カプロイルリゾチームの合成とラットにおける
リンパ移行性の改善

友田 寛・田中友希夫・村上正裕・山本 昌・村西昌三*

Synthesis of caproyl lysozyme and improvement of its lymphatic transport following small intestinal administration in rats

Lysozyme (Mw: 14,300) was derivatized by chemical modification with caproic anhydride to the N-terminal of lysine residue. The product observed to be more lipophilic than parent lysozyme by high-performance liquid chromatography. The activity and modified percentage of amino groups of caproyl derivative were 76.5% and 40% of parent lysozyme, respectively.

Intestinal absorption of lysozyme and caproyl derivative was examined by *in situ* closed small intestinal loops of rats. A significant increase in cumulative amount of lymph fluid of caproyl derivative was found in comparison with that of parent lysozyme. However both compounds were not detected in plasma. Lysozyme and caproyl derivative were observed to be almost stable in phosphate buffered saline or lymph fluid *in vitro*.

These findings suggested that acylation of lysozyme such as caproylation might be a useful approach for improving the lymphatic transport of enzyme with high molecular weight.

Yutaka Tomoda・Yukio Tanaka・
Masahiro Murakami・Akira Yamamoto・
Shozo Muranishi*

key words: chemical modification,
intestinal absorption, lysozyme,
caproyl anhydride, lymphatic transport

近年、バイオテクノロジーの急速な進歩により、微量で強力な生理活性を有するペプチドや蛋白質などの大量生産が可能になった。それに伴い、これらの生理活性物質を医薬品として応用する試みがなされている¹⁾。しかしながら、一般にペプチド性医薬品は、経口投与後、消化管粘膜からはほと

んど吸収されないことが知られている。これは、ペプチドが水溶性で消化管粘膜をほとんど透過せず、また、消化管粘膜に存在する蛋白分解酵素により容易に分解されてしまうためと考えられている²⁾。

こうした問題を解決するため筆者らは、比較的分子量の低いペプチドである TRH³⁾、テトラガストリン、インスリン⁴⁾ に種々の脂肪酸を化学修飾させ脂溶性を高めた新規アシル化誘導体を合成し、消化管粘膜からの透過性改善を報告してきた。

そこで本研究では、この手法をより蛋白質レベルの化合物へ応用する目的で、モデル薬物として分子量 14,300 の卵白リゾチームを用い、6 個の炭素鎖長を有するカプロン酸を化学修飾させた新規リゾチーム誘導体を合成し、その化学的特性およびラットにおける小腸からの吸収実験を行った。

方 法

(1) カプロイルリゾチームの合成

Coon & Hunter らの方法^{5,6)} に従い、精製卵白リゾチームと無水カプロン酸を、carbonate buffer (pH 8.5)/t-butanol (7:3) 混合溶媒中で反応させたあと、凍結乾燥させることにより行った。またこの際、添加する脂肪酸とリゾチームは、モル比 4:1 で反応させた。

(2) HPLC による疎水性の評価

リゾチームおよびカプロイルリゾチームの疎水性の評価は、ODS 系カラムへの保持時間 (retention time) を測定し、保持値 k' を算出することにより行った⁷⁾。

(3) 脂肪酸修飾率および活性の測定

カプロイルリゾチームの脂肪酸修飾率は、導入された脂肪酸の数を TNBS 法を用い測定し、この値から残存するリジン残基の数を定量して求め

*Department of Biopharmaceutics, Kyoto pharmaceutical University 京都薬科大学製剤学教室

図3 リゾチームとカプロイルリゾチームの
生物学的活性およびアミノ基修飾率
a: 活性, b: 遊離アミノ基残存率

リゾチームの保持値3.2と比較して、(b)カプロイルリゾチームの保持値は4.1と増大した。この結果よりカプロン酸を導入することによりリゾチームの疎水性を増加していることが示唆された。

図3 aは、カプロイルリゾチームの活性をリゾチームと比較したものである。カプロイルリゾチームの活性は、元のリゾチームの76.5%を示した。また、図3 bには残存するアミノ基の割合をあらわした。これよりカプロイルリゾチームのアミノ基修飾率は、40%を示した。

これらの結果より、カプロン酸を導入することによりリゾチームの活性は低下する傾向を示したが、新規誘導体は比較的高い活性を保持していることが明らかとなった。このように誘導体が高い活性を保持している一因は、リゾチームの活性部位がX線解析の結果^{12,13)}などによりカプロン酸導入部位と異なっていることが考えられる。しかしながら、脂肪酸導入によるリジン残基周辺の疎水結合あるいは水素結合の変化によりリゾチームの3次構造が変化し、基質との親和性が低下したことが、若干の活性低下につながったものと思われる。

つぎに、合成したカプロイルリゾチームを用いてラットにおける消化管吸収実験を行った。図4は、リゾチームおよびカプロイルリゾチーム投与後4時間目までの胸管リンパ液中における累積量を示している。カプロイルリゾチームの累積量は、元のリゾチームと比較して、投与後3時間目より有意に高くなり、4時間目には約4.7倍の値を示した。しかしながら、血液中のリゾチーム量は、リゾチームあるいはカプロイルリゾチームのいず

図4 胸管リンパ液中におけるリゾチームおよびカプロイルリゾチームの累積量

図5 等張リン酸緩衝液およびラットリンパ液中における活性の時間推移

れの場合においても、検出限界以下の低いものであった。

図5には、リゾチームおよびカプロイルリゾチームの(a)PBS中、あるいは(b)リンパ液中における安定性を示した。PBS中では、カプロイルリゾ

チームが native リゾチームより、やや低下の程度は大きいものの統計学上有意な差は認められず、また、リンパ液中においては、両者ともほとんど活性の低下は認められなかった。

このように、リゾチームのカプロイル化は、リゾチームの活性部位に影響を与えることなく、比較的高い活性を保持し、また、元のリゾチームと比較して有意に高いリンパ移行性を示したが、この要因として、① 脂肪酸導入によるリゾチームの安定性の改善、② 疎水性上昇による消化管粘膜透過性の増加、③ 分子量増加によるリンパ移行性の増大などが考えられた。

このうち今回は、リンパ液中における安定性について検討を行ったが、リゾチームとカプロイルリゾチームの間に有意な差は認められず(図5)、この点はリンパ移行性上昇の要因ではないと考えられる。また、高分子化合物は、リンパへの移行性が高い¹⁴⁾が、今回行った合成ではカプロン酸導入による分子量の増加は数百程度であり、この点に関してもリンパ移行性に与える影響は少ないものと思われる。

これらのことより、カプロイルリゾチームのリンパ移行性の増大は、消化酵素に対する安定性の増加、もしくは膜透過性の増加と考えられる。いずれにせよ、これらの詳細に関しては、現在 *in vitro* における腸管ホモジネートなどによる検討を行っており、今後の結果を待たねばならない。

結 論

以上、リゾチームにカプロン酸を化学修飾させることにより、元の化合物にくらべて、有意に高いリンパ移行性を示すことが明らかとなった。

これらの知見は、脂肪酸による化学修飾が高分子のペプチドにおいても消化管吸収を改善するうえで有用な手段となりうることを示唆しており、他の高分子量ペプチドにも応用できるものと思わ

れる。

文 献

- 1) Davis, S. S. et al.: Delivery system for peptide drugs. Plenum Press, 1986.
- 2) Lee, V. H. L., Yamamoto, A.: Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Adv. Drug Delivery Rev.* 4: 171-207, 1990.
- 3) Muranishi, S. et al.: Lipophilic peptide: synthesis of lauroyl thyrotropin-releasing hormone and its biological activity. *Pharm. Res.* 8: 649-652, 1991.
- 4) Hashimoto, M. et al.: Synthesis of palmitoyl derivatives of insulin and their biological activities. *Pharm. Res.* 6: 171-176, 1989.
- 5) Coon, J., Hunter, R.: Selective induction of delayed hypersensitivity by a lipid conjugated protein antigen which is localized in thymus dependent lymphoid tissue. *J. Immunol.* 110: 183-190, 1973.
- 6) Kojima, A. et al.: Immunogenicity of lysozyme derivatives lipid-conjugated to various degrees in mice treated with and without cyclophosphamide: dissociation of delayed-type hypersensitivity and helper function. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 29: 323-333, 1976.
- 7) 能田静穂・他: 高速液体クロマトグラフィーによる製剤中の塩化リゾチームの定量. *分析化学* 37: 570-574, 1988.
- 8) 奥山典生, 笠井久隆: TNBS 法による蛋白質の定量法. *蛋核酵* 18: 1153-1159, 1973.
- 9) 小田達也, 前田 浩: 蛍光偏光法による蛋白質・蛋白質相互作用の解析. *蛋核酵* 31: 243-251, 1987.
- 10) Maeda, H.: A new lysozyme assay based on fluorescence polarization or fluorescence intensity utilizing a fluorescent peptidoglycan substrate. *J. Biochem.* 88: 1185-1191, 1980.
- 11) Hashida, N. et al.: Intestinal absorption of carboxyfluorescein entrapped in liposomes in comparison with its administration with lipid-surfactant mixed micelles. *J. Pharmacobio Dyn.* 7: 195-203, 1984.
- 12) Blake, C. C. F. et al.: Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. Roy. Soc. B.* 167: 378-388, 1967.
- 13) 山田秀徳: リゾチームの構造と機能. *生化学* 62: 1254-1259, 1990.
- 14) 吉川広之, 村西昌三: リンパ指向性 DDS: DDS 6: 159-164, 1991.