

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, Butyryl-*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 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ 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。