

アミノ酸とラウリン酸を利用した安全性の高い吸収改善製剤の開発：  
アミノ酸による **Cytoprotection** とその機構

檜垣和孝

**Safe Improvement of Drug Absorption by Combinatorial Use of Sodium Laurate with  
Amino Acids: Cytoprotection by Amino Acids and Its Mechanisms**

Kazutaka HIGAKI

*Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University,  
1-1-1 Tsushima-naka, Okayama City 700-8530, Japan*

(Received August 24, 2006)

The development of combinatorial chemistry and high-throughput screening techniques has made it possible to generate many new drug candidates very rapidly, but it has also resulted in a number of poorly soluble and/or poorly absorbable candidates. A new trend in drug development based on pharmacogenomics or the development of molecular-targeted drugs is also spurring the tendency, and it does not necessarily lead to good output in terms of the development of new drugs. It is attractive to improve membrane permeability as well as solubility by using adjuvants, because this method could be applicable for various drugs. However, the practical use of absorption-enhancing adjuvants has been limited because of the potential local toxicity. Therefore suppressing the potential local toxicity would lead to the successful development of safe preparations with improved absorption using adjuvants. Our biochemical and histopathologic studies showed that several amino acids such as taurine and L-glutamine had cytoprotective activity, and it has been found that the combinatorial use of sodium laurate (C12) with these amino acids could maintain the absorption-enhancing ability of C12. A suppository preparation containing C12 and taurine remarkably improved the rectal absorption of rebamipide, classified as BCS class IV, and the preparation was safe to the rectal mucosa. For the mechanisms of cytoprotective action by these amino acids, it has been found that they suppress the intracellular calcium level, induce the expression of heat-shock protein 70, and inhibit the release of histamine and apoptosis.

**Key words**—absorption improvement; amino acids; sodium laurate; taurine; safety; calcium

## 1. はじめに

近年, combinatorial chemistry, high-throughput screening 等の技術導入により, 短期間に多くの開発候補化合物が見出されているが, 同時に, 多くの難水溶性, 難吸収性化合物を生み出す結果となっている。また, ゲノム創薬, 分子標的型創薬といった新薬開発の新しい流れは, この傾向に拍車を掛けることとなり, かならずしも新薬開発に好結果をもたらすに至っていないのが現状である。なかでも膜透過性の低い化合物は, たとえ何らかの方法により溶解性が改善されたとしても, 経口投与後に十分な生

物学的利用率を得ることは困難である。プロドラッグ化により膜透過性の改善を図ることは可能であるが, 薬理活性そのものが変動する可能性があるほか, 個々の化合物に対する対応が必要となるため汎用性に欠ける。吸収改善を可能とする添加剤などを利用した処方工夫により膜透過性を改善することができれば, 様々な化合物への適用が可能となり, その有用性は非常に高い。しかしながら, 添加剤利用による膜透過性改善法には粘膜障害の可能性が指摘されており,<sup>1)</sup> 実用化に至ったのはカプリン酸 (sodium caprate, C10) 利用の坐剤のみである。<sup>2)</sup> したがって, この局所障害性を抑えることが, 添加剤利用による吸収改善製剤の成否を握ることになる。われわれは, 数種のアミノ酸が粘膜保護効果を示すこと, そのアミノ酸を併用することにより, ラウリン酸 (sodium laurate, C12) の持つ吸収改善効果を

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1)

e-mail: higaki@pharm.okayama-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 126 年会シンポジウム S36 で発表したものを中心に記述したものである。

十分に維持できることを見出した。本稿では、このアミノ酸を利用した安全性の高い吸収改善製剤の開発研究について、アミノ酸による粘膜保護作用の機構を中心に、これまでに得られた知見を紹介する。

C10 や中鎖脂肪酸グリセリドなどの中鎖脂肪酸関連の油脂は以前より吸収改善能を示すことが知られており、その吸収改善機構の解明も精力的に行われてきた。<sup>2-4)</sup> また、これらの油脂は、肝・膵機能の障害などによる胆汁やリパーゼの分泌低下による高級脂肪酸の消化吸収不全患者に対する脂肪性栄養剤として経口利用されており、<sup>5-7)</sup> 安全性の面からも有望な添加剤であると考えられる。筆者らは、C10 などの中鎖脂肪酸を含むいくつかの添加剤について吸収改善効果を評価したところ、C12 が広範な分子量の化合物の吸収改善に有用であるとの結果を得た。<sup>8)</sup> C12 は、やし油の主成分でもあり、効果、安全性の両面から有望な添加剤であると考えられた。そこで、吸収改善を目的とした添加剤として C12 を選択し、安全性の高い吸収改善製剤の検討を進めた。

## 2. C12 による吸収改善効果と粘膜障害性の評価<sup>9)</sup>

まず、C12 単独使用による吸収改善と安全性について、ラット結腸において検討を行った。吸収改善効果は、難吸収性色素 phenol red (PR) の吸収を指標として評価し、粘膜障害性は、生化学的手法として、リン脂質、蛋白質、乳酸脱水素酵素 (LDH) の粘膜からの漏出を指標として評価した。C12 の影響を 2, 5, 10  $\mu\text{mol}$  の投与量で検討したところ、2  $\mu\text{mol}$  C12 は、生化学的マーカーの漏出を有意に増大させることなく PR の吸収を約 2 倍に増大させることが明らかとなった。一方、5  $\mu\text{mol}$  C12 は、3 倍の吸収改善を示したが、リン脂質の漏出が有意に増大し、10  $\mu\text{mol}$  C12 は PR の吸収を 4 倍に改善できるものの、3 つの生化学的マーカーすべての漏出を有意に増大させることが明らかとなった。これらの結果は、わずかな吸収改善でよければ低濃度の C12 を単独使用することで、安全な吸収改善製剤が調製できる可能性を示しているが、高い吸収改善を望む場合に 5  $\mu\text{mol}$  以上の投与量で C12 を使用すると、粘膜障害が懸念されることを示している。そこで筆者らは、ある種のアミノ酸に種々の外的ストレスから粘膜を保護する作用があるとの報告<sup>10,11)</sup> に着

目し、アミノ酸を C12 と併用することによる吸収改善、及び粘膜への安全性について検討することとした。

## 3. アミノ酸の影響：C12 の吸収改善効果、粘膜障害性への影響<sup>9,12,13)</sup>

アミノ酸としては、粘膜保護作用の可能性が示されている L-glutamine (L-Gln), L-arginine (L-Arg), L-methionine (L-Met), taurine (Tau) 等を選択した。まず、これらアミノ酸自身 (10  $\mu\text{mol}$ ) の作用について評価したところ、いずれのアミノ酸も粘膜に対する影響はほとんどないことが示された。PR の吸収に対しては、L-Gln, L-Met について、2  $\mu\text{mol}$  C12 と同程度の吸収改善作用があることが明らかとなった。Tau については未検討であるが、自身に吸収改善効果があることが報告されている。<sup>14)</sup>

これらの結果を踏まえて、粘膜障害を示すものの最大の吸収改善効果を示した 10  $\mu\text{mol}$  C12 と、アミノ酸 (10  $\mu\text{mol}$ ) との併用効果について検討を行った。ラット結腸を用いた *in situ* ループ法による吸収実験を行い、PR の残存率から吸収改善効果を評価し、リン脂質、蛋白質、LDH の漏出から粘膜障害性を評価した。その結果、併用したアミノ酸は、C12 の吸収改善効果に影響を及ぼすことなく、結腸粘膜からの生化学的マーカーの漏出を有意に低下させることが明らかとなった (Fig. 1)。

次に、単離結腸粘膜を用いた *in vitro* 透過実験により、C12 と L-Gln の併用効果を検討した。その結果、漿膜側への PR の透過は、C12 により約 4 倍改善され、L-Gln の併用は C12 による透過性改善効果に影響を及ぼさなかった。また、L-Gln を単独で作用させた場合、約 2 倍の透過改善を示すことが確認された。これらの結果は、先の *in situ* ループ法での検討結果に一致するものであり、C12 及び C12 と L-Gln の併用による吸収改善が膜透過亢進によるものであることが裏付けられた。この実験系では、



榎垣和孝

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科助教。1959年広島県生まれ。京都大学薬学部卒業。京都大学大学院薬学研究科博士前期、博士後期課程修了。1988年塩野義製薬研究員。1996年岡山大学薬学部助教授。1998～2000年米国ミシガン大学薬学部博士研究員。2005年より現職。薬物の消化管吸収の改善、吸収機構の解明、吸収挙動の解析と予測を中心に研究展開。

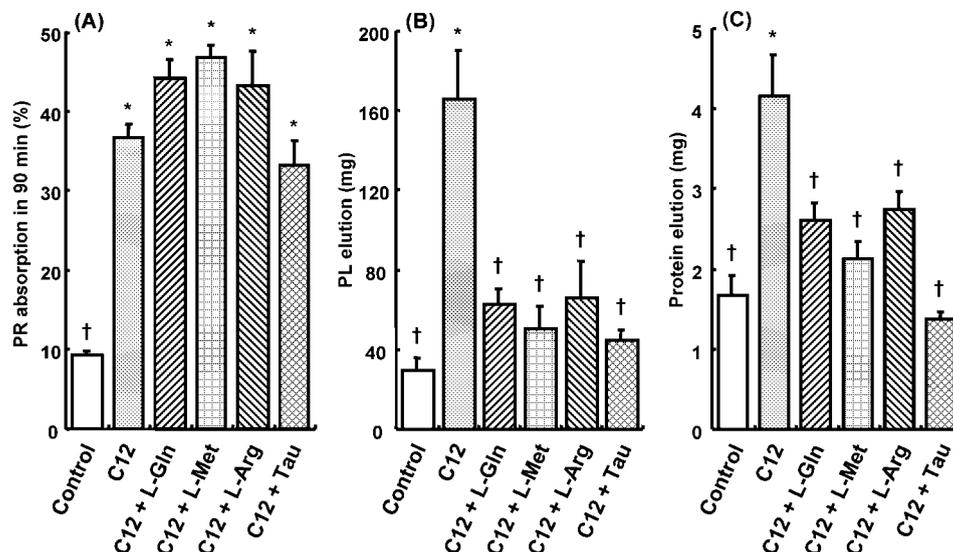


Fig. 1. Effect of Amino Acids on Absorption Enhancement and Local Toxicities Caused by Sodium Laurate in Rat Large Intestine

(A): Absorption of phenol red (PR), (B): Phospholipid (PL) elution, (C): Protein elution. Concentrations of C12, amino acids were 10 mM. Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of three or four experiments. \*,  $p < 0.05$  compared with control; †,  $p < 0.05$  compared with C12. [Reproduced from Ref. 12) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

同時に、細胞間隙経路を介した膜透過の指標である膜抵抗値を測定したが、C12添加により膜抵抗値は速やかな低下を示し、添加後30分にはコントロールの約20—30%となり定常状態を示すことが明らかとなった。この結果は、C12による吸収改善の機構の1つとしてtight junctionの開口が挙げられることを示している。一方、C12とL-Glnの併用は、この膜抵抗値の低下を50—60%程度に抑制することが示された。膜抵抗値の過度の低下は、粘膜障害につながると考えられており、L-Glnは膜抵抗値の低下を抑制することにより粘膜障害を防ぐ働きがあるものと考えられた。一方、L-Glnを単独で作用させた場合は、膜抵抗値に有意な変化は認められなかった。これらの現象を膜透過性の観点から考えると、L-Glnを併用した場合には、細胞間隙経路を介した膜透過性はC12単独使用の場合よりも減少していると考えられる。しかしながら、先にも述べたように、PRの膜透過はC12を単独で作用させた場合と同程度であること、L-Glnは膜抵抗値を有意に変化させることなくPRの透過を有意に亢進させることから、細胞間隙経路を介した透過の改善が有意に寄与しているものと推察された。この一連の実験では、 $\text{Na}^+$ イオンを中心としたイオンの能動輸送により形成される膜電位も測定した。その結果、C12は膜電位を有意に低下させること、L-Glnの併用はC12

による膜電位の低下を有意に抑制することが示された。このことから、L-GlnはC12による障害から結腸粘膜を保護することが明らかとなった。このC12とL-Gln等のアミノ酸併用の効果は、ヒト大腸癌由来細胞Caco-2を用いた検討でも同様に認められている。

そこで次に、L-GlnとTauを選択し、その粘膜保護作用について病理組織学的検討を行った (Table 1)。その結果、L-Glnについては、前処理及び同時投与により、Tauについては同時投与により、投与後1.5及び6時間の時点において、粘膜保護作用が認められた。このように、生化学的検討、病理組織学的検討によりL-GlnやTauなどのアミノ酸の併用によりC12によりもたらされる粘膜障害を有意に軽減できることが明らかとなった。

#### 4. アミノ酸による粘膜保護効果の機構<sup>12,15)</sup>

前項においてアミノ酸が粘膜保護効果を示すことが明らかになったが、その効果をより積極的に、あるいは効率的に利用するためには、その保護機構を明らかにする必要がある。そこで、以下の4つの要因に着目し、そのアミノ酸による粘膜保護効果との関連性について検討を進めた。

**4-1 Heat Shock Protein 70 (HSP70) の関与<sup>12)</sup>**  
HSPは、熱刺激、酸化ストレス、炎症時やアルコールなどの化学物質による刺激により発現誘導が

Table 1. Histopathological Study on Cytoprotective Action by L-Gln and Tau in Rat Colon

Time after dosing	Findings	Control					C12					C12+L-Gln <sup>a)</sup>					C12+Tau				
		a	b	c	d	mean	a	b	c	d	mean	a	b	c	d	mean	a	b	c	d	mean
1.5 h	Shrinkage	0	0	0	0	0.00	2	2	2	1	1.75	1	0	1	1	0.75	1	1	1	2	1.25
	Exfoliation	0	0	0	0	0.00	2	2	2	2	2.00	0	0	0	1	0.25	0	1	2	1	1.00
	Coagulation necrosis	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00
6 h	Shrinkage	0	1	1	—	0.67	0	0	0	—	0.00	0	0	0	—	0.00	0	0	0	—	0.00
	Exfoliation	1	1	1	—	1.00	2	2	2	—	2.00	0	0	2	—	0.67	0	0	0	—	0.00
	Coagulation necrosis	0	0	0	—	0.00	0	0	0	—	0.00	0	0	0	—	0.00	0	0	0	—	0.00

[Score] 0: no change, 1: very slight, 2: slight, 3: moderate, 4: severe. Doses of rebamipide, C12 and Tau were 5 mg, 10 mmol and 125 mmol, respectively. Histopathological examination was performed by an experienced veterinary histopathologist. a) 75 mmol L-Gln was preloaded 1 h before dosing of rebamipide and was also coadministered with C12. [Reproduced from Ref. 13] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

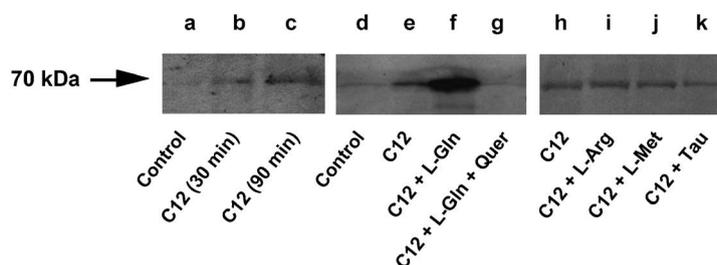


Fig. 2. Expression of Heat Shock Protein 70 Induced by Sodium Laurate and Amino Acids in Rat Large Intestine (Western Blot Analysis)

Concentrations of C12 and amino acids were 10 mM. Rabbit anti-Hsp70 polyclonal antibody and goat anti-rabbit IgG labeled with peroxidase were employed as a primary and a secondary antibody, respectively. [Reproduced from Ref. 12] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

起こり、細胞保護作用を示すことの知られている蛋白質である。<sup>16)</sup> 吸収改善作用を示す添加剤は、消化管に炎症を引き起こす可能性が指摘されているほか、<sup>17)</sup> L-Gln やある種のアミノ酸誘導体により HSP が誘導されるとの報告があることから、<sup>16)</sup> C12 とアミノ酸の併用時における粘膜保護効果と HSP との関連性について検討を進めることとした。HSP には多くの分子種が存在するが、ここでは、消化管における最も主要な分子種である HSP70<sup>16)</sup> について検討を行った。

*In situ* ループ法に従い、ラット結腸内に C12 (10  $\mu$ mol)、アミノ酸 (10  $\mu$ mol) を投与し、90 分後に採取した結腸粘膜を用いて、Western blot 法により HSP70 の発現量の変化を評価した (Fig. 2)。C12 のみを投与した場合において若干の時間依存的な発現誘導がみられたが、L-Arg, L-Met, Tau の併用では HSP70 のさらなる誘導は確認できなかった。それに対し、L-Gln を併用した場合には、著しい発現誘導が認められた。また、この L-Gln による発現誘導は、HSP の生合成阻害剤である quercetin

(Quer)<sup>18)</sup> を作用させることで、ほぼ完全に抑制された。そこで、この HSP70 の発現誘導とアミノ酸による粘膜保護効果との関連性を明らかにするため、結腸粘膜からのリン脂質と蛋白質の漏出を指標として、Quer の影響を検討した。その結果、C12 に L-Gln を併用した場合にのみ、Quer の添加により、その粘膜保護効果が顕著に減弱することが明らかとなった。このことから、L-Gln による粘膜保護作用には HSP70 の発現誘導が関与していることが明らかとなった。一方で、他のアミノ酸により示される粘膜保護効果には HSP70 は関与していないことが示された。

**4-2 Histamine 遊離の関与<sup>12)</sup>** 次に、C12 による粘膜障害及びアミノ酸による粘膜保護効果と炎症性メディエーターの遊離との関連性について検討した。ここでは、代表的なメディエーターである histamine の遊離に着目し、C12 及び各アミノ酸の影響について検討した。Histamine は、腸クロム親和性細胞や肥満細胞に貯蔵されているが、IgE 受容体を介した抗原抗体反応や、種々の物理的、化学的

刺激により、放出が促されることが知られている。<sup>19)</sup> ラット単離結腸粘膜を用いて、histamineの遊離に及ぼすC12の影響を検討したところ、接触時間及びC12の投与量に応じて、その遊離が有意に増大することが明らかとなった。このことは、C12によりもたらされる粘膜障害の一部に、histamine遊離を伴った炎症性の障害が含まれる可能性を示すものと考えられた。そこで、次にC12 (10  $\mu\text{mol}$ ) とアミノ酸 (10  $\mu\text{mol}$ ) の併用効果を検討したところ (Fig. 3), C12を単独で作用させた場合に比べ、いずれのアミノ酸も有意にhistamineの遊離を抑制することが明らかとなった。なかでも、TauとL-Glnの効果が顕著であることが示された。腸クロム親和性細胞や肥満細胞からのhistamine遊離は、これらの細胞の細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が直接的な引き金となっていると考えられており、C12は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を上昇させることにより histamine 遊離を亢進させ、アミノ酸は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇を抑制することにより histamine 遊離を抑制しているものと考えられた。

**4-3 細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の関与<sup>12,15)</sup>**  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇に伴う tight junction の開口は、C10やC12による吸収改善の機構の1つと考えられている。<sup>2-4)</sup> しかしながら、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の過度の上昇は、細胞の機能不全を引き起こし、場合によっては細胞死につながるということが知られている。<sup>20)</sup> そこで、本項では、C12及びアミノ酸の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  へ

の影響を検討し、C12による粘膜障害性、アミノ酸による粘膜保護効果と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  との関連性について解明を試みた。Figure 4は、Caco-2細胞を用いて、その  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  に及ぼすC12とアミノ酸併用の影響をみたものである。C12を添加すると、速やかに  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は上昇し、高い濃度で推移することが明らかとなった。一方、併用したアミノ酸は、時間曲線のパターンに違いはあるものの、いずれもC12による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇を有意に抑制することが示され、Fig. 4の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の曲線下面積 (AUC) を求めたところ、AUCはTau併用時に最も小さく、ついでL-Met, L-Arg, L-Glnの順であった。このように、今回検討したアミノ酸は、いずれも  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇を抑制する作用があることが明らかとなった。

そこで次に、このC12による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇と、アミノ酸によるその抑制作用の機構について解析を試みた。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は、以下の3つの大きな機構のバランスによって保たれている：(i) channelなどによる細胞外からの取り込み、小胞体などの細胞内storeからの放出などの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を増加させる機構、(ii)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, mitochondria への取り込みなどの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を減少させる機構、(iii) calmodulinなどの  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白による緩衝的な制御。<sup>20)</sup> 本項では、このうち主要な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加、減少機構について、C12とアミノ酸の作用との関連性を検討した。

Figure 5に、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加機構の関与について検

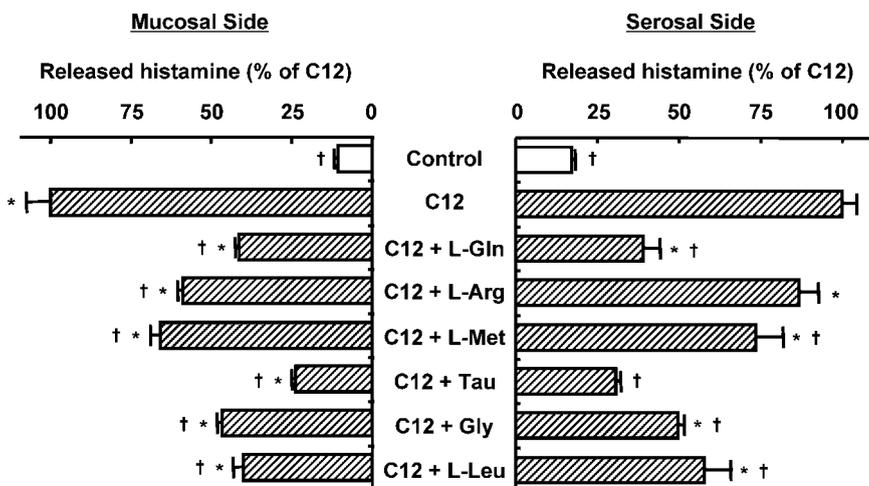


Fig. 3. Suppressive Effect of Amino Acids on Histamine Release Enhanced by Sodium Laurate in Rat Large Intestine

Concentrations of C12 and amino acids were 10 mM. Released histamine was estimated as the percentage to the amount of histamine released when treated with C12. Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value of four experiments. \*,  $p < 0.05$  compared with control; †,  $p < 0.05$  compared with C12. [Reprinted from Ref. 12) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

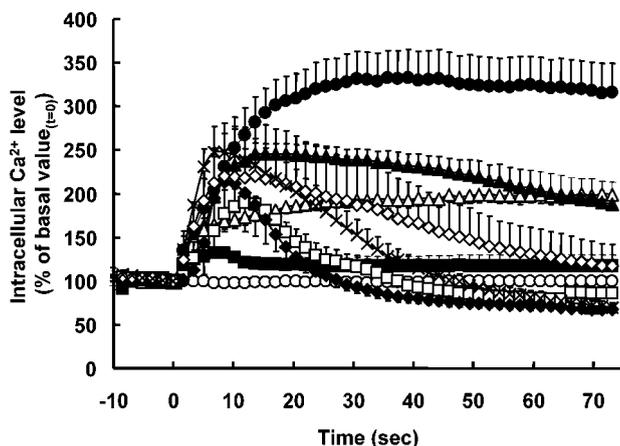


Fig. 4. Effect of Sodium Laurate and Amino Acids on Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Level in Caco-2 Cells

Concentrations of C12 and amino acids were 3 mM and 30 mM, respectively. Results are expressed as the mean with the bar showing S.E. value.  $\circ$ : control ( $n=8$ ),  $\bullet$ : C12 ( $n=4$ ),  $\triangle$ : C12+L-Gln ( $n=3$ ),  $\blacktriangle$ : C12+D-Gln ( $n=6$ ),  $\square$ : C12+L-Met ( $n=5$ ),  $\blacksquare$ : C12+L-Arg ( $n=4$ ),  $\diamond$ : C12+Gly ( $n=3$ ),  $\blacklozenge$ : C12+Tau ( $n=3$ ),  $\times$ : C12+L-Leu ( $n=4$ ). [Reprinted from Ref. 12) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

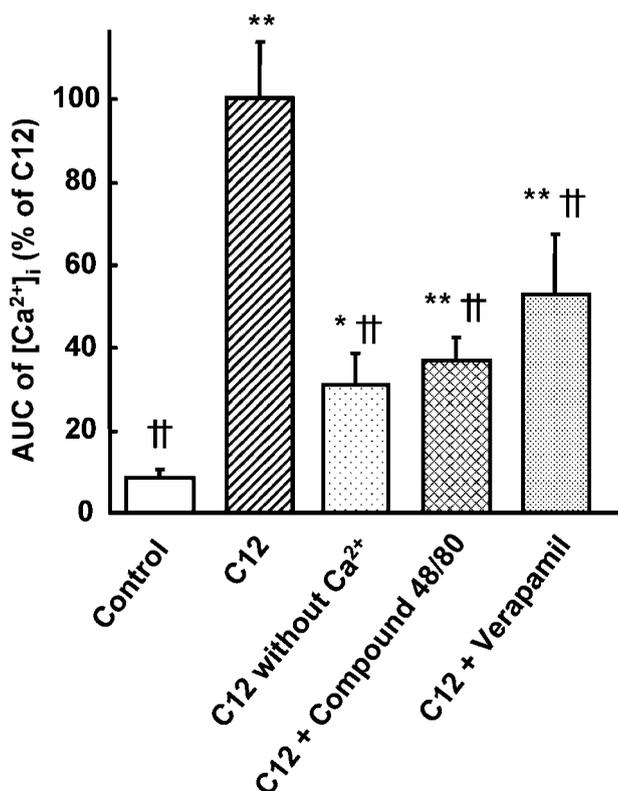


Fig. 5. Effects of Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , Compound 48/80, Verapamil and BAPTA-AM on Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) Increased by Sodium Laurate in Caco-2 Cells

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4-12$ ). Concentration of C12 was 3.4 mM. \*\*,  $p < 0.01$  compared with C12 alone; ††,  $p < 0.01$  compared with control. [Reproduced from Ref. 15) with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

討した結果をまとめた。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を取り除いておくと、C12 を単独で処理した後の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加が著しく低下することが明らかとなった。このことから、C12 による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みに大きく依存していると考えられた。そこで、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、verapamil により  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを阻害したところ、C12 による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加は有意に抑制され、C12 は  $\text{Ca}^{2+}$  channel を介した細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを亢進することにより  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を増大させていることが明らかとなった。一方、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下においても  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は有意な増加を示しており、いわゆる、細胞内 store からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の寄与も示唆された。そこで、phospholipase C (PLC) により刺激され  $\text{IP}_3$  経路を介して促される小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の寄与について、PLC 阻害剤である compound 48/80 の影響を検討した。その結果、C12 による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加は、compound 48/80 により有意に低下することが明らかとなった。このことから、C12 は、何らかの機構により PLC 活性を亢進し、 $\text{IP}_3$  経路を介した小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離も亢進させているものと考えられた。アミノ酸は、これらの機構を介した  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を抑制していると考えられるが、現時点では、その詳細は明らかになっていない。

次に、 $\text{Ca}^{2+}$  を細胞外にくみ出すことにより  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を低下させる形質膜  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA) の関与について、PMCA 阻害剤である orthovanadate ( $\text{VO}_3$ ) を用いて検討した (Fig. 6)。その結果、 $\text{VO}_3$  はアミノ酸による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  低下作用を有意に抑制することが明らかとなった。また、C12 を単独で作用させた場合には、 $\text{VO}_3$  は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  に有意な影響を示さなかった。これらの結果より、C12 は PMCA の活性をかなり低下させており、Tau を始めとするアミノ酸は、C12 により低下した PMCA 活性を回復させることにより  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  低下に寄与しているものと推察された。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  を低下させる機構として、mitochondria への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みについても検討した。Table 2 は、mitochondria 内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) を測定し、その AUC を算出後、C12 を単独で作用させた場合を 100% として算出した結果をまとめている。得られた結果から、C12 により  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  が有意に増大することが明らかとなった。この現象は、

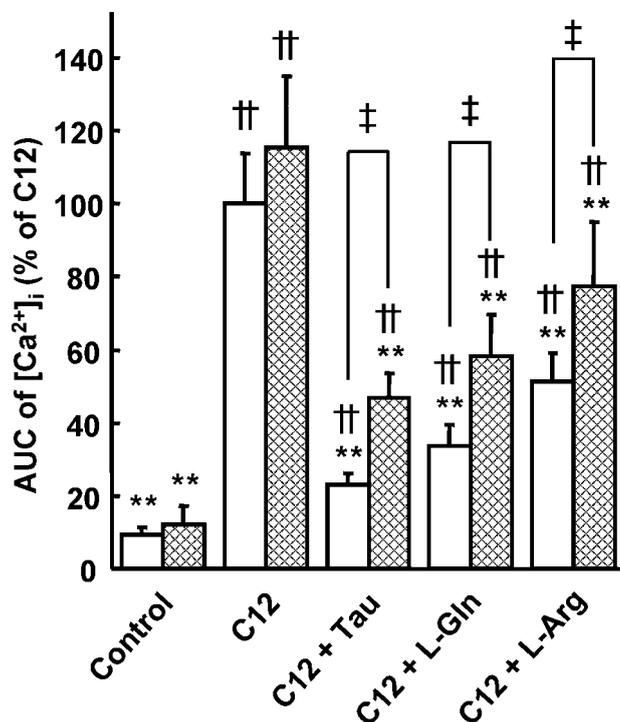


Fig. 6. Effect of Sodium Orthovanadate on AUC of  $[Ca^{2+}]_i$  in Caco-2 Cells

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=8-16$ ). Concentrations of C12 and each amino acid were 3.4 mM and 34 mM, respectively. \*\*,  $p < 0.01$  compared with C12 (with or without orthovanadate); ††,  $p < 0.01$  compared with control (with or without orthovanadate); ‡,  $p < 0.01$  compared between with and without orthovanadate. □: without orthovanadate, ▨: with orthovanadate. [Reproduced from Ref. 15] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

Table 2. Effect of C12 and Amino Acids on  $[Ca^{2+}]_m$  in Caco-2 Cells

Treatment	AUC of $[Ca^{2+}]_m$ (% of C12)	$p <$	
		vs C12	vs control
Control	44.0 $\pm$ 2.0	0.01	—
C12	100.0 $\pm$ 19.9	—	0.01
C12+L-Gln	116.0 $\pm$ 21.5	0.01	0.01
C12+Arg	62.6 $\pm$ 12.3	0.01	0.01
C12+Tau	174.3 $\pm$ 26.7	0.01	0.01

AUC of  $[Ca^{2+}]_m$  was expressed as the mean S.E. of 12–16 experiments. Concentrations of C12 and amino acid were 3.4 and 34 mM, respectively. [Reproduced from Ref. 15] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

mitochondria が増大した  $[Ca^{2+}]_i$  に反応し,  $Ca^{2+}$  を取り込んだものと推察されたが, 通常,  $[Ca^{2+}]_m$  の増大は mitochondria の機能障害につながるとされており, apoptosis の引き金ともなっていると考えられている.<sup>21)</sup> Figures 4 及び 5 で示しているように, C12 は有意に  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させており, C12

による  $[Ca^{2+}]_m$  増大は  $[Ca^{2+}]_i$  の低下にはつながっておらず, むしろ mitochondria の機能障害を促しているものと考えられた. 一方, 検討した 3 つのアミノ酸は三者三様の結果を示した. すなわち, Tau は C12 単独添加時よりも, さらに  $[Ca^{2+}]_m$  を有意に増大させており,  $[Ca^{2+}]_m$  の増大が  $[Ca^{2+}]_i$  の減少に寄与していると考えられた. L-Gln は, C12 単独添加時と同程度の  $[Ca^{2+}]_m$  を示したが, L-Arg は有意に低下させた. 詳細については, 今後の検討が必要だが, L-Arg は他の機構により  $[Ca^{2+}]_i$  を下げることにより  $[Ca^{2+}]_m$  の上昇を抑制したものと考えられる. また, L-Gln は mitochondria への取り込みによる  $[Ca^{2+}]_i$  低下には貢献していないものの,  $[Ca^{2+}]_m$  が C12 単独添加時と同程度であることから, mitochondria の機能障害に至らない  $Ca^{2+}$  取り込み容量を増大させることにより, mitochondria を機能障害から保護する働きを示したものと推察できる. Tau は, L-Gln よりもさらに mitochondria の  $Ca^{2+}$  容量を増大させる働きがあるものと考えられる.

このように C12 により  $[Ca^{2+}]_i$  が増大し, Tau や L-Gln などのアミノ酸の併用は, その増加を有意に抑制できることを, その機構とともに示してきた. 実際に, この  $[Ca^{2+}]_i$  の変動と, 細胞の障害性の指標である蛋白質の漏出量との関係を統計的に解析したところ, 両者には有意な相関があることが示された (Fig. 7). このことは, C12 による細胞障害性, 及びアミノ酸による粘膜保護効果において, 細胞内  $Ca^{2+}$  dynamics が最も重要な要因の 1 つであることを示している.

**4-4 Apoptosis の関与** 前項で示したように, C12 は様々な機構により  $[Ca^{2+}]_i$  を増大させ, さらには  $[Ca^{2+}]_m$  をも有意に増大させることが明らかとなった. 先にも述べたように,  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_m$  の増大は, apoptosis を誘導する可能性が知られている.<sup>21)</sup> また, L-Gln による粘膜保護効果に重要な役割を果たしていることが明らかとなった HSP は apoptosis を抑制するとの報告もある.<sup>22)</sup> そこで, C12 による粘膜障害, 及びアミノ酸による粘膜障害防御機構への apoptosis の関与について検討を加えた. その結果, apoptosis の特徴の 1 つである DNA の断片化が C12 により促され, L-Gln, Tau 等のアミノ酸を併用することで, それが抑制されることが

明らかとなった。また, caspase 9, caspase 3 の活性を評価したところ, C12 は両酵素の活性を有意に亢進させること, また, Tau, L-Gln は, それを有意に抑制することが明らかとなり, C12 による粘膜障害, アミノ酸による粘膜保護効果に apoptosis が関与していることが明らかとなった。

C12 による apoptosis 誘導とアミノ酸によるその

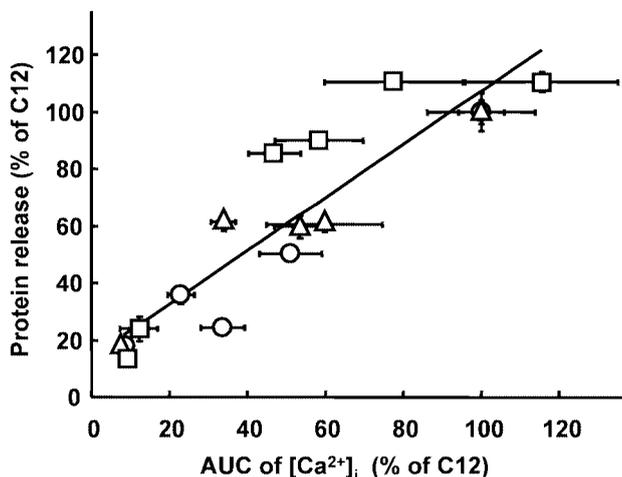


Fig. 7. Significant Relationship between AUC of Intracellular  $Ca^{2+}$  Concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and Protein Release

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of at least three experiments. The straight line was obtained by least-squares regression ( $r=0.9141, p<0.01$ ). [Reprinted from Ref. 15] with permission from John Wiley & Sons, Inc.]

抑制の機構について検討したところ, C12 は apoptosis 誘導因子である cytochrome C の mitochondria からの放出を有意に増大すること, Tau, L-Gln はそれを有意に抑制することが明らかとなった。さらに, mitochondria からの cytochrome C の放出を抑制する因子 Bcl-2 の発現量を Western blot 法により検討したところ, C12 により Bcl-2 の発現量がコントロールの半分にまで減少すること, また, Tau, L-Gln を併用することでそれがほぼコントロールレベルにまで回復することが明らかとなった。これらの結果より, C12 は, Bcl-2 の発現量を低下させることにより, mitochondria からの cytochrome C の放出を促し apoptosis を誘導するものと考えられた。また, Tau や L-Gln は, Bcl-2 の減少を抑えることで mitochondria からの cytochrome C の放出を抑制し, 下流に位置する caspase 活性を抑制することにより, apoptosis を抑制しているものと推定された。

Figure 8 に, これまでに明らかになった C12 及びアミノ酸の作用機構をまとめた。C12 は, histamine の遊離を促し炎症性の障害を誘引するほか,  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_m$  の上昇に起因する apoptosis の誘導などにより粘膜障害をもたらしていることが明らかとなった。また, Tau, L-Gln, L-Arg などのアミノ酸は, 一部は共通した機構により, あるいは各ア

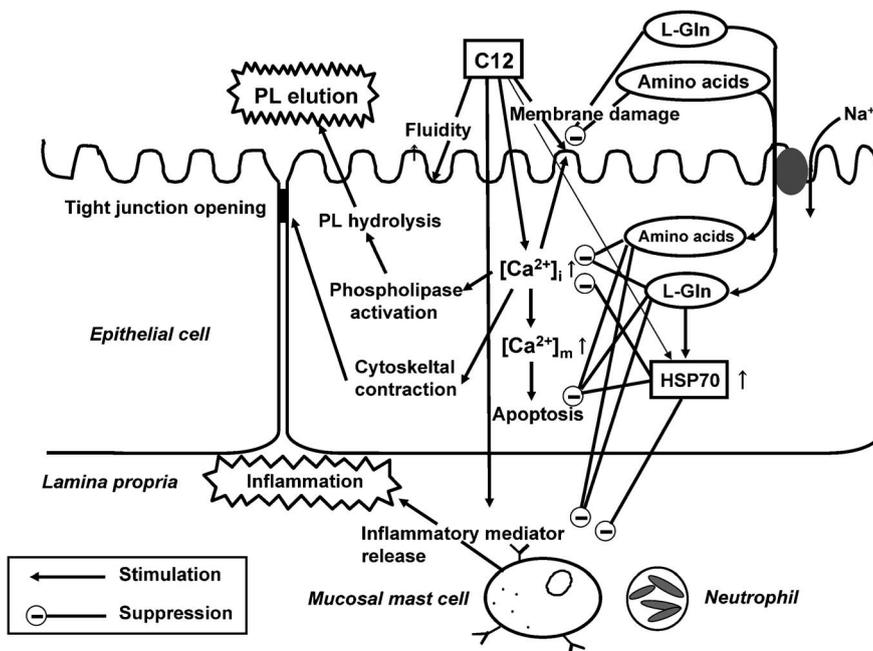


Fig. 8. Scheme of Possible Mechanisms by which Amino Acids Protect the Epithelial Cells

ミノ酸に依存した機構により腸粘膜細胞を保護することが明らかとなった。

### 5. 実用化へ向けての検討<sup>23,24)</sup>

前項までは水溶液による検討であったが、実用化を念頭に坐剤を調製し、その吸収改善効果、粘膜への安全性について検討を行った。用いるアミノ酸は Tau 及び L-Gln とし、モデル薬物として、Biopharmaceutics Classification System (BCS)<sup>25)</sup>においてクラス IV に属すると考えられる難水溶性、難吸収性薬物 rebamipide<sup>13)</sup> を用い、PEG1000 あるいは 6000 を基剤とした水溶性坐剤と Witepsol H15 を基剤とした油脂性坐剤を調製した。まず、*in vitro* 溶出試験により rebamipide の溶出性について評価したところ (Fig. 9), 水溶性坐剤からの溶出はいずれも良好であることが明らかとなった (Fig. 9(B))。一方、油脂性坐剤の場合は、C12 を含まない坐剤からの rebamipide の溶出は非常に遅く、C12 の添加により顕著に改善されることが示された (Fig. 9(A))。Tau の添加は、若干、溶出を遅らせる傾向がみられたものの、依然として顕著な溶出改善を示すことが明らかとなった。

これら調製した坐剤をラット直腸に挿入後、経時的に血液を採取し血清中濃度を測定した。<sup>23)</sup> Figure 10(A) は油脂性坐剤についての結果を示している。C12 含有坐剤で、コントロールの約 7 倍、C12-Tau 含有坐剤で約 4 倍の AUC を示し、顕著な吸収改善が認められた。一方、C12-L-Gln 含有坐剤では、

約 2 倍の改善に留まった。また、水溶性坐剤では、C12 含有坐剤が最も高い効果を示したものの、約 3 倍の吸収改善を示すに留まった (Fig. 10(B))。この吸収改善効果の相違については、詳細は明らかとなっていないが、坐剤からの C12 の放出性の相違が原因ではないかと考えている。

次に、粘膜への安全性について病理組織学的評価を行った (Table 3)。得られた結果から、C12-Tau 坐剤、C12-L-Gln 坐剤とも、C12 坐剤よりも直腸粘膜への影響が小さく、コントロール坐剤と遜色のない安全性を示すことが明らかとなった。

引き続き、ヒトへの応用を念頭に、坐剤のスケールアップとアニマルスケールアップ実験を行った。ここでは、市販されている C10 坐剤との比較も行ったが、C12 (20 mg)-Tau (30 mg) を含む油脂性坐剤は C10 (25 mg) 坐剤よりも、また、C12 (10 mg)-Tau (30 mg) を含む油脂性坐剤は C10 (15 mg) 坐剤よりも、rebamipide の吸収改善、家兔直腸粘膜への安全性の観点から優れていることが明らかとなり、安全性の高い吸収改善坐剤の開発の可能性が示された。<sup>24)</sup>

### 6. おわりに

本稿では、C12 とアミノ酸の併用による安全性の高い吸収改善製剤の可能性について、既存の坐剤との比較を含め坐剤としての有用性、安全性を明確に示すことができた。しかし、経口製剤とするにはさらなる工夫が必要と考えており、今後、検討を進め

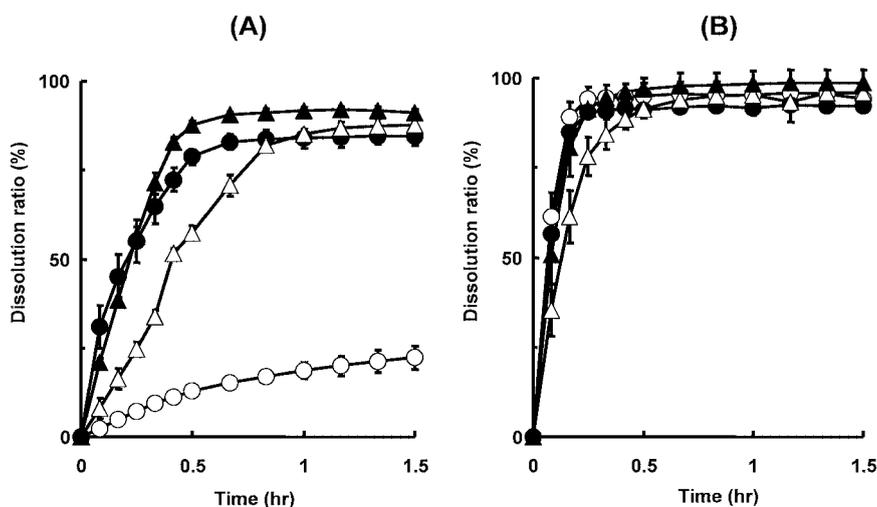


Fig. 9. (A) Dissolution Profiles of Rebamipide from FB Suppositories (A) and WB Suppositories (B) by Rotating Basket Method  
Dissolution study was performed at 50 rpm using JP 2nd fluid. Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. value of three experiments. ○: Control, ●: C12, △: C12+Tau, ▲: C12+L-Gln. [Reprinted from Ref. 23) with permission from Elsevier]

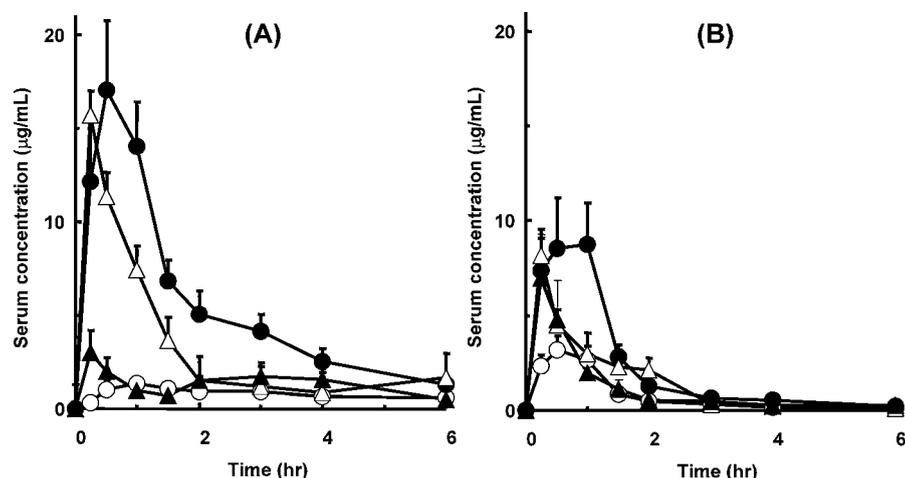


Fig. 10. Serum Concentration of Rebamipide after Rectal Administration of FB (A) or WB (B) Suppository Containing C12 and L-Gln or Tau

Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. value from three to five experiments. ○: control, ●: C12, △: C12+Tau, ▲: C12+Preload L-Gln. [Reprinted from Ref. 23] with permission from Elsevier]

Table 3. Histopathological Examination of Rat Rectum after Rectal Administration of Fatty Base Suppository Containing C12 with or without Tau or L-Gln

Findings	Control	C12	C12+L-Gln <sup>a)</sup>	C12+Tau
Flattering of epithelial cells	0.67	1.50	0.17	0.00
Shrinkage of epithelial cells	0.00	0.50	0.00	0.50
Erosion	0.33	0.83	0.00	0.00
Inflammatory cell infiltration	0.33	1.00	0.17	0.33
Atrophy of crypts	0.33	1.50	0.17	0.00

[Score] 0: no change, 1: very slight, 2: slight, 3: moderate, 4: severe. Data were expressed as the mean value. Doses of rebamipide, C12, L-Gln and Tau were 5 mg, 10 µmol, 75 µmol and 50 µmol, respectively. Histopathological examination was performed by an experienced veterinary histopathologist. <sup>a)</sup> The suppository containing 75 µmol L-Gln only was preloaded 1 h before dosing of the one containing rebamipide, C12 and L-Gln. [Reproduced from Ref. 23] with permission from Elsevier]

ていく予定である。また、筆者らは、ポリアミンの1つであるスペルミンと胆汁酸を利用することにより、安全性の高い経口吸収改善製剤開発の可能性を見出した。<sup>26,27)</sup> この処方については、今後、吸収改善の機構解明や実用的な製剤化についての検討が必要と考えている。これらの製剤は、難水溶性化合物の溶解性を改善するとともに安全に吸収改善を可能とする、汎用性の高い有用なシステムであると考えられる。

## REFERENCES

1) Swenson E. S., Curatolo W., *Adv. Drug*

*Deliv. Rev.*, **8**, 39–92 (1992).

- 2) Lindmark T., Kimura Y., Artursson P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 362–369 (1998).
- 3) Higaki K., Takechi N., Kato M., Hashida M., Sezaki H., *J. Pharm. Sci.*, **79**, 334–338 (1990).
- 4) Tomita M., Hayashi M., Awazu S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739–743 (1995).
- 5) Matsunaga F., Shimoyama T., Kikuchi H., Itoh T., Sakamoto Y., Tomita S., Satomi M., Hosaka T., *Shokuhinn to Kagaku*, **10**, 75–80 (1968).
- 6) Naitoh M., *Clin. Nutr.*, **37**, 635–642 (1970).
- 7) Mashima Y., *Clin. Nutr.*, **54**, 214–224 (1979).
- 8) Higaki K., Yata T., Sone M., Ogawara K., Kimura T., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **109**, 231–240 (2001).
- 9) Yata T., Endo Y., Sone M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1456–1465 (2001).
- 10) Takagi K., Okabe S., *Jpn. J. Pharmacol.*, **18**, 9–18 (1968).
- 11) Kinouchi Y., Yata N., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 375–378 (1996).
- 12) Endo Y., Hanada K., Miyake M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Pharm. Sci.*, **91**, 730–743 (2002).
- 13) Miyake M., Oka Y., Minami T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 911–921 (2003).

- 14) Kimura T., Kim K. S., Sezaki H., *J. Pharmabio-Dyn.*, **4**, 35–41 (1981).
- 15) Okuda T., Kadotsuji K., Takayama C., Hanada K., Mukaizawa F., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2256–2265 (2006).
- 16) Kiang J. G., Tsokos G. C., *Pharmacol. Ther.*, **80**, 183–201 (1998).
- 17) Swenson E. S., Milisen W. B., Curatolo W., *Pharm. Res.*, **11**, 1132–1142 (1994).
- 18) Koishi M., Hosokawa N., Sato M., Nakai A., Hirayoshi K., Hiraoka M., Abe M., Nagata K., *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1216–1222 (1992).
- 19) Babe Jr. K. S., Serafin W. E., “Goodman & Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics,” McGraw-Hill, 1995, pp. 581–600.
- 20) Mooren F. C., Kinne R. K. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1406**, 127–151 (1998).
- 21) Cano-Abad M. F., Villarroya M., Garcia A. G., Gabilan N. H., Lopez M. G., *J. Biol. Chem.*, **276**, 39695–39704 (2001).
- 22) Lis T. S., Musch M. W., Sugi K., Walsh-Reitz M. M., Ropeleski M. J., Hendrickson B. A., Pothoulakis C., Lamont J. T., Chang E. B., *Am. J. Physiol.*, **284**, C1073–C1082 (2003).
- 23) Miyake M., Kamada N., Oka Y., Mukai T., Minami T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Control. Release*, **99**, 63–71 (2004).
- 24) Miyake M., Minami T., Oka Y., Kamada N., Yamazaki H., Kato Y., Mukai T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 330–335 (2006).
- 25) Amidon G. L., Lennernas H., Shah V. P., Crison J. R., *Pharm. Res.*, **12**, 413–420 (1995).
- 26) Miyake M., Minami T., Hirota M., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Control. Release*, **111**, 27–34 (2006).
- 27) Miyake M., Minami T., Toguchi H., Odomi M., Ogawara K., Higaki K., Kimura T., *J. Control. Release*, **115**, 130–133 (2006).