

キモトリプシン阻害剤の合成と経口インスリン製剤への応用に関する研究

1988年

横尾信夫

キモトリプシン阻害剤の合成と経口インスリン製剤への応用に関する研究

目次

序論	1
第一部 キモトリプシン阻害剤の合成と阻害活性	6
第一章 カルボン酸無置換フェニルエステルの阻害活性	7
小括	11
第二章 ハイドロキシ安息香酸誘導体エステルの阻害活性	12
第一節 Isopropylpiperazine誘導体	12
第二節 Dimethylaminoethylamine誘導体	19
第三節 遊離カルボキシル基を有する化合物	21
小括	23
第三章 ハイドロキノンヘテロジエステルの阻害活性	24
小括	27
第四章 アミジノフェニルエステルの阻害活性	28
小括	30
第五章 その他の化合物の阻害活性	31
第一節 アルキルエステル	31
第二節 ピリジルエステル	33
第三節 立体障害について	35
第四節 Phenyl componentのベンゼン環上の中性置換基の影響	38
小括	39
第六章 キモトリプシン阻害の作用機序	40
小括	47
第一部 考察	49
第一部 実験の部	53

第二部 キモトリプシン阻害剤併用によるインスリンの経口投与の試み	63
第一章 蛋白性医薬品の消化酵素による分解と酵素阻害剤によるその抑制	66
第一節 消化液によるインスリンの分解	66
小括	70
第二節 インスリンの腸管吸収に及ぼす各種蛋白分解酵素阻害剤の影響	71
小括	73
第三節 合成キモトリプシン阻害剤によるインスリンの消化管吸収増強作用	76
小括	76
第四節 キモトリプシン阻害剤によるリンチームの消化管吸収増強作用	79
小括	82
第五節 キモトリプシン阻害剤によるストレプトキナーゼの 消化管吸収増強作用	84
小括	85
第一章 実験の部	87
第二章 阻害剤の選択	92
第一節 阻害剤の活性と併用効果	92
小括	94
第二節 阻害剤の水溶性と併用効果	97
小括	99
第三節 阻害剤の毒性	100
小括	102
第二章 実験の部	104
第三章 インスリンの消化管からの吸収過程における FK-448の役割	106
小括	113
第三章 実験の部	117
第四章 経口インスリン製剤化の試み	120
第一節 腸溶性カプセルの経口投与におけるインスリンの吸収率	120
小括	123
第二節 クエン酸のインスリン吸収増強効果	125
小括	125

第四章 実験の部	130
第二部 考察	131
結論	135
文献	138
掲載雑誌目録	149
謝辞	151

キモトリプシン阻害剤の合成と経口インスリン製剤への応用に関する研究

[序論]

生体はその生命維持のために多種多様な化学反応を行っている。それらの大部分は酵素反応によって進められている。更に、ホメオスタシスを保つためにそれらの酵素反応を調節する仕組みの一つとして、不活性なプレ酵素(zymogen)-活性化物質(酵素)-阻害剤又は分解酵素、の系をうまく組み合わせ、又、それらを次々に連鎖させるなど絶妙なコントロールがなされている。そして、それらのバランスの破綻は生体に大小の不都合、即ち疾病をもたらすことが多い。

これらの酵素の中に、主に蛋白性の生体高分子を加水分解するプロテアーゼの一群がある。¹⁾ それらはエネルギー源としての食物を、吸収、利用できる形に分解する消化酵素類、不必要となった自らの生体成分あるいは外から侵入した異物を分解処理するライソゾームプロテアーゼ類や補体系酵素類、最終的にはフィブリンを生成することにより止血を完遂させる血液凝固系及びそれを溶解させる線溶系酵素類を始め、高い特異性を持ち限定分解により各種酵素の活性化を行う多くのプロテアーゼ等である。

プロテアーゼはまた酵素活性の性格から次のようにも分類される。²⁾

- 1) 活性中心としてのセリン(Ser)が基質によりアシル化を受け、それが脱アシル化され、再び活性を回復する形を酵素反応のプロセスとするセリンプロテアーゼ(キモトリプシン、トリプシン、トロンビン、カリクレイン等)
- 2) 活性部位としてチオール基(SH基、システイン残基)を持ち、重金属で阻害されるシステインプロテアーゼ、又は、チオールプロテアーゼ(パパイーン、プロメライン等)
- 3) 活性発現にZn等の金属を必要とする金属プロテアーゼ(カルボキシペプチダーゼ等)
- 4) 活性中心にカルボキシル基をもち、至適pHが酸性側にある酸性プロテアーゼ(ペプシン、カテプシンD等)

これらの中でセリンプロテアーゼは種類も多く、純粋な酵素標品の得やすい等

の理由もあり、最も多くの研究が進められている。キモトリプシン (EC 3.4.21.1) もその中の一つであり、トリプシノーゲンと共に主に哺乳動物の膵臓において合成、貯蔵される前駆体キモトリプシノーゲンから、小腸においてトリプシンにより活性化される消化酵素である。1966年 Hartleyら³⁾によりアミノ酸配列の一次構造が決定され、その後徐々に三次構造も決定されるに至った。⁴⁾ 反応機構についても、電荷リレー説⁵⁾等多くの研究が積み重ねられているが、近年崎山⁶⁾は次のようなプロトンリレー説を提唱している。即ち、活性中心Ser近傍に位置するアスパラギン酸(Asp)102のカルボキシル基は、ヒスチジン(His)57のイミダゾール基のプロトンを引き付け、Ser195の水酸基のHとの間にプロトンリレー系を形成し、Serの水酸基を活性化する。一方“疎水性ポケット”⁷⁾に捕捉されることにより活性化された基質のペプチド結合、エステル等のカルボニルは容易にSerの水酸基との間に四面体構造中間体を形成し、更にアシル中間体へと進行する。⁸⁻¹⁰⁾ 次に同じプロトンリレーにより、同じコースをたどり脱アシル化を起こし元に戻る(Fig. 1)。

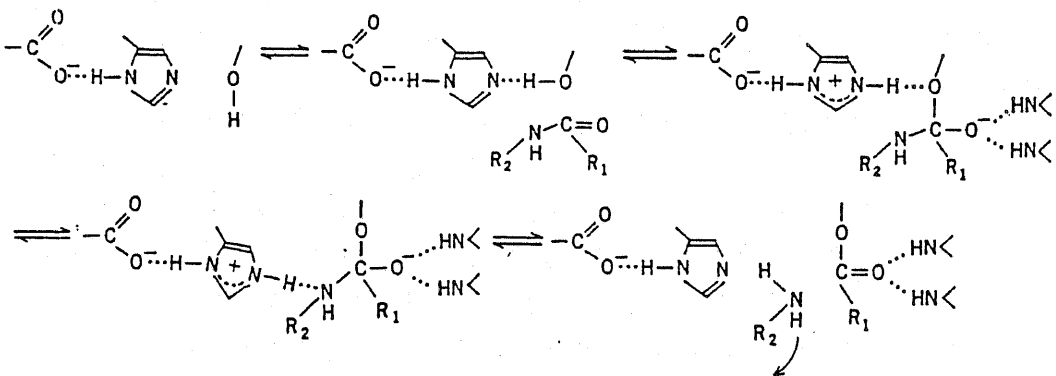


Fig. 1 Mechanism of hydrolysis of peptide by chymotrypsin based on “proton relay theory” (acylation step, F.Sakiyama⁶⁾)

このように酵素化学的性格については最も明らかにされたものの一つに数えられるキモトリプシンであるが、生体内の類縁酵素の存在、役割等については、同

じセリンプロテアーゼであるトリプシン様酵素* に比較し研究の歴史は浅い。1975年 Katunumaら¹¹⁾は、小腸粘膜より N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE) 水解活性を有し、キモトリプシン阻害剤キモスタチン¹²⁾により阻害される、キモトリプシン様酵素* を分離し結晶化した。Starkeyら、¹³⁾ Gutmannら¹⁴⁾ はヒト脾臓からカテプシンGを、又、Ludwig¹⁵⁾ はヒト好中球中に塩基性プロテアーゼを見出し、基質特異性から、それらが同一のキモトリプシン様酵素であることを示し、その後 Jusicら¹⁶⁾ はラット肝臓から中性の類縁酵素を精製した。又、Sanadaら¹⁷⁾も骨格筋細胞よりキモトリプシン様酵素を見出し、ミオシン、トロポニン等筋収縮蛋白に対し高い基質特異性を有することを報告し、筋ジストロフィーとの関連性が検討されている。Schickら、¹⁸⁾ Woodburyら、¹⁹⁾ Patrickら²⁰⁾はマスト細胞中に存在するキモトリプシン様酵素 chymaseが脱顆粒作用を有することを報告し、I g Eによるアレルギー反応との関連性について研究が進められている。更に Kitagawaら²¹⁾ は、ヒト多形核白血球及び単球における superoxide (O_2^-)の生成に、セリンプロテアーゼが関与することをつきとめ、この酵素がキモトリプシン様酵素であり、その阻害剤によりこの反応が抑制されることを報告している。

このような生体内の酵素の役割の解明には、それらに対する特異的阻害剤を作用させ、その変化を観察することは有力な手段となる。又、酵素活性のバランスの破綻により惹き起こされる疾病には、その阻害剤は治療薬となり得る。即ち脾臓内のトリプシンの活性化により惹き起こされる脾炎に、トリプシン阻害剤であるメシル酸ガベキセート、²²⁾ メシル酸カモスタット、²²⁾ メシル酸ナファモスタット、²³⁾ アプロチニン²⁴⁾等が医薬品として使用されるのはこの例である。

一方キモトリプシン阻害剤の研究も、トリプシン阻害剤に比較し遅れている。キモトリプシンは動植物界に広く分布しており、それに対応して天然のキモトリプシン阻害剤も生体内に存在することが見出されている。²⁵⁾ Kunitzらによってウシ脾臓中に見出されたアプロチニンは、トリプシン様酵素及びキモトリプシンを阻害する、分子量約 6,500のペプチドである。²⁶⁾ 又、その他にもダイズ、リマメ、ジャガイモ等にも存在が知られているが、これらはいずれもペプチ

* トリプシン及びキモトリプシンと類似した低分子基質特異性をもつプロテアーゼを、以後それぞれ、トリプシン様、キモトリプシン様酵素と称する。

ド性のトリプシン、キモトリプシン阻害剤（多価阻害剤）である。²⁵⁾ Umezawaら¹²⁾ は末端にアルデヒド基をもつテトラペプチド様のキモトリプシン特異的阻害剤、キモスタチンを、放線菌培養液中から見出した。この化合物はヘミアセタールの形で活性中心と反応するものと考えられている。

キモトリプシンの酵素活性には、活性中心のSer195、プロトンリレー系のAsp102、His57、²⁷⁾ メチオニン(Met)192 及び疎水結合ポケットが関係しているので、これらのどこかに反応するものは、その酵素活性に影響を及ぼすものと予想され、従って阻害剤もそれに応じ、diisopropyl fluorophosphate (DFP)、²⁸⁻³⁰⁾ halomethyl ketone類(L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone: TPC K etc.)、^{27, 31, 32)} p-nitrophenyl bromoacetyl- α -aminoisobutyrate、³³⁾ halomethyl dihydrocoumarin, enol lactone類、³⁴⁾ polycyclic fused aromatic rings、³⁵⁾ diphenylcarbamylochloride ³⁶⁾ 等が知られている。

以上述べてきた既存のキモトリプシン阻害剤は、高分子物質であったり、広範な酵素阻害スペクトルを示したり、あるいは、キモトリプシン自身が疎水性アミノ酸に対し親和性を有することから、ほとんど水に溶解させることが期待できない物質であった。In vitroにおいても、又、静脈内投与等の in vivoの実験においても、これらの性質は実験に支障を生じさせることが多い。筆者は先に述べたように、キモトリプシン様酵素の生体内での役割の検討及び疾病の治療に用い得る阻害剤として、次の条件を目標にキモトリプシン阻害剤の合成を試みた。

- 1) 低分子であること
- 2) 水溶性を有すること
- 3) 特異性の高いこと
- 4) 阻害活性の強いこと
- 5) 毒性の低いこと（他の作用を示さないこと）

Benderら³⁷⁾ はキモトリプシンの基質についての研究から、一般に芳香族アミノ酸のエステルは対応するアミドよりアシル化反応が速く、又、基質となるアミノ酸誘導体の、アシルアミノ基を欠くカルボン酸から生じたアシル化酵素は、脱アシル化反応が遅いことを示した。Fujiiら³⁸⁾ は、トリプシン様酵素について同様の成績を得て、トリプシン阻害剤 4-carboethoxyphenyl 6-guanidinocaproate methanesulfonate(メシル酸ガベキセート、FOY-007) を合成した。この化合物

はトリプシンの基質の脱アシルアミノ体を基本骨格とするものである。この研究の過程において彼等は、カルボン酸のアリルエステルはアルキルエステルに比較して強い阻害活性を示すことを見出した。

このような知見に基づき、筆者は、キモトリプシンに親和性を示す芳香族アミノ酸の脱アミノ体から、フェニルエステル及びその関連化合物を合成し、基質アナログ型キモトリプシン阻害剤を得ることを計画した。

本論文第一部において、阻害剤の合成及びその阻害作用について記述し、第二部においては生体への適用に関する研究の一環として、キモトリプシン阻害剤を用いて蛋白性医薬品、特にインスリンの経口投与製剤への応用について検討した結果を記述する。

第一部 キモトリプシン阻害剤の合成と阻害活性

キモトリプシンの酵素反応は S e r 195のアシル化及び脱アシル化の繰り返しである。^{37, 41)} 基質としてのエステルによるアシル化に関しては、Hartleyら⁴²⁾の酢酸 p-ニトロフェニルに関する研究を始め多数の報告がある。これら基質のうち脱アシル化速度の遅いものは、基質アナログ型阻害剤とみなすことができる。この型の化合物では反応機構から考え、同じacyl componentについてはアルコールの構造によってアシル化速度が決まり、アシル化後はアシル基の構造によって脱アシル化速度が決定される。キモトリプシンは疎水性カルボン酸に対し親和性を有することから、筆者の目的とする水溶性エステル型阻害剤は、親水性カルボン酸からは期待し難いものと予想され、アルコール側に水溶性置換基を導入せざるを得ないと思われた。そこで、最初にキモトリプシンの特異的基質となる、フェニルアラニン (P h e)、チロシン (T y r)及びトリプトファン (T r y)類縁カルボン酸のフェニルエステルの合成から始め、キモトリプシン阻害活性を指標としてカルボン酸を選択し、次いでアルコール(フェノール)の可溶性側鎖について検討を進めた。

第一章 カルボン酸無置換フェニルエステルの阻害活性

キモトリプシンに対する N-acetyl-L-phenylalanine amideとその類縁体の反応速度に関する研究から、アシルアミノ基を欠くカルボン酸アミドの加水分解速度は、元のアミノ酸アミドより遅く、その程度は約1/1,000であることが知られており、又、これらアミノ酸のエステルはアミドよりアシル化が速い。³⁷⁾ トリプシンのアシル化については、同じ酸のエステルにおいてアリルエステルはアルキルエステルより反応が速い。³⁸⁾ そこでPhe、Tyr、Tryの脱アミノ体であるフェニルプロピオン酸、インドールプロピオン酸及びそれらと炭素鎖の異なるカルボン酸のフェニルエステルを合成し、キモトリプシン阻害活性を測定した。又、それらの芳香環以外の ring systemを含むカルボン酸についても併せて検討した。

[実験結果]

カルボン酸とフェノールの縮合は Chart 1 に示す、2つの方法を用いた。インドール等異項環を含むカルボン酸の反応には dicyclohexylcarbodiimide (DCC) を用い (以下、DCC法と略す)、その他の炭素環式化合物の反応には酸クロライドを経由する方法 (以下、酸クロライド法) を用いた。なお、以下の各章においても、特記しない場合は同様である。

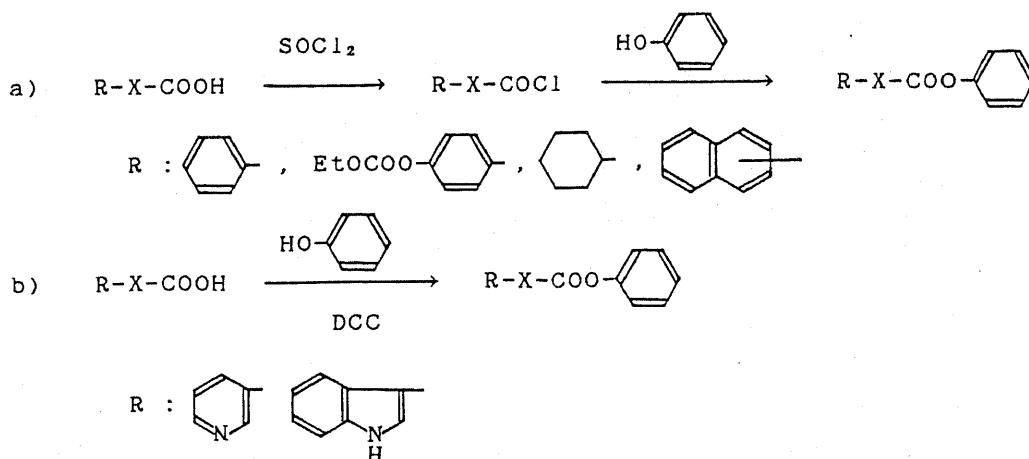


Chart 1

キモトリプシン阻害活性は、N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)を基質として、Hestrin法を改良した Roberts⁴³⁾の方法に従い測定し、用いた酵素の活性を50%阻害する阻害剤濃度 (IC₅₀値) として表した。なお、以下の各章においても、特記しない場合は同様である。

1) フェニルアラニン類縁体

フェニルアラニン類縁カルボン酸として、安息香酸 (直結型*)、フェニル酢酸 (酢酸型*)、桂皮酸 (アクリル酸型*) 及びフェニルプロピオン酸 (プロピオン酸型*) を選び、それぞれフェニルエステルを合成し、acyl componentのベンゼン環とカルボニル基をつなぐ炭素鎖の、キモトリプシン阻害活性に及ぼす影響を検討した。これらの化合物はいずれもキモトリプシンに対し 10⁻⁴M 台の IC₅₀ 値を示し炭素鎖の長さは大きな影響を与えないものと思われた (Table 1)。

2) チロシン類縁体

チロシン類縁カルボン酸として、4-ethoxycarboxyphenyl基を持つカルボン酸を、フェニルエステルに導き、更に、Chart 2に示すようにピロリジンにより保護基をはずし、遊離水酸基を有するエステルを合成し、同様に阻害活性に及ぼす炭素鎖の影響等を検討した。

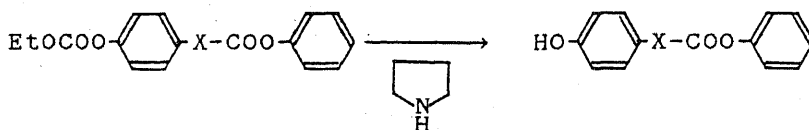


Chart 2

* Table 1 における一般式で、X : - (単結合) の場合を直結型、X : -CH₂- の場合を酢酸型、X : -CH₂CH₂- の場合をプロピオン酸型、X : -CH=CH- の場合をアクリル酸型、X : -CH₂CH₂CH₂- の場合を酪酸型と称する。

この系列においては酢酸型(5)、(8)以外の化合物に活性はみられなかった。又、水酸基の保護基の有無にかかわらず、対応する先のフェニルアラニン類縁体に比較し活性は弱く、水酸基を、フェニルアラニン類縁体の場合の4位置換基とみなせば、4位への酸素の導入は活性を弱めるものと考えられた(Table 1)。

3) トリプトファン類縁体

芳香環としてインドールを含む脂肪族カルボン酸をフェニルエステルに導き、先の結果と比較した。炭素鎖の影響については、酢酸型(11)が 6×10^{-5} Mの IC_{50} 値を示し、又、アクリル酸型(12)は酢酸型とほぼ同じ活性を示したが、アルキル鎖の炭素数の増加に従って活性の低下がみられた。この系列の化合物においては、先のフェニルアラニン系、チロシン系に比較し、より強い阻害剤を与える可能性が示唆された(Table 1)。

4) シクロヘキサン誘導体

芳香環ではないが、疎水性環式化合物であるシクロヘキサンについても、同様にカルボン酸フェニルエステルを合成し、キモトリプシン阻害活性を測定した。

直結型化合物であるシクロヘキサンカルボン酸エステル(15)の IC_{50} 値は 3×10^{-4} Mを示した他、この系列の化合物のフェニルエステルも、対応する安息香酸等ベンゼン系化合物と同程度の阻害活性がみられた。なおベンゼン系の場合とやや異なり、炭素鎖の介在は活性の低下をもたらす傾向がみられた(Table 1)。

5) ニコチン酸類縁体

塩基性を有する芳香環であるピリジンを含むカルボン酸について、フェニルエステルを合成し、その活性について検討した。ニコチン酸類縁体はいずれも、 1×10^{-3} Mにおいて50%の阻害を示さなかった(Table 1)。

6) ナフタレン誘導体

ナフタレン類縁カルボン酸をフェニルエステルに導き、阻害活性を測定した。ナフタレン誘導体の阻害活性は1-置換体と2-置換体で異なった結果を与えた。即ち、1-置換体においては、酢酸型(23)の IC_{50} 値は 4×10^{-6} Mと無置換フェニルエステルの中では最も強い阻害活性を示したが、プロピオン酸型(25)等、他の型では 10^{-4} M台にとどまった。一方、2-置換体においては、酢酸型(27)

($IC_{50} : 5 \times 10^{-5} M$)よりプロピオン酸型(29)($IC_{50} : 9 \times 10^{-6} M$)の方が強い阻害を示した。以上の結果をまとめて Table 1 に示した。なお、阻害活性測定標準とした TPCK²⁷⁾ は $1 \times 10^{-4} M$ 、キモスタチン¹²⁾ は $1 \times 10^{-7} M$ の IC_{50} 値を示した。

[小括]

キモトリプシンに親和性を有する代表的なアミノ酸、Phe、Tyr、Try のアミノ基を欠くカルボン酸を中心に、それらの無置換フェニルエステルを合成し、キモトリプシンの基質アナログ型阻害剤の基本骨格を検索した。

Phe、Tyr 類縁の単環型化合物のエステルは、強いキモトリプシン阻害活性を示さなかったが、Try 類縁のインドール誘導体からは強い阻害剤が得られた他、ナフタレン誘導体からも強い活性を有する阻害剤が得られた。又、シクロヘキサンを含む化合物も、ベンゼン環を含む化合物と同様に阻害活性を示したが、塩基性を有するピリジンを含むカルボン酸から得られるエステルには阻害活性は認められなかった。

環とエステルを結ぶ炭素鎖については、ベンゼンを含む化合物の場合は明らかな傾向を示さなかったが、シクロヘキサンを含む化合物の場合には直結型、インドール及びナフタレンの1-誘導体の場合は酢酸型、2-誘導体ではプロピオン酸型の化合物が最も強いキモトリプシン阻害活性を示した。

第二章 ハイドロキシ安息香酸誘導体エステルの阻害活性

前章において1-ナフチル酢酸、2-ナフチルプロピオン酸及びインドール3-酢酸のような縮合環を有するカルボン酸のフェニルエステルに、TPCKに優る比較的強いキモトリプシン阻害活性がみられたが、それらはいずれも水に難溶性であった。塩として水溶性を賦与することを目的として、ハイドロキシ安息香酸のカルボキシル基を利用し2価の塩基を反応させ、塩基性置換基を有するフェニルエステル（以下塩基性エステルと称する）を合成した。又、遊離のカルボキシル基を残した、酸性エステルについても検討を加えた。これら2種類の化合物の阻害活性を、先の対応する無置換フェニルエステルの活性と比較することにより、phenyl componentの4位置換基の、キモトリプシン阻害活性に及ぼす影響を検討するとともに、より強い活性を有する化合物を目指し、他の縮合環を有するカルボン酸フェニルエステルについても新たに検索を行った。

第一節 Isopropylpiperazine誘導体

Chart 3 に示す経路により 4-ethoxycarboxybenzoic acidと isopropylpiperazine(I)から得られる 4-置換フェノール(II)を用い、縮合環を有するカルボン酸の置換フェニルエステルを合成した。

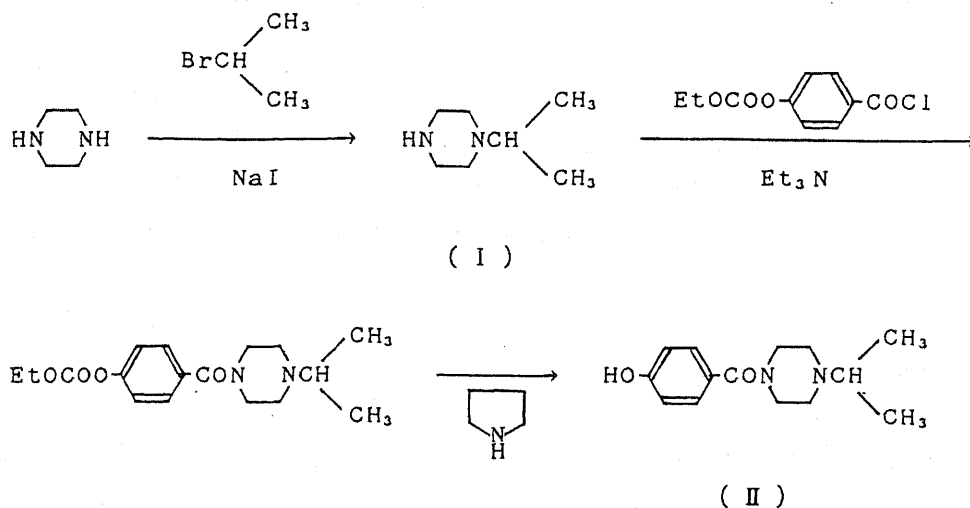


Chart 3

【実験結果】

1) ナフタレン誘導体

ナフタレン1-誘導体の中では酢酸型のエステル(31)が最も強い活性を示し、その IC_{50} 値は $5 \times 10^{-7}M$ であった。又直結型(30)のそれは $5 \times 10^{-5}M$ であった。両者は先の無置換フェニルエステルの活性に比較してそれぞれ8倍、6倍に活性が上昇した。即ち、これらフェニルエステルのキモトリプシンに対する反応性は、phenyl componentの4位に置換基を導入したことにより高められるものと考えられた。これに対しアクリル酸型(32)、プロピオン酸型(33)についてはともに $5 \times 10^{-4}M$ にとどまり、活性の上昇はみられなかった。

一方、2-置換体では、プロピオン酸型(36)が $7 \times 10^{-6}M$ の IC_{50} 値を示し、最も強い阻害を示したことは、先の無置換フェニルエステルの場合と同様であったが、4位への置換基導入の影響は直結型を除きほとんどみられなかった(Table 2)。

2) インドール誘導体

酢酸型化合物(38)の阻害活性は最も強く、その IC_{50} 値は $6 \times 10^{-6}M$ であった。無置換フェニルエステルの活性と比較すると10倍の活性増強がみられた。アクリル酸型(39)も概ね同様の傾向を示した。なお、直結型(37)については $10^{-3}M$ においても50%の阻害を示さなかった。又、プロピオン酸型(40)、酪酸型(41)へと鎖を伸長すると活性は低下した(Table 2)。

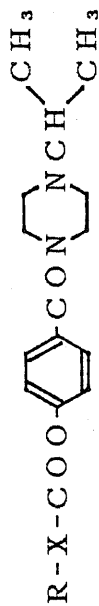
3) ベンゾフラン誘導体

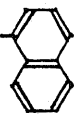
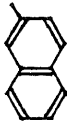
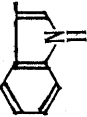

ベンゾフラン誘導体についても酢酸型化合物(43)の阻害活性が最も強く、その IC_{50} 値は $9 \times 10^{-6}M$ であった。又、その他の型の化合物についてもインドール誘導体の場合とほぼ同じ結果が得られた(Table 2)。

4) テトラリン誘導体

テトラリン骨格の1位に直接又は炭素鎖を介し結合したカルボン酸をエステルに導き、炭素鎖の、阻害活性に及ぼす影響を検討した。直結型(45)(FK-448)の IC_{50} 値は $8 \times 10^{-7}M$ と強い阻害活性を示し、以下酢酸型(46)、プロピオン酸型(47)へと、鎖の伸長に伴い活性は弱まった(Table 2)。第一章において、シクロヘキサンを母核とする化合物群に同じ傾向がみられており、ベンゼン、ナフ

Table 2 Chymotrypsin inhibitory activity of 4-substituted phenyl esters



X	R			
				
—	(30) 5×10^{-5}	(34) 8×10^{-5}	(37) $> 10^{-3}$	(42) 8×10^{-4}
-CH ₂ -	(31) 5×10^{-7}	(35) 4×10^{-5}	(38) 6×10^{-6}	(43) 9×10^{-6}
-CH=CH-	(32) 5×10^{-4}		(39) 8×10^{-6}	(44) 7×10^{-5}
-CH ₂ CH ₂ -	(33) 5×10^{-4}	(36) 7×10^{-6}	(40) 2×10^{-4}	(47) 3×10^{-4}
-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -			(41) $> 10^{-3}$	

14

The activity was expressed as IC₅₀(M). The numeral in parentheses represents the number of the compound.

タレン等の芳香環の場合との相異がみられる。しかし、テトラリンの場合には脂環側を“アルキル鎖”とみなせば、直結型のテトラリン1-カルボン酸は“フェニル酢酸”とみなすこともでき、他の芳香環の場合と一致する結果となり、テトラリンカルボン酸エステルの強い活性は、両方の寄与によるものと考えられた。

5) インドール酢酸誘導体

上述のように、インドール酢酸の置換フェニルエステル(38)に強い阻害活性が認められたので、インドール骨格に置換基を導入し、阻害活性に対する影響を検討した(Table 3)。インドール骨格の2位にメチル基を導入(48)すると、無置換体(38)に比較し阻害活性は約10倍上昇したが、更に5位にも置換基を導入してもそれ以上著しい活性上昇はみられなかった。しかしながら、5位にのみ置換基を有する化合物(55)、(56)は最も強い阻害活性を示し、 IC_{50} 値はそれぞれ $8 \times 10^{-8}M$ 、 $6 \times 10^{-8}M$ であった。この視点からみると5位の他に2位にも置換基を導入すると活性は減弱したと考えることができる。

1位の置換基については、メチル基の導入(52)は活性に影響を与えなかったものと判断されたが、acetyl、chlorobenzoyl等のN-アシル体(53)、(54)は著しく弱い活性を示した。これら置換基の影響は、いわゆる疎水性ポケットへのfitnessの相異によるものと考えられ、その立体構造を知る上で興味あるところである。

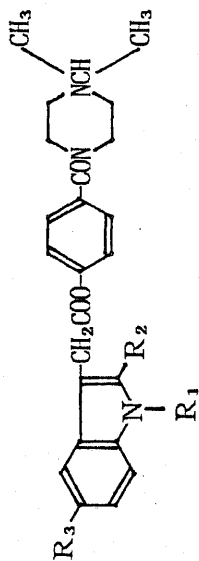
6) その他の類縁化合物

上述のインドール酢酸エステルの他にも1-ナフチル酢酸、テトラリン1-カルボン酸のエステルに強い阻害活性が認められたので、より強い阻害剤を求め、類縁カルボン酸のエステルを合成し、阻害活性を比較した(Table 4)。まず、テトラリンの脂環側の大きさについては、6員環であるテトラリンカルボン酸エステル(45)が最も活性が強く、以下5員環(58)、7員環(57)の順に低下した。なお5員環(インダン)、6員環(テトラリン)とも2-カルボン酸エステル(59)、(60)では1-カルボン酸エステルに比較して活性は低下した。

弱い塩基性を有する、キノリンカルボン酸のエステル(67)~(69)では、 IC_{50} 値がいずれも $10^{-4}M$ 台の弱い活性を示したにすぎなかった。この結果はニコチン酸フェニルエステルについての先の結果と一致するものと考えられた。

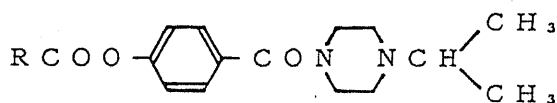
インデン3-酢酸のエステルに関し、5- OCH_3 誘導体(62)はその置換基をもた


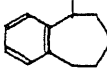
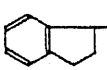
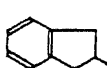
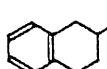
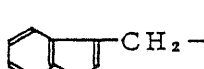
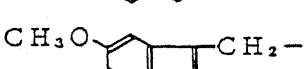
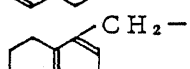
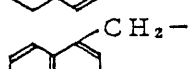
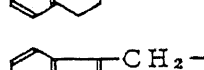
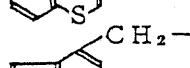
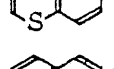
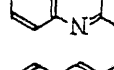
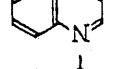
Table 3 Chymotrypsin inhibitory activity of esters of indoleacetic acid derivatives



Compound No	(38)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)	(53)	(54)	(55)	(56)
R ₁	H	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃ CO	Cl-C ₆ H ₄ -CO	H	H
R ₂	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
R ₃	H	H	CH ₃	n-Bu	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O	Br
IC ₅₀ (M)	6×10 ⁻⁵	7×10 ⁻⁷	5×10 ⁻⁷	6×10 ⁻⁷	4×10 ⁻⁷	3×10 ⁻⁷	4×10 ⁻⁵	3×10 ⁻⁵	8×10 ⁻⁸	6×10 ⁻⁸

Table 4 Chymotrypsin inhibitory activity of 4-substituted phenyl esters

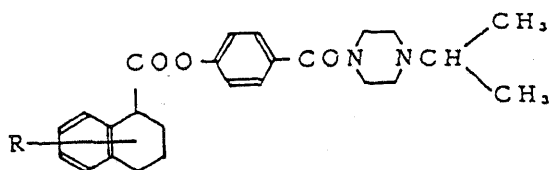


Compound No.	R	I C ₅₀ (M)
(45)		8×10^{-7}
(57)		2×10^{-5}
(58)		6×10^{-6}
(59)		1×10^{-5}
(60)		6×10^{-5}
(61)		8×10^{-6}
(62)		1×10^{-6}
(63)		3×10^{-6}
(64)		3×10^{-6}
(65)		9×10^{-7}
(66)		3×10^{-6}
(67)		3×10^{-4}
(68)		5×10^{-4}
(69)		6×10^{-4}

ない化合物(61)に比較し活性の上昇がみられた。そこでテトラリン1-カルボン酸エステルについて、テトラリン環上の置換基の、阻害活性に及ぼす影響を検討したが、得られた化合物はいずれも(45)と同程度の活性を示すにとどまった(Table 5)。

なお、本節において得られた化合物は大部分、塩として水に溶解した。

Table 5 Chymotrypsin inhibitory activity of esters of tetralin-1-carboxylic acid derivatives



Compound No.	R	IC ₅₀ (M)
(45)	—	8 × 10 ⁻⁷
(70)	4-CH ₃	8 × 10 ⁻⁷
(71)	6-CH ₃	6 × 10 ⁻⁷
(72)	6-Cl	8 × 10 ⁻⁷
(73)	7-NO ₂	1 × 10 ⁻⁶

第二節 Dimethylaminoethylamine誘導体

Chart 4 に示した経路により、methyl 4-hydroxybenzoateと dimethylaminoethylamineから導かれる 4-置換フェノール(Ⅲ) を用い、第一節と同様に塩基性フェニルエステルを合成した。

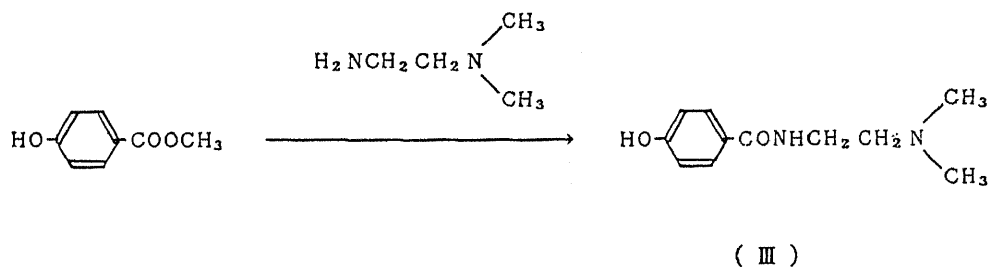
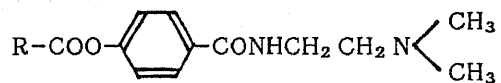



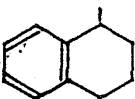
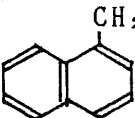
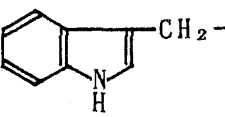
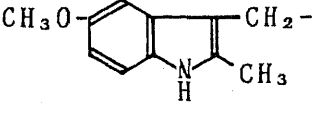
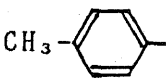
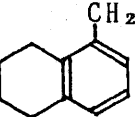
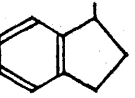
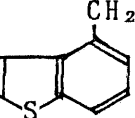
Chart 4

【実験結果】

主として第一節において強い阻害活性を示したエステルのカルボン酸を用い、同様に塩基性フェニルエステルを合成した (Table 6)。阻害活性の IC_{50} 値から、主な acyl component の、活性への寄与は、5-methoxy-2-methyl-3-indolyl-acetyl (78) \cong 1-naphthylacetyl (76) \cong tetralin-1-carbonyl (75; FK-316) > 3-indolylacetyl (77) > indane-1-carbonyl (81) > 4-methylbenzoyl (79) > benzoyl (74) の順であった。又、これらの4-置換フェニルエステルの阻害活性を、第一章の無置換フェニルエステルと比較すると、約10倍程度の上昇が認められた。第一節において用いた塩基 isopropylpiperazine (I) と本節において用いた塩基 N,N-dimethylaminoethylamine は、両N間の距離等比較的類似した構造であることから、同程度の活性を与えるものと予想されたが、大部分の化合物において活性は上昇した。なお、本節において得られた化合物は、塩として水に対し 10% 以上の溶解度を示した。

Table 6 Chymotrypsin inhibitory activity
of 4-substituted phenyl esters



Compound No.	R	I C ₅₀ (M)
(74)		6×10^{-5}
(75)		5×10^{-7}
(76)		4×10^{-7}
(77)		3×10^{-6}
(78)		4×10^{-7}
(79)		1×10^{-5}
(80)		7×10^{-7}
(81)		4×10^{-6}
(82)		7×10^{-7}

第三節 遊離カルボキシル基を有する化合物

第一、二節においては phenyl component のベンゼン環の 4 位に 塩基性置換基を導入することにより水溶性キモトリプシン阻害剤を得ることが出来、同時に阻害活性の上昇を認めたことを述べた。本節においては、カルボン酸を 4-カルボキシフェニルエステルに導き、可溶化を計り、またその阻害活性をこれまでの結果と比較した。

Chart 5 に示すように、benzyl 4-hydroxybenzoate とカルボン酸、又は酸クロライドを Chart 1 に従い反応させた後、接触還元により保護基をはずし、目的物を得た。

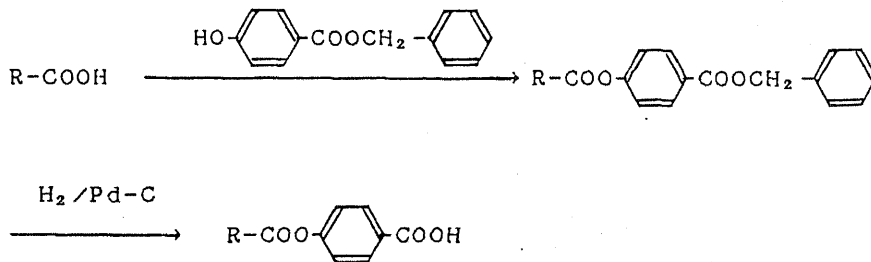
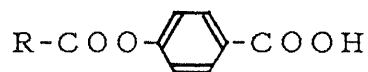


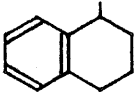
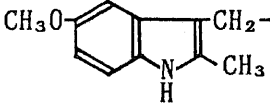
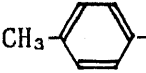
Chart 5

【実験結果】

テトラリンカルボン酸及び 5-メトキシ 2-メチルインドール酢酸のエステル (83)、(84) の阻害活性の IC₅₀ 値は、ともに $6 \times 10^{-5} \text{M}$ であり、前節の塩基性化合物 (75)、(78) に比較し約 1/100 と、著しく活性は低かった。4-メチル安息香酸エステル (85) では 10^{-3}M においても 50% の阻害がみられず、対応する塩基性エステル (79) に比較し、少なくとも 100 倍以上の差があるものと思われた (Table 7)。

Table 7 Chymotrypsin inhibitory activity
of 4-carboxyphenyl esters



Compound No.	R	I C ₅₀ (M)
(83)		6×10^{-5}
(84)		6×10^{-5}
(85)		$> 10^{-3}$

[小括]

縮合環を持つカルボン酸を中心に、4-ヒドロキシ安息香酸誘導体を用いエステルを合成した。

環とエステルを結ぶ炭素鎖の、阻害活性への影響は、第一章の無置換フェニルエステルの場合と同様の傾向がみられた。又、塩基性を有するキノリンのカルボン酸から得られるエステルには強い活性はみられなかった。

Phenyl componentのベンゼン環の4位に塩基性置換基を有する化合物（塩基性エステル）は、HCl塩として水溶性であった。

又、それらの塩基性エステルは、先の無置換フェニルエステルと比較して強いキモトリプシン阻害活性を示した。5-メトキシ及び5-ブロムインドール酢酸の4-置換フェニルエステルは最も強い活性を示し、そのIC₅₀値は、それぞれ 8×10^{-8} 、 6×10^{-8} Mであった。

一方、4位にカルボキシル基を持つ酸性エステルは、無置換フェニルエステルより弱い活性を示した。

第三章 ハイドロキノンヘテロジエステルの阻害活性

先の第一、二章において合成した化合物はいずれもトリプシンに対する阻害活性をほとんど持たない、キモトリプシン特異的阻害剤と言えるものである。トリプシンはキモトリプシンと同じ Asp-His-Ser の電荷リレー⁵⁾、又はプロトンリレー⁶⁾により Ser がアシル化される反応機構をとるが、アルギニン (Arg)、リジン (Lys) 等の塩基性アミノ酸に親和性を有し、基質アナログ型阻害剤として 4-carboethoxyphenyl 6-guanidinocaproate methanesulfonate³⁸⁾ (FOY-007, メシル酸ガベキセート)、 N,N -dimethylcarbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy)phenylacetate methanesulfonate⁴⁴⁾ (FOY-305, メシル酸カモスタット)、6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate dimethanesulfonate⁴⁵⁾ (FUT-175, メシル酸ナファモスタット) が知られている。これらの化合物のうち、メシル酸カモスタットは水に対する溶解性も優れている。一方、第二章に述べたように、phenyl componentへの塩基性置換基の導入はキモトリプシン阻害活性の上昇をもたらすことが明らかとなったので、上記の塩基性トリプシン阻害剤の構造を生かし、ハイドロキノンを用い、キモトリプシン、トリプシン両酵素に対する阻害活性moietyを結合させ、両酵素に対する阻害作用を検討した。

Chart 6 に示す経路により、4-置換フェノール (V) 及び (VI) を合成し、Chart 1 の方法によりカルボン酸と縮合させ、ジエステルを得た。

トリプシン阻害活性は、 $N\alpha$ -*p*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) を基質として、キモトリプシン阻害活性と同様の方法により測定した。

【実験結果】

1) キモトリプシン阻害活性

ハイドロキノンエステルとして得られた化合物を Table 8 に示す。

これまで述べてきたキモトリプシン阻害剤の基本骨格は、疎水性カルボン酸のフェニルエステルである。“グアニジノ安息香酸のフェニルエステル”とみなすことの出来る(86)には、キモトリプシン阻害活性はみられなかった。これは、グアニジノ基の塩基性、親水性によるものと考えられる。一方(87)は、先の安息香酸フェニル(1)に比較し、100倍以上の活性の上昇が見られたが、上記の結果を考慮すると、“グアニジノ安息香酸フェニル”は、アシル化剤としてキモトリプシンに直接阻害作用を示すのではなく、安息香酸フェニル(1)の、phenyl

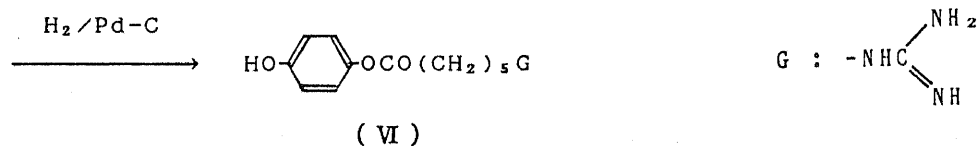
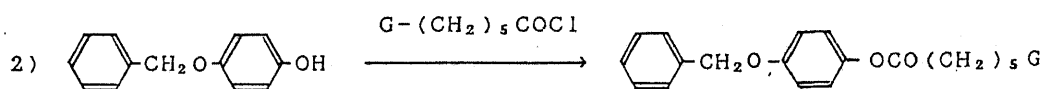
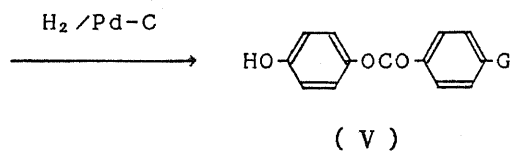
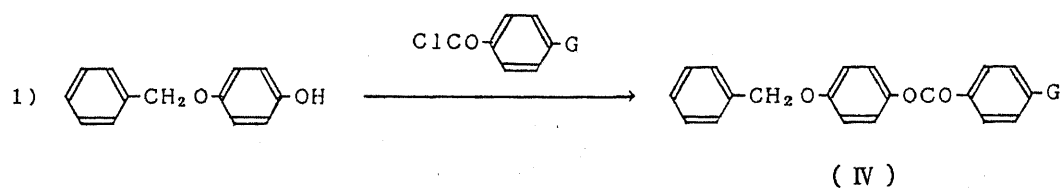
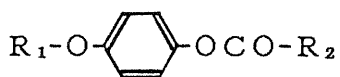
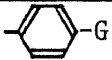
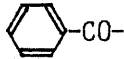
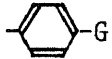
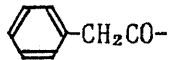
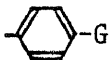
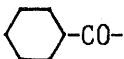
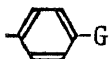
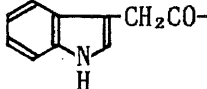
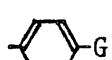
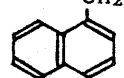
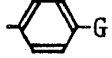
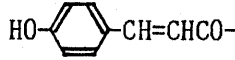
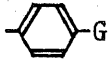
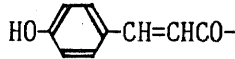

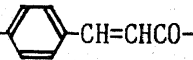
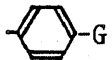
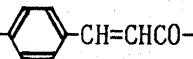

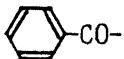
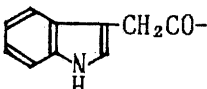


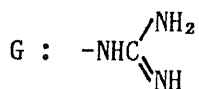
Chart 6

componentのベンゼン環の4位置換基として、活性増強効果をもたらしたものと考えた方が自然であろう。このことは(93)、(95)に比較し、(92)、(94)がいずれも約100倍強い活性を示すことによっても裏付けられた。即ち、phenyl componentのベンゼン環上の4位の塩基性置換基は、無置換の場合に比較し、活性の上昇がみられるとした第二章の結果と一致した。又、上記の関係は、guanidinobenzoyl基についてのみでなく、guanidinocaproyl基を有する(96)~(98)についても同様であった。

Table 8 Inhibitory activities of hydroquinone diesters
against chymotrypsin and trypsin



Compound No.	R ₁	R ₂	Inhibitory activity, IC ₅₀ (M)	
			Chymotrypsin	Trypsin
(86)	H-	 -G	>10 ⁻³	6×10 ⁻⁷
(87)	 -CO-	 -G	5×10 ⁻⁶	6×10 ⁻⁸
(88)	 -CH ₂ CO-	 -G	7×10 ⁻⁶	8×10 ⁻⁸
(89)	 -CO-	 -G	4×10 ⁻⁶	7×10 ⁻⁸
(90)	 -CH ₂ CO-	 -G	7×10 ⁻⁷	9×10 ⁻⁸
(91)	 -CH ₂ CO-	 -G	3×10 ⁻⁷	8×10 ⁻⁸
(92)	 -CH=CHCO-	 -G	7×10 ⁻⁶	9×10 ⁻⁸
(93)	 -CH=CHCO-		4×10 ⁻⁴	>10 ⁻³
(94)	EtOCO-  -CH=CHCO-	 -G	5×10 ⁻⁶	3×10 ⁻⁷
(95)	EtOCO-  -CH=CHCO-		4×10 ⁻⁴	>10 ⁻³
(96)	H-	-(CH ₂) ₅ ·G	>10 ⁻³	8×10 ⁻⁴
(97)	 -CO-	-(CH ₂) ₅ ·G	7×10 ⁻⁶	3×10 ⁻⁴
(98)	 -CH ₂ CO-	-(CH ₂) ₅ ·G	7×10 ⁻⁷	8×10 ⁻⁵



2) トリプシン阻害活性

トリプシンはArg、Lys等塩基性アミノ酸に対する親和性を有することから、基質アナログ型阻害剤として Fujii等³⁸⁾により 6-guanidinocaproate 誘導体が得られた。その中の一つ、メシル酸ガベキセートのトリプシン阻害活性のIC₅₀値は 3×10^{-5} Mであった。その後 Fujii等⁴⁴⁾は、より強い活性を有する化合物 phenyl 4-guanidinobenzoate誘導体を合成した。この基本骨格を持つメシル酸カモスタットのIC₅₀値は 9×10^{-8} Mであった。今回合成した化合物のうち(97)、(98)は前者の型に属し、IC₅₀値は、それぞれ 3×10^{-4} 、 8×10^{-5} Mと、メシル酸ガベキセートの値とほぼ一致した(Table 8)。これらの化合物はいずれも同じguanidinocaproyl trypsinを生じたことによるものと思われる。一方、(87)~(92)等の化合物は 6×10^{-8} ~ 9×10^{-8} MのIC₅₀値を示し、メシル酸カモスタットのIC₅₀値と一致した。これらの化合物から共通して得られる guanidinobenzoyl trypsin は先の guanidinocaproyl trypsin に比較し、脱アシル化速度が遅いものと推定された(Table 8)。

【小括】

ハイドロキノンの2個の水酸基を利用し、一方にキモトリプシンに対する阻害活性を有する部分構造、他方にトリプシンを阻害する、グアニジンを含む acyl componentsを導入した。

キモトリプシン阻害活性については、phenyl componentのベンゼン環の4位にguanidinobenzoyl基を導入したことにより、阻害活性は著しく上昇した。Acyl componentとしての guanidinobenzoyl基は強い活性を与えなかった。

一方、トリプシン阻害活性については、FOY-305の基本骨格であるグアニジノ安息香酸のエステルは一様に強い阻害活性を示した。

第四章 アミジノフェニルエステルの阻害活性

前章において、強塩基であるグアニジンを、phenyl componentのベンゼン環の4位に導入することにより、キモトリプシン阻害活性の増強が認められた。グアニジノ安息香酸エステルと並び、代表的なトリプシン阻害剤として知られるアミジノフェニルエステル⁴⁶⁾も、acyl componentを選択すれば、これまで述べてきた4-置換フェニルエステルとして、キモトリプシン阻害活性をも期待することが出来るものと予想された。第二章及び第三章に述べた方法に続き、水溶性フェニルエステルを得る第三の方法として、これまでに用いた代表的なカルボン酸について4-amidinophenolとの反応によりエステルを合成し、キモトリプシン、トリプシン両酵素に対する阻害活性を測定した。

【実験結果】

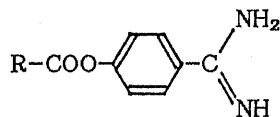
1) キモトリプシン阻害活性

代表的なカルボン酸から得られたアミジノフェニルエステルのキモトリプシン阻害活性を相互に比較すると、acyl componentとしての活性への寄与は、第二章において得られた結果と一致した(Table 9)。対応するacyl componentについて無置換フェニルエステルと比較すると、phenyl componentのベンゼン環4位へのアミジノ基の導入は10~30倍の活性増強をもたらした。アミジノ基の活性増強効果は、第二章において用いた2-N,N-dimethylaminoethylaminocarbonyl基のそれと比較すると同程度ないしやや強いものと思われたが、前章のグアニジノ基と比較するとその効果はやや弱いものと思われた。これら塩基の中では、活性部位であるエステルからの距離は、本章に述べたアミジノ基が最も短く、塩基による活性増強効果は単に立体的な距離によるものではないことがうかがわれた。

2) トリプシン阻害活性

今回合成したアミジノフェニルエステルは、いずれもトリプシンに対しても阻害活性を示した。第三章に述べたように、グアニジノ安息香酸フェニルエステルがほぼ一様に 10^{-8} M台の IC_{50} 値を示したのと対照的に、この系統の化合物の IC_{50} 値は、 9×10^{-5} M(101)から 3×10^{-8} M(103)まで、さまざまであった。この型の化合物は、逆性基質として⁴⁷⁻⁵⁰⁾本来の基質でない、即ち、親和性の低いと思われる疎水性acyl componentによりトリプシンがアシル化されるた

Table 9 Inhibitory activities of 4-amidinophenyl esters against chymotrypsin and trypsin



Compound No.	R	Inhibitory activity, IC ₅₀ (M)	
		Chymotrypsin	Trypsin
(99)		2×10^{-4}	5×10^{-5}
(100)		3×10^{-5}	4×10^{-5}
(101)		8×10^{-6}	9×10^{-5}
(102)		2×10^{-6}	6×10^{-6}
(103)		2×10^{-7}	3×10^{-8}
(104)		4×10^{-7}	7×10^{-7}
(105)		5×10^{-7}	6×10^{-7}

め、アシル基の離脱が速いことによるものと考えられる。Acyl componentのトリプシン阻害活性への寄与は、キモトリプシン阻害の場合と全く一致したわけではないが、キモトリプシンに対し、最も強い阻害活性を与えた acyl component である 5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetylは、トリプシンに対しても最も強い活性を与え、そのエステル IC_{50} 値は $3 \times 10^{-8}M$ と、グアニジノ安息香酸フェニルエステルに匹敵するものであった(Table 9)。塩基を含まない、疎水性のこのアシル基が、どのような形でトリプシンの疎水性活性site⁵¹⁾と安定なアシル中間体を形成しているか興味深いところである。又、一般にアミジノフェニルエステルは、トリプシンと同時にトロンビン、プラスミン等にも阻害活性を示すことが知られており、抗血液凝固剤としての応用に関する研究も、進められている。⁵²⁾

【小括】

逆性基質型トリプシン阻害剤として知られるアミジノフェニルエステルを合成し、塩基としてのアミジンの、キモトリプシン阻害活性への影響を検討した。

アミジノフェニルエステルは、先に得られた塩基性エステルと比較し、エステル結合から塩基までの距離は短いが、グアニジンを含む化合物に準ずる強い活性増強がみられた。

一方、これらの化合物はトリプシンに対しても阻害活性を示したが、その活性の強さは acyl componentによって大きく異なった。5-Methoxy-2-methyl-3-indolylacetateは、トリプシンに対し、通常の基質アナログ型阻害剤に匹敵する強い阻害活性を示した。

第五章 その他の化合物の阻害活性

第一節 アルキルエステル

第一章より筆者の進めてきたキモトリプシン阻害剤の合成は、トリプシンに対する基質アナログ型阻害剤について、カルボン酸フェニルエステルの阻害活性は対応するアルキルエステルより強いという Fujiiら³⁸⁾の知見に従い、疎水性カルボン酸の aryl esters に限られていた。キモトリプシンに対する基質アナログ型阻害剤の場合についてこの仮定を確認する目的で、対応するacyl componentのアルキルエステルを合成し、その阻害活性を、フェニルエステルと比較した。なお、縮合反応は Chart 1 の酸クロライド法に従った。

【実験結果】

1) 3-Hydroxypropyl esters

1-ナフチル酢酸及び1-ナフチルアクリル酸から得られたアルキルエステル(106)、(107)は いずれも 10^{-3} Mにおいて 50%の阻害を示さなかった。対応するacyl componentを持つ無置換フェニルエステル(23)、(24)の IC_{50} 値はそれぞれ 4×10^{-5} 、 3×10^{-4} Mであったことを考えると、アルキルエステルはフェニルエステルに比較し著しく活性の弱いことが明らかとなった(Table 10)。

2) 4-Amidinocyclohexyl benzoate

安息香酸アミジノフェニルエステル(100)は、キモトリプシンに対し、 3×10^{-5} M、トリプシンに対し、 4×10^{-6} Mの IC_{50} 値を有する。(100)の phenyl componentのベンゼン環を還元した形の上記化合物(108)は、キモトリプシンに対し、 10^{-3} Mにおいて 50%以上の阻害を示さなかったのみならず、トリプシンに対する阻害活性をも失った(Table 10)。

3) 4-Amidinobenzyl benzoate

上記(100)の phenyl componentのベンゼン環とエステルの間にメチレンを介在させた aralkyl ester(109)は、 10^{-3} Mの濃度において、キモトリプシンに対し50%以上の阻害を示さなかった。又、トリプシンに対する活性も失った(Table 10)。

Table 10 Inhibitory activities of alkyl esters against chymotrypsin and trypsin

Compound No.	Structure	Inhibitory activity against	
		Chymotrypsin	Trypsin
(23)		4×10^{-6}	$> 10^{-3}$
(106)		$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
(107)		$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
(108)		$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
(109)		$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$
(100)		3×10^{-5}	4×10^{-6}

The activity was expressed as IC_{50} (M).

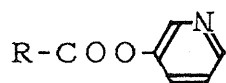
第二節 ピリジルエステル

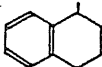
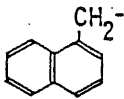
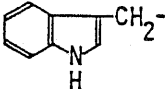
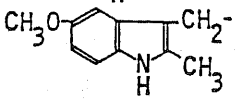
前章において、phenyl componentのベンゼン環に直結して塩基、アミノ基を導入しても、無置換フェニルエステルに比較し強い阻害活性をもたらすことを述べた。先の各章に述べた塩基性置換基の場合には、活性部位であるエステル結合から塩基までの距離が大きく、これらの塩基とキモトリプシンが、何らかの相互作用を持つとすれば、立体的にどのような形をとるのか興味を持たれる。本節においては、代表的なカルボン酸をピリジルエステルに導き、塩基とエステル結合までの距離を更に短縮した形として、又、aryl component自体に塩基性を持たせた場合のキモトリプシン阻害活性への影響を、他の塩基性エステルの場合と比較した。なお、各カルボン酸と 3-hydroxypyridine の縮合は Chart 1 のフェニルエステルの反応に準じて行った。

【実験結果】

この系統の化合物の中で最も強い活性を示した、pyridyl 1-naphthylacetate (111) ($IC_{50} : 4 \times 10^{-7}M$) の場合はアミノフェニルエステル(104)と同じ値を示したが、pyridyl tetralin-1-carboxylate(110)の IC_{50} 値は $6 \times 10^{-6}M$ であり、(45) ($IC_{50} : 8 \times 10^{-7}M$) 等 同じ acyl component を有する他の塩基性エステルに比較し活性は弱かった。しかし、無置換フェニルエステル(11) ($IC_{50} : 6 \times 10^{-5}M$)、(23) ($IC_{50} : 4 \times 10^{-6}M$) と比較すると、対応する(112) ($IC_{50} : 7 \times 10^{-6}M$)、(111) ($IC_{50} : 4 \times 10^{-7}M$) は高い活性を示し、全体として中性のエステルに比較すれば、活性は強いものと考えられた (Table 11)。ピリジンはアミジン、ピペラジン等にくらべ塩基性自体も弱く、相対的にピリジルエステルの活性の弱かった理由とも考えられる。ここでは、ピリジルエステルも“塩基性エステル”として、活性の増強がみられたことを評価すべきであろうと考えた。なお、これらの化合物は塩酸塩として水に溶解させることは出来なかった。

Table 11 Chymotrypsin inhibitory activity of pyridyl esters



Compound No.	R	I C ₅₀ (M)
(110)		6×10^{-6}
(111)		4×10^{-7}
(112)		7×10^{-6}
(113)		9×10^{-7}

第三節 立体障害について

Acyl componentの、阻害活性への寄与に関するこれまでの実験結果により、2環縮合型(two-ring system)化合物は単環型(one-ring system)化合物より活性が強いことが見出された。インドール酢酸誘導体において、5位に n-Bu、Br等 bulky な置換基を導入しても、活性の低下はみられず、“疎水性ポケット”は大きなものと考えられた。しかしながら、キモトリプシン活性中心近傍の bulk tolerance⁵³⁾については、未だに明らかにされていない。そこで3環縮合環(three-ring system)を持つカルボン酸のフェニルエステルを合成し、疎水性ポケットの大きさについて検討した。又、活性エステル部位近傍の置換基の、立体的な影響についても検討を加えた。

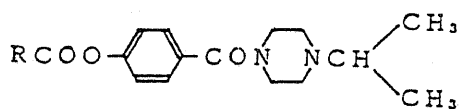
【実験結果】

Three-ring system を持つカルボン酸フェニルエステルの阻害活性をTable 12に示す。酢酸型化合物(119)の IC_{50} 値は $1 \times 10^{-6}M$ であった。この化合物に近い構造の two-ring system (インデン) の酢酸型化合物(61)の IC_{50} 値は $8 \times 10^{-6}M$ であり、疎水性の増加により活性はむしろ上昇する可能性も示唆された。しかし、(114)、(121)はそれぞれ構造の近い two-ring systemの化合物(58)、(30)に比較して、明らかに活性は低い等、その他の化合物では総じて強い活性を有するものはみられなかった。ポケットの大きさそのものはthree-ring systemも入れるものと思われたが、立体的に制約が増すものと考えられた。

次に、安息香酸エステルについて、カルボニルに近い、2位にメチル基を有する化合物(122)ではメチル基を持たない(100)と比較し活性は低下し、更に、6位にもメチル基を導入した(123)では $1 \times 10^{-3}M$ において50%の阻害を示さなかった(Table 13)。

又、phenyl component側の置換基についても立体障害がみられ、(45)に比較し、phenyl componentのベンゼン環2位にメトキシ基を導入(124)すると、活性は約1/10に低下した。同様に、4-isopropylpiperazinocarbonyl基を2位に持つ(125)も上記(124)の活性と一致した(Table 14)。

Table 12 Chymotrypsin inhibitory activity
of esters with three-ring system



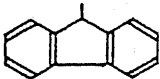
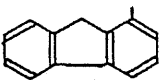
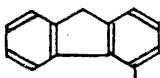
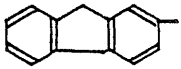
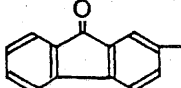
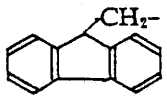
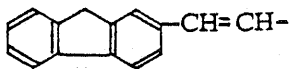
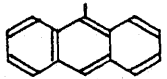
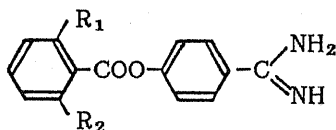
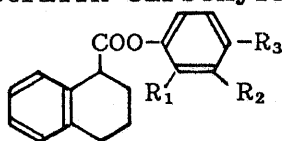
Compound No.	R	IC ₅₀ (M)
(114)		6×10^{-4}
(115)		$> 10^{-3}$
(116)		2×10^{-5}
(117)		$> 10^{-3}$
(118)		$> 10^{-3}$
(119)		1×10^{-5}
(120)		$> 10^{-3}$
(121)		$> 10^{-3}$

Table 13 Inhibitory activities of 4-amidinophenyl benzoates against chymotrypsin and trypsin

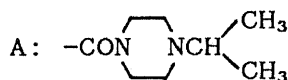


Compound No.	R ₁	R ₂	Inhibitory activity, IC ₅₀ (M)	
			Chymotrypsin	Trypsin
(100)	H	H	3 × 10 ⁻⁵	4 × 10 ⁻⁶
(122)	CH ₃	H	4 × 10 ⁻⁴	3 × 10 ⁻⁴
(123)	CH ₃	CH ₃	> 10 ⁻³	> 10 ⁻³

Table 14 Chymotrypsin inhibitory activity of tetralin carboxylates



Compound No.	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (M)
(45)	H	H	A	8 × 10 ⁻⁷
(124)	OCH ₃	H	A	9 × 10 ⁻⁶
(125)	A	H	H	1 × 10 ⁻⁵
(126)	H	A	H	6 × 10 ⁻⁶



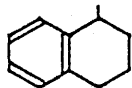
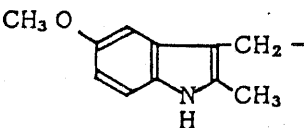
第四節 Phenyl componentのベンゼン環上の中性置換基の影響

Phenyl componentのベンゼン環への塩基性置換基の導入は活性上昇をもたらすことは既に述べたが、第二章に示したように酸性基は著しく活性を減ずる。これらの対比を明らかにするために中性置換基を有するエステルを合成した。なお、フェノールとしては、水溶性トリプシン阻害剤メシル酸カモスタット⁴⁴⁾の部分構造である N,N-dimethylcarbamoylmethyl (4-hydroxy)phenylacetate⁵⁴⁾を選んだ。

【実験結果】

Tetralin-1-carboxylate(127) 及び 5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetate (128)の IC_{50} 値はそれぞれ 7×10^{-6} 、 4×10^{-6} Mと、対応する塩基性エステル (45)、(51)に比較すると約 $1/10$ の活性であった。一方、酸性エステル(83)、(84)に比較すれば10倍と、丁度中間に位置することが分かった。又、これらの相対的な関係は、塩基性エステル及び酸性エステルの活性を無置換フェニルエステルと比較した場合とほぼ同様と考えられ、phenyl componentベンゼン環上の中性置換基は、活性に影響を与えていないものと推定された(Table 15)。

Table 15 Chymotrypsin inhibitory activity of neutral esters

Compound No.	R	IC_{50} (M)
(127)		7×10^{-6}
(128)		4×10^{-6}

[小括]

疎水性カルボン酸の各種アルキルエステルを合成し、先の各章に得られたアリルエステルの活性と比較した。本章において得られたアルキルエステルはいずれもキモトリプシン阻害活性を示さなかった。

エステル結合と塩基間の距離がアミジノフェニルエステルより更に短いピリジルエステルも、相当する中性のフェニルエステルより強い活性を示した。

Three-ring systemを持つカルボン酸のエステルは、two-ring systemの化合物に比較し強い活性を示さなかった。

エステル結合近傍の置換基の存在は活性を低下させた。

第六章 キモトリプシン阻害の作用機序

キモトリプシンの基質である蛋白質あるいはアシルアミノ酸誘導体等は、キモトリプシンの活性Ser残基の水酸基をアシル化した後、脱アシル化反応により可逆的に離脱してゆく。一方、セリンプロテアーゼ阻害剤DFPは、化学量論的に、不可逆的にSerの水酸基をリン酸化する。²⁸⁾ DFP以外にもフェニルメタンスルフォニルフルオリド(PMSF)、⁵⁵⁾ ジフェニルカルバミルクロライド³⁵⁾等も同様の阻害型式をとることが知られている。又、TPCK等のクロルメチルケトンは活性Hisのイミダゾール基のNをアルキル化し、不可逆的に失活させる。^{27, 56)} 本章においては、基質アナログ型阻害剤を目指してこれまでに合成された化合物が、実際にキモトリプシンに対しどのような阻害形式をとっているか等について、主として化合物(45) (4-(4-isopropylpiperazinocarbonyl)phenyl 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoate methanesulfonate, FK-448)をモデルとして酵素化学的な検討を行った。

【実験結果】

1) 各種セリンプロテアーゼに対する阻害作用

FK-448のキモトリプシンに対する阻害活性は、ATEEを基質とした場合、そのIC₅₀値は 8×10^{-7} Mであった。アミド基質であるSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (AAPF-MCA)を用いた場合も、天然基質であるカゼインを用いた場合もほぼ同様に、強い阻害活性を示した(Table 16)。

その他の代表的なセリンプロテアーゼに対する、FK-448の阻害スペクトラムについて検討した。

トロンビン及びエラスターゼに対するIC₅₀値は、いずれも 10^{-5} M台と弱い活性を示したが、トリプシン、プラスミン及び糜カリクレインに対しては、ほとんど活性を示さなかった(Table 16)。

2) 阻害様式及び阻害定数

ATEEを基質とした場合の、キモトリプシンの酵素反応に対する化合物(45) (FK-448)及び化合物(75) (FK-316)の阻害定数(K_i)を、Lineweaver-Burkの方法⁵⁷⁾及びDixonの方法⁵⁸⁾に従って測定した。

各種基質濃度において、阻害剤存在下及び非存在下に一定量のキモトリプシン

Table 16 Inhibitory activities of FK-448
against various serine proteases

Enzyme	Substrate	IC ₅₀ (M)
Chymotrypsin	ATEE ^{a)}	8×10^{-7}
	Casein	3×10^{-7}
	AAPF-MCA ^{b)}	1×10^{-7}
Trypsin	TAME ^{c)}	7×10^{-4}
Thrombin	TAME	3×10^{-5}
Plasmin	TAME	$> 10^{-3}$
Pancreas Kallikrein	TAME	$> 10^{-3}$
Elastase	APA-MCA ^{d)}	4×10^{-5}

^{a)} N-Acetyl-L-tyrosine ethyl ester

^{b)} Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA

^{c)} N-Tosyl-L-arginine methyl ester

^{d)} Suc-Ala-Pro-Ala-MCA

を反応させ、反応速度を測定し、Lineweaver-Burkの方法⁵⁷⁾に従いプロットすると Fig. 2に示す結果が得られた。3本の直線は縦軸上の一点で交わり、両阻害剤による阻害は、拮抗的であることがわかった。阻害剤非存在下の反応速度から、Michaelis定数(K_m)は、 7.1×10^{-3} Mと求められた。阻害剤存在下の反応速度のプロットから得られた直線の勾配から、両阻害剤のK_iを計算すると、FK-448: 1.1×10^{-7} M、FK-316: 1.0×10^{-7} Mと求められた。

次に、2種類の濃度のATEEを用い、各種濃度のFK-448存在下キモトリプシンの反応速度を測定し、Dixonの方法⁵⁸⁾によりプロットすると、Fig. 3に示す結果が得られた。2本の直線の交点から、K_iは 1.8×10^{-7} Mと求められ、先にLineweaver-Burkの方法により得た結果とほぼ一致した。

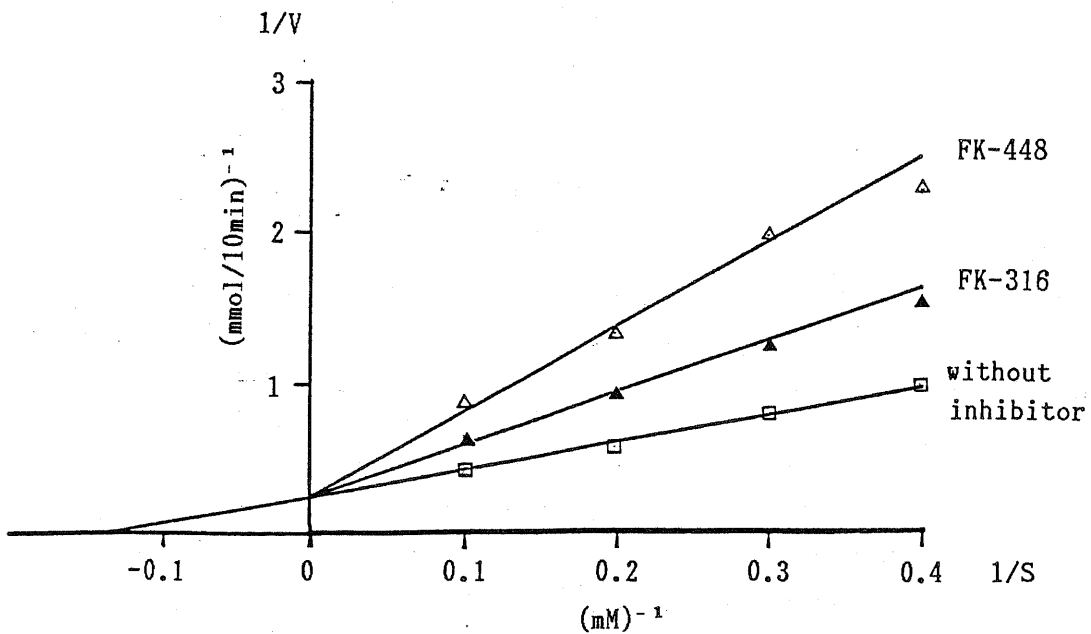


Fig. 2 Lineweaver-Burk plots of chymotrypsin activities

Chymotrypsin ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) and ATEE (2, 2.5, 3.33, 5 and 10mM) were incubated at 37°C for 10min with or without inhibitors (FK-448 : $2 \times 10^{-7}\text{M}$, FK-316 : $1 \times 10^{-7}\text{M}$).

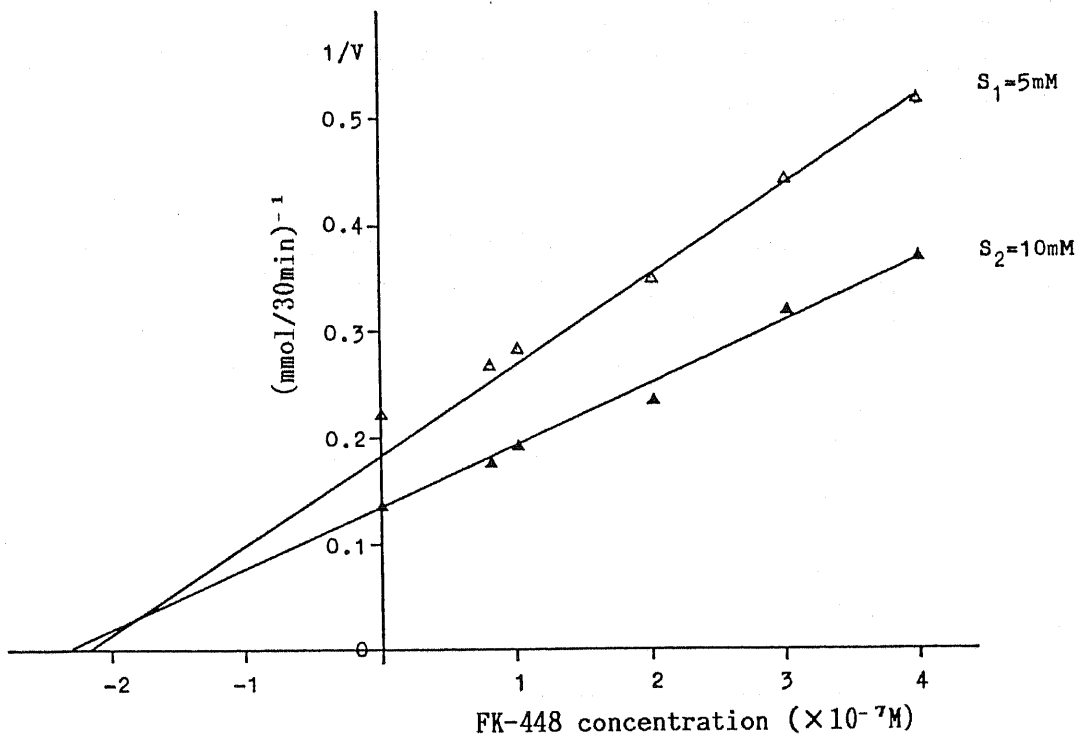


Fig. 3 Dixon plots of chymotrypsin inhibitory activities

Chymotrypsin ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) and ATEE (5 and 10mM) were incubated at 37°C for 30min with various concentrations of FK-448.

3) 阻害反応の可逆性⁵⁹⁾

上述の結果から、キモトリプシンに対する FK-448の阻害は可逆的であろうと推定されるが、Tamuraら⁴⁴⁾の方法により、酵素と阻害剤を反応させ、過剰の阻害剤等を透析により除去した後、37°Cに加温した場合の酵素活性の回復を指標に、阻害の可逆性を検討した。

キモトリプシンは 10^{-3} MのFK-448存在下 37°C 5分のインキュベートによりほぼ完全に活性を失ったが、4°C 一夜の透析により 約50%の活性を回復し、更に37°C、2時間のインキュベートによりほぼ完全に活性を回復した。この結果から FK-448による阻害は、可逆的であることが確認された(Fig. 4)。

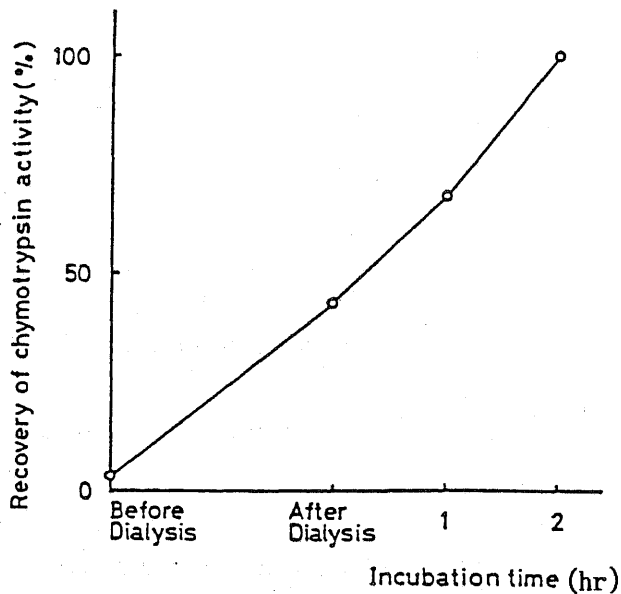


Fig. 4 Effects of dialysis and incubation on esterase activity of FK-448-treated chymotrypsin.

Chymotrypsin(20 μ g/ml) and FK-448 (10^{-3} M) in 50mM Tris-HCl buffer (containing 1mM CaCl_2), pH 8.0, were incubated at 37°C for 5min and then dialyzed against the same buffer overnight at 4°C. The dialysate was incubated at 37°C for 2hrs. The esterase activities of the samples from the indicated points were determined by incubation at 37°C for 30 min after addition of 10mM ATEE.

4) FK-448によるキモトリプシンのアシル化³⁹⁾

前章までに得られた阻害剤は全てカルボン酸アリルエステルであり、基質類似の反応機構によりキモトリプシンをアシル化すると仮定すれば、反応の進行により、加水分解産物である 4-置換フェノールが生成してくるものと予想される。そこで FK-448をキモトリプシンと反応させ 経時的にサンプリングし、反応液中のエステルと4-置換フェノールの濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定した(Fig. 5)。

$5 \times 10^{-4} \text{M}$ のキモトリプシンと $5 \times 10^{-3} \text{M}$ の FK-448を 37°C に反応させたところ、反応初期に速やかに、用いたキモトリプシンのモル数に等しいフェノール、1-(4-hydroxybenzoyl)-4-isopropylpiperazine (HIP)の生成が認められた。その後HIPの生成は緩やかな定常状態で進行した。同時に測定したエステル(FK-448)の減少量もこれと相応した動きを示した。これらの結果は酢酸p-ニトロフェニルとキモトリプシンの反応について検討した Benderら³⁷⁾、Hartleyら⁴²⁾の報告と一致するものであり、この阻害剤もこれと同様に【アシル-脱アシル】という基質類似の反応機構をとるものと推定された。

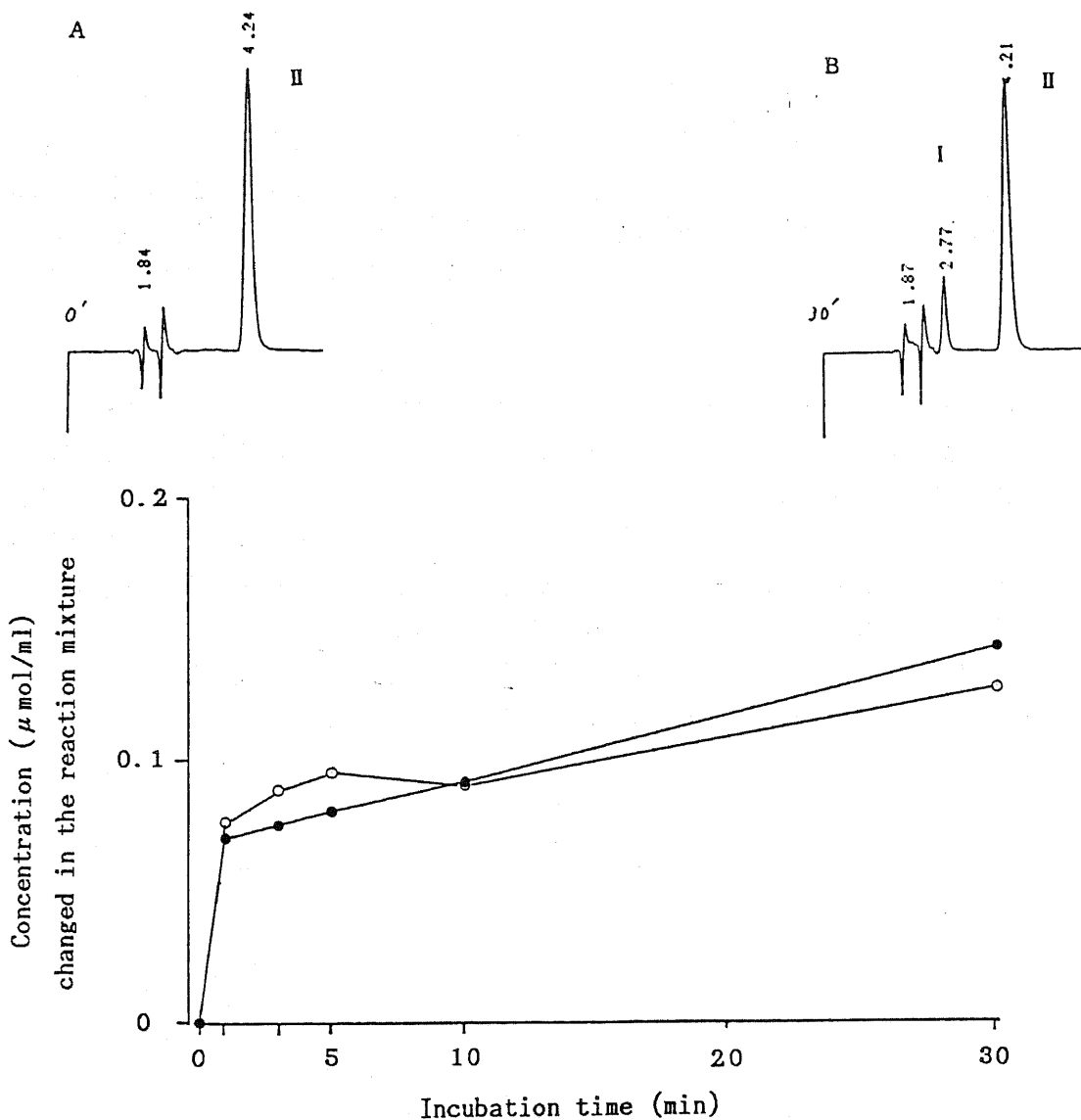


Fig. 5 Reaction of chymotrypsin with FK-448

Chymotrypsin ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) and FK-448 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) were incubated at 37°C , and 0.1ml of reaction mixture was removed at the indicated time. Concentrations of FK-448 and 4-substituted phenol (HIP) were determined by HPLC.

A : before incubation, B : after 30min incubation.

● — ● : Increase of 4-substituted phenol,

○ — ○ : decrease of FK-448.

5) キモトリプシンによる阻害剤の加水分解

これまでに得られた化合物の阻害活性については IC_{50} 値を用いて表した。しかしながら活性の弱い阻害剤については、アシル化速度が遅いことによるものか、あるいはアシル化、脱アシル化がともに速いことによるものか、明らかでない。そこで阻害剤とキモトリプシンを反応させ、加水分解速度を検討した。

$1 \times 10^{-3} M$ の各阻害剤に対し、阻害活性測定時と同量のキモトリプシン $2 \mu g/ml$ を反応させた場合の加水分解速度を Table 17 に示す。 $37^\circ C$ 30 分のインキュベートにより、化合物 (47) 及び (33) のみそれぞれ、約 5 % 及び 10 % の加水分解がみられた。両者ともプロピオン酸型であるが、ATEE 等よい基質となるアミノ酸エステルにおいては、環とエステル間の炭素数が 2 であることと一致することは興味深い。なお、両者のキモトリプシン阻害活性の IC_{50} 値はそれぞれ $3 \times 10^{-4} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ であり、阻害活性としては弱いものであったが、これらの化合物は少なくとも阻害活性測定時の、10 分の preincubation 中に阻害に必要な濃度以下にまで加水分解を受けてしまったことによるものではなかったと考えられる。一方、強い活性を示した化合物 (45) (FK-448) 及び (31) はエステルの加水分解速度としては遅く、先の HIP 定量の結果を併せて考えると、速いアシル化と遅い脱アシル化による阻害であったものと推定される。又、化合物 (30)、(42)、(116) 等は阻害活性も弱く、加水分解も受けにくいことから、アシル化反応そのものが進行しにくいものと思われたが、いずれも芳香環直結でカルボキシル基が平面にある共通点を持ち、活性 Ser の水酸基と疎水性ポケットの立体的な位置関係によるものと思われた。

[小括]

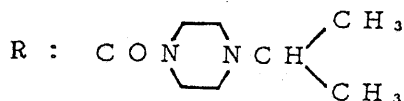
FK-448 はいずれの基質を用いた場合もキモトリプシンに対し、強い阻害活性を示した。ATEE を基質とした場合の K_i 値は約 $2 \times 10^{-7} M$ であった。又、その阻害スペクトルは、キモトリプシンに対し特異的であった。阻害の型式は可逆的な拮抗阻害であり、キモトリプシンの活性中心の Ser 残基をアシル化する反応機構をとるものと推定された。

安息香酸、ナフチルプロピオン酸等、比較的 IC_{50} 値の大きい(活性の低い)化合物は、アシル化、脱アシル化とも速くよい基質となる可能性も考えられたが、酵素による加水分解速度は遅く、活性の低いことは、アシル化速度自体が遅いことによるものであろうと推定された。

Table 17 Hydrolysis of inhibitors by chymotrypsin

Compound No.	Structure	IC ₅₀ (M)	Rate of hydrolysis (%)
(1)		8×10^{-4}	0.5
(2)		4×10^{-4}	1.3
(15)		3×10^{-4}	0
(45)		8×10^{-7} ^{a)}	0
(46)		1×10^{-5}	0.9
(47)		3×10^{-4}	4.5
(30)		5×10^{-5}	0
(31)		5×10^{-7}	0
(33)		5×10^{-4}	9.9
(42)		8×10^{-4}	0.3
(69)		6×10^{-4}	0.8
(114)		6×10^{-4}	0
(116)		2×10^{-5}	0

Each inhibitor (1×10^{-3} M) was incubated with chymotrypsin (2μ g/ml) at 37°C for 30min. ^{a)}:FK-448





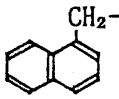

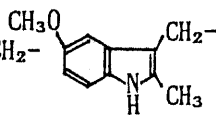
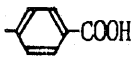

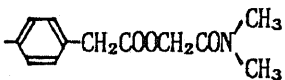

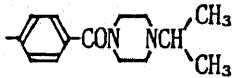

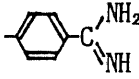
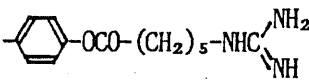
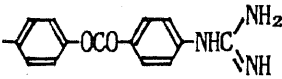
【第一部 考察】

キモトリプシン研究の歴史は 1913年 Vernonにより膵臓抽出液中にその存在が発見された時に始まる。それ以来、結晶化、一次構造、三次構造の解明といった蛋白質化学的な第一段階の研究が進められる一方、基質との反応速度論あるいは反応機構の研究、即ち第二段階の研究についても既に非常に多くの報告がなされている。そしてそれらが一段落した観がある中で、次の段階として、生体内に存在するキモトリプシン様酵素の発見が相次ぎ、同時にそれらの生体内での役割についての研究の時代を迎えたように思われる。これと並行して、その阻害剤についての研究も続けられている。先に述べたハロメチルケトン型の阻害剤の他に、基質アナログ型の阻害剤に関する報告も散見されるが、⁵⁰⁾ キモトリプシンは疎水性アミノ酸に対し親和性を有することから、阻害剤も水溶性のものは得られていない。従って、*in vitro*の実験においても少量のアルコール、DM SO等の有機溶媒を用いざるを得ない等の支障を来すことも少なくない。筆者は、水溶性の、強い活性を有する阻害剤を得る目的で、多数のエステルを合成し、カルボン酸及びフェノールの置換基の影響について検討した。代表的なカルボン酸とフェノールの組み合わせにより得られるエステルの活性を Table 18 にまとめた。キモトリプシン阻害活性と化合物の構造との間には規則性がみられることがわかる。この表をもとに、各章においてこれまでに得られた結果を、構造と活性についてまとめると次のように要約される（()内の数字は化合物No.を表す）。

[A] Acyl componentの活性への寄与について

- 1) 単環型化合物 < 縮合環 (2環) 型化合物 e.g. (2) < (23) etc.
- 2) 環へのアルキル基の導入：活性上昇 e.g. (38) < (48) etc.,
水酸基の導入：活性低下 e.g. (9) < (3) etc.
- 3) 脂環 ≒ 芳香環 e.g. (89) ≒ (87)
- 4) 酢酸型 ≧ 直結カルボン酸型 ≧ プロピオン酸型 (芳香環について)
e.g. (31) > (30) > (33),
直結カルボン酸型 > 酢酸型 > プロピオン酸型 (脂環について)
e.g. (15) > (16) > (17)
- 5) 中性環 > 塩基性環 e.g. (30) > (69)
- 6) カルボキシル基近傍の立体障害：活性低下 e.g. (100) > (122) >

Table 18 Comparison of chymotrypsin inhibitory activity of the esters R-COO-R'

R'	R				
					
		(83) 6×10^{-5}			(84) 6×10^{-5}
	(1) 8×10^{-4}		(23) 4×10^{-6}	(11) 6×10^{-5}	
		(127) 7×10^{-6}			(128) 4×10^{-6}
		(110) 6×10^{-6}	(111) 4×10^{-7}	(112) 7×10^{-6}	(113) 9×10^{-7}
		(45) 8×10^{-7}	(31) 5×10^{-7}	(38) 6×10^{-6}	(51) 4×10^{-7}
	(74) 6×10^{-5}	(75) 5×10^{-7}	(76) 4×10^{-7}	(77) 3×10^{-6}	(78) 4×10^{-7}
	(100) 3×10^{-5}	(105) 5×10^{-7}	(104) 4×10^{-7}	(102) 2×10^{-6}	(103) 2×10^{-7}
	(97) 7×10^{-6}			(98) 7×10^{-7}	
	(87) 5×10^{-6}		(91) 3×10^{-7}	(90) 7×10^{-7}	

The numeral in parentheses represents the number of the compound.

(123)

[B] Phenyl componentの活性への寄与について

7) ベンゼン環4-位の置換基の影響:

guanidinobenzoyloxy- \cong guanidinocaproxyloxy- > amidino- \cong
dimethylaminoethylaminocarbonyl- \cong isopropylpiperazinocarbonyl-
> (pyridyl) > H (non-substituted) \cong dimethylcarbamoylmethoxy-
carbonylmethyl (neutral) > carboxyl (acidic)

8) 活性エステル近傍の立体障害 (フェノールのオルト位の置換基) : 活性
低下 e.g. (45) > (124) (Table 14)

9) アリルエステル > アルキルエステル e.g. (23) > (106) etc.
(Table 10)

第六章において述べたように、これらの化合物の阻害機構については、FK-448をモデルとして検討した結果、酵素のアシル化を経由する、基質類似型の反応と推定され、可逆的、拮抗型阻害剤であることが明らかとなった。従って、上述の acyl component 及び phenyl componentの、阻害活性への寄与は、どちらも阻害活性の強弱を左右するものではあるが、前者は主としてアシル中間体の脱アシル化速度を反映し、後者は四面体構造中間体から酵素のアシル化までの速度を反映しているものと推定される。Acyl componentの影響を更に簡単にまとめれば、疎水性ポケットの大きさ等、立体的な制約を越えない限りにおいて、疎水性が高まれば脱アシル化速度は遅くなるものと推論されよう。一方、phenyl componentについては、キモトリプシンに、塩基をトラップする site が存在するのではないかと推定されるが、活性エステル部位からの距離について柔軟性があり、今回のデータからその詳細について明らかにすることはできなかった。

キモトリプシンの疎水性ポケットについては、未だ解明されていない部分が多い。^{7, 53)} 上記の結果のうち 1)、2) 及び 5) は acyl component側の疎水性が高まると阻害活性は強まると解釈できる。しかしながら疎水性ポケットがアシル基をしっかりと捕捉することは Asp-His-Ser のプロトンリレーを円滑にすると考えられ、脱アシル化反応も起きやすくなる可能性がある。そう考えると、阻害剤として脱アシル化速度の遅い構造を探した結果である上記の項目は、直ちに疎水性ポケットの構造解明に結びつけることには慎重でなければならない。

上記のカルボン酸とフェノールの組み合わせの中で、インドール酢酸誘導体の塩基性フェニルエステルは最も強い阻害活性を与えた。これらの化合物の IC_{50} 値はキモスタチンにも匹敵するものである。又、活性測定に用いたキモトリプシンの濃度は約 $1 \times 10^{-7} M$ であることを考慮すると、 IC_{50} 値が $6 \times 10^{-8} M$ である化合物(56)等は、ほとんど1:1に存在する状態で阻害が進行しているものと計算される。

4-Amidinophenyl (5-methoxy-2-methyl)-3-indolylacetate(103)は、キモトリプシンを阻害すると同時に逆性基質型阻害剤としてトリプシンをも阻害したが、その IC_{50} 値は、逆性でない、通常基質アナログ型阻害剤であるグアニジノ安息香酸フェニルエステル類に優るとも劣らないものである。Kraut⁵⁾はトリプシンの活性siteについて、塩基性、疎水性両吸着部位の存在を提唱しているが、疎水性部位の性格について詳しい記載はみられない。この化合物(103)に限らずキモトリプシン阻害活性の強い、疎水性カルボン酸のアミジノフェニルエステルが、トリプシンに対しても強い阻害活性を示したという事実は、両酵素に、構造の類似した吸着部位が存在する可能性を示唆する。これらの疑問点については今後の検討を待たなければならない。

次に、目的の一つであった水溶性に関しては、塩基性カルボン酸等による水溶性フェニルエステルには強い阻害活性はみいだされなかったが、[B]、7)に示す guanidinobenzoyloxy、guanidinocaproyloxy、amidino誘導体はメタンスルホン酸塩として、又、dimethylaminoethylaminocarbonyl、isopropylpiperazino-carbonyl誘導体は塩酸塩としても水溶性であり、しかも強い阻害活性を示した。これらの化合物は今後 *in vitro*、*in vivo*の実験に活用され得るものと考えられる。

又、上述のようにグアニジンあるいはアミジンの誘導体は、トリプシン阻害剤として膵炎の治療に用いられているガベキセート、ナファモスタットの部分構造であるが、それらはメタンスルホン酸塩としては水に溶解するが、塩酸塩は比較的難溶であるため、輸液その他と配合する場合に制約がある。筆者が今回キモトリプシン特異的阻害剤に導入した、塩酸塩として可溶性となる塩基性フェノールはトリプシン阻害剤にも応用が可能であった。⁶⁾ この水溶性という利点により、従来不可能であった、胆膵管造影(ERCP)実施時、ウログラフィン等の造影剤と混溶することもでき、ERCP実施による急性膵炎様症状の予防に道を開くものと期待される。

第一部 実験の部

1) 実験材料

a) 合成実験に使用した benzoyl chloride, phenylacetic acid, cinnamic acid, indoleacetic acid, cyclohexanecarboxylic acid, nicotinyl chloride, naphthylacetic acid, benzofurancarboxylic acid, 1,2,3,4-tetrahydronaphthoic acid, indanecarboxylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, phenol, hydroquinone, 4-amidinophenol, 3-hydroxypyridine, 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, piperazine, N,N-dimethylaminoethylamine, thionyl chloride, dicyclohexylcarbodiimide(DCC), Pd-C, pyrrolidine 及びその他の試薬は、東京化成工業(株)、和光純薬工業(株)、Aldrich Chemical Co. Inc. の製品を購入した。

b) 酵素活性測定に使用した酵素については、chymotrypsin A (bovine pancreas), trypsin (bovine pancreas)は Boehringer Mannheim社、thrombin (human), plasmin (human)は (株)ミドリ十字、pancreas kallikrein (porcine), elastase (porcine)は Sigma社の製品を使用した。

基質については、N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)は Sigma社、N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (AAPF-MCA), Suc-Ala-Pro-Ala-MCA (APA-MCA) は蛋白質研究奨励会、casein (nach Hammarsten) はMerck社の製品を使用した。

阻害剤については、chymostatin は 蛋白質研究奨励会、L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK) はSigma社の製品を使用した。4-Carboethoxyphenyl 6-guanidinocaproate methanesulfonate (gabexate mesilate, FOY-007)³⁸⁾, N,N-dimethylcarbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy)phenylacetate methanesulfonate (camostat mesilate, FOY-305)⁴⁴⁾ 及び第一部において使用した阻害剤は、興和(株)・東京研究所で合成した。

c) Tris-(hydroxymethyl)aminomethaneは Sigma社、hydroxylamine hydro-

chloride, trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride (FeCl_3), phenol reagent, dimethyl sulfoxide (DMSO) 等の試薬は 和光純薬工業 (株)の製品を使用した。

2) 合成法

a) カルボン酸とフェノール(アルコール)の縮合

カルボン酸とフェノールの縮合は原則として次の2つの方法を用いた。インドール等異項環を含むカルボン酸の反応にはdicyclohexylcarbodiimide (DCC)法、その他の炭素環式化合物の反応には酸クロライド法を用いた。

第五章におけるアルキルエステルの場合は、対応するアルコールを用い、ピリジルエステルの場合は 3-hydroxypyridineを用い、同様に反応させた。なお、得られたエステルの融点等は、Table 19にまとめた。

i) 酸クロライド法

0.05molのカルボン酸に 40gの thionyl chloride (SOCl_2)を加え、80℃で30分攪拌した。冷後 n-hexaneを加え析出する結晶を濾取し、150mlのpyridineに溶解し、0.05molのフェノールを加え室温に一夜反応させた。冷却しつつ、 NaHCO_3 水溶液を加えて生じる結晶を濾取し、目的物を得た。

ii) DCC法

0.03molのカルボン酸及び 0.045molのフェノールを 120mlのtetrahydrofuran (THF)に溶解し、0.03mol(6.19 g)のDCCを加え室温で一夜反応させた。生じた dicyclohexylureaを濾去し、目的物を得た。

第二章、第三節における遊離カルボキシル基を有する化合物の合成は、benzyl 4-hydroxybenzoateとカルボン酸または酸クロライドを上記の i) 又は ii) に従い反応させた後、接触還元により保護基をはずし、目的物を得た。

b) 4-置換フェノールの合成

i) 1-(4-Hydroxybenzoyl)-4-isopropylpiperazine(II)

Piperazine 25.9g(0.3mol)、NaI 1.5g(0.01mol)、 K_2CO_3 6.91g (0.05mol)に MeOH 50mlを加え更に 2-bromopropane 12.3g(0.1mol)を加え、攪拌しつつ 60°Cに4時間加温した。冷後 $CHCl_3$ 150mlを加え、不溶物を濾去後飽和食塩水で洗浄し、 $MgSO_4$ により乾燥し 1-isopropyl-piperazine(I)の $CHCl_3$ 溶液を得た。I は取り出さず、triethylamine 14ml(0.1mol)を加え氷冷し、あらかじめ4-ethoxycarbonyloxybenzoic acid 21.0g(0.1mol)と $SOCl_2$ 21mlの反応により得た酸クロライドを滴下し、室温に3時間攪拌した。 $CHCl_3$ を溜去しAcOEtを加え不溶物を濾去後、稀HClにより抽出した。NaHCO₃アルカリ性としAcOEt抽出、飽和食塩水洗浄後 $MgSO_4$ により乾燥した。このものも取り出さず、次の反応に用いた。即ち、AcOEt溶液に pyrrolidine 5.0ml (0.06mol)を加え、室温に一夜放置すると(II)の結晶が析出した。mp 141-145°C。(未補正、以下同様) Anal.Calcd. $C_{14}H_{20}N_2O_2$: C,67.72; H,8.12; N,11.28. Found: C,67.90; H,8.18; N,11.19.

ii) N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-4-hydroxybenzamide(III)

Methyl 4-hydroxybenzoate 9.10g(0.06mol)に N,N-dimethylaminoethylamine 10.55g(0.12mol)を加え、150°Cに 20時間加熱攪拌した。冷後反応液を濃縮し、AcOEtを加えて得た粗結晶をacetoneから再結晶し、5.95g(48%)の(III)を得た。

mp 118-121°C. Anal. Calcd. $C_{11}H_{16}N_2O_2$: C,63.44; H,7.74; N,13.45. Found C,63.25; H,7.55; N,13.26.

3) 測定法

a) キモトリプシン阻害活性

Hestrin法を改良したRoberts⁴³⁾の方法に従い測定した。阻害剤のDMSO溶液 0.1mlにpH 8.0、0.1M トリスHCl緩衝液 0.1ml及び同緩衝液に溶解した10 μ g/mlのキモトリプシン溶液 0.1mlを加え、37°Cに10分加温した。ATEE 25mM溶液(5%DMSOを含む同緩衝液に溶解した) 0.2mlを加え、37°Cに30分反応させた後、アルカリ性ヒドロキシルアミン溶液(2M hydroxylamine HClと3.5M NaOHを用時等量に混和した) 0.75mlを加え、37°Cに15分加温した。氷冷後、18% TCA溶液 0.5

ml、4N HCl 0.5ml及び 10% FeCl₃溶液 0.5mlを加え、530nmにおいて測定した吸光度から、次式によりキモトリプシン阻害活性を求め、用いた酵素の活性を 50% 阻害する阻害剤濃度 IC₅₀値を求めた。

$$\text{阻害活性(\%)} = \frac{A_T - A_C}{A_S - A_C} \times 100$$

但し、A_s：基質のみの発色

A_c：基質+酵素、反応後の発色（対照）

A_T：基質+酵素+阻害剤、反応後の発色

カゼインを基質とした場合のキモトリプシン阻害活性は、Muramatsuら⁶²⁾の方法に従い、反応により生じたTCA可溶性蛋白を、フェノール試薬を用い Folin-Lowry法⁶³⁾により定量した。又、AAPF-MCAを基質とした場合のキモトリプシン阻害活性は、Yokoyamaら⁶⁴⁾の方法に従い、蛍光法により測定した。

b) トリプシン阻害活性

キモトリプシン阻害活性と同様に Hestrin法により測定した。但し、緩衝液は 10mMのCaCl₂を含むpH 8.0、0.1MトリスHCl緩衝液とし、酵素として 2.5 μg/mlのトリプシン、又、基質として 25mMのTAMEを使用した。

c) その他の酵素に対する阻害活性

トロンビン、プラスミン、糜カリクレインに対する阻害活性は、TAMEを基質として³⁹⁾キモトリプシンと同様に Hestrin法により測定した。但し、酵素としてそれぞれ、トロンビン 37.5U/ml、プラスミン 2.5U/ml、糜カリクレイン 20U/mlの各溶液を、又、基質として 25mMのTAMEを使用した。

エラスターゼに対する阻害活性は、終濃度 1 μg/mlの酵素を用い、APA-MCAを基質として蛍光法により測定した。⁶⁴⁾

d) キモトリプシンに対するK_i値の測定

A T E Eを基質とした場合のFK-448のK_i値は、既述の方法による阻害活性測定結果をもとに、Lineweaver-Burkの方法⁵⁷⁾及び Dixonの方法⁵⁸⁾により求めた。但し、Lineweaver-Burkのプロットの場合は基質濃度(終濃度)を10, 5, 3.33, 2.5mM、FK-448及びFK-316の濃度を、それぞれ、 2×10^{-7} M、 1×10^{-7} Mとした。又、Dixonのプロットの場合は基質濃度を10及び5mMとし、各種濃度のFK-448存在下のキモトリプシン活性を測定した。

e) キモトリプシンに対する阻害の可逆性⁴⁴⁾

1 mMのCaCl₂を含むpH 8.0、0.05MのトリスHCl緩衝液8mlに同緩衝液に溶解した200 μg/mlのキモトリプシン溶液1mlと 10^{-2} MのFK-448溶液1mlを加え37°Cに5分間加温した。氷冷し、全量を透析チューブに移し、同緩衝液に対し4°Cにて一夜透析した。その後37°Cにてインキュベートし1及び2時間の時点にサンプリングした。透析前、直後及び透析後インキュベート1、2時間の各時点の反応液0.1mlについて、A T E Eを基質として既述の方法によりキモトリプシン活性を測定した。

f) キモトリプシンに対するアシル化反応

FK-448をpH 8.0、0.1MのトリスHCl緩衝液に、 5×10^{-3} Mとなるように溶解した。同緩衝液により、キモトリプシンを12mg/ml(約 5×10^{-4} M)となるよう溶解した。FK-448溶液0.2mlに同緩衝液0.6ml及びキモトリプシン溶液0.2mlを加え37°Cに30分間加温した。その間経時的に反応液0.1mlをサンプリングし、後にHPLCの溶出液として用いるpH 3.5の酢酸緩衝液を含むCH₃CN 0.9ml中に加え冷却した。反応終了後、次の条件によりHPLCを用い、未変化体であるフェニルエステル(FK-448)及び反応生成物である4-置換フェノール(1-(4-hydroxybenzoyl)-4-isopropyl-piperazine; H I P)を同時に定量した。

(HPLC条件)

装置、JASCO TRI ROTAR-V, UVIDEC-100-V, HITACHI 833型 data processor
カラム、μ-Bondapak C₁₈(Waters社製)

溶媒、CH₃CN : pH 3.5, 0.05M 酢酸緩衝液 : E t₃N = 850 : 200 : 1
流速、1.5ml/min

温度、23°C

測定波長、265nm

g) キモトリプシンによる阻害剤の加水分解

5×10^{-3} Mの阻害剤のDMSO溶液 0.1mlに、pH 8.0、0.1MトリスHCl緩衝液 0.3ml及び同緩衝液に溶解した $10 \mu\text{g/ml}$ のキモトリプシン溶液 0.1mlを加え 37°Cに 30分加温した。反応後、3) a) に述べた Hestrin 法に準じ、アルカリ性ヒドロキシルアミンを加え 37°Cに15分作用させ、 FeCl_3 による発色により残存エステル量を測定した。

Table 19 Yields and physical properties of inhibitors

Compound No.	Formula	Recrystallizing Solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental Analysis (%)		
					Calcd. (Found)	C	H
(11)	$C_{16}H_{13}NO_2$	Et ₂ O-pet.ether	20	72-74	76.48 (76.57)	5.21 5.10	5.57 5.54
(23)	$C_{18}H_{14}O_2$	Et ₂ O-hexane	24	60-61.5	82.42 (82.39)	5.38 5.24	- -)
(30)	$C_{25}H_{26}N_2O_3$	EtOH-Et ₂ O-hexane	56	117-119	74.60 (74.45)	6.51 6.49	6.96 6.95
(31)	$C_{25}H_{28}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	81	197-202	63.26 (62.91)	6.29 6.34	5.46 5.12
(32)	$C_{27}H_{28}N_2O_3$	CHCl ₃ -Et ₂ O	79	123-124	75.68 (75.54)	6.59 6.65	6.54 6.48
(33)	$C_{27}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-Et ₂ O	41	188-191	68.13 (68.24)	6.78 6.76	5.88 5.68
(34)	$C_{25}H_{26}N_2O_3$	AcOEt-Et ₂ O	72	142-143	74.60 (74.60)	6.51 6.55	6.96 7.01
(35)	$C_{26}H_{28}N_2O_3$	AcOEt-Et ₂ O-hexane	60	115-117	74.98 (74.95)	6.78 6.78	6.73 6.63
(36)	$C_{27}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl$	MeOH-Et ₂ O	47	233-235	69.44 (69.07)	6.69 6.75	6.00 6.00
(37)	$C_{23}H_{25}N_3O_3$	EtOH	6	224-227	70.57 (70.37)	6.44 6.47	10.73 10.73
(38)	$C_{24}H_{27}N_3O_3$	AcOEt	48	145-147	71.09 (71.09)	6.71 6.73	10.36 10.39
(39)	$C_{25}H_{27}N_3O_3$	EtOH	11	229-230	71.92 (72.06)	6.52 6.51	10.06 10.17
(40)	$C_{25}H_{29}N_3O_3$	AcOEt-pet.ether	61	129-130	71.58 (71.71)	6.97 7.02	10.02 10.06
(41)	$C_{25}H_{31}N_3O_3$	AcOEt-hexane	76	101-104	72.03 (72.02)	7.21 7.19	9.69 9.81
(42)	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	AcOEt	46	118-120	70.39 (70.36)	6.16 6.06	7.14 7.16
(43)	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	AcOEt	27	117-118	70.92 (70.63)	6.45 6.36	6.89 6.87
(44)	$C_{25}H_{26}N_2O_4$	AcOEt-pet.ether	68	159-160	71.75 (71.62)	6.26 6.28	6.69 6.66
(45)	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	90	179-181	62.13 (62.11)	6.82 6.82	5.57 5.67

Table 19 Yields and physical properties of inhibitors (continued)

Compound No.	Formula	Recrystallizing Solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental Analysis (%)		
					C	H	N
(46)	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH	49	218-219	68.33 (68.03)	7.28 (7.28)	6.13 (6.06)
(47)	$C_{27}H_{34}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	65	206-208	68.85 (68.90)	7.49 (7.45)	5.95 (6.03)
(48)	$C_{25}H_{29}N_3O_3 \cdot HCl \cdot 1/4H_2O$	EtOH	62	222-223 (dec.)	65.21 (65.09)	6.68 (6.73)	9.13 (9.24)
(49)	$C_{26}H_{31}N_3O_3 \cdot \begin{matrix} COOH \\ \\ COOH \end{matrix} \cdot H_2O$	EtOH	42	123-125 (dec.)	62.10 (62.08)	6.51 (6.62)	7.76 (7.34)
(50)	$C_{29}H_{37}N_3O_3 \cdot HCl \cdot 1/4H_2O$	EtOH	40	217-219	67.43 (67.47)	7.51 (7.37)	8.13 (8.09)
(51)	$C_{26}H_{31}N_3O_4 \cdot HCl$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	73	174-175	64.26 (63.90)	6.64 (6.58)	8.65 (8.27)
(52)	$C_{27}H_{33}N_3O_4 \cdot HCl$	EtOH	64	223-226 (dec.)	64.85 (64.77)	6.85 (6.81)	8.40 (8.52)
(53)	$C_{28}H_{33}N_3O_5$	AcOEt-pet. ether	58	146-147	68.41 (68.47)	6.77 (6.70)	8.55 (8.47)
(54)	$C_{33}H_{34}N_3O_5 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	76	214-215	59.69 (59.45)	5.60 (5.57)	6.14 (6.29)
(55)	$C_{25}H_{29}N_3O_4 \cdot \begin{matrix} COOH \\ \\ COOH \end{matrix} \cdot 1/4 \cdot H_2O$	EtOH	68	178-182	61.18 (61.06)	5.99 (6.10)	7.93 (7.48)
(56)	$C_{24}H_{26}N_3O_3Br$	EtOH	69	139-140	59.51 (59.78)	5.41 (5.18)	8.67 (8.26)
(57)	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	62	213-214	68.33 (68.04)	7.28 (7.17)	6.13 (5.96)
(58)	$C_{24}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	55	222-226 (dec.)	67.20 (67.22)	6.81 (6.81)	6.53 (6.71)
(59)	$C_{24}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl$	H ₂ O	62	236-237 (dec.)	67.20 (67.22)	6.81 (6.80)	6.53 (6.63)
(60)	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H \cdot 1/2H_2O$	EtOH-Et ₂ O	59	165-167	61.04 (61.24)	6.89 (6.87)	5.48 (5.68)
(61)	$C_{25}H_{28}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH	32	211-212	62.38 (62.06)	6.44 (6.37)	5.60 (5.59)
(62)	$C_{26}H_{30}N_2O_4 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	40	208-210	65.06 (65.53)	6.72 (6.56)	5.84 (5.84)
(63)	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	65	214-216	68.33 (68.30)	7.28 (7.24)	6.13 (6.28)

Table 19 Yields and physical properties of inhibitors (continued)

Compound No.	Formula	Recrystallizing Solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental Analysis (%)		
					Calcd. (Found)	C	H
(64)	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	54	224-226	68.63 (68.49)	6.87 (6.81)	6.16 (6.31)
(65)	$C_{24}H_{26}N_2O_3S \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	46	175-177	57.90 (57.63)	5.83 (5.93)	5.40 (5.12)
(66)	$C_{24}H_{26}N_2O_3S \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	76	205-207	57.90 (57.65)	5.83 (5.84)	5.40 (5.19)
(67)	$C_{24}H_{25}N_3O_3$	AcOEt-Et ₂ O-pet.ether	53	124-127	71.44 (71.19)	6.25 (6.22)	10.41 (10.39)
(68)	$C_{24}H_{25}N_3O_3$	AcOEt-Et ₂ O	52	135-137	71.44 (71.71)	6.25 (6.29)	10.41 (10.28)
(69)	$C_{24}H_{25}N_3O_3$	AcOEt-Et ₂ O-pet.ether	59	120-122	71.44 (71.54)	6.25 (6.29)	10.41 (10.37)
(70)	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	74	178-180	62.77 (62.66)	7.02 (6.99)	5.42 (5.46)
(71)	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH	62	218-219	62.77 (62.75)	7.02 (6.96)	5.42 (5.13)
(72)	$C_{25}H_{29}ClN_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	43	190-196	58.15 (57.94)	6.19 (6.18)	5.22 (5.00)
(73)	$C_{25}H_{29}N_3O_5$	EtOH-Et ₂ O	9	135-138	58.90 (58.67)	5.86 (5.68)	7.63 (7.68)
(74)	$C_{18}H_{20}N_2O_3 \cdot HCl$	CHCl ₃ -AcOEt	23	174-178	61.98 (61.48)	6.07 (5.95)	8.03 (7.90)
(75)	$C_{22}H_{26}N_2O_3 \cdot HCl$	acetone	46	153-156	65.58 (65.30)	6.75 (6.94)	6.95 (6.95)
(76)	$C_{23}H_{24}N_2O_3$	AcOEt-pet.ether	46	126-128	73.38 (73.14)	6.43 (6.33)	7.44 (7.47)
(77)	$C_{21}H_{23}N_3O_3 \cdot HCl$	MeOH-Et ₂ O	22	176-178	62.76 (62.75)	6.02 (5.97)	10.46 (10.41)
(78)	$C_{23}H_{27}N_3O_4 \cdot \begin{matrix} CHCOOH \\ \\ CHCOOH \end{matrix}$	EtOH	77	151-153	61.71 (61.65)	5.95 (5.95)	8.00 (7.78)
(83)	$C_{18}H_{16}O_4$	EtOH	62	140-144	72.96 (72.48)	5.44 (5.41)	- (-)
(84)	$C_{19}H_{17}NO_5$	AcOEt-Et ₂ O-hexane	18	166-168	67.25 (67.26)	5.05 (5.02)	4.13 (4.06)
(87)	$C_{21}H_{17}N_3O_4 \cdot HCl \cdot H_2O$	DMF-AcOEt	53	222-225	58.68 (59.08)	4.69 (4.36)	9.78 (9.99)

Table 19 Yields and physical properties of inhibitors (continued)

Compound No.	Formula	Recrystallizing Solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental Analysis (%)		
					Calcd. (Found)	C	H
(90)	$C_{24}H_{20}N_4O_4 \cdot HCl$	DMF-AcOEt	22	196-198	62.00 (62.00)	4.55 4.32	12.05 12.01
(91)	$C_{26}H_{21}N_3O_4 \cdot HCl$	acetone	9	158-160	65.62 (65.75)	4.66 4.53	8.83 8.79
(102)	$C_{17}H_{15}N_3O_2 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	31	223-226	55.52 (55.51)	4.92 4.98	10.79 10.80
(103)	$C_{19}H_{19}N_3O_3 \cdot HCl$	MeOH-Et ₂ O	24	188-193	61.04 (61.02)	5.39 5.41	11.24 11.40
(104)	$C_{19}H_{16}N_2O_2 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	26	197-199	59.99 (59.98)	5.03 4.95	7.00 7.05
(105)	$C_{18}H_{18}N_2O_2 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	23	177-180	58.45 (58.49)	5.68 5.58	7.17 7.18
(112)	$C_{15}H_{12}N_2O_2$	AcOEt-hexane	82	114-115	71.42 (71.38)	4.79 4.78	11.10 11.09
(114)	$C_{28}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-Et ₂ O	37	196-201	69.20 (69.31)	6.22 6.10	5.76 5.82
(115)	$C_{28}H_{28}N_2O_3$	EtOH-Et ₂ O	45	126-128	76.34 (76.58)	6.41 6.44	6.36 6.18
(116)	$C_{28}H_{28}N_2O_3$	AcOEt-pet.ether	46	95-96	76.34 (76.19)	6.41 6.43	6.36 6.07
(117)	$C_{28}H_{28}N_2O_3 \cdot 1/2 \cdot H_2O$	CHCl ₃ -Et ₂ O	40	148-150	74.81 (74.26)	6.50 6.30	6.23 5.97
(119)	$C_{29}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl \cdot 1/4H_2O$	EtOH-Et ₂ O	58	225-228	70.29 (70.06)	6.41 6.28	5.65 5.68
(120)	$C_{30}H_{30}N_2O_3$	EtOH-AcOEt	55	192-195	77.23 (77.49)	6.48 6.52	6.00 6.09
(121)	$C_{29}H_{28}N_2O_3 \cdot 1/2H_2O$	AcOEt-Et ₂ O-pet.ether	14	181-183	75.47 (75.69)	6.33 6.22	6.07 5.81
(124)	$C_{26}H_{32}N_2O_4 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	32	186-188	64.78 (65.05)	7.11 6.89	5.81 5.74
(125)	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	40	175-178	67.78 (67.54)	7.05 7.09	6.32 6.31
(126)	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	43	193-197	66.43 (66.76)	7.14 6.90	6.20 6.18
(127)	$C_{23}H_{25}NO_5$	AcOEt-Et ₂ O	85	90-93	69.86 (69.62)	6.37 6.36	3.54 3.37
(128)	$C_{24}H_{26}N_2O_5$		29	(oil)	65.74 (65.32)	5.98 5.69	6.39 5.96

第二部 キモトリプシン阻害剤併用によるインスリンの経口投与の試み

インスリン、カルシトニン等のペプチドホルモンを始め、エラスターゼ、カクレイン等の酵素やグロブリンその他の生理活性を有する蛋白質は広く医薬品として用いられている。これらのうちのいくつかは経口投与製剤として用いられているが、⁶⁵⁻⁶⁷⁾多くは注射剤として使用されている。それらは高分子物質であるため難吸収性であることに加えて、消化酵素による分解を受け易く、一般に吸収率は低いものと考えられている。しかしながら、長期間に亘り連用されるインスリン、エラスターゼ等は、特に注射剤に代わる経口投与製剤が望まれ、それに対する研究も盛んに行われている。

Sangerら^{68, 69)}によればインスリンは消化酵素のうち、ペプシン及びキモトリプシンにより分解を受け易い。筆者は本論文第一部に述べたように、各種キモトリプシン阻害剤を得た。そこで、インスリンをモデルとして、腸溶性製剤とすることで胃におけるペプシンによる分解を避け、^{70, 71)}キモトリプシン阻害剤と併用することによりキモトリプシンによる分解を防ぎ、腸管よりインスリンを吸収させる方法について検討した。又、この方法は他の蛋白性医薬品についても応用できるものと考え、併せて若干の検討を加えた。

インスリンは1921年 Bantingと Bestにより発見されて以来約60年、糖尿病の治療に用いられて来たが、現在に至るまで臨床では専ら注射剤として使用されている。近年、糖尿病性網膜症、腎症、神経症等の合併症に対する研究が進み、これらの合併症、特に網膜症は長い年月に亘る血糖のコントロールが大きな影響を及ぼすことが知られるようになり、⁷²⁻⁷⁴⁾1日1回の持続型インスリン製剤の注射でなく、より健常人に近い形で食事時に合わせたインスリンの補給がなされるようになって来た。⁷³⁻⁷⁵⁾その方法は、大きく分けて次の二つである。

- 1) Continuous (又は Controlled) Subcutaneous Insulin Infusion (C S I I) : あらかじめ日常生活のリズムに合わせてプログラムを組み、携帯用持続注入装置により、速効型インスリンを皮下に持続注入する。^{76, 77)}
- 2) Intensive therapy : 速効型、持続型インスリン製剤を組み合わせ、複数回注射する (multiple injectionとも呼ばれる)。⁷⁸⁾

しかしながら、これらの方法は、頻回の注射によりリポジストロフィーを来すのみでなく、精神的、肉体的苦痛を伴い、インスリンの非注射剤に対する要望は一層高まっている。

注射剤に代わる剤形については古くから多くの研究がなされており、それらは以下のようにまとめられる。

1) 坐剤

- i) ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO-60)、⁷⁹⁾ セトマクロゴール⁸⁰⁾ デオキシコール酸、⁸¹⁾ グリココール酸、⁸²⁾ 四級アンモニウム塩⁸³⁾ 等の界面活性剤や、5-メトキシサリチル酸等、⁸⁴⁻⁸⁷⁾ アミノ酸エナミン誘導体^{87, 88)} 等をそれぞれ吸収促進剤として配合する方法
- ii) エマルジョン、⁸⁹⁾ リポゾーム⁹⁰⁾ の形として投与する方法
- iii) 蛋白分解酵素阻害剤(アプロチニン)⁹¹⁾ との併用

2) 経鼻投与製剤

グリココール酸ナトリウム等の界面活性剤、⁹²⁻⁹⁵⁾ 中級脂肪酸ナトリウム⁹⁶⁾ と配合する方法

3) 舌下錠

ヒドロキシプロピルセルロース、カルボポール、グリココール酸ナトリウムを用いた粘膜接着型製剤⁹⁷⁾

4) 経口(小腸内)投与製剤

- i) ポリアミノスチレン樹脂に吸着させる方法⁹⁸⁾
- ii) グルコース、高級脂肪酸等を化学的に結合させたインスリン誘導体に導く方法⁹⁹⁻¹⁰¹⁾
- iii) セトマクロゴール、¹⁰²⁾ ポリオキシエチレンオレイルエーテル(Brij 98)、¹⁰³⁾ ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(Tween 80)¹⁰⁴⁾ 等の界面活性剤、5-メトキシサリチル酸、¹⁰⁵⁾ アミノ酸関連化合物 N α -naphthylacetyl-L-phenylalanine(A-42)^{106, 107)} 等を吸収促進剤として併用投与する方法
- iv) DFP、¹⁰⁸⁾ 大豆トリプシンインヒビター(Soybean Trypsin Inhibitor; SBTI)、^{108, 109)} アプロチニン¹¹⁰⁻¹¹²⁾ 等の蛋白分解酵素阻害剤を併用投与する方法
- v) エマルジョン、¹¹³⁻¹¹⁵⁾ ミセルあるいはリポゾーム¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾ の形で投与する方法

等が試みられている。

これらの方法のうち、経鼻吸収、舌下錠（口腔粘膜接着型）及び一部の坐剤、経口投与製剤についての試みで使用されている界面活性剤は、繊毛や粘膜表面を損傷することが知られており、^{94, 120, 121)} 長期間に亘り連用される薬としては適さない。又、リポゾーム等は製剤そのものの不安定性⁹⁵⁾から 現段階では製品化することができない。更に、膵臓から分泌されるインスリンの生理的ルートである門脈を通過させることができる点^{122, 123)}及び毎日複数回の適用を考慮すると、坐剤よりも経口投与製剤が優るものと考えられる。しかしながら、上に掲げた経口投与の試みも試験的段階にとどまり、効果¹²⁴⁾及び安全性の面で今だに実用の域に達するものはない。

このような状況から、筆者は連用される医薬品として、安全性が高く安定な腸溶性製剤として供給することを目標として研究を重ねた。

第一章 蛋白性医薬品の消化酵素による分解と酵素阻害剤によるその抑制

第一節 消化液によるインスリンの分解

食物として摂取された蛋白質は、胃液中の酸とペプシンにより変性、分解を受けた後、主として膵液中の消化酵素により加水分解を受ける。小腸内に投与されたインスリン等の蛋白質も同じ運命をたどるものと予想される。そこで、ラットの消化液を採取し、インスリン分解活性を指標にして、インスリンが主としてどの消化酵素により分解を受けるかについて検討した。

[実験結果]

1) ラットに対するインスリンの血糖降下作用

インスリン 0~2.5U/kgを1群3匹のラット腹腔内に投与し、2時間後の血糖値を測定し、投与前値との比から血糖降下率を算出した(Fig. 6)。0.31~2.5U/kgのインスリンの投与により、用量に依存した血糖降下作用が認められた。得られた、用量-反応曲線を、以下のインスリンの定量に用いた。

2) ラット膵液のインスリン分解活性

ラットを麻酔下開腹し、肝臓寄りの胆管上部にカニューレを挿入し、膵液を含まない胆汁を採取した。一方、別のラットを用い、十二指腸の胆管開口部にカニューレを挿入し、膵液を含む胆汁を採取した。得られた胆汁又はその希釈液0.5mlに2U/mlのインスリン溶液0.5mlを加え、37℃に30分インキュベート後、ラットの腹腔内に投与し、血糖降下作用から Fig. 6により反応液中に残存するインスリン量を求めた。膵液を含まない胆汁にはインスリン分解活性はみられなかった(<0.5U insulin/30min/0.5ml)。膵液を含む胆汁の場合は、500U insulin/30min/0.5mlと強い分解活性がみられた。この、膵液を含む胆汁につき、硫酸アンモニウム(硫安)を用いて分別沈澱法により分画し、透析後同様に各画分のインスリン分解活性を測定した。インスリン分解活性は、硫安30%飽和沈澱画分(30% precipitate と略す)には検出されず、その上清を60%飽和として沈澱した画分(30-60% precipitate)に、分画前の胆汁にほぼ等しい活性が認められた。なお、60%飽和上清(60% supernatant)中には活性は検出されなかった(Table 20)。

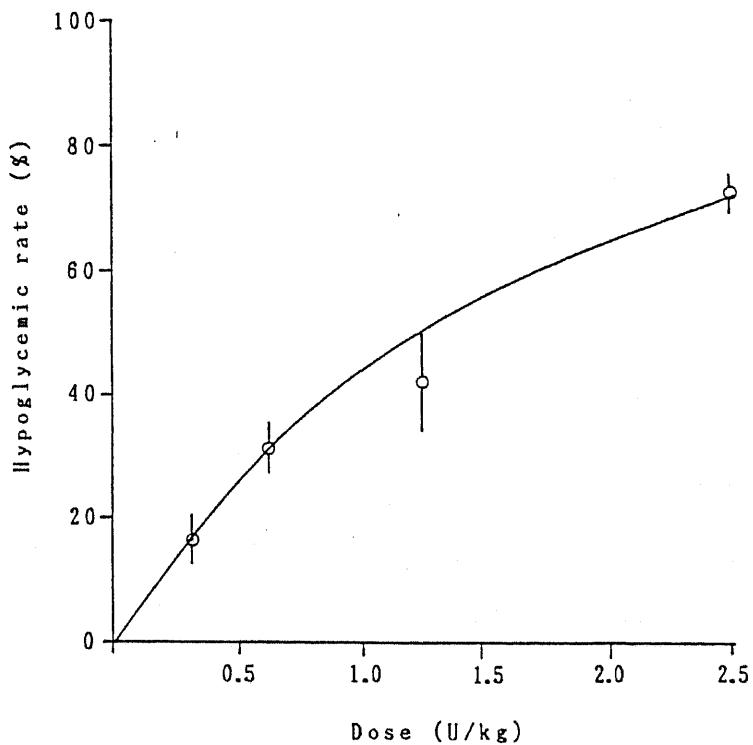


Fig. 6 Hypoglycemic effect of insulin

Blood glucose levels were determined 2hrs after intraperitoneal administration of insulin in rats. Each point represents $M \pm SE$ ($n=3$).

Table 20 Insulin degrading activities for the fractions obtained from bile containing pancreatic juice

Fraction	Activity(U insulin/30min/0.5ml)
30% precipitate	<0.5
30~60% precipitate	500
60% supernatant	<0.5

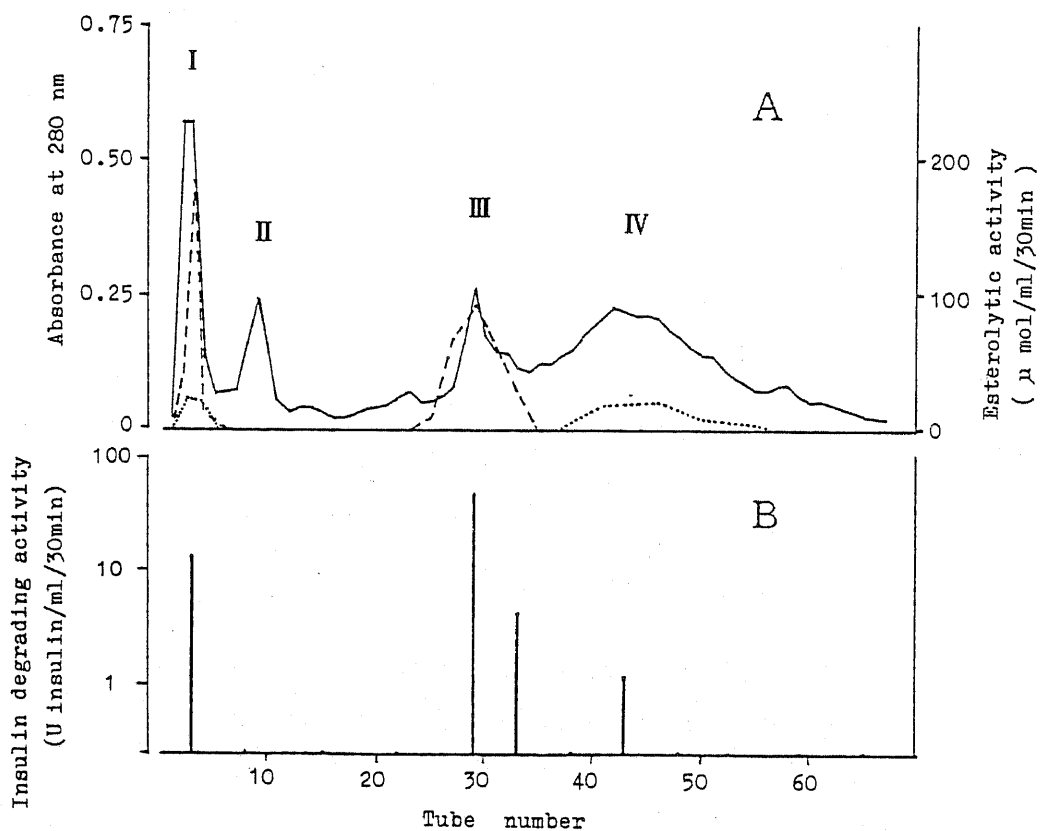


Fig. 7 Chromatography of rat bile containing pancreatic enzymes on DEAE Sephadex A-25

The enzymes fractionated by means of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were subjected to chromatography on DEAE Sephadex A-25 column (1.5X 40cm) in 0.01M phosphate buffer, pH 8.0.

(A) : Absorbance at 280nm and enzyme activities

— : Absorbance at 280nm

----- : ATEE hydrolytic activity

..... : TAME hydrolytic activity

(B) : Insulin degrading activity

次にこの画分をDEAEセファデックスによるイオン交換クロマトグラフィーに付した(Fig. 7)。分離後、各フラクションの280nmにおける吸光度(A_{280})及びATEE、TAMEを基質として酵素活性を測定した。 A_{280} のピークは非吸着のフラクション(ピークI)の他に3つ見出され、それぞれピークII、III、IVとした。ATEE分解活性は、ピークI及びIIIに見出され、いずれも 10^{-3} MのTPCKの添加によりほぼ100%阻害された。又、TAME分解活性は、ピークI及びIVに見出され、 10^{-3} Mの1-chloro-3-tosylamide-7-amino-2-heptanone(TLCK)の添加によりほぼ100%阻害された。一方、インスリン分解活性を測定したところ、最も強い活性はピークIII及びIに見出され、ピークIVにも弱い活性がみられたが、その他のフラクションに活性はみられなかった。

3) キモトリプシン及びトリプシンのインスリン分解活性

終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ のキモトリプシン 及びトリプシンと、それぞれ終濃度 1U/ml

Table 21 Degradation of insulin by chymotrypsin and trypsin

Enzyme	Hypoglycemic effect (%)	Degradation of insulin (U/30min)
Chymotrypsin	11 ± 6	0.9
Trypsin	46 ± 11	0.5

Each enzyme ($10 \mu\text{g/ml}$, final) was incubated with insulin (1U/ml) at 37°C for 30min. Each reaction mixture (2ml/kg) was then administered intraperitoneally to rats and blood glucose level was assayed 2hrs later to determine the residual amount of insulin. Hypoglycemic effect was represented $M \pm SE$ ($n=3$).

のインスリンを 37°C 30分反応させた後、ラットに腹腔内投与し、残存するインスリンの血糖降下作用 (Fig. 6) によりインスリン分解活性を求めた (Table 21)。キモトリプシンはトリプシンに比較し、より強い分解活性を示した。

【小括】

ラット膵管は胆管のほぼ中央部に開口しており、胆汁と混合された後十二指腸に分泌される。膵液の分泌量は少なく、胆汁を含まない膵液を採取することは難しく、胆汁との混液として採取せざるを得ない。一方、膵液を含まない胆汁は容易に得られたが、そこにはインスリン分解活性はみられず、膵液との混液に強い活性がみられたことから、膵酵素がインスリンを分解する可能性が示唆された。膵液を含む胆汁を硫酸により分画し、活性画分を D E A E セファデックスを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより分画した結果、基質分解活性及び特異的阻害剤²⁷⁾に対する作用から ピーク I はキモトリプシン及びトリプシンを含み、ピーク III はキモトリプシン、ピーク IV はトリプシンと推定された。

これらの結果は、セリンプロテアーゼ阻害剤 D F P を加えてラット膵液を D E A E セルロースにより分画した Marchis-Mourenら¹²⁵⁾の報告、及びウシ膵液を同様に分画した Kellerら¹²⁶⁾の報告とほぼ一致した。筆者は各フラクションのインスリン分解活性を測定することを主目的としたので、阻害剤を加えずに分画を行ったため、一部自己触媒的に活性化及び分解が進んだことも考えられ、やや定量性に問題は残るが、定性的には、インスリンは膵液中のキモトリプシン及びトリプシンにより分解されるものと考えられた。

Kellerら¹²⁶⁾はウシ膵液中のキモトリプシン (C)、トリプシン (T) の割合を詳細に検討し、C : T = 5.2 : 2.5 と報告し、Figarella¹²⁷⁾はヒト膵液について、C : T = 2.06 : 1 と報告している。今回、筆者の行った実験において、キモトリプシン及びトリプシンはいずれもインスリンを分解したが、キモトリプシンのインスリン分解活性はトリプシンの活性より強かった。インスリン 1 分子中には主としてトリプシン親和性のアミノ酸、A r g, L y s, H i s は 4 個、主としてキモトリプシン親和性のアミノ酸、T y r, P h e は 7 個含まれており、これらのことから総合的に、膵液によるインスリンの分解は、主としてキモトリプシンによるものと判断した。

第二節 インスリンの腸管吸収に及ぼす各種蛋白分解酵素阻害剤の影響^{1,2,8)}

小腸内に投与されたインスリンが粘膜から吸収され、門脈血中に現れるまでには多くの障害があるものと考えられる。その最初の障害は膵消化酵素による管腔内消化であり、続いて小腸粘膜絨毛に吸着された膵酵素、刷子縁膜プロテアーゼ、粘膜細胞中のライソゾームプロテアーゼ等が想定される。小腸内に分泌された膵酵素は単独で作用するだけでなく、それぞれの基質特異性に基づく部分水解を組み合わせることにより、迅速に、かつ、より細かくペプチド鎖の切断を進めて行くものと考えられる。先の実験結果より、インスリンはキモトリプシン及びトリプシンにより分解を受けることがわかったが、膵液による総合的な消化と、更にそれに続く小腸粘膜の各種蛋白分解酵素による分解について、*in vitro* 及び *in vivo*の検討を行った。

【実験結果】

1) 膵酵素によるインスリンの分解に対する蛋白分解酵素阻害剤の作用

膵消化酵素の標品としてブタパンクレアチンの溶液を用い、インスリンと37℃に30分インキュベートした場合の分解活性に対する、各種蛋白分解酵素阻害剤の抑制作用を検討した。パンクレアチンの溶液は濃度に依存したインスリン分解活性を示したが、蛋白濃度として1 mg/mlの溶液を加えることにより、用いたインスリンのほぼ90%の分解を示したので、以後この濃度の溶液を用いた。

この反応系に対し、キモトリプシン阻害剤キモスタチンは強い分解抑制作用を示し、終濃度 10^{-5} Mにおいてもなおインスリン分解抑制活性が認められた。同じキモトリプシン阻害剤 FK-448 (第一部における化合物 45) も 10^{-3} Mにおいて強い分解抑制を示したが、濃度を 10^{-5} Mとした場合は、ややインスリンの分解が認められた。キモトリプシン、トリプシン両者の阻害剤であるアプロチニンには弱い作用がみられたが、その他の阻害剤には分解抑制作用はほとんどみられなかった (Table 22)。

Table 22 Inhibitory effects of protease inhibitors against degradation of insulin by porcine pancreatin solution or intestinal homogenate of rats

Inhibitor	Concentration (M)	Inhibition rate (%) against degradation by	
		Pancreatin	Homogenate
Leupeptin	10^{-3}	9	23
Elastatinal	10^{-3}	2	19
Pepstatin	10^{-3}	21	53
Aprotinin	12500KIE/ml	27	24
N-Ethylmaleimide	5×10^{-3}	0	79
FOY-305	10^{-3}	0	0
Chymostatin	10^{-3}	100	90
	10^{-4}	100	78
	10^{-5}	100	52
FK-448	10^{-3}	98	81
	10^{-4}	74	77
	10^{-5}	64	31

Insulin was incubated in pancreatin solution or intestinal homogenate of rats with or without the inhibitor at 37°C for 30 min.

Reaction mixtures were then administered intraperitoneally to rats.

The residual amount of insulin was calculated from the blood glucose level determined 2hrs after administration.

2) 小腸ホモジネートによるインスリンの分解に対する蛋白分解酵素阻害剤の作用

ラット小腸のホモジネートにインスリンを加え、37℃に 30分反応させた。ホモジネートは添加量に依存してインスリンを分解したが、蛋白濃度として20mg/mlの溶液を加えることにより、用いたインスリンのほぼ 90%の分解がみられたので、以後この濃度の溶液を用いた。

キモスタチン及び FK-448は濃度に依存して強い分解抑制作用を示した。又、システインプロテアーゼ阻害剤 N-エチルマレイミド^{129, 130)}にも強い作用がみられた他、ペプシン、カテプシンD等の阻害剤ペプスタチン^{131, 132)}もインスリンの分解を抑制した(Table 22)。

3) 十二指腸内投与実験

250U/kgのインスリンを、麻酔開腹下のラット十二指腸に投与したが、投与前値に比較し、1、3時間後の血糖値に低下はみられなかった。同量のインスリンにキモスタチン 20mg/kgを混合し投与した場合の血糖値は、投与1、3時間後にそれぞれ投与前値の 44%、80%となり強い血糖降下作用が認められた。FK-448 (20mg/kg)を用いた場合にもこれとほぼ同じ効果が得られた。トリプシン及びその他の酵素に対する阻害剤を併用した場合には、いずれも作用は認められなかった(Table 23)。

【小括】

第一節に示した如く、ラット腹腔内にインスリンを投与した場合、0.31U/kgより用量に依存した血糖降下作用が認められた(Fig. 6)が、今回、その約1,000倍に相当する 250U/kgのインスリンを単独で十二指腸内に投与したが、血糖降下作用は認められなかった。先にも述べたように、小腸内に投与されたインスリンが門脈血流中へ吸収される過程には、種々の障害が存在することが窺われた。その最初の障害と思われる膵酵素によるインスリンの分解に対する、in vitroの実験においては、キモトリプシン阻害剤のみ分解抑制作用を示した。この結果は前節において得られた結論、即ち、消化酵素によるインスリンの分解は、主としてキモトリプシンによるものであろうとの予測を裏づけると同時に、インスリンの腸管腔内における分解は、キモトリプシン阻害剤の併用により防げるものと推定できた。

Table 23 Percent changes of blood glucose levels after intraduodenal administration of insulin to rats with or without the inhibitor

Group	Change of blood glucose level(%)		
	Pre	1hr	3hrs
Control (Saline)	100	104± 5	107± 4
Insulin (250U/kg)	100	102± 6	101±12
+Leupeptin ¹³²⁾ (20mg/kg)	100	100± 8	106± 6
+Elastatinal ¹³²⁾ (20mg/kg)	100	106±12	112± 9
+Pepstatin ¹³²⁾ (20mg/kg)	100	110±12	109±13
+Bestatin ¹³²⁾ (20mg/kg)	100	108±14	109±10
+E-64 ¹³³⁾ (20mg/kg)	100	104± 6	104±15
+N-Ethylmaleimide (20mg/kg)	100	100±12	104±10
+FOY-305 (20mg/kg)	100	101± 8	102±11
+Chymostatin (20mg/kg)	100	44± 4	80±14
+FK-448 (20mg/kg)	100	48± 7	80±14

The numeral represents M ± SE (n=4).

一方、小腸ホモジネートによるインスリンの分解に対してもキモトリプシン阻害剤は強い分解抑制作用を示した。ホモジネート中には粘膜に吸着された、胆汁由来のキモトリプシンの他に Katunumaら¹¹⁾の発見した粘膜中のキモトリプシン様酵素も存在するものと考えられるが、キモスタチンはこれらのいずれに対しても阻害作用を示すことが知られている。又、N-エチルマレイミド、ペプスタチンにも作用がみられていることから、粘膜中のシステインプロテアーゼや、カテプシンD等のライソゾームプロテアーゼも関与している可能性も考えられた。このように in vitroの実験結果から インスリンの分解に多くの酵素の関与して

いることが予想されたが、膵液は絶えず分泌されていること等の理由により、量的関係については示唆は与えられない。

インスリンと各種蛋白分解酵素阻害剤を、ラット十二指腸内に併用投与した場合、キモトリプシン阻害剤のみがインスリンの吸収増強作用を示したことは、上記の *in vitro* の成績と一致するものであり、膵キモトリプシン又は、キモトリプシン様酵素の寄与が最も大きいことを意味するとも考えられるが、同時に、キモトリプシン阻害剤非存在下には、他の粘膜中の酵素¹³⁴⁾にインスリンが到達する以前にキモトリプシンにより分解を受ける可能性もあると考えられた。

第三節 合成キモトリプシン阻害剤によるインスリンの消化管吸収増強作用

前節における *in vitro*、*in vivo*の実験結果から、インスリンの投与方法としてキモトリプシン阻害剤の併用による小腸内投与の可能性が示唆された。本節においては、ラット及びウサギ十二指腸内に、インスリンを合成キモトリプシン阻害剤とともに投与し、その作用について確認した。

【実験結果】

1) ラット十二指腸内投与実験

麻酔、開腹下のラット十二指腸に、インスリン 500U/kgを投与したが血糖降下作用は認められなかった。インスリン 31.3~500U/kgを FK-448 20mg/kgとともに投与したところ 62.5U/kgから投与量に依存した血糖値の低下が認められた。血糖値は投与1時間後に最低値となる例が多かったが高用量のインスリンを投与した場合には回復に数時間を要した。なお FK-448単独を投与した場合には、血糖値に変化は認められなかった(Fig. 8)。

2) ウサギ十二指腸内投与実験

あらかじめ十二指腸に留置カテーテルを施した、¹³⁵J無麻酔、無拘束状態のウサギに、インスリン 25U/kgを投与したが血糖値に変化はみられなかった。同用量のインスリンに、FK-316(第一部における化合物 75) 10mg/kgを併用投与した場合には、投与30分後に、前値に比較して32%の血糖降下がみられた。なお、FK-316 10mg/kgの投与によっては血糖値に変化はみられなかった(Fig. 9)。

【小括】

ラット及びウサギを用いキモトリプシン阻害剤の、*in vivo*のインスリン吸収増強効果について検討した。ラット十二指腸内投与実験においてFK-448はインスリンの用量に依存した血糖降下作用をもたらした。FK-448に血糖降下作用は認められなかったことから、併用投与により消化管内酵素によるインスリンの分解を抑制し、その結果、吸収率を高めたものと推察された。

ラットを用いた実験においては、動物を麻酔下開腹し投与を行った。しかしながら、麻酔により、消化液の分泌、腸管の蠕動運動等は影響を受け、又、手術の侵襲により、血糖値に変化をもたらすことも考えられた。ウサギを用いた実

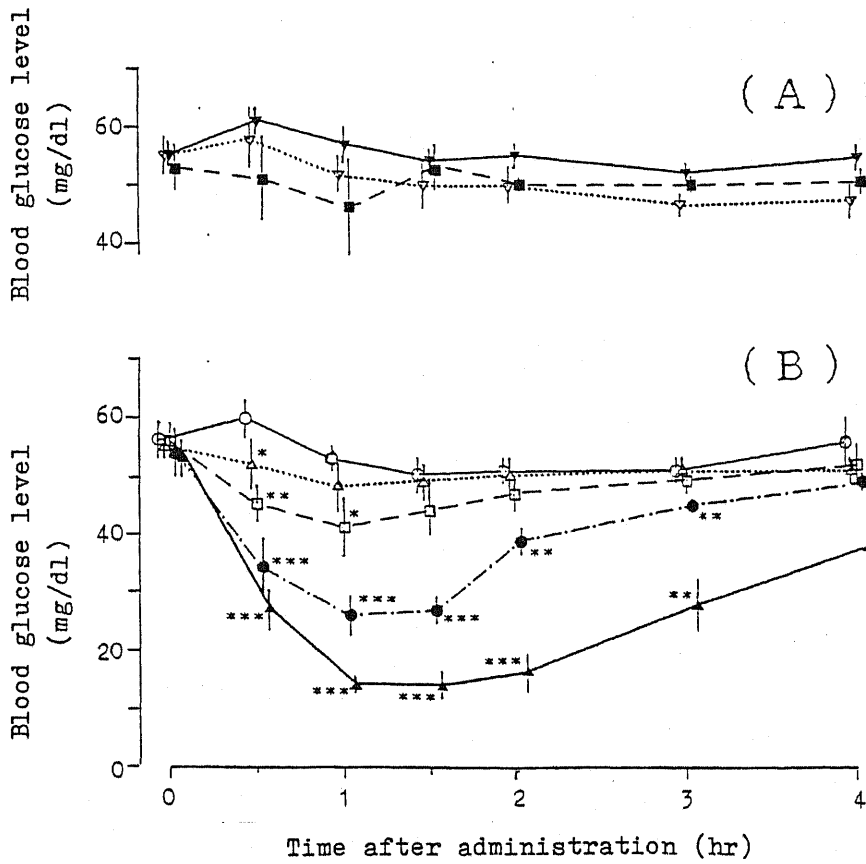


Fig. 8 Blood glucose levels after intraduodenal administration of various doses of insulin and 40mg/kg FK-448 to rats

(A)

▼——▼ : Saline control, ▽·····▽ : FK-448 without insulin, ■-----■ : insulin 500U/kg without FK-448.

(B)

○——○ : Insulin 31.3U/kg + FK-448, △·····△ : insulin 62.5U/kg + FK-448, □-----□ : insulin 125U/kg + FK-448, ●-----● : insulin 250U/kg + FK-448, ▲——▲ : insulin 500U/kg + FK-448. Each point represents M ± SE (n=6).

* : P < 0.05, ** : P < 0.01, *** : P < 0.001.

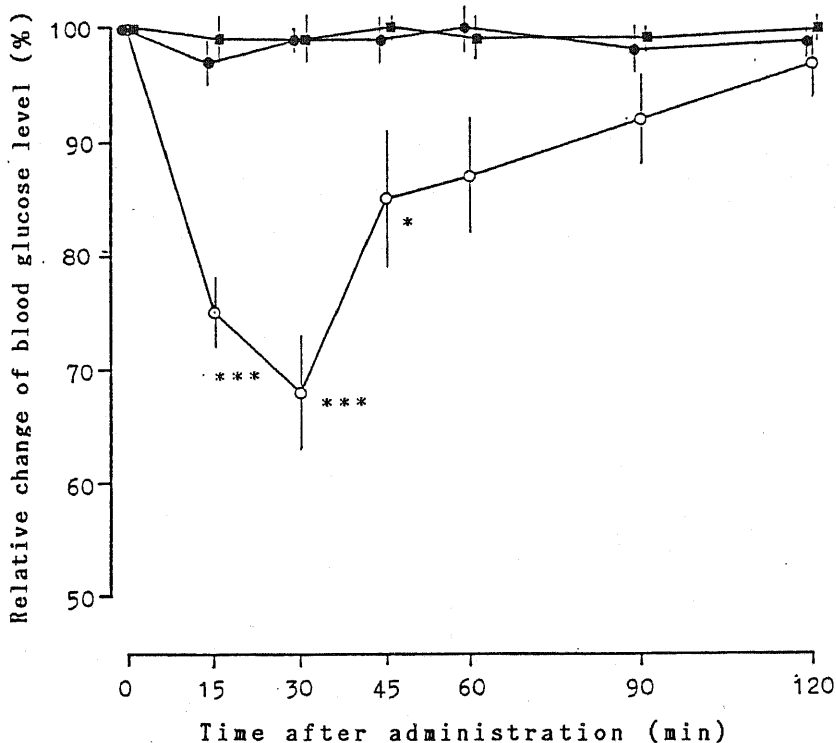


Fig. 9 Relative changes of blood glucose levels after intraduodenal administration of 25U/kg insulin with or without 10mg FK-316 via a catheter to rabbits.

●—●: Insulin 25U/kg, ■—■: FK-316 10mg/kg,
○—○: insulin 25U/kg + FK-316 10mg/kg.

Each point represents $M \pm SE$ ($n=5$). *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, compared with the group administered only insulin.

験においては、無麻酔、無拘束状態の動物により効果を観察することができ、上述のような影響を除外することができる点で優れているものと考えられた。このような実験系においても FK-316はインスリンの吸収増強作用を示し、先のラットにおける FK-448の結果と合わせ、合成キモトリプシン阻害剤の併用によりインスリンの腸管からの吸収が確認された。

第四節 キモトリプシン阻害剤によるリゾチームの消化管吸収増強作用

1922年 Flemingによって最初に発見されたリゾチームは、卵白を始めとして動物の体液、植物、細菌等自然界に広く分布している muramidaseの一種である。細菌等の細胞壁の N-acetylmuramic acidと N-acetylglucosamineの結合を加水分解することにより溶菌作用を示す。¹³⁶⁾ 分子量 約14,300の塩基性蛋白質である卵白由来の酵素は最もよく研究されており、一次構造から高次構造まで明らかにされている。¹³⁶⁾ 臨床には主にこの酵素が用いられており、抗菌作用、抗炎症作用、膿液分解作用を有することが知られている。筋肉内注射によっても用いられるが、アナフィラキシーを避ける意味で経口的に投与されることが多い。しかしながらその吸収率は高いものではない。そこで、先に述べたインスリンの消化管吸収の例にならい、膵酵素等に対する安定性と、キモトリプシン阻害剤併用による消化管吸収の増強について検討した。

【実験結果】

1) リゾチームの定量

ウサギを免疫して得た抗リゾチーム血清を含む、免疫拡散板(プレート)を用いて Single radial immunodiffusion法¹³⁷⁾によりリゾチームの定量を行った。高、低2種類の濃度(それぞれ 3.0, 0.75%)の抗血清を含む免疫拡散板に、リゾチーム1.5~100 $\mu\text{g/ml}$ の標準液を添加し、24時間後の沈降リングの直径を測定した。沈降リングの直径は、高濃度の抗血清を含むプレートの場合には 12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ 、低濃度の抗血清を含むプレートの場合には 3.1~25 $\mu\text{g/ml}$ のリゾチーム濃度に比例した。Fig. 10には高濃度抗血清を含むプレートを用いた場合の検量線を示す。なお、低濃度の抗血清を含むプレートを用いた場合の検出限界は 3.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2) 膵酵素及び小腸ホモジネートによるリゾチームの分解に対する酵素阻害剤の作用

a) 膵酵素による分解に対する作用

反応系における終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ のリゾチームに、膵液を含むラット胆汁を加え 37℃に 30分反応させたところ、リゾチーム濃度は反応前の58%に低下した。この反応系に、キモトリプシン阻害剤 FK-316 10^{-3}M を添加した場合にはリゾチ

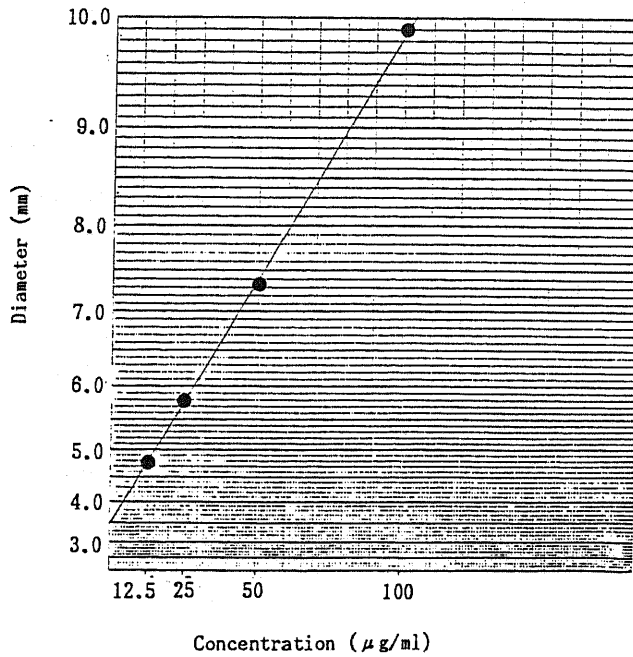


Fig. 10 Standard curve of lysozyme

Lysozyme solutions (12.5~100 $\mu\text{g/ml}$) were applied on a immunodiffusion plate.

The diameters of precipitation rings were measured 24hrs later.

ーム濃度に低下はみられず、分解は 100%抑制された。トリプシン阻害剤 FOY-305を添加した場合にはやや分解がみられ、抑制率は 55%であった(Table 24)。

b) 小腸ホモジネートによる分解に対する作用

上記と同様に、小腸ホモジネートによるリゾチームの分解に対する、両阻害剤の抑制効果を検討した。リゾチーム溶液に小腸ホモジネートを加え、37℃、30分インキュベートしたところ、反応液中のリゾチーム濃度は反応前の 45%に低

Table 24 Inhibitory effects of FK-316 and FOY-305 on the degradation of lysozyme by bile and intestinal homogenate of rats

Lysozyme solution (200 μ g/ml)	Enzyme solution	Inhibitor(10^{-2} M)		Saline	Lysozyme concentration after incubation (μ g/ml)	Percentage of inhibition (%)
		FK-316	FOY-305			
250 μ l	—	—	—	250 μ l	100	100
	Bile					
250 μ l	100 μ l	—	—	150 μ l	58	0
250 μ l	100 μ l	50 μ l	—	100 μ l	105	100
250 μ l	100 μ l	—	50 μ l	100 μ l	81	55
250 μ l	100 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	106	100
	Homogenate					
250 μ l	100 μ l	—	—	150 μ l	45	0
250 μ l	100 μ l	50 μ l	—	100 μ l	94	89
250 μ l	100 μ l	—	50 μ l	100 μ l	100	100
250 μ l	100 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	98	96

Lysozyme concentration was determined after an incubation of respective reaction mixture for 30min at 37°C, by a method of single radial immunodiffusion.

下した。この反応系に、 10^{-3} MのFK-316を添加したところ、リゾチームの分解は89%抑制された。FOY-305を添加した場合には、リゾチームの濃度に低下はみられなかった(Table 24)。

3) 十二指腸内投与実験

あらかじめ十二指腸に留置カテーテルを施したウサギに、無麻酔、無拘束下、リゾチーム 100mg/kgを、カテーテルを通じ投与したが、血漿中にリゾチームは検出されなかった。同じ用量のリゾチームにFK-316 100mg/kgを併用投与したところ、血漿中のリゾチーム濃度は投与15分後にピークとなり、その時の値は15 μ g/mlであった(Fig. 11)。

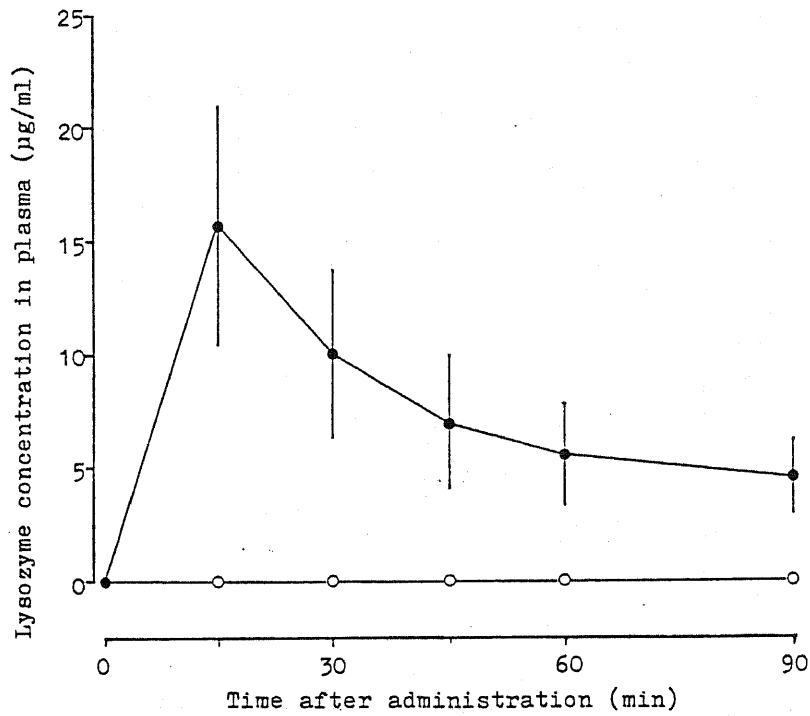


Fig. 11 Absorption of lysozyme administered intraduodenally with or without FK-316 to rabbits

○—○ : Lysozyme 100mg/kg
 ●—● : Lysozyme 100mg/kg with FK-316 100mg/kg
 Each point represents $M \pm SE$ (n=4).

【小括】

リゾチームは *Micrococcus lysodeikticus* に特に強い溶菌作用を示すことから命名されたいきさつがあり、今日でもこの菌体を基質として活性を測定されることが多い。¹³⁸⁾ しかしながら、血漿中には白血球等に由来する酵素が存在するため、体外から投与した酵素の血中濃度の測定には適当でない。そこで、血清

リゾチームとは抗原性が異なる卵白製リゾチームを用い、その定量は抗原抗体反応を利用した single radial immunodiffusion法¹³⁷⁾により行った。

免疫拡散板による沈降反応は室温で24時間行うため、*in vitro*の、酵素による分解に対する阻害活性の検討においては、その間に進行するリゾチームの分解も加わることになる。しかし、リゾチームは熱に対する安定性が高く、100℃、3分の加熱に耐えることが知られている¹³⁹⁾ので加熱処理により添加した酵素を失活させた後、免疫拡散板による定量を行った。

リゾチームと唾液を反応させた*in vitro*の実験において、キモトリプシン阻害剤 FK-316はリゾチームの分解に対し 100%の抑制を示した。トリプシン阻害剤 FOY-305もある程度分解抑制作用を示したが、キモトリプシン阻害剤に比較するとその作用は弱いものであった。一方、小腸ホモジネートによる分解に対しては、両者とも分解抑制作用を示した。このような *in vitro*の成績をふまえ、ウサギ十二指腸に FK-316とリゾチームを併用投与したところ、FK-316は リゾチームの吸収を増強した。

第五節 キモトリプシン阻害剤によるストレプトキナーゼの消化管吸収増強作用

ストレプトキナーゼは 1933年Tillettらにより溶連菌から見出された、分子量約 45,000の蛋白質である。そのものに直接的な酵素活性はないが、ヒト、ネコ等の血中のプラスミノゲンと、ペプチドの切断を伴わずに、容易に複合体を形成し、プラスミン様活性及びプラスミノゲンアクティベータ活性を示す。¹⁴⁰⁾

¹⁴¹⁾ 欧州では静脈内投与が認められているが、日本では、異種蛋白質としての抗原性を重視して、現在注射用製剤は認められていない。近年、プラスミノゲン-ストレプトキナーゼ複合体の低抗原性、持続性が注目され、多くの研究が続けられている。そこで注射に比較してアレルギー反応の弱いとされている経口投与について、先のインスリン等に準じ、キモトリプシン阻害剤併用による消化管吸収を検討した。

【実験結果】

1) ストレプトキナーゼのキモトリプシンによる分解に対するFK-316の抑制作用

実験に先立ち、反応に用いるストレプトキナーゼの濃度と、プラスミノゲン添加後の Boc-Val-Leu-Lys-MCA水解活性¹⁴²⁾について検討したところ、過剰のプラスミノゲン存在下、終濃度 20~200U/mlの範囲でストレプトキナーゼは濃度に比例したAMCを生成した。

次にストレプトキナーゼに対する、キモトリプシンの分解作用について検討した。200U/mlのストレプトキナーゼに対し 2ng/mlのキモトリプシンを添加し、37°Cに反応させたところ、ほぼ 100%の分解がみられたので、以後この濃度のキモトリプシンを用いた。

以上の予備実験から設定した反応系に、終濃度 10^{-3} ~ 10^{-5} Mの FK-316を添加し分解抑制作用を検討したところ、FK-316に濃度に依存した分解抑制作用がみられ 10^{-5} Mにおいて 約50%の抑制率を示した(Table 25)。

2) ネコ十二指腸内投与実験

麻酔開腹下のネコ 十二指腸内に、ストレプトキナーゼ 10,000U/kgを投与したが、血漿中にプラスミン様 Boc-Val-Leu-Lys-MCA水解活性の上昇は認められなかった(Fig. 12)。次に、同用量のストレプトキナーゼに FK-316 50mg/kgを併用投与したところ、血中のプラスミン様活性は、投与 15分後に、投与前に比較し

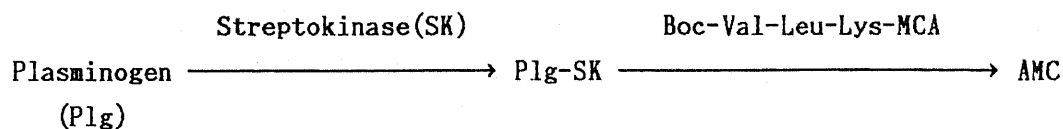
Table 25 Inhibitory effect of FK-316 on the degradation of streptokinase by chymotrypsin

Concentration of FK-316 (M)	Inhibition rate (%)
1×10^{-3}	100.0
1×10^{-4}	73.4
1×10^{-5}	48.0
1×10^{-6}	35.5
0	0

32nmol AMC/ml/hr上昇し、ストレプトキナーゼが吸収されたことが確認された。

【小括】

ストレプトキナーゼは単独の蛋白質としては酵素活性を示さず、その活性について検討する場合、プラスミノゲン複合体としてのプラスミン様活性に基づいた方法によらざるを得ない(Scheme 1)。プラスミンは、トリプシン系の酵素に属し、トリプシン阻害剤の多くのものでその活性を阻害する。又、トリプシンはプラスミノゲン活性化作用を有する。従って膵液、小腸ホモジネートによる分解に対する酵素阻害剤の作用を検討することはできなかった。又、トリプシン阻害剤の併用による吸収増強効果についても、吸収後のプラスミン様活性に対する阻害作用も考えられ、正確な評価が出来ない。そこで in vitroにおける、キ



Scheme 1

モトリプシンによるストレプトキナーゼの分解に対する、キモトリプシン阻害剤の作用を検討したところ、FK-316に分解抑制作用がみられた。先のインスリン及びリゾチームの例にならい、ネコ十二指腸にFK-316とストレプトキナーゼを併用投与したところ、血漿中にプラスミン様活性の上昇が認められ、FK-316にストレプトキナーゼの吸収増強作用が確認された。この結果は、先のインスリンの場合にみられたキモトリプシン阻害剤の、消化管吸収増強作用がインスリン以外の蛋白質全般についても応用され得ることを示唆するものと考えられた。

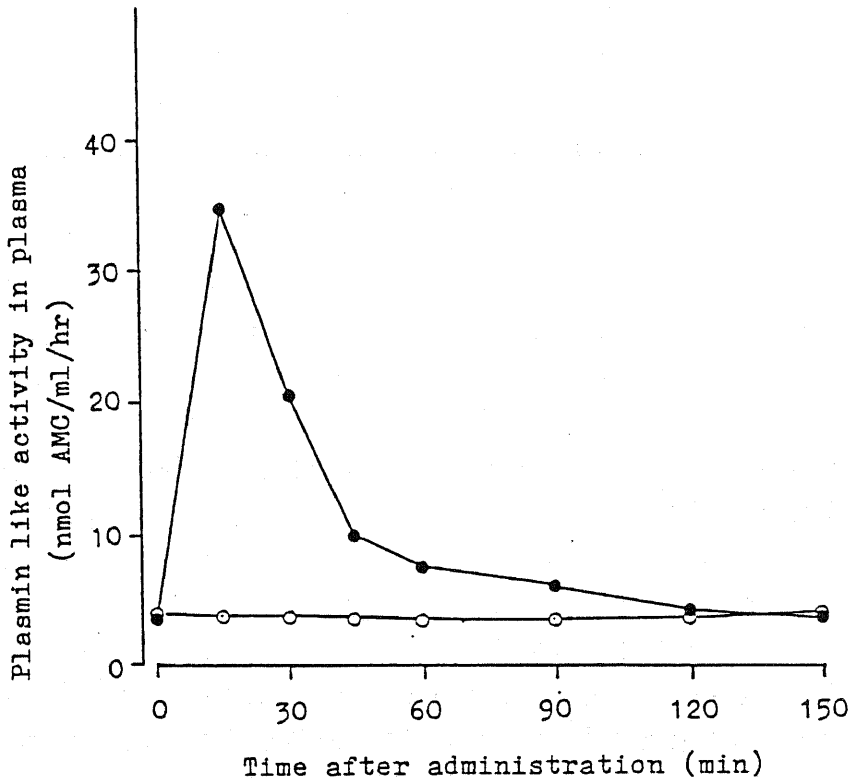


Fig. 12 Absorption of streptokinase administered intraduodenally with or without FK-316 to a cat.

○—○: Streptokinase 10,000U/kg
 ●—●: Streptokinase 10,000U/kg + FK-316 50mg/kg
 Enzyme activity was assayed using Boc-Val-Leu-lys-MCA as a substrate.

第一章 実験の部

1) 実験材料

a) 第一部において用いた試薬の他、Insulin (bovine, crystalline, 24.6U/mg)は Armour社、lysozyme (egg white), pancreatin (porcine), N-ethylmaleimide (NEM), Glucose B Test[®], zink sulfate, barium hydroxide, ammonium sulfate, sodium azide, urethane (ethyl carbamate)は和光純薬工業(株)、leupeptin, elastatinal, pepstatin, bestatin, E-64, Boc-Val-Leu-Lys-MCA (VLK-MCA)は 蛋白質研究奨励会、1-chloro-3-tosylamide-7-amino-2-heptanone (TLCK)は Sigma社、aprotinin (Trasylol[®])は Bayer社、pentobarbital sodium (Somnopentyl[®])は Pitman Moore社、Freund's complete adjuvantは (株)ヤトロン、agaroseは 半井化学(株)、注射用ヘパリン(1,000U/ml)は 清水製薬(株)、DEAE-Sephadex[®] A-25は Pharmacia社の製品を使用した。

b) Streptokinase (Validase[®])は日本レダリー社の製品を購入し、DEAE-Sephadex A-25により精製した。

Human plasminogenはヒト血清から、リジンセファロースを用いて精製した。

c) Wistar系雄性ラットは(株)日本医科学動物資材研究所及び北山ラベス(株)、日本白色在来種雄性家兎は(株)クリーン実験動物、雑種雄性ネコは(株)武田化製場よりそれぞれ購入し使用した。

2) 実験方法

a) 消化液の採取

体重 約200 gのラットをウレタン麻酔下開腹し、十二指腸から胆管開口部にカニューレを挿入し結紮、固定した。分泌された膵液を含む胆汁を、氷冷した試験管に3時間採取した。膵液を含まない胆汁を得る場合は、胆管の、肝臓側起始部にカニューレを挿入した。

b) 消化液中のインスリン分解活性物質の分離

胆汁 10mlに、冷却しつつ硫酸アンモニウム(硫安)の結晶を加え、30%飽

和沈澱、60%飽和沈澱、及びその上清の3フラクションに分画した。それぞれの沈澱は、pH 8.0, 0.01MのトリスHCl緩衝液10mlに溶解し、3画分とも同緩衝液に対し透析した。インスリン分解活性を測定した後、60%飽和沈澱画分を、DEAEセファデックス A-25を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより分画した。即ち、蛋白質として約10mgをpH 8.0, 0.01 M 磷酸塩緩衝液で平衡化したDEAEセファデックス A-25カラム(1.5cmφ×40cm)に添加し、0.01~0.4Mの同緩衝液の濃度勾配により溶出した。各フラクションは280nmにおける吸光度(A_{280})、ATEEを基質とした場合のキモトリプシン様酵素活性、TAMEを基質とした場合のトリプシン様酵素活性及び次に述べる方法によりインスリン分解活性をそれぞれ測定した。

c) インスリン分解活性の測定

1群3匹のラットの尾先端を切断し、血液 約0.1mlを採取した後、インスリン 0.31~2.5U/kgを腹腔内に投与した。2時間後に同様に採血し、血糖値を測定した。血糖降下の用量-反応曲線 (Fig. 6)を次のインスリンの定量に用いた。

胆汁及びその分画後のフラクション又はその希釈液、あるいは、標準のキモトリプシン、トリプシン溶液 0.5~1mlに、等容量の2U/mlのインスリン溶液を加え、37°Cで30分加温した後直ちに氷冷し被検液とした。被検液 2ml/kg体重を1群3匹のラット腹腔内に投与し、2時間後の血糖降下率から Fig. 6により反応液中の残存インスリン量を求め、30分間に分解されたインスリンの量を概算した。

d) 血糖値の測定

1mlの精製水を入れた試験管に、採取した全血 50 μ lを加え溶血させた。1.8%水酸化バリウム溶液 0.5mlを加え混和し、次いで2.0%硫酸亜鉛溶液 0.5mlを加え混和し、除蛋白した。15分室温に放置し、3,000rpm 15分遠心分離し、その上清1mlを別の試験管に移し、グルコースオキシダーゼ法に基づくグルコースBテスト・キットの試液3mlを加え、37°Cで15分反応させた。505nmにおける吸光度(A_{505})により比色定量した。

e) パンクレアチン溶液の調製

パンクレアチン 10gに生理食塩液 100mlを加え1時間攪拌し、10,000rpmで30分遠心分離した。その上清につき、Folin-Lowry法⁶³⁾による蛋白定量を行った後、膵消化酵素液としてインスリンの分解作用の検討に用いた。

f) 小腸ホモジネートの調製

一夜絶食させたラットを断頭放血後、十二指腸から回腸までの小腸を摘出して、生理食塩液により軽く洗い内容物を除去した。ハサミで細断後生理食塩液を加え、ホモジナイザー(Kinematica社製 Polytron[®])を用い20%ホモジネートを調製した。105,000×gで1時間遠心分離を行い、その上清につき、Folin-Lowry法による蛋白定量を行った後、小腸粘膜ホモジネートとしてインスリン分解作用の検討に用いた。

g) インスリン分解抑制作用の検討

2U/mlのインスリン溶液1mlに、パンクレアチン溶液又は小腸ホモジネート0.5ml及び各種濃度の蛋白分解酵素阻害剤溶液0.5mlを加え、37℃で30分加温した。反応後直ちに氷冷し、c)と同様に血糖降下作用により、残存するインスリン量を求め、各阻害剤の分解抑制率を計算した。

h) ラット十二指腸内投与実験

ラットの尾先端を切断し、血液約0.1mlを採取した後、ペントバルビタールによる麻醉下、腹部を正中線に沿って約2cm切開し十二指腸を露出させた。幽門より1~2cm下位の十二指腸内に、注射針を介し、薬液1~2ml/kgを投与した。経時的に尾先端から、約0.1mlの血液を採取し、血糖値を測定した。なお、インスリンは0.01NのHClにより溶解し、蛋白分解酵素阻害剤溶液と用時等量に混和した。

i) ウサギ十二指腸内投与実験

投与実験に先立ち、Shichiriら¹³⁵⁾の方法に準じてウサギ十二指腸に留置カテーテルを施した。即ち、体重約3kgのウサギを麻醉下開腹し、胃体部より十二指腸へビニール細管を15cm挿入した。胃外壁にそのビニール細管を結紮、固定した後、ビニール細管の他端を、皮下をくぐらせ頸部に約5cm露出させ結紮、固定した。カテーテル内に水を満たした後、熱により融

封した。

投与実験には、上述の方法により、あらかじめ十二指腸に留置カテーテルを施した、無麻酔・無拘束状態のウサギ1群5羽を用いた。耳介辺縁静脈にメスにより小さな創傷を作り、血液 約0.1mlを採取した。カテーテルの融封部を切断し、カテーテルを介し、インスリン 25U/kg及び酵素阻害剤 10 mg/kg 等を含む薬液 2 ml/kgを投与した。投与後創傷部より経時的に血液約 0.1mlを採取し、上述の方法により血糖値を測定した。

第四節に述べたリゾチームの投与実験の場合も、リゾチーム100mg/kgを単独又は FK-316 100mg/kgと混合し、同様にカテーテルを通じ投与した。投与前及び投与後経時的に、ヘパリン処理した注射筒により血液 約0.5mlを採取し、得られた血漿につき、以下に述べる方法によりリゾチーム濃度を測定した。

j) リゾチームの分解に対する阻害剤の分解抑制作用の検討

200 μ g/mlのリゾチーム溶液 250 μ lに、10倍希釈した胆汁又は小腸ホモジネート 100 μ l、 10^{-2} Mの阻害剤溶液 50 μ l及び生理食塩液を加え 500 μ lとした後、37°Cに 30分加温した。沸騰水浴中1分加熱した後、次に記載する方法により反応液中に残存するリゾチームの濃度を測定した。

k) Single radial immunodiffusion法¹³⁷⁾によるリゾチーム濃度の測定法

測定に先立ち、あらかじめ次の方法によりウサギを免疫し、抗リゾチーム抗血清を作成した。Freundの complete adjuvant 1 mlに 1 mg/mlのリゾチーム溶液 1 mlを加え、乳液を作成した。2羽のウサギの足蹠数ヶ所に計 1 ml/bodyの割合で乳液を皮下投与した。2週後同じ乳液により足蹠又は腹部皮下に追加免疫を行い、10日後に採血した。血液は室温に 30分放置した後遠心分離し、得られた血清を 60°C 30分加熱処理し、抗血清としてリゾチームの測定に利用した。

アガロース 1.5g、窒化ナトリウム 0.1g、4% Tween 80溶液 0.6mlに、pH 7.2、0.15Mペロナル緩衝液を加え加熱溶解した後 50°Cに保ち、上記により得た抗リゾチーム抗血清 3ml又は 0.75mlを加え、同緩衝液により全量を 100mlとした。プラスチックシャーレに厚さ 1 mmとなるように流し、冷却、固化させ、免疫拡散板を調製した。直径3.5mmの穴をくり抜き湿潤箱中に保

存した。 リゾチーム 3.125~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準液又は被検液5 μl を、くり抜いた穴に添加し、湿潤箱中室温に一夜放置した後、沈降リングの直径を測定した。 標準液により作成した検量線から被検液中のリゾチーム濃度を求めた。

l) キモトリプシンによるストレプトキナーゼの分解に対する抑制作用の検討

1,000U/mlのストレプトキナーゼ溶液 0.1mlに、pH 8.0、0.1MトリスHCl緩衝液0.2ml、10ng/mlのキモトリプシン溶液 0.1ml及び 5×10^{-3} ~ 5×10^{-6} MのFK-316溶液 0.1mlを加え、37°Cに30分反応した。 0.1mg/mlのヒトプラスミノゲン溶液 0.1mlを加え、37°Cに5分加温してストレプトキナーゼをプラスミノゲン複合体に導き、Boc-Val-Leu-lys-MCA(VLK-MCA)のDMSO溶液 5 μl (終濃度 0.1mM)を加え 37°C 10分反応させ、生成した 7-amino-methylcoumalin (AMC)を蛍光光度計により、励起波長 380nm、蛍光波長 440 nmで測定した。¹⁴²⁾

ストレプトキナーゼのキモトリプシンによる分解に対するFK-316の抑制作用は、キモトリプシンを加えない場合のプラスミン様活性を100%、キモトリプシンを加えFK-316を加えない場合の活性を0%とした相対的な値として算出した。

m) ネコ十二指腸内投与実験

ペントバルビタール麻酔下開腹したネコの股動脈に、採血用カニューレを挿入し、生理食塩液により10倍稀釈した注射用ヘパリン溶液を、その中に満たした。 10,000U/kgのストレプトキナーゼ及び50mg/kgのFK-316を、注射針を介し十二指腸に投与した。 投与前及び投与後、ヘパリン処理した注射筒により経時的に血液約0.5mlを採取し、3,000rpm 15分遠心分離後血漿を得た。 血漿 0.1mlにpH 8.0、0.1MのトリスHCl緩衝液 0.4ml及びVLK-MCA 5 μl を加え 37°Cに10分間反応させ、生成したAMCを上述の方法により蛍光光度計を用いて測定した。

n) 統計計算

薬物投与群と対照群の値は、平均値±標準誤差で示し、Studentのt-testにより有意差検定を行い、 $P < 0.05$ をもって推計学的有意差と考えた。

第二章 阻害剤の選択

前章において FK-448、FK-316等のキモトリプシン阻害剤に、インスリン等蛋白質の消化管吸収増強作用のあることを示した。第一部において、阻害スペクトル、活性の強さ、安定性、溶解性等の異なる多数のキモトリプシン阻害剤を得たが、これらの化合物は生体内に投与された場合には、基本的なキモトリプシン阻害作用に、その他の諸性質が影響し合い、総合的に異なる吸収増強作用を表すと同時に、その他の作用、即ち副作用をもたらすものと思われる。本章においては、併用する阻害剤の選択を目的として、多くの阻害剤について、インスリンの吸収増強作用及び毒性の両面から比較検討した結果を述べる。

第一節 阻害剤の活性と併用効果¹⁴³⁾

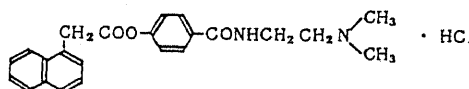
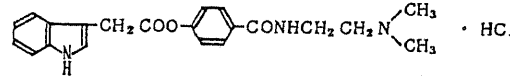
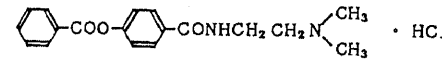
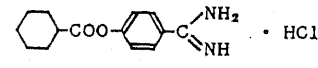
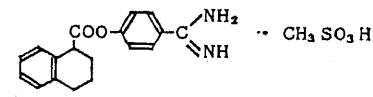
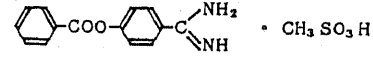
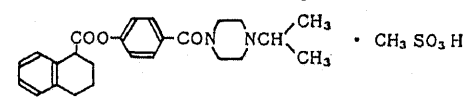
先に合成した基質アナログ型キモトリプシン阻害剤の基本骨格は、疎水性カルボン酸フェニルエステルである。比較的構造が類似し、しかも阻害活性の異なるキモトリプシン特異的阻害剤を用いて、阻害活性の強さとインスリンの消化管吸収増強効果について検討した。又、キモトリプシンと同時にトリプシンを阻害する、アミジノフェニルエステル型の阻害剤を用いて、トリプシン阻害作用に基づく吸収増強の寄与についても検討した。

【実験結果】

1) キモトリプシン阻害活性の強さと吸収増強効果

あらかじめ十二指腸内に留置カテーテルを埋め込んだウサギ1群5羽に、カテーテルを通じ、キモトリプシンに対する阻害活性(IC_{50} 値)の異なる4種のキモトリプシン特異的阻害剤、FK-207、206、448及び204 (Fig. 13) 各10mg/kgをインスリン 25U/kgとともに投与し、阻害剤の吸収増強作用を比較した。いずれの阻害剤を併用した場合も投与 15分後に血糖降下が見られたが、最高血糖降下率はほぼ阻害活性の強さの順に従っており、最も強い阻害剤である FK-204、448 において降下率はそれぞれ 24%、26%を示した (Fig. 14A、Table 26A)。

Fig. 13 Structures of inhibitors

Inhibitor	Structural formula
FK-204 (76)	 · HCl
FK-206 (77)	 · HCl
FK-207 (74)	 · HCl
FK-210 (101)	 · HCl
FK-215 (105)	 · CH ₃ SO ₃ H
FK-221 (100)	 · CH ₃ SO ₃ H
FK-448 (45)	 · CH ₃ SO ₃ H

The numeral in parentheses corresponds to the number of the compound in Part I.

2) キモトリプシン-トリプシン阻害剤の併用効果

ウサギ十二指腸内に、阻害活性の異なる、キモトリプシン-トリプシン阻害剤 FK-221、210及び 215 (Fig. 13) 各10mg/kgを 25U/kgのインスリンとともに投与して吸収増強作用を比較した。両酵素に対し、最も強い阻害作用をもつ FK-215は最高血糖降下率22%と、強い効果を示した。しかしながら、キモトリプシンに対し FK-215とほぼ同じ阻害活性を有するキモトリプシン特異的阻害剤 FK-204と、同程度の効果を示すにとどまった(Fig. 14B、Table 26B)。

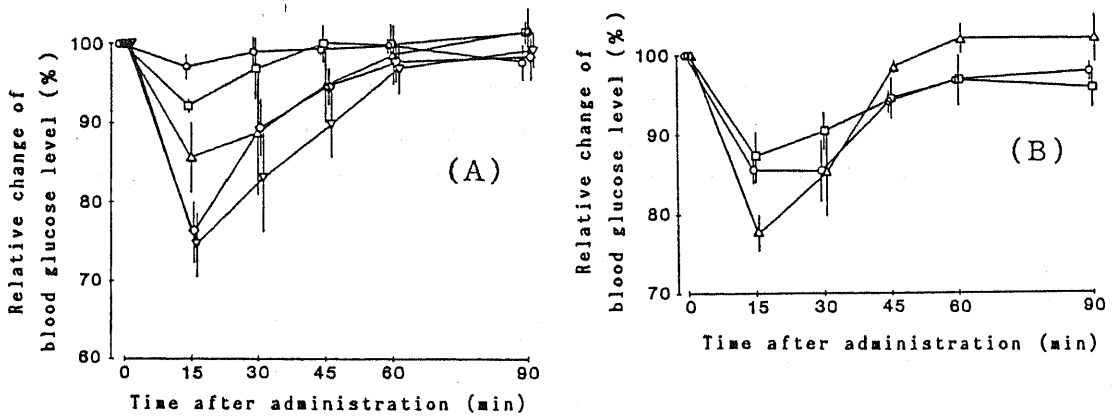


Fig. 14 Relative changes of blood glucose levels after intraduodenal administration of 25U/kg insulin with 10mg/kg inhibitors via a catheter to rabbits.

A: Chymotrypsin specific inhibitors

- : without inhibitor, □—□: with FK-207,
 △—△: with FK-206, ◇—◇: with FK-204,
 ▽—▽: with FK-448.

B: Chymotrypsin-Trypsin inhibitors

- : with FK-221, □—□: with FK-210,
 △—△: with FK-215.

Each point represents $M \pm SE$ (n=5).

【小括】

キモトリプシン阻害剤のインスリン吸収増強作用に対し、最も強い影響を及ぼすと予想される酵素阻害活性について検討した。キモトリプシン特異的阻害剤相互の比較において、その効果は IC_{50} 値との間に相関がみられた。この結果は吸収増強作用がキモトリプシン阻害活性に基づくものであることを裏づけるものと考えられる。又、 IC_{50} 値が $8 \times 10^{-7} M$ の FK-448 の作用が $4 \times 10^{-7} M$ の FK-204 と同様であったことから、阻害活性としては $1 \times 10^{-6} M$ 以下であれば、ほ

Table 26 Comparison of the promoting effects of chymotrypsin inhibitors on the intestinal absorption of insulin

(A) Chymotrypsin specific inhibitors

Inhibitor	IC ₅₀ (M)		Maximal decrease of blood glucose (%)
	Chymotrypsin	Trypsin	
FK-207 (74)	6×10^{-5}	$>10^{-3}$	8
FK-206 (77)	3×10^{-6}	$>10^{-3}$	14
FK-204 (76)	4×10^{-7}	$>10^{-3}$	24
FK-448 (45)	8×10^{-7}	7×10^{-4}	26

(B) Trypsin-chymotrypsin inhibitors

Inhibitor	IC ₅₀ (M)		Maximal decrease of blood glucose (%)
	Chymotrypsin	Trypsin	
FK-221 (100)	3×10^{-5}	4×10^{-6}	14
FK-210 (101)	8×10^{-6}	9×10^{-5}	13
FK-215 (105)	5×10^{-7}	6×10^{-7}	22

The numeral in parentheses corresponds to the number of the compound in Part I.

ほ同程度の強い効果をもたらすものと考えられた。

次にキモトリプシンと同時にトリプシンを阻害する阻害剤を併用した場合の効果は、それぞれキモトリプシンに対するIC₅₀値の同じ、キモトリプシン特異的阻害剤の効果と同程度であったことから、トリプシンも同時に阻害する必要はな

いと考えられた。FK-448とインスリンを15分ずらせて別々に投与した場合に、FK-448のインスリンの吸収に対する増強作用は著しく弱まる¹²⁸⁾ことから、FK-448の消化管からの消失は速いものと推定され、従って、食物の消化に対する抑制は少ないものと考えられるが、本来、生理的作用である消化の働きを、一時的ではあれ抑制することを考えると、主たる消化酵素、トリプシン、キモトリプシン全てを阻害する必要の無いことは、意義のあることと思われた。

第二節 阻害剤の水溶性と併用効果^{1,44)}

経口投与用の腸溶性製剤を調製する場合、原則として薬剤は結晶の形で用いられる。先に述べたラット及びウサギを用いた実験では、いずれも、薬液を、直接小腸内に投与するものであった。そこで、より現実に近い形で実験を行うべく、投与するインスリン及び阻害剤をゼラチンカプセルに充填し、腸溶性被膜を施した後、ビーグル犬に対し経口投与を試み、各阻害剤の物性がインスリン吸収増強効果に及ぼす影響を比較した。

【実験結果】

25U/kgのインスリンに 10mg/kgのキモトリプシン阻害剤 FK-317・マレイン酸塩(第一部における化合物 78)を混合し、ゼラチンカプセルに充填し、Hydroxypropylmethylcellulose phthalateからなる腸溶性被膜を施した。日本薬局方に基づき崩壊試験を行ったところ、第1液では 180分まで崩壊せず、第2液中では7分で内容物の放出がみられた。この腸溶性カプセルをビーグル犬に経口投与したところ、血糖降下は投与前値に比較し、15%とわずかであった(Fig. 15)。FK-317は、キモトリプシンに対する IC_{50} 値が $4 \times 10^{-7} M$ と、強い阻害活性を有し、図には示さなかったが、前節に述べた方法により、ウサギ十二指腸内に溶液として投与した場合には、FK-317・マレイン酸塩も FK-316と同様の併用効果が認められた。マレイン酸塩の水に対する溶解度が1%であることに着目し、インスリンと FK-317・マレイン酸塩を含む腸溶性カプセルを投与した場合に作用が弱かった原因が、阻害剤が水に対し難溶性であることに由来するのではないかと考え、水に対する溶解性の異なる阻害剤とインスリンを、同様に腸溶性カプセルの形でビーグル犬に投与し、その吸収増強効果を比較した(Fig. 15)。FK-317・マレイン酸塩から得られたFK-317・塩酸塩(溶解度 10%以上)を併用した場合にはマレイン酸塩併用の場合と異なり、42%の血糖降下がみられたが、水に対し不溶性のキモスタチン¹²⁾を併用した場合には血糖降下は認められなかった。

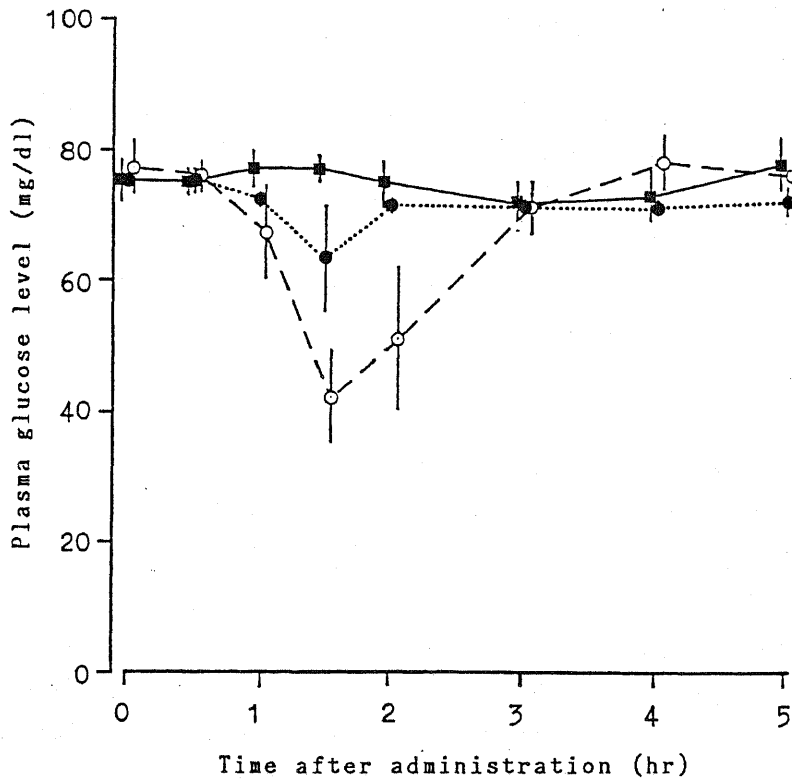


Fig. 15 Comparison of the promoting effects of chymotrypsin inhibitors on the absorption of insulin in beagle dogs

Insulin (25U/kg) was administered orally to dogs with each inhibitor (10mg/kg) as enteric-coated capsules.

■——■ : Chymostatin, ●·····● : FK-317-maleate,

○-----○ : FK-317-HCl

Each point represents $M \pm SE$ (n=3).

〔小括〕

日本薬局方には顆粒剤及び錠剤に、腸溶性被膜に関する記載があり、また腸溶性顆粒をゼラチンカプセルに充填することも可能であるが、カプセルそのものに腸溶性被膜をコーティングすることについては記載がない。また、カプセルの材料にhydroxypropylmethylcellulose phthalate等を用いることにより、腸溶性製剤とすることも、実験的には試みられているが、^{145, 146)} 実用の段階には至っていない。今回の実験においては、ゼラチンカプセルに腸溶性被膜を施したが、日本薬局方の腸溶性製剤の基準を満たすものが得られた。大量生産には適さないが腸溶性製剤として多種類の阻害剤の比較実験を行うには、異なる色のカプセルを使用し同時に調製できる等の点で優れているものといえる。

このような腸溶性カプセルを試作し、各阻害剤のインスリン吸収増強作用を検討した。薬液の十二指腸内投与と異なり、固体の経口投与においては、阻害剤の水に対する溶解性が大きな影響を与えることが明らかになった。理論的には、インスリンが腸管腔内の消化酵素に触れる以前に、酵素を阻害しておくことが望ましいものと予想される。水溶性のよい阻害剤は、カプセルの崩壊後直ちに溶解して高濃度の状態で酵素と反応できる点で有利であったものと考えられる。この結果から、内側にインスリン、外側に阻害剤の二層からなる製剤を調製すること等、今後の製剤上の検討課題が残されているものと思われた。いずれにしても、この成績は薬液の投与でなく、イヌを用い現実に近い形で経口投与実験を行うことの重要性を示したものといえる。

第三節 阻害剤の毒性

医薬品にとって最も重要なことは、当然のことながら主作用の強いことと毒性の少ないことである。第一、二節において、主作用に関する必要条件について検討したのに続き、本節においては、多数の阻害剤の毒性について比較検討した。

化学物質の毒性はその部分構造から、必ずしも、全体の毒性を、予測できるものではないが、便宜的に、一定用量の阻害剤をマウスに7日間連続経口投与し、死亡率、体重の推移、一般症状等を比較し、より毒性の低い阻害剤を得る助けとした。

【実験結果】

1) Acyl componentについての検討

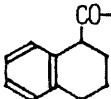
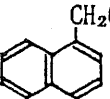
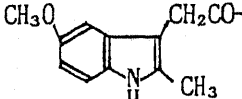

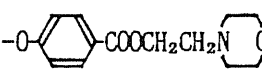
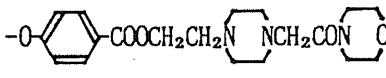
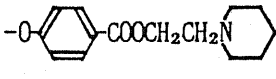
第一部において得られたキモトリプシン阻害剤のうち、強い活性を示したものは、テトラリンカルボン酸、ナフチル酢酸及び5-メトキシ2-メチル3-インドール酢酸の4-置換フェニルエステルであった。そこで、この3種のカルボン酸につき、同じ4-置換フェノールを用いエステルに導き、2,000mg/kgの用量をマウスに経口投与し、毒性を比較した。

いずれの阻害剤投与群も7日間の投与期間中、投与後の症状に異常は認められなかった。なお、解剖時の肉眼所見としてジメチルアミノ基を有する誘導体3剤の死亡例の全て、及び生存例の一部にも消化管内ガス貯留が認められた。

死亡率は、特にキモトリプシン阻害活性との間に相関はみられなかった(Table 27)。

Acyl componentに着目し比較すると、3種のacyl componentの間に大きな差はみられなかった(Table 27)。即ち、phenyl componentのベンゼン環4位の置換基にジメチルアミノ基を有する誘導体の場合、3種のカルボン酸から得られたエステル投与群の死亡率は40~67%の間であった。又、同じく、モルホリンを含む誘導体の場合は3者とも0~20%の間であった。

Table 27 Toxicities of chymotrypsin inhibitors

Phenyl component	Acyl component		
			
	9/15 (5×10^{-7}) ^{a)}	2/5 (4×10^{-7}) ^{b)}	4/6 (4×10^{-7}) ^{c)}
	1/5 (8×10^{-7})	1/5 (9×10^{-7})	0/5 (5×10^{-7})
	1/5 (6×10^{-7})	1/5 (3×10^{-7})	0/5 (6×10^{-7})
	3/5 (5×10^{-7})		2/5 (6×10^{-8})

Inhibitors were administered orally to mice once a day for 7 days at a dose of 2,000 mg/kg. The rate in this Table shows mortality. The numeral in parentheses represents the inhibitory activity against chymotrypsin (IC_{50} , M). a) FK-316 (Compound 75), b) FK-204 (Compound 76), c) FK-317 (Compound 78).

2) Phenyl componentについての検討

Acyl componentを テトラリン1-カルボン酸に固定し、各種 4-置換フェニルエステルに導き、上記と同様に経口投与による毒性を比較した。

投与後の一般症状については、いずれの検体の場合にも特記すべきものはみられなかった。解剖時の肉眼所見として、死亡例の多くと生存例の一部に、消化管内ガス貯留が認められたが、死亡率の低い検体の場合はガス貯留例も少なかった。

死亡率については Table 27に示した化合物も含め、フェノールの4位の置換基により大きな差がみられ、FK-448(化合物 45)等、塩基としてピペラジン環又はモルホリン環を含む化合物の投与群では、その他の直鎖アルキルアミノ基をもつ化合物、例えば FK-316(化合物 75)等の投与群より低い死亡率を示した(Table 28)。

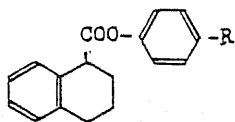
【小括】

阻害剤を経口インスリンとして配合する場合には、長期に亘り投与されることから考え、より安全性の高い化合物を選択すべきものと考えた。

強い阻害活性を与えたテトラリンカルボン酸、ナフチル酢酸及び5-メトキシ2-メチル3-インドール酢酸の、3種のカルボン酸について、同じフェノールを用いフェニルエステルとした場合の毒性はほぼ同様であった。そこで3者を比較してみると、ナフタリン骨格をもつナフチルアミンは、強い変異原性を有することが知られている。¹⁴⁷⁾ 又、インドール酢酸は催奇形性を有することが知られている。¹⁴⁸⁾ そこでそのような特殊毒性の知られていない、テトラリン1-カルボン酸を選択した。次に、多数の4-置換フェノールを用いエステルに導き毒性を比較したところ、ピペラジン環を持つ化合物は毒性が低く、中でも FK-448は死亡率、体重増加、解剖所見の全ての点において優れていた。

本章において得られたこれらの実験成績から、インスリンと併用する阻害剤として、4-(4-isopropylpiperazinocarbonyl)phenyl 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoate methanesulfonate (FK-448)を選択した。

Table 28, Toxicities of chymotrypsin inhibitors



R	I C ₅₀ (M)	Mortality
$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	2×10^{-6}	3/5
$\text{OCH}_2\text{COOCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	3×10^{-6}	3/5
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	9×10^{-7}	5/5
$\text{CH}_2\text{CON} \begin{matrix} \text{NCH}_2\text{CON} \\ \text{ } \end{matrix}$	8×10^{-6}	1/5
$\text{CH}=\text{CHCOOCH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	4×10^{-7}	3/5
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH} \begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2 \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	9×10^{-7}	3/5
$\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{ } \\ \text{ } \end{matrix}$	7×10^{-7}	5/5
$\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	5×10^{-7}	3/5
$\text{CON} \begin{matrix} \text{NCH} \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ a)	8×10^{-7}	0/10
$\text{CON} \begin{matrix} \text{NCH}_3 \\ \text{ } \end{matrix}$	9×10^{-7}	1/5
$\text{CON} \begin{matrix} \text{NCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 \\ \text{ } \end{matrix}$	4×10^{-6}	0/5
$\text{CON} \begin{matrix} \text{NCH}_2\text{CON} \\ \text{ } \end{matrix}$	3×10^{-6}	0/5

Inhibitors were administered orally to mice once a day for 7 days at a dose of 2,000mg/kg. a) FK-448 (Compound 45)

第二章 実験の部

1) 実験材料

キモスタチンは蛋白質研究奨励会の製品を使用した。その他の阻害剤は、興和(株)・東京研究所において合成した。

I C R系雄性マウスは静岡県実験動物農業協同組合、ビーグル犬はHazleton社より、それぞれ購入し使用した。

2) 実験方法

a) 血糖値の測定

ウサギを用いた実験の場合は、全血を用い第一章に示した方法により血糖値を測定した。イヌを用いた実験の場合の、血漿中グルコース濃度の測定は、血漿 20 μ lを用いてグルコースメータ(富士電機(株)製、Glucos-20A型)により行った。

b) 腸溶性カプセルの調製法

インスリン及び各種キモトリプシン阻害剤等を磨碎混合し、ゼラチンカプセルに充填した。接合部をゼラチン濃溶液で封じた後、カプセル剤約1,500個と共にコーティング用樹脂パンに入れ、hydroxypropyl methylcellulose phthalateからなる腸溶性被膜を施した。調製後、日本薬局方に基づき崩壊試験を行い、第1液により180分で崩壊せず、第2液により7分で内容物が放出されることを確認した。又、各対照群にはそれぞれの薬剤の代わりに、同量の乳糖を加えた。

c) ビーグル犬に対する経口投与実験

体重 約12kgのビーグル犬を一夜絶食させ実験に用いた。インスリン及び阻害剤等を含む腸溶性カプセルを、20mlの水と共に経口投与した。投与前及び投与後経時的に、前肢肘静脈より、ヘパリン処理を行った注射筒により血液約1mlを採取し、遠心分離により得た血漿につき、グルコースメータを用い血漿中グルコース濃度を測定した。

d) マウスに対する経口投与による毒性試験

4.5週齢のICR系雄性マウスを、原則として1群5匹として用いた。キモトリプシン阻害剤 2,000mg/kgを1日1回、7日間連続して強制経口投与した。投与液量は、0.2ml/10g体重とした。投与期間中、体重、死亡率の測定及び一般症状の観察を行い、8日目に解剖し、肉眼的に観察した。

第三章 インスリンの消化管からの吸収過程におけるFK-448の役割¹⁴⁹⁾

インスリン等蛋白性の生理活性物質は、消化管内に投与された場合、活性を保持したまま吸収される量は極めて低い。その理由は、インスリンが高分子であるため難吸収性であるだけでなく、他の食餌性の蛋白質と同様に、蛋白分解酵素により加水分解を受け失活するためと考え、これまで研究を進めてきた。本章においては、第二章で選択した阻害剤 FK-448を ラット小腸ループ内に投与し、インスリンの消化管からの吸収過程でどのような役割を果たすかについて検討を加えた。

【実験結果】

ラット 20匹を麻酔下開腹し、脾液の流入を避けるため胆管開口部より下位の小腸2箇所を結紮し、約5cmの小腸ループを作成した。門脈内に採血用カニューレを挿入した後、Table 29に示すように5群に分け、それぞれ Group I～Vとした。Group II及びIVの動物は、あらかじめ Krebs-Henseleit液¹⁵⁰⁾によりループ内腔を洗淨した。

Table 29 Experimental conditions for each group

Group	Washing in the loop	Dose of insulin (U/kg)	Dose of FK-448 (mg/kg)
I	—	63	0
II	+	63	0
III	—	63	20
IV	+	63	20
V	—	0	20

Group I (コントロール群)、Group II (ループ内洗浄群)のラットの小腸ループ内に、インスリン 63U/kgを投与し、Group III (FK-448 併用群)、Group IV (ループ内洗浄+FK-448 併用群)には同量のインスリンとキモトリプシン阻害剤 FK-448 20 mg/kgを併用投与した。各Groupの血漿中の immunoreactive insulin (IRI)¹⁵¹⁾濃度及び血糖値の推移を Fig. 16に、IRIの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC)をTable 30に示した。

インスリンを単独で投与したGroup Iでは、門脈血漿中のIRIのピーク値は $49 \pm 2 \mu\text{U/ml}$ とわずかであり、血糖値の低下はみられなかった。ループ内を洗浄後、同量のインスリンを単独で投与した Group IIでは、IRIのAUCは Group Iの約2倍に上昇したが、有意の血糖低下はみられなかった。一方、同量のインスリンを FK-448 20mg/kgと併用した Group IIIでは、門脈血漿中IRIは投与15分後に $331 \pm 91 \mu\text{U/ml}$ 上昇し、血糖値は投与30分後に 40%低下した。又、ループ内を洗浄した後投与した Group IVにおいても、Group IIIとほぼ同じ結果が得られた。

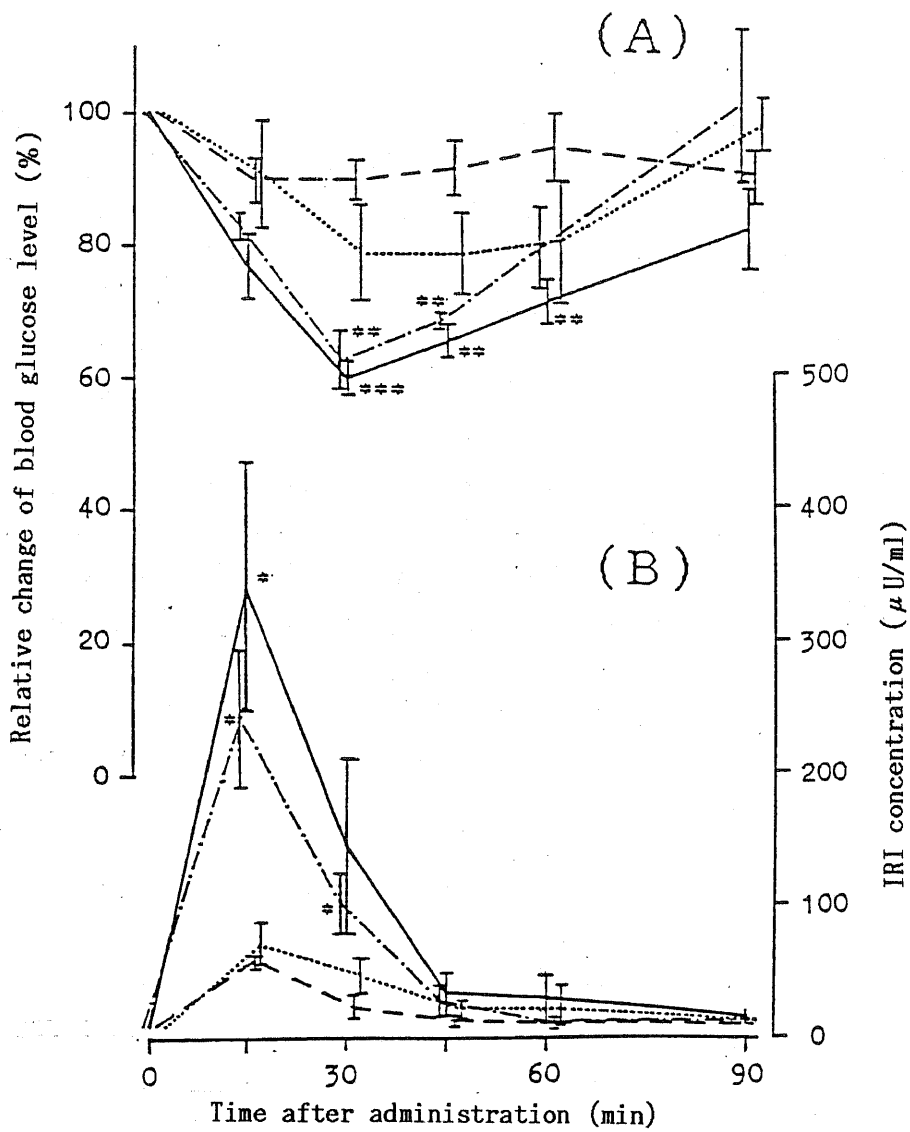


Fig. 16 Relative changes of blood glucose levels (A) and portal plasma IRI levels (B) after administration of insulin (63U/kg) with or without FK-448 (20mg/kg) into an intestinal loop of rats

----- : Group I (insulin alone, without washing)
 : Group II (insulin alone, after washing)
 ——— : Group III (insulin with FK-448, without washing)
 - - - : Group IV (insulin with FK-448, after washing)

Each point represents $M \pm SE$ (n=4).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Group II 及びIVのループ内に存在する消化酵素が、洗浄によりどの程度除去されたかを調べるため、ループ内洗浄液中のキモトリプシン活性を測定した (Fig. 17)。 30分の洗浄により、洗浄液中の酵素活性は 最初の2%程度に減少した。

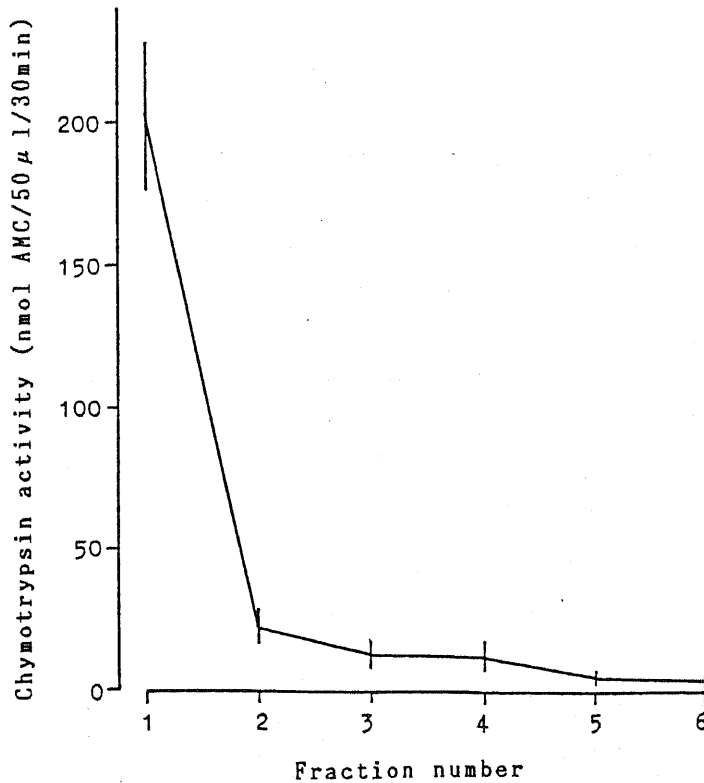


Fig. 17 Chymotrypsin activity in the perfusate for the purpose of washing.

Intestinal loop of rats was perfused with Krebs-Henseleit solution for 30min at a rate of 1ml/min. The perfusate was fractionated each 5min. Chymotrypsin activity was assayed using Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA as a substrate. Each point represents $M \pm SE$ (n=4).

次に、インスリンが消化管腔から門脈血中へ移行する過程で、小腸内に投与された阻害剤がインスリンと共存し、有効な濃度が保たれるかどうかについて検討した。

Group Vのラットの小腸ループ内に FK-448 (20mg/kg)を投与し、門脈血漿中のFK-448濃度を測定した。FK-448濃度は投与 15分後にピークとなり、その値は 141 ± 24 ng/mlであった(Fig. 18)。

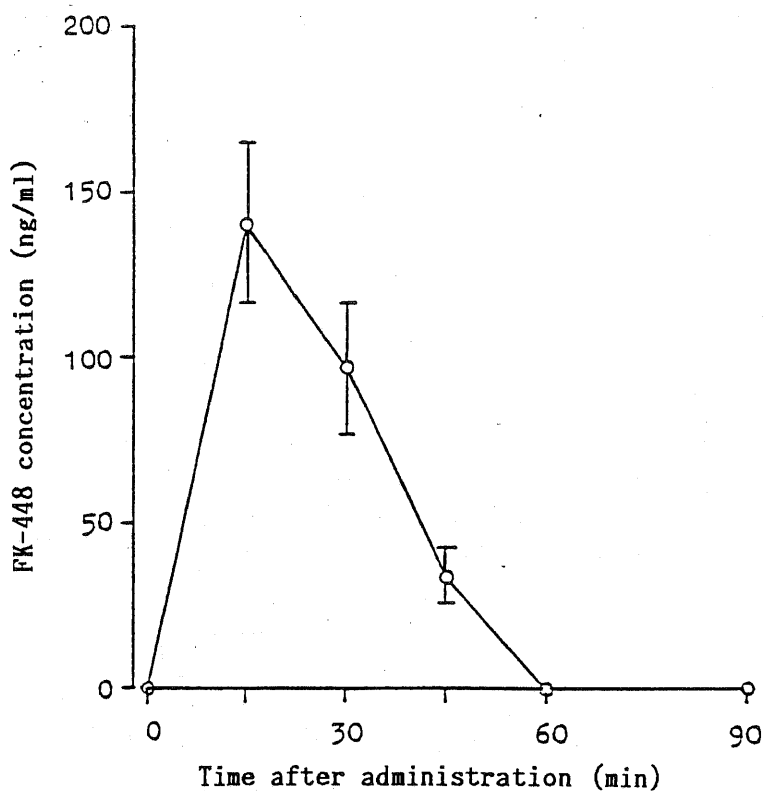


Fig. 18 Concentrations of FK-448 in portal plasma after administration of FK-448 (20mg/kg) into an intestinal loop (group V)
Each point represents $M \pm SE$ (n=4).

門脈血漿中の I R I 濃度からインスリンの吸収率を正確に計算することは困難である。 おおよその吸収率を推定する目的で、空腸静脈内にインスリンを一定速度で 30 分間持続注入し、先のループ内投与群と同様に 門脈血漿中 I R I 濃度を測定した (Fig. 19)。 0.31 及び 0.63 U/kg のインスリンを投与した場合の、持続注入終了時の I R I 濃度はそれぞれ 188 及び 507 μ U/ml 上昇した。 それぞれの AUC を算出したところ、先の小腸ループ内投与の Group III の値は 2 つの投与群の中間の値を示した (Table 30)。

Table 30 The areas under the IRI concentration-time curves (AUC) following administration of insulin in the various conditions

Mode of administration	Dose of insulin (U/kg)	AUC (M \pm SE) (μ U/ml \cdot min)
Intestinal loop		
Group I (control)	63	1089 \pm 205
Group II (after washing)	63	2145 \pm 575
Group III (with 20mg/kg of FK-448)	63	7996 \pm 2554*
Group IV (with 20mg/kg of FK-448, after washing)	63	5391 \pm 1053**
Portal vein		
Portal vein	0.63	12785 \pm 1192
Portal vein	0.31	5240 \pm 1263

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group

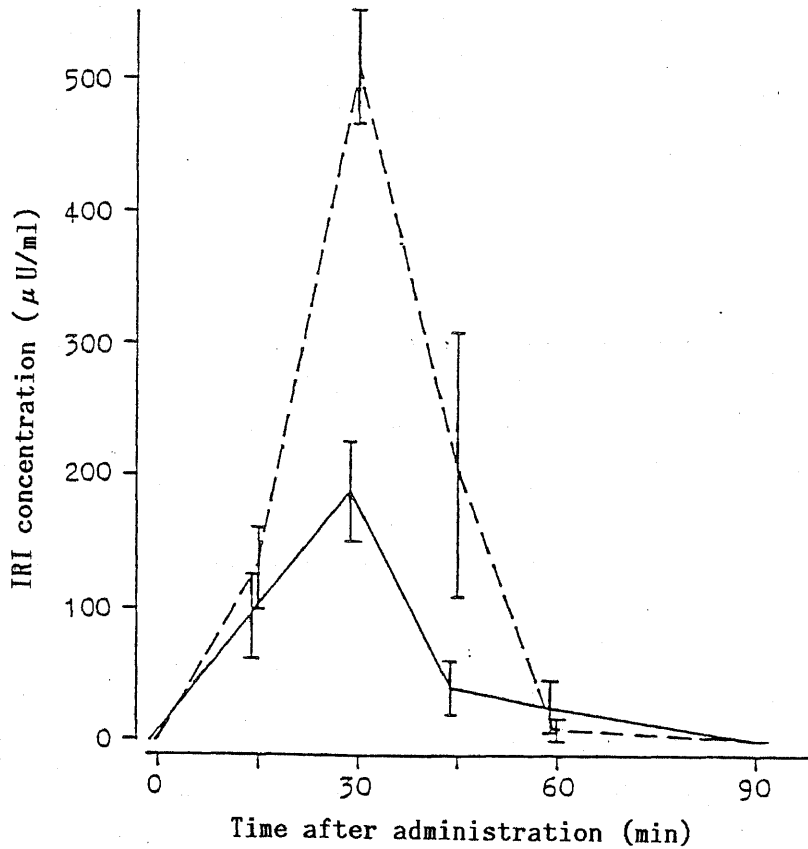


Fig. 19 Portal Plasma IRI levels after portal infusion of insulin at rates of 0.63 (-----) and 0.31 U/kg/30min (—) in rats.

Each point represents $M \pm SE$ (n=3).

インスリンとの併用投与時の FK-448の作用機序を検討する目的で、FK-448の小腸粘膜透過性亢進作用を検討した。灘井ら¹⁵²⁾の方法に従って、十二指腸から盲腸直前の回腸までの小腸を、薬剤 2 mg/mlの溶液で灌流し、同時に静脈内投与したスルファニル酸が小腸灌流液中に漏出して来る量を測定した(Fig. 20)。キレート形成能を有し、小腸粘膜の透過性亢進作用を示す塩酸テトラサイクリンは、灌流開始後速やかにスルファニル酸を漏出させた。FK-448は 15分後までは作用がみられず、25分以降やや透過性の亢進がみられたが、塩酸テトラサイクリンと比較しその作用は弱かった。

【小括】

ラットの小腸ループ内に、キモトリプシン阻害剤 FK-448をインスリンと同時に投与することによって、門脈血中の I R I 濃度の上昇と血糖値の低下が認められた。この実験結果から、インスリンの吸収率を正確に算出することはできないが、63U/kgのインスリンをループ内に併用投与した場合の血漿中 I R I の A U C は、0.43U/kgのインスリンを空腸静脈内に持続注入した場合の A U C に相当するものと計算され、吸収率は約0.7%程度と推定された。またループ内に FK-448を同時投与した場合の A U C は、インスリンを単独でループ内に投与した場合の約7倍であった。先に筆者ら¹⁵³⁾は、ラット十二指腸内に、63U/kgのインスリンをFK-448 (20mg/kg)と併用投与し、血糖降下作用によりインスリンの腸管腔からの吸収を確認したが、この時の血糖値-時間曲線から求めた血糖降下作用面積¹⁴⁴⁾を、既知量のインスリンを静脈内投与した場合の作用面積と比較し、腸管腔からの吸収率が 0.72%であったことを報告したが、今回免疫学的手法により定量した結果もこれと一致した。又、Zivら¹¹¹⁾はラット回腸ループ内にインスリン 50U/kgを、トリプシンとキモトリプシンの両方を阻害するアプロチニン²⁶⁾ 12,000 KIU/kgに併用投与し、アプロチニンにインスリンの吸収増強作用を認めているが、血漿中の I R I 濃度からこの時の吸収率を、0.82%と算出しており、筆者の結果とほぼ一致した。

筆者は第二章において、ウサギ小腸内にインスリンとともに各種キモトリプシン阻害剤を投与した場合の血糖降下作用を比較したが、キモトリプシンとトリプシンの両者の阻害剤の効果は、キモトリプシンの特異的阻害剤の効果とほぼ同様であった。今回、キモトリプシン特異的阻害剤 FK-448を併用した場合のインスリンの吸収率が、キモトリプシンとトリプシンの両者を阻害するアプロチニン

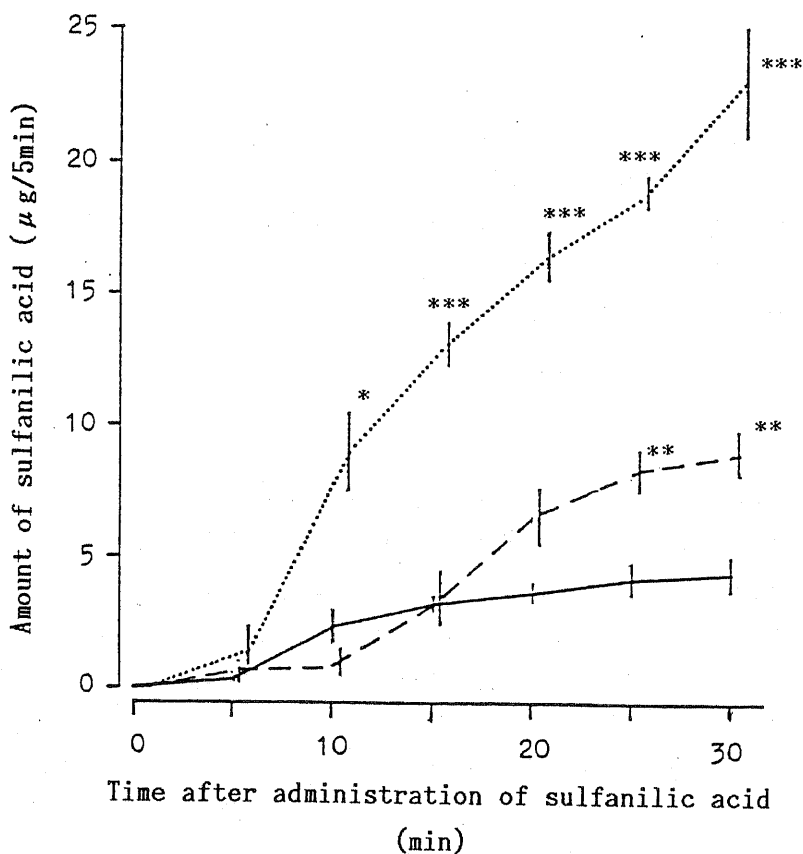


Fig. 20 The amounts of sulfanilic acid appeared in the perfused solution after administration of sulfanilic acid

The rat small intestine was perfused with drug solution (2mg/ml in physiological saline solution) at a rate of 2 ml/min. Sulfanilic acid (60mg/kg) was administered intravenously at the start of perfusion.

— : Control (saline), - - - - - : FK-448,
 : Tetracycline HCl.

Each point represents $M \pm S E$ (n=3).

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

を併用した Zivら¹¹¹⁾の結果とほぼ一致したことは、ウサギにおける上述の結果の正当性を裏づけるものと考えられる。

FK-448には血糖降下作用がない¹⁵³⁾ことから、FK-448の作用はインスリンの消化管腔又は粘膜中の酵素による分解を阻害するか、あるいは小腸壁の透過性に影響を及ぼしインスリンの吸収を促進したかのいずれかと考えられる。FK-448の溶液で小腸内灌流を行った場合、塩酸テトラサイクリンのような顕著な小腸粘膜の透過性亢進¹⁵²⁾は認められず、特に最初の15分には影響がみられなかった。

一方、小腸ループ内にインスリンを投与した場合の吸収は投与後15分をピークとしていることから、FK-448は腸管の透過性を亢進させることによりインスリンの吸収を促進させたものではなく、酵素阻害活性に基づくものと考えられる。

食物として摂取される蛋白質は、主として小腸においてオリゴペプチドからアミノ酸に分解されて吸収される。トリプシン、キモトリプシン等の消化酵素は消化管腔を流れる間に加水分解を行う管腔内消化¹⁵⁴⁾(luminal digestion)のみならず、絨毛表面を覆っている糖衣(glycocalyx)に吸着されており、^{155, 156)}(Fig. 21)蛋白質又はペプチドが近づくとこれを分解し、直ちに門脈血中へ移行させることにより消化・吸収が円滑に行われるものとされている。¹⁵⁴⁾又、小腸粘膜中にはキモトリプシン様酵素の存在が知られている¹¹⁾他、刷子縁膜プロテアーゼ、ライソゾーム中のプロテアーゼ等、小腸内に投与されたインスリンを加水分解するプロテアーゼはいくつか考えられる。

今回の実験において、小腸ループ内の洗浄により管腔内の消化酵素は大部分除去されていたにもかかわらず、ループ内を洗浄した後インスリンを単独投与した場合、洗浄せずに投与した場合に比較して有意の吸収増強は認められなかった。ループ内は膵液の流入を遮断されているので、管腔内消化の影響を否定することはできないが、管腔内消化の影響は少ないものと考えられた。一方、ループ内に投与されたFK-448はインスリンと同様に門脈血中に吸収され、投与15分後に132 ng/mlに達し、キモトリプシン阻害に対するK_i値 1.8×10^{-7} M(約90ng/ml)を上回っていた。腸管粘膜中においてはそれ以上の濃度であると推定され、インスリン吸収の過程において十分なキモトリプシン阻害活性を示すものと考えられた。

以上述べた結果から、FK-448のインスリン吸収増強作用は、小腸粘膜絨毛に吸着されたキモトリプシン、又は、粘膜中のキモトリプシン様酵素のいずれかあるいは双方を阻害することにより、活性を保持したまま小腸壁を通過するインスリンの比率を高めた結果であると推定された。

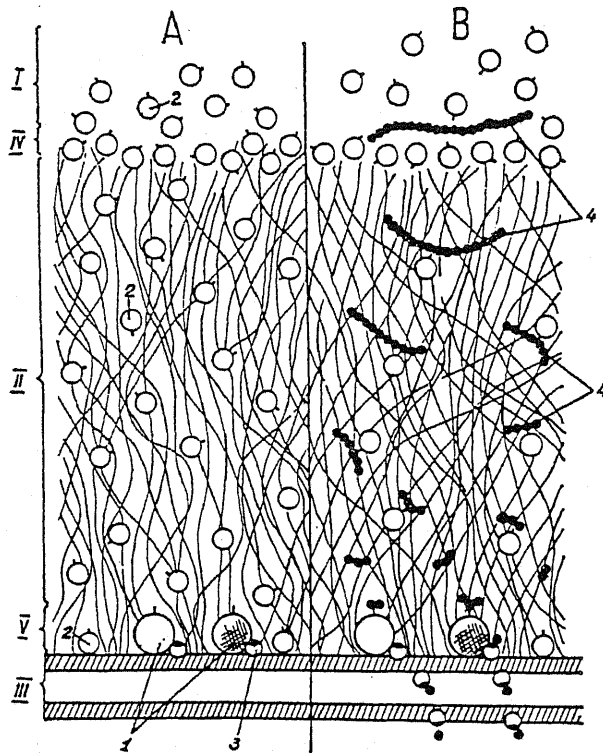


Fig. 21 Schematic representation of enteric and adsorbed enzymes during membrane digestion (section of the apical membrane of microvillus). (A) Distribution of enzymes. (B) Interactions of hydrolysis and transport. I, lumen; II, glycocalyx; III, three-layered membrane; IV, luminal edge of glycocalyx; V, luminal surface of membrane. 1, enteric enzymes; 2, pancreatic enzymes within the lumen or adsorbed onto glycocalyx and membrane; 3, carriers; 4, substrates. (A.M.Ugolev and P.D.Laey, *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 105 (1973) ¹⁵⁶)

第三章 実験の部

1) 実験材料

既に述べた材料の他、Insulin RIA Beads[®] はダイナボット社、tetracycline hydrochlorideは Sigma社、sulfanilic acid, sodium nitrite, sulfamic acidは 和光純薬工業(株)の製品を使用した。

2) 実験方法

a) 小腸ループ内投与実験

体重 約300gのラット 20匹を1群4匹ずつ5群に分け、それぞれ Group I ~ Vとした。いずれの動物も、ペントバルビタールによる麻酔下開腹し、胃幽門部より約5 cm下(胆管開口部より下位)から大腸側へ向け、又、そこから更に約5 cm下から胃側へ向けビニール細管を挿入し、結紮、固定し小腸盲管を作成した。幽門静脈に採血用カニューレを挿入し、カニューレの先端を門脈-幽門静脈合流部に、肝臓に向けて固定した。なお採血用カニューレ内には生理食塩液により10倍に希釈した注射用ヘパリン液を満たした。ヘパリン処理を行った注射筒により、採血用カニューレから0.3ml採血した後大腸側のカニューレを閉じ、胃側のカニューレから、Group I、IIは63U/kgのインスリン(薬液量はいずれも2 ml/kg)を単独で、Group III、IVは同量のインスリンにFK-448(20mg/kg)を併用し、又、Group VはFK-448(20mg/kg)を単独でループ内に投与した(Table 29)。なおGroup II及びIVの動物は、あらかじめ次の方法によりループ内腔を洗浄した。即ち胃側のカニューレからKrebs-Henseleit液¹⁵⁰⁾(処方よりグルコースを除く)を1 ml/minの流速で30分間注入し、大腸側カニューレから洗浄液を5分毎に分取し、キモトリプシン活性を測定した。Group I ~ IVは投与後経時的に0.3ml採血し、血糖値と血漿中 immunoreactive insulin(IRI)濃度を、又、Group Vは同じ時点にEDTA処理を施した注射筒により1 ml採血し、血漿中のFK-448濃度を測定した。なお、各 Groupとも採血後、同量の他のラットからの血液を輸血した。

b) 腸管腔洗浄液中のキモトリプシン活性の測定

Yokoyamaら⁶⁴⁾の方法に従い、洗浄液0.5mlにAAPF-MCA 5 μ lを基質とし

て加え、37℃で 30分加温した。生成したAMCを、蛍光光度計により測定した。

c) 血漿中IRI濃度の測定

血漿中IRI濃度は、採血後遠心分離により得られた血漿につき、インシュリン・リアビーズ[®]を用い、野村ら¹⁵⁷⁾の方法に従い固相法により測定した。なお、IRIの血漿中濃度-時間曲線下面積(AUC)は台形法により求めた。

d) ラットに対するインスリン門脈内投与実験

体重 約300gのラット1群3匹を麻酔下開腹し、門脈内に採血用カニューレを、上述の方法により挿入し固定した。持続注入器を用い、空腸静脈からインスリンを 0.31又は 0.63U/kg/30minの割合で 30分間持続注入した。投与前を含め経時的に 0.3ml採血し、血漿中IRI濃度を測定した。なお採血後、同量の他のラットからの血液を輸血した。

e) 小腸粘膜の透過性亢進作用の検討

灘井ら¹⁵²⁾の方法に従い、一夜絶食させた体重 約300gのラット1群3匹をウレタン麻酔下開腹し、胃幽門直下の十二指腸及び盲腸直前の回腸にカニューレを挿入し、結紮、固定した。持続注入器を用い 37℃に加温した生理食塩液を小腸上部から下方へ向け、2ml/minの流速で灌流した。スルファニル酸 60mg/kgを尾静脈より投与し、直ちに灌流液を薬物 2mg/mlを含む生理食塩液に切り替え、5分毎に流出液を分取した。坂口¹⁵⁸⁾の方法に従いジアゾ法により灌流液中のスルファニル酸濃度を測定し、各分画の液量との積として各分画中の総量を求めた。なお対照薬物として、塩酸テトラサイクリンを用いた。

f) 血漿中FK-448濃度の測定

血漿0.5mlに 0.2N HCl 0.5mlを加え、ベンゼン-クロロホルム(4:1)混液6mlを加え抽出を行った。有機溶媒層2mlをN₂気流中 50℃で濃縮し、0.01N NaOH 0.5mlを加え、2分間 50℃に加温し加水分解を行った。検液のpHを 2~3とし上記混合溶媒により洗浄後pHを 8~9とし、10%

イソプロパノール-クロロホルム混液により 1-(4-hydroxybenzoyl)-4-isopropylpiperazine (HIP) を抽出し、TMS化後、次の条件により gas chromatography-mass spectrometry法により定量した。

装置と定量条件

装置：日本電子DX-300型

カラム：3% OV-1 (ガスクロムQ、100~200メッシュ) 2mm×1m ガラス
カラム

温度：カラム、230℃；注入部、270℃；セパレータ、210℃；イオン源、180℃

キャリアガス：ヘリウム 0.8 kg/cm²

設定質量数：m/z 193 .

第四章 経口インスリン製剤化の試み

注射によるインスリンの血糖降下作用は、ラットを除きウサギ、イヌ、ヒト等動物種差は少ないものといえる。しかし、インスリンの経口投与については、一般的な腸管からの吸収率の種差のみならず、消化酵素の量及び組成にも種差が存在する¹²⁷⁾ことから、動物種により大きく異なることも考えられる。本章においては、先の、ラット及びウサギにおける、インスリンと FK-448混合溶液の投与から一歩現実に近づけ、腸溶性カプセルをビーグル犬に経口投与し、種差を含めその作用を確認すると同時に、その場合の吸収率について検討し、更に、インスリンの吸収率の向上を目指し検討を加えた。

第一節 腸溶性カプセルの経口投与におけるインスリンの吸収率

第二章において選択した FK-448は、ラット *in situ*の実験において小腸ループよりのインスリンの吸収に対し増強作用を示し、その時のインスリンの吸収率は約0.7%であった。より現実的な、腸溶性製剤を経口的にビーグル犬に投与した場合の FK-448の吸収増強作用について検討し、インスリン皮下投与時の血漿中の I R I 濃度の動き及び血糖降下作用と比較した。

【実験結果】

1) 経口投与

6.25~50U/kgのインスリンを 20mg/kgのFK-448と共に腸溶性カプセルとしてビーグル犬に経口投与し、血漿中 I R I 濃度及びグルコース濃度を測定した。血漿中 I R I 濃度は、投与 0.5~1 時間後より投与量に依存した上昇が認められ、又、血漿中グルコース濃度は、それにやや遅れ 1~1.5時間後より低下が認められ、インスリンの吸収が確認された。Fig. 22に各用量のインスリンを併用投与した場合の血漿中 I R I、グルコース濃度の推移を示した。インスリン 12.5U/kgの投与により、1 時間後に血漿中 I R I 濃度は $61\mu\text{U/ml}$ となった。血漿中 I R I 濃度から AUC を算出すると Fig. 23 のようにほぼインスリンの投与量に比例した。

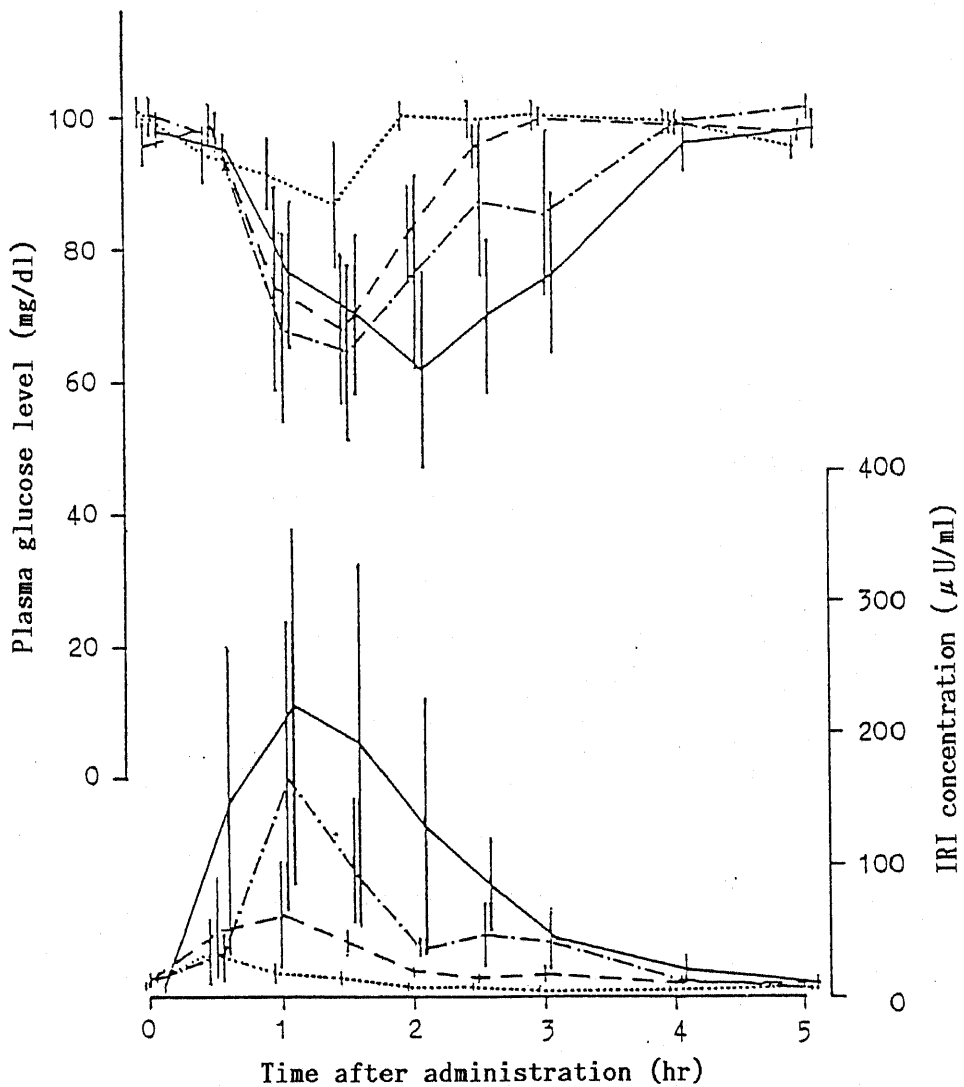


Fig. 22 Plasma IRI and glucose levels after oral administration of enteric-coated capsules containing insulin and FK-448 (20mg/kg) to beagle dogs.

..... : Insulin 6.25U/kg, - - - - - : 12.5U/kg
 - · - · - : 25U/kg, ——— : 50U/kg.

Each point represents $M \pm S E$ (n=5).

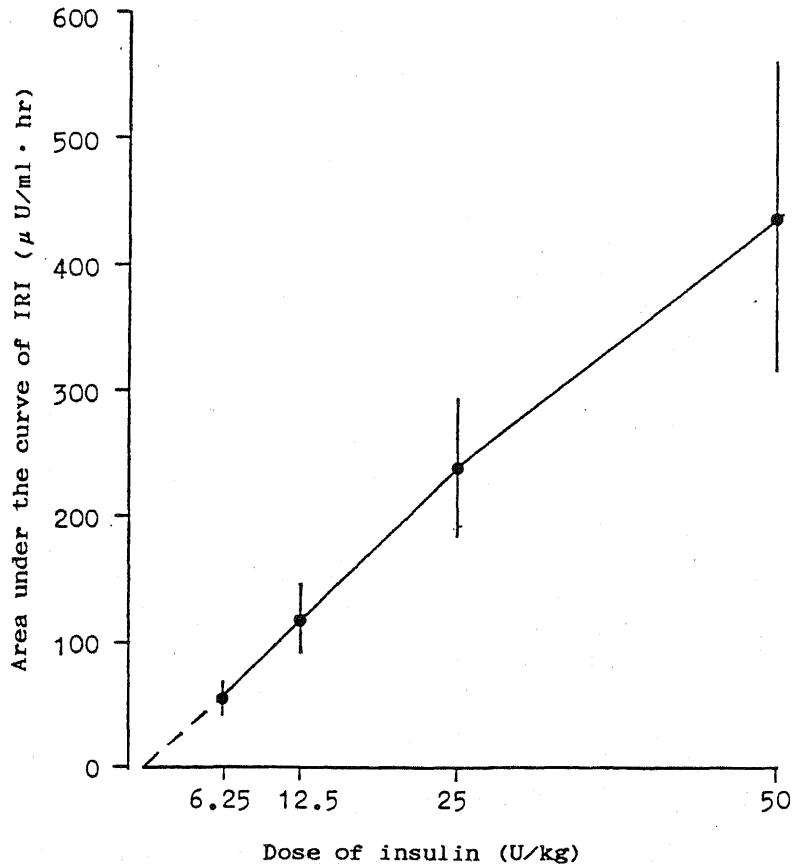


Fig. 23 The areas under the plasma IRI concentration-time curves after administration of enteric-coated capsules containing insulin and FK-448 (20mg/kg) to beagle dogs. Each point represents $M \pm SE$ (n=5).

2) 皮下投与

0.1U/kgのインスリンを同じビーグル犬に皮下投与し、同様に血漿中IRI濃度及びグルコース濃度を測定した(Fig. 24)。血漿中IRI濃度は投与直後から上昇し、投与30分後にピークとなり、その時の値は $37 \pm 3 \mu\text{U/ml}$ であった。なお、IRIの値からAUCを算出したところ $85 \mu\text{U/ml} \cdot \text{hr}$ となった。

【小括】

インスリンを20mg/kgのFK-448と併用し腸溶性カプセルとしてビーグル犬に経口投与した場合の血漿中IRI濃度のAUCは、ほぼインスリンの投与量に比例した。0.1U/kgのインスリン皮下投与時のIRIのAUC $85 \mu\text{U/ml} \cdot \text{hr}$ はFig. 23より、インスリン9.5U/kgを含む腸溶性カプセルを経口投与した時のAUCに相当し、インスリンの吸収率は約1%と計算された。第三章において述べた、ラット *in situ*の試験の成績では約0.7%であり、両者はほぼ一致した。しかしながら、腸溶性カプセル投与後の血漿中IRI濃度及びグルコース濃度のバラツキは、インスリン皮下投与後の血漿中IRI濃度及びグルコース濃度のそれと比較して大きかった。この理由の一つは、経口投与時の、作用発現までに要する時間、即ち、胃を通過しカプセルの腸溶皮が崩壊するまでの時間が0.5~2時間と、個体差が大きかったことであろうと思われる。一般に、ビーグル犬の小腸のpHは個体差が大きいことが知られており、腸溶性製剤の経口投与実験ではバラツキの原因となるものと予想される。¹⁵⁹⁾ 今回の筆者の実験においてもそれが窺われた。又、作用持続時間をみると、皮下投与時は血糖の低下し始めから回復まで約4時間であったが、経口投与時では0.5~1時間と短いように思われた。

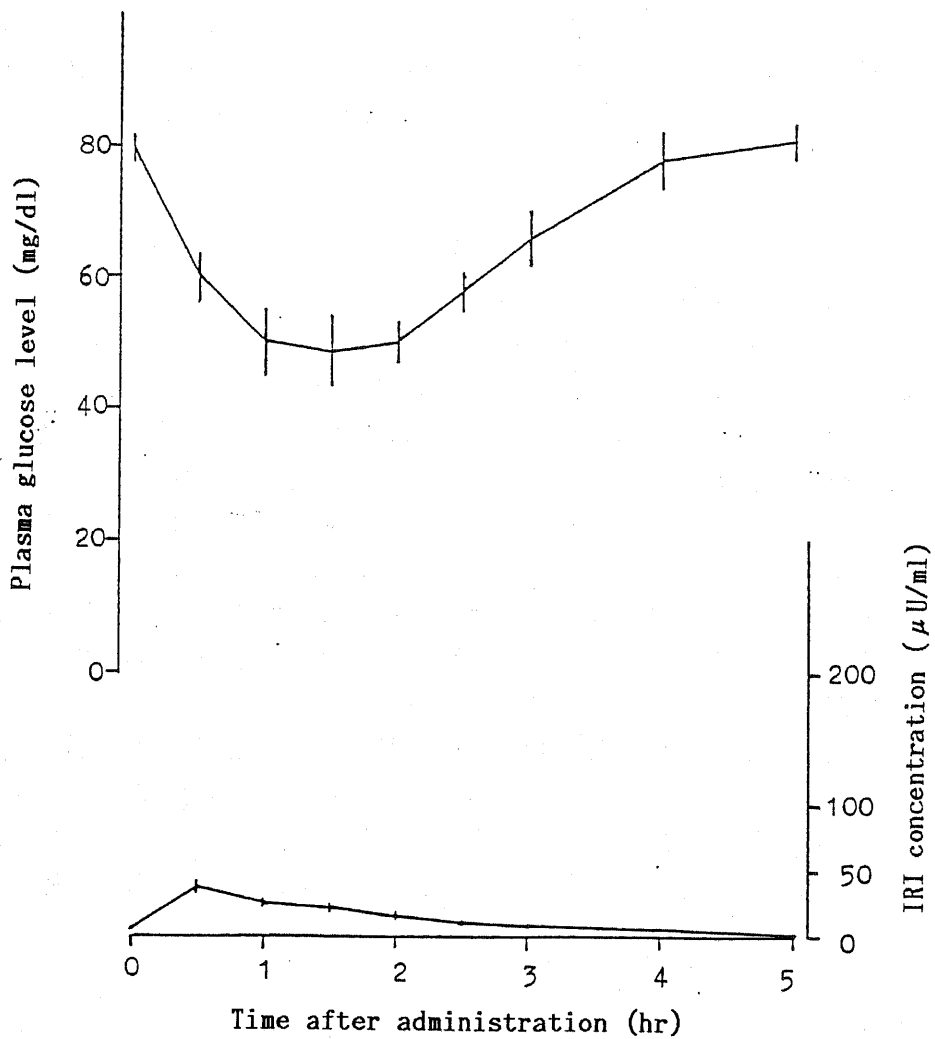


Fig. 24 Plasma IRI and glucose levels after subcutaneous injection of insulin (0.1U/kg) to beagle dogs. Each point represents $M \pm S E$ (n=5).

第二節 クエン酸のインスリン吸収増強効果¹⁴⁴⁾

腸溶性製剤の経口投与によるインスリンの吸収率は約1%と、必ずしも充分なものとはいえない。又、吸収率のバラツキが大きかった理由の一つは、吸収率の低いことによるものとも考えられる。そこで、更に吸収率を高める作用を有する物質を、主として医薬品に添加することが認められている物質の中から検索した。原ら¹⁶⁰⁾は、直腸、鼻腔等粘膜からのインスリンの吸収についての研究から、クエン酸等の有機酸に吸収増強効果があることを見出した。本節においては、FK-448の、インスリンの消化管吸収増強作用に対する、クエン酸等の影響を検討した結果について述べる。

【実験結果】

留置カテーテルを施したウサギ十二指腸内に 25U/kgのインスリン及び10mg/kgのFK-448を投与したところ、投与15分後に約16%の血糖降下がみられた。血糖値の推移を示すグラフから血糖降下作用面積^{144, 161, 162)}を求めたところ、 $5.5 \pm 1.6 \text{ mg/dl} \cdot \text{hr}$ となった(Fig. 25, 26)。これに対しクエン酸、乳酸、酒石酸等の有機酸 30mg/kgを添加した場合には、作用面積はそれぞれ 14.4 ± 4.0 、 16.1 ± 4.2 、 $14.5 \pm 3.6 \text{ mg/dl} \cdot \text{hr}$ と増加がみられた(Fig. 26)。これらオキシカルボン酸の効果の作用機序を知る目的で、クエン酸ナトリウム、OH基を持たない酢酸及び無機酸である塩酸を、それぞれクエン酸 30mg/kgと化学量論的な等量を添加し、同様に吸収促進作用を検討したところ、塩であるクエン酸ナトリウムには作用がみられなかったが、酸類にはいずれも作用が認められた(Fig. 25)。

クエン酸の効果を確認する目的で、12.5U/kgのインスリン、20mg/kgのFK-448及び各種用量のクエン酸を含む腸溶性カプセルをビーグル犬に経口投与した。クエン酸非添加時の血糖降下作用面積は約 $20 \text{ mg/dl} \cdot \text{hr}$ であったのに対し、クエン酸を添加した場合、クエン酸の添加量に依存して作用面積は増加したが、30mg/kgの添加によりほぼ平衡に達し、その時の値は約 $50 \text{ mg/dl} \cdot \text{hr}$ を示し、非添加時の約2.5倍となった(Fig. 27)。

【小括】

インスリンの小腸からの吸収率を上昇させる目的で酸類の作用を検討した。Touitouら¹⁰²⁾はセトマクロゴール、Gallowayら¹⁰³⁾はBrij 98、Mesiba¹⁰⁴⁾は

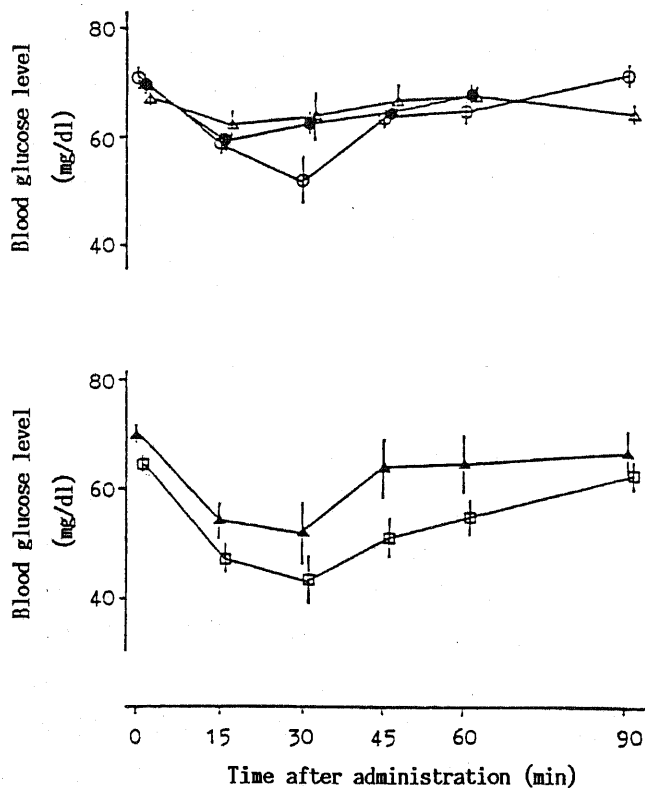


Fig. 25 Enhancing effects of acids on the absorption of insulin co-administered with FK-448 in rabbits

Insulin (25U/kg) and FK-448 (10mg/kg) were administered intraduodenally via a catheter to rabbits with:

- —● no acid
- —○ citric acid 30mg/kg=0.143m mol/kg
- △ —△ sodium citrate 42mg/kg=0.143m mol/kg
- ▲ —▲ acetic acid 25.8mg/kg=0.429m mol/kg
- —□ hydrochloric acid 15.6mg/kg=0.429m mol/kg.

Each point represents $M \pm SE$ (n=6).

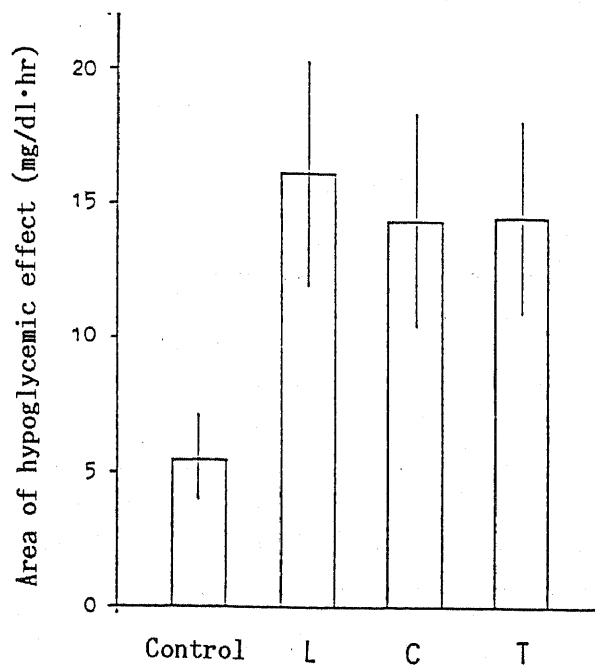


Fig. 26 Enhancing effects of acids for FK-448 on the absorption of insulin in rabbits

Each acid (30mg/kg) was co-administered intra-duodenally via a catheter to rabbits with insulin (25U/kg) and FK-448 (10mg/kg). Hypoglycemic effect was estimated as an area calculated from the blood glucose level-time curve.

Control : without any acid

L : with lactic acid

C : with citric acid

T : with tartaric acid

The value represents $M \pm SE$ (n=6).

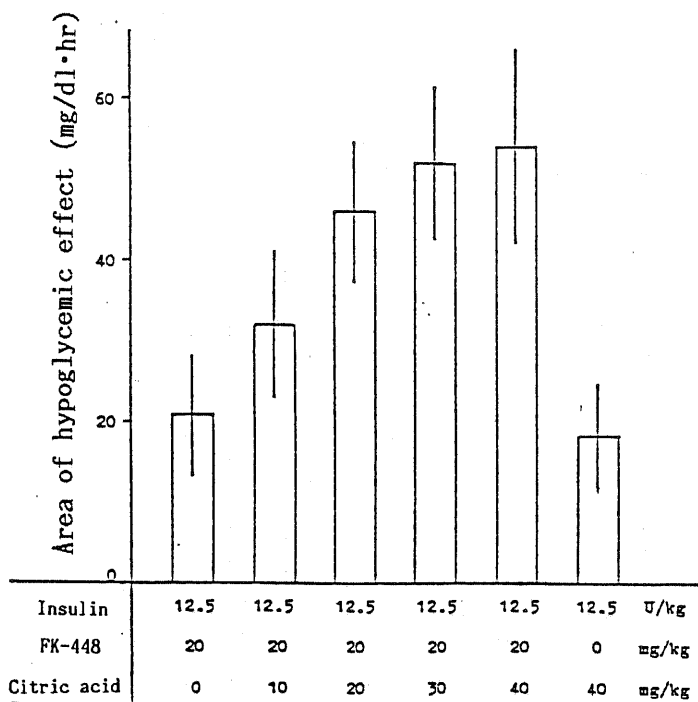


Fig. 27 Enhancing effects of citric acid for FK-448 on the absorption of insulin in beagle dogs

Drugs were administered orally to beagle dogs as enteric-coated capsules. Hypoglycemic effect was estimated as an area calculated from the plasma glucose level-time curve. The value represents $M \pm SE$ (n=6).

Tween 80等界面活性剤にインスリンの吸収促進作用を認めたとする報告は多い。しかし、Nadaiら¹²⁰⁾は sodium laurylsulfate等の、小腸の透過性亢進作用についての実験結果から、それらの物質の、粘膜に対する障害を指摘している。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO-60)等比較的障害性の少ないと思われる活性剤は医薬品として用いることが認められているが、このような理由から長期に亘る服用は避けることが好ましいと考えた。

関根ら¹⁶³⁾は直腸内に、カルシトニン、ヘパリン等をクエン酸及びクエン酸ナトリウムと併用投与し、それらに吸収促進作用があると報告している。今回の筆者の実験結果ではこれと異なり、酸の代わりにナトリウム塩を用いた場合に、効果は認められなかった。いずれの酸を用いた場合にも作用が認められたことから、クエン酸の作用は小腸内のpHを低下させたことによるものと思われた。即ち、小腸内のpHは通常6~8でありキモトリプシン等の至適pHの範囲にあるが、酸類の投与によりpHが低下し、一時的に消化酵素の活性が抑制されたものと考えられた。原ら、¹⁶⁰⁾関根ら¹⁶³⁾の結果との相異は、一つには直腸と十二指腸という投与部位の違いであろう。しかし、筆者の場合はFK-448との併用であり、FK-448は活性エステルとして、腸管内のエステラーゼにより加水分解を受けるが、pHの低下はエステラーゼによるFK-448の分解の抑制にも寄与していると考えられた。

酸類の中では、乳酸は液体であり製剤化に難点があり、酒石酸は体内で代謝を受けにくく、アチドーシスの原因となることが知られている。これに対しクエン酸は、レモン1個に約4g含まれる等安全性の上で不安はないものと考えられている。¹⁶⁴⁾

クエン酸の作用は腸溶性カプセルとして用いた場合にも認められ、30mg/kgの添加により血糖降下作用は非添加時の約2.5倍に増強された。

第四章 実験の部

1) 実験材料

クエン酸、酒石酸、乳酸、クエン酸ナトリウム等の試薬は、和光純薬工業(株)、インスリン・アクトラピッド(40U/ml)は Novo社の製品を使用した。

2) 実験方法

a) ビーグル犬に対するインスリンの皮下投与実験

経口投与実験に用いたビーグル犬5頭に、インスリン・アクトラピッド 0.1U/kgを頸部皮下に投与した。投与前及び投与後経時的に前肢肘静脈より採血し、前述の経口投与の場合と同様に血漿中グルコース濃度、IRI濃度及びIRIのAUCを求めた。

b) 血糖降下作用面積は、血糖値の推移を示すグラフ上、血糖降下を認める直前と血糖値の回復した時点を結ぶ直線と、その間の血糖値の推移により描かれる多角形の面積を、台形法により計算した。

【第二部 考察】

動物は多糖類の素材から、消化の機構により得たグルコースを筋肉その他あらゆる細胞でエネルギー源として利用する。血糖として主に血液により運ばれてくるグルコースの細胞への取り込みは、脳等の特殊な場合を除いて、全てインスリンとそのレセプターの助けを借りて行われている。膵臓B細胞において、唯一の血糖降下性ホルモンであるインスリンの産生・分泌が円滑に行われない糖尿病にあっては、体外からこれを補給し細胞へのグルコースの取り込みの調節、即ち血糖値のコントロールを行わざるを得ない。糖尿病の治療におけるインスリンの投与方法にとって最も望ましいことは、摂食による血糖値の上昇に合わせて、必要量のインスリンが門脈内に放出され、速やかに肝臓でグルコースをグリコーゲンとして貯蔵させ、血糖値を低下させることである。⁷⁸⁾ 門脈内投与ということを除けば、この条件に最も近いのはベッドサイド型の人工膵臓であるが、患者はこの大きな装置を離れて生活することは出来ない。そこで便宜的に次の二法が行われる。即ち、

- 1) あらかじめ人工膵臓により、その患者の生活に合わせ、経時的なインスリン注入プログラムを作成し、それを組み込んだ、持続注入装置 (continuous 又は、controlled subcutaneous insulin infusion system, C S I I S)。
(76, 77)
- 2) 一定の持続的基礎注入に加え、食事に先立ち手動で必要量を急速追注するペン型 infuser¹⁶⁵⁾。

これまでのところ、実用的な、最もよい血糖コントロールを与えるとされているこれらの方法も、注射液中のインスリンの凝集、¹⁶⁶⁻¹⁶⁹⁾ 夜間の低血糖¹⁷⁰⁾ といったトラブルを別としても、糖尿病性網膜症の進展 (悪化)¹⁷¹⁾ という予期せざる結果を招く例も多く報告されており、従来通りの bolus投与 (multiple injectionを含む)の重要性は依然として変わりが無い。これらの方法に限らず、インスリン療法は投与プログラムの厳密さと、日常生活における煩わしさのバランスの上に成り立っているものといえる。そして多くの患者の場合、1日1~2回の bolus投与が採用されている。先に述べたように、最も望ましいインスリンの投与方法として、食事に合わせ門脈内にインスリンを補給できるのは経口投与のみである。インスリンの経口投与が可能となれば、上述のトラブルは全て

解決されるものと期待されるゆえんである。

動物はその生命現象を維持するのに必須の素材を食物として摂取するが、それらの素材は動植物の細胞そのものか細胞の生産した細胞間物質等であり、たいていは高分子物質である。従ってそのままでは生体に利用できないし体内への取り込みもできないので、利用しやすいように分解、即ち消化し体内に取り込むのが原則である。しかし、新生児期の短い期間、母乳よりの抗体の吸収の目的で蛋白分子の取り込みが行われる。¹⁷²⁾ この場合、微絨毛膜を巨大分子のままでは通過できないので、微絨毛膜間の細胞膜が陥入することにより蛋白分子は細胞内に移送され、陥入膜はその内腔にこれらの物質を収容したまま離断され食小胞となる。¹⁷²⁾ 即ちエンドサイトーシスとよばれる形式である。その後の成長によりこのような吸収は行われなくなり、少なくとも栄養学的な意味は持たないとされているが、食物アレルギー¹⁷³⁾等、生物学的には重要な意味を持っているにもかかわらず、成長後の動物における *in vivo* の蛋白質の腸管吸収については十分な研究がなされているとはいいい難い。Uhlenhuth及び Ascoliがウサギに卵白アルブミンを経口投与し、前者が抗体産生を、後者が血中に抗原活性を証明して以来蛋白質、特に酵素の吸収に関する報告が散見される。^{174, 175)} 投与した蛋白質が吸収されたことの証明にはそれぞれの蛋白質に応じ、¹³¹I や蛍光ラベルした蛋白質を投与し血中の放射活性や蛍光を測定する方法、radio immunoassay (RIA)法あるいは enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法等を利用するか、又は、生理活性を有する蛋白質あるいは酵素の場合は血中にそれぞれの活性を直接証明したり、*in vivo*での薬理作用で示す等の方法が用いられている。このようにして得られた諸家のデータから吸収量を推定すると、蛋白質により吸収の難易はあるものの、おおよそ、0.1~2%と考えられる。¹⁷⁵⁾ いずれにしても、消化という本来生理的な、強力な破壊力の網の目をくぐり抜けて微量の蛋白質が吸収される可能性は充分あるものと思われる。

インスリンの経口投与については、インスリン療法の導入以来強い要望があったにもかかわらず、未だに成功していない。上述のように、成熟動物においても0.1~2%吸収されるものとの予想に反して、イヌに 500U/kg のインスリンを腸溶性カプセルの形で投与した場合にも、血糖値に全く変化はみられなかった。0.1U/kgのインスリンを注射すれば血糖値は 約50%低下することを考えると、十

二指腸に投与されたインスリンは、多く見積もっても0.02%を越えて有効に利用されることはない、即ち、実に 5,000倍以上の開きがあるものと思われた。

しかし、Danforth¹⁷⁶⁾は反転腸管を用いて *in vitro*におけるインスリンの吸収について検討し、外液（粘膜側）より内腔（漿膜側）へ約2%の吸収を認めたと報告している。又、唐崎、¹⁷⁶⁾Shichiriら¹⁷⁷⁾はウサギを用いた*in vitro*の腸管灌流実験により、添加したインスリンの約18%が門脈血中に吸収されたことを示した。唐崎の実験においては、腸管粘膜は比較的生理的状态に近いと考えられ、消化酵素が存在しないことを除けば *in vivo*に近いものといえる。これらの実験報告は、消化酵素を抑えることさえ可能となれば、生理的活性を保持したままインスリン分子が腸管粘膜を通過することは充分可能であると予想されるものであった。

消化管内における蛋白質の消化・吸収の機序には、現在でも多くの疑問が残されている。一日の蛋白質の摂取量 約30~50gに対し、分泌されるトリプシン及びキモトリプシンの量は合わせて 約0.16~1gと推定されている¹³⁴⁾が、試験管内の反応においては、食塊としてのその量の蛋白質を、この量の酵素で充分加水分解することは不可能であるとされている。主として膵酵素による管腔内消化は、部分消化としての役割を果たすにとどまるものと位置づけられており、可溶化されたオリゴペプチドを、膜消化によりアミノ酸ないしジペプチドに分解し即座に吸収することは、管腔内の細菌等により栄養分を利用されることを避けるという合目的性と考えられている。¹³⁴⁾

管腔内において膵酵素によりインスリンが分解を受けるとすれば、主としてキモトリプシンによるものであろうことは、第一章の結果から明らかである。しかし、第三章に示したように、管腔内を洗浄した後に、インスリンを単独又はFK-448とともに小腸内に投与した場合、洗浄せずに投与した場合に比較しほとんど差がみられなかったことは、管腔内消化の影響は小さいものと考えざるを得ない。この結果は、Ugolevの膜消化の機構において重要な役割を果たす、glyco-calyxに吸着された膵酵素が、腸管内灌流によっては容易に除かれまいと考えるならば、矛盾は生じない(Fig. 21)。投与されたインスリンの挙動は、今後、消化・吸収機構に関する研究の進展に従い、明らかにされるものと思われる。

今回筆者の行ったビーグル犬における実験の結果は、通常、ヒトにおいて行われる経口投与と同じ方法によるものであり、かつてこのような方法により血糖降下作用が認められたという報告はない。しかし、先に述べたように、個体差の問題、作用発現までに要する時間の問題を始め、まだ多くの難問を抱えており、経口インスリンの開発はいまだ緒についた段階といわざるを得ない。

[結論]

I キモトリプシン阻害剤の活性と化学構造の関係

水溶性キモトリプシン阻害剤を得る目的で、芳香環又は脂環を有するカルボン酸のフェニルエステルを合成した。構造と活性について検討した結果次のことが明らかになった。

a) Acyl component について

- 1) インドール、ナフタレン、テトラリン等 two-ring systemを含むカルボン酸のエステルは、ベンゼン、シクロヘキサン等 one-ring systemを含むカルボン酸及び three-ring systemを含むカルボン酸のエステルより強いキモトリプシン阻害活性を示した。
- 2) ピリジン、キノリン等塩基性を有する環を含むカルボン酸のエステルは強い阻害活性を示さなかった。
- 3) 脂環（シクロヘキサン、テトラリン）を含む acyl componentは芳香環（ベンゼン、ナフタレン等）を含む acyl componentとほぼ同等の阻害活性を与えた。

b) Phenyl component について

- 1) アリルエステルはアルキルエステルより強い阻害活性を示した。
- 2) フェニルエステルのベンゼン環の4位の置換基が活性に与える影響は、塩基性置換基 > 中性置換基（無置換を含む） > 酸性置換基の順であった。

塩基性置換基相互の間にも影響の強弱に規則性がみられ、キモトリプシンに塩基を吸着する活性siteが存在するものと考えられるが、阻害剤のエステル部分から塩基までの距離等については明確でなかった。

- 3) ナフチル酢酸等の (4-guanidinobenzoyloxy)phenyl esters及び 4-amidinophenyl estersは、ともにキモトリプシンに対し強い阻害を示すと同時にトリプシンに対しても阻害を示した。
- 4) フェニルエステルのベンゼン環の4位に塩基性置換基を有する阻害剤（塩基性エステル）は塩として水に可溶性の化合物が多かったが、特にアルキルアミノ基を持つ化合物は塩酸塩として高い溶解度を示した。

II FK-448のキモトリプシン阻害活性の作用機序

4-(4-Isopropylpiperazinocarbonyl)phenyl 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoate methanesulfonate (FK-448)をモデルとしてキモトリプシンに対する阻害の形式について検討した。

- 1) FK-448はキモトリプシンに対し可逆的な拮抗型の阻害を示し、N-acetyl-L-tyrosine ethyl esterを基質とした場合の K_i は、約 $1 \times 10^{-7}M$ であった。
- 2) キモトリプシン以外のセリンプロテアーゼに対しては、強い阻害を示さなかった。
- 3) キモトリプシンとの反応の過程で酵素のアシル化を伴う、基質類似の作用機構をとるものと推定された。

III 経口インスリン製剤に適したキモトリプシン阻害剤の選択

阻害スペクトル、水溶性等物性の異なる多くの阻害剤が得られたので、これらを経口インスリン製剤に応用した。

膵酵素及び小腸ホモジネートとインスリンの反応において、キモトリプシン阻害剤は蛋白分解酵素阻害剤の中で最も強いインスリン分解抑制作用を示した。又、十二指腸内に蛋白分解酵素阻害剤とインスリンを併用投与した場合、キモトリプシン阻害剤のみインスリンの吸収増強作用を示した。

併用するキモトリプシン阻害剤の必要条件について検討した結果、

- 1) キモトリプシン阻害の IC_{50} 値が $1 \times 10^{-6}M$ 以下の強い阻害活性が必要であった。
- 2) トリプシンを阻害する必要はなかった。
- 3) 高い水溶性が必要であった。

これらの条件を満たし、毒性の低い阻害剤として、FK-448を選択した。

IV 蛋白性医薬品の消化管吸収に対するキモトリプシン阻害剤の増強作用

a) インスリンの消化管吸収

- 1) FK-448の、インスリンの消化管吸収に対する増強作用は、ラット、ウサギ、ビーグル犬のいずれを用いた場合にも認められた。
- 2) インスリンと 20mg/kgのFK-448を、腸溶性カプセルとしてビーグル犬に経口投与した場合のインスリンの吸収率は、インスリン 0.1U/kgを皮下投

与した場合の血漿中immunoreactive insulin(I R I)濃度-時間曲線下面積(A U C)から計算して、約1%であった。

3) インスリンの吸収率を高める目的で、各種医薬品添加物の吸収増強作用を調べた結果、クエン酸にその作用が見出された。クエン酸は小腸内のp Hを一時的に低下させることによってインスリン及び/又はFK-448の分解を抑制したものと推定された。12.5U/kgのインスリンと20mg/kgのFK-448に、30mg/kgのクエン酸を添加することによって、血糖降下作用は非添加時の約2.5倍に上昇した。

b) その他の蛋白性医薬品の消化管吸収

リゾチーム及びストレプトキナーゼは、キモトリプシン阻害剤の併用により、消化管からの吸収が増強された。この方法は、その他の蛋白性医薬品の経口投与にも応用が可能なものと考えられた。

V FK-448の消化管におけるインスリン吸収増強機序

インスリン(63U/kg)とFK-448(20mg/kg)をラット小腸loop内に投与し、FK-448の吸収増強作用について検討した結果、

1) FK-448に血糖降下作用はみられなかった。

2) FK-448の、小腸粘膜透過性亢進作用は弱かった。

3) Loop内を栄養液で洗浄してもインスリンの吸収に著明な変化はみられなかった。

4) 門脈血漿中にK iを上回る濃度のFK-448が検出された。

以上のことから、FK-448は主に腸管粘膜に吸着されたキモトリプシン及び/又は粘膜中のキモトリプシン様酵素によるインスリンの分解を抑制することによりインスリンの吸収率を高めたものと推定された。又、この時の門脈血漿中のI R I濃度のA U Cを、空腸静脈内にインスリンを持続注入した場合のA U Cと比較し、インスリンの吸収率は、約0.7%と推定された。

[文献]

- 1) E.Reich, D.B.Rifkin and E.Shaw, "Proteases and Biological Control," Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., 1975
- 2) 一島英治, "プロテアーゼ," 学会出版センター, 東京, 1983
- 3) B.S.Hartley and D.L.Kauffman, *Biochem. J.*, 101, 229 (1966)
- 4) B.W.Matthews, P.B.Sigler, R.Henderson and D.M.Blow, *Nature*, 214, 652 (1967)
- 5) J.Kraut, *Annu. Rev. Biochem.*, 46, 331 (1977)
- 6) 崎山文夫, *生化学*, 55, 166 (1983)
- 7) 飛田亨, 安藤鋭郎, 石井信一, "蛋白分解酵素と生体制御," 村地孝, 浅田敏男, 藤井節郎編, 東京大学出版会, 東京, 1977, p.p.206-252
- 8) A.C.Satterthwait and W.P.Jenks, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 7018 (1974)
- 9) M.L.Bender, G.R.Schonbaum and B.Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 2540 (1962)
- 10) M.L.Bender and B.Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 2550 (1962)
- 11) N.Katunuma, E.Kominami, K.Kobayashi, Y.Banno, K.Suzuki, K.Chichibu, Y.Hamaguchi and T.Katsunuma, *Eur. J. Biochem.*, 52, 37 (1975)
- 12) H.Umezawa, T.Aoyagi, H.Morishima, S.Kunimoto, M.Matsuzaki, M.Hamada and T.Takeuchi, *J. Antibiot.*, 23, 425 (1970)
- 13) P.M.Starkey and A.J.Barrett, *Biochem. J.*, 155, 273 (1976)
- 14) H.R.Gutmann and J.S.Fruton, *J. Biol. Chem.*, 174, 851 (1948)
- 15) R.R.Ludwig and H.Braunsteiner, *Biochim. Biophys. Acta*,

- 379, 606 (1975)
- 16) M. Jusic, S. Seifert, E. Weiss, R. Haas and P. C. Heinrich, Arch. Biochem. Biophys., 177, 355 (1976)
 - 17) Y. Sanada, N. Yasogawa and N. Katunuma, Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 108 (1978)
 - 18) B. Schick, K. F. Austen and L. B. Schwartz, J. Immunol., 132, 2571 (1984)
 - 19) R. G. Woodbury and H. Neurath, Biochemistry, 17, 4298 (1978)
 - 20) M. K. Patrick, I. J. Dunn, A. Buret, H. R. P. Miller, J. F. Huntley, S. Gibson and D. G. Gall, Gastroenterol., 94, 1 (1988)
 - 21) S. Kitagawa, F. Takaku and S. Sakamoto, J. Clin. Invest., 65, 74 (1980)
 - 22) G. Adler, U. Rausch, F. Weidenbach, R. Arnold and H. F. Kern, Klin. Wochenschr., 62, 406 (1984)
 - 23) M. Iwaki, Y. Ino, A. Motoyoshi, M. Ozeki, T. Sato, M. Kurumi and T. Aoyama, Jpn. J. Pharmacol., 41, 155 (1986)
 - 24) A. D. McCutcheon and D. Race, Ann. Surgery, 158, 233 (1963)
 - 25) R. Vogel, I. Trautschold und E. Werle, "Natürliche Proteinase-Inhibitoren," Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1966
 - 26) I. Trautschold, E. Werle and G. Z. Rüdell, Biochem. Pharmacol., 16, 59 (1967)
 - 27) G. Schoellmann and E. Shaw, Biochemistry, 2, 252 (1963)
 - 28) R. A. Oosterbaan, P. Kunst, J. Van Rotterdam and J. A. Cohen, Biochim. Biophys. Acta, 27, 556 (1958)
 - 29) N. K. Schaffer, S. C. May, Jr. and W. H. Summerson, J. Biol. Chem., 202, 67 (1953)
 - 30) E. F. Jansen, F. Nutting, R. Jang and A. K. Balls, J. Biol. Chem., 179, 189 (1949)
 - 31) K. Kurachi, J. C. Powers and P. E. Wilcox, Biochemistry, 12,

- 771 (1973)
- 32) B. Imperiali and R.H. Abeles. *Biochemistry*, 25, 3760 (1986)
 - 33) W.B. Lawson and H.J. Schramm, *Biochemistry*, 4, 377 (1965)
 - 34) M.J. Sofia and J.A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.*, 29, 230 (1986)
 - 35) R.A. Wallace, A.N. Kurtz and C. Niemann, *Biochemistry*, 2, 824 (1963)
 - 36) B.F. Erlager and W. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 348 (1963)
 - 37) M.L. Bender, G.E. Clement, F.J. Kézdy and B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 358 (1963)
 - 38) M. Muramatu and S. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, 268, 221 (1972)
 - 39) 横尾信夫, 服部英三, 平田光輝, 渡辺好一郎, 佐藤文泰, 永倉正彦, 藤井節郎, *薬誌*, 107, 732 (1987)
 - 40) 横尾信夫, 服部英三, 平田光輝, 渡辺好一郎, 佐藤文泰, 永倉正彦, 藤井節郎, *薬誌*, 108, 443 (1988)
 - 41) S.A. Bernhard and Z.H. Tashjian, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1806 (1965)
 - 42) B.S. Hartley and B.A. Kilby, *Biochem. J.*, 56, 288 (1954)
 - 43) P.S. Roberts, *J. Biol. Chem.*, 232, 285 (1958)
 - 44) Y. Tamura, M. Hirado, K. Okamura, Y. Minato and S. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, 484, 417 (1977)
 - 45) T. Aoyama, T. Okutome, T. Nakayama, T. Yaegashi, R. Matsui, S. Nunomura, M. Kurumi, Y. Sakurai and S. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 1458 (1985)
 - 46) M.M. Guia and E. Shaw, *J. Biol. Chem.*, 242, 5782 (1967)
 - 47) K. Tanizawa, Y. Kasaba and Y. Kanaoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 4485 (1977)
 - 48) K. Tanizawa, A.B. McLaren, W.B. Lawson and Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 913 (1986)

- 49) F. Markwardt, G. Wagner, P. Walsmann, H. Horn and J. Stürzebecher, *Acta Biol. Med. Germ.*, 28, 19 (1972)
- 50) A. D. Turner, D. M. Monroe, H. R. Roberts, N. A. Porter and S. V. Pizzo, *Biochemistry*, 25, 4929 (1986)
- 51) M. M. Guia, E. Shaw and W. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 242, 5777 (1967)
- 52) S. V. Pizzo, A. D. Turner, N. A. Porter and S. L. Gonias, *Thrombosis and Haemostasis*, 56, 387 (1986)
- 53) B. R. Baker, "Design of active-site-directed irreversible enzyme inhibitors" J. Wiley and Sons Inc., New York, 1976, p. 116
- 54) ONO Pharmaceutical Co. Ltd., Ger. Patent 2548886 (1976)
- 55) A. M. Gold and D. Fahrney, *Biochemistry*, 3, 783 (1964)
- 56) E. B. Ong, E. Shaw and G. Schoellmann, *J. Biol. Chem.*, 240, 694 (1965)
- 57) H. Lineweaver and D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934)
- 58) M. Dixon, *Biochem. J.*, 55, 170 (1953)
- 59) S. Fujii, T. Yokoyama, K. Ikegaya and N. Yokoo, *J. Biochem.*, 95, 319 (1984)
- 60) 藤井節郎, 徳弘孝夫, 加山直宏, 伊藤博之, 平田文雄, 林正樹 公開特許公報, 昭53-147044 (1978)
- 61) T. Yokoyama, N. Yokoo, F. Sato, K. Ikegaya, E. Hattori, K. Watanabe, J. Kirihara, M. Nagakura and S. Fujii, Kinin '87 Tokyo International Congress, 1987
- 62) M. Muramatu, T. Onishi, S. Makino, S. Fujii and Y. Yamamura, *J. Biochem.*, 57, 402 (1965)
- 63) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 64) T. Yokoyama and S. Fujii, *Jap. J. Clin. Chem.*, 15, 338 (1986)
- 65) 村地孝, 代謝, 3, 576 (1966)

- 66) K.Katayama and T.Fujita, *Biochim. Biophys. Acta*, 288, 181 (1972)
- 67) 山口 穉子, 森脇 千秋, *現代医療*, 10, 1489 (1978)
- 68) F.Sanger and H.Tuppy, *Biochem. J.*, 49, 481 (1951)
- 69) F.Sanger and E.O.P.Thompson, *Biochem. J.*, 53, 353 (1953)
- 70) 中野 昭一, *最新医学*, 20, 2963 (1965)
- 71) R.N.Speth and H.J.Christian, *Diabetes*, 12, 243 (1963)
- 72) H.E.Lebovitz, *Drug Ther.*, 17, 37 (1987)
- 73) 林 洋一, *医学のあゆみ*, 129, 472 (1984)
- 74) 中川 昌一, *医学のあゆみ*, 113, 747 (1980)
- 75) R.C.Turner, M.A.Phillips and E.A.Ward, *Acta Med. Scand.*, 671, Suppl., 75 (1983)
- 76) A.Pietri, F.L.Dunn and P.Raskin, *Diabetes*, 29, 1001 (1980)
- 77) 河盛隆造, 東堂龍平, 窪田耕輔, 森島豊彦, 山崎義光, 清水靖久, 七里元亮, 阿部裕, *糖尿病*, 22, 573 (1979)
- 78) 繁田幸男, *プラクティス*, 1, 122 (1984)
- 79) 西岡豊, 川邑年四郎, *薬剤学*, 37, 119 (1977)
- 80) H.Bar-On, E.M.Berry, A.Eldor, M.Kidron, D.Lichtenberg and E.Ziv, *Br. J. Pharmac.*, 73, 21 (1981)
- 81) E.Ziv, M.Kidron, E.M.Berry and H.Bar-On, *Life Sci.*, 29, 803 (1981)
- 82) B.J.Aungst, N.J.Rogers and E.Shefter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 23 (1988)
- 83) 河村茂男, 川田裕溢, 前野弘夫, 大畑勲雄, 市川邦英, *公開特許公報*, 昭53-18723 (1978)
- 84) T.Nishihata, J.H.Rytting, T.Higuchi and L.Caldwell, *J. Pharm. Pharmacol.*, 33, 334 (1981)
- 85) T.Nishihata, M.Sudoh, H.Inagaki, A.Kamada, T.Yagi, R.Kawamori and M.Shichiri, *Int. J. Pharmaceut.* 38, 83 (1987)
- 86) G.G.Liversidge, T.Nishihata, K.K.Engle and T.Higuchi,

- Int. J. Pharmaceut. 30, 247 (1986)
- 87) T.Nishihata, Y.Okamura, H.Inagaki, M.Sudoh, A.Kamada, T.Yagi, R.Kawamori and M.Shichiri, Int. J. Pharmaceut., 34, 157 (1986)
- 88) S.Kim, A.Kamada, T.Higuchi and T.Nishihata, J. Pharm. Pharmacol., 35, 100 (1983)
- 89) 西岡豊, 川邑年四郎, 薬剂学, 38, 67 (1978)
- 90) 黒木保広, 石井丈由, 高村彰, 野呂俊一, 上杉孝, 第五回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, (1982) p 84
- 91) T.Nishihata, G.Liversidge and T.Higuchi, J. Pharm. Pharmacol, 35, 616 (1983)
- 92) 横須賀智子, 大森安恵, 平田幸正, 平井真一郎, 糖尿病, 20, 146 (1977)
- 93) A.C.Moses, G.S.Gordon, M.C.Carey and J.S.Flier, Diabetes, 32, 1040 (1983)
- 94) S.Hirai, T.Yashiki and H.Mima, Int. J. Pharmaceut., 9, 173 (1981)
- 95) G.S.Gordon, A.C.Moses, R.D.Silver, J.S.Flier and M.C.Carey, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 7419 (1985)
- 96) M.Mishima, Y.Wakita and M.Nakano, J. Pharmacobio-Dyn., 10, 624 (1987)
- 97) M.Ishida, Y.Machida, N.Nambu and T.Nagai, Chem. Pharm. Bull., 29, 810 (1981)
- 98) Y.Shigeta, M.Shichiri, A.Okada and K.Karasaki, Endocrinology, 91, 320 (1972)
- 99) E.von Schenker and P.Speiser, Dtsch. Apoth. Ztg., 127, 1980 (1987)
- 100) 橋本宗明, 橋爪稔, 高田寛治, 村西昌三, 三本勤, 木曾良明, 日本薬学会第108年会講演要旨集, p.551 (1988)
- 101) 芳賀信, 前沢由起子, 斎藤勝実, 加藤百合子, 日本薬学会第108年会講演要旨集, p.526 (1988)

- 102) E. Touitou, M. Donbrow and A. Rubinstein, *J. Pharm. Pharmacol.*, 32, 108 (1980)
- 103) J. A. Galloway and M. A. Root, *Diabetes*, 21, Suppl. 2, 637 (1972)
- 104) M. S. Mesiha, *Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed.*, 9, 137 (1981)
- 105) T. Nishihata, J. H. Rytting, A. Kamada and T. Higuchi, *Diabetes*, 30, 1065 (1981)
- 106) K. Fukushima and S. Toyosima, *医学のあゆみ*, 138, 59 (1986)
- 107) 福島紘司, 藤田陽子, 団克昭, 瀬戸淑子, 豊島滋, *糖尿病*, 25, 402 (1982)
- 108) E. Danforth, Jr. and R. O. Moore, *Endocrinology*, 65, 118 (1959)
- 109) M. Kidron, H. Bar-On, E. M. Berry and E. Ziv, *Life Sci.* 31, 2837 (1982)
- 110) G. L. Haberland, J. Pütter und W. Puls, *Med. Pharmacol. Exp.*, 14, 297 (1966)
- 111) E. Ziv, O. Lior and M. Kidron, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1035 (1987)
- 112) M. Laskowski, Jr., H. A. Haessler, R. P. Miech, R. J. Peanasky and M. Laskowski, *Science*, 127, 1115 (1958)
- 113) M. Shichiri, R. Kawamori, M. Yoshida, N. Etani, M. Hoshi, K. Izumi, Y. Shigeta and H. Abe, *Diabetes*, 24, 971 (1975)
- 114) M. Shichiri, Y. Shimizu, Y. Yoshida, R. Kawamori, M. Fukuchi, Y. Shigeta and H. Abe, *Diabetologia*, 10, 317 (1974)
- 115) R. H. Engel, S. J. Riggi and M. J. Fahrenbach, *Nature*, 219, 856 (1968)
- 116) M. Shichiri, R. Kawamori, Y. Goriya, M. Kikuchi, Y. Yamasaki, Y. Shigeta and H. Abe; *Acta Diabetologica Latina*, 15, 175 (1978)
- 117) J. F. Arrieta-Molero, K. Aleck, M. K. Sinha, C. M. Brown-sheidle, L. J. Shapiro and M. A. Sperling, *Hormone Res.*,

- 16, 249 (1982)
- 118) H. M. Patel, R. W. Stevenson and J. A. Parsons, *Biochim. Biophys. Acta*, 716, 188 (1982)
- 119) H. M. Patel and B. E. Ryman, *FEBS Letters*, 62, 60 (1976)
- 120) T. Nadai, R. Kondo, A. Tatematsu and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 20, 1139 (1972)
- 121) T. Nishihata, J. H. Rytting and T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, 70, 71 (1981)
- 122) R. W. Stevenson, J. A. Parsons and K. G. M. M. Alberti, *Am. J. Physiol.*, 244, E190 (1983)
- 123) 山崎義光, 河盛隆造, *糖尿病*, 31, Suppl. 1, 65 (1988)
- 124) Y. Shigeta, M. Shichiri, Y. Harano, R. Kawamori and H. Abe, "Proinsulin, Insulin, C-Peptide," ed. by S. Baba, T. Kaneko and N. Yanaihara, Elsevier North-Holland, 1978, p. 311
- 125) G. Marchis-Mouren, L. Paséro and P. Desnuelle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 262 (1963)
- 126) P. J. Keller, E. Cohen and H. Neurath, *J. Biol. Chem.*, 233, 344 (1958)
- 127) C. Figarella, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 97 (1966)
- 128) 藤井節郎, 横山融, 池ヶ谷耕司, 横尾信夫, *臨床化学*, 13, 7 (1984)
- 129) T. C. Tsao and K. Bailey, *Biochim. Biophys. Acta*, 11, 102 (1953)
- 130) E. Roberts and G. Rouser, *Anal. Chem.*, 30, 1291 (1958)
- 131) H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada and T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, 23, 259 (1970)
- 132) H. Umezawa, "Enzyme Inhibitors of Microbial Origin," University of Tokyo Press, 1972
- 133) K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada and I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 523 (1978)
- 134) 内藤博, *化学と生物*, 18, 551 (1980)

- 135) M. Shichiri, A. Okada, K. Karasaki, R. Kawamori, Y. Shigeta and H. Abe, *Diabetes*, 21, 203 (1972)
- 136) P. Jollès, *Angew. Chem.*, 76, 20 (1964)
- 137) 木村一郎, “免疫学・アレルギー学実験法,” 進藤宙二監修, 文光堂, 東京, 1971, p.272
- 138) 桑島実, 河合忠, *臨床検査*, 16, 693 (1972)
- 139) G. Alderton, W. H. Ward and H. L. Fevold, *J. Biol. Chem.*, 157, 43 (1945)
- 140) K. N. N. Reddy and G. Markus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 672 (1973)
- 141) L. Summaria and K. C. Robbins, *J. Biol. Chem.*, 246, 2136 (1971)
- 142) H. Kato, N. Adachi, Y. Ohno, S. Iwanaga, K. Takada and S. Sakakibara, *J. Biochem.*, 88, 183 (1980)
- 143) 横尾信夫, 佐藤文泰, 桐原順子, 横山融, 池ヶ谷耕司, 永倉正彦, 藤井節郎, *臨床化学*, 14, 8 (1985)
- 144) 横尾信夫, 佐藤文泰, 藤井節郎, *臨床化学*, 15, 264 (1986)
- 145) 高岸靖, 土居義男, 星 登, 公開特許公報, 昭56-32413 (1981)
- 146) 平井通博, 清水豊一, 特許公報, 昭56-3848 (1981)
- 147) J. L. Radomski, E. Brill, W. B. Deichmann and E. M. Glass, *Cancer Research*, 31, 1461 (1971)
- 148) J. A. John, C. D. Blogg, F. J. Murray, B. A. Schwetz and P. J. Gehring, *Teratology*, 19, 321 (1979)
- 149) 横尾信夫, 藤井節郎, 鈴木徳治, *薬誌*, 108, 164 (1988)
- 150) H. A. Krebs and K. Henseleit, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 210, 33 (1932)
- 151) R. S. Yalow and S. A. Berson, *J. Clin. Invest.*, 39, 1157 (1960)
- 152) 灘井種一, 西井絹代, 立松晃, *薬誌*, 92, 388 (1972)
- 153) S. Fujii, T. Yokoyama, K. Ikegaya, F. Sato and N. Yokoo, *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, 545 (1985)

- 154) 田港朝彦, 松倉茂, “経腸栄養,” 佐藤博監修, 小越章平編集, 朝倉書店, 東京, (1984) p. 105
- 155) 山元寅男, “経腸栄養,” 佐藤博監修, 小越章平編集, 朝倉書店, 東京, (1984) p. 63
- 156) A. M. Ugolev and P. D. Laey, *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 105 (1973)
- 157) 野村武則, 小田桐玲子, 明石弘子, 出村黎子, 出村博, *医学と薬学*, 9, 225 (1983)
- 158) 坂口武一, “医薬品定量分析,” 南江堂, 東京, 1961, p. 34
- 159) 高橋照孝, 上園裕子, 藤岡弘, *薬剤学*, 43, 61 (1983)
- 160) 原健次, 立花恭三郎, 内藤聖二, 公開特許公報, 昭55-153712 (1980)
- 161) J. P. Bantle, D. C. Laine, G. W. Castle, J. W. Thomas, B. J. Hoogwerf and F. C. Goetz, *New Eng. J. Med.*, 309, 7 (1983)
- 162) D. J. A. Jenkins, T. M. S. Wolever, R. H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J. M. Baldwin, A. C. Bowling, H. C. Newman, A. L. Jenkins and D. V. Goff, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 362 (1981)
- 163) 関根邦男, 鈴木嘉樹, 山下源太郎, 山口久夫, 公開特許公報, 昭56-138110 (1981)
- 164) Evaluation of the Toxicity of a Number of Antimicrobials and Antioxidants; Sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1962)
- 165) B. Regling, *Therapiewoche*, 37, 3219 (1987)
- 166) B. V. Fisher and P. B. Porter, *J. Pharm. Pharmacol.*, 33, 203 (1981)
- 167) W. D. Loughheed, H. W. Flanagan, J. R. Clement and A. M. Albisser, *Diabetologia*, 19, 1 (1980)
- 168) V. Feingold, A. B. Jenkins and E. W. Kraegen, *Diabetologia*, 27, 373 (1984)
- 169) J. Bringer, A. Heldt and G. M. Grodsky, *Diabetes*, 30, 83

(1981)

- 170) S. M. Teutsch, W. H. Herman, D. M. Dwyer and J. M. Lane, *New Eng. J. Med.*, 310, 361 (1984)
- 171) E. Helve, L. Laatikainen, L. Merenmies and V. A. Koivisto, *Acta Endocrinol.*, 115, 313 (1987)
- 172) 黒住一昌, *細胞*, 15, 98 (1983)
- 173) W. A. Walker and K. J. Bloch, *Annals of Allergy*, 51, 240 (1983)
- 174) A. L. Warshaw, W. A. Walker and K. J. Isselbacher, *Gastroenterol.*, 66, 987 (1974)
- 175) 村地孝, *化学と生物*, 19, 37 (1981)
- 176) 唐崎健吉, *糖尿病*, 16, 28 (1973)
- 177) M. Shichiri, A. Okada, R. Kawamori, N. Etani, Y. Shimizu, M. Hoshi, Y. Shigeta and H. Abe, *Endocrinology*, 93, 1371 (1973)

掲載雑誌目録

本稿の各部、章に記述した内容は、それぞれ以下の投稿論文に基づくものである。

第一部 キモトリプシン阻害剤の合成と阻害活性

第一章 カルボン酸無置換フェニルエステルの阻害活性：

- 1) 横尾信夫、服部英三、平田光輝、渡辺好一郎、佐藤文泰、永倉正彦、藤井節郎、水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究、薬誌、107、732 (1987)

第二章 ハイドロキシン安息香酸誘導体エステルの阻害活性：

- 1) 横尾信夫、服部英三、平田光輝、渡辺好一郎、佐藤文泰、永倉正彦、藤井節郎、水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究、薬誌、107、732 (1987)
- 2) 横尾信夫、服部英三、平田光輝、渡辺好一郎、佐藤文泰、永倉正彦、藤井節郎、水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究 (第二報)、薬誌、108、443 (1988)

第三章 ハイドロキノンヘテロジエステルの阻害活性；

第四章 アミジノフェニルエステルの阻害活性；

第五章 その他の化合物の阻害活性：

- 2) 横尾信夫、服部英三、平田光輝、渡辺好一郎、佐藤文泰、永倉正彦、藤井節郎、水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究 (第二報)、薬誌、108、443 (1988)

第六章 キモトリプシン阻害の作用機序：

- 1) 横尾信夫、服部英三、平田光輝、渡辺好一郎、佐藤文泰、永倉正彦、藤井節郎、水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究、薬誌、107、732 (1987)
- 3) S.Fujii, T.Yokoyama, K.Ikegaya and N.Yokoo, New Synthetic Inhibitors of Chymotrypsin, J. Biochem., 95, 319 (1984)

第二部 キモトリプシン阻害剤併用によるインスリンの経口投与の試み

第一章 蛋白性医薬品の消化酵素による分解と酵素阻害剤によるその抑制：

- 4) 藤井節郎、横山 融、池ヶ谷耕司、横尾信夫、新しいキモトリプシン阻害剤 FK-448の性質と、インスリンの経腸吸収におよぼす影響について、臨床化学、13、7 (1984)

第二章 阻害剤の選択：

- 5) 横尾信夫、佐藤文泰、桐原順子、横山 融、池ヶ谷耕司、永倉正彦、藤井節郎、インシュリンの腸管吸収に及ぼすキモトリプシン阻害剤の作用、臨床化学、14、8 (1985)
- 6) 横尾信夫、佐藤文泰、藤井節郎、キモトリプシン阻害剤併用によるインシュリン経口投与の試み、臨床化学、15、264 (1986)

第三章 インスリンの消化管からの吸収過程における FK-448の役割：

- 7) 横尾信夫、藤井節郎、鈴木徳治、インスリンの消化管吸収に対するキモトリプシン阻害剤 FK-448の増強作用、薬誌、108、164 (1988)

第四章 経口インスリン製剤化の試み：

- 6) 横尾信夫、佐藤文泰、藤井節郎、キモトリプシン阻害剤併用によるインシュリン経口投与の試み、臨床化学、15、264 (1986)
- 8) S.Fujii, T.Yokoyama, K.Ikegaya, F.Sato and N.Yokoo, Promoting effect of the new chymotrypsin inhibitor FK-448 on the intestinal absorption of insulin in rats and dogs, J. Pharm. Pharmacol., 37, 545 (1985)

謝 辞

本論文作成に際し、懇篤な御指導と御助言を賜りました 千葉大学薬学部 生物薬剤学教室 鈴木徳治教授、生薬学教室 村越 勇教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるに当たり、終始御指導と御鞭撻をいただきました 大阪大学 名誉教授 藤井節郎博士に慎んで謝意を表します。

本論文の作成を許可し、適切な御助言をいただきました 興和株式会社 専務取締役 加納宏一郎氏、興和総合科学研究所長 谷 英郎博士、東京研究所長 大谷元治博士、東京研究所 生物研究部長 織田 健博士、薬効第二研究課長 永倉正彦博士、薬効第一研究課長 中村政記博士に深謝いたします。

本研究の実験に御協力いただきました 興和株式会社 東京研究所 有機化学研究課 服部英三氏、平田光輝氏、国枝 永氏、渡辺好一郎氏、薬効第二研究課 佐藤文泰氏、桐原順子氏、横山 融氏、池ヶ谷耕司氏、広瀬由美子氏、分析を担当していただいた大川 泰氏、本葉カツ子氏、吉村三夫氏、石河芳治氏、依田宏子氏、製剤を担当していただいた 富士研究所 製剤第一研究課長 小川典之博士、堀 平二氏に感謝いたします。