

フェノキシ酢酸系および安息香酸系除草剤の Caco-2 細胞への取り込み機構

著者	塚越 建介
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成28年度
学位授与番号	30110甲第282号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064449/

研究発表要旨

フェノキシ酢酸系および安息香酸系除草剤の Caco-2 細胞への取り込み機構

平成 28 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

塚越 建介

【目的】 近代除草剤の幕開けは 1942 年、米国での 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) の開発、またほぼ時を同じくして英国での 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) の開発にはじまる。フェノキシ酢酸 (phenoxyacetic acid; PA) を基本構造とする 2,4-D と MCPA はオーキシン作用 (植物成長ホルモン) を有しているが、天然植物ホルモンと比べて代謝されにくい。これらは急激に植物の成長を促進させることで、種々の新陳代謝のバランスを失調させて除草効果を有する。MCPA は除草剤として、PA は成長促進剤として、現在でもわが国で使用されている。安息香酸系化合物もフェノキシ酢酸系除草剤と同様にオーキシン作用を有し、除草剤として使用されている。これらの除草剤のヒトおよび実験動物での消化管吸収は良好であるが、その開発された時期が古いために、吸収機構について詳細な検討がされないまま今日に至っている。

弱酸性化合物である MCPA の消化管吸収は良好であることから、 H^+ 依存性の monocarboxylic acid transporters (MCTs) が関与していることが予想された。MCTs は多くの分子種を含んでおり、酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸を輸送し、また安息香酸 (benzoic acid; BA)、桂皮酸 (cinnamic acid; CA)、フェルラ酸 (ferulic acid; FA)、フルオレセインなどの芳香族モノカルボン酸系化合物も輸送する。短鎖脂肪酸の輸送は乳酸により拮抗阻害を受け、CHC (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) はこれらの化合物の特異的な阻害剤である。一方、芳香族モノカルボン酸系化合物の輸送は乳酸や CHC による阻害をほとんど受けず、BA により拮抗阻害を受ける。

本研究は、フェノキシ酢酸系および安息香酸系除草剤が MCTs により吸収されることを小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞を用いて明らかにした。さらに塩素原子や水酸基などの置換による吸収 (細胞内取り込み) の変化を検討し、CA や FA 類似化合物の場合と比較した。

【実験方法】 本実験はコンフルエントに達した Caco-2 細胞を使用した。培養液を除草剤などの化合物を含む 37°C の Hanks' balanced salt solution に置換して、所定時間インキュベートした。その後、細胞内に取り込まれた化合物を HPLC にて測定した。

【結果・考察】

1. Caco-2 細胞の頂側膜側から MCPA の取り込みは pH が低いほど高かった。MCPA の取り込みは BA により拮抗阻害を受け、BA の前処理による trans-stimulation 効果が認められた。しかし、乳酸や CHC による取り込み阻害効果は小さかった。これらの結果から、MCPA は主に BA と同じサブタイプの MCTs を介して細胞内に取り込まれると思われる。

2. PA、4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)、2,4-D および 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) の取り込みを比較した。PA の取り込みは最も低く、塩素原子の増加に伴い取り込みが増加した。2,4-D と 2,4,5-T の場合には BA の前処理による trans-stimulation 効果が認められた。これらの化合物の取り込み量は担体輸送と単純拡散の総和であるとして、 K_m 、 V_{max} および K_d を求めた。また脂

溶性の指標として 1-octanol と HBSS の分配係数(P)を測定した。塩素原子の置換数の増加により P は増加し、 K_m は低下したが、 K_d には変化が認められなかった。塩素原子の置換数の増加による脂溶性の増加は、MCTs との親和性を増加させ、その取り込みを促進すると考えられる。

3. BA の誘導体である 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba) と 3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid (Triclopyr) の取り込みを比較した。Triclopyr の取り込みは BA と FA により拮抗的な阻害を受けたが乳酸や CHC による阻害は認められなかったことから、Triclopyr はフェノキシ酢酸系化合物や BA と同じサブタイプの MCTs で取り込まれると考えられる。一方、Dicamba の取り込みは Triclopyr より顕著に低く、代謝阻害剤の影響を受け無かった。Dicamba の取り込みの低さは、置換基の影響と思われた。

4. Triclopyr と Dicamba の相違を検討するため、塩素原子及びメキシ基を置換した種々の BA 化合物の取り込み量を比較した。塩素原子を1つ置換した BA 化合物の取り込みはその位置にかかわらず BA の場合とほぼ同じであった。2 ないし 3 つの塩素原子を置換した BA 化合物の取り込みは、2 位と 6 位に置換した場合には顕著に低下したが、それ以外の位置では変化が認められなかった。また 2 位と 6 位の塩素原子のいずれかをメキシ基で置換した場合でも顕著な低下が認められた。このことからベンゼン環の 2 位と 6 位に置換基をもつ BA 化合物の MCTs による取り込みの低さは、これらの置換基が MCTs へのアクセスを阻害していることが原因と思われた。そこで置換基とカルボン酸の距離が離れた 2,6-dichlorophenylacetic acid の取り込みを測定したところ、その取り込み量は BA とほぼ同じ値であった。これらの結果から、BA の 2 位と 6 位の置換基はカルボン酸の MCTs へのアクセスを阻害しているとする仮説が支持された。

5. CA 化合物の MCTs による Caco-2 細胞への取り込みは、そのベンゼン環への水酸基の導入により減少することが知られている。そこで、フェノキシ酢酸および BA 化合物に水酸基を導入した場合の取り込みを検討した。PA に水酸基を導入した p-hydroxyphenoxyacetic acid の取り込みは PA より低かった。BA のオルト位、メタ位およびパラ位への水酸基の導入はこれら化合物の取り込みを低下させ、水酸基を2つ導入した場合には、さらなる顕著な減少が認められた。これらの取り込みの減少は脂溶性の低下が原因と思われる。

CHC (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) は短鎖脂肪酸の特異的な阻害剤であるが、芳香族モノカルボン酸系化合物の取り込みに対する阻害効果は少ない。この CHC の選択的な阻害効果には、CHC のもつシアノ基と水酸基によると予想されたので、その点について検討した。CHC および α -cyanocinnamic acid (CN-CA) の取り込みは CA に比べて顕著に低かった。CHC 及び CN-CA は BA の取り込みにはほとんど影響を与えなかったが、CA は顕著に阻害した。CHC による短鎖脂肪酸の MCTs による阻害様式は不明であるが、CHC 自身の取り込みが顕著に低いことから、CHC による拮抗阻害の可能性は低い。 α 位のシアノ基による MCTs へのアクセスの阻害とベンゼン環の水酸基による脂溶性の低下が CHC による短鎖脂肪酸化合物の選択的な取り込み阻害に関与していると思われる。

【結論】 フェノキシ酢酸系化合物および安息香酸系化合物は BA と同じサブタイプの MCTs で Caco-2 細胞に取り込まれる。フェノキシ酢酸系化合物のベンゼン環へ塩素原子を導入すると脂溶性が増加して取り込みが増加し、水酸基の導入は脂溶性を低下させて取り込み減少させると考えられる。安息香酸系の 2 位と 6 位の置換基および CHC の α 位のシアノ基はカルボン酸の MCTs へのアクセスを阻害することで取り込みを減少させると考えられる。