

学 位 論 文 題 名

Drug Metabolizing Activity of Cerebral
Tissue:7-Ethoxycoumarin Deethylation
Activity in the Perfused Rat Brain

(脳組織の薬物代謝活性：ラット灌流脳における
7-エトキシクマリンの脱エチル活性)

学位論文内容の要旨

灌流臓器は生きている動物に近いモデルとして、多くの代謝過程の研究に用いられている。臓器の構造が保存されているので、これが臓器全体の代謝能力に及ぼす影響を解析できる。そこでは細胞膜を介して物質の動きが制限されるので、均一な系とは異なり、酵素と基質が自由に接近し反応することが出来ない。生体においては基質は動脈から供給され、酵素は臓器の細胞内部に固定されている。更に、反応に必要な補酵素は細胞内部で別の代謝系を通して供給されるので、一般に *in vitro* の代謝活性を *in vivo* に外挿するには注意が必要である。

<第一章>

我々の研究室では、ラット灌流脳の手法を開発しており、本研究では、これを薬物代謝の研究に適用した。まず、実験条件の設定を行った。灌流液に用いた人工血液 FC-43 エマルジョンを、酸素キャリアーを含まないリンゲル液に変えても脳波が消失するにも関わらず、7-エトキシクマリン (7-EC) 脱エチル活性は影響を受けなかった。このことは酸素供給が 7-EC 脱エチル活性に影響しないことを示し、興味深い結果であった。

<第二章>

次に灌流脳の 7-EC 脱エチル活性が、既報の脳マイクロソーム画分を用いて測定した活性よりも、100 倍以上高いことを見出した。この結果は、脳マイクロソームの活性が、一般的に低く見積もられていることを示し、従来より指摘されている、酵素の失活、脳マイクロソームの収率の低さが要因と考えられる。従って、灌流脳はサンプルの調整段階における活性の低下が起こらず、*in vivo* における高い活性の保持につながっていると考えられる。

次に、脳での結果を肝臓のデータと比較した。肝臓では、脳の場合と逆に、マイクロソームの活性が、灌流肝の活性の約 10 倍大きい。これは、灌流肝では、肝小葉の動脈側から静脈側にかけて、薬物、酸素、グルコースの分布に大きな勾配があり、酵素活性が最大レベルに達していないということを示す。この事実は、脳組織では上記の物質の勾配が小さいこと、あるいは、物質の勾配が酵素の配置と一致していることを示唆する。この薬物の勾配は、肝臓の方が脳よりも代謝活性が高く、更に薬物の排出システムが発達している（胆管からの排

出) ことを反映していると思われる。脳における薬物の勾配と酵素の配置の一致に関し、脳血管関門 (BBB) の存在が興味深い。脂溶性の高い薬物に対し、BBB は本来無効であるが、ここに薬物代謝酵素が局在し、脂溶性を低くすることで、代謝的関門を形成するという考えがある。この代謝的関門が効果的に働けば、臓器全体の活性は大きくなるであろう。どの効果が優位かは不明であるが、これらの結果は臓器の構造が活性に大きく影響を及ぼすことを示唆する。脳は肝臓よりも、酵素量が少なくて済むような、効果的な構造を持っているのかもしれない。

<第三章>

7-EC 脱エチル反応は、シトクロム P-450 (P-450) で触媒される。この酵素の、誘導剤と阻害剤の効果は肝臓と同じであった。したがって、肝臓でこの反応に関わっているサブタイプ 1A が脳でも機能していることを示す。また、このような複数の薬物の相互作用を研究する上で、灌流脳は有用な実験系であると考えられる。

<第四章>

灌流脳で 7-EC が代謝される過程には、種々の生化学反応が含まれている。7-EC はまず、BBB を通り脳組織に入り、さらに細胞に入って、そこに固定された酵素によって代謝を受け、代謝産物とともに排出される。7-EC の代謝の時間経過 (Time course) を分析した結果、7-EC と代謝産物である 7-ヒドロキシクマリン (7-HC) の流出液中の比が一定であった。よって、代謝産物の組織内への滞留は小さいと結論した。また、7-HC はさらに、抱合反応を受けるが、7-HC の生成量が低い範囲では、全代謝産物中の抱合体の割合は一定であった。代謝産物が滞留しないならば、この割合は、抱合/脱抱合のバランスで決まるので、抱合反応が平衡に近いと考えられる。次に BBB を介した輸送の過程が、7-HC の流出液への生成に影響を与えるかどうかを調べる目的で、飽和マンニトール液を同時流入させたところ、BBB の Evans-Blue-BSA の透過は増加したが、7-HC 生成速度に変化を与えなかった。従って BBB を介しての受動輸送は、この場合律速過程になっていないと考えられる。

灌流液中の酸素濃度とグルコース濃度を変化させる実験を行った。第一章で、酸素のキャリアーを抜いても、7-HC の生成速度は変化しなかったが、更に、その 20% にまで、酸素濃度を下げても、やはり生成速度に影響を与えないことが示された。このことは、酸素代謝と 7-EC 脱エチル反応、または、薬物トランスポート系が互いに影響しないということを示している。反応機構から考えると、酸素が薬物動態に影響を与える箇所は数多くあるので、これは意外な結果であった。一方、グルコース濃度は、7-HC の生成速度に大きく影響した。これは、特に NADPH の供給過程に関与するものと推測される。また、グルコースが関与する基礎的な代謝過程が薬物代謝過程を支えており、これを正常に保つことが、灌流脳を薬物動態の研究に用いるのに、最も重要な点であることが示唆される。

<結語>

灌流脳は生きた動物脳と同様な幾つかの特性を持つ。： (1) 調整段階での修飾が小さいので、代謝レベルが正常である。(2) 臓器の構造が保持されている。(3) 多数の生化学的過程の相互作用が存在する。従って、(1) 他のプレパレーションと比較して活性が高く、(2) 連続した生化学反応の個々の解析が可能である。しかし、あまりにも多数の生化学的

過程が関与した場合は、解析が困難であり、この場合、*in vitro* での解析を有効に利用すべきであろう。今回、我々が得た脳における薬物代謝活性の *in vivo* と *in vitro* の差は、特定酵素活性の *in vitro* 測定のみでは、臓器全体の活性を示す上で不十分であることを示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

Drug Metabolizing Activity of Cerebral Tissue:7-Ethoxycoumarin Deethylation Activity in the Perfused Rat Brain

(脳組織の薬物代謝活性：ラット灌流脳における
7-エトキシクマリンの脱エチル活性)

脳組織における薬物代謝活性は不明な点が多い。本論文は、ラット灌流脳の手法を用い、これを薬物代謝の研究に適用した。まず、実験条件の設定を行った。灌流液に用いた人工血液 FC-43 エマルジョンを、酸素キャリアーを含まないリンゲル液に変えても脳波が消失するにも関わらず、7-エトキシクマリン (7-EC) 脱エチル活性は影響を受けなかった。このことは酸素供給が 7-EC 脱エチル活性に影響しないことを示し、興味深い結果であった。

次に灌流脳の 7-EC 脱エチル活性が、既報の脳マイクロソーム画分を用いて測定した活性よりも、100 倍以上高いことを見出した。この結果は、脳マイクロソームの活性が、一般的に低く見積もられていることを示し、従来より指摘されている、酵素の失活、脳マイクロソームの収率の低さが要因と考えられる。従って、灌流脳はサンプルの調整段階における活性の低下が起こらず、in vivo における高い活性の保持につながっていると結論した。

このあと脳での結果を肝臓のデータと比較したところ、肝臓では脳の場合と逆に、マイクロソームの活性が、灌流肝の活性の約 10 倍大きいことが示された。これは、灌流肝では、肝小葉の動脈側から静脈側にかけて、薬物、酸素、グルコースの分布に大きな勾配があり、酵素活性が最大レベルに達していないということを示す。この事実は、脳組織では上記の物質の勾配が小さいこと、あるいは、物質の勾配が酵素の配置と一致していることを示唆する。この薬物の勾配は、肝臓の方が脳よりも代謝活性が高く、更に薬物の排出システムが発達している (胆管からの排出) ことを反映していると思われる。脳における薬物の勾配と酵素の配置の一致に関し、脳血管関門 (BBB) の存在が興味深い。脂溶性の高い薬物に対し、BBB は本来無効であるが、ここに薬物代謝酵素が局在し、脂溶性を低くすることで、代謝的関門

を形成するという考えがある。この代謝的関門が効果的に働けば、臓器全体の活性は大きくなるであろう。どの効果が優位かは不明であるが、これらの結果は臓器の構造が活性に大きく影響を及ぼすことを示唆した。脳は肝臓よりも、酵素量が少なくて済むような、効果的な構造を持っている可能性が示唆された。

7-EC 脱エチル反応は、シトクロム P-450 (P-450) で触媒される。この酵素の、誘導剤と阻害剤の効果は肝臓と同じであった。したがって、肝臓でこの反応に関わっているサブタイプ 1A が脳でも機能していることを示す。また、このような複数の薬物の相互作用を研究する上で、灌流脳は有用な実験系である。灌流脳で 7-EC が代謝される過程には、種々の生化学反応が含まれている。7-EC はまず、BBB を通り脳組織に入り、さらに細胞に入って、そこに固定された酵素によって代謝を受け、代謝産物とともに排出される。7-EC の代謝の時間経過 (Time course) を分析した結果、7-EC と代謝産物である 7-ハイドロキシクマリン (7-HC) の流出液中の比が一定であった。よって、代謝産物の組織内への滞留は小さいと結論した。また、7-HC はさらに、抱合反応を受けるが、7-HC の生成量が低い範囲では、全代謝産物中の抱合体の割合は一定であった。代謝産物が滞留しないならば、この割合は、抱合/脱抱合のバランスで決まるので、抱合反応が平衡に近いと考えられる。次に BBB を介した輸送の過程が、7-HC の流出液への生成に影響を与えるかどうかを調べる目的で、飽和マンニトール液を同時流入させたところ、BBB の Evans-Blue-BSA の透過は増加したが、7-HC 生成速度に変化を与えなかった。従って BBB を介しての受動輸送は、この場合律速過程になっていないと結論した。

灌流液中の酸素濃度とグルコース濃度を変化させる実験を行った。第一章で、酸素のキャリアーを抜いても、7-HC の生成速度は変化しなかったが、更に、その 20% にまで、酸素濃度を下げても、やはり生成速度に影響を与えないことが示された。このことは、酸素代謝と 7-EC 脱エチル反応、または、薬物トランスポート系が互いに影響しないということを示している。反応機構から考えると、酸素が薬物動態に影響を与える箇所は数多くあるので、これは意外な結果であった。一方、グルコース濃度は、7-HC の生成速度に大きく影響した。これは、特に NADPH の供給過程に関与するものと推測される。また、グルコースが関与する基礎的な代謝過程が薬物代謝過程を支えており、これを正常に保つことが、灌流脳を薬物動態の研究に用いるのに、最も重要な点であることが示唆された。

以上、著者は、脳における薬物代謝活性について、肝臓に匹敵する新知見を得たものであり、薬物生化学に対して、脳の役割に関する研究の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。