牛乳脂肪球被膜物質による薬物の消化管吸収促進作用

劉 紅星,^a 足立伊佐雄,^a 堀越 勇,^a 上野雅晴*,^b

富山医科薬科大学附属病院薬剤部,^a 薬学部^b

Promotion of Intestinal Drug Absorption by Milk Fat Globule Membrane

Hong-Xing LIU,^a Isao ADACHI,^a Isamu HORIKOSHI,^a
and Masaharu UENO*,^b

Department of Hospital Pharmacy,^a Faculty of Pharmaceutical Sciences,^b
Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani,
Toyama 930-01, Japan

(Received January 8, 1991)

A soybean oil emulsion was prepared by using milk fat globule membrane (MFGM) materials as an emulsifier. Its stability and effect on the intestinal absorption of vitamin D₃, amphotericin B and kanamycin were studied.

The MFGM emulsion was as highly stable as a Tween 80 emulsion. When the MFGM emulsion was sonicated with ultrasonic disrupter, the emulsion became more stable. Quantification of vitamin D₃ in the intestinal lymph indicated that the MFGM emulsion enhanced lymphatic absorption of vitamin D₃. The recovered percentage of vitamin D₃ emulsified with MFGM in the lymph was 1.4 times that by Tween 80, and 2.5 times that of oil-in-water suspension. Statistically significant difference was found among them ($p < 0.05$). The volumes of an oil phase in the emulsion affected the absorption of vitamin D₃. The recovered percentage of vitamin D₃ from the lymph increased with reducing the volume of the oil phase. Sonication of the emulsion did not affect the intestinal drug absorption. Furthermore, the MFGM emulsion had no effect on the intestinal absorption of amphotericin B and kanamycin.

Keywords—milk fat globule membrane (MFGM); lymphatic transport; vitamin D₃; amphotericin B; kanamycin

牛乳脂肪球被膜 MFGM (milk fat globule membrane) 物質は牛乳中の脂肪球を被覆している膜様物質である。^{1,2)} 脂肪が脂肪球の形で存在することは古くから知られていたが、脂肪球の表面が乳腺細胞由来の被膜物質で包まれていることは余り知られておらず、これに関する研究は遅れていた。最近、膜の処理技術の進歩により、膜の生化学的研究が著しく発展し、MFGM は主としてリン脂質とリポ蛋白質より成ること³⁾ が明らかになった。牛乳には 1 ml 当り平均 3.6×10^9 個の脂肪球が分散しており、脂肪 1 g 当りの表面積は約 2 m² に達する。この莫大な表面積を持つ脂肪球が安定なエマルジョンの状態を保持できるのは、天然の界面活性物質である MFGM によるものである。MFGM は水、油いずれにも難溶で、水と油とが共存するとその界面に集まり、安定な分散系をつくる理想的な界面活性物質である。本研究の目的は、この MFGM を、水に難溶な薬物の乳化剤、又は薬物吸収のキャリアーとして利用しようとするものである。薬物投与形態の改善には種々の界面活性剤が用いられているが、現在もっとも安全とされ、注射薬にも添加が認められている HCO60 でさえ、ビタミン K₂ 注射剤でショック症状等の副作用が報告され、副作用のより低い界面活性剤の発見、開発が、医療の現場で緊急の課題となっている。そこで、まず MFGM の乳化能について検討を開始した。次に、脂溶性薬物としてビタミン D₃、両親媒性で難吸収性薬物としてアムホテリシン B 及び水溶性で、難吸収性薬物のカナマイシンを選び、MFGM による消化管での吸収促進効果について検討した。

実 験 の 部

1. 試料及び試薬 MFGM は中外製薬生研機構プロジェクトより提供を受けた。硫酸カナマイシンは明治製薬製注射剤を用い、ビタミン D₃、アムホテリシン B、Tween 80 は和光純薬社より入手し、[1 α ,2 α (n)-³H]-vitamin D₃ は Amersham 社製を用いた。また、大豆油は半井化学薬品会社の製品を用いた。

2. 試料の調製 MFGM をリン酸緩衝液 (10 mM, pH=7.0) に分散し、MFGM 懸濁液 (27 mg/ml) を調製した。MFGM 懸濁液 3 に対し大豆油 (必要に応じて薬物を含む) を 1 の割合で MFGM 懸濁液に加え、ポリトロンホモジナイザーで 1 分間攪拌 (強度=11) し、エマルジョンとした。また、比較の目的で MFGM の代わりに、Tween 80 (27 mg/ml) を用い同様にエマルジョンを調製した。超音波処理を施す場合は、さらにプローブ型の Ultrasonic disrupter (UR-200P, Tomy Seiko Co., Ltd.) を用い、出力 200 W で 30 分間 4°C で処理を行った。

3. エマルジョンの安定性について エマルジョンの安定性は以下に記述する濁度測定により評価した。調製したエマルジョンを 1 ml ずつ試験管 (i.d., 10 mm×75 mm) に分注し、垂直に静置した。あらかじめ規定した経時時間ごとにエマルジョンを試験管中の所定位置 (底より 10 mm) から採取し、サンプルとした。これらを 400 倍に希釈した後、自記分光光度計 (日立 U-3401 型) を用い、600 nm で濁度を測定した。粒子径は準弾性光散乱法 (大塚電子 LPA 3000/3100) により求めた。

4. 消化管吸収実験 1) ビタミン D₃——ビタミン D₃ を大豆油に溶解し MFGM 及び Tween 80 を用いて、エマルジョン (ビタミン D₃ 450 IU/大豆油 0.25 ml あるいは 0.05 ml/リン酸緩衝液 0.75 ml あるいは 0.95 ml) を調製した。このエマルジョンに [³H]ビタミン D₃ を 1000 cpm/IU の割合で添加した。Dose は 1500 IU/kg とした。12 時間以上絶食させた Wistar 系雄性ラット (体重 250—300 g) を用い、ネブタール麻酔下、Warshaw⁴⁾ の方法に従って腸管リンパ管にカテーテル (i.d., 0.5 mm; o.d., 0.965 mm) を挿入し、腸リンパ液を持続的に採集できるようにした。さらに、十二指腸 (i.d., 0.80 mm; o.d., 1.20 mm) と大腿動脈 (i.d., 0.5 mm; o.d., 0.965 mm) にもカニューレーションを実施した。十二指腸より薬物を含むエマルジョンを投与し、大腿動脈より Syringe Infusion Pump 22 (Harvard Apparatus U.S.A.) を用い、1.44 ml/h⁵⁾ の速度で生理食塩水を補充した。経時的に腸管リンパ管よりリンパ液を収集し、液体シンチレーションカウンターを用い腸管リンパ中に移行した [³H]ビタミン D₃ 量を測定して、吸収挙動を検討した。

2) アムホテリシン B——アムホテリシン B を大豆油に加え、MFGM を用いてエマルジョン (アムホテリシン B 90 μ g/大豆油 0.25 ml/リン酸緩衝液 0.75 ml) を調製した。アムホテリシン B の溶解性を高める目的で、大豆油にコレステロールを 10 mg/ml の割合で加えた。投与量は 300 μ g/kg とした。実験方法はビタミン D₃ の場合と同様であるが、アムホテリシン B の定量は Kobayashi ら⁶⁾ の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法に準じて、HPLC 法 (島津 LC-6A システム) で行った。測定条件は、カラム: Shim-pack CLC-ODS (i.d., 6.0 mm×15 cm), 移動相: 10 mM acetate buffer (pH=7.0)-acetonitrile-methanol-tetrahydrofuran (50 : 25 : 20 : 5), カラム温度: 室温, 流速: 1.5 ml/min, 測定波長: 405 nm であった。

3) カナマイシン——カナマイシン水溶液 3 に対し、大豆油 1 の割合で加え、これに MFGM を添加してエマルジョン (カナマイシン 180 mg/リン酸緩衝液 1.5 ml/大豆油 0.5 ml) を調製し、ラットに経口投与した。Dose は 600 mg/kg で、投与体積は 6.6 ml/kg であった。経時的に頸静脈から採血し、TDX-全自動蛍光偏光測定装置「アボット」(ダイナボット社) を用い fluorescence polarization immunoassay (FPIA) 法で血漿中のカナマイシン濃度を定量した。

結 果

1) エマルジョンの安定性について

MFGM と Tween 80 及び超音波処理の有無について比較検討した結果を Fig. 1 に示す。比較を容易にするために、縦軸のスケールは吸光度の初期値に対する分率 (A_t/A_0) で示した。超音波処理、無処理いずれの場合も、乳化剤の間に顕著な差は認められなかったが、超音波処理により著しく安定性が高まった。すなわち超音波処理しなかったものは約 10 時間で相分離し、超音波処理を行ったものは 5 日間経過しても、相分離が認められなかった。また平均粒子直径は超音波処理しなかったものが 2—3 μ m (光学顕微鏡より) に対し、超音波処理したものは MFGM emulsion の場合は 200 nm で、Tween 80 emulsion の場合は 150 nm (準弾性光散乱法より) となり、両者の粒子径に 10 倍以上の差が認められた。

Fig. 1. The Effect of Emulsifiers and Sonication on Stability of Emulsions

A soybean oil in water emulsion was prepared using MFGM (○; ●) or Tween 80 (△; ▲) as emulsifier with (○; △) or without (●; ▲) sonication. The data are presented as means of duplicate determinations.

Fig. 2. Lymphatic Absorption of Vitamin D₃ in Rat Intestinal Lymph after Vitamin D₃ (1500 IU/kg) Administration

Vitamin D₃ in MFGM emulsion (○) or in Tween 80 emulsion (●) or in aqueous suspension (△) was given through a duodenal tube. Group of no [³H] vitamin D₃ was used as control of experiment (□). Values are the mean ± S.D. (n=4).

Fig. 3. Cumulative Percent Dose Recovered in Rat Intestinal Lymph after Vitamin D₃ (1500 IU/kg) Administration

The symbols are same as in Fig. 2 (n=4).

Fig. 4. The Effect of Different Volumes of Oil Phase of MFGM Emulsion on Lymphatic Absorption of Vitamin D₃

Vitamin D₃ (1500 IU/kg) was dissolved in 5% (●) or 25% (○) of soybean oil-emulsion using MFGM as emulsifier and was administered to rats intraduodenally. Values are the mean ± S.D. (n=4).

2) ビタミン D₃ の腸管リンパ吸収への影響

ビタミン D₃ はリンパ系を介して吸収されることが知られている。⁸⁾ ビタミン D₃ の MFGM エマルジョンと Tween 80 エマルジョンとその水懸濁液の単位時間あたりのリンパ吸収実験の結果を Fig. 2 に示す。いずれの場合も投与 6 時間後に吸収ピークが見られたが、吸収量は MFGM で最も高く、曲線下面積で比較すると、3 種の投与群の間に有意差が認められた ($p < 0.05$, Student's *t*-test)。またリンパからの回収率を比較した結果を Fig. 3 に示す。MFGM エマルジョン投与群の回収率はそれぞれ Tween 80 のエマルジョン投与群の 1.4 倍、水懸濁液投与群の 2.5 倍であり、最も高いリンパ移行性を示した。

3) エマルジョン中の油相の比率及び超音波処理による影響

MFGM エマルジョン及び Tween 80 エマルジョンの油相 (大豆油) 及び水相間の量的比率の変動によるビタミン D₃ の累積リンパ移行量への影響を調べた結果をそれぞれ Fig. 4 及び 5 に示す。27 時間までのリンパからの回収率は、油相の量を 5% から 25% にすると、MFGM エマルジョンの場合は 34% から 23.9% に (Fig. 4), Tween 80 エマルジョンの場合は 31.3% から 16.7% に (Fig. 5), いずれも有意に減少した。

又、超音波処理の有無による比較検討の結果を Fig. 6 に示す。超音波処理により、MFGM エマルジョンの安

Fig. 5. The Effect of Different Volumes of Oil Phase of Tween 80 Emulsion on Lymphatic Absorption of Vitamin D₃

Vitamin D₃ (1500 IU/kg) was dissolved in 5% (●) or 25% (○) of soybean oil-emulsion using Tween 80 as emulsifier and administered to rats intraduodenally. Values are the mean $\pm$ S.D. ($n=4$).

Fig. 6. The Effect of Sonication on Lymphatic Absorption of Vitamin D₃

Vitamin D₃ (1500 IU/kg) was dissolved in MFGM emulsion with (●) or without (○) sonication and administered to rats intraduodenally. Values are the mean $\pm$ S.D. ($n=4$).

Fig. 7. Lymphatic Absorption of Amphotericin B in Rat Intestinal Lymph after Amphotericin B (300 μ g/kg) Administration

Amphotericin B in MFGM emulsion (Δ) or in oil-in-water-suspension (●) was given through a duodenal tube. Amphotericin B was dissolved in soybean oil with (Δ , ●) or without ($\square$) Cholesterol (10 mg/ml soybean oil) before emulsion or oil-in-water suspension formation. Values are the mean $\pm$ S.D. ($n=4$).

Fig. 8. Plasma Concentration of Kanamycin as a Function of Time

Kanamycin (600 mg/kg) was dissolved in water (○) or in MFGM emulsion (●) and administered to rats orally. Values are mean $\pm$ S.D. ($n=4$).

定性は著しく改善されたが、ビタミン D₃ のリンパ吸収には影響が認められなかった。

4) アムホテリシン B 及びカナマイシンの消化管吸収への影響

MFGM エマルジョンによるアムホテリシン B のリンパ移行及びカナマイシンの血中移行についての実験結果をそれぞれ Fig. 7 及び 8 に示す。アムホテリシン B は両親媒性薬物であり、水、油のいずれにも難溶解性で、エマルジョンによるリンパ吸収促進効果は認められなかった。コレステロールを加えて油相への溶解性を高めることにより、リンパ吸収が改善されたが、MFGM による吸収促進作用は認められなかった。また水溶性のカナマイシンにも MFGM による吸収促進効果は認められなかった。

考 察

MFGM エマルジョンと Tween 80 エマルジョンはほぼ同程度の安定性を示した。また超音波処理により粒子径を小さくすると、エマルジョンの安定性が著しく高まることが判明した。MFGM は合成界面活性剤と同程度の乳化能を有するという森脇ら⁷⁾の報告を考え併せると、MFGM は Tween 80 に代わる安全性の高い経口、経

腸用の界面活性剤として利用できると考えられる。

MFGM はアムホテリシン B, カナマイシンに対して消化管吸収促進効果を示さなかったが, リンパ系を介して吸収される⁹⁾脂溶性薬物ビタミン D₃ に対して, 顕著な促進効果が認められた。我々は以前の研究で MFGM は水溶性薬物であるアセトアミノフェンやヘパリンに対して吸収促進効果を示さないが, 脂溶性薬物である 1,1-bis(*p*-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (DDT) に対して高いリンパ吸収促進効果があるという結果⁹⁾を得ている。また, 森脇ら¹⁰⁾はビタミン A に対して吸収促進効果を認めている。これらを考え併せると, MFGM は脂溶性薬物に対して高いリンパ吸収促進効果を示すが, 水溶性薬物や水, 油いずれにも難溶性の薬物の吸収には影響しないと考えられる。

脂溶性薬物の消化管吸収についてはエマルションのサイズが小さいほど良いとされている。^{11,12)} しかし, 本研究では, Tween 80 エマルションと MFGM エマルションは同程度の粒子サイズを有するがリンパ吸収は MFGM の方が有意に優れているという結果が得られた。また超音波処理によってエマルションの粒子サイズを小さくしても, 吸収に影響しなかった。これらのことを考えると, 吸収にはエマルションのサイズ以外の要素も配慮されなければならない (例えばエマルション粒子の表面状態, 薬物と MFGM の蛋白質との結合, MFGM の消化管粘膜に対する直接作用の可能性など)。今後詳細な検討をする予定である。

エマルション中の油相の量的相違による吸収量の差について, いずれの投与群でも, dose は一定であるから, 油相の量の増大により油相中に溶けているビタミン D₃ の濃度は減少している。このようなことにより, 小腸吸収部位の近傍における濃度勾配が減少し, ビタミン D₃ の吸収率を減少させた可能性が考えられる。また, 脂肪酸による脂溶性の薬物のリンパ吸収の低下の報告¹³⁾もあるので, 脂肪酸の量が増大するとともに, ミセルサイズの増大などの原因で, ビタミン D₃ のリンパ吸収が低下することも考えられる。

謝辞 本研究は文部省科学研究費 02807195 (M.U.) の援助により行われた。

引用文献

- 1) 齊藤善一, *Jpn. J. Dairy. Food. Sci.*, **31**, A-215 (1982).
- 2) 菅野長右門, *Jpn. J. Dairy. Food. Sci.*, **31**, A-221 (1982).
- 3) 菅野長右門, 日畜会報, **51**, 75 (1980).
- 4) A. L. Warshaw, *Gut*, **13**, 66 (1972).
- 5) W. N. A. Charman, T. Noguchi, V. J. Stella, *Int. J. Pharmaceut.*, **33**, 155 (1986).
- 6) K. Kobayashi, T. Sakoguchi, K. Fujiwara, K. Taniuchi, K. Kohri, A. Matsuoka, *J. Chromatogr.*, **417**, 439 (1987).
- 7) 森脇俊哉, 吉川広之, 高田寛治, 村西昌三, *Drug Delivery System*, **5**, 61 (1990).
- 8) S. Dueland, J. I. Pedersen, P. Helgerud, C. A. Drevon, *J. Biol. Chem.*, **257**, 146 (1982).
- 9) 堀越 勇, 小林史明, 平手純司, 北川さゆり, 刘 紅星, 上野雅晴, *Drug Delivery System*, **4**, 215 (1989).
- 10) 森脇俊哉, 吉川広之, 高田寛治, 村西昌三, *薬剤学*, **50**, 263 (1990).
- 11) P. J. Carrigan, T. R. Bates, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1476 (1973).
- 12) B. D. Tarr, S. H. Yalkowsky, *Pharm Res.*, **6**, 40 (1989).
- 13) D. Hollander, *J. Lab. Clin. Med.*, **97**, 449 (1981).