

$\mu$ FLUX を用いた膜透過性評価：pH modifier が diclofenac の膜透過性に与える影響

静岡県立大学 薬学部 薬剤学分野 佐藤 秀行先生

## 【背景】

Diclofenac sodium (DC) (Fig. 1) は非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) の一種であり, cyclooxygenase を阻害することで炎症誘導因子である prostaglandin の産生を抑制し, 抗炎症作用を示す. NSAIDs はその優れた抗炎症作用と鎮痛効果から関節リウマチ, 変形性関節症のような慢性疾患の鎮痛薬として広く使用されている.

しかしながら, 長期的な投与は消化管障害, 腎障害, 心血管障害, 肝障害および出血傾向などの多くの副作用を引き起こす. これらの副作用のなかでも消化管障害が最も頻繁におこり, 長期服用者および高齢の患者に多く見られるとの報告がある.

NSAIDs による胃粘膜障害の主な発生機序として, 胃粘膜保護作用の低下と酸性環境下での胃粘膜細胞への直接障害が知られている. DC (pKa: 4.0) をはじめ多くの NSAIDs は酸性薬物であり, 胃内の酸性条件下にて分子状態で存在する. 分子型 NSAIDs は胃粘膜上皮の細胞膜を単純拡散により透過して細胞内に取り込まれ, 細胞内の中性条件下でイオン化し蓄積される (Fig. 2). この細胞内に蓄積された NSAIDs が細胞障害性を示し, 胃粘膜障害を引き起こす考えられている.

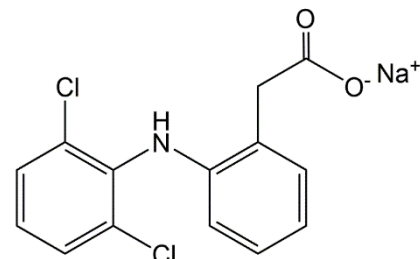


Fig. 1 Chemical structure of DC.

本検討では, 微小環境における pH 制御により化合物の溶解性を改善する pH modifier に着目した. pH modifier の中で, alkalizer は微小環境の pH を上昇させることで, pH 依存的な溶解性を示す化合物の溶解性を改善するアプローチである.

一般的に alkalizer は pH 依存的な溶解度を持つ弱酸性化合物の溶解性改善に用いられているが, 今回, 微小環境における pH 制御が DC の分子型比率を減少し, 細胞膜透過性の低下, ひいては胃粘膜障害軽減に有用であると考えた.

多くの NSAIDs は酸性薬物であり胃内で分子型として存在するため, 胃内の微小環境の pH 上昇は NSAIDs の溶解性を向上 (イオン型分率の増加) するとともに分子型 NSAIDs を減少させ, 胃粘膜障害を軽減可能と考えられる.

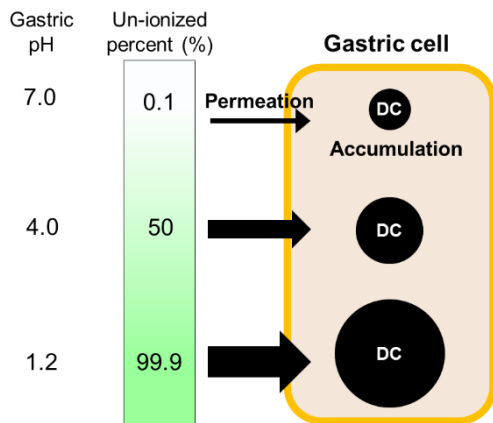


Fig. 2 Influence of pH conditions on membrane permeability of DC.

本研究では、我々の先行研究にて開発した alkalizer 含有徐放性製剤について、DC による胃粘膜障害の軽減に関する有用性を評価すべく  $\mu$ FLUX の応用検討を試みた。

【方法】

Alkalizer 含有 DC 徐放性製剤の調製：

DC (120 mg) , alkalizer として meglumine (MEG) (160 mg) を精製水 50 mL に溶解後、curdlan (CUR) (3,720 mg) を Physcotron (Microtech Co., Ltd, Chiba,

Japan) により攪拌し (15,000 rpm, 10 min) 溶液中に分散させた。その後、加熱処理 (95°C, 1 h) によりゲル化させた。

得られたゲルをエバポレーターにより乾燥させ、乾燥物を粉砕することで製剤 (CUR/DC-MEG) を得た。また、上記と同様の方法で MEG を含まない参照製剤である CUR/DC を調製した。

膜透過性試験：

膜透過性試験には  $\mu$ FLUX (Pion Inc., Billerica, MA, USA) を使用した。ドナーチャンバーには溶出試験第一液 (pH1.2, 18 mL) , アクセプターチャンバーには HEPES buffer (pH7.4, 18 mL) をそれぞれ用い、マグネティックスターラーの回転数 200 rpm にて行った (Fig. 3)。

DC および CUR/DC-MEG を DC 量として 36  $\mu$ g となるようにドナーチャンバーに添加後 10, 20, 30, 60, 120 および 180 min 後において Donor side および Acceptor side の DC 量を HPLC/UV にて定量した。

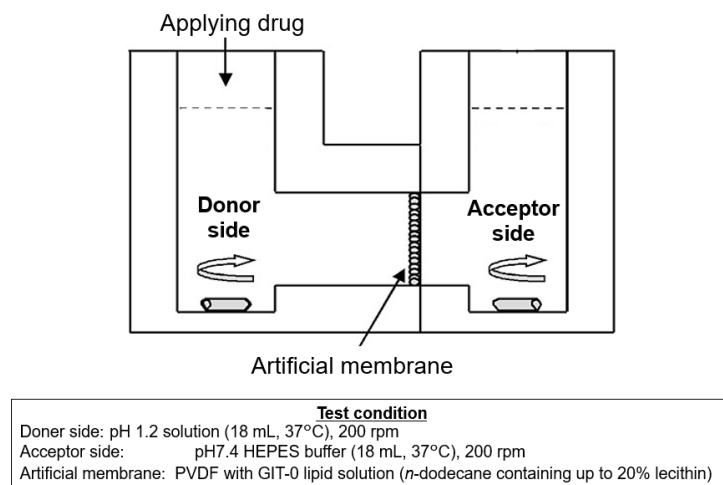


Fig. 3 Test condition for evaluation of membrane permeability of DC.

## 胃粘膜障害性リスク評価 :

(実験動物)

日本 SLC から購入した SD 系雄性ラット (6-9 週齢) を用いた. すべての動物実験は, 静岡県立大学動物実験倫理委員会のガイドラインに準じて行った.

(製剤投与および胃摘出)

SD 系雄性ラットを 4 匹ずつランダムに DC 原末投与群, CUR/DC-MEG 投与群および CUR/DC 投与群に振り分け, 経口投与約 24 h 前から絶食を開始した.

DC 原末 (45 mg/kg), CUR/DC-MEG (45 mg-DC/kg) および CUR/DC (45 mg-DC/kg) の懸濁液を精製水 2 mL で調製し, 胃ゾンデを用いて経口投与した. その後, 投与 4 h 後に各群のラットから胃を摘出した.

(胃組織における出血部位面積測定)

摘出した胃を大湾に沿って切開し, 生理食塩水で洗浄した. 粘膜表面の出血を評価するため, 胃の粘膜側をデジタルカメラで撮影し, 画像の出血部位面積を画像処理ソフトで定量した. 測定には ImageJ ver. 1.54i (NIH, Washington DC, USA) を用いた.

(薬物組織濃度測定)

胃の重量を測定後, ハサミでミンス処理を行い, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 中で Physcotron (Microtech Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いてホモジネートを作製した. 作成したホモジネートから, ethyl acetate によって DC を抽出し, LC/MS により定量した.

## 【結果・考察】

膜透過性評価 :

ドナー側に溶出試験第一液 (pH1.2), アクセプター側に HEPES buffer (pH7.4) を用いて DC 原末および CUR/DC-MEG から放出された DC の膜透過性を評価した (Fig. 4 A and B).

DC 原末は, ドナー側にて速やかな溶出を示し, アクセプター側へ移行することで溶解濃度の低下を示した. 一方, CUR/DC-MEG は原末と比較し緩徐な溶出を示し, 溶出過程において溶解している DC の濃度減少は限定的であった. アクセプター側にて, DC 原末が 30 min で濃度の上昇を示したが, CUR/DC-MEG では 30 min において濃度の上昇は見られず, 180 min 時点においても DC 原末と比較し濃度は低かった.

このときのドナー側とアクセプター側における曲線下面積  $AUC_{0-3 h}$  を算出して Table 1 に示した. ドナー側では両製剤ともに  $100 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$  程度であり, 溶出量に大きな違いを認めなかった. 一方, アクセプター側では DC 原末が  $69.2 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$  に対し CUR/DC-MEG は  $34.7 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$  と透過量は DC 原末の 50% であった. これは, 製剤中の alkalizer により分子型 DC が減少したことで膜透過が抑制されたためと考える.

また, 試験後におけるドナー側溶液 pH の変動は認められなかったことから, 微小環境における pH 上昇がこのような結果に寄与したと推察する. 膜透過の抑制は胃組織への蓄積を減少させるため, 蓄積による直接的胃粘膜障害の軽減が期待できよう.

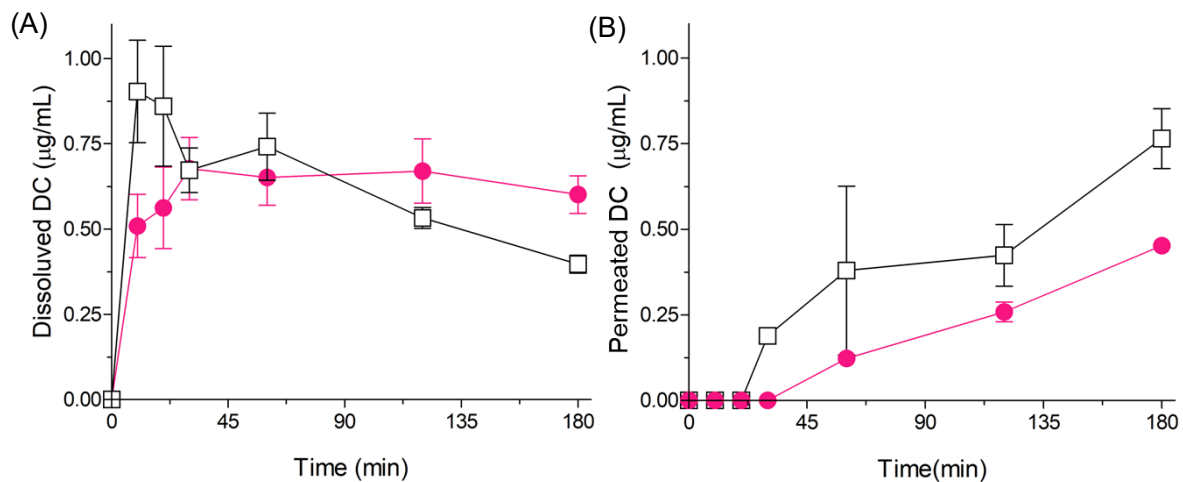


Fig. 4 Dissolution/permeation profiles of DC samples in (A) donor side and (B) acceptor side. □, Crystalline DC; and ●, CUR/DC-MEG. Data represent mean  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

Table 1 AUC values of each compartment in  $\mu$ FLUX system.

	AUC <sub>0-3 h</sub> ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$ )	
	Donor side	Acceptor side
Crystalline DC	108.3 $\pm$ 14.6	69.2 $\pm$ 14.7
CUR/DC-MEG	118.0 $\pm$ 21.1	34.7 $\pm$ 3.5

Data represent mean  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

#### 胃粘膜障害性リスク評価：

(胃粘膜に対する障害性)

DC 原末, CUR/DC, CUR/DC-MEG (45 mg-DC/kg) をラットへ単回投与後, 摘出した胃を切開することで, 胃粘膜表面への障害性について評価した (Fig. 5). DC 原末投与群は, Control 群で見られなかった出血による広範な黒い変色部位を認めた (Fig. 5 A and B).

一方, CUR/DC および CUR/DC-MEG 投与群では, 原末投与群と比較して胃組織における出血が軽度であった (Fig. 5 C

and D). また, 画像処理ソフトにより出血面積を測定したところ, CUR/DC-MEG 投与群は原末投与群と比較して出血面積を有意に減少させ, CUR/DC より低値を示した (Fig. 6).

これらの結果は, CUR ゲル中に DC が内封されることによる直接暴露量ならびに alkalizer による分子型 DC の減少が胃粘膜組織への薬物移行を制限し, DC による障害性軽減に寄与したと推察する.

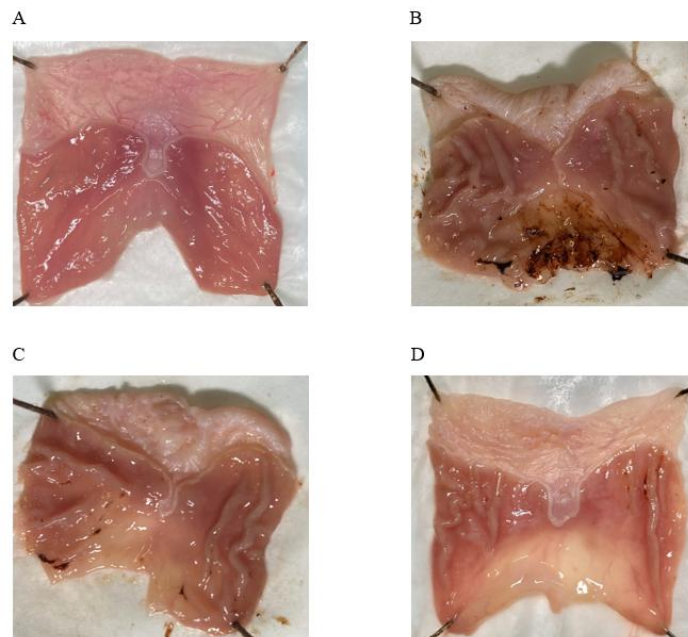


Fig. 5 Appearance of gastric tissue with or without oral administration of DC samples (45 mg-DC/kg) in rats. (A) Control, (B) Crystalline DC, (C) CUR/DC, (D) CUR/DC-MEG.

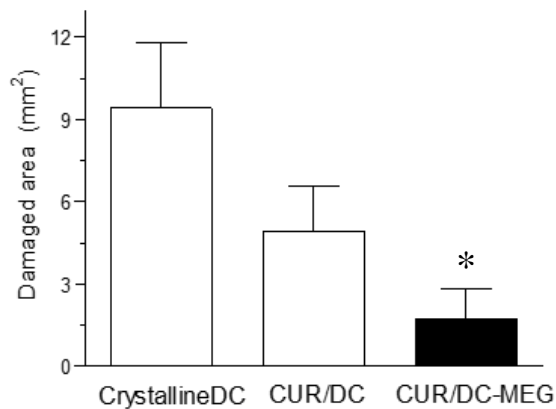


Fig. 6 Bleeding area in stomach with oral administration of DC samples (45 mg-DC/kg) in rats. Data represent mean  $\pm$  S.E. of 4 determinations. \*,  $P < 0.05$  vs. Crystalline DC.

(胃組織中 DC 量)

*In vivo* における薬物透過性を評価するため、DC 原末、CUR/DC、CUR/DC-MEG (45 mg-DC/kg) をラット投与 4 時間後における胃組織中の DC 量を測定した。CUR/DC-MEG 投与群は原末投与群と比較して DC 量は有意に低く、CUR/DC 投与群と比較して 50% 程度の薬物量であった (Fig. 7)。また、胃組織内薬物量は胃組織における出血面積と対応する結果であった。これは alkalizer により胃内で局所的に pH が上昇し、分子型 DC が減少したことで胃組織への DC の蓄積が抑制されたためと推察する。

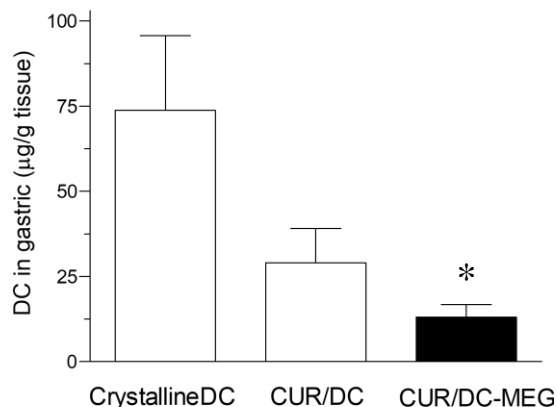


Fig. 7 Drug amount in stomach after oral administration of DC samples (45 mg-DC/kg) in rats. Data represents mean  $\pm$  S.E. of 4 determinations. \*,  $P < 0.05$  vs. Crystalline DC.

### 【結論】

本検討では、alkalizer による微小環境 pH 変動が酸性薬物である DC の膜透過性に与える影響について  $\mu$ FLUX を用いて評価した。その結果、*In vitro* にて得られた DC の膜透過性は、*in vivo* における胃粘膜障害のリスクと対応する結果が得られた。 $\mu$ FLUX のチャンバー中にて生体内環境を模倣することで、部分的ではあるものの胃組織への薬物分布に関する情報を得ることが可能であったと考える。以上より、 $\mu$ FLUX は、薬物の吸収性評価のみならず、組織への薬物集積によって引き起こされる副作用リスク等々を評価するうえでも有用なツールとなりうることを示された。本検討では pH 環境のみを模倣したが、脂質やタンパク等のその他の組成物を組み込むことでより精度の高い評価となることが期待される。