

氏名	みず うち ひろし 水 内 博
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 632 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	H <sup>+</sup> /三級アミン逆輸送体を介したカチオン性薬物の消化管吸収機構に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 橋 田 充 教 授 川 寄 敏 祐

### 論 文 内 容 の 要 旨

カチオン性薬物の多くは生理的 pH において解離型として存在するにもかかわらず、消化管での吸収は良好であることが知られている。その消化管吸収機構に関しては、pH 分配仮説に基づく単純拡散、輸送体(トランスポータ)の関与等が論じられているが詳細は未だ明らかではない。近年、新薬開発においてコンビナトリアルケミストリーやハイスループットスクリーニングが導入され、候補化合物の大規模な検索が行われている。その過程においては薬理活性のみならず、薬物の体内動態、特に消化管吸収性を考慮した合成展開が必要と考えられるが、輸送体を介した吸収機構については情報が乏しいのが現状である。

そこで著者は、カチオン性薬物の消化管吸収機構の解明を目的とし、培養腸上皮細胞 Caco-2 および小腸刷子縁膜小胞を用いて、カチオン性薬物であるジフェンヒドラミンならびにプロカインアミドの膜輸送特性について詳細に検討を行い、これらカチオン性薬物の小腸における輸送機構に関して以下の新知見を得た。

#### I. Caco-2 細胞におけるジフェンヒドラミンの輸送特性

ディッシュ上に培養した Caco-2 細胞へのジフェンヒドラミンの取り込みは速やかであり、初期取り込みに温度依存性・基質飽和性が認められた。取り込みは細胞外 pH によって影響を受け、pH の低下に伴って取り込み量が減少した。取り込みに及ぼす他の抗ヒスタミン剤の影響について検討を加えたところ、クロルフェニラミンによってのみ取り込み阻害が認められた。一方、生体アミンや神経伝達物質による影響は認められなかった。さらに、クロルフェニラミンをあらかじめ Caco-2 細胞に負荷することによって、その後のジフェンヒドラミンの取り込みが促進される *trans-stimulation* 効果が認められた。これらの結果より、ジフェンヒドラミンの Caco-2 細胞への取り込みに輸送体が関与していることが示唆された。

次に、多孔性フィルター上に培養した Caco-2 細胞を用いて、ジフェンヒドラミンの経細胞輸送特性について検討を行った。頂側膜側から側底膜側への経細胞輸送に飽和性が認められ、頂側膜側 pH を低下させることによって、側底膜側への輸送量は減少した。輸送の方向性について検討した結果、側底膜側から頂側膜側への分泌方向優位な輸送が認められ、さらに、細胞内に負荷したジフェンヒドラミンの頂側膜側への方向選択的な *efflux* が認められた。これらの結果より、Caco-2 細胞はジフェンヒドラミンに対して分泌方向優位な経細胞輸送特性を示すものと考えられた。しかし、P-糖蛋白質はジフェンヒドラミンの輸送に関与していないことが、P-糖蛋白質安定発現細胞等を用いた検討より明らかとなった。また、頂側膜と同様の性質を有する pH に依存した輸送体が側底膜にも存在することが示唆された。

#### II. 三級アミン輸送体の基質認識特性

ジフェンヒドラミンの Caco-2 細胞への取り込みに及ぼす腎有機カチオン輸送系基質の影響について検討した結果、プロカインアミドによってのみ濃度依存的な取り込み阻害が認められた。プロカインアミド、クロルフェニラミンおよびジフェンヒドラミンはいずれも三級アミンであり、N-ジメチルもしくは N-ジエチル構造を有する点で化学構造上類似していた。そこで次に、種々三級アミン化合物がジフェンヒドラミン取り込みに及ぼす影響について検討したところ、N-ジメチルもしくは N-ジエチル構造を有する三級アミン化合物によって取り込みは阻害されたが、四級アミン化合物や、N-ジエタノー

ル構造を有する三級アミンによる影響は認められなかった。また、取り込み阻害を示したトリエチルアミンおよびジメチルアミノエチルクロライドによって、ジフェンヒドラミン取り込みに対する *trans-stimulation* 効果が観察された。さらに、Caco-2 細胞内 pH に及ぼす種々三級アミン化合物の影響について検討したところ、三級アミン付加による細胞内 pH 変化量とジフェンヒドラミン取り込みの阻害強度の間に相関はなく、三級アミンによる取り込み阻害や促進が物理化学的要因のみでは説明できないことが示された。

以上の結果より、Caco-2 細胞に存在するジフェンヒドラミン輸送体は、N-ジメチルもしくは N-ジエチル構造を有する三級アミンを特異的に認識する輸送体であることが示唆された。

### Ⅲ. 三級アミン輸送体を介したプロカインアミドの小腸刷子縁膜小胞への取り込み機構

三級アミン輸送体の駆動力を明らかにするため、家兎小腸より調製した刷子縁膜小胞を用い、プロカインアミドの輸送機構について検討を行った。その結果、外向きプロトン勾配存在下で、プロカインアミドの小胞内への取り込みが一過性に促進されるオーバーシュート現象が観察され、プロトノフォア FCCP によってその促進が減弱されることが明らかとなった。また、N-ジメチルもしくは N-ジエチル構造を有する三級アミンによって取り込みは阻害を受け、さらに、取り込み阻害を示した三級アミンによるプロカインアミド取り込みの *trans-stimulation* 効果が認められた。従って、この輸送体は逆向きプロトン勾配を駆動力とし、N-ジメチルもしくは N-ジエチル構造を有する三級アミンを特異的に認識する、 $H^+$ /三級アミン逆輸送体であることが明らかとなった。

以上、著者は小腸における  $H^+$ /三級アミン逆輸送体の存在を初めて明らかにし、カチオン性薬物の消化管吸収機構について新知見を得た。この輸送体は消化管管腔内の pH を考慮すると、生体にとって異物である三級アミンの血液から管腔中への分泌に関与するものと考えられたが、経口投与後の濃度勾配に従った薬物輸送にも関与している可能性が示唆された。本研究成果は、消化管における薬物輸送機構を理解するための重要な基礎的知見であるとともに、カチオン性薬物の分子設計や製剤開発に新たな情報を提供するものとする。

## 論文審査の結果の要旨

カチオン性薬物の多くは生理的 pH において解離型として存在するにも関わらず、消化管での吸収は良好であることが知られている。その消化管吸収機構については、pH 分配仮説に基づく単純拡散、輸送体の関与等が論じられているが詳細は未だ明らかではない。一方、近年の新薬開発過程においては、薬理活性のみならず薬物の体内動態、特に消化管吸収性を考慮した合成展開が必要と考えられるが、輸送体を介した吸収機構については情報が乏しいのが現状である。申請者は、カチオン性薬物の消化管吸収機構の解明を目的とし、培養腸上皮細胞 Caco-2 および小腸刷子縁膜小胞を用いて、カチオン性薬物であるジフェンヒドラミンならびにプロカインアミドの膜輸送特性について精査し、これらカチオン性薬物の小腸における輸送機構について以下の研究成果を得た。

Caco-2 細胞へのジフェンヒドラミンの初期取り込みには、温度依存性、基質飽和性が認められた。また、取り込みは pH 依存性を示し、細胞外 pH の低下に伴って取り込み減少が示された。クロルフェニラミンによって取り込みが阻害されたが、既知有機カチオン輸送系の基質や生体アミンによる影響は認められなかった。さらに、ジフェンヒドラミン取り込みに対するクロルフェニラミンによる *trans-stimulation* 効果が認められた。多礼性フィルターを用いた検討から、側底膜における輸送に関しても頂側膜と同様な輸送特性を示すことが判明した。以上の結果より、Caco-2 細胞におけるジフェンヒドラミン輸送には、頂側膜および側底膜に存在する PH 依介性の輸送体が関与していることが示唆された。

次に、申請者はジフェンヒドラミン輸送体の基質認識特性について検討し、N,N-ジメチルもしくは N,N-ジエチル構造を有する三級アミン化合物によって取り込みが阻害されることを明らかにした。さらにこれら三級アミン化合物によって、ジフェンヒドラミン取り込みに対する *trans-stimulation* 効果が示されたことから、ジフェンヒドラミン輸送体は、N,N-ジメチルもしくは N,N-ジエチル構造を有する三級アミンを特異的に認識する輸送体であることを明らかにした。

さらに、三級アミン輸送体の駆動力を明らかにするため、家兎小腸より調製した刷子縁膜小胞を用い、プロカインアミドの輸送機構について検討を加えた。その結果、外向きプロトン勾配存在下で、プロカインアミドの小胞内への取り込みが一過性に促進されるオーバーシュート現象が観察されること、プロトノフォア FCCP によってその促進が減弱されること、

また N,N-ジメチルもしくは N,N-ジエチル構造を有する三級アミンは、プロカインアミド取り込みに対する *trans-stimulation* 効果を示すことが明らかとなった。従って、この輸送体は逆向きプロトン勾配を駆動力とし、N,N-ジメチルもしくは N,N-ジエチル構造を有する三級アミンを特異的に認識する、新規 H<sup>+</sup>/三級アミン逆輸送体であることが結論された。

以上の研究成果は、小腸における H<sup>+</sup>/三級アミン逆輸送体の存在を初めて明らかにしたものであり、消化管における薬物輸送機構の解明に貢献するところ大であり、薬物動態研究の発展に寄与するものと考ええる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成12年6月28日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。