

博士論文

新規抗凝血薬 YM466 の低経口吸収性の要因解明
および吸収改善に関する基礎的研究

平成 25 年 3 月

竹村 栄生

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程創薬生命科学専攻

目次

略語一覧	1
要約	2
総論の部	6
諸言	6
第1章 YM466 の吸収動態特性および吸収性に及ぼす胆汁の影響評価	8
1.1. YM466 の溶解度評価	8
1.2. Caco-2 細胞を用いた膜透過性の評価	9
1.3. YM466 の消化管吸収部位の影響評価	10
1.4. YM466 の経口吸収性に及ぼす消化管内移行性の影響	12
1.5. YM466 の消化管吸収に及ぼす胆汁の影響	15
1.6. 小括	17
第2章 YM466 と胆汁との相互作用の評価	19
2.1. YM466 と胆汁／胆汁酸との相互作用の <i>in vitro</i> 評価	19
2.2. 胆汁酸の種類の違いにおける YM466 との相互作用性評価	21
2.3. 難溶性複合体の経口吸収性の <i>in vivo</i> 評価	24
2.4. 可溶性複合体の経口吸収性の <i>in vivo</i> 評価	26
2.5. ¹ H-NMR による YM466 と胆汁酸との相互作用の評価	28
2.6. 小括	31
第3章 YM466 と胆汁との相互作用抑制物質の探索および評価	32
3.1. YM466 と胆汁との相互作用評価系の確立	32
3.2. YM466 と胆汁との相互作用を抑制する添加剤の探索	34
3.3. AAM copolymer E による YM466-胆汁相互作用抑制効果の用量依存性の評価	38
3.4. 他のカチオン性高分子を用いた YM466 と胆汁との相互作用抑制効果の用量依存性の評価	40
3.5. AAM copolymer E の YM466 および胆汁酸への結合性評価	44
3.6. ラット経口投与における AAM copolymer E の YM466 吸収改善効果の評価	46
3.7. 小括	49

結論	51
謝辞	54
実験の部	55
第 1 章 実験の部	55
第 2 章 実験の部	62
第 3 章 実験の部	65
引用文献	69

略語一覧

AAM copolymer E	Aminoalkylmethacrylate copolymer E (アミノアルキルメタクリレートコポリマーE)
AEA	Polyvinylacetal diethylaminoacetate (ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート)
AUC	Area under the plasma concentration-time curve (血漿中濃度-時間曲線下面積)
C _{max}	Maximum plasma concentration (最大血漿中濃度)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
D ₀	Dose Number
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FaSSIF	Fasted-state- simulated intestinal fluid (絶食時小腸内模擬腸液)
FBS	Fetal bovine serum
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran-4000 (フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン 4000)
FeSSIF	Fed-state-simulated intestinal fluid (飽食時小腸内模擬腸液)
HBSS	Hank's balanced salts solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperzineethane sulfonic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
MES	2-(N-morpholino) etanesulfonic acid
NDL	Nadolol (ナドロール)
NEAAs	Nonessential amino acids
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (核磁気共鳴)
P _{app}	Apparent permeability coefficient (見かけの膜透過係数)
P/D ratio	Polymer to drug ratio (高分子添加剤/薬物比)
PPL	Propranolol (プロプラノロール)
T _{max}	The time after administration of a drug when the maximum plasma concentration is reached (最大血漿中濃度到達時間)

要約

N-[4-[(1-acetoamidoyl-4-piperidyl)oxy]phenyl]-N-[(7-amidino-2-naphthyl)methyl]sulfamoyl acetic acid monomesilate (YM466) は強力な抗 factor Xa 活性および高い安全性を兼ね備える新規抗凝血薬として開発中の化合物である。Factor Xa 阻害剤は、連日の服用を必要とすることから、簡便な服用を可能とする経口製剤としての開発が望まれている。しかしながら、YM466 の経口バイオアベイラビリティは、ラットおよびイヌにおいて、それぞれ 4% および 7% と低く、その理由は低い経口吸収性であることが報告されている。従って、本薬物の経口製剤化を可能とする為には、経口吸収性を改善する必要があり、そのためにはまず、本薬物の低い経口吸収性の要因を解明する必要がある。

本研究では、まず YM466 の低い経口吸収性の要因を理解する目的で、本薬物の溶解性および膜透過性について評価を行った。溶解性に関しては、経口投与後の消化管管腔内液を想定して pH 1-7 において検討したところ、1.6-18.3 mg/mL であった。次いで、この溶解性が実際の経口吸収性を制限する要因となるか否か、Dose number (D_0) を算出することにより検討した。 D_0 は、投与量を投与時に摂取する水の容積(通常 250 mL)と溶解度で除することにより算出するが、得られた値が 1 を超えると当該薬物の溶解性が吸収性を律速する可能性を示すとされている。YM466 について得られた D_0 は 0.02-0.27 と 1 よりも小さく、このことから、本薬物の消化管内での溶解性には問題はなく、本薬物の低吸収性は薬物自体の溶解性に起因するものではないと考えられた。次いで、本薬物の膜透過性について、ヒトにおける吸収性が報告されている 3 種のモデル化合物 (プロプラノロール、ナドロール、フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン 4000) と共に、ヒト結腸がん由来細胞 Caco-2 細胞を用いて、比較・検討を行った。その結果、YM466 の膜透過性は、ナドロールをやや上回る程度であり、Biopharmaceutics Classification System では低膜透過

性薬物に分類されるものの、ヒトにおける吸収量は約 30–40%と推察された。しかしながら実際の経口バイオアベイラビリティは、前述の通り種々の動物において 4%から 7%と低い結果が得られていることから、本薬物の低い経口吸収性には膜透過性以外の因子が関与している可能性が示唆された。一方で、YM466 は、肝ミクロソームによりほとんど代謝されないこと、またラットにおいては経口投与後に代謝物が検出されないことが報告されており、経口投与後の初回通過代謝によるバイオアベイラビリティ低下の可能性も低いと考えられた。

そこで、更に消化管からの吸収についてより詳細な検討を行うため、YM466 の消化管吸収における部位差について、ラット *in situ* ループ法により評価した。その結果、YM466 の吸収性には消化管部位による差が認められ、腸管上部（十二指腸、空腸）からの吸収が胃及び腸管下部（回腸、結腸）に比して良好であることが示された。この結果は、腸管上部における滞留時間を延長することで、本薬物の吸収性の改善が期待できることを示唆するものであった。そこで次に、YM466 の経口吸収性に及ぼす消化管内移行性の影響を、消化管内移行性を抑制することが知られている臭化プロパンテリン処理を施したイヌを用いて評価した。その結果、臭化プロパンテリン処理群で得られた YM466 の AUC および C_{max} は、予想に反し、それぞれ対照群の 19%および 9%に著しく低下することが明らかとなった。この結果は、本薬物の消化管内滞留時間の延長が、むしろ吸収の抑制につながっていることを示すものであった。YM466 は、生理的 pH では化学的にも安定であり、前述のように代謝もほとんど受けないことから、この YM466 の吸収低下の原因として胆汁等の消化管内成分との相互作用の影響が考えられた。

そこで、YM466 の吸収に及ぼす胆汁の影響を、ラット *in situ* ループ法により検討した。胆管カニューレションにより胆汁のループ内への流入を阻害したラットにおける YM466 の血漿中濃度は、無処置群と比較して有意に高く、投与後 1 時間では約 3 倍の値を示したことから、YM466 は小腸内の胆汁により吸収性が低下することが示唆された。さらに

YM466 に種々の濃度の胆汁あるいは胆汁酸塩を添加・混合したところ、YM466 の溶解度は、添加濃度 10–15 mg/mL まで濃度依存的に減少し、YM466 自身の溶解度の 20–25% まで低下することが明らかとなった。このことから、YM466 は胆汁あるいは胆汁酸と相互作用し、難溶性の複合体を形成しているものと考えられた。胆汁あるいは胆汁酸塩濃度 15 mg/mL 以上においては、YM466 の溶解度は対照の 50%程度にまで漸増する傾向を示したが、これは可溶性複合体（ミセル）が形成されているものと考えられた。この可溶性複合体をラットに経口投与した時の薬物血漿中濃度は薬物単独投与時の約 25%であったことから、この可溶性複合体は難吸収性であると考えられた。ヒトにおける小腸管腔内胆汁酸濃度は 3–15 mM（タウロコール酸ナトリウム濃度換算では 2–8 mg/mL）と報告されており、YM466 と難溶性複合体を形成する条件に相当することから、YM466 と胆汁との相互作用は、ヒト小腸管腔内環境においても難溶性複合体を形成することにより本薬物の吸収に抑制的に影響する可能性が示唆された。次に、この YM466 と胆汁酸との相互作用のメカニズムを分子レベルで評価することを目的に、NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 分析を行った。その結果、YM466 と胆汁酸は YM466 のナフタレン環と胆汁酸のステロイド骨格との間で相互作用していることが示唆された。

これらの知見を元に、YM466 の経口吸収性を改善する目的で、本薬物と胆汁との相互作用を抑制する添加剤の探索を、胆汁末を用いた *in vitro* 限外ろ過法により行った。添加剤として、アルギン酸ナトリウム、ヒプロメロース、アミノアルキルメタクリレートコポリマー E (AAM copolymer E) の 3 種を選択し、YM466 と胆汁との相互作用に対する影響を検討した結果、AAM copolymer E が顕著に難溶性複合体の形成を抑制することが明らかとなった。この相互作用抑制効果は AAM copolymer E 濃度に依存的であり、YM466 に対して重量比で約 5 倍量の AAM copolymer E を共存させることにより、胆汁との相互作用をほぼ完全に抑制可能であることが示された。この相互作用抑制機序解明の一端として、YM466 と AAM copolymer E、および胆汁酸と AAM copolymer E の相互作用について *in vitro*

限外ろ過法により検討した。その結果、AAM copolymer E は YM466 とではなく胆汁酸と相互作用していることが明らかとなった。このことから、AAM copolymer E は胆汁酸と相互作用することで、YM466 と胆汁酸の難溶性複合体形成を抑制しているものと考えられた。

次に、AAM copolymer E が実際に YM466 の経口吸収性に影響を及ぼすか否か検討するために、ラットに YM466 および AAM copolymer E の同時経口投与を行った。その結果、YM466 の血漿中濃度は AAM copolymer E 濃度に依存的な増大を示し、薬物量に対し 3 倍量のポリマーを投与することにより、薬物単独投与時に比し、AUC は約 2.6 倍と、有意な増大を示すことが明らかとなった。このことから、AAM copolymer E は、経口投与後においても小腸管腔内において、YM466 と胆汁の相互作用を抑制し、難溶性複合体の形成を防ぐことで、YM466 の吸収を改善しているものと考えられた。AAM copolymer E はカチオン性合成高分子（平均分子量 150000）で、主に苦味マスキングの為のコーティング剤として用いられている経口製剤用添加剤であり、安全性の観点からも非常に有用であると考えられた。

以上、YM466 の経口吸収に影響を及ぼし得る諸因子の解析結果より、胆汁との相互作用による難溶性複合体の形成が、YM466 の吸収性を抑制する重要な要因であることを明らかとした。この相互作用を回避・軽減することが、本薬物の経口吸収の改善に有用と考えられ、探索の結果、AAM copolymer E が YM466 と胆汁との相互作用抑制および YM466 の経口吸収改善に有用な添加剤であることを見出した。これらの知見は、YM466 および胆汁との相互作用により吸収性が低下するその他の薬物に対して、その経口製剤処方設計に有益な情報を提供するものと考えられる。

総論の部

諸言

N-[4-[(1-acetoamidoyl-4-piperidyl)oxy]phenyl]-N-[(7-amidino-2-naphtyl)methyl]sulfamoyl acetic acid monomesilate (YM466, FX-93 monomesilate, Figure 1) は、近年、抗凝血治療薬開発の為の新たな標的として着目されている factor Xa (凝固第 10 因子)^{1,2)}に対する強力な抗活性作用を有するとともに、高い安全性を兼ね備える新規抗凝血薬として開発中の化合物である³⁻⁷⁾。Factor X は、生体中における凝血機構において、中心的な役割を果たす糖タンパク質であり、内因性および外因性の両経路において活性化される⁸⁾。Factor Xa (活性化された factor X)によって血液の凝固を促すタンパク分解酵素トロンビンの形成が促進されるが、この機構を阻害するのが YM466 の抗凝血活性メカニズムと考えられている³⁾。

Factor Xa 阻害剤は、連日の服用を必要とすることから、簡便な服用を可能とする経口製剤としての開発が望まれている³⁾。しかしながら、YM466の経口バイオアベイラビリティは、ラットおよびイヌにおいて、それぞれ4%および7%と低いことが報告されている⁹⁾。YM466 は、pH 3-7 (40 °C) で24時間インキュベーションを行った後の回収率、およびpH 1.2 (37 °C) の溶出試験における30分後の回収率は、いずれも100%であることを確認しており、生理的条件において化学的に安定であると言える。また、アミジノ基の存在により、pKa (計算値) は11以上となることから、イオン型に対する非イオン型の割合は、生理的pH条件 (pH 1-7) において殆ど同じ (0.01%以下) であり、YM466の親油性は、これらのpH条件において影響を受けないと考えられる。さらに、YM466は、肝ミクロソームによりほとんど代謝されないこと⁹⁾、またラットにおいては経口投与後に代謝物が検出されないことが報告されており¹⁰⁾、経口投与後の初回通過代謝によるバイオアベイラビリティ低下の可能性も低いと考えられた。これらの結果より、YM466の低い経口バイオアベイラビリティは低い

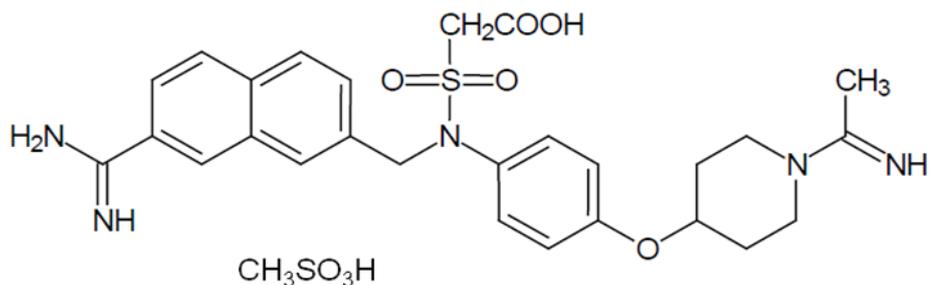


Figure 1. Chemical structure of YM466.

経口吸収性によるものと考えられた。従って、本薬物の経口製剤化を可能とする為には、経口吸収性を改善する必要があり、そのためにはまず、本薬物の低い経口吸収性の要因を解明する必要がある。

本研究では、まず YM466 の経口製剤化の為の基礎的知見を得る目的で、YM466 の吸収動態特性の評価を行った。経口吸収に影響を及ぼし得る諸因子の解析結果より、胆汁が YM466 の吸収低下の重要な因子であることを明らかとした。次いで、YM466 と胆汁との相互作用の評価の結果、難溶性複合体の形成が、YM466 の吸収性を抑制する重要な要因であることを明らかとした。この相互作用を回避・軽減することが、本薬物の経口吸収の改善に有用と考えられ、当該作用を有する素材の探索の結果、合成高分子アミノアルキルメタクリレートコポリマーE (Aminoalkylmethacrylate copolymer E, AAM copolymer E) が YM466 と胆汁との相互作用抑制および YM466 の経口吸収改善に有用な添加剤であることを見出した。

以下、三章にわたり得られた知見を論述する。

第 1 章 YM466 の吸収動態特性および吸収性に及ぼす胆汁の影響評価

1.1. YM466 の溶解度評価

はじめに、YM466 の低い経口吸収性の要因を解明する目的で、本薬物の溶解性について評価を行った。検討には YM466 (メシル酸塩)、および YM466 塩酸塩の 2 種類の塩形態の薬物を用いた。種々の pH 条件における YM466 および YM466 塩酸塩の溶解度を示す (Table 1)。いずれの塩形態においても、YM466 は高 pH 条件よりも低 pH 条件において、より高い溶解度を示したことから、YM466 は塩基性薬物であることが確認された。YM466 の溶解度は 0.8–9.9 mg/mL、YM466 塩酸塩の溶解度は 0.3–18.3 mg/mL と、pH 11 の場合を除き、塩酸塩の方がメシル酸塩よりも高い溶解度を示したが、経口投与後の消化管管腔内液環境と想定される pH 1–7 条件においては、YM466 の溶解度はいずれも 1 mg/mL 以上であった。次いで、この溶解性が実際の経口吸収性を制限する要因となるか否かを、Dose number (D_0) を算出することにより評価した。 D_0 は、投与量を投与時に摂取する水の容積(通常 250 mL)と溶解度で除することにより算出するが、得られた値が 1 を超えると当該薬物の溶解性が吸収性を律速する可能性を示すとされている¹¹⁾。

D_0 は以下の式により算出される。

$$D_0 = (D/V_0)/C_s$$

C_s は溶解度、 D は服用量、 V_0 は服用時に飲む水の量であり、水の量に関しては標準値として報告されている 250 mL を用いた¹²⁾。YM466 の臨床最大投与量は一日あたり 100 mg と想定されており、この値を D に用いて計算した結果、生理的 pH 条件 (pH 1-7) における YM466 および YM466 塩酸塩の D_0 値はそれぞれ 0.04-0.27、および 0.02-0.09 と、1 よりも十分に小さい値であることが明らかとなった。このことから、本薬物の消化管内での溶解性には問題はなく、本薬物の低吸収性は薬物自体の溶解性に起因するものではないと考えられた。

Table 1. Solubility of YM466 in various pH conditions.

	pH	1	3	5	7	9	11
Solubility (mg/mL)	YM466 (monomesilate)	9.9	1.7	1.5	1.6	1.7	0.8
	YM466 monohydrochloride	18.3	6.8	4.5	4.3	4.1	0.3

1.2. Caco-2 細胞を用いた膜透過性の評価

ヒト結腸がん由来細胞 Caco-2 細胞はヒトにおける薬物の経口吸収を予測する際の小腸上皮細胞のモデルとして広く用いられている^{13,14)}。本検討では、YM466 の膜透過性について、ヒトにおける吸収性が報告されている3種のモデル薬物（プロプラノロール、ナドロール、フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン 4000）^{13,14)}と共に、Caco-2 細胞を用いて比較・検討を行った。プロプラノロール（PPL）、ナドロール（NDL）、フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン 4000（FD-4）は、それぞれ、高吸収性、中吸収性、低吸収性の薬物として評価に用いた。得られた YM466 および他のモデル薬物の見掛けの膜透過係数 P_{app} を Table 2 に示す。YM466 の P_{app} は、 $0.45 \pm 0.10 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ 、FD-4、NDL、PPL の P_{app} はそれぞれ、 $0.06 \pm 0.22 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ 、 $0.37 \pm 0.09 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ 、および $4.53 \pm 1.15 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ であった。YM466 の膜透過性は NDL と同程度かやや上回る程度であった。Caco-2 細胞における P_{app} と種々のモデル薬物のヒトにおける吸収性にはシグモイド型の相関関係が存在することが知られており¹⁵⁾、今回得られたモデル薬物の P_{app} の結果より、YM466 のヒトにおける吸収率は 30%-40% と推定された。本結果は、YM466 は Biopharmaceutics Classification System では低膜透過性薬物に分類されるものの¹¹⁾、経口製剤開発の観点からは許容レベルの吸収性を示すことを示唆するものであった。しかしながら実際の経口バイオアベイラビリティでは前述の通り種々の動物において 4%から 7%と低い結果が得られていることから、本薬物の低い経口吸収性には膜透過性以外の因子が関与

Table 2. Permeability of YM466 and model compounds across Caco-2 cell monolayers.

Compound	P_{app} (×10⁻⁶ cm/s)	F (%)^a
YM466	0.45 ± 0.10	-
FD-4	0.06 ± 0.02	0
NDL	0.37 ± 0.09	35
PPL	4.53 ± 1.15	90

Results are expressed as the mean ± SD (*n*=9).

^aFraction of dose absorbed, F, in humans was cited from references; FD-4 [Yamashita et al., 2000], NDL and PPL [Chong et al., 1996].

している可能性が示唆された。

1.3. YM466 の消化管吸収部位の影響評価

YM466 は、肝ミクロソームによりほとんど代謝されないこと⁹⁾、またラットにおいては経口投与後に代謝物が検出されないこと¹⁰⁾が報告されており、経口投与後の初回通過代謝によるバイオアベイラビリティ低下の可能性は低いと考えられる。また、静脈内投与後の胆汁中への排泄率は高いものの肝抽出率は 0.33 程度であり¹⁰⁾、低バイオアベイラビリティの主要な原因とは考えられない。これらのことから、YM466 の経口バイオアベイラビリティは主として消化管内管腔からの吸収性により決定されると考えられた。そこで、消化管からの吸収について詳細に検討を行うため、YM466 の消化管吸収における部位差について、ラット *in situ* ループ法により評価した。YM466 は、静脈内投与後、主として胆汁に排泄されることが報告されていることから¹⁰⁾、検討は胆管を結紮した条件において実施した。消化管ループは、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸の 5 つの消化管部位について作成した。

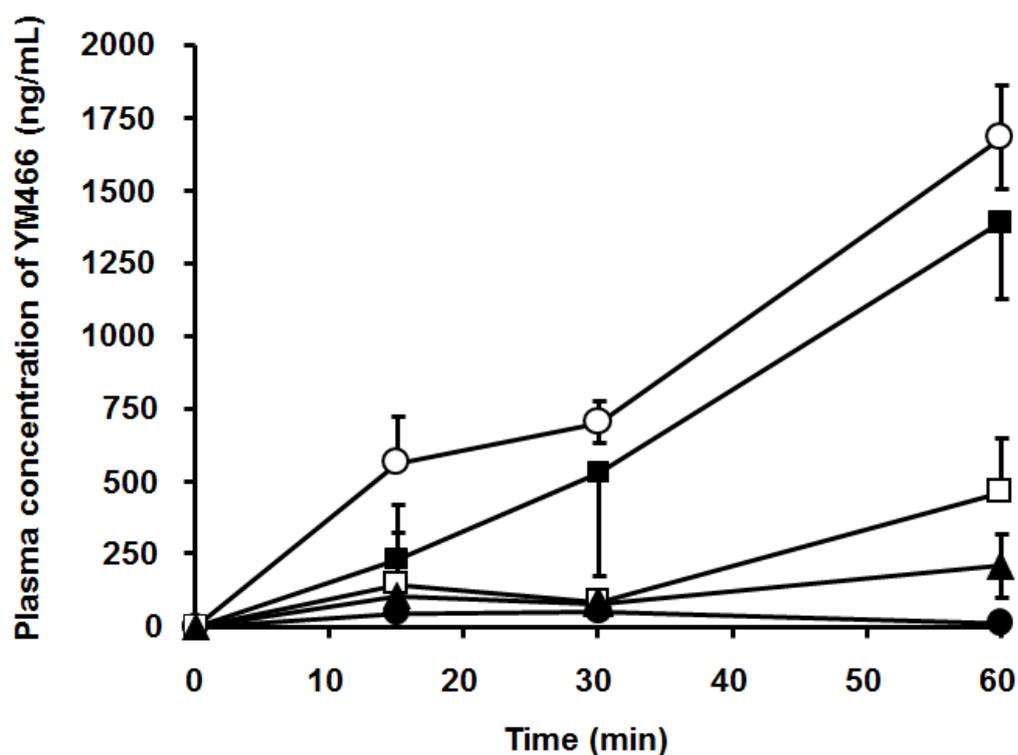


Figure 2. Plasma concentrations of YM466 after administration to different segments of the gastrointestinal tract in rats. Keys: ●, Stomach; ○, Duodenum; ■, Jejunum; □, Ileum; ▲, Colon.

Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$).

YM466 をそれぞれの消化管内ループから投与した後の薬物血漿中濃度プロファイルを図 2 に示す。胃を除き、何れの部位においても投与後 60 分まで持続的な薬物の吸収が認められた。YM466 の吸収性には消化管部位による差が認められ、特に、腸管上部（十二指腸、空腸）からの吸収は胃及び腸管下部（回腸、結腸）に比して良好であることが示された。腸管上部と下部における吸収性の違いの理由の詳細は現時点で不明であるが、今回の結果より、YM466 は胃を除いていずれの消化管部位でも吸収されること、中でも腸管上部がより効率的な吸収部位であることが明らかとなった。

1.4. YM466 の経口吸収性に及ぼす消化管内移行性の影響

1.3 での検討結果は、YM466の腸管上部における滞留時間を延長することで、本薬物の吸収性の改善が期待できることを示唆するものであった。そこで次に、YM466の経口吸収性に及ぼす消化管内移行性の影響を、臭化プロパンテリン処理を施したイヌを用いて評価した。副交感神経遮断効果を有する臭化プロパンテリンは、ラットおよびイヌにおいて静脈内投与することにより、消化管運動を抑制することがよく知られている^{16,17)}。ラットを用いた難吸収性薬物の経口投与に関する検討においては、本処理によりCmax の低下やTmaxの遅延は認められるものの、吸収量は増加したことが報告されている¹⁷⁾。今回の検討における、臭化プロパンテリン処理による消化管運動の抑制効果の確認は、スルファサラジンの経口投与により行った。スルファサラジンは経口投与後、消化管から吸収されないが、盲腸到達後、腸内細菌によりアゾ結合が開裂することで、吸収性のスルファピリジンを生成し、このスルファピリジンが吸収され血中に出現する¹⁸⁾。この特性を利用することで、スルファサラジン/スルファピリジンは盲腸到達時間のマーカーとして用いられる¹⁹⁾。本検討において、スルファサラジン経口投与後の血漿中のスルファピリジンの初回検出時間（平均値）は、未処置群では2.8時間であったのに対し、処置群では5.0 時間に遅延した。本結果より、臭化プロパンテリン処理により確かに消化管運動が抑制されていることを確認した。臭化プロパンテリン処置群における、YM466 経口投与（5 mg/kg）後の、血漿中濃度プロファイルおよび薬物動態パラメータをそれぞれFigure 3 およびTable 3 に示す。比較として、未処置群の結果を対照として合わせて示した。臭化プロパンテリン処置群におけるYM466のCmax は 74.2 ± 29.6 ng/mL、AUC_{0-10h}は 278.4 ± 125.3 ng・h/mL であり、対照群に比してそれぞれ9%、19%といずれも著しく有意な低値を示した。Tmax は 4.5 ± 2.2 h と、対照群に比して約4時間の遅延が認められた。本結果は、予想に反し、YM466の消化管内滞留時間の延長が、むしろ吸収の抑制につながっていることを示すものであった。YM466は、生理的pHでは化学的にも安定であり、前述のように代謝もほとんど受けない。それ故、今回認められた

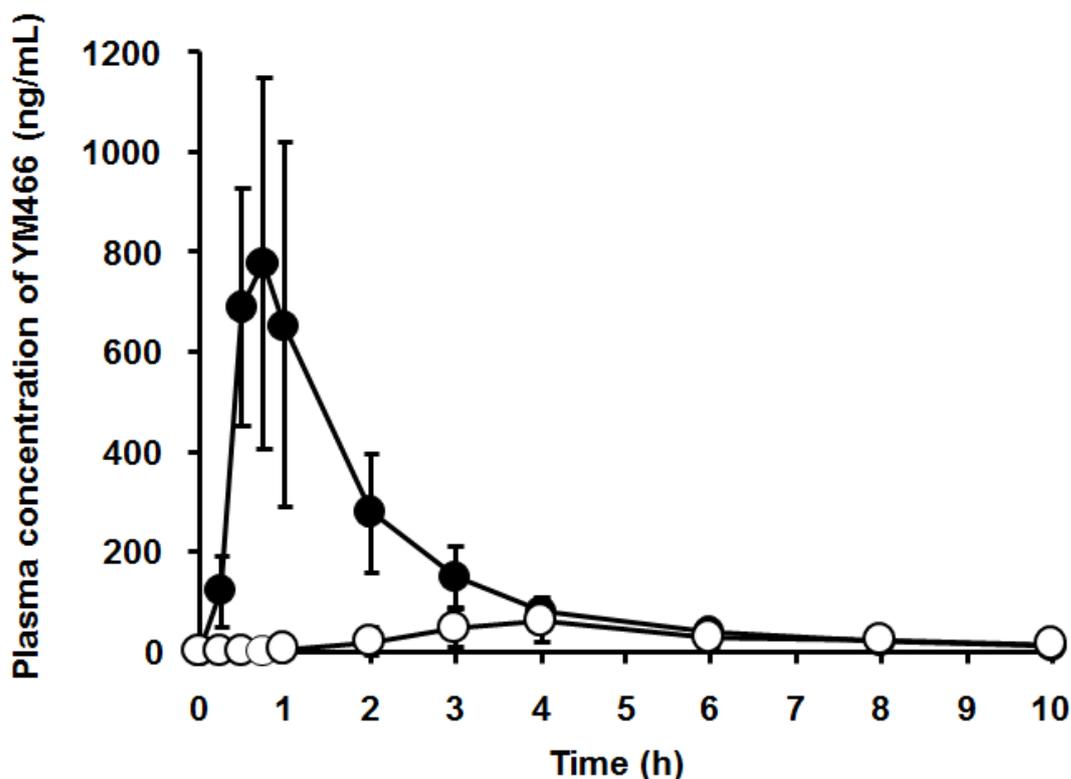


Figure 3. Plasma concentrations of YM466 after oral administration at 5 mg/kg to fasted dogs with or without treatment of propantheline bromide. Keys: ●, Non-treatment; ○, Treatment with propantheline bromide. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 6$).

消化管運動抑制条件での YM466 の吸収低下を説明する一つの考え方として、YM466 の胃排出速度、言い換えれば小腸上部への移行速度の低下が本薬物と小腸上部に存在、あるいは分泌されている、例えば胆汁等の物質との相互作用を促進し、その相互作用が薬物の消化管吸収を抑制している可能性が考えられた。胆汁は、通常、イヌやヒトにおいては、胆嚢より十二指腸に分泌される。ラットにおいては、小腸管腔に持続的に分泌されている²⁰⁾。胆汁はその大部分が食事中に分泌されることはよく知られているが、空腹・絶食条件においても、一定の割合での分泌はなされており²¹⁾、消化管内、特に小腸上部には常時存在

Table 3. Pharmacokinetic parameters of YM466 after oral administration of YM466 solution (5 mg/kg) to fasted beagle dogs.

Treatment	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-10h} (ng·h/mL)
None (control)	0.7 ± 0.2	823.1 ± 354.8	1481.3 ± 579.6
Propantheline bromide	4.5 ± 2.2	74.2 ± 29.6 **	278.4 ± 125.3 **

Pharmacokinetic parameters were calculated based on the results shown in Fig. 3. Results are expressed as the mean ± SD (*n* = 6). ** *p* < 0.01, compared with none-treatment (control).

しているものと考えられる。従って、臭化プロパンテリン処置によるYM466の胃排出速度の低下は、YM466と胆汁との相互作用を引き起こしている可能性が考えられた。以上の結果より、消化管移動を抑制したイヌにおけるYM466の血漿中濃度の低下の原因として、YM466と胆汁との相互作用の関与が示唆された。

1.5. YM466 の消化管吸収に及ぼす胆汁の影響

YM466 の消化管からの吸収に及ぼす胆汁の影響を、ラット *in situ* ループ法により検討した。小腸内への胆汁の流入を抑えるための胆管カニュレーション処置を施した群と、同処置を施さない群につき、胃幽門部および回盲接合部を結紮した小腸ループを作成し、本ループ内に、2.5 mg/kg の投与量となるように投与した YM466 の血漿中濃度プロファイルを調べた。得られた結果を Figure 4 に示す。胆汁の存在する胆管カニュレーション無処置ラットにおける YM466 の AUC_{0-1h} は $56.7 \pm 12.3 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ (平均値, $n=3$) であったのに対し、胆管カニュレーション処置を行った胆汁分泌を抑制したラットにおける YM466 の AUC_{0-1h} は $160.4 \pm 18.7 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ (平均値, $n=3$) と、無処置群と比較して有意に高く、YM466 の血漿中濃度は投与後 1 時間で、約 3 倍の値を示した。本結果より、YM466 の消化管吸収は小腸管腔内における胆汁の存在により著しく抑制されることが明らかとなった。胆汁はその主成分に内因性の界面活性剤である胆汁酸を含有しており、脂質、コレステロール、脂溶性ビタミン等の消化管吸収に重要な役割を果たしていることが報告されている²²⁾。またこれまで、グリセオフルビン、フェノールレッド、スルファグアニジン 等多くの薬物において、胆汁の存在によって、薬物の溶解度あるいは膜透過性が改善されることにより消化管吸収が改善されることが報告されている²³⁻²⁶⁾。その一方で、胆汁が薬物の吸収を抑制することがあることも報告されており、例として、イミプラミン、パフェノロール、ナドロール といった塩基性薬物の吸収が、胆汁によりそれぞれ、50–60%、40–55%、50% 低下することが報告されている^{22, 27-28)}。今回の実験で YM466 は胆汁存在下で約 65% の吸収低下を示したことから、上記の他の薬物での報告例と比べても、YM466 の吸収性は小腸管腔内の胆汁により、同程度かそれ以上の抑制的影響を受けていると考えられた。

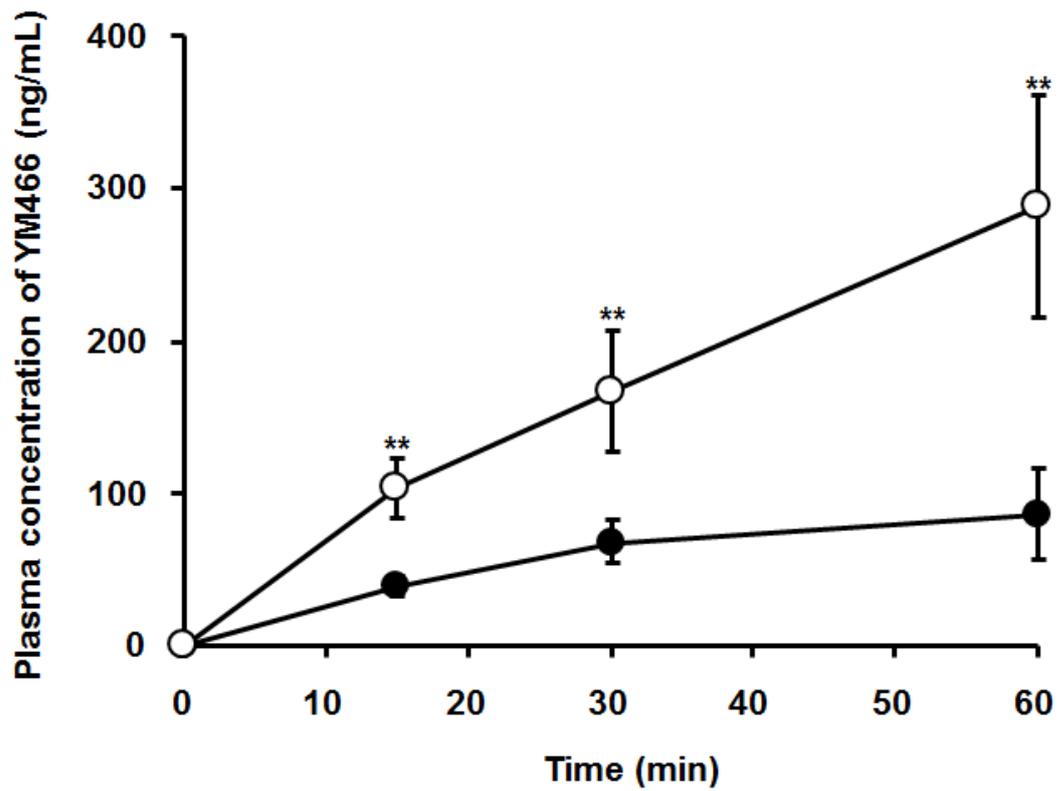


Figure 4. Plasma concentrations of YM466 after administration to the small intestinal loop of fasted rats with bile duct cannulation or sham operation. Keys: ○, rats with bile duct cannulation; ●, rats with sham operation. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). ** $p < 0.01$, compared with rats with sham operation.

1.6. 小括

本章では、まず YM466 の低い経口吸収性の要因を理解する目的で、本薬物の溶解性について評価を行った。溶解性が実際の経口吸収性を制限する要因となるか否かの指標となる Dose number (D_0)は、生理的消化管管腔内条件下において、1 よりも低値であった。このことから、本薬物の消化管内での溶解性には問題はなく、本薬物の低吸収性は薬物自体の溶解性に起因するものではないと考えられた。

次いで、本薬物の膜透過性について、ヒトにおける吸収性が報告されている 3 種のモデル化合物と共に、ヒト結腸がん由来細胞 Caco-2 細胞を用いて、比較・検討を行った。その結果、ヒトにおける吸収量は約 30–40% と推察された。実際の経口バイオアベイラビリティは、種々の動物において 4% から 7% と低い結果が得られていることから、本薬物の低い経口吸収性には膜透過性以外の因子が関与している可能性が示唆された。

更に、消化管からの吸収についてより詳細な検討を行うため、YM466 の消化管吸収における部位差について、ラット *in situ* ループ法により評価した。その結果、YM466 の吸収性には消化管部位による差が認められ、腸管上部（十二指腸、空腸）からの吸収が胃及び腸管下部（回腸、結腸）に比して良好であることが示された。一方で、YM466 の経口吸収性に及ぼす消化管内移行性の影響を、消化管内移行性を抑制することが知られている臭化プロパンテリン処理を施したイヌを用いて評価した結果、臭化プロパンテリン処理群で得られた YM466 の吸収は、予想に反し、対照群に比し著しく低下することが明らかとなった。この結果は、本薬物の消化管内滞留時間の延長が、むしろ吸収の抑制につながっていることを示すものであった。YM466 は、生理的 pH では化学的にも安定であり、肝ミクロソームによりほとんど代謝されないこと、またラットにおいては経口投与後に代謝物が検出されないことから、この YM466 の吸収低下の原因として胆汁等の消化管内成分との相互作用の影響が考えられた。

そこで、YM466 の吸収に及ぼす胆汁の影響を、ラット *in situ* ループ法により検討した。

胆管カニューレーションを施すことにより胆汁のループ内への流入を阻害したラットにおける YM466 の血漿中濃度は、無処置群と比較して約 3 倍の有意な高値を示したことから、YM466 は消化管内の胆汁により吸収性が低下することが示唆された。

以上、YM466 の経口吸収に影響を及ぼし得る諸因子の解析結果より、消化管管腔内の胆汁が、YM466 の吸収性を抑制する重要な要因であることが示唆された。

第2章 YM466 と胆汁との相互作用の評価

第1章での検討において、YM466の低い経口吸収性の原因として、消化管管腔内の胆汁との相互作用の影響が示唆された。第2章では、YM466と胆汁との相互作用の詳細を明らかにする目的で、種々の検討を行った。

2.1. YM466 と胆汁／胆汁酸との相互作用の *in vitro* 評価

YM466 と胆汁との相互作用を定量的に評価する目的で、種々の量の胆汁存在下における本薬物の溶解度を調べた。胆汁の主成分である胆汁酸の影響についても、タウロコール酸ナトリウムを用いて、YM466 の溶解度に及ぼす影響について調べた。タウロコール酸ナトリウムは代表的な胆汁酸塩として、絶食時小腸内模擬腸液である FaSSIF (fasted-state-simulated intestinal fluid) や、飽食時小腸内模擬腸液 FeSSIF (fed-state-simulated intestinal fluid) 等の成分として用いられている²⁹⁻³⁰。種々の濃度の胆汁および胆汁酸塩を添加した際の本薬物の溶解度プロファイルを図5に示す。YM466 の溶解度は、胆汁および胆汁酸塩の添加濃度 10–15 mg/mL まで濃度依存的に減少し、YM466 自身の溶解度の 20–25% まで低下した。このことから、YM466 は胆汁および胆汁酸と相互作用し、難溶性の複合体を形成しているものと考えられた。また、濃度 15 mg/mL 以上においては、YM466 の溶解度は対照の 50% 程度にまで漸増する傾向を示した。これは、可溶性の複合体（ミセル）が形成されたためではないかと考えられた。胆汁と胆汁酸において、同様の溶解度プロファイルを示したことから、胆汁酸が YM466 との相互作用を示す胆汁中の代表的な成分であると考えられた。図5に示した YM466 の溶解度-胆汁および胆汁酸塩濃度プロファイルは、YM466 は胆汁および胆汁酸と相互作用し、難溶性の複合体を形成すること、そして薬物に対する胆汁の量比が複合体形成に重要であることを示している。胆汁および胆汁酸塩濃度が 10–15 mg/mL までは、濃度依存的に、YM466 の溶解度の低下が認められた。本結果は、1.4 で認められた、臭化プロパンテリン処置を行ったイヌにおける YM466 の吸収性の低下

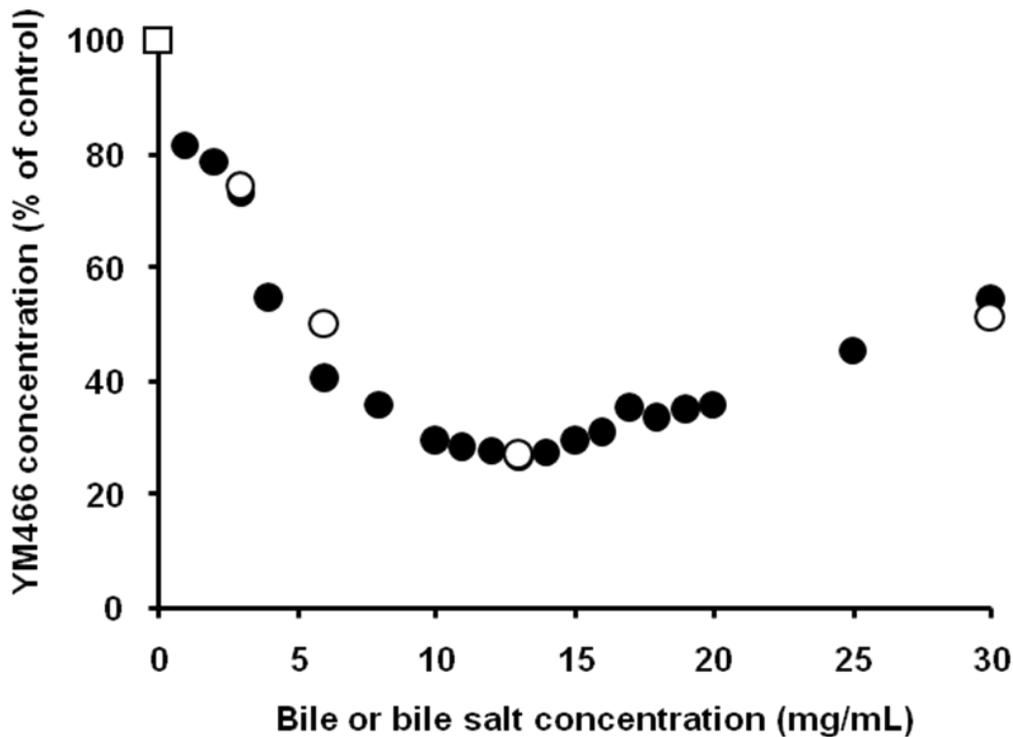


Figure 5. Effect of bile or bile salt on YM466 solubility. Keys: □, Control (saturated solution in phosphate buffered saline, pH6.5); ●, Bile added; ○, Sodium taurocholate added. Each symbol represents a single value of YM466 concentration in the supernatant of mixture.

を説明可能なものであった。すなわち、胃排出速度の低下が小腸上部への薬物の移行速度の低下を引き起こし、胆汁および胆汁酸に対する薬物の割合が低い状態が形成されたものと考えられた。これにより、小腸管腔内において難溶性の複合体が形成され、吸収の低下につながった可能性が考えられた。一方、胆汁および胆汁酸塩濃度 15 mg/mL 以上の条件においては、限外濾過（分子量カットサイズ：3000 Da）で YM466（0.875 mg/mL）と胆汁（50 mg/mL）との混合物を濾過した結果、濾液中の薬物濃度は約 30%にまで低下したことから、見掛け上高分子となる可溶性複合体（ミセル）が形成されているものと考えられた。

以上の結果より、YM466 は胆汁および胆汁酸と相互作用し、難溶性あるいは可溶性の複

合体を形成することが明らかとなった。

2.2. 胆汁酸の種類の違いにおける YM466 との相互作用性評価

YM466 は親水基と疎水基の両方を有する塩基性薬物であり、これは、胆汁酸との相互作用が報告されているナドロール、イミプラミン、パフェノロール、アテノロール等の薬物と共通している点である^{22, 27, 28, 31)}。また、胆汁酸と相互作用することが知られている薬物の中でも、 β ブロッカーであるナドロールは、胆汁酸との相互作用が胆汁酸の種類に依存することが報告されている²²⁾。YM466 についても、胆汁酸との相互作用における胆汁酸の種類の影響を評価する目的で、タウロコール酸ナトリウムを含む 6 種の胆汁酸塩または胆汁酸（タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸、リトコール酸）を用い、その薬物の溶解度に対する影響を評価した。用いた胆汁酸塩および胆汁酸の構造式を Figure 6 に示した。各種胆汁酸塩または胆汁酸を用いて得られた薬物の溶解度プロファイルを示す。比較の為、胆汁を添加した際の溶解度プロファイルを合わせて示した。結果、得られた溶解度プロファイルは、胆汁酸の種類に依存して異なることが明らかとなった。相互作用の様式としては、1) 難溶性複合体形成による溶解度の低下の後、可溶性の複合体を形成する（タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、コール酸ナトリウム）、2) 難溶性の複合体の形成による溶解度低下のみを示す（デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸）、3) 相互作用による溶解性の低下を殆ど生じない（リトコール酸）の 3 種類に分類された。興味深いことに、様式 1) に分類された胆汁酸は、何れも構造中に 3 つの水酸基を有する胆汁酸であり、様式 2)、様式 3) に分類された胆汁酸はそれぞれ、構造中に 2 つの水酸基、および 1 つの水酸基を有する胆汁酸であった。本結果より、胆汁酸の水酸基の数が、YM466 と胆汁酸との相互作用の様式に影響を及ぼす可能性が示唆された。胆汁酸の水酸基の数が薬物と胆汁酸との相互作用の程度に影響を及ぼす例はナドロールにおいて

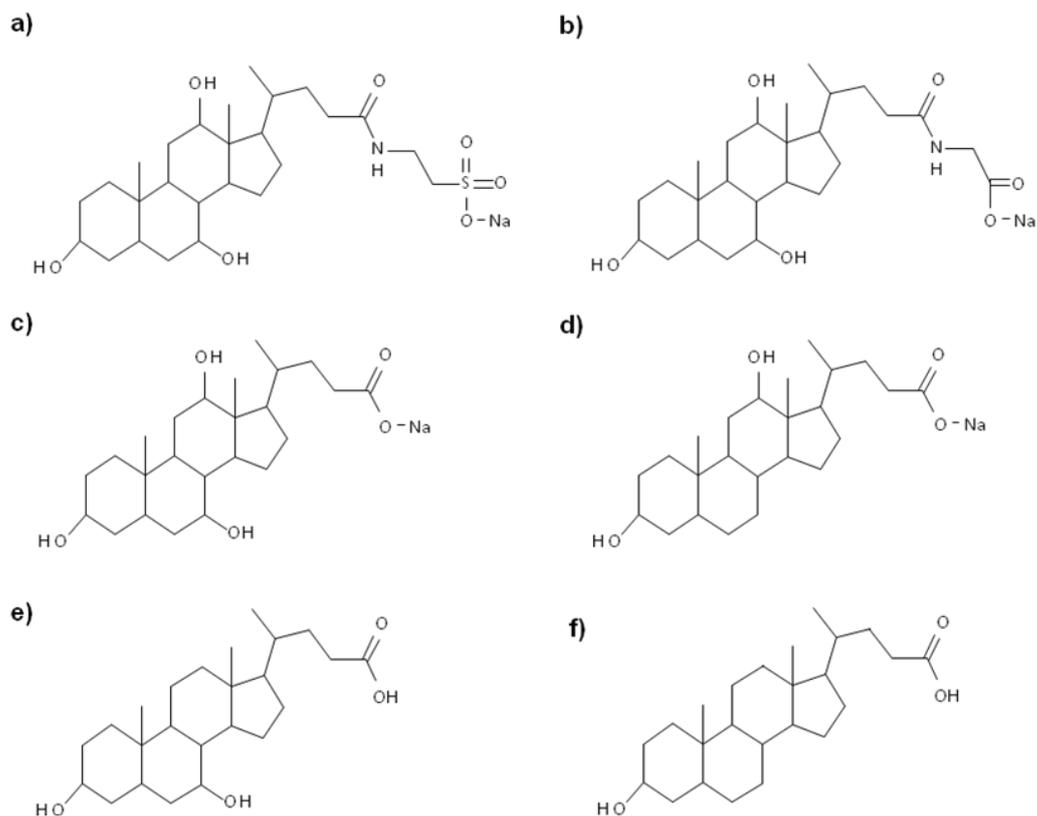


Figure 6. Chemical structure of bile salts used in this study. a) Sodium taurocholate, b) Sodium glycocholate, c) Sodium cholate, d) Sodium deoxycholate, e) Chenodeoxycholic acid (bile acid), f) Lithocholic acid (bile acid).

も報告されている²²⁾。しかしながら、ナドロールでの検討においては、3つの水酸基を有する胆汁酸のみが相互作用を示し、2つの水酸基、および1つの水酸基を有する胆汁酸では相互作用が殆ど認められなかった²²⁾。YM466においては、2つの水酸基を有する胆汁酸とも相互作用が認められていることから、ナドロールで認められた胆汁酸との相互作用とはメカニズムが異なっている可能性が考えられた。ヒトの小腸上部における胆汁酸については、約60%以上がタウロコール酸、グリココール酸といった、3つの水酸基を有した胆汁酸で

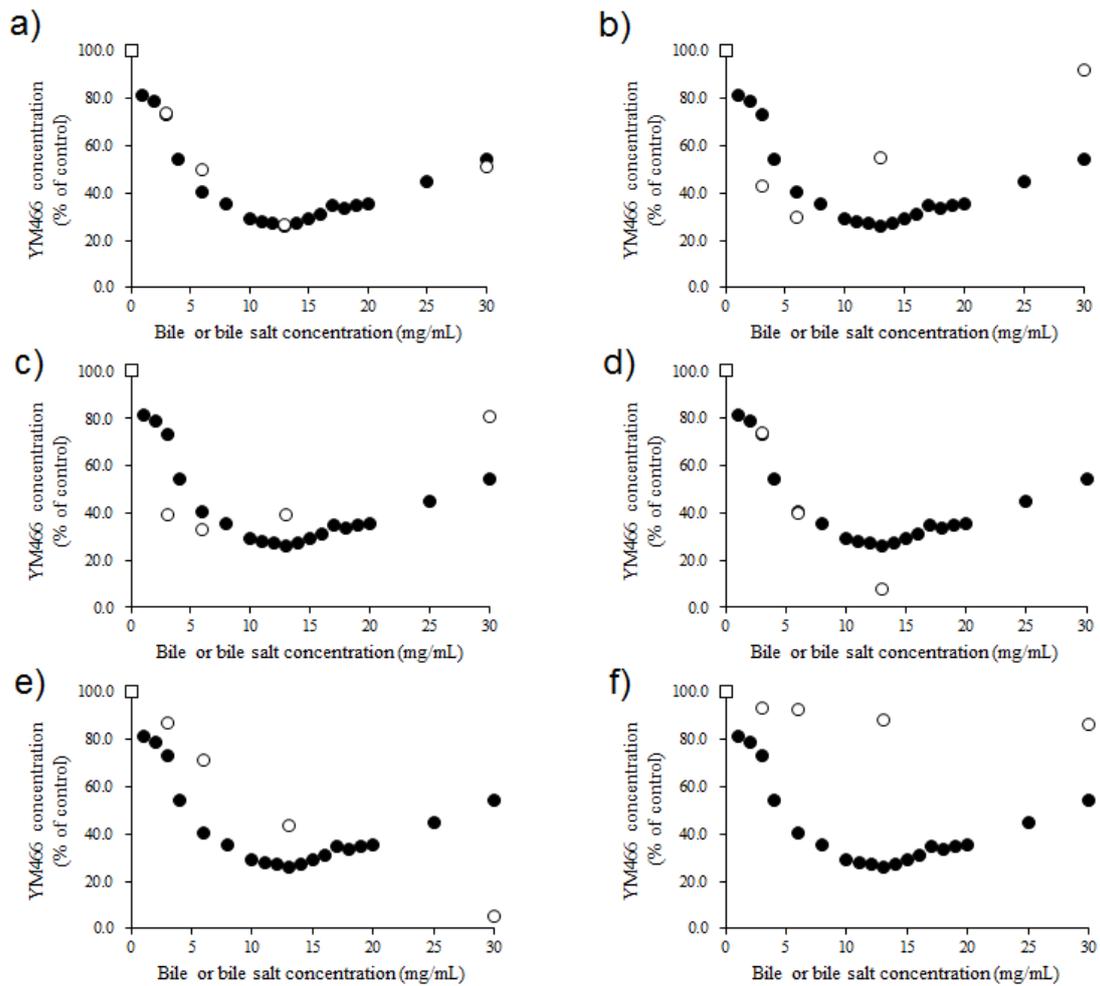


Figure 7. Effect of various bile salts on YM466 solubility. Keys: □, Control (saturated solution in phosphate buffered saline, pH6.5); ●, Bile added ; ○, a) Sodium taurocholate, b) Sodium glycocholate, c) Sodium cholate, d) Sodium deoxycholate, e) Chenodeoxycholic acid, f) Lithocholic acid added. Each symbol represents a single value of YM466 concentration in the supernatant of mixture.

あることが報告されている³²⁾。残りの胆汁酸成分は2つの水酸基を有する胆汁酸であり、1つの水酸基を有する胆汁酸は殆ど確認されていない^{32,33)}。以上の結果より、ヒト小腸管腔内においても、YM466は各種胆汁酸と相互作用を示す可能性が示唆された。

2.3. 難溶性複合体の経口吸収性の *in vivo* 評価

2.1 および 2.2 の検討において、YM466 は胆汁および胆汁酸と相互作用し、難溶性あるいは可溶性の複合体を形成することが明らかとなった。そこで、これら複合体の吸収性について評価を行う目的で、ラットを用いた経口投与実験を行った。本検討ではまず、難溶性複合体の経口吸収性を評価した。YM466 水溶液に、胆汁酸塩（タウロコール酸ナトリウム）をモル比 1:1 で添加し、乾燥することで得た難溶性複合体を 15 mg/kg の YM466 投与量となるように絶食下経口投与した後に得られた YM466 の血漿中濃度プロファイルおよび薬物動態パラメータを Figure 8 および Table 4 にそれぞれ示す。比較の為、YM466 単独投与群（対照群）の結果も合わせて示した。対照群の吸収性は 1.5 で示したラットにおける薬物吸収性の結果に比し、胆管未処置条件であるにも関わらず、一定の吸収性を示したが、これは投与量を 2.5 mg/kg から 15 mg/kg へと 6 倍（投与液量濃度としては 0.125 mg/mL から 3 mg/mL へ 24 倍）に上げたことにより、薬物の胆汁酸に対する存在割合が増大することで胆汁の影響が限定的になった為であると考えられ、複合体化による吸収の影響を簡易的に評価可能な投与条件と判断した。難溶性複合体投与群の血漿中濃度、 AUC_{0-2h} および C_{max} はいずれも対照群に比して、有意な低値を示した。難溶性複合体試料投与群の YM466 の AUC_{0-2h} および C_{max} の平均値は、対照群のそれぞれ 23% および 30% であった。本結果より、形成された難溶性複合体中の YM466 の吸収性は低いことが明らかとなった。要因としては、複合体自体の溶解度の低いことに依るものと考えられ、消化管内におけるこのような複合体の形成は、YM466 の吸収低下の一因となり得ると考えられた。

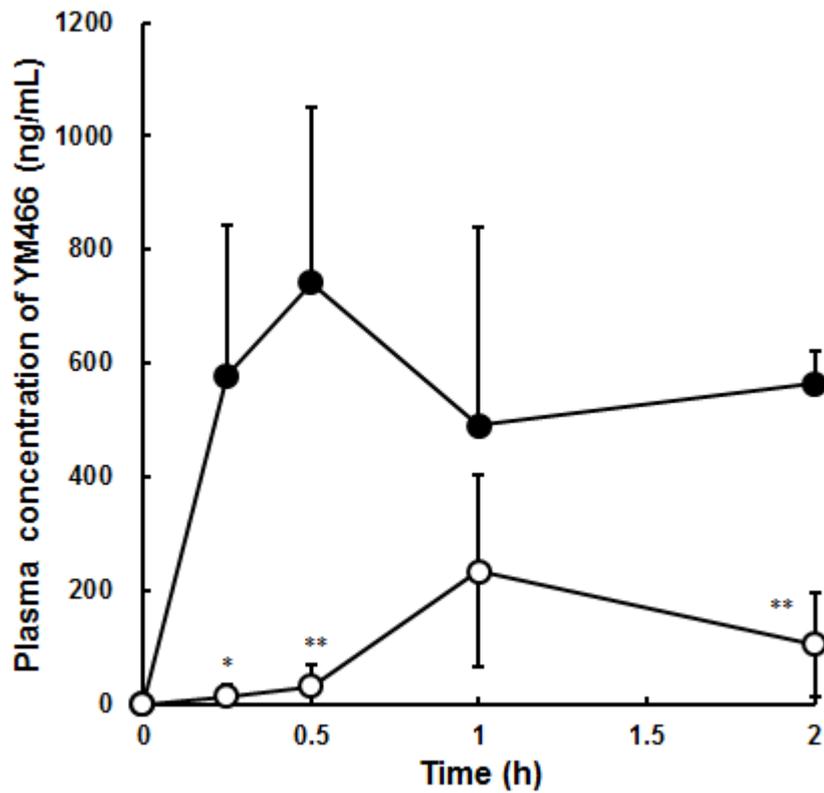


Figure 8. Plasma concentrations of YM466 after oral administration of YM466 solution and insoluble complex with bile salt to rats. Keys: ●, YM466 solution (control); ○, insoluble complex with bile salt. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$).

** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, compared with control.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of YM466 after oral administration of YM466 solution and insoluble complex with bile salt to rats.

Dosing sample	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-2h} (ng·h/mL)
YM466 solution (control)	1.2 ± 0.8	815.6 ± 208.3	1072.9 ± 240.6
Insoluble complex with bile salt	1.7 ± 0.6	247.6 ± 156.7 *	242.0 ± 100.5 **

Pharmacokinetic parameters were calculated based on the results shown in Fig. 8. Results are expressed as the mean ± SD ($n = 3$). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, compared with control.

2.4. 可溶性複合体の経口吸収性の *in vivo* 評価

2.1 および 2.2 の検討において、胆汁および胆汁酸が過剰量存在する条件においては、可溶性複合体の形成が認められた。この複合体が可溶化により良好に吸収されるのであれば、胆汁のような性質を有する添加剤を添加する等の手法で、可溶性の複合体を形成することが YM466 の吸収改善アプローチの候補の 1 つとなり得る。そこで本検討では、YM466 水溶液に過剰量の胆汁酸塩（タウロコール酸ナトリウム）を YM466：胆汁酸塩= 1:67（モル比）で加えた可溶性複合体試料を調製し、ラットに 15 mg/kg の YM466 投与量となるように絶食下経口投与し、吸収性について評価した。得られた YM466 の血漿中濃度プロファイルおよび薬物動態パラメータをそれぞれ Figure 9 および Table 5 に示す。YM466 単独溶液群（対照群）に比し、可溶性複合体投与群の血漿中濃度および薬物動態パラメータはいずれも有意な低値を示した。可溶性複合体投与群における YM466 の AUC_{0-2h} および C_{max} の平均値は、対照群のそれぞれ 26% および 22% であり、これらの値は 2.3 で示した難溶性複合体の結果とほぼ同程度であった。本結果より、YM466 と胆汁酸との相互作用により形成される可溶性複合体は難吸収性であると考えられた。この理由としては、ミセル自体のサイズが大きい為にミセルとして細胞を透過することができないこと、また、安定なミセルが形

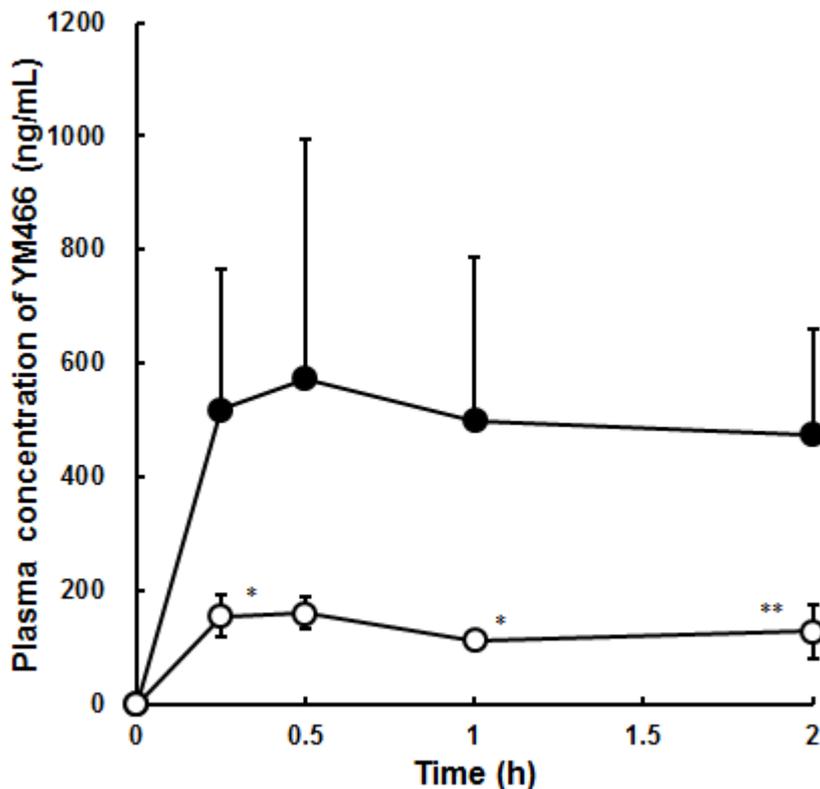


Figure 9. Plasma concentrations of YM466 after oral administration of YM466 solution and micelle solution to rats. Keys: ●, YM466 solution (control); ○, micelle solution. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 4$). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, compared with control.

成されており YM466 のミセルからの放出が遅く、YM466 としての吸収も少なかったものと考えられた。ヒトにおける小腸管腔内胆汁酸の濃度は 3-15 mM と報告されている^{30,35}。本濃度は今回用いたタウロコール酸ナトリウム（分子量：537.7 Da）濃度に換算すると、2-8 mg/mL であり、この濃度は今回得られた YM466 の溶解度-胆汁あるいは胆汁酸塩濃度プロファイルからは、YM466 と難溶性複合体を形成する条件に相当することから、YM466 は、ヒト小腸管腔内環境においても胆汁と相互作用し難溶性複合体を形成することにより、その吸収が抑制される可能性が示唆された。

Table 5. Pharmacokinetic parameters of YM466 after oral administration of YM466 solution and micelle solution to rats.

Treatment	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-2h} (ng·h/mL)
YM466 solution (control)	1.1 ± 0.6	743.8 ± 262.0	956.7 ± 304.4
Micelle solution	0.8 ± 0.8	166.4 ± 29.4 **	247.4 ± 39.3 **

Pharmacokinetic parameters were calculated based on the results shown in Fig. 9. Results are expressed as the mean ± SD (*n* = 4). ** *p* < 0.01, compared with control.

2.5. ¹H-NMR による YM466 と胆汁酸との相互作用の評価

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) による分析は、分子の化学構造解析のみでなく、分子間相互作用の分析においても用いられる。そこで YM466 と胆汁酸との相互作用を分子レベルで評価する目的で、タウロコール酸ナトリウムを用い、YM466 に対して滴定することにより、NMR 分析を行った。YM466 にタウロコール酸ナトリウムを添加することにより、YM466 の各原子に由来するシグナルの変化を観察した。その結果、Figure 10 に示す様に、シグナルのシフト、またピークの形状のブロード化が認められた。この観察されたケミカルシフトから、分子間相互作用している原子の同定を試みた。YM466 およびタウロコール酸ナトリウムにおいて認められたケミカルシフトの結果より、相互作用していると考えられた原子を Figure 11 にまとめた。YM466 におけるケミカルシフトの変化は、主にナフタレン環において認められることが明らかとなった。一方、タウロコール酸ナトリウムにおけるケミカルシフトは主にステロイド骨格の疎水箇所位置しているメチル基に認められた。これらの結果より、YM466 は胆汁酸との相互作用は、YM466 のナフタレン環と胆汁酸のステロイド骨格の間の疎水的相互作用によって起こり、難溶性あるいは難吸収性の複合体が形成されていることが示唆された。今回、NMR 分析では示されなかったが、

YM466 は正電荷を、タウロコール酸ナトリウムは負電荷を有していることから、これらによる静電的相互作用が先行して起こった可能性が考えられる。この静電的相互作用により、両分子が接近し、その後 NMR 分析で推定された疎水的相互作用につながったのではないかと考えられた。

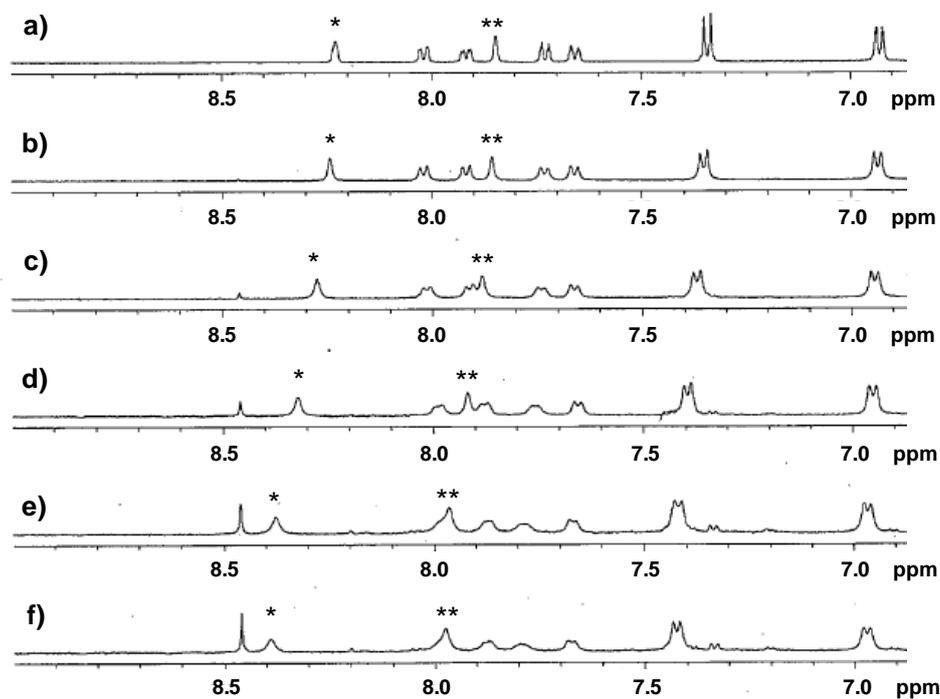
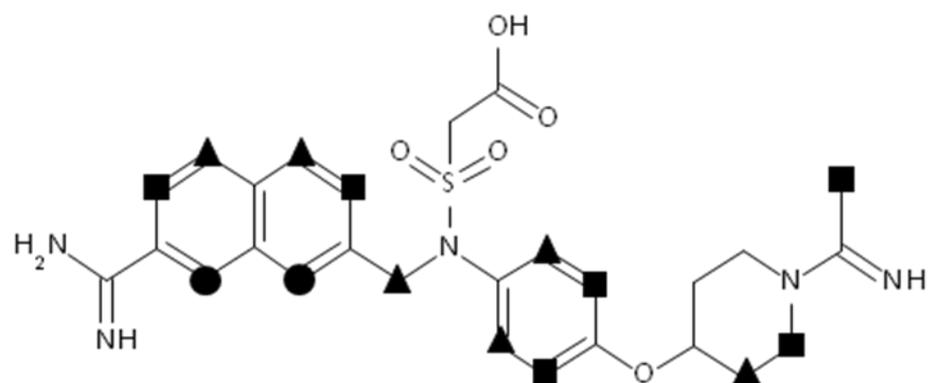


Figure 10. The NMR spectra of YM466 in the titration of sodium taurocholate.

Spectra were recorded for YM466 when the molar ratio of sodium taurocholate to YM466 was a) 0, b) 1, c) 3, d) 7, e) 15 or f) 19.

*, ** ; Signals with changes of chemical shifts more than 0.1 ppm by the titration of sodium taurocholate.

a) YM466



b) Sodium Taurocholate

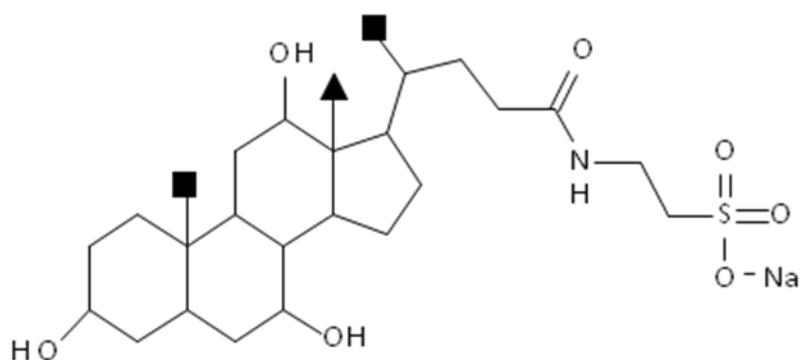


Figure 11. NMR analysis of YM466 and bile salt interaction. Evaluation was based on the results shown in Fig. 10. Changes of chemical shifts: ●, >0.1 ppm; ▲, >0.05 ppm; ■, >0.01 ppm.

2.6. 小括

本章では、第1章の検討において示唆された YM466 と消化管管腔内の胆汁との相互作用の詳細を評価する目的で、YM466 の溶解度に対する胆汁および胆汁酸の影響を検討した。結果、YM466 の溶解度は胆汁あるいは胆汁酸の添加濃度依存的な変化を示し、用いる胆汁酸の濃度および種類により難溶解性あるいは可溶性の複合体が形成されることが明らかとなった。

次いで、YM466 と胆汁酸を混合して形成される難溶性複合体および可溶性複合体の経口吸収性をラットを用いて評価した。難溶性複合体を経口投与した時の YM466 の血漿中濃度は薬物単独投与群（対照群）に比して有意な低値を示し、 AUC_{0-2h} および C_{max} の平均値は、対照群のそれぞれ 23% および 30% であった。本結果より、形成された難溶性複合体からの YM466 の吸収性は低いことが明らかとなった。また、可溶性複合体を経口投与した場合においても、 AUC_{0-2h} および C_{max} の平均値は、対照群のそれぞれ 26% および 22% であり、難溶性複合体投与時と同程度の低値を示した。本結果より、YM466 と胆汁との相互作用により形成される複合体は可溶性の場合も難吸収性であると考えられた。また得られた結果より、YM466 と胆汁との相互作用は、ヒト消化管管腔内環境においても難溶性複合体を形成することにより本薬物の吸収に抑制的に影響する可能性が示唆された。

更に、NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 分析により、YM466 と胆汁酸との相互作用のメカニズムを分子レベルで評価した。得られたプロトンシグナルのケミカルシフト変化の結果より、YM466 は胆汁酸との相互作用は、YM466 のナフタレン環と胆汁酸のステロイド骨格の間の疎水的相互作用に依って起こり、難溶性かつ難吸収性の複合体が形成されることが示唆された。

第3章 YM466 と胆汁との相互作用抑制物質の探索および評価

これまでの検討の結果、YM466 の低い経口吸収性には、消化管管腔内における胆汁との相互作用が関与していることが考えられた。従って、この相互作用を製剤学的工夫により抑制できれば、YM466 の経口吸収を改善することが可能になると考えられた。そこで第3章では、YM466 と胆汁との相互作用を抑制する物質の探索および評価を行った。

3.1. YM466 と胆汁との相互作用評価系の確立

はじめに、YM466 と胆汁酸との相互作用を抑制する添加剤を見出す目的で、薬物と胆汁の相互作用を評価する *in vitro* 評価法の検討を行った。ヒトと同様に、胆汁酸のタウリン抱合体およびグリシン抱合体の両方が胆汁酸として含有されているウシ由来胆汁末を胆汁として用い³⁶⁾、限外濾過法の応用を試みた。YM466 と胆汁との混合物は目視観察より不溶性であることが確認できた為、限外濾過に用いる濾過膜の分子量カットサイズは、YM466 の分子量（フリー体として 537.5 Da）よりも大きい 10,000 Da とし、限外濾過後の濾液中の薬物量を測定した。添加した胆汁濃度と、限外濾過後の濾液中の YM466 回収率との関係を Figure 12 に示す。YM466 の回収率は胆汁の添加量依存的に、胆汁非混合群（対照）に比し、有意な低下を示した。ヒトの小腸上部における胆汁濃度に近い 5 mg/mL 存在下においては（第2章2.1 参照）、YM466 の濾液中の回収率は対照の約 30%にまで低下した。この結果は、YM466 が胆汁との相互作用により難溶性の大きな複合体を形成することを示しており、前述した” YM466 の溶解度が胆汁の存在下で顕著に低下すること（第2章2.1 参照）” およびラットにおける”胆汁存在下の YM466 の消化管吸収が約 35%にまで低下する結果（第1章1.5 参照）” を支持するものであった。今回用いた、胆汁 5 mg/mL での *in vitro* 限外濾過法は、簡便な方法であるとともに、小腸管腔内における YM466 と胆汁との相互作用を良好に反映できている評価法であると判断できたことから、本相互作用を抑制する添加剤のスクリーニングに用いることとした。

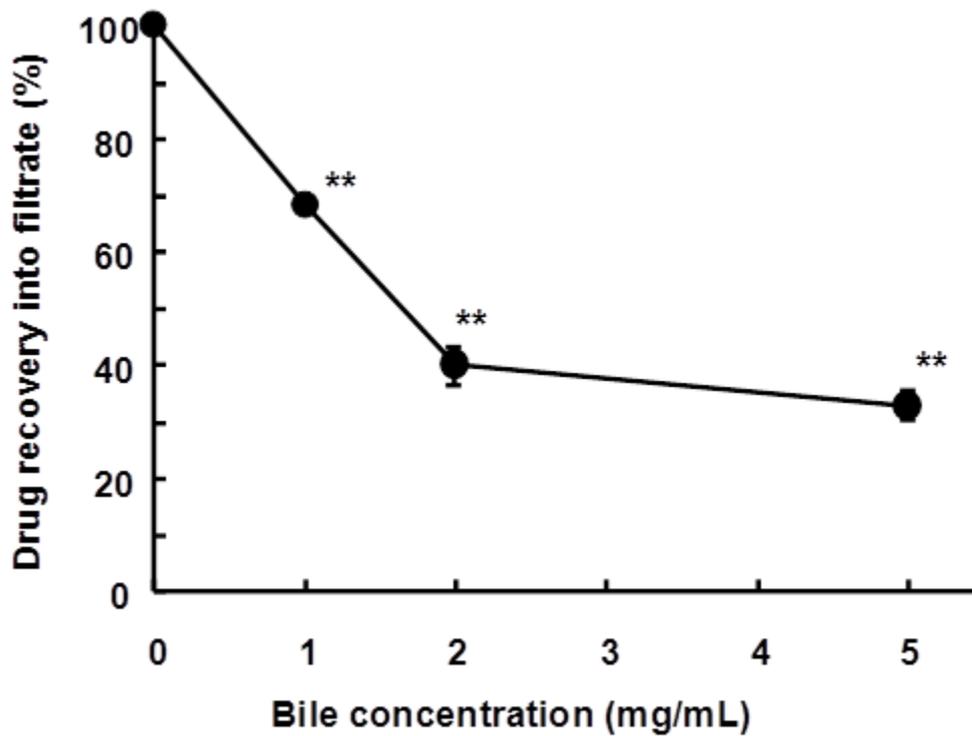


Figure 12. Recovery of YM466 from the mixtures with bile following ultrafiltration.

Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$).

** $p < 0.01$, compared with the result of bile concentration 0%.

3.2. YM466 と胆汁との相互作用を抑制する添加剤の探索

YM466と胆汁との相互作用を抑制する添加剤の探索に際し、高分子添加剤が立体的障害効果により化合物間の相互作用を抑制することが報告されていることから³⁷⁾、高分子添加剤に着目した。そこで、3種類の帯電性の異なる高分子として、アルギン酸ナトリウム（アニオン性）、ヒプロメロース（非イオン性）、アミノアルキルメタクリレートコポリマーE（Aminoalkylmethacrylate copolymer E, AAM copolymer E）（カチオン性）を選択し、検討することとした。それぞれの添加剤の構造式をFigure 13 に示した。アルギン酸ナトリウムは褐藻類由来の β -D-マンニユロン酸および α -L-グルクロン酸からなる直鎖型の多糖類であり、ゲル化剤や安定化剤として用いられている。また、アニオン性の性質やカルシウムイオンとの反応でゲル化する特性を利用した、ハイドロゲル製剤の基剤としても広く用いられている³⁸⁻⁴⁰⁾。ヒプロメロースは、メチルセルロースにヒドロキシプロピル基を導入したセルロースエステルであり、主にフィルムコート基剤や結合剤として食品、医薬品用に広く使用されているのみならず、水溶性高分子としての特性を利用した放出制御製剤の基剤としても多くの報告がなされているセルロース誘導体である⁴¹⁻⁴³⁾。AAM copolymer Eは、ジメチルアミノエチルメタクリレートおよびメタクリル酸エステルからなる、酸可溶性の性質を有する合成高分子であり、主に苦味のマスキング剤や湿度をプロテクトする為のコーティング剤として用いられている他、経口放出制御製剤や固体分散体の基剤としての利用が報告されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。これらの添加剤は、既にいずれも市販され、汎用されている経口剤用の添加剤であること、消化管内では安定な高分子であるため、全身血中には吸収されにくく、安全性の観点からも適した素材と考えられたことから、これらの添加剤を候補として選択した。

3.1の項で示した*in vitro* 限界濾過法を用い、YM466と胆汁の混合試料に、これらの添加剤を加えた時の、濾液中へのYM466の回収率を検討した。結果をFigure 14 に示す。YM466に対して、胆汁のみを添加し、添加剤を加えなかった試料におけるYM466の濾液中への回収

率は、YM466単独時（対照）の33%と有意な低値を示した。YM466および胆汁の混合物に、アルギン酸ナトリウムおよびヒプロメロース を添加した時の回収率は、それぞれ26%、39%であり、添加剤を加えなかった試料と同様に、対照に対して有意な低値を示し、その値も添加剤非使用条件の結果とほぼ同程度であった。アルギン酸ナトリウムに関しては、そのアニオン性の静電的特性が、YM466の正電荷との静電的相互作用により、胆汁との相互作用を抑制することを期待したが、結果としては胆汁の添加によって低下したYM466の溶解度を改善する効果は認められなかった。一方、AAM copolymer Eを添加した場合、YM466と胆汁の混合物からの薬物の回収率は大きく増大した。その値はほぼ100%と対照とほぼ同程度であり、対照との間に有意な差は認められなかった。本結果より、AAM copolymer EはYM466と胆汁との相互作用をほぼ完全に抑制する効果を有することが明らかとなった。AAM copolymer Eは、平均分子量150000 Daのカチオン性合成高分子であり、前述の通り、経口製剤の添加剤として、主に苦味マスキングの為のコーティング剤として広く使用されている。今回の結果より、AAM copolymer Eは、YM466と胆汁との相互作用を抑制する添加剤として有用な候補であると考えられた。

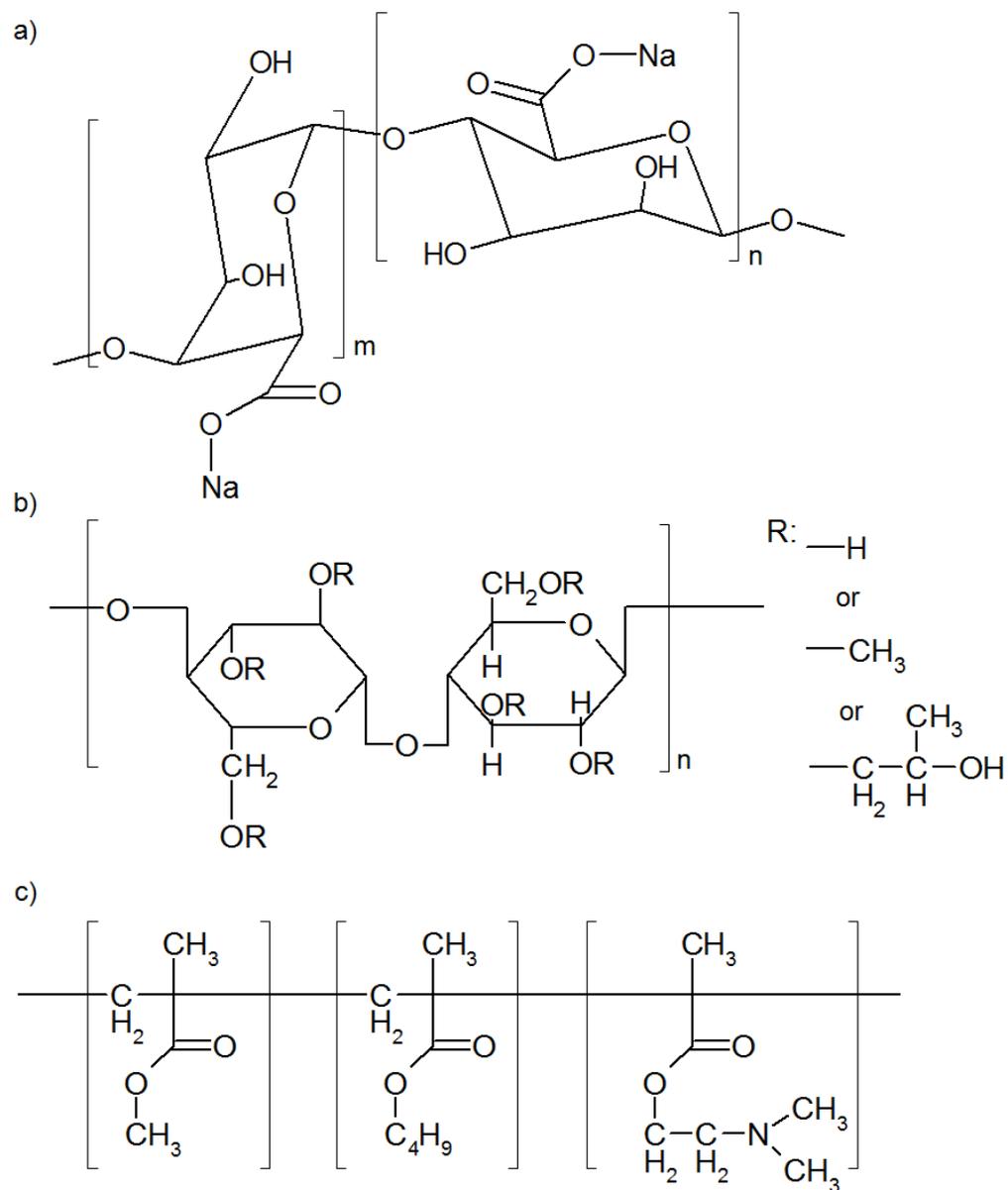


Figure 13. Chemical structure of tested polymeric excipients : a) sodium alginate, b) hypromellose, c) aminoalkylmethacrylate (AAM) copolymer E.

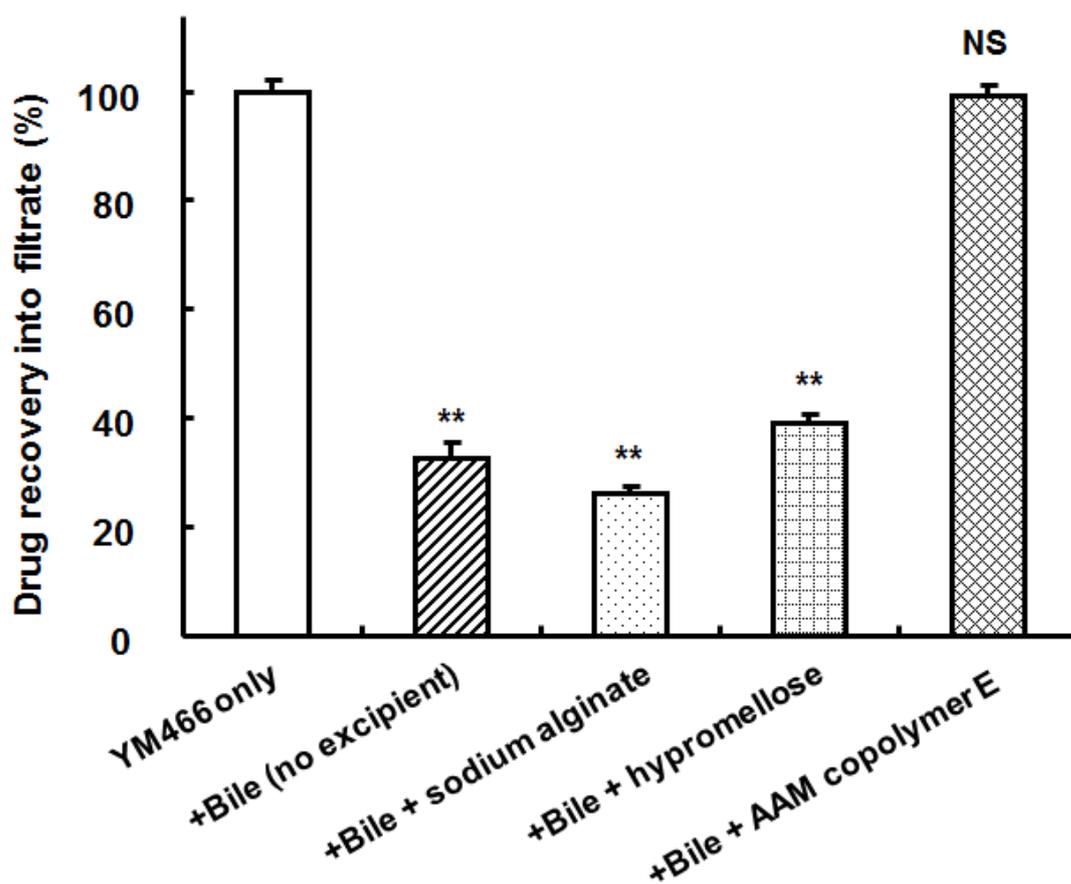


Figure 14. Effect of polymers on the recovery of YM466 from the mixtures with bile following ultrafiltration. AAM copolymer E means aminoalkylmethacrylate copolymer E. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). ** $p < 0.01$, compared with the control (YM466 only). NS, not significant.

3.3. AAM copolymer E による YM466-胆汁相互作用抑制効果の用量依存性の評価

AAM copolymer E の YM466-胆汁相互作用の抑制効果をさらに詳細に評価する目的で、AAM copolymer E の濃度が、YM466 と胆汁との混合試料の限外濾過後の濾液中への YM466 の回収率に及ぼす影響を評価した。結果を Figure 15 に示す。AAM copolymer E は添加濃度依存的に、YM466 と胆汁との相互作用を抑制した。AAM copolymer E 非添加条件（YM466 と胆汁の混合）においては、YM466 単独の 33%と有意な低値を示したのに対し、AAM copolymer E 1 mg/mL 添加時（高分子添加剤/薬物重量比、the polymer to drug ratio, P/D ratio 1.6）においては、濾液中への薬物回収率は $84.5 \pm 1.6\%$ と、AAM copolymer E 非添加時に比して有意な改善効果を示した。AAM copolymer E 1 mg/mL 添加時には、依然として YM466 単独の値との比較においては、有意な低値を示していたものの、AAM copolymer E 3 mg/mL（P/D ratio 4.8）の条件においては、薬物回収率は $103.6 \pm 1.2\%$ まで有意に改善し、YM466 単独時との間に有意な差を認めなかった。AAM copolymer E 5 mg/mL 条件（P/D ratio 7.9）においても $99.2 \pm 2.0\%$ と、有意な回収率改善効果は維持されていた。これらの結果より、この相互作用抑制効果は AAM copolymer E 濃度に依存的であり、YM466 に対して重量比で約 5 倍量の AAM copolymer E を共存させることにより、胆汁との相互作用をほぼ完全に抑制可能であることが示された。

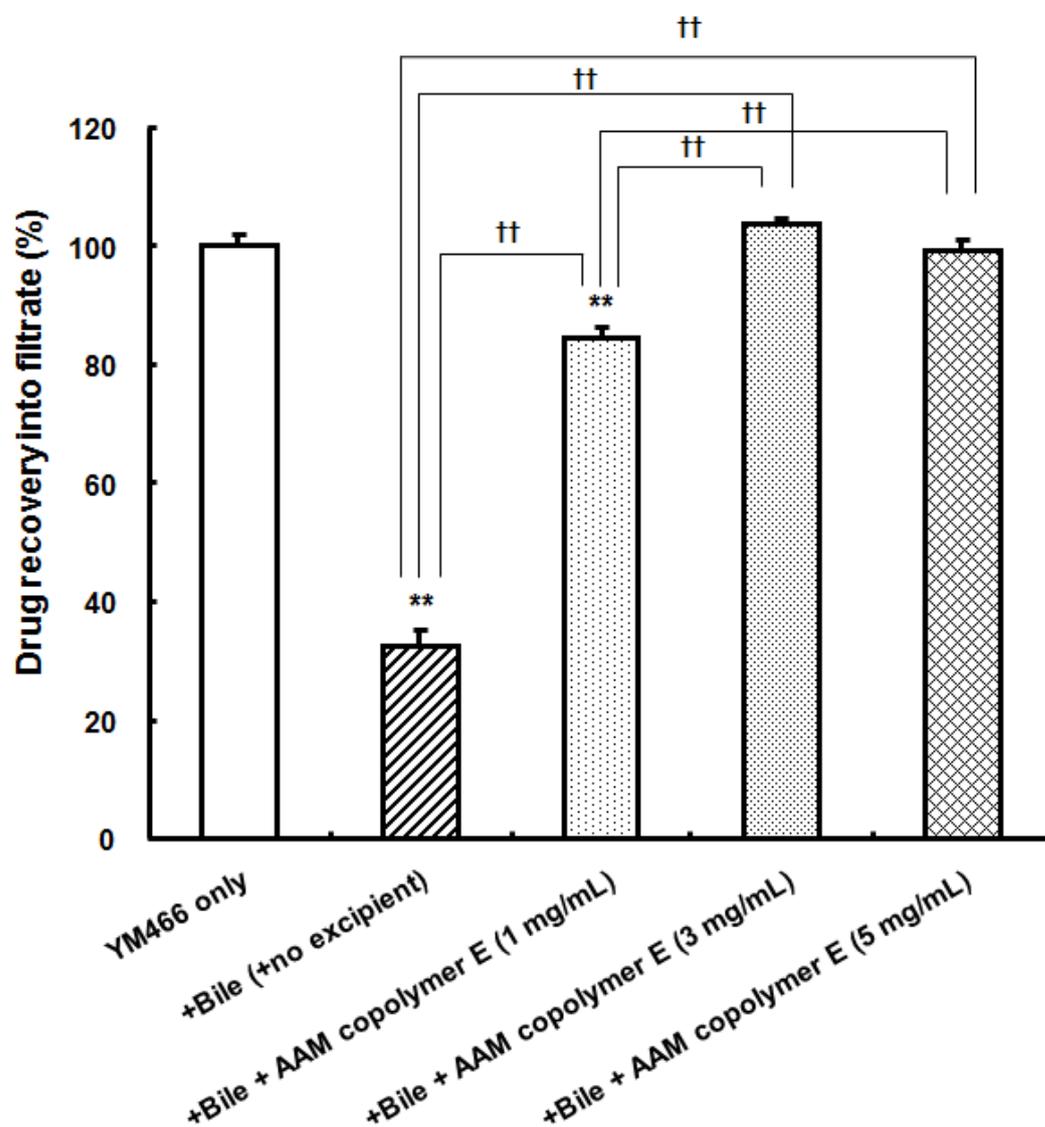


Figure 15. Dose-dependent effect of aminoalkylmethacrylate (AAM) copolymer E on the interaction between YM466 and bile. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). $**p < 0.01$, compared with the control (YM466 only). $††p < 0.01$, compared between the indicated two groups.

3.4. 他のカチオン性高分子を用いた YM466 と胆汁との相互作用抑制効果の用量依存性の評価

これまでの検討において、カチオン性高分子である AAM copolymer E が YM466-胆汁相互作用の抑制効果を有することが認められた。そこで、更に有効な添加剤を検索するために、他のカチオン性高分子について YM466-胆汁相互作用に対する抑制効果を検討した。

他のカチオン性高分子としては、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート (Polyvinylacetal diethylaminoacetate, AEA) およびキトサンを選択した。AEA およびキトサンの構造式をFigure 16 に示した。AEAは分子量約65000の合成高分子であり、AAM copolymer E と同様に、酸性条件 (< pH 5.8) にて溶解する特性を有することから、主に苦味マスキング用の添加剤として用いられる他、酸可溶性の特性を利用したpH依存的放出制御製剤の基剤としての検討が報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。キトサンはD-グルコサミンとN-アセチル-D-グルコサミンからなる直鎖型の多糖類であり、甲殻類の外骨格由来であるキチンをデアセチル化することにより得られる⁵⁰。この天然物由来のカチオン性高分子の特性を利用して、キトサンおよびその誘導体を用いた、粘膜付着製剤、ハイドロゲル製剤、タンパク質やDNAのデリバリー製剤等、種々の製剤への応用研究が報告されている⁵¹⁻⁵³。

AEAおよびキトサンを、3.3 で行ったAAM copolymer E の評価時と同じ濃度条件で添加した際の、YM466と胆汁との混合試料限外濾過後の濾液中へのYM466の回収率を評価した。結果をそれぞれFigure 17 およびFigure 18 に示す。結果、いずれの高分子を用いた場合も、添加量依存的に限外濾過後の濾液中へのYM466の回収率の有意な増加が認められた。AEA 1 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL 添加時の回収率は、それぞれ $43.0 \pm 0.9\%$ 、 $67.3 \pm 0.5\%$ 、 $90.0 \pm 0.4\%$ であった。キトサン 1 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL 添加時の回収率は、それぞれ $78.3 \pm 1.3\%$ 、 $95.7 \pm 1.1\%$ 、 $100.0 \pm 0.8\%$ であった。本結果より、いずれの高分子を用いた場合にもYM466と胆汁との相互作用を抑制する効果を有することが明らかとなったことから、カチオン性の性質が本相互作用を抑制するための重要な役割を果たしている可能性が示唆され

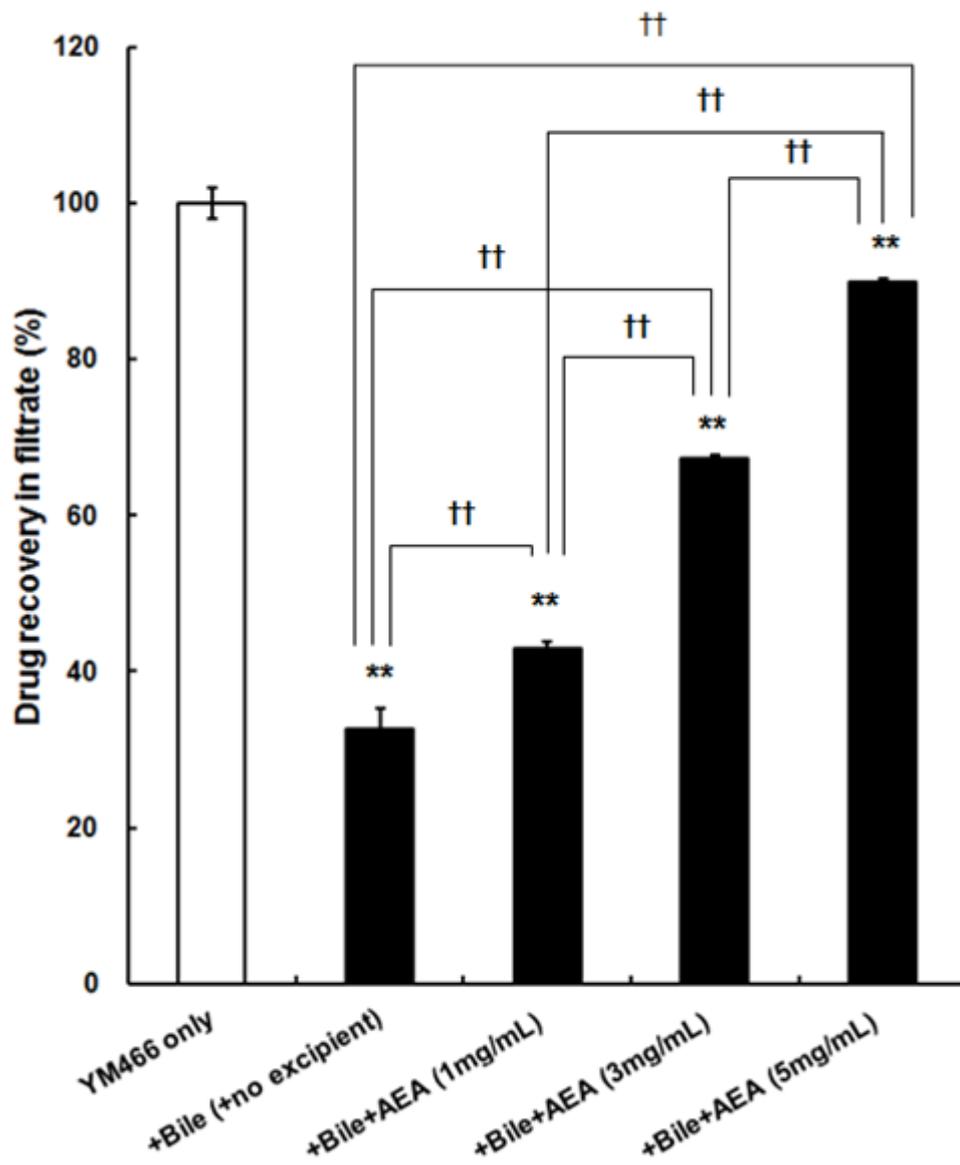


Figure 17. Dose-dependent effect of polyvinylacetal diethylaminoacetate (AEA) on the interaction between YM466 and bile. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). ** $p < 0.01$, compared with the control (YM466 only). †† $p < 0.01$, compared between the indicated two groups.

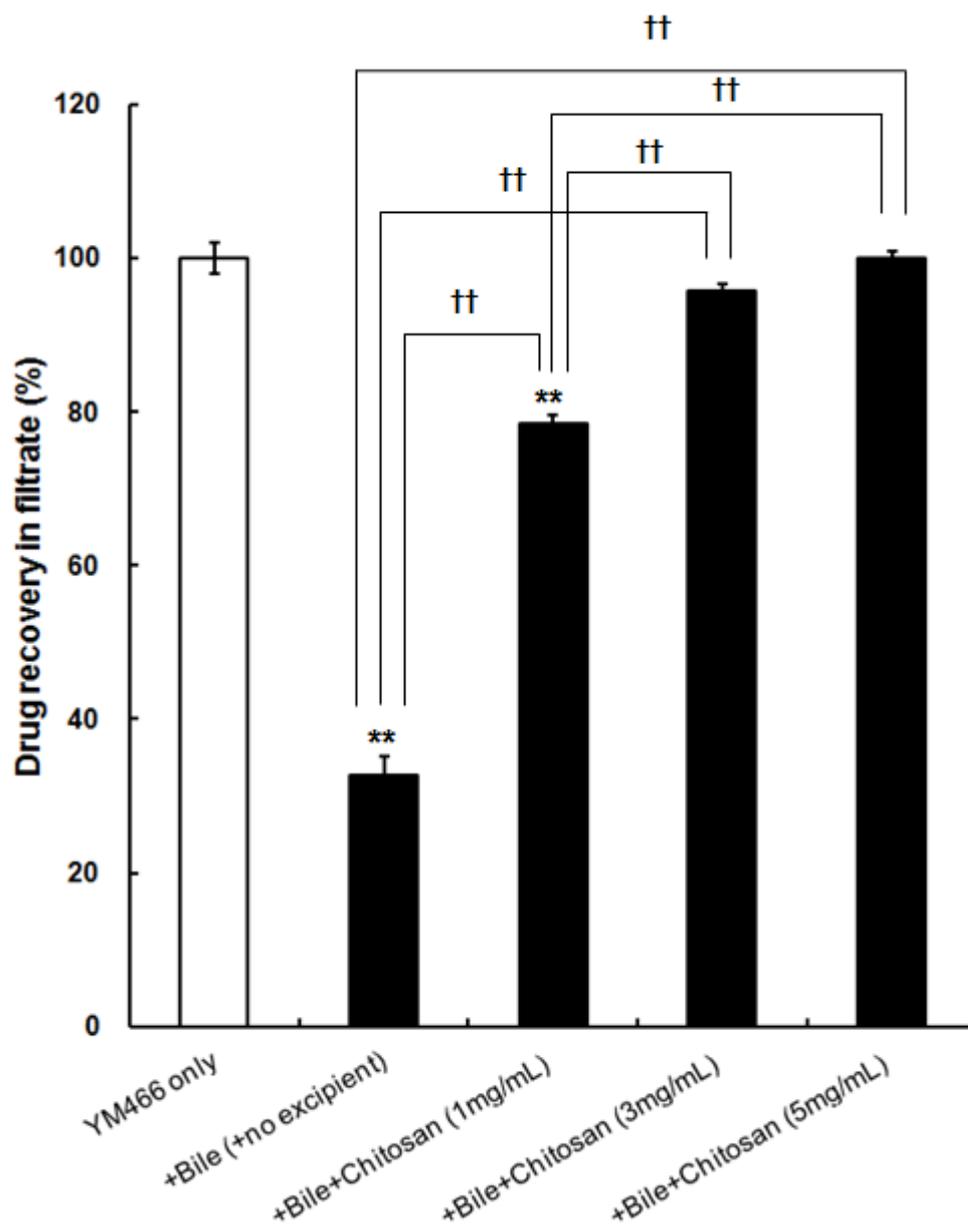


Figure 18. Dose-dependent effect of chitosan on the interaction between YM466 and bile.

Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). ** $p < 0.01$, compared with the control (YM466 only). †† $p < 0.01$, compared between the indicated two groups.

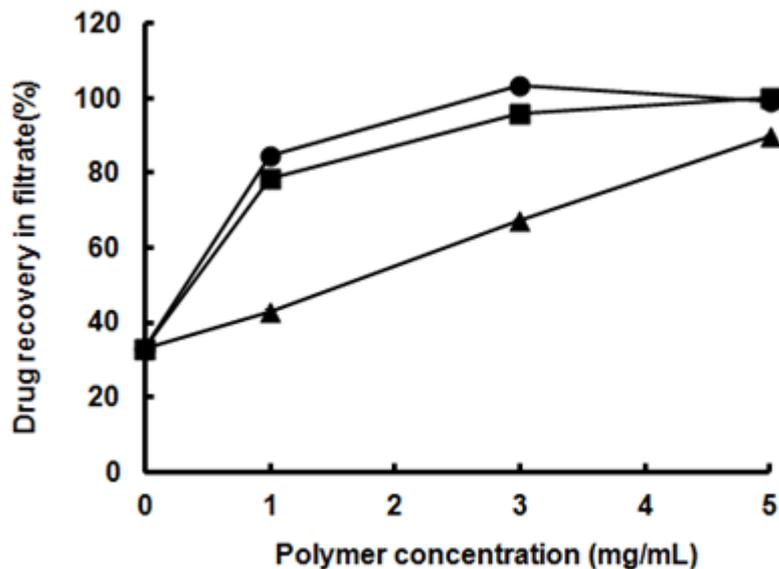


Figure 19. Effect of tested cationic polymers on the interaction between YM466 and bile.

Keys: ●, AAM copolymer E; ▲, AEA; ■, Chitosan. Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$).

3.5. AAM copolymer E の YM466 および胆汁酸への結合性評価

AAM copolymer E の YM466 と胆汁との相互作用抑制機序解明の一端として、YM466 と AAM copolymer E、および胆汁酸と AAM copolymer E の相互作用について *in vitro* 限外濾過法により検討した。検討には代表的な胆汁酸塩であるタウロコール酸ナトリウムを用いた。タウロコール酸ナトリウムの濃度については、ヒト小腸上部の胆汁酸濃度が 3-15 mM と報告されていることを参考に 8 mM の条件とした^{30,35}。Figure 20(A) に示すように、限外濾過後の濾液中への YM466 の回収率は、AAM copolymer E の添加によっても全く影響を受けなかった。一方、胆汁酸に AAM copolymer E を添加し、限外濾過を行った後の濾液中への胆汁酸の回収率は、Figure 20 (B)に示すように、AAM copolymer E 非添加（胆汁酸単独）条件の約 10%と有意な低値を示した。これらの結果より、AAM copolymer E は YM466 とではな

く胆汁酸と相互作用していることが明らかとなった。AAM copolymer E は疎水性骨格を有したカチオン性高分子であり、一方、胆汁酸はアニオン性の両親媒性物質である。それゆえ、AAM copolymer E と胆汁酸との間で認められた相互作用は、静電的および／あるいは疎水的相互作用に依るものと推察された。このことから、AAM copolymer E は胆汁酸と相互作用することで、YM466 のナフタレン環と胆汁酸のステロイド骨格との間で起こる疎水的相互作用（第 2 章 2.4 参照）を抑制し、YM466 と胆汁酸の難溶性／難吸収性複合体の形成を抑制しているものと考えられた。

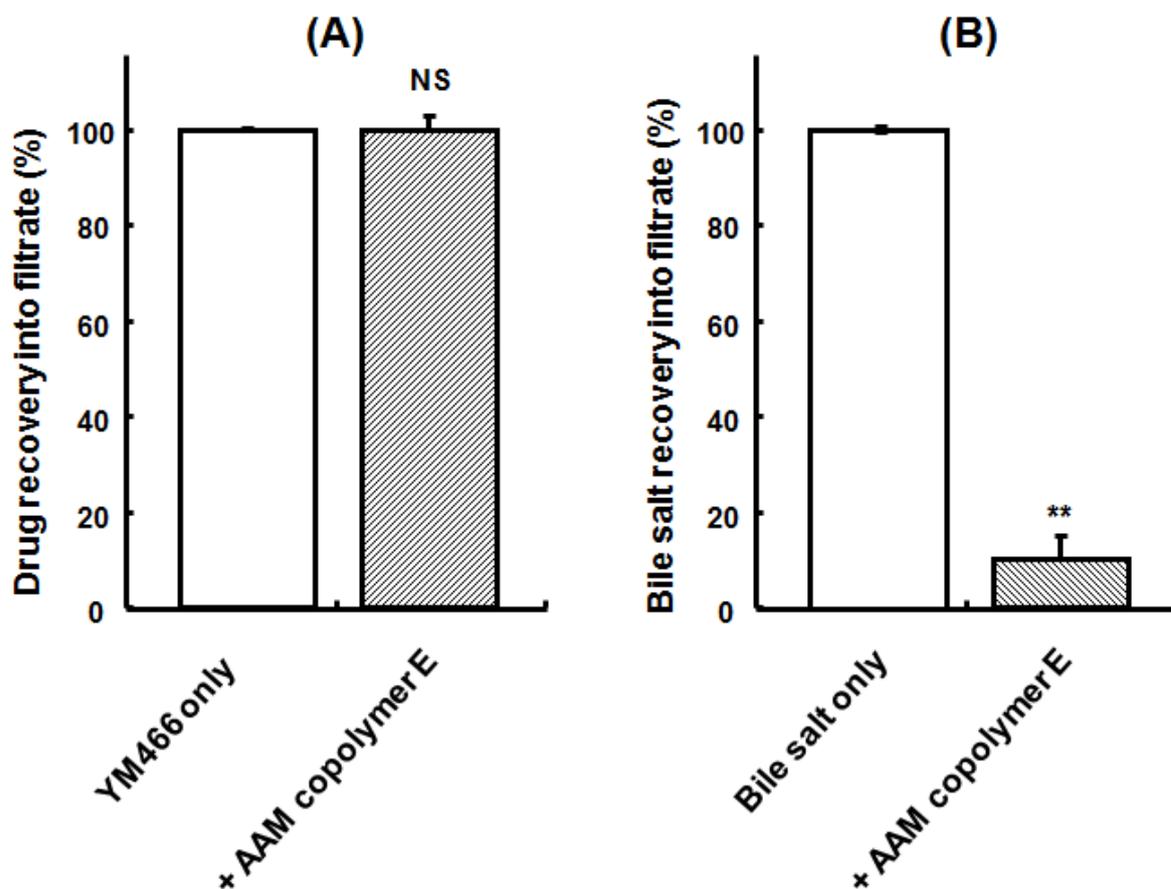


Figure 20. Investigation for the interaction of aminoalkylmethacrylate (AAM) copolymer E with YM466 (A) and bile salt (B). Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). ** $p < 0.01$, compared with the control. NS, not significant.

3.6. ラット経口投与における AAM copolymer E の YM466 吸収改善効果の評価

経口投与した YM466 の吸収性に及ぼす AAM copolymer E の効果を評価する目的で、ラットを用いた *in vivo* 投与実験を行った。投与試料の調製は、以下に示す噴霧乾燥加工を施した AAM copolymer E を用いて行った。AAM copolymer E は pH 依存性の溶解性を有しており、酸性条件 (< pH 5.5) において溶解する。この高分子を小腸のような中性付近 (pH 6-8) の pH 条件においても安定的に溶解させる目的で、AAM copolymer E を pH 調節剤を含有した噴霧乾燥品へと加工した。本加工を施した AAM copolymer E は中性条件の pH 試験液および精製水にも溶解可能であることを確認した。

高分子の薬物に対する重量添加比 (P/D ratio) は治療条件の観点より1および3にて実施した。すなわち、YM466の臨床上の一日最大投与量が100 mg であるとの前提で、毎日服用する患者の利便性の観点から1錠の錠剤化を考慮した場合に、許容可能なAAM copolymer E の添加量は薬物の3倍 (300 mg) が上限と考えられた。Figure 21 に、YM466 (2.5 mg/kg) と AAM copolymer E を2種の比率で同時経口投与した後の薬物血漿中濃度プロファイルを示す。得られた薬物動態パラメータはTable 6 に示した。YM466単独(control) 投与時のC_{max} およびAUC_{0-1h}はそれぞれ、15.8 ± 2.3 ng/mL、8.6 ± 4.5 ng/mLであった。AAM copolymer E の投与により、YM466のC_{max} およびAUC_{0-1h}は添加量依存的な増大を示し、P/D ratio 3 の条件においては、C_{max} は33.6 ± 2.5 ng/mL、AUC_{0-1h}は22.4 ± 2.9 ng/mL と、control のそれぞれ2.1倍、2.6倍と有意な増大を示した。本結果より、AAM copolymer E は添加量依存的に、YM466の経口吸収を増大することが明らかとなった。C_{max} およびAUC_{0-1h}の増大効果は、胆汁の影響を評価した各種 *in vitro* 実験 (Figures 12 and 14) で得られた結果と近似した結果であり、AAM copolymer Eは、経口投与後においても小腸管腔内において、YM466と胆汁の相互作用を抑制し、難溶性複合体の形成を防ぐことで、YM466の吸収を改善しているものと考えられた。AAM copolymer Eの、小腸管腔内の他のアニオン性成分、例えば粘液層などへの

相互作用性の評価等を行うことで、AAM copolymer E によるYM466の経口吸収の改善機序をより詳細に理解できるものと考えられた。

また、今回用いたAAM copolymer Eの投与量（2.5 mg/kg, 7.5 mg/kg）は製造メーカーにより提唱されている経口連日投与時の最大許容投与量（20 mg/kg）より低い条件であったこと、および前述の通り、本高分子はすでに経口製剤用の添加剤として汎用されている素材であることから、安全性の観点からも非常に有用であると考えられた。

Table 6. Dose-dependent effects of aminoalkylmethacrylate (AAM) copolymer E on absorption kinetics of YM466 after oral administration to rats.

Dose of AAM copolymer E (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-1h} (ng·h/mL)
Control (P/D 0)	15.8 ± 2.3	0.7 ± 0.3	8.6 ± 4.5
2.5 (P/D 1)	18.9 ± 10.4	0.5 ± 0.0	12.7 ± 6.9
7.5 (P/D 3)	33.6 ± 2.5*	0.5 ± 0.0	22.4 ± 2.9*

YM466 was orally administered to rats at a dose of 2.5 mg/kg. P/D means the ratio of AAM copolymer E to YM466 (w/w) in dose. Results are expressed as the mean ± SD (*n* = 3). * *p* < 0.05, compared with the control group.

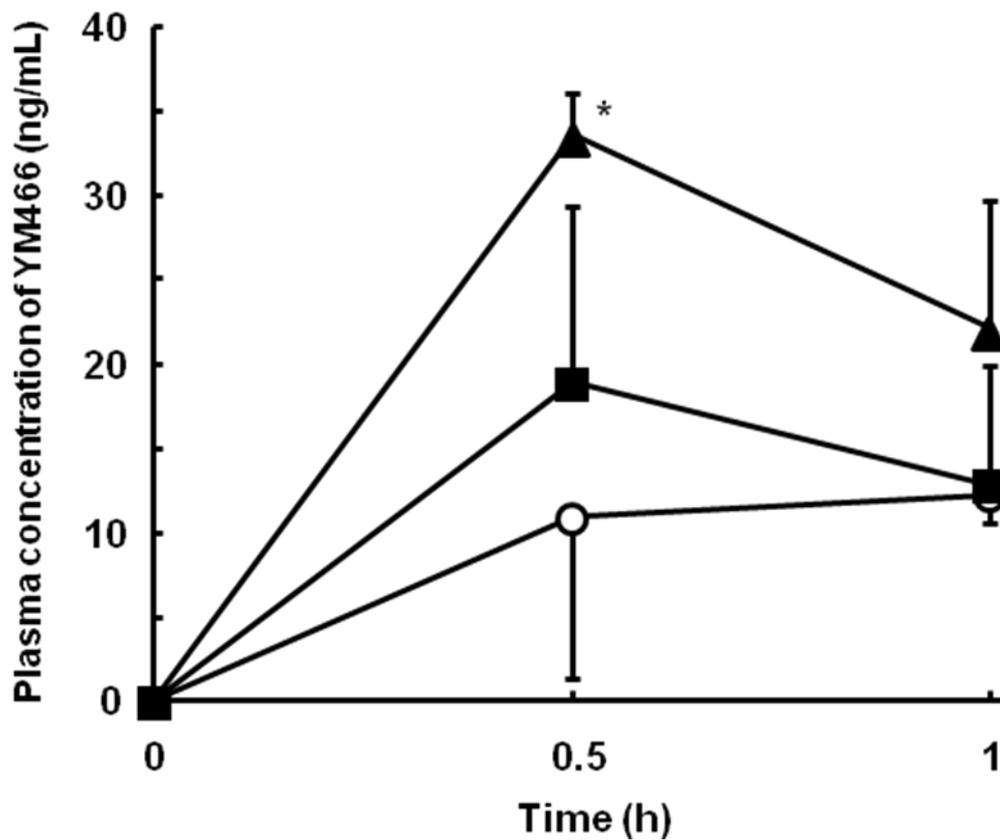


Figure 21. Effect of aminoalkylmethacrylate (AAM) copolymer E on plasma concentrations of YM466 after oral administration of YM466 (2.5 mg/kg) to rats. Keys: ○, control (P/D, 0); ■, with 2.5 mg/kg of AAM copolymer E (P/D 1); ▲, with 7.5 mg/kg of AAM copolymer E (P/D 3). Results are expressed as the mean with the bar showing the SD value ($n = 3$). * $p < 0.05$, compared with control.

3.7. 小括

本章では、YM466 の経口吸収性を改善する目的で、本薬物と胆汁との相互作用を抑制する添加剤の探索を、胆汁末を用いた *in vitro* 限外濾過法により行った。帯電特性の異なる各種の高分子添加剤につき、YM466 と胆汁との相互作用に対する影響を検討した結果、カチオン性高分子である AAM copolymer E が顕著に難溶性複合体の形成を抑制することが明らかとなった。この相互作用抑制効果は AAM copolymer E 濃度に依存的であり、YM466 に対して重量比で約 5 倍量の AAM copolymer E を共存させることにより、胆汁との相互作用をほぼ完全に抑制可能であることが示された。他のカチオン性高分子を用いて評価を行った結果、いずれも抑制効果が認められたことから、カチオン性という静電的特性が効果の発現に関与している可能性が示唆された。候補添加剤の比較評価においては、抑制効果の程度や経口製剤用の添加剤としての使用実績、安全性の観点より、AAM copolymer E が YM466 と胆汁との相互作用を抑制するために用いる添加剤として、より有用であると考えられた。

次いで、AAM copolymer E による相互作用抑制機序解明の一端として、YM466 と AAM copolymer E、および胆汁酸と AAM copolymer E の相互作用について *in vitro* 限外濾過法により検討した。その結果、AAM copolymer E は YM466 とではなく胆汁酸と相互作用していることが明らかとなった。このことから、AAM copolymer E は胆汁酸と相互作用することで、YM466 と胆汁酸の難溶性複合体形成を抑制しているものと考えられた。

更に、AAM copolymer E が実際に YM466 の経口吸収性に影響を及ぼすか否か検討するために、ラットに YM466 および AAM copolymer E の同時経口投与を行った。その結果、YM466 の血漿中濃度は AAM copolymer E 濃度に依存的な増大を示し、薬物量に対し 3 倍量のポリマーを投与することにより、薬物単独投与時に比し、AUC は約 2.6 倍と、有意な増大を示すことが明らかとなった。このことから、AAM copolymer E は、経口投与後においても小腸管腔内において、YM466 と胆汁の相互作用を抑制し、難溶性複合体の形成を防ぐことで、YM466 の吸収を改善しているものと考えられた。AAM copolymer E は主に苦味

マスクングの為のコーティング剤として広く用いられている経口製剤用添加剤であり、安全性の観点からも非常に有用であると考えられた。

結論

以上、著者は三章にわたり、新規抗凝血薬 YM466 の低い経口吸収性の要因の解明および YM466 の経口吸収性の改善に向けた製剤設計を目的として種々の検討を行い、以下の結論を得た。

第1章 YM466 の吸収動態特性および吸収性に及ぼす胆汁の影響評価

YM466 の溶解性について評価を行った結果、本薬物の低吸収性は薬物自体の溶解性に起因するものではないと考えられた。また、Caco-2 細胞を用いた膜透過性の評価から予測された吸収率は *in vivo* 経口投与後のバイオアベイラビリティよりも高く、本薬物の低い経口吸収性には膜透過性以外の因子が関与している可能性が示唆された。ラット *in situ* ループ法による YM466 の消化管吸収における部位差評価、および消化管内移行性を抑制することが知られている臭化プロパンテリン処理を施したイヌを用いた YM466 の経口吸収性に及ぼす消化管内移行性評価の結果、YM466 の吸収低下の原因として胆汁等の小腸管腔内成分との相互作用の影響が考えられた。そこで、YM466 の吸収に及ぼす胆汁の影響を、ラット *in situ* ループ法により検討した結果、胆管カニュレーションにより胆汁のループ内への流入を阻害したラットにおける YM466 の血漿中濃度は、無処置群と比較して約 3 倍の有意な高値を示し、YM466 は小腸管腔内の胆汁により吸収性が低下することが示唆された。

以上、YM466 の経口吸収に影響を及ぼし得る諸因子の解析結果より、小腸管腔内の胆汁が、YM466 の吸収性を抑制する重要な要因であることが示唆された。

第2章 YM466 と胆汁および胆汁酸との相互作用の評価

各種濃度の胆汁および胆汁酸存在下における YM466 の溶解度を調べた結果、本薬物の溶解度は胆汁あるいは胆汁酸の添加濃度依存的な変化を示し、YM466 は胆汁および胆汁酸と

相互作用をすることにより難溶性あるいは可溶性の複合体を形成することが明らかとなった。形成される難溶性複合体および可溶性複合体からの YM466 の経口吸収性をラットを用いて評価した結果、いずれの複合体においても、YM466 の吸収性は著しく低いことが明らかとなった。以上の結果より、YM466 と胆汁との相互作用は、ヒト小腸管腔内環境においても難溶性複合体を形成することにより本薬物の吸収に抑制的に影響する可能性が示唆された。また NMR により YM466 と胆汁酸との相互作用のメカニズムを分子レベルで評価した結果、YM466 と胆汁酸との相互作用は、YM466 のナフタレン環と胆汁酸のステロイド骨格の間の疎水的相互作用に依って起こり、難溶性、難吸収性の複合体が形成されることが示唆された。

第 3 章 YM466 と胆汁との相互作用抑制物質の探索および評価

YM466 の経口吸収性を改善する目的で、本薬物と胆汁との相互作用を抑制する添加剤の探索を、胆汁末を用いた *in vitro* 限外濾過法により行った。結果、カチオン性の合成高分子である AAM copolymer E が難溶性複合体の形成を顕著に抑制することが明らかとなった。この相互作用抑制効果は高分子の添加濃度に依存的であり、YM466 に対して重量比で約 5 倍量の AAM copolymer E を共存させることにより、胆汁との相互作用をほぼ完全に抑制可能であることが示された。他のカチオン性高分子を用いて評価を行った結果、いずれも抑制効果が認められたこと、アニオン性および非イオン性高分子では効果が認められなかったことから、高分子のカチオン性の静電的特性が効果の発現に関与している可能性が示唆された。候補添加剤の比較評価においては、抑制効果の程度や経口製剤用添加剤としての使用実績、また安全性の観点より、AAM copolymer E が YM466 と胆汁との相互作用抑制物質として、より有用であると考えられた。*In vitro* 限外濾過法による相互作用性評価の結果、AAM copolymer E は YM466 とではなく胆汁酸と相互作用することで、YM466 と胆汁酸の難溶性複合体形成を抑制しているものと考えられた。ラットを用いた経口投与による評価の

結果、YM466 の血漿中濃度は併用する AAM copolymer E 濃度に依存的な増大を示し、薬物量に対し 3 倍量の AAM copolymer E を投与することにより、薬物単独投与時に比し、AUC は約 2.6 倍と、有意な増大を示すことが明らかとなった。このことから、AAM copolymer E は、経口投与後においても小腸管腔内において、YM466 と胆汁の相互作用を抑制し、難溶性複合体の形成を防ぐことで、YM466 の吸収を改善しているものと考えられた。

以上著者は、YM466 の経口吸収に影響を及ぼし得る諸因子の解析結果より、胆汁との相互作用による難溶性複合体の形成が、YM466 の吸収性を抑制する重要な要因であることを明らかとした。この相互作用を回避・軽減することが、本薬物の経口吸収の改善に有用と考え、探索の結果、カチオン性合成高分子アミノアルキルメタクリレートコポリマーE(AAM copolymer E) が YM466 と胆汁との相互作用抑制および YM466 の経口吸収改善に有用な添加剤であることを見出した。これらの知見は、YM466 および胆汁との相互作用により吸収性が低下するその他の薬物に対して、その経口製剤処方設計に有益な情報を提供するものと考えられる。

謝辞

本研究に際して、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部 檜垣和孝教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、多大なる御指導と御助言を賜りました岡山大学薬学部 大河原賢一准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

本研究はアステラス製薬株式会社製剤研究所にて行われたものであり、研究の機会を与えて頂くと共に終始多大なる御支援と御助言を頂きましたアステラス製薬株式会社製剤研究所所長 迫和博博士、製剤研究所剤形研究室室長 渡辺俊典修士、並びに製剤研究所剤形研究室 近藤啓博士に心から感謝の意を表します。また、本研究にご協力頂いたアステラス製薬株式会社創薬推進研究所創薬分析研究室 鈴木謙一博士、並びに多くの皆様に深く感謝いたします。

実験の部

第1章 実験の部

【1】 試薬

YM466、YM466 塩酸塩および YM-59892 (内部標準物質) はアステラス製薬株式会社 (旧山之内製薬株式会社) で作製した。Caco-2 細胞は大日本住友製薬 (旧 大日本製薬株式会社) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), nonessential amino acids (NEAAs), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, trypsin(0.25%)-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)(1mM), および細胞培養用 antibiotic-antimycotic mixture は Life Technologies, Inc. より購入した。プロプラノロール(PPL)、アルギン酸ナトリウムは和光純薬株式会社より購入した。ナドロール(NDL)およびフルオレセインイソチオシアネート-デキストラン 4000 (FD-4) は Sigma Chemical Company 社より購入した。臭化プロパンテリンおよびスルファサラジンは Sigma-Aldrich 社より購入した。胆汁末は片山化学工業より購入した。その他の一般試薬は市販の特級品を使用した。

【2】 実験動物

ラット

Fisher 系雄性ラット (8週齢、体重130–160 g) およびWistar 系雄性ラット (8週齢、体重180–210 g) (日本エスエルシー株式会社) を用いた。室温20–26 °C、湿度40%–70%に設定した動物管理エリア内で1週間馴化させた。馴化中は実験動物用標準飼料と水を自由に与えた。実験に際しては、実験20時間前から絶食を行った。消化管内投与、処置、採血はエーテル麻酔下で実施した。

イヌ

オスのビーグル犬 (11.6–14.0 kg) (株式会社ナルク) を用いた。室温 20–26 °C、湿度 40%

ー70%に設定した動物管理エリア内で1ヶ月以上馴化させた。馴化中は実験動物用標準飼料と水を自由に与えた。実験に際しては、実験20時間前から絶食を行い、実験終了後速やかに実験動物試料を与えた。水は実験開始30分前迄および試料投与後2時間以降は自由に与えた。

【3】 YM466 の溶解度評価

YM466 または YM466 塩酸塩を 0.1 mol/L の塩酸 (pH 1) または Briston-Robinson 緩衝液 (pH 3, 5, 7, 9, 11) に 25 °C 条件で添加し、飽和溶液を調製した。フィルターろ過後の薬物濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。

【4】 Caco-2 細胞を用いた膜透過性実験

実験に用いた Caco-2 細胞の培養は、既報の方法⁵³⁾に準じて実施した。Caco-2 細胞は 10% (v/v) FBS を添加した 4.5 g/L D-glucose、1% (v/v) L-glutamine、1% (v/v) NEAA、および 1% (v/v) antibiotic-antimycotic mixture を加えた DMEM を培地として用い、37 °C、5%CO₂、98%相対湿度の環境に制御した CO₂ インキュベーター (CPD-170W, 平沢ワークス) 内で培養した。培地は 48 時間毎に交換した。21 日培養 Caco-2 単層膜の調製の為に、Caco-2 細胞を trypsin-EDTA 溶液を用いて回収し、HTS Multiwell™ (pore size : 1 μm、area : 0.31 cm²、Becton-Dickinson 社) 上に 1 × 10⁵ cells/insert の濃度で播種し、21 日間培養した。培養液は播種後 3 日間は毎日交換し、その後は 48 時間毎に交換した。20 mM glucose を加えた Hank's balanced salts solution (HBSS) を 20 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) で pH 6.0 に調整し、apical side に 0.5 mL 添加した。20 mM glucose を加えた HBSS を 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperzineethane sulfonic acid (HEPES) で pH 7.4 に調整し、basal side に添加した。

透過性実験はYM466 (100 μg/mL)または吸収性の異なるモデル化合物 (PPL、NDL、FD-4 ; ,

300 μM) を apical chamber に添加した。サンプル (100 μL) は basal side から 15 分 および 1 時間後に採取し、サンプリング後直ぐに等量の HBSS を basal side に加えた。全ての実験は 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件で実施した。各薬物の apical から basal への透過性 (見かけの透過係数, apparent permeability coefficient, P_{app}) は既報の以下の式により算出した¹³⁾。

$$P_{\text{app}} (\text{cm/s}) = dQ/dt(1/C_0A)$$

dQ/dt は basal side への見かけの透過速度 (mg/s)、 C_0 は apical side の初期の薬物濃度 (mg/mL)、および A は単層膜の表面積 (cm^2) である。Caco-2 細胞膜の電気抵抗値は EVOMTM epithelial voltometer (World Precision Instruments 社) を用いて、実験を通じていずれも $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上であることを確認した。

【5】 *In situ* 消化管内吸収部位差の影響評価

Fisher 系雄性ラットを用い、次に示す *in situ* closed loop 法により、消化管内の各セグメントからの薬物吸収性を評価した。ペントバルビタールナトリウム麻酔下で開腹した後、胆管を結紮した。胃ループは噴門部と幽門部を結紮して作成した。十二指腸、空腸、回腸のループについてはそれぞれの部位 10 cm の両端を、結腸については 5 cm の部位の両端を結紮して作成した。YM466 塩酸塩をリン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、それぞれのループに 1 mg/0.5 mL 投与した。投与後 15 分、30 分、60 分に下大静脈より 1 匹 1 点で採血を行った。採取した血液は 1800 \times g、15 分、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件にて遠心分離後、血漿を回収し、濃度測定時まで -20 $^{\circ}\text{C}$ にて保管した。

【6】 イヌ経口投与試験

リン酸緩衝液に溶解した YM466 塩酸塩 (3 mg/mL) を 5 mg/kg となるように経口投与し、その後 20 mL の水を経口投与した。消化管内運動を抑制する目的で、副交感神経遮断薬の臭化プロパンテリンを生理食塩水に溶解し (3 mg/mL)、YM466 溶液の投与 10 分前にイヌの前肢腕頭静脈から 0.5 mg/kg で投与した。結腸到達時間のマーカーとして用いた

Sulfasalazine は 50% polyethylene glycol 400 を用いて 50 mg/mL 懸濁液を作成し、本懸濁液 0.6 mL を 0 号のハードゼラチンカプセルに充填した後、YM466 溶液投与の直前に水 10 mL と共に経口投与した。YM466 溶液を経口投与後 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, および 10 時間後に大腿静脈より採血した。採取した血液は 1800×g、15 分、4 °C の条件にて遠心分離後、血漿を回収し、濃度測定時まで -20 °C にて保管した。

【7】 YM466 の消化管吸収におよぼす胆汁の影響評価

Wistar 系雄性ラットを用い、次に示す *in situ* ループ法により、小腸吸収におよぼす胆汁の影響評価実験を行った。胃幽門部および回盲接合部を結紮して腸管ループを作成した。胆汁の影響を排除したい評価群については、小腸内への胆汁の流入を抑制する為、胆管カニューレション処置を行った。リン酸緩衝液 (pH 6.5) に YM466 を溶解し (0.125 mg/mL)、ループ内に 2.5 mg/kg となるように投与した。YM466 溶液を腸管ループ内に投与後 0.25, 0.5 および 1 時間後に頸静脈より採血した。採取した血液は 1800×g、15 分、4 °C の条件にて遠心分離後、血漿を回収し、濃度測定時まで -20 °C にて保管した。

【8】 YM466 と胆汁および胆汁酸との *in vitro* 相互作用性評価

YM466 塩酸塩を種々の濃度の胆汁末または胆汁酸塩 (タウロコール酸ナトリウム) と共にリン酸緩衝液 (pH 6.5) 中で YM466 が 10 mg/mL となるように混合し、約 3 時間振とうした。混合後、1400×g、10 分、室温の条件にて遠心分離後、上清中に溶解している YM466 を HPLC により測定した。

【9】 定量法

(1) YM466

YM466 の血漿中濃度測定は、既報³⁴⁾に準じ、HPLC 法により実施した。内部標準物質であ

るYM-59892 solution (5 µg/mL) 0.1 mL および 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) 1 mL を0.5 mL の血漿試料に加え、固相抽出カラムOASIS HLB (Waters 社)に通した。10%エタノール 2 mL でカラムをWash した後、2 mL のエタノールを加えてYM466 を溶離させた。この溶離液を蒸発乾固し、残渣を50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) 0.25 mL に再溶解した。生体由来の不純物をジエチルエーテル 2 mL で2回抽出除去し、水相画分 50 µL をHPLC装置に注入した。HPLC はLC-10AT ポンプ (島津製作所)、SIL-10A オートサンプラー (島津製作所)、SPD-10AV 分光光度計 (島津製作所)、C-R7A インテグレーター (島津製作所) から構成されたものを使用した。分離カラムはTSK gel ODS 80Ts [4.6 × 250 mm] (東ソー株式会社) を室温条件にて用いた。移動相は50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) /アセトニトリル混液 (74:24, v/v) を用い、1.0 mL/min の速度で流した。YM466は波長240 nm で検出した。本定量法の検出限界は10 ng/mL であった。検量線 (10-2000 ng/mL) の相関係数はいずれも0.9992 以上であり、変動係数はいずれも0.5%から3.0%の間であった。*in vitro* 実験で得られたYM466 試料の濃度定量は、固相抽出カラムでの前処理を行わないことを除き、上記と同じ方法にて実施した。

(2) スルファピリジン

スルファピリジンはスルファサラジンの盲腸周囲に存在する腸内細菌によるアゾ結合の開裂により生成される¹⁸⁾。血漿中のスルファピリジン濃度は既報⁵⁵⁾に準じ、次の方法により測定した。内部標準物質である 2-acetaminophenol (20 µg/mL) 0.1 mL および 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 mL 、および酢酸エチル 5 mL を 0.5 mL の血漿試料に加え、10 分振とう後、遠心分離した (830×g、5 分、4 °C)。有機相はエバポレーターにて減圧留去し、残渣は後述する HPLC 用移動相 0.2 mL で再溶解した。サンプル 50 µL を YM466 の定量法の項で記載した HPLC 装置を用い、分離カラム Nucleosil 5C18 [内径 4 × 150 mm] (株式会社ケムコ) に注入した。移動相はメタノール、アセトニトリル、および水の混液 (4:4:92, v/v)

を用い、1 mL/min の速度で流した。スルファピリジン は波長 254 nm で検出した。検量線 (50-2000 ng/mL) の相関係数はいずれも 0.9995 以上であり、変動係数はいずれも 2.2% から 14.1% の間であった。

(3) プロプラノロール (PPL)

全てのサンプルの測定は HPLC システム LC-10AVP (島津製作所) を用いて行い、検出には蛍光検出器 (励起波長 295 nm、発光波長 360 nm) を使用した。測定試料 (20 µL) を分離カラム Wako Sil AR column [内径 4.6 × 150 mm] (和光純薬株式会社) に注入した。移動相は 10 mM リン酸とメタノールの混液 (6:4, v/v) を用い、流速 1.0 mL/min で流した。検量線 (10-200 ng/mL) の相関係数はいずれも 0.9995 以上であり、変動係数はいずれも 1.8% 以下であった。

(4) ナドロール (NDL)

全ての試料の測定は HPLC システム LC-10AVP (島津製作所) を用いて行い、検出には蛍光検出器 (励起波長 230 nm、発光波長 300 nm) を使用した。測定試料 (30 µL) を分離カラム Wako Sil AR column [内径 4.6 × 150 mm] (和光純薬株式会社) に注入した。移動相は 50 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.5) とアセトニトリルの混液 (85:15, v/v) を用い、流速 1.0 mL/min で流した。検量線 (1-100 ng/mL) の相関係数はいずれも 0.9995 以上であり、変動係数はいずれも 2.5% 以下であった。

(5) フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン 4000 (FD-4)

全ての試料の測定は HPLC システム LC-10AVP (島津製作所) を用いて行い、検出には蛍光検出器 (励起波長 495 nm、発光波長 514 nm) を使用した。測定試料 (30 µL) を分離カラム Wako Sil RS column [内径 4.6 × 250 mm] (和光純薬株式会社) に注入した。移動相は

0.04 M クエン酸を加えた 0.13 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) とアセトニトリルの混液 (9:1, v/v) を用い、流速 1.0 mL/min で流した。検量線 (6-120 ng/mL) の相関係数はいずれも 0.9999 以上であり、変動係数はいずれも 1.2%以下であった。

【10】 薬物動態パラメータの算出

最大血漿中濃度 C_{max} 、 C_{max} に到達するまでの時間 T_{max} は、実測値より求めた。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は台形公式に従って算出した。

【11】 統計解析

イヌ経口投与試験データおよびラットの消化管吸収におよぼす胆汁の影響評価データについて統計解析を行った。実験群の比較に対する平均値の差の統計的有意性は Student's t -test により評価した。 p 値が <0.01 の場合、差は統計的に有意であると見なした。

第2章 実験の部

【1】 試薬

YM466、YM466 塩酸塩および YM-59892 (内部標準物質) はアステラス製薬株式会社 (旧山之内製薬株式会社) で作製した。胆汁末 (ウシ由来) は片山化学工業より購入した。タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸およびリトコール酸は和光純薬株式会社より購入した。その他の一般試薬は市販の特級品を使用した。

【2】 実験動物

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、体重 180–210 g) (日本エスエルシー株式会社) を用いた。室温 20–26 °C、湿度 40%–70% に設定した動物管理エリア内で 1 週間馴化させた。馴化中は実験動物用標準飼料と水を自由に与えた。実験に際しては、実験 20 時間前から絶食を行った。採血はエーテル麻酔下で実施した。

【3】 YM466 と胆汁酸の複合体 (難溶性複合体、可溶性複合体) のラット経口投与実験

難溶性複合体試料は、YM466 水溶液に、胆汁酸塩 (タウロコール酸ナトリウム) をモル比 1 : 1 で添加後、十分に乾燥を行うことにより得た。可溶性複合体試料は、YM466 水溶液に、過剰量の胆汁酸塩 (タウロコール酸ナトリウム) をモル比 1 : 67 で添加して調製した。得られた溶液は黄色の透明であった。難溶性複合体はカプセルに充填して、可溶性複合体は溶液で、YM466 として 15 mg/kg となるように絶食下経口投与した。比較の為、YM466 単独溶液の投与も行った。投与後 0.25, 0.5, 1 および 2 時間後に頸静脈より経時的に採血した。採取した血液は 1800×g、15 分、4 °C の条件にて遠心分離後、血漿を回収し、濃度測定時まで -20 °C にて保管した。

【4】 YM466 と胆汁酸の相互作用の NMR (核磁気共鳴) 分析

¹H NMR スペクトルは核磁気共鳴装置 Jeol Alpha 500 (日本電子株式会社) により測定した。YM466 および種々の濃度のタウロコール酸ナトリウムを D₂O リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解した。プロトン由来のケミカルシフト (ppm) をそれぞれの原子毎に測定した。YM466 のスペクトルは、YM466 単独、および YM466 にタウロコール酸ナトリウムを YM466 : タウロコール酸ナトリウム比で 1 : 1 から 1 : 19 (モル比) まで滴定した条件にて測定した。

【5】 YM466 定量法

YM466の血漿中濃度測定は、既報³⁴⁾に準じ、HPLC法により実施した。内部標準物質であるYM-59892 溶液 (5 µg/mL) 0.1 mL および 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) 1 mL を0.5 mL の血漿試料に加え、固相抽出カラムOASIS HLB (Waters 社)に通した。10%エタノール 2 mL でカラムをWash した後、2 mL のエタノールを加えてYM466 を溶離させた。この溶離液を蒸発乾固し、残渣を50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) 0.25 mL に再溶解した。生体由来の不純物をジエチルエーテル 2 mL で2回抽出除去し、水相画分 50 µL をHPLC装置に注入した。HPLC はLC-10AT ポンプ (島津製作所)、SIL-10A オートサンプラー (島津製作所)、SPD-10AV 分光光度計 (島津製作所)、C-R7A インテグレーター (島津製作所) から構成されたものを使用した。分離カラムはTSK gel ODS 80Ts [4.6 × 250 mm] (東ソー株式会社) を室温条件にて用いた。移動相は50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) /アセトニトリル混液 (74:24, v/v) を用い、1.0 mL/min の速度で流した。YM466は波長240 nm で検出した。本定量法の検出限界は10 ng/mL であった。検量線 (10-2000 ng/mL) の相関係数はいずれも0.9992 以上であり、変動係数はいずれも0.5%から3.0%の間であった。*in vitro* 実験で得られたYM466 試料の濃度定量は、固相抽出カラムでの前処理を行わないことを除き、上記と同じ方法にて実施した。

【6】 薬物動態パラメータの算出

最大血漿中濃度を C_{max} 、 C_{max} に到達するまでの時間を T_{max} と表記した。血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は台形公式に従って算出した。

【7】 統計解析

ラットの経口投与実験データについて統計解析を行った。実験群の比較に対する平均値の差の統計的有意性は Student's *t*-test により評価した。 p 値が <0.01 または <0.05 の場合、差は統計的に有意であると見なした。

第3章 実験の部

【1】 試薬

YM466およびYM-59892 (内部標準物質) はアステラス製薬株式会社(旧 山之内製薬株式会社) で作製した。胆汁末 (ウシ由来) は片山化学工業より購入した。タウロコール酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム (100-150 cP) およびキトサン(Chitosan 10) は和光純薬株式会社より購入した。アミノアルキルメタクリレートコポリマーE (AAM copolymer E) (Eudragit® E100 and Eudragit® EPO) はエボニックデグサジャパンより購入し、ヒプロメロース(TC-5E) は信越化学工業より購入した。ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート(AEA) は第一三共株式会社より購入した。その他の溶媒および一般試薬は市販の特級品を使用した。

【2】 実験動物

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、体重 180–210 g) (日本エスエルシー株式会社) を用いた。室温 20–26 °C、湿度 40%–70%に設定した動物管理エリア内で 1 週間馴化させた。馴化中は実験動物用標準飼料と水を自由に与えた。実験に際しては、実験 20 時間前から絶食を行った。採血はエーテル麻酔下で実施した。

【3】 YM466 と胆汁との相互作用評価

YM466 溶液(1 mM) に各種濃度条件の胆汁 (0, 1, 2, 5 mg/mL) の混合液を精製水中にて調製した。それぞれの試料を、Ultrafree®-MC フィルター (ミリポア社製、カットサイズ 10,000 Da) を用いて限外濾過を行った。得られた濾液の YM466 濃度を測定し、濾液中の薬物回収率を次の式により求めた。

濾液中の薬物回収率 (%)

= (濾液中の YM466 量/限外濾過装置に添加した試料中の YM466 量) × 100

【4】 YM466 と胆汁との相互作用抑制効果を有する添加剤の探索

アルギン酸ナトリウム、ヒプロメロース、AAM copolymer E、AEA およびキトサン を評価に用いた。それぞれの添加剤溶液(20 mg/mL)を、ヒプロメロースおよびアルギン酸ナトリウムは精製水に、AAM copolymer E および AEA は 0.05 N HCl に溶解して調製した。キトサンは 0.1 N HCl に溶解して調製した。各添加剤溶液を、YM466 (1 mM) および胆汁(5 mg/mL)の混合液に、添加後の添加剤濃度が 5 mg/mL となるように加えた。混合液を 30 秒間ボルテックスミキサーにて混合後、【3】で述べた限外濾過法により、濾液中の YM466 の回収率を求めた。

【5】 AAM copolymer E と YM466 および胆汁酸との *in vitro* 結合性の評価

YM466 水溶液 (2 mM)、タウロコール酸ナトリウム水溶液 (16 mM)、および AAM copolymer E (20 mg/mL) 0.05 N HCl 溶液を調製した。これらを用いて、YM466 溶液(1 mM)に AAM copolymer E (5 mg/mL) を混合した溶液と混合しない溶液、タウロコール酸ナトリウム水溶液 (8 mM) に AAM copolymer E (5 mg/mL) を混合した溶液と混合しない溶液を作成した。各サンプルを 30 秒間ボルテックスミキサーにて混合後、【3】で述べた限外濾過法により、濾液中の YM466 およびタウロコール酸ナトリウムの回収率を求めた。

【6】 ラット経口投与試験

AAM copolymer E 溶液(3%)を AAM copolymer E をメタノール/0.15 M HCl (4:3, w/w) に溶解して調製した。本溶液を DL-41 噴霧乾燥機 (ヤマト科学株式会社) を用いて噴霧乾燥した (噴霧乾燥速度 10 g/min、風量 0.8 m³/min、噴霧空気圧 1 MPa、品温 55–57 °C)。得られた粉末を PH120 箱形乾燥機 (松井製作所) を用いて 40 °C で 24 時間乾燥し、AAM

copolymer E の噴霧乾燥粉末を得た。YM466 と AAM copolymer E 噴霧乾燥粉末を精製水に溶解し、ラット経口投与試験用の投与試料を調製した。AAM copolymer E の濃度が 0, 1, 3 mg/mL と異なる 3 種の投与試料を調製し、YM466 の濃度はいずれも 1 mg/mL となるように調製した (高分子添加剤/薬物比 polymer/drug ratio (P/D ratio) = 0, 1, or 3)。調製した試料を、YM466 が 2.5 mg/kg の投与量となるようにラットに経口投与した($n=3$)。全てのラットは投与前 20 時間は絶食状態とした。投与後 30 分および 60 分にエーテル麻酔下にて頸静脈より採血を行った。採取した血液は 1800×g、15 分、4 °C の条件にて遠心分離後、血漿を回収し、濃度測定時まで -20 °C にて保管した。

【7】 定量法

(1) YM466

YM466 の血漿中濃度測定は、既報³⁴⁾に準じ、HPLC 法により実施した。内部標準物質である YM-59892 solution (5 µg/mL) 0.1 mL および 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) 1 mL を 0.5 mL の血漿試料に加え、固相抽出カラム OASIS HLB (Waters 社) に通した。10%エタノール 2 mL でカラムを Wash した後、2 mL のエタノールを加えて YM466 を溶離させた。この溶離液を蒸発乾固し、残渣を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) 0.25 mL に再溶解した。生体由来の不純物をジエチルエーテル 2 mL で 2 回抽出除去し、水相画分 50 µL を HPLC 装置に注入した。HPLC は LC-10AT ポンプ (島津製作所)、SIL-10A オートサンプラー (島津製作所)、SPD-10AV 分光光度計 (島津製作所)、C-R7A インテグレーター (島津製作所) から構成されたものを使用した。分離カラムは TSK gel ODS 80Ts [4.6 × 250 mm] (東ソー株式会社) を室温条件にて用いた。移動相は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) / アセトニトリル混液 (74:24, v/v) を用い、1.0 mL/min の速度で流した。YM466 は波長 240 nm で検出した。本定量法の検出限界は 10 ng/mL であった。検量線 (10-2000 ng/mL) の相関係数はいずれも 0.9992 以上であり、変動係数はいずれも 0.5% から 3.0% の間であった。in vitro 実験で

得られた YM466 試料の濃度定量は、固相抽出カラムでの前処理を行わないことを除き、上記と同じ方法にて実施した。

(2) タウロコール酸ナトリウム

タウロコール酸ナトリウム の定量は、酵素比色法により、測定キット（胆汁酸テストワコー、和光純薬株式会社）を用いて実施した。

【8】 薬物動態パラメータの算出

最大血漿中濃度 C_{max} 、 C_{max} に到達するまでの時間 T_{max} は、実測値より求めた。血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は台形公式に従って算出した。

【9】 統計解析

全ての実験は3つ以上の独立した試験から得られた平均 \pm SDで示した。実験群の単独比較に対する平均値の差の統計的有意性はStudent's *t*-test により評価した。実験群の多重比較に対する平均値の差の統計的有意性はDunnett's test あるいはTukey's test により評価した。*p* 値が<0.01または<0.05の場合、差は統計的に有意であると見なした。

引用文献

1. Dunwiddie CT, Thornberry NA, Bull HG, Sardana M, Friedman PA, Jacobs JW, Simpson E. 1989. Antistatin, a leech derived inhibitor of FXa. Kinetic analysis of enzyme inhibition and identification of the reactive site. *J Biol Chem* 264:16694-16699.
2. Sitko GR, Ramjit DR, Stabilito II, Lehman D, Lynch JJ, Vlasuk GP. 1992. Conjunctive enhancement of enzymatic thrombolysis and prevention of thrombotic reocclusion with the selective FXa inhibitor, tick anticoagulant peptide. Comparison to hirudin and heparin in a canine model of acute coronary artery thrombosis. *Circulation* 85:805-15.
3. Taniuchi Y, Sakai Y, Hisamichi N, Kayama M, Mano Y, Sato K, Hirayama F, Koshino H, Matsumoto Y, Kawasaki T. 1998. Biochemical and pharmacological characterization of YM-60828, a newly synthesized and orally active inhibitor of human factor Xa. *Thromb Haemost* 79:543-548.
4. Kawasaki T, Sato K, Sakai Y, Hirayama F, Koshino H, Taniuchi Y, Matsumoto Y. 1998. Comparative studies of an orally-active factor Xa inhibitor, YM-60828, with other antithrombotic agents in rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 79:410-416.
5. Sato K, Kawasaki T, Taniuchi Y, Hirayama F, Koshino H, Ichihara M, Matsumoto Y. 1998. Antithrombotic effects of YM-60828 in three thrombosis models in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 350:87-91.
6. Sato K, Kawasaki T, Hisamichi N, Taniuchi Y, Hirayama F, Koshino H, Matsumoto Y. 1998. Antithrombotic effects of YM-60828, a newly synthesized factor Xa inhibitor in rat thrombosis models and its effects on bleeding time. *Brit J Pharmacol* 123:92-96.
7. Iwatsuki Y, Kaku S, Sakai-Moritani Y. 2002. Antithrombotic effect of YM466, a synthesized factor Xa inhibitor, in arterio-venous shunt thrombosis model in squirrel monkeys. *Jpn J Pharmacol* 88 (suppl 1):76.

8. Davie EW, Fujiwara K. 1975. Basic mechanisms in blood coagulation. *Ann Rev Biochem* 44:799-829.
9. Mano Y, Usui T, Kamimura H. 2004. Pharmacokinetics of YM466, a new factor Xa inhibitor, in rats and dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 29:7-13.
10. Mano Y, Sonoda T, Usui T, Kamimura H. 2004. Absorption, distribution, metabolism and excretion of YM466, a novel factor Xa inhibitor, in rats. *Biopharm Drug Dispos* 25:253-260.
11. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 12:413-420.
12. Yu LX, Lipka E, Crison JC, Amidon GL. 1996. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliver Rev* 19:359-376.
13. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. 2000. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 10:195 – 204.
14. Chong S, Dando SA, Soucek KM, Morrison RA. 1996. In vitro permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of in vivo absorption for peptide – like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. *Pharm Res* 13:120-123.
15. Artursson P, Karlsson J. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175:880-885.
16. Benoit PS, Karz NL, Mintz MR, Jenkins HJ. 1969. Evaluation of antiparasitic and related activity in the intact dog. *J Pharm Sci* 58:225-228.
17. Haruta S, Iwasaki N, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. 1998. Absorption behavior of orally

- administrated drugs in rats treated with propantheline. *J Pharm Sci* 87:1081-1085.
18. Fujioka Y, Metsugi Y, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. 2008. Evaluation of *in-vivo* dissolution behavior and GI transit of griseofulvin, a BCS class II drug. *Int J Pharm* 352:36-43.
 19. Kellow JE, Borody TJ, Phillips SF, Haddad AC, Brown ML. 1986. Sulfapyridine appearance in plasma after salicylazosulfapyridine. Another simple measure of intestinal transit. *Gastroenterology* 91:396-400.
 20. Tønsgberg H, Holm R, Mu H, Boll JB, Jacobsen J, Müllertz A. 2011. Effect of bile on the oral absorption of halofantrine in polyethylene glycol 400 and polysorbate 80 formulations dosed to bile duct cannulated rats. *J Pharm Pharmacol* 63:817-824.
 21. Itoh Z, Takahashi I, Nakaya M, Suzuki T, Arai H, Wakabayashi K. 1982. Interdigestive gallbladder bile concentration in relation to periodic contraction of gallbladder in the dog. *Gastroenterology* 83:645-651.
 22. Yamaguchi T, Ikeda C, Sekine Y. 1986. Intestinal absorption of a β -adrenergic blocking agent nadolol I. Comparison of absorption behavior of nadolol with those of other β -blocking agents in rats. *Chem Pharm Bull* 34:3362-3369.
 23. Gibaldi M, Feldman S. 1970. Mechanisms of surfactant effects on drug absorption. *J Pharm Sci* 59:579-589.
 24. Bates TR, Gibaldi M, Kanig JL. 1966. Solubilizing properties of bile salt solutions I: Effect of temperature and bile salt concentration on solubilization of glutethimide, griseofulvin, and hexestrol. *J Pharm Sci* 55:191-199.
 25. Kakemi K, Sezaki H, Konishi R, Kimura T, Murakami M. 1970. Effect of bile salts on the gastrointestinal absorption of drugs I. *Chem Pharm Bull* 18:275-280.
 26. Kakemi K, Sezaki H, Konishi R, Kimura T, Okita A. 1970. Effect of bile salts on the gastrointestinal absorption of drugs II. Mechanism of the enhancement of the intestinal

- absorption of sulfaguanidine by bile salts. *Chem Pharm Bull* 18:1034-1039.
27. Kimura T, Sezaki H, Kakemi K. 1972. Effect of bile salts on the gastrointestinal absorption of drugs. IV. Site of intestinal absorption of sodium taurocholate and its consequence on drug absorption in the rat. *Chem Pharm Bull* 28:1656-1662.
 28. Lennernäs H, Regardh CG. 1993. Evidence for an interaction between the β -blocker pafenolol and bile salts in the intestinal lumen of the rat leading to dose-dependent oral absorption and double peaks in the plasma concentration-time profile. *Pharm Res* 10:879-883.
 29. Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. 1998. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 15:698-705.
 30. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. 2008. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 25:1663-1676.
 31. Barnwell SG, Laudanski T, Dwyer M, Story MJ, Guard P, Cole S, Attwood D. 1993. Reduced bioavailability of atenolol in man: the role of bile acids. *Int J Pharm* 89:245-250.
 32. Perez de la Cruz Moreno M, Oth M, Deferme S, Lammert F, Tack J, Dressman JB, Augustijns P. 2006. Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. *J Pharm Pharmacol* 58:1079-1089.
 33. Persson EM, Gustafsson AS, Carlsson AS, Nilsson RG, Knutson L, Forsell P, Hanisch G, Lennernäs H, Abrahamsson B. 2005. The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharm Res* 22:2141-2151.
 34. Mano Y, Aoki T, Kikuchi Y, Soeishi Y, Usui T, Kamimura H. 2002. LC determination of YM466, a new factor Xa inhibitor, in rat and dog plasma. *J Pharm Biomed Anal* 29:631-638.
 35. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 15:11-22.

36. Alvaro D, Cantafora A, Attili AF, Ginanni Corradini S, De Luca C, Minervini G, Di Biase A, Angelico M. 1986. Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp Biochem Physiol* 83B:551-554.
37. Yang YW, Yang JC. 1996. Effect of polyionic compounds on the adsorption of polyoma virus. *Antiviral Res* 33:33-39.
38. Gombotz WR, Wee SF. 2012. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliver Rev* 64:194-205.
39. Mustafin RI, Van der Mooter G. 2005. Eudragit E modified by inclusion into an interpolyelectrolyte complex. *Pharm Chem J* 39:39-42.
40. Bowersock TL, HogenEsch H, Suckow M, Porter RE, Jackson R, Park K. 1996. Oral vaccination with alginate microsphere systems. *J Controlled Release* 39:209-220.
41. Miranda A, Millan M, Caraballo I. 2006. Study of the critical points of HPMC hydrophilic matrices for controlled drug delivery. *Int J Pharm* 311:75-81.
42. Fu XC, Wang GP, Liang WQ, Chow MSS. 2004. Prediction of drug release from HPMC matrices: effect of physicochemical properties of drug and polymer concentration. *J Controlled Release* 95:209-216.
43. Siepmann J, Peppas NA. 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliver Rev* 48:139-57.
44. Lehmann K. 1989. Chemistry and applications properties of polymethacrylate coating systems. In JW McGinity (ed.), *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*. Marcel Dekker New York 153-245.
45. Yang L, Watanabe S, Li J, Chu JS, Katsuma M, Yokohama S, Fix JA. 2003. Effect of colonic lactulose availability on the timing of drug release onset *in vivo* from a unique colon-specific drug delivery system (CODESTM). *Pharm Res* 20:429-434.

46. Qi S, Belton P, Nollenberger K, Clayden N, Reading M, Craig DQM. 2010. Characterization and prediction of phase separation in hot-melt extruded solid dispersions: A thermal, microscopic and NMR relaxometry study. *Pharm Res* 27:1869-1883.
47. Hamaguchi T, Shinkuma D, Tanaka T, Yamanaka Y, Miyake M, Tamura S, Mizuno N. 1995. Factors affecting the dissolution rate of sulphiride from tablets coated with polyvinylacetal diethylaminoacetate, a gastric-fluid-soluble polymer. II. Effect of mechanical destructive and film coating strength in the gastrointestinal tract. *Chem Pharm Bull* 43:2205-2210.
48. Aikawa K, Mitsutake N, Uda H, Tanaka S, Shimamura H, Aramaki Y, Tsuchiya S. 1998. Drug release from pH-responsive polyvinylacetal diethylaminoacetate hydrogel, and application to nasal delivery. *Int J Pharm* 168:181-188.
49. Hashimoto Y, Tanaka M, Kishimoto H, Shiozawa H, Hasegawa K, Matsuyama K, Uchida T. 2002. Preparation, characterization and taste-masking properties of polyvinylacetal diethylaminoacetate microspheres containing trimebutine. *J Pharm Pharmacol* 54:1323-1328.
50. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Domb AJ. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* 104:6017-6084.
51. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. 2010. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliver Rev* 62:28-41.
52. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. 2010. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliver Rev* 62:59-82.
53. Mao S, Sun W, Kissel T. 2010. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliver Rev* 62:12-27.
54. Higo I, Raub TJ, Borhardt RT. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-749.

55. Mizuta H, Kawazoe Y, Haga K, Ogawa K. 1990. Effect of meals on gastric emptying and small intestinal transit times of a suspension in the beagle dog assessed using acetaminophen and salicylazosulfapyridine as markers. *Chem Pharm Bull* 38: 2224-2227.