S1-10

In vitro 評価系を用いたペプチド性医薬品の経肺吸収に 及ぼす諸要因の検討

○藤田卓也、後藤新治、奥村茂樹、山本 昌、村西昌三
京都薬科大学・製剤学教室

EFFECTS OF VARIOUS FACTORS ON PULMONARY ABSORPTION OF PEPTIDE DRUGS USING *IN VITRO* EXPERIMENTAL SYSTEMS

Takuya FUJITA, Shinji GOTOH, Shigeki OKUMURA,
Akira YAMAMOTO and Shozo MURANISHI

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto 607

【目的】生理活性ペプチドの注射以外の投与部位として各種粘膜部位が注目を集めているが、とりわけ肺は比較的薬物の吸収が良好なことからペプチド性医薬品の新規投与部位として有望視されている。我々はこれまでに insulin、calcitonin をモデルペプチドとしてラット *in situ* の系を用いて経肺投与実験を行い、これらペプチドの肺吸収性が吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤を併用することにより大きく改善することを報告してきた^{1,4)}。また、insulin のラット肺組織ホモジネート中での分解特性を小腸粘膜ホモジネートと比較し、insulin は肺組織ホモジネートにおいても小腸同様速やかに分解されること、さらにタンパク分解酵素阻害剤の併用による insulin の肺吸収性の増大と肺組織ホモジネート中での insulin の安定化との間には比較的良好的な相関が得られることも明らかにしてきた⁵⁾。そこで本研究では、ペプチドの肺吸収性を *in vitro* で評価するためのモデルとして肺 type II 様培養上皮細胞株 A-549^{6,7)} およびアフリカツメガエル摘出肺組織⁸⁾ を用い、FITC-dextran (FDs) や insulin、calcitonin の肺上皮細胞における透過性を検討するとともに A-549 細胞ホモジネート中におけるこれらペプチドの分解特性に関してもあわせて検討を行った。

【実験方法】(1) ペプチドの A-549 培養細胞透過性：A-549 細胞は 5 % ウシ胎児血清および各種抗生物質を含む Dulbecco's Modified Eagles Medium を用い、37 °C - 5 % CO₂ インキュベーター内で単層培養した。透過実験は Transwell™ を用い、単層細胞の apical 側に各種 FDs およびペプチド溶液を添加し、basolateral 側に透過してきた薬物量を測定することにより行った⁹⁾。FDs の定量は蛍光法により、insulin および calcitonin の定量は逆相 HPLC により行った。

(2) A-549 細胞およびラット肺組織ホモジネートの調整：単層培養した A-549 細胞を Hanks Balanced Salt Solution を用いて洗浄後、剥離器具を用いて剥離し、氷冷下テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。また、ラット肺組織ホモジネートは常法に従って調製した⁵⁾。得られたホモジネートは 100,000 × g、60 分間冷却遠心し、得られた上清、沈殿をそれぞれ細胞質画分、細胞膜画分として安定性実験に供した。

(3) 安定性実験：ホモジネート中でのペプチドの安定性実験は、37 °C 条件下各種濃度のペプチド溶液 (300 μl) をホモジネート (最終タンパク濃度 1.5 mg/ml: 300 μl) に添加し、経時的にサンプリングすることにより行った。氷冷下、50 % 酢酸 100 μl と混合することにより反応を停止し、ペプチドの定量は逆相 HPLC により行った。

(4) アフリカツメガエル摘出肺組織における薬物の透過性評価：Wall 等の方法⁸⁾ に従い、体重約 50 g の雌性アフリカツメガエルから摘出した肺を Ussing chamber に装着し、胸腔側に薬液 (phenol red、FDs) を投与後、胸膜側に出現してきた薬物量を経時的に 3 時間までサンプリングした。また、薬物の肺組織透過に及ぼす吸収促進剤添加の影響に関しても合わせて検討した。

【結果・考察】

(1) FDs およびペプチドの A-549 培養細胞透過性

FDs の A-549 単層細胞透過性には分子量依存性が認められたが、平均分子量が約 70 kDa の FD-70 に

においても投与後 180 分までの透過量は約 5 % であり、この値は Kim & Lee 等のグループが報告しているラット肺上皮初代培養 (RAEM) を用いて同様な検討を行った場合と比較すると極めて高いものであった。RAEM が type-I 様の上皮細胞であるのに対して A-549 細胞は type-II 様の上皮細胞であることから、

両者における有意な透過性の差異は形態学的な差異に起因しているものと思われる。次に、A-549 単層細胞を用いて insulin および calcitonin の透過性を検討した (Fig. 1)。Apical 側への添加濃度が $20 \mu\text{M}$ の場合、insulin および calcitonin の A-549 細胞透過性に有意な差は認められなかった。また、insulin の分解は透過の際にほとんど認められなかったのに対し、calcitonin では若干の分解が認められた。一方、apical 側への添加濃度を $5 \mu\text{M}$ とした場合、calcitonin の basolateral 側への透過量は投与 60 分後から減少する傾向が認められた。この結果は、A-549 細胞において calcitonin が分解を受ける可能性を示唆するものであり、実験終了時における apical 側薬物残存量を調べたところ、calcitonin においては添加量の約 70 % が、insulin においては添加量の 41% が分解されていた。

Fig. 1 Penetration profiles of insulin and calcitonin across the A-549 cell monolayers. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. of three experiments. Closed and open symbols represent 5 and $20 \mu\text{M}$ applied concentration, respectively.

干の分解が認められた。一方、apical 側への添加濃度を $5 \mu\text{M}$ とした場合、calcitonin の basolateral 側への透過量は投与 60 分後から減少する傾向が認められた。この結果は、A-549 細胞において calcitonin が分解を受ける可能性を示唆するものであり、実験終了時における apical 側薬物残存量を調べたところ、calcitonin においては添加量の約 70 % が、insulin においては添加量の 41% が分解されていた。

Table 1 Michaelis-Menten parameters for insulin and calcitonin degradation in various fractions of A-549 and rat lung homogenate

Fraction	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg-p)	Vmax/Km (ml/min/mg-p)
A-549			
Insulin			
Whole homogenate	16.9	0.39	0.039
cytosol	7.29	1.11	0.253
membrane	6.41	0.14	0.037
Calcitonin			
Whole homogenate	4.59	0.54	0.194
cytosol	21.2	3.92	0.308
membrane	6.94	0.27	0.066
Rat Lung			
Insulin			
Whole homogenate	4.88	0.07	0.024
cytosol	5.43	0.16	0.050
membrane	11.6	0.07	0.010
Calcitonin			
Whole homogenate	27.7	0.65	0.039
cytosol	42.9	1.41	0.055
membrane	52.2	0.54	0.017

(2) A-549 細胞におけるペプチドの安定性 そこで、A-549 細胞における insulin および calcitonin の分解特性を明らかにするため、A-549 細胞ホモジネートを用いて insulin、calcitonin の安定性実験を行った。Calcitonin は A-549 細胞ホモジネート中において insulin と比較して非常に速い分解性を示し、この結果はラット肺組織ホモジネートを用いた場合においても同様であった。また、A-549 細胞およびラット肺組織ホモジネートいずれの場合においても、細胞膜画分よりも細胞質画分において、これらペプチドに対する分解活性が高いことが明らかとなった。さらに、基質となるペプチド濃度を変化させた際のペプチドの分解速度を求め、Lineweaver-Burk plot より Km、Vmax 値を求めた (Table 1)。みかけの分解クリアランスに相当する Vmax/Km 値は、いずれのホモジネートにおいても細胞質画分で最大となった。また、

calcitonin に対する分解性はいずれのホモジネートの場合にも insulin と比較して高い値を示した。また、各種ホモジネート中における 6 種の酵素活性 (trypsin、elastase、chymotrypsin、Leu-aminopeptidase、aminopeptidase B、aminopeptidase N) を測定したところ、chymotrypsin の比活性が最も高いことが明らかとなり、この結果は肺組織ホモジネート中での insulin の分解が soybean trypsin inhibitor で抑制された我々の報告²⁾を支持するものであった。

(3) 水溶性薬物のアフリカツメガエル単離肺組織透過性と吸収促進剤併用時の影響

アフリカツメガエル単離肺組織においても phenol red、FDs の透過には分子量依存性が認められ、そのみかけの透過係数の値は、我々がラット摘出腸管を用いて同様の検討を行った場合と比較してほぼ同程度の値を示した (Table 2)。また、実験終了時までに胸膜側に透過してきた薬物量と *in situ* 経肺実験から deconvolution 法により求めた吸収量との間に比較的良好な相関が認められたことから (Fig. 2)、この実験系が水溶性薬物の経肺吸収性を評価する上で有効な実験手法になり得ることが示唆された。さらに、phenol red のアフリカツメガエル単離肺組織透過性に及ぼす 6 種の吸収促進剤 (laurylmaltoside、linoleic acid-HCO-60 mixed micelle、Na-glycocholate、EDTA、Na-salicylate、Na-caprate) の影響を検討した。Phenol red の肺組織透過におけるみかけの透過係数の値は laurylmaltoside、mixed micelle、Na-caprate の添加により、吸収促進剤未添加時と比較して 10 ~ 20 倍高い値となり、特に laurylmaltoside により顕著な透過性亢進が認められたが、Na-salicylate や EDTA においては吸収促進効果が認められなかった。こうした結果は、calcitonin を用いた *in situ* 経肺投与実験において Na-salicylate や EDTA に吸収促進効果が認められなかった我々の以前の報告とよく一致するものであり、アフリカツメガエル摘出肺組織を用いた *in vitro* 評価系が経肺投与時における吸収促進剤のスクリーニング系としても有用であることを示唆するものと思われる。

【結論】

以上、A-549 細胞およびアフリカツメガエル摘出肺組織を用いた透過実験により、アフリカツメガエル摘出肺組織を用いた系がこれまでに我々が報告してきた *in situ* の系と比較的良好な相関することが明らかとなった。また、肺ホモジネートを用いた検討により calcitonin や insulin は経肺投与時においても消化管投与の場合と同様、各種タンパク分解酵素、特に chymotrypsin により分解を受けることが

Table 2 Permeability coefficients of phenol red and FDs across various mucosal membranes

Compound	Permeability Coefficient ($\times 10^{-6}$ cm/sec)		
	Xenopus Lung	Small Intestine	Large Intestine
Phenol red	2.83 ± 0.06	4.21 ± 0.45	1.82 ± 0.19
FD-4	0.24 ± 0.02	1.12 ± 0.11	0.67 ± 0.08
FD-10	0.17 ± 0.00	0.91 ± 0.08	0.49 ± 0.08
FD-40	n.d.	0.27 ± 0.04	0.09 ± 0.01
FD-70	0.02 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.05

Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. (n = 3-5).
n.d.: not determined

Fig. 2 Correlation between % absorption of drugs after intrapulmonary administration to rats and their transport across the *Xenopus* pulmonary membrane in the presence of various absorption enhancers. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3-6 experiments. Keys: phenol red (○); phenol red + Na-GC (●); phenol red + Na-Sal (■); phenol red + EDTA (□); FD-4 (△); FD-10 (▲); FD-70 (▽). a) Data were cited from Ref. (2).

示唆された。この結果は、A-549 細胞ホモジネートにおいてもほぼ同様の傾向を示しており、A-549 細胞はペプチドを経肺投与した際の肺組織における安定性をスクリーニングする上で有用な実験系になると思われる。こうした *in vitro* 系を用いたペプチド性医薬品の経肺吸収性の評価法の確立・整理は、ペプチドの経肺投与製剤を開発していく上で有用な基礎的知見を提供するものと思われる。

ABSTRACT

We examined the *in vitro* penetration characteristics of FITC-dextran (FDs) with various molecular weights and peptides such as calcitonin and insulin across human lung carcinoma A-549 cell monolayer. The permeability coefficients of FDs through the A-549 monolayers (type-II like cells) were much larger than those in the rat alveolar epithelial cell monolayers (RAEMs: type-I like cells), which were established by Kim and coworkers. The high permeability characteristics of A-549 monolayers may be attributed to their morphological differences as compared with the RAEMs.

On the other hand, we studied the degradation characteristics of peptide drugs such as calcitonin and insulin using rat lung and A-549 cell homogenates. Calcitonin was rapidly disappeared than insulin in both homogenates. The apparent degradation clearance (K_m/V_{max}) values of these peptides were higher in the cytosol fraction than membrane fraction. In both homogenates, chymotrypsin activity was the highest among the six protease activities such as trypsin, elastase, chymotrypsin, Leu-aminopeptidase, aminopeptidase B and aminopeptidase N examined in this study. These results confirmed our previous report that the degradation of insulin in the rat lung homogenate was suppressed by the addition of soybean trypsin inhibitor.

Furthermore, the penetration characteristics of water soluble compounds, such as phenol red and FDs across the *Xenopus* isolated pulmonary membrane were examined with the modified Ussing chamber system. The permeability coefficients of FDs with various molecular weights through the *Xenopus* isolated pulmonary membrane were similar to those through the small and large intestine. A good correlation was observed between the penetrated amounts of drugs across the *Xenopus* isolated pulmonary membrane with the *in vitro* Ussing chamber system and their absorbed amounts calculated by deconvolution method in an *in situ* rat intrapulmonary absorption experiment. Three types of absorption enhancers, such as laurylmaltoside, mixed micelle and Na-caprate, increased the penetration of phenol red across the *Xenopus* isolated pulmonary membrane, while EDTA and Na-salicylate did not affect its penetration across the *Xenopus* isolated pulmonary membrane. These results were in agreement with our previous report of an *in situ* rat intrapulmonary experiment.

【References】

1. Ohtani T., Murakami M., Yamamoto A., et al. *Int. J. Pharm.* **77**, 141-150 (1991).
2. Morita T., Yamamoto A., Hashida M., et al. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 259-262 (1993).
3. Yamamoto A., Umemori S. and Muranishi S. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 14-18 (1994).
4. Morita T., Yamamoto A., Takakura Y., et al. *Pharm. Res.* **11**, 909-913 (1994).
5. Fukuda Y., Tsuji T., Fujita T., et al. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 891-894 (1995).
6. Giard D. J., Adaonson S., Todaro G., et al. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417-1422 (1973).
7. Lieber M., Smith B., Azakal A., et al. *Int. J. Cancer* **51**, 62-70 (1976).
8. Wall D. A., Pierdomenico D. and Wilson G. *J. Contr. Rel.* **24**, 227-235 (1993).
9. Fujita T., Kawahara I., Yamamoto M., et al., *Pharm. Sci.* **1**, 231-234 (1995).