

「人工膜を用いた経口吸収性評価法の確立と応用」

菅野清彦

ファイザー株式会社中央研究所薬剤研究室

(1) 研究の狙い

人工膜を用いた経口吸収性評価法の確立は、高精度 HTS 系の確立に留まらず、in vivo や cell 系アッセイとの差分解析 (in combo 利用)、膜透過メカニズムの検討、in silico 確立も視野に入れた研究である。

経口投与後の薬物は、分散、溶解、膜透過の各過程を経て消化管吸収される。分散・溶解とは異なり、膜透過は製剤的工夫による改善が難しい。従って、創薬段階で、膜透過性の高い化合物を見出すことは必須である。消化管膜透過は、主に、受動拡散による細胞膜透過、細胞間隙透過、トランスポーターによる能動輸送がある。研究開始当時、トランスポーター研究は急速に進展しており、特に日本はその研究において非常に優位な状況にあった。一方、受動拡散による細胞膜透過の研究は、オクタノール分配係数(logP_{oct})の延長上に留まっていた。

Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA)は、1998年に Kansy ら(Roche)により報告された。PAMPA は、有機溶媒に溶かした脂質を疎水性フィルタ(96 well plate filter)に添加して膜を作成し、膜透過性を測定する方法である。Kansy らの方法では、リン脂質として egg lecithin、有機溶媒として dodecan を用いていた(当時、実験の詳細は記述されていなかった)。しかし、この方法では、吸収率が 0-90%に相当する膜透過を適切に評価することは出来なかった。また、塩基性化合物の透過性を高めるため、生理的条件ではない pH 7.4 を便宜的に用いていた。そこで、これらの欠点を克服する研究を決意した。しかし、多数あるリン脂質や有機溶媒を網羅的に試すこと難しく、何らかの道標が必要であった。そこで、生体を模倣することを研究の指標とした(bio-mimetic, bio-inspired)。

(2) 結果

(2-1) 高精度 HTS 化^{1,2}

消化管膜の組成に近いリン脂質組成を用い、有機溶媒としては alkyldiene を用いた(リン脂質の不飽和部分を模擬)。30 化合物(分子量(MW) > 225)をモデル薬物として用い、ヒト経口吸収率(Fa%)の予測性を評価したところ、良好な相関性を得た($r = 0.858$ 。トランスポーター基質、低溶解性薬物は除く)。また、消化管内の生理的条件に近い pH 5.5-6.5 で経口吸収率予測性が高かった。

(2-2) 差分解析による吸収経路解析(in combo 利用)

(2-2-1) 細胞間隙経路計算モデルとの組み合わせ^{3,4}

モデル薬物の分子量範囲を拡大すると、分子量が小さい化合物や塩基性化合物で、PAMPA による予測に比べ、実測 Fa%が揃って大きかった。細胞間隙経路の寄与が考えられた。そこで、実測 Fa%と PAMPA 予測値との差分解析により、細胞間隙経路の計算モデルを最適化できると考えた。計算モデルとしては、以前より、分子篩関数と電場関数の積が知られていた。このモデルは、化

化合物の独立変数として pK_a と MW のみを用いた in silico model である。しかし、モデルの係数(細胞間隙経路の見かけの半径と電位)を正常状態のヒトに対して十分な数のデータを用いて最適化した報告はなかった。モデルを最適化し、PAMPA と組み合わせることで Fa% 予測性は大幅に向上した。また、ヒト消化管膜透過係数 (P_{eff}) の予測も可能であった。細胞間隙経路は、主要な薬物透過経路ではないが、簡単な in silico 予測であるため、benefit/cost 比は良い。

(2-2-2) 他のアッセイとの組み合わせ

上述の検討で、受動拡散による膜透過は予測可能となった。一方で、現在 Caco-2 assay も企業内で利用されている。Caco-2 は、トランスポータを有していることが PAMPA に対する大きな利点である。しかし、日常測定される A to B の膜透過性値からはトランスポータの関与を判別することは出来ない。そこで、PAMPA と Caco-2 の差分解析を、既知のトランスポータ基質を用いて行ったところ、両者の組み合わせでトランスポータの基質となる可能性を診断できることがわかった⁵。肝要な点は、細胞間隙経路の影響を補正することである⁶。このように、PAMPA を他の方法と組み合わせることで、情報付加価値を向上させることが出来る。迅速溶解度測定との組み合わせによる BCS 分類も報告した⁷。

(2-3) Ion pair transport⁸

本研究を通じて、親水性塩基性化合物の PAMPA 膜透過性に対し、酸性リン脂質が大きな促進効果を与えることを見出した。促進効果を詳細に検討したところ、飽和性があり、カチオン性化合物により阻害されることを見出した。そこで、酸性リン脂質と親水性塩基性化合物がイオンペアを形成して膜を透過する機構を提案した (ion pair transport (IPT))。IPT は以前より示唆されていたが、適切な内因性酸性物質が知られていなかった。酸性リン脂質は、消化管上皮細胞の刷子縁膜管腔側に多量に分布していることから、生体でも同様の機構が存在すると推察している。

(2-4) In silico 予測

後述の要旨に記載したように、今後 in silico は、統計解析的手法による black box 的な方法から、メカニズムを明示的にモデルに反映した方法に変遷していくと考えている⁹。そこで、pH 分配理論に、これまでに得られた2つの知見(細胞間隙経路計算モデルと IPT)を組み込んだ明示的モデルを検討した¹⁰。化合物の独立変数として $\log P_{oct}$, pK_a , MW の3つだけを用いた場合でも、ある程度 Fa% を予測可能であることが示唆された。

謝辞

本研究は、中外製薬において行われたものであり、お世話になった方々に大変感謝致します。結果(2-2-2)と結果(2-4)に関しては、小畑香樹氏、東田敦子氏、齋藤良一氏との共同研究であり、大変感謝致します(各氏を第一著者として発表されております。)。また、ご指導いただきました、東邦大学寺田教授に大変感謝致します。

主要論文

¹ Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H., *J Biomol Screen* **2001**, 6, 189-196.

² Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H.; Saitoh, K.; Terada, K., *Int J Pharm* **2001**, 228, 181-188.

³ Sugano, K.; Takata, N.; Machida, M.; Saitoh, K.; Terada, K., *Int J Pharm* **2002**, 241, 241-251.

- ⁴ Sugano, K.; Nabuchi, Y.; Machida, M.; Aso, Y., *Int J Pharm* **2003**, 257, 245-251.
- ⁵ 東田敦子, 齊藤良一, 菅野清彦, 小畑香樹, 名淵義明, 町田実, 満井哲也, 麻生良典, 日本薬学会第 124 回年会、2004, 大阪
- ⁶ Saitoh, R.; Sugano, K.; Takata, N.; Tachibana, T.; Higashida, A.; Nabuchi, Y.; Aso, Y., *Pharm Res* **2004**, 21, 749-755.
- ⁷ Obata, K.; Sugano, K.; Machida, M.; Aso, Y., *Drug Dev Ind Pharm* **2004**, 30, 181.
- ⁸ Sugano, K.; Nabuchi, Y.; Machida, M.; Aso, Y., *Int J Pharm* **2004**, 275, 271-278.
- ⁹ Sugano, K. LogP2004 symposium, Zurich, 2004
- ¹⁰ Obata, K.; Sugano, K.; Machida, M.; Aso, Y., *Int J Pharm* **2004**, 30, 181.

菅野清彦

ファイザー株式会社中央研究所薬剤研究室

(1) 薬物の消化管吸収をめぐる諸問題とその解決に向けた理論と新技術

医薬品開発における物性研究には、実社会的に重要なフロンティアが残されている。

消化管吸収をめぐる諸問題には、難水溶性、低膜透過性、食事の影響の予測などがある。物性研究による解決手段は、構造改変(分子設計)、塩・結晶形選択、製剤技術が挙げられる。これらの解決手段は、医薬品開発において、時系列的に、構造改変から製剤技術の順で検討され、逆戻りは難しい。従って、構造改変の段階(=創薬段階)で解決しておくべきか、あるいは、後の塩・結晶形選択や製剤技術検討で解決可能なのか、意思決定が求められる。しかしながら、創薬段階では、化合物はせいぜい数十~百数十 mg 程度合成されれば良い方であり、分子物性のデータしか得られない。従って、分子物性や化合物構造から問題点と解決手段を予測し、意思決定することは重要な課題となっている。そのためには、消化管吸収や製剤技術に関して、分子構造まで十分に還元された理解と、分子構造から製剤・臨床へ至る再構築が要求される。しかし、現在、分子構造に至る部分が、もう一歩及んでいない。そこを埋めるのは、最新の測定技術であり、計算化学であり、コンピュータシミュレーションである。

酸塩基解離定数

酸塩基解離定数(pK_a)は、研究対象として魅力を感じないかもしれない。しかし、21世紀を迎えるまで、 pK_a 測定は非常に煩雑であり、創薬段階のスピードに追いつけなかった。それゆえ、 pK_a はしばしば見過ごされ、特に、*in silico*では忘れられることが多かった(dryだから?)。生体の大部分は、あるpHを示す水であり、多くの薬物は、その pK_a に応じて、解離型分子と非解離型分子の平衡状態にある。もちろん、 pK_a は、溶解性と膜透過性も規定する。化合物設計では、解離型と非解離型に分離して解析することが重要である($\log D/\log P/pK_a$ の関係)。新しい測定法として、UVスペクトルや電気泳動度のpH依存性を利用した迅速測定法が研究されている^{1,2}。現在でも計算化学による予測は誤差が大きい。

受動拡散によるリン脂質二重膜透過

(理論)意外かもしれないが、受動拡散によるリン脂質二重膜透過には、決定的な理論は無い。小さい分子の場合、Fickの法則から導かれるSolubility-Diffusion Theory (SDT)で説明可能と考えられている。SDTに関しては、分子動力学計算によりリン脂質膜中の部分拡散係数が計算可能になりつつある³。一方で、近年の医薬品は分子量が大きく、本理論の妥当性が疑問視されており、リン脂質二重膜上でのflip-flopを考慮した理論が増えている⁴。刷子縁膜は、負電荷リン脂質が存在しているため、疎水性相互作用に加えて、イオン相互作用も重要である⁵。*In silico*予測は誤差が大きく、実測に置き換わるには至っていない。オクタノール分配係数($\log P$)予測でさえ、 \log 単位で $\pm 0.5 \sim 1$ 、つまり10倍程度の誤差が頻発する。

(測定技術)21世紀に入って、細胞膜を模倣した実用レベルの測定方法が普及し始めた。PAMPA

以外にも、リン脂質カラム⁶やリポソームを用いる方法⁷が開発されている。

溶解性

(理論)溶解性の in silico 予測は、logP や pK_aと比較して難しい。結晶構造の予測が困難なためである。平衡溶解度は、溶液と固体(結晶)の化学ポテンシャルが等しくなる濃度である。溶液科学(創薬物性)から固体科学(製剤)への橋渡しは、科学的に大きな挑戦である。

(測定技術)現在、溶解度は、創薬ロボットにより測定されている。濁度測定を応用した方法⁸や、フィルタ濾過と UV や HPLC を組み合わせた方法⁹が主流である。両者とも 96 well フォーマットで測定可能である。サンプルは DMSO 溶液の場合が多い(一般に、企業では、DMSO に溶解後、各部署にサンプルが配布される)。DMSO の影響を排除するために DMSO の減圧除去を組み込んだ方法もある⁹。溶出試験も、小型化・迅速化が検討されている¹⁰。

塩・結晶形の選択

化合物の塩・結晶形は、吸収性に大きな影響を与える。解離性薬物の場合、塩形成による溶出速度の向上が可能である。また、塩形成や結晶化により、保存安定性や製造適正を改善可能な場合もある。近年、コンピュータ技術やロボット技術が、塩・結晶の合成および同定に導入されている¹¹。

溶解と膜透過の同時評価

候補化合物の難水溶性化に伴い、溶解性向上のための製剤技術が注目されている。これらの製剤技術では、「(見かけの)可溶化」? 「水中に分子状態で分散」である場合も多い。その場合、溶解と膜透過を個別に測定し、シミュレーションで吸収を予測することは難しい。そこで、溶解と膜透過を同時に評価可能な in vitro 系が検討されている¹²。In vitro – in vivo correlation(IVIVC)は、創薬において重要な課題である¹⁰。

Knowledge Management

創薬研究においては、複数の測定が、ある程度平行して行われる(例: PAMPA と Caco-2)。これらのデータを組み合わせて解析することで、情報付加価値を向上できる¹³。創薬ロボットから流れ出る膨大なデータから、いかにして知識を取り出し、分子設計や化合物選択に利用するか? が成功の鍵を握っている¹⁴。

(2) Virtual ADME の将来展望

ちょうど、望遠鏡が宇宙への目を開いたように、顕微鏡がミクロの世界の秘密を明かしたように、コンピュータが今や自然の本性に向かって、わくわくするような新しい窓を開こうとしている。

Heinz Pagels, 1998, The dreams of reason の広告

今後、コンピュータの性能向上に伴い、Virtual ADME の利用が拡大することは間違いない¹⁵。ここでは、コンピュータが介在する予測全般を Virtual ADME とし、化合物構造から行う予測を in silico とする。

現在

Virtual ADME は創薬現場で既に利用されている。Role of five(水素結合数や分子量などから“薬らしさ”を推定する方法)¹⁶を用いた化合物ライブラリ設計や、ヒト材料を用いた in vitro 試験が

らのヒト予測などである。In silico は、モデルや理論を仮定せず、化合物構造から統計的手法を用いて予測する研究が多い。

近い将来(0~10年)

実測スクリーニング体系を反映した Virtual ADME の利用が進む(図1)。ADME 素過程に対する in silico が確立される(ADME 素過程は、分子レベルまで還元した過程。例:非解離型分子種の固有溶解度, pKa, HSA 結合率)。多分子系 ADME 素過程(溶解度や受動拡散による膜透過)は、明示的モデルによる定量計算は難しく、半経験的計算方法(現在の logP 計算のような方法)の優位が続く。従って、未知化合物の予測に関しては精度に限界がある(logP の例から考えて、log 単位で±0.5 が限界?)。タンパク結合や代謝阻害に関しては、半定量的予測が可能となる。代謝速度やトランスポータ輸送速度については定性的予測にとどまる。In silico の精度は、構築に用いた実測値の精度・量・化学構造多様性が左右するので、精度とスピードの高い in vitro 系の確立が in silico 構築の要となる。ADME 素過程は、分子レベルから全身まで記述された PBPK で結合される¹⁷。化合物が実存する場合、実測により in silico/Virtual ADME を検証していく(特に、構造類似化合物シリーズに対して)。実測データの蓄積に伴い、予測精度は向上していく。Systems Biology(生命をシステムとして理解する科学)¹⁸と PK/PD の融合が開始する。

とおい未来(10-30年)

多分子系 ADME 素過程が、明示的モデルによって、高い精度で予測可能になる。薬物構造から *ab initio*(経験的パラメータを一切用いないで、第一原理から行う計算)に予測される。やがて、代謝速度やトランスポータ輸送速度が、高い精度で予測可能になる。Systems Biology と PK/PD は融合されている。

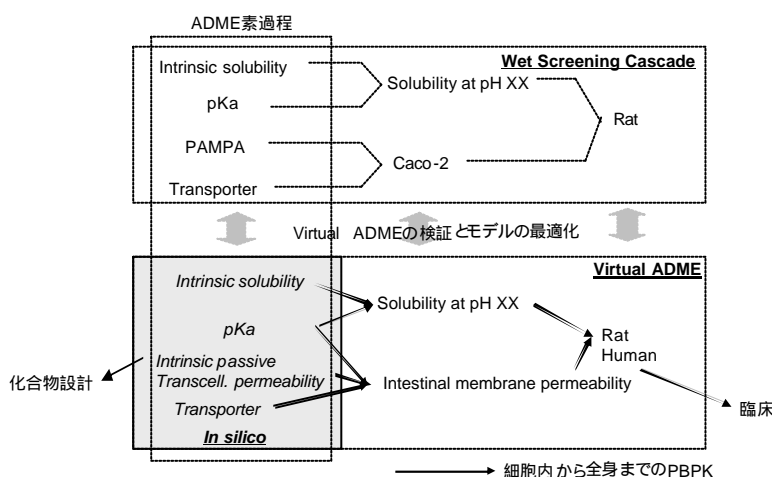


図1 実際のスクリーニングカスケードの構造を反映した Virtual ADME

すごく、とおい、みらい

量子コンピュータなど、現時点での計算速度をはるかに上回る計算機の実用化に伴い、すべての ADME 素過程を、化学構造から高い精度で予測可能となる。実用上実存と同じレベルで、virtual に生体を再現できる。それでも、人体を形成するすべての分子の運動方程式を数値解析することは不可能なので、モデル記述は残る(モデル記述でも、計算爆発は容易に生じる)。また、複雑系理論から導かれる予測の不確定性は間逃れない。コンピュータ内に生体を高いレベルで実現し

た場合、そのコンピュータモデル自体、生体と同じくらい複雑で理解が難しい。従って、創薬に「人間の理解」の介入が必要である限り、研究者は必要とされる（in silico が進めば、研究者が必要なくなるのでは？という心配は杞憂である）。

謝辞 本稿作成に際し、ご助言頂いた、摂南大学山下教授ならびに京都薬科大学藤田助教授に大変感謝致します。

参考文献

- 1 Box, K.; Bevan, C.; Comer, J.; Hill, A.; Allen, R.; Reynolds, D., *Anal Chem* **2003**, 75, 883-892.
- 2 Zhou, C.; Jin, Y.; Kenseth, J. R.; Stella, M.; Wehmeyer, K. R.; Heineman, W. R., *J Pharm Sci* **2005**, 94, 576.
- 3 Bemporad, D.; Essex J. W.; Luttmann C. *J Phys Chem.* **2004**, 108, 4875-4884.
- 4 Burton, P. S.; Conradi, R. A.; Hilgers, A. R. *Adv Drug Deliv Rev* **1991**, 7, 365-386.
- 5 Sugano, K.; Nabuchi, Y.; Machida, M.; Asoh, Y., *Int J Pharm* **2004**, 275, 271-278.
- 6 Pidgeon, C.; Ong, S.; Liu, H.; Qiu, X.; Pidgeon, M.; Dantzig, A. H.; Munroe, J.; Hornback, W. J.; Kasher, J. S.; Glunz, L. *J Med Chem* **1995**, 38, 590-594.
- 7 GLSynthesis inc.
- 8 Bevan, C. D.; Lloyd, R. S., *Anal Chem* **2000**, 72, 1781-1787.
- 9 Chen, T.-M.; Shen, H.; Zhu, C., *Comb Chem High Through Screen* **2002**, 5, 575.
- 10 Takano, T; Sugano, K; Hayashi, Y; Machida, M; Aso, Y PSWC2004, Kyoto, 2004
- 11 Morissette, S. L.; Almarsson, O.; Peterson, M. L.; Remenar, J. F.; Read, M. J.; Lemmo, A. V.; Ellis, S.; Cima, M. J.; Gardner, C. R., *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, 56, 275-300.
- 12 Kataoka, M.; Masaoka, Y.; Yamazaki, Y.; Sakane, T.; Sezaki, H.; Yamashita, S., *Pharm Res* **2003**, 20, 1674-1680.
- 13 Kerns, E. H.; Di, L.; Petusky, S.; Farris, M.; Ley, R.; Jupp, P., *J Pharm Sci* **2004**, 93, 1440.
- 14 Sugano, K. Proceedings of LogP2004 symposium, Zurich, (to be published)
- 15 van de Waterbeemd, H.; Gifford, E., *Nature Rev Drug Discov* **2003**, 2, 192-204.
- 16 Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Adv Drug Deliv Rev* **1997**, 23, 3-25.
- 17 Ito, K.; Kusuhara, H.; Sugiyama, Y., *Pharm Res* **1999**, 16, 225-231.
- 18 Kitano, H., *Nature* **2002**, 420, 206-210.