中に排泄されるか骨に吸収されることにより血漿から迅速に除去されると報告している²⁾。これらの以前の報告に基づいて、本研究の消化管吸収実験において ALN の C_{max} 及び T_{max} が観察されたと考えられる。

吸収促進剤を臨床的に使用する場合、これらの化合物の消化管粘膜毒性及び可逆性を考慮し、評価する必要がある⁵⁶⁾。本研究では、放出された LDH 活性値及びタンパク質放出量を測定することによって、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩による粘膜障害性を検討した。一般に、消化管粘膜が損傷した場合、生体膜の成分の 1 つであるタンパク質の放出が増加する。したがって、タンパク質は膜損傷の典型的な指標である。一方、LDH は乳酸脱水素酵素であり、一般に細胞内に局在するため、LDH の活性は消化管粘膜が損傷した場合に増強される。Fig. 7 (a) に示すように、1% (w/v) MN 併用時に LDH 活性値の上昇が観察された。これは、MN が高濃度においては消化管粘膜にいくらかの毒性作用を有することを示唆している。しかし、1% (w/v) MN 存在下における LDH 活性値及びタンパク質放出量は、3% (v/v) Triton X-100 の存在下と比較して顕著に低かった。これらの結果は、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩が、重篤な消化管粘膜障害を惹起せずに ALN の吸収を増加させることが出来ることを示唆している。以前の研究では、有効かつ安全性の高い吸収促進剤はこれまでにほとんど見出されていない。

したがって、これらの知見は、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルアミノタウリン塩が、重篤な消化管粘膜障害を引き起こすことなく ALN の小腸吸収性を改善する優れた吸収促進剤であることが認められた。

また、1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT による前処理は、同時投与ではこれらの吸収促進剤は ALN の小腸吸収を顕著に増加させたにも関わらず、ALN の消化管吸収を有意に促進しなかった (Fig. 9、Fig. 10)。本実験では 1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT を洗浄した後すぐに ALN を投与しており、1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT 前処理群では、ALN 投与から 90 min までは ALN 10 mg/kg 投与群と比較して、わずかに ALN の吸収促進効果が認められた。この結果から、1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT の吸収促進効果が完全に消失するまでには、いくらか時間が必要であると考えられる。しかしながら、ALN 投与から 90 min 以降には、ALN 10 mg/kg 投与群と同等の血漿中濃度であったことから、1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT の吸収促進効果が完全に消失するのに必要な時間は短時間であると考えられる。同様の結果は、ポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー及びジェミニ界面活性剤を新規な吸収促進剤として使用する以前の研究においても観察されている^{60,61}。これらの結果は、これら吸収促進剤の吸収促進効果は可逆的であり、これら吸収促進剤が重篤な消化管粘膜毒性を引き起こさないことを示している。

以上より、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は有効かつ安全性の高い優れた吸収促進剤であることが認められた。

一方で、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の分子量は約 400 であることから、吸収促進剤自体が消化管から吸収される可能性も十分考えられる。本研究では、吸収促進剤が消化管から吸収された後の全身循環系を介した毒性については未検討であるが、肝毒性に関しては ALT や AST を、腎毒性に関してはクリアチニン値などをマーカーとして、臓器レベルでの毒性検査を行うことで検討は可能であると考えられる。

第2章 各種吸収促進剤の吸収促進機構の解明に関する検討

緒言

第1章において、各種 *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。しかしながら、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構については未だ不明な点が多い。

一般に、消化管上皮細胞を介する物質の輸送経路は、細胞内経路 (transcellular route) 及び細胞間経路 (paracellular route) が知られている (Fig. 11)。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る。一方、細胞間経路は隣接する細胞同士の接着分子により選択的透過性が制御されており、バリア機能を果たしている。この選択的透過性を担う接着分子構造が tight junction であり、tight junction は occluding や claudin などの膜貫通型タンパク質と zonula occludens (ZO) などの細胞内裏打ちタンパク質から構成されている⁶²⁾。細胞間経路は水溶性の高い物質や受動輸送で輸送される薬物の透過経路である。

本章では、第1章で高い有効性と安全性が確認された PN 及び CMT を選択し、吸収促進機構の解明を試みた。まず、細胞内経路を介した吸収促進機構があるか否かを検討するため、膜流動性に及ぼす PN 及び CMT の影響について検討を行った。さらに、細胞間経路を介した吸収促進機構があるか否かを検討するため、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* における 5(6)-carboxyfluorescein (CF) の膜透過性及び膜抵抗値 (TEER) における PN 及び CMT の影響について検討を行った。さらに、tight junction の構成タンパク質である claudin-1 及び claudin-4 の発現に及ぼす PN 及び CMT の影響についても検討した。

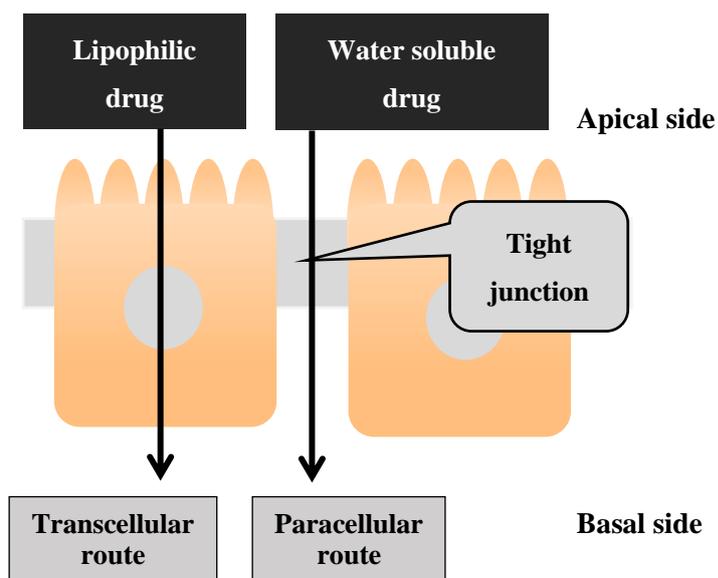


Fig. 11 Scheme of transport of drugs across the epithelial cells.

実験材料及び方法

1. 試薬

Alendronate sodium trihydrate は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。N-アシルアミノ酸塩及び N-アシルタウリン塩は Nikko Chemical Co. Ltd. (Osaka, Japan) より入手した。CF は Eastman Kodak Company (Rochester, NY) から、Dulbecco's modified Eagle's medium、fetal bovine serum、modified Eagle's medium non-essential amino acid solution は Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA) から、Trypsin-EDTA、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES)、antibiotic-antimycotic mixed stock solution は Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) から購入した。Hank's balanced salt (HBS)、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd (St. Louis, MO) より入手した。N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate (tma-DPH) は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX) から購入した。

2. 実験動物

実験動物には Wistar 系雄性ラット (8 週齢, 230 ~ 250 g) は清水実験材料株式会社 (京都) から購入した。なお、本実験のプロトコールは京都薬科大学動物倫理委員会により承認され、動物実験はすべて京都薬科大学動物実験実施規程に従って行った。

3. ラット小腸 brush border membrane vesicles (BBMV) の抽出・精製

BBMV は Mg^{2+} 沈殿法を用いて調製した^{63,64}。16 時間絶食した Wistar 系雄性ラット (230 ~ 250 g) を使用した。ラットに pentobarbital (32 mg/kg) を用いて麻酔し、固定台に背位固定した。ラットの体温を一定に維持するため、実験は加熱ランプの下で行った。腹部正中切開により小腸を露出させ、十二指腸上部にカニューレを挿入し、胆汁の影響を除外するために胆管と共に結紮し、盲腸上部 2 cm の回腸部位を切開した。小腸の内容物を洗浄するため、20 mL PBS (pH 7.4) をゆっくりと注入し、洗浄後に脱血死させた。その後、小腸を摘出し、氷冷した PBS で洗浄を行い、腸間膜に沿って切開し、粘膜をスライドガラスを用いて剥ぎ取った。剥ぎ取った小腸粘膜は homogenizing buffer (12mM Tris, 5mM EGTA, 300mM mannitol, pH 7.4 by 1M HEPES) でポリトロン組織ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後、 $MgCl_2$ で処理し、懸濁液を遠心分離 (3000 g, 15 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 を含む沈殿物に homogenizing buffer を加え、27 G の針を用いて再懸濁させた。タンパク濃度は Bradford 法を用いて定量し、最終タンパク濃度が 4 mg/mL となるように調製した。BBMV サンプルは使用時まで -80 °C で保存した。

4. 蛍光偏光解消法

一般的な蛍光プローブである 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)、1-(4-trimethyl ammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-p-toluenesulfonate (tma-DPH)、dansyl chloride (DNS-Cl)

を用いて、膜流動性に及ぼす吸収促進剤の影響を検討した⁶⁵⁾。BBMV (4 mg/mL protein/mL) は各種蛍光プローブを用いてラベル化を行った。ラベル化は、DPH (10 μ M)、DNS-Cl (5 μ M) となるように BBMV に加え、30 min 37 °C でインキュベーションを行った。一方、tma-DPH は最終濃度 0.5 μ M となるように BBMV に加え、15 min 37 °C でインキュベーションを行った。ラベル化された BBMV に各濃度 PN 及び CMT を加え、37 °C で 1 min インキュベーションした後、励起側と蛍光側に 2 枚の偏光フィルターを装着した fluorescence spectrophotometer F-2000 (株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いて蛍光偏光度を測定した。DPH、tma-DPH 測定時には Ex. 360 nm、Em. 430 nm、DNS-Cl については Ex. 380 nm、Em. 430 nm の波長にてそれぞれ測定した。蛍光異方性 r (fluorescence anisotropy) は以下の式により算出した。

$$r = (I_{vv} - G \times I_{vh}) / (I_{vv} + G \times 2 I_{vh})$$

$$G = I_{hv} / I_{hh}$$

ここで、 I_{vv} 、 I_{vh} 、 I_{hv} 、 I_{hh} は異なる偏光度を持った励起光、蛍光での蛍光強度を表し、添字の v 、 h は偏光の角度を表す。すなわち、 v は垂直 (vertical)、 h は水平 (horizontal) 方向の変更を示す。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。なお、 G は grating correction factor であり、装置固有の補正值である。

5. 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 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地を用いて、37 °C、5% CO₂ 存在下において、培養フラスコ中で培養した。Subconfluent に達した Caco-2 細胞を 0.05% trypsin / 0.02% EDTA を用いて剥離後、1 \times 10⁵ cells / insert で 12 well Transwell に播種した。培地交換は 2 日ごとに行い、21 日間培養し、膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance ; TEER) が 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上となったもののみを実験に使用した。

6. Caco-2 細胞透過実験

Caco-2 細胞単層膜を Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) で洗浄後、apical 側に 0.5 mL HBSS (pH 6.0)、basal 側に 1.5 mL HBSS (pH 7.4) を加え、37 °C の恒温槽で 40 分間プレインキュベーションを行った。その後、apical 側に pH 6.0 に調整した PN、CMT (0.01 ~ 1.0% [w/v]) 及び CF (10 μ M) を含有した HBSS 溶液を添加して実験を開始した。その後、4 時間まで経時的に basal 側より 120 μ L ずつサンプリングを行い、等量の HBSS (pH 7.4) を basal 側に添加した。

また、Caco-2 細胞単層膜における TEER の変化は、経時的に実験開始から 4 時間、Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter (MA) を用いて測定した。なお、実験開始時の TEER 値を 100 (% of initial value) として、それぞれの時点の TEER 値を算出した (Fig. 12)。

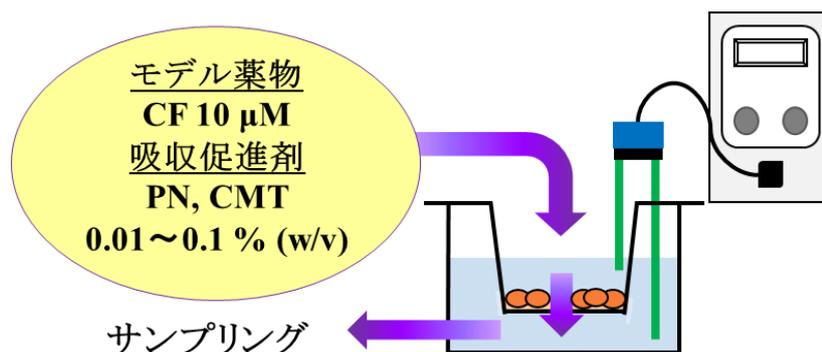


Fig. 12 *In vitro* study on the transepithelial transport of CF.

7. 薬物の定量

透過実験より採取したサンプル中 CF 濃度の測定は、マイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader、POWERSCAN®HT、HITACHI) を用いて、Ex. 485 nm、Em. 535 nm の波長にて蛍光強度を測定することにより算出した。

8. データ解析

透過実験において、CF の透過性は、CF の透過量-時間曲線から見かけの透過係数 (P_{app}) を以下の式を用いて算出、評価した。

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

ここで、 P_{app} は見かけの透過係数 (cm/sec)、Flux は定常状態における累積輸送プロファイルの直線部分の傾き (nmol / min)、A は拡散面積 (1.12cm²)、および C_0 はドナー側の薬物の初期濃度 (nmol / mL) を表す。

9. Western blot 法

16 時間絶食した Wistar 系雄性ラット (230~250 g) を使用した。ラットに pentobarbital (32 mg/kg) を用いて麻酔し、固定台に背位固定した。ラットの体温を一定に維持するため、実験は加熱ランプの下で行った。腹部正中切開により小腸を露出させ、十二指腸上部にカニューレを挿入し、胆汁の影響を除外するために胆管と共に結紮し、盲腸上部 2 cm の回腸部位を切開した。小腸の内容物を洗浄するため、20 mL PBS (pH 7.4) をゆっくりと注入し、洗浄後は空気により小腸内の PBS を除去した。その後、回腸の切開部位にカニューレを挿入し、結紮することで小腸ループとした。1% PN、1% CMT を投与し 4 時間処理した後、小腸を取り出し BBMV を抽出・精製を行った。一方、前処理群においては、薬液投与から 4 時間後に腸管内を PBS (pH 7.4) を用いて洗浄し、洗浄からさらに 4 時間後に小腸を取り出し BBMV の抽出・精製を行った (Fig. 13)。

最終タンパク濃度が 4 mg/mL となるように調製した BBMV サンプル (10 μL) を sodium

lauryl sulfate-15% polyacrylamide slab gel を用いて電気泳動を行い (100 v, 90 min)、PVDF 膜へ転写した (60 v, 4 h)。その後 PVDF 膜を 5% (w/v) スキムミルクを用いて室温で 1 時間ブロッキングを行い、TTBS で洗浄を行った後、一次抗体 (claudin-1 (rabbit monoclonal antibody ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), claudin-4 (mouse monoclonal antibody ; Life Technologies Corporation)と反応させた (4 °C, overnight)。PVDF 膜を TTBS で洗浄した後、これら一次抗体に対応する二次抗体 (Goat Anti-Rabbit IgG HRP-linked antibody, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA and Rabbit anti-Mouse IgG HRP-linked Antibody, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と室温で 1 時間反応させ、化学発光検出システムである Chemi-Lumi One Ultra Western blotting kit (Nacalai Tesque, Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて可視化し、生じた化学発光を luminescence imaging system (Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS4000 System, Tokyo, Japan) を用いて検出した⁶⁶⁾。また、生じた化学発光を β -actin のバンド強度を定量し、claudin-1、claudin-4 のピクセル強度を β -actin のピクセル強度で補正した。

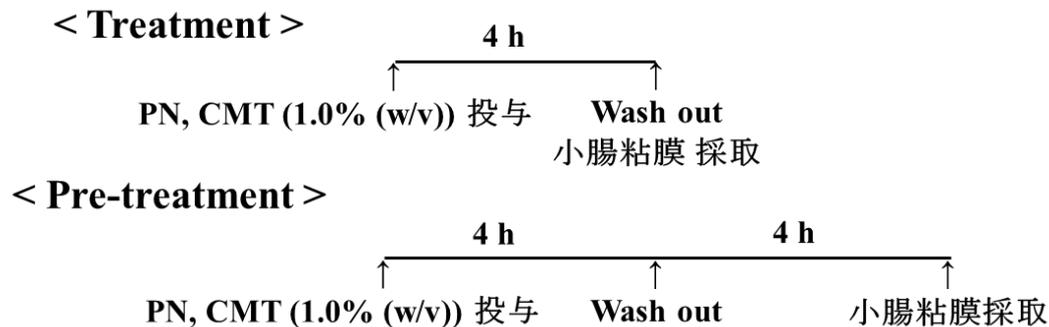


Fig. 13 The protocol of Western blot analyses, (a) Treatment (b) Pre-treatment.

10. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値±標準誤差 (S.E.) にて表示した。有意差検定は、多重比較 (Post-hoc test)、Dunnett 法により行い、 $p < 0.05$ 以上を有意差ありと判断した。

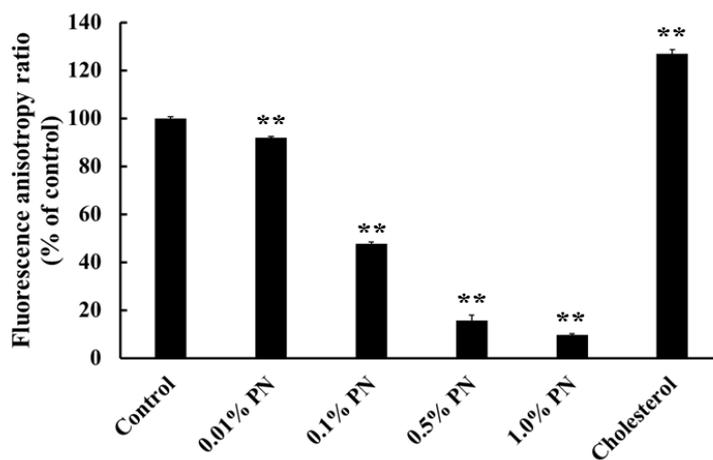
実験結果

1. 膜流動性に及ぼす各種吸収促進剤の影響

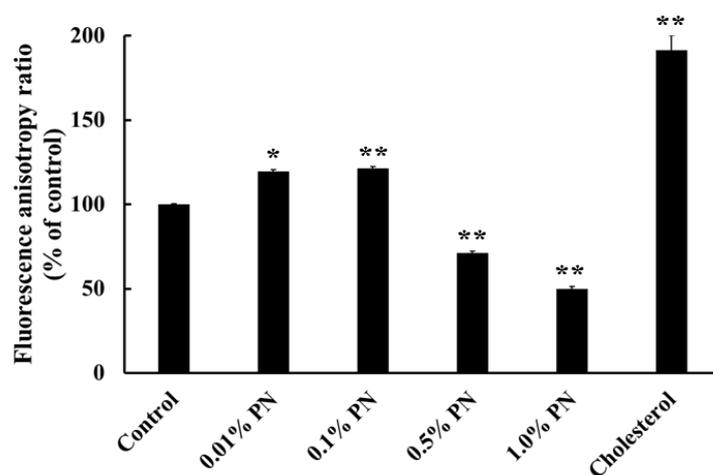
N-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構に細胞内経路が関与するか否かを検討するため、膜流動性に及ぼす PN、CMT の影響について検討を行った。膜流動性変化の評価には、一般的に蛍光偏光解消法が用いられており、本研究では蛍光プローブとして、脂質膜内部に分布する DPH、脂質膜外部に分布する tma-DPH、及び膜タンパク質に分布する DNS-Cl を使用してラベル化を行った。ラット小腸 BBMV に PN、CMT を添加した際の蛍光異方性比 (fluorescence anisotropy ratio) を Fig. 14、Fig. 15 に示す。縦軸には control 群を 100% とした際の蛍光異方性比を示しており、この値が減少した場合、膜流動性が增大することを示している。

その結果、PN 及び CMT は脂質膜内部、脂質膜外部及び膜タンパク質の膜流動性を濃度依存的に増大させることが示唆された。中でも、PN は DPH 及び tma-DPH の蛍光異方性比を減少させたことから、主に脂質二重膜内部および外部の流動性を増大させることが示唆された。一方、CMT は DPH および DNS-CL の蛍光異方性比を減少させたことから、主に脂質二重膜内部の脂質及び膜タンパクの流動性を増大させることが示唆された。以上より、PN、CMT の吸収促進機構には、細胞内経路が一部寄与している可能性が示唆された。

a) DPH



b) tma-DPH



c) DNS-Cl

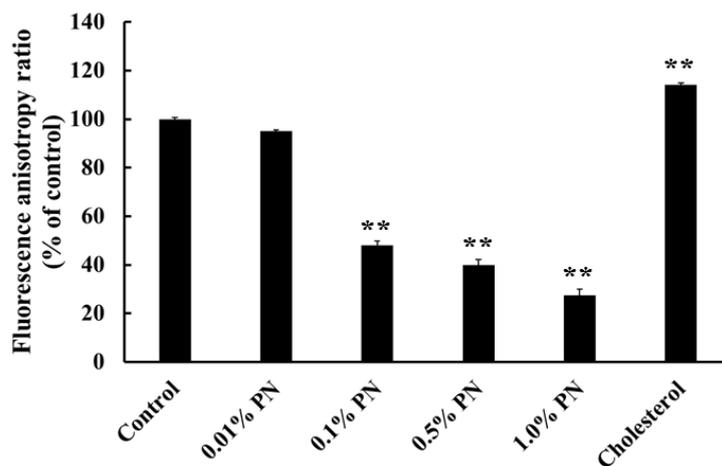
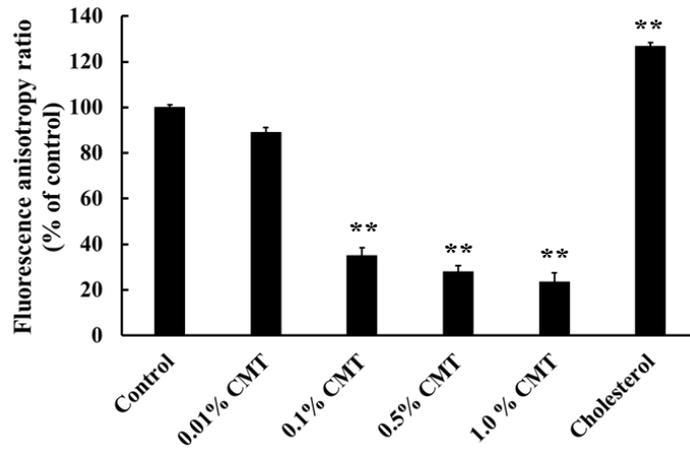
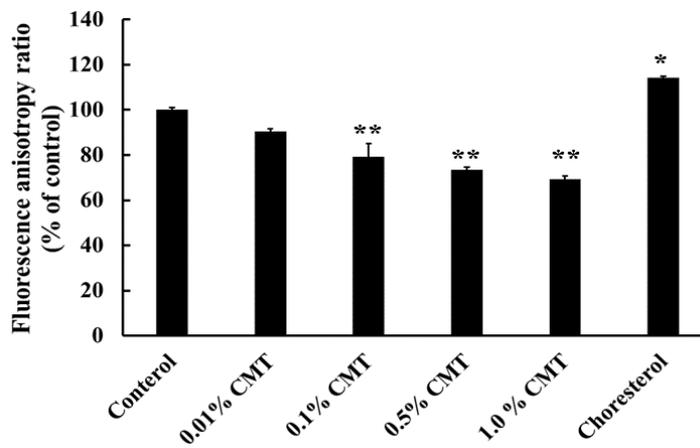


Fig. 14 Effect of PN with various concentrations on the fluorescence anisotropy of the small-intestinal membrane labeled with 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) (a), 1-(4(trimethylamine)phenyl)-6-phenylhexa-1, 3, 5-hexatriene-p-toluene sulfonate (Tma-DPH) (b) and dansyl chloride (DNS-Cl) (c) as probes. Each value represents the mean \pm S.E. of three experiments. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$, compared with the alendronate group. This figure was cited from Fig. 5 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3688, 2016.

a) DPH



b) tma-DPH



c) DNS-Cl

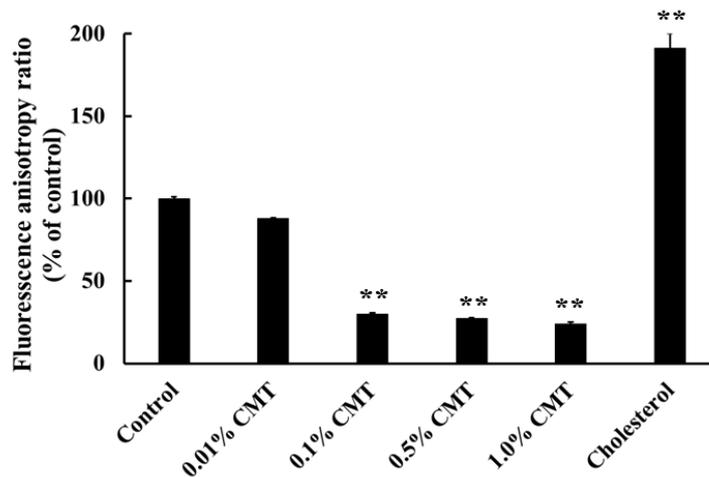


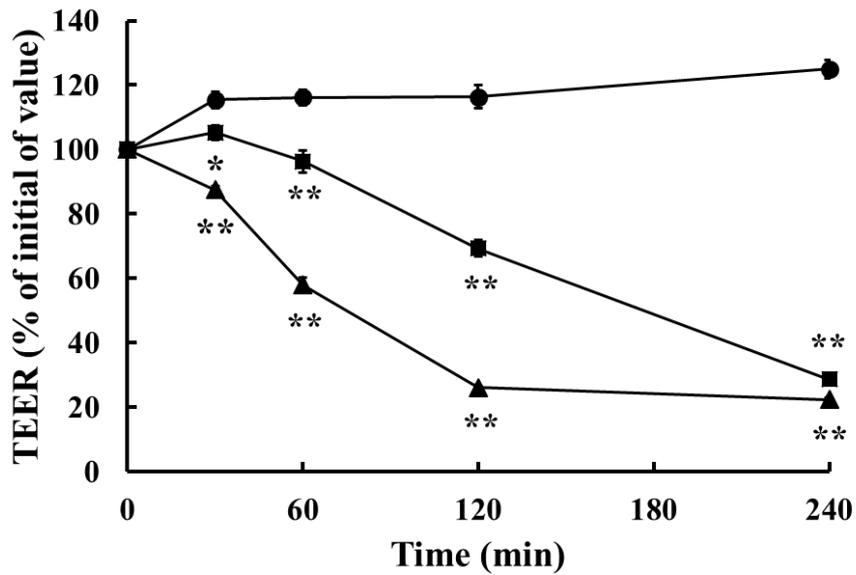
Fig. 15 Effect of CMT with various concentrations on the fluorescence anisotropy of the small-intestinal membrane labeled with 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) (a), 1-(4(trimethylamine)phenyl)-6-phenylhexa-1, 3, 5-hexatriene-p-toluene sulfonate (Tma-DPH) (b) and dansyl chloride (DNS-Cl) (c) as probes. Each value represents the mean \pm S.E. of three experiments. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$, compared with the alendronate group.

2. CF の膜透過性ならびに膜抵抗値に及ぼす各種吸収促進剤の影響

N-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構に細胞間経路が関与しているかを検討するため、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* における CF 膜透過性及び TEER における PN 及び CMT の影響について検討を行った。ヒト結腸癌由来細胞である 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の有用なツールとして広く利用されているモデルである。また、細胞間経路を介して膜透過する化合物であることが知られている CF を難吸収性薬物のモデルとして選択した。吸収促進剤として PN を併用した際の CF の透過性 (P_{app}) 及び TEER を Fig. 16 に示し、CMT を併用した際の CF の透過性 (P_{app}) 及び TEER を Fig. 17 に示した。

その結果、TEER は PN、CMT の併用により濃度依存的に顕著に低下することが認められた。さらに、CF の見かけの透過係数は PN、CMT の併用により濃度依存的に増大することが明らかとなった。0.1% (w/v) PN 併用時の P_{app} は CF の約 55 倍、0.05% (w/v) CMT 併用時の P_{app} は約 43 倍であった。以上の結果より、PN 及び CMT の吸収促進機構には、tight junction 開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用が一部寄与している可能性が示唆された。

a)



b)

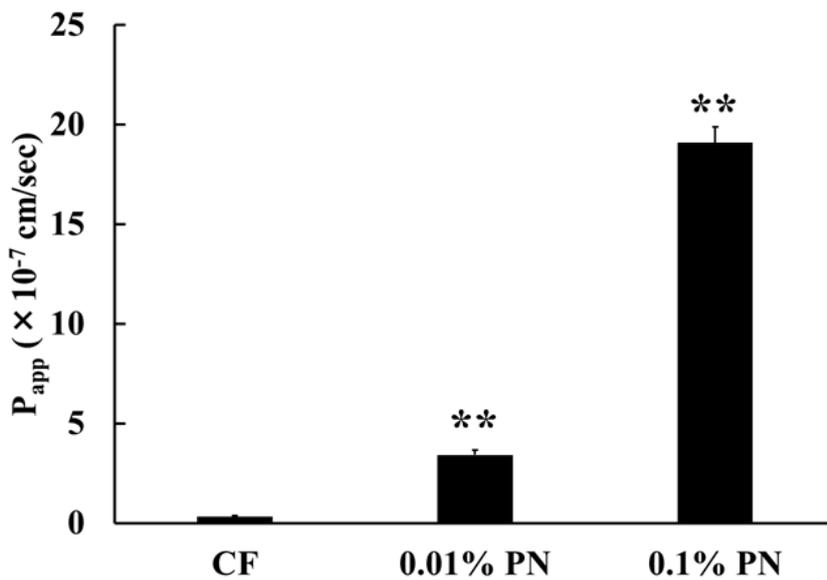
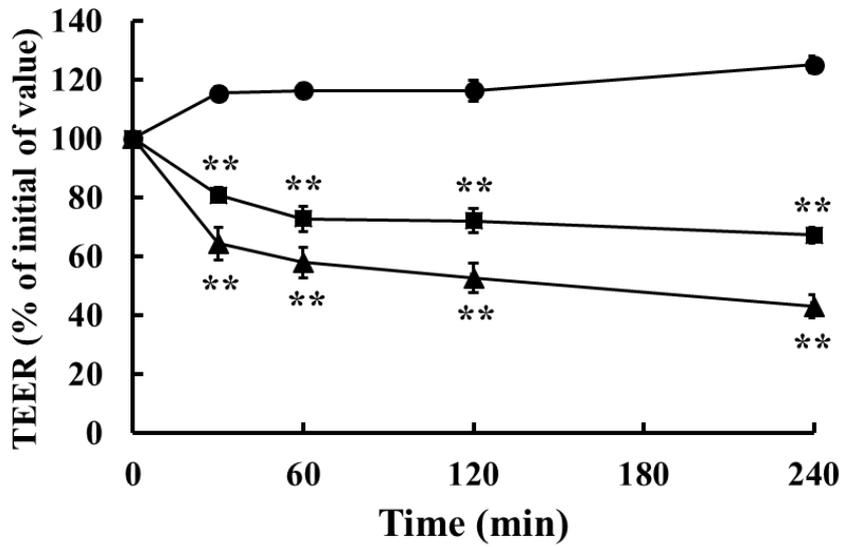


Fig. 16 Effect of PN on the transepithelial electrical resistance (TEER) values (a) and the transport of 5(6)-carboxyfluorescein (CF) (b) in Caco-2 cell monolayers. (●) CF, (■) with 0.01% (w/v) PN, (▲) with 0.1% (w/v) PN. Each value represents the mean \pm S.E. of three experiments. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$, compared with the CF without PN group.

This figure was cited from Fig. 6 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3688, 2016.

a)



b)

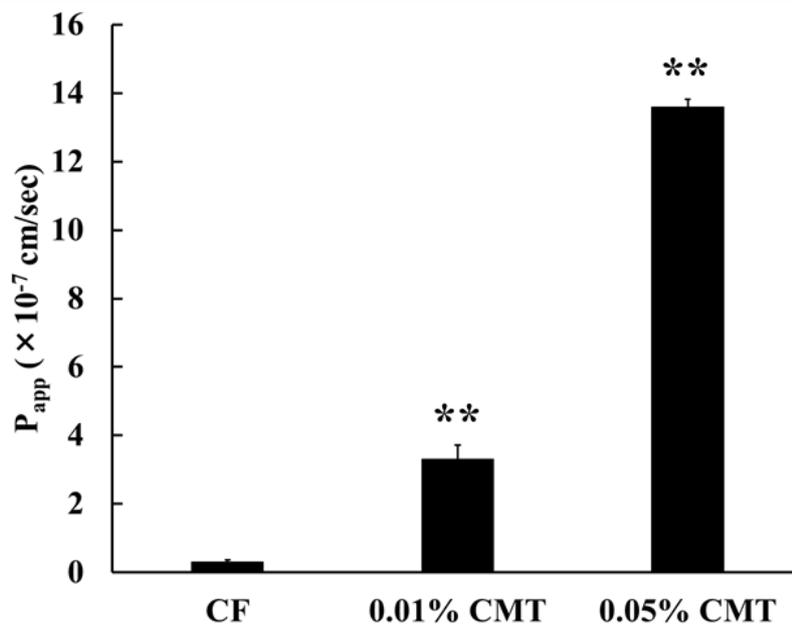
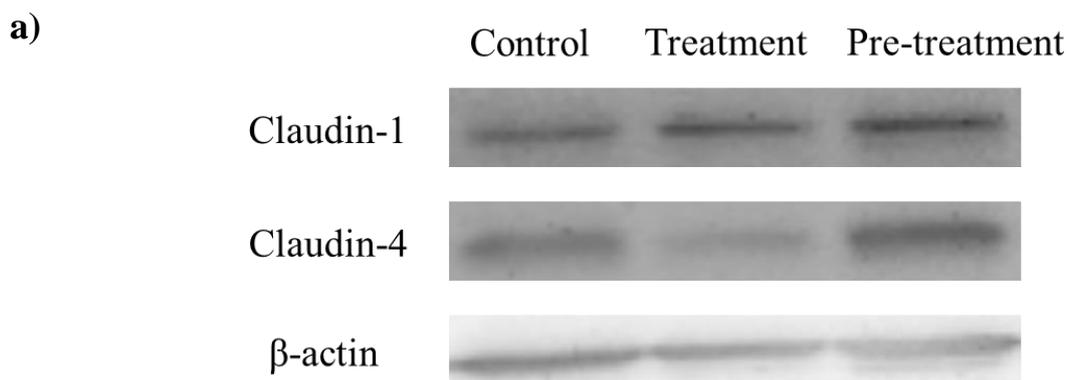


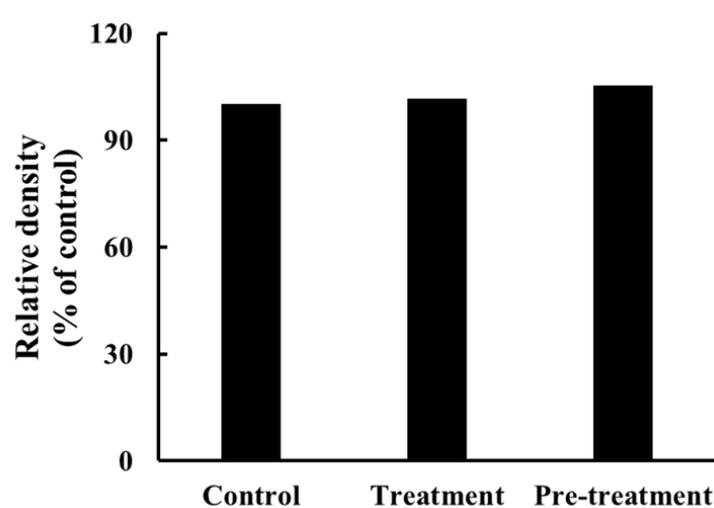
Fig. 17 Effect of CMT on the transepithelial electrical resistance (TEER) values (a) and the transport of 5(6)-carboxyfluorescein (CF) (b) in Caco-2 cell monolayers . (●) CF, (■) with 0.01% (w/v) CMT, (▲) with 0.05% (w/v) CMT. Each value represents the mean \pm S.E. of three experiments. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$, compared with the CF without CMT group.

3. Claudin-1 及び claudin-4 の発現量に及ぼす各種吸収促進剤の影響

Fig. 16、Fig. 17 で PN 及び CMT の吸収促進機構には、tight junction 開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用が一部寄与している可能性が示唆された。そこで小腸の tight junction を構成する claudin family に及ぼす PN、CMT の影響について検討した。その結果を Fig. 18、Fig. 19 に示す。Fig. 18 (c) で示すように、1% (w/v) PN Treatment 群では claudin-4 の発現量が 44% に減少した。一方、Pretreatment 群では claudin-4 の発現量の回復が認められた。しかしながら、1% PN を投与しても claudin-1 の発現量には変化が見られなかった。したがって、PN の吸収促進機構には、claudin-4 の発現量を介した tight junction 開口作用が寄与しており、その作用は可逆的である可能性が示唆された。一方、CMT を投与しても claudin-1 及び claudin-4 の発現量には変化が認められなかった (Fig. 19)。したがって、claudin-1 及び claudin-4 以外の tight junction 構成タンパクに影響している可能性が示唆された。



b) Claudin-1



c) Claudin-4

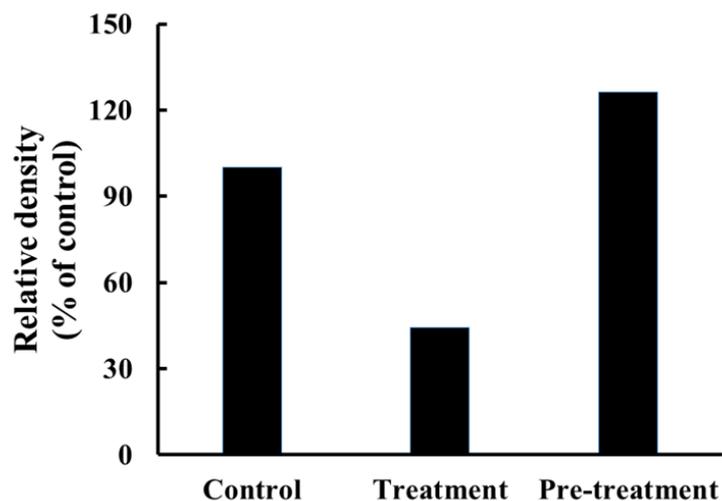
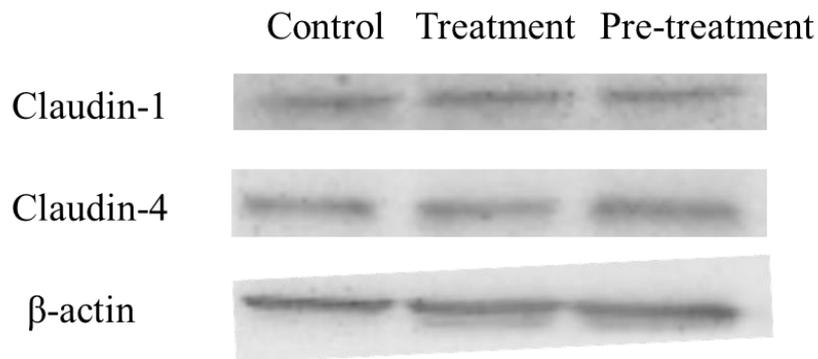


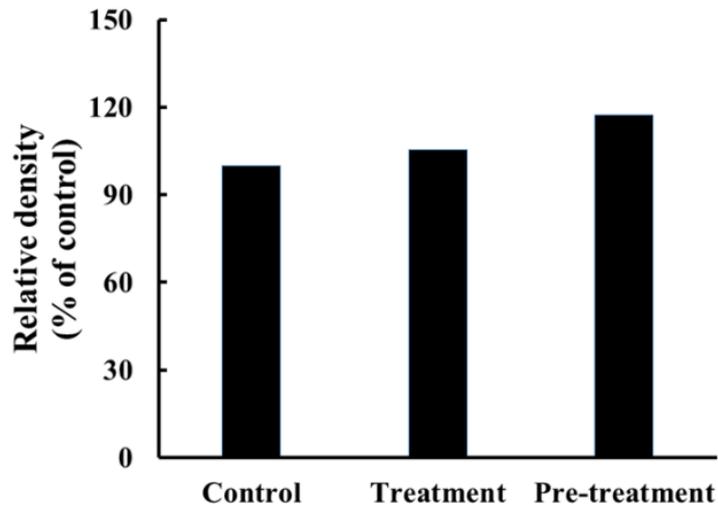
Fig. 18 The Western blot images of claudin-1 and claudin-4. (a) The expression levels of claudin-1 (b) and claudin-4 (c) in the rat small intestines were quantitatively calculated after treatment with 1% (w/v) PN for 4 h. After pretreatment with 1% (w/v) PN for 4 h, the proteins were extracted.

This figure was cited from Fig. 7 in *J. Pharm. Sci.*, **105**, 3689, 2016.

a)



b) Claudin-1



c) Claudin-4

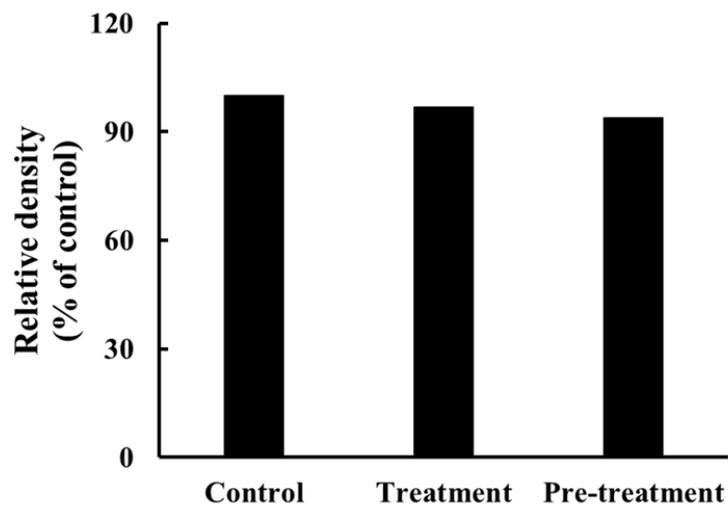


Fig. 19 The Western blot images of claudin-1 and claudin-4. (a) The expression levels of claudin-1 (b) and claudin-4 (c) in the rat small intestines were quantitatively calculated after treatment with 1% (w/v) CMT for 4 h. After pretreatment with 1% (w/v) CMT for 4 h, the proteins were extracted.

考察

第1章では、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の有効性と安全性が明らかとなったが、これら吸収促進剤が ALN の消化管吸収性を増加させる機序は未だ不明である。そこで、第1章で有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった 1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT を吸収促進剤として選択し、その吸収促進機構の解明を試みた。まず、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構に細胞内経路が関与するか否かを検討するため、膜流動性に及ぼす PN、CMT の影響について検討を行った。DPH は脂質膜内部を、tma-DPH は脂質膜外部を、DNS-Cl は膜タンパク質をラベル化する物質である (Fig. 20, 21)。Fig. 14、Fig. 15 に示すように、PN 及び CMT は蛍光異方性比を濃度依存的に減少させた。中でも、PN は DPH 及び tma-DPH の蛍光異方性比を減少させたことから、脂質二重膜内部及び外部の流動性を増大させることが示唆された。一方 CMT は、DPH 及び DNS-CL の蛍光異方性比を顕著に減少させたことから、脂質二重膜内部及び膜タンパク質の流動性を増大させることが示唆された。サリチル酸ナトリウムやカプリル酸ナトリウムは膜流動性を高め、薬物の消化管吸収性を増大させることが知られている^{67,68}。また以前より、膜流動性の増加と薬物の消化管吸収性改善との間には密接な関連があるとの報告がある⁶⁹。したがって、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は膜流動性を増加させ、細胞内経路を介して ALN の消化管吸収性を増加させる可能性が示唆された。

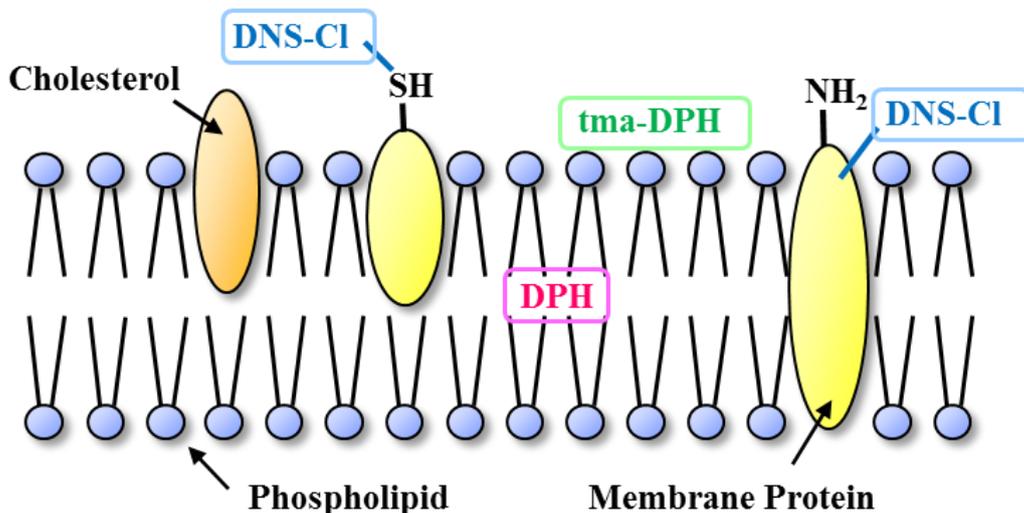


Fig. 20 Evaluation of membrane fluidity of lipid membrane.

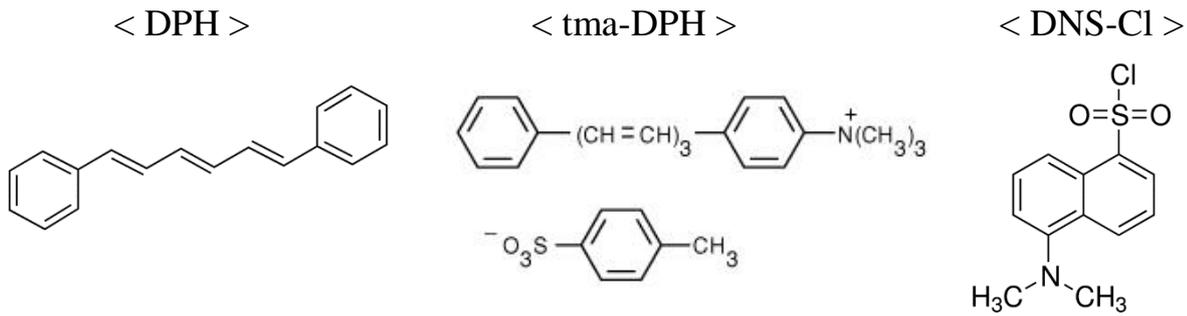


Fig. 21 Chemical structures of DPH, tma-DPH and DNS-Cl.

次に、PN 及び CMT の吸収促進機構に、細胞間経路の寄与があるか否かを検討するため、Caco-2 細胞単層膜を用いて薬物透過実験および膜抵抗値測定を行った。*In vitro* 実験では、細胞間経路を介して透過することが知られている CF をモデル薬物として使用した。PN (0.01%、0.1% [w/v]) 及び CMT (0.01%、0.05% [w/v]) 処理後、TEER 値は PN 及び CMT の併用により濃度依存的に低下した (Fig. 16 (a)、Fig. 17 (a))。さらに、CF の Papp 値は PN、CMT の併用により濃度依存的に有意に増大した。一般に、TEER 値は **tight junction** の強さの指標であり、吸収促進剤を用いた際の TEER 値の減少は、**tight junction** の開口を意味する。実際、多くの吸収促進剤は TEER 値を低下させ、薬剤の消化管吸収性を増加させることが報告されている⁷⁰⁻⁷²⁾。したがって、これらの結果は、PN 及び CMT の吸収促進効果は上皮細胞における密着結合の開口によるものであり、この作用により細胞間経路を介した薬物の透過性が増大することが示唆された。

本研究では、1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT 処置後のラットの小腸における claudin-1 及び claudin-4 の発現レベルをさらに検討した。Gonzalez-Mariscal らは、密着結合タンパク質が **tight junction** 間の相互作用に重要な役割を果たしていると報告している⁷³⁾。また、**tight junction** 構成タンパク質の発現レベルにおける変化は、**tight junction** のバリア機能に相関することが報告されている^{74,75)}。Claudin-1 と claudin-4 は **tight junction** を構成する重要な要素である。Fig. 16 に示すように、1% (w/v) PN は、control 群と比較した場合、claudin-4 の発現レベルを 44% に減少させた。これらの結果は、**tight junction** の主要タンパク質である claudin-4 の発現レベルを低下させることにより、PN が **tight junction** を開口する可能性があることを示している。したがって、PN が密着結合を開口し、細胞間経路を介して薬物の吸収を促進している可能性が示唆された。しかしながら、PN は claudin-1 の発現レベルを変化させなかった。Del Vecchio らは sodium caprate が一時的に傍細胞間隙を開き、内皮細胞および上皮細胞の周縁接合部領域で細胞間の claudin-5 /claudin-5 相互作用及び重合した actin を減少させる一方で、zonula occludens protein 1 (ZO1) は sodium caprate 処理によって影響を受けないことを報告している⁷⁶⁾。したがって、PN は sodium caprate と同様に **tight junction** 関連タンパク質を個別に調節する可能性があると考えられる。現在、PN が claudin-4 の発現にのみ影響を与える原因は不明であり、これら吸収促進剤を小腸に適用した場合の claudin-1 及び claudin-4 の発現レベルの差異を明らかにするために、さらなる研究が必要であると考えられる。さらに、1% (w/v) PN 投与により claudin-4 の発現量が減少した一方で、1% (w/v) PN 前処理群では claudin-4 発現量

が Control 群と同等レベルとなっており、完全な回復が認められた。このことより、tight junction 構成タンパク質に 1% (w/v) PN が及ぼす影響は可逆的であることが示唆された。したがって、この検討では、第 1 章で述べた *in vivo loop* 実験の結果を支持する結果が得られた。さらに Fig. 17 に示すように、1% (w/v) CMT は claudin-1 及び claudin-4 いずれの発現量にも変化を与えなかった。したがって、CMT は、おそらく claudin-1、claudin-4 以外の tight junction 構成タンパク質に働きかけて tight junction を開口しているものと考えられる。

以上より、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構には、細胞内経路及び細胞間経路の両経路が寄与していることが明らかとなったが、いずれの寄与の方が大きいかといった検討は本研究では行っていない。しかしながら、ALN は分配係数が 1×10^4 以下と非常に水溶性が高い物質であり、細胞間経路を介して透過する物質であると考えられることから、細胞間経路の寄与の方が細胞内経路と比較して大きいのではないかと推測される。しかし明確なことは未だ不明であり、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

総括

本研究では典型的な BPs の一種で臨床において使用されている ALN をモデル薬物に選択し、安全性を高めた投与形態の構築を目的として、新規吸収促進剤である *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩を用いて ALN の消化管吸収改善を試み、さらに *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構について検討し、以下の結果を得た。

第 1 章では、いずれの吸収促進剤も ALN の消化管吸収性を顕著に増大させ、中でも 1% (w/v) PN は ALN の吸収を 14 倍に、1% (w/v) CMT は 7.7 倍に増大させることが認められた。さらに、1% (w/v) MN を除く吸収促進剤併用時の LDH 活性値及びタンパク質放出量は control 群に比べ有意な差は認められなかったのに対し、3% (v/v) TritonX-100 投与群を positive control として用いた場合に有意な差が認められた。したがって、これら吸収促進剤は比較的安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

さらに、*N*-アシルアミノ酸及び *N*-アシルタウリン塩の中でも、1% (w/v) PN、1% (w/v) CMT が、粘膜障害性に比較して高い吸収促進効果を有することが明らかとなった。したがって、1% PN、1% CMT は ALN の消化管吸収性を改善する有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

また、1% (w/v) PN 及び 1% (w/v) CMT による ALN の吸収促進効果は可逆的であることが示唆された。吸収促進剤の可逆性は安全性を評価する重要な要因の一つとなることから、PN 及び CMT は安全性に優れた吸収促進剤であると考えられる。以上のことから、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩は ALN の消化管吸収を改善できる有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

第 2 章では、高い吸収促進効果及び安全性が認められた PN 及び CMT を選択し、まず細胞内経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を評価するため、膜流動性の変化について検討を行った。その結果、PN 及び CMT 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が示唆された。このことから、PN 及び CMT の吸収促進機構には一部細胞内経路を介する薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。中でも、PN は、DPH 及び tma-DPH の蛍光異方性比を顕著に減少させたことから、脂質二重膜内部および外部の流動性を増大させることが示唆された。一方、CMT は DPH および DNS-CL の蛍光異方性比を顕著に減少させたことから、脂質二重膜内部及び膜タンパク質の流動性を増大させることが示唆された。

さらに細胞間経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を検討するため、CF をモデル薬物に選択し、Caco-2 細胞単層膜を用いた薬物透過実験ならびに膜抵抗値測定実験を行った。その結果、PN 及び CMT 併用により、膜抵抗値は吸収促進剤の濃度依存的に有意に低下することが認められ、さらに CF の見かけの透過係数は吸収促進剤の濃度依存的に顕著に増大することが明らかとなった。以上の結果より、PN 及び CMT の吸収促進機構には、一部 tight junction の開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。

そこで tight junction 構成タンパク質である claudin-1 及び claudin-4 の発現量に及ぼす PN 及

び CMT の影響について Western blot 法を用いて検討した結果、PN を投与した際の claudin-4 発現量は顕著に減少したが、PN 前処理群では claudin-4 発現量の回復が見られた。したがって、この現象は可逆的であることが示唆された。一方、CMT は claudin-1 及び claudin-4 いずれの発現量にも影響を与えなかったことから、claudin-1 及び claudin-4 以外の tight junction 構成タンパクに影響している可能性が示唆された。

以上、本研究で得られた知見は、BPs の消化管吸収を改善し、粘膜傷害性を軽減した投与形態を開発していく上で有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

謝辞

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

本研究を遂行するにあたり、種々の貴重な御指導、御助言を賜りました、神戸薬科大学製剤学研究室 坂根 稔康 教授、ならびに京都薬科大学薬剤学分野 勝見 英正 准教授、草森 浩輔 助教に心より御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田 徹 男 教授ならびに臨床薬学分野 西口 工司 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

実験の一部に御協力いただきました上原 左知代 学士、日夏 優太 学士、高屋 麻由 学士、西躰 文香 氏、金田 彩花 氏に深く御礼申し上げます。

4年間の研究生生活を共にし、始終温かい御支援を頂きました 趙 婉廷 博士、Tammam Alama 博士をはじめとする大学院生の皆様に深く感謝致します。

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

引用文献

- 1) Raisz L. G. : Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.*, **115**, 3318-3325 (2005).
- 2) Kim M. H., Lee H. J. : Osteoporosis, vitamin C intake, and physical activity in Korean adults aged 50 years and over. *J. Phys. Ther. Sci.*, **28**, 725-730 (2016).
- 3) Robling A. G., Castillo A. B., Turner C. H. : Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 455-498 (2006).
- 4) Report of a WHO study group : Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **843**, 1-129 (1994).
- 5) Yoshimura N., Muraki S., Oka H., Kawaguchi H., Nakamura K., Akune T. : Cohort profile: research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *Int. J. Epidemiol.*, **39**, 988-995 (2010).
- 6) Yoshimura N., Muraki S., Oka H., Mabuchi A., En-Yo Y., Yoshida M., Saika A., Yoshida H., Suzuki T., Yamamoto S., Ishibashi H., Kawaguchi H., Nakamura K., Akune T. : Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J. Bone Miner. Metab.*, **27**, 620-628 (2009).
- 7) Hagino H., Yamamoto K., Teshima R., Kishimoto H., Kuranobu K., Nakamura T. : The incidence of fractures of the proximal femur and the distal radius in Tottori prefecture, Japan. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, **109**, 43-44 (1990).
- 8) 厚生省. 厚生白書 (平成 12 年度版) 第 2 章 高齢者と健康 (2000).
- 9) Harada A., Matsui Y., Takemura M., Ito Z., Wakao N., Ota T. : Cost-utility analysis of osteoporosis. *Nihon Ronen Igakkai Zashi*, **42**, 596-608 (2005).
- 10) Cauley J.A., Thompson D.E., Ensrud K.C., Scott J.C., Black D. : Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporosis Int.*, **11**, 556-561 (2000).
- 11) 健康日本 21 (総論) , 厚生労働省 (2000).

- 12) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版 (2015).
- 13) Stepan J. J., Alenfeld F., Boivin G., Feyen J. H., Lakatos P. : Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr. Regul.*, **37**, 225-238 (2003).
- 14) Faustino R. Pérez-López : Postmenopausal osteoporosis and alendronate. *Maturitas.*, **48**, 179-192 (2004).
- 15) Black D. M., Thompson D. E., Bauer D. C., Ensrud K., Musliner T., Hochberg M. C., Nevitt M. C., Suryawanshi S., Cummings S. R. Fracture Intervention Trial. : Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the fracture intervention trial. Fit research group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 4118-4124 (2000).
- 16) Harris S. T., Watts N. B., Genant H. K., McKeever C. D., Hangartner T., Keller M., Chesnut C. H. 3rd, Brown J., Eriksen E. F., Hoseney M. S., Axelrod D. W., Miller P. D. : Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *J. Amer. Med. Associat.*, **282**, 1344-1352 (1999).
- 17) van Beek E. R., Cohen L. H., Leroy I. M., Ebetino F. H., Löwik C. W., Papapoulos S. E. : Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone*, **33**, 805-811 (2003).
- 18) フォサマック錠 35mg インタビューフォーム (2016).
- 19) Blanchette P. S., Pritchard K. I. : The role of bisphosphonates in early- and advanced-stage breast cancer: have we finally optimized care? *Oncology*, **29**, 23-30 (2015).
- 20) Aviva E., Gershon G. : Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **31**, 175-195 (2000).
- 21) Porras A. G., Holland S. D., Gertz B. J. : Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet.*, **36**, 315-328 (1999).
- 22) Itoh A., Akagi Y., Shimomura H., Aoyama T. : Interaction between bisphosphonates and mineral water: Study of oral risedronate absorption in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 323-328 (2016).

- 23) Gertz B. J., Holland S. D., Kline W. F., Matuszewski B. K., Freeman A., Quan H., Lasseter K. C., Mucklow J. C., Porras A. G.: Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 288-298 (1995).
- 24) Graham D. Y., Malaty H. M. : Alendronate gastric ulcers. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **13**, 515–519 (1999).
- 25) Graham D. Y. : What the gastroenterologist should know about the gastrointestinal safety profiles of bisphosphonates. *Dig. Dis. Sci.*, **47**, 1665–1678 (2002).
- 26) Naniwa T., Maeda T., Mizoshita T., Hayami Y., Watanabe M., Banno S., Ito R. : Alendronate-induced esophagitis: possible pathogenic role of hypersensitivity to alendronate. *Intern. Med.*, **47**, 2083–2085 (2008).
- 27) フォサマック添付文書 (2016).
- 28) Kusamori K., Katsumi H., Abe M., Ueda A., Sakai R., Hayashi R., Hirai Y., Quan Y. S., Kamiyama F., Sakane T., Yamamoto A. : Development of a novel transdermal patch of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, **25**, 2582-2591 (2010).
- 29) Katsumi H., Liu S., Tanaka Y., Hitomi K., Hayashi R., Hirai Y., Kusamori K., Quan Y. S., Kamiyama F., Sakane T., Yamamoto A. : Development of a novel self-dissolving microneedle array of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate: evaluation of transdermal absorption, safety, and pharmacological effects after application in rats. *J. Pharm. Sci.*, **101**, 3230-3238 (2012).
- 30) Katsumi H., Nakatani M., Sano J., Abe M., Kusamori K., Kurihara M., Shiota R., Takashima M., Fujita T., Sakane T., Hibi T., Yamamoto A. : Absorption and safety of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, after intrapulmonary administration in rats. *Int. J. Pharm.*, **400**, 124-130 (2010).
- 31) Katsumi H., Takashima M., Sano J., Nishiyama K., Kitamura N., Sakane T., Hibi T., Yamamoto A. : Development of polyethylene glycol-conjugated alendronate, a novel nitrogen-containing bisphosphonate derivative: evaluation of absorption, safety, and effects after intrapulmonary administration in rats. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3783-3792 (2011).
- 32) Sutton S. C., Engle K., Fix J. A.: Intranasal delivery of the bisphosphonate alendronate in the rat and dog. *Pharm. Res.*, **10**, 924–926 (1993).

- 33) Aihara E., Hayashi S., Amagase K., Takeuchi K. : Prophylactic effect of rebamipide against the irritative and healing impairment actions of alendronate in rat stomachs. *Inflammopharmacology.*, **15**, 196-202 (2007).
- 34) Takeuchi K., Kato S., Amagase K. : Gastric ulcerogenic and healing impairment actions of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate - prophylactic effects of rebamipide. *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1602-1011 (2011).
- 35) Amagase K., Inaba A., Senta T., Ishikawa Y., Nukui K., Murakami T., Takeuchi K : Gastric ulcerogenic and healing impairment effects of risedronate, a nitrogen-containing bisphosphonate in rats. Comparison with alendronate and minodronate. *J. Physiol. Pharmacol.*, **62**, 609-18 (2011).
- 36) Janner M., Mühlbauer R. C., Fleisch H.: Sodium EDTA enhances intestinal absorption of two bisphosphonates. *Calcif. Tissue. Int.*, **49**, 280-283 (1991).
- 37) Ezra A., Hoffman A., Breuer E., Alferiev I. S., Mönkkönen J., E. I. Hanany-Rozen N., Weiss G., Stepensky D., Gati I., Cohen H., Törmälehto S., Amidon G. L., Golomb G.: A peptide prodrug approach for improving bisphosphonate oral absorption. *J. Med. Chem.*, **43**, 3641-3652 (2000).
- 38) Meng J., Hu L.: Positively-charged microemulsion for improving the oral bioavailability of alendronate: *in-vitro* and *in-vivo* assessment. *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**, 400-408 (2011).
- 39) Han H. K., Shin H. J., Ha D. H.: Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **46**, 500-507 (2012).
- 40) Fleisch H.: Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr. Rev.*, **19**, 80-100 (1998).
- 41) Pazianas M., Cooper C., Ebetino F. H., Russell R. G.: Long-term treatment with bisphosphonates and their safety in postmenopausal osteoporosis. *Ther. Clin. Risk Manag.*, **6**, 325-343(2010).
- 42) Li L. S., Babendure J. L., Shinha S. C., Olefsky J. M., Lerner R. A.: Synthesis and evaluation of photolabile insulin prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3917-3920 (2005).
- 43) Yodoya E., Uemura K., Tenma T., Fujita T., Murakami M., Yamamoto A., Muranishi S.: Enhanced permeability of tetragastrin across the rat intestinal membrane and its reduced degradation by acylation with various fatty acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1509-1513 (1994).

- 44) Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A., Muranishi S.: Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J. Pharm., Sci.*, **86**, 1016-1021 (1997).
- 45) Sarmento B., Ribeiro A., Veiga F., Ferreira D., Neufeld R. : Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*, **8**, 3054-3060 (2007).
- 46) Fetih G., Habib F., Okada N., Fujita T., Attia M., Yamamoto A.: Nitric oxide donors can enhance the intestinal transport and absorption of insulin and [Asu(1,7)]-eel calcitonin in rats. *J. Control. Release*, **106**, 287-297 (2005).
- 47) Gao Y., He L., Katsumi H., Sakane T., Fujita T., Yamamoto A.: Improvement of intestinal absorption of insulin and water-soluble macromolecular compounds by chitosan oligomers in rats. *Int. J. Pharm.*, **359**, 70-78 (2008).
- 48) Alama T., Katayama H., Hirai S., Ono S., Kajiyama A., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A.: Enhanced oral delivery of alendronate by sucrose fatty acids esters in rats and their absorption-enhancing mechanisms. *Int. J. Pharm.*, **515**, 476-489 (2016).
- 49) Zhang H., Mi J., Huo Y., Huang X., Xing J., Yamamoto A., Gao Y.: Absorption enhancing effects of chitosan oligomers on the intestinal absorption of low molecular weight heparin in rats. *Int. J. Pharm.*, **466**, 156–162 (2014).
- 50) Siegel I. A., Gordon H. P.: Effects of surfactants on the permeability of canine oral mucosa *in vitro*. *Toxicol. Lett.*, **26**, 153-158 (1985).
- 51) Cassidy M. M., Tidball C. S.: Cellular mechanism of intestinal permeability alterations produced by chelation depletion. *J. Cell Biol.*, **32**, 685-698 (1967).
- 52) Gordon G. S., Moses A. C., Silver R. D., Flier J. S., Carey M. C.: Nasal absorption of insulin : enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 7419-7423 (1985).
- 53) Ishizawa T., Hayashi M., Awazu S. : Enhancement of jejunal and colonic absorption of fosfomycin by promoters in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 892-895 (1987).
- 54) Krug S. M., Amasheh M., Dittmann I., Christoffel I., Fromm M., Amasheh S.: Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials*, **34**, 275-282 (2013).

- 55) Myazawa K., Tamura U., Tomita K.: The development of *N*-acyl-*N*-methyltaurate (AMT) as a low irritating detergent for scalp and hair. *Shiseido Products Research Laboratories*, **39**, 925-930 (1990).
- 56) 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.*, **48**, 1285-1289 (1996).
- 57) Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyuu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M., Muranishi S.: Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.*, **11**, 1496-1500 (1994).
- 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) Wong J. A., Renton K. W., Crocker J. F., O'Regan P. A., Acott P. D.: Determination of pamidronate in human whole blood and urine by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 98-101 (2004).
- 60) Lin Y., Fujimori T., Kawaguchi N., Tsujimoto Y., Nishimi M., Dong Z., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. : Polyamidoamine dendrimers as novel potential absorption enhancers for improving the small intestinal absorption of poorly absorbable drugs in rats. *J. Control. Release*, **149**, 21-28 (2011).
- 61) Alama T., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. : Absorption-enhancing effects of gemini surfactant on the intestinal absorption of poorly absorbed hydrophilic drugs including peptide and protein drugs in rats. *Int. J. Pharm.*, **499**, 58-66 (2016).
- 62) Itoh M., Furuse M., Morita K., Kubota K., Saitou M., Tsukita S.: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.*, **147**, 1351-1363 (1999).
- 63) Vázquez C. M., Zanetti R., Ruiz-Gutierrez V. : Lipid composition and fluidity in the jejunal brush-border membrane of spontaneously hypertensive rats. Effects on activities of membrane-bound proteins. *Biosci. Rep.*, **16**, 217-226 (1996).

- 64) 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).
- 65) Lee K. J., Hwang S. J., Kim J. S., Kim D. D., Shin Y. H., Lee C. H. : Effects of HPE-101, a skin penetration enhancer, on human erythrocyte membranes. *Int. J. Pharm.*, **285**, 43-49 (2004).
- 66) Satoh H., Amagase K., Ebara S., Akiba Y., Takeuchi K. : Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 both play an important role in the protection of the duodenal mucosa in cats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **344**, 189-195 (2013).
- 67) 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).
- 68) Kajii H., Horie T., Hayashi M., Awazu S. : Fluorescence study of the membrane-perturbing action of sodium caprylate as related to promotion of drug absorption. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 390-392 (1988).
- 69) Koga K., Kusawake Y., Ito Y., Sugioka N., Shibata N., Takada K. : Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulfate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **64**, 82-91 (2006).
- 70) Uchiyama T., Sugiyama T., Quan Y. S., Kotani A., Okada N., Fujita T., Muranishi S., Yamamoto A. : Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl-beta-D-maltopyranoside. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1241-1250 (1999).
- 71) Yamamoto A., Tatsumi H., Maruyama M., Uchiyama T., Okada N., Fujita T. : Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors: implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs. *J. Pharmacol. Exp., Ther.*, **296**, 84-90 (2001).
- 72) Gao Y., He L., Katsumi H., Sakane T., Fujita T., Yamamoto A. : Improvement of intestinal absorption of insulin and water-soluble macromolecular compounds by chitosan oligomers in rats. *Int. J. Pharm.*, **359**, 70-78 (2008).
- 73) González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., Jaramillo B. E. : Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **81**, 1-44 (2003).

- 74) Ma T. Y., Nguyen D., Bui V., Nguyen H., Hoa N. : Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol.*, **276**, G965-974 (1999).
- 75) Madara J. L. : Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 143-159 (1998).
- 76) Del Vecchio G., Tscheik C., Tenz K., Helms H. C., Winkler L., Blasig R., Blasig I. E. : Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Mol. Pharm.*, **9**, 2523–2533 (2012).