

Title	難水溶性弱塩基性医薬品の生体内挙動予測技術開発を 目指したin vitro-in silicoアプローチの確立
Author(s)	松井, 一樹
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69673
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

難水溶性弱塩基性医薬品の生体内挙動予測技術開発を目指した

in vitro-in silico アプローチの確立

2018年

松井 一樹

略号表

本論文中に用いた略号および略記号を以下に示した。

AUC	area under plasma drug concentration-time curve
AUDC	area under the dissolved drug amount-time curve
BA	bioavailability
Caco-2	human colonic carcinoma cell line
C _{max}	maximum drug concentration
F_{a}	fraction absorbed
FaSSIF	fasted state simulated intestinal fluid
FBS	fetal bovine serum
$\mathbf{F}_{\mathbf{g}}$	fraction escaped from gut metabolism
$\mathbf{F}_{\mathbf{h}}$	fraction escaped from liver metabolism
GIS	gastrointestinal simulator
HEPES	$\label{eq:constraint} 4\mbox{-}(2\mbox{-hydroxyethyl})\mbox{-}1\mbox{-piperazineethanesulfonic acid}$
НР-в-СД	hydroxypropyl-beta-cyclodextrin
HPLC	high pressure liquid chromatography
iPD	in vivo predictive dissolution
IVIVC	in vitro-in vivo correlation
$\log P$	partition coefficient
NaTC	sodium taurocholate
$\mathbf{P}_{\mathrm{app}}$	apparent permeability coefficient
$\mathbf{P}_{\mathrm{eff}}$	effective permeability coefficient
p <i>Ka</i>	acid dissociation constant
PTFE	polytetrafluoroethylene
PVC	polyvinyl chloride
PVDF	polyvinylidene difluoride
SGF	simulated gastric fluid
SIF	simulated intestinal fluid
TEER	transepithelial electrical resistance
USP	united states pharmacopeia
USP II	united states pharmacopeia apparatus II

目次

緒論			2
本論			6
第一章	GIS 溶出詞	式験による過飽和・析出現象の観察及び吸収性に与える影響の評価	
	第一節	序論	6
	第二節	実験方法	7
	第三節	結果	15
	第四節	考察	20
第二章	人工胆汁酶	浚を用いた GIS 溶出試験系の改良	
	第一節	序論	22
	第二節	実験方法	23
	第三節	結果	24
	第四節	考察	26
第三章	GIS 溶出詞	式験による製剤間の体内薬物挙動差の検出	
	第一節	序論	27
	第二節	実験方法	28
	第三節	結果	33
	第四節	考察	41
第四章	GIS 溶出詞	式験に基づいた生理学的経口吸収モデルの構築	
	第一節	序論	43
	第二節	実験方法	44
	第三節	結果	49
	第四節	考察	55
総括			57
引用文南	犬		60
Support	ting Inform	ation	66

緒論

近年、低分子医薬品候補化合物の探索にコンビナトリアル化学やハイスループットスク リーニング、タンパク質立体構造に基づく分子設計の導入が進んだことに伴い、候補化合 物の分子量は増加し脂溶性も増す傾向にある。その結果、高い薬理活性を有する反面、難 水溶性の性質を有する医薬品候補化合物の数が年々増加してきている[1]。経口投与された 難水溶性医薬品候補化合物は消化管内で十分な溶解度に達することができず、低い経口吸 収率や血中薬物濃度の著しい個体差に至る。このような難水溶性に起因する薬物動態学的 特性は不十分な治療効果や予期せぬ副作用の発生を引き起こし、結果として医薬品開発の ドロップアウトや溶解性改善を指向した製剤検討による開発の遅延へと繋がる。そのため、 前臨床段階や臨床初期段階で難水溶性化合物のヒト経口吸収性を予測し、開発継続の可否、 あるいは製剤検討の必要性有無を早期に判断することが強く求められている。

固形製剤として経口投与された薬物は消化管内で崩壊・溶解し、消化管粘膜を透過して 小腸上皮細胞内で薬物代謝を受けた後に門脈血中に移行する。そしてその後、肝臓による 初回通過効果を免れた薬物が循環血中に到達する (Figure 1)。



Figure 1. Oral drug absorption processes

従って、薬物の絶対的経口吸収率 (oral bioavailability, BA)は消化管吸収率 (fraction absorbed, F_a)に小腸アベイラビリティ (fraction escaped from gut metabolism, F_g)と肝ア ベイラビリティ(fraction escaped from liver metabolism, F_b)を乗じた下の式(1)で記述され る。

$$BA = F_a \times F_g \times F_h \tag{1}$$

さらに、Faは消化管内における薬物濃度 (luminal concentration, Cluminal)と消化管透過 係数 (effective permeability coefficient, Peff)、そして消化管有効表面積 (Surface area, S) の積を消化管通過時間 (intestinal transit time, T)で積分し、薬物投与量で除することによ って求める事ができる (式(2))。

$$F_{a} = \frac{\int_{0}^{T} C_{luminal} \times P_{eff} \times S}{Dose}$$
(2)

即ち、薬物の消化管吸収率を予測するには消化管膜透過係数 (Peff)と、消化管内における 薬物濃度 (Cluminal)を適切な手法で見積もることが不可欠である。1995 年 Amidon らは医薬 品原薬の溶解性・膜透過性を指標とした biopharmaceutics classification system (BCS)を 提唱し、各医薬品の経口吸収性を制限している律速段階を元に経口医薬品を 4 つのクラス に分類した (Figure 2)[2]。この 4 つのクラスのうち、低溶解性・高膜透過性に分類されるク ラス 2 (BCS class II)の薬物の経口吸収性は、消化管内での溶出速度・溶解度に大きく左右 される溶解速度/溶解度律速となり、これらのパラメーターの推定が経口吸収性の予測に重 要となる。しかし、消化管内における溶出挙動を予測するにあたって未だ確立した方法は 存在せず、難水溶性医薬品の経口吸収予測精度は依然として高いとは言えない。



Figure 2. Biopharmaceutics classification system

経口医薬品の溶出挙動を評価する際、一般的には薬局方記載の溶出試験器が利用されて いる。これら溶出試験器は制御性・再現性に優れることから経口製剤の品質保証や製造ロ ット比較に汎用されている。しかし一方で、難水溶性化合物の評価を実施した場合にin vitro 溶出試験と in vivo 薬物動態試験との間に相関性 (in vitro-in vivo correlation, IVIVC)が認 められない例が多数報告されている。この IVIVC 不成立の一因は、薬局方記載の溶出試験 法が消化管内溶液の組成や pH、液量、消化管運動などの消化管生理を反映していない事に 起因していると考えられている。従ってこれら消化管生理に溶出挙動が影響を受けやすい 開発候補化合物を評価した際、その経口吸収性を見誤る可能性があり、医薬品開発戦略の 舵取りを誤る懸念がある。こういった背景から近年、種々の消化管生理を反映した溶出試 験、in vivo predictive dissolution (iPD) methodology を用いた難水溶性医薬品の溶出試験 の重要性が指摘されている[3,4]。これまでに複数の iPD methodology が報告されており、 各々はヒト消化管生理の異なる側面を取り入れた溶出試験となっている。そのため、評価 薬物の物性や製剤に応じて適切な iPD methodology を用いることによって、定型的な溶出 試験では困難であった難水溶性医薬品の適正な溶出挙動評価と経口吸収性予測が期待され る。

BCS class II 薬物の中でも特に経口吸収性の予測が困難なケースとして、2~7 程度の pKaを有する難水溶性弱塩基性薬物 (BCS class II with basic property, BCS class IIb)が 知られている[5]。BCS class IIb 薬物は各々のpKaより低pH条件下では塩基性官能基が 解離して大部分がイオン型として存在するため、高い溶解度を示す。しかし反面、高pH環 境下では分子型が主として存在するため著しく溶解度が低下する。ヒト絶食下の消化管生 理を考慮すると、経口投与された難水溶性弱塩基性医薬品は酸性度の高い胃内では高い溶 解度を、中性pH付近である十二指腸や小腸では低い溶解度を有することになる。そのため、 胃内で速やかに溶出したのちに十二指腸・小腸で平衡溶解度を超える薬物濃度を示す過飽 和という状態が一時的に観察されることとなる。この過飽和状態は熱力学的に不安定な状 態であるため、その後析出が生じ溶解濃度はいずれ平衡溶解度まで低下する。過飽和の程 度及び維持時間は経口吸収に直結するが、これらの現象は化合物の物理化学的性質のみか らは予測できず、また定型的な溶出試験でも評価ができなかった[6]。

こういった問題点を解決すべく、Takeuchi、Amidon らはヒト絶食下における胃排出過 程を忠実に再現した multi-compartment 溶出試験器、gastrointestinal simulator (GIS)を 提唱・構築した[7]。GIS は胃・十二指腸・空腸を模した 3 つのチャンバーで構成される溶 出試験器で、各々のチャンバー間の送液速度や分泌液の供給速度、撹拌速度は絶食状態の ヒトの胃・消化管運動を再現している。そのため、前述した難水溶性弱塩基性医薬品の過 飽和・析出挙動の評価に GIS 溶出試験は有用であると考えられるが、詳細な検討は未着手 であった。

本研究ではヒト絶食時の胃排出過程を忠実に再現した新規 multi-compartment 溶出試験、 GIS を用いて難水溶性弱塩基性医薬品の溶出挙動評価を行い、体内挙動予測における GIS 溶出試験の有用性を評価した。第一章では難水溶性弱塩基性医薬品ジピリダモールの過飽 和・析出現象の検出と、制酸剤併用時の経口吸収性低下率の定性的な予測を試みた。第二 章では人工腸液を用いて試験系の改良を行った。そして第三章では、臨床応用されている イトラコナゾール2製剤の薬物動態差異の検出を目指して、GIS 溶出試験と Caco-2 単層細 胞膜透過試験を組み合わせた IVIVC 評価を行った。最後に第四章では GIS 溶出試験に基づ いた生理学的吸収モデルを構築し、ジピリダモール生体内挙動の定量的な予測可否を検討 した。

第一章 GIS 溶出試験による過飽和・析出現象の観察及び吸収性に与える影響の評価 第一節 序論

2011 年 Psachoulias らは、難水溶性弱塩基性医薬品であるケトコナゾール及びジピリダ モールを溶解状態で胃内強制投与した後、十二指腸において各薬物が平衡溶解度以上の溶 解薬物濃度を示すことを初めてヒトで明らかにした[8]。そして同時に、溶液投与した薬物 の一部が析出していることも示した。この知見は、両薬物ともに制酸剤併用被験者で血中 曝露が大きく低下するという臨床試験結果と合致する[9,10]。即ち、消化管内で生じる過飽 和現象の検出が経口吸収性予測に重要であることを意味している。過飽和の程度及び持続 時間については薬物の物理化学的特性に左右されるだけでなく、消化管腔内の pH や撹拌条 件、分泌成分などによっても影響を受ける。iPD methodology の一つである GIS 溶出試験 はヒト絶食状態の消化管上部環境を模倣した溶出試験であることから、胃から小腸にかけ ての pH 変化の影響を受けやすく且つ消化管上部から速やかに吸収される BCS class IIb の 医薬品評価に適していると推察される。

本章では BCS class IIb に分類され、ヒト十二指腸内で過飽和と析出が認められたジピリ ダモールをモデル化合物に、また BCS class I に分類され過飽和を示さないフルコナゾール を陰性対象化合物に用いて、定型的な溶出試験及び GIS 溶出試験でそれらの溶出挙動を評 価した。その上で、胃内酸性度が各薬物の経口吸収挙動に及ぼす影響を定性的に予測可能 か明らかにするため、制酸剤との薬物間相互作用試験を比較対象とした IVIVC 評価を行っ た。また、in vitro で認められた過飽和現象が経口吸収性亢進に寄与するかを明らかとする 目的で、in situ マウス腸管インフュージョン試験を実施した。

 $\mathbf{6}$

第二節 実験方法

1. 実験材料

評価した医薬品の構造式及び物理化学的特性は Table 1 に示した。フルコナゾール 200 mg 即放錠は Teva Pharmaceuticals USA (North Wales, PA, USA)から、ジピリダモール 25mg 即放錠は Zydus Pharmaceuticals (Pennington, NJ, USA)から入手した。試薬特級グ レードのフルコナゾール原薬、ジピリダモール原薬、ケトコナゾール原薬、リン酸水素二 カリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムは Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA)より購入した。アセトニトリル、トリフルオロ酢酸、ギ酸は Fisher Scientific Inc. (Pittsburgh, PA, USA)の HPLC グレードのものを使用した。

test drug	Fluconazole	Dipyridamole
chemical structure		
$\log P$	0.5^{lpha}	2.74^{6}
p <i>Ka</i>	$11.01, 2.94^{\circ}$	6.24^{6}
aqueous solubility (mg/mL)	7.5^{lpha}	0.005^{6}
oral bioavailability (%)	>90ª	43 ^y

Table 1. Chemical structure and physicochemical property of test drugs

α: Charoo et al. [11]

^B: Kalantzi et al. [12]

Y: Mahony et al. [13]

2. パドル法溶出試験 (USP II)

第24 改正米国薬局方 (United States Pharmacopeia, USP)に適合した溶出試験器 USP apparatus II (USP II, Hanson SR6 Dissolution Test Station, Chatsworth, CA, USA)を用 いてフルコナゾール 200 mg 錠 1 錠 (200 mg)及びジピリダモール 25 mg/錠 2 錠 (50 mg) の溶出性をパドル法で評価した。溶出試験はパドル回転速度 50 回転/分、37±1°C で行った。 試験液には simulated gastric fluid at pH 2.0 (SGF_{pH2.0})、simulated gastric fluid at pH 6.0 (SGF_{pH6.0})、あるいは simulated intestinal fluid at pH 6.5 (SIF_{pH6.5})を用いた。各試験液は 第 24 改正米国薬局方に準じた組成を元に、SGF には pepsin を加えず、また pH を所定の 値に調整して作成した。SGF_{pH6.0} は制酸剤併用時の胃液を模倣したものである。試験液の 組成は Table 2 に示した。パドル法溶出試験に用いた試験液量は GIS 溶出試験での液量に 合わせるため、またヒト消化管内の水分量を模倣する目的で 300 mL と設定した[14]。

Table 2. Media composition for dissolution study

composition	$\mathrm{SGF}_{\mathrm{pH2.0}}$	$\mathrm{SGF}_{\mathrm{pH6.0}}$	${ m SIF}_{pH6.5}$
HCl (N)	10^{-2}	10-6	-
NaCl (mM)	34.2	34.2	15.4
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (mM)	-	-	50
pH	2.0	6.0	6.5

フルコナゾール 200 mg あるいはジピリダモール 50 mg を溶出試験器に投下し、0、3、6、 9、12、15、18、21、24、30、45、60、90、120、150、180 分後に試験液を採取し、30 秒間 2000×g で遠心後、上清を等量のメタノールと混合し、高速液体クロマトグラフィー法 (high pressure liquid chromatography, HPLC)にて溶解薬物濃度を測定した。 3. GIS 溶出試験

フルコナゾール 200 mg 及びジピリダモール 50 mg の GIS 溶出試験は既報に従って実施 した[7]。GIS は胃・十二指腸・空腸を模した 3 つのチャンバーで構成される溶出試験器で、 各々のチャンバーの試験液には胃及び小腸模倣液を用いている (Figure 3)。チャンバー間

の送液速度及びチャンバーの撹拌速度、そして分泌 液の分泌速度は絶食状態におけるヒトの胃・消化管 運動を再現している。実験に先立ち、胃チャンバー (GIS_{stomach})を 50 mL の SGF_{pH2.0} あるいは SGF_{pH6.0} に 250 mL の超純水を加えた計 300 mL の液量で満 たした。超純水 250 mL は米国での薬物動態試験時 の飲水量 8 オンス (約 240 mL)を模倣するために添 加した。十二指腸チャンバー (GIS_{duodenum})には 50 mL の SIF_{pH6.5}を試験液として用い、空腸を模倣した チャンバー (GIS_{jejunum})は実験開始時には空の状態 とした。



Figure 3. Diagram of the GIS

文献[15]より引用

GIS_{stomach} と GIS_{duodenum} にはヒト消化管を模して それぞれ分泌液を一定速度で供給した。GIS_{stomach}に

は SGF_{pH2.0} あるいは SGF_{pH6.0} を 1 mL/min で、GIS_{duodenum} には緩衝能と pH 維持の目的で 2 倍に濃縮した SIF_{pH6.5} (2×SIF_{pH6.5})を 1 mL/min で滴下した。

GIS_{stomach}から GIS_{duodenum}、GIS_{duodenum}から GIS_{jejunum}への送液はペリスタポンプ (Ismatec REGLO pump, IDEX Health and Science, Glattbrugg, Switzerland)を用いて行 い、GIS_{stomach}から GIS_{duodenum}への胃排出半減時間は 8 分に設定した。これは、既報にお いて GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} での合算薬物量・時間推移を元に、消化管吸収が胃排出速度律 速であるとされる高溶解性・高膜透過性の BCS class I 薬物 2 種の血中濃度推移をシミュレ ーションにより予測したところ、胃排出半減期が 5 分から 10 分の間で各薬物の血中濃度推 移が再現できる挙動が得られたためである[7]。また 8 分という胃排出半減時間はヒトでの 実測値にも近い値であり妥当性が示唆される[14]。GIS_{duodenum}から GIS_{jejunum}への送液速度 は、常に GIS_{duodenum}の液量を一定 (50 mL)に保つよう、胃排出速度と分泌速度を考慮して 設定した。送液はコンピュータープログラムによりコントロールした。GIS_{stomach} と GIS_{duodenum}の撹拌にはオーバーヘッドパドルを用い、回転速度は 20 回転/分を基本速度と し、消化管における蠕動運動を模倣するため 25 秒毎に 5 秒の高速撹拌 (100 回転/分)を設 けた。一方、GIS_{jejunum} は消化管下部に向かうにつれて弱まる蠕動運動を再現するため、マ グネティックスターラーで 25 回転/分の一定速度で撹拌した[16]。各チャンバー及び分泌液 のリザーバーはウォーターバスにて 37±1°C に温めながら実験を行った。フルコナゾール 200 mg あるいはジピリダモール 50 mg を溶出試験器に投下し、0、2、5、8、11、14、17、 20、23、26、29、32 分後に 3 つのチャンバーから試験液を採取し、30 秒間 2000×g で遠 心後、上清を等量のメタノールと混合し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)にて溶解 薬物濃度を測定した。

4. 理論曲線の算出

GISduodenum 及び GISjejunum での析出、あるいは未溶解薬物の流入は理論曲線との比較に より判断した。理論曲線とは、送液元のチャンバー中薬物濃度と送液速度のみから算出し た仮想の濃度推移である。以下にその理論曲線の算出方法を示した。

GIS_{stomach}に投下した錠剤は崩壊後、溶解した薬物と未溶解の薬物両方が送液チューブに よりGIS_{duodenum}、GIS_{jejunum}へと移行する。そして各々のチャンバー内で溶解、あるいは析 出する。従って各チャンバーにおける溶解した薬物の単位時間当たりの変化量(dX_{d(s}/dt、 dX_{d(d}/dt、dX_{d(j}/dt)は以下の式(3)~(5)で記述される。

$$\frac{dX_{d(s)}}{dt} = k_{d(s)} X_{ud(s)} - k_{t(s-d)} X_{d(s)}$$
(3)

$$\frac{dX_{d(d)}}{dt} = k_{d(d)}X_{ud(d)} + k_{t(s-d)}X_{d(s)} - k_{t(d-j)}X_{d(d)} - k_{p(d)}X_{d(d)}$$
(4)

$$\frac{dX_{d(j)}}{dt} = k_{d(j)}X_{ud(j)} + k_{t(d-j)}X_{d(d)} - k_{p(j)}X_{d(j)}$$
(5)

Xud(s)、Xud(d)、Xud(j)は各々GISstomach、GISduodenum、GISjejunum で未溶解の薬物量である。 kd(s)、kd(d)、kd(j)は各チャンバーにおける溶解速度定数、kp(d)、kp(j)はGISduodenum、GISjejunum での析出速度定数である。GISstomach からGISduodenum への薬物移行速度定数、GISduodenum からGISjejunum への薬物移行速度定数はそれぞれ kt(s-d)、kt(d-j)である。ここで、GISduodenum、 GISjejunum には未溶解薬物が移行せず、且つ析出が生じないと仮定すると Xud(d)、Xud(j)、kp(d)、 そして kp(j)は0に近似する事ができ、式(4)と式(5)はそれぞれ以下のように簡略化する事が

$$\frac{dX_{d(d)}}{dt} = k_{t(s-d)}X_{d(s)} - k_{t(d-j)}X_{d(d)}$$
(6)

$$\frac{\mathrm{d}X_{\mathrm{d}(j)}}{\mathrm{d}t} = \mathbf{k}_{\mathrm{t}(\mathrm{d}-j)} \mathbf{X}_{\mathrm{d}(\mathrm{d})} \tag{7}$$

式(6)及び式(7)で記述される薬物濃度推移は、薬物の溶解は GIS_{stomach} のみで生じ、 GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} に移行した薬物は析出せずに溶解状態で存在するという仮定下で の推移となる。GIS_{stomach} での溶解速度定数 (kd(s))は時間依存的な変数として実測値から算 出する事で理論曲線が描写できる。この理論曲線よりも実測の薬物濃度が高ければ未溶解 薬物の流入が、低ければ溶解薬物の析出が主に生じている事が判断できる。

5. IVIVC 評価

USP II 溶出試験で認められた制酸剤併用による溶出低下率 (Reduction ratio in USP)を 以下の式(8)で算出した。

$$(\text{Reduction ratio in USP}) = 1 - \frac{(\text{dissolved drug amount in SGF}_{\text{pH6.0}})}{(\text{dissolved drug amount in SGF}_{\text{pH2.0}})}$$
(8)

dissolved drug amount in SGF_{pH2.0}、dissolved drug amount in SGF_{pH6.0} はそれぞれ 300 mL の SGF_{pH2.0}、SGF_{pH6.0} 中で溶出試験開始 180 分後に溶解している薬物量である。

GIS 溶出試験で認められた溶出低下率 (Reduction ratio in GIS)も同様に以下の式(9)で 算出した。

(Reduction ratio in GIS) = 1

 $-\frac{(\text{dissolved drug amount in the GIS}_{\text{duodenum}} \text{ and GIS}_{\text{jejunum}} \text{ with SGF}_{\text{pH6.0}})}{(\text{dissolved drug amount in the GIS}_{\text{duodenum}} \text{ and GIS}_{\text{jejunum}} \text{ with SGF}_{\text{pH2.0}})}$ (9)

dissolved drug amount in the GIS_{duodenum} and GIS_{jejunum} with SGF_{pH2.0}、 dissolved drug amount in the GIS_{duodenum} and GIS_{jejunum} with SGF_{pH6.0} はそれぞれ SGF_{pH2.0} と SGF_{pH6.0} を胃模倣液として用いた際に、最終時点 (32 分)にて GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} で溶解してい る薬物の合計量である。この式(9)はフルコナゾール、ジピリダモールの胃からの吸収は無

視できるとし、ともに高膜透過性であるために溶解した薬物が即時吸収されると仮定して いる。

in vitro試験で認められた溶出低下率は臨床で観察された制酸剤との薬物間相互作用試験 における主要薬物動態学的パラメーター、即ち最大血漿中薬物濃度(maximum drug concentration, C_{max})と血漿中薬物濃度・時間曲線下面積(area under plasma drug concentration-time curve, AUC)の低下率と比較した。

6. in situ マウス腸管インフュージョン試験

動物実験はミシガン大学動物倫理委員会(University of Michigan Committee of Use and Care of Animals)に承認された実験プロトコールに則って実施した。10~12 時間絶食し た 20~30 g の C57/BL6 マウスに対して 5 mg/kg キシラジン/ 80 mg/kg ケタミン混合麻酔 の筋注で麻酔処置を行い、37°C に温めたヒートパッド(Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA)の上に静置した。十分に麻酔が効いている事を確認したのち、正中切 開により 1.5 cm 程度開腹し、小腸上部に相当する消化管部位に切り込みを入れてポリ塩化 ビニル (PVC)チューブ (2.29 mm i.d., Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA, USA)を挿管 した。そして次に記す方法で調製したジピリダモール飽和溶液あるいは過飽和懸濁液を 0.1 mL/min の流速で PVC チューブに送液した。30 分後に流速を止め、さらに 30 分静置後、 腹部大静脈より採血を行った。4 °C、9700×g で 10 分間遠心処理後、上清を血漿サンプル として薬物濃度測定まで・20°C にて凍結保存した。血漿中の薬物濃度測定は高速液体クロマ トグラフ質量分析法 (LC-MS)にて行った。

ジビリダモール飽和溶液は、ジビリダモール原薬 25 mg を 300 mL の SIF_{pH6.5} に一晩室 温で撹拌しながら溶解させたのち、フィルター濾過(孔径 0.22µm, Millipore, Milford, MA, USA)して調製した。ジビリダモールの過飽和懸濁液は先述した GIS 溶出試験で調製した。 SGF_{pH2.0}を胃模倣液として用い、ジビリダモール 25 mg あるいは 50 mg の GIS 溶出試験 を開始した 2 分後、GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum}の溶出液を速やかに吸引し PVC チューブに注 入した。

12

7. HPLC 分析

フルコナゾール及びジピリダモールの溶解薬物濃度は Table 3 の構成の Waters HPLC シ ステム (Waters Inc., Milford, MA, USA)で測定した。

Table 3. System compositions of HPLC

system composition	model number
Pump system	Waters 515 HPLC pump
Autosampler	Waters 712 Wisp HPLC sampler
Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μ m, 4.6 mm × 150 mm)
UV detector	Waters 996 photodiode arraydetector

移動相の流速は1mL/minとし、移動相Aに0.1% トリフルオロ酢酸、移動相Bに0.1% トリフルオロ酢酸含有アセトニトリルを Table 4 に示したグラジエント条件でサンプルを 分析した(分析時間10分)。フルコナゾール、ジピリダモールのピークはそれぞれ吸収波長 260 nm、290 nm で検出し定量した。

Table 4. Gradient method for HPLC analysis

Time (min)	0	0.1	4	4.1	7	7.1	10
%B (%)	20	20	50	95	95	20	20

8. LC-MS 分析

ジピリダモールのマウス血漿中濃度は Table 5 の構成の Shimadzu LC-MS システム (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan)にて測定した。

Table 5. System compositions of LC-MS

system composition	model number
Pump system	Shimadzu LC-20AD
Autosampler	Shimadzu SIL-20A HT autosampler
Column	XTerra MS-C18 (5 µm, 2.0 mm × 50 mm)
Mass spectrometry	Shimadzu LC-2010EV

融解したマウス血漿に、内標準物質として 50 µg/mL ケトコナゾールを含む 4 倍量のメ タノールを加え 3 分間ボルテックス処理を施した。4°C、9700×g で 10 分間遠心後、上清を 用いてサンプル中のジビリダモール濃度を測定した。移動相の流速は 0.2 mL/min とし、移 動相 A に 0.1% ギ酸、移動相 B に 0.1%ギ酸含有アセトニトリルを用いて Table 6 に示した グラジエント条件でサンプルを分析した (分析時間 14分)。ジビリダモール及びケトコナゾ ールのピークはそれぞれ m/z 505.15、531.50 で検出した。

Table 6. Gradient method for LC-MS analysis

Time (min)	0	0.5	5	9.5	10.5	14
%B (%)	20	20	95	95	20	20

第三節 結果

1. パドル法溶出試験

フルコナゾール 200 mg 及びジピリダモール 50 mg のパドル法溶出試験の結果を Figure 4 に示した。フルコナゾールは SGF_{pH2.0}、SGF_{pH6.0}、SIF_{pH6.5} いずれの試験液中においても 速やか且つ完全な溶解を示した (Figure 4a)。一方、ジピリダモールは SGF_{pH2.0} 中では速や かに全量溶解したのに対し、SGF_{pH6.0}、SIF_{pH6.5} 中では試験開始 180 分後においても 10% 未満の溶出率であった (Figure 4b)。既報の通り pH 依存的な溶解プロファイルが確認され た[17]。



Figure 4. Drug % dissolved-time profiles of (a) a tablet of 200 mg fluconazole and (b) two tablets of 25 mg dipyridamole in USP apparatus II at different fluids. Each drug was dosed into 300 mL of SGF_{pH2.0}, SGF_{pH6.0}, or SIF_{pH6.5}. Closed, open, and gray circles represent the dissolution profiles in SGF_{pH2.0}, SGF_{pH6.0}, and SIF_{pH6.5}, respectively. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[15]より引用

2. GIS 溶出試験

フルコナゾール 200 mg の GIS 溶出試験の結果を Figure 5 に示した。GIS_{stomach}の試験 液として SGF_{pH2.0} あるいは SGF_{pH6.0} どちらを用いた場合においても、各チャンバーにおい て類似する溶出プロファイルを示した。Figure 5 には式(6)、式(7)で計算した理論曲線も併 せて示した。実測の薬物濃度と比較すると、SGF_{pH2.0}、SGF_{pH6.0} 両条件ともに、GIS_{duodenum} においては試験開始 8 分後程度までは理論曲線を実測値が上回っており、析出は生じずに GIS_{stomach} からの未溶解薬物が流入している可能性が示唆された(Figure 5b)。一方、 GIS_{jejunum} では理論曲線と実測薬物濃度曲線はほぼ重なる推移を示した(Figure 5c)。その ため、フルコナゾールは GIS_{jejunum} において析出を生じていないことが示唆された。



Figure 5. Drug concentration-time profiles of fluconazole in the (a) gastric, (b) duodenal, and (c) jejunal chamber at different gastric conditions in GIS. Closed and open circles represent a condition with gastric pH 2.0 and 6.0, respectively. Black and gray lines indicate the theoretical concentration curves at a condition with gastric pH 2.0 and 6.0, respectively. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[15]より引用

ジピリダモール 50 mg の GIS 溶出試験の結果を Figure 6 に示した。GIS_{stomach}の試験液 に SGF_{pH6.0}を用いた場合、SGF_{pH2.0}の場合に比べて全てのチャンバーで溶解薬物濃度が大 きく低下した。SGF_{pH2.0}を用いた際、最大溶解薬物濃度は GIS_{stomach} で 234 ± 27 µg/mL、 GIS_{duodenum} で 125 ± 13 µg/mL、GIS_{jejunum} で 56 ± 4 µg/mL であった。SIF_{pH6.5} 中でのジピ リダモールの平衡溶解度は 8.1 ± 0.4 µg/mL であったことから、GIS_{duodenum}、GIS_{jejunum} ではそれぞれ平衡溶解度の 15 倍、7 倍の薬物濃度が確認され、過飽和状態にある事が示唆 された。一方、制酸剤併用化を模倣した SGF_{pH6.0} を GIS_{stomach}の試験液とした場合には、 GIS_{duodenum}、GIS_{jejunum} における溶解薬物濃度は平衡溶解度に近い値 (~10 µg/mL)であった。

析出を考慮しない理論曲線と実測の溶解薬物濃度を比較すると、SGF_{pH2.0} を胃液とした 条件下において GIS_{duodenum}、GIS_{jejunum} では実測の溶解薬物濃度が理論曲線を大きく下回っ ており、両チャンバーで析出が生じている事が示された (Figure 6b and 6c)。一方、SGF_{pH6.0} を用いた場合の理論曲線は実測値とほとんど重なる推移を示し、中性 pH 条件下での低溶解 性を反映した溶出プロファイルが認められた。



Figure 6. Drug concentration-time profiles of dipyridamole in the (a) gastric, (b) duodenal, and (c) jejunal chambers at different gastric conditions in GIS. Closed and open circles represent a condition with gastric pH 2.0 and 6.0, respectively. Black and gray lines indicate the theoretical concentration curves at a condition with gastric pH 2.0 and 6.0, respectively. Dotted lines represent the saturated concentration at pH 6.5. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[15]より引用

3. IVIVC 評価

パドル溶出試験及び GIS 溶出試験で得た結果からそれぞれ式(8)と式(9)に従って制酸剤 併用模倣条件における溶出低下率を算出し、臨床で認められた制酸剤との相互作用試験の 薬物動態学的パラメーター低下率と比較した(Table 7)。フルコナゾールの血中動態に対す る制酸剤の影響はパドル溶出試験、GIS 溶出試験どちらでも良好に予測できた。一方、ジ ピリダモールの制酸剤併用下の Cmax、AUC 低下率はパドル溶出試験では過剰に予測された のに対し、GIS 溶出試験からの推定値は特に Cmax 低下率と一致する結果となった。GIS 溶 出試験は消化管上部を模倣しているため、主に初期の経口吸収速度を反映する Cmax の低下 率は良好に捉えられているのに対して、消化管下部での再溶解などが加味されたパラメー ターである AUC の低下率の予測精度は不十分であったと考えられた。

	<i>in vitr</i> o reduction		<i>in vivo</i> reduc	tion ratio caused by	
Compound	ratio		acid-re	acid-reducing agents	
	USP II	GIS	C _{max}	AUC	
Fluconazole (200 mg)	0	0.11	Οα	Qα	
Dipyridamole (50 mg)	0.93	0.78	0.79^{6}	0.37^{6}	

Table 7. Comparison of in vitro dissolution results with clinical data

α: Blum et al. [10]

^B: Russell et al. [9]

文献[15]より改変引用

4. in situ マウス腸管インフュージョン試験

ジピリダモールの飽和溶液、あるいは GIS 溶出試験で得た異なる過飽和濃度を示す懸濁 液をマウス腸管にインフュージョンし、一定時間後に取得した血漿中のジピリダモール濃 度を測定した。血漿中薬物濃度を縦軸に、インフュージョン溶液中の溶解薬物濃度・時間曲 線下面積を横軸にとり双方の相関性の有無を検討したところ、Figure 7 に示した通りマウ ス消化管を透過した血中薬物濃度と消化管に注入した薬物濃度・時間曲線下面積には高い正 の相関が得られた (R²=0.786)。従って、GIS 溶出試験で認められた過飽和現象はジピリダ モールの消化管吸収を促し、その程度は溶解薬物濃度に比例する事が明らかとなった。



Figure 7. Correlation between mice plasma concentration of dipyridamole and area under the dissolved drug concentration-time curve of infusion fluid. Each data point represents mean \pm SD (n = 4-7).

第四節 考察

ジピリダモールに代表される難水溶性弱塩基性医薬品は、胃内の酸性度により BA が左右 されること広く知られている。胃酸分泌が低下している高齢者や制酸剤を服用するヒトに おいては BA が低下し、結果として薬剤の治療効果が減弱する[18]。この薬物間相互作用は 消化管内における溶出挙動の差異に起因しているため、pH の異なる試験液を用いたパドル 法溶出試験でもある程度推定できる。しかし、生体内で薬物が吸収される部位は主に小腸 であるため、経口吸収予測に当たっては胃内における溶解度ではなく幽門通過後の十二指 腸及び空腸において示す過飽和の程度及び維持時間の推定がより重要な情報となる。実際、 酸性環境下で高い溶解性を示すものの消化管内で速やかに析出して過飽和を示さない医薬 品などもあり、定型的な溶出試験からの予測は困難であった[19]。

本章では、BCS class I 医薬品であるフルコナゾールと BCS class IIb 医薬品のジピリ ダモールの溶出挙動をヒトの絶食下における胃排出過程を模倣した溶出試験器、GIS を用 いて評価し、BCS class IIb に特異的な過飽和・析出挙動の検出と制酸剤併用が被験薬物の 薬物動態に及ぼす影響の予測を試みた。フルコナゾール 200 mg は高い平衡溶解度とパドル 法溶出試験結果からも予想された通り、GIS 溶出試験において胃模倣液の pH に依らず類似 する溶出挙動を示した。一方、ジピリダモール 50 mg を GIS 溶出試験評価した際、 GISduodenum 及び GISjejunum においてジピリダモール平衡溶解度のそれぞれ 15 倍、7 倍の最 大溶解濃度が認められ、また過飽和も試験終了時まで維持されていた。これらの結果は、 ヒトの十二指腸内において平衡溶解度を超える過飽和を観測した既報と合致している[8]。 さらに、ヒト十二指腸で認められる析出を検出できていたことに加え、過飽和現象に起因 する制酸剤併用時の曝露低下率も良好に予測可能であった。また、GIS 溶出試験で認めら れたジピリダモールの過飽和の程度に応じて消化管吸収が向上することをマウス腸管イン フュージョン試験で示した。以上の結果から、GIS 溶出試験が難水溶性医薬品の過飽和・ 析出挙動の観察と制酸剤併用時の曝露変動予測に有用である事が示された。

GIS 溶出試験に類似する multi-compartment 溶出試験器として TNO Gastrointestinal Tract Model (TIM)が知られている。TIM は消化管液量や pH、酵素分泌、蠕動運動などよ り多くの生理学的要素をコンピュータープログラムで動的に制御した溶出試験器で、ヒト 消化管生理の模倣という点では卓越した試験系と言える[20, 21]。しかし TIM は同時にそ の煩雑さ故に、試験液の調製やセットアップに膨大な時間を要しスループット性は極めて

悪い。その点、GIS 溶出試験は定型の溶出試験に近い準備時間で実施できるため、例えば 創薬初期段階における難水溶性化合物プロファイリング用途での有用性は非常に高い。ま た、胃内 pH 変動に伴う薬物間相互作用予測や過飽和と析出挙動に影響を与える添加剤の 選定など、創薬後期段階や製剤開発段階においても有用性が期待できる。

第二章 人工胆汁酸を用いた GIS 溶出試験系の改良

第一節 序論

第一章で論じた通り、GIS 溶出試験は難水溶性弱塩基性医薬品の過飽和析出挙動評価に 有用である可能性が示唆された。しかし、既存の実験系では消化管模倣液として pH6.5 の 単純リン酸緩衝液 (SIF_{pH6.5})を用いており、ヒト消化管内の完全な模倣には至っていない。 ヒトの消化管内では胆嚢から胆汁酸が十二指腸に向けて分泌されており、脂溶性の高い化 合物は胆汁酸が形成するミセルに取り込まれる可溶化効果により溶解度が飛躍的に向上す る[22]。Galia らはヒト消化管液の組成を分析し、これを模倣するためにリン酸緩衝液に胆 汁酸とリン脂質を加えた人工腸液 (fasted state-simulated intestinal fluid, FaSSIF)を提 唱した[23]。この FaSSIF はヒト空腹時の腸液の組成を模倣しており、FaSSIF を用いた溶 出試験は特に水への濡れ性が悪い化合物や著しい難水溶性化合物のヒト経ロ吸収率の予測 精度が格段に向上する事が報告されている[24]。今後、GIS 溶出試験の幅広い有用性を評価 し、近年増加している超難水溶性医薬品の経口吸収予測精度向上を目指すにあたっては FaSSIF を用いた GIS 溶出試験系の構築は必要不可欠と言える。

そこで本章では、GIS 溶出試験に FaSSIF を適用する事を目的として、GISduodenum 及び GISjejunum において生理学的な pH と胆汁酸濃度を維持可能な試験条件の最適化を行った。

第二節 実験方法

1. 人工腸液の調製

FaSSIFの調製には simulated intestinal fluid (SIF) powder (Biorelevant.com, Croydon, Surrey, UK)を用いた。また、十二指腸分泌液として2倍、4倍濃縮したFaSSIF (2×FaSSIF, 4×FaSSIF)を調製し実験に使用した。各試験液の組成はTable 8 に示した。

······································			
composition	FaSSIF	2×FaSSIF	4×FaSSIF
sodium taurocholate (mM)	3	6	12
lecithin (mM)	0.75	1.5	3
KCl (mM)	103.4	206.8	413.6
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (mM)	28.7	57.4	114.8
pН	6.5	6.5	6.5

Table 8. Media composition for GIS dissolution study

2. GIS 溶出試験

リン酸緩衝液 (SIF_{pH6.5})を GIS_{duodenum} 試験液とした GIS 溶出試験は第一章に記載した方 法に準じて実施した。FaSSIF を GIS_{duodenum} の試験液とした場合には、2×FaSSIF あるい は 4×FaSSIF を十二指腸分泌液として用いた。全ての試験は pH レベルの経時的推移を確 認する目的で医薬品を用いずにポンプ及びパドルを稼働した。胆汁酸濃度・時間推移は送液 元チャンバー中の濃度と送液速度から理論値として算出した。 第三節 結果

1. pH 推移の確認

GIS 溶出試験実施時の GIS_{duodenum} 及び GIS_{jejunum} における pH レベルの経時的な変化を モニターした (Figure 8)。GIS_{duodenum} 及び GIS_{jejunum} では GIS_{stomach} からの胃模倣液の流入 により pH が一時的に低下する。SIF_{pH6.5}を GIS_{duodenum} の試験液とした場合は pH の過度 な低下を防ぐ目的で 100 mM リン酸緩衝液 (2×SIF_{pH6.5})を十二指腸分泌液として供給して いた。この実験条件下で GIS_{duodenum}、GIS_{jejunum} における pH はそれぞれ 5.9~6.5、6.3~6.5 の間を推移していた。一方、GIS_{duodenum}の試験液に FaSSIF、十二指腸分泌液に 2×FaSSIF を用いた場合、FaSSIF の弱い緩衝能 (28.7 mM リン酸)の影響で GIS_{duodenum} の pH は一時 的に 3.1 まで低下した。そこで十二指腸分泌液として 4×FaSSIF を用いて pH レベルを確 認したところ、その推移は単純リン酸緩衝液を用いた実験条件と類似するプロファイルが 得られた。



Figure 8. pH-time profiles in the (a) duodenal and the (b) jejunal chambers with different buffer conditions in GIS. White circles represent the condition with 50 mM phosphate buffer (SIF_{pH6.5}) as an initial duodenal fluid and 100 mM phosphate buffer ($2\times$ SIF_{pH6.5}) as a duodenal secretion fluid. Gray circles indicate the condition with FaSSIF and $2\times$ FaSSIF as a duodenal fluid and a duodenal secretion fluid, respectively. Black circles represent the condition with FaSSIF as a duodenal fluid and $4\times$ FaSSIF as a duodenal secretion fluid. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[25]より引用

2. 胆汁酸濃度推移の算出

送液元チャンバー中の濃度と送液速度を元にタウロコール酸ナトリウム (sodium taurocholate, NaTC)の理論濃度推移を算出した。胃模倣液は NaTC を含有していないため、 pH と同様、一時的に GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} における NaTC 濃度は低下する。Figure 9 に示した通り、十二指腸分泌液に 2×FaSSIF を用いた場合、GIS_{duodenum} における NaTC 濃 度は試験開始 45 分後にも十分な回復を示さなかった。一方、4×FaSSIF を用いる事で試験 開始 45 分後の GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} における NaTC 濃度はそれぞれ 3.2、1.4 mM まで 回復した。



Figure 9. Simulated sodium taurocholate (NaTC) concentration-time profiles in the (a) duodenal and the (b) jejunal chambers of GIS (b). Gray line represents the condition with FaSSIF as a duodenal fluid and 2×FaSSIF as a duodenal secretion fluid. Black line indicates the condition with FaSSIF as a duodenal fluid and 4×FaSSIF as a duodenal secretion fluid.

文献[25]より引用

第四節 考察

ヒトの腸液中の pH レベル、胆汁酸及び脂質濃度については古くから盛んに研究されてきた。Bergström らのメタ解析によると、十二指腸液の pH は 5.6~7.0 (中央値 6.3)、胆汁酸 濃度は 2.5~5.9 mM (中央値 3.25 mM)程度で、空腸液の pH は 6.5~7.8 (中央値 6.9)、胆汁 酸濃度は 1.4~5.5 mM (中央値 2.52 mM)程度である[26]。in vitro の溶出試験で人工腸液を 用いる場合には、この組成を再現しうる系で評価を行うことが望まれる。

本章では、GIS 溶出試験に人工腸液を用いるために pH と胆汁酸濃度を指標に試験条件の 最適化を行った。その結果、生理学的な pH 及び胆汁酸濃度を維持するためには、十二指腸 分泌液に 4 倍濃縮した FaSSIF を用いる必要があることを明らかとした。設定した試験条 件での GISduodenum における pH は 5.8~6.5、胆汁酸濃度は 0.7~3.2 mM、GIS_{jej}unum</sub> におけ る pH は 6.2~6.5、胆汁酸濃度は 1.1~3.0 mM となり、生理学的な範囲内での推移を示した。 以上の結果から、試験液に FaSSIF を用いる事でより in vivo を反映した GIS 溶出試験の実 験条件が構築できた。本試験系は、単純なリン酸緩衝液では評価が困難とされる超難水溶 性化合物や濡れ性が低い化合物への評価に応用でき、GIS 溶出試験の汎用性を格段に高め ることができると考えられた。

第三章 GIS 溶出試験による製剤間の体内薬物挙動差の検出

第一節 序論

iPD methodology に期待される事として、創薬初期段階における医薬品候補化合物の初 期物性評価に加え、前臨床・開発段階における製剤検討評価の一環としての in vivo 予測性 が挙げられる。特に医薬品開発段階においては、複数の臨床プログラムが同時並行で進行 し、それらを遅延なく遂行することで医薬品の早期上市及び価値最大化が達成される。し かし、目標とする血中曝露や血中動態プロファイルが得られなければ、数ヶ月から数年に 及ぶ製剤化検討期間が設けられ、開発遅延が余儀なくされる。特に近年、難水溶性の候補 化合物が増加した事に伴い、ナノ化、可溶化、非晶質、塩や共結晶などによる曝露向上を 志向した製剤開発が盛んに実施されている[27]。これら製剤は定型の溶出試験ではそのポテ ンシャルが評価できず、non-sink 条件での溶出試験や吸収相を有する溶出試験、あるいは multi-compartment 溶出試験による評価が提唱されており、製剤化検討における iPD methodology に対する期待は大きい[6]。こういった開発段階における = – ズを踏まえ、GIS 溶出試験はその特性から難水溶性弱塩基性医薬品の製剤検討における in vivo 予測にも有用 であると期待される。

本章では、イトラコナゾールを題材として製剤検討段階における GIS 溶出試験の有用性 を評価した。イトラコナゾールは BCS class II に分類される難水溶性弱塩基性医薬品で、 著しく低い濡れ性と溶解性が原因となり結晶型ではほとんど経口吸収されない[28, 29]。そ のため、非晶質を含有するカプセル剤とヒドロキシプロピル-B-シクロデキストリン (HP-6-CD)で可溶化した内用液剤の2製剤が上市され臨床現場で用いられている[30, 31]。 この2製剤は血中濃度プロファイルが異なるため、GIS 溶出試験の in vivo 予測性を検討す るにあたっては格好の被験薬と言える。イトラコナゾール2製剤をパドル法溶出試験及び GIS 溶出試験で評価し、2種類の製剤間の体内挙動を予測可能か検証した。各溶出試験では 単純リン酸緩衝液に加え、人工腸液を用いた系でも評価を行い、試験液の重要性について も議論した。また、異なる製剤技術で達成された溶解状態が膜透過性に与える影響をヒト 結腸癌由来細胞 (human colonic carcinoma cell line, Caco-2)を用いた経細胞輸送試験で確 認した。

27

第二節 実験方法

1. 実験材料

イトラコナゾールの構造式及び物理化学的特性は Table 9 に示した。イトラコナゾール 100 mg カプセル (Sporanox[®] 100 mg capsule)、イトラコナゾール 10 mg/mL 内用液 (Sporanox[®] 10 mg/mL oral solution)は Janssen Pharmaceutical USA (Raritan, NJ, USA) から入手した。

test drug	Itraconazole
chemical structure	
$\log P$	5.66^{lpha}
p <i>Ka</i>	3.7^{lpha}
aqueous solubility (mg/mL)	<0.0001°
oral bioavailability (%)	<16
α: Stevens et al. [29]	

Table 9. Chemical structure and physicochemical property of itraconazole

^B:Hostetler et al. [28]

2. パドル法溶出試験

第一章に記載した方法に準じてイトラコナゾール 100 mg カプセル及びイトラコナゾー ル 10 mg/mL 内用液 10 mL (100 mg)の溶出性をパドル法で評価した。試験液には 300 mL の SIF_{pH6.5} 及び FaSSIF を用いた。イトラコナゾール 100 mg を溶出試験器に投下し、所定 時間経過後に試験液を採取し、60 秒間 9000×g で遠心後、上清を等量のメタノールと混合 し、HPLC 法にて溶解薬物濃度を測定した。

3. GIS 溶出試験

GIS 溶出試験の概略は第一章に記載した。小腸模倣液には SIF_{pH6.5} あるいは FaSSIF を 用いてイトラコナゾール 100 mg カプセルと 10 mg/mL 内用液 10 mL (100 mg)の溶出挙動 を評価した。FaSSIF を用いる場合は、第二章で検討した方法に準じて GIS_{duodenum}、十二 指腸分泌液にそれぞれ FaSSIF、4×FaSSIF を用いた。イトラコナゾール内用液 100 mg (10 mL)の評価時には GIS_{stomach}の試験液に 50 mL の SGF_{pH6.5} に超純水 240 mL を加えて、内 用液 10 mL を含めた合計液量が 300 mL となるように設定した。チャンバー間の送液ポン プ及び分泌液は試験開始 45 分後に停止したが、析出挙動を追跡するためにパドルによる撹 拌とサンプリングは 180 分後まで実施した。所定時間後に試験液を採取し、60 秒間 9000×g で遠心後、上清を等量のメタノールと混合し、HPLC 法にて溶解薬物濃度を測定した。

4. IVIVC 評価

パドル法溶出試験及び GIS 溶出試験で得られたカプセルと内用液の溶出挙動と臨床薬物 動態プロファイルを比較する事で、各溶出試験の in vivo 予測性を評価した。溶解薬物濃度 -時間推移と各時点におけるチャンバー内水量から溶解薬物量-時間曲線を算出し、曲線下面 積 (area under the dissolved drug amount-time curve, AUDC)を求めた。そして 2 製剤の 製剤ポテンシャル差を AUDC ratio として以下の式(10)、(11)で算出した。

$$AUDC \text{ ratio in } USP = \frac{AUDC_{\text{oral solution in USP apparatus II}}{AUDC_{\text{capsule in USP apparatus II}}$$
(10)

$$AUDC \text{ ratio in } GIS = \frac{AUDC_{\text{oral solution in } GIS}}{AUDC_{\text{capsule in } GIS}}$$
(11)

AUDC_{capsule} in USP apparatus II、AUDC_{oral solution} in USP apparatus II はそれぞれイト ラコナゾールカプセル、内用液のパドル法溶出試験実施時の AUDC である。AUDC_{capsule} in GIS、AUDC_{oral solution} in GIS は GIS 溶出試験における AUDC である。AUDC in GIS の計 算時、胃からの吸収は無視し、ともに高膜透過性であるために溶解した薬物が即時吸収さ れるという仮定に基づき GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} で溶解している薬物量の合計量として算 出した。

溶出試験から算出した AUDC ratio は、臨床で認められた2製剤間の AUC 比率と比較した。イトラコナゾールカプセル及び内用液の薬物動態学的パラメーターは下の Table 10 に示した。

formulation	C _{max} [ng/mL]	T _{max} [hr]	t _{1/2} [hr]	AUC [ng×hr/mL]
$capsule^{\alpha}$	53.2 ± 24.5	3.6 ± 0.9	32.8 ± 7.8	1326 ± 573^{6}
oral solution $^{\rm y}$	309.9 ± 43.8	1.8 ± 0.4	24.1 ± 9.6	$2843 \pm 703^{\Delta}$

Table 10. Pharmacokinetic parameters of itraconazole two dosage forms in healthy subjects after an administration of single dose (100 mg) in fasted state

a: Oguchi et al. [31]

6: AUC(0-23hr)

y: Tei et al. [30]

 Δ : AUC(0- ∞)

文献[25]より引用

5. Caco-2 単層細胞膜透過試験用イトラコナゾール懸濁液の調製

イトラコナゾール原薬の飽和懸濁液は 100 mg のイトラコナゾール原薬を 300 mL の FaSSIF に加え撹拌しながら一晩溶解させて調製した。

各種製剤を用いたイトラコナゾール懸濁液は GIS 溶出試験で調製した。イトラコナゾール 100 mg カプセルあるいは 10 mg/mL 内用液 10 mL (100 mg)を用いて GIS 溶出試験 (FaSSIF 条件)を実施し、カプセルの場合は 60 分後、内用液の場合は 5 分後に GIS_{jejunum} からイトラコナゾール懸濁液を採取し Caco-2 単層細胞膜透過試験に供した。各々の採取時間は各製剤が GIS_{jejunum} で最大薬物濃度を示す時点を元に設定した。

6. Caco-2 単層細胞膜透過試験

Caco-2 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)から入手し、温度 37°C、5% CO₂ 条件下で 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)中で培養した。

継代数 39~43 回の Caco-2 細胞を 12 穴コラーゲンコート PTFE メンブレンインサート (Corning Inc., Corning, NY, USA)に播種にし、2 日あるいは 3 日おきに apical 側と basolateral 側両方の培地を交換しながら 21~23 日間培養した。膜透過試験実施前日に Millicell-ERS epithelial Voltohmmeter (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)を用 いて膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance, TEER)を測定し、TEER 値が 200 Ω×cm²以上の細胞のみを実験に用いた。

膜透過試験当日、apical 側培地を FaSSIFに、basolateral 側培地を 1% BSA 含有 transport buffer (5 mM HEPES, 5 mM D-glucose, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 145 mM NaCl, 1 mM NaH₂PO₄, 3 mM KCl, pH 7.4)に交換し、30 分間プレインキュベーションした後に試 験に使用した。apical 側に先述の方法で調製したイトラコナゾール懸濁液 0.5 mL を、 basolateral 側に新しい 1% BSA 含有 transport buffer 1.5 mL を加え膜透過性試験を開始 した。12 穴プレートは 37°C、オービタルシェーカー上で 50 rpm で振とうしながら細胞膜 を透過した薬物量を定量した。試験開始 30、60、90、120 分後、basolateral 側から 0.1 mL1 サンプルを採取し、採取量と等量の 1% BSA 含有 transport buffer をウェルに加え液量を 維持した。apical 側からは試験開始前 (0 分後)と終了時 (120 分後)にサンプルを採取した。 basolateral 側サンプルには 2 倍量のメタノールを加えて 3 分間 9000×g で遠心分離して蛋 白質を除去した後、上清を HPLC 分析に供した。apical 側サンプルは不溶物を遠心分離後 (1 分間、9000×g)、上清を等量のメタノールと混合してイトラコナゾール濃度を HPLC 法に て測定した。

各イトラコナゾール懸濁液からの膜透過係数 (apparent permeability coefficient, Papp) は 90~120 分にかけての細胞膜透過量を元に以下の式(12)に従って算出した。

$$P_{app} = \frac{X_{120min,BL} - X_{90min,BL}}{S \times C_{120min,AP}} \times \frac{1}{T}$$
(12)

X_{90min,BL}及び X_{120min,BL}は 90、120 分後に basolateral 側に透過した薬物量、S はインサートの表面積 (1.12 cm²)、C_{120min,AP}は 120 分後の apical 側のイトラコナゾールの溶解濃度、 T は 90 分後から 120 分後の間のインキュベーション時間 (1800 秒)である。

7. Caco-2 単層細胞膜機能の確認

膜透過試験に用いた単細胞膜の頑健性は TEER 値及び Lucifer yellow の膜透過係数で評価 した。TEER 値を膜透過試験開始前 (0分)及び終了時点 (120分)で測定し、その値を比較 した。Lucifer yellow の膜透過性試験はイトラコナゾール懸濁液の膜透過試験終了後に実施 した。apical 側及び basolateral 側培養液を除去し、apical 側には 30 mgmL Lucifier yellow 含有 transport buffer (pH 6.8)を、basolateral 側には transport buffer (pH 7.4)を加え、オ
ービタルシェーカー上で 50 rpm で振とうした。60 分後、basolateral 側から試験液を採取 し、Lucifier yellow の蛍光強度を Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA)にて測定した。 Lucifer yellow の膜透過係数 (P_{app})は以下の式(13)に従って算出した。

$$P_{app} = \frac{V}{S \times C_{0,AP}} \times \frac{C_{T,BL}}{T}$$
(13)

Vは basolateral 側の培養液量 (1.5 mL)、C_{0,AP}は Lucifer yellow の apical 側添加濃度 (30 mg/mL)、T はインキュベーション時間 (3600 秒)、C_{T,BL}は T 時間後の basolateral 側 Lucifer yellow 濃度である。この式で求めた Lucifer yellow の P_{app} が 1×10⁻⁶ cm/sec 未満の場合に 細胞膜の頑健性が担保されていると判断した[32]。

8. HPLC 分析

イトラコナゾールの溶解薬物濃度は第一章に記載した構成の Waters HPLC システム及 び移動相で測定した。グラジエント条件は Table 11 に示した(分析時間 12分)。イトラコ ナゾールのピークは吸収波長 263 nm で検出し定量した。

Table 11. Gradient method for HPLC analysis

Time (min)	0	0.1	4	4.1	7	7.1	10
%B (%)	20	20	50	95	95	20	20

第三節 結果

1. パドル法溶出試験

イトラコナゾールカプセル及び内用液 (100 mg)のパドル法溶出試験の結果を Figure 10 に示した。SIF_{pH6.5}中において、カプセル剤は試験開始 90 分程度で 1 µg/mL に達し、以降 その溶解濃度を維持したのに対し、内用液は試験液に添加した直後に白濁し、溶解薬物濃 度は 50 µg/mL まで低下しその後 180 分後まで同濃度を維持していた (Figure 10a)。 FaSSIF 中におけるイトラコナゾールカプセルの溶解濃度は 9.5 ± 0.4 µg/mL まで達し、 SIF_{pH6.5}における溶解度の 10 倍程度の値を示したことから、胆汁酸による強い可溶化効果 が確認された。一方、内用液は添加直後の濃度は 106.5 ± 4.9 µg/mL で、その後徐々に低下 し 180 分後の濃度は 57.6 ± 8.5 µg/mL 程度であった (Figure 10b)。



Figure 10. Dissolved drug concentration-time profiles of itraconazole in USP apparatus II with (a) 50 mM phosphate buffer (SIF_{pH6.5})or (b) FaSSIF. A itraconazole (SPORANOX®) 100 mg capsule (black circles) and 10 mL of itraconazole (SPORANOX®) 10 mg/mL oral solution (white circles) were dosed into 300 mL of either SIF_{pH6.5} or FaSSIF and dissolved drug concentration was determined up to 180 min. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[25]より引用

2. GIS 溶出試験

リン酸緩衝液 (SIF_{pH6.5})を用いてイトラコナゾールカプセル及び内用液のGIS 溶出試験 を実施した。各チャンバーで観察された溶解薬物濃度・時間推移の結果を Figure 11 に示し た。カプセル剤は GIS_{stomach} で最大 32.9 ± 3.5 µg/mL 程度の溶解度を示したが、GIS_{duodenum} 及びGIS_{jejunum}で認められた最大溶解薬物濃度はそれぞれ 2.0±0.6 μg/mL、0.7±0.1 μg/mL 程度であった。パドル法で認められた溶解度 (1 µg/mL, Figure 10a)と比較しても大幅な増 加は認められず、GIS_{stomach}からの送液によって生じる過飽和は軽微であった。内用液は GIS_{stomach}に添加直後に 199.9±8.7 μg/mL 程度の溶解薬物濃度を示し、44 分後には胃分泌 液による希釈の影響で 138.0 ± 12.7 µg/mL まで低下した。GIS_{duodenum} 及び GIS_{jeunum} の最 大溶解薬物濃度はそれぞれ 50.4 ± 4.3 µg/mL、31.2 ± 1.4 µg/mL であった。しかし、両チャ ンバーにおける薬物濃度は180分間の溶出試験時間内に徐々に低下し、最終的な溶解薬物 濃度は GIS_{duodenum} で 5.0 ± 0.5 μg/mL、GIS_{jeunum} で 2.8 ± 0.3 μg/mL となった。内用液のパ ドル法溶出試験と比較すると、最大溶解薬物濃度は同程度であったが、GIS 溶出試験で認 められたような溶解度の低下はパドル法溶出試験では生じなかった(Figure 10a)。パドル法 溶出試験では内用液を投下直後に白濁し、HP-8-CD によって可溶化された薬物のみが溶解 状態として安定的に存在する。一方、GIS 溶出試験では見かけ上の薬物濃度はパドル法溶 出試験時と変わらないものの、GIS_{stomach}から流入してくる溶解状態の単分子薬物が中性 pH 環境下で一時的に過飽和状態となり、その結果核形成と結晶成長が促されて析出が生じ、 溶解薬物濃度の低下が認められたものと考えられた。



Figure 11. Drug concentration-time profiles of itraconazole capsule and oral solution in the (a) gastric, (b) duodenal, and (c) jejunal chambers in GIS with 50 mM phosphate buffer (SIF_{pH6.5}). Black and white circles represent dissolution profiles of itraconazole capsule and oral solution, respectively. Each data point represents mean \pm SD (n = 3). 文献[25] \downarrow 9 引用

イトラコナゾールカプセル及び内用液の溶出プロファイルを FaSSIF を試験液とした GIS 溶出試験で確認した (Figure 12)。カプセル剤は GIS_{duodenum} 及び GIS_{jejunum} において SIF_{pH6.5}を試験液に用いた時に較べてそれぞれ 11 倍 (14.3 ± 0.3 µg/mL)、7 倍 (7.6 ± 0.7 µg/mL)の最大溶解薬物濃度を試験開始 60 分後に示した。内用液は GIS_{duodenum}、GIS_{jejunum} 内でそれぞれ 2 分後、5 分後に最大溶解濃度 (54.3 ± 7.2 µg/mL、40.6 ± 6.2 µg/mL)に到達 した。しかし、この溶解濃度は 60 分後あたりから急激に低下し、試験終了時点における溶 解薬物濃度は各チャンバーでそれぞれ 3.6 ± 0.4 µg/mL、3.7 ± 0.5 µg/mL となった。



Figure 12. Drug concentration-time profiles of itraconazole capsule and oral solution in the (a) gastric, (b) duodenal, and (c) jejunal chambers in GIS with FaSSIF. Black and white circles represent dissolution profiles of itraconazole capsule and oral solution, respectively. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[25]より引用

イトラコナゾール両製剤の溶解薬物濃度・時間プロファイルから溶解薬物量・時間プロフ ァイルを算出し、GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} で溶解している薬物量の総量を Figure 13 に示し た。SIF_{pH6.5}を試験液とした場合、イトラコナゾールカプセルの最大溶解量は 0.4 ± 0.02 mg (38 分後)、内用液は 12.6 ± 1.0 mg (41 分後)となった。その後、内用液の溶解度は徐々に低 下し、180 分後には 1.3 ± 0.1 mg となった (Figure 13a)。FaSSIF を試験液とした際、カ プセルの最大溶解量は 3.6 ± 0.3 mg となり、胆汁酸の可溶化効果により劇的に増加した。 そしてその溶解量は 3.6 ± 0.3 mg となり、胆汁酸の可溶化効果により劇的に増加した。 そしてその溶解量は 180 分後までおおよそ維持されていた。一方内用液の最大溶解量 (12.8 ± 1.6 mg)は SIF_{pH6.5}を用いた場合とほとんど同程度であった (Figure 13b)。興味深い事に、 SIF_{pH6.5} と FaSSIF での内用液の析出挙動を比較すると FaSSIF 中では溶解量の低下が SIF_{pH6.5} 中より速やかに生じていた。内用液に含有される HP-6-CD は胆汁酸と複合体を形 成することが知られている[33, 34]。従って、FaSSIF 中の NaTC が HP-6-CD の形成する ミセルにイトラコナゾールと入れ替わりで取り込まれる事で、イトラコナゾールが単分子 として溶液中に放出され、熱力学的に不安定な状況となって速やかに析出したものと考え られた。



Figure 13. Drug amount in solution-time profiles of itraconazole capsule and oral solution in the sum of duodenal and jejunal chambers in GIS with (a) 50 mM phosphate buffer (SIF_{pH6.5}) or (b) FaSSIF. Black and white circles represent dissolution profiles of itraconazole capsule and oral solution, respectively. Each data point represents mean \pm SD (n = 3).

文献[25]より引用

3. IVIVC 評価

パドル溶出試験及び GIS 溶出試験で得たイトラコナゾール 2 製剤の溶出プロファイルか らそれぞれ式(10)と式(11)に従って製剤間の溶出比を算出し、臨床薬物動態試験における AUC ratio と比較した (Table 12)。試験液を SIF_{pH6.5} としたパドル法溶出試験で AUDC ratio は 66.0、FaSSIF を用いた場合は 14.2 となり、臨床の AUC ratio (2.1)とは大きくか け離れた値となった。一方、GIS 溶出試験で得られた AUDC ratio は SIF_{pH6.5}を用いた場 合で 31.4、FaSSIF を用いた場合で 1.8 となり、大きく低下した。これは、パドル法溶出試 験では溶出が緩やかだったカプセル剤が GIS では GIS_{stomach}内の酸性環境に曝されること で速やかな溶出が認められた事と、内用液が GIS_{duodenum}及び GIS_{jejunum}中で徐々に析出を 示した事によるものと考えられた。臨床 AUC ratio に最も近い値が得られたのは FaSSIF を試験液とした GIS 溶出試験であった。

Table 12. The comparison of *in vitro* dissolutions with *in vivo* pharmacokinetics of itraconazole two dosage forms

<i>in vitro</i> device/clinical PK data		AUDC ratio, AUC ratio			
		(oral solution/capsule)			
	${ m SIF}_{ m pH6.5}$	66.0			
USP apparatus II	FaSSIF	14.2			
GIS	SIF _{pH6.5}	31.4			
	FaSSIF	1.8			
clinical data		2.1			
		文献[25]より引用			

4. Caco-2 单層細胞膜透過試験

各種イトラコナゾール製剤の GIS 溶出試験を実施し、GIS_{jejunum} で得られた懸濁液を Caco-2 細胞の apical 側に添加し、細胞膜を透過した薬物量を経時的に定量した。比較対象 として、イトラコナゾール原薬を FaSSIF に溶解させた懸濁液を調製し膜透過試験に供し た。

まず、Caco-2 単層細胞膜の頑健性を確認する目的で、試験前後の TEER 値、及び試験後の細胞を用いて Lucifer Yellowの膜透過係数を算出した。Table 13 に示した通り、TEER 値の顕著な低下は認められず、また細胞間隙透過マーカーである Lucifer yellow の P_{app} も基準値 (1×10⁻⁶ cm/sec)以下であった。以上の結果から、単層細胞膜機能は維持されていることが示された。

Table 13. Caco-2 cell monolayer integrity during transport study of itraconazole suspension, confirmed by TEER value and apparent permeability coefficient of Lucifer yellow (n=3-4, mean ± s.d.)

itraconazole	apical –	TEER [$\Omega imes m cm^2]$	Lucifer yellow Papp
suspension	suspension media	0 min	120 min	× 10 ⁻⁶ [cm/sec]
pure powder	FaSSIF	300 ± 34	279 ± 24	0.78 ± 0.11
capsule	GIS/FaSSIF	317 ± 14	285 ± 24	0.76 ± 0.11
oral solution	GIS/FaSSIF	311 ± 13	281 ± 26	0.66 ± 0.17
				文献[25]より引用

Caco-2 細胞膜を透過した薬物量の定量結果を Figure 14 に示した。イトラコナゾール原 薬から調製した懸濁液を apical 側に添加した際の膜透過薬物量は 120 分後まで定量下限 (0.03 µg)未満であった。一方、イトラコナゾールカプセル及び内用液から GIS 溶出試験で 調製した懸濁液を添加した際には膜透過薬物量の経時的な増加が認められた。

膜透過試験開始時と終了時でイトラコナゾール原薬、カプセルから調製した懸濁液中の 溶解薬物濃度 (apical 側濃度)に変化は認められなかったが、内用液から調製した懸濁液で は開始時には 41.5±2.2 µg/mL だった溶解薬物濃度が終了時には 22.9±0.8 µg/mL に低下 していた (Table 14)。試験終了時点の apical 側溶解薬物濃度を基準として式(12)に従って 各種製剤からのイトラコナゾールの膜透過係数を算出した。原薬からの膜透過薬物量は定 量下限以下であったため膜透過係数は算出出来なかった。一方、カプセル剤と内用液から の膜透過係数はそれぞれ 3.29±0.85×10⁻⁶ cm/sec、2.50±0.87×10⁻⁶ cm/sec となり両製剤 に有意な差は認められなかった。以上の結果から、両製剤に含有される添加剤がイトラコ ナゾールの膜透過係数に影響を与えている可能性は否定できないが、少なくとも 2 製剤間 では同程度の膜透過係数が維持されていた。



Figure 14. Cumulative amount of itraconazole in the basolateral side of Caco-2 cell monolayer after addition of itraconazole suspensions to the apical compartment; a suspension of itraconazole capsule in the jejunal chamber of GIS with FaSSIF (black circles), oral solution in the jejunal chamber of GIS with FaSSIF (white circles), and itraconazole pure powder in FaSSIF (gray circles), respectively. Each data point represents mean \pm SD (n = 3-4).

文献[25]より引用

Table 14. Dissolved concentration of itraconazole in the apical compartment before (0 min) and after (120 min) transport study, and apparent permeability coefficient of itraconazole (n=3-4, mean \pm s.d.)

itraconazole	apical	drug concentr	ration [µg/mL]	itraconazole P_{app}	
suspension media		0 min	120 min	\times 10 ⁻⁶ [cm/sec]	
pure powder	FaSSIF	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	N.C.ª	
capsule	GIS/FaSSIF	9.0 ± 0.4	8.9 ± 0.7	3.29 ± 0.85	
oral solution	GIS/FaSSIF	41.5 ± 2.2	22.9 ± 0.8	2.50 ± 0.87	

 α : Not Calculated

文献[25]より引用

第四節 考察

イトラコナゾールはその著しく低い濡れ性と難水溶性(<0.0001 mg/mL)のために、過去 に様々な製剤化技術研究がなされてきた。製剤化技術の適用によりヒトあるいは動物での 血中曝露が市販製剤や原薬に較べて著しく改善した例が報告されている[35, 36]が、反対に in vitro 溶出試験で顕著な溶出改善効果が認められたにも関わらず、in vivo で曝露改善に失 敗した例も多い[37-40]。これらの IVIVC に失敗した例では全て定型的な溶出試験器で製剤 ポテンシャルを評価しており、生体内での溶出挙動を模倣できていない事が原因の一つだ と推察される。本章では上市されているイトラコナゾール 2 製剤の溶出ポテンシャルを単 純リン酸緩衝液あるいは FaSSIF を試験液としたパドル法溶出試験及び GIS 溶出試験で評 価し、最も in vivo 予測性の優れた試験系を模索した。その結果、パドル法溶出試験ではイ トラコナゾール 2 製剤間の薬物動態挙動差を過剰に予測していたのに対し、FaSSIF を用い た GIS 溶出試験では適切に 2 製剤の薬物動態特性を捉えている事が示された。

FaSSIFを用いた GIS 溶出試験で2製剤の溶出比率が小さくなった原因は2つと考えら れた。一つ目はカプセルが GIS_{stomach}で速やかに溶解することで溶出曲線の立ち上がりが早 まったことと、もう一つは内用液が GIS_{duodenum} 及び GIS_{jejunum} で急激な溶解度低下を示し たことである。胆汁酸存在下で、薬物・シクロデキストリン複合体は胆汁酸・シクロデキスト リン複合体に一部置換され、フリー型薬物が遊離する事で析出が加速する。本研究ではタ ウロコール酸ナトリウムを単一の胆汁酸として含有する FaSSIF を用いてこの挙動を検出 した。しかし、生体では単一ではなく複数の分子が胆汁酸として存在しており、各胆汁酸 とシクロデキストリンとの親和性は分子毎に異なる事が知られている[34]。従って、FaSSIF の代わりにヒト小腸から吸引した腸液を用いても同様の結果が得られるか大変興味深い。

式(2)にあるように、経口吸収性は消化管内薬物濃度と膜透過係数の積で表わされる。従って in vitro 溶出試験から in vivo 薬物動態を推定する際には膜透過係数を考慮する必要がある。特に経口製剤に含まれる様々な添加剤は溶解濃度を向上させる反面、膜透過係数を低下させる事が知られている[41]。可溶化などにより見かけの溶解薬物量は増加した場合でも単分子として溶解している薬物量は変わらず、上皮細胞を透過できる薬物量も増加しない。膜透過係数は透過薬物量を見かけの薬物濃度で除する事で求められる(式(12))ため、可溶化された薬物が単分子型薬物と比較して多ければ多いほど膜透過係数が低下し、結果として溶出試験から予測されるほどの経口吸収性改善効果が発揮されないと考えられる。イ

トラコナゾール内用液は HP-8-CD を主成分とする可溶化製剤であるため、このような膜透 過係数の低下は十分起こりうることであった。そこで、GIS 溶出試験で得られた過飽和懸 濁液からの薬物吸収性を Caco-2 単層細胞膜透過試験で評価した結果、膜透過係数がカプセ ル剤と内用液で同程度であることを明らかとなった。この結果は即ち、イトラコナゾール2 製剤の場合には溶出試験の溶出率から曝露量を推定する IVIVC が妥当である事を意味して いる。以上から、GIS 溶出試験と Caco-2 細胞膜透過試験を組み合わせることにより、過飽 和の程度と持続時間、そして膜透過性を考慮した生体内の消化管に極めて近い環境での経 口吸収性の評価が可能となった。

第四章 GIS 溶出試験に基づいた生理学的経口吸収モデルの構築

第一節 序論

第一章や第三章での難水溶性弱塩基性医薬品の溶出評価で、GIS 溶出試験は過飽和析出 の観察、制酸剤併用に伴う薬物間相互作用の予測、そして製剤間差の溶出ポテンシャル評 価など、定性的な経口吸収予測に有用であることが示された。GIS 溶出試験を含む iPD methodology は消化管内での薬物挙動を捉える事を目的としており、究極的には時間推移 も加味した消化管吸収の定量的な予測の達成が期待される。しかし、消化管吸収過程は医 薬品の崩壊・溶出・析出のみならず、消化管下部への通過や消化管上皮細胞の膜透過、そ して初回通過代謝にも支配されている。これら全ての素過程が iPD methodology に加味さ れてはおらず、溶出試験のみからの経口吸収予測のハードルは依然として高い。実際、第 一章では GIS 溶出試験の活用によりジピリダモールの制酸剤併用時の Cmax 低下率を精度高 く予測できたが、AUC 低下率とは依然として乖離が生じていた。これは、消化管上部にお ける過飽和現象が Cmax には大きく寄与しているものの、速やかに吸収されるために消化管 内薬物濃度の上昇は一過性にとどまり、消化管下部において過飽和の程度はそれほど高く なく、結果として AUC の亢進が Cmax 上昇率よりも限定的だったものと考えられる。GIS 溶出試験はこういった現象を部分的には捉えているものの、膜透過速度とのバランスによ って決まる経口吸収速度と吸収率を定量的に予測するまでには至っていない。

このような in vitro 溶出試験の問題点を解決する手段として、経口吸収予測モデルの活用 が挙げられる。コンピューターの発展に伴い複雑な計算式を利用した様々な経口吸収シミ ュレーションソフトが実用化され、その有用性が数多く報告されてきた[42, 43]。これらシ ミュレーションソフトは生理学・物理化学・分子生物学に基づき、医薬品の体内挙動を数 式で記述する事で複雑な数理解析を可能としている。しかしこれらソフトは市販品である が故に input できるパラメーターの形式には制限があり、GIS 溶出試験のような特殊な iPD methodology で得られた結果を活用することは難しい。そのため、iPD methodology で得 られた結果を input パラメーターとして経口吸収モデルに組み込むには、観測結果を数式 で記述し、他の素過程を考慮した物質収支式を自ら構築する方法が最良だと考えられる。 この場合、構築するモデルは簡便なモデルとなるケースが多いが、経口吸収の律速過程を 正しく記述できていれば非常に有用なヒト薬物動態予測ツールとなる[44, 45]。こうした in vitro-in silico アプローチによって、定性的な予測にとどまらない経口吸収性の推定が期待 できる。 本章では、難水溶性弱塩基性医薬品ジピリダモールを題材として、iPD methodology で 得られた溶出速度・溶解度・過飽和の程度及び維持時間を考慮した簡便な生理学的経口吸 収モデルを構築し、ジピリダモールの消化管内挙動及び血漿中薬物濃度推移の定量的な予 測が可能であるか検討した。

第二節 実験方法

1. 実験材料

ジピリダモールの構造式及び物理化学的特性は Table 1 に示した。第一章と同じく、Zydus Pharmaceuticals (Penningston, NJ, USA)から入手したジピリダモール 25mg 即放錠を試験に供した。

2. パドル法溶出試験 (USP II)

第一章に記載した方法に準じてジピリダモール 25 mg/錠 2 錠 (50 mg)の溶出性をパドル 法で評価した。試験液には 300 mL の SGF_{pH2.0} 及び FaSSIF を用いた。ジピリダモール 50 mg を溶出試験器に投下し、所定時間経過後に試験液を採取し、PVDF シリンジフィルター (孔径 0.22µm, Millipore, Milford, MA, USA)で濾過後、濾液を等量のメタノールと混合し、 HPLC 法にて溶解薬物濃度を測定した。SGF_{pH2.0} 及び FaSSIF の組成はそれぞれ Table 2、 Table 8 に示した。

3. 溶解速度式の構築

ジビリダモールの溶解速度 (dX_{dis}/dt)は Noyes-Whitney の式[46]に基づき算出した (式 (14))。

$$\frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{dis}}}{\mathrm{dt}} = \frac{3D_{\mathrm{eff}}}{r_{\mathrm{o}}h_{\mathrm{p}}\rho} X_{\mathrm{tot}}^{1/3} X_{\mathrm{ud}}^{2/3} \left(C_{\mathrm{s}} - \frac{X_{\mathrm{dis}}}{V} \right)$$
(14)

Deffは拡散係数、roは溶解初期の粒子径、hpは拡散相の厚み、ρは粒子密度、Csは平衡溶 解度、Vは溶媒液量である。Xtotは溶媒中に存在する全薬物量、Xudは未溶解薬物量、Xdis は溶解薬物量である。ここで、球状で粒子径が均一な薬物粒子を想定し、それらが溶解す る際には拡散係数と拡散相の厚みが変化しないと仮定すると、3Deff/rohppは溶解速度定数 zeta (z value)に置換できる(式(15))[24]。

$$\frac{dX_{dis}}{dt} = zX_{tot}^{1/3}X_{ud}^{2/3}(C_s - \frac{X_{dis}}{V})$$
(15)

SGF_{pH2.0}及び FaSSIF 中における z value はパドル法溶出試験で得た溶解薬物量-時間推移から非線形最小二乗法により求めた。フィッティングには Hisaka、Sugiyama らによって開発された薬物動態解析プログラム Napp (version 2.31)を用いた[47]。

4. GIS 溶出試験

GIS 溶出試験の概略は第三章に記載した。小腸模倣液には FaSSIF を用いてジピリダモ ール 25 mg/錠 2 錠 (50 mg)の溶出挙動を評価した。所定時間後に試験液を採取し、PVDF シリンジフィルター (孔径 0.22 µm, Millipore, Milford, MA, USA)で濾過後、濾液を等量の メタノールと混合し、HPLC 法にて溶解薬物濃度を測定した。

5. GIS 溶出試験の物質収支式の構築

GIS 溶出試験の物質収支の概要を Figure 15 に示した。GIS_{stomach} における溶解速度 (dX_{dis(s})/dt)は SGF_{pH2.0} を試験液としたパドル法 溶出試験で、GIS_{duodenum} と GIS_{jejunum} における溶 解速度(dX_{dis(d})/dt, dX_{dis(j})/dt)は FaSSIF を用いた パドル法溶出試験から求めた z value (式(15))で 記述されると仮定した。

溶解薬物及び未溶解薬物の各チャンバー間の 移行速度は、GIS 溶出試験の実験条件に従って 記述した。即ち、時間 t 分後の各チャンバーにお ける溶媒量 (V_s, V_d, V_j)は試験開始時における試 験液量 (V_{s,0}, V_{d,0})と胃排出半減時間 (GE)、そし



Figure 15. Mass transport kinetics for the GIS.

て分泌液の分泌速度 (ksec(s), ksec(d))を考慮した次の式(16)~(18)で記述できる。

$$V_{\rm s} = V_{\rm s,0} \times \mathrm{e}^{-\left(\frac{\ln(2)}{\mathrm{GE}}\right)t} \tag{16}$$

$$V_{d} = V_{d,0} \tag{17}$$

$$V_{j} = V_{s,0} \times \left(1 - e^{-\left(\frac{\ln(2)}{GE}\right)t}\right) + \left(k_{\sec(s)} + k_{\sec(d)}\right) \times t$$
(18)

チャンバー間の薬物移行速度は試験液移行速度と時間 t分後における単位体積当たりの 薬物量の積となる。例えば、GIS_{stomach}から GIS_{duodenum}への溶解薬物移行速度 ($dX_{d(s-d)}/dt$) 及び未溶解薬物移行速度 ($dX_{ud(s-d)}/dt$)は次の式(19)、(20)で表わされる。

$$\frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{d(s-d)}}}{\mathrm{dt}} = \left(-\frac{\mathrm{dV}_{\mathrm{s}}}{\mathrm{dt}} + \mathbf{k}_{\mathrm{sec(s)}}\right) \left(\frac{\mathbf{X}_{\mathrm{d(s)}}}{\mathbf{V}_{\mathrm{s}}}\right) \tag{19}$$

$$\frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{ud}(\mathrm{s}-\mathrm{d})}}{\mathrm{dt}} = \left(-\frac{\mathrm{dV}_{\mathrm{s}}}{\mathrm{dt}} + \mathrm{k}_{\mathrm{sec}(\mathrm{s})}\right) \left(\frac{\mathrm{X}_{\mathrm{ud}(\mathrm{s})}}{\mathrm{V}_{\mathrm{s}}}\right) \qquad (\text{if } t < \mathrm{t}_{\mathrm{lag}}, \ \frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{ud}(\mathrm{s}-\mathrm{d})}}{\mathrm{dt}} = 0) \tag{20}$$

チャンバー間の送液は内径 2 mm のチューブで行われている。そのため、錠剤が崩壊し、 直径 2 mm 以下の粒子が生成するまでの時間を t_{lag} と定義し、 t_{lag} までの時間には未溶解薬 物は GIS_{duodenum} に移行しない (dX_{ud(s-d})/dt=0)と仮定した。

析出速度 (dXpre/dt)は1次速度に従うと仮定した。ジピリダモールを評価した際、試験終 了時点 (180分後)の溶解薬物濃度 (Cend)は FaSSIF 中の飽和溶解度を超える値が認められ、 過飽和の維持が示唆された。従って析出速度式はこの Cend を加味した形で記述した (式 (21))。

$$\frac{dX_{\text{pre}}}{dt} = k_{\text{pre}}(X_d - C_{\text{end}}V)$$
(21)

kpは析出速度定数で、析出が生じていた GISduodenum と GISjejunum に各々別個の定数として適用した(kpre(d), kpre(j))。

これらの溶解速度、移行速度、そして析出速度を考慮した物質収支式を式(3)~(5)に従っ て構築し、GIS 溶出試験での実測の溶解薬物量-時間推移から t_{lag}, k_{pre(d)}, k_{pre(j)}を非線形最小 二乗法で求めた (Napp, version 2.31)。全ての物質収支式は Supporting Information に記 載した。

6. 消化管内の物質収支式の構築

GIS 溶出試験には大腸への薬物移行、及び膜透過過程が考慮されていないが、消化管内 薬物挙動を予測するにはこれら過程が不可欠である。そこで、Figure 16 の物質収支概要図

に基づいたモデルを構築した。溶解速度、析出速 度、胃排出速度は GIS の物質収支式をそのまま 用いた。GIS 溶出試験では 3 つ目のチャンバー を空腸 (GIS_{jejunum})としていたが、試験終了時点 における GIS_{jejunum}中の液量は約 390 mL となり、 これはヒト小腸の液量に相当する[14]。従って、 消化管内モデルでは GIS_{jejunum}を小腸コンパー トメントと定義してモデルを構築した。即ち、 GIS 溶出試験で得られた GIS_{duodenum}から GIS_{jejunum}への薬物移行速度 (dX_{d(d-i})/dt)は十二 指腸から小腸への移行速度 (dX_{d(d-i})/dt)と同一と した。

大腸移行速度 は compartmental absorption and transit (CAT)モデルに基づいた移行速度定 数 (k_{(irc}))と小腸コンパートメント内の薬物量 (X_(i))を用いて式(22)のように記述した[49]。



Figure 16. Mass transport kinetics for the GI tract.

(22)

$$\frac{\mathrm{d}X_{(i-c)}}{\mathrm{d}t} = k_{(i-c)}X_{(i)}$$

消化管膜透過速度 (dXperm/dt)は次のように記述した。

$$\frac{dX_{\text{perm}}}{dt} = \frac{2}{R} DF \times X_d P_{\text{eff}}$$
(23)

R は消化管の内径、DF は消化管の扁平率である。ジピリダモールの膜透過係数 (Peff)は Sugano らが提唱した gastrointestinal unified theoretical framework (GUT framework) 理論に基づいた予測値を用いた[50, 51]。胃からの膜透過は無視できると仮定し、式(23)を 十二指腸と小腸に適用した (X_{perm(d)}, X_{perm(i)})。全ての物質収支式は Supporting Information に記載した。 7. 生体内薬物挙動シミュレーション

Psachoulias らは 30 mg、90 mg のジビリダモールを胃内に溶解状態として投与した際の 十二指腸における薬物濃度・時間推移を報告している[8]。そこで、6. で構築した消化管内の 物質収支式を用いて、同じ投与条件とした際の十二指腸コンパートメントにおける溶解薬 物濃度・時間推移のシミュレーションを行った。実測のデータは文献のグラフから Digit version 1.0.4 (SimulationPlus, Inc., Lancaster, CA, USA)を用いて読み取った。

ジビリダモール 50 mg 投与時の血漿中薬物濃度・時間推移の実測値は文献から読み取った [9]。この文献では、胃内 pH が 2.1 以下の高齢健常人 6 名とファモチジンの併用で胃内 pH が 4.4~6.6 の範囲にある高齢健常人 5 名に絶食下でジピリダモール 50 mg 錠を単回で投与 している。従って、同一投与条件の際の血漿中薬物濃度・時間推移のシミュレーションを実 施した。

薬物吸収速度 (dXabs/dt)は膜透過速度と Fg と Fh を考慮した式(24)に従うと仮定した。

$$\frac{dX_{abs}}{dt} = \left(\frac{dX_{perm(d)}}{dt} + \frac{dX_{perm(i)}}{dt}\right) F_g F_h$$
(24)

ここで小腸代謝は無視でき、全身循環からの消失は肝代謝のみによって担われると仮定 すると、Fgは1となり、Fhは肝血流量(Qh=20 mL/min/kg)と全身クリアランス(CLtot=2 mL/min/kg)で表わす事ができ、膜透過速度は式(23)を十二指腸と小腸コンパートメントに 適用することで式(24)は式(25)に書き換えることができる。

$$\frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{abs}}}{\mathrm{dt}} = \left(\frac{2\mathrm{DF}}{\mathrm{R}}\mathrm{X}_{\mathrm{d}(\mathrm{d})}\mathrm{P}_{\mathrm{eff}} + \frac{2\mathrm{DF}}{\mathrm{R}}\mathrm{X}_{\mathrm{d}(\mathrm{i})}\mathrm{P}_{\mathrm{eff}}\right) \left(1 - \frac{\mathrm{CL}_{\mathrm{tot}}}{\mathrm{Q}_{\mathrm{h}}}\right) \tag{25}$$

この式で表わされる薬物吸収速度で全身循環に到達した薬物はその後、静脈内投与後の 血漿中濃度推移から得られた薬物動態学的パラメーター[13]に従うと仮定して、薬物濃度推 移を推定した。ファモチジンを併用した被験者の胃内溶解過程をシミュレーションする際、 胃内溶解度及び溶解速度は FaSSIF 中の溶解度と溶解速度と同一だと想定し薬物濃度推移 を予測した。

8. HPLC 分析

第一章に記載した方法に準じて実施した。

第三節 結果

1. パドル法溶出試験

ジピリダモール 50 mg のパドル法溶出試験の結果を Figure 17 に示した。SGF_{pH2.0}中で は速やかに全量溶解したのに対し、FaSSIF 中では試験開始 120 分後においても 12%程度 の溶出率であった。溶解速度定数 (z value)は SGF_{pH2.0}、FaSSIF 中でそれぞれ 1.6, 0.45 (mL/mg/min)と推定され (Table 15)、実測の溶解薬物量・時間推移を良好に再現していた。



Figure 17. Dissolved drug amount-time profiles and % dissolved-time profiles of 50 mg dipyridamole in USP apparatus II with 300 mL of (a) SGF_{pH2.0} and (b) FaSSIF. White circles represent the experimental data, and dotted lines indicate the fitted curves. Experimental data were shown as mean \pm SD (n=3).

Table 15. Dissolution parameters for dipyridamole in USP apparatus II with different media.

parameter	value
C _{s,SGFpH2.0} (mg/mL)	5
C _{s,FaSSIF} (mg/mL)	0.0197
Z(SGFpH2.0) (mL/mg/min)	1.6
Z(FaSSIF) (mL/mg/min)	0.45
	文献[48]より引用

2. GIS 溶出試験

ジビリダモール 50 mg の GIS 溶出試験の結果を Figure 18 に示した。GIS_{stomach} 内では 速やかな溶出を示し、パドル法溶出試験の結果と一致した。GIS_{duodenum} 及び GIS_{jejunum} に おける最大溶解薬物濃度はそれぞれ 160.3 µg/mL、68.6 µg/mL となり、FaSSIF 中の平衡 溶解度 (19.7 µg/mL)のそれぞれ 8.1 倍、3.5 倍の溶解濃度が認められた。両チャンバーでは この高い溶解薬物濃度がある程度維持された状態が続き、試験最終時点 (180 分後)におけ る濃度はそれぞれ 76.0 µg/mL、54.2 µg/mL となって平衡溶解度よりも高い値が維持されて いた。従って、このある程度維持された過飽和溶解度を析出速度式 (式(21))に考慮して析出 速度定数及びラグ時間を推定した。用いたパラメーター及びフィッティングで得られたパ ラメーターは Table 15 に示した。 GIS_{duodenum}、GIS_{jejunum} における析出速度定数 (kpre)は それぞれ 0.0330 (min⁻¹)、0.137 (min⁻¹)と推定された。またラグ時間 (t_{lag})はフィッティグ で 5.8 min と推定された。フィッティングカーブは Figure 18 に点線で示した。全てのチャ ンバーにおいて実測の推移を再現するカーブが得られた。



Figure 18. Drug amount in solution-time profiles of 50 mg dipyridamole in the (a) $GIS_{stomach}$, (b) $GIS_{duodenum}$, and (c) $GIS_{jejunum}$ of the GIS. White circles represent the experimental data, and dotted lines indicate the fitted curves. Experimental data were shown as mean \pm SD (n=3).

Table 15.	Experimental	and compou	ind-related	parameters	for the	GIS	mass	transpo	\mathbf{rt}
equations	8								

parameter	value	reference
Dosed amount (mg)	50	Russell et al.[9]
ksec(s) (mL/min)	1	Takeuchi <i>et al.</i> [7]
k _{sec(d)} (mL/min)	1	Takeuchi <i>et al.</i> [7]
GE (min)	8	Takeuchi <i>et al.</i> [7]
V _s (mL)	300~5	equation (16)
V _d (mL)	50	equation (17)
V _j (mL)	0~390	equation (18)
$C_{s,stomach}$ (mg/mL)	5	Solubility in $\mathrm{SGF}_{\mathrm{pH2.0}}$
C _{s,duodenum} (mg/mL)	0.0197	Solubility in FaSSIF
C _{s,jejunum} (mg/mL)	0.0197	Solubility in FaSSIF
z(s) (mL/mg/min)	1.6	z value in SGF _{pH2.0}
z(d) (mL/mg/min)	0.45	z value in FaSSIF
z(j) (mL/mg/min)	0.45	z value in FaSSIF
$C_{end(d)}$ (mg/mL)	0.076	Experimental data
C _{end(j)} (mg/mL)	0.054	Experimental data
t _{lag} (min)	5.8	Optimized by fitting
$k_{pre(d)}$ (min ⁻¹)	0.0330	Optimized by fitting
kpre(j) (min ⁻¹)	0.137	Optimized by fitting

3. 生体内薬物挙動シミュレーション

Table 16 に示した生理学的パラメーター及びジピリダモールの膜透過係数を用い、十二 指腸における溶解薬物濃度・時間推移をシミュレーションした。Figure 19 に示した通り、 30 mg または 90 mg のジピリダモールを投与した際の十二指腸内予測推移は実測値を再現 している事が示された。

parameter	value	reference
$k_{(i-c)}$ (min ⁻¹)	0.00556	α
DF	1.7	Sugano <i>et al.</i> [51]
R (cm)	1.5	Sugano <i>et al.</i> [51]
$P_{\rm eff}$ (×10 ⁻⁴ cm/sec)	3.0	Sugano <i>et al.</i> [51]

Table 16. Physiological and compound-related parameters for GI tract mass transport equations

 $^{\alpha}$ Mean small intestinal transit time = 180 min

文献[48]より引用



Figure 19. Drug concentration-time profiles in the duodenum after an administration of (a) 30 mg and (b) 90 mg dipyridamole as a complete solution. Box plots indicate the observed data, and dotted lines represent the predicted curves, respectively. Observed data were taken from the literature[8].

ジビリダモール 50 mg 投与後の血漿中薬物濃度推移を Table 17 の静脈内投与後の薬物動 態学的パラメーターを用いてシミュレーションした。Figure 20 に通常の胃内 pH を有する 被験者の血漿中濃度実測値(中央値)とシミュレーション推移の比較を示した。シミュレー ション推移は実測値を概ね捉えていた。また、正常被験者及びファモチジン併用被験者に おける薬物動態学的パラメーターの実測値と予測値を Table 18 に示した。C_{max}、T_{max}、そ して AUC の予測値は実測値に近い値となった。

pharmacokinetic parameter $^{\alpha}$	value
V _c (mL)	6160
ke (min ⁻¹)	0.0275
k ₁₂ (min ⁻¹)	0.666
k ₂₁ (min ⁻¹)	0.0447
k ₁₃ (min ⁻¹)	0.01
k ₃₁ (min ⁻¹)	0.00135

Table 17. Systemic pharmacokinetic parameters for dipyridamole

a: Estimated from reference: Mahony et al.[13]



Figure 20. Plasma concentration-time profile after a single oral administration of 50 mg dipyridamole in healthy subjects with normal gastric pH level. White circles indicate the observed data, and dotted line represents the predicted data. Observed data are median values, taken from the literature[9]. 文献[48]より引用

文献[48]より引用

subjects	C _{max} (µg/mL)		T _{max}	T _{max} (hr)		AUC _{0·36hr} (µg*hr/mL) (AUC ratio)	
Subjects	$Observed^{\alpha}$	Predicted	$Observed^{\alpha}$	Predicted	$Observed^{\alpha}$	Predicted	
Normal gastric pH	1.58	1.54	0.58	0.64	4258 (1.00)	4728 (1.00)	
Elevated gastric pH	0.333	0.446	2.25	2.08	2692 (0.63)	3145 (0.67)	

Table 18. The comparison of observed and predicted pharmacokinetic parameters after a single oral administration of 50 mg dipyridamole

^α Reference: Russell *et al.*[9]

第四節 考察

本章ではパドル法溶出試験と GIS 溶出試験を活用した生理学的経口吸収モデルを構築し、 難水溶性弱塩基性医薬品のジビリダモールの消化管内溶出挙動と血漿中薬物濃度推移の予 測を試みた。その結果、ジビリダモールの十二指腸における薬物挙動及び血漿中薬物濃度 推移を良好に再現することに成功した。

生理学的経口吸収モデルの構築にあたって、生理学的パラメーター及び医薬品の動態学 的パラメーターは注意深く収集する必要がある。今回構築したモデルにおいて、胃排出速 度や消化管液量などの生理学的パラメーターは GIS 溶出試験の実験条件をそのまま適用し た。GIS 溶出試験の設定条件は文献などで報告されている消化管生理学的パラメーターと も合致しており、妥当性が示唆されている[14,52]。さらに、膜透過係数は GUT framework 理論による予測値を用いた。この理論では膜透過過程を経細胞輸送、傍細胞輸送、そして 非撹拌水相拡散などの素過程に分解し、各過程に対して適切な実験値及び予測値を求める 事で膜透過係数を算出している。そのため、膜透過速度の予測手法としては現状最も確か らしい方法である[53]。実際、この膜透過速度係数を用いて予測したジピリダモールの薬物 動態学的パラメーター予測値は実測値をよく再現していた。特に制酸剤併用時には過飽 和・析出が生じないため、膜透過係数及び平衡溶解度に依存したシミュレーションとなる が、この条件下においても良好な予測結果が得られた事から、用いた膜透過係数の値が適 切であることが示唆された。

析出速度は GIS 溶出試験の結果に基づき 1 次速度を仮定し、フィッティングで得たパラ メーターをシミュレーションに用いた。しかし析出過程は厳密には核形成過程と結晶成長 過程で構成されており、それぞれを表わした数理学的モデルによって析出速度を予測する 試みもなされている[54,55]。ジビリダモールのように結晶成長過程が析出の律速段階とな るような医薬品の場合には単純な 1 次速度での記述が比較的容易だが、核形成過程が律速 の場合には析出パターンが 1 次速度に従わない可能性がある[56]。この場合、核形成を考慮 した析出速度式の構築が必要となる。核形成が律速となるとされる医薬品、例えばカルベ ジロールを題材とした析出挙動の数理学的モデル式の構築が今後期待される。

本章では、GIS 溶出試験と経口吸収モデルを組み合わせることによりジピリダモールの 定量的なヒト体内挙動予測が可能となることを示した。さらなるバリデーションは必要だ が、他の難水溶性弱塩基性医薬品や開発化合物にも同様のアプローチを用いる事で制酸剤 併用時の薬物相互作用予測に加え、製剤設計、生物学的同等・非同等製剤の検出など、幅 広い用途への応用が期待される。

総括

近年、バイオ医薬品と呼ばれる高分子の生物学的製剤が次々と承認・上市され、患者の QOL 向上に大きく貢献している。しかし同時に、患者の負担軽減や医療費抑制の観点から も低分子経口医薬品に対するニーズは依然として高い。低分子医薬品の経口吸収性評価に ついては生理学や物理化学、生物薬剤学の分野で古くから研究が進められ、多種多様な知 見が集積している。そしてこれまでの研究知見を踏まえ、経口吸収性予測技術の構築と評 価が国際的にも再度注目を集めている。欧州では、経口吸収プロセスの理解と革新的な評 価ツールの開発を目指して 2012 年に OrBiTo (innovation tools for oral biopharmaceutics) という革新的医薬品イニシアティブ (innovative medicines initiative, IMI)プロジェクト が発足し、産学が一体となって経口吸収に関連する諸問題の解決を推し進めている[57]。米 国においては、in vivo predictive drug dissolution/simulation をテーマとした学術集会や ワークショップが 2014、2017 年に開催され、特に FDA (米国食品医療品局)の能動的な取 り組みにも注目が集まっている[58]。また、我が国でも医薬品開発段階における最新の薬物 動態評価やヒト吸収性予測技術、測定基盤技術に関する最新情報の共有を目的とした創剤 研究コンソーシアム (代表世話人 立命館大学薬学部 藤田卓也 教授)が発足し、 アカデミア と企業の間で課題の共有と人的な交流が活発に行われている。こういった学術集会の開催 状況からも分かるように、適切な経口吸収性評価系の構築が低分子経口医薬品の研究開発 における喫緊の課題の一つと認識されている。

このような背景から、本研究では低分子経口医薬品の中でも特に複雑な溶出挙動を示す 難水溶性弱塩基性医薬品の経口吸収性予測を目的として、新規 multi-compartment 溶出試 験、GIS 溶出試験を用いて生体内挙動予測法の確立を試みた。GIS 溶出試験はヒト絶食状 態の胃-小腸上部環境を模倣しており、難水溶性弱塩基性医薬品の溶出性評価及び経口吸収 性評価に適していると考えられたため、四章にわたりその有用性を評価した。

第一章では、ヒト十二指腸で過飽和と析出を示す事が報告されているジピリダモールを 題材として、その溶出挙動を GIS 溶出試験で評価した。ジピリダモールはその酸塩基解離 定数から推察される通り、酸性環境下で高い溶解度を示した。そして GIS 溶出試験の十二 指腸及び空腸部位では平衡溶解度よりも高い溶解薬物濃度が認められ、その後析出物が生 じ過飽和濃度は徐々に低下した。これら現象はヒト十二指腸で観察された結果と類似して いた。ジピリダモールは制酸剤併用下でAUC、Cmaxが低下する事が知られており、GIS 溶 出試験ではこの薬物間相互作用の程度を定性的に予測できることが示された。さらに、in situ マウス腸管インフューション試験において、GIS 溶出試験で認められた過飽和は腸管 からの薬物吸収を溶解薬物濃度依存的に亢進させる事を明らかとした。以上から、GIS 溶 出試験を用いることにより、ジピリダモールの消化管内における過飽和・析出挙動の観察 と制酸剤併用時の曝露変動が予測可能であることが示され、他の難水溶性弱塩基性医薬品 の溶出挙動推定にも有用である可能性が示唆された。

続いて第二章では、人工胆汁酸を含有する緩衝液を試験液とした GIS 溶出試験の実験条件の最適化を行った。十二指腸及び空腸部位における pH 推移と胆汁酸濃度推移を指標に、 ヒトの実測推移に近い条件を模索したところ、十二指腸分泌液として4倍濃縮した人工腸 液を用いた際に生理学的なヒト消化管環境が模倣できることが明らかとなった。最適化し た本実験条件により、単純緩衝液では溶出評価が困難とされる著しく低い溶解性を有する 医薬品の溶出評価ができるようになり、GIS 溶出試験の汎用性を高めることが可能となっ た。

第三章では、第二章で最適化した GIS 溶出試験系を超難水溶性化合物であるイトラコナ ゾールに適用し、臨床応用されている 2 製剤の溶出挙動を比較した。単純緩衝液あるいは 人工腸液を試験液としたパドル法溶出試験・GIS 溶出試験でイトラコナゾールカプセル剤 と内用液剤の溶出挙動を評価し、おおよその消化管通過時間である 3 時間後までの溶解薬 物量・時間推移曲線下面積をそれぞれ算出した。そして 2 製剤間の比率と臨床 AUC 比を較 べた結果、人工腸液を用いた GIS 溶出試験が最も 2 製剤間の溶出ポテンシャル差を検出で きていることを明らかとした。さらにこの時、GIS 溶出試験で得られた懸濁液からの膜透 過性を Caco-2 単層細胞膜透過性試験で評価し、カプセル剤と内用液剤からのイトラコナゾ ール膜透過係数は同程度であることを示した。即ち、GIS 溶出試験と膜透過性試験を組み 合わせることにより、過飽和の程度及び維持の評価に加えて膜透過性を加味した製剤評価 が可能である事が示された。従って、例えばジェネリック医薬品開発において先発製剤の 特許戦略から同一の添加剤が使用できないケースなどにこの GIS 溶出試験を用いた生物学 的同等性予測が有効であると考えられた。 最後に第四章では、消化管内環境の完全な模倣として GIS 溶出試験に基づいた経口吸収 モデルを構築し、ジピリダモールの時間推移を加味した生体内挙動の定量的な予測を試み た。パドル法溶出試験から溶解速度パラメーターを、GIS 溶出試験から析出速度パラメー ターを推定し、これら数値を消化管生理に基づいた経口吸収モデルに組み込みジピリダモ ールの十二指腸内薬物挙動及び血漿中薬物濃度推移をシミュレーションした。その結果、 構築した経口吸収モデルがジピリダモールの生体内挙動を適切に予測できることを明らか とした。この経口吸収モデルを用いれば過飽和維持に寄与する添加剤が血中薬物動態に与 える影響などを推定することが可能となり、難水溶性医薬品の曝露改善に有効と考えられ る製剤処方の提案や不必要な製剤化検討の未然防止などが期待できる。

以上、本研究では四章にわたって難水溶性弱塩基性医薬品の経口吸収性評価における GIS 溶出試験の有用性を評価した。GIS 溶出試験が in vivo で生じている過飽和と析出の検出だ けでなく、制酸剤併用時の曝露変動の予測にも有用であることを明らかとし、人工腸液を 用いた試験系を構築する事で超難水溶性医薬品の製剤間の溶出ポテンシャル比較が可能で あることを示した。さらに、GIS 溶出試験と経口吸収モデルを組み合わせる事で時間推移 を考慮した生体内薬物挙動の適切な予測に成功した。本研究で構築した GIS 溶出試験及び 数理学的経口吸収モデルによる生体内薬物挙動予測手法が、近年増加する難水溶性医薬品 候補化合物の研究開発の加速、剤形追加を介した既存医薬品のライフサイクルマネジメン ト、そして Quality by Design を志向した製剤設計など、医薬品の研究開発の効率化促進に 寄与することを期待する。

引用文献

[1] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, J Pharmacol Toxicol Methods 44(1) (2000) 235-49.

[2] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, Pharm Res 12(3) (1995) 413-20.

[3] G.E. Amidon, M. Hawley, Oral bioperformance and 21st century dissolution, Mol Pharm 7(5) (2010) 1361.

[4] E.S. Kostewicz, B. Abrahamsson, M. Brewster, J. Brouwers, J. Butler, S. Carlert, P.A. Dickinson, J. Dressman, R. Holm, S. Klein, J. Mann, M. McAllister, M. Minekus, U. Muenster, A. Müllertz, M. Verwei, M. Vertzoni, W. Weitschies, P. Augustijns, In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms, Eur J Pharm Sci 57 (2014) 342-66.

[5] Y. Tsume, D.M. Mudie, P. Langguth, G.E. Amidon, G.L. Amidon, The Biopharmaceutics Classification System: subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC, Eur J Pharm Sci 57 (2014) 152-63.

[6] J. Bevernage, J. Brouwers, M.E. Brewster, P. Augustijns, Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: strategies and issues, Int J Pharm 453(1) (2013) 25-35.

[7] S. Takeuchi, Y. Tsume, G.E. Amidon, G.L. Amidon, Evaluation of a three compartment in vitro gastrointestinal simulator dissolution apparatus to predict in vivo dissolution, J Pharm Sci 103(11) (2014) 3416-22.

[8] D. Psachoulias, M. Vertzoni, K. Goumas, V. Kalioras, S. Beato, J. Butler, C. Reppas, Precipitation in and supersaturation of contents of the upper small intestine after administration of two weak bases to fasted adults, Pharm Res 28(12) (2011) 3145-58.

[9] T.L. Russell, R.R. Berardi, J.L. Barnett, T.L. O'Sullivan, J.G. Wagner, J.B. Dressman, pH-related changes in the absorption of dipyridamole in the elderly, Pharm Res 11(1) (1994) 136-43.

[10] R.A. Blum, D.T. D'Andrea, B.M. Florentino, J.H. Wilton, D.M. Hilligoss, M.J. Gardner,
E.B. Henry, H. Goldstein, J.J. Schentag, Increased gastric pH and the bioavailability of
fluconazole and ketoconazole, Ann Intern Med 114(9) (1991) 755-7.

[11] N. Charoo, R. Cristofoletti, A. Graham, P. Lartey, B. Abrahamsson, D.W. Groot, S. Kopp,
P. Langguth, J. Polli, V.P. Shah, J. Dressman, Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: fluconazole, J Pharm Sci 103(12) (2014) 3843-58.

[12] L. Kalantzi, E. Persson, B. Polentarutti, B. Abrahamsson, K. Goumas, J.B. Dressman, C.

Reppas, Canine intestinal contents vs. simulated media for the assessment of solubility of two weak bases in the human small intestinal contents, Pharm Res 23(6) (2006) 1373-81.

[13] C. Mahony, K.M. Wolfram, D.M. Cocchetto, T.D. Bjornsson, Dipyridamol kinetics, Clin Pharmacol Ther 31(3) (1982) 330-8.

[14] D.M. Mudie, G.L. Amidon, G.E. Amidon, Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing, Mol Pharm 7(5) (2010) 1388-405.

[15] K. Matsui, Y. Tsume, G.E. Amidon, G.L. Amidon, In Vitro Dissolution of Fluconazole and Dipyridamole in Gastrointestinal Simulator (GIS), Predicting in Vivo Dissolution and Drug-Drug Interaction Caused by Acid-Reducing Agents, Mol Pharm 12(7) (2015) 2418-28.

[16] P. Kerlin, A. Zinsmeister, S. Phillips, Relationship of motility to flow of contents in the human small intestine, Gastroenterology 82(4) (1982) 701-6.

[17] R. Zhou, P. Moench, C. Heran, X. Lu, N. Mathias, T.N. Faria, D.A. Wall, M.A. Hussain, R.L. Smith, D. Sun, pH-dependent dissolution in vitro and absorption in vivo of weakly basic drugs: development of a canine model, Pharm Res 22(2) (2005) 188-92.

[18] N.R. Budha, A. Frymoyer, G.S. Smelick, J.Y. Jin, M.R. Yago, M.J. Dresser, S.N. Holden, L.Z. Benet, J.A. Ware, Drug absorption interactions between oral targeted anticancer agents and PPIs: is pH-dependent solubility the Achilles heel of targeted therapy?, Clin Pharmacol Ther 92(2) (2012) 203-13.

[19] A. Kourentas, M. Vertzoni, M. Symillides, K. Goumas, R. Gibbon, J. Butler, C. Reppas, Effectiveness of supersaturation promoting excipients on albendazole concentrations in upper gastrointestinal lumen of fasted healthy adults, Eur J Pharm Sci 91 (2016) 11-9.

[20] S. Blanquet, E. Zeijdner, E. Beyssac, J.P. Meunier, S. Denis, R. Havenaar, M. Alric, A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions, Pharm Res 21(4) (2004) 585-91.

[21] S. Souliman, S. Blanquet, E. Beyssac, J.M. Cardot, A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: applied to solid immediate release oral dosage form, Eur J Pharm Sci 27(1) (2006) 72-9.

[22] S.D. Mithani, V. Bakatselou, C.N. TenHoor, J.B. Dressman, Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration, Pharm Res 13(1) (1996) 163-7.

[23] E. Galia, E. Nicolaides, D. Hörter, R. Löbenberg, C. Reppas, J.B. Dressman, Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs, Pharm Res 15(5) (1998) 698-705.

[24] R. Takano, K. Sugano, A. Higashida, Y. Hayashi, M. Machida, Y. Aso, S. Yamashita, Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test, Pharm Res 23(6) (2006) 1144-56.

[25] K. Matsui, Y. Tsume, G.E. Amidon, G.L. Amidon, The Evaluation of In Vitro Drug

Dissolution of Commercially Available Oral Dosage Forms for Itraconazole in Gastrointestinal Simulator With Biorelevant Media, J Pharm Sci 105(9) (2016) 2804-14.

[26] C.A. Bergström, R. Holm, S.A. Jørgensen, S.B. Andersson, P. Artursson, S. Beato, A. Borde, K. Box, M. Brewster, J. Dressman, K.I. Feng, G. Halbert, E. Kostewicz, M. McAllister, U. Muenster, J. Thinnes, R. Taylor, A. Mullertz, Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: current status and unmet needs, Eur J Pharm Sci 57 (2014) 173-99.

[27] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications, Int J Pharm 420(1) (2011) 1-10.

[28] J.S. Hostetler, L.H. Hanson, D.A. Stevens, Effect of cyclodextrin on the pharmacology of antifungal oral azoles, Antimicrob Agents Chemother 36(2) (1992) 477-80.

[29] D.A. Stevens, Itraconazole in cyclodextrin solution, Pharmacotherapy 19(5) (1999) 603-11.

[30] M. Tei, M. Yamamoto, K. Inoue, S. Torii, Single- and multiple-dose pharmacokinetics of itraconazole oral solution in healthy men, Jpn J Chemother 54(suppl 1) (2006) 6-17.

[31] K. Oguchi, E. Uchida, S. Kobayashi, H. Yasuhara, K. Sakamoto, T. Nagai, Phase I study on itraconazole (ITZ), an oral triazole antifungal -Pharmacokinetics of ITZ in healthy subjects after single and multiple oral administrations-. Clin Rep 25 (1991) 397-407.

[32] S. Skolnik, X. Lin, J. Wang, X.H. Chen, T. He, B. Zhang, Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay, J Pharm Sci 99(7) (2010) 3246-65.

[33] K. Miyajima, M. Yokoi, H. Komatsu, M. Nakagaki, Interaction of beta-cyclodextrin with bile salts in aqueous solutions, Chem Pharm Bull (Tokyo) 34(3) (1986) 1395-8.

[34] R. Holm, H.V. Nicolajsen, R.A. Hartvig, P. Westh, J. Ostergaard, Complexation of tauroand glyco-conjugated bile salts with three neutral beta-CDs studied by ACE, Electrophoresis 28(20) (2007) 3745-52.

[35] M.J. Park, S. Ren, B.J. Lee, In vitro and in vivo comparative study of itraconazole bioavailability when formulated in highly soluble self-emulsifying system and in solid dispersion, Biopharm Drug Dispos 28(4) (2007) 199-207.

[36] H.A. Hassan, A.H. Al-Marzouqi, B. Jobe, A.A. Hamza, G.A. Ramadan, Enhancement of dissolution amount and in vivo bioavailability of itraconazole by complexation with beta-cyclodextrin using supercritical carbon dioxide, J Pharm Biomed Anal 45(2) (2007) 243-50.

[37] S.D. Yoo, S.H. Lee, E. Kang, H. Jun, J.Y. Jung, J.W. Park, K.H. Lee, Bioavailability of itraconazole in rats and rabbits after administration of tablets containing solid dispersion particles, Drug Dev Ind Pharm 26(1) (2000) 27-34.

[38] S. Lee, K. Nam, M.S. Kim, S.W. Jun, J.S. Park, J.S. Woo, S.J. Hwang, Preparation and

characterization of solid dispersions of itraconazole by using aerosol solvent extraction system for improvement in drug solubility and bioavailability, Arch Pharm Res 28(7) (2005) 866-74.

[39] K. Six, T. Daems, J. de Hoon, A. Van Hecken, M. Depre, M.P. Bouche, P. Prinsen, G. Verreck, J. Peeters, M.E. Brewster, G. Van den Mooter, Clinical study of solid dispersions of itraconazole prepared by hot-stage extrusion, Eur J Pharm Sci 24(2-3) (2005) 179-86.

[40] A. Sarnes, M. Kovalainen, M.R. Häkkinen, T. Laaksonen, J. Laru, J. Kiesvaara, J. Ilkka, O. Oksala, S. Rönkkö, K. Järvinen, J. Hirvonen, L. Peltonen, Nanocrystal-based per-oral itraconazole delivery: superior in vitro dissolution enhancement versus Sporanox® is not realized in in vivo drug absorption, J Control Release 180 (2014) 109-16.

[41] J.M. Miller, A. Beig, R.A. Carr, G.K. Webster, A. Dahan, The solubility-permeability interplay when using cosolvents for solubilization: revising the way we use solubility-enabling formulations, Mol Pharm 9(3) (2012) 581-90.

[42] Y. Tsume, P. Langguth, A. Garcia-Arieta, G.L. Amidon, In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs: ibuprofen and ketoprofen, Biopharm Drug Dispos 33(7) (2012) 366-77.

[43] A. Margolskee, A.S. Darwich, X. Pepin, L. Aarons, A. Galetin, A. Rostami-Hodjegan, S. Carlert, M. Hammarberg, C. Hilgendorf, P. Johansson, E. Karlsson, D. Murphy, C. Tannergren, H. Thörn, M. Yasin, F. Mazuir, O. Nicolas, S. Ramusovic, C. Xu, S.M. Pathak, T. Korjamo, J. Laru, J. Malkki, S. Pappinen, J. Tuunainen, J. Dressman, S. Hansmann, E. Kostewicz, H. He, T. Heimbach, F. Wu, C. Hoft, L. Laplanche, Y. Pang, M.B. Bolger, E. Huehn, V. Lukacova, J.M. Mullin, K.X. Szeto, C. Costales, J. Lin, M. McAllister, S. Modi, C. Rotter, M. Varma, M. Wong, A. Mitra, J. Bevernage, J. Biewenga, A. Van Peer, R. Lloyd, C. Shardlow, P. Langguth, I. Mishenzon, M.A. Nguyen, J. Brown, H. Lennernäs, B. Abrahamsson, IMI - Oral biopharmaceutics tools project - Evaluation of bottom-up PBPK prediction success part 2: An introduction to the simulation exercise and overview of results, Eur J Pharm Sci 96 (2017) 610-625.

[44] Y. Shono, E. Jantratid, N. Janssen, F. Kesisoglou, Y. Mao, M. Vertzoni, C. Reppas, J.B. Dressman, Prediction of food effects on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling, Eur J Pharm Biopharm 73(1) (2009) 107-14.

[45] C. Wagner, E. Jantratid, F. Kesisoglou, M. Vertzoni, C. Reppas, J. B Dressman, Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model, Eur J Pharm Biopharm 82(1) (2012) 127-38.

[46] M.V. Dali, J.T. Carstensen, Effect of change in shape factor of a single crystal on its

dissolution behavior, Pharm Res 13(1) (1996) 155-62.

[47] A. Hisaka, Y. Sugiyama, Analysis of nonlinear and nonsteady state hepatic extraction with the dispersion model using the finite difference method, J Pharmacokinet Biopharm 26(5) (1998) 495-519.

[48] K. Matsui, Y. Tsume, S. Takeuchi, A. Searls, G.L. Amidon, Utilization of Gastrointestinal Simulator, an in Vivo Predictive Dissolution Methodology, Coupled with Computational Approach To Forecast Oral Absorption of Dipyridamole, Mol Pharm 14(4) (2017) 1181-1189.

[49] L.X. Yu, G.L. Amidon, A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption, Int J Pharm 186(2) (1999) 119-25.

[50] K. Sugano, Introduction to computational oral absorption simulation, Expert Opin Drug Metab Toxicol 5(3) (2009) 259-93.

[51] K. Sugano, Computational oral absorption simulation of free base drugs, Int J Pharm 398(1-2) (2010) 73-82.

[52] G.B. Hatton, V. Yadav, A.W. Basit, H.A. Merchant, Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans, J Pharm Sci 104(9) (2015) 2747-76.

[53] K. Sugano, Y. Nabuchi, M. Machida, Y. Aso, Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability, Int J Pharm 257(1-2) (2003) 245-51.

[54] K. Sugano, A simulation of oral absorption using classical nucleation theory, Int J Pharm 378(1-2) (2009) 142-5.

[55] S. Carlert, H. Lennernäs, B. Abrahamsson, Evaluation of the use of Classical Nucleation Theory for predicting intestinal crystalline precipitation of two weakly basic BSC class II drugs, Eur J Pharm Sci 53 (2014) 17-27.

[56] Y.L. Hsieh, G.A. Ilevbare, B. Van Eerdenbrugh, K.J. Box, M.V. Sanchez-Felix, L.S. Taylor, pH-Induced precipitation behavior of weakly basic compounds: determination of extent and duration of supersaturation using potentiometric titration and correlation to solid state properties, Pharm Res 29(10) (2012) 2738-53.

[57] H. Lennernäs, L. Aarons, P. Augustijns, S. Beato, M. Bolger, K. Box, M. Brewster, J. Butler, J. Dressman, R. Holm, K. Julia Frank, R. Kendall, P. Langguth, J. Sydor, A. Lindahl, M. McAllister, U. Muenster, A. Müllertz, K. Ojala, X. Pepin, C. Reppas, A. Rostami-Hodjegan, M. Verwei, W. Weitschies, C. Wilson, C. Karlsson, B. Abrahamsson, Oral biopharmaceutics tools - time for a new initiative - an introduction to the IMI project OrBiTo, Eur J Pharm Sci

57 (2014) 292-9.

[58] H. Lennernäs, A. Lindahl, A. Van Peer, C. Ollier, T. Flanagan, R. Lionberger, A. Nordmark, S. Yamashita, L. Yu, G.L. Amidon, V. Fischer, E. Sjögren, P. Zane, M. McAllister,

B. Abrahamsson, In Vivo Predictive Dissolution (IPD) and Biopharmaceutical Modeling and Simulation: Future Use of Modern Approaches and Methodologies in a Regulatory Context, Mol Pharm 14(4) (2017) 1307-1314.

Supporting Information

物質収支式 (GIS 溶出試験)

Undissolved drug in the ${\rm GIS}_{\rm stomach}$:

When $t < t_{lag}$,

$$\frac{dX_{ud(s)}}{dt} = -z_{(s)}(X_{d(s)} + X_{ud(s)})^{1/3}X_{ud(s)}^{2/3}\left(C_{s(s)} - \frac{X_{d(s)}}{V_s}\right)$$

When $t \ge t_{lag}$,

$$\frac{dx_{ud(s)}}{dt} = -z_{(s)}(X_{d(s)} + X_{ud(s)})^{1/3}X_{ud(s)}^{2/3}\left(C_{s(s)} - \frac{X_{d(s)}}{V_s}\right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)}\right)\left(\frac{X_{ud(s)}}{V_s}\right)$$

Dissolved drug in the GIS_{stomach}:

$$\frac{dX_{d(s)}}{dt} = z_{(s)} (X_{d(s)} + X_{ud(s)})^{1/3} X_{ud(s)}^{2/3} \left(C_{s(s)} - \frac{X_{d(s)}}{V_s} \right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} \right) \left(\frac{X_{d(s)}}{V_s} \right)$$

Undissolved drug in the ${\rm GIS}_{{\rm duodenum}}$:

When
$$t < t_{lag}$$
,

$$\frac{dx_{ud(d)}}{dt} = -z_{(d)}(X_{d(d)} + X_{ud(d)})^{1/3}X_{ud(d)}^{2/3}\left(C_{s(d)} - \frac{X_{d(d)}}{V_d}\right) + k_{pre(d)}(X_{d(d)} - C_{end(d)}V_d) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)}\right)\left(\frac{X_{ud(d)}}{V_d}\right)$$

When $t \ge t_{lag}$,

$$\frac{dX_{ud(d)}}{dt} = -z_{(d)}(X_{d(d)} + X_{ud(d)})^{1/3}X_{ud(d)}^{2/3}\left(C_{s(d)} - \frac{X_{d(d)}}{V_d}\right) + k_{pre(d)}(X_{d(d)} - C_{end(d)}V_d)$$
$$+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)}\right)\left(\frac{X_{ud(s)}}{V_s}\right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)}\right)\left(\frac{X_{ud(d)}}{V_d}\right)$$

Dissolved drug in the $\operatorname{GIS}_{duodenum}$:

$$\frac{dX_{d(d)}}{dt} = z_{(d)} (X_{d(d)} + X_{ud(d)})^{1/3} X_{ud(d)}^{2/3} \left(C_{s(d)} - \frac{X_{d(d)}}{V_d} \right) - k_{pre(d)} (X_{d(d)} - C_{end(d)} V_d)$$
$$+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} \right) \left(\frac{X_{d(s)}}{V_s} \right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{d(d)}}{V_d} \right)$$

Undissolved drug in the ${\rm GIS}_{\rm jejunum}$:

$$\begin{aligned} \frac{dX_{ud(j)}}{dt} &= -z_{(j)}(X_{d(j)} + X_{ud(j)})^{1/3} X_{ud(j)}^{2/3} \left(C_{s(j)} - \frac{X_{d(j)}}{V_j} \right) + k_{pre(j)} \left(X_{d(j)} - C_{end(j)} V_j \right) \\ &+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{ud(d)}}{V_d} \right) \end{aligned}$$

Dissolved drug in the ${\rm GIS}_{\rm jejunum}$:

$$\frac{dX_{d(j)}}{dt} = z_{(j)} (X_{d(j)} + X_{ud(j)})^{1/3} X_{ud(j)}^{2/3} \left(C_{s(j)} - \frac{X_{d(j)}}{V_j} \right) - k_{pre(j)} (X_{d(j)} - C_{end(j)} V_j)$$

$$+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{d(d)}}{V_d} \right)$$

$$\begin{split} V_{s} &= V_{s,0} \times e^{-\left(\frac{\ln(2)}{GE}\right)t} \ [mL] & (\text{if } t > 45 \text{ min, } t = 45) \\ V_{d} &= V_{d,0} \ [mL] \\ V_{j} &= V_{s,0} \times \left(1 - e^{-\left(\frac{\ln(2)}{GE}\right)t}\right) + (k_{\text{sec}(s)} + k_{\text{sec}(d)}) \times t \ [mL] (\text{if } t > 45 \text{ min, } t = 45) \\ k_{\text{sec}(s)} &= 1 \ [mL/\text{min}] & (\text{if } t > 45 \text{ min, } k_{\text{sec}(s)} = 0) \\ k_{\text{sec}(d)} &= 1 \ [mL/\text{min}] & (\text{if } t > 45 \text{ min, } k_{\text{sec}(d)} = 0) \end{split}$$
物質収支式 (消化管内, 全身循環)

Undissolved drug in the stomach:

When $t < t_{lag}$,

$$\frac{dX_{ud(s)}}{dt} = -z_{(s)}(X_{d(s)} + X_{ud(s)})^{1/3}X_{ud(s)}^{2/3}\left(C_{s(s)} - \frac{X_{d(s)}}{V_s}\right)$$

When $t \ge t_{lag}$,

$$\frac{dX_{ud(s)}}{dt} = -z_{(s)}(X_{d(s)} + X_{ud(s)})^{1/3}X_{ud(s)}^{2/3}\left(C_{s(s)} - \frac{X_{d(s)}}{V_s}\right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)}\right)\left(\frac{X_{ud(s)}}{V_s}\right)$$

Dissolved drug in the stomach:

$$\frac{dX_{d(s)}}{dt} = z_{(s)}(X_{d(s)} + X_{ud(s)})^{1/3} X_{ud(s)}^{2/3} \left(C_{s(s)} - \frac{X_{d(s)}}{V_s}\right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)}\right) \left(\frac{X_{d(s)}}{V_s}\right)$$

Undissolved drug in the duodenum:

When $t < t_{lag}$,

$$\frac{dX_{ud(d)}}{dt} = -z_{(d)} \left(X_{d(d)} + X_{ud(d)} \right)^{1/3} X_{ud(d)}^{2/3} \left(C_{s(d)} - \frac{X_{d(d)}}{V_d} \right) + k_{pre(d)} \left(X_{d(d)} - C_{end(d)} V_d \right) \\ - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{ud(d)}}{V_d} \right)$$

When $t \ge t_{lag}$,

$$\frac{dX_{ud(d)}}{dt} = -z_{(d)} \left(X_{d(d)} + X_{ud(d)} \right)^{1/3} X_{ud(d)}^{2/3} \left(C_{s(d)} - \frac{X_{d(d)}}{V_d} \right) + k_{pre(d)} \left(X_{d(d)} - C_{end(d)} V_d \right)$$
$$+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} \right) \left(\frac{X_{ud(s)}}{V_s} \right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{ud(d)}}{V_d} \right)$$

Dissolved drug in the duodenum:

$$\frac{dX_{d(d)}}{dt} = z_{(d)} (X_{d(d)} + X_{ud(d)})^{1/3} X_{ud(d)}^{2/3} \left(C_{s(d)} - \frac{X_{d(d)}}{V_d} \right) - k_{pre(d)} (X_{d(d)} - C_{end(d)} V_d) + \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} \right) \left(\frac{X_{d(s)}}{V_s} \right) - \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{d(d)}}{V_d} \right) - \frac{2DF}{R} X_{d(d)} P_{eff}$$

Undissolved drug in the intestine:

$$\begin{aligned} \frac{dX_{ud(i)}}{dt} &= -z_{(i)} \left(X_{d(i)} + X_{ud(i)} \right)^{1/3} X_{ud(i)}^{2/3} \left(C_{s(i)} - \frac{X_{d(i)}}{V_i} \right) + k_{pre(i)} \left(X_{d(i)} - C_{end(i)} V_i \right) \\ &+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{ud(d)}}{V_d} \right) - k_{(i-c)} X_{ud(i)} \end{aligned}$$

Dissolved drug in the intestine:

$$\frac{dX_{d(i)}}{dt} = z_{(i)} (X_{d(i)} + X_{ud(i)})^{1/3} X_{ud(i)}^{2/3} \left(C_{s(i)} - \frac{X_{d(i)}}{V_i} \right) - k_{pre(i)} (X_{d(i)} - C_{end(i)} V_i)$$
$$+ \left(-\frac{dV_s}{dt} + k_{sec(s)} + k_{sec(d)} \right) \left(\frac{X_{d(d)}}{V_d} \right) - k_{(i-c)} X_{d(i)} - \frac{2DF}{R} X_{d(i)} P_{eff}$$

Fraction escaped from gut metabolism: $F_g = 1 \label{eq:Fg}$

Fraction escaped from liver metabolism:

$$F_{\rm h} = \left(1 - \frac{CL_{\rm tot}}{Q_{\rm h}}\right)$$

Drug in the central compartment:

$$\frac{dX_{cen}}{dt} = \left(\frac{2DF}{R}X_{d(d)}P_{eff} + \frac{2DF}{R}X_{d(i)}P_{eff}\right)F_{g}F_{h} - k_{12}X_{cen} - k_{13}X_{cen} + k_{21}X_{peri1} + k_{31}X_{peri2} - k_{e}X_{cen}$$

Drug in the peripheral compartment 1:

$$\frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{peri1}}}{\mathrm{dt}} = \mathrm{k}_{12}\mathrm{X}_{\mathrm{cen}} - \mathrm{k}_{21}\mathrm{X}_{\mathrm{peri1}}$$

Drug in the peripheral compartment 2:

$$\frac{\mathrm{dX}_{\mathrm{peri2}}}{\mathrm{dt}} = \mathrm{k}_{13}\mathrm{X}_{\mathrm{cen}} - \mathrm{k}_{31}\mathrm{X}_{\mathrm{peri2}}$$

Plasma drug concentration:

$$C_p = \frac{X_{cen}}{V_c}$$

Duodenal drug concentration:

$$C_d = \frac{X_{d(d)}}{V_d}$$

$$V_{s} = V_{s,0} \times e^{-\left(\frac{\ln(2)}{GE}\right)t} \text{ [mL]} \qquad (\text{if } t > 45 \text{ min, } t = 45)$$

$$V_{d} = V_{d,0} \text{ [mL]}$$

$$V_{i} = V_{s,0} \times \left(1 - e^{-\left(\frac{\ln(2)}{GE}\right)t}\right) + (k_{\text{sec}(s)} + k_{\text{sec}(d)}) \times t \text{ [mL] (if } t > 45 \text{ min, } t = 45)$$

$$k_{\text{sec}(s)} = 1 \text{ [mL/min]} \qquad (\text{if } t > 45 \text{ min, } k_{\text{sec}(s)} = 0)$$

$$k_{\text{sec}(d)} = 1 \text{ [mL/min]} \qquad (\text{if } t > 45 \text{ min, } k_{\text{sec}(d)} = 0)$$

難水溶性弱塩基性医薬品の生体内挙動予測技術開発を目指した in vitro-in silico アプローチの確立

松井 一樹