

## 目次

総論の部	1
緒言	2
第1章 消化管内での薬物の移行及び膜透過を評価するための <i>in vitro</i> system	5
第1節 ヒト消化管内の薬物の移行を再現した SIFC system	6
1.1-1) SIFC system の設計	6
1.1-2) SIFC system における溶液 pH の経時変化	8
1.1-3) モデル薬物の消化管内溶解挙動の解析	10
1.1-4) 考察	16
第2節 親水性 filter と octanol を用いた <i>in vitro</i> 薬物吸収評価 system	18
1.2-1) BiDP system の構築	19
1.2-2) BiDP system における薬物の octanol 相への移行性	22
1.2-3) BiDP system における薬物の吸収性の予測	24
1.2-4) 考察	28
第2章 経口製剤の生物学的同等性評価を目的とした新たな <i>in vitro</i> system	31
第1節 BE チェッカーの構築及び吸収評価 system としての妥当性の検証	32
2.1-1) BE チェッカーの概要	32
2.1-2) BE チェッカーにおける donor 側溶液の pH プロファイル	34
2.1-3) BE チェッカーの実験条件の検証-1：セロケン <sup>®</sup> 錠 20 mg	34
2.1-4) BE チェッカーの実験条件の検証-2：ペルサンチン <sup>®</sup> 錠 25 mg	37
2.1-5) 考察	40
第2節 BE チェッカーを用いた 2 製剤間の BE 評価	42
2.2-1) BE チェッカーを用いたフリバス <sup>®</sup> 錠、フリバス <sup>®</sup> OD 錠の BE の評価	43
2.2-2) 胃到達までの製剤の崩壊過程を反映した protocol の作成	46
2.2-3) 新規 protocol によるフリバス <sup>®</sup> 錠、フリバス OD <sup>®</sup> 錠の BE の評価	47
2.2-4) 考察	51
第3節 特殊な患者集団における製剤 BE 評価の重要性に関する考察	52
第3章 OD 錠を水なし条件で服用した場合の BE 評価	54
第1節 水なし服用条件での薬物の溶出性評価のための <i>in vitro</i> system	55

3.1-1) 水なし服用条件での同等性評価のための chamber の構築	55
3.1-2) 水なし服用条件での同等性評価のための試験 protocol の構築	61
3.1-3) BE チェッカーを用いた水なし服用条件での同等性評価の妥当性の検証	63
第 2 節 水なし服用条件での薬物の溶出に及ぼす胃内の攪拌力の影響	67
第 3 節 考察	69
結論	72
謝辞	76
実験の部	77
第 1 章	78
第 2 章	87
第 3 章	90
引用文献	93

## 総論の部

## 緒言

後発医療用医薬品（ジェネリック医薬品）とは、新有効成分や新しい効能・効果等を有することが臨床試験等により確認され承認された新薬（先発医薬品）の特許が切れた後に、その新薬と同一の有効成分を同一量含み、同一投与経路の製剤であり、効能・効果、用法・用量も原則的に同一である医薬品で、生物学的同等性（Bioequivalence、BE）試験等にてその新薬と治療学的に同等であることが検証されている医薬品と定義されている<sup>1)</sup>。後発医薬品は、研究開発に多大な費用を要する先発医薬品に比べて薬価を低く設定出来ることから、主として、患者負担の軽減や医療保険財政の改善に資することを目的として使用される。我が国でも、高騰する医療費の削減を目的として政府主導で後発医薬品の使用促進が進められてきた。これまでの経緯としては、平成 25 年に厚生労働省によって「後発医薬品のさらなる使用促進のためのロードマップ」が策定され、さらに平成 27 年の閣議決定では、「平成 29 年に後発医薬品の使用率を 70 %以上とするとともに、平成 30 年度から平成 32 年度末までの間のなるべく早い時期に 80 %以上とする」新たな数量シェア目標が定められた。その結果、令和 2 年の段階で日本の医療用医薬品に占める後発医薬品の数量シェアは 78.3 % に上昇し、閣議決定の目標がほぼ達成されたことが報告されている<sup>2)</sup>。

現在販売されている後発医薬品の多くは、2000 年代前半に新薬として開発された糖尿病、高血圧あるいは高脂血症などの生活習慣病薬に代表される経口製剤である。したがって、現在我が国で多くの患者が日常的に服用している医薬品の少なくとも 70 % 近くは、BE 試験によって品質が保証された後発医薬品ということになる。生活習慣病薬の多くは血糖値や血圧等のコントロールを目的とした対症療法薬であり、患者は大抵の場合一生服用を続ける。多くの患者が一生服用する薬であるが故、その品質は極めて慎重に検証されるべきである。そのため、製剤の BE 試験は、その意味で極めて重要な試験と位置付けられる。

我が国における製剤の BE 試験の実施方法や判定基準等は、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」<sup>3)</sup>に細かく定められており、いかなる製剤もこのガイドラインに沿った試験を実施し、判定基準に合致することが求められる。経口製剤の BE 試験では、基本的には試験製剤と標準製剤（既存製剤）を健常被験者にクロスオーバーで投与した後の薬物血中濃度推移を測定し、試験製剤と標準製剤でその濃度推移に差がないことを証明する必要がある。現行のガイドラインでは、比較に用いる動態学的

パラメータとして最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) 及び血中濃度時間曲線下面積 (AUC) を用いることが定められている。

後発医薬品の開発においては、通常、ヒト BE 試験を実施する前に試験製剤と標準製剤について *in vitro* での溶出試験を行い、両製剤の溶出挙動を比較することによって BE 試験の成功確率の向上を図る。現行の第十八改正日本薬局方に定められた経口製剤の溶出試験法としては、回転バスケット法、パドル法及びフロースルー法があり、製剤の特性や試験目的によって適宜使用することが出来る。溶出試験に用いる溶液の組成、volume、pH あるいはパドルやバスケットの回転速度なども細かく決められており、それら規定にしたがった様々な条件下で製剤からの薬物溶出性が測定される。

一方、実際に水とともに経口投与された製剤は、食道を経て、胃、小腸へと消化管内を移行し、その過程で製剤の崩壊及び薬物の溶出・溶解が起こる。消化管内溶液に溶解した薬物は、主として小腸の粘膜を透過し血中へ運ばれる (Fig. 1)。この時、消化管内での薬物の溶出・溶解・膜透過の速度は、胃や小腸の peristaltic な運動による攪拌力や移行速度、消化管内溶液の pH、組成及び volume 等の生理的条件に大きく影響され、それら消化管内の生理的環境の違いは薬物の血中濃度推移の変動の要因となる。

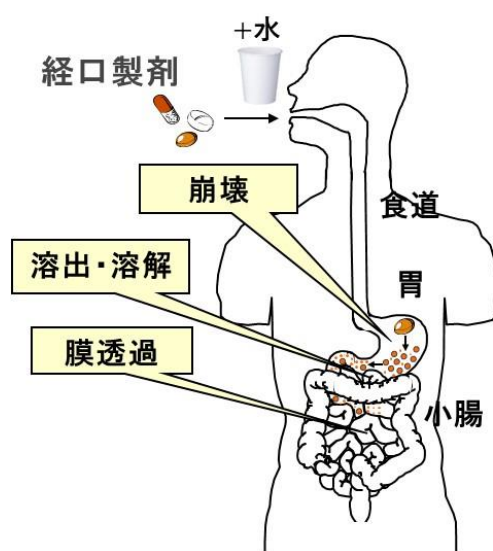


Fig. 1 経口投与された製剤の消化管内移行

しかしながら、現行の溶出試験に用いられる試験液の組成や緩衝能 (例えば、pH 1.2 の日本薬局方溶出試験第 1 液 (JP1)、pH 6.8 の日本薬局方試験第 2 液 (JP2、リ

ン酸緩衝液) 及び特定の pH に調節した薄めた McIlvaine 緩衝液等) は、ヒト消化管内溶液とは大きく異なっている。さらに、パドル法や回転バスケット法では、回転数 50~100 rpm で原則 900 mL の溶液中で薬物の溶出を測定するため、実際の消化管内での生理的条件を反映しているとは言い難い。したがって、2つの製剤間で *in vitro* と *in vivo* での薬物溶出プロファイルの相関性が異なり、*in vitro* 試験の結果からヒトにおける BE を担保出来ない可能性がある。

より *in vivo* に近い条件下で薬物の溶出性を測定することを目的として、これまで絶食時のヒト胃内溶液を模した FaSSGF (Fasted state simulated gastric fluid)<sup>4,5)</sup>、及び小腸内溶液を模した FaSSIF (Fasted state simulated small intestinal fluid)<sup>6,7)</sup> が考案され、製剤開発の様々な段階で繁用されている。また、それぞれ摂食時の模擬溶液 (FeSSGF、FeSSIF) も、食後の溶出挙動の解析に用いられている。これら模擬溶液の特徴として、特に小腸模擬溶液ではヒト消化管内溶液と同等な比率で胆汁酸及び脂質が添加されており、特に溶解性の低い薬物を含む製剤に有効と考えられている。また、胃または小腸の模擬溶液を入れた複数の vessel をポンプを用いて連結し、胃に相当する vessel に製剤を添加した後の製剤・薬物の胃から小腸への移行と溶出を経時的に測定できる system が開発されている<sup>8-17)</sup>。これらの system は *in vivo* predictive *in vitro* dissolution method と称され、製剤処方設計や BE を含めた製剤評価において一定の成果を挙げている。しかし、system が複雑となるため、スループット性及びコストパフォーマンスが問題となるとともに、消化管内の生理的条件の個体間差や個体内差に起因した薬物溶出性の変動、あるいは製剤間の BE に及ぼす食事の影響など、様々な条件設定を必要とする試験には不向きな場合が多い。

そこで本研究では、消化管内の溶液 pH、組成、volume 等の変動を反映した生理的条件下で、胃から小腸への移行及び小腸からの膜透過による吸収を同時にかつ簡便に評価可能な *in vitro* 吸収評価 system の構築を試みた。以下、本研究で開発した Stomach-to-Intestine Fluid Changing System (SIFC system)、Biphasic Dissolution/Permeation system (BiDP system)、及びその2つの system を組み合わせた *in vitro* bioequivalence checking system (BE チェッカー) について、それぞれの system の機能と有用性を検証するとともに、種々製剤の BE 評価を行った結果を 3 章にわたり論述する。

## 第1章 消化管内での薬物の移行及び膜透過を評価するための *in vitro* system

著者らの研究室では、薬物の消化管吸収性を *in vitro* において簡便に評価することを目的として Dissolution/Permeation system (D/P system) を開発し、すでに、その有用性に関する多くの報告を行っている<sup>18-24)</sup>。D/P system は donor と receiver の二つの chamber からなる side-by-side 型の装置で、両 chamber の間にヒト小腸膜のモデルとしてヒト大腸がん由来の培養細胞である Caco-2 細胞単層膜を装着することによって、薬物の溶解と膜透過（吸収）の二つの過程を同時に評価可能とした system である (Fig. 2)<sup>18)</sup>。

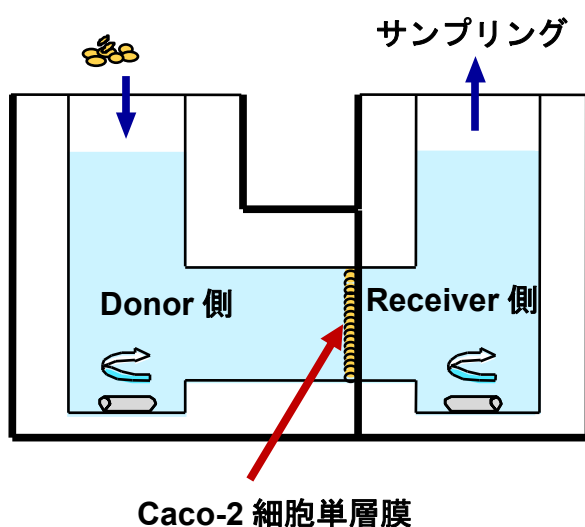


Fig. 2 D/P system の概略図

D/P system では、donor 側溶液としてヒトの小腸模擬液に FaSSIF あるいは FeSSIF を用い、そこに固形の薬物を添加した後、一定時間の間に donor 側で溶解し receiver 側へ透過した薬物量を測定することによって、ヒトにおける経口投与後の吸収率を推定することが出来る。現在では多くの製薬企業において、主に経口製剤開発初期での薬物自体の吸収性や製剤化による吸収改善効果の評価に繁用されている。D/P system は極めて簡便化された装置であり、薬物の主たる吸収部位である小腸での溶解・膜透過に focus して投与後の最終的な吸収率（吸収量）を評価することを目的としている。そのため、胃から小腸への薬物移行過程やそれに伴う吸収量の経時的変化を捉えることは基本的には困難である。さらに、小腸モデル膜として用いる Caco-2 細胞単層膜の

培養には通常 3 週間程度の培養期間を要すること、また培養のための施設と労力が必要であることなどが問題となる場合がある。

そこで本章では、まず薬物の消化管内移行過程を一つの chamber 内で再現し、それに伴う溶解や析出などの現象を経時的に評価が可能な system (SIFC system) の開発を試みた。さらに、Caco-2 細胞単層膜の代わりに octanol と親水性 filter を使用することによって、薬物の小腸膜透過過程の評価が可能かどうかについて、同様な side-by-side 型の吸収評価 system (BiDP system) を用いた検討を行った。

## 第 1 節 ヒト消化管内の薬物の移行を再現した SIFC system

経口投与された製剤は、食道から胃を通過し小腸へと移行していく。製剤は消化管内を移行する過程で崩壊し、放出された薬物は消化管内溶液中に溶解し、消化管粘膜を透過して血中へと吸収される。一方、製剤が直接接する消化管内溶液の pH や組成、volume などの様々な生理的環境は、製剤の胃から小腸への移行に伴って経時的に変化する。一般に食前投与時の、胃内 pH は 1~2 程度、また小腸上部の pH は 5~6 程度と報告されており、弱塩基性、弱酸性薬物は pH に依存した溶解度を示すことから、それぞれの環境下での製剤からの薬物放出性が、主たる吸収部位である小腸での薬物溶解濃度のプロファイルに大きく影響することになる。

これまでに、胃内あるいは小腸内の各部位での溶液組成を模した消化管内模擬溶液を入れた複数の vessel をポンプで連結することによって、胃から小腸への薬物の移行を *in vitro* で再現した Gastro-Intestinal simulator (GIS)<sup>8-10)</sup> などの multivessel system が開発されている<sup>11-17)</sup>。しかしそれらの system の欠点として、構造が複雑でスループットが低く、また消化管内の様々な条件に合わせた試験条件のセットアップが困難であることが指摘されている。そこで本節では、*in vitro* においてより簡便に消化管内での薬物移行過程を再現することを目的として、一つの vessel 中の溶液の組成や pH を胃から小腸へと経時的に変化させることが可能な system として、Stomach-to-Intestine Fluid Changing System (SIFC system) の開発を試みた。

### 1.1-1) SIFC system の設計

SIFC system の概要を Fig. 3 に示した。また Fig. 3 下部は、本 system と消化管内での製剤（あるいは薬物原薬 (Active Pharmaceutical Ingredient: API)）の挙動との



対応を経時的に表している。本 system では、ヒト胃模擬溶液中に薬物を添加して一定時間溶解させた後、濃縮したヒト小腸模擬溶液を一定速度で滴下することによって、溶液の pH、組成、volume を胃から小腸へと変化させ、薬物の胃から小腸への移行に伴う生理的な環境変化を再現することが可能である。

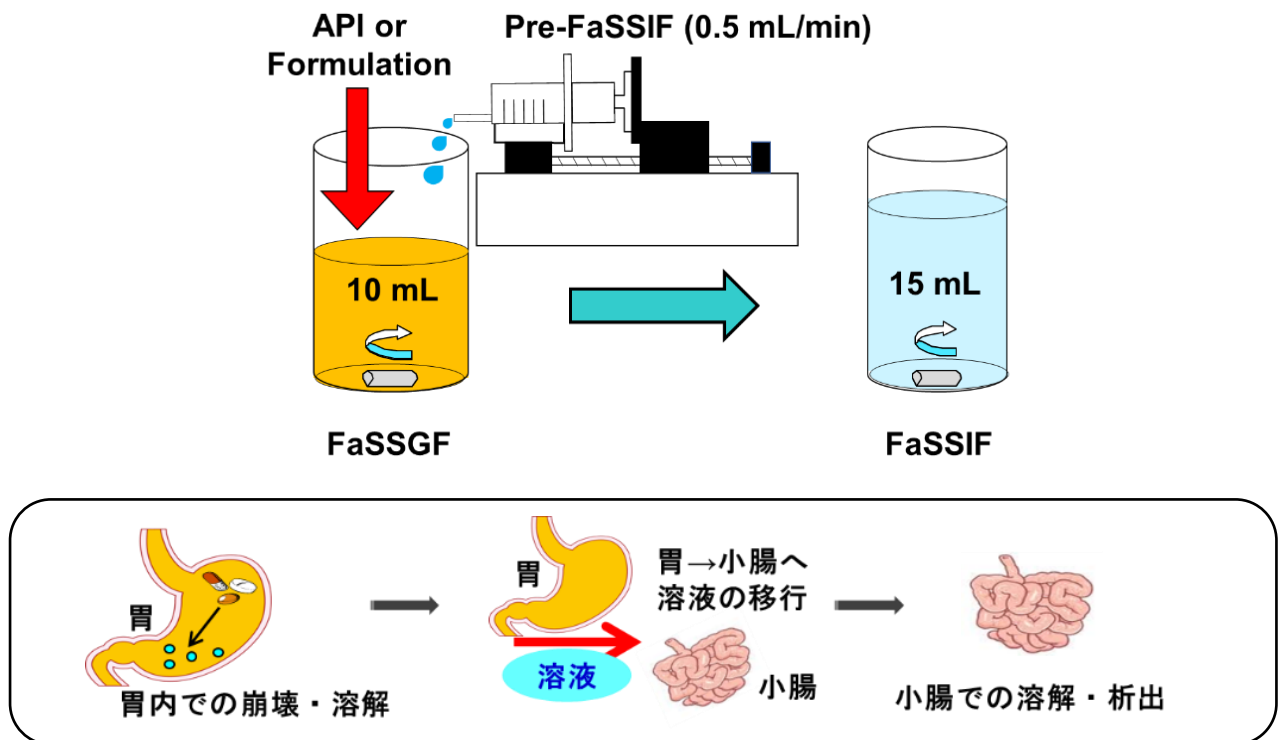


Fig. 3 SIFC system と *in vivo* での消化管内薬物移行過程の対応

本検討では、胃のモデル液として pH 1.6 または 4.0 に調整した FaSSGF を用い、小腸モデル液の濃縮液 (pre-FaSSIF) を一定速度で添加することによって、vessel 内の溶液を最終的に pH 6.5 の FaSSIF に変化させた。ヒト消化管内の溶液量に関しては、MRI や PET などの分子イメージング技術を用いた直接的な測定の外、薬物の消化管内濃度推移に基づく推定など、多くの報告があり、通常、絶食時の胃内溶液量は 10~50 mL 程度<sup>25)</sup>、小腸内溶液量は 100~200 mL 程度<sup>26)</sup>と考えられている。臨床試験において、薬物経口投与時には、通常、150 mL の水を同時に服用することから、薬物服用直後の胃内溶液量は約 180 mL と想定される。また、この胃内溶液がそのまま小腸へ移行した場合、小腸内の溶液量は 250~300 mL 程度になると考えられる。

SIFC system では、溶液量として消化管内実容積の 1/18、胃と小腸内の溶液量の比を 1:1.5 とするため、実験開始時の FaSSGF を 10 mL、最終的な FaSSIF の volume を 15 mL とする protocol を設定した。またこの時、pre-FaSSIF の組成を FaSSIF の 3 倍濃縮とし、pH を 0.1 N の NaOH 溶液を用いて予め高く調整しておくことで、最終的に pH 6.5 の FaSSIF へと変化させた。それぞれの溶液の組成を Table 1 に示した。

Table 1 本研究で用いた各溶液の組成

	FaSSGF	Pre-FaSSIF	FaSSIF
NaTC (mM)	0.08	9.0	3.0
Lecithin (mM)	0.02	2.25	0.75
NaCl (mM)	43.2	-	28.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)		87	29
KCl (mM)		309	103
MES (mM)		15	5

SIFC system において、pre-FaSSIF の滴下によって溶液の pH 及び溶液量が変化している時間は、実際の *in vivo* における胃排出時間に相当する。Yamashita らは、胃から小腸への溶液の移行速度は 1 次速度に従い、その半減期は平均して 5 分程度であること報告している<sup>25)</sup>。SIFC system において 1 次速度で pre-FaSSIF を滴下するためには、滴下速度を時間に対して変化させる必要があり、実験上複雑な system を要する。そこで、本研究では一定の速度で pre-FaSSIF を滴下することとし、その速度を胃排出半減期の 2 倍となる 10 分とすることによって、*in vivo* での胃排出に近似することとした。

### 1.1-2) SIFC system における溶液 pH の経時変化

通常、胃から小腸に薬物が移行するに従い、薬物が溶解している消化管内溶液の pH は徐々に上昇する。しかし、実際のヒト消化管内で薬物を含む消化管内溶液の pH が時間に対してどのような変化パターンを示すのかに関する正確な情報は得られていない。そこで本研究では、pre-FaSSIF の滴下開始 5 分後程度で急速に pH が上昇する protocol (Steep pH change protocol)、及び滴下開始 2 分後以降から徐々に pH が上昇する protocol (Gradual pH change protocol) の 2 種の protocol を用いた検討を実施

した。Gradual pH change protocol では、薄めた McIlvaine buffer (0.02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び 0.01 M Citric acid) を添加することによって緩衝能を高くした pre-FaSSIF 溶液を用いた (Table 2)。

Table 2 本研究で用いた protocol の液性

		FaSSGF	Pre-FaSSIF	FaSSIF
Steep pH change (Dissolved in water)	pH	1.6	7.55-7.80	6.5
	Buffer capacity (mM/ ΔpH)		17.4	
Gradual pH change (Dissolved in McIlvaine)	pH	1.6	10.9-11.4	6.5
	Buffer capacity (mM/ ΔpH)		23.3	
High gastric pH (Dissolved in McIlvaine)	pH	4.0	6.75-6.85	6.5
	Buffer capacity (mM/ ΔpH)		23.3	

Fig. 4 に両 protocol における pre-FaSSIF 滴下 10 分間での pH 変化パターンを示した。Steep pH change protocol では、溶液の buffer capacity が低いため pre-FaSSIF の注入開始 5~7 分間に pH が 2.5 から 6 程度まで急激に上昇するのに対し、Gradual pH change protocol では滴下開始後 2~8 分にかけて pH が徐々に変化することが確認された。さらに、低胃酸症患者、あるいは胃酸分泌阻害薬を併用した患者などでは、もともとの胃内 pH が上昇していると考えられることから、その様な患者での薬物の溶解プロファイルを検討する目的で最初の胃内 pH を 4.0 とした protocol (High gastric pH protocol) を設定した。Fig. 4 に示した様に、High gastric pH protocol においては pre-FaSSIF の滴下直後より溶液の pH が上昇し、滴下開始 5~6 分後には pH はほぼ 6 以上となった。

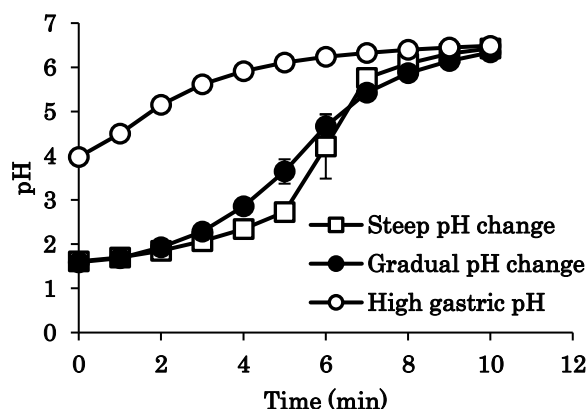


Fig. 4 pH-shift profiles of the simulated GI fluids in the SIFC system. Three types of conditions (Steep pH change (□), Gradual pH change (●) and High gastric pH (○) protocol) are representing variability of GI physiology.

### 1.1-3) モデル薬物の消化管内溶解挙動の解析

通常、ヒト BE 試験はクロスオーバー試験として実施されることから、標準製剤と試験製剤の製剤間差を考える上で、被験者間の個体内変動は基本的に無視することが出来る。一方、各被験者ごとの個体内変動は血中濃度推移のばらつきの原因となり、BE 試験における製剤間差の判定に影響を及ぼす。Sugihara らは、113 のジェネリック医薬品について、ヒト BE 試験での各被験者における血中濃度推移の AUC 及び  $C_{max}$  の個体内変動 (intrasubject variability:  $V_{intra}$ ) を調査し、それを数値化することによって変動要因の解析を試みている<sup>27)</sup>。その結果、消化管内での溶解性の低い薬物では、被験者の様々な要因 (摂食からの時間経過<sup>28, 29)</sup> やメンタル面<sup>30)</sup> など) により、製剤の崩壊や薬物の溶出が影響を受け、個体内変動が大きくなるケースがあることを報告した。特に、弱塩基性薬物は pH の低い胃内で一旦溶解するものの、小腸に移行して pH が上昇すると溶解度が低下するため、小腸内で析出が生じる可能性がある。また薬物によっては、pH が上昇した後もすぐに析出せず、飽和溶解度よりも高い溶解濃度が小腸内で一定時間維持される場合がある (過飽和溶解)。小腸で過飽和溶解を示す薬物では、胃内 pH や胃から小腸への移行速度の個体内変動がその後の吸収に大きなバラツキをもたらすと考えられる<sup>31, 32)</sup>。

そこで本節では、SIFC system の有用性を検証するためのモデル薬物として、弱塩基性薬物の Pioglitazone、Terbinafine、及び両性薬物であり中性 pH で極めて低い溶

解度を示す Telmisartan を選び、SIFC system によって得られた結果を Sugihara らによって報告された各薬物の BE 試験における  $C_{max}$  の  $V_{intra}$  の大きさとの比較を行った。各薬物の溶解度、膜透過性、pKa 及び BE 試験における  $C_{max}$  の  $V_{intra}$  を Table 3 に示す。

Table 3 モデル薬物の物理化学的性質及び BE 試験における個体内変動

		Pioglitazone	Terbinafine	Telmisartan		
Solubility (mg/mL)	Water	0.027	0.14	0.00083		
	pH 1.2	2.652	1.2	≈ 0.25		
	pH 6.8	0.0003	0.001	≈ 0.0002		
FaSSIF solubility (mg/mL) mean ± S.D.		0.000726 ± 0.000063	0.364 ± 0.028	0.00114 ± 0.00003		
$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/s)		2.96	8.55	4.8		
pKa		5.8	7.13	3.5, 4.1, 6.0		
Intra-individual variance in BE study	Dose (mg)	15	125	20	40	80
	AUC $V_{intra}$ (%)	15.6	21.5	15	14	18.5
	$C_{max}$ $V_{intra}$ (%)	20.7	41.2	17.3	32.4	68.7

### Pioglitazone、Terbinafine の溶解・析出プロファイル

まず、弱塩基性薬物で  $C_{max}$  の  $V_{intra}$  が比較的小さい Pioglitazone と  $V_{intra}$  が大きい Terbinafine について、SIFC system を用いて消化管内移行過程における溶解・析出プロファイルを観察した。薬物自体及び製剤としての挙動を比較するため、API 及び粉砕した製剤を、それぞれ 10 mL の FaSSGF へ添加し実験開始とし、その後、1 分間攪拌を行った後に pre-FaSSIF の滴下を開始した。滴下時間は 10 分間とし、その間は 1 分間隔で、また滴下終了後は 10~30 分間隔で 60 分後まで sampling を行い、溶解濃度プロファイルを観察した。なお、SIFC system における FaSSGF の液量 10 mL が、推定されるヒト胃内溶液量 180 mL (定常状態の胃内水分量 30 mL + 経口投与試験に伴う飲水量 150 mL) の 1/18 であることから、FaSSGF への薬物添加量は臨床投与量の 1/18 とした。

Fig. 5 に Pioglitazone の溶解濃度時間プロファイルを示した。Steep pH change protocol に API を投与した場合、投与直後に完全に溶解し、その後、pre-FaSSIF の注入開始 7 分後に速やかな析出を示し、溶解濃度は急激に低下した。析出が認められた時点での溶液 pH は 5.8 付近で、Pioglitazone の pKa に近い値であった。Gradual pH change protocol の場合、初期の溶解は Steep pH change protocol の時よりも低かったが、pre-FaSSIF 注入開始 7 分後に同じように析出を生じた。胃内 pH を 4.0 とした High gastric pH protocol では、初期の溶解は他の条件と比べ低い値であったものの、析出後の溶解濃度は同様に極めて低い値であった。また、粉碎した製剤を投与した場合では、Gradual pH change protocol の初期の溶解は改善したものの、pre-FaSSIF 添加終了後の溶解濃度はすべての実験条件において API とほぼ同じ値となった。以上、Pioglitazone は弱塩基性薬物であるものの、全ての条件で過飽和溶解は観察されず、小腸移行時の濃度は中性 pH での飽和溶解度となり、実験条件による影響や製剤化による改善は観察されなかった。

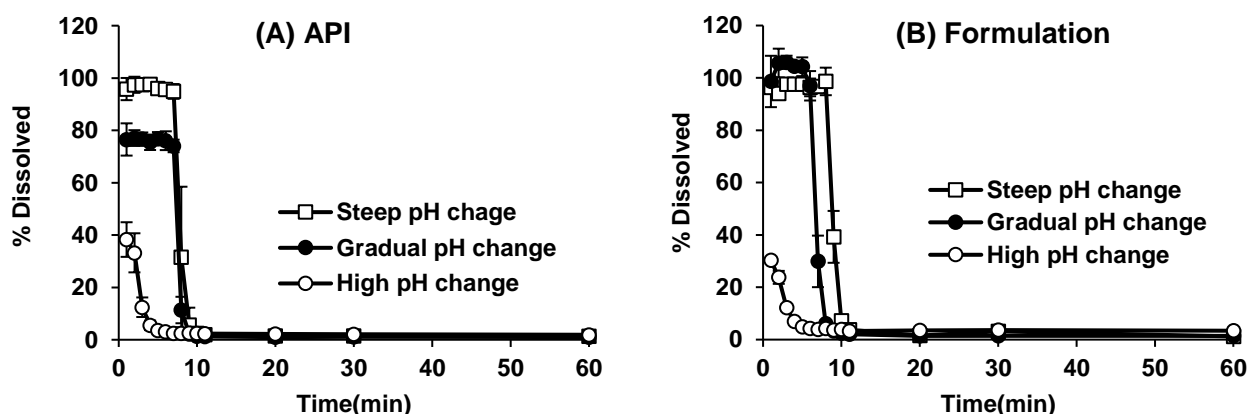


Fig. 5 Dissolution-time profiles after administration of (A) Pioglitazone API or (B) Pioglitazone formulation in the SIFC system. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3).

次に  $C_{max}$  の  $V_{intra}$  が大きいとされる Terbinafine の SIFC system における溶解濃度プロファイルを示した。API 投与時、Terbinafine の溶解濃度は Steep pH change protocol でも Gradual pH change protocol でも最初の 10 分で 80 %に達し、その溶解濃度は pre-FaSSIF 滴下終了後も一定に維持された。その値は、いずれも FaSSIF 中の Terbinafine の飽和溶解度と同じであった。一方、High gastric pH

protocol では、溶解濃度は他の条件よりも有意に低くなった。粉碎した製剤を投与した場合、Steep pH change protocol でも Gradual pH change protocol でも滴下 5 分後にはほぼ 100 %が溶解し、その後、API の場合と同様に約 80 %に減少した。High gastric pH protocol の場合、初期の溶解濃度は API の時よりも少し高い値を示したが、pre-FaSSIF 滴下終了後の溶解濃度は API とほぼ同様の 30 %程度であった。

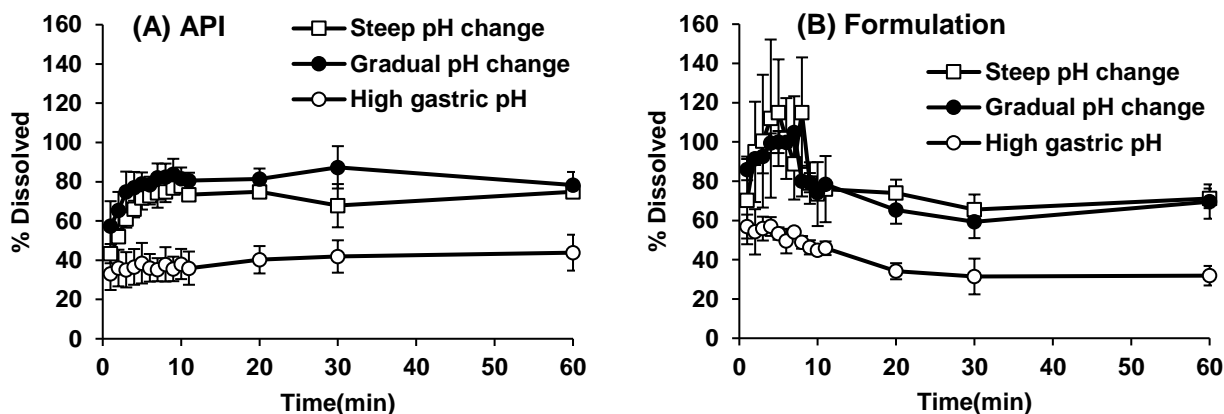


Fig. 6 Dissolution-time profiles after administration of (A) Terbinafine API or (B) Terbinafine formulation in the SIFC system. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3).

以上の結果は、Sugihara らの報告において Pioglitazone の BE 試験における  $C_{max}$  の  $V_{intra}$  が 20 %程度と他の弱塩基性薬物に比べて比較的小さかったこと、及び Terbinafine では 40 %程度と大きな個体内変動を示したことと一致する結果と考えられる。また、Terbinafine では、胃内 pH が小腸移行時の溶解濃度に大きな影響を及ぼすことが個体内変動の要因の一つと推察される。

### Telmisartan の溶解・析出プロファイル

Telmisartan は酸、塩基の両方の解離基を有しており、 $pK_a$  は 3.5、4.1 及び 6.0 と報告されている<sup>33)</sup>。中性 pH ではほとんどの薬物分子が非イオン型となるため、特に pH 4~7 付近において溶解度が極めて低い値となる。Telmisartan の市販製剤では、中性 pH 付近での溶解性を向上させる目的で pH 調整剤としてメグルミンが配合されており、メグルミンの溶解によって主薬近傍の溶液 pH が上昇し、Telmisartan の溶解度が上昇すると考えられている。また、Telmisartan の市販製剤には 20、40、80 mg の 3

つの規格があり、投与量が高くなるほど  $C_{max}$  の  $V_{intra}$  が大きくなることが報告されている。そこで Telmisartan の溶解・析出に及ぼす製剤及び投与量の影響について SIFC system による評価を行った。

Fig. 7 に Telmisartan の API の溶解パターンを示した。なお、Pioglitazone 及び Terbinafine での検討において、Steep pH change protocol と Gradual pH change protocol で溶解や析出に差が観察されなかったため、本検討では Gradual pH change protocol と High gastric pH protocol の 2 パターンを用いて評価を行った。Fig. 7 に示すように、API を投与した場合、Gradual pH change protocol では低 pH において 50 %程度まで速やかに溶解した。その後、溶解濃度は pH 4.1 付近 (pre-FaSSIF 注入開始 7 分後) に一旦 40 %まで減少し、pH が pKa の 6.0 を超えた時点で再び 45 %程度まで溶解した。この時の溶解濃度は pH 6.5 での飽和溶解度の 60 倍以上であった。pre-FaSSIF 注入終了後、溶解濃度は徐々に減少したものの、実験開始後 60 分での溶解濃度では飽和溶解度よりも有意に高い値であった。一方、High gastric pH protocol においては、投与初期から溶解濃度は低く推移し、実験終了時においても投与量の 4.3 %であったことから、胃内の pH が小腸移行後の吸収に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

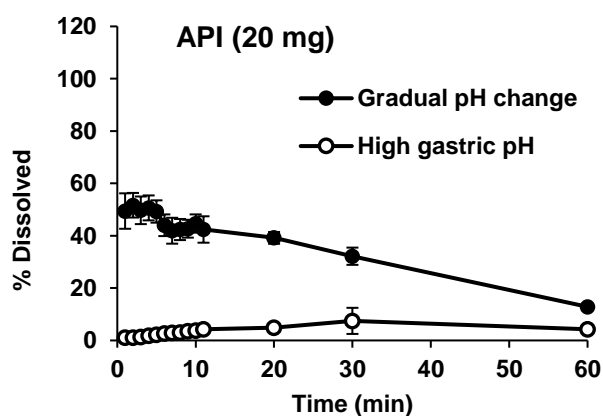


Fig. 7 Dissolution-time profiles after administration of Telmisartan API in the SIFC system. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3).

粉碎した製剤投与後の Telmisartan の溶解濃度プロファイルは、投与量に依存したものの、API 投与時に比べていずれの protocol においても大きく改善した。Fig. 8 に示すように、Gradual pH change protocol では 20 mg、40 mg で初期の低 pH 領域ではほとんど完全に溶解し、その後、pre-FaSSIF 注入開始 7 分後に 70~80 %まで一過性の



減少を示した。これは溶液 pH が  $pK_{a2}$  に近づいたためと考えられる。溶液 pH が pH 6.5 に変化した後、溶解濃度は 90 %程度まで増加し、その後実験終了時まで 80 %以上の値が保れた。実験終了時の溶解濃度は 20 mg、40 mg で FaSSiF 中での飽和溶解度の 54 倍、108 倍高い値であった。一方投与量を 80 mg とした場合には、 $pK_{a2}$  付近での溶解濃度は 8 %程度にまで急激に減少した。その後、pre-FaSSiF 注入に従い溶解濃度は約 60 %まで増加し、実験終了時の濃度は飽和溶解度の 157 倍高くなった。High gastric pH protocol では初期の溶解濃度は Gradual pH change protocol と比べて明らかに低かったものの、pre-FaSSiF の注入終了時にはすべての投与量で 75~90 %に増加した。60 分後の pH が 6.5 付近であったため、メグルミンが実験を通して pH に影響を与えなかったことには注意する必要がある。

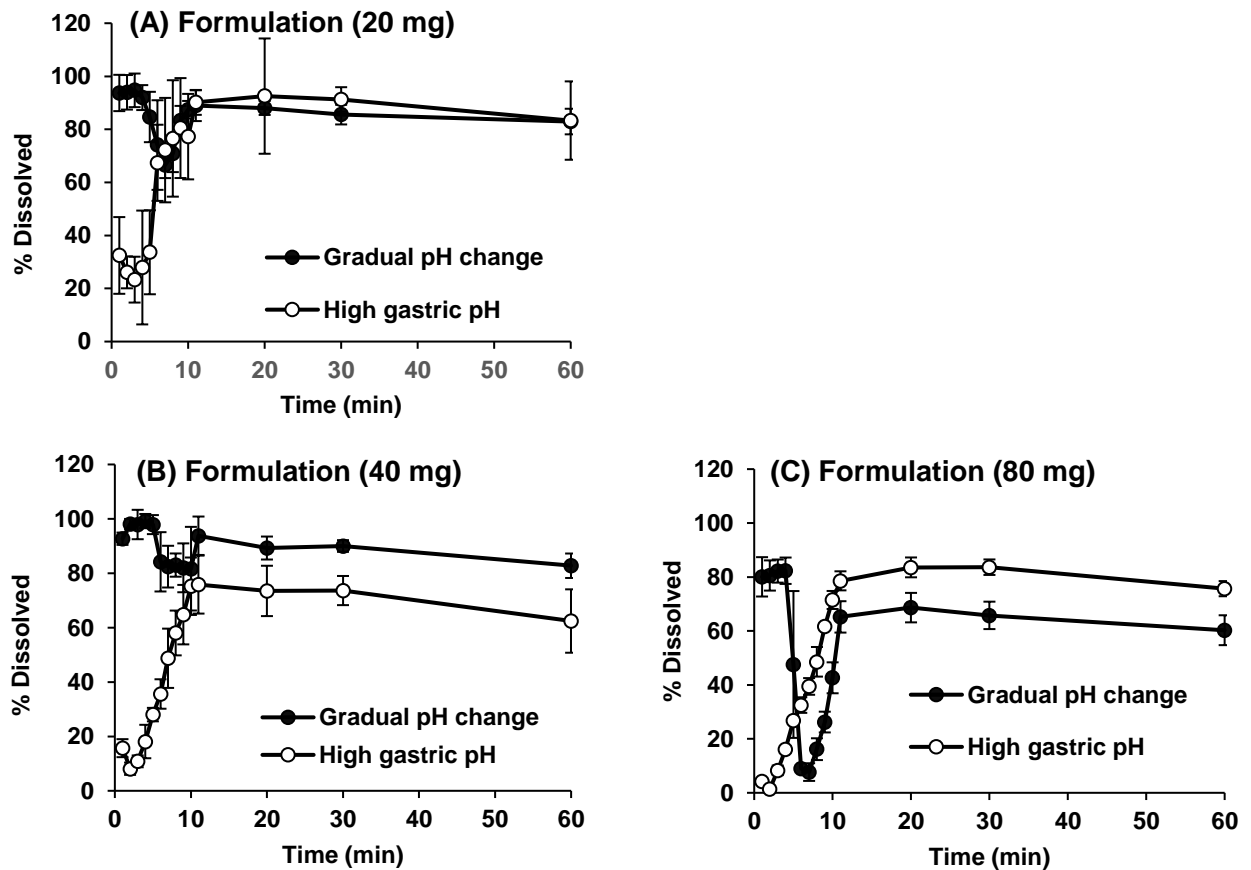


Fig. 8 Dissolution-time profiles after administration of (A) low dose, (B) middle dose or (C) high dose of Telmisartan formulation in the SIFC system. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3).

#### 1.1-4) 考察

消化管内の生理的環境は、疾病、年齢、精神状態、食事等の様々な影響を受けて変動する。例えば、胃内 pH や胃排出速度は、低胃酸症等の疾病、胃酸分泌阻害剤の併用あるいは年齢によって個体間で大きく異なるとともに、食事のタイミングや精神状態などによって個体内でも変動することが知られている<sup>35-38)</sup>。経口投与された固形製剤からの薬物の溶出・溶解は、消化管内の pH や volume、組成などに強く依存するため、ヒトにおける個体間及び個体内での吸収の変動を評価するためには、消化管内の生理的環境を反映させた *in vitro* の評価法が必須と考えられる。本節では、固形製剤の消化管内で溶解や析出プロファイルを評価するための新たな *in vitro* system として SIFC system を開発した。SIFC system の最大の特徴は、胃から小腸への製剤や薬物の移行過程を一つの vessel 内で再現するため、製剤や薬物自体を移動させるのではなく、溶液の pH、組成及び volume を経時的に変化させるという点である。本手法によって、多数の vessel やポンプを用いた複雑な system を構築することなく、極めて簡便な手法で消化管内の環境変化を再現することが可能となった。同様なコンセプトの評価法として、日本薬局方に規定されている溶出試験において、最初の溶液を胃モデル液とし、一定時間薬物と incubate した後に濃縮した FaSSIF を一気に加えて溶液組成や pH を FaSSIF へ変化させるという pH-shift 法がしばしば利用されている<sup>39)</sup>。しかし実際の *in vivo* では、胃から移行した胃内容物が小腸上部において徐々に小腸内溶液と混ざり合うことによって、溶液の pH や組成が経時的に変化していくことから、本研究で開発した SIFC system によって、より *in vivo* に近い環境を再現することが可能である。本節では、ヒト BE 試験において吸収における個体間変動が無視できることに着目し、SIFC system の結果から BE 試験における薬物の血中濃度推移の  $V_{intra}$  の要因解析を試みた。

Hens らは、弱塩基性薬物を経口投与した後の血中濃度の変動に関して *in silico* 感度分析を行い、胃内 pH と胃排出速度が弱塩基性薬物の吸収における主たる変動要因であることを明らかにした<sup>40)</sup>。多くの弱塩基性薬物は、経口投与後、胃で速やかに溶解した後小腸から吸収される。通常、溶解性の低い薬物では、小腸移行に伴う pH の上昇に従って溶解度が低下し析出を生じるため、胃内での溶解と胃排出速度がその後の吸収速度や吸収率に大きな影響を及ぼす。また、薬物によっては小腸内で過飽和溶解を示すことによって、平衡溶解度よりも高い濃度が維持される場合がある。弱塩基性薬物が過飽和溶解を示すためには、胃内の低 pH 条件下で溶解することが必須であ

る。また、過飽和状態は熱力学的に不安定な状態であるため、析出が生じるタイミングやその速度は消化管内での生理的要因によって大きく変動する。SIFC system では、pre-FaSSIF の注入が終了した時点で小腸への移行がほぼ完了したと想定していることから、その時点での溶解濃度及びその後の溶解濃度の経時的変化が吸収を考える上で重要となる。

Pioglitazone では、pre-FaSSIF 注入終了時点での溶解濃度が、pH 変化パターンや初期の胃内 pH に関わらずいずれの条件においてもほぼ飽和溶解度まで低下していたことから、胃内 pH などの個体内変動は Pioglitazone の吸収に大きな影響を与えないものと推察される。一方、Terbinafine の溶解濃度は、API、製剤とも溶液が完全に FaSSIF に変化した後も飽和溶解濃度とほとんど同じレベルで一定に維持されていた。しかし、初期の胃内 pH が高い High gastric pH protocol における溶解濃度は、胃内 pH が低い場合の 50 %未満であった。この結果は、胆汁酸ミセルを含む FaSSIF 中でも、中性 pH 領域では Terbinafine の溶解速度が遅いことを示しており、小腸からの吸収において胃内での溶解過程の重要性を示すものである。また、製剤からの Terbinafine の FaSSIF 中の溶解濃度推移は API とほぼ同じであったことから、製剤化の効果は、胃内 pH の上昇による吸収低下を改善するという観点では限定的であると考えられた。以上の結果より、pH の上昇による胃内での不完全な溶解は、ヒト BE 試験において Terbinafine の  $C_{max}$  に大きな  $V_{intra}$  が認められた原因の 1 つであると推察された。

Telmisartan は中性 pH 範囲での溶解度が極めて低いため、その製剤には pH 調整剤としてメグルミンが添加されている。製剤中のメグルミンの溶解に伴って固体粒子表面の pH が上昇し、Telmisartan の溶解が促進すると考えられる<sup>4)</sup>。本研究においてもメグルミンを含有する製剤では、High gastric pH protocol を含むいずれの条件においても初期の溶解が有意に改善され、pre-FaSSIF 注入終了時の溶解濃度は API よりも高い値となった。また、pH 6.5 の FaSSIF 中においても実験終了時まで飽和溶解度以上の高い溶解濃度が保たれていたことから、Telmisartan では胃内で製剤から溶解した後、小腸において過飽和溶解が長時間維持されることが明らかとなった。実際、ヒトにおける Telmisartan 製剤投与後の吸収率は 80 %程度と高いことが報告されており、今回の結果を裏付けるものと思われる。

Telmisartan のヒト BE 試験において、血中濃度の個体内変動は投与量が増加するにつれて大きくなる傾向にある。Fig. 8 に示した様に、20 mg、40 mg、80mg の臨床用

量に相当する投与量を用いた検討において、80 mg 投与時には胃から小腸への移行に伴って、急激な溶解度の低下が観察された。これは、高投与量時には pH 4 付近で過飽和度が極めて大きくなり、一気に析出が生じたためと考えられる。低投与量においても同様な現象は認められるもののその程度は僅かであったことから、高投与量時には胃から小腸への移行に伴って **Telmisartan** の急激な析出が生じ、その後の小腸での再溶解過程のバラツキによって吸収速度が大きく変動するものと推察された。また、投与量が高くなるにつれて、二つの **protocol** 間で小腸における溶解濃度の差が大きくなったことから、胃内 pH や胃排出速度などの生理的条件の違いが、吸収における個体内変動の要因となることが示唆された。

以上、本節で構築した **SIFC system** によって、弱塩基性薬物のヒト消化管内での溶解、析出過程を *in vitro* で精度良く再現することが可能であった。さらに、経口製剤投与後の吸収における個体内変動の要因を解析する上で、本 **system** を用いた検討が有用であることを示した。今回、薬物の胃排出速度は全て一定とした条件で試験を行ったものの、胃排出速度は個体内あるいは個体間変動の要因となることが知られている<sup>40)</sup>。本 **system** では **pre-FaSSIF** の注入速度を調整するだけで、胃排出速度を簡単に変化させることが可能であることから、今後、胃内 pH に加えて、胃排出速度の違いによる吸収の個体内変動についても評価を行っていく予定である。

## 第 2 節 親水性 filter と octanol を用いた *in vitro* 薬物吸収評価 system

著者らの研究室で開発された **D/P system** は、薬物の溶解、膜透過を同時に測定することによって、主に難溶性薬物の吸収性や吸収に及ぼす製剤化等の効果を簡便に評価することを目的としている (**Fig. 2**)<sup>18)</sup>。本 **system** の問題点の一つとして、経時的な吸収過程の評価が困難である事とともに、ヒト小腸のモデル膜として用いる **Caco-2** 細胞単層膜の培養に時間と労力がかかることが挙げられる。**Caco-2** 単層膜以外の培養細胞膜として、より短期間 (5 日間程度) での培養が可能なイヌ尿細管由来の **MDCK II** (**Madin-Darby canine kidney**) 単層膜を用いた検討も報告されているが<sup>24)</sup>、その培養には同様な施設が必要であり、例えば製剤研究所などで容易に用いることは難しい。

**Hoa** らによって報告された **Biphasic system** は、水系溶媒から **octanol** 中への薬物の分配率を測定することによって小腸膜透過性を評価する **system** であり<sup>42)</sup>、**Caco-2** 細胞単層膜等のモデル膜を用いないため、施設によらず簡便に薬物の吸収性を評価する

ことが可能である<sup>11)</sup>。Biphasic system の問題点としては、薬物の octanol への分配と膜透過は現象として根本的に異なっていること、及び octanol と水系溶媒が直接接しているため、脂質成分を含む FaSSIF や FeSSIF などの小腸模擬液の使用が難しいと言う点が指摘されている。そこで、本節では、D/P system と Biphasic system を組み合わせることによって、それぞれの問題点を解決可能な新たな system (Biphasic-D/P system (BiDP system)) を構築し、ヒト吸収性予測への適応性を検証した。

### 1.2-1) BiDP system の構築

BiDP system の概要を Fig. 9 に示した。D/P system と同様な side-by-side 型の chamber system で、二つの chamber の間に Caco-2 細胞単層膜の代わりに親水性 filter を装着することで、FaSSIF 等の水系溶媒を入れた donor 相と、octanol を入れた receiver 相の間を仕切ることが特徴である。chamber 中央に親水性 filter を装着することで、FaSSIF 等の模擬腸液中の脂質成分の octanol 相への移行を防ぐとともに、donor 相から receiver 相への薬物移行の測定を簡便に行うことが可能である。さらに、親水性 filter は小腸の上皮細胞表面に存在する非攪拌水層 (Unstirred Water Layer: UWL) として機能することで、小腸粘膜を介した膜透過過程をより精密に再現できるものと期待される。

実験手順としては、donor 側に固形の薬物を添加し、donor 側における溶解率と receiver 側へ透過した透過率を同時に測定する。Donor 側溶液としては FaSSIF あるいは FeSSIF を用い、receiver 側溶液には予め水飽和させた octanol を用いた。BiDP system に用いる親水性 filter は Caco-2 細胞単層膜に比べて膜有効面積を大きくすることが可能であることから、膜面積は 12.56 cm<sup>2</sup> とし (D/P system では 1.77 cm<sup>2</sup>)、donor 側容積は 30 mL とした (Table 4)。薬物投与量としては、薬物服用後の絶食時のヒト小腸内溶液量が 200~300 mL と報告されていることから、臨床投与量の 1/10 と設定した。

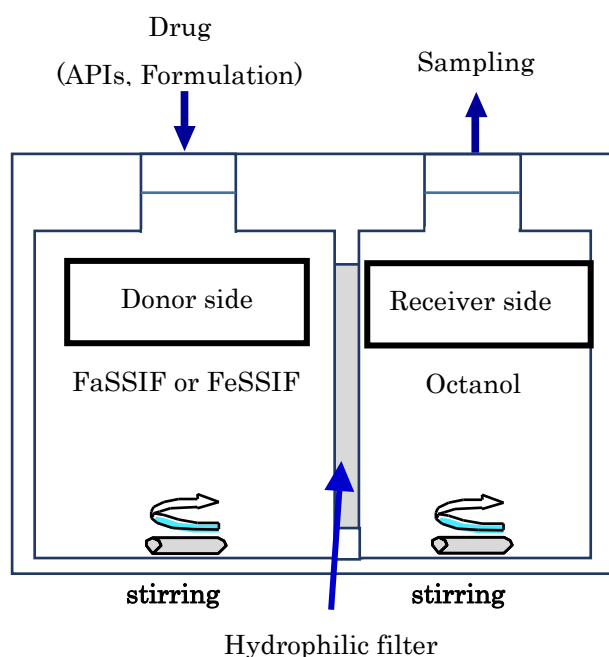


Fig. 9 BiDP system の概要

Table 4 BiDP system の実験条件 (D/P system との比較)

	D/P system	BiDP system
Fluid	Donor side	FaSSIF, FeSSIF
	Receiver side	Transport medium (+BSA)
Membrane	Caco-2 cell monolayer	Hydrophilic filter (Durapore, 0.1 $\mu\text{m}$ pore)
Membrane surface area	1.77 $\text{cm}^2$	12.56 $\text{cm}^2$
Fluid volume (Donor side)	8 mL	30 mL
Applied drug amount (ratio to the clinical dose)	1/100	1/10

本研究では、親水性 filter として octanol に対して高い耐性を有することが報告されている MERCK Millipore 社製の Durapore Membrane filter (MERCK Millipore, Burlington, MA, USA) を使用した。まず、Durapore Membrane filter の本 system

への適応性を確認するため、モデル薬物として Dipyridamole を用いて donor 側から receiver 側への移行量の評価を行った。孔径 0.1、0.22、0.45  $\mu\text{m}$  の 3 つのタイプの filter を使用した場合の移行率の経時的プロファイルを図 10 に示す。いずれの孔径サイズの filter においても実験開始 15 分から移行率は増加し、その後の移行速度に孔径サイズによる有意な差は認められなかった。しかしながら、孔径が 0.45  $\mu\text{m}$  の filter を使用した場合、donor 側の脂質成分の移行が視覚的に確認された。

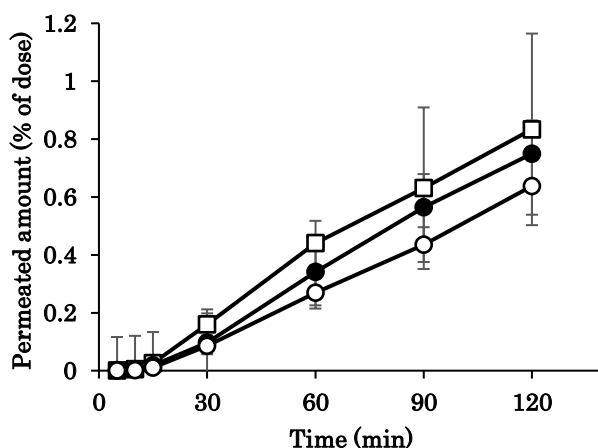


Fig. 10 Time profiles of the permeated amount of Dipyridamole in the BiDP system. As a hydrophilic filter Durapore<sup>®</sup> membrane with 0.1  $\mu\text{m}$  pore (○), 0.22  $\mu\text{m}$  (●) or 0.45  $\mu\text{m}$  (□) was used. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

Fig. 11 に、3 種の孔径サイズの Durapore Membrane filter を用いて FaSSIF 中の成分であるタウロコール酸の receiver 側への移行率を測定した結果を示す。Filter の孔径サイズが大きくなるにつれてタウロコール酸の移行率が上昇し、その傾向は特に実験開始初期に顕著であった。この結果より、今後の検討においては octanol 相への FaSSIF 成分の移行が最も小さかった孔径サイズ 0.1  $\mu\text{m}$  の Durapore Membrane filter を使用することとした。

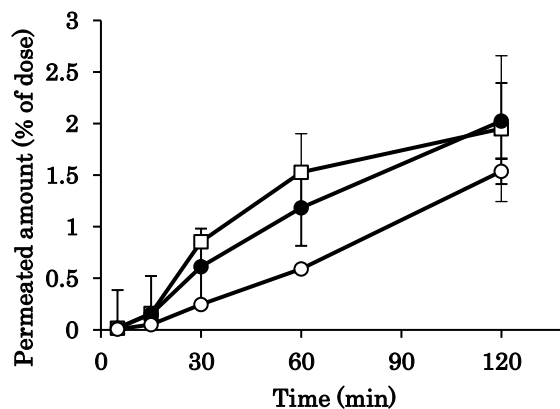


Fig. 11 Time profiles of the permeated amount of bile acid (taurocholic acid) in the BiDP system. As a hydrophilic filter, Durapore® membrane with 0.1 μm pore (○), 0.22 μm pore (●) or 0.45 μm pore (□) was used. Each data point represents mean ± S.D. (n = 3).

### 1.2-2) BiDP system における薬物の octanol 相への移行性

BiDP system を用いて膜透過性の異なる 3 種の薬物 (Propranolol、Metoprolol、Atenolol) の octanol 相への移行量を経時的に測定した結果を Fig. 12 に示す。いずれの薬物も donor 側に原薬粉末として添加した後、FaSSIF 中で完全に溶解し、また添加後少なくとも 90 分までは移行率が直線的に増加した。直線部分から親水性 filter を介した octanol 中への移行性 (filter/octanol 透過性) を算出した結果を、それぞれの薬物の pH 6.5 における水/octanol 分配係数及び水溶解度ともに Table 5 にまとめた。また、比較のため Caco-2 細胞単層膜を装着した D/P system における膜透過性、及び *in vivo* intubation 法により測定されたヒト小腸膜に対する透過性を示した<sup>18, 43-45)</sup>。Propranolol と Metoprolol では BiDP system における filter/octanol 透過性が Caco-2 単層膜透過性よりも 1.5~2 倍程度高く、またヒト小腸膜透過性の 1/4 程度であった。両薬物の透過性自体は異なっていたものの、各種膜に対する透過性の順位相関にはほぼ同じ傾向が認められた。一方、水溶性で脂質膜透過性の低い Atenolol の場合は、filter/octanol 透過性が最も低い値となり、次いで Caco-2 細胞単層膜<ヒト小腸膜の順であった。Atenolol の生体膜透過には細胞間隙を介した paracellular pathway が大きく寄与していると考えられることから、細胞間隙の存在しない filter/octanol system においては、Atenolol の様な水溶性薬物の膜透過性を過小評価する可能性が示唆された。



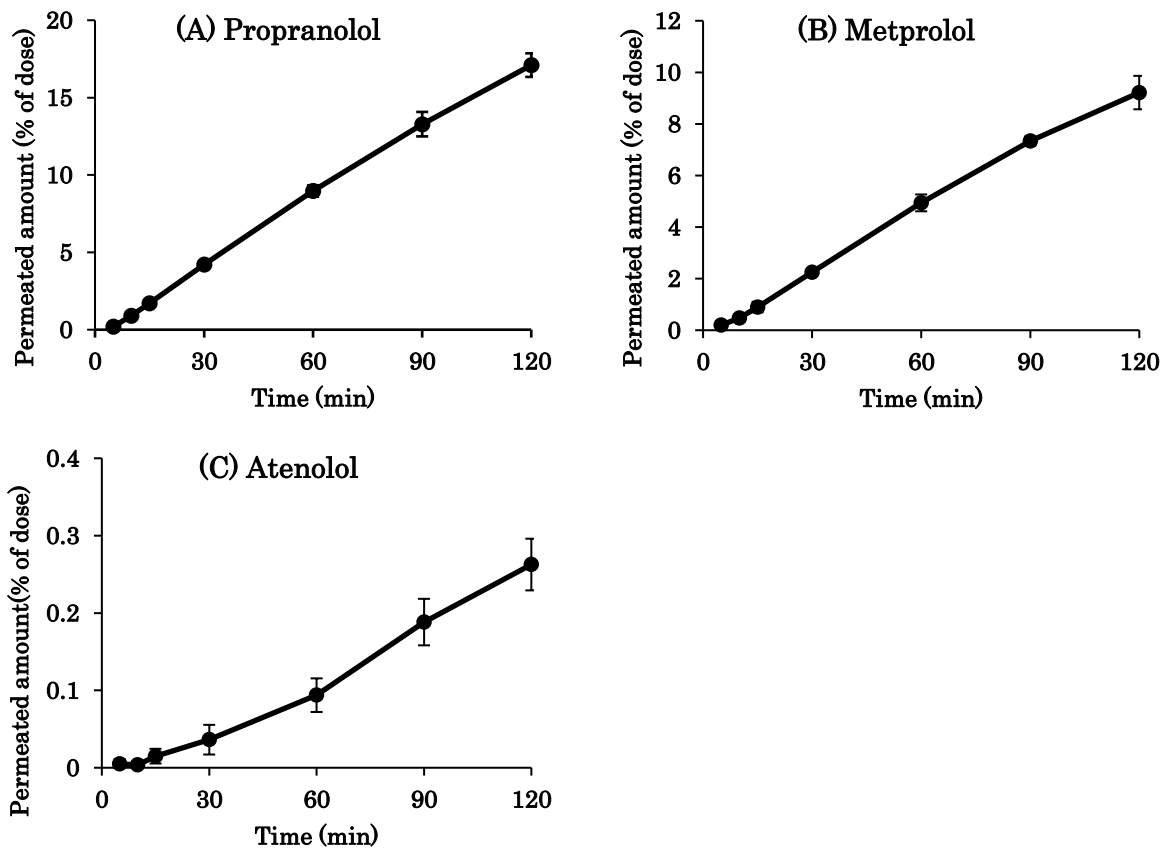


Fig. 12 Time profiles of the permeated amount of Propranolol (A), Metoprolol (B), and Atenolol (C) in the BiDP system under fasted condition.

As a hydrophilic filter, Durapore<sup>®</sup> membrane with 0.1  $\mu\text{m}$  pore was used. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

Table 5 Lipophilicity and solubility of Propranolol, Metoprolol and Atenolol and their permeability to filter/octanol in the BiDP system

	logD <sub>6.5</sub>	solubility (water)	Permeability (x 10 <sup>-4</sup> cm/s)		
			BiDP system (filter/octanol)	D/P system (Caco-2 monolayer)	Human small intestine
Propranolol	0.48	61.7 µg/mL	0.653	0.331	2.94
Metoprolol	-1.32	>10 mg/mL	0.362	0.272	1.34
Atenolol	-2.9	>10 mg/mL	0.011	0.018	0.20

For comparison, permeability of these drugs to a Caco-2 cell monolayer in the D/P system<sup>18)</sup>, and to the human small intestine *in vivo*<sup>43-45)</sup> were shown.

### 1.2-3) BiDP system における薬物の吸収性の予測

BiDP system に固形薬物を添加した後の octanol 相への移行率を測定することによって、各薬物のヒト吸収率の予測を試みた。BiDP system の主たる目的は、消化管内での溶解過程が吸収の律速となる難溶解性薬物の吸収性評価であることから、本検討では、溶解性の高い Metoprolol、Atenolol に加え、溶解性の低い 6 種の薬物 (Albendazole, Carbamazepine, Danazol, Dipyridamole, Griseofulvin, Ketoprofen) をモデル薬物として用いた。Table 6 に示した様に、各薬物の BiDP system への添加量は臨床投与量の 1/10 とし、donor 側溶液を FaSSIF または FeSSIF とすることで、それぞれ絶食時、摂食時の吸収率の予測を行った。

BiDP system における octanol 相への移行率から、各薬物のヒトでの吸収率 (Fraction of a dose absorbed: Fa) を予測する方法は、すでに報告されている D/P system における Fa 予測と同じ手法を用いた<sup>13)</sup>。まず、各薬物添加 2 時間までの移行率と実際のヒト Fa との関係について検証を行った。Fig. 13 に示した様に、ヒト Fa と BiDP system における移行率との間には、絶食時、摂食時ともシグモイド型の相関が認められた。これは D/P system における相関性と同様であったことから (Fig. 13 (B))、次に D/P system の場合と同様に、絶食時及び摂食時のヒト Fa と BiDP system での移行率との相関関係を Hill 式 (式 1) に当てはめることにより、両者の関係を表す以下のパラメータを求めた。パラメータの算出には、非線形最小二乗法を用いた data

fitting プログラムである MALTl を用いた。

$$\text{Human Fa (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{max}} \cdot \text{PA}^\gamma}{\text{PA}_{50}^\gamma + \text{PA}^\gamma} \quad (\text{式 1})$$

$\text{Abs}_{\text{max}}$ : 最大吸収率 (%), 100 %

PA: D/P system における移行率 (% of dose/2 h)

$\text{PA}_{50}$ : 吸収率 50 % のときの D/P system における移行率 (% of dose/2 h)

$\gamma$ : Hill 係数

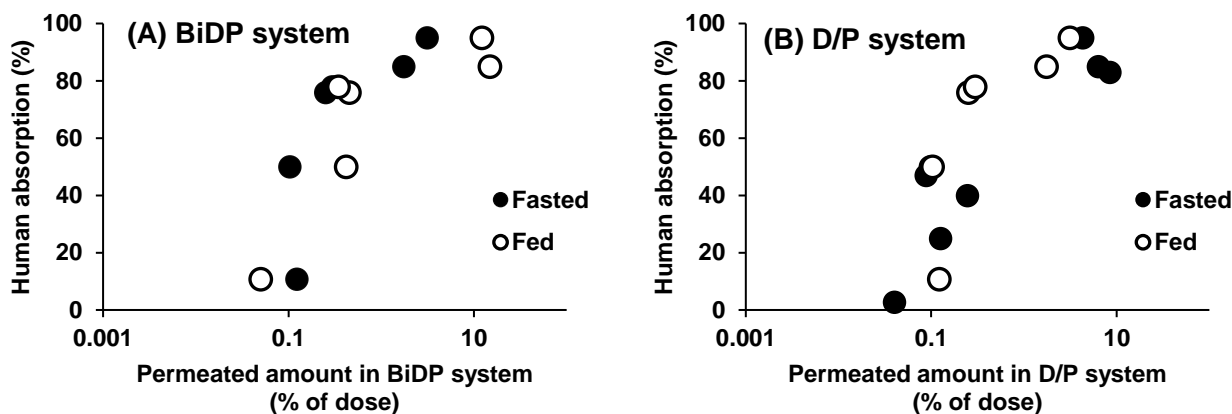


Fig. 13 The correlation between *in vivo* human absorption (% of dose) and *in vitro* permeated amount of tested drugs in fasted (●) and fed condition (○) obtained in the BiDP system (A) and in the D/P system (B).

Data in the D/P system were taken from the previous reports<sup>18-20, 22, 23</sup>.

得られた各パラメータを式 1 に代入することにより、Fig. 13 で得られた相関曲線を standard curve として BiDP system での移行率 (PA) から絶食時及び摂食時におけるヒト Fa を推定した。なお、今回求めた BiDP system におけるパラメータは、絶食時では  $\text{PA}_{50} = 0.63 \pm 0.23$ 、 $\gamma = 0.59 \pm 0.12$ 、摂食時では  $\text{PA}_{50} = 0.22 \pm 0.08$ 、 $\gamma = 1.20 \pm 0.57$  であった。BiDP system における移行率から推定した各薬物の絶食時、及び摂食時のヒト Fa を Table 6 に、また BiDP system からの推定値と実際のヒト Fa の相関性を Fig. 14 に示した。その結果、Albendazole の絶食時を除いて、BiDP system からの推定値は実際のヒト Fa とほぼ一致しており、Fig. 14 においても 1:1 対応の高い相

関性が得られたことから、BiDP system はヒト Fa を簡便に予測可能な *in vitro* system であることが示された。絶食時の予測精度 ( $R^2$  値) に比べて、摂食時の予測精度は低くなったが、これは摂食時のヒト Fa の実測データが少ないこと、及び摂食時には吸収率自体のバラツキが大きくなるためと考えられる。また、Caco-2 細胞単層膜をモデルとして用いた D/P system に比べて (Fig. 14 (C)、(D)) 推定値と実測値の相関性が高かったことから、BiDP system を用いて、脂溶性の高い薬物のヒト吸収性を簡便に予測することが可能であると判断された。

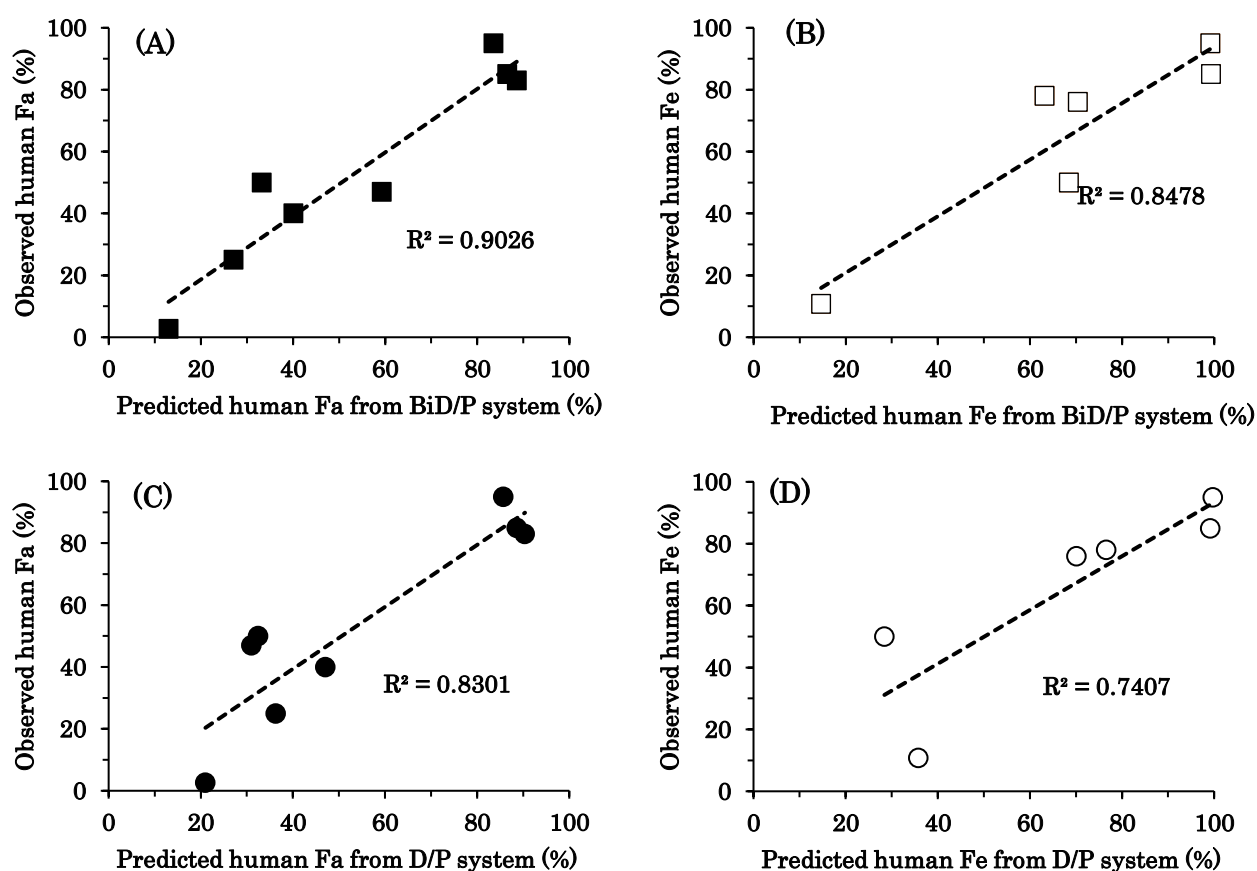


Fig. 14 The relationship between observed and predicted Fa (% of dose) in human. Fa of each drug was predicted from the permeated amount in BiDP system under fasted (A) and fed conditions (B). As a reference, Fa of the same drug was predicted from the permeated amount in D/P system under fasted (C) and fed conditions (D). Data in the D/P system were taken from the previous reports<sup>18-20, 22, 23)</sup>. In each figure, a regression line was indicated by the dotted line with a square of the regression coefficient ( $R^2$ ).

Table 6 Predicted human Fa of tested drugs in the BiDP system under fasted and fed conditions

Clinical Dose (mg)	Applied Amount to BiDPsystem (mg)	Fasted state (FaSSIF in donor side)			Fed state (FeSSIF in donor side)		
		Permeated Amount (% of dose/2h)	Predicted Human Fa (%)	Observed Human Fa (%)	Permeated Amount (% of dose/2h)	Predicted Human Fa (%)	Observed Human Fa (%)
Atenolol	5	0.193	33.2	50	0.417	68.5	50
Albendazole	40	0.025	13.0	2.7	0.050	14.7	10.8
Carbamazepine	10	20.4	88.6	83	22.4	99.6	-
Danazol	10	0.118	27.1	24	0.451	70.5	76
Dipyridamole	10	1.20	59.3	47	4.12	97.1	-
Griseofulvin	50	0.344	40.1	40	0.353	63.2	78
Ketoprofen	5	14.9	86.5	85	14.8	99.4	85
Metoprolol	4	9.88	83.5	95	12.1	99.2	95

Human Fa of each drug was predicted from the permeated amount in the BiDP system. For comparison, observed human Fa values were shown which were obtained from individual drug references or the Goodman & Gilman's as shown in our previous reports<sup>18, 19, 22</sup>.

#### 1.2-4) 考察

Caco-2 細胞単層膜はヒト由来の cell line であること、及び通常の培養で小腸上皮細胞と同様な形態・機能を有した細胞からなる単層膜を形成することから、経口製剤開発を目的とした医薬品候補化合物の初期の膜透過性スクリーニングに繁用されている。トランスポーターや代謝酵素の発現レベルにはヒト小腸上皮細胞との相違が認められているものの、これまで多くの薬物について Caco-2 細胞単層膜に対する透過性がヒト小腸膜透過性と良好な相関を示すことが報告されている<sup>46,47)</sup>。単層膜の培養に 21 日程度かかるものの、大手製薬企業において多くの化合物の膜透過性スクリーニングをルーティンに実施する上では大きな問題とならない。

一方、選択された化合物の消化管内での溶解過程を含めてヒトにおける経口吸収率を予測し、その後の製剤化研究へと進むためには、より精度の高い *in vitro* での検討が必要となる。D/P system はその様な要望に対して開発された system であり、すでに実際の医薬品開発に導入されているものの、部署によっては培養細胞を用いた system を不定期に利用することが難しい場合がある。Miyaji らは、イヌの腎尿細管上皮細胞由来の MDCK II 細胞単層膜を Caco-2 細胞単層膜の代わりとして D/P system に適用することで、ほぼ同じ精度でヒト Fa を予測可能であることを示した<sup>22)</sup>。MDCK II 細胞単層膜は、通常 5~6 日間の培養で使用できると言う利点はあるものの、やはり細胞培養のための施設と専門的な技術が必要である。

本節では、D/P system の欠点を克服することを目的として、薬物の octanol への分配性から膜透過性を推定する Biphasic system を参考に BiDP system を構築した。本 system では、薬物の octanol 中への移行量（分配量）の測定が簡便な side-by-side 型の chamber system を利用するため、donor 側と receiver 側の間に親水性 filter を装着し donor 側溶液の octanol 相への移行を防ぐこととした。まず、予備試験として、MERCK Millipore 社製から市販されている数種の親水性 filter を用いて BiDP system への適合性を評価した。各 filter をチャンバーに装着して 2 時間のインキュベーションを行ったところ、MF-filter、Millipore filter、Millipore Express Plus では明らかな膜の変性が確認された。これらの filter はアルコール類を始めとした有機溶媒への耐性が低く、octanol が filter 内に侵入することにより、膜の構造が崩壊したと考えられた。Durapore Membrane filter には変性が観察されなかったことから、次にこの filter の膜内の孔径の影響について検討を行った結果、孔径 0.1  $\mu\text{m}$  の filter では donor 側溶液として用いた FaSSIF の receiver 側への混入は認められず、またその成分である胆汁

酸の透過も低く抑えられていたことから、本研究では、孔径 0.1  $\mu\text{m}$  の filter を用いることとした。FaSSIF 中の脂質／胆汁酸混合ミセルの粒子径は 40~50 nm であるにもかかわらず<sup>34)</sup>、その移行を効果的に抑制できた理由として、孔径サイズが小さい Durapore membrane filter では、孔内に侵入した donor 側溶液が表面張力によって孔内に保持され、孔内の拡散が律速となることで octanol へのミセル成分の移行が制限されたものと推察される。一方、孔径の大きな filter の場合には、水の圧力が表面張力よりも大きくなり、細かな液滴が孔内から octanol 中に漏出したと考えられる。

膜透過性の高い Propranolol の BiDP system (filter/octanol) における透過性は、D/P system (Caco-2 cell monolayer) の約 2 倍であったものの、ヒト小腸膜透過性と比べる 1/4 程度と明らかに低い値であった。今回の検討で用いた脂溶性薬物のうち、Carbamazepine も添加後 FaSSIF 中で完全に溶解したことから、同様の方法で BiDP system 及び D/P system における透過性を算出したところ、それぞれ  $0.92 \times 10^{-4}$  cm/sec、 $0.77 \times 10^{-4}$  cm/sec と同程度の値であった。この値は、ヒト小腸透過性 ( $4.3 \times 10^{-4}$  cm/sec)<sup>45)</sup> の 1/4 程度であり Propranolol と同様な傾向が得られた。一方、水系溶媒と octanol が直接接している Biphasic system で測定された Carbamazepine の移行性は  $26 \times 10^{-4}$  cm/sec と報告されており<sup>48)</sup>、これは BiDP system に比べて octanol 中への移行速度が 30 倍程度速いことを意味している。この理由として、BiDP system では親水性 filter 中の拡散が脂溶性の高い薬物の octanol 相への移行の律速段階になっていると考えられる。さらに、BiDP system と D/P system における Propranolol や Carbamazepine の透過性が同程度であったことから、親水性 filter は Caco-2 細胞単層膜表面に存在する UWL と同様な膜透過バリアとして機能したと推察された。

BiDP system における各薬物の 2 時間までの octanol 相中への移行量を指標として、D/P system の場合と同様な手法でヒト経口投与後の Fa を推定し、その予測性について検証を行った。Fig. 14 に示した様に、BiDP system を用いて推定した Fa 値と実際のヒト Fa 値の間には、絶食、摂食時とも良好な 1:1 の相関が得られた。またその相関性は D/P system と同じか、それ以上であったことから、filter/octanol system における薬物の移行性はヒト小腸膜透過性と一定の相関を有することが示された。脂溶性薬物が受動拡散によって小腸上皮細胞を透過する場合、まず薬物分子が溶液から細胞膜の脂質層へ分配した後、膜内外の濃度勾配に従って薬物が膜内を拡散する。薬物の octanol への分配性は、種々の有機溶媒の中で細胞膜脂質成分への分配性に最も近いとされており<sup>49, 50)</sup>、薬物の水/octanol 分配係数 (logD 値) は古くから薬物の膜透過性の

指標として繁用されている。したがって、薬物の octanol 相への移行性からその吸収性を予測する BiDP system の薬物吸収評価 system としての妥当性が確認された。さらに、BiDP system では、脂質膜透過性の高い薬物の小腸上皮細胞膜透過を律速する UWL 中の拡散過程を親水性 filter を用いて再現していることから、高い吸収予測性が得られたものと考えられる。一方で、小腸上皮細胞層の細胞間隙を經由して膜を透過する親水性薬物、及び Peptide transporter (PEPT1) などの吸収トランスポーターあるいは P-glycoprotein (P-gp) などの排出トランスポーターの基質となる薬物では、正確な吸収性予測が困難となる場合があることに注意が必要である。

以上、BiDP system は、培養細胞を用いることなく、簡便かつ迅速に薬物の経口吸収性の評価が可能な system として医薬品開発の様々な過程で有用と考えられる。特に、標的分子への高い affinity を持った新規の薬物候補化合物の多くは、脂溶性が高く水への溶解性が低いことが知られており、それら難溶解性化合物の吸収性あるいは製剤化による吸収改善効果を早期に評価することで、有効な経口製剤開発が促進されるものと期待される。次章においては、第 1 章で構築した 2 つの *in vitro* system を組み合わせることで、製剤投与後の消化管内での薬物の移行、溶解、膜透過過程を再現し、薬物の吸収性ととも製剤間の生物学的同等性を評価可能な system の構築を試みる。



## 第 2 章 経口製剤の生物学的同等性評価を目的とした新たな *in vitro* system

第 1 章において筆者は、経口投与後の薬物の吸収性及び吸収に及ぼす消化管内の生理的要因の影響を簡便に評価することを目的として、SIFC system 及び BiDP system の二つの新たな *in vitro* system を構築し、その有用性に関する検討を行った。それぞれの system は、投与後の胃から小腸への移行に伴う薬物の溶解、及び小腸における溶解と膜透過のそれぞれの過程を個々に評価することが可能であり、評価の目的（吸収率の予測あるいは吸収の変動要因の解析など）や評価薬物の吸収律速過程（溶解過程あるいは膜透過過程）に沿って試験条件を設定することで、新たな経口製剤の開発に大きく寄与するものと考えられる。

一方、経口製剤のヒト BE 試験では、投与後の吸収に関する速度的及び量的な評価が求められる。ヒト BE 試験において、製剤投与後の薬物血中濃度推移から得られる AUC は量的な吸収率を、 $C_{max}$  は主として吸収の速度を評価するための指標として用いられる。経口投与後の量的な吸収率に影響する要因としては、消化管内での薬物の溶解の程度及び溶解した薬物の小腸膜透過性が挙げられる。一方、消化管内での薬物の溶解速度や析出速度は、製剤投与後の薬物吸収速度を決定する最も重要な要因であり、消化管内での移動速度や攪拌力、消化管内溶液の pH や組成などの生理学的な因子によって変動する。また、製剤添加物などの製剤的因子にも大きく依存する。したがって、製剤間の同等性を *in vitro* において精度よく予測するためには、製剤投与後の吸収に関わるすべての過程、すなわち胃から小腸への移行に伴う製剤の崩壊、薬物の溶解・析出、溶解した薬物の小腸での膜透過に関する総合的な評価が求められる。そのためには、ヒト消化管内の移行速度や攪拌力などの様々な生理学的要因を再現するとともに、それら要因の個体間・個体内の変動に対応できる system が必要となる。

そこで本章では、第 1 章において構築した二つの system を組み合わせることによって、経口製剤の BE を評価するための新たな *in vitro* system (BE チェッカー) を構築し、BE 評価の妥当性及び有用性の検証を行った。

## 第 1 節 BE チェッカーの構築及び吸収評価 system としての妥当性の検証

### 2.1-1) BE チェッカーの概要

経口製剤の BE を簡便に評価することを目的として新たに構築した BE チェッカーの概要を Fig. 15 に示す。基本構造は D/P system や BiDP system と同様な side-by-side 型の chamber system とし、donor 側に添加した薬物の receiver 側への移行を測定することによって薬物の吸収及び製剤の BE の評価を行う。本 system では、donor 側底部に胃に相当する部分を設け、まず、この部分に胃モデル液として FaSSGF（絶食条件の場合）を入れ、評価対象となる固形製剤を投与する。その後、SIFC system と同様な要領で、シリンジポンプを用いて濃縮した小腸モデル液（pre-FaSSIF）を胃部 chamber に一定速度で注入し、溶液の pH、組成、volume を胃から小腸へ変化させる。Donor 側 chamber の胃部の上には receiver 側へ薬物が移行（膜透過）するための接合部分を設け、chamber 間に第 1 章で透過性評価への適応性を確認した親水性 filter（Durapore membrane）を装着した。pre-FaSSIF の注入に伴って donor 側の液面が上昇し、filter に接することで薬物の receiver 側への移行（透過）が開始される。receiver 側溶液としては octanol を用い、その液面が donor 側の液面と常に同じ高さになるよう、ポンプを用いて一定の速度で receiver 側 chamber に注入した。本 system では、製剤の胃から小腸への移行に伴う溶液の pH、組成、volume 等の変化を一つの chamber 内で再現するとともに、小腸移行後の薬物の透過速度を測定することが出来る。また、FaSSGF による初期の胃内 pH、胃排出速度に相当する pre-FaSSIF の注入速度、胃及び小腸での攪拌力に対応するパドルの回転速度、などを変化させることによって、薬物の吸収に及ぼす消化管内の生理的要因の影響の評価が可能と考えられる。

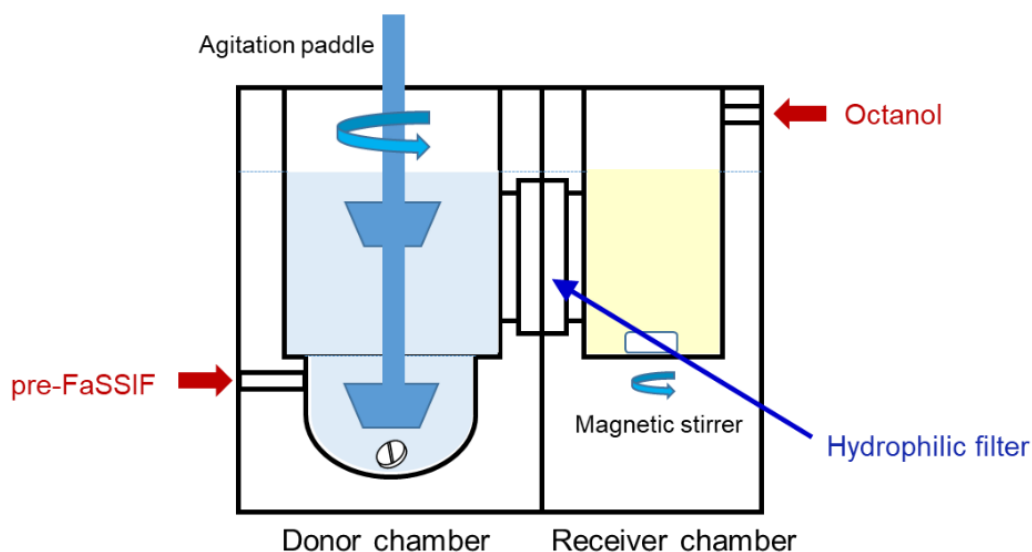


Fig. 15 Schematic illustration of the BE checker.

製剤間の BE を評価するためには、実際の臨床製剤を適用する必要がある。臨床では、主薬含量の異なる製剤として、最大用量 (max strength) の主薬を含む製剤の他、その 1/2 及び 1/4 用量の製剤がしばしば用いられる。そこで今回の研究では、消化管内溶液の volume を実際のヒト消化管内溶液量の 1/4 に設定し、1/4 用量の製剤を適用することによって、最大用量の製剤をヒトに投与した場合と同じ状況を再現することとした。ヒト絶食時の胃内溶液量は通常 10~40 mL 程度と報告されている<sup>25)</sup>。本邦での臨床試験では、通常 150 mL の水とともに薬物を服用する<sup>3)</sup>ことから、薬物服用後の胃内溶液量は約 160~200 mL となる。本 system においては薬物服用後の胃内容量を 160 mL と仮定し、chamber 胃部の FaSSGF の量をその 1/4 量の 40 mL とした。一方、絶食時のヒト小腸内の溶液量は報告によって異なっており 120~400 mL 程度との報告が多い。小腸で溶解した薬物は、その膜透過性に応じた速度で小腸から吸収される。特に、膜透過性の高い薬物は速やかに吸収されるため、小腸内の濃度は低く保たれる (sink condition)。一方、BE チェッカーにおける膜 (親水性 filter) の面積はヒト小腸に比べて小さく、receiver 側への薬物の移行速度はヒト小腸での吸収速度に比べて著しく遅いため、chamber 内での薬物濃度は相対的に高くなると予想される (non-sink condition)。本 system でヒト小腸と同様な速い吸収速度を確保することは困難であることから、薬物の濃度をある程度低く保つため、ヒト小腸内液量を報告値の高めの値である 400 mL と仮定し、最終的な FaSSIF の液量はその 1/4 量の 100 mL と

した。したがって、pre-FaSSIFはFaSSIFの5/3倍濃縮した組成で作成した。また、薄めたMcIlvaine緩衝液を用いて緩衝能を持たせることによって、pre-FaSSIFの添加に伴って第1章のSIFC systemにおけるGradual pH change protocolと同様なpHプロファイルを得た。

### 2.1-2) BE チェッカーにおける donor 側溶液の pH プロファイル

pHを1.6、3.0または5.0に調節したFaSSGF 40 mLに60 mLのpre-FaSSIFを一定速度で注入した時の、donor側chamber内溶液のpHの経時的なプロファイルをFig. 16に示した。初期胃内pHは健常人と低胃酸患者の胃内pHを想定している。またpre-FaSSIFの注入時間は胃から小腸への溶液の排出速度に相当し、個体間差を考慮して10分、20分の2パターンを設定した。Fig. 16において、すべてのprotocolでpre-FaSSIFの注入によるpHの緩やかな上昇が認められ、そのプロファイルはSIFC systemのGradual pH change protocolと同様であった。また溶液の最終的なpHは $6.5 \pm 0.5$ の範囲内であった。

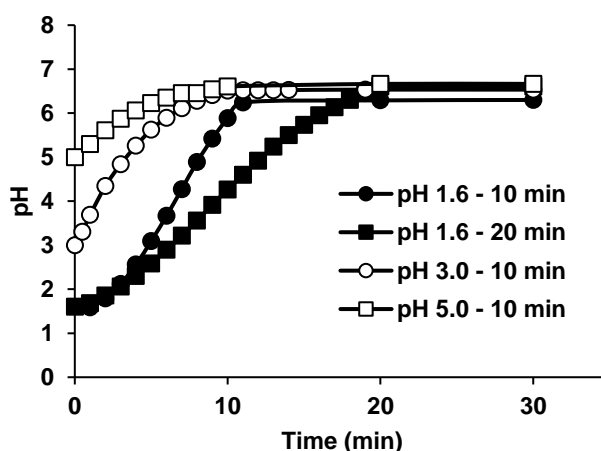


Fig. 16 Time profile of the fluid pH in the donor chamber of the BE checker.

### 2.1-3) BE チェッカーの実験条件の検証- 1 : セロケン<sup>®</sup>錠 20 mg

BE チェッカーにおけるパドルの回転速度を設定するため、Biopharmaceutics Classification System (BCS) class Iに分類されるMetoprololの市販製剤(セロケン錠<sup>®</sup>20 mg)を用いてその溶出、透過プロファイルを観察した。セロケン錠<sup>®</sup>は日本薬局方(JP)に規定された溶出試験(パドル法)において、いずれの溶液pH(1.2、

4.0、6.8) においても完全に溶解し、また、溶出挙動は溶液 pH に依存しないことが知られている<sup>51)</sup>。BE チェッカーを用いた実験は Fig. 17 に示す protocol に従って行った。まず、胃内での崩壊、溶解過程を再現するため、40 mL の FaSSGF を入れた donor 側 chamber の底部に錠剤を投与し、1 分間パドルを用いて攪拌を行った。1 分間の攪拌後、胃排泄過程として一定速度で donor 側 chamber に pre-FaSSIF を注入した。注入終了時には donor 側溶液は FaSSIF と同じ組成に変化していることから、その後の溶解、透過プロファイルを小腸における溶解・膜透過過程として測定した。

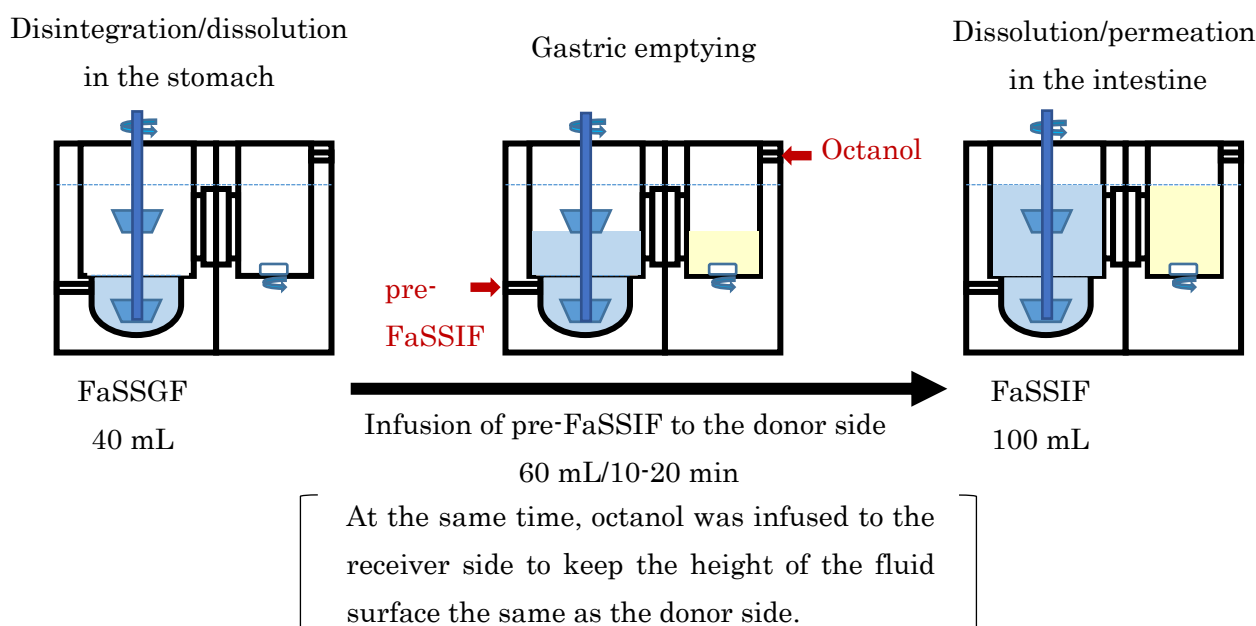


Fig. 17 Experimental conditions represent the GI physiology in the fasted state in the BE checker.

Fig. 18 に示すように、セロケン<sup>®</sup>錠からの Metoprolol の溶出は、パドルの回転速度を上げるにつれて速くなり、200 rpm では 30 分以内に 80 %以上が溶出した。この Metoprolol の溶出プロファイルは、JP に規定されたパドル法 (50 rpm, 900 mL) での結果に類似している<sup>51)</sup>。また、100 rpm、50 rpm での溶解は遅く、100 rpm では 45 分で、50 rpm では 60 分で 80 %の Metoprolol が溶出した。

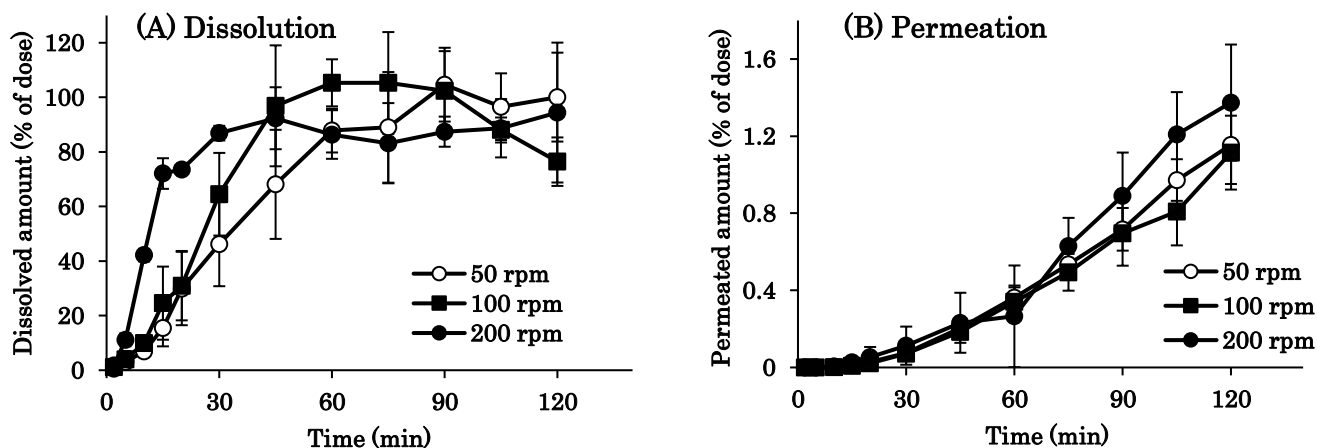


Fig. 18 Effect of paddle speed on the dissolution (A) and permeation (B) time profiles of Metoprolol from Seloken® tablets 20 mg in the BE checker. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

溶液の攪拌力は用いる vessel とパドルの形状、大きさ等に依存することから、一般的な溶出試験器と BE チェッカーでパドルの回転速度と薬物の溶出プロファイルの関係を直接比較することは難しい。さらに、健常人の胃内での攪拌力を数値的に表すことは困難であり、通常は JP 規定のパドル法における 50 rpm/900 mL の条件が健常人の消化管内での攪拌力に近いと考えられている。しかし、ヒト胃内の攪拌力にはもっと弱いとする報告も多く見られることから<sup>52)</sup>、BE チェッカーでのパドルの回転速度として、50~200 rpm の範囲で実験を行うこととした。これは健常人の他、高齢者や胃疾患患者の様に胃や小腸の運動性が低く、攪拌力に劣る患者も想定している。

Metoprolol の receiver 側への透過量は、200 rpm のパドル回転速度で若干大きくなったものの、donor 側での溶出速度に比べて、透過量に対するパドル回転速度の影響を小さかった。この理由として、実験の開始直後は donor 側、receiver 側ともフィルターは溶液に浸っていないこと、またその後液面上昇に伴って receiver 側への透過が徐々に起こることから、早い段階での溶出プロファイルの違いが透過プロファイルに完全には反映されなかったためと考えられる。ヒトにおいても、Metoprolol の様に胃内で速やかに溶解する薬物では、薬物投与直後の胃内溶解プロファイルが小腸での吸収プロファイルに大きく影響しないことから、本結果は *in vivo* での吸収に対応したものと考えられる。

#### 2.1-4) BE チェッカーの実験条件の検証-2：ペルサンチン<sup>®</sup>錠 25 mg

ペルサンチン<sup>®</sup>錠は弱塩基性薬物の Dipyridamole を主薬とする製剤である。Dipyridamole は胃内の低い pH ではほとんどイオン型として存在し高い溶解性を示すものの、中性 pH では溶解度が著しく低下するため、その製剤であるペルサンチン<sup>®</sup>錠からの溶出は溶液 pH の影響を強く受ける。JP に規定されている溶出試験において、Dipyridamole は pH 1.2 では 10 分以内に完全に溶出するが、pH 6.8 では 360 分後においても溶出率は 20 %以下である<sup>53)</sup>。

Fig. 19 に、実験開始時の FaSSGF の pH を 1.6、pre-FaSSIF の注入時間を 10 分、パドルの回転速度を 50、100、200 rpm として、BE チェッカーにおける Dipyridamole の donor 側での溶出と receiver 側への透過プロファイルを測定した結果を示した。パドルの回転速度が 200 rpm の時、Dipyridamole は 5 分以内に完全に溶解し、その後、溶解率は緩やかに減少した。10 分の時点で pre-FaSSIF の注入が終了し溶液 pH が 6.5 になっていることから、Dipyridamole は初期の低 pH 領域で一旦完全に溶解した後、pH の上昇にともなって過飽和状態となり徐々に析出が生じたものと推察された。これに対し、パドルの回転数を 100 rpm、50 rpm と遅くした場合には、胃内での製剤の崩壊と製剤からの溶出が遅くなったために過飽和溶解は観察されず、Dipyridamole の溶解率は実験を通して 25 %以下であった。この時、receiver 側への透過量もこれら条件下での溶解プロファイルを反映したものとなった (Fig. 19 (B))。パドルの回転速度は主に胃内での攪拌力に対応するパラメータであることから、胃内攪拌力の違いによってペルサンチン<sup>®</sup>錠の経口投与後の Dipyridamole の吸収に大きな違いが生じる可能性が示唆された。

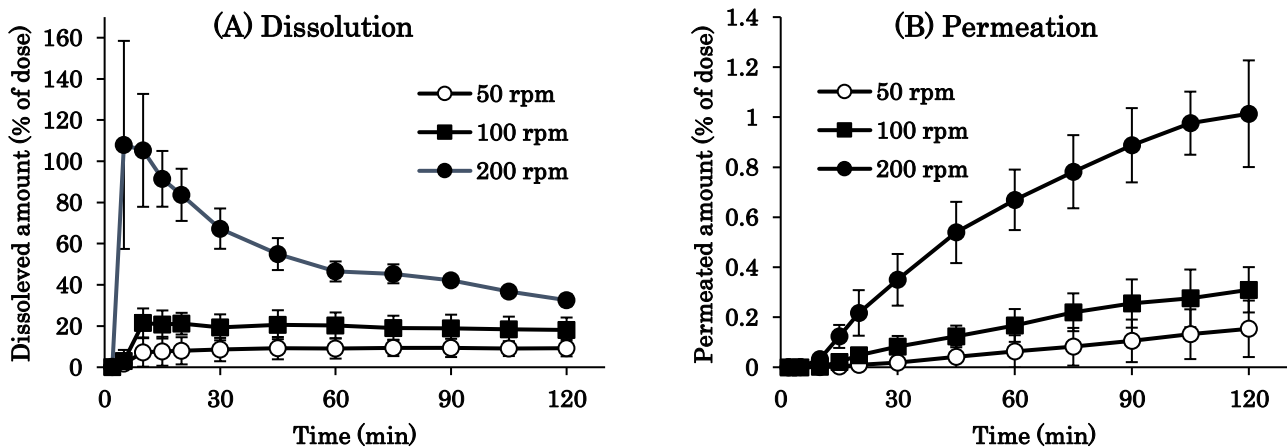


Fig. 19 Effect of paddle speed on the dissolution (A) and permeation (B) time profiles of Dipyridamole from Persantin® tablets 25 mg in the BE checker. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

次に、FaSSGF の pH 及びパドル回転速度は同じで、pre-FaSSIF 注入時間を 20 分とした場合の結果を Fig. 20 に示した。本条件下では初期の過飽和とそれに続く析出は 200 rpm だけでなく、100 rpm、50 rpm でも観察された。また、100 rpm と 200 rpm では溶解、透過プロファイルはほとんど同じであった。50 rpm での透過は実験開始 30 分まで 100 rpm と 200 rpm よりも低くなったものの、その後はほぼ同じ推移を示した。BE チェッカーでの pre-FaSSIF の注入時間は *in vivo* での胃から小腸への薬物移行時間を反映したパラメータであることから、pre-FaSSIF の注入時間を長くすることは、胃排出速度が比較的遅い被験者での吸収過程を再現していると考えることが出来る。本結果より、胃排出が遅い被験者では、胃内の低 pH 条件下で製剤の崩壊・薬物の溶出が十分に進行し、胃の攪拌力に関わらず小腸において過飽和溶解が生じることにより、一定の吸収率が得られるものと推察された。



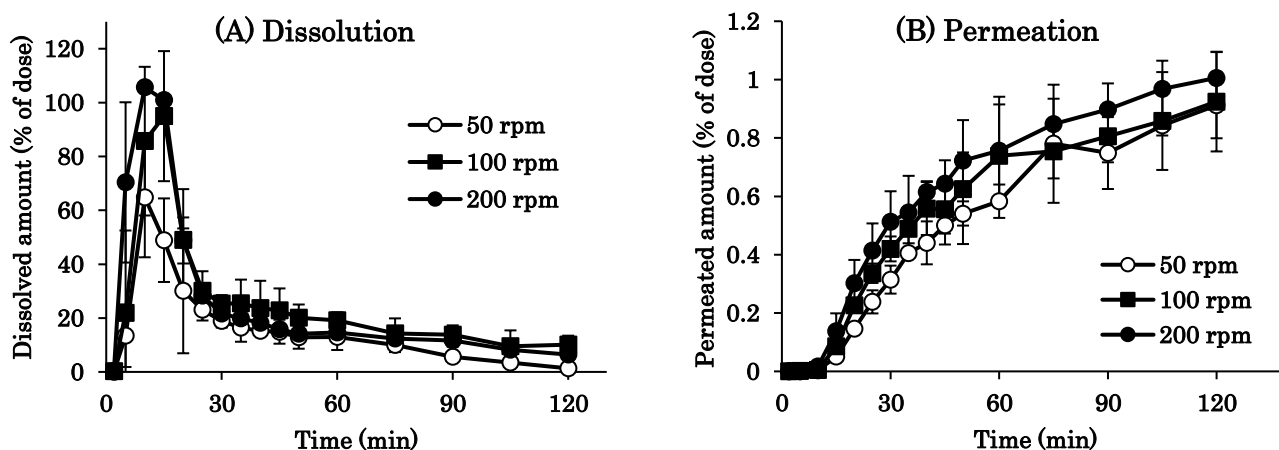


Fig. 20 Effect of pre-FaSSIF infusion time on the dissolution (A) and permeation (B) time profiles of Dipyridamole from Persantin® tablets 25 mg in the BE checker. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

Dipyridamole の吸収に影響を与えるもう一つの要因として、胃内の pH が挙げられる。そこで、BE チェッカーにおける実験開始時の FaSSGF の pH を 1.6、3.0、5.0、6.5 として同様な検討を行った。その他の条件は、pre-FaSSIF の注入時間 20 分、パドルの回転速度 100 rpm とした。Fig. 21 に示したように、FaSSGF の pH を 1.6 としたときには、過飽和溶解と高い透過率が確認されたものの、初期の胃内 pH が高い条件では、溶解速度が遅くその後の過飽和溶解はほとんど認められなかった、receiver 側への透過率も初期の胃内 pH の上昇に伴って減少した。Dipyridamole の pKa は 6.3 であり、それより高い pH では溶解度が著しく低くなることから、この結果は妥当と考えられる。また、臨床試験において低胃酸患者で Dipyridamole の吸収率が低下することが報告されており<sup>54)</sup>、BE チェッカーでの結果は実際の *in vivo* での結果とも対応することが確認された。

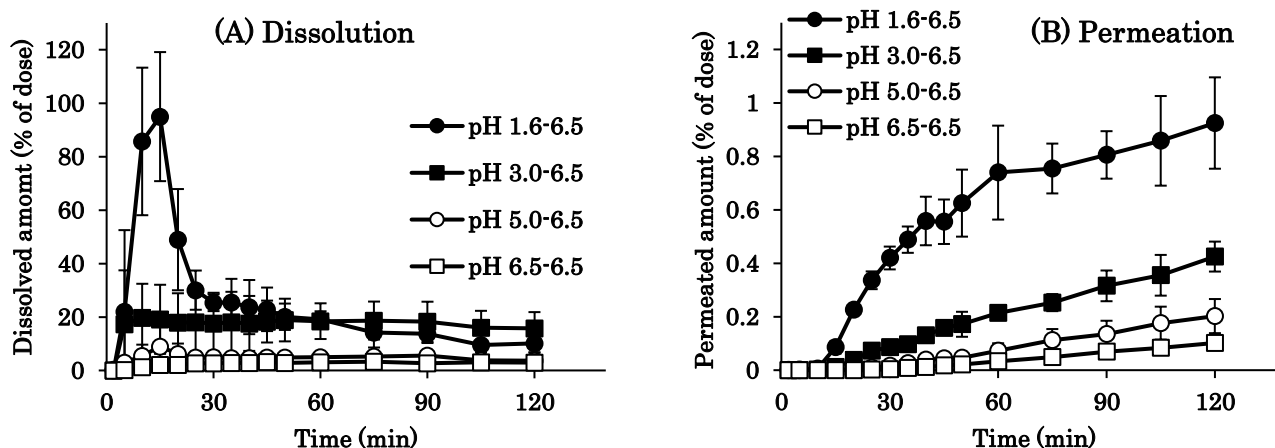


Fig.21 Effect of initial FaSSGF pH on the dissolution (A) and permeation (B) time profiles of Dipyridamole from Persantin® tablets 25 mg in the BE checker. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

## 2.1-5) 考察

*In vitro* において経口製剤の Bioavailability (BA) や BE を精度よく評価するためには、ヒト消化管の生理的環境に出来るだけ近い条件下で、製剤投与後の崩壊・溶出・膜透過の各過程を検証する必要がある。本章で構築した BE チェッカーでは、1つの vessel 内で溶液の組成、pH、volume を変化させることによって、製剤を移動させることなく経口投与後の胃から小腸への移行過程を再現するという点で、幾つかの vessel をポンプで連結した multi-compartment system と大きく異なっている。これは第 1 章で構築した SIFC system をベースとした手法である。さらに、side-by-side 型の system として receiver 側 chamber を加えることによって、溶解した薬物の膜透過過程の評価を可能とした。BE チェッカーに用いた親水性 filter/octanol system の膜透過性評価法としての妥当性は、第 1 章で構築した BiDP system において検証されている。また、BE チェッカーでは、filter が徐々に消化管模擬溶液に浸ることによって吸収膜面積が経時的に増加する。これは、胃から排出された溶液が腸管内で広がっていき、吸収表面積が時間とともに大きくなるという *in vivo* での吸収過程を反映していると考えられる。

BE チェッカーにおける receiver 側への透過率 (% of dose) は、D/P system や BiDP system の場合と同様に、実際の *in vivo* における吸収率 (Fa) よりも著しく小さい値

であった。これは、本 system に用いた膜の面積と溶液量の比 (SA/V 比) がヒト小腸に比べて小さいため (BE チェッカー:  $0.066 \text{ cm}^{-1}$ 、ヒト小腸:  $2 \text{ cm}^{-1}$ )、薬物の膜透過クリアランスが *in vivo* よりも小さくなった結果と考えられる。BE チェッカーでの透過率から Fa を評価するためには、BiDP system の場合と同様に、ヒトでの Fa が既知の薬物を用いて透過量と Fa の関係を予め求めておく必要がある。ただし、本研究の目的である製剤の BE 評価においては、各薬物の Fa の絶対値の評価は基本的には不要であるため、BE チェッカーを用いた Fa 評価に関する検討は将来的な課題とし、今回は実施しないこととした。

製剤投与後の薬物の吸収に影響を及ぼす要因として、胃排出速度、胃・小腸内での攪拌力及び消化管内溶液の pH や volume などが挙げられる。本項では、これらの生理的な要因を BE チェッカーでの実験 protocol に適切に反映することを目的として、パドル回転数、pre-FaSSIF 注入時間及び実験開始時の FaSSGF の pH に関して、市販製剤を用いた検討を行った。

*In vitro* での胃の攪拌力は一つの値として数値化できないため、*in vitro* でパラメータ化することが最も難しい要因の一つである。セロケン<sup>®</sup>錠を用いた検討の結果、被験者間での個体間差、さらには様々な患者での生理的な違いを考慮すれば、BE チェッカーにおけるパドルの回転速度として 50、100、200 rpm の 3 つの異なる条件で評価することが妥当と判断された。また、絶食時のヒト胃内 pH は通常 2 以下と考えられているものの、健常人においても 3 以上の pH を示す割合が 10 %程度と報告されている<sup>55)</sup>。さらに、高齢者、あるいは胃酸分泌抑制剤等を併用した患者では、胃内 pH はほぼ中性まで上昇している場合がある<sup>54, 56, 57)</sup>。本節では、これら様々な患者の胃内 pH を反映させることによって、薬物の吸収及び製剤の BE に対する溶液 pH の影響を検討した。溶液の胃排出速度についても多くの報告があり、Yamashita らは、排出速度が一次式に従うと仮定した場合、その排出半減期は 3~5 分と極めて速やかであることを報告している<sup>25)</sup>。Takeuchi らは、*in vitro* の multi-compartment system において胃排出半減期を 5~10 分と設定したとき、Metoprolol と Propranolol の溶出プロファイルが、ヒト *in vivo* での血漿中濃度推移と高い相関性を示すことを見出している<sup>8)</sup>。これらの結果を考慮して、BE チェッカーでの pre-FaSSIF の注入時間は 10 分及び 20 分とした。なお、胃排出半減期が 20~30 分程度との報告も見られるため<sup>58, 59)</sup>、注入時間を 30 分とした検討も実施したが、ほぼすべての薬物において注入時間 20 分の場合と同様な結果が得られたため、今回の検討は 10 分及び 20 分の 2 パターンのみとした。

弱塩基性薬物の Dipyridamole を主薬とするペルサンチン<sup>®</sup>錠を用い、様々な条件下で検討を行ったところ、Dipyridamole は胃内で速やかに溶解した後、小腸内で過飽和溶解が一定時間維持されることによって良好に吸収されることが明らかとなった。BE チェッカーでは、FaSSGF の pH、pre-FaSSIF の注入時間及びパドルの回転数を変化させることによって、胃内 pH が高い、胃内での攪拌力が弱い、あるいは胃排出が速いなどの生理的な要因の違いを簡便に再現することが可能である。ペルサンチン<sup>®</sup>錠を用いた検討では、それらの要因によって胃内での Dipyridamole の溶解が十分に起こらないまま小腸へ移行した場合には、吸収率が低くなることが示唆された。さらに、BE チェッカーではそれら個々の要因を組み合わせた試験 protocol を用いることによって、様々な患者における薬物の吸収性を評価することが可能と考えられる。

以上、本節では、BiDP system と SIFC system を組み合わせることにより、*in vivo* での消化管内の環境を反映した新たな *in vitro* system として BE チェッカーを構築した。次節においては、本 system を用いて実際に 2 つの製剤間の BE を評価した結果を記す。

## 第 2 節 BE チェッカーを用いた 2 製剤間の BE 評価

口腔内崩壊錠 (Orally disintegrating tablet、OD 錠)<sup>60)</sup>は、服用後口腔内で速やかに崩壊し微細な粒子として食道を通過し胃に達することから、嚥下性に優れ、また水なしでも服用可能であるため、多くの患者に好まれる製剤の一つである。特に我が国においては、医薬品の life cycle management の一環として普通錠から OD 錠への変更が行われる他、患者に優しい後発医薬品製剤として多くの OD 錠が開発されている。一般に、普通錠から OD 錠への変更、あるいは後発医薬品としての OD 錠の製造は、BE 試験によって承認される。しかし、普通錠と OD 錠では崩壊や溶解の仕組みが異なるため、*in vitro* の溶出試験のみでその類似性を判断することが難しい場合がある。また、水とともに服用した場合と水なしで服用した場合の両方で BE を担保する必要があるため、*in vitro* 溶出試験で類似と判断されても、ヒト BE 試験で同等性が得られない事例も多い。本節では、第 1 節で構築した BE チェッカーの製剤 BE の評価 system としての有用性を検証するため、すでに BE が確認されている 2 つの市販製剤 (普通錠と OD 錠) の同等性に関する検討を行った。なお、本節ではまず水あり条件下での評価を行い、水無し条件下での評価は次章において実施することとする。

## 2.2-1) BE チェッカーを用いたフリバス<sup>®</sup>錠、フリバス<sup>®</sup>OD 錠の BE の評価

BE チェッカーを用いて経口投与後の吸収過程における 2 製剤間の挙動の違いを評価するため、第 1 節と同じく様々な実験条件下で製剤からの薬物の溶出及び溶解した薬物の透過を経時的に測定した。まず、ヒト BE 試験において BE が確認され、すでに市販されている Naftopidil の製剤、フリバス<sup>®</sup>錠（普通錠）とフリバス<sup>®</sup>OD 錠をモデル製剤として使用した<sup>61)</sup>。Naftopidil は pKa が 3.7、6.7 の弱塩基性薬物で、中性 pH では溶解度が低くなることが知られている。

前節の Fig. 17 に示した手順で実験を行った結果を Fig. 22 に示した。実験条件としては、試験開始時の FaSSGF の pH を 1.6、パドルの回転速度を 100 rpm とし、pre-FaSSIF の注入時間を 10 分、20 分の 2 パターンとした。Fig. 22 で明らかな様に、pre-FaSSIF の注入時間に関わらず、OD 錠からの初期の薬物の溶出が普通錠よりも有意に遅く、普通錠で観察された過飽和溶解パターンは OD 錠では認められなかった。そのため、OD 錠からの透過は、実験開始から 30 分程度は有意に遅いと言う結果が得られた。OD 錠は服用後口腔内で速やかに崩壊するように設計されているため、BE チェッカーにおいても OD 錠からの薬物の溶出は普通錠よりも速くなると予測していたものの、Fig. 22 の結果は予測とは大きく異なるものであった。

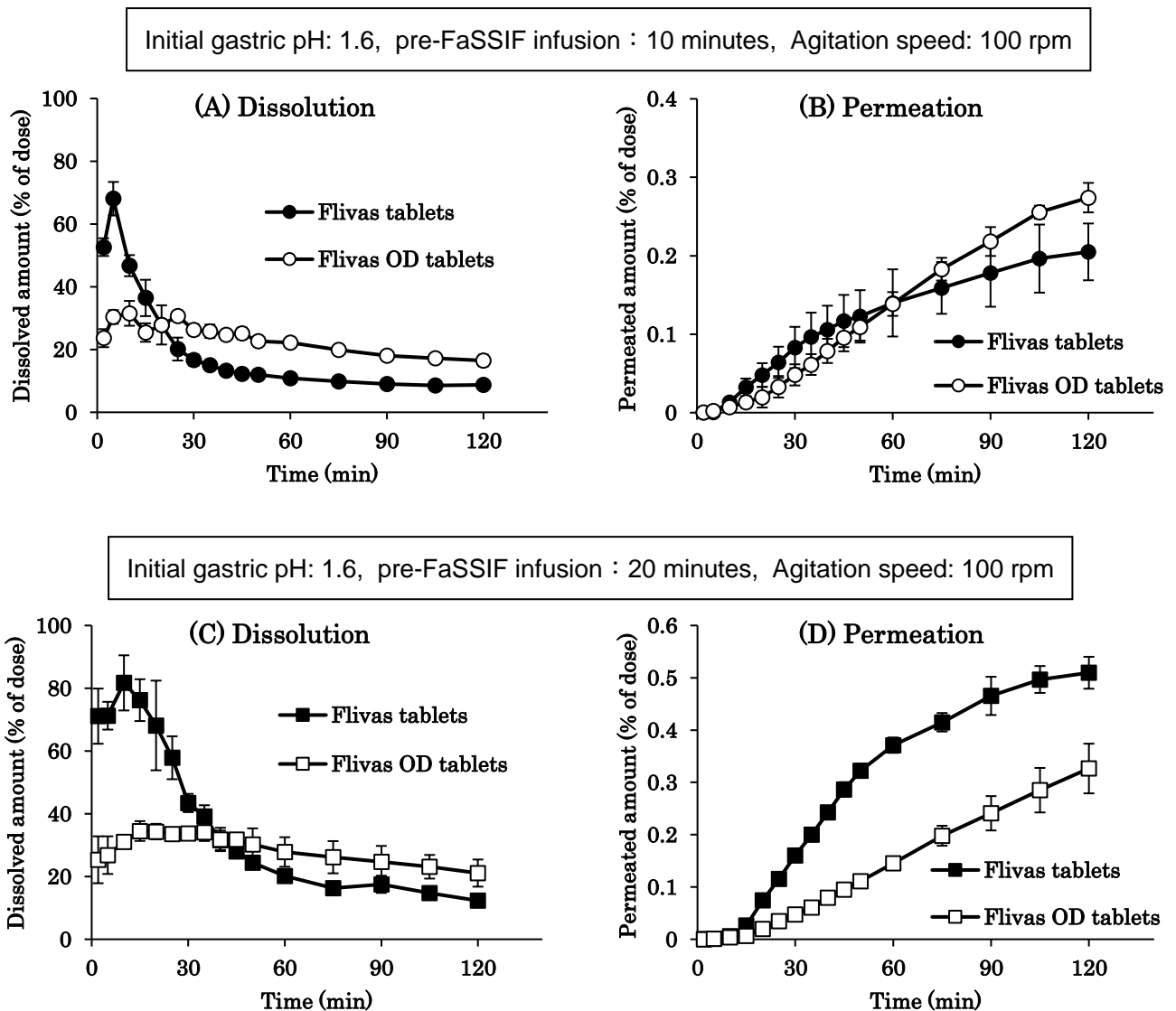


Fig. 22 Comparison of dissolution (A, C) and permeation (B, D) of Naftopidil from Flivas® tablets and Flivas® OD tablets in the BE checker. pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min (A, B) and to 20 min (C, D). Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 100 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

この理由を明らかにするため、日本薬局方第1液 (JP1)、FaSSGF、蒸留水の3種類の溶液中にフリバス®OD錠を浸し、製剤の崩壊過程を観察した。Fig. 23にそれぞれの溶液にフリバス®OD錠を加え、その1分後、及び3分後に撮影した写真を示した。JP1やFaSSGFにOD錠を浸した場合、1分後にはOD錠の表面にゲル状の層が形成されており、その後、製剤の崩壊はほとんど起こらないことが明らかとなった。一方、

蒸留水中では OD 錠は速やかに崩壊した。

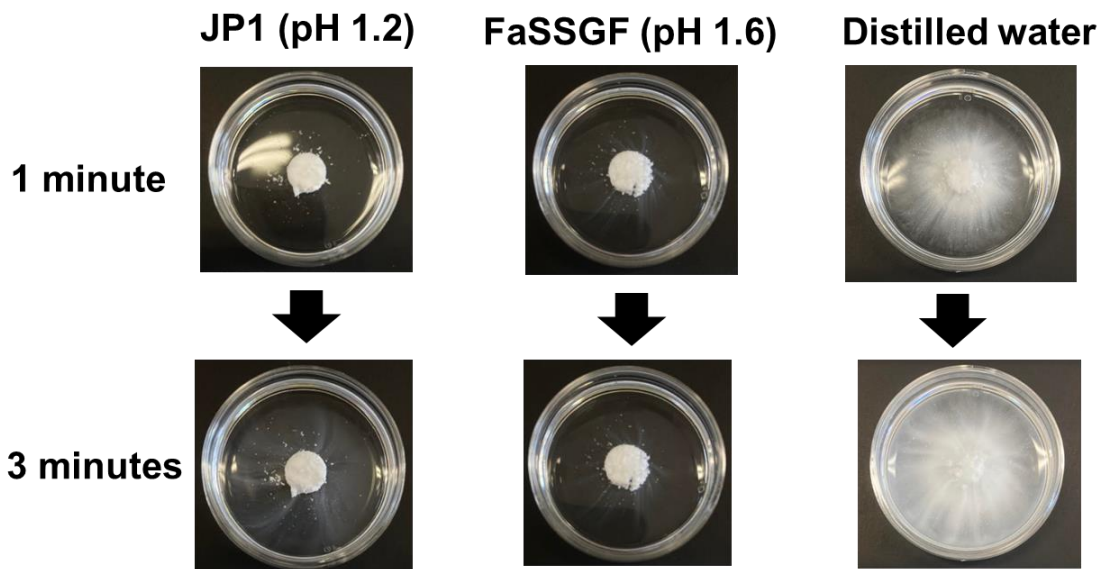


Fig. 23 Disintegration of Flivas® OD tablets after addition of JP1, FaSSGF, or distilled water onto the tablets.

Naftopidil は Cl イオンを高濃度に含む溶液中では、Cl イオンと難溶性の複合体を形成し、溶解は Cl イオン複合体との溶解平衡によって制限される。そのため、Cl イオンを高濃度に含む JP1 中での Naftopidil の溶解度は、pH 2.0 のリン酸緩衝液中での溶解性よりも低くなることが報告されている<sup>61)</sup>。FaSSGF にも JP1 と同様に高濃度の Cl イオンが含まれていることから、両液に OD 錠を直接浸した場合、製剤表面から速やかに溶解した Naftopidil が Cl イオンとの複合体を形成し、析出した複合体がゲル状の層となって製剤表面を覆ったものと考えられた。これは、Cl イオンを含まない蒸留水中では、製剤が速やかに崩壊したことから明らかである。また、普通錠の場合は製剤の崩壊及びその後の薬物の溶解が遅いため、OD 錠で見られた様なゲル層の形成による溶解の遅延は生じなかったものと推察された。

実際に製剤を服用する場合、OD 錠が直接胃液中に投与されるのであれば、Fig. 22 と同様に溶解が遅延し普通錠に比べて吸収が遅くなる可能性がある。しかし、フリバス®OD 錠のヒト BE 試験における Naftopidil の血中濃度推移は普通錠と同等であり、両製剤は同等であることが確認されている。この理由として、OD 錠は胃に到達する前に服用した水分、あるいは水なしでの服用の場合であれば唾液によって、口腔内で

速やかに崩壊し分散するため、Cl<sup>-</sup> イオン複合体の胃内での析出は認められなかったものと推察される。したがって、*in vitro* において Naftopidil の様な薬物を含む製剤の BE を評価するためには、*in vivo* と同様な条件下で崩壊・溶解過程を観察する必要がある。そこで、胃に到達するまでの崩壊を考慮した新たな protocol の構築を試みた。

## 2.2-2) 胃到達までの製剤の崩壊過程を反映した protocol の作成

経口投与後、胃に到達するまでの製剤の崩壊プロセスを BE チェッカーで再現することを目的として新たに考案した試験 protocol を Fig. 24 に示した。Fig. 17 の protocol からの変更点として、最初に donor 側 chamber の底部に 37.5 mL の蒸留水を満たし、そこに製剤を投与して 1 分間の incubation を行った後に試験を開始することとした。これは、製剤を 150 mL の水とともに服用する場合を想定した protocol で、経口投与された錠剤がほぼ 1 分間で胃に到達すると仮定している。蒸留水中での 1 分間の incubation の後、濃縮した FaSSGF (pre-FaSSGF) 2.5 mL を donor 側に加えることによって、donor 側溶液を 40 mL の FaSSGF (pH=1.6) とし、その後 Fig. 17 と同じ手順で薬物の donor 側での溶出と receiver 側への透過を測定する。また、製剤が胃に到達するまでの過程は普通錠、OD 錠に関わらず同様であることから、以下すべての製剤の評価に本 protocol を用いることとした。



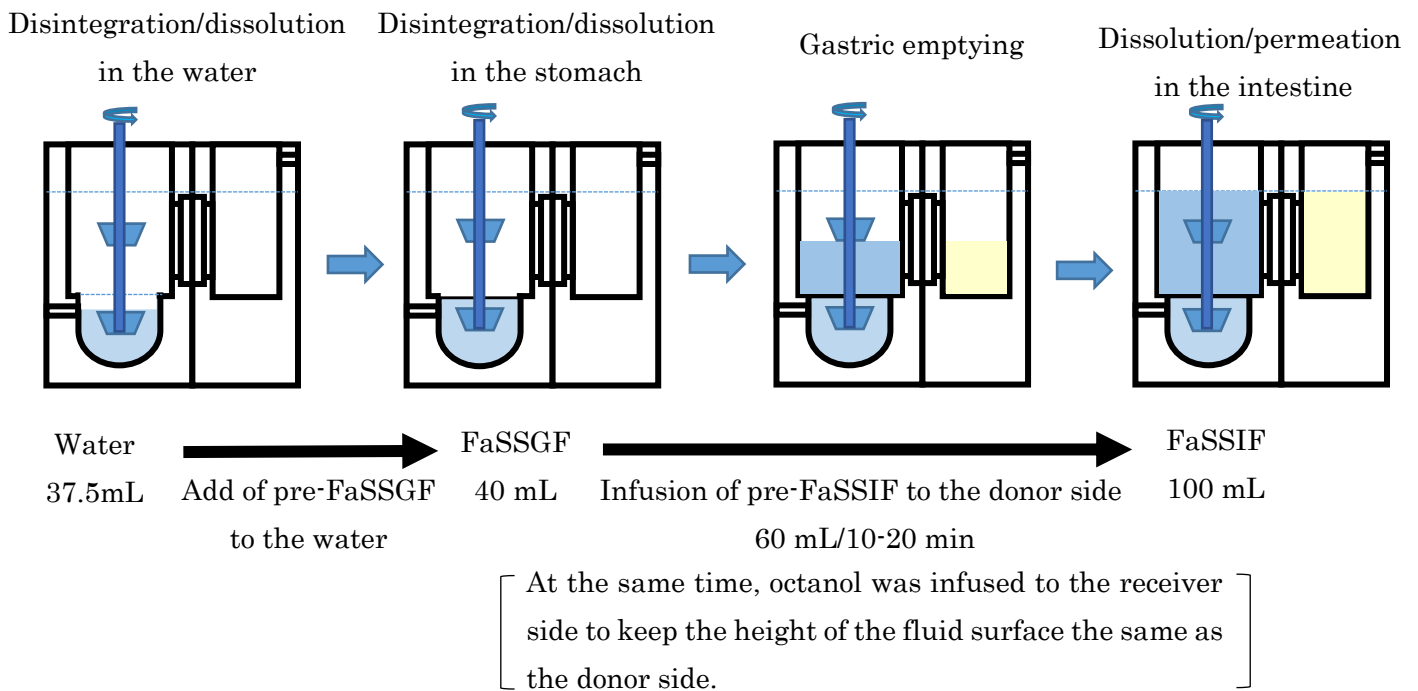


Fig. 24 Experimental conditions of the BE checker with a new protocol with 1-min disintegration in water.

### 2.2-3) 新規 protocol によるフリバス<sup>®</sup>錠、フリバス<sup>®</sup>OD 錠の BE の評価

新たに考案した protocol を用いて、フリバス<sup>®</sup>錠とフリバス<sup>®</sup>OD 錠の製剤間差の評価を行った。試験条件として蒸留水中で incubation した後の FaSSGF pH を 1.6、パドルの回転速度を 100 rpm とし、pre-FaSSIF の注入時間を 10 分、20 分とした時の結果を Fig. 25 に示した。水で予め崩壊させる過程を加えたことにより、OD 錠からの Naftopidil の溶出は速くなり、普通錠からの溶出及び透過プロファイルと同様な結果となった。pre-FaSSIF の注入時間を 20 分と長く設定した条件では、溶解、膜透過率ともに上昇したものの、それらプロファイルに普通錠、OD 錠間での有意な差は認められなかった。

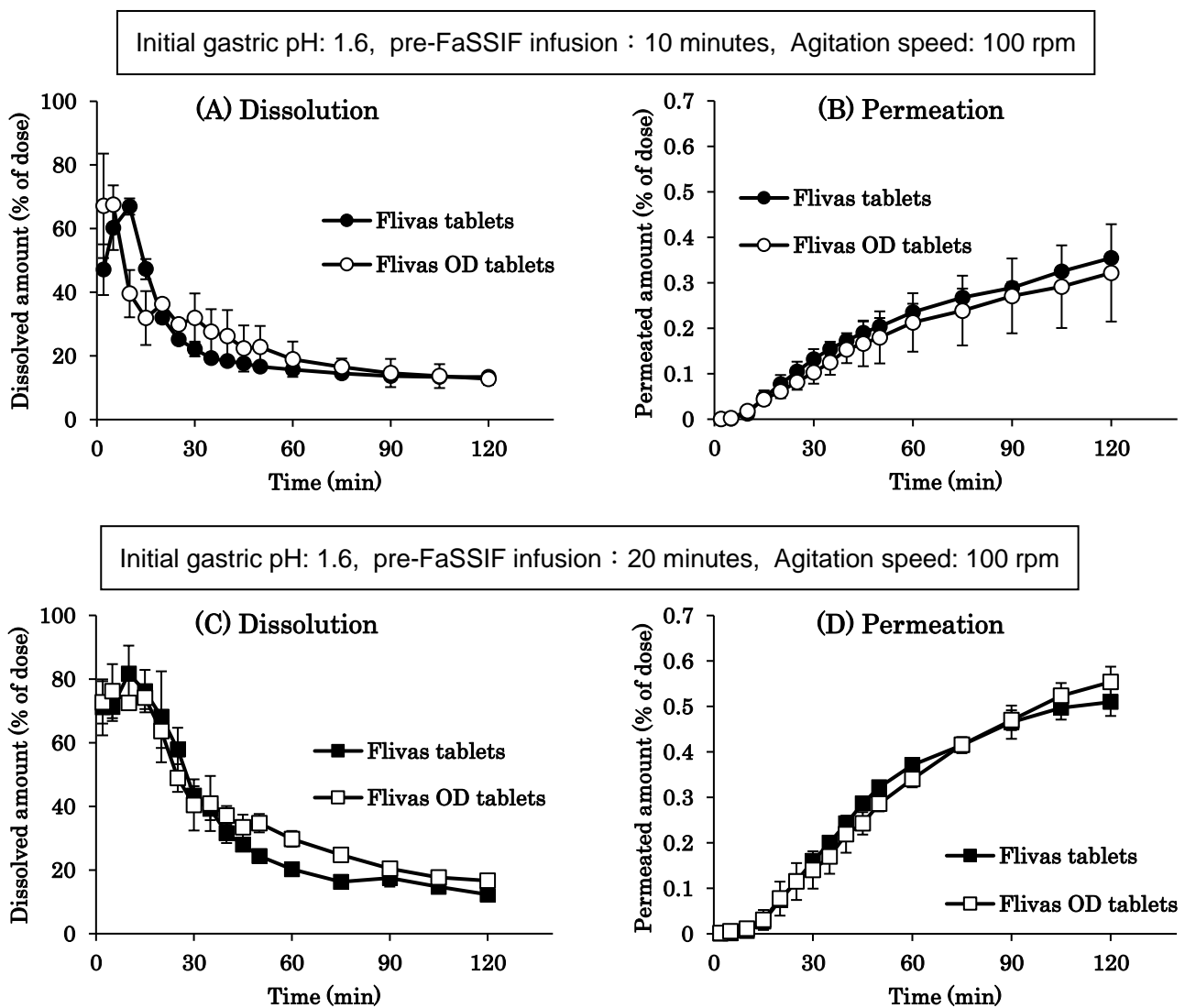


Fig. 25 Comparison of dissolution (A, C) and permeation (B, D) of Naftopidil from Flivas<sup>®</sup> tablets and Flivas<sup>®</sup> OD tablets in the BE checker. Experiments were performed with a new experimental protocol with 1-min disintegration time. Pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min (A, B) or to 20 min (C, D). Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 100 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

他の条件は同じとして、パドルの回転速度を 50 rpm に落とすことで胃内での攪拌力の弱い患者を想定した試験を行った。結果を Fig. 26 に示した。Naftopidil の溶解率、透過率は Fig. 25 のパドルの回転速度 100 rpm 時と比べて、普通錠、OD 錠ともに大幅に

減少した。これは胃内での崩壊・溶出速度が遅くなったために、その後の過飽和溶解の程度が小さくなったためと考えられた。ただし、パドルの回転速度の影響は普通錠でより顕著であり、pre-FaSSIFの注入時間10分、20分ともに普通錠からの溶解率、透過率がOD錠に比べて低くなった。またその差はpre-FaSSIFの注入時間を10分とした場合により大きかった。

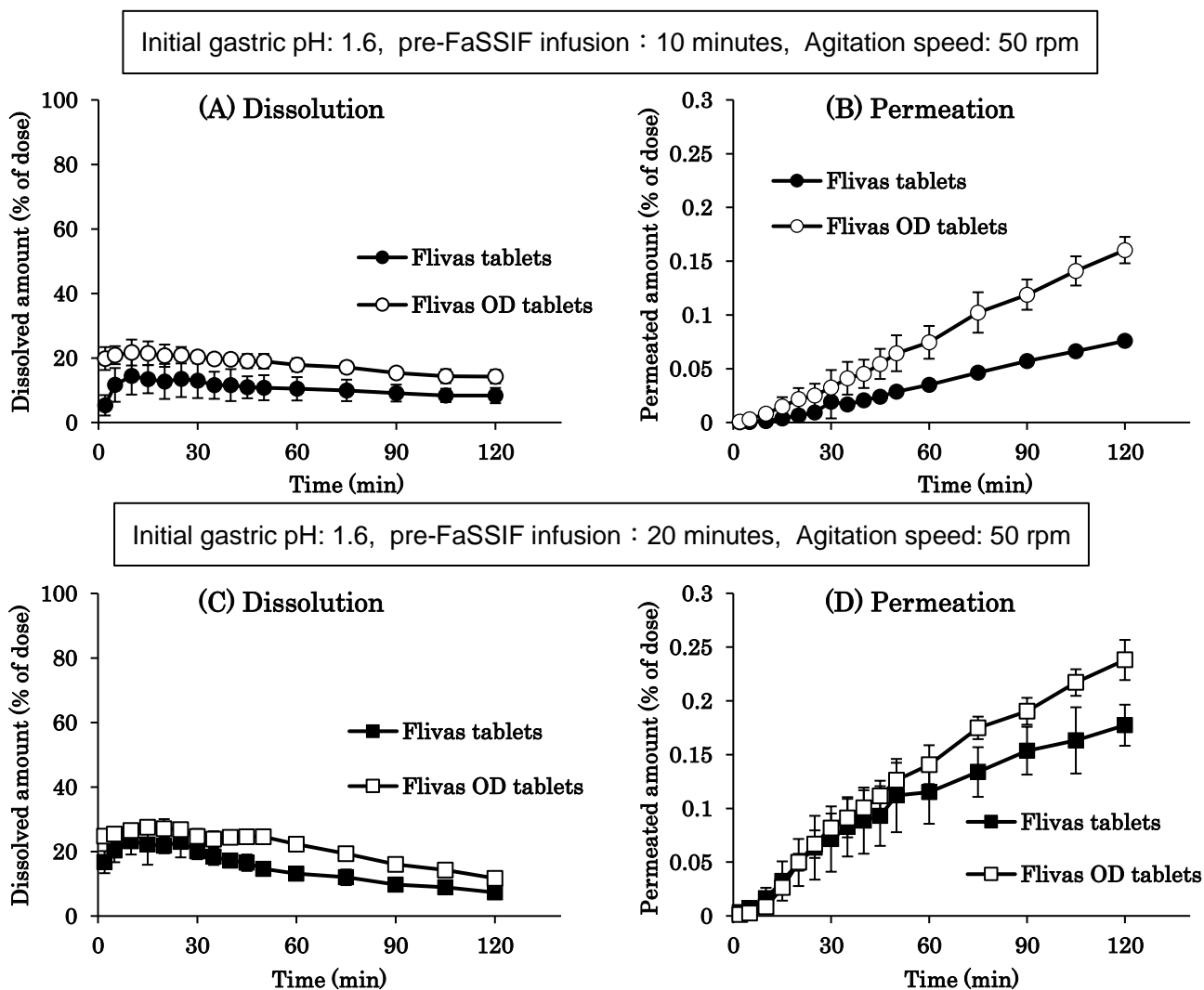


Fig. 26 Effects of paddle speed (50 rpm) on the dissolution (A, C) and permeation (B, D) of Naftopidil from Flivas® tablets and Flivas® OD tablets in the BE checker. Experiments were performed with a new experimental protocol with 1-min disintegration time. pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min (A, B) or to 20 min (C, D). Initial FaSSGF pH was 1.6. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

フリバス<sup>®</sup>錠とフリバス<sup>®</sup>OD 錠の製剤間差を定量的に表すことを目的として、BE チェッカーにおける 2 つの製剤からの Naftopidil の透過プロファイルの類似性  $f_2$  関数 (式 3) を用いて評価した<sup>3)</sup>。

$$f_2 = 50 \times \log \left( \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (T_i - R_i)^2}{n}}} \right) \quad (\text{式 2})$$

$f_2$  関数は、製剤からの薬物溶出プロファイルの類似性を判定するため、実際の BE 試験に用いられている。薬物の溶出性を比較する場合、式 2 の  $T_i$  及び  $R_i$  はそれぞれ各時点における試験製剤及び標準製剤の平均溶出率、 $n$  は平均溶出率を比較する時点の数を示す。本検討では、 $f_2$  関数を用いて薬物の透過プロファイルを比較するため、120 分の時点での透過率を 100 % として、その 85 % の透過率となる時間を  $T_a$  と設定して、 $1/4 T_a$ 、 $1/2 T_a$ 、 $3/4 T_a$  の 4 つの時点で評価を行った。Fig. 22、25、26 の結果から  $f_2$  関数を算出した結果を Table 7 にまとめた。二つの製剤が類似であると判定される基準値を 50 と設定した場合、水での incubation を行わない protocol では両製剤からの Naftopidil の透過プロファイルに類似性は認められなかったのに対し、新たな protocol を用いることで pre-FaSSIF 注入時間に関わらず透過は類似と判定された。一方、パドル回転速度を 50 rpm とした場合、透過プロファイルの類似性は得られなかった。

Table 7 Assessment of the similarity in drug permeation profiles between Flivas<sup>®</sup> tablets and Flivas<sup>®</sup> OD tablets using similarity factor.

protocol	Similarity factor	
	Without a disintegration time in water	With a disintegration time in water
100 rpm, 10 min	31	60
100 rpm, 20 min	23	63
50 rpm, 10 min	-	34
50 rpm, 20 min	-	41

## 2.2-4) 考察

本節では、BE チェッカーによる製剤の BE 評価の妥当性を検証する目的で、ヒト BE 試験において BE が確認されている Naftopidil の普通錠と OD 錠について、薬物の溶出及び透過プロファイルから製剤の類似性の評価を試みた。

フリバス®OD 錠を直接 pH1.6 の FaSSGF に添加した場合、Naftopidil の初期の溶出率は普通錠よりも低くなった。その理由として、Naftopidil は FaSSGF や JP1 のような高濃度の Cl イオンを含む溶液中では、Cl イオンと不溶性の複合体を形成し溶解度が低下するためと考えられた。そこで、予め製剤を蒸留水中で 1 分間 incubation する新たな protocol を考案し試験を実施した結果、両製剤からの Naftopidil の溶出及び透過は同等となることが確認された。一般に、経口投与された製剤は、服用時に摂取した水とともに食道内を移動し胃に到達する。本節で考案した新たなプロトコールは、*in vivo* における製剤服用後の胃までの移行過程を含むものであることから、いかなる製剤を評価する場合にも妥当な手順と考えられる。特に口腔内で速やかに崩壊する OD 錠の場合には、崩壊後の細かな粒子が胃に到達するまでに薬物がある程度溶解する可能性があることから、本 protocol の導入によって溶出プロファイルに大きな違いが生じたものと推察される。なお、製剤服用後、ヒトにおいて胃到達までにどの程度の時間がかかるかに関しての正確な値は報告されていないため、本検討ではこれを 1 分程度と仮定した protocol を採用した。

$f_2$  関数は、溶出試験における製剤間での溶出性の類似性を判定するための基準の一つであり、本邦における後発医薬品の同等性試験ガイドライン<sup>3)</sup>にも、溶出試験における溶出挙動の類似性の判定方法として算出法及び判定法が明記されている。例えば、即放製剤において、標準製剤が 15~30 分に平均 85%以上溶出する場合には  $f_2$  関数の値が 42 以上であれば類似と見なされる。判定の基準は製剤からの溶出速度によって異なっているものの、即放製剤に対する判定基準は 42~53 である。 $f_2$  関数を薬物の透過プロファイルの判定に用いた例は報告されていないものの、統計学的には時間とともに増加する測定値の経時的なプロファイルの類似性の判定に適用することは妥当と思われる<sup>62)</sup>。今回の検討では、 $f_2$  関数の基準を 50 以上として BE チェッカーにおける Naftopidil の透過プロファイルの類似性を検証した結果、パドル回転数が 100 rpm の場合には普通錠と OD 錠からの透過が類似であると判定された。これは、両製剤がヒト BE 試験において BE と判定されていることを反映する結果と考えられる。一方、パドル回転速度を 50 rpm とした場合には、OD 錠からの透過率が高くなり、 $f_2$  関数も基

準値以下であった。パドル回転速度は主に胃内での攪拌力を反映するパラメータであることから、この結果は胃の攪拌力の弱い患者では、両製剤が非同等となるリスクがあることを示唆するものと考えられた。

以上、本章で構築した BE チェッカーを用いることにより、経口投与された製剤の胃から小腸への移行に伴う製剤の崩壊、及び薬物の溶出・膜透過の各過程に及ぼす消化管内の様々な生理的要因の影響を、定量的に評価することが可能となった。先発医薬品と後発医薬品など 2 つの製剤の消化管内での挙動を、本 system を用いて測定することによって製剤間の違いを検出するとともに、ヒトにおける BE を精度よく予測出来るものと期待される。

### 第 3 節 特殊な患者集団における製剤 BE 評価の重要性に関する考察

本章では、*in vitro* の新たな薬物吸収評価 system として BE チェッカーを構築し、その有用性に関する検証を行った。その過程で、ある特定の試験条件下でのみ、製剤からの薬物の溶出や透過プロファイルに大きな違いが認められることが明らかとなった。第 1 節 Fig. 19、Fig. 20 に示した様に、ペルサンチン<sup>®</sup>錠からの Dipyridamole の溶出は、パドル回転速度が速くまた pre-FaSSIF 注入時間が長い場合は極めて速やかで、またその後の溶解率も高く維持されたものの、パドル回転数の低下に伴って溶出率は顕著に低下した。さらに第 2 節 Fig. 26 では、パドル回転数を遅くした場合、フリバス<sup>®</sup>錠からの Naftopidil の溶出率及び透過率がフリバス OD 錠よりも小さくなり、 $f_2$  関数による判定で両製剤からの透過プロファイルの類似性は検証されなかった。BE チェッカーにおける FaSSGF の pH、donor 側のパドル回転数及び pre-FaSSIF 注入速度は、それぞれヒト消化管における胃内 pH、胃内での攪拌力及び胃から小腸への排出速度を反映したパラメータであることから、これらの結果は消化管の生理条件が異なる特定の患者集団間では、製剤間の BE が担保されないリスクを示唆するものと考えられる。

ヒト BE 試験は、通常、健康な成人ボランティアを対象に実施される。多くの場合、好ましくない疾患を有する被験者や併用薬を服用している被験者、及び高齢者等は除外基準に従って試験から除外される。これは、薬物投与によって生じる有害事象のリスクを出来る限り回避するためであり、その意味で健常者を対象とした試験は合理的である。しかし、一旦承認・上市されれば、高齢者を含めて多様な疾患や健康状態、生活習慣を持つ患者がその医薬品を服用することになる。特に、先発医薬品からの切

り替えとして後発医薬品を使用する場合、後発医薬品は先発医薬品と BE であることが担保されているため、ほとんどの患者では同等な有効性と安全性が得られる。しかし、特定の患者集団においては必ずしもそうとは限らない。典型的な例として、難溶性の塩基性薬物は、胃内の低い pH で溶解し、溶液として小腸に移行することによって速やかに吸収されることが知られている。無胃酸症の患者やプロトンポンプ阻害剤 (PPI) を併用している患者では、塩基性薬物の胃での溶解が阻害され小腸からの吸収が低下する。このような患者では、薬物の吸収速度やその程度は製剤の特性に強く依存するため、二つの製剤が、健常人を対象とした BE 試験では検出できなかった異なる吸収プロファイルを示す可能性がある。その他、胃排出速度、攪拌力、消化管液組成 (胆汁濃度を含む) などの消化管の生理的要因も、特殊な患者集団における 非同等性の原因となり得る。

本章で得られた結果は、BE チェッカーによって、消化管の生理的要因の異なる患者における BE の検証が可能であることを示唆している。例えば、Table 7 の類似性の判定結果は、胃内の攪拌力の弱い患者においては普通錠と OD 錠が非同等となるリスクを示すものである。胃の攪拌力が弱い患者集団としては、胃潰瘍や胃癌など胃に疾患のある患者、胃切除手術を受けた患者、あるいは高齢者などが挙げられる。しかし、それら患者において普通錠と OD 錠の非同等性を示す臨床的な実証試験の結果は報告されていない。この様に、「特殊な患者集団における BE」という概念は、後発医薬品を開発・使用する際の重要な課題として広く認識されているものの、臨床的なエビデンスやそれを定量的に検出するための方法論が構築されていないため、未だ明確なルールは定義されていない。今後、本研究の成果が、様々な患者における医薬品の有効性と安全性を担保するために役立つことを期待する。

### 第3章 OD錠を水なし条件で服用した場合のBE評価

OD錠は服用後、口腔内の少量の水と接することで速やかに崩壊するため、服用時に水を摂取することなく容易に嚥下可能な製剤である。服用時の水の摂取を必要としないことは、一般の患者におけるOD錠の服用性を高めるとともに、水分摂取が制限されている様な患者にとっても好ましい。

現行の「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」では、後発医薬品としてOD錠を開発するには、①水とともに服用（水あり）②水の摂取なしで服用（水なし）、の二つのprotocolでヒトBE試験を行い、両方の試験で二つの製剤がBEであることを証明する必要がある（Table 8）。その場合、先発メーカーですでにOD錠が開発されていれば、これを標準製剤として用いることが可能であるものの、普通錠のみが上市されている医薬品では、普通錠を標準製剤として用いることになる。普通錠は水なしでは服用出来ないため、ヒトBE試験においては水ありで服用した普通錠と水なしで服用したOD錠の間でのBEが求められる。

Table 8 OD錠開発におけるヒトBE試験のprotocol

	標準製剤が普通錠の場合		標準製剤がOD錠の場合	
	標準製剤 (普通錠)	試験製剤 (OD錠)	標準製剤 (OD錠)	試験製剤 (OD錠)
試験①	水あり	水あり	水あり	水あり
試験②	水あり	水なし	水なし	水なし

実際のヒトBE試験において、水なし服用時の胃内の水分量は、当然水あり試験に比べて少なく、製剤や主薬の特性によっては胃内での溶出性・溶解性に違いが生じる。また、水なしの場合には胃排出速度も変化する可能性がある。この様に、消化管の生理環境の異なる条件下でBEを検証するためには、水なし条件での薬物の溶出・溶解を測定できるsystemが必要である。しかし、現在までに水なし条件時の薬物溶出性を評価できる*in vitro* systemは開発されておらず、ヒトでBE試験の前に行う溶出試験は、普通錠、OD錠とともに基本的には同じ規格のパドル法（50 rpm/900 mL）によって実施され、薬物溶出の類似性が評価されている。



そこで本章では、第 2 章において 2 製剤間の BE の評価に有用であることを明らかとした BE チェッカーを基本として、水なし条件での製剤からの薬物の溶出及び膜透過を評価可能な system の構築を試みた。さらに、すでにヒト BE 試験において BE が確認されている普通錠と OD 錠を用いて、水あり条件下と水なし条件下での製剤間差の評価を行った。

## 第 1 節 水なし服用条件での薬物の溶出性評価のための *in vitro* system

### 3.1-1) 水なし服用条件での同等性評価のための chamber の構築

我が国においては、医薬品の経口投与臨床試験では通常 150 mL の水を製剤服用時に摂取することが推奨されている。投与後、製剤は水とともに胃へと移動し、胃内で崩壊及び薬物の溶出が始まる。一方、OD 錠を水なしで服用した場合には、唾液によって口腔内で速やかに崩壊した後、微細な粒子となって胃へと移動する。唾液とは、唾液腺から口腔内に分泌される分泌液であり、水分だけでなく電解質や酵素などを含んでいる。健康成人の唾液の分泌量は、個人差があるものの 1 日 1 ~ 1.5 L 程度とされている<sup>63)</sup>。これは平均して 0.5 ~ 1 mL/min 程度であり、胃内に入る唾液量としてもおよそ 0.9 mL/min との報告がある<sup>64)</sup>。

水あり条件を前提とした BE チェッカーでの donor 側 chamber は、胃部を 40 mL、最終的な小腸溶液量を 100 mL になるように設計している。これはヒトの 1/4 サイズを想定した値で、胃部の 40 mL は製剤を服用する際の飲水量の 150 mL と定常的に胃に存在する胃内溶液の 10 mL を合わせた 160 mL の 1/4 量に相当する。40 mL の内訳は水 37.5 mL と濃縮した胃モデル液 2.5 mL であり、そこに 60 mL の pre-FaSSIF を注入して 100 mL の FaSSIF としている。水なし条件下での BE チェッカーの胃部の液量として、唾液 2 mL + 胃 10 mL = 合計 12 mL、唾液 10 mL + 胃 10 mL = 合計 20 mL、及び唾液 30 mL + 胃 10 mL = 合計 40 mL の 3 つのパターンを想定し、その 1/4 量の 3 mL、5 mL 及び 10 mL の 3 種の chamber を作成した（以下、それぞれの chamber を胃容積量の違いから、3 mL-chamber、5 mL-chamber、10 mL-chamber と表記する）。唾液の代わりに精製水を使用し、胃液として pre-FaSSGF を注入しそれぞれ最終的に通常の FaSSGF へと変化するように調節した。また、水なし条件のどのパターンにおいても、pre-FaSSIF の注入量は 60 mL とし、最終的に pH 6.5 の FaSSIF になるように、pre-FaSSIF の組成をパターンごとに調節した。水なし条件での実験手順を Fig.

27 に示した。

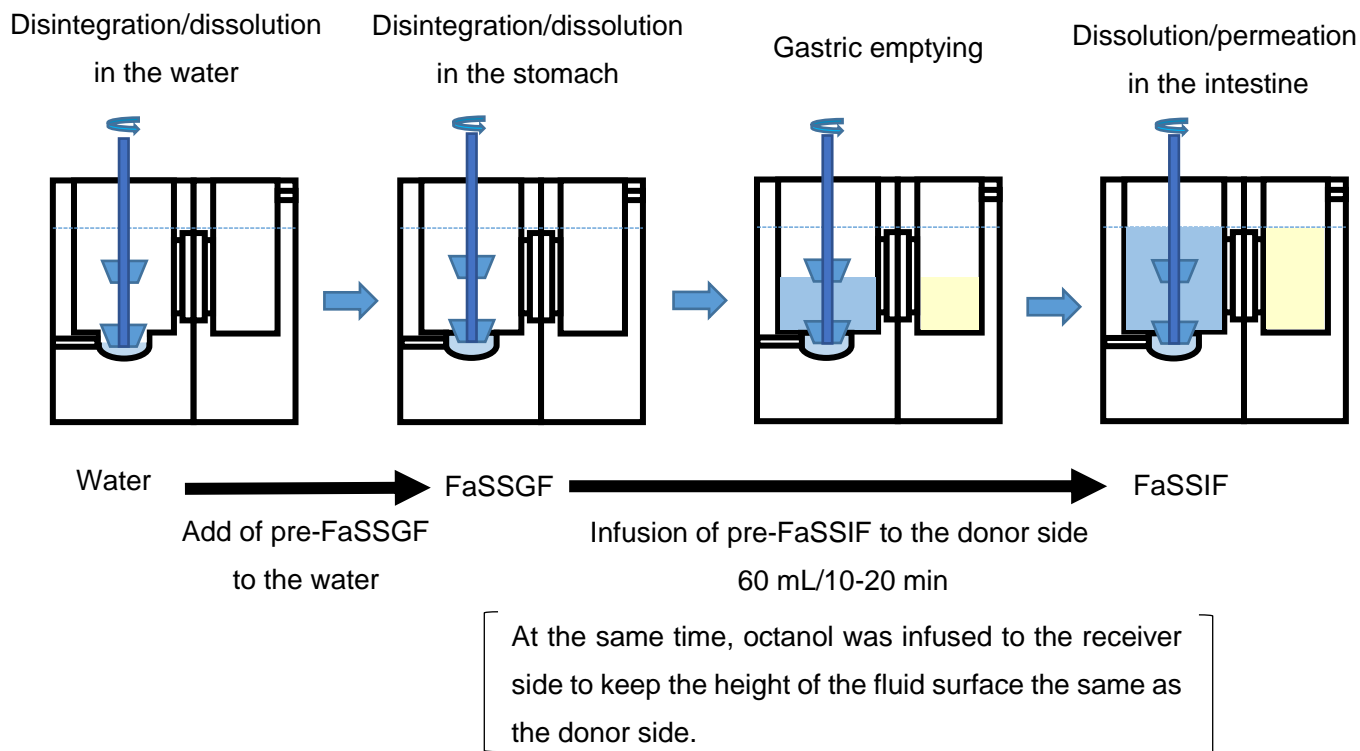


Fig. 27 Experimental conditions represent the GI physiology in the fasted state and taking without water in the BE checker.

この場合も、前節で考案したように、まず製剤をそれぞれの唾液量に相当する精製水中で1分間 incubation した後、pre-FaSSGF を添加して pH 1.6 の FaSSGF とした。実際には、まず、唾液を想定した蒸留水 (0.5 mL/3 mL-chamber、2.5 mL/5 mL-chamber または 7.5 mL/10 mL-chamber) を donor 側底部に入れ、そこに OD 錠を添加して1分間攪拌する。その後、2.5 mL の pre-FaSSGF を donor 側に加え、donor 側溶液を FaSSGF とした。その後、胃内での崩壊、溶解する過程を再現するためにさらに1分間攪拌し、水あり条件と同じく pre-FaSSIF の注入を開始した。pre-FaSSIF の注入時間は10分または20分とした。その時の donor 側溶液の pH の変化パターンを Fig. 28 に示した。

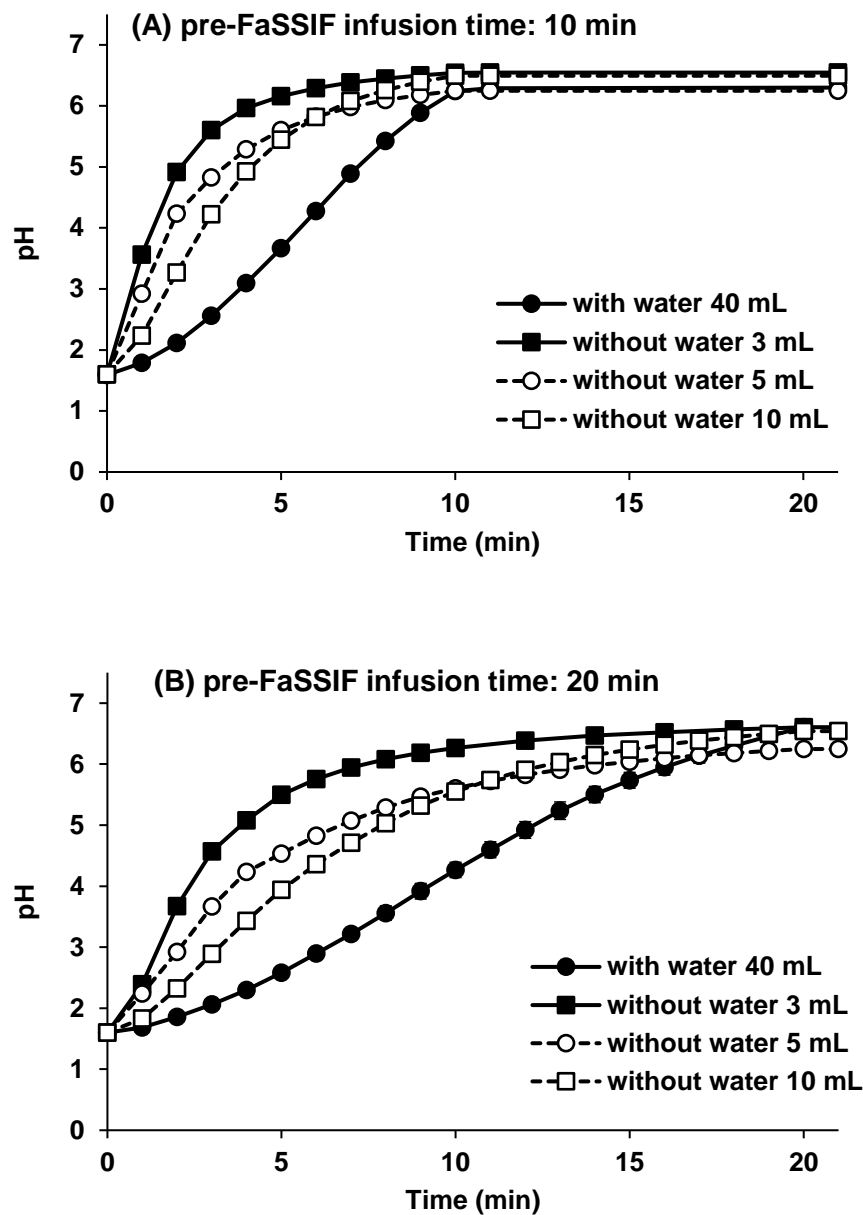


Fig. 28 Time profile of the fluid pH in the donor chamber of the BE checker both administration conditions.

まず、第 2 章で検討を行った Naftopidil 製剤のフリバス<sup>®</sup>錠、フリバス<sup>®</sup>OD 錠を用いて、適切な chamber の選択を試みた。比較のための普通錠の水あり条件下での薬物の溶出及び透過プロファイルは第 2 章の Fig. 24 と同じ方法によって測定した。水あり条件でのフリバス<sup>®</sup>錠（普通錠）及び水なし条件でのフリバス<sup>®</sup>OD 錠（OD 錠）からの

Naftopidil の donor 側での溶出及び receiver 側への透過プロファイルを Fig. 29、Fig. 30 に示した。実験の条件としては、FaSSGF の pH を 1.6、パドルの回転速度を 100 rpm、pre-FaSSIF の注入時間を 10 分 (Fig. 29)、20 分 (Fig. 30) とした。

Fig. 29 に示すように、pre-FaSSIF の注入時間を 10 分とした場合、水なし条件のすべての chamber の donor 側 Naftopidil 濃度は、水あり条件に比べて初期に高くなったものの、その後、速やかに低下することが明らかとなった。これは、液量が少ないために初期の濃度は高くなるものの、Fig. 28 で明らかな様に水なし条件下では pre-FaSSIF の注入直後より donor 側の pH が上昇するため、低 pH で溶解した Naftopidil が速やかに析出したと考えられる。この時、receiver 側への透過率は水あり条件下での普通錠に比べて明らかに低くなった。pre-FaSSIF の注入時間を 20 分とした場合でも、3 mL-chamber では 10 分の時と同様に Naftopidil は速やかに析出し、透過率も明らかに低い値となった。しかし、5 mL-chamber、10 mL-chamber では溶解濃度の低下は 10 分の場合よりも緩やかとなり、また透過率も上昇し水あり条件の普通錠に近いプロファイルを示した。実際のヒトにおける唾液量を考慮すれば、水なし条件を再現するには 3 mL-chamber が妥当と考えられるものの、以上の結果より、この chamber では初期の水分量が少なすぎるために薬物の溶出を安定して測定することは困難であると推察された。したがって、以下の検討では、薬物の溶出及び透過プロファイルを考慮して、5 mL-chamber を水なし条件での評価に用いることとした。

Initial gastric pH: 1.6, pre-FaSSIF infusion : 10 minutes, Agitation speed: 100 rpm

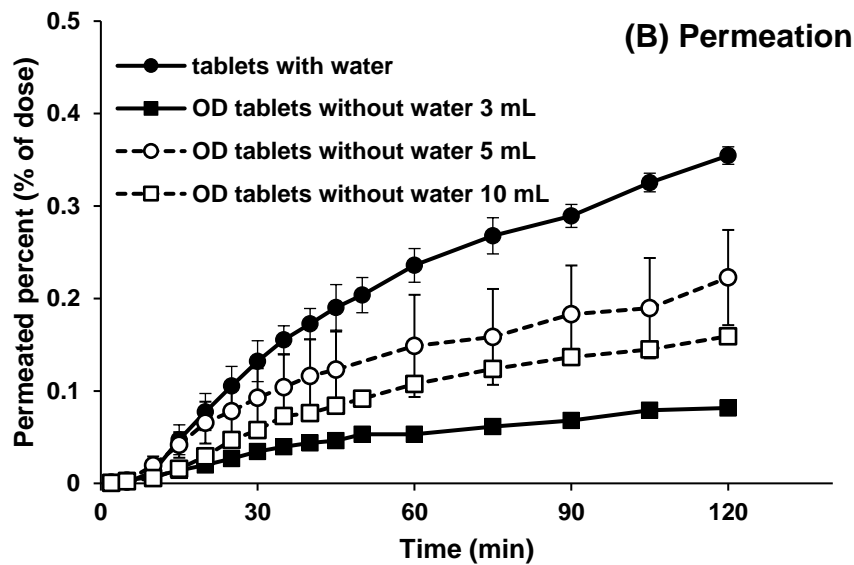
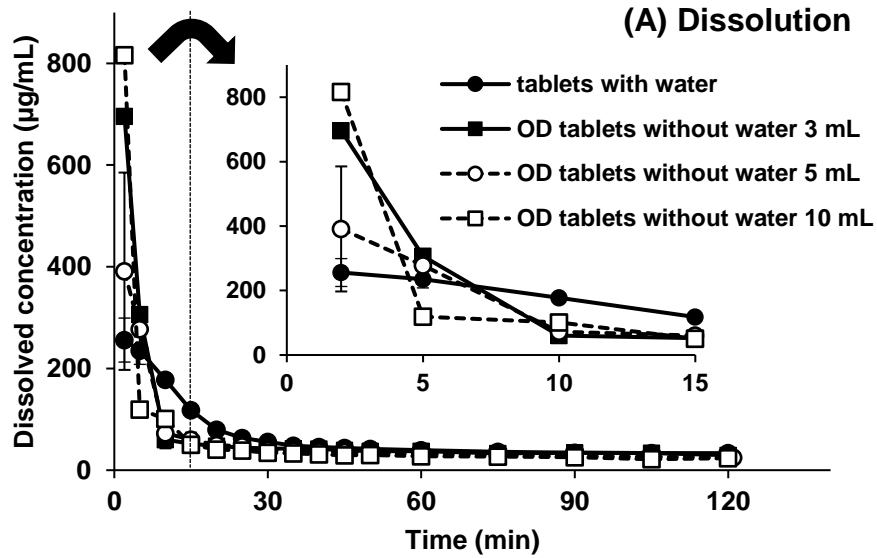


Fig. 29 Difference of the chamber volume on the dissolution (A) and permeation (B) of Naftopidil from Flivas<sup>®</sup> tablets and Flivas<sup>®</sup> OD tablets in the BE checker. In all chambers, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min, Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 100 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

Initial gastric pH: 1.6, pre-FaSSIF infusion : 20 minutes, Agitation speed: 100 rpm

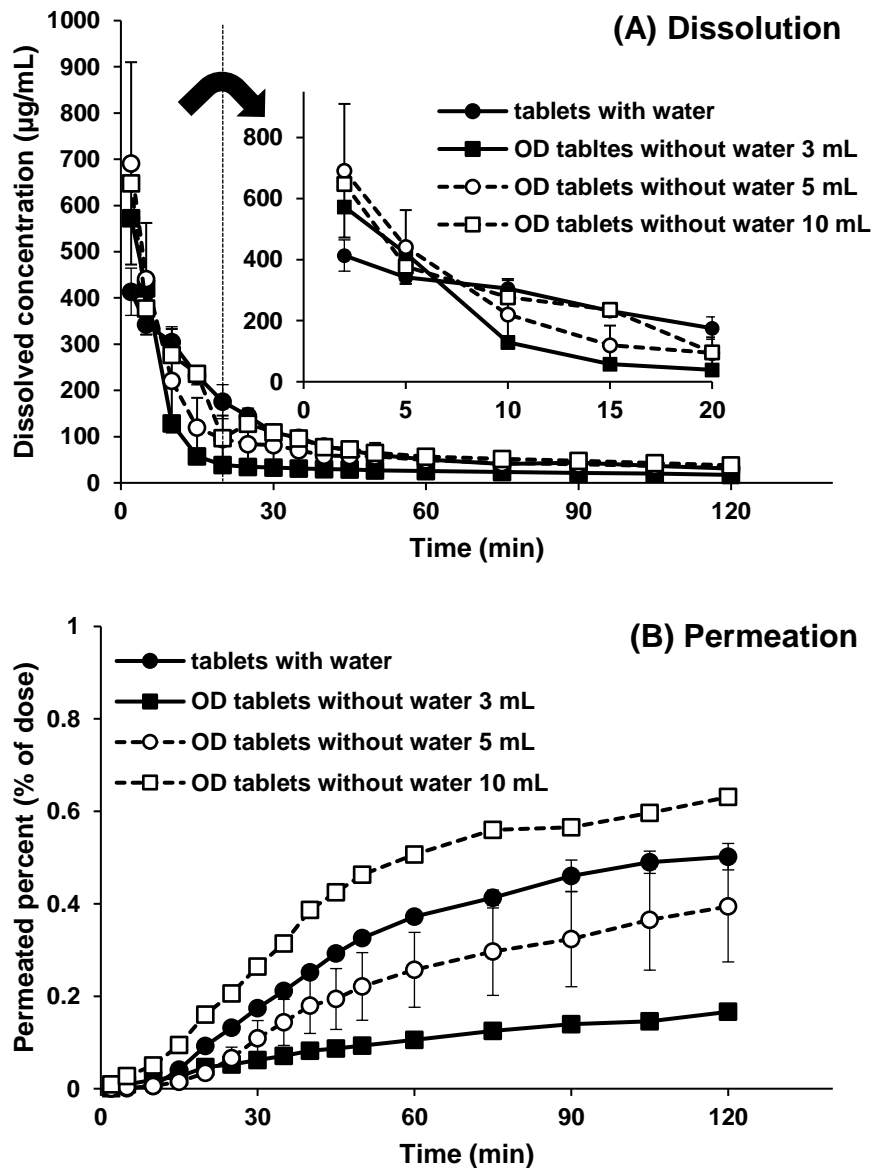


Fig. 30 Difference of the chamber volume on the dissolution (A) and permeation(B) of Naftopidil from Flivas® tablets and Flivas® OD tablets in the BE checker. In all chambers, pre-FaSSIF infusion time was set to 20 min, Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 100 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

### 3.1-2) 水なし服用条件での同等性評価のための試験 protocol の構築

Fig. 30 において、donor 側 chamber として 5 mL-chamber を用いた場合のフリバス<sup>®</sup>OD 錠からの Naftopidil の receiver 側への透過率は、3 mL 及び 10 mL- chamber に比べて、水あり条件下でのフリバス<sup>®</sup>錠からの透過率と最も近いプロファイルとなったものの、透過率自体は明らかに低くなった。この要因として、水あり条件と水なし条件では消化管内の生理的条件が異なるため、市販されている OD 錠はその条件下で同等な吸収を示す様に設計されており、同じ実験条件下で比較した場合にはヒト BE に関して正しい評価が行うことができない可能性が考えられた。そこで、胃内液量以外の要因として、水あり条件と水なし条件下での胃排出速度に関する調査を行った。ヒト BE 試験において、同じ OD 錠を水ありで服用した場合と水なしで服用した場合のインタビューフォームから、それぞれの  $T_{max}$  を比較したところ、Table 9 に示した様に、もともと  $T_{max}$  が長いメモリー<sup>®</sup>OD 錠以外、すべての製剤で水なし条件での  $T_{max}$  が水あり条件より 1.5~2 倍程度長くなることが確認された。

Table 9 Comparison of  $T_{max}$  and  $k_a$  in both conditions from interview form.

	Without water		With water		Ka ratio without/with water
	$T_{max}$ (hr)	$k_a$ (hr <sup>-1</sup> )	$T_{max}$ (hr)	$k_a$ (hr <sup>-1</sup> )	
Flivas <sup>®</sup> OD tablets <sup>61)</sup>	0.80	5.72	0.50	10.12	0.57
Memary <sup>®</sup> OD tablets <sup>65)</sup>	4.19	1.07	4.80	0.87	1.23
Urief <sup>®</sup> OD tablets <sup>66)</sup>	1.46	2.18	1.04	3.54	0.62
Lyricea <sup>®</sup> OD tablets <sup>67)</sup>	1.00	3.54	0.50	8.77	0.40
Uritos <sup>®</sup> OD tablets <sup>68)</sup>	1.40	1.62	1.00	2.68	0.61
Average					0.68

各製剤について、インタビューフォーム中に記載されている  $T_{max}$  値、及び薬物の血中からの消失速度定数 ( $k_{el}$ ) を用いて、製剤投与後の薬物の吸収速度定数 ( $k_a$ ) を算出したところ、水なし条件では  $k_a$  が水有り条件の 0.6~0.7 程度に低下していることが明らかとなった。製剤からの薬物の吸収が胃排泄律速であると仮定した場合、 $k_a$  の違いは胃排泄速度の違いに起因する。そこで、この違いを BE チェッカーにおける試験

protocol に反映させるため、水なし条件での検討においては、pre-FaSSIF の注入時間を水有り条件での 1.5 倍として、フリバス®OD 錠からの Naftopidil の donor 側での溶解濃度及び receiver 側への透過率を測定した。Fig. 31 に示すように、パドルの回転速度を 100 rpm、pre-FaSSIF の注入時間を水あり条件で 10 分（フリバス®錠）、水なし条件で 15 分（フリバス®OD 錠）とした場合、普通錠、OD 錠からの Naftopidil の receiver 側への透過率はほぼ同様となった。さらに、フリバス®錠とフリバス®OD 錠からの Naftopidil の receiver 側への透過率に関して、 $f_2$  関数を算出してその類似性を検証した結果、水あり、水なしとも pre-FaSSIF の注入時間を 10 分とした場合には  $f_2$  関数は 32 であったのに対し、水なしの条件のみ注入時間を 15 分とした protocol では 50 に上昇し、両製剤の類似性が確認された。以上の結果より、水あり、水なし条件下での胃内液量及び胃排出時間を考慮することによって、*in vitro*において *in vivo*での OD 錠の水なし服用後の製剤の放出、薬物の溶出及び吸収過程を再現できたためと考えられた。

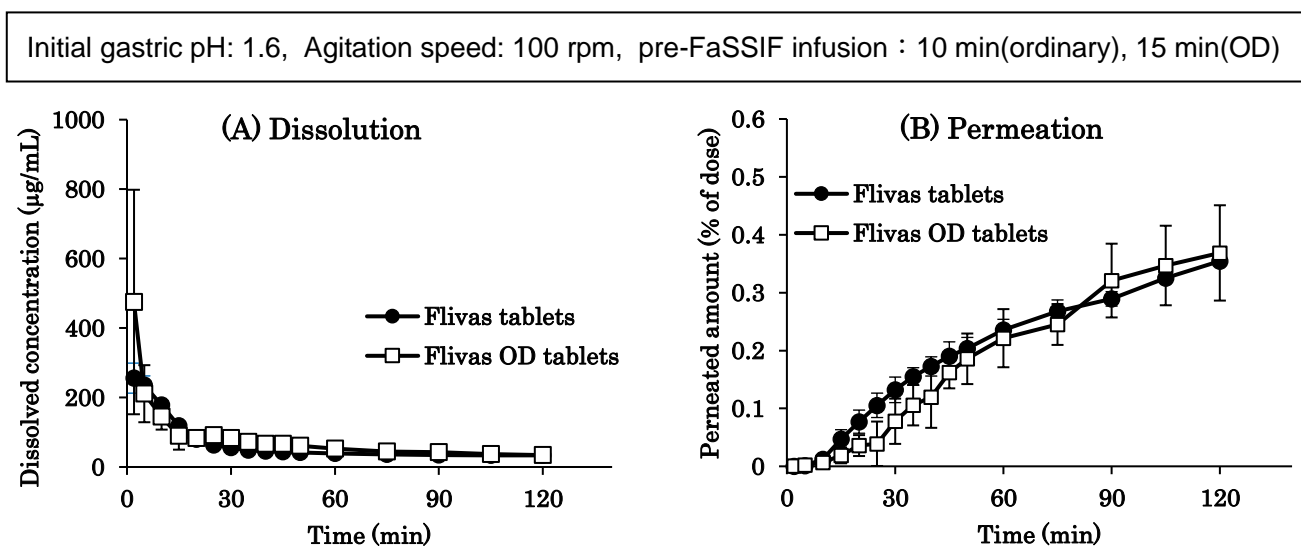


Fig. 31 Comparison of dissolution (A) and permeation (B) of Naftopidil from Flivas tablets and Flivas® OD tablets in BE checker. Flivas® tablets were taken with water, and Flivas® OD tablets were taken without water. In the case of Flivas® tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min. In the case of Flivas® OD tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 15 min. Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 100 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3)



次に、本 protocol の妥当性を検証するため、ヒト BE 試験において BE が確認されている他の医薬品の普通錠及び OD 錠を用いて同様の検討を行った。

### 3.1-3) BE チェッカーを用いた水なし服用条件での同等性評価の妥当性の検証

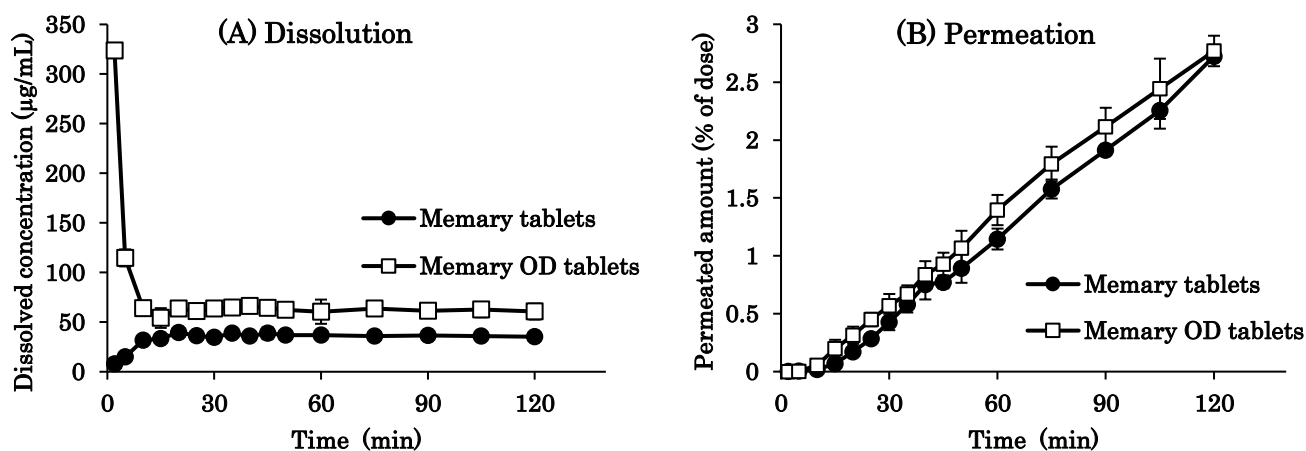
#### ① Memantine 製剤 (メマリー<sup>®</sup>錠、メマリー<sup>®</sup>OD 錠)

Naftopidil と同じ弱塩基性薬物である Memantine の製剤、メマリー<sup>®</sup>錠、メマリー<sup>®</sup>OD 錠を用いて、BE チェッカーにおける溶出及び透過率を測定した。Fig. 32 に示すように、パドルの回転速度を 100 rpm、pre-FaSSIF の注入時間を水あり、水なし条件下ともに 10 分と設定した条件とした場合、水なし条件のみ 15 分とした場合、いずれにおいても二つの製剤で同様な透過率プロファイルが観察された。また  $f_2$  関数はそれぞれ 58、61 であり製剤の類似性が確認された。

#### ② Pitavastatin 製剤 (リバロ<sup>®</sup>錠、リバロ<sup>®</sup>OD 錠)

次に酸性薬物である Pitavastatin の製剤であるリバロ<sup>®</sup>錠とリバロ<sup>®</sup>OD 錠を用いて BE チェッカーの水あり条件、水なし条件での 2 製剤間の違いの評価を試みた。一般に、Pitavastatin のような酸性薬物は pH が低い溶液中では溶解度が低く、pH が上昇するにつれて溶解度が上昇する。そのため、通常の胃内 pH ではほとんど溶解せず、小腸へ移行後、速やかに溶解し吸収されると考えられる。BE チェッカーを用いてリバロ<sup>®</sup>錠とリバロ<sup>®</sup>OD 錠の donor 側での溶出及び receiver 側への透過率を測定した結果を Fig. 33 に示す。

Initial gastric pH: 1.6, Agitation speed: 100 rpm, pre-FaSSIF infusion : 10 min(ordinary, OD)



Initial gastric pH: 1.6, Agitation speed: 100 rpm, pre-FaSSIF infusion : 10 min(ordinary), 15 min(OD)

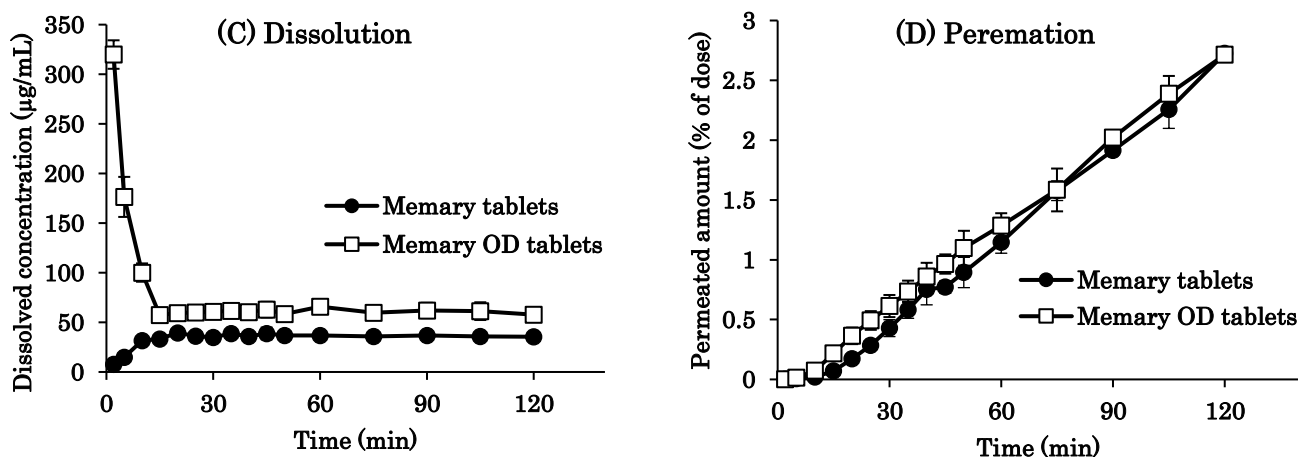
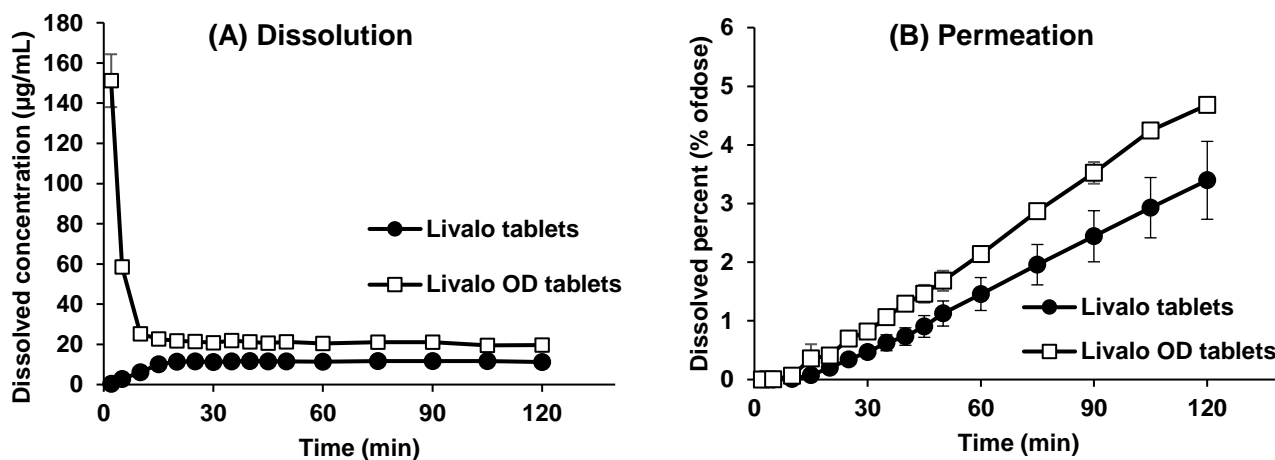


Fig. 32 Comparison of dissolution (A, C) and Permeation (B, D) of Memantine from Memary® tablets and Memary® OD tablets in BE checker. Memary® tablets were taken with water, and Memary OD tablets were taken without water. In the case of Memary® tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min. In the case of Memary® OD tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min (A, B), and 15 min (C, D). Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 50 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3)

Initial gastric pH: 1.6, Agitation speed: 100 rpm, pre-FaSSIF infusion : 10 min(ordinary, OD)



Initial gastric pH: 1.6, Agitation speed: 100 rpm, pre-FaSSIF infusion : 10 min (ordinary), 15 min(OD)

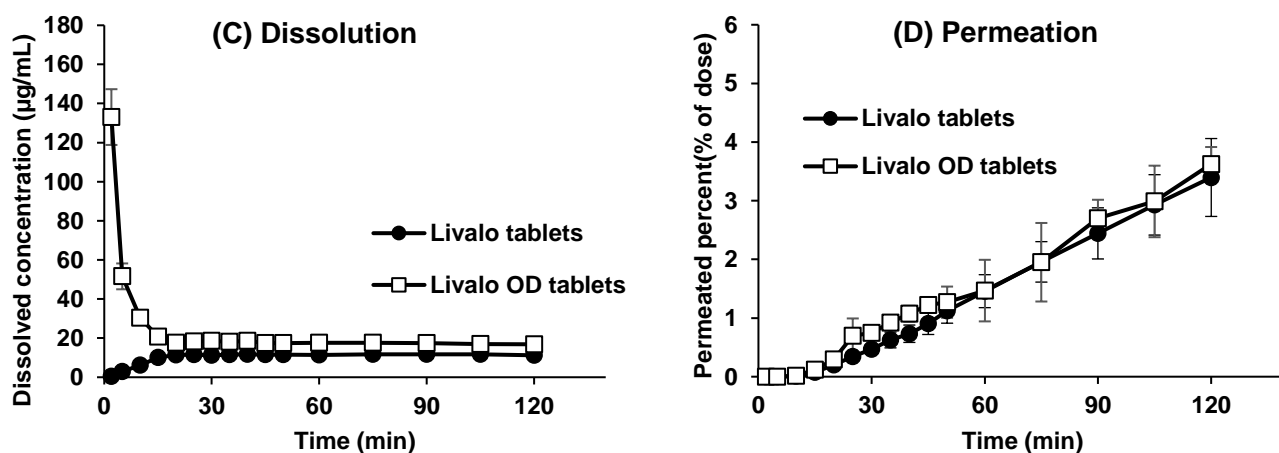


Fig. 33 Comparison of dissolution (A, C) and permeation (B, D) of Pitavastatin from Livalo® tablets and Livalo® OD tablets in BE checker. Livalo® tablets were taken with water, and Livalo® OD tablets were taken without water. In the case of Livalo® tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min. In the case of Livalo® OD tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min (A, B), and 15 min (C, D). Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 100 rpm. Each data point represents mean ± S.D. (n=3)

Pitavastatin の pKa は 4.40 及び 5.36 であり、医薬品としてはそのカルシウム塩が用いられている。Fig. 33 において、水あり、水なし条件ともに pre-FaSSIF の注入時間を 10 分と同じ時間に設定した場合には、receiver 側への透過率が OD 錠で高くなり、2 製剤で類似性は示されなかった。これは、Fig. 28 に示しているように、水なし条件では pH が速やかに上昇するため、中性 pH 条件での溶解が促進され透過率が普通錠よりも高くなったと考えられる。しかし、pre-FaSSIF の注入時間を水なし条件で 1.5 倍と設定することで、Pitavastatin の両製剤からの透過率はほぼ同等となり、 $f_2$  関数も 61 と製剤の類似性が示された。

Table 10 に、BE チェッカーで類似性を検証した 3 種の製剤からの薬物の透過率プロファイルから算出した  $f_2$  関数をまとめた。いずれの製剤においても、水あり条件での pre-FaSSIF 注入時間を 10 分、水なし条件での注入時間を 15 分と設定した場合に、高い  $f_2$  関数が得られ、製剤の類似性が示された。この結果は、本節で設定した protocol によって、水あり、水なしの異なる条件で実施される普通錠と OD 錠のヒト BE 試験の推定が可能であることを示すものと考えられる。

Table 10 Assessment of the similarity in drug permeation profiles between Flivas® tablets and Flivas® OD tablets using similarity factor.

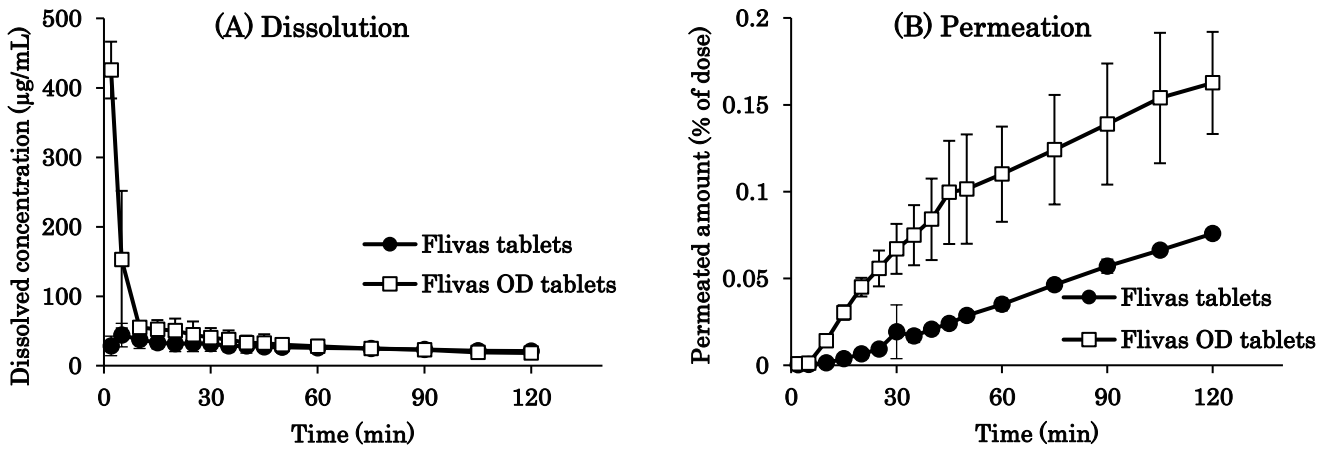
製剤名	Pre-FaSSIF の注入時間		$f_2$ 関数
	普通錠 (水あり)	OD 錠 (水なし)	
Flivas	10 min	10 min	32
	10 min	15 min	50
Memary	10 min	10 min	58
	10 min	15 min	61
Livalo	10 min	10 min	30
	10 min	15 min	61

## 第2節 水なし服用条件での薬物の溶出に及ぼす胃内の攪拌力の影響

第2章の第3節において、特殊な患者集団における製剤BE評価の重要性に関して、BEチェッカーでの検討結果に基づいて考察を行った。同様に、OD錠を水なしで服用する場合にも、患者によってはBEが担保されなくなる可能性がある。そこで、第1節で構築した水なし条件下での評価法を用いて、水と一緒に服用した普通錠と水なしで服用したOD錠のBEに対する胃内攪拌力の影響を検討した。モデル製剤として第2章において水有り条件下での試験で、パドル回転数を低下させた場合にOD錠からの透過率が普通錠よりも高くなり、*in vivo*において非同等となる可能性が示唆されたNaftopidilの製剤（フリバス®錠、フリバス®OD錠）を用いた。両製剤からのNaftopidilの透過率は、パドルの回転速度が100 rpmの場合、水なし条件下でのpre-FaSSIF注入時間を水有り条件の1.5倍とした試験において類似となることが、すでに確認されている（Fig. 30）。しかし、Fig. 34に示したように、パドルの回転速度を50 rpmとした場合には、Pre-FaSSIFの注入時間に関わらず、両製剤からのNaftopidilの透過率は大きく異なり、いずれのプロトコールにおいてもOD錠からの透過率が高くなった。この差は、Fig. 30における水有り条件下での試験に比べて顕著であり、 $f_2$ 関数もpre-FaSSIF注入時間がいずれも10分の場合には17、水なし試験のみ15分とした場合には25と低い値であった。これは、攪拌力が弱い場合には製剤の崩壊性の違いによってOD錠からの薬物の溶出及び透過率が高くなるためと考えられるが、本結果はその影響が水なしで服用した場合により顕著になることを示唆している。

この様に、高齢者や胃の疾患を有する患者など、健常人と比べて消化管内の攪拌力の弱い患者においては、水なし条件の様に通常と異なる方法で製剤を服用した場合、製剤間の挙動の違いがより大きくなる可能性があることに注意が必要であると考えられる。

Initial gastric pH: 1.6, Agitation speed: 50 rpm, pre-FaSSIF infusion : 10 min (ordinary, OD)



Initial gastric pH: 1.6, Agitation speed: 50 rpm, pre-FaSSIF infusion : 10 min(ordinary), 15 min(OD)

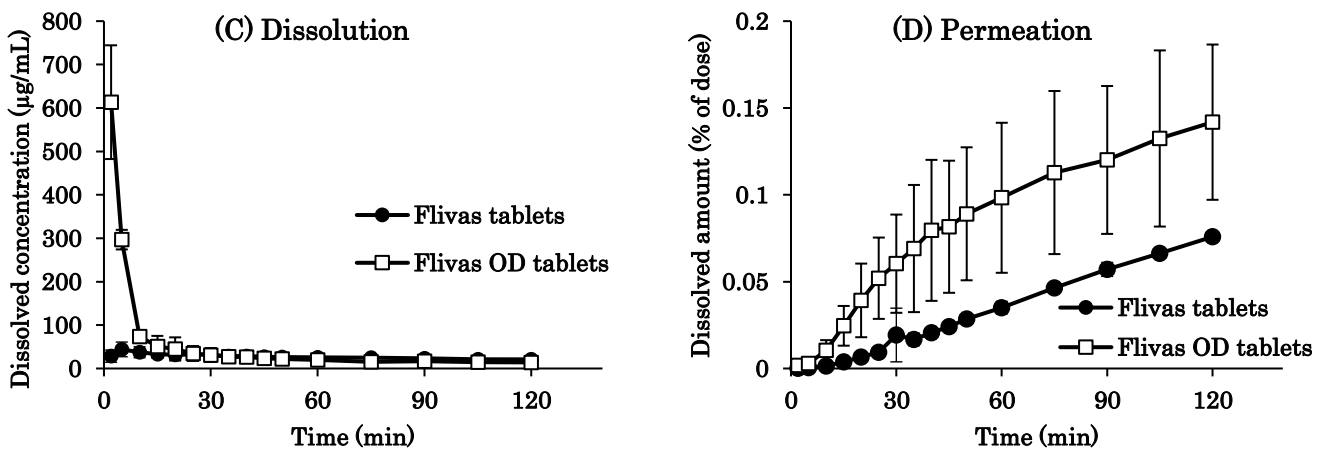


Fig. 34 Comparison of dissolution (A, C) and permeation (B, D) of Naftopidil from Flivas tablets and Flivas OD tablets in BE checker. Flivas tablets were taken with water, and Flivas OD tablets were taken without water. In the case of Flivas tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min. In the case of Flivas OD tablets, pre-FaSSIF infusion time was set to 10 min (A, B), and 15 min (C, D). Initial FaSSGF pH was 1.6, and paddle speed was 50 rpm. Each data point represents mean  $\pm$  S.D. (n=3)

### 第3節 考察

OD錠は崩壊性が非常に高く、水なしでも服用可能な製剤である。そのため、ヒトBE試験においても水なし条件でも評価をする必要があり、水あり条件の普通錠と比較することも多々ある。そのため、崩壊性だけでなく、消化管内の生理的条件も異なってくるため、ヒトBE試験で失敗するケースも少なくない。また、水なし条件を予測、評価可能な *in vitro* system も現状ない。消化管内の生理的条件の異なる条件でのBEを評価するためには、水なし条件での薬物の溶出、溶解、膜透過を評価可能な system が必要であると考えられるため、本章では第2章で構築したBEチェッカーを応用して水なし条件用のBEチェッカーの構築を試みた。第2章で構築したBEチェッカーの実験 protocol は水で服用する状態を再現しているため、初めの飲水量を想定した水 37.5 mL を少なく設定することで水なしで服用した状態を再現できると考えられた。

これまでのBEチェッカーではヒトの1/4スケールのサイズで設計しており、Donor側のFaSSGFの量を水 37.5 mL と Pre-FaSSGF 2.5 mL を混ぜ合わせ 40 mL と設定していた。この時の pre-FaSSGF 2.5 mL は絶食時のヒトの胃内に定常的に存在する量である 10 mL から設定しているため、水なし条件も同様に 1/4 スケールのサイズで作成し、pre-FaSSGF は水あり条件と同じく 2.5 mL と設定した。また、水なし服用条件では口腔内で唾液によって崩壊させてから服用するため、少量の唾液を想定した精製水に pre-FaSSGF を加え従来の FaSSGF へと変化させる。この時、水を使用したのは唾液の成分の 99 % が水であるためである<sup>69)</sup>。水あり、水なし条件での一番の違いが胃内溶液量であると考え、最初の検証として、3つのパターンの唾液量を想定し、胃容積部分が 3 mL、5 mL、10 mL となるように設定した水なし条件用 chamber を作成した。pre-FaSSIF の量は、水の服用がないため、最終的な小腸内の溶液量も水あり条件に比べて減少していると考え、水あり条件と同様 60 mL 注入した。その結果、最終的な FaSSIF の量は水あり条件では 100 mL、水なし条件では 63~70 mL になる。Fig. 29、30 より、pre-FaSSIF の注入時間に関わらず 3 mL-chamber では donor 側の析出が速く、膜透過率も低かった。これは 3 mL-chamber では pH の上昇が注入時間に関わらず速かったためである。5 mL-chamber では 10 分の pre-FaSSIF の注入時間では 3 mL-chamber と同じ結果であったが、20 分では改善された。唾液は胃内におおよそ 0.9 mL/min の速度で入るとの報告があり<sup>64)</sup>、投与後、約 1 分間で胃に到達すると考え、約 2 mL と想定し、その 1/4 の 0.5 mL と Pre-FaSSGF 2.5 mL を合わせた 3 mL-

chamber を作成した。約 1 分間で胃に到達するというのは、OD 錠が口腔内で完全に崩壊させてから飲み込むため、FDA のガイドラインで 30 秒以内に崩壊することを推奨されていることから<sup>60)</sup>、口腔内で崩壊させる時間を 30 秒とし、また、水が食道を通過する時間が 8~15 秒と報告されており、さらに固形のものには通過する時間が長くなると報告があるため<sup>70, 71)</sup>、これらの時間を合計して 1 分と設定した。また、別の報告では唾液は口腔内に平均で 1.1 mL 存在しており<sup>72)</sup>、さらに刺激を与えると唾液の分泌速度は 1.5~2.0 mL/min になることが報告されている<sup>69, 73)</sup>。OD 錠を口腔内に投与すると、同様に唾液の分泌速度が上昇することが考えられ、水なし条件では口腔内で完全に崩壊させてから飲み込むため、胃に移動するまでに OD 錠は 2 mL よりも多い量の水と触れ合うことが考えられる。Fig. 29、30 の結果とこの考察をから、5 mL-chamber が水なし条件用の chamber として最適であると考えた。

また、水あり条件と水なし条件では胃内の水分量の違いなどから、消化管内の生理的条件が大きく異なり、胃排出速度、時間も大きく影響を及ぼす要因であると考えられた。これまでにこの点に関して詳しい報告はほとんどされていないが、先発医薬品のインタビューフォーム<sup>61, 65-68)</sup>による水あり条件、水なし条件のヒト BE 試験の結果を比較すると、水なし条件では水あり条件より  $T_{max}$  が遅れる傾向にあった。製剤からの吸収が胃排出律速であると仮定した場合、インタビューフォームから  $T_{max}$ 、 $k_{el}$  を用いて、 $k_a$  を算出したところ、 $k_a$  は水なし条件では、水あり条件の 0.6~0.7 倍程度であり、水なし条件では、胃排出時間はこの逆数の 1.5 倍遅延していると推定される。このことを考慮すると、胃排出時間は水なし条件では、水あり条件の 1.5 倍に設定して評価することがより生理的条件に近いのではないかと考えられた。この条件で Naftopidil の製剤で水あり条件の普通錠と水なし条件の OD 錠の評価を行ったところ、差はみられず 2 製剤の間には類似性が示された。Naftopidil と同じ弱塩基性薬物の Memantine の製剤の普通錠と OD 錠、さらに、酸性薬物である Pitavastatin の製剤の普通錠と OD 錠でも同様な検証を行い、水なし条件の pre-FaSSIF の注入時間を 1.5 倍と設定した実験条件で類似性が示された。

また、Memantine の製剤では水あり、水なし条件で pre-FaSSIF の注入時間を同じに設定した条件においても類似性が示された。Memantine は  $T_{max}$  がもともと他の薬物に比べて長く、水あり、水なし条件において  $k_a$  に差がない薬物である。そのため、水なし条件で pre-FaSSIF の注入時間を同じに設定しても、1.5 倍に設定しても、普通錠の水あり条件と類似性が示されたと考えられる。このような  $T_{max}$  が長い薬物において



も pre-FaSSIF の注入時間を 1.5 倍に設定した条件で評価できることから、どの薬物の製剤を評価する際も水なし条件の pre-FaSSIF の注入時間は 1.5 倍と設定することが実験 protocol として最適であると考えられる。

今回の検証では水なし条件では pre-FaSSIF の注入時間を長くし、Donor 側 chamber の胃容積を小さく設定し、水あり条件の普通錠と比較した。しかし、この条件以外にも攪拌力などにも影響が生じる可能性は十分考えられる。攪拌力はそもそも *in vitro* と *in vivo* で異なっている点が多く、また、数値化することが難しいため、この点を水あり条件と水なし条件で違いをつけることは難しいと考えられる。さらに水あり条件と水なし条件での条件設定で異なる点が多ければどれが要因になっているか評価することが難しくなる。そのため、今回の条件設定では大きな要因となると考えられる胃排出速度と胃内溶液量に注目して条件設定を行った。もちろん他の要因が BE を評価する上で大きく影響を与える要因と考えられれば、今後、条件設定の検討を再び行わなければならないと考える。

以上、本章では、第 2 章で構築した BE チェッカーを応用した水なし条件の構築を行い、水なし条件の試験 protocol の構築を行った。また、この試験法を用いて、実際のヒト BE 試験で行われる水あり条件の普通錠と水なし条件の OD 錠の製剤間差の評価を行い、類似性が示された。本結果より、この system は *in vitro* で水なし条件を評価可能な system として有用な system となることが今後期待される。

## 結論

以上、著者は3章にわたり、製剤が消化管内を移行する過程を *in vitro* で再現することを目的に、*in vitro* system を構築し、様々な製剤を用いて、製剤の崩壊及び薬物の溶出、膜透過について評価し、system の有用性について検証を行った。その結果、製剤の経口投与後、消化管内で起こりうる様々な環境変化を再現することができ、2 製剤間の BE を *in vitro* で評価する上で、本 system は有用であるとの結論を得た。

### 第1章 消化管内での薬物の移行及び膜透過を評価するための *in vitro* system

胃から小腸への製剤の移行に伴う薬物の溶出・溶解過程を簡便に測定することを目的として、製剤を含む vessel 内の溶液の pH、組成及び容量を経時的に変化させることで、製剤や薬物自体を移動させることなくその消化管内移行を再現する SIFC system を構築した。SIFC system では、FaSSGF (pH 1.6、4.0) 中に薬物を添加した後、FaSSIF を濃縮した pre-FaSSIF を一定速度で注入することにより、vessel 内の溶液を最終的に pH 6.5 の FaSSIF とすることで胃から小腸への移行過程を再現した。その有用性を検証するため、ヒト BE 試験における  $C_{max}$  の個体内変動と SIFC system での薬物の溶解挙動との関係を調べた。 $C_{max}$  の個体内変動が小さい Pioglitazone では、FaSSGF の pH やその後の pH の変化パターンの違いに関わらず、全ての条件で FaSSIF 中の溶解濃度推移に差は認められなかった。一方、 $C_{max}$  の個体内変動が大きい Terbinafine では、FaSSGF の pH の違いによって最終的な薬物溶解濃度に有意な差が観察され、胃内 pH の違いが個体内変動の要因の 1 つであることが示唆された。また、高投与量時に大きな個体内変動を示す Telmisartan について、その市販製剤を用いた検討を行った。製剤では原薬に比べ Telmisartan の溶解濃度が明らかに高くなり、これは製剤中に含まれる pH 調整剤の効果であると考えられた。また、投与量の増加に伴って溶解濃度の変動が大きくなったことから、SIFC system によって、薬物の吸収における個体内変動、及び変動に対する投与量や製剤化の影響を評価可能であると考えられた。

次に、薬物の小腸における膜透過過程を評価する目的で、side-by-side 型の chamber を用いた膜透過評価 system の構築を試みた。著者らの研究室では、すでに薬物の小腸での溶解と膜透過の過程を同時に測定可能な D/P system を開発しており、多くの製薬企業で創薬初期の化合物の吸収評価に利用されている。D/P system はヒト

小腸のモデル膜として Caco-2 細胞単層膜を用いるため、その培養に時間及び専用の施設が必要となる。そこで、より簡便な膜透過性評価 system として、receiver 相を octanol とし、donor と receiver の chamber 間に親水性 filter を装着した BiDP system を構築した。BiDP system でのヒト吸収率の予測性を評価するため、8 種類の薬物について、2 時間までの透過量から予測した吸収率と *in vivo* ヒト吸収率との相関性を観察した。その結果、BiDP system の予測性が D/P system と同等以上であったことから、本 system は、薬物の吸収性を簡便かつ定量的に評価可能であり、製剤開発の様々な場面で利用可能と考えられた。

## 第 2 章 経口製剤の生物学的同等性評価を目的とした新たな *in vitro* system

経口製剤の BE を *in vitro* で評価することを目的として、第 1 章で構築した SIFC system と BiDP system を組み合わせた新たな system (BE チェッカー) を考案した。BE チェッカーでは、FaSSGF を入れた donor 側底部に製剤を適用後、胃から小腸への移行を溶液の pH や容量の変化によって再現すると同時に、octanol を満たした receiver 側への薬物の透過を測定することで、小腸からの薬物の吸収性を評価する。またこの時、FaSSGF の pH や pre-FaSSIF の注入速度、donor 側でのパドルの回転数を変化させることによって、胃内 pH、胃排出時間及び胃や小腸での攪拌力の違いによる薬物吸収の個体間/個体内変動についての検討が可能であると考えられた。

まず、BE チェッカーにおいてヒト消化管内の生理的環境を再現するための試験条件の評価を行った。製剤からの溶出や膜透過が pH の影響を受けない Metoprolol を用いて、パドルの回転数と溶出プロファイルの関係を調べた結果、回転数を 50~200 rpm と設定することでヒトの胃・小腸の攪拌力が反映されることが示された。次に、pre-FaSSIF の注入速度について、弱塩基性薬物である Dipyridamole の製剤を用いた検討を行った。FaSSGF の pH を 1.6、pre-FaSSIF の注入時間を 10 分間とした時、パドル回転数 200 rpm では初期の速やかな溶解及び FaSSIF 中での過飽和溶解が観察されたのに対し、50 rpm、100 rpm では過飽和溶解は確認されず receiver 側への透過量も低い値となった。一方、pre-FaSSIF の注入時間を 20 分間とした場合、パドルの回転数に関わらず Dipyridamole の過飽和溶解が観察され、透過率も高く推移した。これらの結果は、胃からの排出速度や胃内での攪拌力が異なる患者では Dipyridamole の吸収が大きく変動する可能性を示唆するものと考えられた。また、Dipyridamole の吸収率は胃内 pH の高い患者で有意に低下することが報告されていることから、初期の

FaSSGF の pH の影響を調べた結果、pH が高くなるほど Dipyridamole の溶解及び透過率が低くなった。以上、様々な実験条件を組み合わせることにより、BE チェッカーを用いて消化管の生理的環境の異なる患者における薬物の吸収性、さらには製剤の BE に及ぼす生理的条件の影響を簡便に評価出来ることが明らかとなった。

次に、実際にヒトでの BE が確認されている普通錠と OD 錠を用いて製剤間差の評価を試みた。新たな試験 protocol として、OD 錠が胃に到達する前に唾液中あるいは摂取した水分中で崩壊する過程を再現するため、まず蒸留水中で製剤を incubate した後、濃縮した FaSSGF を添加して胃内溶液とした。弱塩基性薬物である Naftopidil の製剤、フリバス<sup>®</sup>錠とフリバス<sup>®</sup>OD 錠からの薬物の溶出と透過率の時間推移を比較したところ、パドルの回転数が 100 rpm の場合には両製剤からの透過率プロファイルに類似性が確認された。しかし、パドルの回転数を 50 rpm と遅くした場合には、pre-FaSSIF の注入速度に関わらず、OD 錠からの溶出・透過が普通錠よりも高くなった。これは OD 錠の崩壊が極めて速いことに起因する現象で、胃の攪拌力が弱い患者では、これら二つの製剤が非同等となる可能性を示唆するものである。したがって、健常成人で BE と判定された製剤であっても、高齢者や胃に疾患を有する患者などの特殊な患者集団では、その使用に際して十分な注意が必要と考えられた。

### 第 3 章 OD 錠を水なし条件で服用した場合の BE 評価

OD 錠は服用後、口腔内で速やかに崩壊するため、服用時に水を摂取することなく容易に嚥下可能な製剤である。OD 錠の BE 試験では、水とともに服用、及び水なしで服用の二つの条件で BE を確認する必要がある。本章では、BE チェッカーを改良し、水なし服用時の薬物の溶出及び透過率を評価可能な system を構築した。新たな system では、唾液の分泌量等を考慮して donor 側底部の胃溶液量を 5 mL とした。水あり条件でのフリバス<sup>®</sup>錠と水なし条件でのフリバス<sup>®</sup>OD 錠からの Naftopidil の溶出、透過率を比較したところ、pre-FaSSIF の注入速度を同じとした場合には OD 錠からの透過率が明らかに低くなった。その理由として、ヒト BE 試験で水なし服用後の最高血中濃度到達時間が水あり服用時と比べて遅くなっていることから、胃排出速度に違いがあると考えられた。そこで、水なし条件での pre-FaSSIF の注入時間を水あり条件の 1.5 倍に設定した結果、二つの製剤からの薬物透過率は類似と判定された。さらに、Naftopidil と同じ弱塩基性薬物である Memantine、及び弱酸性薬物の Pitavastatin の普通錠と OD 錠について同様な試験を実施したところ、いずれの製剤

についても薬物の透過率プロファイルが類似と判定された。これらの結果より、BE チェッカーを応用することで、これまで *in vitro* での評価が困難とされてきた水なし条件下での OD 錠からの薬物の溶出と膜透過を簡便に評価可能であることがと示された。

以上著者は、ヒト消化管内の薬物の生理的環境変化を再現した *in vitro* system である BE チェッカーを構築するとともに、本 system を用いることによって経口製剤の胃から小腸への移行に伴う薬物の溶出及び膜透過を簡便に評価可能であることを示した。また、製剤の BE を評価する上で BE チェッカーの有用性を明らかとした。BE を含めて医薬品の品質を適正に検証するためには、多くの科学的エビデンスが必要である。今後本研究で構築した system を用いた多くの研究を実施することによって、高い品質をもった医薬品の安定供給に貢献できることを期待する。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇切なるご指導、御鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 薬剤学研究室 山下伸二 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益な御指導と御助言を頂きました摂南大学薬学部 薬物動態学研究室 高木敏英 准教授、薬剤学研究室 片岡誠 准教授、南景子 助教に感謝の意を表します。

さらに、種々の有益な御助言とご指導を戴いた沢井製薬株式会社 松井一樹 博士、国立医薬品食品衛生研究所 伊豆津健一 博士、第一三共 RD ノバーレ株式会社 高橋雅行 博士、藤井義峰 博士、竹山匠子 氏に深く感謝いたします。また、実験の一部に御協力頂きました当研究室の卒業生ならびに在校生に深く感謝致します。

最後に、いつもよき理解者として励まし支えてくれた父、母、祖母、兄をはじめ、親族、友人一同に心から感謝いたします。

2022年3月

政田 昂人

## 実験の部

## 第1章 消化管内での薬物の移行及び膜透過を評価するための *in vitro* system

### 【1】実験材料

Hank's balanced salt solution (HBSS)、Albendazole、Furosemide、Griseofulvin、Ketoprofen、Carbamazepine、Egg-phosphatidylcholine (lecithin)、Telmisartan、Terbinafine hydrochloride 2-morpholinoethanesul folic acid monohydrate (MES)は和光純薬(株)から購入した。Atenolol、Danazol、MetoprololはSigma Aldrichから購入した。Dipyridamole、Ketoprofen、Propranolol、Pioglitazone hydrochlorideは東京化成(株)から購入した。ピオグリタゾン錠「サワイ」、テルビナフィン錠「サワイ」、テルミサルタン錠「サワイ」は沢井製薬(株)から購入した。

### 【2】SIFC system

#### (1) 溶液の調製

- ・絶食時のヒト胃モデル液 (FaSSGF)

以下に示す組成で調製した。

NaCl	34.2 mM
Sodium taurocholate	80 μM
Lecithin	20 μM

- ・濃縮した小腸モデル液 (pre-FaSSIF)

以下に示す組成で調製した。

Sodium taurocholate	9 mM
Lecithin	2.25 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	87 mM
KCl	309 mM
MES	15 mM

なお、FaSSGF及びpre-FaSSIFの調製は、実験当日に行い、実験前に37℃に加温し、それぞれpHにあわせた。また、FaSSGF、pre-FaSSIFの使用期限は1日にした。

#### (2) 胃から小腸への消化管溶液の移行過程の再現

pHを調節した10 mLのFaSSGFをバイアル内に注ぎ、37℃、120 rpmで攪拌した。5 mLのpre-FaSSIFをシリンジに充てんし、シリンジポンプを用いて0.5 mL/min



の速度で FaSSGF 中に滴下した。

### (3) 消化管内の溶解濃度推移の評価

モデル薬物として、Pioglitazone、Terbinafine、Telmisartan を選択した。FaSSGF 中への薬物の添加濃度は、臨床投与量を 180 mL（日本の経口投与試験の飲水量 150 mL + 定常状態の胃内水分量 30 mL）の水分量で割った値とした。

薬物	臨床投与量 (mg)	FaSSGF への添加濃度 (mg/10mL)
Pioglitazone	15	0.83
Terbinafine	125	6.94
	20	1.11
Telmisartan	40	2.22
	80	4.44

まず、10 mL の FaSSGF へ薬物を添加した後、1 分間 37 °C、120 rpm の条件で攪拌し、200 µL サンプリングした。その後、5 mL の pre-FaSSIF を 0.5 mL/min の速度で 10 分間滴下していき、1 分間隔（2-11 分まで）でサンプリングを行った。さらに、pre-FaSSIF 滴下開始後、20、30、60 分まで経時的に 200 µL ずつサンプリングを行った。得られたサンプルは、直ちにフィルターろ過（0.45 µm, Millex®-LH, MILLIPORE）後、0.1 % formic acid water/acetonitrile（50/50, v/v %）で希釈した。

(4) 薬物の定量それぞれのサンプル中の薬物量は、LC/MS/MS（ACQUITY® UPLC, TQD, Waters）により定量した。各薬物の LC 及び MSMS condition は、以下の通りである。

#### Pioglitazone

<LC condition>

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 1.7 µm 50 × 2.1 mm column

Mobile Phase (A): 0.1% Water containing 0.1 % formic acid

Mobile Phase (B): 0.1% Acetonitrile containing 0.1 % formic acid

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject Volume: 5 µL

Column Temperature: 40°C

Gradient Program: 0.0 min (A) 98 %, (B) 2 %

1.0 min (A) 5 %, (B) 95 %

2.0 min (A) 5 %, (B) 95 %

2.5 min (A) 98 %, (B) 2 %

3.0 min (A) 98 %, (B) 2 % End

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 40 eV

Parent m/z: 357.14

Daughter m/z: 119.07

### Terbinafine

<LC condition>

Pioglitazone と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 24 eV

Parent m/z: 293.19

Daughter m/z: 141.05

### Telmisartan

<LC condition>

Pioglitazone と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 40 V

Collision energy: 42 eV

Parent m/z: 515.63

Daughter m/z: 193.17

### 【3】 BiDP system

#### (1) 実験装置の作成

BiDP system のチャンバーは全てアクリル製とし、総論の部 Fig. 9 に従って左右一対となるように作成した。また、チャンバー内攪拌装置として、MULTISTIRRER® (SCINICS 社) を用いて 200 rpm の速度で攪拌した。

#### (2) 溶液の調整

##### ・ Transport Medium (TM) の調節

以下の組成に従って調整した。

NaCl	136.89 mM	Glucose	25 mM
KCl	5.36 mM	CaCl <sub>2</sub>	1.26 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.34 mM	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.49 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mM	NaHCO <sub>3</sub>	4.17 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.41 mM	HEPES	10 mM

##### ・ 絶食時ヒト小腸モデル液 (FaSSIF) の調製

FaSSIF は TM に以下の組成を加えて調製した。なお、FaSSIF の調製は実験当日に行い、実験前に 37 °C に加温し、pH は 6.5 にあわせた。また、FaSSIF の使用期限は 1 日にした。

Sodium taurocholate            3 mM

Lecithin                            0.75 mM

##### ・ 摂食時ヒト小腸モデル液 (FeSSIF) の調製

FeSSIF も FaSSIF と同様、TM に以下の組成を加えて調製した。なお、FeSSIF の調製も実験当日に行い、実験前に 37 °C に加温し、pH は 6.5 にあわせた。また、FeSSIF の使用期限は 1 日にした。

Sodium taurocholate	15 mM
Lecithin	3.75 mM

### (3) BiDP system による薬物の溶解、膜透過実験

実験開始 1 時間前に TM に浸しておいた親水性 filter を chamber 中央に装着し、donor 側に 30 mL、receiver 側に 20 mL を導入後、chamber を 37°C の環境下に置き、粉末状の薬物を donor 側に投与し、実験開始とした。octanol は予め水と 1:1 で混ぜ合わせ、水飽和させたものを使用した。donor 側、receiver 側は常にスターラーバーを用いて 200 rpm の速度で攪拌した。receiver 側から 5、10、15、30、60、90、120 分後に 200  $\mu$ L ずつサンプリングを行った。サンプリング後、体積補正のため直ぐに receiver 側に octanol を 200  $\mu$ L 加えた。また、実験開始後 120 分後、donor 側溶液を 200  $\mu$ L サンプリングし、直ちにフィルターろ過 (0.45  $\mu$ m, Millex®-LH, MILLIPORE) した。その後サンプル中の薬物量を定量し、薬物の溶解率(% of dose)、膜透過率 (% of dose) を算出した。

donor 側サンプルは 0.1 % formic acid water/acetonitrile (50/50, v/v %) で希釈し、receiver 側サンプルは water/acetonitrile (80/320) で希釈を行った。

(4) 薬物の定量それぞれのサンプル中の薬物量は、LC/MS/MS (ACQUITY® UPLC, TQD, Waters) により定量した。各薬物の LC 及び MSMS condition は、以下の通りである。

### Albendazole

<LC condition>

第 1 章【2】(4) と同様。

<MSMS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V  
Collision energy: 24 eV  
Parent m/z: 266.09  
Daughter m/z: 191.21

### Atenolol

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 20 eV

Parent m/z: 267.18

Daughter m/z: 73.72

### Carbamazepine

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 40 V

Collision energy: 20 eV

Parent m/z: 237.10

Daughter m/z: 194.14

### Danazol

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 50 eV

Parent m/z: 338.19

Daughter m/z: 91.02

### Dipyridamole

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 36 eV

Parent m/z: 505.33

Daughter m/z: 429.33

### Furosemide

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 20 V

Collision energy: 18 eV

Parent m/z: 329.83

Daughter m/z: 78.18

### Griseofulvin

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 40 V

Collision energy: 40 eV

Parent m/z: 354.24

Daughter m/z: 61.18

### Ketoconazole

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 42 eV

Parent m/z: 532.64

Daughter m/z: 81.93

### Ketoprofen

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 40 V  
Collision energy: 48 eV  
Parent m/z: 255.08  
Daughter m/z: 77.07

### Metoprolol

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 40 V

Collision energy: 20 eV

Parent m/z: 268.20

Daughter m/z: 71.73

### Propranolol

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 10 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 260.20

Daughter m/z: 56.01

### Taurocholic acid

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。



<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 50 eV

Parent m/z: 514.25

Daughter m/z: 79.82

## 第2章 経口製剤の生物学的同等性評価を目的とした新たな *in vitro* system

### 【1】実験材料

セロケン®錠はアストラゼネカ（株）から購入した。ペルサンチン®錠は日本ベーリンガーインゲルハイム（株）から購入した。フリバス®錠、フリバス®OD 錠は旭化成ファーマ（株）から購入した。そのほかの試薬は第1章と同じものを使用した。

### 【2】BE チェッカーを使用した評価

#### (1) 実験装置の作成

BE チェッカーの chamber は全てアクリル製とし、総論の部 Fig. 15 に従って左右一対となるように作成した。また、chamber 内攪拌装置として、donor 側溶液は2段パドルを用いて胃部及び小腸部を 50、100、200 rpm の速度で同時に攪拌した。receiver 側は MULTISTIRRER®（SCINICS 社）を用いて 200 rpm の速度で攪拌した。

#### (2) 溶液の調整

##### ・絶食時のヒト胃モデル液（FaSSGF）

以下に示す組成で調製した。

NaCl	34.2 mM
Sodium taurocholate	80 μM
Lecithin	20 μM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
Citric acid	10 mM

##### ・小腸モデル液（FaSSIF）

濃縮した FaSSIF を FaSSGF と混合して以下に示す FaSSIF の組成になるように調

製した。

Sodium taurocholate	3 mM
Lecithin	0.75 mM
NaCl	13.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
Citric acid	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4.17 mM
D-glucose	5.55 mM
HEPES	10 mM

これを HBSS で希釈したものを FaSSIF とした。

pre-FaSSIF の Citric acid と Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> の濃度は FaSSGF と同じとして、最終的な FaSSIF の濃度も同じとなるように設定した。FaSSGF の pH は HCl または NaOH を用いて 1.6、3.0、5.0、6.5 に調節し、pre-FaSSIF の pH は最終的に FaSSGF と混合して 6.5 となるように調節した。なお、FaSSGF 及び pre-FaSSIF の調製は、実験当日に行い、実験前に 37 °C に加温し、それぞれ pH をあわせた。また、FaSSGF、pre-FaSSIF の使用期限は 1 日にした。

### (3) BE チェッカーにおける胃から小腸への移行過程と溶解、過膜透過の評価

モデル製剤として、セロケン<sup>®</sup>錠 (Metoprolol)、ペルサンチン<sup>®</sup>錠 (Dipyridamole)、フリバス<sup>®</sup>錠、フリバス<sup>®</sup>OD 錠 (Naftopidil) を使用した。親水性 filter と octanol は第 1 章の【3】(3) と同様な方法で準備した。まず、40 mL の FaSSGF を donor 側に満たした後、固形製剤を投与した。投与後 1 分間 37 °C の条件下で、パドルを用いて攪拌し、投与 1 分後から 60 mL の pre-FaSSIF と 30 mL の octanol を一定速度で滴下を開始した。ヒトにおける胃から小腸への溶液の排出速度の指標として、排出半減期は 5~10 分程度であると報告されているため、pre-FaSSIF の注入速度は一定 (0 次速度) とし、注入時間は半減期の 2 倍の 10 分あるいは 20 分と設定した。2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、75、90、105、120 分で donor 側、receiver 側からそれぞれ 200 µL ずつサンプリングを行った。donor 側から得られたサンプルは、直ちにフィルターろ過 (0.45 µm, Millex<sup>®</sup>-LH, MILLIPORE) を行った。

(4) 水崩壊過程を加えた評価

donor 側に 37.5 mL の精製水を満たし、そこに固形製剤を投与する。そこで 1 分間攪拌する。その後、濃縮した FaSSGF (pre-FaSSGF) を投与し、donor 側の溶液を FaSSGF とする。ここに pre-FaSSIF と octanol を一定速度で滴下していった。これ以外の操作は (3) と同様な手順で行った。

(5) 薬物の定量それぞれのサンプル中の薬物量は、LC/MS/MS (ACQUITY® UPLC, TQD, Waters) により定量した。各薬物の LC 及び MSMS condition は、以下の通りである。

Metoprolol

<LC condition>

第 1 章【2】(4) と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 10 V

Collision energy: 50 eV

Parent m/z: 267.67

Daughter m/z: 77.05

Dipyridamole

<LC condition>

第 1 章【2】(4) と同様。

<MS/MS condition>

第 1 章【3】(4) の Dipyridamole と同様。

Naftopidil

<LC condition>

第 1 章【2】(4) と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 40 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 393.39

Daughter m/z: 190.09

### 第 3 章 OD 錠を水なし条件で服用した場合の BE 評価

#### 【1】 実験材料

日本薬局方溶出試験液第 1 液 (JP1 (pH 1.2))、日本薬局方溶出試験液第 2 液 (JP2 (pH 6.8)) は関東化学 (株) から購入した。Memantine と Pitavastatin は和光純薬 (株) から購入した。メモリー<sup>®</sup>錠、メモリー<sup>®</sup>OD 錠は第一三共 (株) から購入した。リバロ<sup>®</sup>錠、リバロ<sup>®</sup>OD 錠は興和 (株) から購入した。そのほかの試薬は第 1 章、第 2 章と同様なものを使用した。

#### 【2】 水なし服用条件の BE チェッカーの構築

##### (1) 実験装置の作成

BE チェッカーの chamber は左右一対となるように作成した。また、chamber 内攪拌装置として、donor 側はパドルを用いて、50、100 rpm の速度で、receiver 側は MULTISTIRRER<sup>®</sup> (SCINICS 社) を用いて 200 rpm の速度で攪拌した。

##### (2) 溶液の調製

###### ・ 絶食時のヒト胃モデル液 (FaSSGF)

精製水と pre-FaSSGF を混ぜ合わせ、第 2 章 【2】 (2) に示す FaSSGF の組成になるように調製した。

###### ・ 小腸モデル液 (FaSSIF)

FaSSGF と pre-FaSSIF を混ぜ合わせ、第 2 章 【2】 (2) に示す FaSSIF の組成になるように調製した。

なお、pre-FaSSGF 及び pre-FaSSIF の調製は、実験当日に行い、実験前に 37 °C に加温し、それぞれ pH をあわせた。また、pre-FaSSGF、pre-FaSSIF の使用期限は 1 日にした。

### (3) BE チェッカーにおける胃から小腸への移行過程と溶解、過膜透過の評価

モデル製剤として、フリバス®錠、フリバス®OD 錠 (Naftopidil)、メマリー®錠、メマリー®OD 錠 (Memantine)、リバロ®錠、リバロ®OD 錠 (Pitavastatin) を使用した。親水性 filter と octanol は第 1 章の【2】(3) と同様な方法で準備した。donor 側に唾液に相当する量の精製水を満たし、そこに固形製剤を投与する。そこで 1 分間攪拌する。その後、濃縮した FaSSGF (pre-FaSSGF) を 2.5 mL 投与し、donor 側の溶液を FaSSGF とする。pre-FaSSGF 投与後 1 分間 37 °C の条件下で、パドルを用いて攪拌し、投与 1 分後から 60 mL の pre-FaSSIF と 30 mL の octanol を一定速度で滴下を開始した。これ以下の操作は第 2 章【2】(3) と同様な手順で行った。

(4) 薬物の定量それぞれのサンプル中の薬物量は、LC/MS/MS (ACQUITY® UPLC, TQD, Waters) により定量した。各薬物の LC 及び MSMS condition は、以下の通りである。

#### Naftopidil

<LC condition>

第 1 章【2】(4) と同様。

<MS/MS condition>

第 2 章【2】(5) と同様。

#### Memantine

<LC condition>

第 1 章【2】(4) と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 20 eV

Parent m/z: 180.18

Daughter m/z: 163.18

### Pitavastatin

<LC condition>

第1章【2】(4)と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 50 eV

Parent m/z: 423.26

Daughter m/z: 275.22

## 引用文献

- 1) Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, in Japan, branded generic drugs, <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/about-reviews/p-drugs/0017.html>
- 2) 厚生労働省、令和 2 年薬価調査結果, [http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/157-1\\_R02.pdf](http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/157-1_R02.pdf)
- 3) National Institute of Health Sciences Guideline, bioequivalence studies of generic products; Japanese Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Minister of Health, Labor and Welfare, 2012. [http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide\(e\)/Generic/GL-E\\_120229\\_BE.pdf](http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide(e)/Generic/GL-E_120229_BE.pdf)
- 4) Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005, 60 (3), 413-417.
- 5) Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res.* 2008, 25 (7), 1663-1676.
- 6) Galia E, Nicolaides E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res.* 1998, 15 (5), 698-705.
- 7) Nicolaides E, Galia E, Efthymiopoulos C, Dressman JB, Reppas C. Forecasting the in vivo performance of four low solubility drugs from their in vitro dissolution data. *Pharm Res.* 1999, 16 (12), 1876-1882.
- 8) Takeuchi S, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. Evaluation of a three compartment in vitro gastrointestinal simulator dissolution apparatus to predict in vivo dissolution. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103, 3416-3422.
- 9) Tsume Y, Igawa N, Drelich AJ, Amidon GE, Amidon GL. The combination of GIS and biphasic to better predict in vivo dissolution of BCS class IIb drugs, ketoconazole and raloxifene. *J. Pharm. Sci.* 2018, 107, 307-316.
- 10) Matsui K, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. In vitro dissolution of fluconazole and dipyrindamole in gastrointestinal simulator (GIS), predicting in vivo dissolution and drug-drug interaction caused by acid-reducing agents. *Mol.*

*Pharmaceutics*. 2015, 12, 2418–2428.

- 11) Lennernas H, Lindahl A, Van Peer A, Ollier C, Flanagan T, Lionberger R, Nordmark A, Yamashita S, Yu L, Amidon GL, Fischer V, Sjogren E, Zane P, McAllister M, Abrahamsson B. In vivo predictive dissolution (IPD) and biopharmaceutical modeling and simulation: future use of modern approaches and methodologies in a regulatory context. *Mol. Pharmaceutics* 2017, 14, 1307–1314.
- 12) Kourentas A, Vertzoni M, Barmpatsalou V, Augustijn P, Beato S, Butler J, Holm R, Ouwerkerk N, Rosenberg J, Tajiri T, Tannergren C, Symillides M, Reppas C. The BioGIT system: a valuable in vitro tool to assess the impact of dose and formulation on early exposure to low solubility drugs after oral administration. *AAPS J.* 2018, 20, 71.
- 13) Schick P, Sager M, Voelker M, Weitschies W, Koziolok M. Application of the GastroDuo to study the interplay of drug release and gastric emptying in case of immediate release aspirin formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020, 151, 9–17.
- 14) Xu H, Shi Y, Vela S, Marroum P, Gao P. Development quantitative in vitro-in vivo correlation for fenofibrate immediate release formulations with the biphasic dissolution-partition test method. *J. Pharm. Sci.* 2018, 107, 476–487.
- 15) O'Dwyer PJ, Litou C, Box KJ, Dressman JB, Kostewics ES, Kuentz M, Reppas C. In vitro methods to assess drug precipitation in the fasted small intestine – a PEARRL review. *J. Pharm. Pharmacol.* 2019, 71, 536–556.
- 16) Polster CS, Atassi F, Wu SJ, Sperry DC. Use of artificial stomach – duodenum model for investigation of dosing fluid effect on clinical trial variability. *Mol. Pharmaceutics*. 2010, 7, 1533–1538.
- 17) Mitra A, Fadda HM. Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an in vitro model simulating the stomach and duodenum. *Mol. Pharmaceutics*. 2014, 11, 2835–2844.
- 18) Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T, Sezaki H, Yamashita S. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharm. Res.* 2003, 20, 1674–



1680.

- 19) Kataoka M, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. Effect of Food Intake on the Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: In Vitro Assessment of Drug Dissolution and Permeation Assay System. *J. Pharm. Sci.* 2006, 95, 2051–2061.
- 20) Kataoka M, Itsubata S, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. In Vitro Dissolution/Permeation System to Predict the Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: Effect of Food and Dose Strength on It. *Biol. Pharm. Bull.* 2011, 34, 401–407.
- 21) Kataoka M, Sugano K, da Costa Mathews C, Wong JW, Jones KL, Masaoka Y, Yamashita S. Application of Dissolution/Permeation System for Evaluation of Formulation Effect on Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs in Drug Development. *Pharm Res.* 2012, 29, 1485–1494.
- 22) Miyaji Y, Fujii Y, Takeyama S, Kawai Y, Kataoka M, Takahashi M, Yamashita S. Advantage of the dissolution/permeation system for estimating oral absorption of drug candidates in the drug discovery stage. *Mol. Pharm.* 2016, 13, 1564–1574.
- 23) Kataoka M, Fukahori M, Ikemura A, Kubota A, Higashino H, Sakuma S, Yamashita S. Effects of gastric pH on oral drug absorption: in vitro assessment using a dissolution/permeation system reflecting the gastric dissolution process, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016, 101, 103–111.
- 24) Kataoka M, Terashima Y, Mizuno K, Masaoka Y, Sakuma S, Yokoi T, Yamashita S. Establishment of MDCKII cell monolayer with metabolic activity by CYP3A4 transduced with recombinant adenovirus, *Drug Metabol. Pharmacokinet.* 2013, 28, 125–131
- 25) Yamashita S, Kataoka M, Higashino H, Sakuma S, Sakamoto T, Uchimaru H, Tsukikawa H, Shiramoto M, Uchiyama H, Tachiki H, Irie S. Measurement of drug concentration in the stomach after intragastric administration of drug solution to healthy volunteers: analysis of intragastric fluid dynamics and drug absorption. *Pharm. Res.* 2013, 30, 951–958.
- 26) Schiller C, Frohlich CP, Giessmann T, Siegmund W, Mounnikes H, Hosten N, Weitshies W. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005, 22 (10), 971-979

- 27) Sugihara M, Takeuchi S, Sugita M, Higaki K, Kataoka M, Yamashita S. Analysis of intra- and inter subject variability in oral drug absorption in human bioequivalence studies of 113 generic products. *Mol. Pharmaceutics*. 2015, 12, 4405–4413.
- 28) Divoll M, Greenblatt DJ, Ameer B, Abernethy DR. Effect of food on acetaminophen absorption in young and elderly subject. *J. Clin. Pharmacol.* 1982, 22, 571–576.
- 29) Hunt JN, Stubbs DF. The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J. Physiol.* 1975, 245, 209– 225.
- 30) Tache Y, Larauche M, Yuan PQ, Million M. Brain and Gut CRF Signaling: Biological Actions and Role in the Gastrointestinal Tract. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2018, 11, 51–71.
- 31) Uekusa T, Sugano K. Precipitation behavior of pioglitazone on the particle surface of hydrochloride salt in biorelevant media. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 161, 45–50.
- 32) Sugano, K. Computational oral absorption simulation of free base drugs. *Int J Pharm.* 2010 398(1-2) 73-82.
- 33) ミカルデイス®錠インタビューフォーム（日本ベーリンガーインゲルハイム（株））
- 34) Clulow AJ, Parrow A, Hawley A, Pham AC, Larsson P, Bergstrom CAS, Boyd BJ. Characterization of solubilizing nanoaggregates present in different versions of simulated intestinal fluid, *J. Phys. Chem. B* 2017, 121, 10869–10881.
- 35) Vertzoni M, Augustijns P, Grimm M, Koziolk M, Lemmens G, Parrott N, Pentafragka C, Reppas C, Rubbens J, Van Den Abeele J, Vanuytsel T, Weitschies W, Wilson CG. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: an UNGAP review. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019, 134, 153–175.
- 36) Dressman JB, Bass P, Ritschel WA, Friend DR, Rubinstein A, Ziv E. Gastrointestinal parameters that influence oral medications. *J. Pharm. Sci.* 1993, 82, 857–872
- 37) Russell TL, Berardi RR, Barnett JL, Dermentzoglou, LC, Jarvenpaa KM, Schmaltz SP, Dressman JB. Upper gastric pH in seventy-nine healthy, elderly,

- north American men and women. *Pharm. Res.* 1993, 10, 187–196.
- 38) Davis SS, Hardy JG, Fara JW. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut.* 1986, 27, 886–892.
  - 39) Mathias NR, Xu Y, Patel D, Grass M, Caldwell B, Jager C, Mullin J, Hansen L, Crison J, Saari A, Gesenberg C, Morrison J, Vig B, Raghavan K. Assessing the risk of pH-dependent absorption for new molecular entities: a novel in vitro dissolution test, physicochemical analysis, and risk assessment strategy. *Mol. Pharmaceutics.* 2013, 10, 4063–4073.
  - 40) Hens B, Talattof A, Paixao P, Bermejo M, Tsume Y, Lobenberg R, Amidon GL. Measuring the impact of gastrointestinal variables on the systemic outcome of two suspensions of posaconazole by a PBPK model. *AAPS J.* 2018, 20, 57.
  - 41) Yamashita S, Fukunishi A, Higashino H, Kataoka M, Wada K. Design of supersaturable formulation of telmisartan with pH modifier: in vitro study on dissolution and precipitation. *J. Pharm Investig.* 2017, 47, 163-171.
  - 42) Hoa NT, Kinget R. Design and evaluation of two-phase partition-dissolution method and its use in evaluating artemisinin tablets. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85, 1060-1063.
  - 43) Lennernas H, Knustson L, Kuntson R, Lesko L, Salmonson T, Amidon GL. Human effective permeability data for atenolol, metoprolol, propranolol, desipramine and carbamazepine to be used in the proposed biopharmaceutical classification for IR-products, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 1996, 4, S69.
  - 44) Takamatsu N, Welage LS, Idkadek NM, Liu DY, Lee PI, Hayashi Y, Rhie JK, Lennernas H, Barnett JL, Shah VP, Lesko L, Amidon GL. Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PeG400 determined by jejunal perfusion, *Pharm. Res.* 1997, 14, 1127–1132.
  - 45) Lennernas H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination, *Xenobiotica.* 2007, 37, 1015–1051.
  - 46) Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 46, 27–43.
  - 47) Yamashita S, Tanaka Y, Endoh Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, Sezaki H. Analysis of drug permeation across caco-2 monolayer: implication for predicting in vivo

- drug absorption, *Pharm. Res.* 1997, 14, 486–491.
- 48) Mudie DM, Shi Y, Ping H, Gao P, Amidon GL, Amidon GE. Mechanistic analysis of solute transport in an in vitro physiological two-phase dissolution apparatus, *Biopharm Drug Dispos.* 2012, 33, 378–402.
- 49) Rothwell JA, Day AJ, Morgan MR. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4355-4360.
- 50) Pagliara A, Reist M, Geinoz S, Carrupt PA, Testa B. Evaluation and prediction of drug permeation. *J. Pharm Pharmacol.* 1993, 51(12), 1339-1357.
- 51) メトプロロール：医療用医薬品最新品質情報集（ブルーブック）（医薬品医療機器総合機構）  
[https://www.nihs.go.jp/drug/ecqaged/bluebook/m/o\\_Metoprolol\\_Tab\\_01.pdf](https://www.nihs.go.jp/drug/ecqaged/bluebook/m/o_Metoprolol_Tab_01.pdf)
- 52) D’Arcy DM, Healy AM, Corrigan OI. Towards determining appropriate hydrodynamic conditions for in vitro in vivo correlations using computational fluid dynamics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37, 291–299.
- 53) ジピリダモール：医療用医薬品最新品質情報集（ブルーブック）（医薬品医療機器総合機構）  
[https://www.nihs.go.jp/drug/ecqaged/bluebook/s/o\\_Dipyridamole\\_Tab\\_01.pdf](https://www.nihs.go.jp/drug/ecqaged/bluebook/s/o_Dipyridamole_Tab_01.pdf)
- 54) Russell TL, Berardi RR, Barnett JL, O’Sullivan TL, Wagner JG, Dressman JB. pH-related changes in the absorption of Dipyridamole in the elderly. *Pharm Res.* 1994, 11, 136–143.
- 55) Dressman JB, Berardi RR, Dermentzoglou LC, Russell TL, Schmaltz SP, Barnett JL, Jarvenpaa KM. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm Res.* 1990, 7(7), 756–761.
- 56) Morihara M, Aoyagi N, Kaniwa N, Kojima S, Ogata H. Assessment of Gastric Acidity of Japanese Subjects over the Last 15 Years. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24, 313–315.
- 57) Doki K, Darwich AS, Patel N, Rostami-Hodjegan A. Virtual bioequivalence for achlorhydric subjects: The use of PBPK modelling to assess the formulation-dependent effect of achlorhydria. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017, 109, 111–120.
- 58) Chaudhuri TK, Greenwald AJ, Heading RC, Chaudhuri TK. Measurement of

- gastric emptying time? A comparative study between nonisotopic aspiration method and new radioisotopic technique. *Dig. Dis. Sci.* 1975, 20, 1063–1066.
- 59) Steingoetter A, Fox M, Treier R, Weishaupt D, Marincek B, Boesiger P, Fried M, Schwizer W. Effects of posture on the physiology of gastric emptying: A magnetic resonance imaging study. *Scand. J. Gastroenterol.* 2006, 41, 1155–1164.
- 60) Guidance for Industry Orally Disintegrating Tablets; US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, 2008.
- 61) フリバス<sup>®</sup>錠インタビューフォーム (旭化成ファーマ (株))
- 62) Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 13, 123–133.
- 63) Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *Scientific World Journal.* 2010, 10, 434-456.
- 64) Sugano K. Physiology of gastrointestinal tract and other administration sites in humans and animals: In Biopharmaceutics Modeling and Simulations Theory, Practice, Methods, and Applications; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2012; 161-205.
- 65) メマリー<sup>®</sup>錠インタビューフォーム (第一三共 (株))
- 66) ユリーフ<sup>®</sup>錠インタビューフォーム (キッセイ薬品工業 (株))
- 67) リリカ<sup>®</sup>錠インタビューフォーム (ファイザー (株))
- 68) ウリトス<sup>®</sup>錠インタビューフォーム (杏林製薬ファーマ (株))
- 69) Carmen LP. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006, 11(5), E449-55
- 70) Martins P, Ferreira CS, Cunha-Melo JR. Esophageal transit time in patients with chagasic megaesophagus: Lack of linear correlation between dysphagia and grade of dilatation. *Medicine.* 2018, 97, e0084.
- 71) Covotta F, Piretta L, Badiali D, Laghi A, Biondi T, Corazziari ES, Panebianco V. Functional Magnetic Resonance in the Evaluation of Oesophageal Motility Disorders. *Gastroenterol Res Pract.* 2011, 2011, 367639.
- 72) Pedersen A, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH. Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion.

*Oral Dis.* 2018, 24, 1399-1416.

- 73) Pedersen A, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary Secretion in Health and Disease. *J. Oral Rehabil.* 2018, 45, 730-746.