消化管吸収促進剤の起炎性の *in vitro* 評価

—ヒスタミン受容体を介した粘膜透過性の亢進の寄与—

村上正裕^{*1)}, 内山知実・巽 浩幸・交川佳克・小幡英利・
今岡奈央・佐々木佳代子・友田 寛・村西昌三^{*2)}

Methodology for evaluating inflammation induction potential of enteral absorption enhancers : Epithelial permeability enhancement via histamine receptors

Proinflammatory mediators such as histamine, platelet activating factor and nitric oxide increase intestinal epithelial permeability and lead to disrupt its barrier function. Chemically induced increase in the epithelial permeability could be mediated by stimulation of the release of these mediators. Nevertheless, the contribution of each mediators appears to be difficult to elucidate *in vivo*. Hence, an *in vitro* evaluation methodology for detecting the potential contribution of the mediators to the enhancement in mucosal permeability due to absorption enhancers has been established.

Permeability of the rat colonic epithelial membrane in the presence or absence of the adjuvants was determined *in vitro* with a modified Ussing-type diffusion chambers. Both histamine and its releaser compound 48/80 significantly increased the transepithelial permeability that monitored by using carboxyfluorescein as a poorly permeable maker. The increase in permeability was found to be inhibited by the *in vivo* treatment of the intestine with the intraperitoneal dose of diphenhydramine, a H_1 -blocker, or FPL-52694, a mast cell stabilizer, prior to the excision. The absorption enhancers, oleic acid, lauryl maltoside and sodium deoxycholate showed potent enhancement effects on the epithelial permeability. The enhanced permeability with sodium deoxycholate was found to be significantly suppressed by the H_1 -blocker, indicating that the enhancing effect of sodium deoxycholate

was partially mediated by histamine released within the mucosa. On the other hand, the treatment with H_1 -blocker showed no effect on the mucosal permeability enhanced by oleic acid and lauryl maltoside.

These results demonstrate that the methodology should be of potential usefulness in the evaluation of the possible contribution of inflammatory mediators to chemically induced hyperpermeability in intestinal mucosa especially by absorption enhancers. Investigation on the other inflammatory mediators is in progress.

Masahiro Murakami^{*1)}, Tomomi Uchiyama・
Hiroyuki Tatsumi・Yoshikatsu Majikawa・
Hidenori Obata・Nao Imaoka・
Kayoko Sasaki・Yutaka Tomoda・
Shozo Muranishi^{*2)}

key words : intestinal absorption,
epithelial permeability, absorption enhancer,
inflammation, histamine, methodology

界面活性剤や吸収促進剤などの吸収助剤は、難溶性の薬物や水溶性の薬物の消化管吸収の改善に有用であり、生体適合性の高い吸収促進剤として、これまでに mono-acyl glycerides や fatty acids, alkyl saccharides, bile salts などが見出され、insulin や interferon などの生理活性ペプチドにも有効であることが報告されている¹⁾。しかし、その利用については安全性の保証という課題が残されており、粘膜傷害性や粘液分泌促進、炎症などの局所刺激作用、栄養吸収や粘膜代謝に対する作用などが必要な検討項目としてあげられる。

培養技術の発達により、吸収促進剤の上皮細胞層に対する作用や細胞傷害性を Caco-2 などの培養細胞系において検討した報告がみられる²⁻⁴⁾が、

^{*1)} Research Laboratories, Amato Pharmaceutical Products, Ltd. 天藤製薬㈱研究所

^{*2)} Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University 京都薬科大学製剤学教室
Offprint requests to : Masahiro Murakami, Ph.D., Research Laboratories, Amato Pharmaceutical Products, Ltd., 995 Sasao-cho, Fukuchiyama-shi, Kyoto 620-0932

図 1

筆者らが最近行った検討では、胆汁酸塩など一部の吸収助剤において、培養上皮細胞で認められる透過性亢進効果と *in vivo* で観察される粘膜透過性亢進効果との間に、必ずしも相関性の認められないことが示された (unpublished data). 消化管には、粘膜上皮表面における粘液分泌や、上皮細胞層下における炎症・免疫系細胞の存在など、複数の防御機構が存在する。したがって、起炎性などの安全性面での総合的な評価には組織レベルでの検討が不可欠であり、そのための方法論を確立することが吸収助剤の実用化を図るうえで重要であると考えられる。また、図 1 に示すように、種々の刺激に応答して粘膜組織内で放出される histamine や platelet-stimulating factor (PAF), nitric oxide (NO), 活性酸素等の炎症性の化学伝達物質 (inflammatory mediator) には、吸収促進剤と同様に、消化管粘膜の透過性増大作用を示すものがあり、粘膜構造の破壊をもたらすことも知られている⁴⁻⁷⁾。しかし、吸収促進剤の粘膜透過性亢進作用を、これら炎症性メディエーターとの関連から検討した報告はほとんど見当たらない。

本研究の目的は、炎症系の特異的阻害剤を用いた *in vitro* 評価系において、各種吸収促進剤の粘膜透過性の亢進作用における炎症性メディエーターの寄与を解明することにある。本報では、粘膜組織の肥満細胞 (mucosal mast cell, MMC) 様細胞に貯蔵されている histamine の寄与を、ラットの摘出結腸を用いて検討した結果について報告する。

方 法

(1) 薬 物

粘膜非透過性のマーカーとしては、水溶性蛍光色素 5(6)-carboxyfluorescein (CF) を pH 7.4 のリンゲル液に溶解して用いた。胆汁酸塩として sodium deoxycholate (Na-DC) を、吸収促進剤として oleic acid (OA) および n-lauryl- β -D-maltopyranoside (LM) を用いた。ヒスタミン遊離剤としては compound 48/80 を、histamine 受容体阻害剤 (H_1 -receptor antagonist) として diphenhydramine および tripeleminamine を用いた。

(2) *In vitro* 透過実験

粘膜透過性の評価は過去の報告⁸⁾に従い、modified Ussing chamber 法により行った。雄性 Wistar 系ラットの結腸部の筋層を剝離し、Ussing chamber に装着し、粘膜側に CF を含む薬液を投与後、漿膜側の CF 濃度を経時的に測定した。なお、CF 濃度の測定は蛍光光度法 (Ex: 490 nm, Em: 520 nm) により行った。各種吸収促進剤投与後の粘膜透過性の変化を、CF の見掛けの透過係数 (Papp) の変化から評価した。なお、Papp は Fick の拡散則より、累積 CF 透過量-時間曲線の直線部分の傾き (Slope) から、次式に従い算出した。

$$Papp = \text{Slope} \times V / (A \times 60 + D_0)$$

ここで、A は見掛けの粘膜表面積、V は投与側の液量、 D_0 は薬物投与量である。

一方、消化管粘膜の各種炎症系の阻害剤による処理は、予め *in vivo* において行った。すなわち、麻酔下ラットの腹腔内に阻害剤溶液を投与し、10 分後に腹部大動脈から脱血を行い、腸管を摘出した。

(3) *In situ* 吸収実験

一夜絶食した Wistar 系雄性ラット (230~280 g) を用い、ペントバルビタール麻酔下、*in situ* closed loop 法により行った⁹⁾。CF の pH 7.4 等張リン酸緩衝溶液に吸収促進剤を溶解し、結腸ループ内に投与後 (1 mg/kg)、頸動脈に留置したカテーテルを介して経時的に血液サンプルを採取し

図2 Effect of histamine and a histamine releaser on the permeability of CF across the isolated rat colonic mucosa

Diphenhydramine (20 mg/kg, hatched column) or FPL-52694 (100 mg/kg, shaded column) was intraperitoneally administered to the rat 10 minutes prior to excision of the colonic segment.

Results were expressed as the mean $\pm$ SE of more than four experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図3 Effect of sodium deoxycholate on the permeability of CF across the isolated rat colonic mucosa

Diphenhydramine (20 mg/kg, hatched column) or FPL-52694 (100 mg/kg, shaded column) was intraperitoneally administered to the rat 10 minutes prior to excision of the colonic segment.

Results were expressed as the mean $\pm$ SE of at least three experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

た。血漿中 CF 濃度-時間曲線下面積 AUC は台形公式により求めた。なお、各阻害剤は *in vitro* の実験と同様に、薬液投与前 15 分に腹腔内に投与した。

結果

(1) 吸収促進剤の起炎性の *in vitro* における評価法の確立

調製した腸管粘膜組織が、外部からの histamine の投与や histamine 遊離刺激に対する応答性を保持しているかどうかを調べる目的で、粘膜下組織側に histamine あるいは MMC からの histamine の遊離を促進する compound 48/80 を投与して、粘膜透過性の変化を調べた。結果を図 2 に示す。単離した結腸粘膜組織の透過性は、 1.0×10^{-5} M histamine および 1 mg/ml compound 48/80 の投与により顕著に増大した。この粘膜透過性の亢進は、 H_1 阻害剤である diphenhydramine (20 mg/kg) および mast cell stabilizer である FPL-52694 (100 mg/kg) の腹腔内前処理によって抑制されることが確認された。

(2) 胆汁酸塩による粘膜透過性の増大における histamine の寄与

胆汁酸は、MMC からの histamine の遊離促進作用を有することが知られている。そこで、強い粘膜透過性亢進作用の知られている sodium deoxycholate を用いて、胆汁酸塩による腸管粘膜透過性の増大が上皮細胞に対する直接的な作用であるのか、あるいは histamine を介した間接的な作用であるのかを *in vitro* において調べた。図 3 に示すように、5 mM sodium deoxycholate の添加によって CF の見掛けの粘膜透過性は、 $3.35 \pm 0.51 \times 10^{-6}$ cm/sec から $9.0 \pm 0.25 \times 10^{-6}$ cm/sec と顕著に増大したが、その透過性増大の一部は、diphenhydramine (6.44 ± 0.53 cm/sec, $p < 0.05$) ならびに FPL-52694 (6.45 ± 0.33 cm/sec, $p < 0.05$) の前処理によって有意に抑制されることが明らかとなった。この結果は、sodium deoxycholate による粘膜透過性亢進作用の一部は、MMC 様細胞からの histamine 遊離作用に基づく間接的な作用であることを示唆している。

図4 Effects of oleic acid and lauryl maltoside on the *in vitro* permeability of CF across the isolated colonic mucosa

Diphenhydramine (20 mg/kg, hatched column) was intraperitoneally administered to the rat 10 minutes prior to excision of the colonic segment.

Results were expressed as the mean $\pm$ SE of six experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(3) Oleic acid および lauryl maltoside による吸収促進における histamine の関与

吸収促進作用が強く、粘膜傷害性の低い吸収促進剤としての有用性が報告されている oleic acid¹⁰⁾や lauryl maltoside⁹⁾などの脂肪酸類について、*in vitro* および *in vivo* における検討を行い比較した。図4に示すように、10 mM oleic acid および 5 mM lauryl maltoside は、*in vitro* においていずれも顕著な結腸粘膜透過性の亢進効果を示したが、その透過性の亢進は diphenhydramine の前処理による影響を受けなかった。

一方、 H_1 阻害剤を同様に腹腔内前投与し、15分後に吸収促進剤を含んだ薬液を結腸投与したときの血中プロファイルならびに投与後1時間までのAUCをそれぞれ図5および図6に示す。*In vitro*の結果とは異なり、*in vivo*ではoleic acidやlauryl maltosideの併用によるCFの吸収の増大の一部が、diphenhydramineならびにtripelenamineによって有意に抑制されるという結果が得られた。なお、 H_2 阻害剤であるcimetidineによる前処置は無効であった。

図5 Time profile of plasma concentration of CF in rats after administration with absorption enhancers

Histamine-receptor antagonists were administered intraperitoneally to the rats 15 minutes prior to dosing with CF.

Results were expressed as the mean $\pm$ SE of at least three experiments.

考 察

Millerらは、ウサギ回腸に histamine あるいは histamine monochloramine を灌流することによって、 10^{-5} M で血中から腸管腔への ^{51}Cr -EDTA の漏出を顕著に増加させることを報告している⁵⁾。EDTA は細胞間透過経路のマーカー物質であり、histamine の投与により消化管粘膜の膜抵抗値の減少が観察¹¹⁾されることから、histamine による粘膜透過性の亢進は細胞間隙経路を介する物質輸送を増加するものと考えられる。

図6 Effect of pretreatment with histamine-receptor antagonists on enhanced absorption of CF with absorption enhancers in the rat large intestine

Results were expressed as the mean $\pm$ SE of at least three experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

ns: not significant

しかし *in vivo* では、炎症性メディエーターの作用を、消化管粘膜上皮に対する効果と、血管内皮細胞層の透過性¹²⁾や血流速度¹³⁾に対する効果とに分離して評価することは困難である。これらの作用を分離するために、本研究ではラットの摘出結腸粘膜を用いたが、筋層部を剥離した腸組織の粘膜固有層側に 10^{-5} M の histamine を投与することによって、粘膜透過性が顕著に亢進することが確認された(図2)。また、histamine 遊離剤である compound 48/80 によっても有意に透過性が増大することが示された(図2)。腸管粘膜組織中には 2×10^4 個/mm³ 以上の mast cell が存在するといわれており、histamine や chymase(mast cell

protease-II), PAF, 各種 eicosanoids などが脱顆粒に伴い放出される。Chymase には、tight junction 構成蛋白質に作用して細胞間隙経路を介する物質透過性を高める効果のあることが報告¹⁴⁾されているが、H₁阻害剤である diphenhydramine が FPL-52694 と同様に compound 48/80 の作用を完全に抑制(図2)したことは、この条件下では chymase の寄与はあまり大きくないことを示唆している。ラットの腸管では、MMC よりもむしろ enterochromaffinlike cell (ELC) が多量の histamine を貯留しているといわれており、compound 48/80 の histamine 遊離刺激による粘膜透過性の増大と、MMC の安定化剤である FPL-52694 によるその抑制作用がいずれの炎症細胞系によるものかは明らかではない。しかし、起炎性に基づく透過性の変化を評価するために必要と考えられる腸管粘膜の刺激応答性は、摘出や粘膜剥離などの操作を経ても保持されていることが本研究より明らかとなった。また、各阻害剤の *in vivo* 腹腔内前処置の有効性が確認され、*in vitro* における阻害剤の併用や摘出後の処理による影響を除外できることから、結果の解釈がより容易になるものと考えられる。

吸収促進剤の作用機構については、近年、主にその細胞内分子機構との関連を明らかにする目的で、微視的な検討がなされてきた。たとえば、本検討に用いた oleic acid では、刷子縁膜の膜流動性を高めて電解質の輸送に影響する一方、これを引き金として、カルモジュリン依存性のカルシウム伝達系を賦活化し、細胞間透過性を制御している細胞骨格系蛋白質に影響を与えることが作用機構として示唆されている¹⁵⁾。しかし、いずれの吸収促進剤についても、上皮細胞層以外の粘膜組織における作用はほとんど明らかにされていない。したがって、吸収促進剤の作用と局所における炎症性メディエーターの放出との関連性を明らかにすることは、個々の吸収促進剤の作用機構の全体像を把握し、その安全性を考慮するうえで重要であると思われる。そこで、「吸収促進剤のなかには、炎症性メディエーターを介して間接的に粘膜透過性を増大するものがある」という研究仮説(図1)

のもとに、透過性亢進作用を有する代表的な化合物について、先に妥当性を確認した *in vitro* 評価系において、その粘膜透過性亢進機構における histamine の関与を調べた。

Oleic acid ならびに lauryl maltoside による粘膜透過性の増大は、 H_1 阻害剤の前処置により有意な変化が認められなかった(図4)のに対して、sodium deoxycholate による粘膜透過性の増大は H_1 阻害剤により有意に抑制されることが明らかとなった(図3)。この結果から、上皮細胞層に対する胆汁酸塩の作用は、粘膜組織内での histamine の遊離に基づく透過性の増大が間接的に寄与しており、培養上皮細胞系に対する効果が比較的低いこと(unpublished data)を、その作用点の相違によってうまく説明できることが示唆された。ただし、sodium deoxycholate による histamine の遊離刺激が MMC や ELC に対する直接的な作用であるかどうかは、本研究からは明らかとはされなかった。IgE の関連する機構以外にも間接的な作用の可能性が考えられ、たとえば Kanwar らは、NO 合成酵素の阻害が MMC からの histamine をはじめとする炎症性メディエーターの遊離を促し、粘膜透過性を増大することを報告¹⁶⁾している。一方、筆者らが比較的安全性の高い吸収促進剤として報告してきた oleic acid および lauryl maltoside では、本実験条件下では histamine の関与のないことが示された(図4)。しかし、*in vivo* の結果は、投与初期における histamine の関与を否定しておらず、このことを明らかにするためには、 H_1 阻害剤との相互作用および内皮細胞透過性や血流速度への影響など、さらに詳細な検討が必要である。

腸管粘膜組織には、すでに述べたように、histamine 以外にも透過性を制御する内因性物質が存在しており、吸収促進剤の起炎性の有無を明らかにするためにはさらに詳細な検討が必要である。その際、ここで示した方法論は、他の炎症系メディエーターの寄与を明らかにする際にも有用であるものと考えられる。また、このような研究は、吸収促進剤の作用機構の全体像の把握やメカニズムの解明に寄与するものと考えられ、さらに、安

全性の高い吸収助剤の選択やその使用濃度の決定に際し、有益な基礎的情報を与えるものと期待される。

結 論

炎症性化学物質の特異的阻害剤を有効に使用することによって、摘出粘膜組織を用いた *in vitro* 評価系において吸収促進剤の起炎性を簡易に評価できることを示した。さらに、本評価系における検討により、sodium deoxycholate による粘膜透過性の亢進がその粘膜内での histamine 遊離刺激作用に基づく間接的な効果であることを示唆することができた。

高純度 oleic acid, HCO-60 および lauryl maltoside を供給していただいた(株)日本油脂、(株)ニッコーケミカルズおよび(株)日本精化の各社に深謝致します。

文 献

- 1) Muranishi S: Absorption enhancers. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 7: 1-33, 1990.
- 2) Lindmark T, Nikkilä, Artursson P: Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. J. Pharm. Exp. Ther. 275: 958-964, 1995.
- 3) Anderberg EK, Nyström C, Artursson P: Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. J. Pharm. Sci. 81: 879-887, 1992.
- 4) Salzman AL, Menconi MJ, Unno N, Ezzell RM, Casey DM et al.: Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2Bbe intestinal epithelial monolayers. Am. J. Physiol. 268: G361-G373, 1995.
- 5) Wallace JL, Chin BC: Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. Proc. Sci. Exp. Biol. Med. 214: 192-203, 1997.
- 6) Miller MJS, Zhang X-J, Barkemeyer B, Sadowska-Krowicka H, Eloby-Childress S et al.: Potential role of histamine monochloramine in a rabbit model of ileitis. Scand. J. Gastroenterol. 26: 852-858, 1991.
- 7) Travis SPL, Jewell DP: Regional differences in the response to platelet-activating factor in rabbit colon. Clin. Sci. 82: 673-680, 1992.
- 8) Yodoya E, Uemura K, Tennma T, Fujita T, Murakami M et al.: Enhanced permeability of tetragas-

- trin across the intestinal membrane and its reduced degradation by acylation with various fatty acids in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 : 1509-1513, 1994.
- 9) Murakami M, Kusanoi Y, Takada K, Muranishi S : Assessment of enhancing ability of medium-chain alkyl saccharides as new absorption enhancers in rat rectum. *Int. J. Pharm.* 19 : 159-169, 1992.
 - 10) Yoshikawa H, Muranishi S : Lymphatic transport of polar drugs after gastrointestinal administration. *Lymphatic Transport of Drugs*. (eds. Charmsn WN, Stella VJ), CRC Press, Boca Raton, 1992, p 233-253.
 - 11) Takeuchi K, Ohtsuki H, Nobuhara Y, Okabe S : Mechanisms of irritative activity of compound 48/80 on rat gastric mucosa. *Digestion* 33 : 34-44, 1986.
 - 12) Michel CC, Kendll S : Differing effects of histamine and serotonin on microvascular permeability in anesthetized rats. *J. Physiol.* 501.3 : 657-662, 1997.
 - 13) Mrtillaro NA, Granger DN, Kvietys PR, Rutili G, Taylor AE : Effects of histamine and histamine antagonists on intestinal capillary permeability. *Am. J. Physiol.* 240 : G381-G386, 1981.
 - 14) Scudamore CL, Thornton EM, McMillan L, Newlands GFJ, Miller HRP : Release of the mucosal mast cell protease-II, during anaphylaxis in associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *J. Exp. Med.* 182 : 1871-1881, 1995.
 - 15) Muranishi S, Murakami M : Enhancing mechanisms of intestinal drug permeation produced by absorption enhancers. *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991*. (ed. Crommelin DJA), FIP The Hage, 1992, p 139-147.
 - 16) Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P : Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cell. *Am. J. Physiol.* 266 : G222-G229, 1994.