消化管粘膜における透過性亢進シグナルの伝達機構

村上正裕・村西昌三

京都薬科大学・製剤学教室 ☎ 607 京都市山科区御陵中内町 5

Possible Mechanism of Signaling for Permeability Enhancement in Intestinal Mucosa

Masahiro Murakami and Shozo Muranishi

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University
Yamashina, Kyoto 607 (Japan)

The epithelial cell sheet in the gastrointestinal mucosa is a permselective sophisticated membrane, which serves as a potent permeation barrier to water-soluble and large molecular weight xenobiotics. Fatty acids such as oleic acid and capric acid efficiently enhance the intestinal absorption of poorly absorbed drugs due to the transient reduction of the barrier resistance. However, the mechanisms have not been completely elucidated and their effective and safe use should be desired in drug delivery. It was proposed that these fatty acids could enhance the permeation of drugs by perturbing the lipid bilayer of brush-border membrane. However, it seems unlikely to explain that they increase the mucosal permeation of macromolecular compounds which cannot pass through cell membranes. We have found that the permeability enhancement by the fatty acids is temperature-dependent with being maximal at 37°C, and that it is inhibited by the membrane-permeable SH-modifiers, corresponding with the reduction in sulfhydryl content in the brush-border membrane, and high concentration of potassium ion in the lumen. The sulfhydryl modification of brush-border membrane inhibited the oleic acid-induced increase in membrane fluidity in the SH-protein fraction but not in the lipid bilayer. In addition, W-7, a specific calmodulin inhibitor, significantly inhibited the oleic acid-induced increase in membrane permeability, suggesting the possible roles of calmodulin-dependent protein kinases in the mechanism underlying the permeability enhancement of the intestinal mucosa.

The results discussed in this study suggest that a signal from the action of oleic acid on the brush-border membrane is transmitted via some subcellular molecular systems to the cell skeleton to increase the mucosal drug permeability. However, further detail studies are needed to establish this mechanism.

Key words : permeability enhancement, SH-protein, oleic acid, calmodulin-dependent.

Table 1 Classes of absorption-enhancing agents for intestinal drug delivery

A. Lipid-type adjuvants Fatty acids oleic acid, linoleic acid, capric acid Acylcarnitines palmitoyl-DL-carnitine Acyl coenzyme A palmitoyl coenzyme A Sucrose esters sucrose laurate Alkyl saccharides laury- β -D-maltoside N-Acyl amino acids and peptides N-lauryl-DL-phenylalanine Glycerides monoolein, MGK TM , coconut oil Bile salts and derivatives taurocholate, glycocholate, tauro-24, 24-dihydrofusidate Phospholipids lysophosphatidylcholine Others Azone TM , saponins etc.	B. Non-lipid-type adjuvants Calcium chelating agents EDTA, phytate, tripolyphosphate Non-steroidal anti-inflammatory drugs salicylate, diclofenac, 5-methoxysalicylate Glutathione depleting agents diethylethoxymethylene malonate, diethyl maleate Cyclodextrins α -, β -, γ -cyclodextrins dimethyl- β -cyclodextrin Phenothiazines chlorpromazine, trifluoperazine Others Concanavalin A, N-formyl-Met-Leu-Phe, polyacrylic acid synthetic surfactants etc.
---	--

Fig. 1. Plasma profiles of CF after treatments with 10 mM SLS solution, 10 mM oleic acid-HCO-60 solution, 25 mM EGTA solution, 5 mM LM solution. ..., CO-administration; free CF administration after pretreatment for 30 min, then washing with saline.

1. はじめに

近年のめざましいバイオテクノロジーの進歩は、臨床上重要なホルモンやサイトカインをはじめとする生理活性ペプチドの安定した供給を保証し、その治療薬としての開発におおいに寄与しつつある。これらペプチド性薬

物の生体内への薬物の送達法 (Drug Delivery System, DDS) は、その有効性および安全性の見地から、医学、薬学をはじめ工学、農学など多岐にわたる分野で活発な研究がなされている。とくに薬剤学の領域では、患者の負担を軽減し、在宅ケアを可能にするなどの観点から、注射以外の投与方法にもとづく DDS の開発研究が注目を集めている。ところが、ペプチド性薬物は一般に水溶性が高く、高分子のものが多いため、消化管をはじめとする粘膜からの吸収性にとぼしいという難点がある。この障害を克服するためのアプローチの1つとして吸収促進剤の利用があげられる¹⁾。われわれは脂肪酸やモノグリセリドのような天然の脂質類のなかに、高い消化管吸収促進作用を示すものを見出し²⁾、その発見当初より、種々の応用的研究ならびに吸収促進機構の解明に関する基礎的研究を行ってきた³⁾。とくに後者は、吸収促進剤の安全性と最適な利用法を確立するうえで重要な意味をもつものと考えられる。

ここでは、消化管吸収促進剤の特徴について述べるとともに、脂肪酸、特に不飽和長鎖脂肪酸の消化管吸収促進作用の発現機構に関する検討の結果、現在までに得られた知見を総括して紹介する。

2. 吸収促進剤とその特徴

2.1 吸収促進剤の条件

「吸収促進剤 (absorption enhancers)」ということばは、「皮膚や粘膜などの体表面に作用し、その透過障壁能を一時的に低減することによって、適用部位からの難吸収性薬物の吸収を増大する補助剤 (adjuvants)」の総称として用いられている。薬物吸収は溶解性や安定性を改善することによってもみかけ上増加するが、この場合は薬物自体の吸収性（膜透過性）が変化するのではないので、このために使用した界面活性剤や安定化剤などは吸収促進剤の範疇には属さないといえる。各部位の特性³⁾に応じて、有効な促進剤は必然的に異なってくるが、消化管において吸収促進作用の報告されている主な物質を Table 1 にまとめた。中鎖脂肪酸であるカプリン酸を吸収促進剤として坐剤に配合し、アンピシリンやセフチゾキシムのような本来吸収性の低い薬物の製剤化が成功している。一方、吸収促進剤としては膜傷害性の強いものや膜に不可逆的な変化を与えるものは不適當といえる。Fig. 1 に示すように、オレイン酸では、腸管腔内から洗浄除去することによって、粘膜の透過性は速やかに元のレベルに回復する。また、同じアルキル鎖を有する界面活性剤を用いた場合でも、lauryl maltoside

(LM) では吸収促進作用が速やかに消失するのに対して、sodium laurylsulfate (SLS) の場合では粘膜の障

Fig. 2. Schematic diagrams of intestinal mucous structure and routes of drug permeation

Table 2 Criteria of absorption enhancers

① 皮膚や粘膜など生体側に作用する
② 生体適合性 (biocompatibility) が高い
③ 吸収促進作用が傷害性に基づくものではない
④ 吸収促進作用が可逆的である
⑤ 薬理作用を示さない

Fig. 3. Fluorescence microphotograph of rat colon 5 min after the administration of FD-70 with (A) or without (B) linoleic acid-HCO-60 mixed micelles

Table 3 AUC after large intestinal administration of carbxyfluorescein (CF) in various formulations

Composition	AUC _{0-4h} ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$) ^{a)}
None (control)	2.9 $\pm$ 0.4
4 mM HCO-60	2.2 $\pm$ 0.4 ^{NS}
30 mM capric acid	14.8 $\pm$ 2.5 ^{*c)}
30 mM stearic acid	2.7 $\pm$ 0.5 ^{NS}
30 mM oleic acid	47.8 $\pm$ 1.8 ^{***b)}
30 mM linoleic acid	51.3 $\pm$ 1.3 ^{***b)}
30 mM stearic acid+4 mM HCO-60	29.1 $\pm$ 5.6 ^{*c)}
30 mM oleic acid+4 mM HCO-60	81.9 $\pm$ 9.6 ^{***c)}
30 mM linoleic acid+4 mM HCO-60	88.2 $\pm$ 14.2 ^{***c)}

a) : Data are presented as mean $\pm$ S. E. of at least 3 rats. Comparisons vs. the control were carried out using Student's t-test

b) : or Cochran-Cox test

c) : *, p<0.05 ; **, p<0.01 ; ***, p<0.001 ; ^{NS}, not significant.

壁性が回復しておらず、この濃度でSLSは膜に不可逆的な傷害を引き起こすことが示唆される。実際、光学顕微鏡レベルの組織学的検討の結果は、これらの結果とよく符号することが認められている⁵⁾。Table 2にわれわれが吸収促進剤の基準とする主な条件を示した。

2.2 消化管の構造と吸収促進剤の作用

消化管粘膜を介する物質透過は、上皮細胞層の構造および機能により制御されており、水溶性や高分子性薬物にとっては、この上皮細胞層を介する透過が吸収の律速過程となっている。とくに腸管腔表面に面する吸収上皮細胞の刷子縁膜および上皮細胞間の接着部(tight junction)が最大の透過障壁となっている(Fig. 2)。したがって、薬物の透過経路としては、刷子縁膜を透過する細胞内経路(transcellular route)と、細胞間接着部を透過する細胞間隙経路(paracellular route)とが存在し、吸収促進剤はこれらの双方、あるいは、いずれかの透過性を一時的に高めるはたらきがあるものと考えられる。Fig. 3は、細胞膜非透過性の蛍光標識高分子デキストラン(FD-70)を用い、ラット大腸粘膜におけるリノール酸の透過性亢進作用を調べた結果⁶⁾である。リノール酸を作用させた場合の粘膜組織の蛍光染色像は、FD-70の細胞間隙経路を介した透過を示している。Table 1からは、吸収促進剤として脂肪酸関連化合物、すなわち脂質のなかに有効なもの数多く見出されていることがわかる。また、生物物理学的検討からは、これらの脂質がいずれも生体膜の物理化学的性質に影響を及ぼ

すことが示されてきた。このように機構面からは、消化管吸収促進剤を脂質のように膜作用に基づくものと、それ以外のメカニズムによるものとに大別することができる。たとえば、カルシウムキレート剤は、細胞接着因子であるカルシウムイオンを粘膜組織より奪うことで、細胞間隙経路の薬物透過性を高めることが示唆されており、後者の例としてあげられる。最近の電気生生理学的手法を用いた検討⁷⁾では、EDTAは細胞間隙経路の透過性を、また、ジクロフェナックは細胞内経路の透過性を、比較的選択的に亢進することが示されている。しかしながら、消化管吸収促進剤のなかで、その作用機構の全容が明らかにされているものはきわめて少ない。吸収促進剤を用いた場合には、薬物の吸収が吸収促進剤の作用強度に依存してきまるので、このような吸収促進剤の作用機構を明らかにすることは、薬物の体内への送達速度と量を制御し、その効果的かつ安全な利用を行ううえで重要であるといえる。

3. 脂肪酸の吸収促進作用

脂肪酸は刷子縁膜に対して 10^{-3}M のオーダーで作用することから、その吸収促進作用は非特異的な膜作用に基づくものと考えてよい。このため物性や構造の類似した化合物についても、脂肪酸と類似した吸収促進作用が認められている^{5, 8, 9)}。また、脂肪酸の吸収促進作用は胃から直腸部へと、消化管下部の方がより顕著に現れる¹⁰⁾。このような部位差の原因については、解剖学的

にみた腸管の長さ当たりの有効吸収面積の差に基づくものと考えられているが、これらの部位では生理学的にもかなりの相違があり、明確な解答は得られていない。また、脂肪酸の吸収促進効果の発現はきわめて迅速であり、血中から消化管腔方向への薬物透過 (exsorption) も同時に亢進することから、膜動輸送などの特殊輸送系は関与していないものと考えられる。同濃度で比較した場合、脂肪酸の中では、不飽和長鎖脂肪酸が最も強い吸収促進作用を示し、中鎖脂肪酸にも比較的強い吸収促進作用が

Fig. 4. Plasma concentration of ampicillin after rectal administration in rats. Witepsol H-5 suppositories with 5% linoleate sodium ($\square$), 5% linoleic acid ($\triangle$) and without enhancer ($\blacktriangle$). Microenema with 5% linoleate sodium ($\blacksquare$). Means $\pm$ SE of at least 3 animals.

認められた (Table 3). このときの粘膜透過性の亢進は可逆的であり、脂肪酸による前処理が無効であることから、*in vivo* では脂肪酸の粘膜移行に伴い透過性が変化するものと考えられる。実際、*in vitro* ではオレイン

Fig. 5. pH dependence on absorption-enhancing effect of fatty acids in the large intestine
○: 30 mM oleic acid/4 mM HCO-60; ●: 30 mM oleic acid; ◇, 30 mM linoleic acid; ▽, 30 mM capric acid; ■, free CF. Vertical bars represent standard errors of mean for at least 3 rats.

Table 4 Effects of various lipids in 10 mM taurocholate mixed-micellar solution on rat large intestinal absorption of streptomycin

Lipid	Plasma concentration at 15 min ($\mu\text{g/ml}$)	Ability to induce cell fusion ^{a)}
None	<1.5	—
Taurocholate	<1.5	—
Caprylic acid ($\text{C}_{8:0}$)	<1.5	Negative
Lauric acid ($\text{C}_{12:0}$)	5.0	Positive
Palmitic acid ($\text{C}_{16:0}$)	<1.5	Negative
Oleic acid ($\text{C}_{18:0}$)	14.9	Positive
Linoleic acid ($\text{C}_{18:2}$)	14.4	Positive
Monoolein	14.2	Positive
Diolein	<1.5	Moderate
Triolein	<1.5	Negative
Oleyl alcohol	<1.5	Positive
Methyl oleate	<1.5	Positive

a) reported by Ahkong et al. (1973)

Table 5 Effect of various lipids on motion parameters of 5-nitroxide stearic acid incorporated into liposomal membranes at 25° C

Lipid ^a	2T, (gauss)	Order parameter
None	49.6	0.57
Lauric acid	47.2	0.52
Myristic acid	48.0	0.54
Palmitic acid	48.2	0.54
Stearic acid	49.0	0.55
Palmitoleic acid	47.0	0.51
Oleic acid	47.4	0.52
Linoleic acid	46.8	0.50
Linolenic acid	46.7	0.50
Monoolein	49.7	0.58
Monopalmitin	51.0	0.60
Monostearin	50.4	0.60

^a Equimolar mixture

酸の組織蓄積量の経時的変化と、粘膜透過性の変化とがよく対応することを確かめている。すなわち、吸収促進剤の作用は局所的であり、この部位にそのとき共存している薬物のみが粘膜を透過できることになる。このため、ゲル化剤などの基剤で、薬物および吸収促進剤の腸管に沿った方向への拡散や希釈、両者の分離を防ぐことで吸収促進の効率の向上が認められる。Witepsol H-5 を基剤とするアンピシリン坐剤に、リノール酸ナトリウムを配合してラットに投与した場合、5% の配合で筋注時にほぼ匹敵するバイオアベイラビリティを示した (Fig. 4)¹¹⁾。一方、長鎖脂肪酸の吸収促進作用は、胆汁酸塩や界面活性剤と混合ミセルを形成することによって、さらに顕著に増大する。これは、脂肪酸分子の会合性を低下し、粘膜表面への拡散性を高めることと、混合ミセルとすることによるみかけの pKa の上昇によることが示唆されている¹²⁾。Fig. 5 に脂肪酸および混合ミセルと溶液 pH との関係を調べた結果を示す。このように中鎖脂肪酸と比較して、長鎖不飽和脂肪酸の吸収促進作用は pH の影響を強く受けるが、混合ミセルとすることによって生理的 pH 領域での変動はほとんど消失し、安定した高い促進効果を得ることができる。

4. 脂肪酸による粘膜透過性の亢進機構

4.1 膜構成成分との相互作用

脂肪酸をはじめとする両親媒性の化合物は、生体膜成

分である脂質やタンパク質と相互作用して、膜構造や物性、機能に様々な影響を与える可能性がある。脂質の吸収促進作用が明らかになるにつれて、作用機構面でしだいに注目されたことは、Table 4 に示すように、消化管吸収促進作用を示す脂質¹³⁾と細胞膜融合を誘発する作用の強い融合性脂質 (fusogenic lipids)¹⁴⁾との間に多くの一致がみられたことである。このことは、細胞骨格系を含めた膜の、かなりダイナミックな変化を伴う生体膜融合現象¹⁵⁾と、膜透過性亢進作用との間に共通した機構の存在することを暗示するものであった。実際、膜融合に先立って、細胞膜透過性は亢進することが知られており、比較的高分子のものまで透過可能となる。このことは、少なくとも細胞膜経路の透過性亢進作用を説明するものと考えられた。ESR の検討¹⁶⁾で各脂質を作用させた場合の order parameter (Table 5) は、リポソーム膜の透過性変化ならびに Table 4 の *in vivo* における結果と高い相関性を示すことが示された。

一方、刷子縁膜に取り込まれた脂肪酸は、細胞骨格系を含めた膜のタンパク質成分とも相互作用することが考えられる。そこで、ラットの結腸粘膜より得た刷子縁膜標本を種々の蛍光プローブで標識し、蛍光偏光解消法¹⁷⁾により膜流動性 (秩序性) の変化を調べることにによって、オレイン酸と膜成分との相互作用を調べた。DPH は脂質相の疎水領域の流動状態をモニターし、また、FITC はタンパク質のアミノ基と、NPM は SH 基とそれぞれ結合して、タンパク質相の流動性の変化が検

Fig. 6. Effects of oleic acid and *N*-ethylmaleimide on fluorescence anisotropy (r) of various fluorophores in rat colonic brush-border membrane DPH, 1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene; NPM, *N*-(1-pyrene) maleimide; FITC, fluorescein isothiocyanate

Fig. 7. Schematic diagrams of *in situ* intestinal perfusion technique (A) and *in vitro* everted loop method (B)

出できる。縦軸には蛍光異方性 (fluorescence anisotropy, r) を算出してプロットした。数値の高い方が膜の秩序性が高い (流動性が低い) ことを意味している。Fig. 6 に示すように、オレイン酸は脂質相の流動性を濃度依存的に顕著に増大させることが示され、先の ESR スペクトルによる検討と一致する結果が得られた。しかもオレイン酸は、濃度依存的に NPM の r 値を有意に低下させ、また、FITC の r 値も減少させる傾向を

Fig. 8. Effect of divalent cations on the colonic permeation induced by absorption enhancers. Krebs-Ringer buffered solution containing 1.3 mM CaCl_2 and 1.2 mM MgCl_2 (KRB(+)) or not (KRB(-)).

示し、膜のタンパク質相の流動性も顕著に増大させることが明らかとなった。同様の結果は、最近中鎖脂肪酸についても報告されている¹⁸⁾。

一方、膜タンパク質の SH 基を修飾する *N*-ethylmaleimide (NEM) で膜を処理することによって、このオレイン酸と SH 基膜タンパク質との相互作用のみ選択的に抑制され、膜の脂質相に対するオレイン酸の作用には全く影響の見られないことが見出された (Fig. 6)。

このように脂肪酸の刷子縁膜流動性に及ぼす作用は、

その吸収促進機構の一部を説明するものと考えられる。しかしながら、刷子縁膜透過性の変化からは、前述した細胞膜非透過性高分子の粘膜透過性の増大などを直接説明することは困難である。このため消化管においては、吸収促進剤による薬物透過性の亢進を、あくまで上皮細胞層という組織膜を介する現象としてとらえる必要があるものと考えられる。そこで、Fig. 7 に示すような、ラッ

ト結腸部における *in situ* 灌流法あるいは摘出反転腸管を用いた *in vitro* 灌流法により、さらに詳細な検討を行なった。なお、粘膜透過性の変化は、水溶性で消化管における安定性の高い蛍光色素 6-carboxyfluorescein (CF) をプローブとしてモニターした。

4.2 カチオンの影響

前述したように、細胞接着因子であるカルシウムイオンは、細胞間隙経路の透過性制御における重要な因子の1つである。Fig. 8 は、オレイン酸ならびに EGTA による粘膜透過性の亢進に及ぼす共存 2 価カチオンの影響を *in vitro* において調べた結果を示している。縦軸には粘膜透過性の指標として、投与後 60 分までに粘膜側から漿膜側灌流液中へ透過した CF の累積量 (Qp 値) を求め、プロットした。薬液および灌流液には pH 7.4 の Krebs-Ringer 緩衝液を用いたが、標準条件としては、粘膜側薬液溶液中の 2 価カチオンは除いた。粘膜側薬液に 2 価カチオンを添加することによって、オレイン酸では有意な抑制は認められなかったのに対して、EGTA ではほぼ完全にその粘膜透過性亢進作用が阻害された。一方、漿膜側灌流液の 2 価カチオンを除くと、両促進剤の作用発現濃度は有意に低下し、オレイン酸では

Fig. 9. Effect of monovalent cations on the colonic permeation of CF produced by absorption enhancers

Fig. 10. Effect of coexistent monovalent cations in the lumen on the colonic absorption of CF induced by absorption enhancers.

Table 6 Effect of potassium ion and temperature on the *in vitro* colonic permeation of CF induced by caprate

Enhancer	KRB	Temperature	QP value ^{a)}	N	P ^{b)}
10 mM sodium caprate	Na ⁺	37° C	2.76 ± 0.24	5	(control)
	K ⁺	37° C	0.99 ± 0.28	5	0.01
	Na ⁺	25° C	0.91 ± 0.13	4	0.001

a) Data are represented as the mean ± S. E.

b) Comparisons vs. control were performed by Student's t-test.

Fig. 11. Temperature dependence of adjuvant effect of oleic acid *in vitro*.

○, 10 mM oleic acid/HCO-60; ●, free CF.

1/2 程度の濃度で、また、EGTA では 1/10~1/20 の濃度で作用が認められた (data not shown). 標準条件における両促進剤の有効濃度は、*in vivo* のそれに近いものであることから、EGTA のようなカルシウムキレート剤は、組織からカルシウムなどの 2 価カチオンを奪うことで促進作用を発現するものと考えられるが、*in vivo* では血漿からの 2 価カチオンの供給の影響によって促進作用の発現が緩和され、有効濃度が引き上げられるものと推察された。また、Tight junction の分子構築は完全には明らかではないが、上皮細胞の側底膜の接着には、それぞれカルシウム要求性のカドヘリンおよびインテグリンが寄与していることが明らかとされており¹⁹⁾、高濃度のキレート剤による作用は、上皮細胞の剝離を引き起こし、不可逆的な粘膜透過性の変化をもたらすものと考えられる。Fig. 9 は、粘膜側緩衝液中のナ

トリウムイオンを、カリウムまたはコリンイオンで置換することにより、1 価のカチオンの影響を検討した結果である。カリウムイオンによる置換によって、EGTA の透過性亢進作用には有意な減少が認められなかったが、オレイン酸の透過性亢進作用の発現は顕著に抑制されることが明らかとなった。これに対して、コリンイオンによる置換は、オレイン酸ならびに EGTA による粘膜透過性の増大を有意に抑制したが、その阻害率には差が認められなかった。また、いずれの置換においても、CF 自体の透過性には有意な変化は認められなかった。Fig. 10 に示すように、*in vivo* における検討結果は、これら *in vitro* の結果とよく一致することが示された。さらに、カプリン酸についても同様に、カリウムイオンによる粘膜透過性の亢進作用の抑制がみられた (Table 6)。

このように、オレイン酸は共存 2 価カチオンの影響をほとんど受けず、Tight junction からカルシウムを取り除くことによって透過性を亢進する EGTA のようなキレート剤とは明らかに作用が異なることが示された。また粘膜側に高濃度のカリウムイオンを存在させることによって、脂肪酸による粘膜透過性の増大が抑制されたことから、その刷子縁膜の流動性の変化に基づく膜透過性の増大は、細胞内カリウムレベルの一時的な低下をもたらす、これが組織全体の透過性の増大を誘導するものと推察される。こうした細胞内カリウム濃度の変化は、上皮細胞の容積調節において重要な役割を果たしていることが知られているが²⁰⁾、組織からのカリウムイオンの流出が、脂質層を介する拡散によるものか、細胞内カルシウムイオン濃度の変化に伴う膜のカリウムチャンネルの開閉や、イオン輸送系の活性変化によるものかは不明である。

4.3 タンパク質の関与

オレイン酸の透過性亢進作用に及ぼす系の温度の影響を *in vitro* において調べた結果を Fig. 11 に示した。

Free の CF では温度の上昇に伴い、透過性に上昇傾向が認められるが、オレイン酸による粘膜透過性の増大は、37°C を最適値とする明らかな温度依存性を示すことが明らかとなった。このことはオレイン酸の粘膜透過性亢進作用の発現に、タンパク質の関与する可能性を示唆している。また、オレイン酸とは細胞内での代謝や吸収動態の異なるカプリン酸についても同様の温度依存性が認められたことから (Table 6)、脂肪酸自体の細胞内代謝物は関与せず、これら脂肪酸による透過性の亢進刺激は、

Table 7 Comparison of effect of various sulfhydryl modifiers on the transmucosal permeability of CF in the presence of oleic acid

Pretreatment		Qp ^{a)}	% of Control
None (Control)		4.09	100
(impermeable)			
PCMPS ^{b)}	5 mM	4.00	99
(permeable)			
PCMB ^{c)}	5 mM	2.49	61
HgCl ₂	5 mM	2.65	65
N-Ethylmaleimide	5 mM	1.06	26
Iodoacetamide	5 mM	2.86	70
Diethylmaleate	5 mM	4.58	112

a) Cumulative amount of CF permeated across the mucosa for 90 min after dosing.

b) *p*-chloromercuriphenylsulfonate

c) *p*-chloromercuribenzoic acid

刷子縁膜において他の分子機構に伝達されるものと推察された。さらに、先に示した刷子縁膜小胞における検討結果は、この粘膜透過性の変化に刷子縁膜の SH 基タン

Fig. 12. Plasma concentration-time curves during the in situ single-pass perfusion of CF in the presence of oleic acid. Effect of pretreatment of the mucosa with 0.1 mM diamide (●); 0.1 mM NEM (▲); sham operation with the medium (○) for 15 min.

Fig. 13. Schematic representation of the regulation of contraction and relaxation responses of actin-myosin fibers by cell signal conduction systems.

CaM, calmodulin; MLCK, myosin light-chain kinase; PK-C, protein kinase C; CaD, caldesmon; CaP, calponin.

→, activation; —|, inhibition; ↔, interaction.

パク質の関与することを示唆している。そこで、種々の膜タンパク質の修飾剤を用いて粘膜透過性の変化との関連を*in vitro*において調べた²¹⁾。Table 7は、SH基修飾剤による前処理効果を調べた結果を示している。オレイン酸による粘膜透過性の増大は、膜透過性のSH基修飾剤によって著しく阻害されることが明らかとなり、な

Fig. 14. Effect of calmodulin inhibitors on the colonic permeation of CF produced by oleic acid.

かでも NEM による阻害作用が最も強く、膜非透過性の水銀剤である PCMPs および細胞内の非タンパク質性の SH 基の特異的枯渇剤である diethyl maleate, 種々のアミノ基修飾剤には阻害作用が認められなかった。さらにこの阻害作用の SH 基依存性は、可逆性の SH 基架橋剤である diamide および還元剤である dithiothreitol を用いた検討によって確かめられた²²⁾。

また、このときの粘膜透過性の変化は、刷子縁膜中のタンパク質性 SH 基濃度の変化とよく対応することが示された^{21, 22)}。オレイン酸の吸収促進作用に対する SH 基修飾剤の抑制効果は、Fig. 12 に示すように *in vivo* においても確かめられ、オレイン酸の吸収促進作用が、刷子縁膜の SH 基タンパク質を介して発現する可能性が示唆された。こうした膜の SH 基 reactive な機能性タンパク質としては、カルシウムポンプ ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -AT-Pase) のような膜内在タンパク質の他に、アクチンやミオシンなどの細胞骨格系タンパク質などがあげられる。さらに、NEM や diamide には膜タンパク質のクラスター形成の阻害²³⁾や細胞骨格系タンパク質に対する収縮阻害作用²⁴⁾などが報告されており関連性が注目

Fig. 15. Proposed model for oleic acid-induced enhancement in the colonic absorption.

された。

4.4 細胞内骨格系タンパク質の寄与

上皮細胞の形態維持ならびに細胞間隙経路の透過性制御において、アクチン-ミオシン系の細胞骨格系タンパク質が重要な役割を果たすことが示されてきた²⁵⁾ (Fig. 13)。一方、生体膜と細胞骨格系タンパク質との結合や、接着部の分子構築と構造タンパク質の構造維持、収縮性タンパク質の収縮活性などを抑制する分子機構の解明が進むにつれて、とくにカルシウムイオンにより活性が調節されている一連のタンパク質リン酸化酵素の重要性が注目された²⁶⁾。そこで、種々の細胞内情報伝達系の特異的阻害剤を用いて検討を行った。Fig. 14にオレイン酸の透過性亢進作用に及ぼすカルモジュリン阻害剤の効果を調べた結果を示した。Ca²⁺-カルモジュリン複合体には、腸管の刷子縁膜を収縮させる活性を有することが報告されている²⁷⁾。オレイン酸による粘膜透過性の増大は、W-7によって有意に抑制されるが、そのNegative controlであるW-5によって影響を受けないことが明らかとなった。また、W-7およびW-5自体は、この濃度ではいずれも粘膜透過性には影響を及ぼさなかった。カルモジュリン依存性の結合タンパク質には、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)、カルデスモン (CaM)、プロテインキナーゼ II、MRKCS など複数の存在が知られているが、現在のところ MLCK に対する阻害剤にも、透過性亢進作用を抑制する効果を認めている。このように、カルモジュリンならびに MLCK の阻害剤にオレイン酸による粘膜透過性変化に対する有意な抑制効果が見出されたことは、細胞内カルシウム情報伝達系を介して、活性の調節されている細胞骨格系タンパク質の関与を示唆するものと思われる。

以上の検討結果をまとめると、脂肪酸による粘膜透過性の亢進においては Fig. 15 に示すような図式を想定することができる。ただし、細胞骨格系タンパク質の機能は、C キナーゼあるいは cAMP/cGMP を伝達物質とする情報伝達系によっても調節されており、特定の伝達系の寄与を証明するためには、脂肪酸による粘膜透過性の変化と伝達物質のレベルやタンパク質リン酸化の程度の経時変化などとの相関を詳細に調べる必要があるものと考えている。

5. おわりに

脂肪酸のような脂質類の吸収促進作用は、その脂質二重層に及ぼす物理化学的作用に基づく膜透過性の亢進から説明されてきたが、本研究により、この膜で生じた透過性亢進のシグナルは、SH 基タンパク質を介してなんらかの細胞内分子機構に伝えられ、細胞間隙経路を含めた粘膜上皮細胞層全体の透過性の増大が引き起こされるということを示唆することができた。この細胞内分子機構の有力な候補としては、カルシウム情報伝達系があげられるが、現時点でそれを確定する証拠は得られていない、他の類似する吸収促進剤の作用機構との共通性を含めて全容の解明にはさらに詳細な検討が必要である。こうした細胞内の現象を検討する手段として、最近行われている上皮細胞の単層培養系における検討^{28, 29)}が、有力な情報をもたらすものとして期待される。ただし、薬物の消化管における詳細な吸収動態は完全には明らかとされておらず、吸収上皮細胞のみならずクリプト細胞の吸収における寄与³⁰⁾なども頭念におくと、できるだけ *in vivo* に近い系にフィードバックさせて検討を進めていく必要があると思われる。一方、confocal microscopic imaging technique や stopped flow analysis などの手法の導入も有力であり、最新の分析技術や解析手段を駆使することによって、粘膜透過性の変化や薬物の局所における動態を、細胞内のイオンや情報伝達物質のレベルの変化とともにリアルタイムでとらえていくことも可能であるものと考えている。

専門の諸兄からのご意見など賜われれば幸甚であります。

文 献

- 1) S. Muranishi, A. Yamamoto, H. Okada: "Biological Barriers to Protein Delivery" (K. L. Audus, T. J. Raub. ed.) p. 199, Plenum Press, New York (1993).
- 2) S. Muranishi, Y. Tokunaga, K. Taniguchi, H. Sezaki: Chem. Pharm. Bull., **25**, 1159 (1977).
- 3) S. Muranishi: Crit. Rev. Ther. Drug Carrier System, **7**, 1 (1990).
- 4) 村西昌三: 膜, **15**, 11 (1990).
- 5) M. Murakami, Y. Kusano, K. Takada, S. Muranishi: Int. J. Pharm., **79**, 159 (1992).
- 6) S. Muranishi, K. Takada, H. Yoshikawa, M. Murakami: "Delivery System for Peptide Drugs" (S. S. Davis, L. Illum, E. Thomlinson, ed.) p. 177, Plenum Press, New York (1986).

- 7) S. Yamashita, H. Saitoh, K. Nakanishi, M. Masada, T. Nadai, T. Kimura: *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 512 (1985).
- 8) M. Murakami, K. Takada, S. Muranishi: *Int. J. Pharm.*, **31**, 231 (1986).
- 9) E. L. LeCluyse, L. E. Appel, S. C. Sutton, *Pharm. Res.*, **8**, 84 (1991).
- 10) K. Taniguchi, S. Muranishi, H. Sezaki: *Int. J. Pharm.*, **4**, 219 (1980).
- 11) 村上正裕, 鈴木幸雄, 村西昌三: *薬剂学*, **51**, 166 (1991).
- 12) 村上正裕, 福井 博, 村西昌三: *薬剂学*, **53**, 176 (1993).
- 13) N. Muranushi, M. Kinugawa, Y. Nakajima, S. Muranishi, H. Sezaki: *Int. Pharm.*, **4**, 271 (1980).
- 14) Q. F. Ahkong, D. Fisher, W. Tampion, J. A. Lucy: *Biochem. J.*, **136**, 147 (1973).
- 15) 笹川 滋, 本田憲治: *膜*, **6**, 310 (1981).
- 16) N. Muranushi, N. Takagi, S. Muranishi, H. Sezaki: *Chem. Phys. Lipid*, **28**, 269 (1981).
- 17) R. F. Chen, R. L. Bowman, *Science*, **147**, 729 (1965).
- 18) H. Kajii, T. Horie, M. Hayashi, S. Awazu: *J. Pharm. Sci.*, **75**, 475 (1986).
- 19) S. Muranishi, M. Murakami: "Topics in Pharmaceutical Sciences 1991" (D. J. A. Crommelin, ed.) p. 139, F. I. P., The Hague (1992).
- 20) 永渕昭良: *実験医学*, **9**, 819 (1991).
- 21) B. Sarkadi, J. C. Parker: *Biochim Biophys. Acta*, **1071**, 407 (1991).
- 22) M. Murakami, K. Takada, T. Fujii, S. Muranishi: *Biochim. Biophys. Acta*, **939**, 238 (1988).
- 23) M. Murakami, K. Takada, S. Muranishi: *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 83 (1992).
- 24) R. Karlsson, U. Lindberg: *Exp. Cell. Res.*, **157**, 95 (1985).
- 25) J. L. Madara: *Amer. J. Physiol.*, **253**, C171 (1987).
- 26) M. E. Duffey, B. Hainau, S. Ho, C. J. Bentzel, *Nature*, **294**, 451 (1981).
- 27) T. C. S. Keller, III, M. S. Moosker: *J. Cell Biol.*, **95**, 943 (1982).
- 28) X. Boulenc, E. Marti, H. Joyeux, C. Roques, Y. Berger, G. Fabre: *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1591 (1993).
- 29) E. K. Andeberg, T. Lindmark, P. Artursson: *Pharm. Res.*, **10**, 857 (1993).
- 30) K. C. Pedley, R. J. Naftalin: *J. Physiol.*, **460**, 525 (1993).

(受付 1994年2月14日)