

塩基性薬物の脂溶性に基づく細胞内分布機構に関する研究

石崎純子,^a 横川弘一,^a 大熊勝治,^b 市村藤雄,^a 宮本謙一,^{*,a}金沢大学医学部附属病院薬剤部,^a金沢大学薬学部分子細胞薬学講座生化学研究室,^b 〒920-8641 金沢市宝町 13-1Studies on the Mechanism of Subcellular Distribution
of Basic Drugs Based on Their LipophilicityJunko ISHIZAKI,^a Koichi YOKOGAWA,^a Shoji OHKUMA,^bFujio ICHIMURA,^a and Ken-ichi MIYAMOTO^{*,a}*Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine,^a and Department of Molecular
and Cellular Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,^b
Kanazawa University, Kanazawa 920-8641, Japan*

(Received December 18, 2000; Accepted May 1, 2001)

This paper described the studies on the mechanism of subcellular distribution of lipophilic weak bases. Although the tissue distribution of basic drugs appeared to decrease with time simply in parallel with their plasma concentration, their subcellular distribution in various tissues exhibited a variety of patterns. Basic drugs were distributed widely in various tissues, but were concentrated in lung granule fraction, where their accumulation was dependent on their lipophilicity and lysosomal uptake. As the plasma concentration of drugs decreased after maximum level, the contribution of lysosomes to their subcellular distribution increased. The uptake of the basic drugs into lysosomes depended both on their intralysosomal pH and on the drug lipophilicity. As the lipophilicity of the basic drugs increased, they accumulated more than the values predicted from the pH-partition theory and raised the intralysosomal pH more potently, probably owing to their binding with lysosomal membranes with or without additional intralysosomal aggregation. These phenomena should be considered as a basis of drug interaction in clinical treatments.

Key words—basic drug; distribution; lysosome; lipophilicity; disposition kinetics

1. はじめに

薬物治療において期待される効果を得るあるいは副作用を回避するには、その分布機構の理解が必要である。従来、多くの薬物の生体膜透過機構は pH 分配理論に従う受動拡散によると考えられてきたが、分子生物学・遺伝子工学的研究の飛躍的な進歩に伴い、選択的に薬物の細胞内取り込みや細胞外排出に関与する生体膜輸送担体が次々に明らかにされてきた。¹⁻⁴⁾ 一方、数多くの薬物でその物理・化学的性質である脂溶性と体内分布との間に相関性のあることが報告されている。⁵⁻⁸⁾ 筆者らは、10 種類の塩基性薬物のオクタノール/水分配係数 (P_{oct}) 値と、家兎の実験より求めた組織—血漿中薬物濃度比、血液—血漿中薬物濃度比及び肝固有クリアランス値との間に非結合型非イオン型薬物濃度を考慮することにより、いずれも高い相関性を得た。^{9,10)} そして、これらの正の回帰式に、薬物の P_{oct} 値とヒ

トの血漿中非結合型分率を代入するのみで、家兎での実験からヒトの薬物速度論的パラメータを算出し、生理学的薬物速度論モデルを用いることにより、¹¹⁾ 動物からヒトへのアニマルスケールアップによる脂溶性に基づいたヒトの薬物体内動態予測法を確立した。¹²⁾

一方、塩基性薬物の体内分布の要因については多くの研究がなされている。筆者らは、塩基性薬物の分布容積が顕著に大きく、主要組織では肺、心臓、腎臓、脳、筋肉の順に移行性が高いこと、^{9,13-16)} さらに、その分布容積が体脂肪量に相関することを明らかにした。^{17,18)} その他、酸性リン脂質や、肺の mitochondria (Mit) 内のモノアミン酸化酵素などの関与についても報告されている。^{19,20)} さらに、細胞レベルでの分布についても検討されており、ある種の塩基性薬物の脳内へのキャリアを介した取り込みや、²¹⁾ 濃度勾配に逆らった脳シナプス小胞への濃

縮が報告されている。²²⁾ 特に、薬物の細胞内局在と副作用との関係については、塩基性薬物の amiodarone 投与時に見られる肺線維症や間質性肺炎が、肺のリソソーム (Lys) への濃縮によること、すなわち、薬物が Lys に濃縮されリン脂質代謝を阻害することによって、リン脂質が Lys に蓄積し副作用が発現することが指摘されている。^{23,24)} Lys は 60 種類以上の加水分解酵素を含み pH 3—6 の弱酸性、緩衝能は 20—50 mM/pH、容積は 3.27 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ の顆粒として知られており、細胞の種類によっても、細胞単位でも不均一である。また、Lys の性質や薬物の取り込みについての報告は、肝細胞を用いた報告が多く、組織細胞間での差に関する検討はなされていない。

そこで、筆者らは塩基性薬物の体内分布動態を支配する要因として、細胞内オルガネラの Lys に着目し (Fig. 1)、その細胞内分布機構について検討し新しい知見を得た。

2. ラットにおける塩基性薬物の細胞内分布動態

まず、筆者らは、Lys 阻害剤である NH_4Cl (3 mg/min/kg) をラットに定速静注し、Table 1 に示した塩基性薬物のうち P_{oct} 値が中程度の biperiden (BP) あるいは trihexyphenidyl (TP) を 2 時間後から併用して定速静注し、各組織—血漿中薬物濃度比 (K_p) を求めた。Table 2 には、コントロールあるいは NH_4Cl 投与群での BP 及び TP の各 K_p 値及び

NH_4Cl による低下比を示した。²⁵⁾ NH_4Cl 投与による K_p 値の低下比は組織間で異なり、肺で約 0.7—0.8、心臓及び腎臓で約 0.5—0.55、脳、腸、筋肉及び脂肪で約 0.22—0.4 と肺での低下が著明であった。この低下比が薬物の組織分布への Lys の関与であることが示唆された。

さらに、筆者らは、臓器ごとの細胞レベルでの分布差についての情報を得るため、脳、心臓及び肺における細胞内分布動態について検討した。BP をラットに定速静注し、定常状態における BP の組織細胞内画分—血漿中薬物濃度比 ($K_{p, sf}$) を算出した。脳及び心臓で、各組織の細胞画分の $K_{p, sf}$ とタンパク量との間により相関性が得られたが、肺では顆粒画分 (P_2) への集積が他の画分に比較して著明に高く相関性が認められなかった (Fig. 2-a).²⁶⁾ P_2 は主に Lys と Mit で構成されていることから、Lys 内 pH を上昇させる NH_4Cl を同時に投与し、肺の細胞内分布を比較した結果、いずれの画分でも $K_{p, sf}$ は低下していたが、その低下率と Lys の標識酵素の 1 つである酸性フォスファターゼ活性との間には良い相関性が得られ (Fig. 2-b), Lys が塩基性薬物の組織分布を決定する要因の 1 つであることが示唆

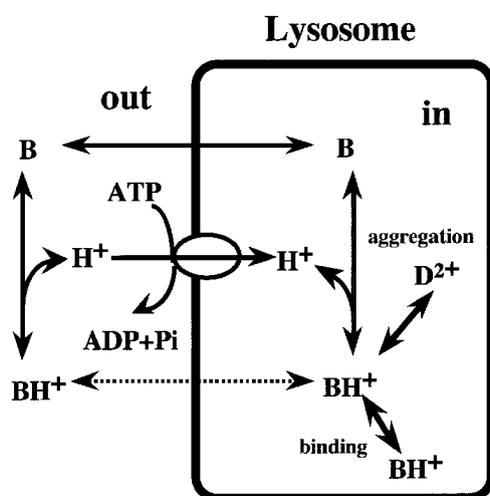


Fig. 1. Diagrammatic Representation of Lysosomal Accumulation of Basic Drugs through Protonation, Aggregation and Binding to Membranes

B and BH^+ denote neutral and protonated species of a basic drug, respectively, and D^{2+} denotes dimer of BH^+ .

Table 1. Physicochemical Properties of Basic Drugs

Drug	pK_a^a	$\text{Log } P_{\text{oct}}^b$
Atropine	9.9	1.51
Nitrazepam	3.4	2.21
Quinine	4.1, 8.5	2.28
Diltiazem	7.7	2.67
Amantadine	10.4	2.7
Diazepam	3.5	2.99
Propranolol	9.5	3.1
Verapamil	8.7	3.13
Haloperidol	7.8	3.23
Pentazocine	8.5	3.31
Clotiazepam	3.6	3.49
Biperiden	8.8	4.25
Trihexyphenidyl	8.7	4.49
Trifluoperazine	8.1	4.61
Clomipramine	8.5	4.71
Imipramine	9.5	4.77
Promethazine	9.1	4.81
Chlorpromazine	9.3	5.19
Chloroquine	8.4, 10.8	5.82

a) Values were obtained from Refs. 9 and 30.

b) Logarithm of the octanol-water partition coefficient of the nonionized form of the drug.

Table 2. Effect of NH_4Cl on the Tissue-to-Plasma Concentration Ratio (K_p) of Biperiden and Trihexyphenidyl

Tissue	Biperiden			Trihexyphenidyl		
	Control ^{a)}	with NH_4Cl ^{b)}	Ratio of decrease ^{c)}	Control ^{a)}	with NH_4Cl ^{b)}	Ratio of decrease ^{c)}
Lung	52.1 ± 9.7	11.8 ± 2.2**	0.773	59.5 ± 2.6	18.9 ± 7.7**	0.682
Heart	6.9 ± 2.3	3.2 ± 0.1*	0.534	7.3 ± 1.0	3.4 ± 0.7**	0.543
Kidney	8.7 ± 1.5	4.1 ± 0.2**	0.526	13.5 ± 1.1	7.0 ± 1.1**	0.484
Brain	6.6 ± 1.5	3.8 ± 0.1*	0.432	6.8 ± 0.7	4.5 ± 0.7*	0.332
Gut	9.8 ± 2.2	7.0 ± 0.5	0.286	15.0 ± 3.3	8.6 ± 0.7*	0.425
Muscle	3.4 ± 0.7	2.6 ± 0.1	0.232	3.2 ± 0.5	2.3 ± 0.6	0.277
Fat	51.0 ± 6.6	41.5 ± 2.9	0.186	67.8 ± 6.5	47.2 ± 15.0	0.303

Each value represents the mean ± S.D. of three rats. Asterisks denote significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). a) K_p after infusion of biperiden or trihexyphenidyl alone. b) K_p after infusion of biperiden or trihexyphenidyl with NH_4Cl . c) The values are the ratio of decrease of K_p by NH_4Cl .

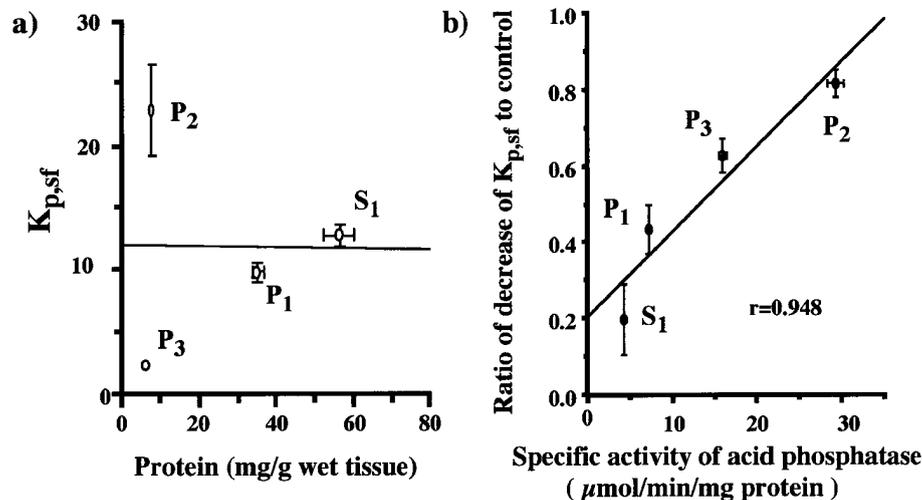


Fig. 2. The Relationships between the Protein Content and Subcellular Fraction-to-Plasma Concentration Ratio ($K_{p, sf}$) of Biperiden at Steady-State without NH_4Cl Treatment (a) and the Relationships between the Specific Activity of Acid Phosphatase and the Decrease in the Ratio of the $K_{p, sf}$ with NH_4Cl Treatment (b) in Rat Lung.

The solid line represents the linear regression. P₁: nuclear fraction, P₂: post-nuclear fraction (e.g. lysosome, mitochondria), P₃: microsomal fraction, S₁: cytosol fraction. Mean ± S.E.M. ($n=3$).

された。²⁵⁾

In vitro 実験において、ラット肺 P₂ への塩基性薬物の取り込みは、脂溶性の低い薬物ほど medium pH の上昇による取り込み量が増加し、 NH_4Cl による取り込み阻害効果は、薬物脂溶性の上昇に伴い低下したので、塩基性薬物の肺 P₂ への分布が、薬物の脂溶性と Lys への取り込みに依存していることが示唆された。²⁷⁾ そこで、Lys の単離精製の手法²⁸⁾ の確立されている肝臓を用いて、塩基性薬物の組織分布に与える Lys の影響を検討した。Chlorpromazine (CPZ), imipramine (IMP) 及び BP を、それぞれラットに静脈内投与し 10 分後における各細胞

画分のタンパク質の構成比 (%) と、総ホモジネートに対する各画分のタンパクあたりの薬物濃度比との関係を求めた (Fig. 3).²⁹⁾ Lys におけるタンパクあたりの薬物濃度比は、CPZ, IMP 及び BP でそれぞれ 7.3, 9.6 及び 4.2 であり、他の画分ではわずか 0.4—1.7 と小さかった。このことより、Lys には、他のオルガネラよりも塩基性薬物がより選択的に集積することがわかった。

塩基性薬物の結合 (集積) 特性を詳細に検討するため、Lys と Mit を分離精製し *in vitro* 結合実験を行った。²⁹⁾ Figure 4 には、37°C における Lys 及び Mit 画分への IMP の取り込みを Scatchard plot で

示した. Lys には少なくとも 2 つのタイプの結合部位, すなわち high-affinity/low-capacity 及び low-affinity/high-capacity の結合部位の存在が示唆された. しかし, 50 mM NH₄Cl 存在下では high-affinity/low-capacity は消失し, low-affinity/high-capacity のみになった. 一方, Mit 画分では 1 つの結合部位, low-affinity/high-capacity のみが認められた. Table 3 には, NONLIN プログラムを用いて算出した 50 mM NH₄Cl, あるいは 50 μM CPZ 存在下又は非存在下での Lys と Mit 画分への IMP の最大結合部位数と解離定数を示した. 高親和性部位は Lys にのみ認められたが, NH₄Cl あるいは CPZ の添加によ

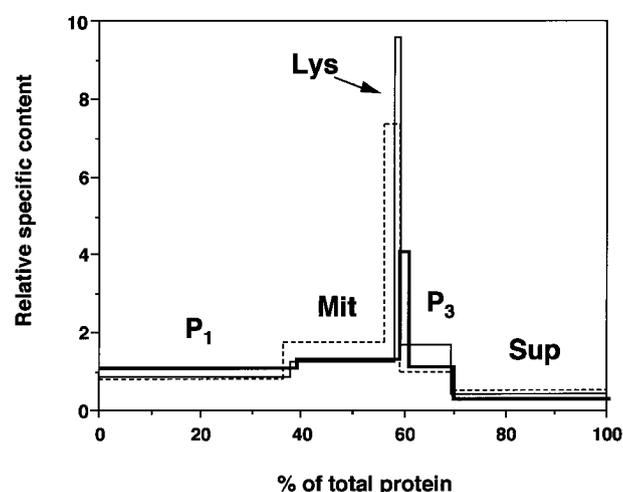


Fig. 3. Subcellular Distribution of Chlorpromazine (CPZ), Imipramine (IMP) and Biperiden (BP) in Rat Liver

Rats were injected *i.v.* with 3.2 mg/kg of each basic drug 10 min before sacrifice and their livers were fractionated. P₁: nuclei fractions, Mit: mitochondria, Lys: lysosome, P₃: microsome, Sup: cytosol fractions.: CPZ, —: IMP, —: BP.

り消失した. 一方, それぞれの画分での低親和性部位の最大結合部位数及び解離定数は, NH₄Cl あるいは CPZ の存在にかかわらず, いずれの場合も同程度の値が得られた.

临床上, IMP の有効血漿中濃度は 100—300 ng/mL とされており, 肝臓の組織—血漿中薬物濃度比 (7.5) 及び組織中蛋白量 (18%) を用いて算出すると肝臓中の IMP 濃度は, 14.9—44.6 pmol/mg protein となる. この濃度における IMP の high-affinity/low-capacity 部位への結合は, Table 3 に示したパラメータを用いて算出した結果, 非結合型濃度を考慮しても 63% 以上も占めることがわかった. したがって, 臨床使用濃度での IMP の肝臓への取り込

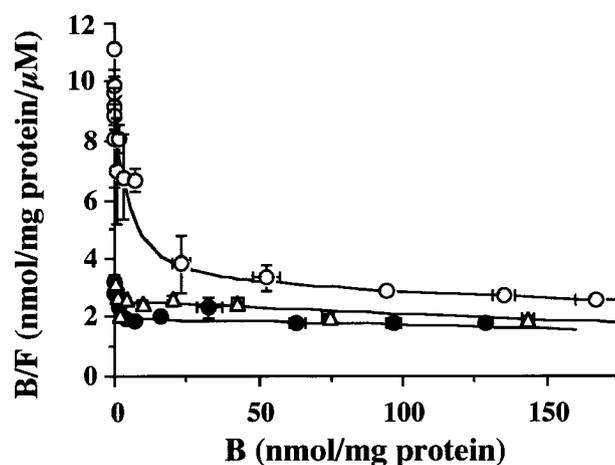


Fig. 4. Scatchard Plots of IMP Uptake into Lys and Mit Fractions

Lys and Mit fractions were incubated at 37°C for 10 min with IMP in the presence (△, Lys) or absence (○: Lys, ●: Mit) of 50 mM NH₄Cl. Mean ± S.E.M. (*n* = 3).

Table 3. Dissociation Constants (K_d) and Maximum Number of Binding Sites (B_{max}) Calculated from Scatchard Analysis of Imipramine Uptake into Lysosome and Mitochondrial Fractions in the Absence and Presence of NH₄Cl or Chlorpromazine (CPZ)

	High affinity site		Low affinity site	
	K_d (μM)	B_{max} (nmol/mg protein)	K_d (μM)	B_{max} (nmol/mg protein)
Lysosome				
control	0.897 ± 0.241	4.902 ± 0.971	258 ± 39	804 ± 97
NH ₄ Cl (50 mM)	—	—	237 ± 50	603 ± 112
CPZ (50 μM)	—	—	382 ± 78	713 ± 132
Mitochondria				
control	—	—	421 ± 129	832 ± 241
NH ₄ Cl (50 mM)	—	—	393 ± 69	733 ± 118

Each value represents the means ± S.D. of three to six experiments.

みは、主として Lys 内 pH に依存した high-affinity/low-capacity 結合部位が関与していると考えられる。

以上のことから、塩基性薬物の細胞内分布動態には、Lys への取り込みが深く関与していることが示唆された。

3. 塩基性薬物の精製ラット肝 Lys への分布・濃縮機構

临床上、塩基性薬物は、抗精神病薬、抗うつ薬、抗不整脈薬、抗悪性腫瘍薬など作用も多岐に渡り繁用されているため、併用投与により Lys への薬物分布が変動し、副作用も含めた薬理効果の発現に影響する可能性がある。そこで、Lys への薬物集積に影響する要因や薬物間での阻害効果を明らかにするために、精製ラット肝 Lys を用いて、塩基性薬物の Lys への分布・濃縮機構を検討した。³⁰⁾

4, 25, 37°C における $[^3\text{H}]$ IMP の Lys への取り込みは、極めて速く 20 秒以内に最高濃度に達し、また温度依存性はほとんど認められなかった。しかし、この取り込み量は各種薬物で影響され、37°C では ATP を添加することにより上昇した (Fig. 5)。この ATP の効果は、bafilomycin A_1 を添加することによってコントロールレベルに低下した。また、nigericin によって取り込みは完全に阻害された。一方、4°C では、 $[^3\text{H}]$ IMP の取り込みは、ATP 非存在下でも 20 分間減衰しなかったが、nigericin 添加により約 30% に低下した。また、IMP の取り込みに対する対向輸送効果は認められなかった。

各種塩基性薬物の Lys 内 pH に対する濃度依存性

を検討した結果、 NH_4Cl , IMP, propranolol (PPR) 及び CPZ のいずれの場合も、薬物濃度の上昇に伴って Lys 内 pH は上昇した (Fig. 6)。しかし、その効果には薬物間で差があり、CPZ が最も低濃度で Lys 内 pH を上昇させ、次いで IMP, PPR, NH_4Cl の順であった。 $[^3\text{H}]$ IMP 及び $[^{14}\text{C}]$ methylamine ($[^{14}\text{C}]\text{MeNH}_2$) の Lys への取り込み阻害効果も pH 上昇作用と同様に CPZ が最も強く、次いで PPR, NH_4Cl の順であった (Fig. 7)。 $[^3\text{H}]$ IMP と $[^{14}\text{C}]\text{MeNH}_2$ の Lys への取り込みに対する各種塩基性薬

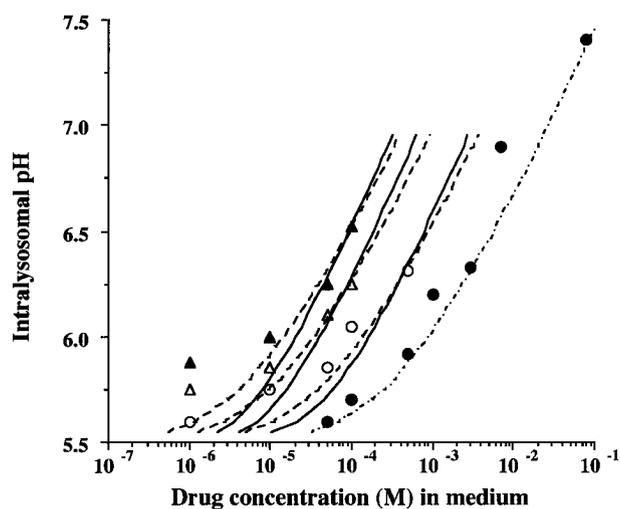


Fig. 6. Effect of the Medium Concentration of the Weakly Basic Drugs on the Intralysosomal pH

▲: Chlorpromazine (CPZ), △: imipramine (IMP); ○: propranolol (PPR), ●: NH_4Cl . The dotted line (---), the broken lines (---), and the solid lines show simulation curves for NH_4Cl using Eq. 2; for CPZ, IMP, and PPR using Eq. 3 for binding, and for CPZ, IMP, and PPR using Eq. 4 for aggregation, all obtained by means of the MULTI program.

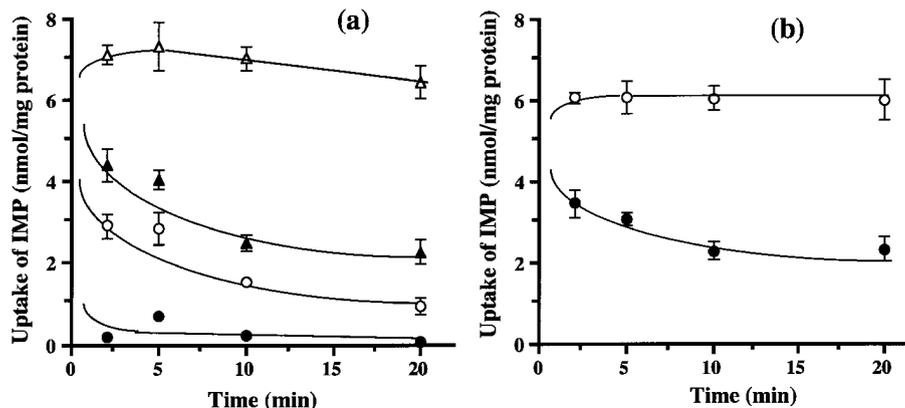


Fig. 5. Effects of Nigericin (NIG), ATP and Bafilomycin A_1 (BAF) on $[^3\text{H}]$ IMP Uptake into Lys at pH 7.4 in KCl Medium
Lys fractions were preincubated at 37°C (a) or 4°C (b) for 3 min with NIG (2.5 μM), ATP (1 mM) and/or BAF (10 nM) before addition of $[^3\text{H}]$ IMP (1 μM).
○: control, ●: +NIG, △: +ATP, ▲: +ATP+BAF.
Mean \pm S.E.M. ($n=3$).

物の阻害効果 (IC_{50} 値)の間には高い相関性が得られた ($r=0.842$). $MeNH_2$ は顆粒内外のプロトン勾配によってのみ取り込まれることより,^{31,32} $[^3H]$ IMPも $[^{14}C]MeNH_2$ と同様にプロトン勾配によって取り込まれること,また,各種塩基性薬物による取り込み阻害は,これらの薬物がLys内pHを上昇させるためであることが示唆された.

さらに,各塩基性薬物の P_{oct} 値と $[^3H]$ IMPの取り込みに対する IC_{50} 値との間には,二酸塩基である chloroquine を除いて高い正の相関が得られ,pH上昇作用には脂溶性が関与していることが示唆された (Fig. 8). Lysへの取り込みはmedium pHの上昇すなわちプロトン勾配の上昇に伴って増加し,IMPの取り込みはLys内外のpH差に依存することがわかった (Fig. 9). De Duveらは既に塩基性薬物のLysへの取り込みがpH差に依存し,その濃縮比がLys内外の H^+ 濃度比に等しいことを報告しているが,³³ 筆者らの結果より算出した濃縮比は理論値を大きく上回り,pH差だけでは説明できなかった.

以上のことより,塩基性薬物のLysへの取り込みの特徴として,(1)基本的にはLys内外のpH差に依存すること,(2)何らかの要因によりpH差で説明される以上に濃縮される薬物があること,(3)その要因として脂溶性が関与していることが示唆された.

4. 塩基性薬物のLysへの濃縮機構

塩基性薬物が H^+ 濃度比以上に濃縮される要因として,脂溶性に関連する因子の関与が考えられた.そこで,筆者らは,膜やマトリックスの脂溶性ポリアニオンなどLys内の構成成分への結合(分配あるいは吸着)あるいはイオン型薬物の凝集(二量体形成あるいは会合)がその要因と考え,薬物濃度とLys内pHを表す関係式を導き理論の妥当性を検討した.³⁰

一般に塩基性薬物は,単純拡散によって細胞内に

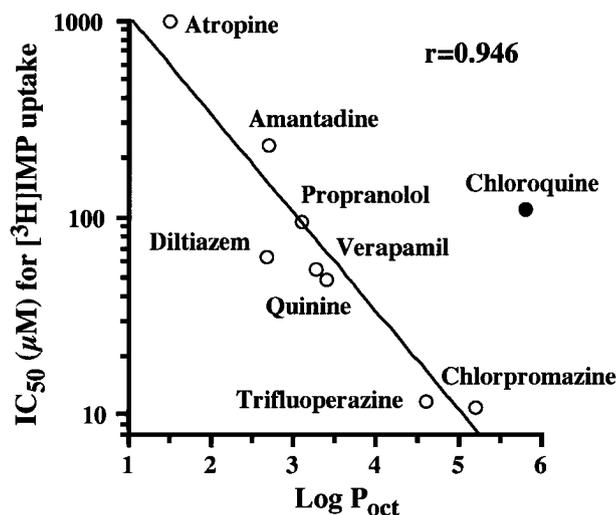


Fig. 8. The Relationship between the IC_{50} for $[^3H]$ IMP Uptake and the $\log P_{oct}$ for Basic Drugs

The continuous line is the regression line for IC_{50} and $\log P_{oct}$. Chloroquine was excluded from the correlation because it is a diprotonable base.

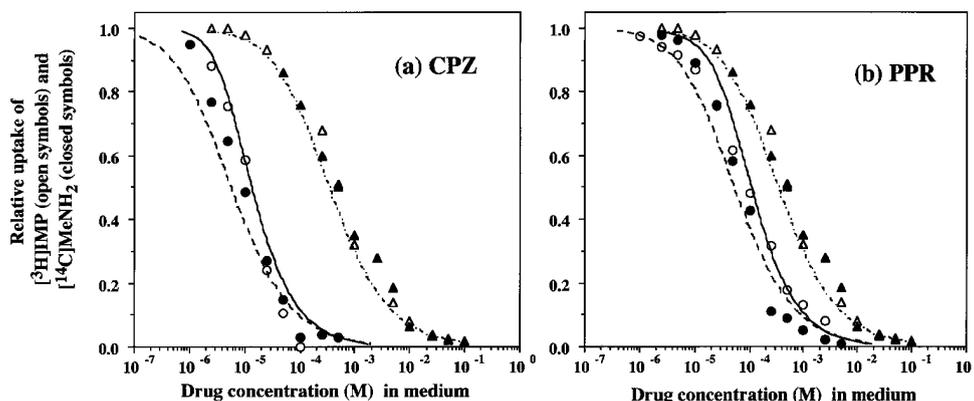


Fig. 7. Inhibition of Uptake into Lys of $[^3H]$ IMP (Open Symbols) and $[^{14}C]MeNH_2$ (Closed Symbols) by Various Drugs at pH 7.4 at $4^\circ C$

The Lys fractions were incubated in the presence of CPZ, PPR or NH_4Cl ($1 \mu M$ - 100 mM) at $4^\circ C$ for 10 min, then $[^3H]$ IMP (1 nM) or $[^{14}C]MeNH_2$ was added. After an additional 10 min incubation for $[^3H]$ IMP or 1 hr incubation for $[^{14}C]MeNH_2$ at $4^\circ C$, the $[^3H]$ IMP or $[^{14}C]MeNH_2$ taken up by Lys was determined. CPZ or PPR (\circ) and NH_4Cl (Δ).

The dotted lines (---) show simulation curves predicted for the inhibition of uptake of $[^3H]$ IMP or $[^{14}C]MeNH_2$ into Lys by NH_4Cl using Eq. 5. The dotted lines (.....) show simulation curves predicted for the inhibition of uptake of $[^3H]$ IMP or $[^{14}C]MeNH_2$ into Lys by CPZ or PPR using Eq. 6 for binding. The solid lines show simulation curves predicted for the inhibition of uptake of $[^3H]$ IMP or $[^{14}C]MeNH_2$ into Lys by CPZ or PPR using Eq. 7 for aggregation.

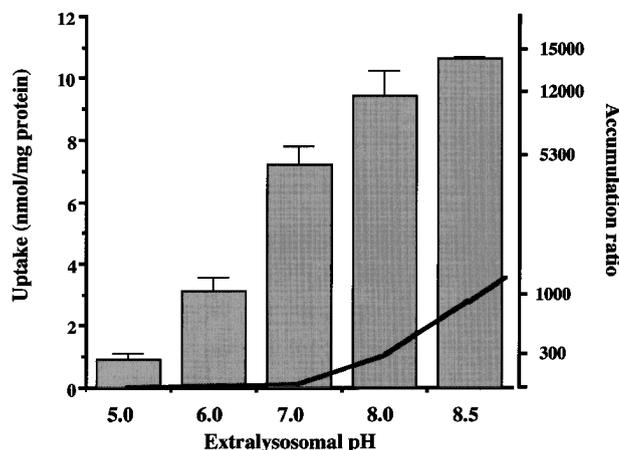


Fig. 9. Effect of Extralysosomal pH on the Accumulation of $[^3\text{H}]\text{IMP}$ ($1\ \mu\text{M}$) within Lysosomes
 —: calculated accumulation ratio based on pH-partition theory.
 Mean \pm S.E.M. ($n=3$).

取り込まれ、酸性顆粒コンパートメント内でプロトン付加型（イオン型）塩基として濃縮される。³²⁾ 塩基性薬物の Lys 内の蓄積比が Lys 内外の H^+ 濃度比に等しいならば、その濃縮比は、次式のように表される。³³⁾

$$F = \frac{C_{in}}{C_{out}} = \frac{K + [\text{H}^+]_{in}}{K + [\text{H}^+]_{out}} \quad \text{式 1}$$

F , 濃縮比; C_{in} , Lys 内の塩基性薬物濃度; C_{out} , Lys 外の塩基性薬物濃度; $[\text{H}^+]_{in}$, Lys 内の H^+ 濃度; $[\text{H}^+]_{out}$, Lys 外の H^+ 濃度; K , 塩基の解離定数

塩基性薬物が Lys 内で結合あるいは凝集しない場合、緩衝液の pH が 7.4 で薬物未添加の Lys 内 pH が N の時、添加した塩基性薬物の濃度 (x) と Lys 内 pH (y) との関係は、式 1 より以下のように導かれる。³⁰⁾

$$x = \beta \cdot (y - N) \cdot \frac{10^{-7.4}}{10^{-y}} \quad \text{式 2}$$

そこで、Lys 内で結合とか凝集せず、Lys 内で消費される H^+ の量が Lys 内に生ずる遊離型の H^+ 付加塩基の量に等しい薬物として NH_4Cl で検討した。

Figure 6 に示した NH_4Cl の添加濃度と Lys 内 pH の実測値との関係に式 2 を適用し、MULTI プログラムを用いた最小二乗法により、Lys の緩衝能 (β : buffering capacity) 45.9 が得られた。また、その β 値を用いて算出した NH_4Cl の計算曲線は、実測値とよい一致を示した。

次に、Lys 内の塩基性薬物が Lys 内膜に結合（分

配あるいは吸着）あるいは二量体を形成し凝集すると仮定して、以下の計算式を導いた。³⁰⁾

まず、塩基性薬物が内膜に結合（分配あるいは吸着）すると仮定すると、 x と y との関係は次式のように導かれる。

$$x = \frac{\beta \cdot (y - N) \cdot 10^{-7.4}}{(1 + L \cdot K_1) \cdot 10^{-y}} \quad \text{式 3}$$

L , Lys 膜の量

結合係数 (K_1) 値は、先の NH_4Cl の場合の β 値を用いて、Fig. 6 に示す CPZ あるいは PPR の薬物濃度と Lys 内 pH との関係に式 3 に適用し、MULTI プログラムを用いた最小二乗法により算出した。

また、塩基性薬物が二量体を形成し凝集すると仮定すると、 x と y との関係は次式のように導かれる。

$$x = \frac{\sqrt{1 + 4 \cdot K_2 \beta \cdot (y - N)} - 1}{2 \cdot K_2} \cdot \frac{10^{-7.4}}{10^{-y}} \quad \text{式 4}$$

凝集係数 (K_2) 値は、Fig. 6 に示す CPZ あるいは PPR の薬物濃度と Lys 内 pH との関係に式 4 に適用し、MULTI プログラムを用いた最小二乗法により算出した。

次に、 K_1 及び K_2 値を用いて Lys への取り込みの阻害効果について検討した。 $[^{14}\text{C}]\text{MeNH}_2$ あるいは $[^3\text{H}]\text{IMP}$ の取り込み率 (Z) は、阻害剤がない場合の取り込み量に対する阻害剤 ($x\ \text{mM}$) の存在により Lys 内 pH が y となったときの取り込み量の比で表せるため、 x と y との関係式より競合阻害効果が予測できる。塩基の Lys への取り込みが Lys 内外の pH 差にのみよる場合、

$$x = -\frac{\beta}{10^{(7.4-N)}} \cdot \frac{\log Z}{Z} \quad \text{式 5}$$

結合あるいは凝集を伴う場合、それぞれ式 3 及び式 4 より、

$$x = -\frac{\beta}{(1 + L \cdot K_1) \cdot 10^{(7.4-N)}} \cdot \frac{\log Z}{Z} \quad \text{式 6}$$

$$x = \frac{\sqrt{1 + 4 \cdot K_2 \cdot \beta \cdot (-\log Z)} - 1}{2 \cdot K_2 \cdot 10^{(7.4-N)}} \cdot \frac{1}{Z} \quad \text{式 7}$$

が導かれる。しかし、Fig. 7 に示したように、これらの式 6 あるいは式 7 を用いて、結合あるいは凝集を考慮して算出した CPZ あるいは PPR の予測曲線は、いずれの場合も、実測値と一致し、どちらの考え方によっても Lys への濃縮を説明できることが明らかになった。しかし、いずれの関与によるかは明確にできなかった。

次に、IMP の添加濃度と Lys への濃縮比との関係式を導いた。結合あるいは凝集の考慮により、それぞれ次式が導かれる。

$$F' = (1 + K_1 \cdot k \cdot A) \cdot F \quad \text{式 8}$$

$$F' = (1 + K_2 \cdot C_{out} \cdot F) \cdot F \quad \text{式 9}$$

F' , 総濃縮比; F , 濃縮比; k , Lys の膜厚; A , 膜表面積; C_{out} , Lys 外の IMP 濃度

これらの関係式を用いて算出した計算曲線と実測値を Fig. 10 に示したが、IMP の濃縮比の実測値は、低濃度となるほど高くなり濃度依存性が認められ、結合を仮定した計算曲線と同様の傾向が認められ

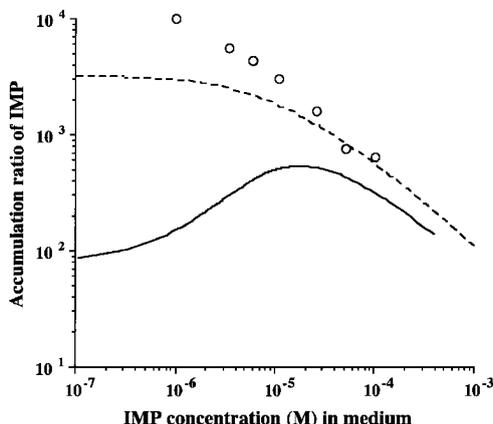


Fig. 10. Effect of the Medium Concentration on the Intralysosomal Accumulation of IMP

The open circles were the observed values of the accumulation ratio (intralysosomal/extralysosomal concentration) of IMP at various extralysosomal concentrations after 10 min at 4°C. The dotted line was calculated using Eq. 8 for binding. The solid line was calculated using Eq. 9 for aggregation.

た。一方、凝集を仮定した場合、 $1 \mu\text{M}$ 以下で濃縮比が実測値の約 $1/70$ と低くなり、基本的には結合が関与していることが示唆されたが、結合の様式として分配あるいは吸着のいずれが主要であるかについては、物理・化学的に明確にできなかった。しかし、塩基性薬物が Lys 内外の pH 勾配によって取り込まれた後、脂溶性の高い薬物ほどイオン型となっても Lys 膜等に結合し低濃度でも高い濃縮が見られることが説明でき、pH 仮説と脂溶性仮説の統一的な理解が可能となった。

5. まとめ

著者らは、高脂溶性塩基性薬物の体内分布機構が、細胞内 Lys への取り込みを考慮することでかなり説明のつくことを明らかにした (Fig. 11). 塩基性薬物は細胞内の酸性コンパートメントである Lys に特に高い親和性を示し、その取り込み量は pH に依存しており脂溶性とは異なる機構が考えられた。しかし、詳細な検討結果より、pH に依存して取り込まれた後、脂溶性の高い薬物ほど Lys 内膜等に結合することによって H^+ 濃度比以上に濃縮されることが明らかになり、細胞内を含めた体内分布には脂溶性の寄与が大きいことがわかった。さらに、脂溶性の高い薬物ほど Lys を介した薬物間相互作用を誘発する可能性が高いことが示唆された。本研究による脂溶性に基づいた細胞内分布機構の解明は、薬物の有効利用や副作用回避を考える上で有益な情報を提供し、適正な薬物療法の実践に貢献すると考える。

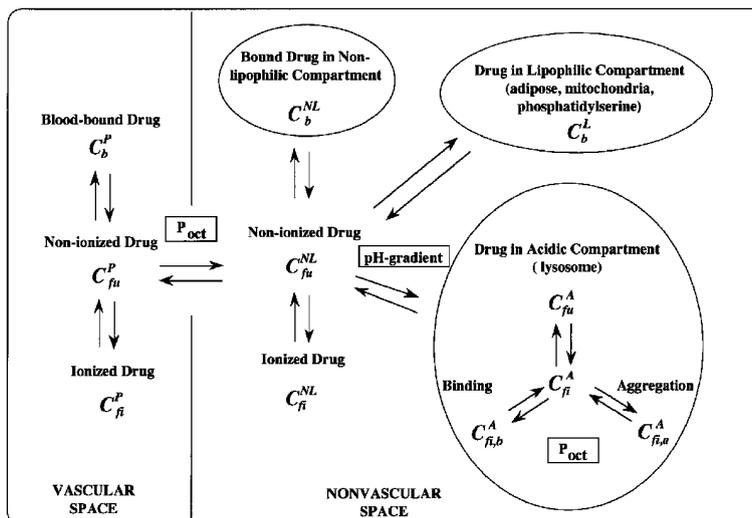


Fig. 11. A Proposed Mechanism of Tissue Distribution of Basic Drugs

REFERENCES

- 1) Fei Y.J., Kanai Y., Nussberger S., Ganapathy V., Leibach F.H., Romero M.F., Singh S.K., Boron W.F., Hediger M.A., *Nature*, **368**, 563–566 (1994).
- 2) Garcia C.K., Goldstein J.L., Pahak R.K., Anderson R.G., Brown M.S., *Cell*, **76**, 865–873 (1994).
- 3) Ito K., Suzuki H., Hirohashi T., Kume K., Shimizu T., Sugiyama Y., *Am. J. Physiol.*, **272**, G16–22 (1997).
- 4) Nezu J., Tamai I., Oku A., Ohashi R., Yabuuchi H., Hashimoto N., Nikaido H., Sai Y., Koizumi A., Shoji Y., Takada G., Matsuishi T., Yoshino M., Kato H., Ohura T., Tsujimoto G., Hayakawa J., Shimane M., Tsuji A., *Nat. Genet.*, **21**, 91–94 (1999).
- 5) Greenblat D.J., Arendt R.M., Abermethy D.R., Giles H.G., Sellers E.M., Shader R.I., *Br. J. Anaesth.*, **55**, 985–989 (1983).
- 6) Levin V. A., *J. Med. Chem.*, **23**, 682–684 (1980).
- 7) Hirohashi T., *Xenobio. Metabol. And Dispos.*, **2**, 291–301 (1987).
- 8) Watari N., Sugiyama Y., Kaneniwa N., Hiura M. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **16**, 279–301 (1988).
- 9) Yokogawa K., Nakashima E., Ishizaki J., Maeda H., Nagano T., Ichimura F., *Pharm. Res.*, **7**, 691–696 (1990).
- 10) Ishizaki J., Yokogawa K., Nakashima E., Ichimura F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 768–772 (1997).
- 11) Nakashima E., Yokogawa K., Ichimura F., Kurata K., Kido H., Yamaguchi N., Yamana T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 718–725 (1987).
- 12) Ishizaki J., Yokogawa K., Nakashima E., Ichimura F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 762–767 (1997).
- 13) Ichimura F., Yokogawa K., Yamana T., Tsuji A., Mizukami Y., *Int. J. Pharm.*, **15**, 321–333 (1983).
- 14) Ichimura F., Yokogawa K., Yamana T., Tsuji A., Yamamoto K., Murakami S., Mizukami Y., *Int. J. Pharm.*, **19**, 75–88 (1984).
- 15) Yokogawa K., Nakashima E., Ichimura F., Yamana T., *J. Pharmacobiodyn.*, **9**, 409–416 (1986).
- 16) Yokogawa K., Nakashima E., Ichimura F., *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 258–263 (1990).
- 17) Nakashima E., Yokogawa K., Ichimura F., Hashimoto T., Yamana T., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **76**, 10–13 (1987).
- 18) Yokogawa K., Nakashima E., Ishizaki J., Hasegawa M., Kido H., Ichimura F., *Biopharm. Drug Dispos.*, **13**, 131–140 (1992).
- 19) Nishiura A., Murakami T., Higashi Y., Yata N., *Pharm Res.*, **5**, 209–213 (1988).
- 20) Yoshida H., Okumura K., Hori R., *Pharm Res.*, **7**, 398–401 (1990).
- 21) Yamazaki M., Terasaki T., Yoshida K., Nagata O., Kato H., Ito Y, Tsuji A., *Pharm. Res.*, **11**, 1516–1518 (1994).
- 22) Moriyama Y., Tsai H.L., Futai M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 278–281 (1993).
- 23) Honegger U.E., Zuehlke R.D., Scuntaro I., Schaefer M.H.A., Toplak H., Wiesmann U.N., *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 349–356 (1993).
- 24) Reasor M.J., *Toxicol Appl. Pharmacol.*, **97**, 47–56 (1989).
- 25) Ishizaki J., Yokogawa K., Nakashima E., Ohkuma S., Ichimura F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 761–766 (1998).
- 26) Ishizaki J., Yokogawa K., Nakashima E., Ohkuma S., Ichimura F., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 67–71 (1998).
- 27) Ishizaki J., Yokogawa K., Nakashima E., Ohkuma S., Ichimura F., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 858–861 (1998).
- 28) Arai K., Kanaseki T., Ohkuma S., *J. Biochem.*, **110**, 541–547 (1991).
- 29) Ishizaki J., Yokogawa K., Hirano M., Nakashima E., Sai M., Ohkuma S., Ohshima T., Ichimura F., *Pharm. Res.*, **13**, 902–906 (1996).
- 30) Ishizaki J., Yokogawa K., Ichimura F., Ohkuma S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 1088–1098 (2000).
- 31) Reijngoud D. J., Tager J. M., *FEBS Lett.*, **64**, 231–235 (1976).
- 32) Reijngoud D. J., Tager J. M., *Biochimica. Biophysica. Acta*, **297**, 174–178 (1973).
- 33) De Dève C., De Barsey T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van Hoof F., *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2495–2531 (1974).