薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (8) 445-450 (1991)

新規非ステロイド性抗炎症剤 2-[3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1*H*-
pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl]ethyl Acetate の消化管吸収の改善

水田博彰,* 鮫元博文, 小川建志

吉富製薬株式会社中央研究所

Improvement of Gastrointestinal Absorption of 2-[3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-
hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl]ethyl Acetate, a
New Non-steroidal Anti-inflammatory Agent

Hiroaki MIZUTA,* Hirofumi SAMEMOTO and Kenji OGAWA

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.,
Koiwai, Yoshitomi-cho, Chikugo-gun, Fukuoka, 871, Japan

(Received January 21, 1991)

The effects of triglycerides on the gastrointestinal absorption of 2-[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl]ethyl acetate (**1**) were investigated in dogs. The enhancing abilities of the triglycerides on the absorption of **1** were demonstrated as in the order of trilinolein > triolein > tristearin > tripalmitin. Among the series of fatty acids and monoglycerides, namely, digestive products of triglycerides by pancreatic lipase, linoleic acid and monolinolein showed the most potent solubilizing activities of **1** in a solution of bile salt. The incorporation of **1** into mixed micelle formed by lipids and bile salts was presumed to play an important role in the accelerated absorption of **1** after ingestion of triglycerides. On the basis of these findings, an emulsion containing **1** was prepared with soybean oil. The emulsion exhibited a remarkable improvement of the absorption of **1** compared to a suspension of the drug in methylcellulose solution.

Keywords—triglyceride; absorption; mixed micelle; bile salt; unsaturated long-chain fatty acid; solubility; soybean oil; emulsion; dog

緒 言

新規非ステロイド性消炎鎮痛薬である 2-[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl]ethyl acetate (**1**)¹⁾ は極めて水に難溶な脂溶性化合物である。²⁾ 著者らは、既に、**1** の消化管からの吸収には胆汁による可溶化作用が重要な役割を演じている事実、空腹時のビーグル犬に **1** のメチルセルロース溶液を経口投与した際に認められる不完全な吸収が摂食により著しく改善される事実、及び、食餌のなかでも、特に脂肪食の吸収促進効果が大である事実を明らかにした。²⁾ 本報では、脂肪の主要成分である長鎖脂肪酸トリグリセリドの種類と吸収促進効果との関係を調べるとともに、各種のトリグリセリドが示す吸収促進効果を、消化管内で形成される脂質-胆汁酸塩混合ミセルの **1** に対する可溶化能の面から考察した。また、得られた知見を基に、吸収の改善を意図して製剤化検討を行った。

実 験 の 部

試薬 **1** (平均粒子径 14.8 μm) 及び 2-[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl]ethanol (M1; 活性代謝物)¹⁾ は当社での合成品を使用した (Fig. 1)。トリパルミチン、トリステアリン及びトリオレインはナカライテスク製 (京都) 試薬 1 級品を、トリリノレインは Sigma 社製 (St. Louis, MO, U.S.A.) を、グリココール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸及びリノール酸はナカライテスク製試薬特級品を、モノパルミチン、モノステアリン、モノオレイン及びモノリノレインは Sigma 社製を、*p*-ヒドロキシアセトフェノン (I.S.: 内部標準物質) はナカライテスク製試薬 1 級品を、ポリソルベート 80 及びモノオレイン酸ソルピタンは日光ケミカルズ製 (東京) 試薬特級品を、大豆油は山桂産業製

Fig. 1. Chemical Structures of 1 and M1

(大阪) 試薬特級品を用いた。その他の試薬類はすべて市販の特級品を用いた。

1 の吸収に及ぼす各種トリグリセリドの影響 1) 血漿中 M1 濃度の測定法——生体内に取り込まれた **1** はエステラーゼにより直ちに加水分解され、血漿中には活性代謝物である M1 のみが検出される。²⁾ そこで、血漿中の M1 濃度を指標として **1** のバイオアベイラビリティを評価した。測定には既報³⁾ の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を用いた。

2) 吸収実験——雄性ビーグル犬 6 頭 (体重 11—13 kg) を用いた。各ビーグル犬を 20 時間絶食させた後、トリグリセリド (トリパルミチン、トリステアリン、トリオレイン又はトリリノレイン) 2 g を充填したゼラチンカプセルを水 20 ml とともに経口投与後 30 分に、0.5% (w/v) メチルセルローズ溶液に 0.3% (w/v) 濃度の **1** を懸濁した液 1 ml/kg (3 mg/kg) を、水 30 ml とともにカテーテルを用いて経口投与した。対照として、トリグリセリドを前投与しない場合についても **1** の投与試験を行った。投与 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 及び 24 時間後に、ヘパリン処理済みシリンジを用いて 0.5 ml ずつ血液を採取し、遠心分離 (3000 rpm, 10 分) して得た血漿中の M1 濃度を HPLC で測定した。なお、試験中の摂餌は禁止し、水は自由に摂取させた。投与は 2 週間の間隔を置いて行った。

脂質-胆汁酸塩混合ミセル溶液中での 1 の溶解度の測定 リン酸緩衝液 ($[Na^+] = 0.11$ M, pH 6.4; 0.1 M リン酸二水素ナトリウムと 0.05 M リン酸一水素ナトリウムの混液に塩化ナトリウムを添加して調製) に、40 mM 濃度になるようグリコール酸ナトリウム又はタウロコール酸ナトリウムを溶かした液に、胆汁酸塩と当モル量の長鎖脂肪酸 (パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸又はリノール酸) 又は対応するモノグリセリドを添加し、37°C で 2 時間インキュベートした後、メンブランフィルター (0.45 μ m; 日本ミリポア工業 (米沢)) でろ過した。各々のろ液の一定量に過剰量の **1** を投入し、37°C で 20 時間インキュベートした後、メンブランフィルターでろ過し、ろ液 50 μ l を HPLC (島津 LC-6A) で定量した。脂肪酸及びモノグリセリドを添加せず、胆汁酸塩のみを溶かしたリン酸緩衝液についても過剰量の **1** を投入した後、同様の処理を行った。カラムは Nucleosil 10C₁₈ (4.6 mm i.d. $\times$ 20 cm; M. Nagel, Duren, Germany) を、移動相にはメタノール-0.1 M 酢酸アンモニウム (6:1, v/v) を用いて流速 1 ml/min で溶出し、330 nm の吸収を紫外分光光度計検出器 (島津 SPD-6A) で測定した。検出感度は 1 μ g/ml であった。

胆汁酸塩ミセル溶液中での 1 の溶解性に対する塩化ナトリウムの添加効果 リン酸緩衝液 ($[Na^+] = 20$ mM, pH 6.4; 20 mM リン酸二水素ナトリウムと 10 mM リン酸一水素ナトリウムを混合して調製) に 20 mM 濃度になるようグリコール酸ナトリウムを溶かした液に、塩化ナトリウムを添加し、ナトリウム濃度が 40, 80 及び 160 mM 濃度の溶液をそれぞれ調製した。その各々に過剰量の **1** を投入した後、37°C で 20 時間インキュベートした。この溶液をメンブランフィルター (0.45 μ m; 日本ミリポア工業) でろ過し、得られたろ液の 50 μ l を、それぞれ HPLC で定量した。HPLC は、胆汁酸塩混合ミセル溶液中での溶解度試験と同様の条件下で行った。

エマルジョンの吸収性の評価 1) エマルジョンの調製——大豆油に **1** を溶解させた後、モノオレイン酸ソルビタン及びポリソルベート 80 溶液を加え、45°C で 10 分間混和した。次いで、ポリトロンホモジナイザー (Kinematica PT 10-35, Steinhofhalde, Switzerland) を用いて 5 分間ホモジナイズすることにより o/w 型エマルジョンを調製した。エマルジョン中の大豆油の濃度は 25% (w/v) とし、大豆油 1 g あたりの **1**, モノオレイン酸ソルビタン及びポリソルベート 80 の添加量は、それぞれ 8, 40 及び 74 mg とした。

2) 吸収実験——雄性ビーグル犬 4 頭 (体重 10—13 kg) を 20 時間絶食させた後、0.5% (w/v) メチルセルローズ溶液に 0.2% (w/v) 濃度の **1** を懸濁した液 10 ml, 又はエマルジョン 10 ml (ともに 20 mg 相当量の **1** を含有) を水 30 ml とともに経口投与した。採血、血漿中の M1 濃度の測定は、前項の各種トリグリセリドの影響の検討と同一の条件下で行った。

薬物動態の解析 時間に対する血漿中 M1 濃度をプロットしたグラフから、最高血漿中濃度 ($C_{\max}$) 及び最高血漿中濃度到達時間 ($T_{\max}$) を求めた。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) は台形法により算出した。平均体内滞留時間 (MRT) は model-independent statistical moment analysis⁴⁾ により算出した。

統計解析 薬物動態値について、2 群比較の場合は paired-*t* test により、3 群以上の場合は分散分析を行った後、Tukey's multiple range test により検定した。

結 果

1 の吸収に及ぼす各種トリグリセリドの影響

4 種のトリグリセリドを前投与した際には、前投与しない場合に比べ、血漿中 M1 濃度の増加が認められた (Fig. 2)。 $C_{\max}$ 及び AUC_{0-24h} は、ともに、トリリノレイン、トリオレイン、トリステアリン、トリパルミチンの順で低下し、飽和長鎖脂肪酸トリグリセリドに比べ、不飽和長鎖脂肪酸トリグリセリドの吸収促進効果が有意に大であった。一方、 $T_{\max}$ 及び MRT については、両種のグリセリド間に差が認められなかった (Table I)。

脂質-胆汁酸塩混合ミセル溶液中での 1 の溶解性

胆汁酸塩としてグリココール酸ナトリウム又はタウロコール酸ナトリウムのいずれを用いた場合にも、1 の溶解度は、胆汁酸塩のみに比べ、不飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドの添加により増加し、飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドを添加した際には減少した (Table II)。

胆汁酸塩ミセル溶液中での 1 の溶解性に対する塩化ナトリウムの添加効果

塩化ナトリウムの添加量の増加に対応して、グリココール酸ナトリウム溶液中での 1 の溶解度は増大した (Table III)。

エマルションの吸収性

メチルセルロース懸濁液に比べ、エマルションの投与後の血漿中 M1 濃度は高く (Fig. 3)、 $C_{\max}$ 及び AUC_{0-24h} はそれぞれ約 4 倍及び約 3 倍に増大した。一方、 $T_{\max}$ 及び MRT については、両剤形間で差は認められなかった (Table IV)。

Fig. 2. Mean Plasma Concentrations of M1 after Oral Administration of 1 to Dogs with and without Ingestion of Triglycerides

○, without triglyceride; ■, trilinolein; □, triolein; ▲, tristearin; △, tripalmitin.
Each point represents the mean of 6 dogs.

TABLE I. Pharmacokinetic Parameters of M1 after Oral Administration of 1 with and without Ingestion of Triglycerides

Dosage form	$C_{\max}$ (ng/ml)	$T_{\max}$ (h)	AUC_{0-24h} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	MRT (h)
Control ^{a)} (C)	145.7 ± 71.1	2.0 ± 1.1	1.82 ± 0.91	10.0 ± 0.6
Trilinolein (L)	390.8 ± 59.7	2.0 ± 0.0	4.68 ± 0.85	9.9 ± 0.4
Triolein (O)	355.5 ± 66.4	1.8 ± 0.4	4.10 ± 0.65	10.0 ± 0.7
Tristearin (S)	237.3 ± 101.1	2.0 ± 1.0	2.72 ± 1.22	9.9 ± 0.6
Tripalmitin (P)	220.5 ± 47.5	2.3 ± 0.8	2.51 ± 0.38	9.9 ± 0.4
Tukey's test ($p < 0.05$)	L, O > S, P, C S > C	N.S. ^{b)}	L, O > S, P, C	N.S. ^{b)}

a) Without ingestion of triglyceride. b) Not significant among treatments.
Each value represents the mean ± S. D. of 6 dogs.

TABLE II. Effects of Lipid Additives on the Solubilization of 1 in 40 mM Bile Salts at 37°C

Lipid	Solubility ($\mu\text{g/ml}$)	
	Sodium glycocholate	Sodium taurocholate
—	106 $\pm$ 4	90 $\pm$ 1
Linoleic acid	134 $\pm$ 6	136 $\pm$ 6
Oleic acid	113 $\pm$ 6	149 $\pm$ 2
Stearic acid	91 $\pm$ 1	79 $\pm$ 3
Palmitic acid	73 $\pm$ 1	68 $\pm$ 2
1-Monolinolein	218 $\pm$ 7	292 $\pm$ 4
1-Monoolein	205 $\pm$ 21	250 $\pm$ 6
1-Monostearin	102 $\pm$ 1	84 $\pm$ 2
1-Monopalmitin	74 $\pm$ 2	74 $\pm$ 3

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 3 determinations.

TABLE III. Effect of Sodium Chloride on the Solubilization of 1 in 20 mM Sodium Glycocholate at 37°C

Solubility ($\mu\text{g/ml}$)	Total sodium ion concentration (mM)		
	40	80	160
	15 $\pm$ 0	21 $\pm$ 1	29 $\pm$ 0

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 3 determinations.

TABLE IV. Pharmacokinetic Parameters of M1 after Oral Administration of Methylcellulose Suspension and Emulsion of 1

Dosage form	$C_{\max}$ (ng/ml)	$T_{\max}$ (h)	AUC_{0-24h} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$)	MRT (h)	Bioavailability ^{a)} (%)
Suspension	100.4 $\pm$ 31.8	1.8 $\pm$ 0.5	1.51 $\pm$ 0.61	11.1 $\pm$ 1.7	29.0 $\pm$ 7.9
Emulsion	431.1 $\pm$ 68.4 ^{b)}	1.3 $\pm$ 0.5	4.70 $\pm$ 1.69 ^{c)}	9.4 $\pm$ 0.5	87.9 $\pm$ 13.8 ^{b)}

a) Calculated as follows: $AUC_{0-24h,po} \times \text{Dose}_{iv} / AUC_{0-24h,iv} \times \text{Dose}_{po}$. b) Significantly different from suspension ($p < 0.01$). c) Significantly different from suspension ($p < 0.05$). Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 4 dogs.

Fig. 3. Plasma Concentrations of M1 after Oral Administration of Methylcellulose Suspension and Emulsion of 1

○, methylcellulose suspension; ●, emulsion. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 4 dogs.

考

察

1 を経口又は静脈内投与すると血漿中には活性代謝物 M1 のみが検出された。予備的な検討の結果、1 は生理的 pH 範囲の水溶液中及び血漿中で極めて安定であった。また、ラットに 1 及び 1 と相当量の M1 を経口投与した際の血漿中 M1 濃度には両者で明らかな差が認められた。³⁾ これらの知見から、1 を経口投与した際には大部分が未変化体のまま吸収され、体循環に到達する以前の腸壁中又は肝臓中のエステラーゼにより加水分解され M1 が生成するものと推測される。

ビーグル犬に各種トリグリセリドを前投与した際の 1 の吸収は、前投与しない場合に比べ、いずれにおいても増大した。したがって、吸収の促進には、脂質の前投与に伴う胆汁分泌の亢進が関与しているものと推測される。しかし、トリグリセリドが示す吸収促進効果は、それらを構成する脂肪酸の種類によって有意に異なり、不飽和長鎖脂肪酸の場合に最も顕著であった。トリグリセリドを摂取すると、エマルション化した状態で胃から十二指腸に移行⁵⁾ した後、膵リパーゼによって加水分解され、生成したモノグリセリド及び遊離脂肪酸が胆汁酸塩と混

合ミセルを形成する。^{5,6)} その際の胆汁酸塩ミセルへの脂質の溶解挙動は構成脂肪酸の種類によって異なることも知られている。すなわち、飽和長鎖脂肪酸及びそのモノグリセリドはミセルの疎水性中核 (hydrocarbon center) に取り込まれるが、不飽和長鎖脂肪酸及びそのモノグリセリドのような両親媒性の脂質はミセルの柵層 (palisade layer) に割り込むとされている。^{7,8)} このように、脂質の種類により混合ミセルの構造が異なるため、薬物に対する可溶性も脂質の種類と薬物の物理化学的性質との組み合わせによって変化することが予想される。事実、Bates ら⁸⁾は、飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドの添加によって、胆汁酸塩溶液中での griseofulvin 及び glutethimide の溶解度は変化しないが、hexestrol の溶解度は減少すると報告している。また、Palin ら⁹⁾は脂質-胆汁酸塩溶液中での DDT の溶解度について検討し、脂質が飽和中鎖脂肪酸の場合に比べ、不飽和長鎖脂肪酸を用いると 5 倍程度に増加することを報告している。そこで、胆汁酸塩に各種の脂質を添加して調製した混合ミセルに対する **1** の溶解度を比較検討したところ、脂質として飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドを用いた場合には抑制的に、不飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドでは促進的に作用する事実が判明した。これらの結果は、**1** の溶解部位がミセルの疎水性中核であることを示唆している。すなわち、混合ミセルにおいて、脂質が飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドの場合には、これらがミセルの疎水性中核のスペースを **1** と競合し、一方、不飽和長鎖脂肪酸又はそのモノグリセリドは柵層に割り込んで疎水性中核のスペースを拡大する。⁸⁾ そのため、**1** の溶解度が、胆汁酸塩のみの溶液と比べ、それぞれ低下あるいは増大したことが考えられる。この推測の妥当性は、胆汁酸塩溶液への塩化ナトリウムの添加実験の結果からも裏付けられた。すなわち、胆汁酸塩溶液に塩化ナトリウムを添加した際には、添加濃度に依存して **1** の溶解度が増加した。この現象は、塩化ナトリウムを添加すると、ミセルの構成成分である胆汁酸塩分子同士の電気的反発が抑えられ、疎水性中核のスペースが拡大するとの指摘⁸⁾と一致している。なお、胆汁酸塩溶液中の **1** の溶解度に対する添加効果は不飽和長鎖脂肪酸よりもそのモノグリセリドが大であった。胆汁酸塩溶液中でのオレイン酸とそのモノグリセリドの溶解度を比較すると、前者に比べ後者が大であると報告されている。¹⁰⁾ したがって、不飽和長鎖脂肪酸とそのモノグリセリド間で認められた **1** の溶解度に対する添加効果の差は、両者のミセルの柵層への取り込み量の差異を反映した結果であると推測される。

著者らは、既に、**1** の消化管吸収が小腸通過時間にも依存する事実を明らかにしている。⁸⁾ また、ビーグル犬に脂肪食を摂取させると小腸通過時間が遅延する現象に関しても報告した。¹¹⁾ 小腸通過時間は *MRT* 及び *T_{max}* に反映され则认为られるが、今回の実験では、トリグリセリド前投与の有無にかかわらず、これらのパラメータには差異が認められなかった。これは、トリグリセリドの摂取量 (2 g) が小腸通過時間に影響を与えるに足る分量でなかったことによると推測される。

1 の製剤化にあたっては、以上の知見を考慮して、基剤及び剤形を決定した。すなわち、吸収促進効果が最も顕著であったトリリノレインを豊富に含有¹²⁾しており、しかも注射用脂肪乳剤の基剤としても用いられ安全性が高い¹³⁾大豆油を基剤とした。また、リパーゼで速やかに分解され、胆汁酸塩と混合ミセルを形成し易い剤形としてエマルジョンを選択した。**1** を 0.5% (w/v) メチルセルロース溶液に懸濁させた液のバイオアベイラビリティは、既報²⁾とほぼ一致した低い値であったが、エマルジョンは、予想したとおりの良好な吸収性を示すことが確認された。

引用文献

- 1) T. Oe, K. Kawasaki, M. Terasawa, T. Imayosi, Y. Yasunaga, Eur. Patent 254241 (1988) [*Chem. Abstr.*, **108**, 2046179q (1988)].
- 2) 水田博彰, 川添 康, 芳賀慶一郎, 小川建志, 薬誌, **110**, 598 (1990).
- 3) H. Mizuta, Y. Kawazoe, K. Ogawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2825 (1990).
- 4) K. Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **6**, 547 (1978).
- 5) K. J. Palin, *ファーマシィ インターナショナル*, **3**, 30 (1986).
- 6) J. R. Senior, *J. Lipid Res.*, **5**, 495 (1964).
- 7) B. Borgstrom, *Gastroenterology*, **43**, 216 (1962).
- 8) T. R. Bates, M. Gibaldi, J. L. Kanig, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 901 (1966).
- 9) K. J. Palin, C. G. Wilson, S. S. Davis, A. J. Phillips, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 30p (1982).

- 10) A. F. Hofmann, "Handbook of Physiology: section 6, Alimentary Canal," Vol. 5, ed. by C. F. Code, American Physiological Society, Washington, D.C., 1968, pp. 2515—2516.
- 11) H. Mizuta, Y. Kawazoe, K. Haga, K. Ogawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2224 (1990).
- 12) 太田静行, "新製剤開発システム総合技術, 基剤・添加物篇," 井口定男, 太田善夫, 小西良士, 野呂俊一, 堀良了平編, *R & D プランニング*, 1985, p. 305.
- 13) 木村信良, 山田栄一, *診断と治療*, **10**, 139 (1970).