19S2-11 In vitro Caco-2 単層膜透過性データの標準化とヒトへのスケールアップ

○岩井勝明、山崎裕加子、片岡誠、坂根稔康、瀬崎仁、山下伸二
摂南大学薬学部

STANDARDIZATION OF IN VITRO DRUG PERMEABILITY IN CACO-2 STUDY
AND THEIR CORRELATION TO HUMAN DATA IN VIVO

Katsuaki IWAI, Yukako YAMAZAKI, Makoto KATAOKA, Toshiyasu SAKANE, and
Shinji YAMASHITA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Hirakata, Osaka 573-0101

【目的】現在、適当な消化管吸収性を持った開発化合物を創生することを目的として、化合物の膜透過性等に関する早期スクリーニングが導入されている。そこでは、ある程度の throughput を確保するため、主として Caco-2 培養細胞等を用いた in vitro での手法が用いられるが、用いる細胞の状態あるいは培養条件、実験条件などの違いから、企業間でのデータに大きなバラツキが報告されている。これは、各企業において得られた膜透過性データの妥当性の確認を困難にするとともに、文献情報などからの豊富なデータベースの利用に際しても大きな問題となっている。そのため、Caco-2 細胞系を始めとした in vitro 評価系の統一、およびそのデータの標準化の必要性が強く認識されている。さらに、Caco-2 細胞等を用いた in vitro 透過性と in vivo でのヒト小腸膜透過性との違いを克服する手法も確立されていない。本研究では、in vitro 吸収性評価におけるこの様な問題点を解決することを目的として、

- (1) Caco-2 細胞や MDCK 細胞などの培養上皮単層膜における薬物透過性の変動要因の解析とその補正法の確立
- (2) 種々薬物の膜透過性に及ぼす溶液 pH の影響の解析とその標準化

の二つの項目に関して検討を行い、最終的にヒト小腸膜透過性を精度良く推定する方法の開発を試みた。

【方法】Caco-2 単層膜は従来の 21 日間培養法、Becton Dickinson 社によって開発された 3 日間培養法、及びこれを当研究室にて改善した 5 日間培養法を用いた。MDCK 単層膜は通常的手法により 3 日間の培養によって作成した。これら単層膜の paracellular pathway の pore 半径は、mannitol および urea の透過性を Renkin 式に代入すること

によって算出した。

【結果・考察】(1) 薬物透過性の補正法の確立
すでに我々は、培養法の違いによって Caco-2 単層膜及び MDCK 単層膜の tight-junction 部の平均 pore 半径に大きな違いが生じることを明らかにし、これら単層膜間での薬物透過性の違いが、主として paracellular pathway の透過性の違いに起因した現象であることを報告した (Table 1)。今回、各膜における paracellular pathway の透過性の違いを補正することによって、透過性 data の標準化を試みた。各膜の pore 半径を算出するためには、被験薬物とともに mannitol などの paracellular marker の透過性 data が必要となるが、実際のスクリーニングにおいて常にその透過性を測定することは困難である。膜の電気的抵抗値は一般に tight-junction 部の接合強度の指標と考えられることから、抵抗値に基づく補正が可能と考えられる。Table 1 から明らかなように、各膜での抵抗値と pore 半径との間には相関は認められなかったものの、同じ培養法によって得られた Caco-2 単層膜、MDCK 単層膜においては mannitol 透過性と抵抗値の逆数 (膜コンダクタンス) の間に極めて良好な正の相関が得られた (Fig. 1)。そこで、膜抵抗値から各膜における mannitol の透過性を求め、さらに Renkin 式を用いて paracellular pathway の pore 半径を算出することによって、各膜の薬物透過性 data から、一定の pore 半径を仮定した基準膜における膜透過性を推定した。その結果、膜間での薬物透過性のバラツキは極めて小さくなり、本手法を用いることによって、膜透過性の簡便な補正が可能であることが明らかとなった。

(2) 溶液 pH の影響 In vitro 膜透過性測定における溶液 pH として、通常、basal 側の pH は 7.4 とし、apical 側 pH は検討目的等によって 6.0-7.4 の

範囲に設定されている。Apical 側 pH の違いは、当然、弱電解質薬物の膜透過に影響を及ぼすことから、異なる pH 条件下で測定された膜透過性を直接比較することは困難である²⁾。ここでは、受動的な膜透過に関して、(1) 溶液 pH は細胞膜を介した transcellular な透過のみに影響し para-cellular な透過性は基本的には変化しない、(2) Transcellular な透過性は apical 側溶液中での非解離型薬物濃度に比例して変化する、という作業仮説に基づき、異なる pH 条件下で種々薬物の Caco-2 単層膜透過性を測定した。その結果、主として transcellular pathway を介して膜を透過すると考えられる propranolol, warfarin, salicylic acid の透過性は pH の変動とともに一定の割合で変化することが明

らかとなった。一方、透過性の低い atenolol などの薬物での変化は小さく、また透過性変化の割合は pH によって異なることが示された。これらの結果は、上の二つの作業仮説を裏付けるものであったことから、仮説に基づいた膜透過 data の標準化、すなわち、Renkin 式を用いて各薬物の膜透過を transcellular および paracellular の二つの fraction に分離し、非解離型薬物濃度からそれぞれの pH における transcellular な透過性を推定することによって各 pH における全体の透過性の算出を試みた。さらに、以上の手法によって標準化された Caco-2 単層膜透過性 data から、最終的にヒト小腸粘膜透過性を精度良く推定するための方法論の構築を行った。

Table1 Pore radius, permeability of mannitol, and TEER of various cell monolayers

	Caco-2			MDCK
	21 days	3 days	5 days	
Pore radius R (Å)	5.91 ○	18.5 ○	7.85 ○	7.94 ○
Mannitol Per $\times 10^{-7}$ (cm/sec.)	4.11 $\pm$ 5.88	36.7 $\pm$ 24.9	12.6 $\pm$ 5.87	5.84 $\pm$ 2.23
TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)	616 $\pm$ 163	841 $\pm$ 95.6	618 $\pm$ 185	55.3 $\pm$ 6.19

(mean $\pm$ S.E.)

Fig. 1 Relationship between permeability of mannitol and electrical conductance (1/TEER)
 □ Caco-2 21day ◇ Caco-2 3day ▲ Caco-2 5day
 × MDCK

【Abstract】 Inter-laboratory or inter-membrane variations in drug permeability across Caco-2 monolayers are considered to be one of the most critical problems in drug absorption screening performed in pharmaceutical companies. We have already reported that the variations in drug permeability found in Caco-2 or MDCK monolayers are basically due to the differences in the paracellular permeability through cell junctions. In this paper, paracellular permeability of various drugs was calculated according to the pore-theory proposed by Renkin¹⁾, then their permeability to the standard membrane having the defined pore size of the paracellular pathway was re-calculated. Through this mathematical correction process, inter-laboratory or inter-membrane variations in drug permeability could be minimized, giving the standardized permeability of all drugs. The experimental conditions such as pH of the transport medium influence the permeability of weak-electrolyte drugs²⁾. Assuming that the pH of the apical medium mainly affects the transcellular transport of drugs, drug permeability of defined pH condition was estimated from the concentration of unionized molecule of drugs. The results obtained in this research are quite important to predict the oral drug absorption in humans from the *in vitro* study with Caco-2 or other cell monolayers.

【References】 1) Renkin EM. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membrane. *J. Gen. Physiol.*, 1954; **38**: 225-243. 2) Yamashita S. et.al. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, **10**: 195-204.