

アルブミンによる生理活性物質の輸送

Transport of Bioactive Substances across Liquid Membrane with Albumin as Carrier

妹 尾 学*・渡 辺 貞 夫**・岩 元 和 敏*
Manabu SENŌ, Sadao WATANABE and Kazutoshi IWAMOTO

1. 諸 言

血しょう中のリポタンパク質やアルブミン、グロブリンは、水に不溶性の脂肪酸、トリグリセリド、コレステロール、ステロイドホルモンなどを吸着して移送する機能をもつことが知られている¹⁾。たとえば、脂肪酸²⁾や胆汁酸³⁾が、アルブミンと結合して肝内へ促進的に輸送されることが報告されているが、一方血しょうタンパク質と結合しない薬物のほうが薬理的有効性が高いとも言われている⁴⁾。しかし、アルブミンなど血しょうタンパク質の輸送機能については、まだ十分に明らかにされていない。われわれは先に牛血清アルブミンBSAによる長鎖脂肪酸の液膜輸送によって、BSAの輸送キャリアとしての性質を詳細に調べた⁵⁾。さらにアルブミン輸送の意義を明らかにし、工学的応用のための知見を得ることを目的として、ステロイドホルモンやカルバメート系農薬など生理活性物質の液膜輸送を、アルブミンをキャリアとして検討した。

2. 実 験

2.1 試薬

牛血清アルブミンBSAはシグマ社製(フラクションV A-8022)を使用した。アルカリ分解により吸着されている脂肪酸量を調べたところ、BSA100分子あたり脂肪酸1分子程度であった。ステロイドホルモンとして、アンドロステロン(3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one)、デヒドロエピアンドロステロン(3 β -hydroxyandrost-5-en-17-one)、テストステロン(17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one)(以上和光純薬製)、エチニルエストラジオール(17-pregna-1,3,5-trien-20-yne-3,17-diol, 東京化成製)、プロゲステロン(pregn-4-ene-3,20-dione)およびエストラジオール(estra-1,3,5(10)-trien-3,17 α -diol)(以上シグマ社製)を用いた。カルバメート系農薬

として次の8種、すなわちBPMC(*o*-sec-butylphenyl methylcarbamate)、MTMC(*m*-tolyl carbamate)、MPMC(3,4-xylyl methylcarbamate)、MIPC(*o*-cumenyl methylcarbamate)、PHC(2-isopropoxyphenyl methylcarbamate)、XMC(3,5-xylyl methylcarbamate)、MCC(methyl(3,4-dichlorophenyl)carbamate)およびNAC(1-naphtyl methylcarbamate)で、和光純薬製残留農薬試験用を用いた。構造式を表1に示す。

2.2 分析

試料中のステロイドホルモンの濃度は高速液体クロマトグラフィーにより、蛍光または紫外検出器を用いた。カルバメート系農薬の分析は、NACについては高速液体クロマトグラフィー、それ以外はFIDガスクロマトグラフィーによった。

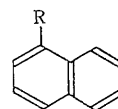
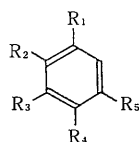
2.3 移行および輸送実験

1%BSAを溶解した1/15Mリン酸緩衝液(pH7.4)50mlを三角フラスコに入れ、種々の濃度の生理活性物質

表1 カルバメート系農薬試料

略号	骨格*	R ₁ (R)	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
MIPC	A	-OCONHCH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-H	-H	-H
BPMC	A	-OCONHCH ₃	-CH(C ₂ H ₅)CH ₃	-H	-H	-H
PHC	A	-OCONHCH ₃	-OCH(CH ₃) ₂	-H	-H	-H
MTMC	A	-OCONHCH ₃	-H	-CH ₃	-H	-H
XMC	A	-OCONHCH ₃	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃
MPMC	A	-OCONHCH ₃	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H
MCC	A	-NHCOOCH ₃	-H	-Cl	-Cl	-H
NAC	B	-OCONHCH ₃				

*A:R₁,R₂,R₃,R₄,R₅-phenyl. B:1-R-naphtyl



*東京大学生産技術研究所 第4部

**神奈川県衛生研究所

研究速報

(ステロイドホルモン、農薬)を含むヘキサン10mlを積層し、25°Cに保ち、水相をかくはんする。平衡に達した後(約15h)、ヘキサン層に残る物質を測定した。別にBSAを添加しないリン酸緩衝液について同様の実験を行い、以上の結果から生理活性物質の水相/ヘキサン相分配比および水相におけるBSA結合比(結合型/遊離型)を求めた。

液膜輸送実験は二重円筒型のガラス製液膜装置を用い、底部にリン酸緩衝液100mlを入れ水相とし、内管および外管(ドーナツ形)にそれぞれ20mlおよび40mlのヘキサンを入れる。内管のヘキサン相Iに生理活性物質を加え、BSAを加えた水相を通し、外管のヘキサン相IIへ移行する量を測定する。このとき温度は25°Cに保ち、底部の水相をヘキサン相との界面がゆるぐ程度にかくはんした。

3. 結果と考察

3.1 ステロイドホルモンの輸送

表2に用いた6種のステロイドホルモンの水/ヘキサン分配比および水相におけるBSA結合比をまとめて示した。液膜輸送の実験結果を、図1に示した。

プロゲステロンの場合、水相のBSA濃度が高くなるほどヘキサン原相Iからの減少速度、ヘキサン受相IIでの増大速度は大きくなり、BSAによる促進輸送が起こっていることが明らかである。デヒドロエピアンドロステロンの場合には、BSAの添加によりヘキサン原相Iから水相への移行速度は高くなるが、水相からヘキサン受相IIへの移行速度は逆に低くなる。この傾向はエチニルエストラジオールの場合にさらに顕著となる。1%BSAを添加したときのヘキサン原相Iからの減少速度およびヘキ

サン受相IIでの増大速度を、BSAを加えない場合の値を100として表2に示した。

表2の結果から、本実験で用いたステロイドホルモンは、BSAをキャリアとする液膜輸送の挙動から3つのグループに分けられることが示される。すなわち、グループAにはプロゲステロン、グループBにはテストステロン、アンドロステロン、デヒドロエピアンドロステロン、グループCにはエストラジオール、エチニルエストラジオールが入る。生理活性からみると、Aは黄体ホルモン、Bは男性ホルモン、Cは女性ホルモンである。これらの輸送特性をとくに支配する性質は、水相/ヘキサン相の分配比と考えられる。すなわち、Aは水相に入りやすく、Bは水/ヘキサンにほぼ等しく存在し、Cは水相に入りやすい。その結果、AではBSAによる促進輸送が顕著に

表2 ステロイドホルモンのBSAとの結合および液膜輸送

	分配比		輸送挙動*	
	水相/ヘキサン相	BSA結合比 結合型/遊離型	ヘキサン原相Iからの減少速度	ヘキサン受相IIでの増大速度
プロゲステロン	0.67	5.03	200	190
テストステロン	6.05	6.39	130	50
アンドロステロン	1.52	10.1	250	100
デヒドロエピアンドロステロン	2.24	3.16	250	60
エストラジオール	11.2	1.45	105	<10
エチニルエストラジオール	91.0	32.5	110	<10

*BSAを加えない場合(コントロール)を100とし、1%BSAを加えた場合の結果を相対値として示した

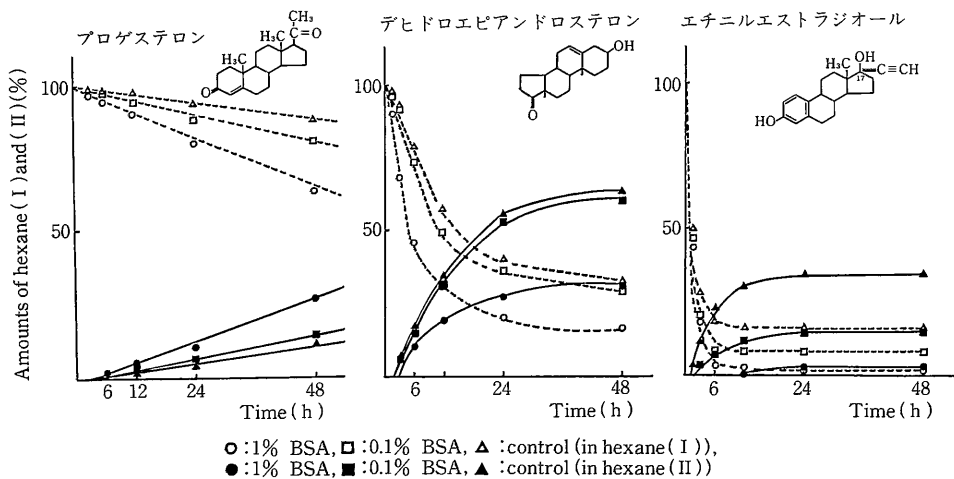


図1 アルブミンをキャリアとするステロイドホルモンの液膜輸送

研究速報
 起るが、Cでは水相への分配が容易に進み平衡に達する。

3.2 カルバメート系農薬の輸送

8種のカルバメート系農薬に対する水相/ヘキサン相分配比および水相におけるBSA結合比(結合型/遊離型)の測定結果を表3に示す。また液膜輸送の代表的な結果として、MCCおよびXMCに対する結果を図2に示した。

ヘキサン原相Iの農薬濃度は1次曲線にしたがい減少する。減少速度は水相のBSA濃度に影響され、BSAを加えない場合(コントロール)を100とすると、MCCの場合、0.1%BSAで105、1%BSAで330、5%BSAで600へ増大した。一方、ヘキサン受相IIの濃度の増加は、3hまではコントロールがいくぶん早い。3~12hではBSAの添加により促進されるようになる。コントロールでは

平衡に達するのに40h以上要するが、5%BSAの添加により20h程度となる。ヘキサン受相IIの濃度はBSAの添加により低くなる。XMCの場合、ヘキサン原相での濃度減少の初速度はBSAの添加によってもほとんど影響されないが、ヘキサン受相IIでの濃度増加はBSAの添加により低下する。濃度増加は初めは緩やかであるが、1~6hで早くなり、その後再び緩やかになり、20hでほぼ平衡に達した。

その他の農薬についての輸送挙動を、ヘキサン原相Iの濃度減少の初速度およびヘキサン受相IIの増加速度を、それぞれコントロールを100として表した結果を表3に示した。BPMCがMCCと類似のパターンを示し、そのほかはXMCと類似のパターンを示した。

以上の輸送挙動を支配する要因を調べるために、図3に示すスキームにしたがって、輸送実験の初期データからヘキサン原相Iから水相への移行速度定数 k_1 および水相からヘキサン受相IIへの移行速度定数 k_2 と水/ヘキサン分配比 P との関係を調べた。結果を図4に示す。

図4にみられるように、 $\log P$ と $\log k_1$ との間に正の相関があり、ほぼ直線の関係が成り立つが、その勾配は水相にBSAが存在するかしないかによってほとんど変化しない。一方、 $\log P$ と $\log k_2$ の間には負の相関があ

表3 カルバメート系農薬のBSAとの結合および液膜輸送

	分配比 水相/ヘキサン相	BSA結合比 結合型/遊離型	輸送挙動*	
			ヘキサン原相I からの減少速度	ヘキサン受相II での増大速度
BPMC	0.43	0.51	120	120
MCC	1.0	6.5	330	120
MIPC	1.3	0.48	100	60
MPMC	3.1	0.68	100	64
NAC	3.5	1.0	100	27
XMC	5.5	3.0	100	64
MTMC	7.3	0.42	100	64
PHC	10.5	0.33	100	62

*BSAを加えない場合(コントロール)を100とし、1%BSAを加えた場合の結果を相対値として示した

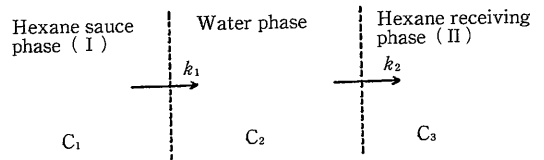
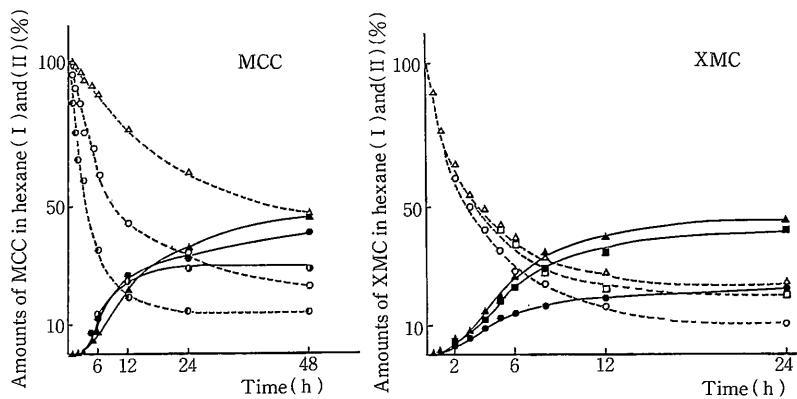


図3 生理活性物質の液膜(水相)輸送



○:1% BSA, □:0.1% BSA, △:control (in hexane (I)), ●:1% BSA, ■:0.1% BSA, ▲:control (in hexane (II))

図2 アルブミンをキャリアとするカルバメート系農薬の液膜輸送

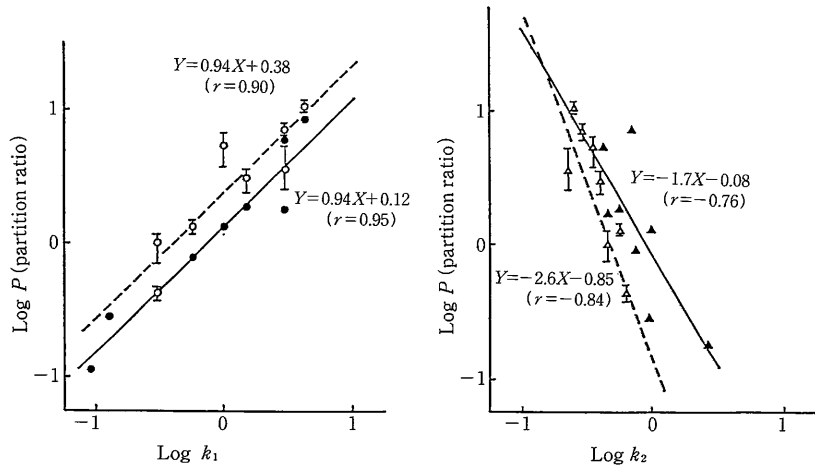


図4 カルバメート系農薬の液膜輸送における水/ヘキサン分配比 P とヘキサン-水、水-ヘキサン移行速度定数 k_1 、 k_2 との関係

り、この場合にもほぼ直線関係が成り立つが、その勾配はBSAの添加によって大きくなる。

前節で、ステロイドホルモンの輸送挙動を支配する最も重要な要因が、水/ヘキサン2相系での分配比であると考察した。すなわち、分配比が低いプロゲステロン(グループA)ではBSAの添加により輸送が促進されるが、分配比が高いグループB、Cでは逆に低下した。しかしヘキサン原相Iから水相への移行量でみると、グループCではコントロールと比べて差がないが、グループBのテストステロン、アンドロステロンでは、BSA添加による促進効果が認められた。カルバメート系農薬の輸送実験では、分配比が低いBPMCおよびMCCの場合に、プロゲステロンの場合ほどではないが、BSAの添加による輸送の促進が認められたが、それより低い分配比を示す場合には、ヘキサン原相から水相への移行に対しては、BSAの添加効果は認められなかった。これはステロイドホルモンの場合に比べてカルバメート系農薬ではBSAに対する結合比が低いためと考えられる。

4. 結 論

ステロイドホルモンおよびカルバメート系農薬の液膜輸送について、水相(液膜)に加えたアルブミンBSAのキャリアとしての性質を調べた。その結果、BSAのキャリアとしての性質が発揮されるのは、輸送基質の水/ヘキサン分配比が低い場合であり、この場合にはBSAとの結合比が高い基質ほど促進輸送が強められることが明らかとなった。水/ヘキサン分配比が高い基質の場合には、水相への取り込みが優先し、BSAの添加により逆に輸送が阻害されることがある。(1988年12月20日受理)

参 考 文 献

- 1) 原一郎, 化学総説, **6**, 197 (1974)
- 2) R. Weisiger, J. Collan, R. Ockner, Science, **211**, 1048 (1981)
- 3) E.L. Forker, B.A. Luxon, J. Clin. Inv., **67**, 1517 (1981); **72**, 1764 (1983)
- 4) J. Nishijo, N. Morita, S. Asada, H. Nakae, E. Iwamoto, Chem. Pharm. Bull., **33**, 2648 (1985)
- 5) J. Otuki, K. Iwamoto, M. Senō, J. Phys. Chem., **92**, 7251 (1988)