

学 位 論 文 題 名

イオン性薬物の小腸刷子縁膜透過における 膜電位の寄与に関する研究

学位論文内容の要旨

生理的条件下でイオン型として存在している薬物の消化管吸収における刷子縁膜透過機構の解明、および薬物構造と膜透過との相関性を明らかにすることを目的として、本研究では、種々の荷電状態を有する薬物（アニオン型、カチオン型、両性イオン型）の小腸刷子縁膜透過に対する膜の電気的性質（膜表面電位、イオン拡散電位）がおよぼす影響について検討した。

また、これまでほとんど検討されたことがなかったヒト小腸における薬物の刷子縁膜透過機構についても検討し、得られた結果を動物実験の結果と比較した。

I イオン性薬物の膜透過における膜電位の寄与

イオン性薬物をそれらが有する置換基の違いにより、アニオン型、カチオン型および両性イオン型に大別し、それぞれの薬物群の小腸刷子縁膜透過におよぼす膜電位の影響を検討した。実験は小腸上皮細胞から刷子縁膜を小胞として単離、精製した“刷子縁膜小胞系”を用い、“迅速ろ過法”による取り込み実験に準拠して行った。この方法は、種々の緩衝液を用いることにより、膜透過実験時のイオン環境や膜電位等を人工的に自由に变化させることができるため、非常に有用である。

本研究では、膜の電気的変化として、イオン拡散電位の誘起と pH 変化にともなう膜表面電荷密度の変化に着目して以下の検討を行った。

1. アニオン型薬物の膜透過における膜電位の寄与

まず最初に、アニオン型薬物として、ジカルボン酸型 β -ラクタム系抗生物質であるセフチブテンを用いて検討した。セフチブテンの酸性条件下での取り込み速度は中性条件下に比べて速く、また、内向きのプロトン勾配存在下では、一過性の小胞内への濃縮を示すオーバーシュート現象が認められた。本実験条件下（pH5.5-7.5）では薬物の解離状態にはほとんど変化はないことから、ここで認められた取り込み速度の変化は膜の性質に起因しているものと考えられる。

そこでまず、イオン拡散電位の寄与を明らかにするために、セフチブテンの取り込みに対するイオノフォアの影響について検討した。その結果、セフチブテンの取り込みはカリウム拡散電位の影響を受けず、また、拡散電位を消失させた voltage clamp の条件下でもプロトン勾配の効果は消失しなかったことから、薬物の取り込み速度の変化はイオン拡散電位に起因するものではないことが示唆された。次に、膜表面電位の影響について検討したところ、セフチブテンの種々 pH における初期取り込み速度は、蛍光プローブである ANS によりモニターされた膜表面電位と良好な相関を示した。しかもその相関関係は、セフチブテンに限らず用いたすべてのアニオン型薬物(セフィキシム、ベンジルペニシリン、s-1006、レンチアプリル)においても同様であった。これらのことより、アニオン型薬物の膜透過は、膜表面電荷密度の影響を大きく受けることが明らかとなった。すなわち、中性領域において膜表面電荷が相対的に負に傾くことにより静電的反発が強くなるため、アニオン型薬物の膜透過の障害となるものと考えられる。

2. カチオン型薬物の膜透過における膜電位の寄与

次に、カチオン型薬物について同様の検討を行った。チラミン、トリプタミン、ベンジルオキシトリプタミンはそれぞれ異なる脂溶性を有するカチオン型薬物である。これら薬物の取り込みは、pH 変化による違いは認められなかったものの、外向きのプロトン勾配に依存した取り込みを示した。一方、プロトン勾配によるトリプタミンの取り込み速度の変化は voltage clamp の条件下では消失し、さらに、トリプタミンの初期取り込み速度は内部負のカリウム拡散電位の増大に比例して大きくなったことから、カチオン型薬物の膜透過にはイオン拡散電位が大きく寄与していることが明らかとなった。

次に、これらカチオン型薬物の膜電位依存的な取り込みの構造特異性を明らかにする目的で、トリプタミンの刷子縁膜小胞への取り込みと脂質のみから成るリポソームへの結合それぞれに対する薬物共存時の阻害効果を検討した。その結果、トリプタミンの取り込みは、三級アミン体であるグラミンにより競合的な阻害を受け、また、リポソームへの結合もカチオン型であるベンジルオキシトリプトファンにより競合的な阻害を受けた。一方、両性イオン型であるトリプトファンやアニオン型であるインドール酢酸ではトリプタミンの取り込みは影響を受けなかった。これらのことより、カチオン型薬物においては、膜表面への結合(吸着)段階における共通構造の認識課程が、これら薬物の膜透過に大きく影響していることが明らかとなった。

3. 両性イオン型薬物の膜透過における膜電位の寄与

生理的 pH において常にイオン型を呈しているアミノ-β-クラタム系抗生物質であるアンピシリンやセフラジン、アミノ酸であるトリプトファン等の取り込みはイオン拡散電位変化および膜

表面電荷密度変化いずれも影響を受けなかった。一方、本実験条件下においてカチオン型か両性イオン型のいずれかの分子種で存在するエノキサシン ($pK_a(\text{COOH}) = 6.2$) では、カチオン型分子量の多い酸性条件下でカチオン型薬物と同様の拡散電位依存的取り込みを示した。これに対して、両性イオン型分子種の多い中性条件下では膜電位の影響をほとんど受けなかった。これらのことより両性イオン型薬物の小腸刷子縁膜透過は、ほとんどが両性イオン型分子種で存在する場合には膜表面電位密度、イオン拡散電位いずれの影響も受けないことが明らかとなった。

II 薬物の小腸刷子縁膜透過における動物種差

セフラジンなどのアミノセファロスポリンやセフチブテンなどの一部の β -ラクタム系抗生物質の膜透過機構については、プロトン-ジペプチド共輸送系の関与が報告がされている。しかし、アミノセファロスポリンの輸送機構については用いた動物により結果に違いが認められることから、これら薬物の膜透過に動物種差があることも考えられる。従って、本研究においてはこの点を明らかにするために、これまでほとんど検討されたことがないヒト小腸より調製した膜標品を用いて膜透過実験を行い、ラット、家兎での結果と比較した。

その結果、ヒト、およびラットではプロトン勾配依存性の著しい透過促進はセフチブテンでのみ認められたのに対し、家兎ではセフチブテン、セフラジンいずれにおいても認められた。また、取り込み阻害実験での構造特異性においてもヒトとラットではよく類似し、家兎では異なっていたことから、これら薬物の膜透過において動物種差があることが明らかとなった。

結論として、イオン性薬物をアニオン型、カチオン型、両性イオン型に大別し、これらの小腸刷子縁膜透過に対する膜電位の影響を検討した結果、これまで担体輸送系を仮定して説明づけられてきたイオン性薬物の膜透過機構を、薬物と生体膜との物理化学的な相互作用の面から説明づけることできた。この機構は特殊な輸送経路に限定されないため、薬物の吸収性や臓器分布特性を予測するうえで重要な基礎的知見となり得る。また、これまで一部の薬物の膜透過機構について認められた報告間での違いを、動物種差により説明づけることができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚

申請者は、生理的条件下でイオン型として存在している薬物の消化管吸収における膜透過機構の解明、および薬物構造と膜透過との相関性を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。これらイオン性薬物の吸収機構を明らかにすることは、これまで薬物の吸収性の指標とされてきた“pH分配仮説”に従わない吸収性を示す多くの化合物の吸収像を、普遍的に考察するうえにおいて極めて重要である。また、吸収性を高めた経口投与剤開発のための基礎的知見を得るなど、薬剤学的にも重要な寄与をなし得る。しかしながら、イオン性薬物の吸収機構およびそれらの膜透過における構造相関については未だ明らかにされていない。従って申請者は、薬物の消化管吸収を大きく左右する小腸刷子縁膜透過におけるこれらイオン性薬物に共通した機構および構造相関について、動物種差も含め、2編にわたり論述している。第I編：イオン性薬物の膜透過における膜電位の寄与……本編ではイオン性薬物をそれらが有する置換基の違いによりアニオン型、カチオン型および両性イオン型の3つに分類し、それぞれの薬物群の小腸刷子縁膜透過におよぼす膜電位の影響を検討している。アニオン型薬物の場合、刷子縁膜透過速度は膜表面電位により大きく影響を受けた。すなわち、膜表面電荷密度が相対的に負に傾く中性領域において薬物と膜との静電的反発が強まり、アニオン型薬物の膜透過速度は著しく減少することを明らかにした。一方、カチオン型薬物の場合、その膜透過はイオン拡散電位に依存し、かつ、これらカチオン型薬物の膜表面への結合（吸着）における共通構造の認識過程がこれら薬物の膜透過に大きく影響することを明らかにした。これらに対して、両性イオン型薬物の膜透過は、そのほとんどが両性イオン型分子種で存在する場合には膜電位の影響を受けず、アニオン型薬物において認められた膜表面電位依存性や、カチオン型薬物において認められた拡散電位依存性は、同一分子内に対イオンが存在することにより消失することを示唆している。これらの検討は、これまで担体輸送系を仮定して説明づけられてきたイオン性薬物の膜透過機構を、特殊な輸送系に限定されない機構として薬物と生体膜との相互作用の面から考察したものであり、薬物の吸収性や臓器分布特性を予測するうえで重要な基礎的知見となり得る。第II編：薬物の小腸刷子縁膜透過における動

物種差……本編では、代表的イオン性薬物である β -クララム系抗生物質を用いて、これまでこれら薬物の小腸刷子縁膜透過機構に関して認められた報告間の違いを動物種差により説明づけた。本検討においては同時に、これまでほとんど検討されたことのなかったヒト小腸より調製した膜標品を用い、ラットや家兎との異同性についても明らかにしている。

以上のことから本学位論文は、イオン性薬物の小腸刷子縁膜透過機構における構造相関を明らかにするとともに、経口剤開発のための分子設計においても重要な基礎的知見を与えるものであり、博士（薬学）を受けるに充分値すると認めた。