

薬
82 函
1-3

水溶性薬物の消化管吸収に及ぼす
脂肪酸類の影響に関する研究

乾 賢 一

水溶性薬物の消化管吸収に及ぼす
脂肪酸類の影響に関する研究

乾 賢 一

目 次

総 論 の 部	
緒 言	3
第 I 編 薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響	4
第 1 章 短鎖脂肪酸の影響	5
第 1 節 モデル薬物のラット小腸からの吸収	5
第 2 節 短鎖脂肪酸の吸収	5
第 3 節 薬物の吸収に及ぼす影響	7
第 4 節 薬物の吸収と水の移動との関連性	9
第 5 節 静注薬物の腸管腔内への移行性に及ぼす影響	13
第 6 節 考 察	14
第 2 章 中鎖脂肪酸の影響	15
第 1 節 薬物の吸収に及ぼす影響	15
第 2 節 静注薬物の腸管腔内への移行性に及ぼす影響	19
第 3 節 考 察	20
第 3 章 長鎖脂肪酸の影響	20
第 1 節 薬物の吸収に及ぼす影響	20
第 2 節 Procainamide に対する効果	22
第 3 節 2-Allyloxy-4-chloro-N-(2-diethylaminoethyl) benzamide hydrochloride に対する効果	23
第 4 節 考 察	24
第 II 編 薬物の消化管吸収に及ぼす食餌性脂質の影響	26
第 1 章 脂肪酸類胃内前投与の影響	26
第 1 節 薬物の吸収に及ぼす影響	26

第2節	Bromsulphophthalein に対する効果	28
第3節	L-Tryptophan に対する効果	33
第4節	考 察	39
第2章	無脂肪食投与の影響	40
第1節	薬物の吸収に及ぼす影響	40
第2節	小腸粘膜脂質組成の変動	42
第3節	考 察	44
第Ⅲ編	薬物の脂質黒膜透過に及ぼす脂肪酸類の影響	45
第1章	脂質黒膜実験法の検討	45
第1節	膜形成脂質及び脂質黒膜の形成法	45
第2節	Egg Phosphatidylcholine 及び臓器脂質より形成した脂質黒膜の諸性質	47
第2章	薬物の脂質黒膜透過性	48
第1節	各種の脂質より形成した脂質黒膜の薬物透過性	49
第2節	Cholesterol 及び Cholesterol Acetate 添加の影響	51
第3節	考 察	53
第3章	酸性薬物の脂質黒膜透過に及ぼす脂肪酸類の影響	54
第1節	Egg Phosphatidylcholine より形成した脂質黒膜における効果	54
第2節	小腸脂質より形成した脂質黒膜における効果	57
第3節	考 察	60
結 論		61
謝 辞		63
実 験 の 部		
第Ⅰ編	実 験 の 部	64
第Ⅱ編	実 験 の 部	72
第Ⅲ編	実 験 の 部	78
引 用 文 献		86

総論の部

緒言

脂質は、生体のエネルギー源あるいは生体膜の構築成分として生命活動に重要な役割を果たしており、これらの研究は生命科学の中心的課題の一つとして今日まで飛躍的な発展を遂げてきた。更に、生体内における脂質の機能や存在様式が解明され、又その物理化学的、生物化学的特性が明確になるにつれて、臨床的に有用な脂肪輸液の開発¹⁾や、薬物の体内動態の制御を目的とした drug delivery system への脂質の応用^{2),3),4),5)}など、医薬品製剤に関する報告も認められるようになった。リン脂質、トリグリセリドを初め多くの脂質に共通する基本的構成成分は脂肪酸で、特に不飽和脂肪酸は、生体内における脂質の構造や機能の保持に密接な関連を有している。これらの脂肪酸は、一部は体内で生合成されるが、主として食餌中の脂肪に由来するものである。

摂取された脂肪の消化、吸収過程については、近年各方面より多角的な検討が行われ詳細な機構の解明がなされている。^{6),7),8)}一方、医薬品を経口投与した際に、食餌性脂質は胃滞留時間、腸運動、胆汁分泌などの生理的因子や、主薬の崩壊、溶解などの物理化学的因子に影響を及ぼし、薬物の bioavailability に変化を来すことが報告されつつある。⁹⁾ griseofulvin^{10),11)}などの難溶性薬物、heparin¹²⁾などの高分子化合物については、高脂肪食の併用やエマルション剤形で投与することによって高い血中濃度が得られること、リポソームに包含された insulin では単独投与に比し血糖降下作用が增強されること、¹³⁾又、 α -tocopherol では脂肪油との併用によって体内分布様式が変化すること¹⁴⁾など種々の検討がなされている。しかし、一般の薬物の吸収動態に及ぼす脂肪酸類の影響については、これまで系統的な検討がほとんど行われておらず、究明すべき点が多く残されている。

そこで著者は、種々の吸収性を示す水溶性薬物を選び、ラット消化管を使用した in situ の実験法、及び再構成膜として脂質黒膜法を用い、薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響、更にその作用機構について検討を加え、生物薬剤学的見地から薬物の消化管吸収特性の解明に必要な基礎的知見を得ることができた。

以下、得られた結果を三編にわたり論述する。

第 I 編 薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響

脂肪の消化，吸収に関する研究は19世紀中頃に始まり，多くの論争，幾多の知見が積み重ねられ，現在では消化，吸収の詳細な機序が明らかにされている。

経口的に摂取された脂肪は，消化管においてホルモン，^{15), 16)} 酵素，¹⁷⁾ 内因性界面活性剤^{18), 19)} の作用により消化，吸収される。^{6), 7), 8)} 長鎖脂肪 (C₁₄~C₁₈) は腸管内で膵リパーゼ及び胆汁酸塩の作用を受けると共に，脂肪酸—モノグリセリド—胆汁酸からなる混合ミセルを形成し，小腸上皮細胞内に取り込まれる。脂肪酸，モノグリセリドは小腸粘膜内で中性脂肪に再合成され，次いでクロミクロンを形成してリンパ系に移行する。これに対し，短鎖²⁰⁾ (C₆以下) 及び中鎖脂肪^{21), 22)} (C₈~C₁₂) は，長鎖脂肪に比べて易溶解性，拡散性，低融点などの性質を有しており，容易に消化，吸収され粘膜リパーゼで加水分解後，主として遊離脂肪酸の形で門脈系に移行することが知られている。一方，脂肪や脂肪酸の消化器系機能に対する効果は，胆汁及び膵液の分泌促進の他に，胃滞留時間の遅延，²³⁾ 胃酸分泌の抑制，²⁴⁾ 腸運動の抑制，^{25), 26)} 血流の促進²⁵⁾ などに関する報告がみられる。

脂肪の消化，吸収に起因する消化管内の物理化学的，生化学的諸現象は，経口投与された薬物の消化管吸収に対しても影響を及ぼすことが予測され，医薬品の有効性，安全性に関連して種々の検討がなされている。内因性界面活性剤である胆汁酸塩については，脂溶性ビタミン²⁷⁾ や，難溶性薬物²⁸⁾ の吸収促進，更に，Gibaldiら，²⁹⁾ Kakemiら³⁰⁾ によって水溶性薬物の吸収に対しても多様な効果を及ぼすことが明らかにされている。又，高脂肪食との併用あるいは脂肪エマルジョン剤形として投与することにより，griseofulvin，^{10), 11), 31)} indoxole，^{32), 33)} sulfonamide，³¹⁾ dicumarol³¹⁾ などの難溶性薬物や heparin，¹²⁾ insulin³⁴⁾ などの高分子化合物の bioavailability が改善されるという知見も認められる。しかし，水溶性薬物の消化管吸収に対する脂肪酸類の影響については，bioavailability を正しく評価する上で重要であるにもかかわらず，未だ系統的に究明しようと試みた報告は少ない。

Table 1 Fatty Acids

Carbon number	Name	Structure
C ₃	Propionic acid	CH ₃ CH ₂ COOH
C ₄	Butyric acid	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
C ₆	Caproic acid	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
C ₈	Caprylic acid	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
C ₁₂	Lauric acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
C ₁₈	Stearic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
C ₁₈	Oleic acid	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
C ₁₈	Linoleic acid	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
C ₁₈	Linolenic acid	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH

本編では、脂肪酸の物理化学的性状や吸収特性を考慮して Table 1 に示す短鎖、中鎖、長鎖脂肪酸を用い、in situ 小腸連続灌流法によって、水溶性モデル薬物の吸収に及ぼす影響について検討した結果を論述する。

第1章 短鎖脂肪酸の影響

短鎖脂肪酸 ($C_2 \sim C_6$) は、反芻動物の前胃³⁵⁾において炭水化物の嫌氣的醗酵に伴い多量に産生され、エネルギー供給源として重要な役割を果たしている。更に、ヒトを含む哺乳動物の大腸^{36), 37), 38)}では同様に炭水化物の細菌醗酵により生ずること、小腸上部³⁹⁾においても腸内細菌の異常繁殖時に存在することなどが報告されているが、腸管における短鎖脂肪酸の栄養学的、生理学的意義については不明の点が多い。

消化管における短鎖脂肪酸の効果としては、Davenport,⁴⁰⁾ Flemström,ら⁴¹⁾ Venturaら⁴²⁾によって胃粘膜のイオン透過性変化、Parsons,⁴³⁾ Csákyら⁴⁴⁾によって小腸からの水、Na の吸収促進、Wallら⁴⁵⁾によって小腸の electrical potential difference の増大などに関して報告されている。一方、薬物の腸管吸収に及ぼす短鎖脂肪酸の影響については、Levine⁴⁶⁾が難吸収性薬物、Hardy⁴⁷⁾が高分子化合物について検討しているにとどまっている。本章においては、propionic acid, butyric acid, caproic acid 及びエステルとして methyl butyrate について検討した結果を述べる。

第1節 モデル薬物のラット小腸からの吸収

一般に、薬物の吸収量を測定する方法としては、(1)薬物投与後の薬理効果による方法、(2)薬物投与後の血中濃度、尿中排泄量などを求め、薬動力学的手法により吸収量を算出する方法、(3)投与、又は吸収部位における残存量により吸収を測定する方法などに大別される。(1)(2)の場合、特に本研究のように脂肪酸類を添加した時、臓器への分布、代謝過程への影響も予想され、多くの複雑な因子が関与してくるので吸収過程のみを検討するには不適當である。そこで著者は、(3)に従い in vivo に近い状態で種々の実験を設定しうる in situ 連続灌流法を主に用いることにした。

実験動物は Wistar 系雄性ラットを使用し、小腸からの吸収実験は既に報告されている Kakemi ら⁴⁸⁾の方法を準用した。又、試料溶液は通常 pH 6.5 リン酸緩衝液を用いて調製した。

モデル薬物は、それ自体の吸収が既に検討されているものの中から、生理的 pH 領域における解離状態や吸収の度合を考慮して選択した。第 I 編、第 II 編において使用したモデル薬物の1時間の吸収率とその初濃度を Table 2 に示す。

第2節 短鎖脂肪酸の吸収

短鎖脂肪酸の腸管吸収については Smyth と Taylor⁴⁹⁾の研究に始まり、現在までに動物^{20), 50), 51)} ヒト^{52), 53)}について幾つかの報告がある。一般にその吸収は速やかであるが、飽和現象、Na 濃度依存性が認められるなど単なる脂溶性だけでは説明され得ないとする説が支配的である。本研究においても、実験条件の設定や薬物吸収に対する脂肪酸の効果を解析する上で、脂肪酸の吸収に関する知見が必要であるが in situ 灌流法による報告はほとんど見当たらない。

そこで、まず短鎖脂肪酸の腸管吸収について基礎的な検討を行った。Fig. 1 は 50 mM butyric acid の腸管吸収の時間的経過を示したものである。灌流液からの消失はきわめて速く、見掛上一次速度式

Table 2 Absorption of Drugs from Rat Small Intestine at pH 6.5

Drug	Concentration(mM)	% absorbed in 60 minutes
Phenol red	0.1	5.2
Sulfanilic acid	0.1	7.5
Sulfaguanidine	0.1	8.6
Procainamide	0.1	9.6
Metoclopramide	0.1	24.4
Bromsulphothalein	0.1	24.5
P. A. M.	1.0	25.7 ^{a)}
D-Tryptophan	5.0	29.1 ^{a)}
A.C.D.B.	1.0	43.1
Quinine	1.0	43.2
Sulfisoxazole	0.1	43.5
Sulfanilamide	0.1	43.6
Methylene blue	0.1	55.2
Caffeine	1.0	62.7
L-Tryptophan	5.0	64.0
p-Aminobenzoic acid	0.1	69.2
Imipramine	1.0	69.7
Sulfadimethoxine	0.1	72.5
Salicylic acid	2.0	79.9

P.A.M.; pyridine-2-aldoxime methiodide

A.C.D.B.; 2-allyloxy-4-chloro-N-(2-diethylaminoethyl)benzamide hydrochloride

a) calculated from % absorbed in 30 minutes

に近い系であることが確認された。

更に butyric acid の濃度依存性について検討するために初濃度を変えて吸収実験を行い、その結果を Table 3 に示した。これから明らかのように、低濃度になるにつれ butyric acid の吸収は漸次増大する傾向がみられた。又、Na-free の mannitol 溶液では吸収が低下し、Na 依存性の吸収機構も一部関与していることが推察される。

これらの結果に基づき、吸収実験中の脂肪酸の濃度変化を小さくするために、灌流時間は主に初期30分間とし、薬物吸収に及ぼす影響について検討を加えた。

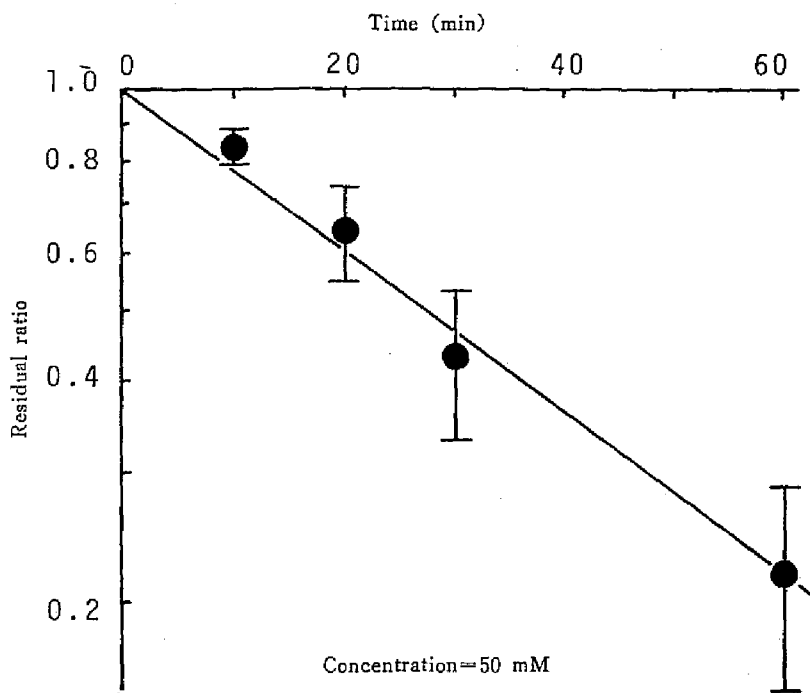


Fig. 1 Time Course of the Intestinal Absorption of Butyric Acid

Table 3 Intestinal Absorption of Butyric Acid

	% absorbed in 30 minutes
Butyric acid 10 mM	75.9±7.9
30 mM	69.1±5.8
50 mM	57.3±4.7
50 mM ^{a)}	40.7±4.0

a) Na-free mannitol solution

第3節 薬物の吸収に及ぼす影響

Table 4 は先に示した各種薬物の腸管吸収に及ぼす butyric acid の影響を示したものであるが, sulfisoxazole, salicylic acid など pH 6.5で負電荷を有する薬物では butyric acid の併用により吸収抑制が, 又 caffeine, sulfanilamide など非解離型で存在する薬物及び metoclopramide, quinine, 2-allyloxy-4-chloro-N-(2-diethylaminoethyl)benzamide hydrochloride (A.C.D.B. と略す) など正電荷を有する薬物では吸収促進が認められた。そこで短鎖脂肪酸共存時に, これら薬物の吸収過程に介在する支配的因子を明らかにするために, イオン解離状態の異なる sulfisoxazole, caffeine, metoclopramide の3種の薬物を用い, 以下詳細に検討した。

Table 4 Effect of Butyric Acid on the Absorption of Drugs from Rat Small Intestine

Drug	% absorbed in 30 minutes	
	Control	50 mM Butyric acid
Sulfanilic acid	2.9±1.3	1.1±1.0
Sulfisoxazole	30.7±2.5	20.6±4.3
Sulfadimethoxine	58.5±3.6	51.7±7.6
Salicylic acid	66.3±4.9	58.3±2.1
Sulfaguanidine	3.6±0.9	2.2±0.4
Sulfanilamide	28.6±2.7	35.5±3.9
Caffeine	46.9±5.6	55.4±7.4
Metoclopramide	12.2±2.8	26.0±3.2
P.A.M.	13.8±1.6	15.1±1.1
Quinine	25.8±1.9	46.0±3.4
A.C.D.B.	28.8±2.0	44.4±0.6
Imipramine	56.6±3.7	67.3±6.4

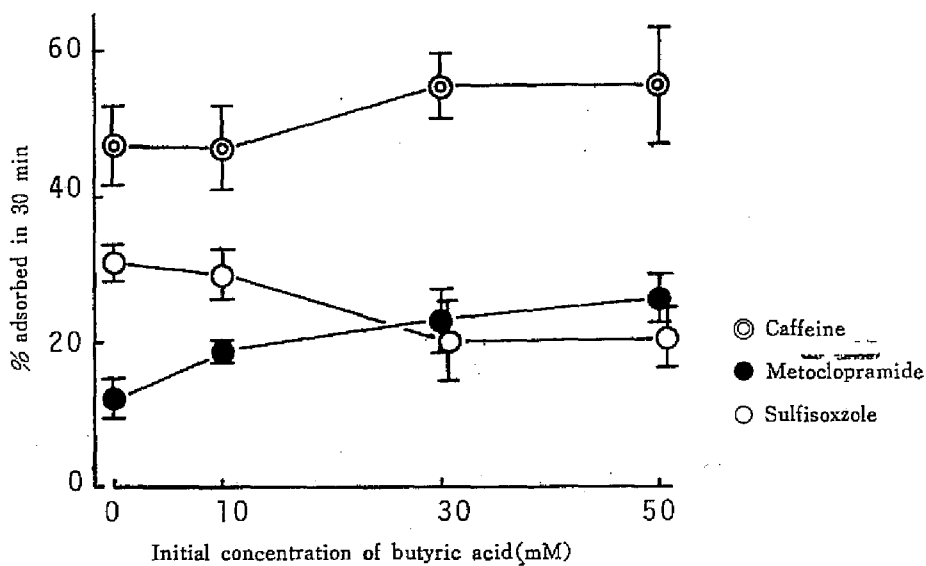


Fig. 2 Effect of Butyric Acid Concentration on the Intestinal Absorption of Drugs

Fig. 2 は、各種濃度の butyric acid 併用による影響を示したものである。いずれの薬物でも butyric acid 10 mM では効果が弱く、高濃度になるにつれて強い効果が認められた。

薬物吸収に及ぼす脂肪酸の効果としては、(1)腸管腔内における脂肪酸と薬物との相互作用などによる物理化学的效果、(2)小腸の吸収膜面に対する効果、(3)小腸に対する生理的效果などが考えられる。

そこで、まず溶液中での薬物-脂肪酸相互作用を検討するために、chloroform に対する sulfisoxazole, caffeine, metoclopramide の分配係数を測定したところ、脂肪酸共存によって著明な変化は認められなかった。又 in vitro 反転腸管への初期取り込みにおける butyric acid の影響についても検討したが、ほとんど影響は認められなかった。従って metoclopramide の吸収の促進, sulfisoxazole の吸収の抑制は、小腸粘膜への分配過程において、単に薬物と脂肪酸とのイオン対形成などの相互作用による吸収膜面への親和性増大、あるいは膜面における薬物と脂肪酸との置換によるものではないと理解される。

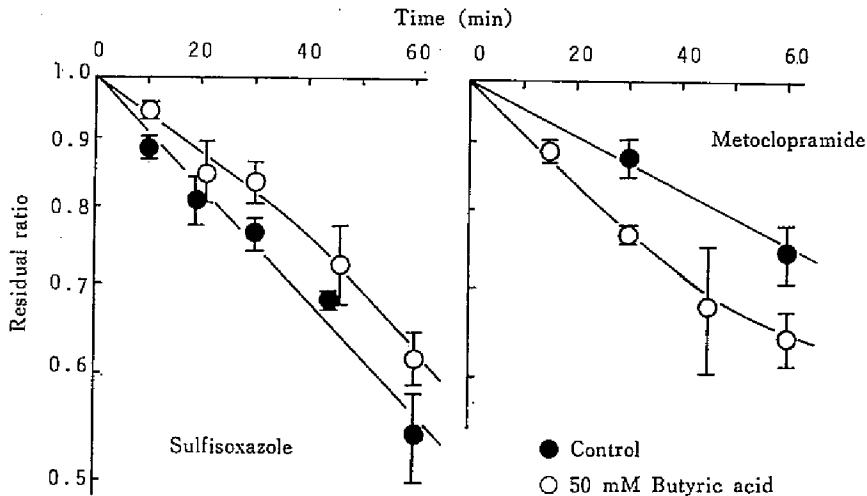


Fig. 3 Time Course of the Intestinal Absorption of Drugs with or without Butyric Acid

次に、脂肪酸の効果が吸収のどの段階に関与しているのかを知る目的で、sulfisoxazole, metoclopramide について吸収の時間的経過を検討した。各時間毎の薬物残存率の対数値が Fig. 3 に示されている。対照では灌流液からの薬物消失が一次速度式に従うのに対して、butyric acid 共存時の薬物吸収はいずれの場合も単純な一次速度式に従わず、butyric acid による吸収抑制、促進効果は、時間と共に弱くなり対照に近づく曲線が得られた。又、小腸を 50 mM butyric acid により30分間前処置した後、薬物のみを含む試料溶液で吸収実験を行ったところ、薬物の吸収には顕著な影響が認められなかった。従って、前節で指摘した如く、butyric acid の吸収速度が速いことを加味すると、薬物吸収に対する効果は腸管腔内及び吸収膜面に、ある程度以上の butyric acid の存在することが必須であると考えられる。

第4節 薬物の吸収と水の移動との関連性

短鎖脂肪酸の生理的效果として、小腸からの水の吸収促進が予測される。Parsons⁴³⁾は acetic acid

により結腸で水の吸収促進が起ること, Csáky, Espositoら^{40,50}は ethyl acetate により空腸で水, Na, glucose の吸収が促進されること, 又最近 Schmittら⁵³はヒトの空腸において, butyric acidの吸収に伴い水, Na の吸収が促進されることを報告している。

そこで, 各種濃度の butyric acid 併用時の水の吸収量を灌流液の容積変化より測定した。結果は Fig. 4 に示す如く, butyric acid 単独, 薬物共存いずれの場合も, 高濃度の butyric acid により水

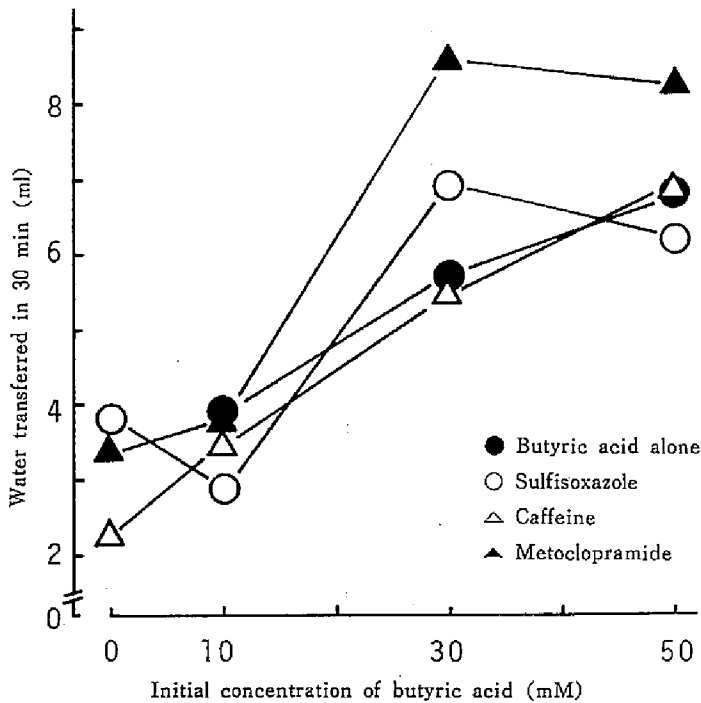


Fig. 4 Effect of Butyric Acid Concentration on the Intestinal Absorption of Water

Table 5 Effect of Short-Chain Fatty Acids on the Intestinal Absorption of Water

Fatty acid	Water transferred in 30 minutes (ml)
Control	3.2±1.6
Propionic acid	10.4±2.8
Butyric acid	7.2±2.0
Caproic acid	9.2±2.0
Methyl butyrate	5.6±1.6
Butyric acid (pretreatment)	0.8±1.6
Butyric acid (Na-free mannitol solution)	1.2±1.2

Concentration of fatty acids=50 mM

の吸収促進が認められた。更に、Table 5 から明らかなように、他の脂肪酸及びエステルである methyl butyrate によっても同様に水の吸収促進効果が認められた。しかし、Na-free の溶液において butyric acid は水の吸収促進効果を示さず、又30分間の butyric acid 溶液前処置後でも水の吸収には影響が認められなかった。なお、灌流実験に用いた脂肪酸溶液の浸透圧変化について検討するために、灌流前及び30分間灌流後の浸透圧を凝固点降下法によって測定したところ、両者には著明な差異が認められず、脂肪酸の吸収に伴い浸透圧は変化しないものと考えられる。

水の移動と薬物吸収の関係については、Kitazawaら⁵⁵⁾によって一定の範囲内で直線関係の成立することが明らかにされている。そこで3種の薬物について propionic acid, butyric acid, caproic acid 及び methyl butyrate 共存時における薬物吸収と水の移動との関係について検索した。Fig. 5 は sulfisoxazole の結果について示したものである。水の移動は、実験開始時と終了時の灌流液の容積比から算出したものであり、この値が1より大きい場合は水が分泌されたこと、1より小さい場合には

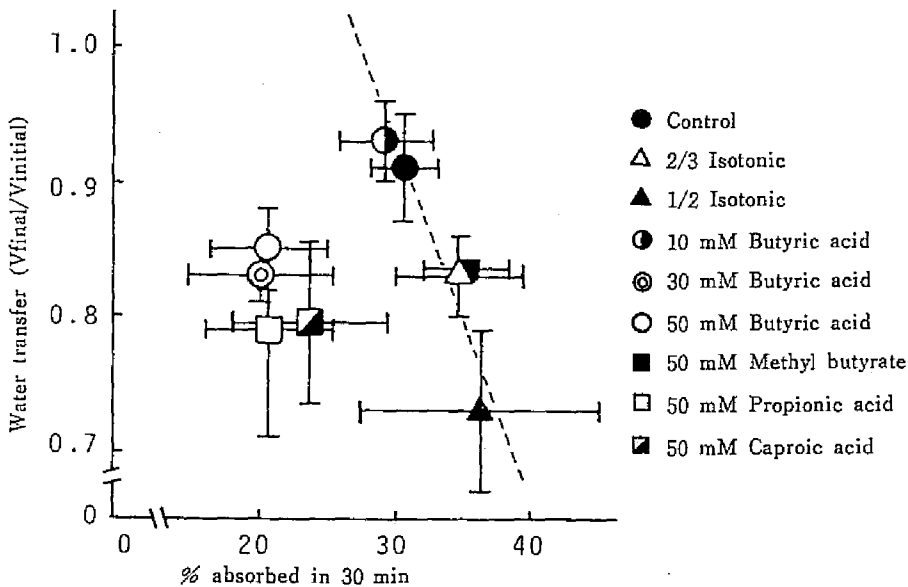


Fig. 5 Relationship between Water Transfer and Sulfisoxazole Absorption with or without Short-Chain Fatty Acids

水が吸収されたことを示している。水の移動効果を表わす回帰直線は、リン酸緩衝液の浸透圧を等張、 $\frac{2}{3}$ 等張、 $\frac{1}{2}$ 等張と変化させ、薬物のみを含む試料溶液を調製して吸収実験を行い、図中に点線で示した。先に述べたように各種脂肪酸共存によって水の吸収促進が起るが、sulfisoxazole では回帰直線から予測されるよりも吸収抑制が認められた。しかし、methyl butyrate の場合は、水の移動効果に従って吸収が促進され、回帰直線とよく符合する結果が得られた。

一方、metoclopramide の場合には、Fig. 6 に示す如く脂肪酸添加によって水の移動効果から予測されるよりも更に吸収が促進され、又、methyl butyrate については、sulfisoxazole の場合と同様に回帰直線上にのる促進効果が認められた。図中には表示しなかったが、緩衝能の小さい Na-free の mannitol 溶液を用いて調製した試料溶液 (pH 6.5) では、Table 5 に示したように 50 mM butyric

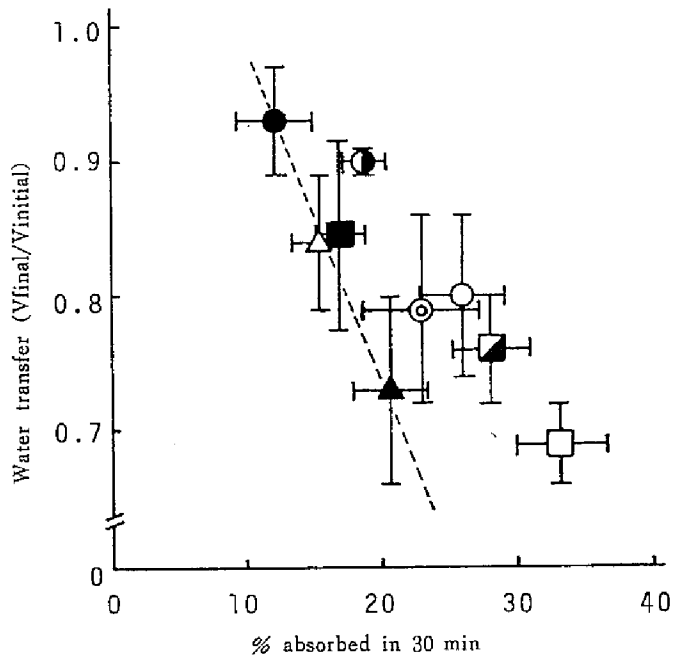


Fig.6 Relationship between Water Transfer and Metoclopramide Absorption with or without Short-Chain Fatty Acids Symbols are the same as in Fig. 5.

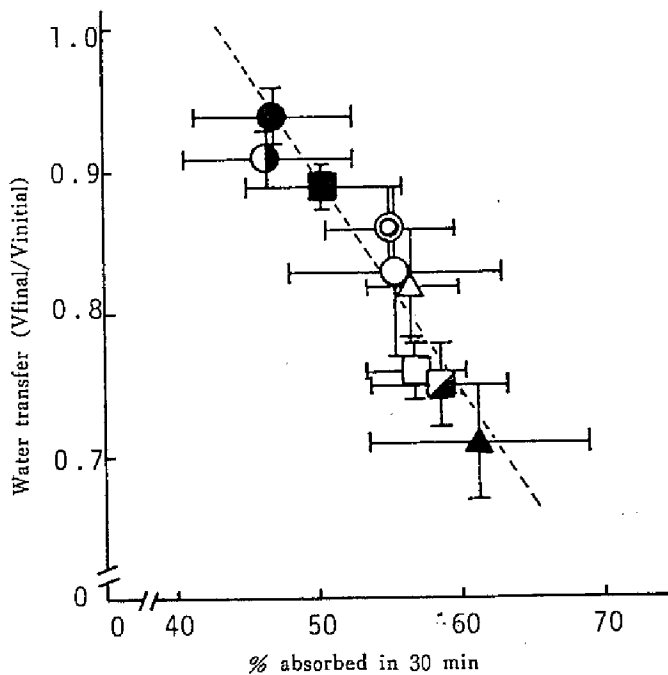


Fig. 7 Relationship between Water Transfer and Caffeine Absorption with or without Short-Chain Fatty Acids Symbols are the same as in Fig. 5.

acid を添加しても水の吸収には促進が見られなかったが、metoclopramide の吸収は顕著に促進された(対照：吸収率 9.5 ± 2.7 、水の移動比 1.03 ± 0.02 、50 mM butyric acid：吸収率 28.6 ± 2.1 、水の移動比 0.98 ± 0.04)。

Fig. 7 は、pH6.5では非解離型で存在する caffeine について示したものであるが、水の移動に相応して吸収が変化し、各種脂肪酸類共存によって回帰直線に従う促進効果が得られた。caffeine に見られる吸収の変化は、脂肪酸による水の移動効果に基づいて説明することができると考えられる。

Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 の結果より、短鎖脂肪酸の効果としては、水の吸収促進による薬物吸収の増加の他に、薬物の解離状態によって吸収促進、抑制効果の存在することが判明した。又、methyl butyrate などの脂肪酸エステルは膜面ではエステル型として存在し、上皮細胞内で脂肪酸に加水分解されることが知られていることより、⁴⁰短鎖脂肪酸による水の吸収促進以外の効果は、主に膜表面に存在する脂肪酸に起因するものと推察される。

第5節 静注薬物の腸管腔内への移行性に及ぼす影響

Dobsonら⁵⁰)は羊の前胃での acetate の吸収に伴い、胃内の HCO_3^- が増し pH が上昇することを報告している。本研究においては主に pH 6.5リン酸緩衝液を使用しており、実験後の脂肪酸灌流液の pH の変動は約 0.2 pH unit の増大が、又緩衝能の小さい mannitol 溶液で調製した場合約 0.7 pH unit の増大が認められた。従って脂肪酸の吸収に伴い小腸粘膜近傍の pH は、相当上昇していると考えられる。薬物吸収に及ぼす短鎖脂肪酸の効果がこのような pH 変化に起因する作用であるか否か、あるいは脂肪酸が吸収膜面に直接作用し、膜の透過性を変化させ生じたものであるか否かを検討するために、薬物静注後、腸管灌流液中に出現する薬物量の測定、いわゆる exsorption 実験を行った。

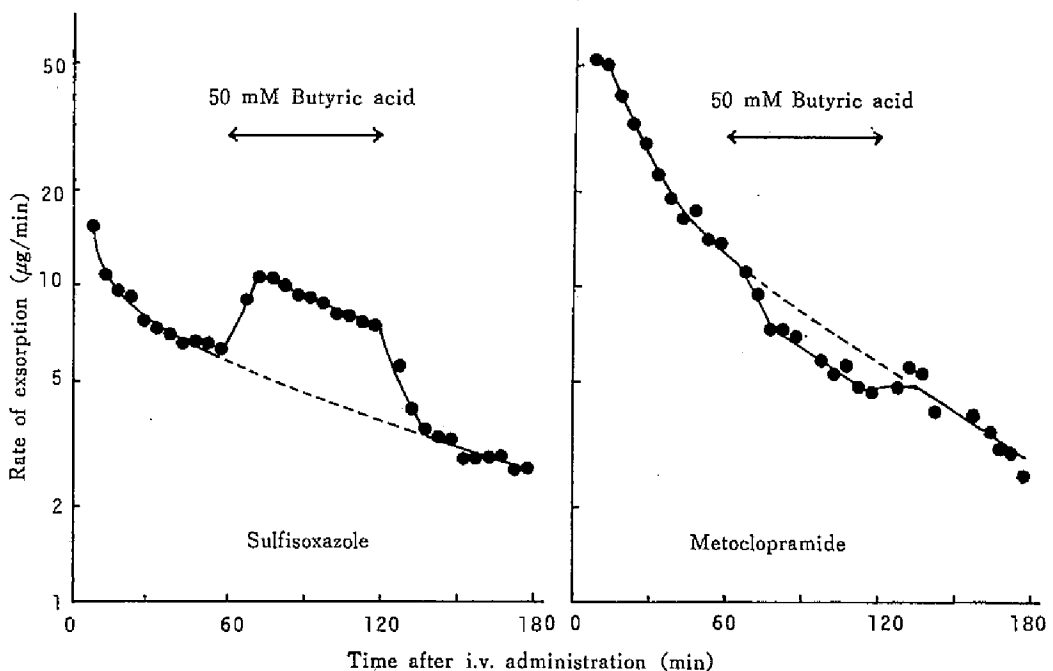


Fig. 8 Effect of Butyric Acid on the Exsorption of Drugs to Rat Small Intestine

sulfisoxazole (30 mg), metoclopramide (8 mg) をラット大腿静脈より静注後、腸管内を一回通過した等張緩衝液、あるいは50 mM butyric acid 溶液中に出てくる薬物を経時的に測定し、その結果を Fig. 8 に示した。これから明らかなように、butyric acid 溶液を流すと吸収抑制された sulfisoxazole では exsorption 速度の増大、又吸収促進された metoclopramide では exsorption 速度の減少が認められ、いずれの効果も butyric acid 溶液から通常の緩衝液に戻すと、exsorption 速度は対照のレベルに回復する可逆的な効果であった。吸収と exsorption における効果が相反することより、butyric acid の効果は膜の透過性変化によるものではないと考えられる。50 mM butyric acid 溶液の代わりに pH 7.5 緩衝液を用いて薬物の exsorption 速度を検討したところ、Fig. 8 と類似の現象を認めた。従って、脂肪酸の吸収に伴う小腸粘膜近傍の pH 上昇によって、血液側と管腔側の非解離型分子の比が、酸性薬物である sulfisoxazole では増加、塩基性薬物である metoclopramide では減少したために exsorption 速度がそれぞれ促進、抑制されたものと考えられる。これらは吸収実験における動向と符合する結果であり、短鎖脂肪酸による水の移動以外の影響は、脂肪酸の吸収に伴う pH の効果によって十分説明され得ることが判明した。

第6節 考 察

水溶性薬物の腸管吸収に及ぼす短鎖脂肪酸の影響について種々の検討を行った。

薬物吸収に及ぼす各種脂肪酸添加の効果は薬物の荷電状態によって異なるが、methyl butyrate はいずれの薬物に対しても吸収を促進すること、又これら脂肪酸類併用時には水の吸収が促進されること、一方薬物の exsorption に対する butyric acid の効果は吸収の場合とは相反することなどが明らかとなった。その結果、薬物吸収に及ぼす脂肪酸の効果は、吸収膜面に対する直接的な透過性変化や溶液中での薬物-脂肪酸相互作用などによるものではなく、脂肪酸の吸収に伴う水の移動、灌流液 pH の増大などの生理的因子に起因することが判明した。Fig. 9 は、Dobsonら⁵⁶⁾及び著者の知見に基づき、妥当と考えられる短鎖脂肪酸の生理的効果を模式的に示したものである。管腔に存在する脂肪酸は2種の経路で非解離型、解離型として吸収され、その結果 pH の増大、水の吸収促進が起る。すなわち、上皮細胞表面において脂肪酸は非解離型として受動拡散により吸収され、それに要す

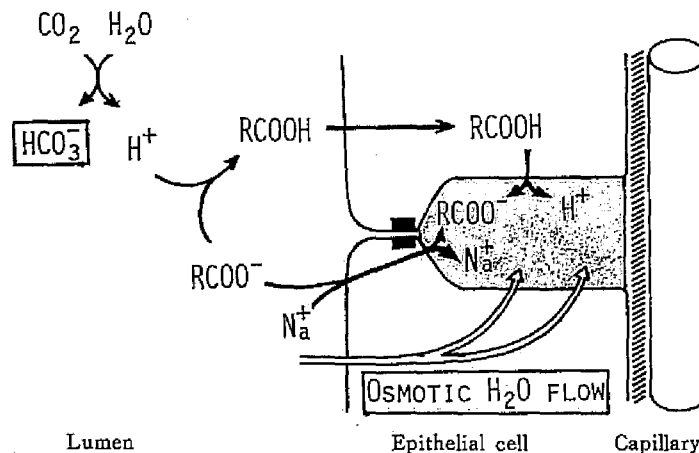


Fig. 9 Schematic Representation of Physiological Action of Short-Chain Fatty Acids in the Intestine

る H^+ を補うため生じた HCO_3^- によって膜近傍の pH が上昇し、塩基性薬物では吸収促進が、酸性薬物では吸収抑制が起り、一方、一部の解離型脂肪酸は能動輸送に類似した系で Na と付随して吸収され、水の移動が促進され、これに伴って薬物の吸収が変化したと考えられる。後者については、Na 無添加の mannitol 溶液では脂肪酸の吸収が減少し、水の移動も認められなかったことから立証された。

第2章 中鎖脂肪酸の影響

中鎖脂肪酸 (C_8-C_{12}) は、ココナツ油など一部の天然油脂構成脂肪酸であるが、中鎖脂肪の生理学的特性とその臨床的应用に関する興味ある知見が多数報告されている。^{21), 22), 57)} 中鎖脂肪の腸管における消化、吸収は、短鎖の場合と同様にきわめてすぐれており、胆汁、膵リパーゼの欠乏状態でも加水分解され吸収されること、一部は加水分解を受けずにトリグリセリドのまま小腸上皮細胞内に取り込まれ得ること、上皮細胞内における転送機序が長鎖脂肪酸とは異なり、大部分遊離脂肪酸として門脈系に移行することなどが明らかにされている。これらの基礎的知見に基づいて、痔、胆汁分泌障害や他の消化器系疾患々々にみられる脂肪吸収不全の治療や栄養改善を目的として、臨床的にも中鎖脂肪の投与が注目され、又その製剤化もなされている。

本章においては、中鎖脂肪酸のうちで最も良く知られている caprylic acid を選び、薬物吸収に対する影響を検討し、短鎖脂肪酸との異同について考察した結果を述べる。

第1節 薬物の吸収に及ぼす影響

caprylic acid は比較的良好に水に溶解し、腸管からの吸収は短鎖脂肪酸と同様にきわめて速やかで、又飽和現象なども認められることが知られている。^{50), 51), 58)} そこで caprylic acid は水溶液として併用し、前章と同様に薬物吸収に及ぼす影響について検索した。

Table 6 は、各種薬物の吸収に対する 30 mM caprylic acid の影響を示したものである。酸性薬物の sulfisoxazole, p-aminobenzoic acid では有意な影響は見られず、中性薬物の caffeine, 塩基性薬物である metoclopramide, A.C.D.B. では吸収促進効果が認められた。更に sulfisoxazole, caffeine, metoclopramide を選び caprylic acid の濃度依存性について検討し、その結果を Fig. 10 に示す。

Table 6 Effect of Caprylic Acid on the Intestinal Absorption of Drugs

Drug	% absorbed in 30 minutes	
	Control	30 mM Caprylic acid
Sulfisoxazole	28.8 ± 2.8	32.7 ± 0.8
p-Aminobenzoic acid	58.3 ± 5.7	56.5 ± 3.9
Sulfaguanidine	5.2 ± 0.1	3.8 ± 0.6
Caffeine	46.9 ± 5.2	59.2 ± 2.3
Metoclopramide	16.1 ± 3.3	31.6 ± 2.1
A.C.D.B.	34.2 ± 3.6	51.4 ± 5.1

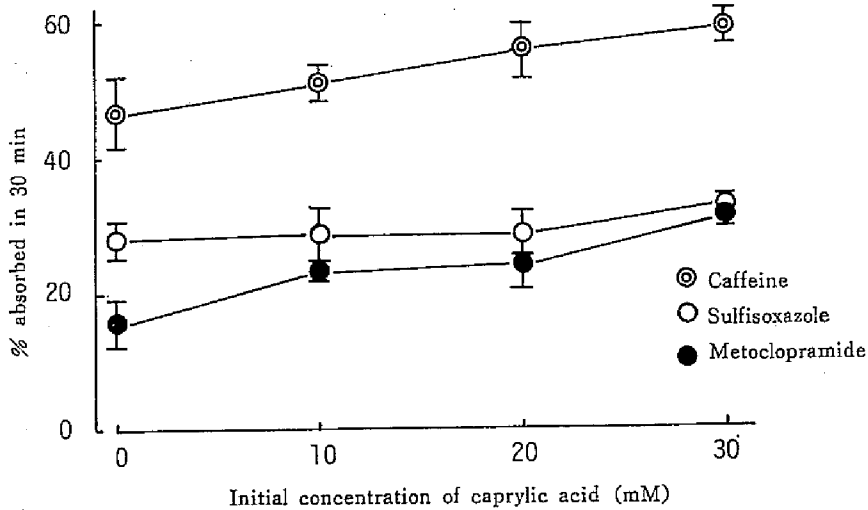


Fig. 10 Effect of Caprylic Acid Concentration on the Intestinal Absorption of Drugs

sulfisoxazole を除いて, caffeine, metoclopramide では脂肪酸濃度が高くなるにつれて大きな吸収促進効果が得られた。caprylic acid の溶解度の関係上, 更に高濃度については検討することができなかった。

中鎖脂肪酸は, 短鎖脂肪酸に比べ疎水基が大きいいため界面活性作用を有すると予想されるが, Campbellら⁵⁹⁾の報告によると, その c.m.c. は sodium caprylate 360 mM, sodium decanoate 98 mM, sodium laurate 25 mM である。従って本研究で使用した濃度範囲では, 薬物のミセルとの相互作用は無視し得るものと考えられる。

caprylic acid の小腸に対する生理的作用として, 短鎖脂肪酸と同様に水の吸収促進及び灌流実験後の灌流液 pH の上昇する傾向が認められた。Fig. 11 は水の吸収量を示したものである。caprylic acid 濃度に従い水の吸収量が漸次増加しているが, caprylic acid では butyric acid の場合に比し

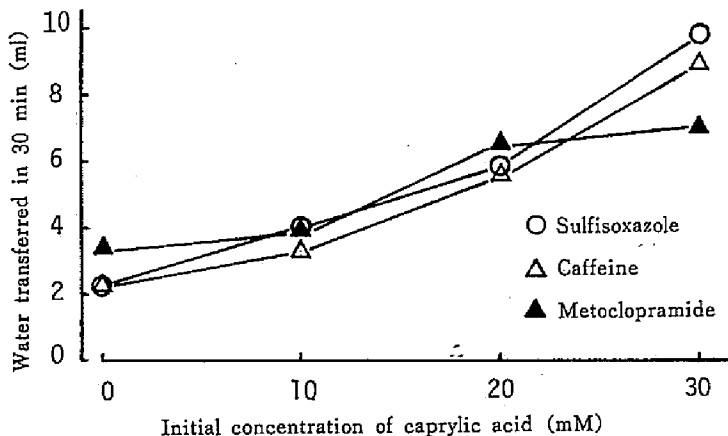


Fig. 11 Effect of Caprylic Acid Concentration on the Intestinal Absorption of Water

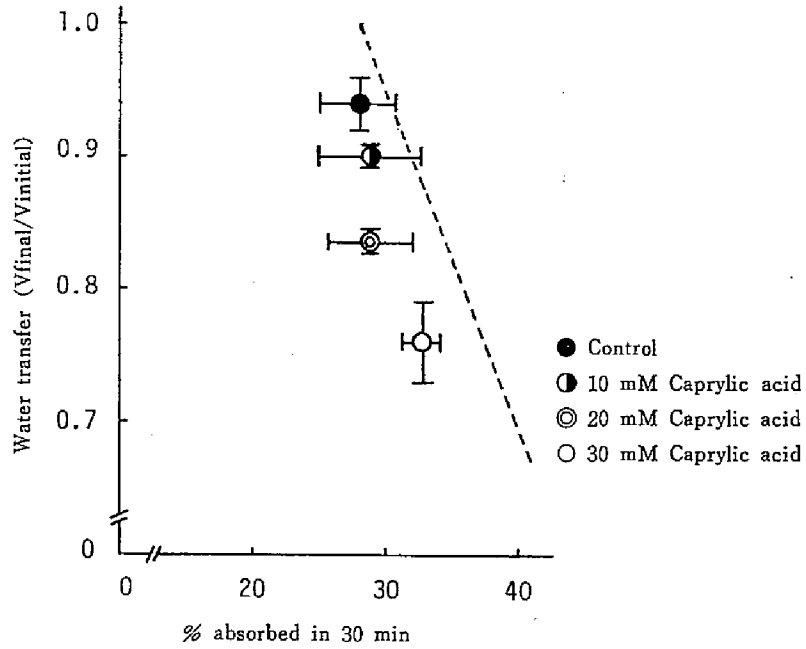


Fig. 12 Relationship between Water Transfer and Sulfisoxazole Absorption with or without Caprylic Acid

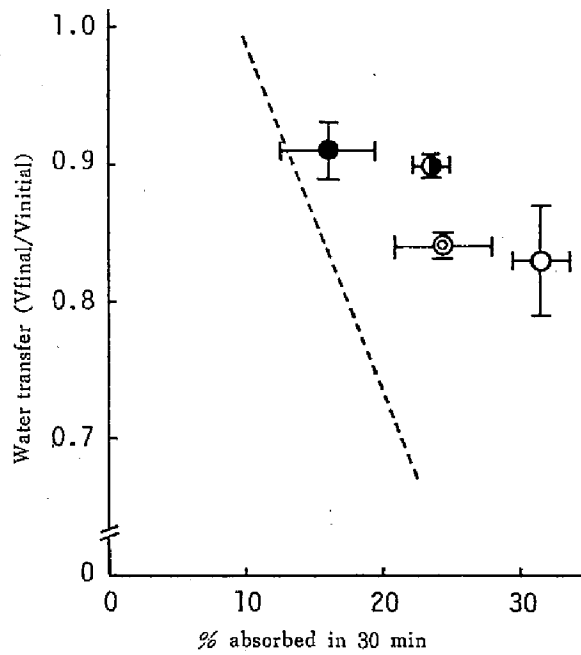


Fig. 13 Relationship between Water Transfer and Metoclopramide Absorption with or without Caprylic Acid
Symbols are the same as in Fig. 12.

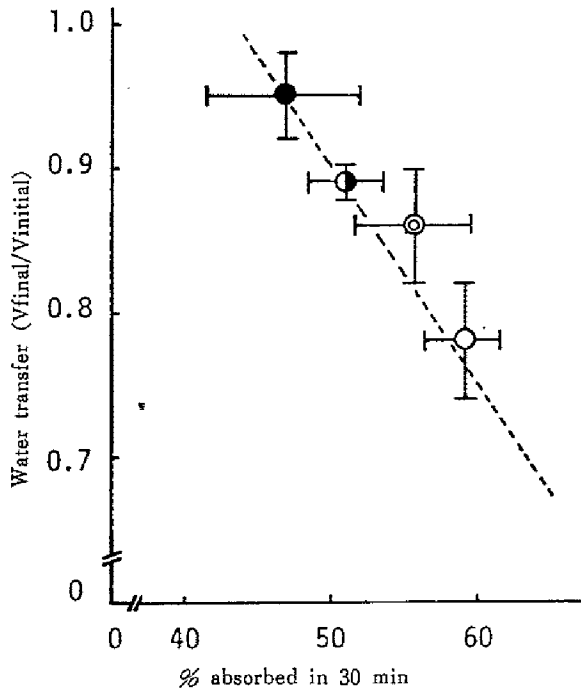


Fig. 14 Relationship between Water Transfer and Caffeine Absorption with or without Caprylic Acid
Symbols are the same as in Fig. 12.

幾分水の吸収量が大きいと考えられる。又、30分間の caprylic acid の吸収は、Salleeら、⁵⁰⁾ Naupertら⁵¹⁾の報告と同様に短鎖脂肪酸に比べ若干大きな値が得られた (20 mM caprylic acid の吸収率、 77.9 ± 1.7)。

次に水の移動と薬物吸収との関係について検討を加えた。Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14 はそれぞれ sulfisoxazole, metoclopramide, caffeine について示したものである。点線は前章で述べた如く、薬物吸収に対する水の移動効果を示す回帰直線である。caprylic acid の併用時には、sulfisoxazoleでは水の移動効果から予測されるよりも吸収が抑制され、metoclopramide では吸収が促進され、一方、caffeine ではほぼ回帰直線に従う効果が認められた。sulfisoxazole の吸収は短鎖脂肪酸共存によって抑制されたが、caprylic acid では水の移動から予想されるよりも抑制されたものの顕著な効果ではなく、いずれの脂肪酸濃度においても対照と同程度の吸収率が得られた。

そこで caprylic acid の吸収膜面に対する透過性変化などの作用を吟味する目的で、30 mM caprylic acid で小腸を30分間前処置後、sulfisoxazole の吸収について検討した。しかし、緩衝液のみで前処置した場合に比べ吸収率及び水の移動比に有意な変化は認められなかった。

界面活性剤は小腸粘膜に作用し、その透過性を変化させることは周知の事実であるが、反転腸管を界面活性剤溶液でインキュベートした時、粘膜側溶液中のタンパク量は対照に比べ増大することが報告されている。⁶⁰⁾そこで更に、caprylic acid による小腸粘膜への直接作用を定量的に検討するために、30 mM caprylic acid 溶液で灌流した後、回収液中に出現するタンパク量を測定し、緩衝液の場合のそれと比較したが有意な差異は認められなかった (対照： 10.5 ± 3.3 , caprylic acid： 9.5 ± 0.3)。

従って本実験条件では、caprylic acid の吸収膜面に対する作用の寄与は少ないものと考えられる。

以上の結果より、caprylic acid 共存時に見られる薬物吸収の変化は、短鎖脂肪酸の場合と同様に水の吸収促進及び灌流液 pH の上昇に起因する効果であると推察される。

第2節 静注薬物の腸管腔内への移行性及び影響

薬物吸収に及ぼす caprylic acid の効果を更に究明するために、次に exsorption の実験を行った。Fig. 15は sulfisoxazole, metoclopramide を静注後、腸管内を一回通過した灌流液中に出現する薬物量を経時的に測定し、その結果を示したものである。caprylic acid 溶液を流すと、吸収には顕著な影響が認められなかった sulfisoxazole では、exsorption 速度が増大し、又吸収促進された metoclopramide では exsorption 速度が減少した。更に、これらの変化は caprylic acid を除くと対照

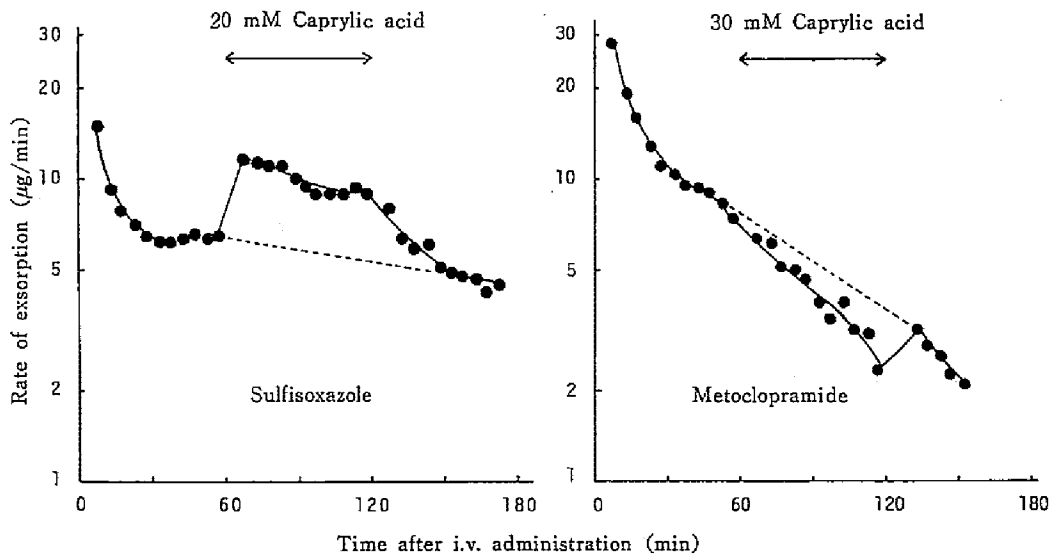


Fig. 15 Effect of Caprylic Acid on the Exsorption of Drugs to Rat Small Intestine

のレベルに回復する可逆的な効果であった。exsorption 速度が増大する要因の一つに、脂肪酸の吸収に伴う血中脂肪酸の増加によって、血漿タンパク結合した薬物の置換が生じ、非結合型薬物濃度が増大することが考えられる。しかし、脂肪酸の分布容量は大きく、血中消失半減期が非常に速いこと⁶¹⁾、⁶²⁾及び薬物タンパク結合の置換を起し得る血中脂肪酸濃度は 2 mM 以上であるという Rudman⁶³⁾の知見を考慮すると、血中脂肪酸の exsorption への影響は少ないものと思われる。又、別の要因として、caprylic acid による小腸粘膜透過性変化の可能性もあるが、前処置によって薬物吸収に変化が認められなかったこと、灌流液中に出現するタンパク量は、脂肪酸添加によって影響されなかったこと、吸収と exsorption の実験結果が相反する薬物も存在したこと、などより薬物の吸収に対してこの寄与の少ないことが示唆される。

従って、exsorption に見る caprylic acid の効果は、短鎖脂肪酸の場合に指摘した如く、脂肪酸の吸収に伴う小腸粘膜近傍の pH 上昇によって、酸性薬物である sulfisoxazole では exsorption 速度の増大、塩基性薬物である metoclopramide では減少が生じたものと推察される。

第3節 考 察

中鎖脂肪酸として caprylic acid を選び、薬物吸収に及ぼす影響について検討した結果、酸性薬物である sulfisoxazole の吸収は著明な変化を示さなかったが、中性薬物の caffeine、塩基性薬物の metoclopramide などでは吸収の促進を認めた。水の吸収量の測定、前処置、灌流液中のタンパク量の測定、exsorption 実験結果などに基づき、caprylic acid の効果は、小腸の吸収膜面に対する透過性変化などの作用に起因するのではなく、短鎖脂肪酸類の場合とほぼ同様に、水の移動、pH 変化などの生理的機作によって薬物吸収に影響を与えることが判明した。

第3章 長鎖脂肪酸の影響

長鎖脂肪酸は、腸管内で膵リパーゼ及び胆汁酸の作用を受けると共に、脂肪酸—モノグリセリド—胆汁酸から成る混合ミセルを形成し、小腸上部から脂肪酸、モノグリセリドのみが上皮細胞内に吸収される。

薬物吸収に及ぼす胆汁酸塩の影響については、既に Gibaldiら²⁹⁾ Kakemiら³⁰⁾によって詳細に検討されているが、脂肪摂取時に腸管腔内で生ずる脂肪酸やモノグリセリド並びに分泌される胆汁酸塩等の挙動と関連して、薬物吸収を考察した研究は数少ない。Levy らは lauric acid, oleic acid が金魚の secobarbital の吸収を促進するが、⁶⁴⁾ラット腸管からの薬物吸収には影響しないことを、⁶⁵⁾Feldmanら⁶⁶⁾は sodium taurodeoxycholate による反転腸管の salicylate に対する透過性増大効果が、脂肪分解産物の添加によって減少することを報告している。

本章においては、種々の脂肪酸類を sodium taurocholate で可溶化し、薬物吸収に及ぼすそれらの影響、並びに関与する支配的因子を究明するために種々の検討を行った。

第1節 薬物の吸収に及ぼす影響

物理化学的性質の異なる各種薬物の腸管吸収に対して、sodium taurocholate 単独、あるいは、

Table 7 Effect of Sodium Taurocholate (STC) and Oleic Acid (OA) on the Intestinal Absorption of Drugs

Drug	P.C. ^{a)}	Control	20 mM STC	20 mM STC +6 mM OA
Procainamide	0.04	9.6±1.5	15.8±2.0	15.7±1.8
Metoclopramide	2.8	24.4±2.7	25.7±2.3	23.2±0.9
A.C.D.B.	430	43.1±2.8	42.3±1.4	27.4±2.6
Sulfisoxazole	0.11	43.5±6.0	40.6±6.7 ^{b)}	48.2±8.4 ^{b)}
Sulfanilamide	0.03	43.6±5.0	39.5±3.0	39.4±2.0
p-Aminobenzoic acid	0.03	69.2±5.6	73.1±4.6 ^{b)}	70.9±1.6 ^{b)}
Sulfadimethoxine	11	72.5±4.8	72.6±2.8	61.9±2.9

a) CHCl₃-to-pH 6.5 phosphate buffer partition coefficients

b) concentration of sodium taurocholate=10 mM

oleic acid を sodium taurocholate で可溶化して併用した時の薬物吸収挙動の変化について検討し、その結果を Table 7 に示した。又、各薬物の chloroform に対する分配係数も表中に付記した。難吸収性の procainamide では sodium taurocholate により吸収は促進され、6 mM oleic acid が共存しても同様の効果が認められた。一方、脂溶性の高い A.C.D.B., sulfadimethoxine は対照に比べ sodium taurocholate では顕著な影響は認められなかったが、oleic acid 共存により吸収が抑制された。sulfisoxazole, metoclopramide, sulfanilamide, p-aminobenzoic acid では、これらの添加物によって顕著な効果はなかった。

Ammonら,⁶⁷⁾ Gagarellaら⁶⁸⁾は、hydroxyl 基を有する ricinoleic acid (castor oil の有効成分) などの長鎖脂肪酸によって、腸管からの水の吸収が抑制され、分泌が促進されることを報告している。しかし、本研究の実験条件下では、脂肪酸によって顕著な水の移動効果は認められなかった。

胆汁酸塩に関しては、c.m.c. 以上の濃度においてミセルを形成し、更に脂肪酸やモノグリセリドと共に会合してサイズの大きい混合ミセルを形成すること^{18), 19)} 又、小腸粘膜の透過性を亢進すること^{29), 30)} などが知られている。従って、薬物の吸収過程に関与する oleic acid—sodium taurocholate 系の効果としては(1)小腸の吸収膜面に対する直接作用と、(2)ミセル複合体形成による有効薬物濃度の低下などの因子が考えられる。

そこでまず、6 mM oleic acid—20 mM sodium taurocholate 溶液を用い30分間小腸を前処置した後、薬物吸収実験を行った。その結果を Fig. 16に示す。procainamide では前処置によって吸収促進が認められ、Table 7 に示した共存の場合と同じ効果であった。しかし、A.C.D.B. では共存の場合のような抑制は認められず、脂肪酸可溶化系においては A.C.D.B. のミセル相互作用の可能性が示唆される。

薬物吸収における混合ミセル形成の影響を明確にするために、薬物と sodium taurocholate, oleic

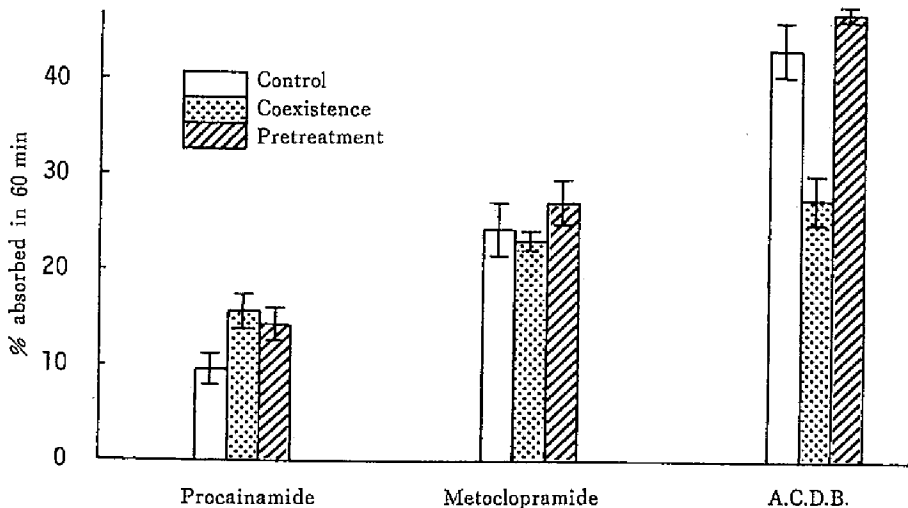


Fig. 16 Effect of Pretreatment with Sodium Taurocholate and Oleic Acid on the Intestinal Absorption of Drugs
 Concentration of oleic acid=6 mM
 Concentration of sodium taurocholate=20 mM

Table 8 Micellar Interactions of Drugs

Drug	Ratio of total to free fraction		
	Control	20 mM STC	20 mM STC+6 mM OA
Procainamide	1.00	1.07	1.35
Metoclopramide	1.00	1.45	2.07
A.C.D.B.	1.00	1.43	3.72
Sulfadimethoxine	1.00	1.13	1.05

acid との相互作用を Ashworthら⁶⁹⁾の分子篩法に準拠して測定した。Table 8 は、薬物のミセル中へ移行する割合を示したものである。これから明らかなように、脂溶性の高い A.C.D.B. は sodium taurocholate—oleic acid 系において強いミセル相互作用を示し、腸管吸収の動向と符合する結果が得られた。脂溶性の低い酸性薬物では、ミセル相互作用は無視し得るが、pH 6.5 で正に荷電する塩基性薬物の場合、ミセル内部に包含されなくても負電荷を有する混合ミセルに対し、イオンのな相互作用の介在が予想され、Table 5 に示された *in vitro* 実験結果もそれを反映していると考えられる。

これらの結果より、脂肪酸可溶化系からの薬物吸収の動態には、薬物自体の吸収性及び物理化学的性状によって多様な効果の認められることが明らかとなった。以下、難吸収性薬物として procainamide、脂溶性薬物として A.C.D.B. を選び更に検討した。

第 2 節 Procainamide に対する効果

胆汁酸塩は、小腸吸収膜面の Ca の脱離や膜成分の可溶化などの作用により、難吸収性薬物の吸収を促進することが明らかにされている。^{29), 30)}そこで次に、難吸収性薬物である procainamide の吸収に及ぼす脂肪酸可溶化系の影響について、脂肪酸の濃度に注目して検討を加えた。Table 9 は、sodium taurocholate に種々の量の oleic acid を添加した時の効果を示したものである。procainamide の吸収は 20 mM sodium taurocholate によって促進され、6 mM, 12 mM oleic acid の添加によ

Table 9 Effect of Sodium Taurocholate (STC) and Oleic Acid on the Intestinal Absorption of Procainamide

Adjuvant	% absorbed in 60 minutes
Control	9.6±1.5
STC	15.8±2.0
STC+ 6 mM Oleic acid	15.7±1.8
STC+12 mM Oleic acid	17.3±2.3
STC+18 mM Oleic acid	10.5±2.2

Concentration of sodium taurocholate=20 mM

でも促進効果が認められた。しかし、18 mM の oleic acid 共存では sodium taurocholate の吸収促進効果は認められず、対照の吸収値に戻った。Feldman ら⁶⁶⁾はリン脂質や脂肪分解産物を添加した sodium taurodeoxycholate 溶液では、小腸の膜成分を可溶化するミセルの能力が減少するために、salicylate に対する反転腸管の透過性は増大しないと報告している。Table 9 の結果のみからは吸収機序について論議し得ないが、高濃度の脂肪酸添加時に見られた procainamide の吸収低下は、胆汁酸塩の吸収膜面に対する直接作用の減少に起因するものと推察される。

第3節 A.C.D.B. に対する効果

脂溶性の高い A.C.D.B. では、脂肪酸-胆汁酸混合ミセル中の薬物濃度が増加し遊離薬物濃度が減少したために、対照に比し脂肪酸可溶化系からの吸収が著明に低下したことを第1節において指摘したが、これを更に確認するために各種脂肪酸、oleyl alcohol, monolein を用い比較検討した。Fig. 17 は、lauric acid, palmitic acid, oleic acid 添加時の吸収、並びにその時の薬物ミセル相互作用を対応させ表示したものである。脂肪酸の溶解度の関係上、各々0.5 mM を20 mM sodium taurocholate で可溶化して併用した。炭素数の違いによる有意な差異は見られなかったが、いずれも sodium taurocholate 単独に比べ A.C.D.B. のミセル中への取り込みが増加し、腸管吸収の有意な抑制が認められた。

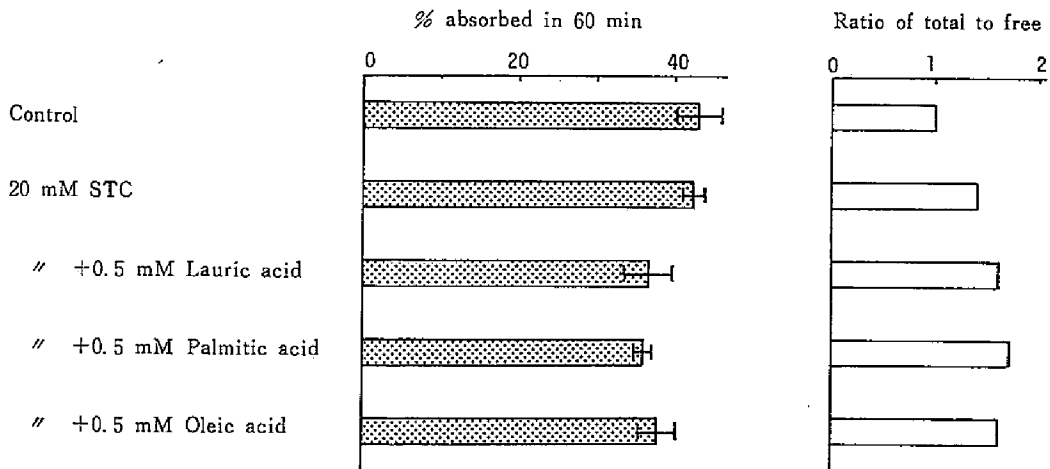


Fig. 17 Effect of Various Fatty Acids with Sodium Taurocholate (STC) on the Intestinal Absorption of A.C.D.B. and Their Micellar Complex Formation

脂肪の吸収時に腸管内で存在する脂肪酸、モノグリセリド、胆汁酸塩の挙動と関連して、A.C.D.B. に対する効果を考察する目的で、oleic acid, oleyl alcohol, monolein を sodium taurocholate で可溶化して併用し、A.C.D.B. の吸収及びミセル相互作用の動向について比較検討したのが Fig. 18である。oleic acid を共存させると、対照、sodium taurocholate 単独に比し A.C.D.B. のミセル相互作用が著しく増大し、又顕著な吸収の抑制を認めた。脂肪の吸収過程に存在するモノグリセリドは、胆汁酸ミセルの可溶化力を増大させることが知られている。^{18), 19)}そこで oleic acid, monolein 共存の影響について検討したところ、A.C.D.B. のミセル相互作用は oleic acid 単独に比べ若干増大したが、

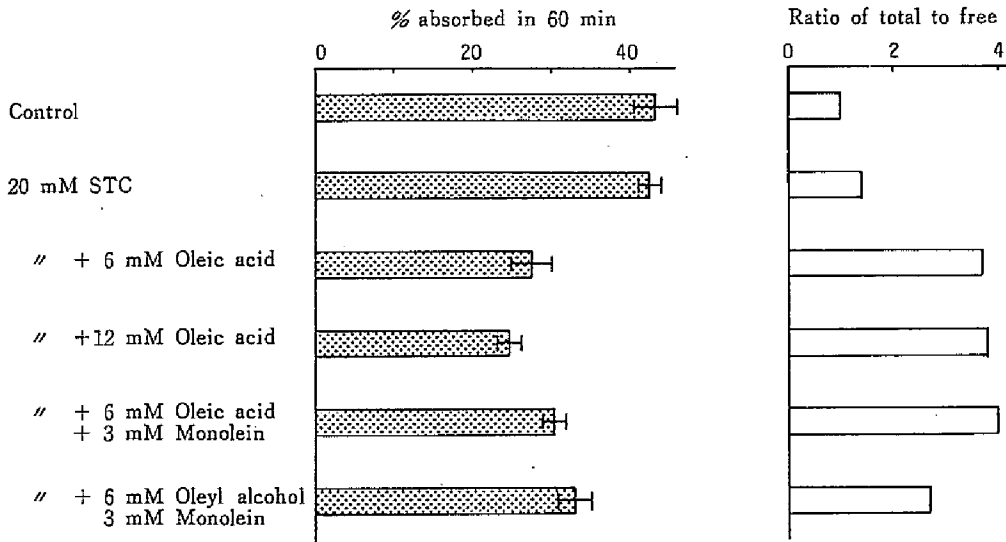


Fig. 18 Effect of Oleic Acid, Oleyl Alcohol, and Monolein with Sodium Taurocholate (STC) on the Intestinal Absorption of A.C.D.B. and Their Micellar Complex Formation

腸管からの吸収は oleic acid 単独の場合ほど抑制され得なかった。この *in vitro* と *in vivo* の相違としては、腸管内におけるミセルの安定性を考慮する必要がある。

長鎖脂肪の吸収機序としては、腸管腔内に存在する混合ミセルのうち、脂肪酸、モノグリセリドのみが小腸粘膜内に移行し、上皮細胞内で脂肪酸とモノグリセリドからトリグリセリドに再合成されることが知られていることより、モノグリセリドが共存する時には脂肪酸の吸収も速やかで、腸管腔内に存在するミセルが経時的に不安定になったものと推論される。従って、静的な *in vitro* ミセル相互作用の結果から予想されるよりも、吸収抑制効果の減少が生じたと考えられる。一方、oleyl alcohol の場合には、それ自身吸収が悪いので先のような現象は認められず、A.C.D.B. の吸収はミセル相互作用とよく符合する結果が得られた。又、oleic acid に比べ oleyl alcohol では A.C.D.B. のミセル相互作用が小さいが、これには第 1 節で言及したように混合ミセルの電気的性質も関与している可能性が示唆される。

第 4 節 考 察

長鎖脂肪酸、長鎖アルコール、モノグリセリドを sodium taurocholate で可溶化して併用し、腸管からの薬物吸収の動態に及ぼすそれらの影響について検討した。

難吸収性の procainamide の吸収は sodium taurocholate によって促進され、これに高濃度の脂肪酸を添加すると対照のレベルに回復することが判明した。これは多量の脂肪酸を可溶化した sodium taurocholate 溶液では、吸収膜面に対する作用が緩和されたものと推察される。

脂溶性の高い A.C.D.B. は、sodium taurocholate 単独によっては影響が認められなかったが、脂肪酸可溶化溶液からの吸収は著明に低下した。又、脂肪酸可溶化溶液で腸管腔を前処置しても抑制効果は認められなかった。分子篩法によるミセル相互作用の検討から、脂肪酸、モノグリセリドを添加した時、A.C.D.B. のミセル中への取り込みが顕著に増大することが明らかとなった。従って、脂溶性

の高い薬物は、巨大混合ミセル中への薬物の移行増加に伴い、有効薬物濃度が低下するために、吸収が抑制されるものと説明することができた。脂肪酸可溶化系の効果は、脂肪酸及び胆汁酸塩の吸収や混合ミセルの電気的性質にも密接に関連していることが示唆されたが、ここに示した結果からは直ちに定量的関係について言及することはできない。

第Ⅱ編 薬物の消化管吸収に及ぼす食餌性脂質の影響

薬物吸収に及ぼす脂肪酸類の影響について究明するために、第Ⅰ編において各種脂肪酸類を水溶液あるいは胆汁酸塩による可溶化溶液として併用投与した際の薬物吸収の動向、及びその過程に介在する諸因子を指摘し作用機序について論述した。医薬品の投与計画や bioavailability の評価など薬剤学的諸問題に基礎的指針を与えるためには、更に、より生理的状态に近い系における脂質投与の影響について検討することが重要である。本編では、食餌に由来する脂質の影響について考察するために、脂質を胃内に1回投与、あるいは無脂肪食を一定期間連続投与したラット腸管からの薬物吸収について検討を加えた。

薬物吸収に対する脂肪及び脂肪酸の生物学的効果としては、(1)胃滞留時間の遅延作用、(2)胆汁酸塩との混合ミセル形成による管腔内の作用、(3)小腸 brush border 及び上皮細胞内の変化による透過性に対する作用、(4)小腸の生理的機能に対する作用、などに起因するものが考えられる。従来の研究は、経口投与した薬物の血中あるいはリンパ中濃度を指標として評価したものが多く、しかも上述の因子が総括された効果を議論したものである。⁹⁾ 著者は系を簡略化するために、(1)(2)を除外し得る実験条件を設定し、in situ 灌流法及びループ法により種々の吸収性を示す薬物の腸管吸収について検討した。

第1章 脂肪酸類胃内前投与の影響

長鎖脂肪の消化、吸収に伴う消化管腔内の挙動については既に述べたが、小腸 brush border や上皮細胞内における生化学的、形態学的な変化についても多岐にわたる詳細な検討がなされている。Forstnerら⁷⁰⁾は safflower oil の胃内投与により microvillus membrane 脂質の脂肪酸組成が変化すること、Borgström,⁷¹⁾ Raghavanら⁷²⁾は投与した脂肪酸が小腸粘膜のリン脂質中に組み込まれ得ること、Friedmanら⁷³⁾は脂肪の吸収時に上皮細胞の滑面小胞体が増加すること、又、最近 Ocknerら⁷⁴⁾は脂肪酸の上皮細胞内移行に脂肪酸結合タンパクが関与していることを報告している。脂肪吸収の形態学的研究については、Strauss⁷⁵⁾による総説がある。これら脂肪吸収時の小腸粘膜に見られる変化は、薬物吸収に対しても何らかの影響をもたらすものと考えられるが、詳細に検討した例は少なく未知の点が多い。

そこで脂肪あるいは脂肪酸を胃内に1回投与し、一定時間後に薬物吸収実験を行った。モデル薬物としては、水溶性薬物の他に、水溶性色素及び小腸で能動輸送される L-tryptophan を選び、脂質投与に伴う小腸粘膜変化の影響について薬物の吸収特性と対応させ、系統的に検討を加えた。

第1節 薬物の吸収に及ぼす影響

薬物吸収において、食餌に由来する脂質の消化管粘膜に対する影響を明らかにし、その支配的要因を究明するために、脂肪酸類の胃内前投与による効果について検索した。薬物吸収実験は15～18時間絶食したラットを用い、経口ゾンデで液状の脂肪、脂肪酸を1ml 胃内に前投与し、3時間後に腸管内を約60 ml の生理食塩水で洗浄し、in situ 小腸連続灌流法あるいはループ法により行った。吸収率は回収液の薬物減少量から算出した。

Table 10 Effect of Pre-administered Linoleic Acid and Safflower Oil on the Intestinal Absorption of Drugs

Drug	Conc (mM)	% absorbed in 60 min	
		Control	Lipid
Perfusion			
Phenol red	0.1	5.2± 0.2	3.3±2.6 (S)
Procainamide	0.1	9.6± 1.5	8.0±0.4 (L)
Metoclopramide	0.1	19.5± 1.7	28.5±3.9 (L)
Bromsulphothalein	0.1	24.5± 2.2	13.8±3.2 (S)
A.C.D.B.	1.0	49.7± 3.5	48.3±6.0 (S)
Methylene blue	0.1	55.2± 1.3	57.3±6.4 (S)
Caffeine	1.0	62.7± 2.5	64.7±2.3 (L)
p-Aminobenzoic acid	0.1	64.3±10.9	65.5±2.4 (L)
Loop			
Phenol red	5.0	12.8± 3.6	12.0±0.3 (S)
Bromphenol blue	5.0	14.8± 3.3	12.6±2.5 (L)
Evans blue	5.0	15.5± 2.1	5.0±1.5 (L) 10.6±1.4 (S)
Bromsulphothalein	5.0	30.6± 3.7	17.3±4.5 (L) 20.3±4.1 (S)
Methylene blue	5.0	74.2± 1.4	65.8±0.8 (L) 70.0±3.8 (S)

(L): Linoleic acid (S):Safflower oil

Table 10は safflower oil あるいはその主要な構成脂肪酸である linoleic acid を投与した後、各種薬物の腸管からの吸収について灌流法、ループ法により測定した結果を示したものである。水溶性薬物では metoclopramide で多少促進効果を認めた以外は、顕著な影響は見られなかった。水溶性色素の内、bromsulphothalein, evans blue などでは safflower oil, linoleic acid の投与によって著しく吸収が抑制された。正電荷を有する methylene blue では著明な影響は認められなかった。

次に、薬物の小腸粘膜への初期取り込みについて in vitro で検討した。Fig. 19は反転腸管への初期10分間の薬物取り込みに及ぼす脂質前投与の影響について示したものである。易吸収性の p-aminobenzoic acid, sulfisoxazole では、初期取り込みにおいて減少が見られたが、吸収実験において抑制効果が認められた bromsulphothalein などの色素では、小腸粘膜への取り込みがむしろ促進される傾向を認めた。

脂質の前投与が薬物の腸管吸収に影響を及ぼす要因としては、(1)小腸粘膜表面に吸着した脂肪あるいは脂肪酸による barrier の形成、(2)小腸上皮細胞内に負荷された脂肪酸による薬物移行性の変化、

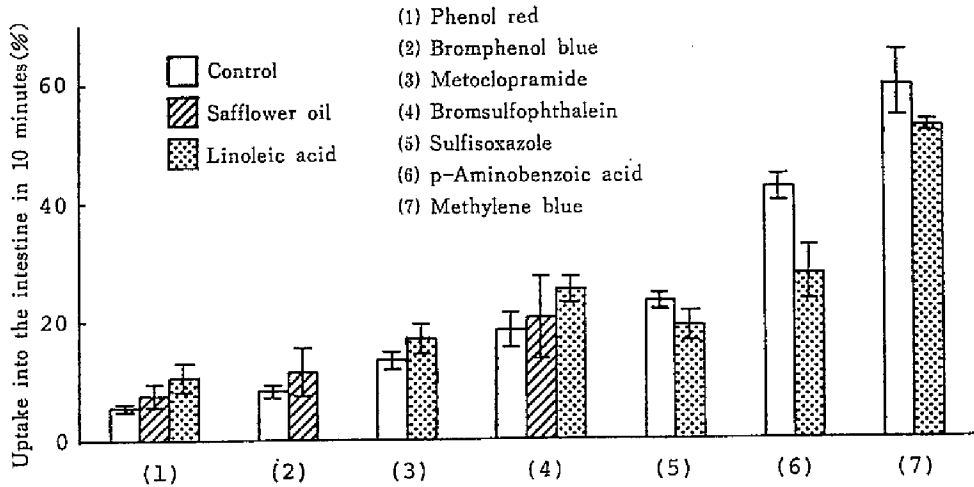


Fig. 19 Effect of Pre-administered Lipids on the Uptake of Drugs into the Everted Intestine

(3)小腸に対する生理的作用などが考えられる。脂溶性は低い小腸粘膜への分配が容易であるために、腸管からの吸収性が良好である p-aminobenzoic acid では、(1)の効果により膜への分配過程が抑制されたことが推測される。しかし、第2節で述べるように、小腸粘膜中に多く蓄積される bromsulphothalein などの水溶性色素では、小腸への取り込みの抑制は認められず、(2)の効果に起因して吸収が変化したものと推察された。

第2節 Bromsulphothalein に対する効果

前節で指摘したように、bromsulphothalein は脂肪酸類の前投与によって小腸粘膜への取り込みは若干増加したが、60分間の吸収率には抑制が認められた。脂質投与時に見られる bromsulphothalein の腸管吸収の動態を解析するために、更に、種々の脂質の効果、小腸組織の蓄積性、循環系への移行

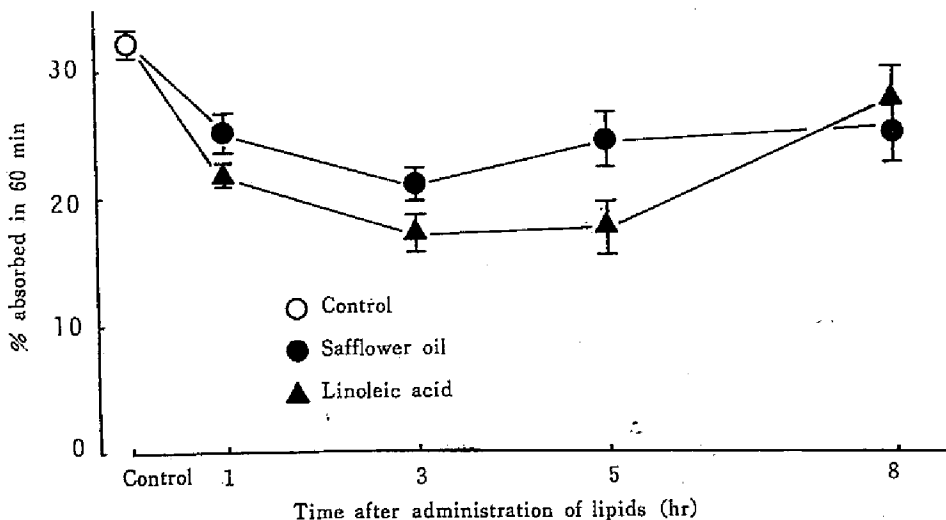


Fig. 20 Time Course of the Effect of Pre-administered Lipids on the Intestinal Absorption of Bromsulphothalein

性などについて検討を加えた。なお、吸収実験はすべて in situ ループ法により行った。

まず実験条件の設定として、脂質投与後の時間の影響について検討するために、safflower oil 及び linoleic acid を胃内に投与し、種々の時間における bromsulphthalein の吸収を測定した。結果は Fig. 20 に示す。safflower oil, linoleic acid いずれの場合も投与3時間で最も著明な吸収の抑制が認められ、以後時間と共にこの効果は減少し8時間ではかなりの回復が認められた。又この図から、脂肪酸の方がトリグリセリドよりも抑制効果が顕著であると考えられる。投与した脂質の腸管内残存量の経時的変化について定量的には検討しなかったが、bromsulphthalein に対する吸収抑制効果は、長鎖脂肪酸の腸粘膜内残存量と相関していると考えられ、以下の実験は脂質胃内投与3時間で行った。

Table 11 は bromsulphthalein の吸収に対する種々の脂質投与の影響を比較検討したものである。safflower oil 及びその主要構成脂肪酸である linoleic acid 投与により bromsulphthalein の吸収が抑制され、又 triolein, oleic acid によっても同様に抑制効果が認められた。一方, oleyl alcohol や中鎖脂肪酸である caprylic acid では顕著な影響が認められなかった。従って bromsulphthalein に対する吸収抑制効果は、小腸粘膜に存在する長鎖脂肪酸に起因するものと考えられる。

次に bromsulphthalein の濃度依存性について検討した。その結果は Fig. 21 に示す。これから明らかなように、各濃度とも linoleic acid 投与により吸収が抑制されたが、低濃度においては抑制率が一層顕著であることがわかる。

bromsulphthalein の吸収に対する長鎖脂肪酸の効果としては、小腸粘膜表面に吸着している脂肪酸よりも、むしろ上皮細胞内部に存在する脂肪酸によって、bromsulphthalein の移行性が抑制されている可能性の強いことを第1節で言及した。そこで次に bromsulphthalein 吸収の時間経過及び実験後の組織中 bromsulphthalein 蓄積量について検討を試みた。Fig. 22 は 5 mM bromsulphthalein の管腔内残存率及び吸収実験後の組織中蓄積率を示したものである。対照では初期の消失が速く、更に飽和現象の認められるパターンが得られた。一方、脂質投与の場合には5分、15分では対照

Table 11 Effect of Pre-administration of Various Lipids on the Intestinal Absorption of Bromsulphthalein

Lipid	% absorbed in 60 minutes
Control	32.1±0.9
Safflower oil	20.9±1.3
Linoleic acid	17.0±1.4
Triolein	22.4±2.3
Oleic acid	21.3±1.9
Caprylic acid	31.0±1.4
Oleyl alcohol	30.3±0.6

Concentration of bromsulphthalein=5 mM

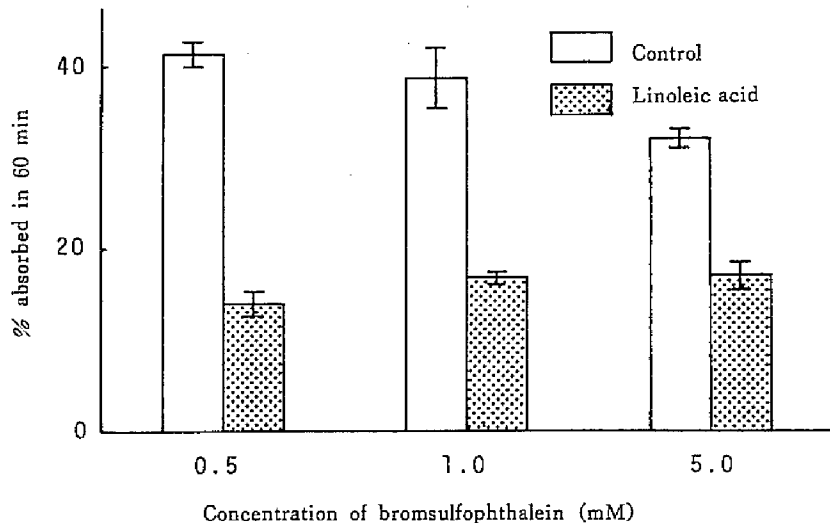


Fig. 21 Effect of Pre-administered Linoleic Acid on the Intestinal Absorption of Bromsulphthalein at Various Initial Concentrations

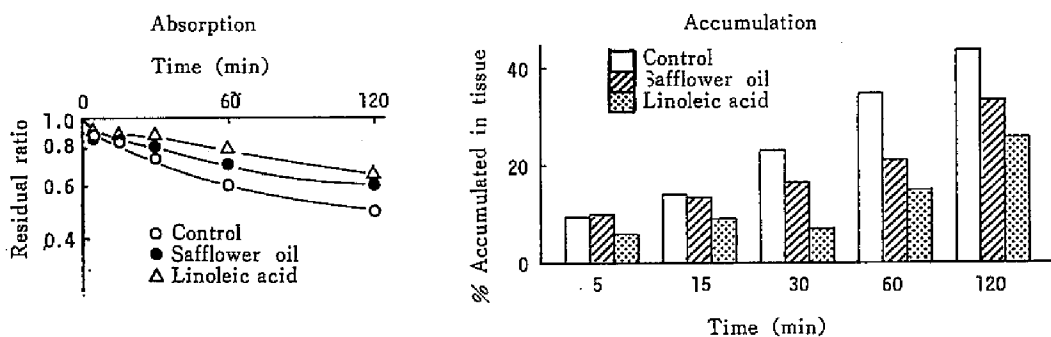


Fig. 22 Time Course of Bromsulphthalein Absorption and Tissue Accumulation Affected by Pre-Administered Lipids

と有意な差異がなかったが、30分以後では吸収抑制が認められた。同様に、組織内蓄積量は、対照に比し脂質投与によって抑制が認められ、特に30分、60分においてその傾向が顕著であった。従って、bromsulphthaleinの管腔からの消失の抑制は、主として組織内蓄積量の減少によるものと考えられるが、Fig. 19で示したように、反転腸管への初期取り込みには抑制が認められなかったことをも考慮すると、脂肪酸類によるこれらの効果は、bromsulphthaleinの腸粘膜表面への分配過程よりも、むしろ上皮細胞内での移行過程に関与するものと推察される。なお、Fig. 22の結果から明らかのように、管腔からの消失より算出した吸収率と組織内蓄積率との差を循環系への移行量とすると、この値は対照に比べ脂質投与によって促進される傾向が認められた。この点に関しては、小腸に投与したbromsulphthaleinの胆汁中出現量の結果と併せ、後で考察を加える。

次に bromsulphthalein の in vitro 反転腸管への取り込みの時間経過についても検討し、その結果を Fig. 23に示した。linoleic acid によって初期では若干取り込みの促進が認められたが、60分後

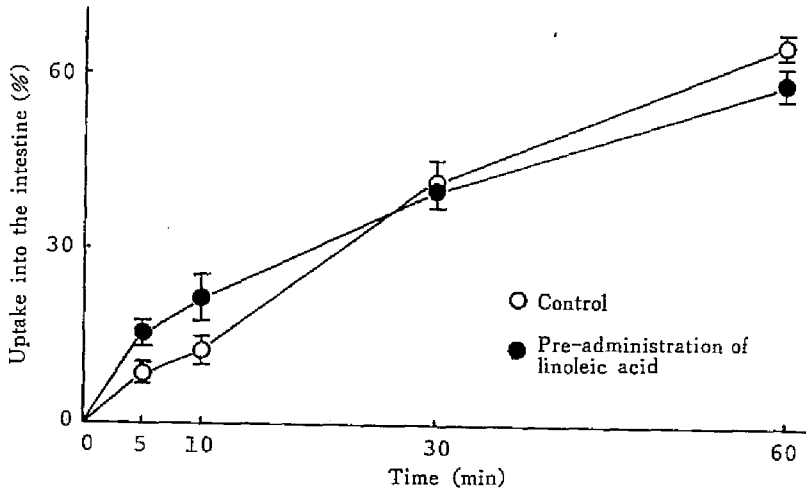


Fig. 23 Effect of Pre-administered Linoleic Acid on Bromsulfophthalein Uptake into the Everted Intestine
Concentration of bromsulfophthalein=5 mM

では in situ 吸収実験結果と同様に有意に抑制された。

Ariasら⁷⁶⁾は肝細胞内に bromsulfophthalein などの有機陰イオン類と非常によく結合するタンパク (Y,Z) が存在し、又、Z-タンパクは小腸粘膜にも存在することを明らかにした。更に、Z-タンパクは長鎖脂肪酸に対しても強い親和性を有することを報告している。⁷⁷⁾ Ocknerら⁷⁴⁾は吸収された脂肪酸の上皮細胞内移行において、脂肪酸結合タンパク (Z-タンパクと同一) が重要な役割を果していることについて詳細に検討を試みている。これらの知見より、bromsulfophthalein の吸収及び小腸粘膜内蓄積には何らかの細胞質タンパクとの結合過程が介在しており、存在する脂肪酸がこの段階で抑制的に働いていると考えられる。

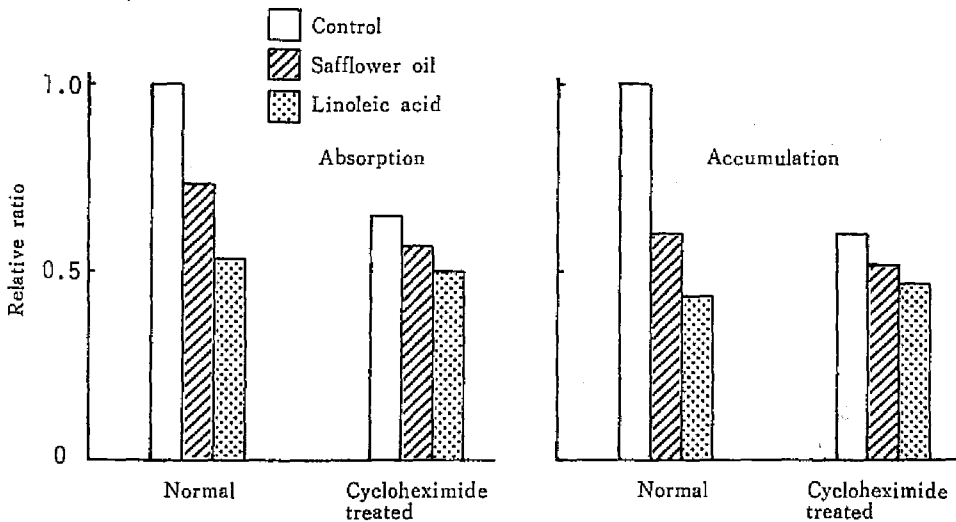


Fig. 24 Effect of Cycloheximide Treatment on Bromsulfophthalein Absorption and Accumulation

そこで次に、タンパク合成阻害剤である cycloheximide 処理の影響について検討を加えた。cycloheximide はタンパク合成を阻害し、上皮細胞内におけるキロミクロン形成を妨げ、脂肪の吸収不良を起すことや、⁷⁸⁾ 能動輸送される一部の栄養物質の吸収抑制を示すこと^{79), 80)} が知られている。Fig. 24は0.6 mg/kg の cycloheximide 腹腔内投与 2 時間後に safflower oil, linoleic acid を胃内投与し、同様に吸収実験を行い吸収量及び組織内蓄積量について検討したものである。先の実験結果における対照の値を 1 とし、それに対する比でそれぞれ示してある。正常の場合、吸収並びに組織内蓄積は safflower oil, linoleic acid 投与によって顕著に抑制された。更に、cycloheximide 処理を行うと、対照における吸収及び蓄積量の比はそれぞれ 0.65, 0.60 となり、正常の場合に比し著明な抑制が認められた。一方、cycloheximide 処理後における safflower oil, linoleic acid の抑制効果は、吸収、蓄積共に正常の場合に認められたほど顕著ではなかった。これらの結果並びに Arias, Ockner らの知見を考え併せると、bromsulphthalein の吸収及び脂肪酸類による効果には、細胞質タンパクとの結合過程の介在していることが示唆される。

Fig. 22で述べたように、吸収率から組織内蓄積率を差引いて得られた循環系への移行量には、脂肪酸類の投与によって促進的傾向が認められた。この現象について更に確証するために、ラットの胆管にカテーテルを挿入後 bromsulphthalein の吸収実験を行い、その胆汁中出現量を測定した。循環系に移行した bromsulphthalein は速やかに胆汁排泄されることが知られており、腸管吸収を検討するために胆汁排泄量を測定し吸収の指標とした報告もある。⁸¹⁾ Fig. 25は小腸に投与した bromsulphthalein の胆汁中移行量について検討し、これに対する脂質前投与の影響を示したものである。脂肪酸類の前投与により bromsulphthalein の胆汁排泄量は有意に増大することが確認され、この結果は Fig. 22から算出した循環系への移行性とよく符合すると考えられる。又、別に胆管結紮したラットで、肝臓中の bromsulphthalein 量を測定したところ、脂質投与により同様に増加が認められた。

以上の知見より、小腸粘膜への蓄積性が大きい bromsulphthalein では、長鎖脂肪酸類の前投与によって、膜への分配過程ではなく小腸粘膜内移行性が抑制されるために、腸管吸収、特に腸管組織

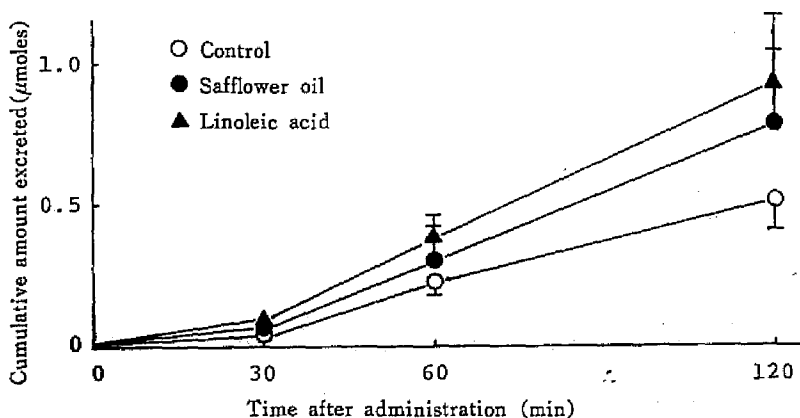


Fig. 25 Effect of Pre-administered Lipids on the Biliary Appearance of Bromsulphthalein Placed in the Intestinal Loop
Dose of bromsulphthalein = 25 μmoles

への蓄積の減少が認められること、又、循環系への移行には促進的効果の認められることが判明した。bromsulphophthalein は brush border 透過は速やかであるが、上皮細胞内の細胞質タンパクと結合し蓄積するために、循環系への移行性が悪いと考えられる。長鎖脂肪酸を投与した場合には、上皮細胞内に負荷された脂肪酸によって bromsulphophthalein-結合能が低下し、循環系への移行が増大したものと推察される。

第3節 L-Tryptophan に対する効果

これまで受動的に腸管から吸収される薬物を用いて、管腔内の挙動、吸収膜面への分配、粘膜組織中蓄積、循環系への移行などの諸過程に及ぼす脂肪酸類の影響を検討したが、更に能動的に腸管吸収される化合物についても検索することは、先の結果との比較検討のみならず脂肪酸の効果の機構を解明する上からも興味あることと考えられる。能動輸送されるアミノ酸と脂質との関連性については、各種アルコール、^{82), 83)}脂肪酸、⁸⁴⁾必須脂肪酸欠乏食^{85), 86), 87)}などによる腸管吸収の変化、アミノ酸の小腸粘膜脂質との結合性⁸⁸⁾などに関する報告が認められる。著者は、能動的に吸収されるモデル化合物として L-tryptophan を選び、その吸収に及ぼす脂肪酸類の胃内前投与による影響について種々の観点から検討を行った。

L-, D-tryptophan の小腸からの吸収機構に関しては既に多くの研究があり、L-tryptophan は Michaelis-Menten 速度式に従う能動輸送系で吸収され、D-tryptophan も一部はこの系によって吸収されることが明らかにされている。^{89), 90), 91)} L-tryptophan の小腸吸収には濃度依存性が認められ、且低濃度におけるその吸収はきわめて速やかであることを考慮し、灌流時間は30分間として吸収率を測定した。

Table 12は 5 mM L-tryptophan の吸収に及ぼす脂質前投与の影響を示したもので、吸収実験は脂質投与と3時間後に行った。これから明らかなように L-tryptophan の吸収は caprylic acid により著しく抑制された。一方、tricaprylin, oleic acid では抑制効果は弱く、又長鎖脂肪の triolein, olive

Table 12 Effect of Pre-administration of Various Lipids on the Intestinal Absorption of L-tryptophan

Lipid	% absorbed in 30 minutes
Control	53.1 ± 4.9
Caprylic acid	28.6 ± 3.3
Oleic acid	44.7 ± 5.1
Tricaprylin	41.4 ± 3.2
Triolein	48.0 ± 4.4
Olive oil	51.5 ± 4.4
Octyl alcohol	42.4 ± 2.1
Methyl caprylate	45.0 ± 2.9

Concentration of L-tryptophan = 5 mM

oil では、ほとんど影響が認められなかった。octyl alcohol, methyl caprylate によっても若干の抑制が生じた。能動輸送系が関与している L-tryptophan の吸収が脂肪酸類の前投与によって抑制され、特に caprylic acid に著明な効果の認められることが明らかとなったが、この L-tryptophan の吸収過程に関与している諸因子を解析するために以下種々の検討を加えた。

まず、L-tryptophan の吸収に及ぼす caprylic acid, tricaprylin 投与の影響についてその時間経過を検討し、結果を Fig. 26 に示した。この図から明らかなように、caprylic acid は tricaprylin に比し、投与後早い時間に L-tryptophan の吸収を顕著に抑制した。又、caprylic acid による吸収抑制効果は漸次減少し、9 時間後には対照の値に回復することが確認された。投与した脂質と考えられる腸管内容物の存否は、投与後 3 時間で多く存在し、9 時間後ではほとんど認め得なかった。従って、この抑制効果には caprylic acid の腸管内存在が必要であると考えられ、第 2 節と同様に実験は脂質投与 3 時間で行った。

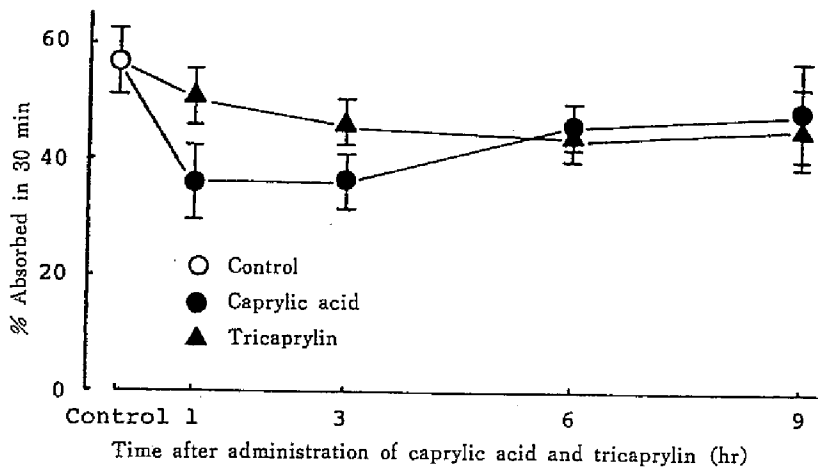


Fig. 26 Time Course of the Effect of Pre-administered Caprylic Acid and Tricaprylin on the Intestinal Absorption of L-Tryptophan
Concentration of L-tryptophan=5 mM

L-tryptophan の吸収には濃度依存性の存在が予測される。そこで初濃度を種々変化させ、吸収、並びにこれに対する caprylic acid 投与の影響について精査した。Fig. 27 は初濃度と吸収率の関係を示し、Fig. 28 は 30 分間の吸収量及び Lineweaver-Burk プロットを示したものである。対照のラットにおいて、L-tryptophan の吸収率は低濃度ほど大きく、30 分間の吸収量には飽和現象が認められ、Michaelis-Menten 式に従うことが確認された。caprylic acid を投与した時、L-tryptophan の吸収には濃度依存性が同様に認められたが、いずれの濃度においても対照に比し吸収が抑制された。Fig. 28 に見られるように、caprylic acid は L-tryptophan 吸収の親和性 (K_m) には影響を及ぼさず、むしろ最大吸収速度 (V_{max}) を低下させていると考えられる。

従来の報告から、L-tryptophan の吸収を変化させ得る小腸の構造的あるいは機能的な変化としては、(1)小腸上皮細胞の管腔側に存在する非攪拌層の厚さ、^{92),93)} (2)血流、⁹⁴⁾ (3)能動輸送系の損傷などが考えられる。Winne,⁹²⁾ Wilsonら⁹³⁾ は小腸粘膜の非攪拌層の厚さが増加した時、みかけの Michaelis

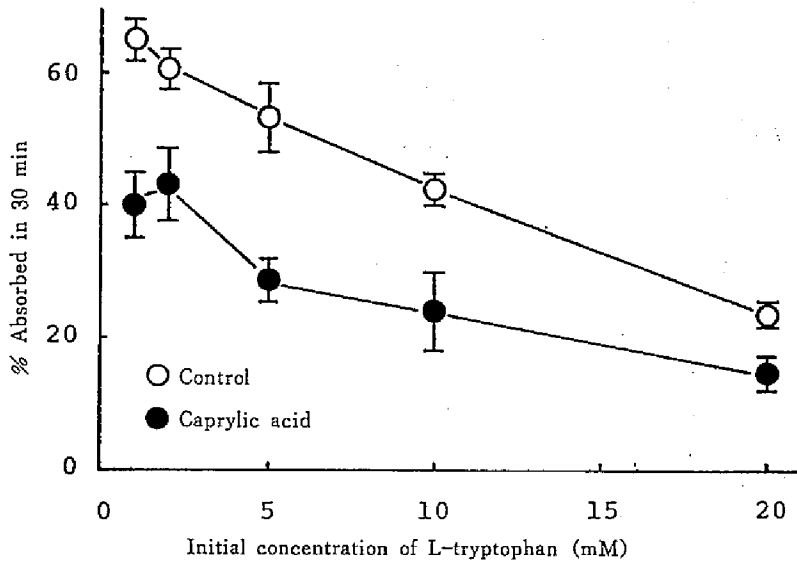


Fig. 27 Effect of Pre-administered Caprylic Acid on the Intestinal Absorption of L-Tryptophan at Various Initial Concentrations

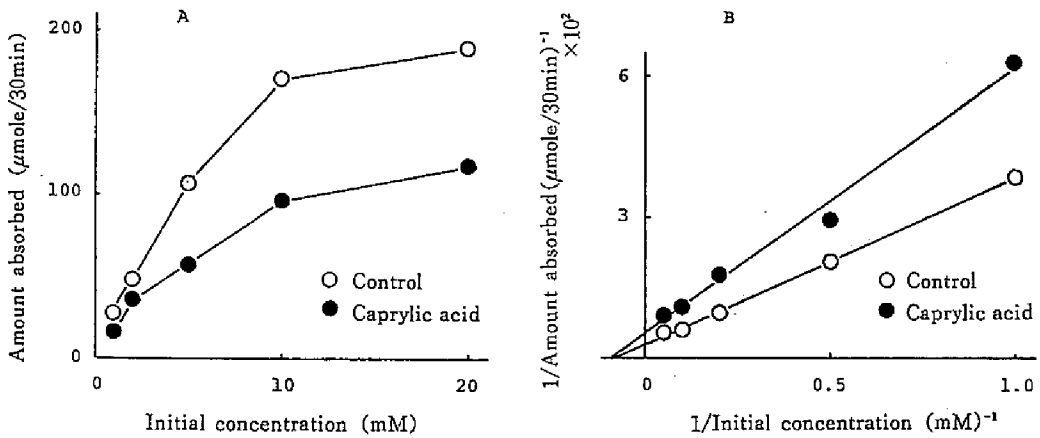


Fig. 28 Effect of Pre-administered Caprylic Acid on the Intestinal Absorption of L-Tryptophan A: Relation between the Initial Concentration and the Absorption Rate of L-Tryptophan B: Lineweaver-Burk Plots

定数 (K_m) が大きくなることを報告している。本研究では, caprylic acid 投与により K_m よりもむしろ V_{max} に影響が認められたことから, この抑制効果が, 小腸粘膜表面に吸着した caprylic acid による非攪拌層の増大に起因するものではないことが示唆される。

灌流液からの L-tryptophan の消失が, 血中への移行を反映しているか否かを確認するために, 吸収実験後の血漿中 tryptophan 濃度を測定した。Fig. 29から明らかなように, 血漿中 tryptophan 濃度は caprylic acid 投与によって減少が認められ, 吸収の結果と符合することが確認された。

又, 相対的な吸収速度に対する影響を詳細に調べるために, 5 mM L-tryptophan の吸収における時間経過について検討し, その結果を Fig. 30に示した。caprylic acid 投与では対照とは異なったパ

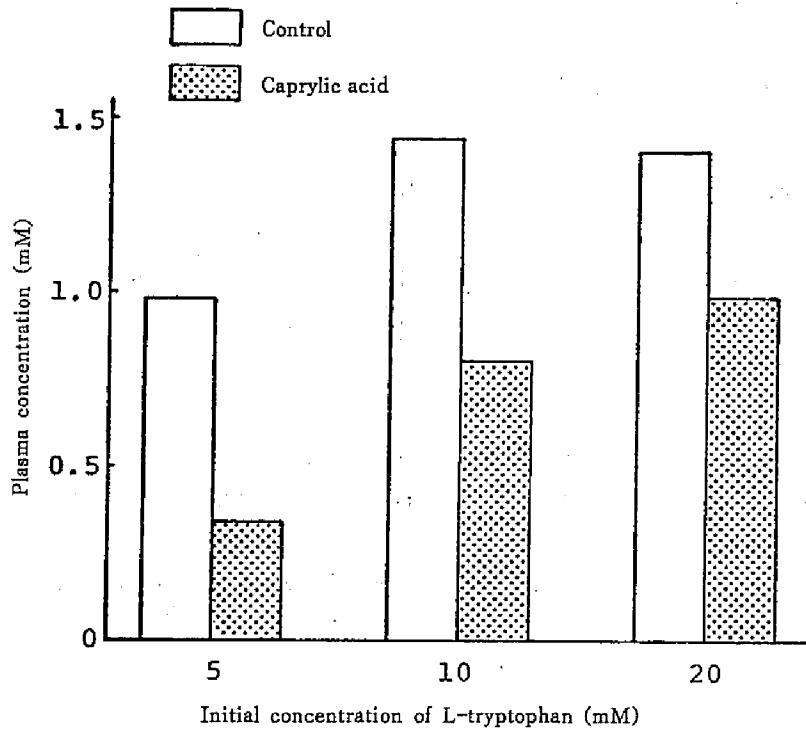


Fig. 29 Plasma Concentration of L-Tryptophan after Intestinal Absorption Experiments at Various Initial Concentrations

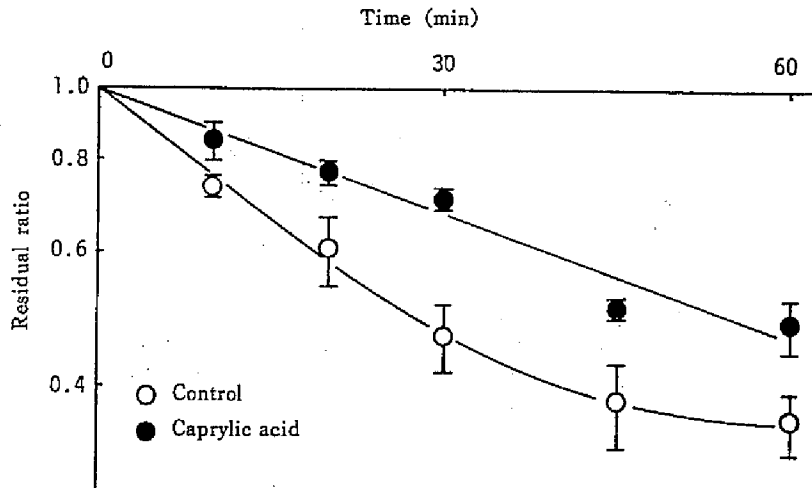


Fig. 30 Time Course of L-Tryptophan Absorption Affected by Pre-administered Caprylic acid
Concentration of L-tryptophan=5 mM

ターンを示しており、この時間内では caprylic acid の効果が持続していると考えられる。別に、caprylic acid を投与したラットの腸管を洗浄し、1時間放置後に行った吸収実験においても、洗浄後直ちに行った場合と同程度に吸収抑制効果が認められた。これらの結果から、caprylic acid の作用は1時間程度は持続するものと考えられる。

次に caprylic acid の効果を明確にするために、in vitro の系における抑制効果の有無について検討を加えた。Fig. 31は、0.25 mM L-tryptophan の反転腸管への初期取り込みについて調べたものである。in situ 吸収実験の結果に示された如く、caprylic acid を投与した腸管では初期取り込みにおいても抑制が認められた。

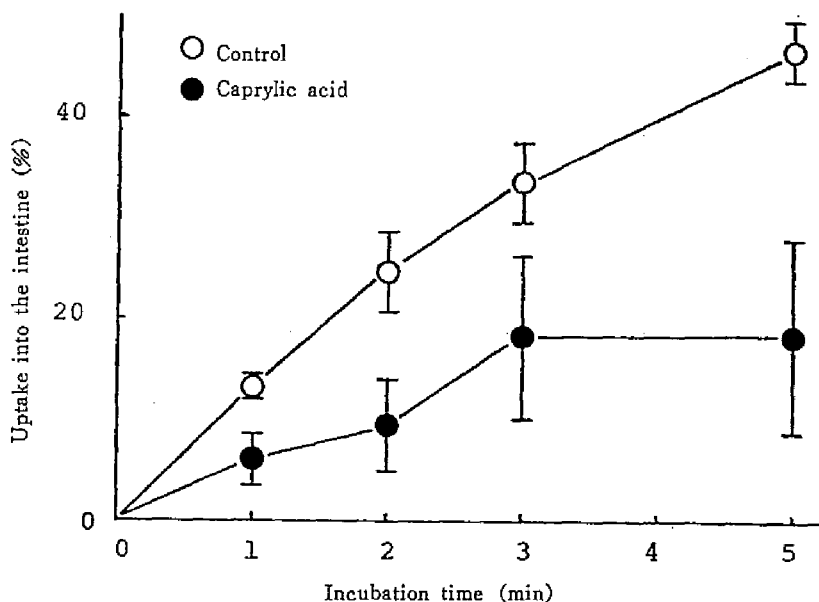


Fig. 31 Effect of Pre-administered Caprylic Acid on the Initial Uptake of L-Tryptophan into the Everted Intestine
Concentration of L-tryptophan=0.25 mM

更に、in vitro 反転腸管法により L-tryptophan の透過性について検討を行った。内液（漿膜側）と外液（粘膜側）の L-tryptophan 濃度を等しくして、60分間インキュベートした後、漿膜側対粘膜側の濃度比を測定した。Fig. 32から明らかなように、漿膜側対粘膜側の濃度比は、caprylic acid 投与により減少し、L-tryptophan の透過の抑制が認められた。in vitro においても、caprylic acid の効果が発現したことから、先に述べた血流変化の寄与は少ないものと考えられる。

caprylic acid が L-tryptophan の吸収を特異的に抑制するの否かを検索するために、D-tryptophan の吸収に対する caprylic acid の影響についても調べた。その結果は Table 13に示す。D-tryptophan の吸収は L-体よりも低かったが、濃度依存性が認められた。caprylic acid は 5 mM D-tryptophan の吸収を抑制するが、10 mM D-tryptophan の吸収には有意な抑制効果は認められなかった。一般に、D体の腸管吸収に対しても能動輸送系が一部関与しているが、D体は主に単純拡散によって小腸粘膜を透過すると考えられている。^{90),91)}従って、10 mM D-tryptophan の吸収には大部分単純拡散が寄与しており、caprylic acid 投与の影響が顕著でなかったと推察される。

一方、脂肪酸の生理作用としては、グラム陽性菌に対する抗菌作用、⁹⁵⁾ Na^+, K^+ -ATPase 活性の抑制、⁹⁶⁾ 腎における有機陰イオンの能動分泌の抑制、⁹⁷⁾ ammonia 代謝の抑制⁹⁸⁾ などエネルギー関与の系に対する抑制的作用について報告されている。先に、caprylic acid を投与した小腸で認められるL-

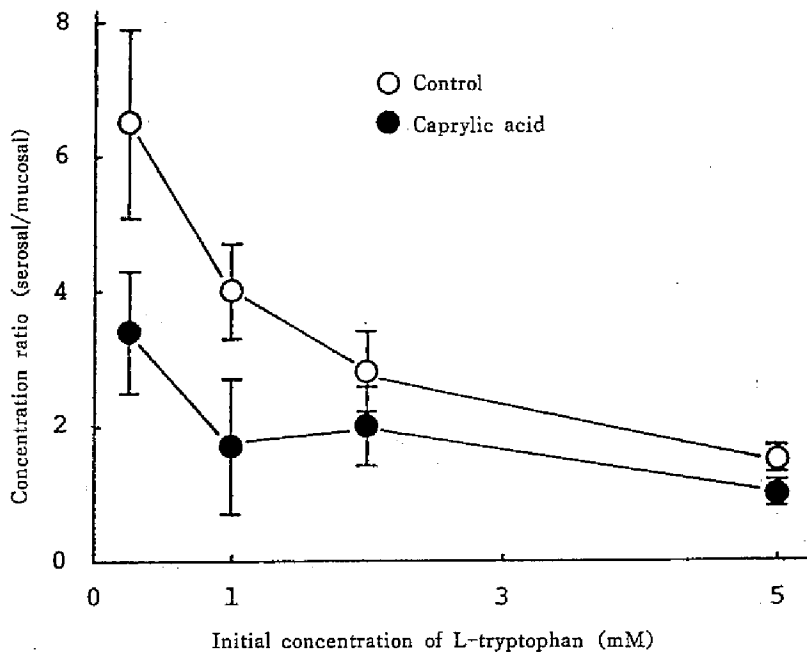


Fig. 32 Relation between the Initial L-Tryptophan Concentration and the Concentration Ratio of Serosal to Mucosal Fluid

Table 13 Effect of Pre-administered Caprylic Acid on the Intestinal Absorption of D-Tryptophan

	% absorbed in 30 minutes	
	5 mM	10 mM
Control	15.8±3.0	11.6±1.3
Caprylic acid	9.4±0.9 ^{a)}	9.5±2.1 ^{b)}

a) significantly different from control, $p < 0.05$

b) not significant, $p > 0.05$

tryptophan の吸収低下は、小腸粘膜への分配過程の抑制に支配されることが示唆されたが、上記の生理作用と関連してこの抑制機構を解析するために caprylic acid 共存下における L-tryptophan の吸収について検討した。しかし、Table 14から明らかのように、5 mM caprylic acid 併用によって 1 mM 及び 5 mM L-tryptophan の吸収には影響が認められず、低濃度の caprylic acid 共存では抑制効果が生じないものと考えられる。

従って L-tryptophan の吸収低下は、投与された caprylic acid が上皮細胞表面に何らかの損傷を与え、その結果生じた構造的、機能的変化による能動輸送能の低下に起因する可能性が考えられる。この点について追究するために、小腸内を緩衝液だけで30分間連続灌流し、そこに出現するタンパク量の測定を行った。すなわち、種々の脂質を前投与し、上記灌流液中に出現したタンパク量について比較したのが Table 15である。caprylic acid 投与の場合、対照及び他の脂質に比べタンパク量の著

Table 14 Effect of Caprylic Acid on the Intestinal Absorption of L-Tryptophan

	% absorbed in 30 minutes	
	1 mM	5 mM
Control	61.7±5.0	53.1±4.9
5 mM Caprylic acid (coexistence)	63.4±5.5	50.9±6.0

Table 15 Effect of Pre-administered Lipids on the Protein Release from the Perfused Rat Small Intestine

Lipid	Protein released (mg)
Control	9.0±2.5
Caprylic acid	21.2±5.5
Tricaprylin	8.7±1.6
Oleic acid	7.7±1.5

明な増加が認められた。従って caprylic acid が小腸粘膜に直接作用し、タンパクなどの膜成分の漏出に伴う膜構造や機能の変化を生じ、その結果、L-tryptophan の能動輸送能が低下したものと推察される。

第4節 考 察

食餌性脂質の消化管粘膜に対する影響について究明するため、脂肪酸類を胃内に前投与した後、吸収特性の異なる各種薬物を選び腸管吸収の動向について検索した。

脂肪酸類の投与によって、水溶性薬物の吸収には若干の変化が見られたに過ぎないが、小腸組織への蓄積性が大きい bromsulphothalein などの水溶性色素及び能動輸送される L-tryptophan では吸収挙動に多様な変動を認めた。bromsulphothalein の場合、吸収、組織内蓄積、反転腸管への取り込み、胆汁排泄などの測定結果から、前投与された linoleic acid 等の長鎖脂肪酸は、bromsulphothalein の粘膜への分配過程ではなく組織内蓄積過程を抑制し、更に、血流中への移行を促進することが判明した。又、これらの効果は、上皮細胞内の細胞質タンパクに負荷された長鎖脂肪酸に起因することが示唆された。

能動輸送される L-tryptophan では、caprylic acid の投与によって著明な吸収の抑制が認められた。これは Lineweaver-Burk プロットによる解析、in vitro 膜透過性、灌流液中に出現したタンパク量などの結果から、caprylic acid が小腸粘膜に直接作用してタンパクの脱離などが生じ、brush border 膜の構造あるいは機能が変化したために能動輸送能が低下し、L-tryptophan の膜への分配が減少したものと推察された。

第2章 無脂肪食投与の影響

前章において脂肪や脂肪酸を経口的に1回投与することによって、腸管からの薬物吸収に種々の変化が認められることを明らかにした。更に、脂肪を含まない食餌をラットに投与し、薬物吸収に及ぼすその影響について検討を加えることは、脂肪酸類の小腸粘膜に対する作用を解明する上で必要と考えられる。

一般に食餌に由来する linoleic acid などの不飽和脂肪酸は必須脂肪酸に分類され、その生物学的作用については様々な報告が出されているが、特にリン脂質の共通構成成分として生体膜の構造や機能を維持する上で重要な役割を果し、脂質の生体内における生理的意義と密接な関連を持っている。必須脂肪酸欠乏食あるいは無脂肪食を長期間投与することによって、生体組織中に存在するリン脂質などの脂肪酸組成が変化すること、更に生体膜の性質並びに他の機能が変化することに関しては Alfin-Slater ら⁹⁹⁾による詳しい総説がある。欠乏食投与の影響としては、肝臓などの生体組織から得られたリン脂質を用いて形成した人工膜の Na, glucose に対する透過性の変化,^{100), 101)} 肝 microsome の P-450 含量及び薬物代謝活性の低下^{102), 103)} などが報告されており、又小腸に対する影響としては、小腸粘膜の構造¹⁰⁴⁾ や粘膜脂質組成¹⁰⁵⁾ の変化、脂肪^{104), 106)} やアミノ酸^{85), 86), 87)} の吸収低下、胆汁流量や組成の変化¹⁰⁷⁾ などが指摘されている。

本章では、無脂肪食を一定期間投与したラット腸管からの薬物吸収及び小腸 brush border の脂質組成を調べ、正常の場合と比較検討した結果について論述する。

第1節 薬物の吸収に及ぼす影響

普通飼料あるいは無脂肪食飼料で一定期間飼育したラットを用い、in situ 灌流法により吸収実験を行った。無脂肪食飼料としては、オリエンタル酵母製の精製飼料を使用した。成分については第II編実験の部に記載する。

Fig. 33は、体重約80gのラットに普通食あるいは無脂肪食を与え、4週間飼育した時の成長曲線を示したものである。両者の体重増加にはこの投与期間で顕著な差は認められないが、無脂肪食を投与した一部のラットでは、3～4週間頃に尾の皮膚の鱗屑化、いわゆる必須脂肪酸欠乏の症状が認められた。

次に各種薬物の腸管吸収に及ぼす無脂肪食投与の影響について検討し、その結果を Table 16 に示した。metoclopramide, A.C.D.B. などの塩基性薬物では顕著な影響が認められなかった。一方、酸性薬物のうち脂溶性から予測されるよりも吸収性が良いと考えられている p-aminobenzoic acid, sulfisoxazole では、対照に比べ有意な吸収の抑制を、又 salicylic acid も抑制的傾向を認めた。比較的脂溶性の高い sulfadimethoxine では影響がなかった。

Brodieら¹⁰⁸⁾は pKa 3 以上を有する弱酸性薬物の小腸からの吸収は、pH-分配仮説に従わず生理的 pH 領域で吸収の良いことを明らかにし、これは彼らが言う小腸の virtual pH に起因すること、一方、Kakemiら¹⁰⁹⁾は弱酸性薬物の腸管吸収に見られる現象が薬物の小腸粘膜との結合性によって説明されることを報告している。又最近、Smolen¹¹⁰⁾は熱力学的観点より virtual pH 説を批判し、解離型でも生体膜を通過し得ることを述べている。このように酸性薬物の腸管からの吸収過程に介在する支配的因子については、なお種々の議論がなされており未だ明確ではない。それ故に、無脂肪食

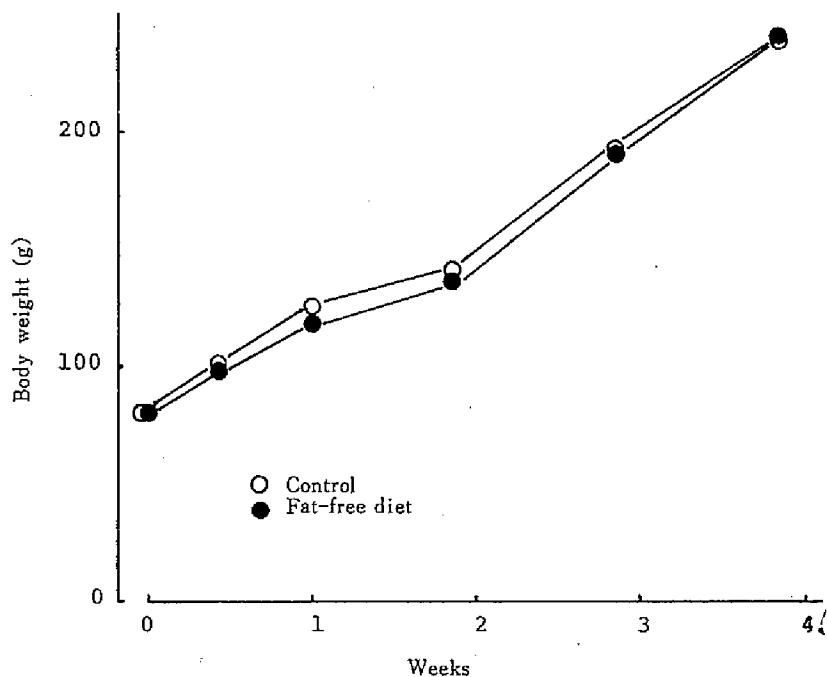


Fig. 33 Growth Patterns of Rats Maintained on Test Diets

Table 16 Effect of Fat-Free Diet on Drug Absorption from Small Intestine

Drug	% absorbed in 60 minutes	
	Control	Fat-free diet ^{a)}
Sulfaguanidine	8.6±1.2	8.9±1.3
Metoclopramide	24.0±2.2	22.3±4.5
A.C.D.B.	43.1±2.8	44.2±3.8
Sulfisoxazole	44.1±5.7	33.6±7.2
p-Aminobenzoic acid	69.2±5.6	55.6±7.8
Salicylic acid	79.9±7.0	70.0±7.2

a) fed for 4-12 days

投与時における酸性薬物の吸収抑制について検索することは、これら薬物の吸収機構の解明と関連して興味あることと考えられる。そこで p-aminobenzoic acid を選び更に検討を試みた。

Table 17は、無脂肪食の投与期間を変え、p-aminobenzoic acid の吸収の動向について精査した結果を示したものである。これから明白なように、投与開始後1~2週間において、吸収抑制効果が最も強いと考えられる。無脂肪食あるいは必須脂肪酸欠乏食の影響について追究した多くの研究では、

Table 17 Effect of Fat-Free Diet on p-Aminobenzoic Acid Absorption from Rat Small Intestine

% absorbed in 60 minutes		
Control	69.2±5.6	
Fat-free diet 2-3 days	61.4±8.4	P<0.01
5-8 days	56.5±7.9	P<0.001
10-14 days	55.1±7.2	P<0.001
16-23 days	66.1±5.0	N.S.

Table 18 Effect of Fat-Free Diet on p-Aminobenzoic Acid Absorption from Rat Jejunum and Ileum

	% absorbed in 60 minutes	Tissue weight (g/cm)
Control Jejunum	50.2±5.7	0.12±0.02
Ileum	53.1±7.0	0.11±0.01
Fat-free diet (5-8 days) Jejunum	49.8±4.5	0.08±0.01
Ileum	42.8±3.8	0.07±0.01

数週間以上の投与において、生体組織中に存在するリン脂質の脂肪酸組成のうち linoleic acid (18:2) arachidonic acid (20:4) が減少し、5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20:3) などが増加し、更に、これに伴って生体膜の性質が変化すると報告されている。⁹⁹⁾ ここで得られた結果は、短期間の投与で薬物吸収に影響が認められたことから、無脂肪食投与によって小腸粘膜のリン脂質脂肪酸組成が変化したこと起因するものではないと推察される。

次に吸収部位による差異について検討するために、空腸部、回腸部それぞれ20 cmを用いて p-aminobenzoic acid の吸収実験を行った。その結果は Table 18に示す。単位長さあたりの湿重量は空腸、回腸いずれも対照に比べ無脂肪食投与において約30%の減少が認められた。p-aminobenzoic acid の吸収は、空腸では顕著な差は認められなかったが、回腸においては無脂肪食投与によって有意(P<0.05)な抑制効果を認めた。

第2節 小腸粘膜脂質組成の変動

無脂肪食や必須脂肪酸欠乏食の投与によって、生体組織の脂質組成が正常時に比し種々変化することは、既に多くの研究で明らかにされており、⁹⁹⁾ 小腸粘膜脂質についても Yurkowski ら¹⁰⁵⁾ の報告が

ある。そこで著者は、先に述べた無脂肪食投与時に見られる腸管からの薬物吸収の変化について、その機構解明の一端とすべく小腸粘膜脂質組成の検討を試みた。

水溶性薬物の吸収における律速段階は、一般に小腸粘膜の brush border 透過々程と考えられている。そこで Forstnerら¹¹¹⁾の方法に従い brush border 画分を調製し、Kates¹¹²⁾の方法に準じて脂質の抽出を行い、得られた全脂質を薄層クロマトグラフィーにより検討した。

Fig. 34に示した薄層クロマトグラムは普通食及び無脂肪食(1週間)を投与した小腸 brush border 画分の脂質 (100 μg)、又、標準として egg phosphatidylcholine (50 μg)、cholesterol (25 μg)、oleic acid (25 μg) を chloroform 溶液としてマイクロシリンジで定量的にスポットし、hexane: ethyl ether: acetic acid (80:20:1 by volume) の溶媒系で展開後、リンモリブデン酸で呈色せしめたものである。この図から明らかのように、正常時の脂質の主な構成々分は、リン脂質、cholesterol、

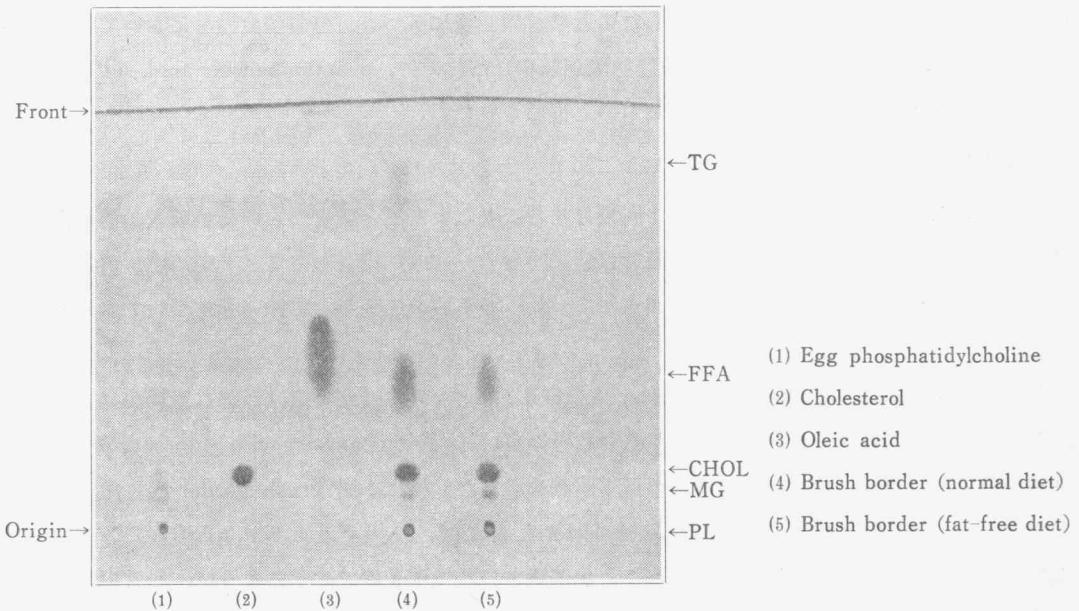


Fig. 34 Thin Layer Chromatogram of Brush Border Lipids

Developing solvent, hexane: ethyl ether: acetic acid=80:20:1

Key: PL, phospholipids; MG, monoglycerides; CHOL, cholesterol;

FFA, free fatty acids; TG, triglycerides

遊離脂肪酸、トリグリセリドであることが示された。これは、小腸粘膜あるいは microvillus membrane の主要な構成脂質として、リン脂質、cholesterol の他に遊離脂肪酸も比較的多く存在するという従来の知見^{70),105),113),114),115)}と一致すると考えられる。一方、無脂肪食投与の場合には、正常時と比較してリン脂質、cholesterol には著明な差がなく、遊離脂肪酸の減少していることが認められた。

これを更に定量的に把握するために、brush border 脂質を薄層クロマトグラフィーで分離し、脂肪酸部分のシリカゲルをかき取り溶媒で抽出後、脂肪酸量を測定した。Table 19に示したように、正常時に比し無脂肪食投与では遊離脂肪酸の減少していることが確認された。

本研究とは実験条件を多少異にするが、Yurkowskiら¹⁰⁵⁾は必須脂肪酸欠乏食投与時の小腸粘膜脂

Table 19 Fatty Acid and Cholesterol Contents in Brush Border Total Lipids

	% of total lipids	
	Fatty acid	Cholesterol
Control	7.9	10.6
Fat-free diet(7 days)	5.1	15.5

質に関する報告の中で、粘膜脂質中の遊離脂肪酸量が正常時に比して減少し、小腸下部においてこの傾向が顕著であると述べている。Table 18で示したように無脂肪食投与によって、回腸からの p-aminobenzoic acid の吸収が抑制されたこと、更に第Ⅲ編の人工膜透過研究において脂肪酸が p-aminobenzoic acid 等の透過を促進したことなどの知見に基づき、無脂肪食投与においては小腸の microvillus membrane に配向した遊離脂肪酸が減少したために、p-aminobenzoic acid, sulfisoxazole などの酸性薬物の吸収低下が認められたものと推論された。

第3節 考 察

第1章において脂肪酸類を経口的に1回投与することによって、腸管からの薬物吸収動態に変化の認められることを明らかにしたが、本章では無脂肪食を一定期間投与したラットを用い、薬物の腸管吸収について検討すると共に、小腸 brush border 脂質成分の変動との関連性について考察を加えた。

無脂肪食投与によって metoclopramide, A.C.D.B. などの塩基性薬物では顕著な影響が見られなかった。一方、脂溶性から予測されるよりも吸収性の良い p-aminobenzoic acid, sulfisoxazole などの酸性薬物では、対照に比べ有意な吸収の低下が認められた。更に小腸 brush border 脂質組成を検索したところ、正常時には主にリン脂質、cholesterol、脂肪酸、トリグリセリドから成っていたが、無脂肪食投与の場合には脂肪酸の減少することが確認された。第Ⅲ編で述べるように、脂質黒膜を用いた薬物透過の研究において、脂肪酸が p-aminobenzoic acid などの透過性を促進したことを併せ考察した結果、小腸の microvillus membrane に存在する遊離脂肪酸が、酸性薬物の易吸収性に一部関与しており、無脂肪食投与時には、この脂肪酸の減少に起因して p-aminobenzoic acid などの酸性薬物の吸収が低下したものと推論された。

第Ⅲ編 薬物の脂質黒膜透過に及ぼす脂肪酸類の影響

薬物の吸収、分布等の生体内移行過程は、種々の形態を有する生体膜を介しての薬物膜透過現象の集積であり、生体膜を構成する脂質が重要な役割を演じていることは周知の事実であるが、その複雑な脂質組成と薬物膜透過との関連性については、なお解明すべき点が多く残されている。

著者は、第Ⅰ編、第Ⅱ編において、薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響について主に *in situ* 吸収実験法により検討し、管腔内や小腸粘膜における効果について考察を加えてきた。更に、薬物吸収の律速段階と考えられている brush border 膜の透過性に対し、脂肪酸類が如何なる効果を及ぼすかを検討することは、薬物吸収機構に関する基礎的知見を得る上からも重要と考えられるが、既に言及した如く、*in situ* 吸収実験法では種々の要因が関与するため技術的に困難な問題が多い。そこで著者は、膜レベルにおける脂肪酸類の影響をより明確にするため、脂質二分子層から成る黒膜 (Black Lipid Membranes) を腸管粘膜モデルとして用いることを試みた。

本編では、小腸脂質より形成した脂質黒膜の薬物透過実験法を確立し、薬物透過に及ぼす膜形成脂質の影響、並びにこれに対する脂肪酸類の効果について検討した結果を詳述する。

第1章 脂質黒膜実験法の検討

薬物の生体膜透過性について薬剤学的立場から検討を加えるために、Doluisioら¹¹⁶⁾ Perrin,¹¹⁷⁾ Levyら¹¹⁸⁾ によってこれまで種々の膜モデルが考案され、*in vitro* の膜透過研究に使用されてきた。しかしこれらは膜を単に脂質層と見たたものが多く生体膜としては不十分である。著者が使用した脂質黒膜¹¹⁹⁾ は脂質二分子層から成る単層の膜で、リボソーム¹²⁰⁾ と共に生体膜の研究において近年多用されている人工膜であり、消化管における薬物膜透過機構をよりミクロな観点から解明するのに適切な方法と考えられる。

従来、黒膜形成に使用された脂質は、脳や赤血球の全脂質、egg phosphatidylcholine、合成リン脂質などであり、小腸粘膜脂質についてはほとんど検討がなされていない。¹²¹⁾ そこで、小腸、脳、肝、肺の全脂質及び egg phosphatidylcholine を用いて pH 6.5 リン酸緩衝液中で黒膜を形成し、その諸性質について比較検討した。

第1節 膜形成脂質及び脂質黒膜の形成法

膜形成脂質としては egg phosphatidylcholine (Sigma 社 Type III E) 及びラット小腸粘膜、脳、肝、肺から、Folchら¹²²⁾ の方法により抽出した全脂質を使用した。Fig. 35は、それらの薄層クロマトグラムを示したものである。小腸粘膜、脳、肝、肺より得られた脂質 (100 μ g)、又標準として egg phosphatidylcholine (50 μ g)、cholesterol (25 μ g)、linoleic acid (25 μ g) を定量的にスポットし、hexane: ethyl ether: acetic acid (80:20:1 by volume) の溶媒系で展開後、リンモリブデン酸で呈色せしめた。各臓器より得られた全脂質の組成は主にリン脂質、cholesterolであったが、小腸粘膜脂質には第Ⅱ編、第2章で述べたように遊離脂肪酸、トリグリセリドも多く存在していることが確認された。

脂質黒膜の形成は Hanaiら¹²³⁾ の方法に基づき Fig. 36に示した膜形成装置を用いて行った。以下

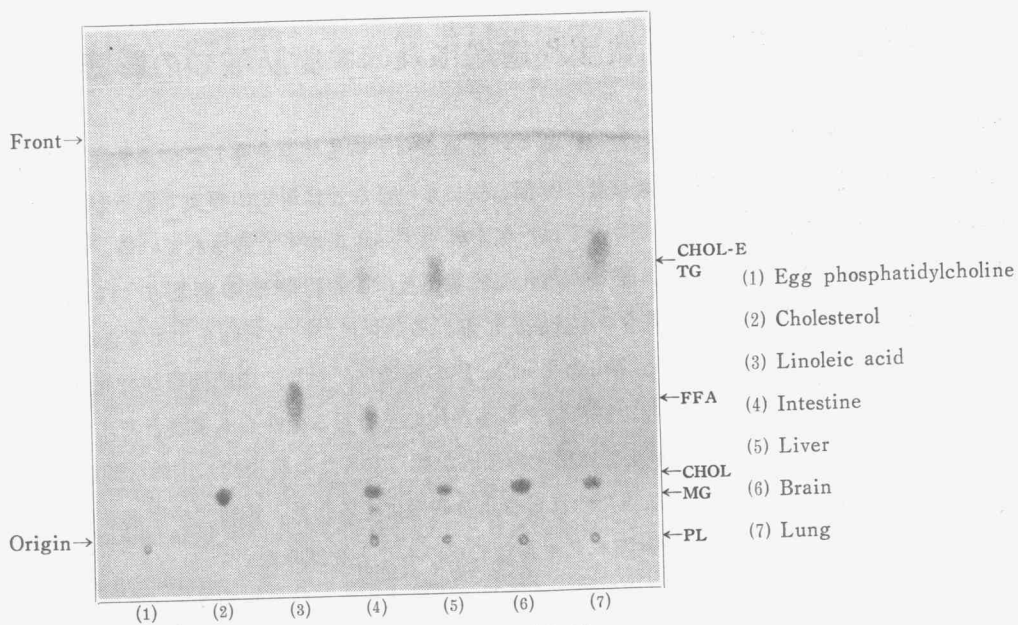


Fig. 35 Thin Layer Chromatogram of Tissue Lipids
 Developing solvent, hexane: ethyl ether: acetic acid=80 : 20 : 1 Key: PL, phospholipids; MG, monoglycerides; CHOL, cholesterol; FFA, free fatty acids; TG, triglycerides; CHOL-E, cholesterol esters

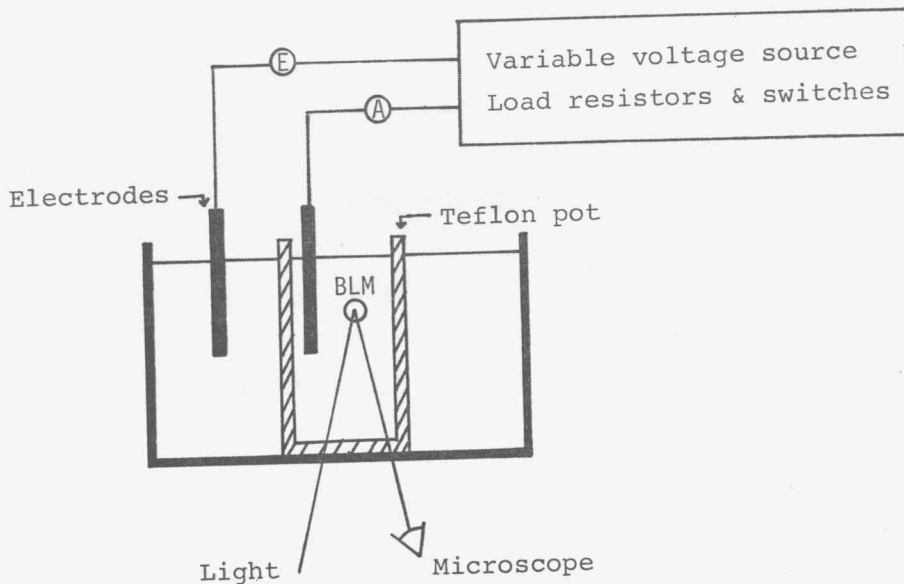


Fig. 36 Arrangement of Apparatus Used for Studying Electrical Properties of Black Lipid Membranes

その概略を記す。脂質の *n*-decane 溶液を「前塗り」したテフロンポットを等張リン酸緩衝液中に固定し、十分「慣らし」を行った後、小筆で直径約 1.5 mm の穴の部分に脂質溶液をつけ膜を形成した。長焦点顕微鏡で膜面の様子を観察しながら黒化時間、膜面積及び膜破壊電圧を測定した。膜の電気抵抗は、0~100 mV の電圧を順次かけて electrometer で電流を測定し、Ohm の法則から算出した。なお、実験は25°恒温室において行った。

第2節 Egg Phosphatidylcholine 及び臓器脂質より形成した脂質黒膜の諸性質

黒膜形成脂質としては、従来脳、赤血球の全脂質、egg phosphatidylcholine などが多く使用され、小腸全脂質などについてはほとんど検討がなされていない。そこで、egg phosphatidylcholine並びに小腸、及び比較として脳、肝の全脂質を用い、必要に応じて cholesterol 等を添加して、黒膜の形成を試み、それらの性質について検討した。

Table 20, Table 21は、egg phosphatidylcholine (1 w/v% in n-decane) 及び各臓器から抽出分離した脂質 (1 w/v% in n-decane) を用い、適宜 cholesterol を添加して形成した膜の黒化時間すなわち膜形成時間、膜破壊電圧、膜抵抗について示したものである。水相には、吸収実験で用いた pH 6.5等張リン酸緩衝液を使用した。phosphatidylcholine 単独では黒膜形成が相当困難で、黒化を開始させるために80~100 mV の電圧を負荷した。又、得られた黒膜は振動、水圧、電圧いずれに対しても非常に弱い。しかし、膜強化剤である cholesterol を添加すると黒化は速やかになり、破壊電圧も高く強固な膜を形成することができた。一方、複雑な組成の小腸、脳、肝の全脂質からも膜形成が可能で、cholesterol 無添加の場合でも自然に黒化が起り、相当強固な膜を作ることができた。特に脳脂

Table 20 Various Properties of Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine

	Cholesterol (w/v %)				
	0	0.3	0.5	1.0	1.5
Time of formation (min)	4 ^{a)}	2	2	1	0.3
Breakdown voltage (mV)	150-180	200-250	250-300	300-315	300-350
Membrane resistance ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	6×10^6	5×10^7	6×10^7	5×10^7	6×10^7

a) The membranes were turned black by applying voltage (up to 80 mV).

Table 21 Various Properties of Black Lipid Membranes Generated from Tissue Lipids

Cholesterol (w/v %)	Intestine					Brain		Liver	
	0	0.1	0.3	0.5	1.0	0	0.3	0	0.3
Time of formation (min)	6	6	2	1	0.5	9	2	8	1
Breakdown voltage (mV)	180-250	180-250	300-350	300-350	250-350	330-400	370-450	250-300	300-350
Membrane resistance ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	2×10^8	2×10^8	3×10^8	3×10^8	3×10^8	4×10^8	4×10^8	3×10^8	3×10^8

質では膜破壊電圧も高く、他の脂質膜に比べ安定であることがわかる。これらの脂質に適量の cholesterol を加えることにより、更に破壊電圧の高い十分強固な膜を得ることができた。

膜抵抗に関しては、phosphatidylcholine 単独では 10^6 order であるが、cholesterol を添加すると約10倍高くなり、又 cholesterol 添加量を増しても顕著な変化を認め得なかった。小腸、脳、肝脂質膜の抵抗は 10^8 order で phosphatidylcholine 膜のそれより高いことがわかる。一般に、膜抵抗はイオン透過性の一つの指標と考えられており、小腸粘膜脂質等の膜は、phosphatidylcholine 膜に比し電解質イオンを透過し難いと考えられる。

次に形成した黒膜の経時的安定性について検討した。小腸全脂質に cholesterol (0.3%) を添加して黒膜を形成し、その比抵抗を経時的に測定して Fig. 37に示した。この図から明らかなように、膜形成数時間後においても膜抵抗に大きな変動は認められず、破壊電圧も膜形成20分後とほぼ同程度の値が得られた。phosphatidylcholine や cholesterol 含量の異なる他の膜においても同様であった。

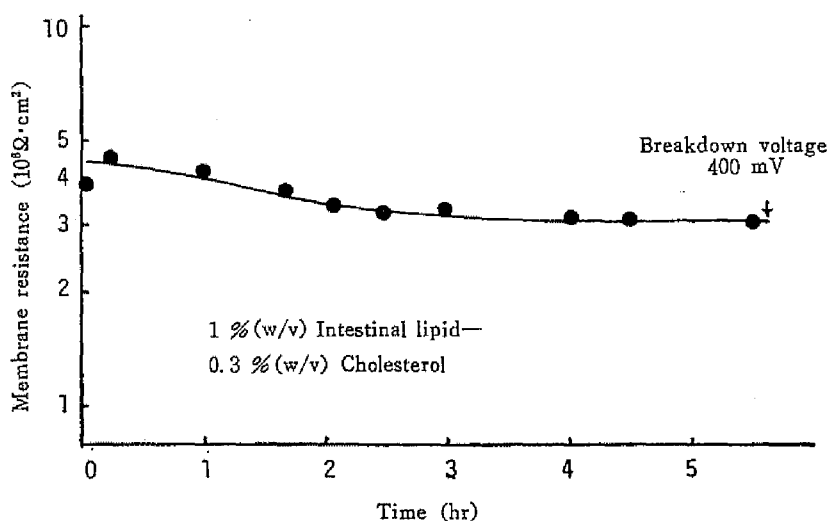


Fig. 37 Electrical Resistance versus Time after Formation of Black Lipid Membrane

以上の結果から、脂質組成の複雑な小腸粘膜脂質などを用いても egg phosphatidylcholine 同様黒膜の形成が可能であり、且得られた膜は、薬物透過実験に供するに十分安定で強固な膜であることが確認された。

第2章 薬物の脂質黒膜透過性

薬物の消化管からの吸収は、Brodieら¹⁰⁸⁾によって、一般に非解離型薬物分子の脂溶性とその存在する割合 (pH-分配仮説) に支配されることが明らかにされている。しかし、salicylic acid や p-aminobenzoic acid など酸性薬物の腸管吸収に見られるように、生理的 pH 領域で解離型として存在し有機溶媒への分配係数も極めて低いにもかかわらず、吸収が良好であるなど一概に説明できない場合もある。^{108), 109)}このような背景から脂質黒膜による in vitro 薬物透過実験は、薬物の消化管吸収

機構を物理化学的に究明する手段として有用であると考えられる。

脂質黒膜に関する従来の研究は、^{121), 124)} 膜の電気的性質やイオン透過性について検討したものが多く、薬物の黒膜透過性については、Bean ら、¹²⁵⁾ Howard ら、¹²⁶⁾ Gutknecht ら、¹²⁷⁾ Wolosin ら¹²⁸⁾ による報告が認められるに過ぎず、未だ十分明確にはされていない。本章では、egg phosphatidylcholine 及び小腸全脂質から形成した黒膜を用い、種々の特性を有する薬物の透過性について精査し、更に腸管吸収との関連性についても考察を加えた。

第1節 各種の脂質より形成した脂質黒膜の薬物透過性

リン脂質の二分子層膜は、温度によってその流動性が変化することや相転移の生じることが知られている。そこでまず実験条件を設定するために、薬物透過に及ぼす温度の影響について検討した。Fig. 38は、小腸脂質に cholesterol (0.3%) を添加して形成した膜を用い、温度を17~29°と変化させて salicylic acid の透過係数を求め、Arrhenius プロットしたものである。salicylic acid の黒膜透過には明らかに温度依存性が認められ、その活性化エネルギーは約20 kcal/mole/degree であった。これは、glucose や電解質イオンのリポソーム透過で報告されている値¹²⁹⁾ と相応しうものである。

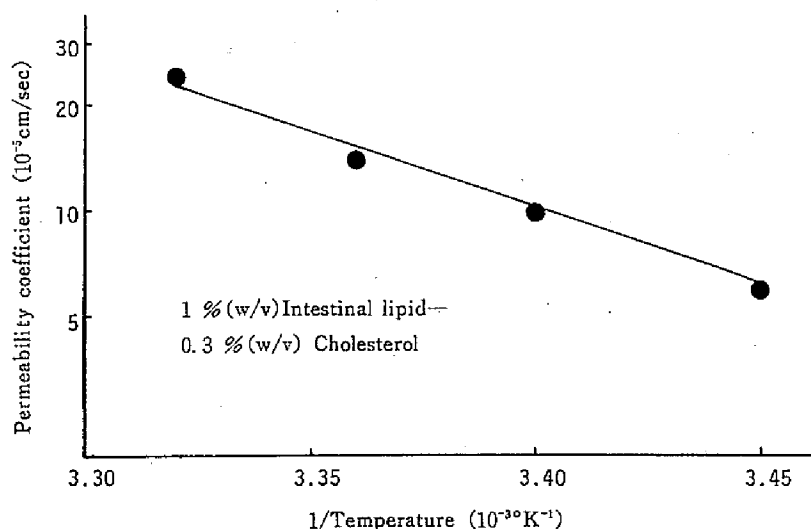


Fig. 38 Arrhenius Plot of Salicylic Acid Permeability Coefficient across Black Lipid Membranes Generated from Intestinal Lipid

膜の性質に関しては、低温では黒化が起りにくく、高温では形成した膜が多少不安定になることがわかった。これらの結果から、以後の実験は25°で行うことにした。

次に、物理化学的性質及び in vivo 腸管吸収挙動の異なる4種のモデル薬物、すなわち生理的pH領域で非解離型として存在し比較的脂溶性が高く腸管吸収の良い salicylamide、負電荷を有し脂溶性は低い小腸からの吸収が良好である salicylic acid 及び p-aminobenzoic acid、両性電解質で脂溶性は低い腸管吸収には能動輸送が関与している L-tryptophan を選び、これら薬物の黒膜透過性について検討した。Table 22は egg phosphatidylcholine に cholesterol 0.5% を添加し形成した膜に対する各薬物の透過係数、並びに chloroform-pH 6.5 リン酸緩衝液系における分配係数を示したもの

Table 22 Permeability Coefficients of Various Drugs across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine at pH 6.5

Drug	M.W.	P.C. ^{a)}	Permeability coefficient ^{b)} (10 ⁻⁵ cm/sec)
Salicylamide	137	2.38	22.7±1.0
Salicylic acid	138	0.01	8.9±1.9
p-Aminobenzoic acid	137	0.03	7.4±1.0
Tryptophan	204	0.01	1.5±0.6

a) CHCl₃-to-pH 6.5 phosphate buffer partition coefficients

b) Each value is the mean±S.D. of 3-6 experiments.

The membranes were generated at 25° from solution containing

1 % (w/v) egg phosphatidylcholine—0.5 % (w/v) cholesterol in n-decane.

である。分子量のほぼ等しいこれら薬物において、分配係数が大きく脂溶性の高い salicylamide では、脂溶性の低い L-tryptophan に比べ、かなり大きな透過係数が得られ、一般の生体膜透過と同じ傾向を示した。本研究では、より広汎な薬物を用いて検討することはできなかったが、生体膜透過で言われている脂溶性の原則が、脂質二分子層を基盤とした黒膜系でも適用されると推察される。しかし salicylic acid, p-aminobenzoic acid の透過係数は、分配係数から推定されるよりも大きな値が得られた。これらの酸性薬物は、先に述べたように小腸吸収実験においても pH-分配仮説に従わず、生理的条件下で吸収の良いことが知られている。

薬物の物理化学的性質と膜透過性との関係をより明確にすることを目的として、次に、薬物の黒膜透過に及ぼす pH の影響について調べた。Table 23は、pH 6.5と pH 4.5において、phosphatidylcholine 膜に対する薬物の透過係数並びに非解離型分子の割合を示したものである。salicylic acid, p-aminobenzoic acid の透過係数は pH 4.5で増加しているが、pKa から計算される非解離型分子の

Table 23 The Relation between the Degree of Ionization and the Permeability Coefficients of Various Drugs across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine at pH 4.5 and 6.5

Drug	Unionized form ^{a)} (%)		Permeability coefficient (10 ⁻⁵ cm/sec)	
	pH 4.5	pH 6.5	pH 4.5	pH 6.5
Salicylamide	100	99.0	17.4±0.7	22.7±1.0
Salicylic acid	3.1	0.0	19.2±2.0	13.3±1.2
p-Aminobenzoic acid	66.6	2.0	20.1±0.8	7.4±1.0

a) calculated using the dissociation constants pKa=8.5 for salicylamide; pKa=3.0 for salicylic acid and pKa=4.8 for p-aminobenzoic acid.

増加の程度より小さく、腸管吸収実験の場合と同様に pH 6.5において透過性が良いことを認めた。Furusawaら¹³⁰⁾は、解離型酸性薬物の chloroform に対する分配係数が、リン脂質の添加によって顕著に増大することを報告しており、これら薬物の黒膜透過々程においても、二分子層を形成しているリン脂質との相互作用が一つの要因となっているものと推察される。なお、pH 4.5における salicylamide の透過性は若干減少したが、これは水相に用いた緩衝液の組成や pH の違いによる膜性質の変化など別の因子に起因するものと考えられる。

次に、小腸粘膜脂質から形成した黒膜の薬物透過性について検討し、egg phosphatidylcholine 及び脳、肝全脂質より形成した膜の場合と比較検討を試みた。その結果を Table 24に示す。いずれの脂質膜においても、脂溶性の高い salicylamide は透過係数が大であり、4種の薬物の透過性はほぼ同じ傾向を示している。しかし、小腸脂質膜の場合、p-aminobenzoic acid の透過係数は 14.4×10^{-5} cm/secで phosphatidylcholine 及び脳、肝の脂質膜に比べ大きいことが明白である。従って解離型で存在する酸性薬物の膜透過は、単なる脂溶性だけでは説明され得ず、解離型薬物の膜への分配過程あるいは膜中の拡散過程に、膜を構成するリン脂質及び他の腸管脂質成分が寄与していると考えられる。

Table 24 Permeability Coefficients of Various Drugs across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine and Tissue Lipids

Drug	Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)			
	Phosphatidylcholine	Intestine	Brain	Liver
Salicylamide	22.7±1.0	24.4±1.8	16.0±2.5	22.7±1.7
Salicylic acid	8.9±1.9	10.0±1.7	5.2±1.6	9.2±0.4
p-Aminobenzoic acid	7.4±1.0	14.4±2.5	3.8±1.6	6.8±1.3
Tryptophan	1.5±0.6	1.8±0.6	—	—

The membranes were generated from solution containing either 1% (w/v) egg phosphatidylcholine—0.5% (w/v) cholesterol or 1% (w/v) tissue lipids—0.3% (w/v) cholesterol in n-decane.

そこで、他の臓器脂質とは多少異なる特性を示した小腸全脂質及びその比較として egg phosphatidylcholine について更に検討を加えた。

第2節 Cholesterol 及び Cholesterol Acetate 添加の影響

黒膜の形成を促進し、膜の安定性を増すために添加した cholesterol は、リン脂質と並び主要な生体膜構成成分である。cholesterol が膜を構成するリン脂質分子の配列を堅固にし、物質透過の抑制をもたらすことについては既に幾多の知見が得られている (condensing effect)^{131), 132)} Table 20において述べた如く phosphatidylcholine 膜の抵抗は、cholesterol の存在下で約10倍の増加を認めたが、これは電解質イオンに対する透過の抑制を示すものと考えられる。そこで cholesterol の薬物透過に及ぼす影響について検索するために、phosphatidylcholine 及び小腸全脂質に添加する cholesterol 量を0~1.5%と変化させ、salicylamide と salicylic acid に対する透過係数を測定した。その結果

は Fig. 39に示す。cholesterol 添加量の増加に伴い, salicylic acid の透過係数が多少低下する傾向を認めたが, この濃度範囲では, 水, ¹³³ glucose^{129), 134)} などについて報告されているほど 顕著な抑制効果ではなかった。

次に, cholesterol ester として cholesterol acetate を用い, cholesterol 効果との比較を試みた。Fig. 40は egg phosphatidylcholine について示したものである。cholesterol acetate (0.5 %) を添加した系では, 完全な黒膜を形成することができるが, 黒化時間は長く破壊電圧も低いことがわかる。一般に, cholesterol ester には cholesterol のようなイオン透過に対する抑制効果は少ないといわれており, この知見¹³⁴⁾と一致して, cholesterol acetate を添加し形成した膜の抵抗は, phosphatidylcholine 単独の場合とほぼ等しい 10^6 order であった。しかしこの膜に対する salicylamide, salicylic acid の透過係数は, cholesterol を添加した膜の値とほとんど変化しなかった。

これらの結果より, 主要な腸管脂質成分であり, 膜を安定化する作用を持つ cholesterol は, 膜抵

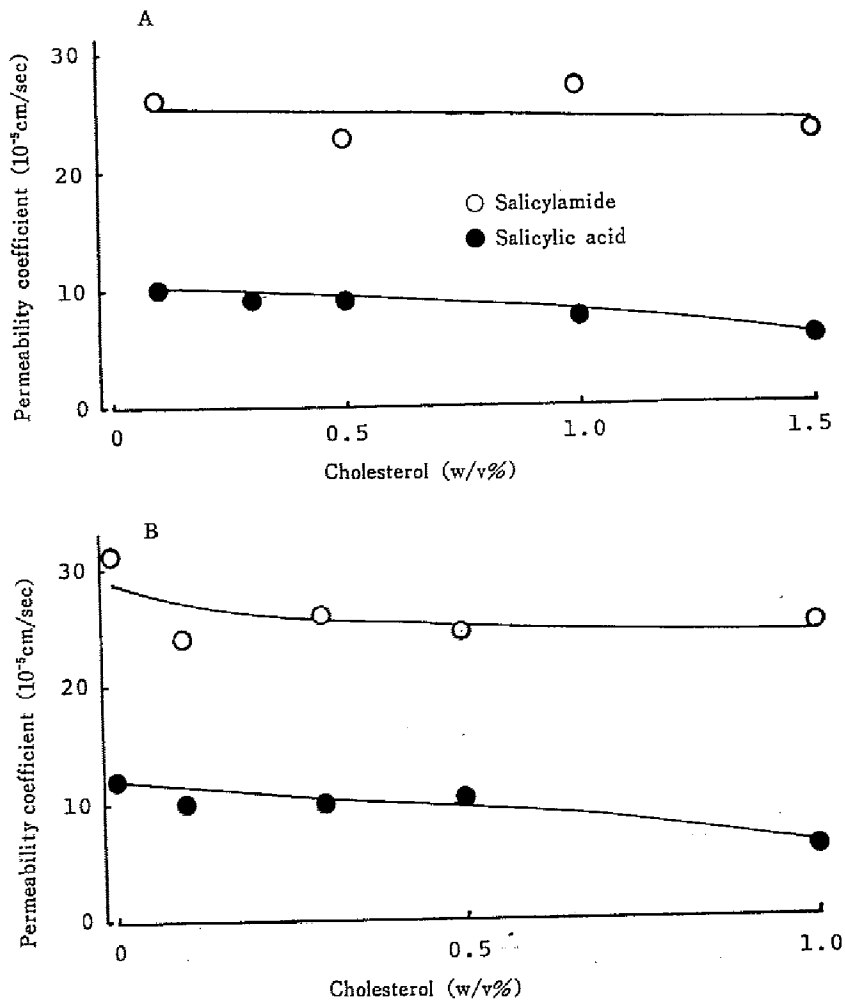


Fig. 39 Effect of Cholesterol on the Permeability Coefficients of Drugs across Black Lipid Membranes Generated from (A) Egg Phosphatidylcholine and (B) Intestinal Lipid

	None	Cholesterol 0.5 (w/v%)	Cholesterol acetate 0.5 (w/v%)
Time of formation (min)	4 ^{a)}	2	8
Breakdown voltage (mv)	150-180	250-320	170-200
Resistance ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	0.6×10^7	5.9×10^7	0.5×10^7

a) The membranes were turned black by applying voltage.

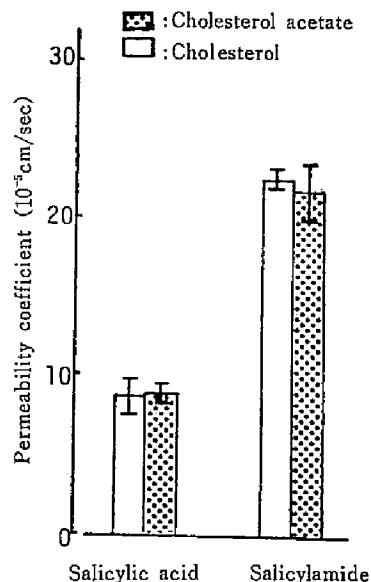


Fig. 40 Effect of Cholesterol Acetate on Membrane Properties and Drug Transfer in Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine

抗で示されるようなイオンの透過を抑制するが、本研究に用いた薬物の黒膜透過性には、多量に添加した場合を除いて顕著な変化をもたらさないと考えられる。

第3節 考 察

物理化学的性質や腸管吸収挙動の異なる薬物として、salicylamide, salicylic acid, p-aminobenzoic acid, L-tryptophan を選び、egg phosphatidylcholine、及び小腸、脳、肝の全脂質より形成した黒膜に対する薬物透過の動向について検索した。

脂溶性の高い salicylamide では、他の薬物に比し大きな透過係数が得られ、一般の生体膜と同様の傾向を示した。しかし、salicylic acid, p-aminobenzoic acid の透過は分配係数から予測されるよりも良く、更に、小腸脂質膜では他の膜よりも大きな透過性が認められた。これら酸性薬物の腸管吸収は、pH-分配仮説に従わず生理的 pH 領域で吸収の良いことが知られているが、黒膜透過においても単なる脂溶性だけでは説明され得ず、解離型薬物の膜への分配過程あるいは膜中の拡散過程に、膜を構成するリン脂質や他の腸管脂質成分が関与している可能性が示唆された。

膜強化剤として添加した cholesterol は主要な生体膜構成成分で、その膜に対する condensing effect については幾多の報告があり、第1章においても phosphatidylcholine 膜の抵抗が cholesterol の存在下で高くなることを認めた。そこで、phosphatidylcholine 及び小腸全脂質に添加する cholesterol を0~1.5%と変化させた時の薬物透過性について検討したところ、高濃度の cholesterol 添加では薬物透過に抑制をもたらしたが、水、glucose に対して報告されているほど顕著な抑制効果は認められなかった。又、phosphatidylcholine に cholesterol acetate を添加した系において、膜抵抗は phosphatidylcholine 単独の場合と同程度であったが、薬物透過係数は cholesterol を添加した膜とほぼ等しい値であった。これらの結果より、膜強化剤として添加した cholesterol は、破壊電圧や膜抵

抗を高めるが、本研究で用いた薬物の黒膜透過性には、多量に添加した場合を除いて著明な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

第3章 酸性薬物の脂質黒膜透過に及ぼす脂肪酸類の影響

第2章において、p-aminobenzoic acid等の黒膜透過性が分配係数から予測されるよりも良く、更に、他の脂質膜に比して小腸脂質膜で有意に高いことを明らかにし、リン脂質や他の腸管脂質成分が解離型酸性薬物の透過に寄与していることを言及した。小腸吸収膜面の脂質組成に関しては、Yurkowskiら、¹⁰⁵⁾ Cottonら¹¹⁵⁾は小腸粘膜、Forstnerら、⁷⁰⁾ Kawaiら¹¹⁴⁾は小腸 microvillus membraneの脂質について検討し、それらの組成が主にリン脂質、cholesterol、遊離脂肪酸、トリグリセリドであることを確認しており、又、本研究においても既に類似の結果を示した。一般に、筋^{135), 136)}など一部の組織を除いて、生体膜構成脂質として本来遊離脂肪酸が存在することは稀であり、小腸脂質に見られる遊離脂肪酸は、食餌性脂質や小腸の生理特性に関連していることが考えられる。一方、脂肪酸の膜に及ぼす作用としては、赤血球¹³⁷⁾やリポソーム¹³⁸⁾の浸透圧抵抗性、細胞の融合¹³⁹⁾など膜の構造や機能に対する影響について報告が認められる。

これらの知見を基に、薬物の黒膜透過に及ぼす長鎖脂肪酸類の影響について検索することは、phosphatidylcholine膜と小腸脂質膜に見られた酸性薬物の透過性の相違を解明する上で重要と考えられる。本章では、phosphatidylcholine、小腸脂質に脂肪酸類を添加して形成した膜の薬物透過性、並びに分画した小腸脂質についても同様に検討し、又、酸性薬物の腸管吸収機構との関連性についても考察を加えた。

第1節 Egg Phosphatidylcholine より形成した脂質黒膜における効果

egg phosphatidylcholine に脂肪酸を添加して形成した黒膜の薬物透過性について検討を試みた。Table 25は phosphatidylcholine (1%)—cholesterol (0.5%) を対照とし、それに stearic acid (0.5%) を添加して形成した膜における各薬物の透過係数を比較したものである。stearic acid を添加した場合、salicylamide の透過係数は対照とほぼ等しく、一方、salicylic acid の透過はやや増加し、p-aminobenzoic acid では顕著な透過性増大が認められた。この stearic acid の薬物透過性に及ぼす効果は、先に示した phosphatidylcholine 膜と小腸脂質膜との間に見られる透過性の差と符合して

Table 25 Effect of Stearic Acid on the Permeability Coefficients of Drugs across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine

Drug	Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)	
	Control	Stearic acid (0.5 w/v%)
Salicylamide	22.7±1.0	21.4±0.5
Salicylic acid	8.9±1.9	11.8±2.3
p-Aminobenzoic acid	7.4±1.0	17.5±2.8

おり、膜に配向した脂肪酸が酸性薬物、殊に p-aminobenzoic acid の透過性増大に關与している可能性が示唆される。

次に egg phosphatidylcholine に種々の脂肪酸を添加して形成した膜を用い、p-aminobenzoic acid の透過性について比較検討した。その結果は Table 26 に示す。飽和脂肪酸である lauric acid, stearic acid の場合、0.5 % 添加すると同程度に p-aminobenzoic acid の透過性が増大したが、0.1 % では顕著な効果は認められなかった。更に、1.0 % 添加した場合には、逆に促進効果が減少した。これに対して、不飽和脂肪酸である oleic acid, linoleic acid, linolenic acid は、0.1 % で十分促進効果が認められ、oleic acid で明らかなように 0.1 % から 0.5 % に添加量を増しても透過性にはそれほど変化をもたらさなかった。又、methyl linoleate や oleyl alcohol の添加によっては、ほとんど促進効果が認められなかった。これらの結果より、ある種の脂肪酸が膜構成脂質として一定量存在する時、p-aminobenzoic acid の透過性増大が起ると考えられる。

Table 26 Effect of Fatty Acids on the Permeability Coefficient of p-Aminobenzoic Acid across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine

		Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)
Control		7.4±1.0
Lauric acid	0.1 %	7.0±2.6
	0.5 %	17.1±1.8
Stearic acid	0.05%	10.3±1.2
	0.1 %	9.4±1.6
	0.5 %	17.5±2.8
	1.0 %	14.1±2.7
Oleic acid	0.05%	12.1±0.7
	0.1 %	13.9±3.1
	0.5 %	15.7±1.0
Linoleic acid	0.1 %	15.1±2.5
Linolenic acid	0.1 %	13.7±2.2
Methyl linoleate	0.5 %	5.7±1.3
Oleyl alcohol	0.5 %	6.8±1.3

Kawai¹¹⁰⁾ は、microvillus membrane におけるリン脂質、cholesterol、脂肪酸、糖脂質の組成はモル比で 1.0 : 1.1 : 0.7 : 1.2 であることを述べている。1 % phosphatidylcholine—0.3 % cholesterol—0.1 % linoleic acid 系の場合、リン脂質の分子量 775 としてモル比で表示すると 1 : 0.6 : 0.3 となり、microvillus membrane の脂肪酸含量においても p-aminobenzoic acid の透過性は促進されるものと

理解される。

Korepanovaら¹⁴⁰⁾は phosphatidylcholine—cholesterol—linoleic acid 系の脂質黒膜について脂肪酸の添加量を変え検討したところ、脂肪酸が増すと膜の負電荷は増大するが、膜抵抗は、脂質モル比 1:1:3 においても多少減少するに過ぎないと述べている。本研究の場合、先の薬物透過実験に用いた脂肪酸添加の黒膜における諸性質を Table 27 に示したが、対照に比べ大きな相違は認め得なかった。膜抵抗に著明な変化が認められなかったことより、脂肪酸の効果は電解質イオンに対する膜の透過性変化ではないと推論される。

更に、脂肪酸による p-aminobenzoic acid の透過性促進効果に対する pH の影響について検討し、その結果を Table 28 に示す。これは pH 4.5 と pH 6.5 における linolenic acid の効果を比較したもので、脂肪酸の促進効果は p-aminobenzoic acid が非解離型で多く存在する pH 4.5 よりも、解離型で存在する pH 6.5 において著明であることが明らかとなった。このことは、p-aminobenzoic acid の腸管吸収に見られるように、非解離型分率や分配係数を指標として予測される以上に、生理的 pH で吸収性が良いことと相応する結果と考えられる。

Table 27 Effect of Fatty Acids on the Various Properties of Black Lipid Membranes

		Time of formation (min)	Breakdown voltage (mv)	Membrane resistance (Ω cm ²)
Control		1-2	250-300	5.9×10^7
Lauric acid	0.5 %	0.5-1	250-300	7.5×10^7
Stearic acid	0.5 %	0.5	250-300	7.7×10^7
Oleic acid	0.5 %	0.5	250-300	4.9×10^7

Table 28 Effect of Linolenic Acid on the Permeability Coefficient of p-Aminobenzoic Acid across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine at pH 4.5 and 6.5

		Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)	
		pH 4.5	pH 6.5
Control		20.1 ± 0.8	7.4 ± 1.0
Linolenic acid	0.1 %	22.2 ± 1.2	13.7 ± 2.2

Gebickiら¹⁴¹⁾は、長鎖脂肪酸から形成したリポソーム様の微小球体を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に分散すると、膜近傍の pH は対イオンとして存在する H⁺ のために bulk の pH よりも 3 unit 低く、それ故脂肪酸の解離は 50 % 程度であることを述べている。又、Hofmann¹⁴²⁾ は胆汁酸ミセルで可溶化された脂肪酸の pKa は、陰イオン界面活性剤である lauryl taurate ミセルの場合よりも

低い値が得られ、これは同一の bulk pH に対して胆汁酸ミセルの表面 pH は陰イオン界面活性剤ミセルのそれよりも高いことによって説明し得ることを報告している。

現在までの結果では、薬物の (1)膜への分配 (2)膜中の拡散 (3)膜からの放出 の諸過程において、脂肪酸が如何なる作用機序で酸性薬物の黒膜透過に関与しているかは十分論議し得ないが、Gebicki ら¹⁴⁾の知見並びに脂肪酸の効果は pH 4.5 よりも pH 6.5 において顕著であったこと、methyl linoleate, oleyl alcohol や後述する monolein では促進効果が乏しかったことを加味すると、脂肪酸の配向した膜では近傍の pH が bulk よりも低下し、弱酸性の薬物では非解離型の割合が増すために膜への分配過程が促進され、黒膜透過性が増大したものと推論される。又、p-aminobenzoic acid (pKa 4.8) と salicylic acid (pKa 3.0) に対する脂肪酸効果の相違も、両者の pKa 値によってある程度説明されると考える。

第2節 小腸脂質より形成した脂質黒膜における効果

前節において、egg phosphatidylcholine に脂肪酸を添加して形成した膜では、p-aminobenzoic acid, salicylic acid の透過性が増大し、脂質二分子膜に配向した遊離脂肪酸が酸性薬物の透過性に寄与している可能性が示唆された。そこで本来構成々分として脂肪酸を含有している小腸粘膜脂質について、脂肪酸の添加や小腸粘膜脂質を分画し、p-aminobenzoic acid の透過性に及ぼすそれらの影響について検討を加え、又、egg phosphatidylcholine 膜の場合と比較考察した。

Table 29 Effect of Fatty Acids on the Permeability Coefficient of p-Aminobenzoic Acid across Black Lipid Membranes Generated from Intestinal Lipid

		Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)
Control		14.4 ± 2.5
Stearic acid	0.1 %	10.8 ± 3.0
	0.5 %	8.9 ± 1.1
Oleic acid	0.1 %	12.8 ± 1.2

Table 29は、小腸脂質に脂肪酸を添加して黒膜を形成し、p-aminobenzoic acid の透過性を調べたものである。小腸全脂質膜における p-aminobenzoic acid の透過係数は、phosphatidylcholine膜に比べ約1.6倍大きな値が得られたが、これに更に stearic acid, oleic acid を添加してもそれ以上の透過性増大は見られなかった。逆に、0.5 % stearic acid 添加により p-aminobenzoic acid の透過係数に減少を認めた。これは多量の脂肪酸の存在によって、膜の流動性変化など別の因子の影響とも考えられるが、その詳細については未検討である。

次に小腸粘膜脂質中の脂肪酸の寄与を詳細に検索するため、全脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーによりリン脂質画分と脂肪酸、cholesterol などを含む中性脂質画分に分離し、各脂質画分について考察を加えた。分離した脂質の薄層クロマトグラムを Fig. 41に示した。これから明らかなよう

に、リン脂質画分、中性脂質画分の分離は完全であった。又、中性脂質画分を薄層で展開後、脂肪酸部分をかき取り定量したところ、脂肪酸は全中性脂質の約30%を占めていた。リン脂質画分を chloroform : methanol : water (65 : 25 : 4 by volume) 系で展開したところ、それらは主に phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine であることが確認された。

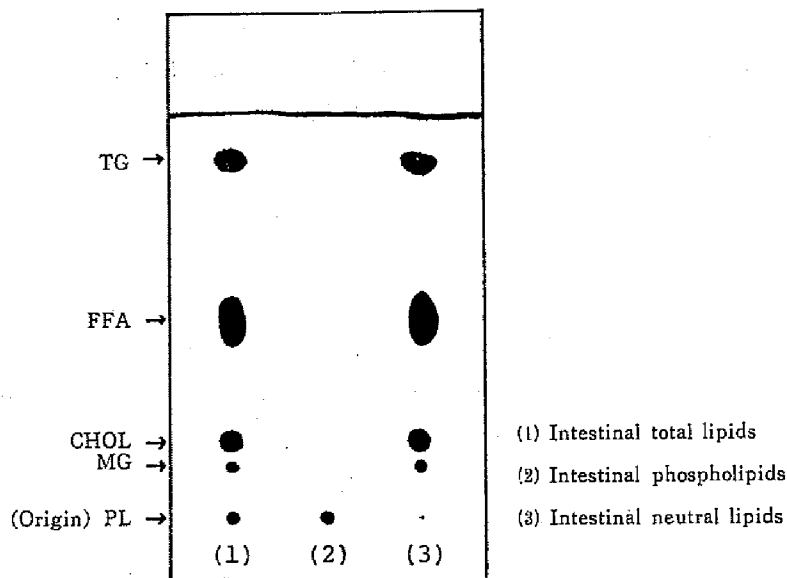


Fig. 41 Thin Layer Chromatogram of Intestinal Mucosal Lipids
 Developing solvent, hexane : ethyl ether : acetic acid = 70 : 30 : 1
 Key: PL, phospholipids; MG, monoglycerides; CHOL, cholesterol;
 FFA, free fatty acids; TG, triglycerides

Table 30 Effect of Fatty Acids on the Permeability Coefficient of
 p-Aminobenzoic Acid across Black Lipid Membranes
 Generated from Intestinal Phospholipids

	Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)
Egg phosphatidylcholine	7.4 ± 1.0
Intestinal total lipid	14.4 ± 2.5
Intestinal phospholipids	7.6 ± 1.1
+ Oleic acid 0.1 %	14.9 ± 1.7
+ Linolenic acid 0.1 %	15.3 ± 1.5

小腸リン脂質画分を用いて形成した膜における p-aminobenzoic acid の透過係数は、Table 30に示したように 7.6×10^{-5} cm/sec で、小腸全脂質膜の値より大幅に減少し、phosphatidylcholine 膜とほぼ等しくなった。小腸リン脂質画分には、phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine も存在し

Table 31 Effect of Intestinal Neutral Lipids and Monolein on the Permeability Coefficient of p-Aminobenzoic Acid across Black Lipid Membranes Generated from Egg Phosphatidylcholine

		Permeability coefficient (10^{-5} cm/sec)
Control		7.4±1.0
Intestinal neutral lipids	0.3 %	15.9±1.1
Monolein	0.1 %	9.9±1.0

ており、egg phosphatidylcholine とは多少異なるが、このリン脂質画分だけでは小腸全脂質膜において p-aminobenzoic acid の透過性の良いことを説明することはできない。しかし、このリン脂質画分に oleic acid, linolenic acid などの脂肪酸を添加して形成した黒膜では、p-aminobenzoic acid の透過性が増大し、小腸全脂質膜に見られた透過係数にほぼ回復した。

更に、脂肪酸などを含む中性脂質画分の寄与を明確にするために、Table 31に示す如く p-aminobenzoic acid の phosphatidylcholine 膜透過性に対する中性脂質画分添加の影響について検討したところ、p-aminobenzoic acid の透過性は phosphatidylcholine 膜に比し有意に増大することが認められた。又、小腸中性脂質としては、cholesterol、脂肪酸の他にグリセリドも存在している。そこで、グリセリドの一つとして monolein を phosphatidylcholine に添加して膜を形成し、p-aminobenzoic acid の透過性を検討したが、顕著な効果は認められなかった。これらの結果より、p-aminobenzoic acid の透過性増大に関与しているのは、小腸中性脂質画分中の脂肪酸であることが判明した。

Stricker¹⁴³⁾は、消化管吸収の simulator を開発するために種々の lipid barrier について検討した結果、caprylic acid—lauryl alcohol (80:20) をしみこませた membrane filter は腸管粘膜モデルとして最も妥当であり、酸性薬物の in vivo 腸管吸収の動向ともかなり相関性を有することを報告している。この lipid barrier は、リン脂質の二分子層を基盤とした一般の生体膜モデル¹⁴⁴⁾とは形態を異にするが、Brodieら、¹⁰⁸⁾ Fordtranら¹⁴⁵⁾は小腸上皮細胞の理論的モデルとして、管腔表面はわずかに酸性であり、膜近傍ではH⁺を含む陽イオンが過剰に存在すると唱えていることを考慮すると、membrane filter 中の caprylic acid が小腸粘膜に類似した機能を果していることが推察される。

本研究では、脂肪酸が小腸 microvillus membrane の構成脂質であることに着目して、薬物の黒膜透過に及ぼす各種脂肪酸類の影響について検討を加えた。phosphatidylcholine に脂肪酸を添加し形成した膜では、p-aminobenzoic acid や salicylic acid の透過性が促進されることを前節において言及したが、更に小腸脂質膜の p-aminobenzoic acid に対する透過性は phosphatidylcholine 膜に比して大きく、これには小腸中性脂質画分中の脂肪酸が主因となっていることを明らかにした。以上の結果は、小腸粘膜の microvillus membrane に配向している遊離脂肪酸が、酸性薬物の易吸収性に寄与していることを示唆するものであり、これら薬物の消化管吸収機構を解明する上で興味ある知見と考えられる。

第3節 考 察

前章で示した小腸脂質膜と他の脂質膜系における薬物透過性の相違について、小腸粘膜脂質成分である脂肪酸に注目して解明を試みるために、egg phosphatidylcholine, 小腸脂質を用いて脂肪酸類添加の影響並びに小腸脂質の分画の影響について検討を加えた。

phosphatidylcholine—cholesterol系に stearic acid 0.5%を添加し形成した膜の薬物透過性を検索したところ、salicylamide では有意な効果を認め得なかったが、p-aminobenzoic acid, salicylic acid は対照に比べ増大し、小腸脂質の場合と類似した透過係数が得られた。不飽和脂肪酸では0.1%の添加によっても p-aminobenzoic acid の透過を顕著に促進したが、methyl linoleate, monolein の促進効果は少なかった。又、p-aminobenzoic acid に対する脂肪酸の効果は、pH4.5よりも pH 6.5において著明であることがわかった。

一方、構成々分として脂肪酸が存在している小腸脂質について p-aminobenzoic acid の透過性を検討したところ、脂肪酸を添加してもそれ以上の透過性増大は見られず、むしろ stearic acid 0.5% 添加により p-aminobenzoic acid の透過係数が減少した。次に小腸全脂質をリン脂質画分と cholesterol, 脂肪酸を含む中性脂質画分に分離し、各脂質画分の p-aminobenzoic acid 透過に対する寄与を検討した。リン脂質画分から形成した膜の透過係数は、全脂質膜の値より減少し、phosphatidylcholine 膜の値とほぼ等しくなった。このリン脂質画分に脂肪酸を加えた膜では、p-aminobenzoic acid の透過が再び増し、又、egg phosphatidylcholine に中性脂質画分を添加して形成した膜でも透過性増大を認めた。従って、小腸脂質膜の p-aminobenzoic acid に対する透過性が egg phosphatidylcholine 膜に比して大きいのは、小腸中性脂質画分中の脂肪酸に起因することが判明した。

以上の知見より、小腸粘膜の microvillus membrane に配向している脂肪酸が、生理的 pH領域における酸性薬物の易吸収性に寄与していることが推察された。

結 論

以上、著者は3編にわたり水溶性薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響、及びその機構について検討を加え次のような結論を得た。

(I) 薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響

腸管腔内や吸収膜面に対する脂肪酸の効果を明らかにするために、脂肪酸の物理化学的性状や吸収特性を考慮して短鎖、中鎖脂肪酸は水溶液とし、長鎖脂肪酸は主に胆汁酸塩で可溶化して用い、薬物の消化管吸収に及ぼす影響について *in situ* ラット吸収実験法により検討した。

短鎖脂肪酸を添加することにより、生理的 pH 領域で負電荷を有する酸性薬物では吸収が抑制され、一方正電荷を有する塩基性薬物及び非解離型で存在する中性薬物では吸収が促進された。更にこれと関連して、水の吸収促進及び灌流液 pH の増大が認められた。又、中鎖脂肪酸の共存によってもほぼ同様の効果が見られた。薬物と脂肪酸との相互作用、及び小腸吸収膜面に対する脂肪酸の直接作用は認められず、薬物吸収に及ぼすこれら脂肪酸の影響は水の移動、腸粘膜近傍の pH 変化などの生理的効果によることが明らかとなった。

次に、脂肪を摂取した時、腸管内で生ずる脂肪酸やモノグリセリド並びに分泌される胆汁酸塩などの挙動と関連して薬物の腸管吸収を考察するために、長鎖脂肪酸類可溶化溶液からの薬物吸収について検討を行ったところ、脂溶性の高い薬物では胆汁酸塩単独の場合に比べ吸収抑制が、又水溶性の難吸収性薬物では胆汁酸塩による吸収促進作用の減少が認められた。これらの影響は、長鎖脂肪酸が胆汁酸塩と混合ミセルを形成することによる薬物—ミセル相互作用の増大や、胆汁酸塩の吸収膜面に対する直接作用の緩和に起因する効果であると考えられた。

(II) 薬物の消化管吸収に及ぼす食餌性脂質の影響

次に、生理的状態に近い系において投与された食餌性脂質の消化管粘膜に及ぼす効果を明らかにするために、脂肪酸類を胃内に1回投与、あるいは無脂肪食を一定期間連続投与したラット腸管からの薬物吸収について検討を加えた。

小腸組織への蓄積性の大きい bromsulfophthalein などの水溶性色素では、長鎖脂肪酸類胃内前投与により腸管への蓄積が減少したが、血流中への移行は増大した。一方、能動輸送される L-tryptophan は中鎖脂肪酸類胃内前投与において吸収抑制が認められた。薬物吸収に見られるこのような興味ある変動は、*in situ*, *in vitro* 実験結果より、吸収膜面あるいは上皮細胞内に存在する脂肪酸の量、種類に支配された効果であることが明らかとなった。

無脂肪食を投与したラットでは、sulfaguanidine, metoclopramide, A.C.D.B. などの中性、塩基性薬物の吸収は変化しなかったが、酸性薬物である p-aminobenzoic acid, sulfisoxazole などでは腸管吸収の低下が認められた。小腸 brush border 脂質組成を検討したところ、正常時には主にリン脂質, cholesterol, 脂肪酸, トリグリセリドから成っていたが、無脂肪食投与の場合脂肪酸が減少しており、後述の膜透過実験と併せ考察した結果、これが酸性薬物の吸収に一部関与していることが判明した。

(III) 薬物の脂質黒膜透過に及ぼす脂肪酸類の影響

(I)(II)で薬物の *in situ* 消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響について検索し、主に管腔内や小腸粘膜における種々の効果を明らかにした。更に、薬物吸収の律速段階と考えられている brush border 膜の透過性に、膜脂質組成の脂肪酸が関与することを認めた。膜レベルにおける脂肪酸類の役割を明らかにすることは、薬物の吸収機構を解明する上で重要な問題であるが、*in situ* 吸収実験法では多くの要因が関与するため基礎的検討が困難である。著者は、再構成膜として脂質黒膜を用い、小腸粘膜脂質や egg phosphatidylcholine などから形成した膜の薬物透過性、並びにこれに対する脂肪酸類の効果について考察を加えた。

薬物の黒膜透過性は、脂溶性の高い salicylamide において大きかったが、p-aminobenzoic acid などの酸性薬物の場合には分配係数から予測されるよりも良く、しかも phosphatidylcholine や他の臓器脂質に比べ小腸全脂質系で大きな透過係数が得られた。これら酸性薬物は *in situ* 小腸吸収実験でもいわゆる pH-分配仮説に従わず、生理的 pH 領域で吸収の良いことが報告されている。

phosphatidylcholine に種々の脂肪酸を添加した膜は p-aminobenzoic acid, salicylic acid の透過性増大が認められたが、小腸全脂質では脂肪酸を添加しても透過係数は増加しなかった。小腸全脂質をリン脂質画分と脂肪酸、cholesterol などを含む中性脂質画分に分離すると、リン脂質画分の膜における p-aminobenzoic acid の透過係数は phosphatidylcholine 膜の値とほぼ等しくなった。リン脂質画分に脂肪酸を加えると p-aminobenzoic acid の透過性は増大し、又 phosphatidylcholine に中性脂質画分を添加しても透過性が増大した。

これらの結果より、小腸粘膜脂質より形成された膜は他の脂質の膜とは異なった薬物透過性を示すこと、更に小腸粘膜脂質中の脂肪酸が p-aminobenzoic acid などの酸性薬物の透過を促進していることが明らかとなり、小腸の microvillus membrane に配向している遊離脂肪酸が、酸性薬物の易吸収性に関与していることが示唆された。

以上、著者は水溶性薬物の消化管吸収に及ぼす脂肪酸類の影響に関して、脂肪酸共存による効果、食餌性脂質の腸管粘膜に対する効果、更に *in vitro* 人工膜における構成脂質としての脂肪酸の役割について系統的に検討を行った。その結果、薬物の物理化学的性状や腸管吸収特性、並びに脂肪酸の種類やその投与法に相応して、(1)短鎖、中鎖脂肪酸の吸収に伴う水の移動や吸収膜面近傍の pH 増大によって薬物の吸収が変化する場合、(2)胆汁酸塩-長鎖脂肪酸類混合ミセルとの相互作用によって有効薬物濃度が低下する場合、(3)混合ミセルあるいは脂肪酸の吸収膜面に対する直接作用によって透過性や能動輸送系が変化する場合、(4)細胞質タンパクに負荷された長鎖脂肪酸によって薬物の上皮細胞内移行性が変化する場合、(5)膜に配向した脂肪酸によって酸性薬物の透過が促進される場合など、薬物の吸収が、これまで未知であった脂肪酸のこのような種々の作用によって変化するという興味ある事実を明らかにすることができた。これらの研究結果は、薬物の bioavailability や製剤添加物の評価、製剤学的手法による drug delivery system への応用、並びに消化管吸収機構の解明上有益な基礎的知見となりうるものと考えられる。

謝 辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学瀬崎 仁教授、並びに広島大学堀 了平教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益な御助言と御指導を戴いた京都大学村西昌三助教授、同花井哲也助教授、広島大学奥村勝彦助教授、京都大学木村聡城郎助手、並びに教室員一同に深謝します。

さらに実験の一部に御協力戴いた佐川真理子学士、山北博一修士、神谷加津恵修士、石原真知子学士、岩川精吾修士、中村洋美学士、二野宮弘美学士、鍵本雄次学士、徳本圭伊子学士に深く感謝致します。

実験の部

第I編 実験の部

第1章 短鎖脂肪酸の影響

(1-1) モデル薬物のラット小腸からの吸収

(1) 試薬及び試料溶液の調製

pyridine-2-aldoxime methiodide (P.A.M. と略す), bromsulfophthalein は Sigma 社のもの, bromphenol blue, evans blue は Merck 社のもの, metoclopramide, 2-allyloxy-4-chloro-N-(2-diethylaminoethyl)benzamide hydrochloride (A.C.D.B. と略す), imipramine は藤沢薬品より供与されたもの, procainamide は Squibb 社より供与されたもの, 他の薬物は局方品あるいは市販特級品を用いた。

通常 pH 6.5等張リン酸緩衝液 (0.163 M NaH_2PO_4 —0.123 M Na_2HPO_4) に薬物を溶解して試料溶液とした。

(2) 吸収実験法

体重160~210gの Wistar 系雄性ラットを実験前15~20時間絶食し, pentobarbital (40~45 mg/kg) で麻酔後固定する。腹部正中線に沿って開腹し幽門部と回盲接合部にカテーテルを挿入し結紮する。胆汁の影響を除外するため胆管も同時に結紮しておく。生理食塩水で小腸内を洗浄後カテーテルを灌流ポンプに接続し, 毎分5 ml の速度で37°に加温した試料溶液40 ml を連続灌流する。又, 直腸温は実験中36~37°に保つ。灌流開始一定時間後に腸管内の灌流液をできるだけ回収し, 次いで生理食塩水で装置及び腸管腔内を洗浄する。洗液を灌流液に加え全量を100 ml とし定量に供した。吸収量は, 原液と回収液中の薬物量の差から算出した。

(3) 薬物の定量法

日立181形分光光度計を用いて紫外部及び可視部の吸光度測定により定量した。

(a) Sulfadimethoxine, Sulfaguanidine, Sulfanilamide, Sulfisoxazole, p-Aminobenzoic acid, Sulfanilic acid, Procainamide, Metoclopramide

検液 (0.04 mM) 1 ml に 1 N-HCl 5 ml, 及び0.2 % NaNO_2 溶液0.2 ml を加え3分間放置する。0.2 % sulfamic acid 溶液0.5 ml を加え更に3分間放置した後, 0.2 % 津田試液0.2 ml を加えて呈色させる。metoclopramide はジアゾ化合物が不安定であるため遮光, 氷冷下で行う必要がある。

sulfisoxazole, p-aminobenzoic acid は呈色30分後, その他は15分後に NaCl 3 g, isoamyl alcohol 5 ml を加え, 10分間振とう後遠心分離し, isoamyl alcohol 層の吸光度を次の波長で測定した。

sulfadimethoxine, sulfaguanidine, sulfanilamide : 550 nm, sulfisoxazole, p-aminobenzoic acid : 555 nm, sulfanilic acid : 560 nm, procainamide : 562 nm, metoclopramide : 541 nm

(b) Salicylic acid

検液 (0.08 mM) 4 ml に 4 N-HCl 1 ml, chloroform 5 ml を加え, 15分間振とう後遠心分離する。

水層を除去し、chloroform 層 3 ml に 0.5 N-NaOH 5 ml を加え 15 分間振とう後遠心分離する。水層 4 ml に 4 N-HCl 1 ml を加え 302 nm における吸光度を測定した。

(c) Caffeine

検液 (0.4 mM) 1 ml に chloroform 6 ml を加え、30 分間振とう後遠心分離し、chloroform 層の 276 nm における吸光度を測定した。

(d) P.A.M.

検液 (0.4 mM) 1 ml に 0.1 N-HCl 4 ml, isoamyl alcohol (予め蒸留水で飽和) を加え、20 分間振とう後遠心分離する。水層 3 ml に 0.2 N-NaOH 5 ml を加え 336 nm における吸光度を測定した。

(e) Quinine

検液 (0.08 mM) 2 ml に 3 N-NaOH 1 ml, ethylene dichloride 7 ml を加え、20 分間振とう後遠心分離する。ethylene dichloride 層 5 ml に 1 N-HCl 5 ml を加え、10 分間振とう後遠心分離し、水層の 251 nm における吸光度を測定した。

(f) A.C.D.B.

検液 (0.4 mM) 1 ml に 1 N-NaOH 1 ml, NaCl 0.5 g, benzene 5 ml を加え、30 分間振とう後遠心分離し benzene 層の 294 nm における吸光度を benzene に対して測定した。

(g) Imipramine

検液 (0.4 mM) 1 ml に 3 N-NaOH 1 ml, NaCl 1 g, n-heptane 7 ml を加え、30 分間振とう後遠心分離する。heptane 層 5 ml に 1 N-HCl 5 ml を加え、15 分間振とう後遠心分離し、水層の 251 nm における吸光度を測定した。

(h) Bromsulphthalein

検液 (0.04 mM) 1 ml に 0.2 M Na_2CO_3 溶液 5 ml を加え 580 nm における吸光度を測定した。

(i) Phenol red

検液 (0.04 mM) 1 ml に 1 N-NaOH 5 ml を加え、557 nm における吸光度を測定した。

(j) Bromphenol blue

検液 (0.04 mM) 1 ml に pH 7.4 リン酸緩衝液 5 ml を加え、600 nm における吸光度を測定した。

(k) Evans blue

検液 (0.04 mM) 1 ml に 生理食塩水 5 ml を加え、620 nm における吸光度を測定した。

(l) Methylene blue

検液 (0.04 mM) 1 ml に NaCl 0.5 g, ethylene dichloride 7 ml を加え、15 分間振とう後遠心分離し、ethylene dichloride 層の 657 nm における吸光度を測定した。

(m) L-,D-Tryptophan

Spiesら¹⁴⁶⁾の方法のうち、A法を準用した。褐色試験管に p-dimethylaminobenzaldehyde 30 mg を含む 2 N- H_2SO_4 1 ml, 18.7 N- H_2SO_4 7 ml を加え混和した後、検液 (0.2 mM) 1 ml を加え室温、暗所にて 4 時間放置する。更に 0.068 % NaNO_2 溶液 0.1 ml を加え、1 時間放置した後 585 nm における吸光度を測定した。

(4) モデル薬物の小腸からの吸収

(2)の方法に従って、pH 6.5 における各種モデル薬物の 1 時間の吸収率を測定した。結果は総論の

部 Table 2 に示した。

(1-2) 短鎖脂肪酸の吸収

(1) 試薬及び試料溶液の調製

propionic acid は Merck 社のもの、butyric acid, caproic acid, methyl butyrate は半井化学のものを用いた。

脂肪酸を含む試料溶液の調製は、脂肪酸及び当量の NaOH を等張リン酸緩衝液に溶解し、これらを等張化するため計算量の蒸留水を加えた後 pH 6.5 に調整して用いた。Na-free の mannitol 溶液は、脂肪酸及び当量の KOH を蒸留水に溶解し、更に等張化量の mannitol を加え pH 6.5 に調整して用いた。

(2) 短鎖脂肪酸の定量

短鎖脂肪酸の定量は Baker¹⁷⁾の方法を一部変更し、以下の条件でガスクロマトグラフィーにより行った。

Column : 1.5 m × 3.0 mm (i.d.), glass

Packing : 10 % FFAP on acid-washed, silanized Chromosorb W (60-80 mesh)

Column temperature : 145°

Injection temperature : 240°

N₂ flow rate : 40 ml/min

H₂ flow rate : 40 ml/min

Air flow rate : 700 ml/min

Sample size : 2 μl

Apparatus : Shimadzu GC-5A FID

注入試料は、脂肪酸を含む希釈した灌流液 5 ml に 25 % metaphosphoric acid 1 ml を加え除タンパクし、遠心分離後その上澄を使用した。内部標準としては caproic acid あるいは butyric acid を用いた。

(3) Butyric acid の吸収

結果は総論の部 Fig. 1, Table 3 に示した。

(1-3) 薬物の吸収に及ぼす影響

(1) 薬物の吸収に及ぼす butyric acid の影響

(1-1)(1-2)に記載した方法に従って、薬物及び種々の濃度の butyric acid を含む試料溶液を調製し、吸収実験を行った。薬物の吸収は30分間の吸収率で表わし、通常少なくともラット4匹の平均値±標準偏差値を示した。結果は総論の部 Table 4, Fig. 2, Fig. 3 に示した。

(2) 薬物の反転腸管への取り込みに及ぼす butyric acid の影響

ラットは pentobarbital 麻酔下で、小腸を摘出し冷生理食塩水で腸管の内外を洗浄後、水分をぬぐいとり反転する。漿膜側に何も入れない状態で袋とし、吸収実験と同じ濃度の試料溶液 10 ml 中に浸し37°で1分間インキュベートした後、外液の薬物濃度の減少から取り込まれた量を算出した。結果は Table 1 に示す。

Table 1 Effect of Butyric Acid on the Uptake of Drugs into the Everted Intestine

Drug	Uptake into the intestine in 1 min (%)	
	Control	50 mM Butyric acid
Sulfisoxazole	1.8±1.3	1.8±1.3
Salicylic acid	11.9±0.3	11.7±0.7
Metoclopramide	4.8±0.9	5.5±1.4
A.C.D.B.	10.0±1.6	11.5±0.5

(3) 薬物の分配係数に及ぼす脂肪酸の影響

吸収実験の際と同様に薬物及び脂肪酸を緩衝液に溶解する。この試料溶液 5 ml を共栓試験管に取り、chloroform 5 ml を加え37°で10分毎に30秒間激しく振とうする。この操作を1時間繰り返し、両層が分離するまで放置する。水層中の薬物を定量し、見かけの分配係数を次式から求めた。

$$\text{見かけの分配係数} = \frac{\text{水層中の初濃度} - \text{分配平衡成立後の水層中の濃度}}{\text{分配平衡成立後の水層中の濃度}}$$

結果は Table 2 に示す。

Table 2 Effect of Fatty Acids on the Apparent Partition Coefficient of Drugs to Chloroform at pH 6.5

Drug	Partition coefficient			
	Control	Propionic acid	Butyric acid	Caproic acid
Sulfisoxazole	0.1	0.1	0.1	0.1
Caffeine	17.5	19.1	18.8	19.8
Metoclopramide	2.8	3.3	2.3	5.0

Concentration of fatty acids=50 mM

Table 3 Effect of Pretreatment with Butyric Acid on the Absorption of Drugs

Drug	% absorbed in 30 minutes		
	Control	Coexistence	Pretreatment
Sulfisoxazole	30.7±2.5	20.6±4.3	28.7±1.3
Caffeine	46.9±5.6	55.4±7.4	49.4±1.8
Metoclopramide	12.2±2.8	26.0±3.2	16.0±1.4

Concentration of butyric acid=50 mM

(4) 薬物の吸収に及ぼす butyric acid 前処置の影響

(1-1)(2)で述べた方法に従って、まず薬物を含まない脂肪酸溶液で30分間灌流後、37°に温めた生理食塩水で腸管腔内を洗浄する。次に薬物のみ含む試料溶液を30分間灌流し、薬物の吸収率を測定した。結果は Table 3 に示す。

(1-4) 薬物の吸収と水の移動との関連性

(1) 凝固点降下法による灌流液の浸透圧測定

Beckmann 凝固点測定装置を用い、生理食塩水、pH 6.5等張リン酸緩衝液、50 mM butyric acid 溶液及び灌流実験後の butyric acid 溶液について凝固点降下度を測定した。結果は Table 4 に示す。

Table 4 Freezing Point Depression of Various Solutions

	Freezing point depression (°C)
0.45 % NaCl solution	0.30
0.90 % NaCl solution	0.60
Isotonic phosphate buffer	0.59
50 mM Butyric acid solution	0.61
/ perfused for 30 minutes	0.61
/ perfused for 60 minutes	0.61

(2) 水の吸収量及び水の移動比の測定

試料溶液40 ml をメスシリンダーに入れ、(1-1)(2)の方法に従い吸収実験を行う。灌流開始後5分毎にその容積を測定し、容積変化の直線から30分間の容積減少量を求め水の吸収量とした。更に次の式より灌流前後の容積比を算出し、これを水の移動比とした。

$$\text{水の移動比} = \frac{\text{灌流後の容積}}{\text{灌流前の容積}} = \frac{40 - \text{水の吸収量}}{40}$$

結果は総論の部 Fig. 4, Table 5 に示した。

(3) 薬物の吸収と水の移動との関連性

各種脂肪酸類共存時における薬物の吸収率と水の移動比との関係について検討した。なお回帰直線は、等張緩衝液の他に $\frac{1}{2}$ 等張、 $\frac{1}{3}$ 等張緩衝液 (pH 6.5) で薬物のみ含む試料溶液を調製し、これらの薬物吸収率、並びに水の移動比を測定して求めた。結果は総論の部 Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 に示した。

(1-5) 静注薬物の腸管腔内への移行性に及ぼす影響

(1) 小腸管腔内へ分泌される薬物量の測定 (Exsorption 実験)

(1-1)(2)で述べた吸収実験の場合と同様に手術する。sulfisoxazole (30 mg) あるいは metoclopramide (8 mg) を含む50 % N,N'-dimethylacetamide-生理食塩水溶液0.5 ml をラット大腿静脈

から静注し、同時に腸管内には pH 6.5 等張リン酸緩衝液を毎分 5 ml の速度で 1 回灌流する。灌流液は 5 分毎に集め、回収した液に含まれる薬物量から exsorption 速度を算出する。脂肪酸の影響を検討する場合には、1 時間後より灌流液は脂肪酸を含む緩衝液とし、更に 1 時間後には再び脂肪酸を含まない緩衝液に戻した。

(2) 薬物の定量法

(a) Sulfisoxazole

検液 5 ml に濃 HCl 0.5 ml を加え、以下 (1-1)(3)(a) に従ってジアゾ化法により定量した。

(b) Metoclopramide

Aritaら¹⁴⁸⁾の方法によって未変化体を分離定量した。検液 5 ml に 2 N-NaOH 1 ml, chloroform 5 ml を加え、20 分間振とう後遠心分離する。更に chloroform 層 3 ml に 0.067 M KH_2PO_4 4 ml を加え 10 分間振とう後遠心分離する。水層 3 ml に 2 N-HCl 2 ml を加え、以下 (1-1)(3)(a) に従ってジアゾ化法により定量した。

(3) 静注薬物の腸管腔内への移行性に及ぼす影響

結果は総論の部 Fig. 8 に示した。

第 2 章 中鎖脂肪酸の影響

(2-1) 薬物の吸収に及ぼす影響

(1) 試薬

caprylic acid は東京化成のものを用いた。

(2) 薬物の吸収に及ぼす caprylic acid の影響

吸収実験は (1-1)(1-2)(1-3)(1-4) に記載した方法に従って行った。結果は総論の部 Table 6, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14 に示した。

(3) Sulfisoxazole の吸収に及ぼす caprylic acid 前処置の影響

(1-3)(4) で述べた方法に従って、30 mM caprylic acid の前処置の影響について検討し、薬物の吸収率及び水の移動比を測定した。対照は緩衝液のみで前処置を行った。結果は Table 5 に示す。

Table 5 Effect of Pretreatment with Caprylic Acid on the Absorption of Sulfisoxazole

	% absorbed in 30 min	Water transfer ratio
Control	24.8±3.3	0.99±0.00
30 mM Caprylic acid	26.1±0.9	0.99±0.01

(4) Caprylic acid の定量

回収液中の caprylic acid は Cohenら¹⁴⁹⁾の方法に従って抽出し、ガスクロマトグラフィーにより定量した。

検液 2 ml に 1 N-H₂SO₄ 1 ml, ethanol-toluene (1:2 by volume) 9 ml を加え, 10 分間振とう後遠心分離する。toluene 層 1 ml を取り減圧乾固した後, 内部標準として chloroform に溶解した decanoic acid 1 ml を加え注入試料とした。ガスクロマトグラフィーは以下の条件で行った。

Column : 1.5 m × 3.0 mm (i.d.), glass

Packing : DEGS+H₃PO₄ (5 + 1%) on acid-washed, silanized Chromosorb W (60-80 mesh)

Column temperature : 130°

Injection temperature : 200°

N₂ flow rate : 60 ml/min

H₂ flow rate : 50 ml/min

Air flow rate : 900 ml/min

Sample size : 2 μl

Apparatus : Shimadzu GC-6A FID

(2-2) 静注薬物の腸管腔内への移行性に及ぼす影響

sulfisoxazole, metoclopramide の投与量はそれぞれ 30 mg, 4 mg とし, 脂肪酸溶液は 20 mM caprylic acid あるいは 30 mM caprylic acid を用い, (1-5) に示した方法に従って行った。結果は総論の部 Fig. 15 に示した。

第 3 章 長鎖脂肪酸の影響

(3-1) 薬物の吸収に及ぼす影響

(1) 試薬

lauric acid, palmitic acid, sodium lauryl sulfate は半井化学のもの, oleic acid, oleyl alcohol, monolein は東京化成のものを用いた。sodium taurocholate は Norman¹⁵⁰⁾の方法に従って合成し, 薄層クロマトグラフィーで単一のものを使用した。

(2) 吸収実験法

長鎖脂肪酸は水に難溶性であるため, sodium taurocholate あるいは sodium lauryl sulfate などの界面活性剤で可溶化して用いた。すなわち, pH 6.5 等張リン酸緩衝液に薬物を溶解し, 種々の濃度の脂肪酸類及び界面活性剤を添加して試料溶液とし, (1-1) で示した方法に従って吸収実験を行い, 1 時間の吸収率を測定した。

Table 6 Effect of Sodium Lauryl Sulfate and Oleic Acid on the Intestinal Absorption of A.C.D.B.

Adjuvant	% absorbed in 60 minutes
Control	43.1 ± 2.8
20 mM Sodium lauryl sulfate	15.0 ± 1.3
20 mM Sodium lauryl sulfate + 6 mM Oleic acid	10.8 ± 0.1

(3) 薬物吸収に及ぼす影響

結果は Table 6, 総論の部 Table 7 に示した。

(4) 薬物の吸収に及ぼす前処置の影響

(1-3)(4)で述べた方法に従って行い, 1時間の吸収率を測定した。結果は総論の部 Fig. 16に示した。

(5) ミセル相互作用の測定

Sephadex G-25 Fine (Pharmacia 社) を用い Ashworthら⁶⁹⁾の分子篩法に準じた。ゲルの外側容積の測定には Blue Dextran 2000 (平均分子量2,000,000 Pharmacia 社) を使用した。

(a) 検量線の作成

薬物及び Blue Dextran それぞれについて検量線を作成する。Blue Dextran の定量は水溶液の 622 nm における吸光度を測定した。

(b) 外液の体積の測定

Sephadex 4.000 g に pH 6.5等張リン酸緩衝液15 ml を加え2時間膨潤させる。次に0.1% Blue Dextran 5 ml と緩衝液 5 ml を加え, 37°で1時間振とう後15分間静置する。その上澄液を取り, 遠心分離して Blue Dextran を定量する。検量線からその濃度を求め, Sephadex 網目構造の外液体積を算定した。結果は15.45 ml であった。

(c) 内相 (Sephadex 網目構造内) の薬物量と外液の薬物濃度との関係

膨潤 Sephadex に緩衝液 5 ml と適当な濃度の薬物溶液 5 ml を加え, (b)と同様に操作後, 薬物の定量を行なう。外液の薬物濃度と外液の体積 (15.45 ml) から外液の薬物量を算出し, 添加した薬物量との差から内相の薬物量を求めた。縦軸に内相の薬物量, 横軸に外液の薬物濃度をとると直線関係が得られた。

(d) ミセル複合体形成の測定

吸収実験に用いた濃度の5倍濃度の脂肪酸可溶性溶液 5 ml 及び薬物溶液 5 ml を膨潤 Sephadexに 加え, 37°で1時間振とうする。15分間静置して上澄液を採取し, 遠心分離後, 薬物を定量する。外液の薬物濃度と外液の体積 (15.45 ml) から外液の薬物量 (遊離薬物とミセル複合体形成した薬物の和) が算出される。添加した薬物量との差から内相の薬物量が求められ, (c)で得られた関係から外液中の遊離薬物濃度, 遊離薬物量が算定される。薬物のミセル複合体形成は次の値で表示した。

$$\frac{\text{遊離薬物量} + \text{ミセル複合体形成薬物量}}{\text{遊離薬物量}}$$

結果は3例の平均とし, 総論の部 Table 8, Fig. 17, Fig. 18に示した。

(3-2) Procainamide に対する効果

結果は総論の部 Table 9 に示した。

(3-3) A.C.D.B. に対する効果

結果は総論の部 Fig. 17, Fig. 18に示した。

第Ⅱ編 実験の部

第1章 脂肪酸類胃内前投与の影響

(1-1) 薬物の吸収に及ぼす影響

(1) 試薬

caprylic acid, oleic acid, linoleic acid, tricaprylin, triolein, oleyl alcohol は東京化成のもの、methyl caprylate, octyl alcohol は半井化学のもの、olive oil は和光純薬のもの、safflower oil は片山化学のものを用いた。

(2) 吸収実験法

15~18時間絶食したラットを用い、経ロゾンデで脂質を1 ml 胃内に投与し、3時間後に pentobarbital 麻酔下、腹部正中線に沿って開腹し、幽門部と回盲接合部にカテーテルを挿入、結紮する。胆管も同時に結紮する。腸管腔内を約60 ml の生理食塩水で洗浄後、in situ 小腸連続灌流法あるいはループ法により吸収実験を行った。なお対照には15~20時間絶食したラットを用いた。試料溶液はpH 6.5等張リン酸緩衝液に薬物のみを溶解して使用した。

(a) 小腸連続灌流法

第Ⅰ編実験の部(1-1)(2)に記載した方法に従って行い、灌流時間は1時間とした。

(b) 小腸ループ法

灌流ポンプを用いず、小腸全体のループとする。試料溶液5 ml を腸管内に注入し、腸管内の空気を追い出したのちループの両端を閉じる。1時間後、腸管内の試料溶液を回収し、次いで生理食塩水で洗浄を行い、回収液と洗液を合わせて50 ml とする。原液からの減少薬物量を吸収量とした。

(3) 薬物の吸収に及ぼす影響

safflower oil, linoleic acid 投与3時間後に吸収実験を行った。結果は総論の部 Table 10に示した。

(4) 薬物の反転腸管への取り込みに及ぼす影響

対照及び脂質を投与したラットを用いて、第Ⅰ編実験の部(1-3)(2)に示した方法で反転腸管の袋を作り、予め O₂-CO₂ (95:5 by volume) 混合ガスを飽和した0.1 mM 薬物溶液10 ml で10分間インキュベート(37°, 毎分70回振とう)する。組織中に取り込まれた量は、外液の薬物濃度の減少から算出した。結果は総論の部 Fig. 19に示した。

(1-2) Bromsulphthalein に対する効果

(1) Bromsulphthalein の吸収に及ぼす影響

bromsulphthalein の濃度は特に記さない限り5 mMとした。結果は総論の部 Table 11, Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22に示した。

(2) Bromsulphthalein の小腸組織内蓄積

(1-1)(2)(b)で述べたループ法による吸収実験終了後、直ちに小腸を摘出し漿膜側の水分をぬぐい取る。組織を小片に細断し、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで生理食塩水を加えて50 ml のホモジネートを調製する。その5 ml に acetone 5 ml を加え、15分間振とう後1500 g で20分間遠心分

離する。上澄を希釈し、第 I 編実験の部 (1-1)(3)(h)に従って定量した。結果は総論の部 Fig. 22 に示した。

(3) Bromsulphothalein の反転腸管への取り込みに及ぼす影響

5 mM bromsulphothalein 溶液 10 ml を用い、(1-1)(4)に示した方法に従いインキュベートし、5, 10, 30, 60分後に外液を0.5 ml ずつ採取し定量に供した。結果は総論の部 Fig. 23に示した。

(4) Cycloheximide 処理の影響

生理食塩水に溶解した cycloheximide (0.2 mg/ml) を用い、脂質を投与する 2 時間前に 0.6 mg/kg の割合で絶食したラットの腹腔内に注入する。脂質投与 3 時間後に (1-1)(2)(b)に示した方法に従い、bromsulphothalein の吸収実験を行い吸収率及び組織内蓄積率を測定した。対照は cycloheximide 腹腔内注入 5 時間後の吸収について、同様に検討した。結果は Table 7 に示す。又、正常時の

Table 7 Effect of Cycloheximide Treatment on Bromsulphothalein Absorption and Accumulation

	% absorbed in 60 min	% accumulated in 60 min
Normal		
Control	40.1±2.1	34.7±1.7
Safflower oil	29.7±4.9	20.9±5.3
Linoleic acid	21.2±3.2	14.9±3.5
Cycloheximide (0.6 mg/kg)		
Control	26.0±4.0	20.8±4.2
Safflower oil	22.7±4.2	17.7±3.4
Linoleic acid	20.1±3.7	15.9±2.9

対照の値を 1 とし、これに対する比で表示し、グラフにしたものが総論の部 Fig. 24 である。

(5) Bromsulphothalein の胆汁中排泄

ラットの胆管にカテーテルを挿入後、(1-1)(2)(b)に示した方法に従って bromsulphothalein の吸収実験を行い、同時に胆汁も採取する。胆汁は秤量した後、生理食塩水で 10 ml とし定量に供した。結果は各期間の胆汁中濃度及び量で表わし Table 8 に示す。又、2 時間までの累積排泄量を示したのが総論の部 Fig. 25 である。

(1-3) L-Tryptophan に対する効果

(1) 吸収実験法

L-tryptophan を pH 6.5 等張リン酸緩衝液に溶解して各種濃度の試料溶液を調製し、(1-1)(2)(a)に示した方法に従って行った。但し、L-tryptophan の吸収は速やかであるため灌流時間は 30 分間とした。

(2) L-Tryptophan の吸収に及ぼす影響

Table 8 Effect of Pre-administered Lipids on the Biliary Appearance of Bromsulphthalein Placed in the Intestinal Loop

	Concentration (mM)			Amount (μ mole)		
	0-30 min	30-60 min	60-120 min	0-30 min	30-60 min	60-120 min
Control	0.150 \pm 0.067	0.708 \pm 0.222	0.556 \pm 0.161	0.042 \pm 0.024	0.226 \pm 0.052	0.506 \pm 0.102
Safflower oil	0.249 \pm 0.111	1.061 \pm 0.460	1.153 \pm 0.773	0.064 \pm 0.031	0.302 \pm 0.116	0.772 \pm 0.268
Linoleic acid	0.330 \pm 0.134	1.121 \pm 0.306	1.054 \pm 0.331	0.082 \pm 0.030	0.373 \pm 0.094	0.919 \pm 0.257

Dose of bromsulphthalein = 25 μ mole

結果は総論の部 Table 12, Fig. 26, Fig. 27, Fig. 28, Fig. 30に示した。

(3) 血中 tryptophan 濃度の測定

吸収実験終了後直ちに頸動脈より採血し、1500 g 10分間遠心分離する。血漿 1 ml に、30 % trichloroacetic acid 1 ml を加え除タンパクし、遠心分離後その上澄 1 ml を定量に供した。結果は総論の部 Fig. 29に示した。

(4) L-Tryptophan の反転腸管への取り込み及び反転腸管透過性

Ca, Mg を除いた Krebs-phosphate 緩衝液 (pH 6.5) に L-tryptophan を溶解した後、O₂-CO₂ (95 : 5 by volume) 混合ガスで飽和し試料溶液とした。

(a) 反転腸管への初期取り込み

0.25 mM L-tryptophan 溶液 10 ml を用い、(1-1) (4) に示した方法に従いインキュベートし、1, 2, 3, 5 分後に外液を 0.5 ml ずつ採取し定量に供した。結果は総論の部 Fig. 31に示した。

(b) 反転腸管の透過性

Wilsonら¹⁵¹⁾の方法に準じた。空腸部から得られた 2 個の切片 (7 cm) を反転した後、袋とし漿膜側に試料溶液 1 ml を注入する。これを同じ濃度の試料溶液 5 ml を入れた Erlenmeyer フラスコ中に移し、37°, 毎分 70 回転との条件下で 60 分間インキュベートする。終了後、粘膜側溶液及び漿膜側溶液 0.5 ml を取って tryptophan 濃度を測定し、漿膜側対粘膜側の濃度比を算定した。結果は総論の部 Fig. 32に示した。

(5) D-Tryptophan の吸収に及ぼす影響

結果は総論の部 Table 13に示した。

(6) L-Tryptophan の吸収に及ぼす caprylic acid 併用の影響

結果は総論の部 Table 14に示した。

(7) 灌流液中のタンパク量の測定

灌流液としては tryptophan を含まない pH 6.5 リン酸緩衝液を用い、(1)と同様に 30 分間灌流を行う。回収液を生理食塩水で希釈後、Lowryら¹⁵²⁾の方法に従ってタンパク量を測定した。検量線の作成には bovine serum albumin (Fraction V 生化学工業) を使用した。結果は総論の部 Table 15に示した。

第2章 無脂肪食投与の影響

(2-1) 薬物の吸収に及ぼす影響

(1) 飼料及び動物

無脂肪食には精製飼料（オリエンタル酵母）を使用し、その組成を Table 9 に示す。対照には飼育用固型飼料（オリエンタル酵母）を用いた。ラットは、投与期間が2週間以内の場合には120~150gのものを、それ以上投与する時には80~100gのものを使用し、投与期間中は定期的に体重を測定した。総論の部 Fig. 33に成長曲線の一例を示した。

(2) 吸収実験法

一定期間飼料を投与した160~210gのラットを15~20時間絶食し、第I編実験の部(1-1)(2)に示した方法に従って行った。灌流時間は1時間とし、試料溶液はpH 6.5等張リン酸緩衝液に薬物のみを溶解して用いた。

Table 9 Composition of Fat-Free Diet

コーンスターチ	44%
ミルクカゼイン	25
アルファー澱粉	10
粉末濾紙	8
無機塩類 ^{a)}	6
グラニュー糖	5
ビタミン類 ^{b)}	2

Contents in 100 g of fat-free diet

a) 無機塩類

K	692 mg
P	597 mg
Ca	411 mg
Na	270 mg
Mg	86 mg
Fe	41 mg
Zn	0.4 mg
Mn	1.3 mg
Cu	0.08 mg
I	7.7 mg

b) ビタミン類

Vitamin A	1,000 IU
〃 D ₃	200 IU
〃 B ₁	2.4 mg
〃 B ₂	8.0 mg
〃 B ₆	1.6 mg
〃 B ₁₂	0.001 mg
〃 C	60.0 mg
〃 E	10.0 mg
〃 K ₃	10.4 mg
Biotin	0.04 mg
Folic acid	0.4 mg
Ca-pantothenate	10.0 mg
p-Aminobenzoic acid	10.0 mg
Niacin	12.0 mg
Inositol	12.0 mg
Cholin-Cl	400.0 mg

(3) 薬物吸収に及ぼす影響

結果は総論の部 Table 16, Table 17に示した。

(4) p-Aminobenzoic acid の空腸と回腸からの吸収に及ぼす影響

(2)と同様であるが、空腸としては Treiz 靱帯以下 20 cm, 回腸としては回盲接合部以上 20 cm とし、灌流液の容量は 20 ml とした。結果は総論の部 Table 18に示した。

(2-2) 小腸粘膜脂質組成の変動

(1) 小腸 brush border の調製

Forstnerら¹¹¹⁾の方法に準じて調製した。15~18時間絶食したラットの小腸を摘出し、冷生理食塩水で腸管内外を洗浄後、水分を濾紙で除き 10~15 cm の長さに切断する。氷塊を敷きつめたガラス板上で腸管を縦に切開し、カバーガラスで粘膜層を剝離する。粘膜を秤量後、75容の氷冷した 5 mM EDTA 溶液 (pH 7.4) を加え、Waring Blendor で 25 秒間ホモジナイズする。450 g で 10 分間遠心分離後、沈殿を 5 容の 5 mM EDTA 溶液で洗浄、遠心分離の操作を 3 回繰り返す。得られた沈殿を brush border 画分として脂質の抽出に用いた。

(2) brush border 脂質の抽出

Kates¹¹²⁾の方法を準用した。乾燥重量約 40~50 mg に相当する brush border 画分を蒸留水で 1 ml に希釈し、methanol-chloroform (2 : 1 by volume) 3.75 ml を加える。室温で一晩放置後遠心分離し、上澄を取る。残分を methanol : chloroform : 水 (2 : 1 : 0.8 by volume) 4.75 ml に再び懸濁させ遠心分離する。全上澄抽出液に chloroform, 蒸留水を各々 2.5 ml 加え、混合物を遠心分離する。chloroform 層を分取し benzene を加え (微量の水を除くため) ロータリーエバポレーターを用いて乾固する。これを chloroform に溶解し、0°以下で保存した。

(3) 薄層クロマトグラフィー

silica gel G (Merck社) を用い、薄層の厚さは通常 0.25 mm, 調製用の場合には 1 mm としてプレートを作製し、120°で 2 時間活性化した後使用した。展開溶媒は hexane : ethyl ether : acetic acid (80 : 20 : 1 又は 70 : 30 : 1 by volume) 系を用い、検出にはリンモリブデン酸 (10 % ethanol 溶液) あるいはヨウ素を用いた。

(4) 脂質の薄層クロマトグラム

対照及び無脂肪食を投与したラットの brush border 脂質 (100 µg), 並びに標準として egg phosphatidylcholine (50 µg), cholesterol (25 µg), oleic acid (25 µg) の chloroform 溶液をマイクロシリンジで定量的に薄層プレートにスポットし、hexane : ethyl ether : acetic acid (80 : 20 : 1 by volume) で展開後リンモリブデン酸で検出した。結果は総論の部 Fig. 34に示した。

(5) 脂質の定量法

(a) 遊離脂肪酸

Duncombe¹⁵³⁾の方法を準用した。検液 (chloroform 溶液) 5 ml に銅試液 (1 M triethanolamine : 1 N acetic acid : 6.45 % $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} = 9 : 1 : 10$ by volume) 3 ml を加え、10分間振とう後遠心分離する。上層を除き、chloroform 層 3 ml を注意深く取り、diethyldithiocarbamate 試液 (0.1 % n-butanol 溶液) 0.5 ml を加え 440 nm における吸光度を測定した。

(b) Cholesterol

Zlatkisら¹⁵⁴⁾の方法を準用した。検液 (chloroform 溶液) 0.5 ml を乾固し, *o*-phthalaldehyde 試液 (0.05 %水酢酸溶液) 2 ml を加え溶解する。更に濃 H₂SO₄ 1 ml を加え, 550 nm における吸光度を測定した。

(6) brush border 脂質中の脂肪酸及び cholesterol 含量

脂質 (800 μg) を調製用プレートに定量的にスポットし, hexane : ethyl ether : acetic acid (70 : 30 : 1 by volume) で展開する。ヨウ素蒸気下で脂肪酸及び cholesterol 部分を確認した後かき取り, chloroform : methanol : ethyl ether (1 : 1 : 1 by volume) 混合溶媒 5 ml で繰り返し 3 回抽出し, 全抽出溶媒を合して乾固する。脂肪酸は残査を chloroform 5 ml に溶解して定量に供した。cholesterol は残査を chloroform 2 ml に溶解し, その 0.5 ml を取り定量に供した。結果は総論の部 Table 19 に示した。

第Ⅲ編 実験の部

第1章 脂質黒膜実験法の検討

(1-1) 膜形成脂質及び脂質黒膜の形成法

(1) 試薬

L- α -phosphatidylcholine (Type III E : from egg yolk), oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, monolein, methyl linoleate, oleyl alcohol は Sigma 社のもの, cholesterol, cholesterol acetate, lauric acid, stearic acid, n-decane は半井化学のものを用いた。

(2) 臓器脂質の抽出

脂質の抽出は Folch^ら¹²³⁾ の方法に準じた。体重160~200 g のラットを16~20時間絶食後 pentobarbital 麻酔下頸動脈より瀉血し、小腸、脳、肝、肺を摘出する。小腸粘膜については、腸管内外を冷生理食塩水で洗浄し、カバーガラスで粘膜層を剝離する。組織を秤量後、20~30容の chloroform : methanol (2 : 1 by volume) 混合溶媒でホモジナイズし、室温で一晩放置する。滲液に0.2容の1% NaCl 溶液を加え (最終的な容積比を chloroform : methanol : 水 = 8 : 4 : 3 になるようにする) 分液ロートで振とうして非脂質成分を除去する。二層に分離後下層を分取し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去する。更に、真空ポンプで減圧乾固 (P₂O₅下) した後、得られた全脂質を秤量し1% chloroform 溶液として用いた。脂質溶液は N₂ガス置換し0°以下で保存し、4週間以内のものを使用した。通常、各組織から得られる全脂質重量 (mg) は単位湿組織重量 (g) あたり、小腸粘膜27, 脳70, 肝50, 肺35であった。

(3) 薄層クロマトグラフィー

第Ⅱ編実験の部 (2-2) (4) に示した方法に従った。展開溶媒には chloroform : methanol : 水 (65 : 25 : 4 by volume) あるいは hexane : ethyl ether : acetic acid (70 : 30 : 1 又は 80 : 20 : 1 by volume) 系を用いた。

(4) 臓器脂質の組成

小腸粘膜、脳、肝、肺の全脂質を各々100 μ g、並びに標準として egg phosphatidylcholine (50 μ g) cholesterol (25 μ g), oleic acid (25 μ g) を定量的に薄層プレートにスポットし、hexane : ethyl ether : acetic acid (80 : 20 : 1 by volume) で展開後リンモリブデン酸で検出した。結果は総論の部 Fig. 35に示した。

(5) 脂質黒膜形成法

(a) 膜形成脂質溶液の調製

phosphatidylcholine 又は各臓器組織より得られた脂質の1% chloroform 溶液1 ml を試料ビンに取り必要に応じて cholesterol, 脂肪酸などの添加物を加え N₂ 気流下 chloroform を除去し、更に真空ポンプを用いて減圧乾固する。これを n-decane 1 ml に溶解して膜形成脂質とした。

(b) 脂質黒膜形成法

25°の恒温室において、Hanai^ら¹²³⁾ の方法に基づいて行った。空気中でテフロンポットの全面に脂質溶液を小筆で塗り自然乾燥させ、この操作を3回繰り返す (前塗り過程)。総論の部 Fig. 36に示し

たように、pH 6.5等張リン酸緩衝液80 mlを入れたガラスセル内にこのポットを固定し、白金黒電極を挿入する。電極は短絡しておく。水相中でポットの前面、側面に脂質溶液を速やかに塗り最後に直径約1.5 mmの穴の部分にも塗り1時間程度放置する(慣らし過程)。十分慣らされたと判断した後、適量の脂質溶液をつけた小筆で穴の部分に膜を形成する。長焦点顕微鏡で観察すると、最初は脂質分子がランダムに配向した厚い膜で全面に虹色の干渉縞が見られるが、次第に下方より干渉縞が消え黒い部分が広がり、周囲に光の輪のみが見られる黒膜となる(黒化過程)。Fig. 1は膜形成過程を模式的に示したものである。¹²⁾ 黒化が起りにくい場合には、60~80 mVの電圧を負荷することにより黒膜の形成が促進される。又、平らな膜を得るために、膜面の様子を観察しながらポットの内外にマイクロシリンジで緩衝液を滴下し、水圧を補正した。内相及び外相の容積は各々約7 ml, 73 mlである。

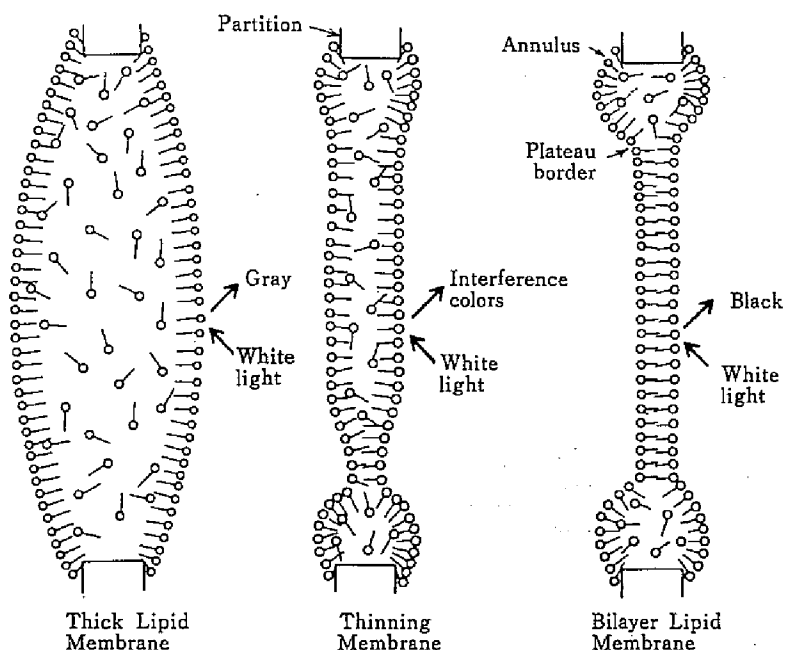
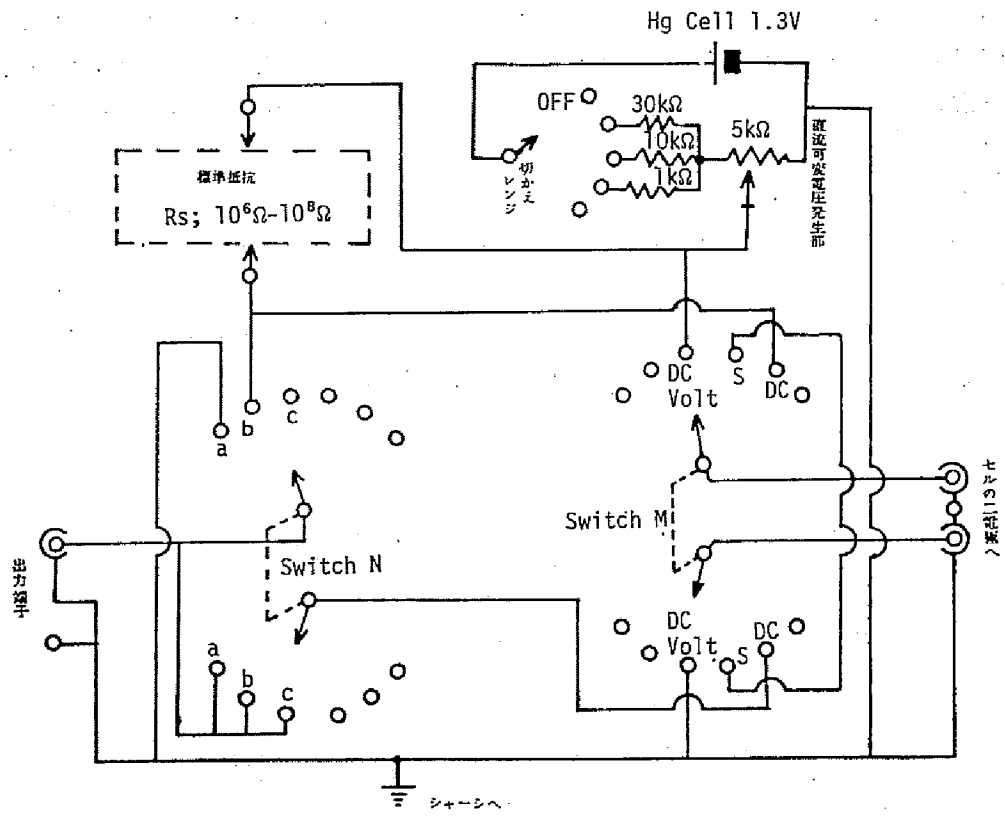


Fig. 1 Diagram Illustrating the Three Stages Observed during Thinning of a Lipid Membrane in Aqueous Media, and Indicating the Patterns of Reflected Light

(c) 膜の電気的性質の測定(抵抗, 消光電圧, 破壊電圧)

Fig. 2に示す測定制御スイッチ箱を膜測定電極及び electrometer (Keithley 610C)に接続する。膜の電気抵抗は黒膜形成15~25分後に、膜系に0~100 mVの直流電圧をかけ、電流を測定して抵抗を算出した。なおその時の膜面積を測り、比抵抗($\Omega \cdot \text{cm}^2$)として表現した。又、膜の様子を顕微鏡で観察しながら順次、膜系に電圧をかけてゆき、膜辺縁の光の輪が消える「消光電圧」及び膜が破れるに至る「破壊電圧」を測定した。

膜抵抗測定の一例として、1% phosphatidylcholine—0.5% cholesterolより形成した黒膜について直流電圧—電流の関係を Fig. 3に示す。直線になることから、抵抗値が Ohm の法則に従っ



出力端子につなぐ計器	スイッチ N の位置	回路様式
電流計	N-a	標準抵抗, セル電極
	N-b	
	N-c	

スイッチ M の位置	回路機構
DC Volt	セルの二電極間に直流可変電圧がかかる
S	セルの二電極を短絡する
DC	セル系の直流電圧-電流関係を測定できる

Fig. 2 Circuit Diagram of Switch Box for Electrical Measurements

ていることが確かめられる。この勾配から $V/I = 5.06 \times 10^9 \Omega$ となる。直列に標準抵抗 $R_s = 0.98 \times 10^8 \Omega$ が入っていることから膜の抵抗は $R = V/I = R_s - 4.96 \times 10^9 \Omega$ となる。この場合膜面積は $0.876 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ であったから、膜の比抵抗として $4.34 \times 10^7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ と算出される。

(1-2) Egg phosphatidylcholine 及び膜脂質より形成した脂質黒膜の諸性質

(1) 種々の脂質より形成した膜の黒化時間, 破壊電圧及び膜形成時間

結果は総論の部 Table 20, Table 21に示した。

(2) Cholesterol 添加の影響

結果は総論の部 Table 20, Table 21に示した。

(3) 黒膜の経時的安定性 (膜抵抗の経時変化)

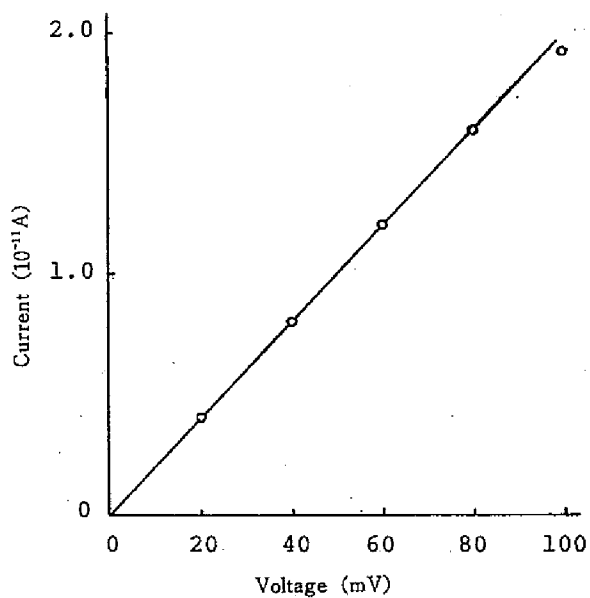


Fig. 3 Current-Voltage Relationship for a Black Lipid Membrane

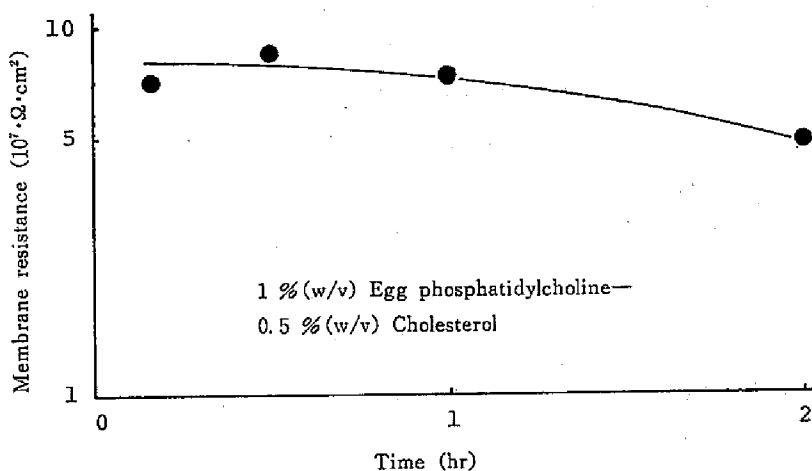


Fig. 4 Electrical Resistance versus Time after Formation of Black Lipid Membrane

(a) Phosphatidylcholine 膜

1 % (w/v) phosphatidylcholine—0.5 % (w/v) cholesterol について Fig. 4 に示す。

(b) 小腸脂質膜

1 % (w/v) intestinal lipid—0.3 % (w/v) cholesterol について総論の部 Fig. 37 に示した。

第2章 薬物の脂質黒膜透過性

(2-1) 各種の脂質より形成した脂質黒膜の薬物透過性

(1) 薬物透過実験法

(a) 試料溶液の調製

salicylamide (1.5 mg/ml), salicylic acid (7.5 mg/ml), p-aminobenzoic acid (7.5 mg/ml), L-tryptophan (7.5 mg/ml) をpH 6.5リン酸緩衝液に溶解して試料溶液とした。

(b) 薬物透過実験

膜の電気測定の結果より、慣らしが十分で安定な膜が得られると判断した段階で、水層を5 ml採取する。これは薬物定量の際、水層中に存在する脂質溶液等のブランク補正に使用する。15~30分間放置した後、透過実験に用いる膜を形成し、黒化時間、膜面積等を測定する。黒膜形成10分後、ポットの内側に薬物溶液0.2 ml, 外側には緩衝液1.25 mlを同時に注入し30分又は60分間の透過実験を行う。透過期間中顕微鏡で膜面の状態を観察し、平面の膜を保つように水圧補正をすると共に、10~15分毎に膜面積を測定する。透過の完了時には、次の操作により内液、外液を採取する。膜面積を測定した後、流動パラフィン (Merck社) をつけた小筆で穴をすばやく塞ぎ、内液、続いて外液全量をアスピレーターにより可及的速やかに各々のメスシリンダーに移す。内液、外液の容積を測定した後、適宜 pH 6.5緩衝液で希釈し蛍光定量法により薬物濃度を測定した。

流動パラフィンをつけた小筆によって穴を塞ぐ際に、薬物濃度の高い内液の漏出が存在するか否かを検討するために、30秒間の薬物透過実験を同様に行ったところ、外液の薬物濃度は無視しえた。従って試料溶液を採取する時に、内液、外液が混合している可能性はないと考えた。

(c) 薬物の膜透過係数

薬物の膜透過係数は次の式に従って算出し、薬物透過性の指標にした。

$$J = \frac{C_o V_o}{A t} = P (C_i - C_o)$$

P : 透過係数 (cm/sec) A : 膜面積 (cm²)

V_o : 外液の容積 (ml) t : 透過時間 (sec)

C_i : 内液の薬物濃度 (μg/ml)

C_o : 外液の薬物濃度 (μg/ml)

(2) 分配係数の測定

第I編実験の部(1-3)(3)に示した方法により25°における分配係数を測定した。

(3) 薬物の定量法

外液はそのまま、内液は pH 6.5緩衝液で希釈した後、液性を調節し、日立204形蛍光々度計を用いて蛍光法により薬物濃度を測定した。

(a) Salicylamide

Barrら¹⁵⁵⁾の方法に準じた。検液5 mlに1 N-NaOH 0.5 mlを加え、励起波長330 nm, 蛍光波長415nmで測定した。標準には1.2×10⁻² μg/mlのsalicylamide溶液5 mlを同様にアルカリ性にして用いた。

(b) Salicylic acid

Udenfriendら¹⁵⁶⁾の方法に準じた。pH 6.5緩衝溶液のまま、励起波長300 nm、蛍光波長400 nmで測定した。標準には0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸キニーネ (0.1 N- H_2SO_4 溶液)を用いた。

(c) p-Aminobenzoic acid

Udenfriendら¹⁵⁶⁾の方法に準じた。検液 5 ml に 1 N-NaOH 0.5 ml を加え、励起波長295 nm、蛍光波長345 nm で測定した。標準には 3×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{ml}$ p-aminobenzoic acid 溶液 5 ml を同様にアルカリ性にして用いた。

(d) Tryptophan

Udenfriendら¹⁵⁶⁾の方法に準じた。検液 5 ml に 2 M Na_2CO_3 1 ml を加え、励起波長280 nm、蛍光波長360 nm で測定した。標準には 7.5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{ml}$ の tryptophan 溶液 5 ml を同様にアルカリ性にして用いた。

(4) Salicylic acid 透過に及ぼす温度の影響

17~29°で salicylic acid の黒膜透過実験を行い、各温度における透過係数を求める。透過係数が Arrhenius の式

$$P = A \exp(-E_a/RT)$$

P : 透過係数 A : 定数

E_a : 活性化エネルギー R : ガス定数 T : 絶対温度

に従うと仮定して $\log P$ と $1/T$ の関係を図示すると直線関係が得られた。結果は総論の部 Fig. 38 に示した。又、傾き ($-E_a/R$) より活性化エネルギーを算出した。

$$E_a = 21.1 \text{ kcal/mole/degree}$$

(5) 薬物の分配係数と egg phosphatidylcholine 膜透過性

結果は総論の部 Table 22 に示した。

(6) pH の影響

水層には pH 4.5 (citric acid— Na_2HPO_4), pH 6.5 (NaH_2PO_4 — Na_2HPO_4) 等張緩衝液を用いた。結果は総論の部 Table 23 に示した。

(7) Egg phosphatidylcholine, 及び小腸, 脳, 肝の脂質より形成した黒膜の薬物透過性 phosphatidylcholine には cholesterol 0.5 %, 他の脂質には cholesterol 0.3 % を添加した。結果は総論の部 Table 24 に示した。

(2-2) Cholesterol 及び cholesterol acetate 添加の影響

(1) Salicylamide, salicylic acid の透過に及ぼす cholesterol 添加の影響 : phosphatidylcholine 膜 結果は総論の部 Fig. 39 に示した。

(2) Salicylamide, salicylic acid の透過に及ぼす cholesterol 添加の影響 : 小腸脂質膜 結果は総論の部 Fig. 39 に示した。

(3) Salicylamide, salicylic acid の透過に及ぼす cholesterol acetate の影響 : phosphatidylcholine 膜 結果は総論の部 Fig. 40 に示した。

(4) Salicylamide, salicylic acid の透過に及ぼす cholesterol acetate の影響 : 小腸脂質膜 結果は Fig. 5 に示す。

	None	Cholesterol 0.3 (w/v%)	Cholesterol acetate 0.5 (w/v%)
Time of formation (min)	6	1	4
Breakdown voltage (mV)	180-250	300-350	170-200
Resistance ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	2.0×10^8	3.3×10^8	0.3×10^8

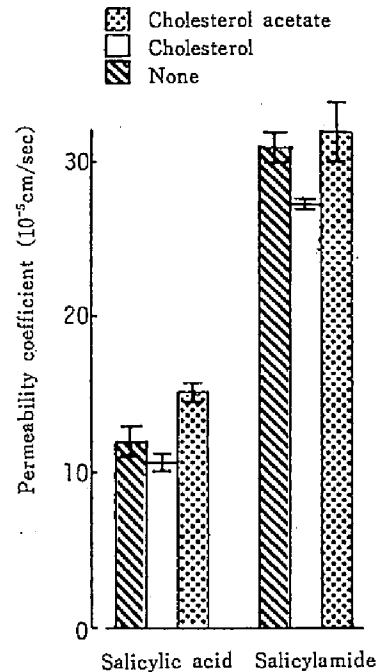


Fig. 5 Effect of Cholesterol Acetate on Membrane Properties and Drug Transfer in Black Lipid Membranes Generated from Intestinal Lipid

第3章 酸性薬物の脂質黒膜透過に及ぼす脂肪酸類の影響

(3-1) Egg phosphatidylcholine より形成した脂質黒膜における効果

(1) Salicylamide, salicylic acid, p-aminobenzoic acid の透過に及ぼす stearic acid の影響

1% egg phosphatidylcholine—0.3% cholesterol に stearic acid 0.5% を添加して黒膜を形成した。結果は総論の部 Table 25に示した。

(2) p-Aminobenzoic acid の透過に及ぼす脂肪酸の影響

結果は総論の部 Table 26に示した。

(3) p-Aminobenzoic acid に対する脂肪酸の効果に及ぼす pH の影響

結果は総論の部 Table 28に示した。

(4) 脂質黒膜の電気的性質に及ぼす脂肪酸の影響

結果は総論の部 Table 27に示した。

(3-2) 小腸脂質より形成した脂質黒膜における効果

(1) ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる小腸全脂質の分離

(a) カラムの調製

Silicic acid (Mallinckrodt社, 100mesh) を methanol で洗浄し, 110~120°で12時間活性化する。活性化した silicic acid 5~8g を methanol に懸濁させ, 内径1cm の活栓付きクロマト管に充填した。(長さ13~15cm)

(b) 小腸全脂質の分離

カラムを30 ml の methanol で洗淨した後, 30 ml の chloroform を流して置換する。小腸全脂質 100 mg を chloroform 1 ml に溶解してカラムにかけ, chloroform 200 ml で中性脂質画分を溶出し続いて methanol 200 ml でリン脂質画分を溶出した。各画分は減圧乾固した後, 1% chloroform 溶液に調製した。全脂質100 mg に対しリン脂質画分約40 mg, 中性脂質画分約35 mg を得た。

(c) リン脂質画分及び中性脂質画分の組成

結果は総論の部 Fig. 41に示した。

(2) p-Aminobenzoic acid の透過に及ぼす脂肪酸の影響

1% intestinal lipid—0.3% cholesterol に脂肪酸を添加して黒膜を形成した。結果は総論の部 Table 29に示した。

(3) 小腸リン脂質画分より形成した黒膜における p-aminobenzoic acid の透過性並びにこれに対する脂肪酸の影響

cholesterol を0.3% 添加して黒膜を形成した。結果は総論の部 Table 30に示した。

(4) p-Aminobenzoic acid の透過に及ぼす小腸中性脂質画分並びに monolein の影響

1% egg phosphatidylcholine—0.3% cholesterol に小腸中性脂質画分 (0.3%), monolein (0.1~0.5%) を添加して黒膜を形成した。結果は総論の部 Table 31に示した。

引用文献

- 1) A. Wretling, "Parenter. Nutr. Acute Metab. Illness," ed. by H.A. Lee, Academic Press, London-New York, 1974, p. 77.
- 2) G. Gregoriadis, *New Eng. J. Med.*, 295, 704 (1976); *ibid.*, 295, 765 (1976).
- 3) R. Jeppsson, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36, 299 (1975).
- 4) C.L. Fortner, W.R. Grove, D. Bowie, and M.D. Walker, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 32, 582 (1975).
- 5) Y. Nakamoto, M. Fujiwara, T. Noguchi, T. Kimura, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 2232 (1975).
- 6) J.M. Johnston, "Handbook of Physiology," Section 6, Alimentary Canal, Vol. 3, ed. by C.F. Code, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C., 1968, p. 1353.
- 7) B. Borgström, "Biomembranes," Vol. 4B, ed. by D.H. Smyth, Plenum Press, London-New York, 1974, p. 555.
- 8) R.K. Ockner and K.J. Isselbacher, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 71, 107 (1974).
- 9) T.R. Bates and M. Gibaldi, "Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences: Biopharmaceutics," ed. by J. Swarbrick, Lea & Febiger, Philadelphia, 1970, p. 57.
- 10) R.G. Crouse, *J. Invest. Derm.*, 37, 529 (1961).
- 11) P.J. Carrigan and T.R. Bates, *J. Pharm. Sci.*, 62, 1476 (1973).
- 12) R.H. Engel and M.J. Fahrenbach, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 129, 772 (1968).
- 13) H.M. Patel and B.E. Ryman, *Febs Lett.*, 62, 60 (1976).
- 14) J. Kelleher, T. Davies, C.L. Smith, B.E. Walker, and M.S. Losowsky, *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 42, 394 (1972).
- 15) S. Anderson, *Ann. Rev. Physiol.*, 35, 431 (1973).
- 16) J. Katz, *Med. Clin. North Amer.*, 57, 893 (1973).
- 17) P. Desnuelle, "Handbook of Physiology," Section 6, Alimentary Canal, Vol. 5, ed. by C.F. Code, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C., 1968, p. 2629.
- 18) M.C. Carey and D.M. Small, *Arch. Intern. Med.*, 130, 506 (1972).
- 19) A.F. Hofmann and H.S. Mekhjian, "The Bile Acids," Vol. 11, Plenum Press, New York, 1973, p. 103.
- 20) M.J. Jackson, "Biomembranes," Vol. 4B, ed. by D.H. Smyth, Plenum Press, London-New York, 1974, p. 673.
- 21) M.R. Playoust and K.J. Isselbacher, *J. Clin. Invest.*, 43, 878 (1964).
- 22) N.J. Greenberger and T.G. Skillman, *New Eng. J. Med.*, 280, 1045 (1969).
- 23) R.W. Harkins, J.B. Longenecker, and H.P. Sarett, *Gastroenterol.*, 47, 65 (1964).
- 24) J.F. Long and F.B. Brooks, *Am. J. Physiol.*, 209, 447 (1965).

- 25) J.W. Fara, E.H. Rubinstein, and R.R. Sonnenschein, *Science*, 166, 110 (1969).
- 26) S. Borgström and M. Arborelius, Jr., *Scand. J. Gastroenterol.*, 10, 599 (1975).
- 27) M. Gagnon and A.M. Dawson, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 99 (1968).
- 28) T.R. Bates, M. Gibaldi, and J.L. Kanig, *J. Pharm. Sci.*, 55, 901 (1966).
- 29) M. Gibaldi and S. Feldman, *J. Pharm. Sci.*, 59, 579 (1970).
- 30) K. Kakemi, H. Sezaki, R. Konishi, T. Kimura, and M. Murakami, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 275 (1970); K. Kakemi, H. Sezaki, R. Konishi, T. Kimura, and A. Okita, *ibid.*, 18, 1034 (1970).
- 31) D.C. Bloedow and W.L. Hayton, *J. Pharm. Sci.*, 65, 328 (1976).
- 32) J.G. Wagner, E.S. Gerard, and D.G. Kaiser, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 7, 610 (1966).
- 33) D.G. Kaiser, E.M. Glenn, R.H. Johnson, and R.L. Johnston, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 155, 174 (1967).
- 34) R.H. Engel, S.J. Riggi, and M.J. Fahrenbach, *Nature*, 291, 856 (1968).
- 35) E.F. Annison and D.G. Armstrong, "Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant," ed. by A.T. Phillipson, Oriel Press, Newcastle upon Tyne, England, 1970, p. 422.
- 36) R.A. Argenzio and M. Southworth, *Am. J. Physiol.*, 228, 454 (1974).
- 37) M.G. Yang, K. Manoharan, and O. Mickelsen, *J. Nutr.*, 100, 545 (1970).
- 38) R. Rubinstein, A.V. Howard, and O.M. Wrong, *Clin. Sci.*, 37, 549 (1969).
- 39) A.J. Chernov, W.F. Doe, and D. Gompertz, *Gut*, 13, 103 (1972).
- 40) H.W. Davenport, *Gastroenterol.*, 46, 245 (1964).
- 41) G. Flemström, B. Frenning and K.J. Öbrink, *Acta Physiol. Scand.*, 62, 422 (1964); G. Flemström, *ibid.*, 82, 1 (1971).
- 42) U.L. Ventura, J.F. Schlegel, and C.F. Code, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 50, 1140 (1972).
- 43) D.S. Parsons, *Brit. Med. Bull.*, 23, 252 (1967).
- 44) T.Z. Csáky, G. Esposito, A. Faelli, and V. Capraro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136, 242 (1971).
- 45) M.J. Wall, R.J. Declusin, K.H. Soergel, and R.D. Baker, *Biochim. Biophys. Acta*, 433, 654 (1976).
- 46) R.R. Levine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 131, 328 (1961).
- 47) R.N. Hardy, *J. Physiol.*, 204, 607 (1969).
- 48) K. Kakemi, T. Arita, R. Hori, and R. Konishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 15, 1883 (1967).
- 49) D.H. Smyth and C.B. Taylor, *J. Physiol. (London)*, 141, 73 (1958); R.J.C. Barry, M. J. Jackson, and D.H. Smyth, *ibid.*, 185, 667 (1966).
- 50) V.L. Sallee and J.M. Dietschy, *J. Lipid Res.*, 14, 475 (1973).
- 51) C. Naupert and K. Rommel, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 13, 553 (1975).

- 52) A.M. Dawson, C.D. Holdsworth, and J. Webb, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117, 97 (1964).
- 53) M.G. Schmitt, K.H. Soergel, and C.M. Wood, *Gastroenterol.*, 70, 211 (1976).
- 54) G. Esposito, A. Faelli, and V. Capraro, *Biochim. Biophys. Acta*, 426, 489 (1976).
- 55) S. Kitazawa, H. Ito, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 1856 (1975).
- 56) R.W. Ash and A. Dobson, *J. Physiol.*, 169, 39 (1963); A. Dobson and A.T. Phillipson, "Handbook of Physiology," Section 6, Alimentary Canal, Vol. 5, ed. by C.F. Code, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C., 1968, p. 2761.
- 57) 加嶋 敬, 日本消化器病学会雑誌, 67, 1082 (1970).
- 58) R. Bloch, F.J. Haberich, and H. Lorenz-Meyer, *Pflügers Arch.*, 335, 198 (1972).
- 59) A.N. Campbell and G.R. Lakshminarayanan, *Can. J. Chem.*, 43, 1729 (1965).
- 60) S. Feldman and M. Reinhard, *J. Pharm. Sci.*, 65, 1460 (1976).
- 61) A. Bezman-Tarcher, *J. Lipid Res.*, 10, 197 (1969).
- 62) A. Bach, D. Guisard, P. Metais, and G. Debry, *Arch. Sci. Physiol.*, 26, 121 (1972).
- 63) D. Rudman, T.J. Bixler II and A.E. Del Rio, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 176, 261 (1971).
- 64) G. Levy and J.A. Anello, *J. Pharm. Sci.*, 58, 494 (1969).
- 65) G. Levy and A. Perälä, *J. Pharm. Sci.*, 59, 875 (1970).
- 66) S. Feldman and M. Gibaldi, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132, 1031 (1969).
- 67) H.V. Ammon and S.F. Phillips, *J. Clin. Invest.*, 53, 205 (1974); H.V. Ammon, P.J. Thomas, and S.F. Phillips, *ibid.*, 53, 374 (1974).
- 68) T.S. Gaginella, P. Bass, W. Olsen, and A. Shug, *Febs Lett.*, 53, 347 (1975); T.S. Gaginella, J.J. Stewart, W.A. Olsen and P. Bass, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 195, 355 (1975).
- 69) R.W. Ashworth and D.D. Heard, *J. Pharm. Pharmacol.*, 18 Suppl., 98 S (1966).
- 70) G.G. Forstner, K. Tanaka, and K.J. Isselbacher, *Biochem. J.*, 109, 51 (1968).
- 71) B. Borgström, *Acta Physiol. Scand.*, 25, 315 (1952).
- 72) S.S. Raghavan, H.S. Juneja, S.K. Murthy, and J. Ganguly, *Nature*, 206, 189 (1965).
- 73) H.I. Friedman and R.R. Cardell, Jr., *J. Cell Biol.*, 52, 15 (1972).
- 74) R.K. Ockner, J.A. Manning, R.B. Poppenhausen, and W.K.L. Ho, *Science*, 177, 56 (1972); R.K. Ockner and J.A. Manning, *J. Clin. Invest.*, 54, 326 (1974); *idem, ibid.*, 58, 632 (1976).
- 75) E.W. Strauss, "Handbook of Physiology," Section 6, Alimentary Canal, Vol. 3, ed. by C.F. Code, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C., 1968, p. 1377.
- 76) A.J. Levi, Z. Gatmaitan, and I. M. Arias, *J. Clin. Invest.*, 48, 2156 (1969).
- 77) S. Mishkin, L. Stein, G. Gatmaitan, and I.M. Arias, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 997 (1972).

- 78) S.M. Sabesin and K.J. Isselbacher, *Science*, 147, 1149 (1965).
- 79) F.A. Jacobs and E.E. Largis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 130, 697 (1969).
- 80) R.A. Frizzell, H.N. Nellans, L.S. Acheson, and S.G. Schultz, *Biochim. Biophys. Acta*, 291, 302 (1973).
- 81) C.S. Tidball, *Am. J. Physiol.*, 206, 239 (1964).
- 82) T. Chang, J. Lewis, and A.J. Glazko, *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 1000 (1967).
- 83) Y. Israel, J.E. Valenzuela, I. Salazar, and G. Ugarte, *J. Nutr.*, 98, 222 (1969).
- 84) P. Holtzapple, W. Berman, and S. Segal, *Gastroenterol.*, 62, 849 (1972).
- 85) R.H. Imami, S. Reiser, and P.A. Christiansen, *J. Nutr.*, 100, 101 (1970).
- 86) S. Ahmed and B.L. Walker, *Biochim. Biophys. Acta*, 255, 815 (1972).
- 87) J.T. Johns and W.G. Bergen, *J. Nutr.*, 104, 300 (1974).
- 88) S. Reiser and P.A. Christiansen, *J. Lipid Res.*, 9, 606 (1968).
- 89) R.P. Spencer and A.H. Samiy, *Am. J. Physiol.*, 199, 1033 (1960).
- 90) K. Kakemi, H. Sezaki, M. Nakano, and E. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 2176 (1970).
- 91) S.G. Schultz, L. Yu-Tu, and C.K. Strecker, *Biochim. Biophys. Acta*, 288, 367 (1972).
- 92) D. Winne, *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 27 (1973).
- 93) F.A. Wilson and J.M. Dietschy, *Biochim. Biophys. Acta*, 363, 112 (1974).
- 94) D. Winne, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 277, 113 (1973).
- 95) H. Galbraith, T.B. Miller, A.M. Paton, and J.K. Thompson, *J. Appl. Bact.*, 34, 803 (1971).
- 96) K. Ahmed and B.S. Thomas, *J. Biol. Chem.*, 246, 103 (1971).
- 97) J. Maxild, *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 434 (1971).
- 98) R.F. Derr and L. Zieve, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 197, 675 (1976).
- 99) R.B. Alfin-Slater and L. Aftergood, *Physiol. Rev.*, 48, 758 (1968).
- 100) J.L. Moore, T. Richardson, and H.F. Deluca, *Chem. Phys. Lipids*, 3, 39 (1969).
- 101) L.F. Chen, D.B. Lund and T. Richardson, *Biochim. Biophys. Acta*, 225, 89 (1971).
- 102) W.P. Norred and A.E. Wade, *Biochem. Pharmacol.*, 21, 2887 (1972).
- 103) L. Rowe and E.D. Wills, *Biochem. Pharmacol.*, 25, 175 (1976).
- 104) R.L. Snipes, *Lab. Invest.*, 18, 179 (1968).
- 105) M. Yurkowski and B.L. Walker, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 48, 631 (1970).
- 106) S.B. Clark, T.E. Ekkers, A. Singh, J.A. Balint, P.R. Holt, and J.B. Rodgers, Jr., *J. Lipid Res.*, 14, 581 (1973).
- 107) R.N. Redinger, A.H. Hermann, and D.M. Small, *Gastroenterol.*, 64, 610 (1973).
- 108) B.B. Brodie and C.A.M. Hogben, *J. Pharm. Pharmacol.*, 9, 345 (1957); L.S. Schanker, D.J. Tocco, B.B. Brodie, and C.A.M. Hogben, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 123, 81 (1958); C.A.M. Hogben, D.J. Tocco, B.B. Brodie, and L.S. Schanker, *ibid.*, 125, 275

(1959).

- 109) K. Kakemi, T. Arita, R. Hori, R. Konishi, K. Nishimura, H. Matsui, and T. Nishimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 255 (1969).
- 110) V.F. Smolen, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 77 (1973).
- 111) G.G. Forstner, S.M. Sabesin, and K.J. Isselbacher, *Biochem. J.*, **106**, 381 (1968).
- 112) M. Kates, "Techniques of Lipidology," ed. by T.S. Work and E. Work, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1972; 邦訳, 山川民夫, 斉藤国彦, 林陽, "脂質研究法," 東京化学同人, p. 63.
- 113) P.F. Millington and D.R. Critchley, *Life Sci.*, **7**, 839 (1968).
- 114) K. Kawai, M. Fujita, and M. Nakao, *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 222 (1974).
- 115) P.B. Cotton, *Digestion*, **8**, 239 (1973).
- 116) J.T. Doluisio and J.V. Swintosky, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 1594 (1965).
- 117) J. Perrin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **19**, 25 (1967).
- 118) G. Levy and E.J. Mrosczak, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 235 (1968).
- 119) P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, and W.C. Wescott, *Nature*, **194**, 979 (1962).
- 120) A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
- 121) M.K. Jain, "The Bimolecular Lipid Membrane: A System," Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1972.
- 122) J. Folch, M. Lees, and G.H. Sloanestaley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 123) T. Hanai, D.A. Haydon and J. Taylor, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **A 281**, 377 (1964).
- 124) H.T. Tien, "The Chemistry of Biosurfaces," Vol. 1, ed. by M. L. Hair, Marcel Dekker, New York, 1971, p. 233.
- 125) R.C. Bean, W.C. Shepherd, and H. Chan, *J. Gen. Physiol.*, **52**, 495 (1968).
- 126) R.E. Howard and R.M. Burton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 202 (1968).
- 127) J. Gutknecht and D.C. Tosteson, *Science*, **182**, 1258 (1973).
- 128) J.M. Wolosin and H. Ginsburg, *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 20 (1975).
- 129) D. Papahadjopoulos, S. Nir, and S. Ohki, *Biochim. Biophys. Acta*, **266**, 561 (1972).
- 130) S. Furusawa, K. Okumura, and H. Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 272 (1972).
- 131) L.L.M. Van Deenen, *Chem. Phys. Lipids*, **8**, 366 (1972).
- 132) D. Papahadjopoulos, M. Cowden, and H. Kimelberg, *Biochim. Biophys. Acta*, **330**, 8 (1973).
- 133) A. Finkelstein and A. Cass, *Nature*, **216**, 717 (1967).
- 134) R.A. Demel, S.C. Kinsky, C.B. Kinsky, and L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 655 (1968).
- 135) G. Meissner and S. Fleischer, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 356 (1971).
- 136) W. Fiehn, J.B. Peter, J.F. Mead, and M. Gan-Elepano, *J. Biol. Chem.*, **246**, 5617 (1971).

- 137) P. Seeman, *Biochem. Pharmacol.*, 15, 1767 (1966).
- 138) E. Alhanaty and A. Livne, *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 146 (1974).
- 139) Q.F. Ahkong, D. Fisher, W. Tampion, and J.A. Lucy, *Biochem. J.*, 136, 147 (1973).
- 140) E.A. Korepanova, V.F. Antonov, and J.A. Vladimirov, *Biofizika*, 20, 740 (1975).
- 141) J.M. Gebicki and M. Hicks, *Chem. Phys. Lipids*, 16, 142 (1976).
- 142) A.F. Hofmann, "Molecular Association in Biological and Related Systems," *Advan. Chem. Ser.*, Vol. 84, 1968, p. 53.
- 143) H. Stricker, *Arzneim. -Forsch.*, 20, 391 (1970).
- 144) S.J. Singer and G.L. Nicolson, *Science*, 175, 720 (1972).
- 145) J.S. Fordtran and J.M. Dietschy, *Gastroenterol.*, 50, 263 (1966).
- 146) J.R. Spies and D.C. Chambers, *Anal. Chem.*, 20, 30 (1948).
- 147) R.A. Baker, *J. Gas Chromat.*, 4, 418 (1966).
- 148) T. Arita, R. Hori, K. Ito, and K. Ichikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1670 (1970).
- 149) M. Cohen, R.G.H. Morgan, and A.F. Hofmann, *J. Lipid Res.*, 10, 614 (1969).
- 150) A. Norman, *Arkiv Kemi*, 8, 331 (1955).
- 151) T.H. Wilson and G. Wiseman, *J. Physiol. (London)*, 123, 116 (1954).
- 152) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 153) W.G. Duncombe, *Biochem. J.*, 88, 7 (1963).
- 154) A. Zlatkis and B. Zak, *Anal. Biochem.*, 29, 143 (1969).
- 155) W.H. Barr and S. Riegelman, *J. Pharm. Sci.*, 59, 154 (1970).
- 156) S. Udenfriend, "Fluorescence Assay in Biology and Medicine," Academic Press, New York, 1962; S. Udenfriend, D.E. Duggan, B.M. Vasta, and B.B. Brodie, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 120, 26 (1957); D.E. Duggan, R.L. Bowman, B.B. Brodie, and S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, 68, 1 (1957); D.E. Duggan and S. Udenfriend, *J. Biol. Chem.* 223, 313 (1956).