

プロドラッグの小腸吸収の定量的解析と  
小腸初回代謝の予測に関する研究

2010

野澤 孝章

Quantitative analysis of intestinal absorption and  
prediction of intestinal first-pass metabolism for prodrug

Takaaki Nozawa

## Quantitative analysis of intestinal absorption and prediction of intestinal first-pass metabolism for prodrug

Takaaki Nozawa

Prodrug modification is a major factor in drug design that can improve, delay, prolong, control or specifically express the action of a parent drug. Most prodrugs used in clinical practice are developed to improve the oral bioavailability of the parent drug. The prodrug, itself an inactive compound, is activated by enzymes in the body, to allow the pharmacological effect of the parent drug. The majority of prodrugs are ester derivatives, because of the ubiquitous expression of hydrolase, required for their activation, in many organs. Prodrugs have adequate membrane permeability due to their increased lipophilicity, and are easily taken up and activated by first-pass metabolism before entering the systemic circulation. In the case of oral dosing, prodrugs are metabolized in the liver and intestine. However, the intestinal first-pass metabolism during absorption is not able to predict quantitatively. In the present study, we examined the detail mechanism of increasing the intestinal absorption of temocapril, a clinically used prodrug, by the permeation experiment through Caco-2 cell monolayers and the *in situ* rat jejunal perfusion experiment. Furthermore, hydrolysis parameter of several ester prodrugs in the *in situ* rat jejunal perfusion has been estimated and then related to the *in vitro* hydrolysis parameter in the intestinal S9. Finally, I have proposed the noble quantitative prediction method of intestinal first pass metabolism by *in vitro* -*in situ* correlation.

1) The permeability experiment through Caco-2 cell monolayer showed that temocapril was a good substrate of P-gp but not for PEPT1 and OATP. Temocapril was easily taken up into the cell by passive diffusion, especially at low pH of apical side because of increase of unionic form of temocapril (pI 3.69). Meanwhile the permeability of temocaprilat, a parent drug of temocapril, was hardly transported due to extremely low hydrophobicity and absence of any influx transporters. Temocaprilat derived from temocapril in the Caco-2 cells was passively transported to out sides of cell according to pH partition theory and membrane area size. The transport of temocaprilat into apical and basolateral side indicated that the presence of microvilli resulted in three-fold larger area of brush border membrane than basolateral membrane.

2) In the *in situ* rat jejunal perfusion experiment, the decrease of temocapril in the lumen indicated its complete absorption in human. Temocapril was almost completely hydrolyzed in the rat intestinal mucosa, although it was slowly hydrolyzed at the intrinsic clearance of 108  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  S9 protein. Therefore the temocapril in the vein was about 10% of total compound

transported into blood. Temocaprilat formed from temocapril in the mucosa is two-fold faster transported into lumen than into vein at pH 6.4 of luminal fluid.

3) Intestinal absorption of temocapril was evaluated in an *in situ* rat jejunal perfusion model under various conditions of luminal pH and in the presence and absence of carboxylesterase (CES) mediated hydrolysis. Temocapril was more easily taken up by mucosal cells at a luminal pH of 5.4 than at pH 6.4 or 7.4. Then temocapril was hydrolyzed to temocaprilat that was transported into both mesenteric vein and jejunal lumen according to pH partition theory. Therefore, the ratio of absorption to secretion for temocaprilat (pI 2.75) was highest at luminal perfusate pH of 5.4. When both the luminal and venous fluid were at pH 7.4, temocaprilat was transported about three-fold faster into the lumen than into the vein, due to the greater surface area of the brush border membrane thanks to the presence of microvilli. Under CES-inhibited conditions, the hydrolysis of temocapril was inhibited by only 60%. It is postulated that serine esterases on the cell membrane were responsible for the residual hydrolysis. It is proposed that temocapril is mainly absorbed from the proximal intestine, and hydrolyzed by serine esterase on the cell membrane in man. The absorption of temocapril is affected by the intraluminal pH and the interaction between serine esterases and simultaneously administered food.

4) The intestinal absorption and first pass metabolism were evaluated for several prodrugs such as Temocapril, Isovaleryl-propranolol, Ethyl-fexofenadine, Butyl-*p*-aminobenzoic acid and Oseltamivir. The rat *in situ* single-pass perfusion experiment showed that bioavailability of all ester prodrugs was more than 90% in man. The parent drugs derived from prodrugs in rat mucosa were preferentially transported to luminal side due to large surface area of brush border membrane at the luminal pH of 6.4. The hydrolysis ratio in rat *in situ* experiment (0.051-0.983) was related in sigmoid type with the intrinsic hydrolysis clearance ( $CL_{int}$ ; 0.018-2120  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  S9 protein) obtained in jejunal S9. This relation clearly showed that a compound with  $CL_{int}$  more than 100  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  S9 protein was completely hydrolyzed by first pass metabolism in the intestine. It is seemed that this *in vitro-in situ* correlation is also suitable for prediction of human intestinal first pass metabolism.

In the present study, I was able to mimic the conditions of the human intestine in a rat model by inhibiting CES activity and control of luminal pH condition. Furthermore, I proposed the noble prediction method of human intestinal first pass metabolism. These findings are significantly useful in a development of prodrugs.

## プロドラッグの小腸吸収の定量的解析と小腸初回代謝の予測に関する研究

生命薬科学専攻 病態薬効解析学分野 野澤 孝章

プロドラッグは、生体内代謝を利用した安全性の高い医薬品であり、吸収の改善や薬効の持続化に利用される。プロドラッグ自身の薬理活性は低く、親薬物に変換して活性を発揮するため、生体内での代謝が重要である。しかしながら、経口投与されたプロドラッグが小腸で初回代謝されると、吸収量の低下を招き、十分な薬効を得ることができない。小腸吸収過程の初回代謝を *in vitro* データから定量的に予測することは難しく、プロドラッグ開発の妨げになっている。そこで本研究では、モデルプロドラッグとして Temocapril を選択し、その小腸吸収を Caco-2 細胞による透過実験およびラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験から詳細に解析した。さらに、*in vitro* 実験から小腸初回代謝を予測するための方法論の構築を行った。以下に本研究で得られた知見を要約する。

1) Caco-2 細胞透過実験において、Temocapril は P-gp によって分泌方向に排出され、多くの ACE 阻害剤とは対照的に、PEPT1 や OATP などの取込みトランスポーターには認識されにくいことが判明した。Temocapril は受動拡散による高い膜透過性を示し、特に、Apical 側の pH が低い場合、分子型の存在比が上昇するため、細胞内取込み量が増大した。一方、親薬物の Temocaprilat の透過にはトランスポーターの関与はなく、Caco-2 細胞内で加水分解生成した Temocaprilat は刷子縁膜における微絨毛の存在により、Apical 側へ Basolateral 側よりも約 3 倍速い速度で排出された。

2) ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験において、腸管腔の Temocapril の減少量からヒトにおける吸収率は 100% と予測された。しかしながら、血管腔に吸収された Temocapril は全吸収量の 10% にすぎず、90% 以上は小腸粘膜透過時に加水分解された。しかも、粘膜内で生成した Temocaprilat は、血管腔に比べて腸管腔に 2 倍多く排出された。空腸粘膜 S9 から求めた加水分解固有クリアランスは  $108 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  と比較的小さな値であり、*in vitro* 加水分解活性が低くても、粘膜内への取り込み速度に比べると加水分解速度は速く、吸収過程ではほぼ完全に加水分解されることが判明した。

3) 腸管腔の pH を 5.4, 6.4, 7.4 という小腸上部から下部までの pH 条件にして、ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験を行った。その結果、Temocapril は pH 5.4 で分子型が最も多く、腸管腔から粘膜への取込みは最大であった。また、粘膜内で生成した Temocaprilat (pI 値; 2.75) は、pH 分配仮説に従って膜透過するため、腸管腔が pH 5.4 の時に血管腔への移行量が最大となり、Temocapril は小腸上部で吸収されることが明らかとなった。

4) ラット小腸における加水分解は、主に Carboxylesterase (CES)に依存することが明らかとなった。しかしながら、ヒト小腸 CES は Temocapril を加水分解しないため、CES 阻害条件下のラット空腸をヒト小腸モデルとして、*in situ* single-pass 実験を行った。CES 阻害により小腸粘膜内の Temocapril 濃度は増大し、結果的に Temocapril の粘膜内取込みの減少と、Temocapril の血管腔への吸収が増大した。しかしながら、CES を阻害したにも関わらず、加水分解率は 30%しか低下せず、ホモジネートを用いた実験から、残存活性は細胞膜上の Serine protease に起因するものと考えられた。以上の結果から、Temocapril はヒト小腸上部で吸収され、細胞膜上の Serine protease によって加水分解されるが、生成した Temocaprilat は小腸上部では血管腔に移行しやすいことが示唆された。また、食後に投与することによって、胃内容排出時間の延長、胆汁酸の分泌による腸管腔 pH の低下に加え、食物による Serine protease の阻害のために、Temocapril のまま吸収される割合が増大すると予測された。

5) 数種のエステルプロドラッグ Temocapril, Isovaleryl-propranolol, Ethyl-fexofenadine, Oseltamivir, Butyl-*p*-aminobenzoic acid の吸収性をラット空腸 *in situ* 実験により評価した。その結果、全てのプロドラッグの膜透過性は良く、ヒト小腸の吸収率は 90%以上と予測された。また、粘膜内で生成した親薬物は刷子縁膜上の微絨毛の存在のために、いずれも腸管腔へ優位に分泌された。受動拡散のみで膜移行する propranolol の透過から、小腸粘膜細胞の刷子縁膜の有効面積は、基底膜の約 4 倍と見積もられ、Caco-2 細胞実験で得られた値に匹敵した。また、加水分解生成した親薬物が酸性薬物の場合、吸収量は増大したが、腸管腔が pH6.4 では、吸収量が分泌量を上回ることなく、小腸粘膜内での加水分解はプロドラッグの吸収に対して負の効果を示すことが確認された。

6) 数種のエステルプロドラッグの *in situ* 実験における代謝率と *in vitro* 代謝の相関性から、小腸初回代謝を予測する方法を検討した。ラット空腸 *in situ* 加水分解率 (0.051-0.983) と、*in vitro* 空腸 S9 の加水分解固有クリアランス( $CL_{int}$ ; 0.018-2120 $\mu$ L/min/mg S9 protein) の間に、シグモイド型の相関が得られた。その相関性から、*in vitro* の  $CL_{int}$  が 100  $\mu$ L/min/mg S9 protein 以上の場合、小腸粘膜透過時にほぼ 100%加水分解されると予測された。この *in vitro-in situ* 相関に、ヒト小腸 S9 を用いた *in vitro* 活性を当てはめることにより、ヒト小腸の初回代謝率が予測できると考えられた。

以上のように、本研究では小腸におけるプロドラッグの膜透過機構および代謝の影響を明らかにし、ヒト小腸吸収動態の予測方法の一端を示した。プロドラッグ開発において小腸初回代謝の予測は極めて重要であり、本研究で得られた成果は、効率的なプロドラッグ開発の重要な道標になると考えられる。

## 目次

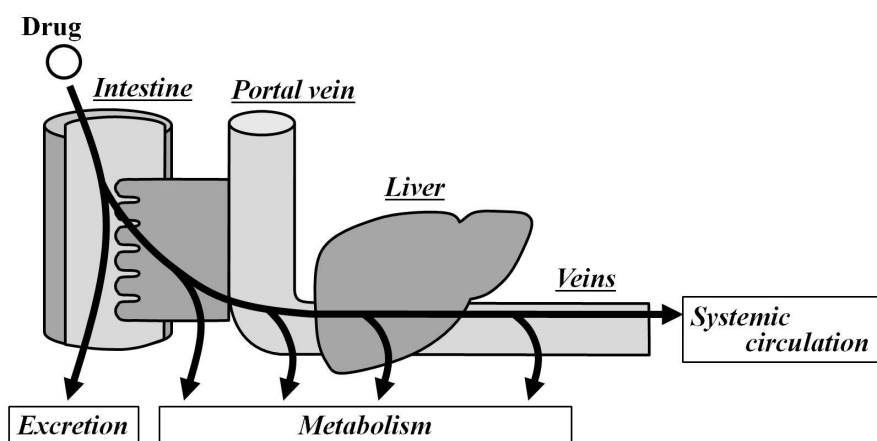
第1章 諸言.....	1
第2章 Caco-2細胞 <i>in vitro</i> 実験における Temocapril と Temocaprilat の膜透過性.....	6
2-1 序.....	6
2-2 BNPP 処理 Caco-2 細胞単層膜を用いた Temocapril の膜透過性.....	7
2-3 Temocapril の吸収における pH 依存性の検討.....	9
2-4 Temocapril の吸収に関わる輸送担体の検討.....	10
2-5 Temocapril の排出に関わる輸送担体の検討.....	12
2-6 親薬物 Temocaprilat の Caco-2 細胞単層膜における吸収動態.....	13
2-7 Temocapril および Temocaprilat の Caco-2 細胞外への移行特性.....	15
2-8 小括.....	17
第3章 ラット空腸 <i>in situ</i> 実験における Temocapril の吸収挙動.....	18
3-1 序.....	18
3-2 Temocaprilat の single-pass 灌流における吸収動態.....	18
3-3 Temocapril の single-pass 灌流における吸収動態.....	20
3-4 single-pass 灌流における粘膜内生成親薬物の粘膜外移行特性.....	22
3-5 ラット空腸 S9 における Temocapril 加水分解活性.....	23
3-6 小括.....	26

第4章	ラット空腸 <i>in situ</i> 実験を用いた pH 制御による Temocapril の小腸吸収部位の検討と、加水分解の制御によるヒト小腸吸収モデリング.....	28
4-1	序.....	28
4-2	pH の異なる腸管灌流液を用いた <i>in situ</i> 実験による小腸吸収部位の検討.....	29
4-3	CES 阻害ラット空腸を用いた <i>in situ</i> 実験によるヒト小腸モデルの評価.....	30
4-4	ラット空腸における Temocapril 加水分解への Serine protease の寄与....	33
4-5	ヒト <i>in vivo</i> での Temocapril の吸収動態予測.....	35
4-6	小括.....	35
第5章	エステルプロドラッグの <i>in vivo</i> 小腸加水分解予測.....	37
5-1	序.....	37
5-2	ラット空腸 <i>in situ</i> single-pass 灌流による膜透過性の評価.....	37
5-3	ラット空腸 <i>in situ</i> single-pass 灌流加水分解生成物の粘膜外移行特性...	40
5-4	ラット空腸 <i>in situ</i> single-pass 灌流中における加水分解率.....	42
5-5	ラット空腸 S9 での <i>in vitro</i> 加水分解活性.....	43
5-6	加水分解に関する <i>in situ</i> – <i>in vitro</i> の相関性.....	44
5-7	小括.....	45
第6章	総括.....	46
	実験の部.....	50
	謝辞.....	68
	参考文献.....	69

## 第1章 緒言

医薬品開発では、薬物の溶解や膜透過に起因する吸収性の問題、組織移行性あるいは代謝が原因となる体内動態に関する問題、または胃粘膜障害などの副作用に関する問題といった様々な問題が原因で開発を中断することがある。それらの解決方法として用いられる分子修飾法の一つがプロドラッグ化である<sup>1)4)</sup>。プロドラッグは、問題のある活性親薬物を化学的に修飾し、分子全体の特性を制御することで問題解決を図る。そのため、分子修飾には薬理活性に必要な官能基を修飾することが多く、プロドラッグ自身は不活性体である<sup>5)</sup>。プロドラッグが薬効を示すには生体内で酵素的もしくは化学的に活性体である親薬物に変換される必要があり、生体内の種々の臓器に広範囲に発現している酵素の活性を利用した化学修飾を施すことが多い。

一般的に経口投与された薬物は、小腸から吸収された後、門脈および肝臓を通過して全身循環に入る (Fig. 1)<sup>6)</sup>。プロドラッグが薬効を示すためには全身循環の親薬物濃度が高い必要がある。全身循環に至るまでに、初回代謝によって親薬物に変換された場合、その変換効率は最も高く、親薬物の高い血中濃度が期待できる。



**Fig. 1** Route of drugs to reach the systemic circulation after oral administration



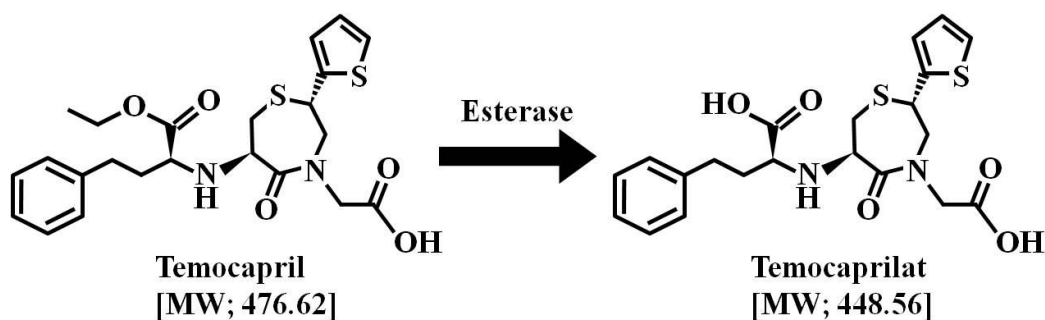
したがって、小腸、肝臓、血液中における代謝、特に酵素の発現が多い肝臓と小腸における代謝を理解することがプロドラッグ開発には重要である。肝臓は薬物の代謝部位として十分に研究され<sup>7), 8)</sup>, *in vitro* の実験結果から *in vivo* の代謝予測が可能である。しかし、小腸に関しては、酵素の発現についての情報は多いが<sup>9)-11)</sup>, 吸収過程における代謝の影響は十分に検討されていない。プロドラッグが小腸粘膜内で代謝された場合、粘膜内で生成した親薬物は受動拡散によって血管腔だけではなく腸管腔にも移行するため、小腸粘膜におけるプロドラッグの代謝は吸収に対して負の効果を示すことになる。プロドラッグ開発において小腸吸収過程の代謝をできるだけ抑えることが課題の一つである。しかしながら、吸収過程での代謝の予測は未だ定量的にはできないのが現状である。

薬物の小腸吸収を評価するには、*in vitro* 法、*in situ* 法、*in vivo* 法の3つの方法がある。*in vitro* 法は最も簡便で、ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞単層膜がよく検討され、High through put の膜透過性の予測に用いられている。Transwell 上で培養すると Caco-2 細胞の表面には小腸上皮細胞のような微絨毛突起を持った刷子縁膜、細胞間には密着帯 (tight junction) が存在し、小腸と同様の形態を呈する<sup>12), 13)</sup>。細胞膜上にはトランスポーターが発現し、膜透過の評価に適している<sup>14)-18)</sup>。また、膜透過性やトランスポーターの寄与を評価するのに、阻害剤を容易に使用できる利点もある<sup>19)-21)</sup>。しかし、Caco-2 細胞単層膜では代謝酵素の発現が小腸と大きく異なるため<sup>22), 23)</sup>, プロドラッグの吸収性評価には適さない。一方、*in situ* 法は、小腸の構造や運動性を保持したまま小腸を単離して薬物吸収を評価する方法である。血流が存在し、また、代謝酵素やトランスポーターの活性が維持できるため、膜透過性と同時に代謝も評価できる利点がある<sup>24)-31)</sup>。しかしながら、実験に利用できる動物に限りがあり、繁用されるラットにおいてはヒトと異なり血液中にエステラーゼが高発現するため<sup>32)-34)</sup>, プロドラッグの小腸吸収を評価するには血液を緩衝液で同時灌流する必要がある<sup>28)-31)</sup>。したがって、*in situ* 法は、一般的には吸収予測には用いられない。*in vivo* 法は生体一頭での吸収を評価する。したがって、生体に起こる現象をまとめて評価できるものの、

多数の臓器の寄与を受けるため小腸だけの吸収を評価するのは難しい。

一般的に、医薬品開発では Caco-2 細胞から得た薬物の膜透過性と、小腸組織で測定した代謝活性から小腸吸収を予測する。その後、候補化合物を選び、*in vivo* 法で全身における吸収を評価する。したがって、*in vivo* 実験の前にできるだけ正確にプロドラッグの吸収動態を予測することがプロドラッグ開発において重要である。しかし、現段階では小腸通過時の代謝率を定量的に予測することはできないため正確な小腸吸収の予測は不可能である。そこで著者は、小腸吸収を予測するために、*in vitro* 代謝活性から吸収過程での代謝率を予測するための *in vitro-in vivo* 相関を構築することを企図した。ヒト小腸組織を用いた代謝実験から代謝活性を求め、*in vitro-in vivo* 相関性より吸収過程の代謝率を予測する。さらに、Caco-2 細胞から膜透過性を予測する。得られた膜透過性と代謝率からプロドラッグの正確な小腸動態を予測する。このような新たなプロドラッグの小腸吸収予測法の構築を目指して本研究を開始した。*in vitro-in vivo* 相関を確立するためには、小腸粘膜のみでの薬物の挙動を正確に評価する必要がある。そのため、本研究では薬物の吸収を *in situ* 法で詳細に検討し、*in vitro-in situ* 相関を確立した。*in situ* 実験の妥当性を示すために、既存のプロドラッグの小腸動態を解明し、さらに数種のプロドラッグを用いて吸収過程での小腸代謝を検討した。

まず、プロドラッグとして成功した既存の薬物として Temocapril を選択し、その小腸における動態を詳細に検討した。Temocapril は疎水性増大に基づく膜透過性の改善により、吸収率の向上を達成した典型的なプロドラッグであり、親薬物 Temocaprilat の2つのカルボキシル基のうちの1つをエチルエステル化したプロドラッグである (Fig. 2)。Temocapril はアンジオテンシン変換酵素阻害薬に分類され、高血圧症の第一選択薬として繁用されている。消化管から速やかに吸収され、腸管、肝臓、血液のエステラーゼにより加水分解を受けるとされているものの、詳しい動態はわかっていない<sup>35), 36)</sup>。まず Temocapril および Temocaprilat の膜透過機構を Caco-2 細胞単層膜により解明し、さらにラット小腸 *in situ* 実験を用いて Temocapril の詳細な吸収挙動を解析した。



**Fig. 2 Structure of temocapril and temocaprilat**

次に、Table 1 に示す小腸代謝予測法の確立を検討した。この方法は *in vitro* 実験から得られた代謝活性と *in situ* 実験での代謝率の相関をとるものである。まず第 1 段階としてラットの小腸を用い、*in vitro* 実験で代謝活性を、*in situ* 実験で吸収過程の代謝率を算出する。複数のプロドラッグでラット小腸代謝活性と代謝率を求め、代謝の *in vitro-in situ* 相関をとる。ラットとヒトの小腸は組織学的構造が類似しており、ヒト小腸でもラットと同じ相関が当てはまると考えられる<sup>26)</sup>。したがって、次にヒト小腸組織で代謝活性を求めれば、相関図から小腸吸収過程での代謝率を予測することが可能である。

**Table 1 Prediction approach of human intestinal metabolism**

<b>Rat</b>	<p><b>Step 1</b> <i>In vitro</i> experiment used rat intestinal tissue Measure an intrinsic clearance</p> <p><i>In situ</i> experiment used rat intestinal organ Calculate a ratio of metabolism during absorption</p>	
	<p><b>Step 2</b> Correlate <i>in vitro</i> with <i>in situ</i> about rat intestinal metabolism used a number of prodrugs</p>	
<b>Human</b>	<p><b>Step 3</b> <i>In vitro</i> experiment used human intestinal tissue Measure an intrinsic clearance</p>	
	<p><b>Step 4</b> Apply the value of human intrinsic clearance into the correlation diagram</p>	

この小腸代謝予測法を検討するため、ラット小腸粘膜 S9 における *in vitro* 加水分解活性と、*in situ* 実験における加水分解率からラット小腸代謝 *in vitro-in situ* 相関をとった。評価には Temocapril, Isovaleryl-propranolol, Ethyl-fexofenadine, Oseltamivir, Butyl-*p*-aminobenzoic acid を用いた。これらは分子サイズおよび加水分解活性が異なり、ラット小腸 *in vitro* においては様々な代謝率を示すエステルプロドラッグである。また、親薬物の pI もしくは pK<sub>a</sub> も異なるものを選択した (30), 37)-41)。

プロドラッグは医薬品の 5-7% を占めその数は年々増加しており<sup>5)</sup>、問題のある候補薬を生かすのにプロドラッグの開発を効率的に行うこと、有効性の高いプロドラッグを開発することが求められる。そのためには、プロドラッグの小腸吸収動態を考え、小腸代謝を簡便な方法で正確に予測をすることが必要である。本研究では Temocapril をモデルプロドラッグとして、プロドラッグおよび親薬物の膜透過機構、小腸吸収過程の代謝を詳細に解析し、*in vivo* 吸収について予測した。さらに、プロドラッグ開発を容易にできるようにするために吸収時の小腸初回代謝の予測法を確立した。以下に検討事項を記述する。まず、第 2 章では Caco-2 細胞を用いて、Temocapril および Temocaprilat の膜透過性と阻害剤を用いた輸送担体の寄与について詳細な検討をおこなった。また、Temocapril と Temocaprilat の細胞内から細胞外への移行について調べた。第 3 章ではラット小腸 *in situ* single-pass 実験を用い、Temocapril の吸収動態を解析した。第 4 章では小腸管腔の pH 制御と小腸粘膜内の加水分解の制御によりヒトの小腸モデルを作製し、Temocapril のヒト小腸吸収動態を予測した。第 5 章では、*in situ* 実験と *in vitro* 実験においてエステルプロドラッグの加水分解を比較し、小腸初回代謝を見積もるための *in vitro-in situ* 相関を検討した。第 6 章は、以上の知見を総括したものである。

## 第2章 Caco-2 細胞 *in vitro* 実験における Temocapril と Temocaprilat の膜透過性

### 2-1 序

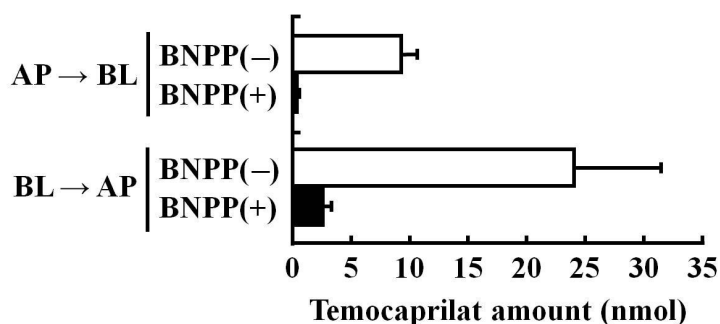
Caco-2 細胞は小腸吸収モデルとして膜透過性の評価によく用いられている。しかし、Caco-2 細胞の代謝酵素の発現は小腸と大きく異なることが報告されており、その代謝酵素の基質となる薬物では Caco-2 細胞と小腸の吸収動態が違う場合がある<sup>22), 23)</sup>。Carboxylesterase (CES) は Temocapril の加水分解に関わる酵素で、ヒト小腸では CES2 アイソザイム (hCE2) が多く発現しており、CES1 アイソザイム (hCE1) はほとんど発現しない。しかし、Caco-2 細胞では hCE1 の発現が多く、逆に hCE2 は少ない<sup>22)</sup>。hCE1 と hCE2 の間には基質認識性の違いが報告されており<sup>42)</sup>、Temocapril は hCE2 よりも hCE1 に基質として認識される。そのため、Temocapril は hCE2 の発現があるヒト小腸マイクロソーム画分ではほとんど加水分解されないのに対し、Caco-2 細胞では著しく加水分解される<sup>22), 43)</sup>。したがって、Temocapril の膜透過を Caco-2 細胞で評価するには、CES の阻害剤などを用いた工夫が必要である。

本章では Temocapril の Caco-2 細胞での加水分解に関して 2 種類の条件を用いて、Temocapril と Temocaprilat の膜透過について評価した。まず、CES による加水分解を特異的阻害剤である Bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP) で阻害し<sup>44), 45)</sup>、加水分解されにくい条件を作り出した。CES 阻害下では加水分解による吸収への影響が少なくなり Temocapril 本来の膜透過を評価できるため、Temocapril の膜透過性、吸収への pH 依存性、トランスポーターの関与、排出性を評価するのに用いた。一方で、CES を阻害せず加水分解が進行する条件では Temocapril が著しく加水分解され Temocaprilat が生成されるため、Temocaprilat の細胞外移行性を評価することができる。

## 2-2 BNPP 処理 Caco-2 細胞単層膜を用いた Temocapril の膜透過性

Caco-2 細胞に CES 特異的阻害剤である BNPP 200  $\mu\text{M}$  を 40 min 処理することで CES 活性を阻害し, Temocapril の膜透過を評価した. このとき BNPP による他のエステラーゼ (Aminopeptidase, DPP-IV) の阻害は見られないこと, また, PEPT1, P-gp, OATP などのトランスポーターの輸送活性に影響を与えないことが報告されている<sup>46)</sup>.

Transwell 上で培養した Caco-2 細胞単層膜の Apical (AP) 側, あるいは Basolateral (BL) 側に Temocapril 100  $\mu\text{M}$  を添加し, 経時的に透過した薬物量を測定した. Caco-2 細胞単層膜のエステラーゼ活性を透過実験 2 時間後の Temocaprilat の生成量から判断すると, BNPP 処理による加水分解阻害率は Fig. 3 に示すように 88% 以上であり, Caco-2 細胞における Temocapril の加水分解の大部分は CES によることが確認された. したがって, BNPP で前処理することにより, 細胞内での加水分解が極めて遅い条件になり, Temocapril 本来の膜透過性を評価できると考えられた.

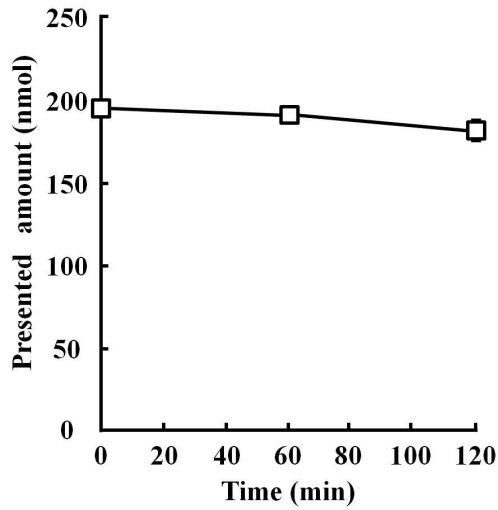


**Fig. 3 Transported amount of temocaprilat after temocapril applied AP or BL side after treatment or not treatment with BNPP**

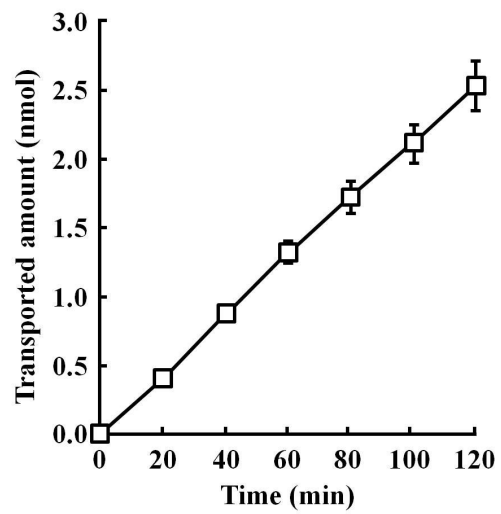
Open columns show the temocaprilat amount treated without BNPP. Closed columns show the temocaprilat amount treated with BNPP. Values represent mean  $\pm$  S.D.

BNPP 処理により CES を阻害し, Temocapril を AP 側に添加した場合および BL 側に添加した場合の薬物の残存量と透過量の経時変化を Fig. 4 に示す. また Table 2 に Temocapril 透過量の定常状態の直線の傾きより求めた, 見かけの膜透過係数 ( $P_{app}$ ) を示す.

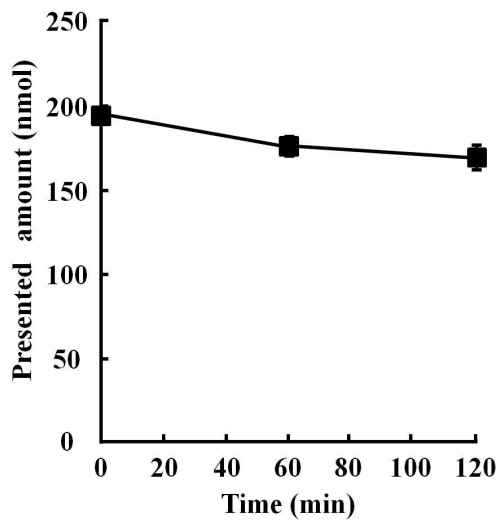
a) AP side (AP→BL)



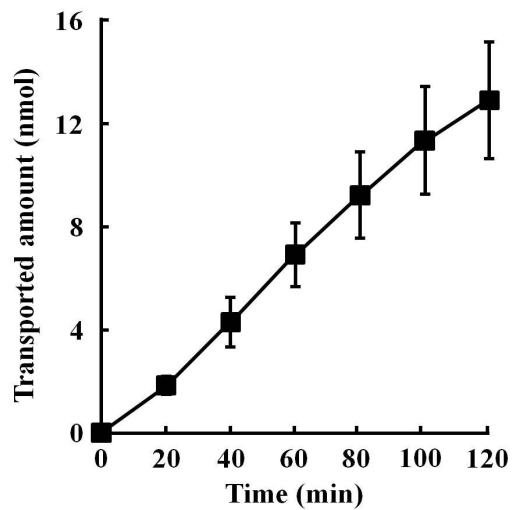
b) BL side (AP→BL)



c) BL side (BL→AP)



d) AP side (BL→AP)



**Fig. 4 Transport of temocapril through Caco-2 cell monolayers with CES inhibited by BNPP**

- a) Presented amount of temocapril on AP side applied temocapril on AP side
  - b) Transported amount of temocapril to BL side applied temocapril on AP side
  - c) Presented amount of temocapril on BL side applied temocapril on BL side
  - d) Transported amount of temocapril to AP side applied temocapril on BL side
- Open squares show temocapril when it was applied on AP side. Closed squares show temocapril when it was applied on BL side. Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

**Table 2 Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of temocapril across Caco-2 cell monolayers with CES inhibited by BNPP**

	$P_{app}$ ( $10^{-7}$ cm/sec)		Ratio of $P_{app}$
	AP → BL	BL → AP	BL → AP / AP → BL
<b>BNPP(-)</b>	<b>0.841 ± 0.273</b>	<b>6.54 ± 2.33</b>	<b>7.77</b>
<b>BNPP(+)</b>	<b>7.68 ± 0.830</b>	<b>44.0 ± 8.54</b>	<b>5.72</b>

Values represent mean ± S.D.

Temocapril を AP 側あるいは BL 側に添加してその透過をみると、BNPP 処理細胞では BL→AP の透過が AP→BL の透過に比べて著しく大きく、 $P_{app}$  は 5.72 倍であった。したがって、Temocapril は AP 側に発現する efflux トランスポーターによって排出されると考えられた。BNPP 未処理細胞では Temocapril の透過は BNPP 処理した細胞と比べて、AP→BL 透過では 9.1 倍、BL→AP 透過では 6.7 倍低い値を示したが、BL→AP/AP→BL の比は 7.77 であり、Temocapril は efflux トランスポーターによって AP 側に排出されることが明らかになった。

### 2-3 Temocapril の吸収における pH 依存性の検討

次に、pH 依存的な Temocapril の吸収について検討した。AP 側を pH6.0 にして 50  $\mu$ M Temocapril を添加し、pH7.4 のときの透過と比較した。結果を Table 3 に示す。pH6.0 のときの  $P_{app}$  は pH7.4 のときと比べて 12.4 倍大きくなり、膜透過性が著しく上昇した。



**Table 3** Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of temocapril across Caco-2 cell monolayers with different pH at AP side

pH at AP side	$P_{app}$ ( $10^{-7}$ cm/sec)
	AP → BL
pH7.4	7.68 ± 0.83
pH6.0	95.2 ± 6.12

Values represent mean ± S.D.

#### 2-4 Temocapril の吸収に関わる輸送担体の検討

Temocapril が pH 勾配を利用した吸収方向のトランスポーターによって小腸粘膜に取り込まれている可能性がある。その代表的なトランスポーターとして PEPT1 があげられる。PEPT1 は小腸に発現してペプチドの吸収に役立っている<sup>47), 48)</sup>。また Enalapril や Captopril など ACE 阻害剤の多くは Temocapril と同じ分子修飾法を用いており、それらは PEPT1 の良い基質であることが報告されている<sup>49), 50)</sup>。そこで、薬物輸送に関わる吸収方向のトランスポーターである PEPT1 と OATP の Temocapril の吸収への寄与を検討した。

PEPT1 の阻害剤として Glycyl-Sarcosine (Gly-Sar) を<sup>19), 51), 52)</sup>、OATP の阻害剤として Rifamycin SV<sup>53)-55)</sup>、Bromosulfophthalein (BSP)<sup>56)-58)</sup> を用いて Temocapril の小腸取り込みへの寄与を調べた。結果を Table 4 に示す。

**Table 4 Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of temocapril across Caco-2 cell monolayers with uptake transporter inhibitors**

	AP pH	$P_{app}$ ( $10^{-7}$ cm/sec) AP → BL	Inhibited ratio %
<b>Control</b>	<b>6.0</b>	<b>95.2 ± 6.12</b>	
<b>Gly-Sar</b>	<b>6.0</b>	<b>94.9 ± 0.54</b>	<b>0.3 %</b>
<b>Rifamycin SV</b>	<b>6.0</b>	<b>81.6 ± 1.43</b>	<b>14.2 %</b>
<b>Control</b>	<b>7.4</b>	<b>7.68 ± 0.83</b>	
<b>Rifamycin SV</b>	<b>7.4</b>	<b>6.09 ± 0.19</b>	<b>20.1 %</b>
<b>BSP</b>	<b>7.4</b>	<b>5.37 ± 0.19</b>	<b>30.0 %</b>

Values represent mean ± S.D.

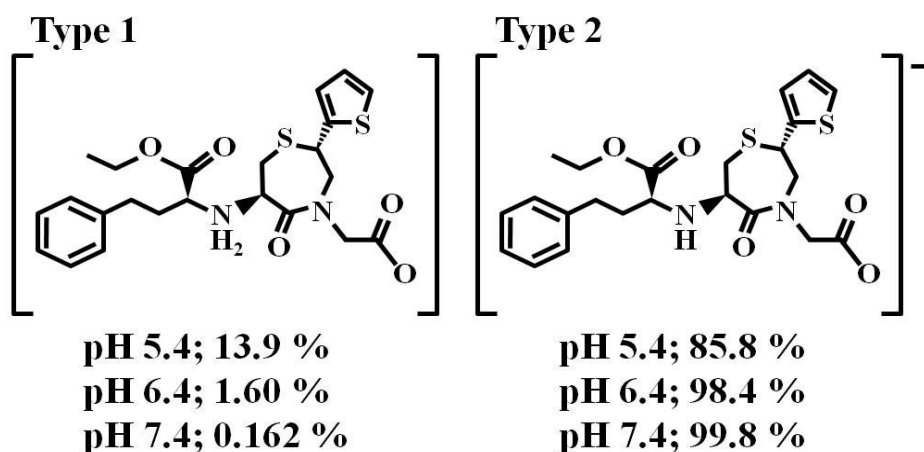
AP 側を pH6.0 にして 50  $\mu$ M Temocapril を添加し, 50  $\mu$ M Gly-Sar で阻害実験を行ったところ, コントロールと比較して  $P_{app}$  に有意な差は見られず, Temocapril は PEPT1 の基質でないことがわかった. さらに, [ $^3$ H]Gly-Sar を基質として Temocapril の阻害効果を検討した結果を Table 5 に示す. コントロールと比較して [ $^3$ H]Gly-Sar の透過が 60% 阻害された. したがって, Temocapril は PEPT1 の基質ではなく, 阻害剤として働くことが明らかになった.

**Table 5 Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of [ $^3$ H]-Gly-Sar across Caco-2 cell monolayers with temocapril as a transport inhibitor**

	$P_{app}$ ( $10^{-7}$ cm/sec) AP → BL	Inhibited ratio %
<b>Control</b>	<b>95.5 ± 4.78</b>	
<b>Temocapril</b>	<b>38.5 ± 4.18</b>	<b>60.0 %</b>

Values represent mean ± S.D.

次に、AP 側 (pH7.4) に 100  $\mu$ M Temocapril を添加し、OATP 阻害剤として 100  $\mu$ M Rifamycin SV で阻害実験を行った。その結果、コントロールと比較して Temocapril の透過は 20% 阻害された。同様に、200  $\mu$ M BSP でも 30% の阻害がみられた。また、AP 側を pH6.0 に変更し 50  $\mu$ M Temocapril を添加、50  $\mu$ M Rifamycin SV で阻害実験をしたところ 14.2% の阻害がみられたものの、低 pH による  $P_{app}$  上昇は OATP では説明できなかった。Temocapril の pI 値は 3.69 であり<sup>37)</sup>、Fig. 5 に示すように溶液中の分子型の割合は pH が低い方で大きい。したがって、Temocapril は OATP の基質になるものの寄与は小さく、pH6.0 の条件での膜透過性向上の原因は、ほとんどが受動拡散によることが示唆された。



**Fig. 5 Molecular species of temocapril in various pH of solutions**

## 2-5 Temocapril の排出に関わる輸送担体の検討

2-2 の結果から、Temocapril は AP 側に排出されることが示された。Caco-2 細胞には P-gp, MRPs, BCRP の発現が確認されている<sup>59)-62)</sup>。そこでこれらの阻害剤を用いて Temocapril の排出に関与する輸送担体の同定を行った。

**Table 6 Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of temocapril across Caco-2 cell monolayers with efflux transporter inhibitors**

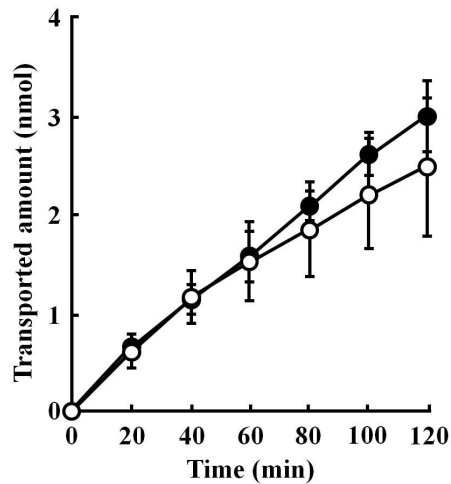
	Ratio of $P_{app}$	Inhibited ratio
	BL → AP / AP → BL	%
<b>Control</b>	<b>5.72</b>	
<b>GF 120918</b>	<b>2.74</b>	<b>52.1</b>
<b>Quinidine</b>	<b>2.69</b>	<b>53.0</b>

阻害剤として、P-gp/BCRP 阻害剤である GF120918<sup>21), 63), 64)</sup>, P-gp 阻害剤である Quinidine<sup>16), 20), 65)</sup>を用いて阻害実験を行った。結果を Table 6 に示す。尚、阻害剤は AP, BL 側に共存させて実験を行った。GF120918 添加時および Quinidine 添加時のどちらにおいても AP→BL の透過と BL→AP の透過に関する  $P_{app}$  の比が約 2.7 となり、Temocapril は P-gp によって排出を受けることが示唆された。

## 2-6 親薬物 Temocaprilat の Caco-2 細胞単層膜における吸収動態

親薬物である Temocaprilat の膜透過性を Caco-2 単層膜透過実験で評価した。Temocapril は Temocaprilat の膜透過性改善のために 2 つのカルボン酸のうちの一つをエチルエステル化することで、pH7.4 緩衝液における *n*-octanol 分配係数が  $\log P_{ow} = -2.5$  から  $-0.1$  になり疎水性の上昇に成功した<sup>67)</sup>。したがって Temocaprilat の Caco-2 細胞単層膜の膜透過性は Temocapril より小さいと考えられる。

Caco-2 細胞単層膜の AP 側, あるいは BL 側に Temocaprilat 100  $\mu$ M を添加し、経時的に透過した薬物量を測定した。Fig. 6 に透過薬物量の時間推移を、また、Table 7 に Temocaprilat の見かけの膜透過係数 ( $P_{app}$ ) を示す。



**Fig. 6 Transport of temocaprilat through Caco-2 cell monolayers**

Open circles show the transported amount into BL side applied temocaprilat on AP side. Closed circles show the transported amount into AP side applied temocaprilat on BL side. Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

**Table 7 Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of temocaprilat across Caco-2 cell monolayers**

	$P_{app}$ ( $10^{-7}$ cm/sec)
<b>AP <math>\rightarrow</math> BL</b>	<b>6.52 <math>\pm</math> 0.95</b>
<b>BL <math>\rightarrow</math> AP</b>	<b>8.04 <math>\pm</math> 0.74</b>

Values represent mean  $\pm$  S.D.

親薬物の Temocaprilat の  $P_{app}$  は AP $\rightarrow$ BL 透過, および BL $\rightarrow$ AP 透過の両方向において同様の値を示したため, Temocaprilat の小腸上皮細胞における膜透過は主に受動拡散によるものと考えられた. また, Temocaprilat の  $P_{app}$  は, 細胞間隙輸送のマーカーである D-mannitol の AP $\rightarrow$ BL 透過の  $P_{app}$  ( $1.1 \times 10^{-7}$  cm/sec)<sup>68), 69)</sup> と同じオーダーであることから, Temocaprilat の小腸粘膜透過性は非常に低いと考えられた. 同じ ACE 阻害剤である Enalapril の親薬物 Enalaprilat の AP $\rightarrow$ BL 透過

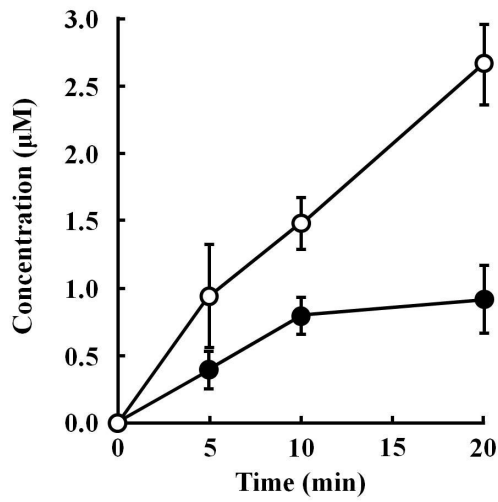
の  $P_{app}$  は  $6.2 \times 10^{-7}$  cm/sec であり, ヒトに経口投与した時の吸収率は 10% 以下である<sup>70)</sup>. したがって, Temocaprilat を経口投与した場合の吸収率も低いことが推測された. この Temocaprilat の低い膜透過性は Temocaprilat の物理化学的特性に依存するものであり, 脂質二重層における溶解拡散過程が律速であると考えられた.

## 2-7 Temocapril および Temocaprilat の Caco-2 細胞外への移行特性

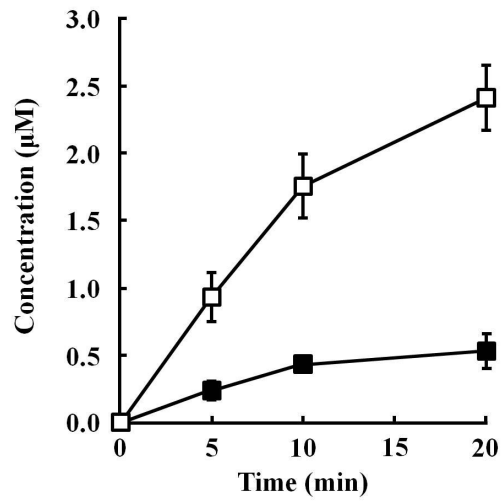
Temocapril は AP 側の efflux トランスポーターによって排出を受けることが明らかになった. Temocaprilat については, 透過実験からは efflux トランスポーターの関与は認められなかった. 一方で, Caco-2 細胞は微絨毛突起 (microvilli) を持った刷子縁膜を保持しているため, 刷子縁膜の表面積は基底膜の表面積よりも大きくなっており<sup>71), 72)</sup>, 栄養など体に必要な物質の吸収を容易にしている. その表面積の差の存在は細胞内で作られた物質を受動拡散によって細胞外に送り出す際に, 刷子縁膜側に優先的に排出する可能性がある. そこで, 細胞内に Temocapril を取り込ませ, 生成した Temocaprilat の細胞外への移行性について評価した. また, Temocapril の細胞外排出については, BNPP 処理した Caco-2 細胞内に Temocapril を取り込ませ, 細胞外の Temocapril を除去した後に分泌される Temocapril を測定した.

Temocapril および Temocaprilat の経時的な細胞外への移行を Fig. 7 に示し, Table 8 に 20 min 後の細胞外濃度を示す.

a) Temocaprilat



b) Temocapril



**Fig. 7 Efflux of temocapril and temocaprilat from Caco-2 cell monolayers**

a) Efflux of Temocaprilat from the cell not treated with BNPP

b) Efflux of Temocapril from the cell treated with BNPP

Open symbols show on AP side and closed symbols show on BL side. Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

**Table 8 Concentration of temocapril and temocaprilat in each compartment of Caco-2 cell monolayers after 20min**

	Without BNPP	With BNPP
	Temocaprilat ( $\mu M$ )	Temocapril ( $\mu M$ )
AP	2.73 $\pm$ 0.69	2.41 $\pm$ 0.24
BL	0.92 $\pm$ 0.25	0.53 $\pm$ 0.13
AP / BL	2.98	4.56

Values represent mean  $\pm$  S.D.

Fig. 7に示されるように、Temocapril, TemocaprilatともにAP側への排出量が多かった。Temocaprilatは実験開始5min後からAP側濃度がBL側に比べて高く、20 min後にはBL側の約3倍高い濃度を示した。したがってTemocaprilatは膜表面積の影響により、AP側に3倍優先的に排出されるといえる。

一方Temocaprilは実験開始20 min後にはAP側でBL側の4.56倍高い濃度を示し、Temocaprilatよりも高い割合でAP側に排出されたことから、AP膜上に発現するeffluxトランスポーターに認識されたといえる。この結果は、2-2および2-5で得られた、TemocaprilがAP側に発現しているeffluxトランスポーターに認識され、細胞外へ排出されるという結果を支持した。

## 2-8 小括

1. Temocaprilの膜透過性は高く、Temocaprilatと比べて疎水性が上昇したことによって膜透過性が改善したと考えられた。しかし、AP膜に発現しているeffluxトランスポーターのP-gpが寄与し、優位に排出を受けていた。また他のeffluxトランスポーターの寄与も考えられた。一方で、AP膜で吸収方向のトランスポーターであるPEPT1の基質にはならずOATPの基質になった。しかし、pH6.0で高い膜透過性を示したのは受動拡散に起因するところが大きかった。
2. Temocaprilatの膜透過性は非常に低く、またトランスポーターの関与は見られなかった。Temocaprilatの膜透過は受動拡散によるものだと考えられた。
3. TemocaprilおよびTemocaprilatの排出実験によって、AP膜とBL膜の膜表面積の差に起因する3倍程度のAP側優先的な排出が見られた。Temocaprilの排出は膜表面積の影響とトランスポーターの働きにより、4.56倍のAP側への排出性が示された。



## 第3章 ラット空腸 *in situ* 実験における Temocapril の吸収挙動

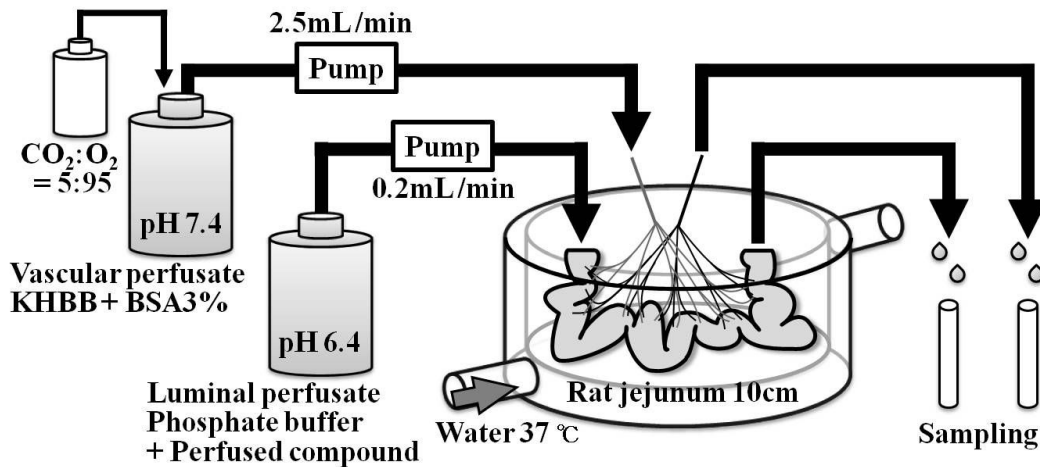
### 3-1 序

前章において、Temocapril と Temocaprilat の膜透過について詳細を調べ、それぞれの膜透過機構を解明した。本章ではラット小腸を用いた *in situ* single-pass 実験により Temocapril の小腸吸収動態を明らかにし、Caco-2 細胞実験から得られた結果と考え合わせて、Temocapril の吸収動態の詳細を明らかにすることを目的とした。

Caco-2 細胞とは異なり、小腸の運動性、非攪拌水層、血流など生理状態を保持した状態で評価するため、*in situ* single-pass 実験を行った。また、ラットなどの齧歯類には血液中にエステラーゼが高発現するため<sup>32)-34)</sup>、血液を灌流液に置換して血液中の加水分解を解消した条件下で、小腸のみの吸収動態を解析した。また、小腸粘膜内生成物の粘膜外移行について調べるため、Temocapril 以外に Isovaleryl-propranolol (IV-PL) を同様に灌流し、評価した。

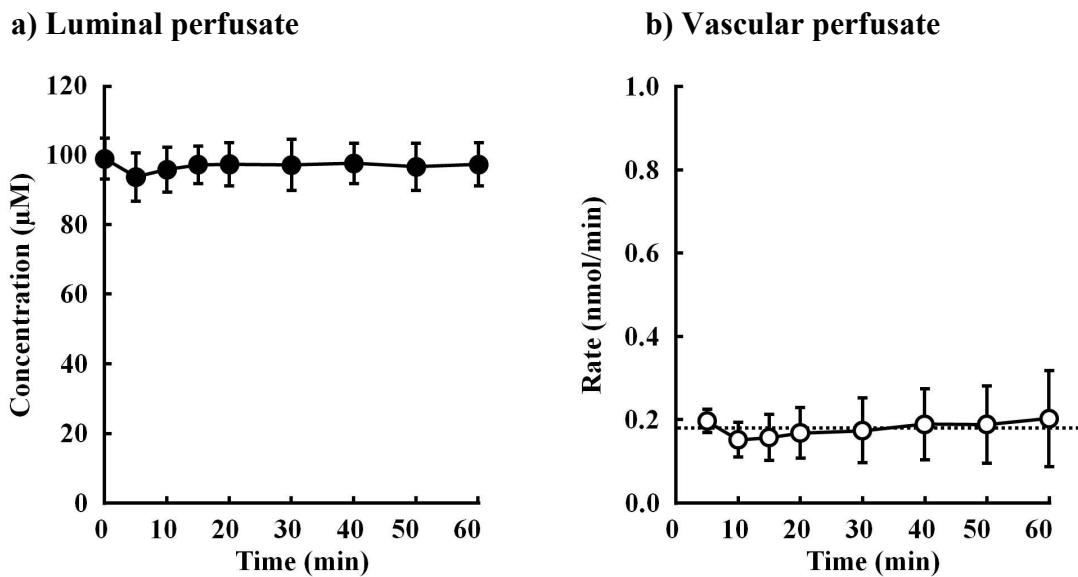
### 3-2 Temocaprilat の single-pass 灌流における吸収動態

single-pass 実験法の模式図を Fig. 8 に示す<sup>24)-31)</sup>。空腸の両端にカニューレを挿入し、空腸上部から下部に向けて管腔内に薬液を流速 0.2 mL/min で灌流した。また、腸管ループに供給されている血管を確保し、腸間膜動脈と門脈にカニューレを挿入し、流速 2.5 ml/min で灌流した。腸管下部および門脈に挿入したカニューレより経時的に灌流液中の薬物濃度を測定し、腸管の薬物の減少量および腸間膜静脈に到達した薬物量が一定になった定常状態における吸収挙動を解析した。



**Fig. 8** Scheme of rat jejunal single-pass perfusion experiments

まず、親薬物である Temocaprilat 100  $\mu\text{M}$  (pH6.4) を腸管腔内に灌流したときの、腸間膜静脈への Temocaprilat の出現速度 ( $v_2$ ) および腸管腔内の Temocaprilat 濃度の経時変化を Fig. 9 に示す. Temocaprilat の血管出現速度 ( $v_2$ ) は血管灌流液の灌流速度と薬物濃度から算出し、サンプル回収時間ごとにプロットした.



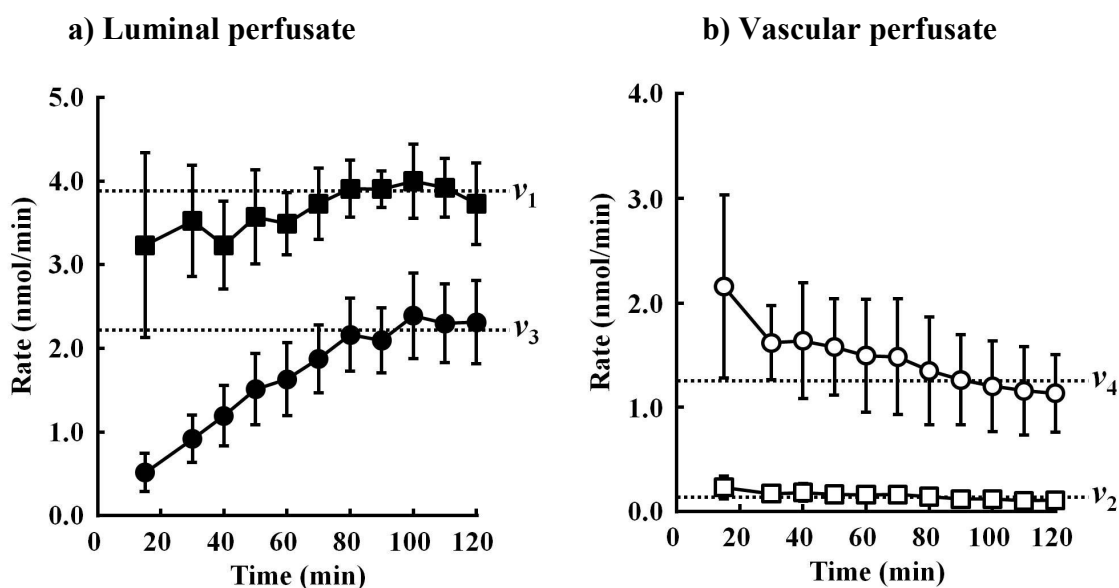
**Fig. 9** Absorption of temocaprilat in rat jejunal single-pass perfusion

- a) Concentration of temocaprilat in jejunal lumen
  - b) Appearance rate of temocaprilat into mesenteric vein
- Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

腸管腔内の Temocaprilat 濃度はほぼ一定であり，Temocaprilat はほとんど吸収されないことが示された．これは Caco-2 細胞から得られた低い膜透過性の結果と一致した．また，腸間膜静脈への出現速度 ( $v_2$ ) は，灌流開始後，約 10 min で定常状態に達し， $0.19 \pm 0.10$  nmol/min であった．Caco-2 細胞実験から得られた結果と考え合わせると，Temocaprilat はその疎水性の低さのために膜透過性が悪く，また，トランスポーターによって吸収されることもなく，受動拡散によってわずかに取り込まれた Temocaprilat が血管腔に出現することが確認された．

### 3-3 Temocapril の single-pass 灌流における吸収動態

single-pass 灌流法を用いて，プロドラッグである Temocapril の吸収動態を検討した．腸管腔内に Temocapril 100  $\mu$ M (pH6.4) を灌流し，腸管腔内からの Temocapril の消失速度 ( $v_1$ ) および腸管腔への加水分解産物 Temocaprilat の出現速度 ( $v_3$ ) を経時的にプロットした結果を Fig. 10-a に，また腸間膜静脈への Temocapril および Temocaprilat の出現速度を経時的にプロットした結果を Fig. 10-b に示す．ここで，腸管腔からの Temocapril の消失速度 ( $v_1$ ) および腸管腔への Temocaprilat の出現速度 ( $v_3$ ) は，腸管灌流液の灌流速度と各薬物濃度から算出し，腸間膜静脈への Temocapril の出現速度 ( $v_2$ ) および Temocaprilat の出現速度 ( $v_4$ ) は血管灌流液の灌流速度と各薬物濃度から算出した (第 3 章に関する実験の部; *in situ* 腸管灌流実験の定常状態における速度論解析 参照)．また，速度論的パラメーターとして見かけの膜透過係数 ( $P_{\text{eff}}$ )，プロドラッグの吸収クリアランス ( $CL_{\text{abs}}$ )，加水分解クリアランス ( $CL_{\text{deg}}$ ) を，実験の部 (第 3 章に関する実験の部; *in situ* 腸管灌流実験の定常状態における速度論解析) に示す式を用いて算出した．



**Fig. 10 Absorption of temocapril in rat jejunal single-pass perfusion**

- a) Disappearance rate of temocapril ( $v_1$ ; closed squares) and appearance rate of temocaprilat in jejunal lumen ( $v_3$ ; closed circles)  
 b) Appearance rate of temocapril ( $v_2$ ; open squares) and temocaprilat into mesenteric vein ( $v_4$ ; open circles)  
 Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

Fig. 10 に示すように Temocapril を 100  $\mu$ M の濃度で灌流開始後、約 70 min で定常状態に達した. Temocapril の腸管腔からの消失速度 ( $v_1$ ) は 3.89 nmol/min となり、 $P_{\text{eff}}$  は  $3.43 \times 10^{-3}$  cm/min と算出された. この値は、ヒトの吸収率との相関性により<sup>26)</sup>、経口投与時にヒト小腸でほぼ 100% 吸収されることを示し、膜透過性は良いと考えられた. Temocapril の血管腔への出現速度 ( $v_2$ ) は 0.147 nmol/min と、取り込まれた Temocapril のわずか 3.7% であった. 一方、Temocaprilat の血管腔への出現速度 ( $v_4$ ) は 1.22 nmol/min であり、血管腔へ移行した薬物の 90% が加水分解により生成した Temocaprilat であった. さらに、Temocaprilat は腸管腔にも 2.25 nmol/min で出現 ( $v_3$ ) した. クリアランスから算出した腸管一回通過時の加水分解率  $CL_{\text{deg}} / (CL_{\text{deg}} + CL_{\text{abs}})$  は 0.957 となり、空腸粘膜中に移行した Temocapril がほぼ完全に加水分解することが示された. したがって、Temocaprilat の粘膜内濃度は 18.1 nmol/g tissue と Temocapril の 1.83 nmol/g tissue

よりも 10 倍高く、加水分解した Temocaprilat の粘膜内濃度は腸管腔および血管腔よりも高いために、受動拡散によって粘膜外へ移行しやすいものと考えられた。さらに、Temocaprilat の pI 値は 2.75 であり、pH 分配仮説に従うと粘膜内の Temocaprilat は腸管腔 (pH6.4) よりも血管腔 (pH7.4) に移行しやすいと考えられる<sup>37)</sup>。しかし、実際には Temocaprilat の粘膜外移行は腸管側 ( $v_3$ ) に 2.25 nmol/min, 血管側 ( $v_4$ ) に 1.22 nmol/min で排出され、腸管側に約 2 倍大きく移行した。Caco-2 細胞実験の結果と同様に、刷子縁膜に存在する微絨毛による表面積の増大が原因で腸管腔へ優先的に排出されたものと考えられる。

以上のように、Temocapril はその疎水性のために、受動拡散によって小腸粘膜内によく取り込まれることが示された。また、粘膜内に移行した Temocapril はほとんどが加水分解されるために、Temocapril のまま血管腔へ移行することは少なく、加水分解により生成した Temocaprilat は表面積と pH 分配仮説に従って、腸管腔と血管腔の両方に受動拡散により移行することが明らかとなった。

#### 3-4 single-pass 灌流における粘膜内生成親薬物の粘膜外移行特性

3-3 において、Temocaprilat は血管腔よりも腸管腔へ約 2 倍大きく移行した。2-7 の Caco-2 細胞の Temocaprilat 排出実験においても同じように刷子縁膜側へ優先的な排出がおり、刷子縁膜における膜表面積が大きいことに起因して受動拡散による移行が多かったと考えられた。そこで、小腸粘膜の膜表面積の大きさを検証するため、腸管灌流液と血管灌流液を pH7.4 にして、膜表面積の影響を明らかにした。また、比較対象として受動拡散で膜移行する Propranolol (PL) を生成親薬物とし<sup>24), 73)</sup>、そのプロドラッグの Isovaleryl-propranolol (IV-PL) を灌流した。結果を Table 9 に示す。

**Table 9 Excretion of metabolites from rat mucosa in single-pass perfusion at identical pH both luminal and vascular perfusates**

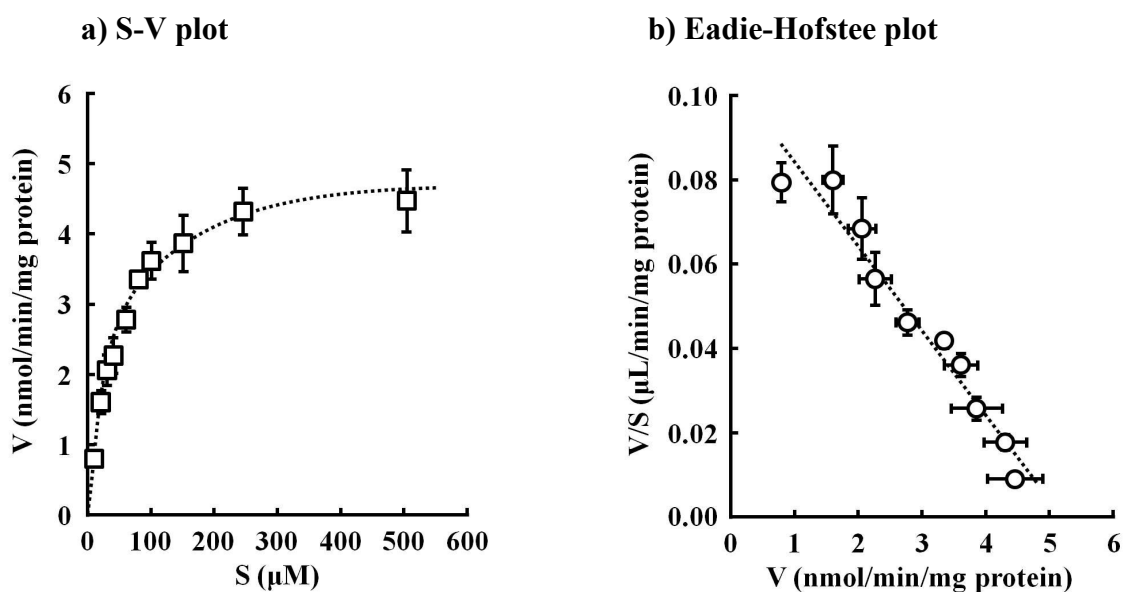
Perfused compound	Measured compound	Lumen	Vessel	Ratio of rate
		<i>nmol/min</i>	<i>nmol/min</i>	Lumen/ Vessel
Temocapril	Temocaprilat	2.76 ± 0.208	0.981 ± 0.486	2.81
Isovaleryl-propranolol	Propranolol	0.672 ± 0.094	0.173 ± 0.024	3.88

Values represent mean ± S.D.

Temocapril を灌流すると、定常状態において粘膜内で生成された Temocaprilat は腸管側には 2.76 nmol/min, 血管側には 0.981 nmol/min の速度で現れ, 腸管腔に 2.81 倍大きい速度で出現した. これは 2-7 の Caco-2 細胞排出実験で得られた結果と一致する. また, IV-PL を灌流したところ, 受動拡散のみで膜透過する PL は腸管側に 3.88 倍多く移行しており. 表面積は刷子縁膜が基底膜の 4 倍程度であると考えられた. Temocaprilat の場合, 出現速度の比は約 3 倍であり, 基底膜に存在するトランスポーターの関与も考えられるが詳細は不明である.

### 3-5 ラット空腸 S9 における Temocapril 加水分解活性

3-3 において, ラット空腸で Temocapril が顕著な加水分解を受けた. そこで本項では, 小腸粘膜ホモジネート 9,000×g 上清 (S9) を用いて, 加水分解活性を求めた. ラットの空腸 S9 における加水分解を Temocapril 10-500 μM の基質濃度で検討し, 酵素速度論的パラメーターを算出した. 横軸に基質濃度 (Substrate concentration; μM), 縦軸にタンパク量当たりの反応速度 (Velocity of reaction; nmol/min/mg protein) をとった S-V プロットの結果を Fig. 11-a に示す, 基質濃度が高くなるにつれ, 反応速度上昇率が減少し, 飽和現象が観察された.



**Fig. 11 S-V plot and Eadie-Hofstee plot of temocapril in rat jejunum S9**

Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

また、測定には S9 を用いており複数の酵素の関与や非特異的な加水分解を考慮する必要があるため、Eadie-Hofstee プロット解析を行い加水分解に関わる成分の解析を行った。その結果を Fig. 11-b に示す。ラット空腸 S9 における Temocapril の加水分解には非特異的な代謝の関与はほとんどなく、Temocapril の加水分解に関与する酵素は 1 種類のみか、同程度の  $K_m$  値を有する複数の酵素が関与していると考えられた。そこで、非線形最小二乗法プログラム MULTI を用いて Michaelis-Menten 式より  $K_m$  と  $V_{\max}$  値を算出した<sup>74)</sup>。その結果、 $K_m$  は 47.3  $\mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  は 5.11 nmol/min/mg protein となった。 $K_m$  値は酵素と基質の親和性を示し、小さいほど親和性が高い。また、粘膜細胞に取り込まれた Temocapril は加水分解固有クリアランス ( $CL_{\text{int}}$ ) にしたがって代謝される。 $CL_{\text{int}}$  は  $K_m$  と  $V_{\max}$  を用いて次式にて算出した。

$$CL_{\text{int}} = \frac{V_{\text{max}}}{K_m + [S]}$$

$V_{\text{max}}$  ; 最大反応速度

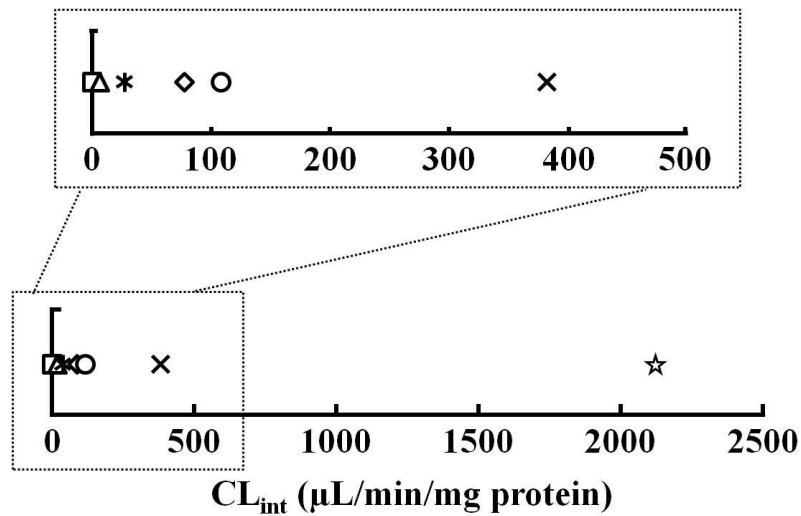
$K_m$  ; Michaelis 定数

$CL_{\text{int}}$  ; 加水分解固有クリアランス

Temocapril の粘膜内濃度は定常状態で 1.83 nmol/g tissue であり,  $CL_{\text{int}}$  は 104  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protein となった. 一般的に肝臓や小腸などの代謝部位においては, 代謝される薬物の酵素近傍での濃度は  $K_m$  値に比べて極めて小さく,  $CL_{\text{int}}$  は  $V_{\text{max}}/K_m$  として近似できる. 空腸における  $CL_{\text{int}}$  ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) は S9 蛋白質あたり  $108 \pm 7.70$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protein という固有クリアランスに従って Temocapril を加水分解するものと考えられた.

今回得られたラット空腸 S9 における Temocapril の加水分解固有クリアランス ( $CL_{\text{int}}$ ; 108  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protein) がどの程度の大きさなのか, また, 小腸での加水分解との関係性はどうかを調べるために, 既存の医薬品を含む 6 種類のエステルプロドラッグ (Oseltamivir, Aspirin<sup>75)</sup>, Cefditren pivoxil<sup>76)</sup>, Isovaleryl-propranolol, Ethyl-fexofenadine, Butyl-*p*-aminobenzoic acid) の  $CL_{\text{int}}$  を求め比較した. その結果を Fig. 12 に示す. Temocapril の  $CL_{\text{int}}$  は 3 番目に大きい値であったが,  $CL_{\text{int}}$  の大きい Isovaleryl-propranolol, Cefditren pivoxil よりも,  $CL_{\text{int}}$  の小さな Oseltamivir, Aspirin, Butyl-*p*-aminobenzoic acid, Ethyl-fexofenadine に近かった. そのため, Temocapril の  $CL_{\text{int}}$  は比較的小さな値ではあると判断できたが, 小腸通過時に 100% 近く加水分解されるという興味深い結果が得られた.





**Fig. 12 Intrinsic clearance for hydrolysis of several esters in rat jejunum S9**

The symbols show that square; oseltamivir, triangle; aspirin, asterisk; butyl-*p*-aminobenzoic acid, diamond; ethyl-fexofenadine, circle; temocapril, cross; cefditren pivoxil and star; isovaleryl-propranolol.

### 3-6 小括

1. Temocaprilat のラット小腸吸収では、膜透過性の低さのためほとんど吸収が見られなかった。
2. Temocapril のラット小腸吸収では、Temocapril が粘膜内に取り込まれたのち、著しい加水分解を受け、小腸一回通過時の加水分解率は 0.957 と算出された。そのため、Temocapril の粘膜内濃度は低くなり、Temocapril のまま血管腔に移行する割合は 10% 程度だった。一方で粘膜内の Temocaprilat 濃度は Temocapril の 10 倍も高くなり粘膜外移行が見られたが、血管腔よりも腸管腔に 2 倍多く移行し、膜表面積に起因した腸管腔優先的な排出を受けたと考えられた。

3. 粘膜内生成物の粘膜外移行に関して、pH 分配仮説を無視できる条件下の single-pass 実験により Temocaprilat と PL の輸送を検討したところ、刷子縁膜と基底膜の膜表面積差による腸管排出は 4 倍と算出された。粘膜外移行には、膜表面積、トランスポーター、pH 分配仮説といった複数の要因が影響することが示された。また、single-pass 実験の結果から考察すると、膜表面積の影響が大きく腸管に排出される薬物が多いと考えられた。
  
4. Temocapril のラット空腸における加水分解の速度論的パラメーターは、 $K_m$  が  $47.3 \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}}$  が  $5.11 \text{ nmol/min/mg protein}$  となり、加水分解固有クリアランス  $\text{CL}_{\text{int}}$  は S9 蛋白質あたり  $108 \mu\text{L/min/mg protein}$  と算出された。Temocapril はラット小腸で加水分解されるプロドラッグとしては  $\text{CL}_{\text{int}}$  の比較的小さい化合物に分類されたが、ラット小腸通過時に 100% 近く加水分解された。

## 第4章 ラット空腸 *in situ* 実験を用いた pH 制御による Temocapril の小腸吸収部位の検討と、加水分解の制御によるヒト小腸吸収モデリング

### 4-1 序

第2章で Temocapril と Temocaprilat の膜透過について詳細に検討し、第3章において Temocapril の基本的な小腸吸収動態を明らかにした。本章ではヒトの *in vivo* での Temocapril の吸収動態を予測する。

ヒトの小腸は上部から下部にかけて、pH が 5.5 から 7.5 に上昇することが報告されており<sup>77)-80)</sup>、その pH 変化が Temocapril の吸収に影響を及ぼすことが考えられる。Temocapril は pI が 3.69 であり<sup>37)</sup>、pH が低く分子型が多い小腸上部で粘膜内取り込みが増える可能性がある。そのため、Temocapril の粘膜内濃度が高まり、 $CL_{int}$  の低下や Temocapril の血管腔移行の上昇がおこるかもしれない。粘膜内濃度や加水分解の変化により生成 Temocaprilat 量も変わるため、粘膜外移行も変化するだろう。そこで、*in situ* single-pass 灌流法の利点の一つである灌流液の選択において、腸管灌流液を pH5.4, pH6.4, pH7.4 とし、ヒト小腸上部、中部、下部の pH に近い状態で小腸吸収動態を解析することで Temocapril の吸収部位を明らかにした。

また、Temocapril はラット小腸 S9 で加水分解されたが、ヒト小腸 S9 ではほとんど加水分解されないという報告がなされている<sup>22), 43)</sup>。したがって、小腸 S9 に発現している酵素の種差によって、ラットの腸では加水分解されたと考えられる。そのため、第3章で得られた結果はヒト小腸における Temocapril の吸収動態を示していない。そこで、本章ではラット小腸 S9 で Temocapril の加水分解に関わる酵素を明らかにし、その活性を抑制することで小腸の加水分解活性をヒトに近付けたヒト小腸モデルを作成し、Temocapril のヒト小腸における吸収動態を明らかにした。

#### 4-2 pH の異なる腸管灌流液を用いた *in situ* 実験による小腸吸収部位の検討

栄養素の吸収だけではなく医薬品の吸収においても小腸 pH は重要な意味を持ち<sup>77)-80)</sup>、ヒトの小腸では上部から下部にかけて pH が 5.5 から 7.5 に上昇することが分かっている<sup>78)</sup>。Temocapril の場合は Caco-2 細胞透過実験の結果に示されたように、低 pH の方が高 pH より Temocapril の膜透過性が高い。これは Temocapril の分子種に依存したもので<sup>37)</sup>、Fig. 5 に示したように低 pH で分子型の割合が増加するためである。また、pH 変化に伴い Temocapril の膜透過性が変わることで粘膜内取り込み量や粘膜内濃度に変化し、加水分解や Temocaprilat の粘膜外移行にまで影響する可能性がある。そこで腸管灌流液を pH5.4, pH6.4, pH7.4 としそれぞれの吸収動態を解析し、Temocapril の吸収部位を検討した。結果を Table 10 に示す。

**Table 10 Absorption of temocapril in the several pH conditions of luminal perfusates in rat jejunal single-pass perfusion experiments**

Luminal pH		pH5.4	pH6.4	pH7.4
$v_1$	(nmol/min)	4.82 ± 0.50	3.89 ± 0.28	3.45 ± 0.33
$v_2$	(nmol/min)	0.353 ± 0.160	0.147 ± 0.081	0.105 ± 0.024
$v_3$	(nmol/min)	1.19 ± 0.38	2.25 ± 0.27	2.76 ± 0.17
$v_4$	(nmol/min)	1.99 ± 1.01	1.22 ± 0.52	0.918 ± 0.486
$P_{\text{eff}}$	( $\times 10^{-3}$ cm/min)	4.56 ± 0.67	3.42 ± 0.27	3.25 ± 0.30
$CL_{\text{deg}}$	( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	34.4 ± 9.32	35.4 ± 3.97	43.2 ± 6.08
$CL_{\text{abs}}$	( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	3.59 ± 0.93	1.59 ± 0.86	1.23 ± 0.27
$CL_{\text{deg}} / (CL_{\text{deg}} + CL_{\text{abs}})$		0.900 ± 0.032	0.957 ± 0.020	0.972 ± 0.008
<b>Intracellular concentration (nmol/g tissue)</b>				
	<b>Temocapril</b>	5.46 ± 0.35	1.83 ± 0.90	1.02 ± 0.37
	<b>Temocaprilat</b>	34.2 ± 2.62	18.1 ± 4.57	17.6 ± 3.16

Values represent mean ± S.D.

Temocapril の腸管からの消失速度 ( $v_1$ ) は pH5.4 のとき 4.82 nmol/min となり、pH 上昇に伴って低下した。また、 $v_1$  に応じて  $P_{\text{eff}}$  も pH5.4 で  $4.56 \times 10^{-3}$  cm/min

と最大だった. 一方で pH6.4 と pH7.4 で差は見られなかった. これは, Temocapril の腸管灌流液中における分子型の割合が, pH6.4 では 1.60%, pH7.4 では 0.16% と低いのに比べ, pH5.4 では 13.9% と高いためだと考えられた (Fig. 5)<sup>37)</sup>. Temocapril の粘膜内取り込み量に依存して, 粘膜内 Temocapril 濃度は高くなり, その結果, Temocapril の血管腔への出現速度 ( $v_2$ ) が pH5.4 で最大となったが, その速度は 0.353 nmol/min に留まった. また, 加水分解クリアランス ( $CL_{deg}$ ) は腸管腔 pH による変動は小さく. そのため,  $CL_{deg} / (CL_{deg} + CL_{abs})$  から求めた粘膜内加水分解率は, pH5.4 で低くなった.

粘膜内で生成した Temocaprilat は, 膜表面積と pH 分配仮説に従って移行する. Temocaprilat はその pI 値 (2.75) により, 低 pH から高 pH 側に移行する特徴を持つ. したがって Temocaprilat が最も血管腔へ移行するのは腸管腔が pH5.4 の条件だと考えられた. 実際に pH5.4 では Temocapril の血管吸収 ( $v_4$ ) は腸管排出 ( $v_3$ ) より 1.7 倍大きいのに対し, pH6.4, pH7.4 では腸管腔に排出されており, pH5.4 においてのみ吸収が分泌を上回った. また, 3-4 で既述したように, 腸管腔, 血管腔が pH7.4 のときは腸管腔排出が約 3 倍大きく, これは刷子縁膜に存在する微絨毛によって膜表面積が大きいためと考えられる. 以上のように, 小腸上部の pH5.4 付近では Temocapril の膜透過性の上昇, Temocapril の血管腔移行の増加および Temocaprilat の優先的な血管腔移行により吸収が大きくなる. しかし, 小腸管腔の pH が 6.4 になると, Temocapril の膜透過性は低下し, 加水分解した Temocaprilat も腸管腔に多く排出され, 吸収率は低下すると考えられた.

#### 4-3 CES 阻害ラット空腸を用いた *in situ* 実験によるヒト小腸モデルの評価

3-5 において, ラット空腸 S9 では Temocapril が加水分解され, 加水分解固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) は 108 nmol/min/mg protein であった. このラット空腸 S9 の Temocapril 加水分解に寄与する酵素について同定を行ったところ, CES 特異的阻害剤 Bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP) 1 mM 処理により活性が 88% 阻害され, CES がラットの空腸加水分解の大部分に関わっていることがわかった. ラ

ットの小腸には CES2 ファミリーに属する 3 種のアイソザイム (D50580, AY034877, AB010635) の発現が報告されている<sup>81)-83)</sup>. Temocapril はヒトの小腸に存在する CES2 アイソザイム (hCE2) では、ほとんど加水分解しないとされているが、ヒトとラットにおいては CES の基質認識性に種差があり<sup>84)</sup>, ラット CES2 では Temocapril を基質としていると考えられた.

ヒトとラット小腸の加水分解の違いは CES 活性に起因することから、CES の特異的阻害剤である BNPP を用い、Masaki らの方法に従ってラット小腸 CES を阻害し、ヒト小腸モデルを作製した. ラットの空腸を 400  $\mu$ M BNPP で 40 min 前灌流し、pH5.4 と pH6.4 で Temocapril の吸収を評価した. 以前の報告により、BNPP による前灌流は、他の酵素や腸管運動性などへの影響がないことが分かっている<sup>31)</sup>. 結果を Table 11 に記し、BNPP 未処理時の結果 (Table 10) と比較する.

**Table 11 Absorption of temocapril in rat jejunal single-pass perfusion under preperfusion with BNPP**

Luminal pH		pH5.4	pH6.4
$v_1$	(nmol/min)	2.98 $\pm$ 0.24	2.44 $\pm$ 0.81
$v_2$	(nmol/min)	0.862 $\pm$ 0.046	0.696 $\pm$ 0.072
$v_3$	(nmol/min)	1.01 $\pm$ 0.11	1.17 $\pm$ 0.17
$v_4$	(nmol/min)	1.01 $\pm$ 0.06	0.604 $\pm$ 0.139
$P_{eff}$	( $\times 10^{-3}$ cm/min)	2.99 $\pm$ 0.15	2.32 $\pm$ 0.11
$CL_{deg}$	( $\mu$ L/min)	24.9 $\pm$ 3.43	19.5 $\pm$ 1.71
$CL_{abs,}$	( $\mu$ L/min)	10.6 $\pm$ 1.11	7.64 $\pm$ 0.59
$CL_{deg} / (CL_{deg} + CL_{abs})$		0.701 $\pm$ 0.012	0.718 $\pm$ 0.030
<b>Intracellular concentration (nmol/g tissue)</b>			
	<b>Temocapril</b>	20.6 $\pm$ 2.37	15.4 $\pm$ 1.08
	<b>Temocaprilat</b>	17.0 $\pm$ 3.26	14.6 $\pm$ 1.23

Values represent mean  $\pm$  S.D.

腸管からの Temocapril の消失速度 ( $v_1$ ) は pH5.4, pH6.4 共に BNPP 未処理時の 60% 程度だった。そのため,  $P_{\text{eff}}$  も pH5.4 で  $2.99 \times 10^{-3}$  cm/min, pH6.4 で  $2.32 \times 10^{-3}$  cm/min と低くなった。しかしこの値であっても,  $P_{\text{eff}}$  とヒト小腸吸収率の相関性からほぼ 100% の吸収率を示すと推測された<sup>26)</sup>。CES を阻害したことで Temocapril の粘膜内濃度が pH5.4 で 20.6 nmol/g tissue, pH6.4 で 15.4 nmol/g tissue に上昇し, そのため Temocapril の粘膜内取り込みが減少し, 結果的に膜透過性の低下を招いた。粘膜内濃度の上昇に伴い Temocapril の血管出現速度 ( $v_2$ ) も 0.862 nmol/min (pH5.4), 0.696 nol/min (pH6.4) と CES 非阻害時より 2.4-4.7 倍上昇した。CL<sub>abs</sub> も同様に高くなり Temocapril のまま吸収される割合が増えた。一方, CL<sub>deg</sub> は pH5.4 では 34.4  $\mu$ L/min から 24.9  $\mu$ L/min に, pH6.4 では 35.4  $\mu$ L/min から 19.5  $\mu$ L/min に低下し, Temocaprilat の粘膜内濃度は減少した。しかしながら, CL<sub>deg</sub> / (CL<sub>deg</sub> + CL<sub>abs</sub>) から求めた加水分解率は約 0.7 で, いまだ加水分解を受けており, その結果として粘膜内 Temocaprilat 濃度の減少は 55-72% に留まり, Temocaprilat は腸管腔 ( $v_3$ ) と血管腔 ( $v_4$ ) の両方へ出現した。以上の結果から, CES 以外の加水分解酵素の関与が示唆された。

CES 阻害を施したラット小腸を用いてヒト小腸の吸収動態を解析したところ, 粘膜内 Temocapril 濃度の上昇に伴って Temocapril の膜透過性は低下したが, 吸収量としては十分であった。しかしながら, 予想に反して CES 以外の酵素によって Temocaprilat が高濃度で生成しており, ヒト小腸においても小腸吸収時に加水分解を受けていることが推察された。

#### 4-4 ラット空腸における Temocapril 加水分解への Serine protease の寄与

4-3 において、400  $\mu$ M BNPP の 40 min 前灌流では完全に Temocapril の加水分解は阻害されていなかった。そこで BNPP 灌流後の空腸粘膜成分を全て含んでいるホモジネートを調製し、空腸 S9 と共に加水分解活性を評価した。結果を Table 12 に示す。

**Table 12 Hydrolysis activities of temocapril in rat jejunal homogenates and S9 preperfused with BNPP**

	Homogenate		S9	
	Activity	Remaining activity	Activity	Remaining activity
	<i>nmol/min/mg protein</i>	%	<i>nmol/min/mg protein</i>	%
<b>Mucosa without perfusion (control)</b>	<b>4.17 <math>\pm</math> 0.43</b>	<b>0</b>	<b>4.46 <math>\pm</math> 0.14</b>	<b>0</b>
<b>Mucosa after perfusion</b>				
without BNPP	3.96 $\pm$ 0.06	100	4.28 $\pm$ 0.03	100
with BNPP	2.05 $\pm$ 0.26	51.8 $\pm$ 5.82	0.652 $\pm$ 0.111	15.2 $\pm$ 2.59

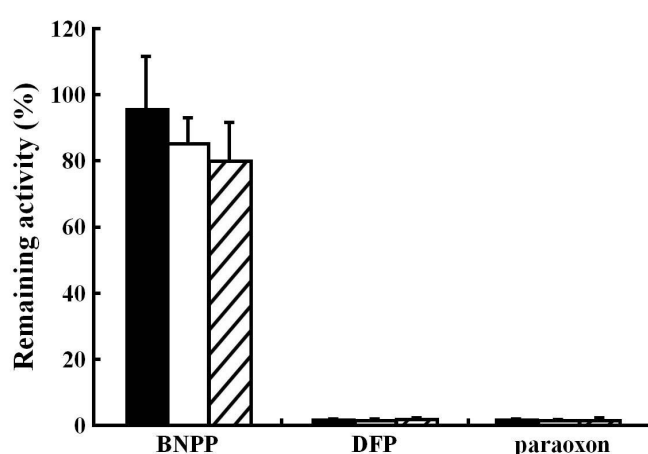
Values represent mean  $\pm$  S.D.

評価に用いたホモジネートおよび S9 サンプルは、灌流操作を加えないで調製したもの (コントロール)、BNPP 溶液の代わりに灌流液を流したもの、BNPP 溶液を灌流したものの 3 種類である。まず、灌流操作後の加水分解活性はコントロールと比較して、ホモジネートで 4.17 nmol/min/mg protein から 3.96 nmol/min/mg protein に、S9 では 4.46 nmol/min/mg protein から 4.28 nmol/min/mg protein と、わずかな減少に留まったため、灌流操作では Temocapril の加水分解活性が低下しないことを確認した。また、コントロールサンプルにおける Temocapril の加水分解活性は CES が多く存在する S9 分画で高くなり<sup>85)-87)</sup>、他のタンパクを多く含むホモジネートでは低くなるはずである。しかし、ホモジネートと S9 で同程度の値となり、S9 以外の分画に CES と同程度の活性をもつ酵素が存在することを示唆した。BNPP の灌流によって S9 の加水分解活性は 85% 低下した。この値は空腸 S9 を BNPP 1 mM で処理した時の阻害率 88% と同程度の値だった。一方で、BNPP の灌流によってホモジネートでは 52% の残存活性が見られた。つま



り、ホモジネートにおいて BNPP により阻害された 48% の活性は CES によるもので、残り 52% の活性は他の加水分解酵素によることが明らかになった。

次に、この CES 以外の Temocapril の加水分解に関与する酵素の特徴を調べるため、阻害剤として BNPP 以外に Serine protease の阻害剤である Diisopropyl fluorophosphate (DFP)<sup>88), 89)</sup>と Paraoxon<sup>89), 90)</sup>を用いて、活性の変化を評価した。BNPP 400  $\mu$ M 灌流後のホモジネートをコントロールとし、各阻害剤の濃度を変えて添加し Temocapril の加水分解活性を測定した (Fig. 13)。



**Fig. 13 Effect of several serine protease inhibitors on hydrolysis of temocapril in homogenate prepared from rat jejunum that is preperfused with BNPP**

Closed, open and hatched lined columns show the remaining activity in the presence of 10, 100, 1000  $\mu$ M of inhibitor. Values represent mean  $\pm$  S.D.

BNPP を添加してもホモジネートの活性はほとんど減少せず、BNPP 400  $\mu$ M の 40 min 灌流によってほぼ完全に CES を阻害したことを示した。また、残存活性は Serine protease 阻害剤の DFP と Paraoxon を 10  $\mu$ M 添加することでほとんど阻害された。この結果より、Temocapril は CES 以外の Serine protease によって加水分解されることが明らかになった。

#### 4-5 ヒト *in vivo* での Temocapril の吸収動態予測

4-3 において CES を阻害してヒト小腸モデルのラット小腸を作製し、Temocapril のヒト小腸吸収動態を予測、評価した。また、CES 以外の Serine protease による小腸での加水分解を明らかにした。この結果を踏まえ、*in vivo* における Temocapril の吸収を予測する。

実際に Temocapril を服用する状況を考えると、Temocapril は Temocapril 塩酸塩として 1 日 1 回 2-4 mg の錠剤を食後に経口投与される<sup>91)</sup>。4 mg の錠剤を 100 mL の水で飲んだとすると、水 100 mL 中の濃度は 78  $\mu$ M となり容易に溶解すると考えられる。食事の影響により胃内容排出時間 (GET) が長くなるため<sup>92), 93)</sup>、Temocapril は小腸上部で滞留する。また、食事により胆汁が十二指腸に分泌され pH は約 5.5 になり<sup>94), 95)</sup>、Temocapril の小腸粘膜への取り込みは促進される。粘膜内において Temocapril は 7 割程度が Serine protease によって加水分解され、Temocaprilat として腸管腔と血管腔に分泌される。しかしながら、細胞膜上の Serine protease は食物中のタンパク質により阻害される可能性が高く<sup>96), 97)</sup>、Temocapril はほとんど加水分解されずに、Temocapril のまま血管腔に移行する。そのため、Temocaprilat に変換されて腸管腔に排出される割合が低下し、実際の小腸吸収率は高まるだろう。その後、肝臓で加水分解され血中に移行し薬効を示すと予測される。

#### 4-6 小括

1. Temocapril は腸管腔 pH が低い時にラット小腸粘膜内に取り込まれやすく、pH6.4、pH7.4 よりも、pH5.4 でよく取り込まれた。また、加水分解には腸管 pH の影響は少ないが、生成した Temocaprilat は腸管腔が pH5.4 のときのみ血管腔に優位に移行し、pH6.4 と pH7.4 では腸管腔に多く移行した。

2. ラットの小腸における Temocapril の加水分解には CES が寄与することが分かった。そこで、BNPP 前灌流によって CES を阻害し、ヒト小腸モデルを作製した。この小腸において Temocapril の粘膜内取り込みが減少し、加水分解が Temocapril の取り込みを上昇させていることが示された。また、Temocapril の粘膜内濃度が上昇し Temocapril のまま血管腔に吸収される割合が増えた。加水分解は 70% 程度となり、CES 以外の酵素の寄与が考えられた。生成した Temocaprilat は腸管腔と血管腔の両方に移行した。
3. ラット空腸に BNPP を灌流させることで粘膜 S9 中の活性はほとんど阻害され、CES による加水分解の低下が確認された。しかし、ホモジネート中の活性は BNPP により 48% の阻害しか認められず、S9 分画以外に CES ではない酵素の関与が考えられた。その活性は Serine protease 阻害剤によって抑制されたことから、Serine protease の Temocapril 加水分解への関与が明らかになった。
4. ヒト小腸では食事の影響により Temocapril は小腸上部での吸収が増え、また、Serine protease が阻害されることで、Temocapril のまま吸収されると予測された。

## 第5章 エステルプロドラッグの *in vivo* 小腸加水分解予測

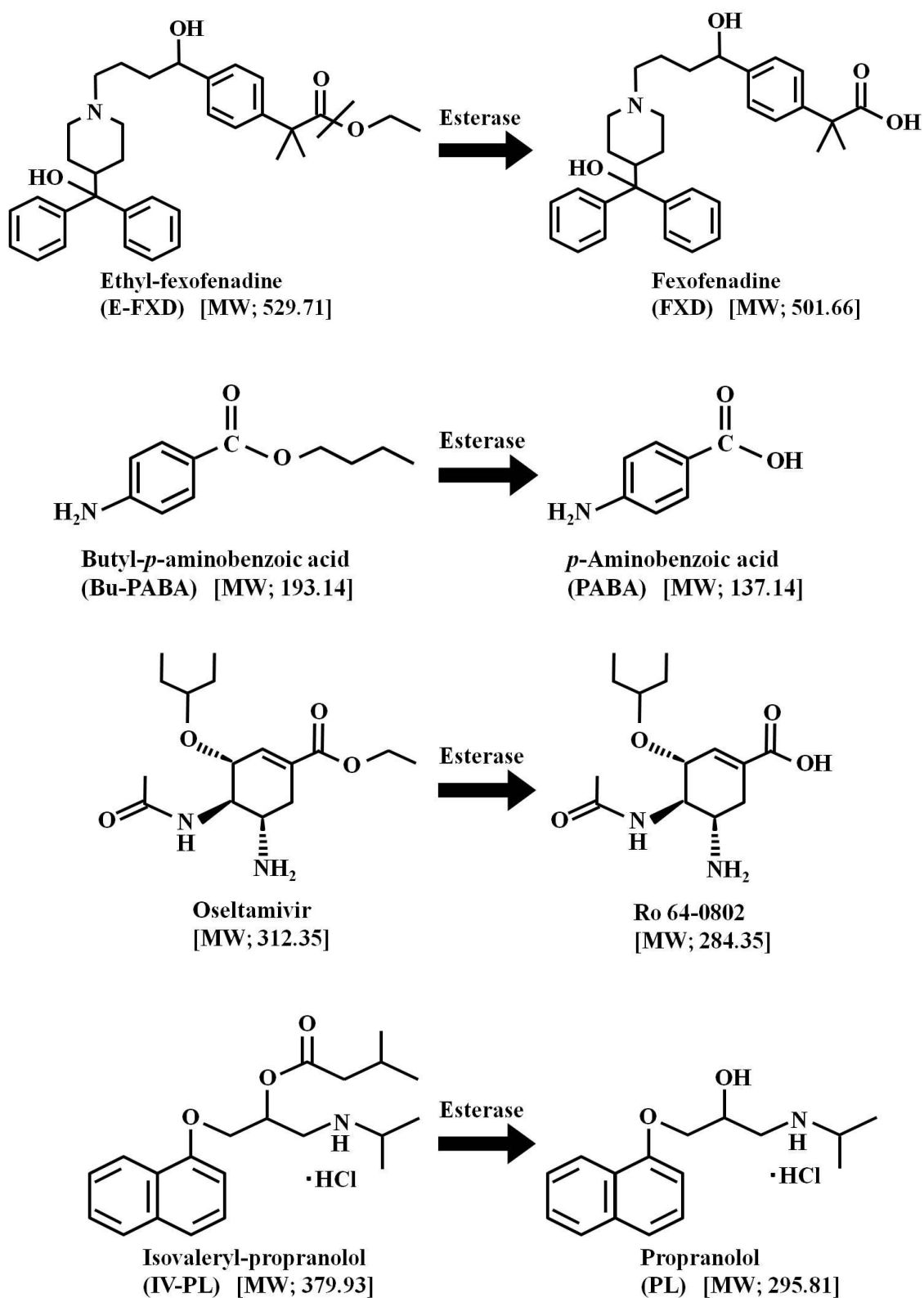
### 5-1 序

プロドラッグが小腸吸収中に粘膜内で代謝されると、生成した親薬物は刷子縁膜の表面積が広いことため腸管腔に優先的に排出されることが明らかになった。これは全薬物に対して起こること、新規プロドラッグの開発では小腸代謝を予測することが重要になる。現在の医薬品の開発段階における小腸代謝の予測は、小腸組織を用いた *in vitro* 実験による活性測定で行われている。しかし、この方法は薬物の膜透過性を考慮しておらず、小腸通過時の正確な代謝を予測することはできない。

そこで本章では、小腸吸収過程での加水分解予測法を確立するため、様々な小腸代謝活性を示す複数のエステルプロドラッグを用いて、*in vitro* 実験から加水分解固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を、*in situ* 実験から加水分解率をそれぞれ算出して相関性を検討し、*in vitro* 実験から小腸初回代謝を予測する方法の構築を試みた。

### 5-2 ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流による膜透過性の評価

評価には Temocapril, Ethyl-fexofenadine (E-FXD), Butyl-*p*-aminobenzoic acid (Bu-PABA), Oseltamivir を用いた。また、Masaki らによって報告された Isovaleryl-propranolol (IV-PL) の結果も評価に加えた<sup>30)</sup>。これらの構造式とそれぞれの親薬物の構造式を Fig. 2 および Fig. 14 に示す。



**Fig. 14 Structures of the ester prodrugs and their parent drugs**

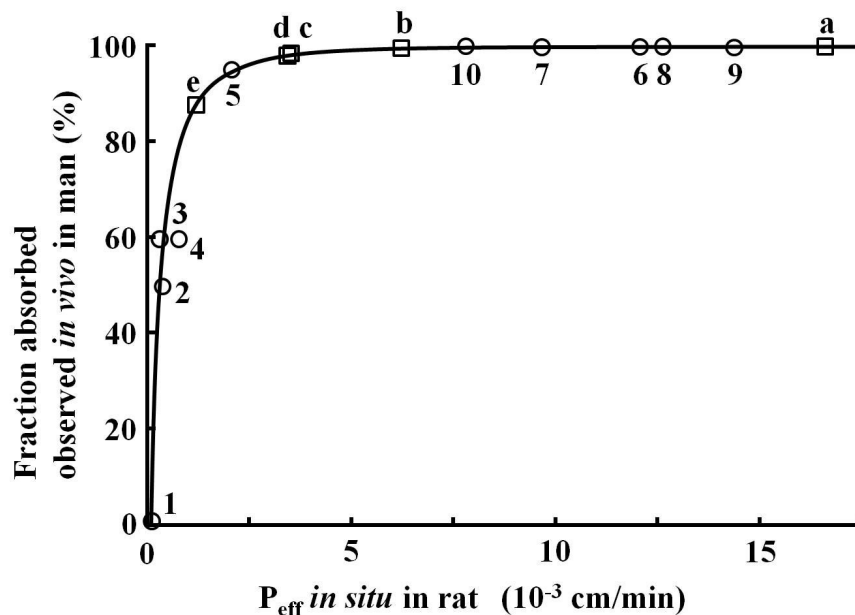
今回用いたプロドラッグは、ラット小腸 *in vitro* において様々な活性を示すと考えられるだけではなく、分子サイズが異なる。したがって、小腸における膜透過性が大きくばらつく可能性がある。小腸吸収中の加水分解はプロドラッグの膜透過性に影響を受ける。膜透過速度が加水分解速度よりも小さい場合、小腸の加水分解活性が非常に大きくても膜透過速度に律速の加水分解となり、加水分解率は 1 になる。逆に膜透過速度が加水分解速度より大きい場合、代謝律速となり、加水分解速度は小腸の加水分解固有クリアランスに依存し加水分解率は 1 よりも小さくなる。エステルプロドラッグは親薬物の親水基をエステル化させるため、総じて疎水性が上昇し膜透過性が高まっていると推察できる。そこでまず、これらエステルプロドラッグの膜透過性をラット空腸 *in situ* single-pass 灌流により  $P_{\text{eff}}$  を算出して評価した。結果を Table 13 に記す。

**Table 13 Apparent permeability coefficients ( $P_{\text{eff}}$ ) of ester prodrugs in rat jejunal single-pass perfusion experiments**

Perfused compound	$P_{\text{eff}}$ $\times 10^{-3} \text{ cm/min}$
Temocapril	3.43 ± 0.27
Isovaleryl-propranolol *	16.6 ± 1.26
Ethyl-fexofenadine	3.49 ± 1.14
Butyl- <i>p</i> -aminobenzoic acid	6.19 ± 1.43
Oseltamivir	1.18 ± 0.27

\*Isovaleryl-propranolol was reported by Masaki et al. (2006).  
Values represent mean ± S.D.

$P_{\text{eff}}$  は IV-PL ≫ Bu-PABA > E-FXD > Temocapril > Oseltamivir となった。ラット空腸 single-pass で求められる  $P_{\text{eff}}$  とヒトの *in vivo* における吸収率には Fig. 15 のような高い相関性があると報告されている<sup>26)</sup>。この相関曲線にエステルプロドラッグの  $P_{\text{eff}}$  をプロットすると、Temocapril, IV-PL, E-FXD, Bu-PABA では 100%、最も  $P_{\text{eff}}$  の低い Oseltamivir でさえ約 90% 吸収されると予測され、全てのエステルプロドラッグで高い膜透過性をもつことが明らかとなった。



**Fig. 15 Relationship between rat  $P_{\text{eff}}$  and fraction absorbed ( $f_a$ ) obtained from pharmacokinetics studies *in vivo* in man**

The circles were reported by Fagerholm U et al. (1996), and numbers correspond to reported compounds, 1; PEG 4000, 2; atenolol, 3; terbutaline, 4; furosemide, 5; metoprolol, 6; levodopa, 7; antipyrine, 8; naproxen, 9; ketoprofen, 10; D-glucose. The squares and alphabets are corresponded to the ester prodrugs, a; IV-PL, b; Bu-PABA, c; temocapril, d; E-FXD, e; oseltamivir.

### 5-3 ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流加水分解生成物の粘膜外移行特性

3-4 において Temocapril および IV-PL を，腸管腔と血管腔を同じ pH 条件下でラット空腸に灌流したことで，エステルプロドラッグが粘膜中で加水分解されると生成した親薬物は腸管腔に約 4 倍優先的に排出されることが明らかになった．これは微絨毛による表面積の増大に起因すると考えられる．腸管 pH を実際の小腸吸収部位の pH に近い 6.5 にした場合の排出について，今回用いたエステルプロドラッグの腸管腔および血管腔への排出を検討した．結果を Table 14 に記す．

**Table 14 Appearance rates of parent drugs ( $v_3$  and  $v_4$ ) and ratio of rates in rat jejunal single-pass perfusion experiments**

Perfused compound	Measured compound		Appearance rate		Ratio of rate
	Name	pK <sub>a</sub> , pI	Lumen (pH6.5)	Vessel (pH7.4)	Lumen / Vessel
			nmol/min	nmol/min	
Temocapril	Temocaprilat	2.75	2.25 ± 0.27 *	1.22 ± 0.52	1.84
Bu-PABA	PABA	3.86	0.698 ± 0.07	0.534 ± 0.10	1.31
IV-PL**	PL	9.44	43.2 ± 34.9	7.20 ± 1.05	6.00
E-FXD	FXD	6.89	0.525 ± 0.08	0.107 ± 0.02	4.93
Oseltamivir	Ro 64-0802	6.70	0.015 ± 0.007	0.019 ± 0.016	0.79

\* Temocapril was perfused into the lumen at pH 6.4.

\*\* Isovaleryl-propranolol was reported by Masaki et al. (2006).

Values represent mean ± S.D.

表面積の違いによる腸管腔への優先的な排出の割合である 4 倍に比べて、小さな値を示したのは、両親媒性あるいは酸性薬物の Temocaprilat, *p*-Aminobenzoic acid (PABA), Ro 64-0802 であった。Temocaprilat と PABA は pI がそれぞれ 2.75 と 3.86 であり pH 分配仮説に従って、血管腔優先的に移行したものと考えられる<sup>37), 41)</sup>、一方で、塩基性薬物の Propranolol (PL) と Fexofenadine (FXD) は分泌が吸収の 4 倍以上を示した。PL は pK<sub>a</sub> が 9.44 であり<sup>30)</sup>、受動拡散で移行することが報告されているため<sup>24), 73)</sup>、表面積による腸管腔優先的な排出の上に、さらに pH 分配仮説に従った腸管腔優先的な排出が加わったと考えられる。FXD の pI は 6.89 で<sup>38)</sup>、腸管灌流液と血管灌流液の pH だけでは腸管への移行を説明できず、トランスポーターの影響も考えられた。実際に FXD は P-gp の基質であり<sup>38), 98)</sup>、共存する E-FXD は P-gp の基質にはならず阻害効果のみを有しているが<sup>46)</sup>、P-gp によって FXD が排出された可能性もある。

以上のように、エステルプロドラッグが小腸粘膜内で加水分解されると生成した親薬物が酸性薬物であっても、微絨毛の存在のために腸管側に多く移行することが示された。したがって、小腸粘膜を代謝部位として狙ったプロドラッグは吸収率が 50% 程度に留まるものと考えられる。



#### 5-4 ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流中における加水分解率

エステルプロドラッグ小腸吸収中における加水分解率を、ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験によって算出した。プロドラッグの吸収クリアランス ( $CL_{abs}$ ), 加水分解クリアランス ( $CL_{deg}$ ) を、実験の部 (第3章に関する実験の部; *in situ* 腸管灌流実験の定常状態における速度論解析) を用いて算出した。 $CL_{abs}$  と  $CL_{deg}$  を用いて、加水分解率を  $CL_{deg} / (CL_{deg} + CL_{abs})$  として算出し、Table 15 に示す。

Temocapril と IV-PL では著しい加水分解をうけ、加水分解率がほぼ1となった。一方で E-FXD, Bu-PABA, Oseltamivir では加水分解率が1よりも小さい値を示し、代謝律速であることが考えられた。また、BNPP 前灌流後に Temocapril を灌流したところ、加水分解率は0.718に減少し、CESの阻害によって膜透過律速の加水分解から代謝律速の加水分解に変化したことが分かった。したがって、通常の小腸における Temocapril の加水分解と、BNPPにより阻害がかかった小腸における Temocapril の加水分解の間に、律速段階を変える変異点が存在することが示唆された。

**Table 15 The ratio of hydrolysis during intestinal absorption in rat jejunal single-pass perfusion experiments**

Perfused compound	$CL_{abs}$	$CL_{deg}$	$\frac{CL_{deg}}{CL_{deg} + CL_{abs}}$
	$\mu L/min$	$\mu L/min$	
Temocapril	1.59 ± 0.86	35.4 ± 3.97	0.957
Temocapril preperfused BNPP	7.64 ± 0.59	19.5 ± 1.71	0.718
IV-PL*	2.42 ± 0.79	141 ± 20.5	0.983
E-FXD	4.82 ± 1.77	10.8 ± 0.23	0.693
Bu-PABA	6.36 ± 2.32	36.1 ± 6.49	0.849
Oseltamivir	10.7 ± 2.08	0.62 ± 0.12	0.051

\*Isovaleryl-propranolol was reported by Masaki et al. (2006).  
Values represent mean ± S.D.

## 5-5 ラット空腸 S9 での *in vitro* 加水分解活性

5-4 で得られた *in situ* における加水分解率と比較するため、空腸粘膜 S9 を用いてエステルプロドラッグの加水分解固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を算出した。Temocapril の小腸代謝では S9 以外の分画に存在する Serine protease が関与することが明らかになった。そのため、小腸代謝を評価するには小腸粘膜成分をすべて含むホモジネートを用いる必要がある。同様のことが新規プロドラッグで起こり得るため、ホモジネートによる代謝活性評価が望ましい。しかし、ヒトの小腸粘膜ホモジネートを入手し開発段階で用いるのは困難であり、現実的な方法としては S9 で評価するしかない。IV-PL, Bu-PABA については基質濃度の範囲において飽和現象を示したことから、 $K_m$  値および  $V_{max}$  値を求め、 $CL_{int}$  を  $V_{max} / K_m$  として算出した。一方、E-FXD と Oseltamivir においては基質の飽和溶解度の範囲内で加水分解活性が直線的に増大し飽和性を示さなかったため、 $CL_{int}$  は S-V plot の直線の傾きから求めた。また、CES 阻害下の Temocapril の  $CL_{int}$  は BNPP 灌流後の S9 サンプルを用いた。結果を Table 16 に示す。

$CL_{int}$  は IV-PL ≫ Temocapril > E-FXD > Temocapril (BNPP 灌流後) > Bu-PABA ≫ Oseltamivir となり、5-4 で得られた加水分解率と類似した傾向になった。

**Table 16 The ratio of hydrolysis during intestinal absorption in rat jejunal single-pass perfusion experiments**

Compound	$K_m$	$V_{max}$	$CL_{int}$
	$\mu M$	$nmol/min/mg\ protein$	$\mu L/min/mg\ protein$
Temocapril	47.4 ± 1.16	5.11 ± 0.406	108 ± 7.70
Temocapril preperfused BNPP *	23.6 ± 2.19	0.825 ± 0.025	35.2 ± 2.45
IV-PL **	13.7 ± 1.71	29.1 ± 3.81	2120 ± 270
E-FXD	N.D.	N.D.	78.3 ± 3.53
Bu-PABA	271 ± 52.5	7.31 ± 1.32	26.9 ± 1.43
Oseltamivir	N.D.	N.D.	0.018 ± 0.0006

\* Temocapril was tested in the jejunal lumen S9 preperfused BNPP

\*\* Isovaleryl-propranolol was reported by Masaki et al. (2006).

Values represent mean ± S.D.

## 5-6 加水分解に関する *in situ* - *in vitro* の相関性

ラット小腸 S9 を用いた *in vitro* 実験から、ラット小腸吸収時の加水分解率を予測するために、*in vitro* 加水分解固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) と *in situ* 加水分解率の相関について検討した。  $CL_{int}$  を横軸に対数プロットし、加水分解率  $CL_{deg} / (CL_{deg} + CL_{abs})$  を縦軸にプロットした結果を Fig. 16 に記す。

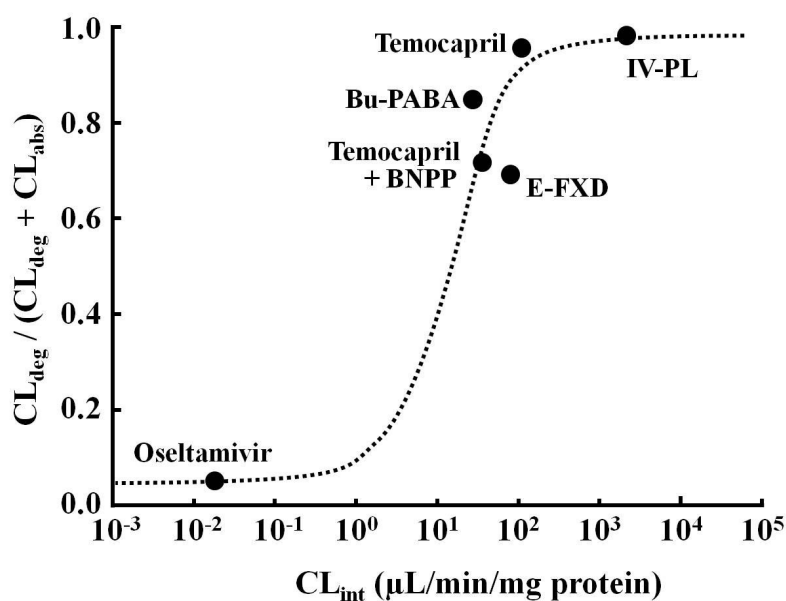


Fig. 16 Relationship between *in vitro*  $CL_{int}$  and *in situ* ratio of hydrolysis

Dotted line represents a predicted sigmoid curve.

*in vitro* の  $CL_{int}$  が 0.1-10  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg S9 protein}$  を示す点が不足しているものの、シグモイド型の相関性が得られ、ラット小腸 S9 の活性から小腸吸収過程の代謝が予測可能であると考えられた。また、 $CL_{int}$  の値が約 100  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg S9 protein}$  よりも大きい場合、吸収時に 100% 加水分解されると推測された。小腸加水分解を受けると生成親薬物が腸管腔に排出されるため、高い吸収性は望めない。したがって、高い吸収性を得るためには、ラット小腸 S9 を用いた *in vitro* 実験で  $CL_{int}$  ができるだけ小さい値を示す必要があり、10  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg S9 protein}$  程度が目安になると予測される。ラットの腸を用いた *in situ* 実験の膜透過性とヒトの吸収率は高い相関性があり、膜透過性が良い薬物で比較する場合、今回得た

相関性はヒトにおいても同じ関係が成り立つ。したがって、ヒト小腸 S9 を用いた *in vitro* 代謝実験で加水分解パラメーターを算出することにより、この相関図を利用することで小腸初回代謝を予測できるものと考えられる。

## 5-7 小括

1. エステルプロドラッグはどれも膜透過性が高く、ヒト小腸において 90% 以上の吸収率を示すことが予測された。したがって、プロドラッグの膜透過性の差は小さく、小腸代謝率への影響はないと考えられた。
2. 腸管腔 pH6.5 では、粘膜内で生成した全ての親薬物が腸管腔へ優位に排出を受けた。粘膜内生成物の粘膜外移行には膜表面積の影響が大きく現れ、ほかにトランスポーターと pH 分配仮説が関与すると考えられることから、加水分解予測の重要性が示された。
3. エステルプロドラッグのラット小腸加水分解に関してシグモイド型の *in situ-in vitro* 相関が得られた。*in vitro* の  $CL_{int}$  が  $100 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  よりも大きい場合、吸収時に 100% 加水分解されると推測された。ヒト小腸にも同じ相関が当てはまると考えられ、ヒト小腸 S9 を用いることで吸収過程の小腸初回代謝の予測が可能になった。

## 第6章 総括

プロドラッグは、生体内代謝を利用した安全性の高い医薬品であり、吸収の改善や薬効の持続化に利用される。プロドラッグ自身の薬理活性は低く、親薬物に変換して活性を発揮するため、生体内での代謝が重要である。しかしながら、経口投与されたプロドラッグが小腸で初回代謝されると、吸収量の低下を招き、十分な薬効を得ることができない。小腸吸収過程の初回代謝を *in vitro* データから定量的に予測することは難しく、プロドラッグ開発の妨げになっている。そこで本研究では、プロドラッグとして臨床応用されている医薬品をモデルに用いて、小腸吸収動態に関する詳細な知見を得、さらに、*in vitro* 実験から吸収過程におけるヒト小腸代謝を予測するための方法論を構築することを目的として検討を行った。モデルプロドラッグとして Temocapril を選択し、その膜透過機構を Caco-2 細胞実験で詳細に調べ、また、ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験によって小腸吸収動態を解析した。さらに、数種のプロドラッグの *in situ* 吸収性と *in vitro* 代謝活性との相関をとり、小腸吸収過程での加水分解予測法を確立した。以下に本研究で得られた知見を統括する。

1) Caco-2 細胞において Temocapril はその疎水性のために、良好な膜透過性を示したが、Temocaprilat とは異なり P-gp の基質として Apical 側に分泌された。また、多くの ACE 阻害剤とは対照的に、PEPT1 や OATP などの取込みトランスポーターには認識されにくいことが判明した。Temocapril は受動拡散による高い膜透過性を示し、特に、Apical 側の pH が低い場合、分子型の存在比が上昇するため、細胞内取込み量が増大した。一方、親薬物の Temocaprilat は膜透過性が低く、またトランスポーターの関与は観察されなかった。しかし、Caco-2 細胞内で加水分解により生成した Temocaprilat は刷子縁膜における微絨毛の存在により、Apical 側へ Basolateral 側よりも約 3 倍速い速度で排出された。小腸粘膜内での加水分解はプロドラッグの吸収に対して負の効果を示すことが確認された。

2) ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験において、腸管腔の Temocapril の減少量からヒトにおける吸収率は 100% と予測された。しかしながら、血管腔に吸収された Temocapril は全吸収量の 10% にすぎず、90% 以上は小腸粘膜透過時に加水分解された。しかも、粘膜内で生成した Temocaprilat は、血管腔に比べて腸管腔に 2 倍多く排出された。空腸粘膜 S9 から求めた加水分解固有クリアランスは 108  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protein と比較的小さな値であり、*in vitro* 加水分解活性が低くても吸収過程ではほぼ完全に加水分解されることが判明した。

3) ヒトにおける Temocapril の小腸吸収動態を予測するため、腸管腔の pH を 5.4, 6.4, 7.4 という小腸上部から下部までの pH 条件にして、ラット空腸 *in situ* single-pass 灌流実験を行った。その結果、Temocapril (pI 値; 3.69) は pH5.4 で分子型が最も多く、腸管腔から粘膜への取込みは最大であった。また、粘膜内で生成した Temocaprilat (pI 値; 2.75) は、pH 分配仮説に従って膜透過するため、腸管腔が pH5.4 の時に血管腔への移行量が最大となり、Temocapril は小腸上部で吸収されることが明らかとなった。したがって、小腸上部において、Temocapril 自身も親薬物の Temocaprilat も吸収されやすく、食後の胆汁酸の分泌による腸管腔内の pH の低下と胃内容排出時間 (GET) の延長が Temocapril の吸収を増大させる要因になると予測された。

4) ラット小腸における Temocapril の加水分解は、主に Carboxylesterase (CES) に依存することが明らかとなった。しかしながら、ヒト小腸 CES は Temocapril を加水分解しないため、CES 阻害条件下のラット空腸をヒト小腸モデルとして、*in situ* single-pass 実験を行った。CES 阻害により小腸粘膜内の Temocapril 濃度は増大し、結果的に Temocapril の粘膜内取込みは 60% に減少し、Temocapril の血管腔への移行は全血管腔移行量の約 40% に増大した。しかしながら、CES を阻害したにも関わらず、加水分解率は 30% しか低下せず、ホモジネートを用いた実験から、残存活性は細胞膜上の Serine protease に起因するものと考えられた。ヒト小腸においても同様の Serine protease が Temocapril の加水分解に関与している

ものと推察された。食後に投与することによって、Serine protease は食物によって阻害され、Temocapril のまま吸収される割合が増大すると予測された。

5) 数種のエステルプロドラッグ Temocapril, Isovaleryl-propranolol, Oseltamivir, Ethyl-fexofenadine, Butyl-*p*-aminobenzoic acid の吸収性をラット空腸 *in situ* 実験により評価した。その結果、全てのプロドラッグの膜透過性は良く、ヒト小腸の吸収率は 90% 以上と予測された。また、粘膜内で生成した親薬物は刷子縁膜上の微絨毛の存在のために、いずれも腸管腔へ優位に分泌された。受動拡散のみで膜移行する Propranolol の透過から、小腸粘膜細胞の刷子縁膜の有効面積は、基底膜の約 4 倍と見積もられ、Caco-2 細胞実験で得られた値に匹敵した。また、加水分解により生成した親薬物が酸性薬物の場合、吸収量は増大したが、腸管腔が pH6.5 では、吸収量が分泌量を上回ることはなく、小腸粘膜内での加水分解はプロドラッグの吸収に対して負の効果を示すことが確認された。

6) 数種のエステルプロドラッグの *in situ* 実験における代謝率と *in vitro* 代謝の相関性から、小腸初回代謝を予測する方法を検討した。ラット空腸 *in situ* 加水分解率 (0.051-0.983) と、*in vitro* ラット空腸 S9 の加水分解固有クリアランス ( $CL_{int}$ ; 0.018-2120  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  S9 protein) の間に、シグモイド型の相関が得られた。その相関性から、*in vitro* の  $CL_{int}$  が 100  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  S9 protein 以上の場合、小腸粘膜透過時にはほぼ 100% 加水分解されると予測された。この *in vitro-in situ* 相関に、ヒト小腸 S9 を用いた *in vitro* 活性を当てはめることにより、ヒト小腸の初回代謝率が予測できると考えられた。

以上のように，本研究ではプロドラッグの膜透過機構および小腸吸収における代謝の影響を明らかにし，ヒト小腸吸収動態の予測方法の一端を示した．プロドラッグ開発において小腸初回代謝の予測は極めて重要である，本研究で得られた成果は，ヒト小腸 S9 における代謝データと，Caco-2 細胞実験による膜透過性データという *in vitro* 実験の結果のみを用いて，小腸初回代謝を予測する画期的な方法に発展することが期待され，効率的なプロドラッグ開発の重要な道標になると考えられる．



## 実験の部

### 第2章に関する実験の部

#### 1) 試料

Temocapril および Temocaprilat は第一三共株式会社から寄与されたものを用いた。ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), 0.25% Trypsin-EDTA, Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS), Hanks' balanced salt solution (HBSS), Earle's balanced salt solution (EBSS), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) は Sigma-Aldrich Co. より購入した。Penicillin-Streptomycine, L-glutamine, MEM 非必須アミノ酸溶液 (Non-Essential Amino Acids Solution, NEAA), は Gibco Co. より, 購入した。牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) は Biosource Co. より購入した。D-(+)glucose, Sodium Hydrogen Carbonate, Dimethyl sulfoxide (DMSO) は和光純薬工業株式会社より購入した。Bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP) はナカライテスクより購入した。

その他, 試薬は全て市販特級品を, 水は超純水を用いた。

#### 2) Caco-2 細胞の培養

Caco-2 細胞は, カルチャーフラスコ (75 cm<sup>2</sup>, TPP 社製) を使い, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。培地には 1% (v/v) NEAA, 10% (v/v) FBS, Penicilline-Streptomycine (100 µg/mL), 2 mM L-glutamine を含有する DMEM を用いた。継代は, 0.01% EDTA を含む PBS を 37°C, 5 min 処理後, 適量の 0.25% Trypsin / 0.53 mM EDTA 溶液を添加して, 細胞を回収し, 一定量の細胞を新しいカルチャーフラスコに播種した。1 日置きに培地の交換を行い, 5-7 日ごとに継代した。実験には, Transwell ポリカーボネート膜フィルター (3 µm 孔, 6 well, Costar Co.) 上で培養した細胞を用いた。継代の時と同様の方法で, 採取した細胞を 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL で懸濁し, その 1.5 mL をフィルター上に播種した。フィルター下部には DMEM 2.6 mL を満たし, 21-27 日間培養後, コンフルエントになった細胞を

用いた。29-53 継代の Caco-2 細胞で、Transwell の細胞上下間電気抵抗 (Transepithelial electrical resistance, TEER) を Millicell<sup>®</sup>-ERS にて測定し、800  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  以上を示すことを確認し、実験に用いた。

### 3) Caco-2 細胞単層膜透過実験

Caco-2 細胞単層膜の Apical 側 (AP 側, 1.5 mL) および Basolateral 側 (BL 側, 2.6 mL) を HBSS (pH7.4) で 2 回洗浄し、両側に HBSS を添加し、40 min プレインキュベーションした。CES 阻害時には 200  $\mu\text{M}$  BNPP を含む HBSS を添加した。10% FBS 含有 DMEM で 2 回洗い、さらに DMEM 存在下 40 min プレインキュベーションした後、10% FBS 含有 DMEM で 1 回洗浄した。両側を新しい HBSS で洗浄した後、AP 側、BL 側の両方に HBSS を 2 mL ずつ添加し、20 min プレインキュベーションした。なおトランスポーターの阻害実験の場合は、阻害剤を含む HBSS でプレインキュベーションした。その後、Donor 側には HBSS に溶解した Temocapril 100  $\mu\text{M}$  を、Receptor 側には HBSS をそれぞれ 2 mL ずつ添加した。また、トランスポーターの阻害実験の場合は、阻害剤を Temocapril と共存させた。経時的に Donor 側から 10  $\mu\text{L}$ 、Receptor 側から 195  $\mu\text{L}$  を採取した。Receptor 側には HBSS を 195  $\mu\text{L}$  補充して容量を一定に保った。サンプルは化学的加水分解を抑えるために 3.4 M リン酸を 5  $\mu\text{L}$  添加し、HPLC サンプルとした。実験前、細胞洗浄時および実験終了後に TEER 値を測定し、細胞の状態を確認しながら実験を行った。トランスポーター阻害実験の条件を Table 17 に記す。

**Table 17 Conditions of transport experiments across Caco-2 cell monolayers with inhibitors**

Inhibited target	AP pH	Test compound		Inhibitor	
		name	concentration	name	concentration
PEPT1	6.0	Temocapril	50 $\mu\text{M}$	Glycyl-Sarcosine	50 mM
	6.0	[ <sup>3</sup> H] Glycyl-Sarcosine	1.4nM	Temocapril	2mM
OATPs	6.0	Temocapril	50 $\mu\text{M}$	Rifamycin SV	50 $\mu\text{M}$
	7.4	Temocapril	100 $\mu\text{M}$	Rifamycin SV	100 $\mu\text{M}$
	7.4	Temocapril	100 $\mu\text{M}$	BSP	200 $\mu\text{M}$
P-gp, BCRP	7.4	Temocapril	100 $\mu\text{M}$	GF120918	100 $\mu\text{M}$
P-gp	7.4	Temocapril	100 $\mu\text{M}$	Quinidine	10 $\mu\text{M}$

見かけの透過係数 (Apparent permeability coefficients;  $P_{app}$ ) は時間に対する累積透過量をプロットし, その定常状態の直線の傾き ( $dQ/dt$ ) から次式にしたがって求めた.

$$P_{app} = dQ/dt/A/C_0$$

$P_{app}$  (cm/sec) : 見かけの透過係数

$dQ/dt$  ( $\mu\text{mol}/\text{sec}$ ) : 単位時間あたりの透過薬物量

$A$  ( $\text{cm}^2$ ) : 細胞単層膜表面積

$C_0$  ( $\mu\text{M}$ ) : 初期濃度

#### 4) Caco-2 細胞からの Temocapril および Temocaprilat の排出実験

Caco-2 細胞単層膜の AP 側および BL 側を HBSS (pH7.4) で 2 回洗浄し, 両側に HBSS (Temocapril 試験時には 200  $\mu\text{M}$  BNPP を含む HBSS) を添加し, 40 min プレインキュベーションした. 10% FBS 含有 DMEM で 3 回洗い, さらに 40 min プレインキュベーションした. その後, 10% FBS 含有 DMEM および HBSS で洗浄を行い, 両側に HBSS を添加し, 10 min 間プレインキュベーションした. その後, 両側に 500  $\mu\text{M}$  Temocapril (HBSS) を添加し, 90 min インキュベーションした. HBSS で 2 回洗った後, AP 側に HBSS を 1770  $\mu\text{L}$ , BL 側に 2870  $\mu\text{L}$  添加し, 5, 10, 20 min 後に両側から 270  $\mu\text{L}$  採取した. 回収したサンプルに 3.4 M リン酸 7  $\mu\text{L}$  を加えて, HPLC サンプルとした.

#### 5) Temocapril および Temocaprilat の定量法

UV 検出器 (JASCO, UV-970), ポンプ (JASCO, PU-980), データ処理ソフト (JASCO, ChromNAV software ver. 1.5), オートサンプラー (JASCO, AS-950), カラムオープン (CO-965) を装備した HPLC 装置を用いて, 以下の条件で定量した.

カラム ; Inertsil ODS-2 (GL Sciences Inc., 5  $\mu\text{m}$ , 250-4.6 mm i.d.)

カラム温度 ; 40°C

移動相 ; A 液 Acetonitrile : 100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=9 : 1  
B 液 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

グラジエント ; 0-10 min A : B=35 : 65  
10-23 min 直線グラジエントで A 液を 100% にする  
23-28 min A : B=100 : 0  
28-29 min 直線グラジエントで A : B=35 : 65 にする  
29-38 min A : B=35 : 65

流速 ; 0.8 mL/min

溶出時間 ; Temocapril 18.2 min  
Temocaprilat 7.0 min

検出波長 ; 258 nm

注入量 ; 120 μL

### 第 3 章に関する実験の部

#### 1) 試料

Fluorescein isothiocyanate dextran 4000 (FD-4), Bovine serum albumin (BSA Fraction V) は Sigma-Aldrich Co.より購入した. Heparin Sodium は和光純薬工業株式会社より購入した. *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N*'-2-ethansulfonic acid (HEPES) は同仁化学より購入した. Pentobarbital sodium salt はナカライテスクより購入した.

その他は, 前章までと同じであり, 試薬は全て市販特級品を, 水は超純水を用いた.

#### 2) 実験動物

実験動物として Wistar 系雄性ラット (九動, 8 週齢, 230-280 g) を用い, 実験開始前 18-24 時間摂水下で絶食させた.

### 3) Temocapril および Temocaprilat の *in situ* 腸管灌流実験<sup>24)-31)</sup>

ラットに 2% Pentobarbital sodium (0.7 mL) を腹腔内注射で麻酔し実験を開始した。腹部を切開し、空腸を取り出した。血管の走行を見ながら Treitz's ligament から約 10 cm 下位を上端として約 10 cm を灌流部位として用いた。小腸内腔を 37°C の生理食塩水、リン酸緩衝液で洗浄後、選択した小腸の両端に切れ目をいれ、カニューレ (テフロンチューブ, 3 mm i.d., 5 mm o.d.) を挿入した。使用する空腸に流れている血管以外の血管を結紮し、腸間膜動脈と門脈に PE10 と PE15 のポリエチレンチューブを各々カニューレーションした。カニューレーションした腸管部位は、胴体から単離し、ウォータージャケットで 37°C に温めた Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (KHBB, pH7.4) の中に静置した。

血管には 3% BSA と 10 mM D-(+)glucose を含む KHBB (pH7.4) を 2.5 mL/min の流速で灌流した。血管の灌流は腸管部位の単離と同時に開始し、実験終了まで持続させた。腸管には浸透圧を 290 mOsm/kg に調整したリン酸緩衝液 (pH5.4, pH6.4, pH7.4) に Temocapril あるいは Temocaprilat を 100  $\mu$ M になるように溶解し、0.2 mL/min の流速で灌流した。腸管灌流液には非吸収性化合物として FD-4 (0.1 mg/mL) を添加し、蛍光分光光度計 (F-4500, Hitachi High-Technologies) で蛍光強度を測定し、腸管灌流液の体積補正を行った。血管および腸管側から 5 min あるいは 10 min ごとに全サンプルを回収した。

血管カニューレから回収したサンプル 5 mL に 0.67 M リン酸溶液 500  $\mu$ L, 酢酸エチル 20 mL を加え、10 min 振盪し、1,500 $\times$ g で 10 min 遠心分離した。有機相 18 mL を遠心エバポレーターで溶媒留去し、残渣を Acetonitrile : H<sub>2</sub>O = 1 : 2 溶液 180  $\mu$ L と 3.4 M リン酸 20  $\mu$ L で再溶解し、HPLC サンプルとした。

また、腸管カニューレから回収したサンプル 500  $\mu$ L に Acetonitrile 500  $\mu$ L を加え、1,500 $\times$ g で 10 min 遠心分離した。上清 180  $\mu$ L を採取し、3.4 M リン酸 20  $\mu$ L を加え、HPLC サンプルとした。

灌流実験終了後、直ちに腸管をリン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄し、腸管粘膜 (350-400 mg) を剥ぎ取った。氷冷 Acetonitrile : Methanol=1 : 2 溶液 6 mL 中でホモジナイズ後 1 M リン酸溶液 (pH2.8) 1 mL を加え、10 min 振盪し、1,500×g で 10 min 遠心分離した。有機相 4 mL を遠心エバポレーターで溶媒留去し、残渣を Acetonitrile : H<sub>2</sub>O=1 : 2 溶液 180 μL と 3.4 M リン酸 20 μL で再溶解し、HPLC サンプルとした。

#### 4) Temocapril および Temocaprilat の定量法

HPLC 装置は前章までと同じであり、以下の条件で定量した。

カラム ; Mightysil RP-18 (関東化学, 5 μm, 250-4.6 mm i.d.)

移動相 ; A 液 Methanol

B 液 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

グラジエント ; 0-20 min A : B=40 : 60

20-22 min 直線グラジエントで A 液を 55% にする

22-37 min A : B=55 : 45

37-40 min 直線グラジエントで A 液を 70% にする

40-42 min A : B=70 : 30

42-43 min 直線グラジエントで A 液を 40% にする

43-53 min A : B=40 : 60

溶出時間 ; Temocapril 41.0 min

Temocaprilat 23.1 min

その他の条件は、前章までと同じである。

#### 5) Isovaleryl-propranolol (IV-PL) の *in situ* 腸管灌流実験

第 3 章に関する実験の部; 3) Temocapril および Temocaprilat の *in situ* 腸管灌流実験に準じた。Isovaleryl-propranolol 15 μM を含む腸管灌流液 (Tris-HCL, pH7.0) を流速 0.3 mL/min で腸管腔に灌流した。同時に、血管には 3% BSA と 10 mM D-(+)glucose を含む KHBB (pH7.0) を流速 3.0 mL/min で灌流した。

血管サンプル 6 mL に飽和食塩リン酸溶液 (pH1.0) 6 mL, 酢酸エチル 10 mL を加え, 10 min 振盪し, 1,500×g で 10 min 遠心分離した. 有機相 8 mL を遠心エバポレーターで溶媒留去し, 残渣を Acetonitrile 200 μL で溶解し, HPLC サンプルとした.

腸管サンプル 100 μL に Acetonitrile 1 mL を加え, 1,500×g で 10 min 遠心分離し, 上清を HPLC サンプルとした.

粘膜サンプルは氷冷 Acetonitrile 2 mL 中でホモジナイズ後 1,500×g で 10 min 遠心分離し, 上清を HPLC サンプルとした.

## 6) Propranolol (PL) および IV-PL の定量

蛍光検出器 (JASCO, FP-1520), ポンプ (JASCO, PU-980), データ処理ソフト (JASCO, ChromNAV software ver. 1.5), オートサンプラー (JASCO, AS-2055), カラムオープン (Hitachi, 6213-12) を装備した HPLC 装置を用いて, 以下の条件で定量した.

カラム	; LiChrosorb RP-select B (関東化学, 7 μm, 250-4.6 mm i.d.)
カラム温度	; 40°C
移動相	; Acetonitril : 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> =1 : 1
流速	; 1.0 mL/min
溶出時間	; IV-PL 11.5 min PL 4.5 min
励起波長	; 285 nm
蛍光波長	; 340 nm
注入量	; 30 μL

## 7) *in situ* 腸管灌流実験の定常状態における速度論解析

*in situ* 腸管灌流実験における腸管腔内からの試験薬物の消失および血管腔への試験薬物の出現に関する速度は下記に示す式により求めた. 灌流速度および

試験薬物濃度を用いて、腸管腔内からの試験薬物の消失速度 ( $v_1$ ) は式 (1) で算出し、また腸間膜静脈への試験薬物の出現速度 ( $v_2$ ) は式 (2) で算出した。

$$v_1 = Q_l \times (C_{in} - C_{out}) \quad \text{式 (1)}$$

$$v_2 = Q_b \times C_b \quad \text{式 (2)}$$

ここで  $Q_l$  は腸管腔における灌流速度、 $C_{in}$  および  $C_{out}$  は腸管入口および出口における試験薬物濃度、 $Q_b$  は腸管膜静脈における灌流速度、 $C_b$  は腸管膜静脈における試験薬物濃度である。さらに、加水分解生成物の管腔側への出現速度 ( $v_3$ ) および血管側への出現速度 ( $v_4$ ) は以下のように算出した。

$$v_3 = Q_l \times C_{M,out} \quad \text{式 (3)}$$

$$v_4 = Q_b \times C_{M,b} \quad \text{式 (4)}$$

ここで  $C_{M,out}$  および  $C_{M,b}$  は腸管腔および腸管膜静脈における加水分解産物の濃度である。 $C_{out}$  および  $C_{M,out}$  は FD-4 の濃度で補正した。

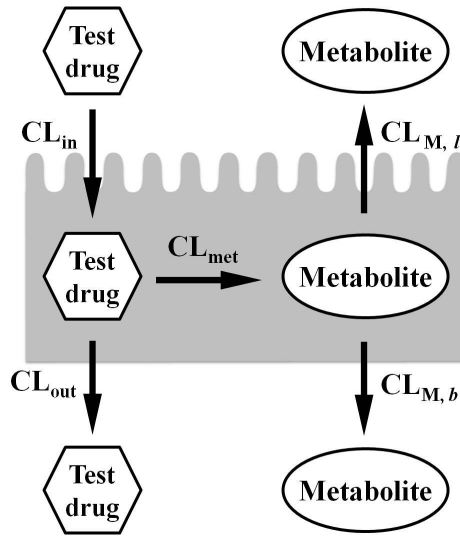
さらに、見かけの膜透過係数  $P_{eff}$  (cm/min) は式 (5) を用いて算出した。

$$P_{eff} = Q_l \times (1 - C_{out} / C_{in}) / 2\pi RL \quad \text{式 (5)}$$

ここで、 $R$  および  $L$  は空腸ループの半径および長さである。 $R$  は文献値より 0.178 cm とみなしており<sup>99)</sup>、 $L$  は実測値 (10 cm) を計算に用いた。

次に、吸収パラメーターは Fig. 17 に示すように 5 つのパラメーターが考えられる。本実験において正確な濃度は灌流液から求められるため、腸管腔の試験薬物濃度  $C_{in}$  から複合パラメーターとして見かけの吸収クリアランス  $CL_{abs}$  と見かけの加水分解クリアランス  $CL_{deg}$  を算出した。





$CL_{in}$  ; Clearance of test drug uptake from intestinal lumen  
 $CL_{out}$  ; Clearance of test drug transport into blood vessel  
 $CL_{met}$  ; Clearance of metabolism  
 $CL_{M, l}$  ; Clearance of metabolite transport into intestinal lumen  
 $CL_{M, b}$  ; Clearance of metabolite transport into blood vessel

**Fig. 17 Pharmacokinetic parameter of test drug**

試験薬物の吸収は見かけの吸収クリアランス ( $CL_{abs}$ ) として式 (6) で表すことができる。

$$CL_{abs} = \frac{CL_{in} \times CL_{out}}{CL_{out} + CL_{met}} \quad \text{式 (6)}$$

また、腸間膜静脈に存在する試験薬物の物質収支式は、見かけの吸収クリアランス  $CL_{abs}$  を用いて式 (7) で表せる。

$$dX_b/dt (= V_b \times dC_b/dt) = CL_{abs} \times C_l - Q_b \times C_b \quad \text{式 (7)}$$

$dX_b/dt (= V_b \times dC_b/dt)$  は腸間膜静脈内の薬物量変化速度,  $C_l$  は腸管腔内薬物濃度である. 定常状態 ( $dX_b/dt = 0$ ) において式 (7) を積分すると  $CL_{abs} \times AUC_l = Q_b \times AUC_b$  となり, 見かけの吸収クリアランス  $CL_{abs}$  は式 (8) から算出できる.

$$\begin{aligned} CL_{abs} &= Q_b \times AUC_b / AUC_l && \text{式 (8)} \\ &= \text{Absorbed amount} / AUC_l \end{aligned}$$

ここで  $AUC_b$  および  $AUC_l$  は各々定常状態における腸間膜静脈および腸管腔内の試験薬物濃度曲線下面積である. 腸管腔内の AUC は腸管腔内の薬物濃度が入口から出口まで一次速度にしたがって減少するとみなして計算した.

次に加水分解は見かけ加水分解クリアランス ( $CL_{deg}$ ) として式 (9) で表すことができる.

$$CL_{deg} = \frac{CL_{in} \times CL_{met}}{CL_{out} + CL_{met}} \quad \text{式 (9)}$$

ここで, 加水分解産物は腸管腔および血管腔に出現するために, 見かけの加水分解クリアランス  $CL_{deg}$  は以下に定義する  $CL_{deg, b}$  と  $CL_{deg, l}$  の和として式 (10) で表わすことができる.

$$\begin{aligned} CL_{deg, b} &= \frac{CL_{deg} \times CL_{M, b}}{CL_{M, b} + CL_{M, l}} \\ CL_{deg, l} &= \frac{CL_{deg} \times CL_{M, l}}{CL_{M, b} + CL_{M, l}} \\ CL_{deg} &= CL_{deg, b} + CL_{deg, l} \\ &= \frac{CL_{deg} \times CL_{M, b}}{CL_{M, b} + CL_{M, l}} + \frac{CL_{deg} \times CL_{M, l}}{CL_{M, b} + CL_{M, l}} \end{aligned}$$

$$= \frac{CL_{deg} \times (CL_{M,b} + CL_{M,l})}{CL_{M,b} + CL_{M,l}} \quad \text{式 (10)}$$

また、腸間膜静脈および腸管腔内に存在する加水分解産物の物質収支式は以下の式のように表わすことができる。

$$dX_{M,b}/dt (= V_b \times dC_{M,b}/dt) = CL_{deg,b} \times C_l - Q_b \times C_{M,b} \quad \text{式 (11)}$$

$$dX_{M,l}/dt (= V_l \times dC_{M,l}/dt) = CL_{deg,l} \times C_l - Q_l \times C_{M,l} \quad \text{式 (12)}$$

$dX_{M,b}/dt (= V_b \times dC_{M,b}/dt)$  および  $dX_{M,l}/dt (= V_l \times dC_{M,l}/dt)$  は各々腸間膜静脈内および腸管腔内での加水分解産物量の変化速度である。定常状態 ( $dX_{M,b}/dt = 0$ ,  $dX_{M,l}/dt = 0$ ) において、式 (11) および式 (12) を積分し、式 (10) を用いると、見かけの加水分解クリアランス  $CL_{deg}$  は式 (13) から算出できる。

$$\begin{aligned} CL_{deg} &= CL_{deg,b} + CL_{deg,l} \\ &= Q_b \times AUC_{M,b} / AUC_{T,l} + Q_l \times AUC_{M,l} / AUC_{T,l} \\ &= \text{Degraded amount} / AUC_{T,l} \end{aligned} \quad \text{式 (13)}$$

ここで、 $AUC_{M,b}$  および  $AUC_{M,l}$  は各々、定常状態における腸間膜静脈および腸管腔内での加水分解産物濃度曲線下面積であり、 $AUC_{T,l}$  は定常状態における腸管腔内での試験薬物濃度下曲線下面積である。また、腸管腔内の AUC は腸管腔内における薬物濃度が入口から出口まで一次速度で変化するとみなして計算した。

## 8) ラット空腸 S9 を用いた *in vitro* 加水分解実験

### 8-1) ラット空腸粘膜 S9 の調製

ラットを Ether 麻酔後，頸動脈を切断瀉血し，直ちに空腸を摘出した．摘出後の空腸を開き，氷冷した 1.15% KCl を用いて洗浄し，内容物を除去した．氷冷下，水分をできるだけ除去して粘膜を剥ぎ取り，湿重量を測定した．3 倍容 (v/w) の 1.15% KCl 含有 50 mM HEPES buffer (pH7.4) を加え，テフロン-ガラスホモジナイザーを用いて粗ホモジネートを調製した．高速冷却遠心機により 4°C で 9,000×g, 20 min 間，遠心分離した上清を S9 とした．調製した S9 の蛋白質濃度は Bradford 法に準じ<sup>100)</sup>，BSA を標準蛋白質として定量した．実験に使用するまでは，-80°C で保存した．

### 8-2) 空腸粘膜 S9 における Temocapril の加水分解実験

ラット空腸 S9 を 50 mM HEPES buffer (pH7.4) で適当な蛋白質濃度になるように希釈し，その希釈液 200 μL を 37°C，5 min 間プレインキュベーションした．Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した Temocapril を 2 μL 加え，初期濃度 10-500 μM で反応を開始した．20 min 後に氷冷 Acetonitrile を 200 μL 加えて反応を停止した．攪拌後，7,200×g，3 min で遠心分離後，上清 200 μL に，20% (v/v) リン酸 40 μL を加えて，HPLC サンプルとした．酵素速度論パラメーター  $K_m$ ， $V_{max}$  は，非線形最小二乗法プログラム MULTI を用いて解析した．

## 第 4 章に関する実験の部

### 1) 試料

Paraoxon は Sigma-Aldrich Co. より購入した．Diisopropyl fluorophosphate (DFP) は和光純薬工業株式会社より購入した．

その他は，前章までと同じであり，試薬は全て市販特級品を，水は超純水を用いた．

## 2) pH の異なる腸管灌流液を用いた Temocapril の *in situ* 腸管灌流実験

第 3 章に関する実験の部; 3) Temocapril および Temocaprilat の *in situ* 腸管灌流実験に準じた。腸管灌流液は全てリン酸緩衝液を用い、pH5.4, pH6.4, pH7.4 に調整した。また、すべての腸管灌流液を浸透圧 290 mOsm/kg に調整した。

## 3) ラット空腸 S9 を用いた *in vitro* CES 阻害条件下加水分解実験

ラット空腸 S9 希釈液 180  $\mu$ L を 37°C, 5 min 間プレインキュベーションした。DMSO に溶解した 10-1000  $\mu$ M BNPP を 2  $\mu$ L 加え、さらに 5 min 間プレインキュベーションした。Temocapril (0.02 N HCl 溶液) 5 mM を 20  $\mu$ L 加え、約 500  $\mu$ M で反応を開始した。20 min 後に氷冷 Acetonitrile を 200  $\mu$ L 加えて反応を停止した。その他は、第 4 章に関するの実験の部; 8-2) 空腸粘膜 S9 における Temocapril の加水分解実験に準じて行った。

## 4) BNPP 事前灌流ラット空腸を用いた Temocapril の *in situ* 腸管灌流実験

第 3 章に関する実験の部; 3) Temocapril および Temocaprilat の *in situ* 腸管灌流実験に準じて灌流操作を行った。Temocapril の灌流前に 400  $\mu$ M BNPP を 40 min 灌流させ、リン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄後、Temocapril 100  $\mu$ M の灌流を開始した。

## 5) BNPP 事前灌流ラット空腸を用いた *in vitro* 加水分解実験

### 5-1) BNPP 事前灌流ラット空腸ホモジネートおよび S9 の調製

第 4 章に関するの実験の部; 3) BNPP 事前灌流ラット空腸を用いた Temocapril の *in situ* 腸管灌流実験において、400  $\mu$ M BNPP を 40 min 灌流させたのち、直ちに 1.15% KCl を用いて腸管を洗浄し、氷冷下で腸管粘膜を採取した。また、コントロールとして、BNPP の代わりにリン酸緩衝液を灌流させた腸管粘膜も採取した。ホモジネートおよび S9 の調製は、第 3 章に関する実験の部; 8-1) ラット小腸粘膜 S9 の調製に準じて行った。

## 5-2) BNPP 事前灌流ラット空腸ホモジネートおよび S9 における Temocapril の加水分解実験

第 3 章に関する実験の部; 8-1) ラット空腸粘膜 S9 の調製ならびに、第 4 章に関する実験の部; 5-1) BNPP 事前灌流ラット空腸ホモジネートおよび S9 の調製に準じてサンプルを調製し、第 4 章に関する実験の部; 8-2) 空腸粘膜 S9 における Temocapril の加水分解実験に準じて加水分解実験を行った。

## 6) BNPP 事前灌流ラット空腸を用いた Serine protease 阻害条件下加水分解実験

第 4 章に関する実験の部; 5-1) BNPP 事前灌流ラット空腸ホモジネートおよび S9 の調製に準じてサンプルを調製し、第 4 章に関する実験の部; 3) ラット空腸を用いた *in vitro* CES 阻害条件下加水分解実験に準じて加水分解実験を行った。阻害剤として BNPP の他に DFP, Paraoxon を用いた。

## 第 5 章に関する実験の部

### 1) 試料

Fexofenadine (FXD), Ethyl-fexofenadine (E-FXD) は日本レダリー株式会社 熊谷年男博士に合成していただいたものを使用した。Oseltamivir および Ro 64-0802 は高崎保健福祉大学薬学部生物薬剤学研究室 萩原琢男先生ならびに森本かおり先生からいただいたものを用いた。p-Aminobenzoic acid (PABA) は東京化成工業株式会社より購入した。dl-Propranolol・HCL (PL) は和光純薬工業株式会社より購入した。

その他は、前章までと同じであり、試薬は全て市販特級品を、水は超純水を用いた。

## 2) エステルプロドラッグの *in situ* 腸管灌流実験

第3章に関する実験の部; 3) Temocapril および Temocaprilat の *in situ* 腸管灌流実験に準じ、試験薬物によって条件を下記に変更して行った。

### 2-1) 腸管灌流手技に関する条件

Table 18 に示す条件に準じて灌流実験を行った。

**Table 18 Conditions of rat jejunal single-pass perfusion experiments**

Compound		Luminal perfusate			Vascular perfusate	
Name	Concentration	Buffer	pH	Rate	pH	Rate
	$\mu M$			$mL/min$		$mL/min$
Temocapril	100	Phosphate	6.4	0.2	7.4	2.5
IV-PL*	300	MES	6.5	0.3	7.4	3.0
E-FXD	30	MES	6.5	0.2	7.4	2.5
Bu-PABA	20	MES	6.5	0.2	7.4	2.5
Oseltamivir	50	MES	6.5	0.1	7.4	2.5

\* Isovaleryl-propranolol was reported by Masaki et al. (2006).

### 2-2) 腸管灌流サンプル処理に関する条件

試験薬物に応じて、サンプルを下記のように処理し、HPLCにて測定した。  
Temocapril の腸管灌流実験については、第3章に関する実験の部; 3) Temocapril および Temocaprilat の *in situ* 腸管灌流実験に準じた。

#### 2-2-1) E-FXD (Ethyl-fexofenadine) 灌流サンプルの処理

血管サンプル 4 mL に Acetonitrile 8 mL を加え、1,500×g で 10 min 遠心分離した。上清を採取し、NaCl 2.5 g, 100 mM リン酸 20  $\mu L$  を加えて 10 min 振盪し、酢酸エチル 8 mL を加えた後、さらに 20 min 振盪し、1,500×g で 10 min 遠心分離した。有機相 13 mL を遠心エバポレーターで溶媒留去し、残渣を HPLC 移動相 200  $\mu L$  で溶解し、HPLC サンプルとした。

腸管サンプル 500  $\mu\text{L}$  に Acetonitrile 500  $\mu\text{L}$  を加え、1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離し、上清を HPLC サンプルとした。

粘膜サンプルは氷冷 Acetonitrile 1 mL 中でホモジナイズ後 1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離し、上清 300  $\mu\text{L}$  に 20 mM リン酸 700  $\mu\text{L}$  を加えて HPLC サンプルとした。

### **2-2-2) Butyl-*p*-aminobenzoic acid (Bu-PABA) 灌流サンプルの処理**

血管サンプル 1 mL に Methanol 3 mL を加え、1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離した。有機相 3 mL を遠心エバポレーターで溶媒留去し、残渣を HPLC 移動相 200  $\mu\text{L}$  で溶解し、HPLC サンプルとした。

腸管サンプル 200  $\mu\text{L}$  に 10 mM リン酸 (Methanol 溶液) 300  $\mu\text{L}$  を加え、1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離し、上清を HPLC サンプルとした。

粘膜サンプルは氷冷 10 mM リン酸 (Methanol 溶液) 1 mL 中でホモジナイズ後 1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離し、上清を HPLC サンプルとした。

### **2-2-3) Oseltamivir 灌流サンプルの処理**

血管サンプル 1 mL に Methanol 3 mL を加え、10 min 振盪し、1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離した。有機相 3 mL を遠心エバポレーターで溶媒留去し、残渣を HPLC 移動相 200  $\mu\text{L}$  で溶解し、HPLC サンプルとした。

腸管サンプル 500  $\mu\text{L}$  に Methanol 1 mL を加え、1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離し、上清 600  $\mu\text{L}$  を採取し、12% (w/v) リン酸 7.5  $\mu\text{L}$ 、1.2 M ペンタンスルホン酸ナトリウム 20  $\mu\text{L}$  を加えて HPLC サンプルとした。

粘膜サンプルは氷冷 Methanol 1 mL 中でホモジナイズ後 1,500 $\times\text{g}$  で 10 min 遠心分離し、上清 400  $\mu\text{L}$  を採取し、8.3 M ペンタンスルホン酸ナトリウム含有 10 mM リン酸 600  $\mu\text{L}$  を加えて HPLC サンプルとした。

## **3) エステルプロドラッグの定量法**

試験薬物に応じて、下記の HPLC 条件にて定量した。



### 3-1) Fexofenadine (FXD) および E-FXD の定量

UV 検出器 (JASCO, UV-2075 plus), ポンプ (JASCO, PU-980), データ処理装置 (SHIMADU, Chromatopac C-R7A plus), オートサンプラー (JASCO, AS-950), カラムオーブン (AO-30) を装備した HPLC 装置を用いて, 以下の条件で定量した.

カラム ; Inertsil ODS-2 (GL Sciences Inc., 5  $\mu$ m, 150-4.6 mm i.d.)  
カラム温度 ; 40°C  
移動相 ; Acetonitrile : 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 3 : 7  
流速 ; 1.0 mL/min  
溶出時間 ; E-FXD 24 min  
FXD 6 min  
検出波長 ; 218 nm  
注入量 ; 100  $\mu$ L

### 3-2) *p*-Aminobenzoic acid (PABA) および Bu-PABA の定量

UV 検出器 (JASCO, UV-2075 plus), その他は, 第 3 章に関する実験の部;6) PL および IV-PL の定量と同じ HPLC 装置を用いて, 以下の条件で定量した.

カラム ; Inertsil ODS-2 (GL Sciences Inc., 5  $\mu$ m, 150-4.6 mm i.d.)  
カラム温度 ; 40°C  
移動相 ; Methanol : H<sub>2</sub>O = 1 : 1  
流速 ; 1.0 mL/min  
溶出時間 ; Bu-PABA 24 min  
PABA 2.5 min  
検出波長 ; Bu-PABA 285 nm  
PABA 励起波長 291 nm  
蛍光波長 340 nm  
注入量 ; 100  $\mu$ L

### 3-3) Ro 64-0802 および Oseltamivir の定量

HPLC 装置は第 5 章に関する実験の部; 3-1) FXD および E-FXD の定量と同じものを用いて、以下の条件で定量した。

カラム	; Myghtysil RP-18 (関東化学, 5 $\mu$ m, 250-4.6 mm i.d.)
カラム温度	; 40°C
移動相	; Methanol : 10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> =4 : 6 (5 mM sodium pentanesulfonate)
流速	; 1.0 mL/min
溶出時間	; Oseltamivir 35 min Ro 64-0802 11 min
検出波長	; 220 nm
注入量	; 100 $\mu$ L

### 4) エステルプロドラッグの加水分解実験

第 3 章に関する実験の部; 8-2) 空腸粘膜 S9 における Temocapril の加水分解実験に準じ、試験薬物によって条件を Table 18 に示す条件に変更して行った。Oseltamivir は反応終了後、遠心分離し、上清 600  $\mu$ L を採取した。12% (w/v) リン酸 7.5  $\mu$ L, 1.2 M ペンタンスルホン酸ナトリウム 20  $\mu$ L を加え、HPLC サンプルとした。

**Table 19 Conditions of rat jejunal hydrolysis experiments**

Compound		Sample		Reaction	
Name	Concentration	Protein concentration	Volume	Time	Termination
	$\mu$ M	$\mu$ g/mL	$\mu$ L	min	
Temocapril	10-500	200	200	20	Acetonitrile, 200 $\mu$ L
IV-PL*	4-200	25	400	10	Saturated NaCl (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH4.0), 1mL Ethyl acetate, 5mL
E-FXD	5-30	400	400	50	Acetonitrile : Methanol = 3 : 1, 800 $\mu$ L
Bu-PABA	100-500	100	200	50	10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Methanol), 300 $\mu$ L
Oseltamivir	400-1000	100	200	60	Methanol, 600 $\mu$ L

\* Isovaleryl-propranolol was reported by Masaki et al. (2006).

## 謝辞

本研究を行うに際し，終始御指導，御鞭撻を賜りました，熊本大学薬学部今井輝子教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成にあたり，有益な御助力と御校閲を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部入江徹美教授，有馬英俊教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し，種々の御鞭撻と御協力を惜しまれなかった，熊本大学薬学部大浦華代子助教に深謝いたします。

本研究で用いた **Temocaprilat** の合成に際し，御助言，御協力を賜りました，熊本大学大学院生命科学研究部中島誠教授ならびに杉浦正晴准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を行うに際し，御協力いただいた副島寿充修士ならびに熊本大学薬学部病態薬効解析学の諸氏に心から感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Liederer B.M., Borchardt R.T., *J Pharm Sci.*, **95**: 1177-1195 (2006).
- 2) Lee H.J., Cooperwood J.S., You Z., Ko D.H., *Arch Pharm Res.*, **25**: 111-136 (2002).
- 3) Boll M., Markovich D., Weber W.M., Korte H., Daniel H., Murer H., *Pflugers Arch.*, **429**: 146-149 (1994).
- 4) Etmayer P., Amidon G.L., Clement B., Testa B., *J Med Chem.*, **47**: 2393-2404 (2004).
- 5) Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T., Oliyai R., Oh D., Järvinen T., Savolainen J., *Nat Rev Drug Discov.*, **7**: 255-270 (2008).
- 6) Kwan K.C., *Drug Metab Dispos.*, **25**: 1329-1336 (1997).
- 7) Schaffner F., *Vet Pathol.*, **12**: 145-156 (1975).
- 8) Goldberg D.M., *Clin Chem.*, **26**: 691-699 (1980).
- 9) Seitz H.K., Pöschl G., *Alcohol Alcohol.*, **32**: 543-549 (1997)
- 10) Warnes T.W., *Gut.*, **13**: 926-937 (1972).
- 11) Harrison E.H., Hussain M.M., *J Nutr.*, **131**: 1405-1408 (2001).
- 12) Traber M.G., Kayden H.J., Rindler M.J., *J Lipid Res.*, **28**: 1350-1363 (1987).
- 13) Peiffer I., Blanc-Potard A.B., Bernet-Camard M.F., Guignot J., Barbat A., Servin A.L., *Infect Immun.*, **68**: 3431-3442 (2000).
- 14) Blais A., Bissonnette P., Berteloot A., *J Membr Biol.*, **99**: 113-125 (1987).
- 15) Chen J., Zhu Y., Hu M., *J Nutr.*, **124**: 1907-1916 (1994).
- 16) Hidalgo I.J., Borchardt R.T., *Biochim Biophys Acta.*, **1035**: 97-103 (1990).
- 17) Artursson P., Palm K., Luthman K., *Adv Drug Deliv Rev.*, **46**: 27-43 (2001).

- 18) Meunier V., Bourrié M., Berger Y., Fabre G., *Cell Biol Toxicol.*, **11**: 187-194 (1995).
- 19) Shu C., Shen H., Hopfer U., Smith D.E., *Drug Metab Dispos.*, **29**: 1307-1315 (2001).
- 20) Prueksaritanont T., DeLuna P., Gorham L.M., Ma B., Cohn D., Pang J., Xu X., Leung K., Lin J.H., *Drug Metab Dispos.*, 520-527 **26**: (1998).
- 21) Luo F.R., Paranjpe P.V., Guo A., Rubin E., Sinko P., *Drug Metab Dispos.*, **30**: 763-770 (2002).
- 22) Imai T., Imoto M., Sakamoto H., Hashimoto M., *Drug Metab Dispos.*, **33**: 1185-1190 (2005).
- 23) Engman H.A., Lennernäs H., Taipalensuu J., Otter C., Leidvik B., Artursson P., *J Pharm Sci.*, **90**: 1736-1751 (2001).
- 24) Amidon G.L., Sinko P.J., Fleisher D., *Pharm Res.*, **5**: 651-654 (1988).
- 25) Yuasa H., Iga T., Hanano M., Watanabe J., *J Pharmacobiodyn.*, **12**: 264-271 (1989).
- 26) Fagerholm U., Johansson M., Lennernäs H., *Pharm Res.*, **13**: 1336-1342 (1996).
- 27) Johnson D.A., Amidon G.L., *J Theor Biol.*, **31**: 93-106 (1988).
- 28) Tamura S., Tokunaga Y., Ibuki R., Amidon G.L., Sezaki H., Yamashita S., *J Pharmacol Exp Ther.*, **306**: 310-316 (2003).
- 29) Windmueller H.G., Spaeth A.E., *Arch Biochem Biophys.*, **171**: 662-672 (1975).
- 30) Masaki K., Taketani M., Imai T., *Drug Metab Dispos.*, **34**: 398-404 (2006).
- 31) Masaki K., Hashimoto M., Imai T., *Drug Metab Dispos.*, **35**:1089-1095 (2007).
- 32) Berry L.M., Wollenberg L., Zhao Z., *Drug Metab Lett.*, **3**: 70-77 (2009).
- 33) Li L., Weng W., Harrison E.H., Fisher E.A., *Metabolism.*, **57**: 1361-1368 (2008).
- 34) Senter P.D., Marquardt H., Thomas B.A., Hammock B.D., Frank I.S., Svensson H.P., *Cancer Res.*, **56**: 1471-1474 (1996).

- 35) Koike H., Yanagisawa H., Ikeda T., Manabe S., Ishikawa S., Kawahara Y. *Annu Rep Sunkyo Res Lab.*, **44**: 1-81 (1992).
- 36) Püchler K., Sierakowski B., Roots I., *J Clin Pharmacol.*, **46**: 363-367 (1998).
- 37) Vistoli G., Pedretti A., Mazzolari A., Bolchi C., Testa B., *Chem Biodivers.*, **6**: 2092-2100 (2009).
- 38) Yasui-Furukori N., Uno T., Sugawara K., Tateishi T., *Clin Pharmacol Ther.*, **77**: 17-23 (2005).
- 39) Govorkova E.A., Leneva I.A., Goloubeva O.G., Bush K., Webster R.G., *Antimicrob Agents Chemother.*, **45**: 2723-2732 (2001).
- 40) Wiltshire H., Wiltshire B., Citron A., Clarke T., Serpe C., Gray D., Herron W., *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, **745**: 373-388 (2000).
- 41) Yasuhara M., Kobayashi H., Kurosaki Y., Kimura T., Muranishi S., Sezaki H., *J Pharm Dyn.*, **2**: 177-186 (1979).
- 42) Imai T., Taketani M., Shii M., Hosokawa M., Chiba K., *Drug Metab Dispos.*, **34**: 1734-1741 (2006).
- 43) Takai S., Matsuda A., Usami Y., Adachi T., Sugiyama T., Katagiri Y., Tatematsu M., Hirano K., *Biol Pharm Bull.*, **20**: 869-873 (1997).
- 44) Frank N., Caesar R., Scherf H.R., Wiessler M., *J Cancer Res Clin Oncol.*, **111**: 98-102 (1986).
- 45) Chambers J.P., Hartgraves S.L., Murphy M.R., Wayner M.J., Kumar N., Valdes J. J., *Neurosci Biobehav Rev.*, **15**: 85-88 (1991).
- 46) Ohura K., Sakamoto H., Ninomiya S., Imai T., *Drug Metab Dispos.*, **38**: 323-331 (2010).
- 47) Döring F., Dorn D., Bachfischer U., Amasheh S., Herget M., Daniel H., *J Physiol.*, **15**: 773-779 (1996).

- 48) Ziegler T.R., Fernández-Estívariz C., Gu L.H., Bazargan N., Umeakunne K., Wallace T.M., Diaz E.E., Rosado K.E., Pascal R.R., Galloway J.R., Wilcox J.N., Leader L.M., *Am J Clin Nutr.*, **75**: 922-930 (2002).
- 49) Han H.K., Rhie J.K., Oh D.M., Saito G., Hsu C.P., Stewart B.H., Amidon G.L., *J Pharm Sci.*, **88**: 347-350 (1999).
- 50) Dringen R., Hamprecht B., Bröer S., *J Neurochem.*, **71**: 388-393 (1998).
- 51) Inui K., Terada T., Masuda S., Saito H., *Nephrol Dial Transplant.*, **15**: 11-13 (2000).
- 52) Mackenzie B., Loo D.D., Fei Y., Liu W.J., Ganapathy V., Leibach F.H., Wright E.M., *J Biol Chem.*, **271**: 5430-5437 (1996).
- 53) Garver E., Hugger E.D., Shearn S.P., Rao A., Dawson P.A., Davis C.B., Han C., *Drug Metab Dispos.*, **36**: 2492-2498 (2008).
- 54) Hirano M., Maeda K., Shitara Y., Sugiyama Y., *Drug Metab Dispos.*, **34**: 1229-1236 (2006).
- 55) Lan T., Rao A., Haywood J., Davis C.B., Han C., Garver E., Dawson P.A., *Drug Metab Dispos.*, **37**: 2375-2382 (2009)
- 56) Ugele B., St-Pierre M.V., Pihusch M., Bahn A., Hantschmann P., *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **284**: E390-E398 (2003).
- 57) Pizzagalli F., Hagenbuch B., Stieger B., Klenk U., Folkers G., Meier P.J., *Mol Endocrinol.*, **16**: 2283-2296 (2002).
- 58) Cui Y., König J., Leier I., Buchholz U., Keppler D., *J Biol Chem.*, **276**: 9626-9630 (2001).
- 59) Miret S., Abrahamse L., de Groene E.M., *J Biomol Screen.*, **9**: 598-606 (2004).
- 60) Hirohashi T., Suzuki H., Chu X.Y., Tamai I., Tsuji A., Sugiyama Y., *J Pharmacol Exp Ther.*, **292**: 265-270 (2000).

- 61) Taipalensuu J., Törnblom H., Lindberg G., Einarsson C., Sjöqvist F., Melhus H., Garberg P., Sjöström B., Lundgren B., Artursson P., *J Pharmacol Exp Ther.*, **299**: 164-170 (2001).
- 62) Naruhashi K., Kurahashi Y., Fujita Y., Kawakita E., Yamasaki Y., Hattori K., Nishimura A., Shibata N., *Drug Metab Pharmacokinet.*, Epub ahead of print (2010).
- 63) Evers R., Kool M., Smith A.J., van Deemter L., de Haas M., Borst P., *Br J Cancer.*, **83**: 366-374 (2000).
- 64) Breedveld P., Pluim D., Cipriani G., Wielinga P., van Tellingen O., Schinkel A.H., Schellens J.H., *Cancer Res.*, **65**: 2577-2582 (2005).
- 65) Bailey D.G., Dresser G.K., *Am J Cardiovasc Drugs.*, **4**: 281-297 (2004).
- 66) Kharasch E.D., Hoffer C., Whittington D., *Br J Clin Pharmacol.*, **57**: 600-610 (2004).
- 67) Shionoiri H., Takasaki I., Minamisawa K., Ishizuka H., Konno K., Naganuma H., Sasahara K., Kawahara Y., *Hypertens Res.*, **24**: 235-240 (2001).
- 68) Stenberg P., Norinder U., Luthman K., Artursson P., *J Med Chem.*, **44**: 1927-1937 (2001).
- 69) Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T., *Gastroenterology*, **96**: 736-749 (1989).
- 70) Grès M.C., Julian B., Bourrié M., Meunier V., Roques C., Berger M., Boulenc X., Berger Y., Fabre G., *Pharm Res.*, **15**: 726-733 (1998).
- 71) Zhang W., Kalive M., Capco D.G., Chen Y., *Nanotechnology.*, **21**: 355103 (2010).
- 72) Sanderson I.R., He Y., *J Nutr.*, **124**: 131S-137S (1994).
- 73) Artursson P., Karlsson J., *Biochem Biophys Res Commun.*, **175** : 880-885. (1991).
- 74) Yamaoka K., Tanigawara Y., Nakagawa T., Uno T., *J Pharmacobiodyn.*, **4**: 879-885 (1981).
- 75) Murray H.S., Strottman M.P., Cooke A.R., *Br Med J.*, **1**: 19-21 (1974).



- 76) Konno M., Baba S., Mikawa H., Hara K., Matsumoto F., Kaga K., Nishimura T., Kobayashi T., Furuya N., Moriyama H., Okamoto Y., Furukawa M., Yamanaka N., Matsushima T., Yoshizawa Y., Kohno S., Kobayashi K., Morikawa A., Koizumi S., Sunakawa K., Inoue M., Ubukata K., *J Infect Chemother.*, **12**: 287-304 (2006).
- 77) Watson B.W., Meldrum S.J., Riddle H.C., Brown R.L., Sladen G.E., *Br Med J.*, **2**: 104-106 (1972).
- 78) Bo-Linn G.W., Davis G.R., Buddrus D.J., Morawski S.G., Santa Ana C., Fordtran J.S., *J Clin Invest.*, **73**: 640-647 (1984).
- 79) Shiau Y.F., Fernandez P., Jackson M.J., McMonagle S., *Am J Physiol.*, **248**: G608-G617 (1985).
- 80) Daniel H., Neugebauer B., Kratz A., *Am J Physiol.*, **248**: G293-G298 (1985).
- 81) Furihata T., Hosokawa M., Fujii A., Derbel M., Satoh T., Chiba K., *Biochem Pharmacol.*, **69**: 1287-1297 (2005).
- 82) Sanghani S.P., Davis W.I., Dumauval N.G., Mahrenholz A., Bosron W.F., *Eur J Biochem.*, **269**: 4387-4398 (2002).
- 83) Bencharit S., Morton C.L., Howard-Williams E.L., Danks M.K., Potter P.M., Redinbo M.R., *Nat Struct Biol.*, **9**: 337-342 (2002).
- 84) Taketani M., Shii M., Ohura K., Ninomiya S., Imai T., *Life Sci.*, **81**: 924-932. (2007).
- 85) Mata N.L., Villazana E.T., Tsin A.T., *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **39**: 1312-1319. (1998).
- 86) Robbi M., Beaufay H., *Biochem J.*, **254**: 51-57 (1988).
- 87) Potter P.M., Wolverson J.S., Morton C.L., Wierdl M., Danks M.K., *Cancer Res.*, **58**: 3627-3632 (1998).
- 88) Hattori M., Isomura S., Yokoyama E., Ujita M., Hara A., *J Biosci Bioeng.*, **100**: 631-636 (2005)
- 89) Kugusheva L.I., Nikol'skaia E.B., *Ukr Biokhim Zh.*, **62**: 93-96 (1990 ).

- 90) Chungjatupornchai W., Fa-Aroonsawat S., *J Microbiol Biotechnol.*, **18**: 946-951. (2008).
- 91) Arakawa M., Sasaki M., Ohmori M., Harada K., Fujimura A., *Eur J Clin Pharmacol.*, **56**: 775-779 (2001).
- 92) Jobin G., Cortot A., Danquechin-Dorval E., Godbillon J., Schoeller J.P., Bernier J.J., Hirtz J., *Br J Clin Pharmacol.*, **19** Suppl 2: 127S-135S (1985).
- 93) Franke A., Nakchbandi I.A., Schneider A., Harder H., Singer M.V., *Alcohol Alcohol.*, **40**: 187-193 (2005).
- 94) Mansbach C.M., Cohen R.S., Leff P.B., *J Clin Invest.*, **56**: 781-791 (1975).
- 95) Sasaki I., Naito H., Matsuno S., Sato T., *Tohoku J Exp Med.*, **150**: 91-99 (1986).
- 96) Bielorai R., Tamir M., Alumot E., Bar A., Hurwitz S., *J Nutr.*, **103**:1291-1298 (1973).
- 97) Gorrill A.D., Schingoethe D.J., Thomas J.W., *J Nutr.*, **96**: 342-348 (1968).
- 98) Cvetkovic M., Leake B., Fromm M.F., Wilkinson G.R., Kim R.B., *Drug Metab Dispos.*, **27**: 866-871 (1999).
- 99) Yamashita S., Tanaka Y., Endoh Y., Taki Y., Sakane T., Nadai T., Sezaki H., *Pharm Res.*, **14**: 486-491 (1997).
- 100) Bradford M.M., *Anal Biochem.*, **72**: 248-254 (1976).