

炎症性腸疾患治療薬E3040の
尿酸排泄促進機構および動態学的解析

山 田 治 美

【博士論文】

①

炎症性腸疾患治療薬 E3040 の
尿酸排泄促進機構および動態学的解析

山田 治美

目次

	頁
序論	1
第1章 ラットおよびマウスにおける E3040 の尿酸排泄促進作用 の動態学的解析	13
1-1 高尿酸モデルラットにおける E3040 の尿酸排泄促進作用	14
1-2 DBA/2Nマウスを用いた E3040 の尿酸排泄促進機構の解析	36
第2章 ラット腎刷子縁膜小胞を用いた腎尿酸輸送に対する E3040 の作用	55
第3章 他薬物に対する E3040 の相互作用	75
3-1 他薬物のラット体内動態に対する E3040 の作用	76
3-2 ラット腎刷子縁膜、側底膜小胞を用いた他薬物への E3040 の作用	94
総括	115
謝辞	117

序論

医薬品開発における、副作用機構解析と、相互作用予測の重要性

近年、ソリブジンと5-フルオロウラシル系抗癌剤との併用で起こった死に至るような重篤な薬害に代表される、薬物間相互作用の問題が大きく注目されている。医薬品の開発において、医薬品はその品質、有効性ととも安全性の確立が必須条件になっている。しかしながら、市販後に重篤な副作用、毒性作用が報告され、発売中止になった医薬品も少なくない。例えば、スピゾフロロン(肝毒性)、ジレバロール(肝障害)、クリダナク(胃腸障害)などがそうであり、また、アスピリン(ライ症候群)、ベスナリン(無顆粒球症)などはその副作用により使用が制限されている。近年、上記のソリブジンによる薬害を契機に、医薬品の適正使用への本格的な取組や、新薬開発の段階においても予想される相互作用に関して、非臨床データをとる重要性が提唱されつつある。例えば、動物実験および *in vitro* 実験による、新規ニューキノロン系抗菌剤に関する相互作用予測(Kawakami et al., 1993; Kawakami et al., 1995) や、動物モデルを用いた心血管系副作用の定量的予測(Ohtani et al., 1996) や、最も重篤な相互作用を引き起こす代謝阻害に関して、肝細胞や、遺伝子レベルにおける代謝酵素の詳細な検討などにより代謝レベルでの相互作用に関する検討が数多く研究されている。

一方、代謝以外の相互作用として知られているのが、腎排泄に関する相互作用である。アニオン系薬物輸送を阻害するプロベネシドは、腎排泄型薬剤である非ステロイド系消炎鎮痛剤(Seegmiller and Grayzel, 1960; Runkel et al., 1978; Dash and Mills, 1976)、メトトレキサート(Bourke et al., 1975; Kates et al., 1976)、クロルプロパミド(Stowers et al., 1958)な

どと腎排泄過程において相互作用し、また、シメチジンに代表されるカチオン系薬物のH₂遮断薬は、同じカチオン系薬物のプロカインアミドと相互作用し (Somogyi and Heinzow, 1982; Somogyi et al., 1983; Christian et al., 1984)、いずれの薬物もその効果を増強させることが知られている。さらに近年、p-糖タンパク質を介して尿細管分泌されるジゴキシンが、基質であるキニジンによってその分泌が阻害されることが明らかにされている (Tanigawara et al., 1992)。これら腎臓における薬物輸送や相互作用は、腎近位尿細管上皮細胞に存在する有機アニオン、カチオン系薬物輸送系、ジペプチド輸送系、p-糖タンパク輸送系などが関わっている。これらの輸送系は、上皮細胞の刷子縁膜と側底膜にそれぞれ局在し、その基質や輸送機構が異なることが知られている。この輸送機構の解析系として、刷子縁膜と側底膜をそれぞれ分離精製して膜小胞とし、その小胞内部への取込みや、内部からの efflux 機構を解析する膜輸送実験系が大きな役割を果たしている (乾, 1994)。

しかしながら、生体内物質あるいは薬物の腎排泄機構における種々薬物との、相互作用予測とその回避の研究に関しては十分になされているとは言えない。

炎症性腸疾患治療薬E3040の尿酸排泄促進作用

エーザイ株式会社で開発された、E3040 (6-hydroxy-5, 7-dimethyl-2-methylamino-4- (3-pyridylmethyl) benzothiazole) (Fig. 1) は、潰瘍性大腸炎、クローン病などの難治性疾患である炎症性腸疾患治療薬として開発された薬物で、アラキドン酸カスケードの炎症性メディエータである、5-リポキシゲナーゼ、トロンボキサン合成酵素抑制効果、サイトカイン、活性酸素などの広範囲なメディエータ産生に対する抑制効果を有するMulti-Mediators Inhibitor であり、炎症部位で直接その効果を発揮し、潰瘍性大腸炎モデルラットに有効性

を示し、炎症性腸疾患 (IBD) 治療薬として臨床的有用性が期待されている薬物である。

E3040は、臨床開発の第I相試験の段階において、健康人への反復投与試験でE3040実薬投与群の全員の血清尿酸レベルが、投与前値と比較して約50%の有意な低下が認められ、投与終了後速やかに正常範囲へ回復し、プラセボ群では変化は見られていない (Fig. 2)。一方、尿中への尿酸排泄量はE3040投与群でプラセボ群に較べて高いことが見いだされている (Fig. 3)。従って、この健康人における血清中尿酸レベルの低下は、E3040に起因するものと考えられた (エーザイ (株) 社内資料)。

この血清中尿酸レベルの低下の原因として、E3040がアロプリノールのように、プリン体よりキサンチンを経て尿酸を合成する際に関わる酵素のキサンチンオキシダーゼ抑制作用を有するか、あるいは、尿酸排泄促進作用を有することが考えられた。そこで、尿酸合成の抑制についての検討において、尿酸生成酵素であるキサンチンオキシダーゼ活性の抑制作用を示すアロプリノールと異なり、E3040にはその阻害作用がないことが確認されている (Fig. 4) (エーザイ (株) 社内資料)。従って、健康人における血清中尿酸レベルの低下は、E3040による尿酸排泄促進作用によるものと考えられた。

一方、尿酸は有機アニオン系の物質であり、腎臓で尿中に排泄されることが知られている。また、先に述べたとおり、腎臓の近位尿細管上皮細胞には有機アニオン系物質の輸送系が存在しており、尿酸を始めとして、*p*-aminohippuric acid (PAH) (Kahn et al., 1983)、メトトレキサート (Saito et al., 1996) などの有機アニオン系薬物が、このアニオン輸送系により輸送されることが明らかにされている。また、臨床で繁用されている尿酸排泄促進薬のプロベネシドは、尿酸のみならず有機アニオン系薬物と腎排泄過程において相互作用することが数多く報告されている。そこで、この尿酸排泄促進作用を有することが予想されるE3040も、プロベネシドと同様に、有機アニオン系薬物を始めとして、腎排泄型の

薬物と相互作用を起こす可能性が考えられた。

また、ヒトおよび実験動物に投与後の E3040 は、主として肝臓において抱合代謝を受け、Sulfate および Glucuronide に代謝された後、尿および胆汁中に排泄される薬物である (Fig. 5)。これらの抱合代謝物は、いずれも有機アニオン系の物質であるため、E3040 の尿酸排泄に対する作用は、E3040 未変化体のみならず Sulfate および Glucuronide の関与の可能性も考えられた。

そこで本研究では、E3040 をモデル薬物として用い、この薬物の生体内内因性物質の腎挙動に及ぼす影響を検討し、さらに E3040 の腎排泄過程における薬物間相互作用について検討した。

本研究の目的

本研究では、ラットを用いて E3040 による尿酸排泄促進作用発現について調べ、E3040 および抱合代謝物の体内動態との検討を行なう (第 1 章 1-1)。また、マウスを用いて、E3040 の尿酸排泄促進作用の作用機構の解析を行う (第 1 章 1-2)。そして、E3040 の尿酸排泄促進作用を、腎尿細管に存在する有機アニオン系輸送機構における尿酸の挙動に対する効果として、*in vitro* 実験系において検討を行う (第 2 章)。また、尿酸と同様に腎有機アニオン系により輸送される有機アニオン系薬物の腎挙動に対する E3040 の効果を *in vivo* ラットを用いて検討し (第 3 章 3-1)、さらに、腎尿細管に存在する有機アニオン、カチオン輸送系に対する E3040 の効果を検討する (第 3 章 3-2)。

引用文献

- Bourke, R. S., Chhada, G., Bremer, A., Watanabe, O. and Tower, D. B.; Inhibition of renal tubular transport of methotrexate by probenecid.; *Cancer Res.*, 35 : 110-116 (1975)
- Christian, C. D., Meredith, C. G. and Speeg, K. V.; Cimetidine inhibits renal procainamide clearance.; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 36 : 221-227 (1984)
- Dash, H. and Mills, J.; Severe metabolic acidosis with nalidixic acid over dose.; *Ann Intern Med.*, 84 : 570 (1976)
- Kahn, A. M., Branham, S. and Weinman, E. J.; Mechanism of urate and *p*-aminohippurate transport in rat renal microvillus membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.* ; 245 : F151-F158 (1983)
- Kates, R. Z., Tozer, T. N. and Sorby, D. L.; Increased methotrexate toxicity due to concurrent probenecid administration.; *Biochem. Pharmacol.*, 25 : 1485-1488 (1976)
- Kawakami, J., Shimokawa, M., Yamamoto, K., Sawada, Y., Asanuma, A., Yanagisawa K. and Iga, T.; Inhibition of GABA_A receptor-mediated current responses by enoxacin (new quinorone) and felbinac (non-steroidal anti-inflammatory drug) in *Xenopus* Oocytes injected with mouse-brain messenger RNA.; *Biol. Pharm. Bull.*, 16 : 726-728 (1993)
- Kawakami, J., Asanuma, A., Yamamoto, K., Sawada, Iga, T. and Yanagisawa K.: Consulative of new quinolone antimicrobial agents (NQs) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) due to inhibition of GABA_A receptor-mediated current responses.; *Jpn. J. Physiol.* , 45 (Sup. 1): S123 (1995)
- Ohtani, H., Hanada, E., Yamamoto, K., Sawada and Iga, T.; Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the electrocardiographic effects of terfenadine and quinidine in rats.; *Biol. Pharm.*

Bull., 19: 1189-1196 (1996)

Runkel, R., Mroszcak, E., Chaplin, M., Sevelius, H. and Segre, E.; Naproxen-probenecid interaction.; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24: 706 (1978)

Saito, H., Masuda, S. and Inui, K.; Cloning and functional characterization of novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in rat kidney.; *J. Biol. Chem.*, 271: 20719-20725 (1996)

Seegmiller, J. E. and Grayzel, A. I.; Use of the newer uricosuric agents in the management of gout.; *J. Amer. Med. Ass.*, 173: 1076 (1960)

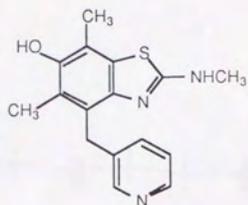
Somogyi, A. and Heinzow, B.; Cimetidine reduces procainamide elimination.; *N. Engl. J. Med.*, 307: 1080 (1982)

Somogyi, A., MacLean, A. and Heinzow, B.; Cimetidine-procainamide pharmacokinetic interaction in man: evidence of competition for tubular secretion of basic drugs.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 25: 339-345 (1983)

Stowers, J. M., Mahler, R. F. and Hunter, R. B.; Pharmacology and mode of action the sulphonylureas in man.; *Lancet* i: 278 (1958)

Tanigawara, Y., Okumura, N., Hirai, M., Yasuhara, M., Ueda, K., Kioka, N., Komono, T. and Hori, R.; Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1).; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263: 840-845 (1992)

乾賢一: 日本膜学会編・膜学実験シリーズ・第1巻・生体膜編(塩澤義則 他・編), 共立出版: pp. 86-90 (1994)



E3040

Fig. 1 Chemical structure of E3040

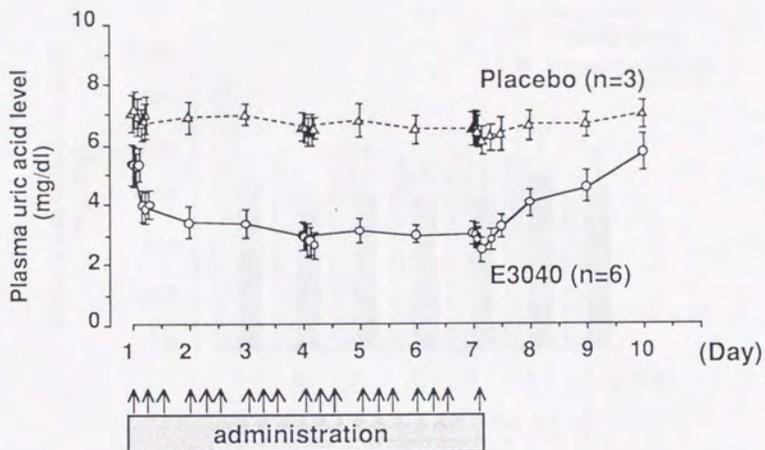


Fig. 2 Time courses of plasma uric acid level in healthy volunteers (mean \pm S.E.)

day 1-6 : 3 times/day, day 7 : 1 time/day.

Dose : 200 mg \times 3 times.

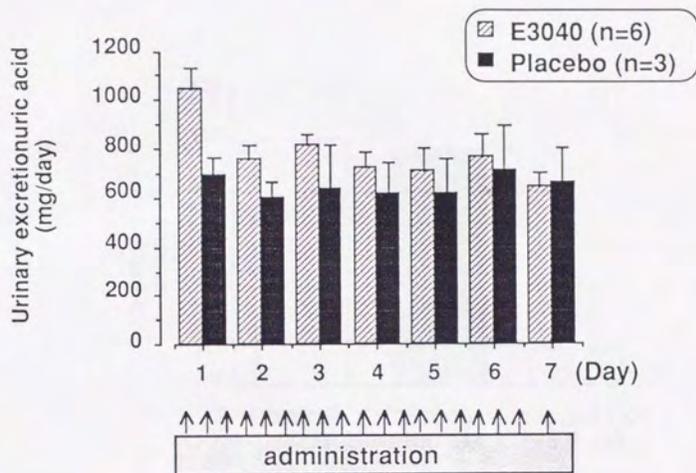


Fig. 3 Change in urinary excretion of uric acid in healthy volunteers (mean \pm S.E.)

day 1-6 : 3 times/day, day 7 : 1 time/day. Dose : 200 mg \times 3 times.

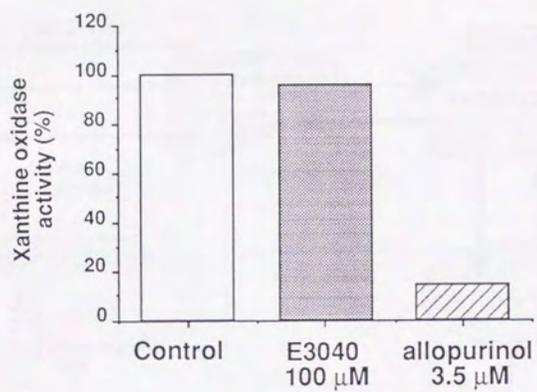


Fig. 4 Lack of inhibitory effect of E3040 on xanthine oxidase activity. (n=2)

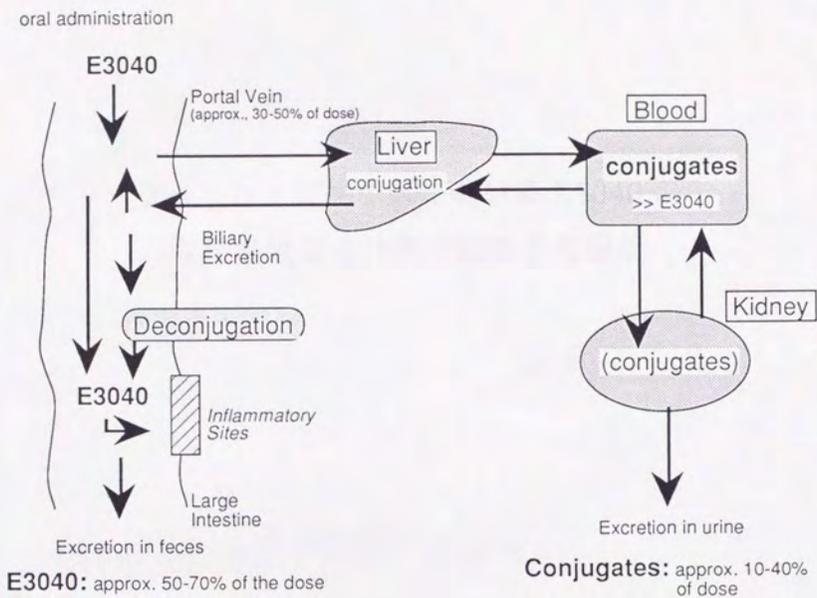


Fig. 5 Characteristics of pharmacokinetics of E3040 in experimental animals

第1章

ラットおよびマウスにおける E3040 の
尿酸排泄促進作用の動態学的解析

第1章

1-1

高尿酸モデルラットにおける E3040 の 尿酸排泄促進作用

緒言

エーザイ（株）で開発された、E3040 (6-hydroxy-5, 7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole) は、5-リボキシゲナーゼ阻害作用とトロンボキサン合成酵素阻害作用を有する Dual Inhibitor であり、さらに腹腔浸出細胞からの TNF 産生を抑制する作用も有する炎症性腸疾患 (IBD) 治療薬として臨床的有用性が期待される薬物である。また、経口投与された E3040 は、動物実験において投与量の約 30-50% が小腸から吸収され、主として肝臓において sulfate (E3040-Sul) および glucuronide (E3040-Glu) に抱合代謝され、胆汁中と尿中に排泄されることが、ヒトおよび実験動物により確かめられている。

この E3040 の臨床第 I 相試験の、反復投与試験において、E3040 実薬投与群の全員の血清尿酸レベルに、投与前値と比較して約 50% の低下が認められ、投与終了後速やかに正常範囲へ回復するが、プラセボ群ではその変化は見られていない。このことより、血清尿酸値の低下は、E3040 に起因するものと考えられた。

in vitro 実験において、E3040 は尿酸生成酵素であるキサンチンオキシダーゼ活性に影響を及ぼさないことが示されており、E3040 による血清尿酸値の低下は、尿酸の生成抑制ではなく、腎臓における尿酸排泄促進作用であることが考えられる (エーザイ (株) 社内資料)。

一方、実験動物として繁用されるげっ歯類 (ラット、マウス等) は、ヒトとは異なり、主として肝臓中に尿酸を allantoin に転換させる酵素のウリカーゼを有しており、ヒトの正常血漿中尿酸レベル (< 7.5 mg/dl) に比べて低い値 (1-2 mg/dl) を示すこと、各種尿酸排泄促進薬に対する感受性がヒトとは異なることが知られている (Roch-Ramel and Peters, 1978; Ullrich and Greger, 1988; Dan et al., 1989)。また、Smith および Dan らは、げっ歯類が

有しているウリカーゼを抑制する oxonate を投与して作成した高尿酸モデルラットを用いて (Fig. 1)、各種尿酸排泄促進薬の効果を報告しており、この高尿酸モデルラットは、尿酸排泄促進効果の解析に有用であると考えられる (Smith et al., 1979; Dan et al., 1994)。

そこで、本章では、高尿酸モデルラットを用いて、E3040 およびその抱合代謝物の尿酸排泄促進作用の有無を調べ、次いで、尿酸排泄作用のメカニズムに関する検討を行った。さらに、E3040 の薬物動態について調べ、E3040 の尿酸排泄促進作用との関係について解析を行った。

材料および方法

実験材料

使用動物

Wistar 系雄性ラット (体重 240 ~ 280 g) は (株) 日本医科学動物資材研究所 (東京) より購入し、環境整備されたステンレスケージに入れて飼育した。水および飼料 (MF 実験動物用固形飼料 ラット・マウス : オリエンタル酵母工業 (株)・東京) は実験に供するまで自由に摂食させた。

使用薬物

E3040、E3040-Sulfate (E3040-Sul) 及び E3040-Glucuronide (E3040-Glu) はエーザイ (株) (東京) より提供された。Oxonic acid, potassium salt (oxonate) は、Aldrich Chem. Co. (WI, U.S.A.) より、Inulin、mannitol およびウリックアシッド-テストワコーは、和光純薬 (株) (東京) より購入した。その他の全ての試薬は HPLC 用または、特級のものを使用した。

in vivo 動物実験

高尿酸モデルラットの作成

高尿酸モデルラットは、oxonate を 0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) に懸濁し、250 mg/3ml/kg の量をラットの腹腔内に投与して作成した。

クリアランス実験

ラットを、ether 麻酔した後、膀胱にカニューレ (Hibiki no. 8; ヒビキ本舗; 東京) を挿入し、次いで左大腿動・静脈にカニューレーション (SP31; 夏目製作所; 東京) を施した。薬物投与 60 min 前に、上記の方法で調製した oxonate の CMC 懸濁液を腹腔内投与し、同時に 3% mannitol、1.5% inulin を 0.9% 生理食塩水に溶解したものを、10 ml/kg の容量で静脈内に瞬時投与した後、直ちに 10 ml/kg/hr の速度でテルフェュージョンシリンジポンプ (model STCS25; テルモ (株)、東京) を用いて定速注入した。血漿中尿酸値が有意に上昇する oxonate 投与後 60 分に、E3040 (50, 20 mg/kg)、E3040-Sul 及び E3040-Glu (各々 100, 50 mg/kg) を静脈内に瞬時投与した。control として生理食塩水のみを投与した。各薬物投与後 1 時間までは 30 分毎に、3 時間までは 60 分毎に尿を採取し、その mid point で血液試料を採取した。血漿中及び尿中の inulin 濃度は、anthon を用いる White の方法により測定し (White, 1954)、血漿中及び尿中の尿酸濃度は、ウリックアシッド-テストワコーを用い、リンタングステン酸法により測定した。糸球体濾過速度の指標である inulin clearance (CLin) は、採取した尿中へのイヌリン排泄量を尿採取期間の中間で採取した血液より求めた血漿中イヌリン濃度で除した値より算出し、uric acid clearance (CLurate) も同様にして求めた。尿細管での尿酸排泄作用を示す fractional excretion of uric acid (FEurate; CLurate/CLin) は、inulin clearance で uric acid clearance を除することにより算出した。Fig. 2 に実験のスキームを示す。

薬物動態実験

ラットを、ether 麻酔した後、右大腿動・静脈にカニューレーション (SP31; 夏目製作所; 東京) を施した。E3040 (50, 20, 10 mg/kg) および E3040-Sul (20, 10, 50 mg/kg) を静脈内

投与し、カニューレより薬物投与後 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 分毎に血液を 200 μ l 採取し、遠心分離後、血漿を採取した。腎臓は、薬物投与後、15, 60, 120, 180 分に ether 麻醉下に開腹し、腹部大動脈を切断して完全に脱血した後、腎臓を採取し秤量した。採取した試料は、-20 $^{\circ}$ C で測定まで冷凍保存した。

血漿および腎臓中の E3040 および Sulfate 濃度の測定

1) E3040 の測定

血漿：採取した血漿 0.1 ml に internal standard (4Q-276) を加え混合した後、0.4 ml のアセトニトリルを加え、氷温で 10 分放置し遠心分離後、上清を採取し、測定サンプルとし、その 25 μ l を下記の HPLC カラムに注入した。

腎臓：摘出した腎臓に 0.6 M Briton-Robinson Buffer (pH 6.0) を加えて 20% ホモジナイズ液を調製し、このホモジネート 0.5 ml に internal standard (4Q-276) を加えた後、5.5 ml の isopropyl ether を加え、10 分間振盪し、3100 rpm で 5 分間遠心分離した。上相を分取し、50 mM H₃PO₄ 0.3 ml を加え、さらに 10 分間振盪し、3100 rpm で 5 分間遠心分離した。上相を aspirator 減圧下で除去した水相を HPLC サンプルとし、その 25 μ l を下記の HPLC カラムに注入した。

HPLC 条件：移動相として、1/15M Phosphate buffer (pH6.8) : Acetonitrile (6:4, v/v), containing 50 mM NaClO₄ and 0.01% EDTA 2Na を用い、column は、YMC AP-313, 250*6.0 mm I.D., S-5 μ m, 300A (YMC Co. Ltd.; 東京) を使用した。column 温度は 40 $^{\circ}$ C に設定し、流速 1.0 ml/min とした。検出器として、SHIMADZU L-ECD-6A (5nAUSF, 550 mV) (SHIMADZU Co.; 東京) を使用した。

検出限界は、血漿で 10 ng/ml、腎臓では 100 ng/ml であった。

2) E3040-Sul の測定

血漿：血漿 0.1 ml に internal standard (4Q-297) を加え混合した後、0.4 ml のアセトニトリルを加え、氷温で 10 分放置し遠心分離後、上清を採取し、その 50 μ l を下記の HPLC カラムに注入した。

腎臓：腎臓の 0.6 M Britton-Robinson Buffer (pH 6.0)、20% ホモジネート 0.5 ml に internal standard を加え混合した後、0.4 ml の acetonitril を加え、混合し、3100 rpm で 10 分間遠心分離して除蛋白し、上相を 0.7 ml 分取、H₂O 2.2 ml を加えた。あらかじめ、3 vol の H₂O と methanol で活性化した bondelut (C18; 3 cc; 200 mg) に spike し、4 ml の 10% methanol で洗い、3 ml の methanol で溶出したものを乾燥 N₂ で乾固し、200 μ l の H₂O で溶解し、3100 rpm で 10 分間遠心分離した上清の 50 μ l を下記の HPLC カラムに注入した。

HPLC 条件：移動相として、CH₃CN : 1% NaClO₄, pH3.0 adjusted by HClO₄ (16:84, v/v) を使い、column は、YMC AP-313, 250*6.0 mm I.D., S-5 μ m, 300A (YMC Co. Ltd.; 東京) を使用した。column 温度は 25°C に設定し、流速 1.5 ml/min とした。検出器として、SPD-6AV UV-VIS spectrometric detector (SHIMADZU Co.; 東京) を使用し、検出波長 262 nm に設定した。

検出限界は、血漿で 100 ng/ml、腎臓では 1 μ g/ml であった。

データの検定

血漿中の各薬物濃度の測定値は Means \pm S.D. で示し、他の測定値は全て Mean \pm S.E. で示した。有意差検定は、多項目有意差検定 (ANOVA) にて検定し、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

結果

Fig. 3 に、ラットに oxonate potassium salt 250 mg/kg、または vehicle の0.5% CMC を腹腔内投与した後の血漿中尿酸レベルの時間変化を示す。oxonate 投与群において、投与後 30 分から 240 分までの血漿中尿酸レベルは、vehicle 投与群に比べて顕著に高い値を維持した。従って、本方法により、高尿酸モデルラットが作成できたと考え、定型クリアランス実験は、有意な血漿中尿酸レベルの上昇がみられる、oxonate 投与後、60分から 240 分の期間で行なった。

Fig. 4 に、各薬物投与時の FEurate 値の時間変化を示す。panel A に示す E3040 投与群では、50 mg/kg の投与量において投与後 30 分から 90 分の間で FEurate は control 群に比べて有意に上昇した。20 mg/kg では有意差は得られなかったが、投与後 30 分で FEurate は上昇傾向にあった。panel B に示す E3040-Sul 投与群では、投与量が 100 mg/kg の時のみ投与後 30 分で FEurate の一過性の上昇が見られたが有意差は認められなかった。一方、50 mg/kg 投与時では、FEurate の上昇は見られなかった。panel C に示す E3040-Glu は、100 および 50 mg/kg の高投与量でも FEurate に有意な変化は観察されなかった。また、薬物投与後 0-30 分後におけるイヌリンクリアランスは、E3040 投与 (50 mg/kg) で 11.3 ± 0.5 ml/kg/min、E3040-Sul 投与 (100 mg/kg) で 11.6 ± 1.4 ml/kg/min であり、両群間で差は認められなかった。

Fig. 5 に、各薬物投与後の尿中尿酸排泄速度の変化を示す。E3040 投与群において、50 mg/kg の投与後の尿中尿酸排泄速度は、control 群に比べて投与後 30 分から増大し、60 分まで有意に増大した (Fig. 5, panel A)。E3040-Sul 100 および 50 mg/kg 投与後の尿酸排泄速度の増大はほとんど見られなかった (Fig. 5, panel B)。E3040-Glu においても、尿酸排泄

速度に有意な変化は観察されなかった (Fig. 5, panel C)。

Fig. 6 に、E3040 静注後の血漿中 E3040 および E3040-Sul の時間推移 (panel A, B) と、E3040-Sul 静注後の血漿中 E3040-Sul の時間推移 (panel C) を示す。E3040 静注後の血漿中 E3040 濃度は速やかに減少し、その消失半減期は約 12 分であった (Fig. 6, panel A)。50 mg/kg 投与時の E3040 の全身クリアランス (CL_{tot}) および分布容積 (V_{dss}) の値は、10 および 20 mg/kg 投与時に比べて有意に減少した。代謝物である E3040-Sul の血漿中レベルは、E3040 投与後 10 分で最高に達し、その値は 50 mg/kg 投与時で約 45 µg/ml であった。一方、E3040-Sul 静注時では、5-20 mg/kg の投与量範囲において E3040-Sul の血漿中濃度曲線下面積 (AUC) は投与量に比例して増大した。

Fig. 7 に E3040 (50 mg/kg) の静注後の腎臓中の E3040 と E3040-Sul 濃度 (panel A) および E3040-Sul (100 mg/kg) 静注後の腎臓中 E3040-Sul 濃度 (panel B) を示す。50 mg/kg 投与時の腎臓中の E3040 未変化体濃度は、投与後 15 分で平均 22 µg/g wet tissue であり、以後速やかに低下した。また、腎臓中 E3040-Sul 濃度は、投与後 15 分で 50 mg/kg で 60 µg/g wet tissue、投与後 60 分でも 50 µg/g wet tissue の濃度であった。一方、E3040-Sul 100 mg/kg を静脈内投与した後の腎臓中 E3040-Sul 濃度は、投与後 15 分で 240 µg/g wet tissue と、6 倍以上の濃度を示し、60 分後でも 150 µg/g wet tissue と高い値を維持していた。

考察

尿酸は哺乳類においてプリン体代謝の最終代謝物であり、尿中に排泄されることが知られている。しかしながら、尿酸の腎臓での排泄には種差があり、例えば、正味の分泌を示す、ウサギ、ブタや、正味の再吸収を示すラット、マウス、イヌ、類人猿、ヒト等に分類することができる (Roch-Ramel and Weiner, 1980)。また、げっ歯類は、肝臓中に尿酸を allantoin に転換する酵素のウリカーゼが存在し、このため類人猿やヒト (正常値 < 7.5 mg/dl) に比べてげっ歯類の血漿中尿酸レベルは低い (1-3 mg/dl) ことが知られている (Roch-Ramel and Peters, 1978; Ullrich and Greger, 1988; Dan et al., 1989)。しかし、げっ歯類であるラットにウリカーゼ抑制作用を有する oxonate を投与することにより、通常のラットよりも高い血漿中尿酸レベルが維持されることが報告されており (Fig.1)、この高尿酸モデルラットを用いて、尿酸排泄作用を解析する実験がなされている (Smith et al., 1979; Dan et al., 1994)。本研究において、oxonate を腹腔内投与したラットが高い血漿中尿酸値を維持したことから (Fig.3)、この高尿酸モデルラットは、E3040 とその代謝物の腎臓における尿酸排泄促進作用を調べるための有用なモデル動物と考える。

腎臓での尿酸排泄メカニズムは、尿酸が腎糸球体で濾過された後、近位尿細管において再吸収された後、分泌され、再び再吸収されるという、4-component モデルで説明されている (Levinson and Sorensen, 1980)。そこで、本研究では尿酸の正味の排泄の変化を測定することにより、E3040 及びその抱合体の腎尿細管における尿酸排泄促進作用を解析した。

クリアランス実験において得られた、CLinulin の値 (約 11 ml/kg/min) は、Dan らの報告値とほぼ一致した (Dan et al, 1991; Dan et al., 1994)。また、E3040 および抱合体の投与

により、尿酸クリアランスおよび、尿酸排泄速度が上昇する投与後 0-30 分の間で、各群間でインスリンクリアランスに差は見られなかった。このことは、E3040 による尿酸クリアランスの上昇は、糸球体濾過量の差によるものではないことを示唆している。さらに、E3040 投与後に観察された FEurate 値および尿酸排泄速度の増大は、E3040 は腎尿細管における尿酸排泄促進作用を有することを示唆している。

E3040 の 10 および 20 mg/kg 投与後に得られた E3040 の CL_{tot} の値は、Takenaka が報告している 1mg/kg 投与後の値 (10 L/hr/kg) とほぼ一致した (Takenaka et al., 1995)。一方、E3040 50 mg/kg 投与時の E3040 の AUC は 20 mg/kg 投与時に比べて有意に上昇し、CL_{tot} は低下したことは、20 mg/kg の投与量以上では E3040 は非線型動態を示すことが示唆された。

E3040 静注後、腎臓中には代謝物の E3040-Sul が、E3040 よりも高濃度 (腎中/血漿中濃度比: 約 2) に見いだされた (Fig. 7; panel C)。一方、E3040-Sul (100 mg/kg) 静注により、一過性の FEurate の増大傾向が見られたが、この投与量での腎臓中の E3040-Sul 濃度は E3040 投与後に見いだされるよりも約 4 倍の高い濃度を示した。これらのことから、E3040 投与後に観察される FEurate の上昇に対する E3040-Sul の寄与はほとんどないと考えられた。

一方、E3040 の静脈内投与後に生成される E3040-Glu の血漿中濃度は E3040-Sul の約 1/7 と低いこと、また尿中への排泄量は E3040-Sul の約 1/10 であることが報告されており (Takenaka et al., 1995)、従って、腎臓中の E3040-Glu 濃度も低値であると考えられた。さらに、100 mg/kg の投与量においても、FEurate、尿酸排泄速度ともに上昇が観察されなかったことから、E3040-Glu には尿中排泄促進作用がほとんどないと考えられる。以上のことから、E3040 投与後に観察された尿酸排泄促進作用は、主に E3040 自体によるもので

あると考えられる。

まとめ

臨床第 I 相試験において観察された、ヒトの血清中尿酸レベルの低下が、E3040 によること、その尿酸レベルの低下は、E3040 の腎尿細管における尿酸排泄促進作用によって起こることを、ラットを用いた実験により明らかにした。さらに、ラットにおける E3040 の薬物動態の検討から、腎尿細管での尿酸排泄促進作用は、主として E3040 未変化体の作用であることが示唆された。

引用文献

- Dan, T., Koga, H., Onuma, E., Tanaka, H., Sato, H. and Aoki, B.; The activity of AA-193, a new uricosuric agent, in animals.; *Adv. Exp. Med. Biol.*, 253 A: 301-308 (1989)
- Dan, T., Onuma, E., Tanaka, H. and Koga, H.; A selective uricosuric action of AA-193 in rats: comparison with its effect on PAH secretion in vivo and in vitro.; *Arch. Pharmacol.*, 343 : 532-537 (1991)
- Dan, T., Yoneya, T., Onoma, M., Onoma, E., Ozawa, K.; Hypouricemic and uricosuric actions of AA-193 in a hyperuricemic rat model.; *Metabolism* 43 , 123-128 (1994)
- Levinson, D. J. and Sorensen, L. B.; Renal handling of uric acid in normal and gouty subjects: evidence for 4-component system.; *Annls. Rheum.*, 39 : 173-179 (1980)
- Roch-Ramel, F. and Peters, G.; Urinary excretion of uric acid in nonhuman mammalian species; Uric acid., *In handbook of Pharmacology*, 51: pp. 211-255, Springer-Verlag, New York (1978)
- Roch-Ramel, F. and Weiner, I. M.; Renal excretion of urate: factors determining the actions of drugs.; *Kidney Int.*, 18 : 665-676 (1980)
- Smith, R. D., Essenburg, A. D., Kaplan, H. R.; The pretreated rats as a model for evaluating hyperuricemic effects of antihypertensive drugs.; *Clin. Exp. Hypertens.*, 1: 487-504 (1979)
- Takenaka, O., Horie, T., Suzuki, H. and Sugiyama, Y.; Different biliary excretion system for glucuronide and sulfate of a model compound: Study using Eizai hyperbilirubinemic rats.; *J. Phamacol. Exper. Ther.*, 274 : 1362-1369 (1995)
- Ullrich, K. J., and Greger, R.; Approach to the study of tubule transport functions.; *In the Kidney: Physiology and pathophysiology*, ed. by D. W. Seldin and G. Giebisch, vol 1, chapter 20: pp.

427-469, Raven, New York (1985)

White R. P.; Determination of inulin in plasma and urine by use of anthrone.; *J. Lab. & Clin. Med.* ,

March , 475-478 (1954)



Fig. 1. Schematic representation of relationship between inulin, glucose and insulin.

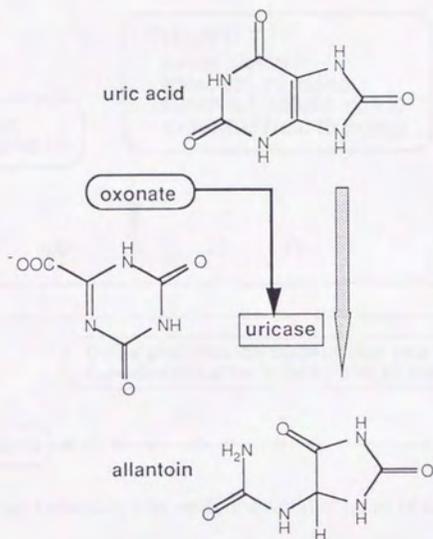


Fig. 1 Schematic representation of metabolic pathway of uric acid and the effect of oxonate on uricase in rats

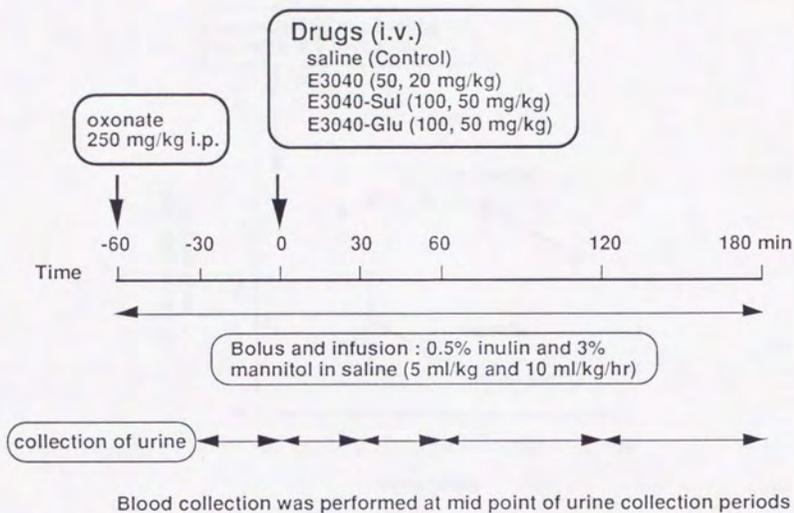


Fig. 2 Schematic representation of the experimental design of uric acid clearance study

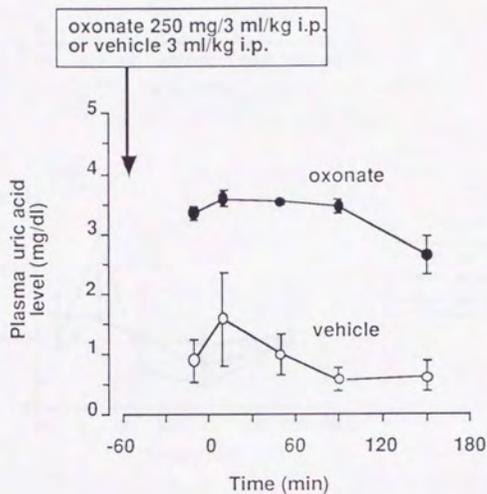


Fig. 3 Time courses of plasma uric acid level after i.p. administration of oxonate (●) (250 mg/3 ml/kg; i.p.) or vehicle (○) (3 ml/kg; i.p.). Each points were significantly different between at the same times. (mean \pm S.E.; n=3-5)

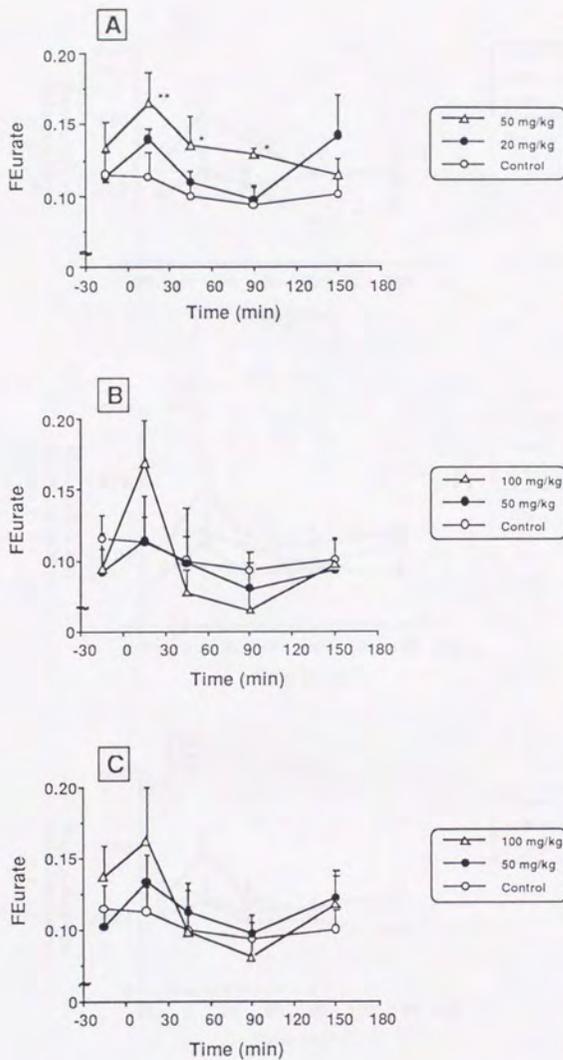


Fig. 4 Time courses of fractional excretion of uric acid (FEurate : CLurate/CLinulin) after i.v. administration of E3040 (panel A), E3040-Sul (panel B) and E3040-Glu (panel C).
 **, $p < 0.01$ vs. control
 *, $p < 0.05$ vs. control (mean \pm S.E., $n = 4-6$)

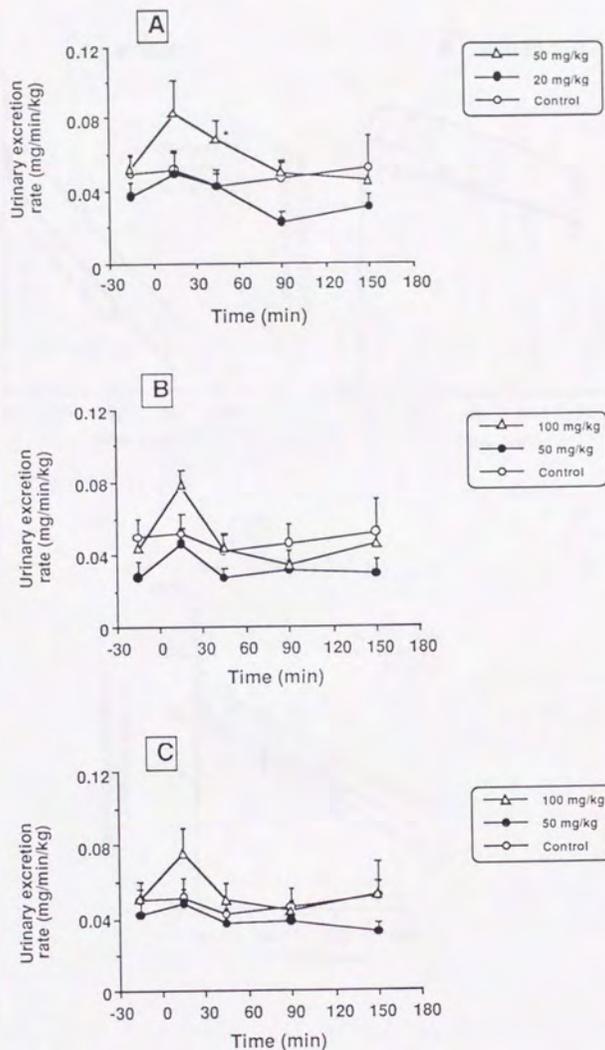


Fig. 5 Time courses of excretion rate of uric acid after i.v. administration of E3040 (panel A), E3040-Sul (panel B) and E3040-Glu (panel C). **, $p < 0.01$ vs. control *, $p < 0.05$ vs. control (mean \pm S.E., $n = 4-6$)

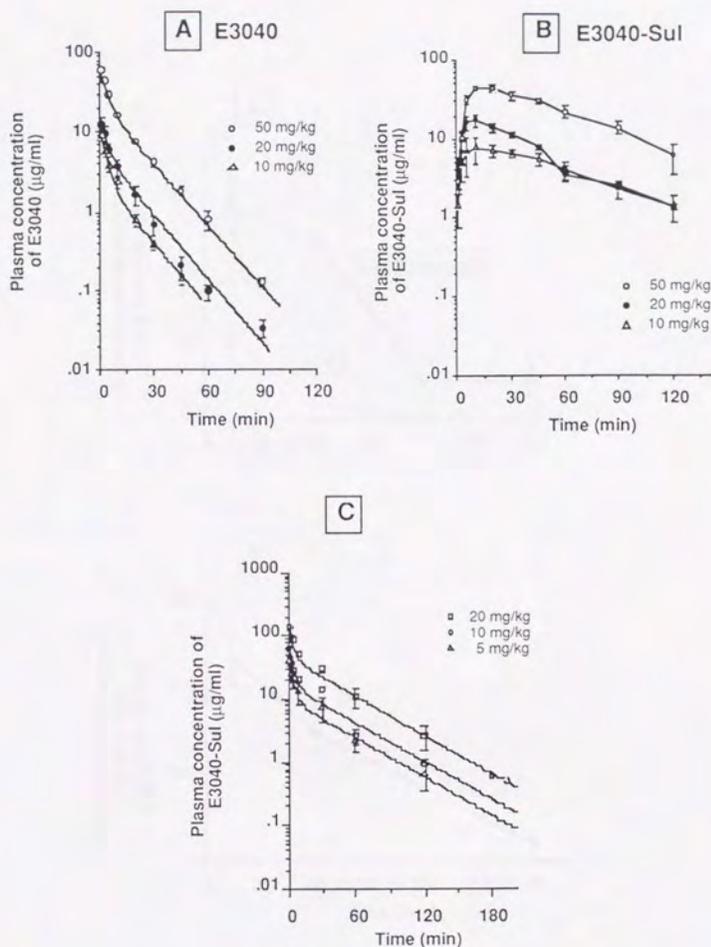


Fig. 6 Plasma concentration-time profiles of E3040 (Panel A) and its sulfate (E3040-Sul; Panel B) after i.v. injection of E3040 (10 - 50 mg/kg). Plasma concentration of E3040-Sul after i.v. injection of E3040-Sul (5 - 20 mg/kg) was also presented in panel C. (mean \pm S.D.; $n=3$)

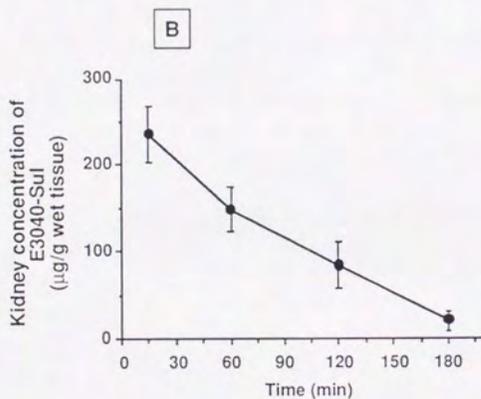
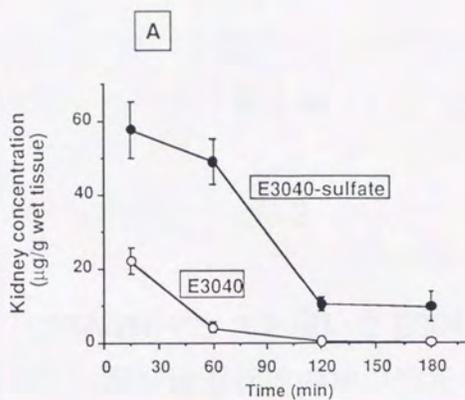


Fig. 7 Kidney concentration-time profiles of E3040 (○) and E3040-Sul (●) (Panel A) after i.v. injection of E3040 (50 mg/kg). kidney concentration of E3040-Sul (panel B) after i.v. injection of E3040-Sul (100 mg/kg). (mean \pm S.D.; n =3-5)

第1章

1-2

DBA/2N マウスを用いた E3040 の 尿酸排泄促進機構の解析

緒言

第1章 1-1において、高尿酸モデルラットにおける検討により、定型クリアランス法により E3040 が腎尿細管における尿酸排泄促進作用を有し、その作用は、E3040 によることを示した。

哺乳類における腎臓での尿酸排泄のメカニズムは、糸球体濾過、分泌前の再吸収、分泌、分泌後の再吸収過程の、4-component モデルで説明されている (Levinson and Sorensen, 1980)。最近、実験動物として繁用されるげっ歯類の中で、DBA/2N マウスは血漿中尿酸レベルが比較的高く、fractional excretion of urate の値もラットよりもヒトに近い系統であることが明らかにされており (Fig. 1) (Roch-Ramel and Peters, 1978; Dan et al., 1990)、腎尿細管における尿酸の挙動に関する薬物の作用機構の解析が可能である。Fig. 2 に、腎尿細管における尿酸の挙動と、各尿酸排泄促進、抑制剤の作用部位を示す。

そこで、E3040 による尿酸排泄促進作用のメカニズムをより詳細に調べるために、腎臓での尿酸排泄の挙動がヒトにより近い DBA/2N マウス を用いて検討を行った。

材料および方法

実験材料

使用動物

DBA/2N 系雌性マウス (体重 18 g~25 g) は日本生物材料 (株) (東京) より購入し、環境整備されたステンレスケージに入れて飼育した。水および飼料 (MF 実験動物用固形飼料 ラット・マウス ; オリエンタル酵母工業 (株) ・東京) は実験に供するまで自由に摂食させた。

使用薬物

E3040、E3040-Sulfate (E3040-Sul) 及び E3040-Glucuronide (E3040-Glu) はエーザイ (株) (東京) より、AA193 は、中外製薬 (株) より提供された。probenecid、Benzbromarone は、Sigma. Co. (U. S. A.) より、pyrazinoic acid、gum arabic は、和光純薬 (株) (東京) より購入した。その他の全ての試薬は HPLC 用または、特級のものを使用した。

in vivo 動物実験

逆説効果実験

DBA/2N マウス は、実験の 2 時間前より、絶食、絶水させた。マウスは、ether 麻醉した後、膀胱にカニューレ (Hibiki no. 5; ヒビキ本舗; 東京) を挿入した。probenecid、benzbromarone、AA193 および pyrazinoic acid は、3% gum arabic 生理食塩水溶液に懸濁し、

40 ml/kg の量で経口投与し、E3040 及びその抱合代謝物は生理食塩水に溶解した溶液を 10 ml/kg の量で尾静脈内投与した。E3040 及び代謝物の投与時の直前に 3% gum arabic 生理食塩水溶液を 40 ml/kg の量で経口投与した。3% gum arabic 生理食塩水溶液経口投与のみ、および 3% gum arabic 生理食塩水溶液経口投与後、生理食塩水を尾静脈内投与したものをそれぞれの control とした。Fig. 3 に実験方法と各尿酸排泄促進薬および、尿酸排泄抑制薬である pyrazinoic acid の構造式を示す (Fig. 4)。各薬物投与後 6 時間までの尿を採取し、尿中の尿酸濃度を測定し、尿中尿酸排泄速度を算出した。尿中の尿酸濃度は、ウリックアシッド-テストワコーを用い、リンタンングステン酸法により測定した。

Pyrazinoic acid 抑制試験

Fig. 5 に実験スキームを示す。DBA/2N マウスは、上記の逆説効果実験と同様の処置を行ったのち、pyrazinoic acid (200 mg/10 ml/kg) を経口投与した。その 30 分後に、probenecid 1200 mg/kg、benzbromzrone 400 mg/kg、AA193 400 mg/kg を、40 ml/kg の量で経口投与した。E3040 は、3% gum arabic 生理食塩水溶液を 40 ml/kg の量で経口投与した後、直ちに 10 mg/kg を尾静脈内投与した。pyrazinoic acid 200 mg/10 ml/kg を経口投与後 30 分に 3% gum arabic 生理食塩水溶液 40 ml/kg を経口投与したもの、生理食塩水 10 ml/kg を尾静脈内投与したものを、それぞれの control とした。各薬物投与後、6 時間までの尿を採取し、尿中への尿酸排泄速度を測定した。

データの検定

データは、全て Mean \pm S.E. で示した。有意差検定は、多項目有意差検定 (ANOVA) にて検定し、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

結果

Fig. 6 に各尿酸排泄薬の尿酸排泄速度と投与量の関係を示す。尿酸排泄薬である probenecid は低投与量では尿酸排泄抑制作用を現わし、高投与量では排泄促進作用を現わす、いわゆる逆説効果を示した。一方、AA193 および benzbromarone では逆説効果を示さず、AA193 では、200 と 400 mg/kg の投与量において尿酸排泄速度が control に比べて有意に上昇した。benzbromarone では、投与量が増加するにつれて上昇の傾向が見られ、600 mg/kg の投与量において有意に尿酸排泄速度が上昇した。また、分泌を抑制する pyrazinoic acid では 400 mg/kg の投与量で尿酸排泄速度は有意に抑制された。

Fig. 7 に E3040 と各抱合体投与時の尿酸排泄速度を示す。E3040 投与で、尿酸排泄速度は投与量依存的に上昇し、10 および 50 mg/kg では control に比べて有意な上昇を示したが、逆説効果は観察されなかった。一方、各抱合体では、200 mg/kg の高投与量において上昇傾向が観察されたが、有意差は認められなかった。また、逆説効果は各抱合体において観察されなかった。

Fig. 8 に pyrazinoic acid 抑制試験の結果を示す。pyrazinoic acid 単独投与時の尿酸排泄速度低下率に対し、pyrazinoic acid と probenecid および benzbromarone を併用時の変化は、両薬物単独投与時の尿酸排泄速度上昇率と比較して、まだ低下したままであった。一方、pyrazinoic acid と AA193 の併用は、尿酸排泄速度の変化を AA193 単独投与時の約 50% にまでに回復させた。同様に、E3040 は pyrazinoic acid 投与で低下した尿酸排泄速度を薬物単独投与時の約 30% まで回復させた。

考察

本研究において使用した DBA/2N マウスは、血中尿酸値が他のマウス、ラット等のげっ歯類よりも高く、尿酸の fractiona excretion of urate、および尿細管での尿酸の 4-component モデルでの挙動がヒトに近いこと (Fig. 1)、従って、尿酸排泄促進薬の開発と、尿酸排泄促進作用を解明するのに適した実験動物であることが、Dan らにより報告されている (Dan et al., 1989; Dan et al., 1990)。そこで、尿細管での 4-component モデルで説明される尿酸の挙動に対する E3040 およびその抱合代謝物の作用を解明するために、この DBA/2N マウスを使用した。

尿酸排泄薬である probenecid は尿細管において尿酸の再吸収、分泌双方を抑制することにより、低投与量では分泌を主として抑制するため、尿酸排泄抑制作用を、高投与量では再吸収も抑制するため、尿酸排泄促進作用を示す、逆説効果を示し (Yu and Gutman, 1959; Fanelli and Weiner, 1975; Emmerson, 1978)、再吸収のみを抑制する AA193、benzbromarone では逆説効果を示さないことが、ヒト (Levinson and Sorenson, 1980) 及び DBA/2N マウスにおいて報告されている (Dan et al., 1989; Dan et al., 1990)。DBA/2N マウスを用いた本実験において、各尿酸排泄促進薬および尿酸排泄を抑制する pyrazinoic acid において、この報告と一致した結果が得られた。一方、E3040 投与で、尿酸排泄速度は投与量依存的に上昇し、逆説反応は観察されなかった (Fig. 7)。このことにより、E3040 は尿酸の尿細管での再吸収を抑制するが、分泌抑制作用を有しないか、ごく弱い抑制作用しか有さないことが示された。また、各抱合体は、200 mg/kg の投与量においても有意な尿酸排泄の上昇は観察されなかった。このことは、E3040 が尿酸排泄促進作用を有することを示唆し、前項の高尿酸モデルラットにおける FEurate の結果と一致した。

pyrazinoic acid 抑制試験は、分泌のみを抑制する pyrazinoic acid を投与して、尿中尿酸排泄を低下させた後、各薬物による尿酸排泄量の回復を観察することにより、分泌前あるいは分泌後の再吸収を抑制するかを検討する試験である。この試験は臨床においても、各尿酸排泄促進薬の作用機構解明のために使用されている (Diamond and Meisel, 1977; Steele, 1979; Levinson and Sorenson, 1980)。pyrazinamide は、pyrazinoic acid のプロドラッグであり、抗結核薬として使用され、体内で活性体の pyrazinoic acid に代謝されて尿酸排泄抑制効果を現わすことが知られている (Faneli and Weiner, 1975; Emmerson, 1978)。この pyrazinoic acid 抑制試験において、間接的に尿細管における尿酸の 4-component モデルが説明され (Levinson and Sorenson, 1980)、また、benzbromarone、probenecid、tienilic acid 等の尿酸排泄促進薬の作用機構が解析されてきた (Diamond and Meisel, 1977; Steele, 1979; Levinson and Sorenson, 1980)。

本研究での DBA/2N マウスを用いた pyrazinoic acid 抑制試験において、分泌、再吸収の両方を抑制する probenecid 単独投与では尿酸排泄速度は約 20% 増大したのに対し、pyrazinoic acid 単独投与時には、逆に尿酸排泄速度は約 20% 減少した。ついで、これら 2 つの薬物の併用時の尿酸排泄速度は、薬物非投与時の値よりも小さかった。この尿酸排泄の様相は、分泌後の再吸収を特異的に阻害すると言われる benzbromarone においても、probenecid の場合と同様の様相を示した。一方、分泌前の再吸収を抑制する AA193 では pyrazinoic acid との併用時の尿酸排泄速度は、薬物非投与時の値よりも大きく、AA193 単独投与時に観察される尿酸排泄速度の上昇に対し約 50% にまで回復させた。pyrazinoic acid 抑制試験における AA193 の尿酸排泄の回復は、probenecid、benzbromarone に比べて大きいことが報告されており (Dan T. et al., 1989; Dan T. et al., 1990)、これらの結果は報告と一致した。そこで、E3040 と pyrazinoic acid との併用時の尿酸排泄速度の変化の比較から、

AA193 と同様の挙動を示すことがわかった (Fig. 8)。このことより、E3040 は AA193 と同様に分泌前の再吸収を抑制することにより尿酸排泄促進作用を現わすことが示唆された (Fig. 9)。

尿細管での尿酸の挙動を説明するのに適している 4-component モデルは、通常の薬物が糸球体濾過後、再吸収され、さらに分泌され、尿中に排泄されるのに対し、尿酸では分泌後に、能動的な尿酸の輸送は、再吸収、分泌双方で平衡であるが、管腔内の尿酸濃度が血中よりも高くなっているため、拡散により血中に移動すると考えられており、これを、分泌後の再吸収と呼んでいる (Grantham and Chonko, 1986)。これを直接的に説明し、各尿酸排泄促進、および抑制薬、また、E3040 の作用機構をより詳細に解明するためには、例えば、尿酸輸送系の発現した上皮細胞培養系での、influx、efflux を詳細に検討する必要があると考えられる。

まとめ

本研究で、げっ歯類の中で尿細管での尿酸の挙動がヒトに近い、DBA/2N マウスを用いて、E3040 の尿酸排泄促進作用機構を詳細に検討した。その結果、E3040 は投与量依存的に尿酸排泄を増加させ、probenecid で観察される逆説効果を示さなかったことから、E3040 は、尿細管での尿酸の分泌を抑制せず、再吸収を抑制することが示唆された。さらに、pyrazinoic acid 抑制試験の結果より、尿細管における 4-component モデルで説明される尿酸の挙動において、糸球体濾過後、分泌前の再吸収を抑制することが示唆された。

引用文献

- Dan, T., Koga, H., Onuma, E., Tanaka, H., Sato, H. and Aoki, B.; The activity of AA-193, a new uricosuric agent, in animals.; *Adv. Exp. Med. Biol.*, 253 A: 301-308 (1989)
- Dan, T., Tanaka, H. and Koga, H.; Mechanism of uricosuric action of AA-193 in DBA/2N mice.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253 : 437-443 (1990)
- Diamond, H. S. and Meisel, A. D.; Evidence for two secretory mechanisms for organic acid transport in man.; *Adv. Exp. Biol. Med.*, 76 B: 56-62 (1977)
- Emmerson, B. T.; Abnormal urate excretion associated with renal and systemic disorders, drugs and toxins.; *In handbook of Pharmacology*, vol. 51: pp. 287-324, Springer-Verlag, New York (1978)
- Fanelli, G. M., Jr. and Weiner, I. M.; Species variations among primates in responses to drugs with alter the renal excretion of uric acid.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 193 : 363-375 (1975)
- Grantham, J. J. and Chonko, A. M.; Renal handling of organic anions and cations; metabolism and excretion of uric acid.; *In Kidney*, ed. by B. M. Bremer and F. C. Rector, 3rd ed., pp. 663-700, Saunders, Philadelphia (1986)
- Levinson, D. J. and Sorensen, L. B.; Renal handling of uric acid in normal and gouty subjects: evidence for 4-component system.; *Annls. Rheum.*, 39 : 173-179 (1980)
- Roch-Ramel, F. and Peters, G.; Urinary excretion of uric acid in nonhuman mammalian species; Uric acid., *In handbook of Pharmacology*, 51: pp. 211-255, Springer-Verlag, New York (1978)
- Steele, T. H.; Mechanism of the uricosuric activity of Ticrynafen.; *Nephron*, 23 (Suppl. 1): 33-37 (1979)

Yu, T. F. and Gutman, A. D.; Study of the paradoxical effects of salicylate in low, intermediate and high dosage on the renal mechanism for excretion of urate in man.; *J. Clin. Invest.*, 38: 1298-1315 (1959)

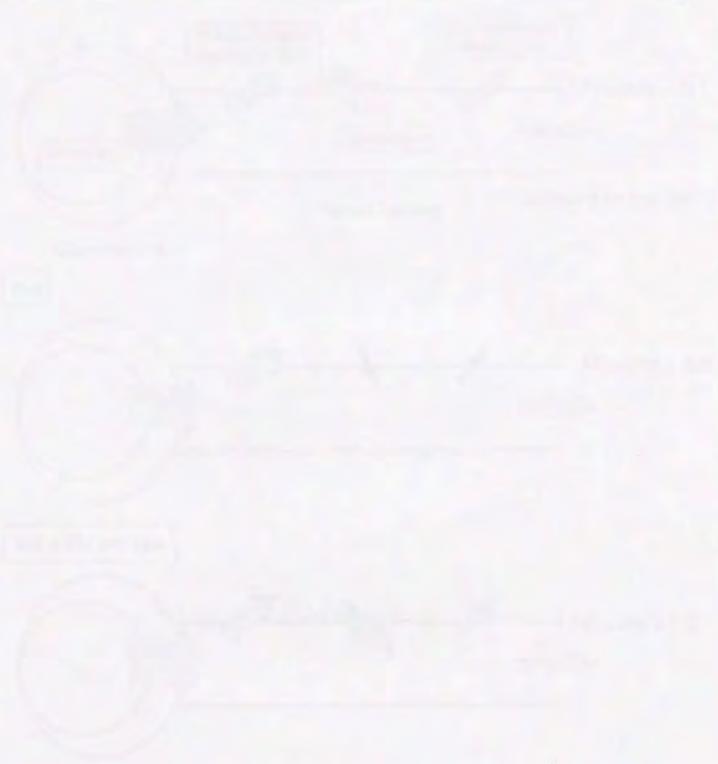
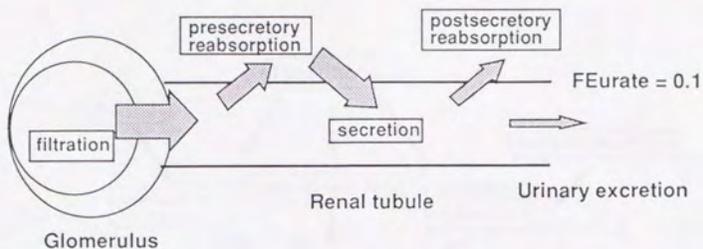
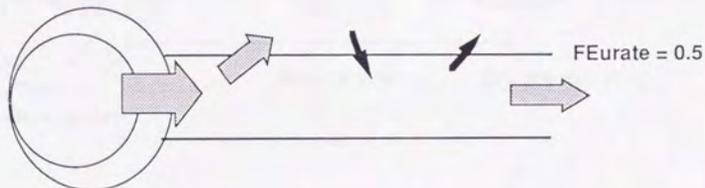


Fig. 1. Schematic representation of renal excretion of uric acid and urate in man. (a) Normal, (b) low dosage of salicylate, (c) high dosage of salicylate.

Cebus monkey (mammalia)



Rat



DBA/2N mouse

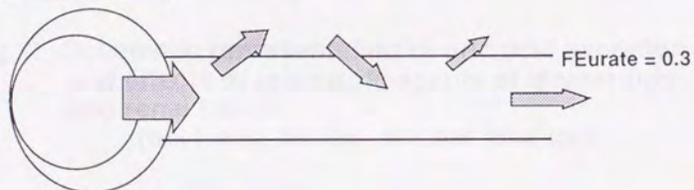


Fig. 1 Schematic representation of uric acid excretion at glomerulus and renal tubule

(T. Dan et al., Adv. Exp. Med. Biol. 253A, 1989)

($FE_{urate} = CL_{urate}/CL_{inulin}$)

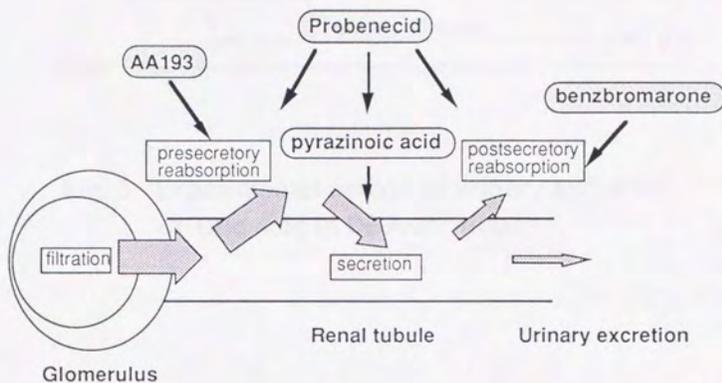


Fig. 2 Schematic representation of uric acid excretion and effects of uricosuric agents at glomerulus and renal tubule

(Dan T. et al., Adv. Exp. Med. Biol. 253A, 1989)

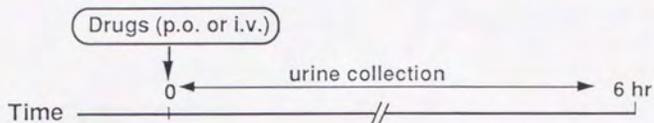


Fig. 3 Experimental design of urinary excretion of uric acid in DBA/2N mouse

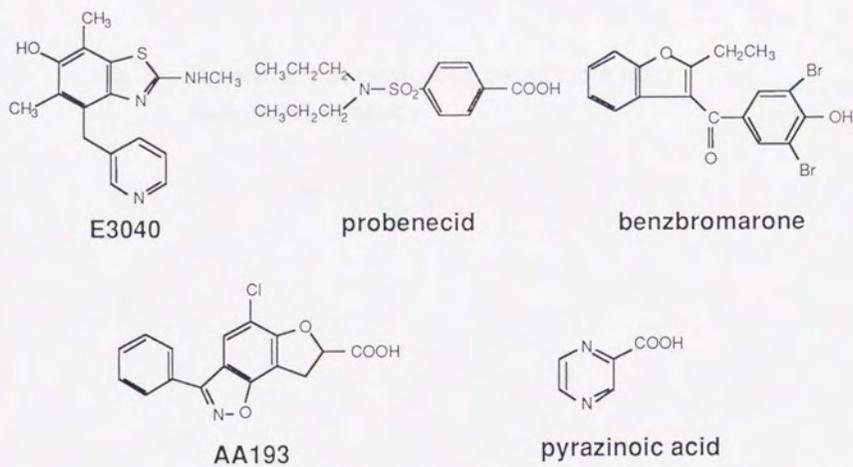


Fig. 4 Chemical structures of uricosuric agents and pyrazinoic acid.

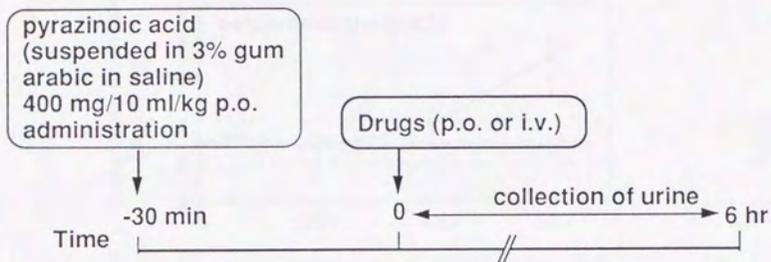


Fig. 5 Experimental design of pyrazinoic acid suppression study

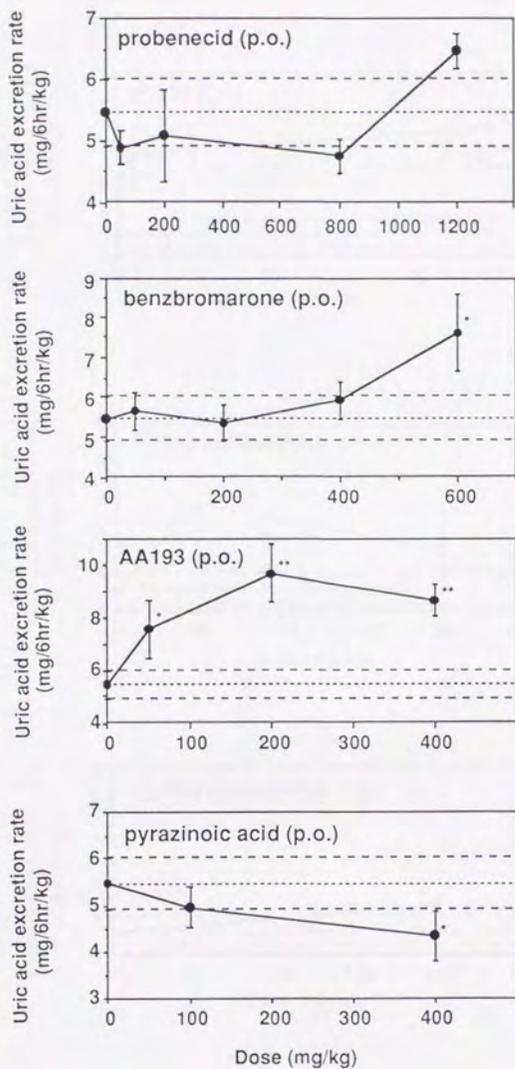


Fig. 6 Dose-response curves for reference drugs on uric acid excretion rate in DBA/2N mice. Drugs were suspended in physiological saline containing 3% gum arabic.

*, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v.s. control (mean \pm S.E.; $n = 5-9$)

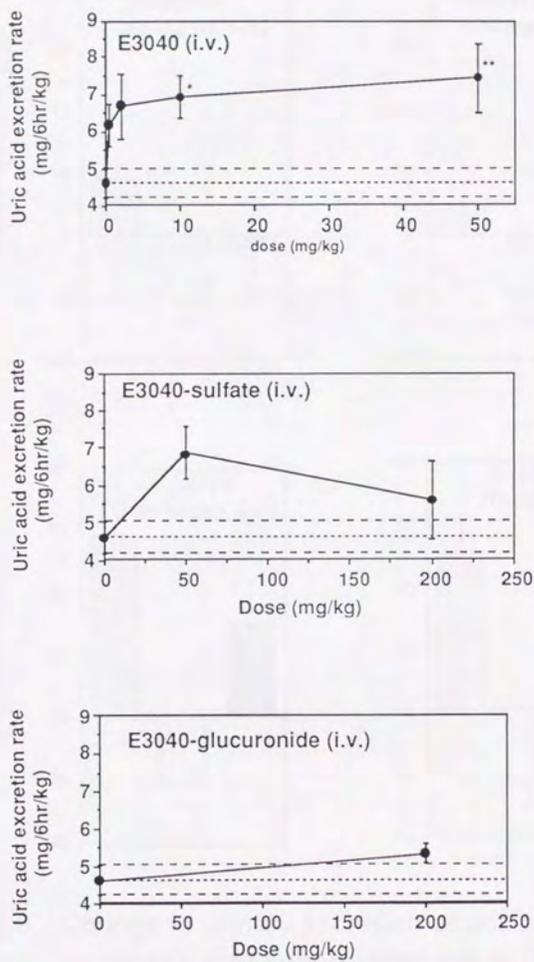


Fig. 7 Dose-response curves for E3040 and its conjugates on uric acid excretion rate in DBA/2N mice.

* , $p < 0.05$, ** , $p < 0.01$ vs control (mean \pm S.E.; $n = 3-6$)

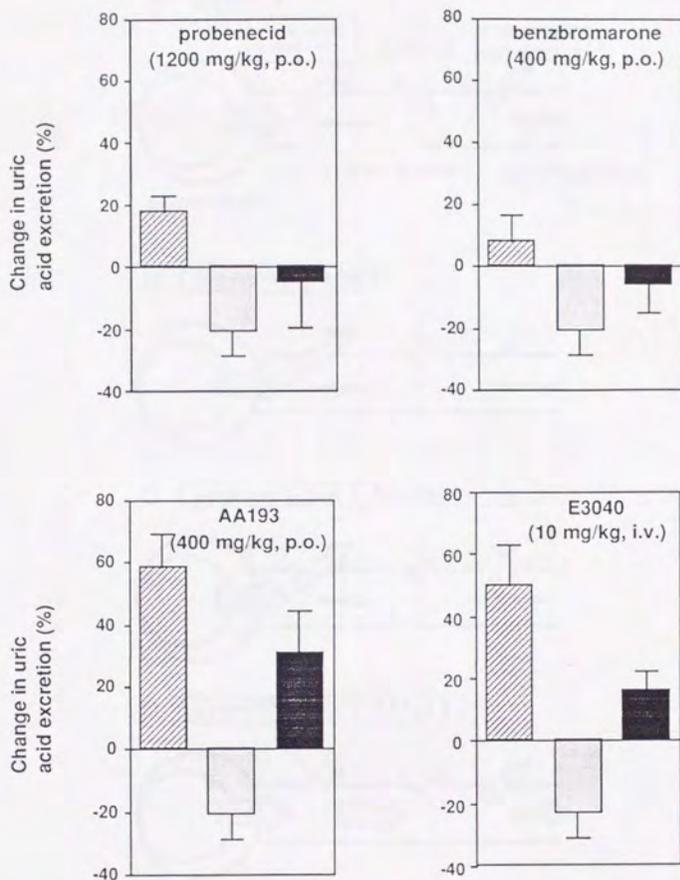


Fig. 8 Change in urinary excretion of uric acid on pyrazinoic acid suppression test in DBA/2N mice (mean \pm S.E.; n=4-6)

- ▨ : drugs alone
- : 400 mg/kg pyrazinoic acid alone
- : pyrazinoic acid + drugs

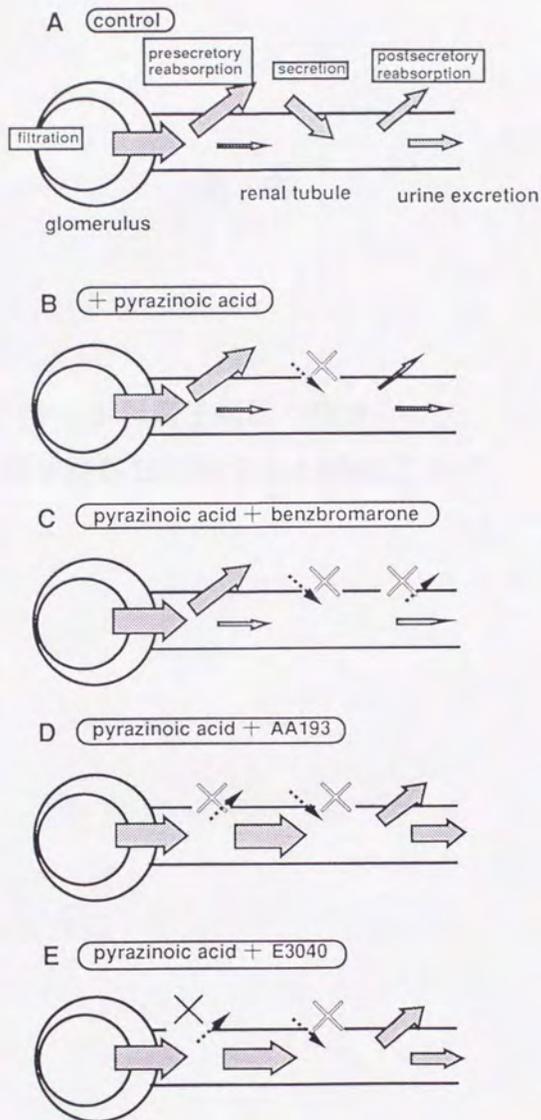


Fig. 9 Schematic representation of the mechanism of uricosurics and E3040 on pyrazinoic acid suppression test at glomeruli and renal tubule.

第 2 章

ラット腎刷子縁膜小胞を用いた 腎尿酸輸送に対する E3040 の作用

緒言

腎臓の近位尿細管において、グルコース、アミノ酸、リンなどの栄養物質の再吸収並びに医薬品等の生体異物の尿中への分泌が営まれていることは良く知られている。尿細管上皮細胞は、形態的、機能的に非対称性を示し、特に物質輸送機構や局在する酵素が異なっている。細胞は互いに隣接する細胞と特殊な密着接合で接合し、細胞膜はその部分で管腔側の刷子縁膜 (Brush border membrane, BBM) と、血液側の側底膜 (Basolateral membrane, BLM) に区分される。この腎尿細管上皮細胞のそれぞれの膜には有機アニオン系物質の輸送機構が存在することが知られている (Fig. 1) (Inui, 1988)。

これらの近位尿細管における物質輸送を解析し、それぞれの膜輸送特性を明らかにするための実験系が、各膜画分を分離調製した膜小胞 (membrane vesicle) を用いて開発された。刷子縁膜小胞の調製は、上皮細胞のミトコンドリア、ライソソーム、小胞体、側底膜が Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの 2 価カチオンと複合体を形成して凝集、沈澱するが、刷子縁膜は上清に残るという性質を利用している (Malathi et al., 1978)。この刷子縁膜小胞を用いることにより、様々な物質の腎尿細管での輸送機構解析が飛躍的に進歩した (Fig. 2) (乾, 1994)。

一方、尿酸は、近位尿細管上皮細胞を通過して、能動的に再吸収されることから、尿酸の輸送機構が腎近位尿細管の刷子縁膜に存在することが示唆されている (Klamp and Lenoir, 1975; Weiman et al., 1976; Frankfurt and Weiman, 1977; Diamond, 1978)。また、上記の刷子縁膜小胞を用いた、pH 勾配存在下の尿酸の取込み実験において、overshoot 現象および countertransport 現象が観察され、さらに probenecid、DIDS により輸送が阻害されることから、尿酸は、尿細管において能動的に再吸収されることが知られている (Blomstedt et al., 1980; Guggino et al., 1983; Kahn et al., 1983; Kahn and Aronson, 1983; Kahn and Weiman, 1985;

Dan and Koga, 1990; Roch-Ramel et al., 1994)。

前項までの実験において、E3040 は腎尿細管での尿酸の再吸収を抑制することを明らかにした。そこで本研究では、腎刷子縁膜小胞を用いて、小胞への尿酸取込みに対するE3040 および各抱合体の阻害作用を検討し、その作用を他の臨床で使用される尿酸排泄促進薬と比較した。

材料および方法

実験材料

使用薬物

E3040、E3040-Sulfate (E3040-Sul) 及び E3040-Glucuronide (E3040-Glu) はエーザイ (株) (東京) より、AA193 は中外製薬 (株) より提供された。probenicid、benzbromarone は、Sigma. Co. (U. S. A.)より購入し、mannitol、MgSO₄、KH₂PO₄、K₂HPO₄、HEPES (*N*-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid)、Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)、CaCl₂、マイクロ TP -テストワコー、アルカリ性フォスファ B-テストワコー、ATP、モリブデン酸アンモニウム、ascorbic acid、Scintisol EX-Hは、和光純薬 (株) (東京) より購入した。Ouabain (g-strophanthin) は東京化成工業 (株) (東京)より、[8-¹⁴C] Uric acid (50 mCi/mmol) はMoravek Biochemical (U. S. A.)より購入した。その他の全ての試薬は HPLC 用または、特級のものを使用した。

in vitro 腎刷子緑膜小胞取込み実験

腎皮質の摘出法

Wistar 系雄性ラット (体重 280~320 g) をエーテル麻酔下、開腹し、腹部大動脈および後大静脈を切断して脱血した後、直ちに両腎を摘出した。摘出した腎臓は氷冷した buffer (10 mM mannitol, 2 mM HEPES-Tris; pH 7.5) 中へ入れ、皮質部分のみを切りだし、湿重量 (X g) を秤量し、以下に述べる腎刷子緑膜小胞の調製に用いた。なお、ラット腎刷子緑膜小胞の調製にはラット 10 匹分の腎臓を用い、得られた皮質の湿重量は、約 8~10 g

であった。

腎刷子縁膜小胞 (Brush Border Membrane Vesicles; BBMV) の調製

腎刷子縁膜小胞 (BBMV) は、Wistar 系雄性ラット (体重 280g~300g) の腎皮質より、Malathi らのカルシウム沈澱法に従って単離した (Malathi et al., 1978)。以下に操作の概要を述べる。

遠心分離は全て 4℃で行い、全ての調製行程は氷温下で行った。腎皮質は、湿重量 (X g) の 9 倍容量 (9 X ml) の氷冷した Buffer A (10 mM mannitol, 2 mM HEPES-Tris; pH 7.5) を加え、ヒストコロン (日音医理工科機械製作所) により 1,800 rpm で 2 分間ホモジナイズした。得られたホモジネートに、Buffer A 中の CaCl₂ 濃度が 10 mM になるように CaCl₂ を加え、ガラス棒で良く攪拌した後、15 分間放置した。放置後、CaCl₂ が 10 mM の濃度になるように調製した、腎皮質湿重量の 10 倍容量の Buffer A を加えた。これを、冷却遠心機 (HIMAC Centrifuge SCR208, HITACHI; 東京) により、500 × g で 12 分間遠心分離した上清を、さらに 15,000 × g で 12 分間遠心分離した。得られたペレットに、5 X ml の Buffer A を加え、ガラス/テフロン ボッター型ホモジナイザーにより、1000 r.p.m. の回転数で 10 回ホモジナイズした。この懸濁液に 10 mM の濃度になるように、CaCl₂ を加え、15 分間放置した後、CaCl₂ が 10 mM の濃度になるように調製した、5 X ml の Buffer A を加えた。これを、750 × g で 12 分間遠心分離した上清をさらに超遠心機 (Automatic preparative ultracentrifuge 70P-72, HITACHI; 東京) により、30,000 × g で 12 分間遠心分離した。得られた残渣に 20 X ml の氷冷した Buffer B (100 mM mannitol, 20 mM HEPES-Tris buffer; pH 7.5) を加え、ガラス/テフロン ボッター型ホモジナイザーにより、1000 r.p.m. の回転数で 10 回ホモジナイズし、48,000 × g で 20 分間遠心分離した。得られたペレットに、腎皮質

の9倍容量のBuffer Bを加え、注射針(20 G × 1; テルモ; 東京)を用いて吸引排出を繰返して懸濁させた懸濁液を、さらに48,000 × gで20分間遠心分離した。得られたペレットを、最終のタンパク質濃度が8-10 mg/mlになるように尿酸取込み実験用 Buffer (150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer; pH 7.5)を加え、注射針(27 G × 1/2; テルモ; 東京)を用いて吸引排出を繰返して懸濁させ、腎刷子縁膜小胞(BBMV)懸濁液を得た。腎刷子縁膜小胞は、取込み実験まで、-80℃で冷凍保存し、調製後、1週間以内に実験に供した。

タンパク質濃度は、マイクロTP-テストワコーを用い、ピロガロールレッド法にて定量した。

得られたBBMVの精製度は、腎刷子縁膜に局在する、アルカリフォスファターゼと、腎側底膜に局在する、(Na⁺ - K⁺)ATPaseを測定して検討した。BBMVのアルカリフォスファターゼ活性は、アルカリ性フォスファターゼB-テストワコーを用い、*p*-ニトロフェニルリン酸基質法により測定し、腎皮質ホモジネートのアルカリフォスファターゼ活性の約10-15倍の酵素活性を得た。(Na⁺ - K⁺)ATPase活性は、Quigleyらの方法により、ATPを基質として、生成するリン酸の量により活性を調べた(Quigley et al., 1969)。得られたBBMVの(Na⁺ - K⁺)ATPase活性は、腎皮質ホモジネートの2倍以下であった。

取込み実験

尿酸の腎刷子縁膜小胞(BBMV)への取込みは、迅速濾過法により行なった。以下に操作の概要を示す。

BBMV懸濁液20 μlは、25℃で10分間ブレインキュベートし、20 μMの[8-¹⁴C] uric acidを含有した150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer (pH

6.0) 180 μ l を加え、取込みの各時間まで 25 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。氷冷した取込み停止液である 150 mM mannitol, 2 mM $MgSO_4$, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) 1 ml を加え、取込み反応を停止させた。停止させた反応液は、直ちにミリポアフィルター (HAWP, 0.45 μ m, 25 mm diameter; Millipore Co.; U. S. A.) の上に滴下し、吸引した。ミリポアフィルター上に残った $[8-^{14}C]$ uric acid は、ミリポアフィルターごと、プラスチックバイアルに入れ、液体シンチレーション用カクテル Scintisol EX-H 8 ml を加え、激しく振盪し、液体シンチレーションカウンター (LSC-3100; アロカ (株); 東京) により放射活性を測定した。

非特異的な膜小胞への吸着を測定するために、別途、BBMV 懸濁液 20 μ l に氷温の取込み停止液を加え、直ちに 20 μ M $[8-^{14}C]$ uric acid を含有した、取込み用 Buffer (pH 6.0) 200 μ l を加え、吸引濾過し、取込みと同様の操作を行なって、非特異的な膜への吸着を測定した。この非特異的な、 $[8-^{14}C]$ uric acid の膜への吸着の値は、バックグラウンドとして、BBMV への $[8-^{14}C]$ uric acid 取込み量から差し引いて、真の BBMV 内への $[8-^{14}C]$ uric acid 取込み量を算出した。

各薬物の BBMV への $[8-^{14}C]$ uric acid 取込み阻害作用は、probenecid、benzbromarone、AA193 の各尿酸排泄促進薬、および E3040、E3040-Sul、E3040-Glu の各薬物を 20 μ M $[8-^{14}C]$ uric acid 含有取込み用 Buffer に溶解し、10 秒間の BBMV への $[8-^{14}C]$ uric acid 取込みを測定した。対照として、各薬物非存在下での 10 秒間の BBMV への $[8-^{14}C]$ uric acid 取込みを 100% として各薬物の $[8-^{14}C]$ uric acid 取込み阻害率を算出した。

結果

Fig. 3 に、BBMV へのヒドロキシイオン (OH^-) 勾配存在下、 $[8\text{-}^{14}\text{C}]$ Uric acid 取込みの時間推移を示す。overshoot 現象が観察され、この取込み実験系に尿酸の能動輸送の関与が示され、過去の報告が確かめられた。

Fig. 4 に、E3040 と尿酸排泄促進薬の、BBMV への OH^- 勾配存在下 $[^{14}\text{C}]$ 尿酸取込みに対する阻害曲線を示し、Table I に、尿酸排泄薬と E3040 の $[^{14}\text{C}]$ 尿酸取込みに対する IC_{50} を示す。BBMV への $[^{14}\text{C}]$ 尿酸の取込みは、いずれの薬物においても阻害効果は濃度依存性であり、その阻害効果の強さは $\text{AA193} > \text{benzbromarone} > \text{E3040} > \text{probenecid}$ の順であり、その IC_{50} は、それぞれ、 $0.26 \mu\text{M}$ 、 $16.7 \mu\text{M}$ 、 $86.6 \mu\text{M}$ および $181 \mu\text{M}$ であった。

Fig. 5 に、E3040 及び各抱合体の BBMV への OH^- 勾配存在下 $[^{14}\text{C}]$ 尿酸取込みに対する阻害曲線を示し、Table II に、E3040、各抱合体の $[^{14}\text{C}]$ 尿酸取込みに対する IC_{50} を示す。BBMV への $[^{14}\text{C}]$ 尿酸の取込みは、いずれの薬物においても濃度依存性を示し、その阻害効果の強さは $\text{E3040} > \text{E3040-Sul} > \text{E3040-Glu}$ の順であり、その IC_{50} は、それぞれ $86.6 \mu\text{M}$ 、 $1919 \mu\text{M}$ および $8408 \mu\text{M}$ であった。

考察

BBMV への尿酸の取込みは、ヒドロキシイオン勾配、クロライドイオンにより駆動され、また、他のアニオン系薬物との、*trans-stimulation* も観察され、尿酸の刷子縁膜における輸送は、尿酸/アニオン交換輸送系であることが知られている (Blomstedt and Aronson, 1980; Giglio et al., 1983; Kahn and Aronson, 1983)。さらに、DIDS 等のアニオン輸送系の阻害剤で取込みが阻害されることも明らかにされている (Kahn et al., 1983; Dan and Koga, 1990; Roch-Ramel et al., 1994)。

本研究において、他の尿酸排泄促進薬と同様に、E3040 が尿細管刷子縁膜における [^{14}C] 尿酸の輸送を抑制することが示された。その強さは AA193 > benzbromarone > E3040 > probenecid の順であった。AA193、benzbromarone、probenecid の IC₅₀ は、Danらの報告とほぼ一致した (Dan and Koga, 1990; Dan et al., 1991)。また、E3040 と、E3040-Sul、E3040-Glu の BBMV への [^{14}C] 尿酸取込みへの阻害効果は、E3040 が、E3040-Sul の約 20 倍、E3040-Glu の 1000 倍であり、このことは、ラットおよび DBA/2N マウスにおける、尿酸排泄に対する E3040 と各抱合体の作用の結果を支持するものである。

また、ラットにおいて、有意な尿酸排泄促進作用を示す、E3040 50 mg/kg 静脈内投与後の腎臓中 E3040 濃度は、73 μM であり、本実験で得られた BBMV への [^{14}C] 尿酸取込みに対する E3040 の IC₅₀ の値の 86.6 μM と良く一致している。また、E3040-Sul 100 mg/kg を静脈内投与して 15 分後の E3040-Sul の腎臓中濃度は、E3040 の約 4 倍の濃度であることが先のラットでの実験で明らかであり、E3040-Sul のこの投与量においてラットで尿酸排泄促進作用を有しなかったという知見と一致した。

一方、E3040 の尿中排泄は未変化体が 1% 以下と、ほとんど尿中に排泄されない薬

物である。従って、E3040 未変化体は、尿細管管腔内にはほとんど存在しないと考えられる。本研究での BBMV への $[^{14}\text{C}]$ 尿酸取込みは、*cis*-inhibition を観察したものであるが、生理的条件下では、尿酸の尿細管における再吸収の際には尿酸と同じ側には E3040 は存在しない。従って、E3040 の尿酸輸送系への阻害作用は、管腔側から阻害するのではなく、血液側から尿細管上皮細胞内に取り込まれた E3040 が、尿細管上皮細胞の内側から尿酸輸送系に作用すると考えられた。これを証明するためには、膜小胞内にあらかじめ E3040 を取り込ませておいた上で、尿酸の取込みを測定する、*trans*-stimulation 試験を行なうことが良い実験であるが、E3040 のタンパク結合率が 99% 以上と高く、E3040 が膜小胞に非特異的に結合する可能性が高いと考えられ、厳密に *trans*-stimulation 実験を行なうことは不可能である。

まとめ

本研究において、ラット腎刷子縁膜小胞を用いて、他の尿酸排泄促進薬と同様に、E3040が尿管刷子縁膜における $[^{14}\text{C}]$ 尿酸の輸送を抑制することを示した。その強さはAA193 > benzbromarone > E3040 > probenecidの順であった。また、E3040と、E3040-Sul、E3040-GluのBBMVへの $[^{14}\text{C}]$ 尿酸取込みへの阻害効果はE3040が最も強く、E3040-Sulの約20倍、E3040-Gluの約1000倍であった。この結果は、ラットおよびDBA/2Nマウスを用いた *in vivo* 実験の結果を支持するものであった。

引用文献

- Blomstedt, J. W. and Aronson, P. S.; pH gradient-stimulated transport of urate and *p*-aminohippurate in dog renal microvillus membrane vesicles.; *J. Clin. Invest.* , 65 : 931-934 (1980)
- Dan, T. and Koga, H.; Uricosurics inhibit urate transport in rat renal brush border membrane vesicles.; *Eur. J. Pharmacol.* , 187 : 303-312 (1990)
- Dan, T., Onuma, E., Tanaka, H. and Koga, H.; A selective uricosuric action of AA-193 in rats: comparison with its effect on PAH secretion in vivo and in vitro.; *Arch. Pharmacol.* , 343 : 532-537 (1991)
- Diamond, H. S.; Uricosuric drugs; *In Handbook of experimental pharmacology*, vol. 51: pp. 459-484, Uric Acid, ed. W. N. Kelley and I. M. Weiner, Springer-Verlag, New York (1978)
- Frankfurt, S. J. and Weinman, E. J.; The effect of probenecid on urate transport in the rat kidney.; *Proc. Soc. Exp. Biol.* , 155 : 554-557 (1977)
- Guggino, S. E., Martin, G. J. and Aronson, P. S.; Specificity and modes of the anion exchanger in dog renal microvillus membranes.; *Am. J. Physiol.* , 244 : F612-F621 (1983)
- Inui, K.; Transport mechanisms of drugs in intestinal and renal epithelial cell membrane.; *Yakugaku Zasshi*, 108 : 921-937 (1988)
- Kahn, A. M. and Aronson, P. S.; Urate transport via anion exchange in dog renal microvillus membranes.; *Am. J. Physiol.* , 244 : F56-F63 (1983)
- Kahn, A. M., Branham S. and Weinman, E. J.; Mechanism of urate and *p*-aminohippurate transport in rat renal microvillus membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.* , 245 : F151-F158 (1983)

Kahn, A. M. and Weinman, E. J.; Urate transport in the proximal tubule: in vivo and vesicle studies.;

Am. J. Physiol., 249 : F789-F798 (1985)

Kramp, R. A. and Lenoir, R.; Distal permeability to urate and effects of benzofuran derivatives in the

rat kidney.; *Am. J. Physiol.*, 228 : 875-883 (1975)

Malathi, P., Preizer, H., Fairclogh, P., Mallet, P. and Crane, R. K.; A rapid method for the isolation

of kidney brush border membranes.; *Biochem. Biophys. Acta*, 506, 259-263, (1979)

Quigley, J. P. and Gotterer, G. S.; Distribution of (Na⁺-K⁺)-stimulated ATPase activity in rat

intestinal mucosa.; *Biochem. Biophys. Acta*, 173, 456-468 (1969)

Roch-Ramel, F., Werner, D. and Guisan, B.; Urate transport in brush-border membrane of human

kidney.; *Am. J. Physiol.*, 266 : F797-F805 (1994)

Weiman, E. J., Knight, R., McKenzie, R. and Ekinoyan, G.; Dissociation of urate from sodium

transport in the rat proximal tubule.; *Kidney Int.*, 10 : 295-300 (1976)

乾賢一: 日本膜学会編・膜学実験シリーズ・第1巻・生体膜編(塩澤義則 他・編), 共立出版: pp. 86-90 (1994)

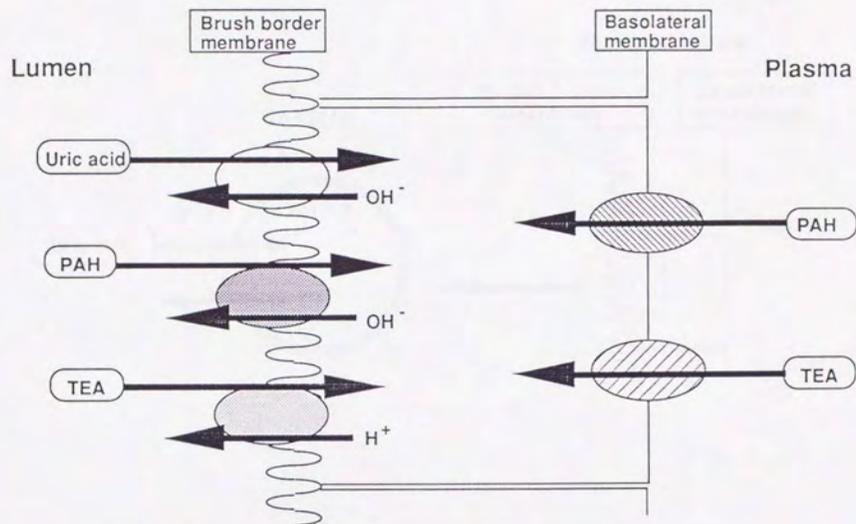


Fig. 1 Transport systems of organic ions in proximal tubular cells

PAH : *p*-aminohippuric acid; TEA : tetraethylammonium

(Inui, K., Yakugaku Zasshi, 108, 1988)

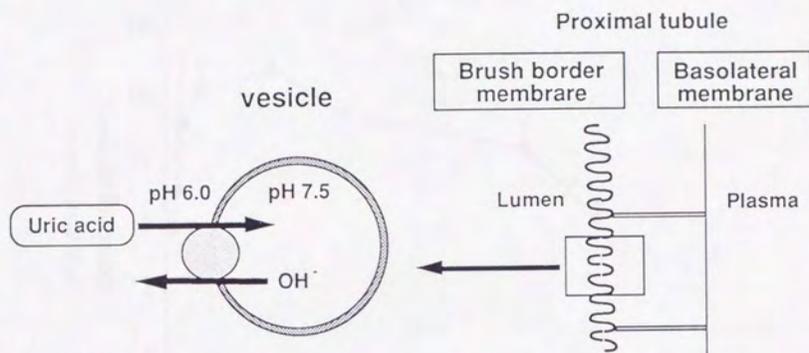


Fig. 2 Schematic representation of the preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) and uptake mechanism of uric acid into BBMV with hydroxy ion gradient.

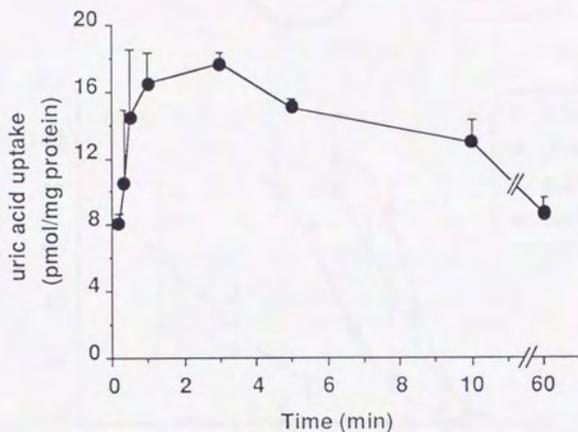


Fig. 3 Time course of uric acid uptake to brush border membrane vesicles. Membrane vesicles were suspended in 150 mM mannitol, 2 mM $MgSO_4$, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Vesicles were incubated in 150 mM mannitol, 2 mM $MgSO_4$, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0. (mean \pm S.E.; $n=3-4$)

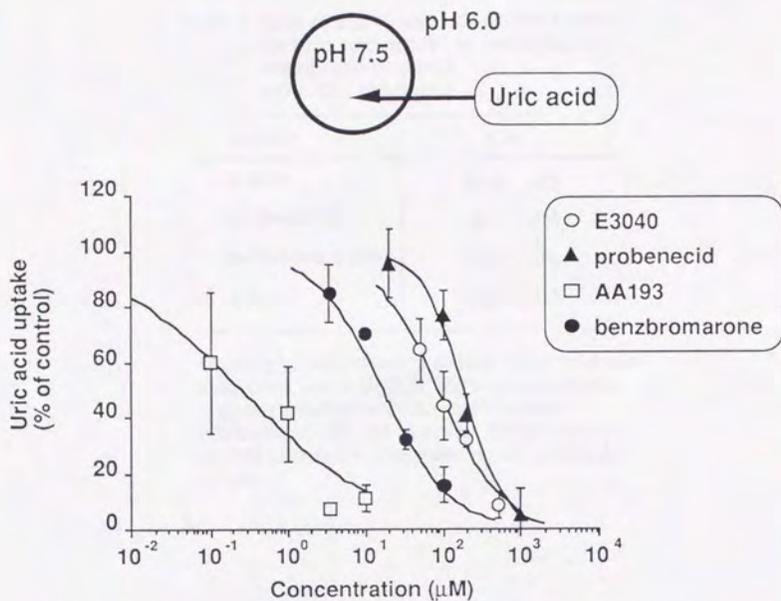


Fig. 4 Concentration-dependence of the inhibition of uric acid uptake by E3040 and uricosuric agents in brush border membrane vesicles (with OH^- gradient). Membrane vesicles were suspended in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO_4 , 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Vesicles were incubated in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO_4 , 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0 for 10 sec. (mean \pm S.E.; $n=3-4$)

Table I IC₅₀ of E3040 and uricosuric agents on uric acid uptake in brush border membrane vesicles.
(with OH⁻ gradient)

agents	IC ₅₀
E3040	86.6 μM
probenecid	181 μM
benzbromarone	16.7 μM
AA193	0.26 μM

Membrane vesicles were suspended in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Vesicles were incubated in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0 for 10 sec.

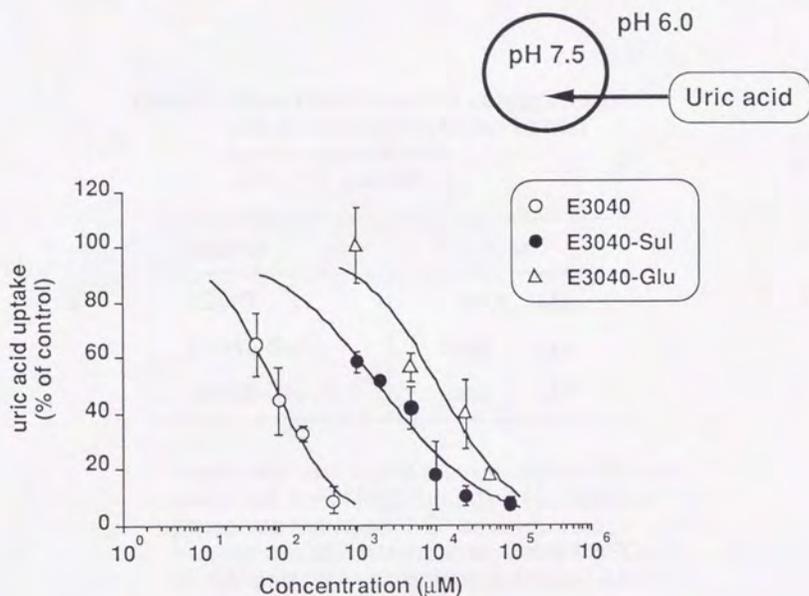


Fig. 5 Concentration dependence of the inhibition of uric acid uptake by E3040 and its conjugates in brush border membrane vesicles (with OH⁻ gradient). Membrane vesicles were suspended in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Vesicles were incubated in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0 for 10 sec. (mean ± S.E.; n=3-4)

Table II IC₅₀ of E3040 and its conjugates on uric acid uptake in brush border membrane vesicles.
(with OH⁻ gradient)

agents	IC ₅₀
E3040	86.6 μM
E3040-Sul	1919 μM
E3040-Glu	8408 μM

Membrane vesicles were suspended in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Vesicles were incubated in 150 mM mannitol, 2 mM MgSO₄, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0 for 10 sec.

第3章

他薬物に対する E3040 の相互作用

第3章

3-1

他薬物のラット体内動態に対する E3040 の作用

緒言

腎臓は、多くの薬物の主要な排泄機関であり、特に近位尿細管において薬物は、管腔内に分泌されることが知られている。この薬物分泌系は、腎臓が様々な生体異物を積極的に体外に排出する機構であり、薬物の体内動態に大きな役割を担っている。代表的な尿細管分泌系として、有機アニオン輸送系、有機カチオン輸送系が良く知られており、また、抗癌剤に多剤耐性を示す癌細胞から発見された *p*-糖タンパク質が、腎尿細管上皮細胞にも存在することが明らかにされている (Tanigawara et al., 1992)。腎排泄過程における薬物間相互作用については、多くの報告があり、特に臨床上重要な相互作用として、アニオン系薬物の競合阻害である、メトトレキサートと非ステロイド系消炎鎮痛剤やサリチル酸系製剤 (Liegler et al., 1969; Maier et al., 1986; Frenia and Long, 1992)、および非ステロイド系消炎鎮痛剤と probenecid (Seegmiller and Grayzel, 1960; Runkel et al., 1978)、カチオン輸送系に関しては、 H_2 遮断薬と、プロカインアミドなどがある (Somogyi and Heinzow, 1982; Somogyi et al., 1983; Christian et al., 1984)。これらの相互作用のメカニズムは、近位尿細管での薬物の管腔内への分泌阻害によるとされている。

第 1 および 2 章において、E3040 は、アニオン系物質の尿酸の排泄促進作用を有すること、尿酸の腎刷子縁膜における尿酸の輸送を阻害すること、その阻害の強度は probenecid よりも強いことを示した。尿酸はアニオン系物質の *p*-aminohippuric acid と同じ輸送系で認識されることが知られている (Blomstedt et al., 1980; Guggino et al., 1983; Kahn et al., 1983)。また、刷子縁膜と側底膜の双方のアニオン輸送系を probenecid が阻害することが報告されており (Hori et al., 1982; Shimada et al., 1987; Ohoka et al., 1993; Makhuli et al., 1995)、尿酸の輸送を抑制する作用を有する E3040 が、尿酸と同様に他のアニオン系物質

の腎挙動を抑制する可能性が考えられた。

そこで本研究では、薬物動態において腎排泄の寄与が大きいアニオン系薬物の、acyclovir (O'Brien and Campoli-Richads, 1989; de Miranda et al., 1981; de Miranda and Blum, 1983) あるいは methotrexate (Christophidis et al, 1981; Wang and Fujimoto, 1984; Iven et al., 1985; Bannwarth et al., 1994) と、E3040 併用による相互作用の有無を *in vivo* 実験により検討した。

材料および方法

実験材料

使用動物

Wistar 系雄性ラット (体重 240 ~ 280 g) は (株) 日本医科学動物資材研究所 (東京) より購入し、環境整備されたステンレスケージに入れて飼育した。水および飼料 (MF 実験動物用固形飼料 ラット・マウス: オリエンタル酵母工業 (株)・東京) は実験に供するまで自由に摂食させた。

使用薬物

E3040 はエーザイ (株) (東京) より、acyclovir (ACV) は、日本ウェルカム社より提供された。methotrexate (MTX) は、日本レダリー (株) より、inulin、mannitol は和光純薬 (株) (東京) より購入した。その他の全ての試薬は HPLC 用または、特級のものを使用した。

in vivo 動物実験

薬物動態実験

ラットを、ether 麻酔した後、膀胱にカニューレ (Hibiki no. 8; ヒビキ本舗; 東京) を挿入し、次いで左大腿動・静脈にカニューレーション (SP31; 夏目製作所; 東京) を施した。

E3040 50 mg/kg を静脈内投与後 1 分に、ACV 25 mg/kg を静脈内投与し、投与後、1, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120 分にカニューレより血液を 200 μ l 採取し、遠心分離後、血漿を採得した。尿量確保のため、薬物投与前 5 分に生理食塩水を 8 ml/kg の量で、腹腔内に投与した。尿は、投与後 1 時間毎に採得した。E3040 非併用群には、生理食塩水のみを静脈内投与した。

MTX はその投与により腎障害が報告されているため、十分な尿量を確保するために、薬物投与 60 min 前に、3% mannitol、1.5% inulin を 0.9% 生理食塩水に溶解して 10 ml/kg の容量で静脈内に bolus 投与した後、直ちに 10 ml/kg/hr の速度でテルフュージョン シリンジポンプ (model STC525; テルモ (株)、東京) を用いて静脈内に定速注入した。E3040 50 mg/kg を静脈内投与後 1 分に、MTX 10 mg/kg を静脈内投与し、その投与後 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 150, 180 分にカニューレより血液を 200 μ l 採得し、遠心分離して血漿を採取した。尿は、投与後 1 時間毎に採取した。E3040 非併用群には生理食塩水のみを静脈内投与した。

各薬物の腎クリアランスは、尿中への各薬物の排泄量を血中濃度曲線下面積 (AUC) で除して算出した。

血漿および尿中の acyclovir および methotrexate 濃度の測定

血漿中、尿中の ACV 濃度の測定は、Smith ら および Fujioka らの方法を一部改変して行なった (Smith and Walker, 1985; Fujioka et al., 1990)。血漿 0.1 ml に、アセトニトリル 0.1 ml を加え、激しく混合した後、5 分間遠心分離後、上清を採取した。尿中の ACV 濃度は、尿 10 μ l にアセトニトリル 190 μ l を加え、激しく混合した後、5 分間遠心分離した後、上清を採取した。それぞれの 30 および 10 μ l を下記の HPLC カラムに注入した。

HPLC 条件：移動相は、CH₃OH : 0.05 M octane sulphonic acid in phosphate buffer, pH3.0 adjusted by H₃PO₄ (10:90, v/v) を用い、column は、YMC AP-313, 250*6.0 mm I.D., S-5 μm, 300A (YMC Co. Ltd., 東京) を使用した。column 温度は25°C、流速は 1.0 ml/min に設定した。検出器として、SPD-6AV UV-VIS spectrometric detector (SHIMADZU Co., 東京) を用い、検出波長は 254 nm に設定した。検出限界は、血漿で 1 μg/ml、尿では 5 μg/ml であった。

血漿中、尿中の MTX は、蛍光免疫測定法により、TDx (ダイナボット、東京) により測定した。検出限界は、血漿、尿ともに 0.01 μM であった。

データの検定

データは、全て Mean ± S.D. で示した。有意差検定は、student *t*-test にて検定し、*p*<0.05 以下を有意差ありと判定した。

結果

Fig. 1 に、ACV、MTX、E3040 の構造式を示す。

Fig. 2 に、E3040 併用および非併用時の ACV の血漿中濃度推移を示す。ACV 投与後 1 分から 30 分の間で、E3040 併用時の血漿中 ACV 濃度は、非併用時に比べて有意に高い値を示した。ACV の AUC は、E3040 併用時の $3178.5 \pm 412.5 \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$ および非併用時の $1386.2 \pm 38.4 \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$ に比べて 2.3 倍大きく、両群間の差は有意であった。

Fig. 3 に、E3040 併用および非併用時の ACV の腎クリアランスを示す。E3040 併用時の ACV の腎クリアランスは、非併用時に比べて有意に低い値を示した。

Fig. 4 に、E3040 併用および非併用時の MTX の血漿中濃度推移を示す。MTX 投与後、5 分から 45 分の間で、E3040 併用時の血漿中 MTX 濃度は、非併用時に比べて有意に高い値を示した。MTX の AUC は、E3040 併用時で $1244.6 \pm 107.3 \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$ であり、この値は、非併用時の $777.0 \pm 18.4 \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$ の値に比べて有意に大きかった。

Fig. 5 に、E3040 併用および非併用時の MTX の腎クリアランスを示す。E3040 併用時の MTX の腎クリアランスは、非併用時に比べて有意に低下した。

考察

抗ウイルス薬である ACV と葉酸代謝拮抗剤の MTX は、いずれも、腎排泄の寄与が大であり、腎尿細管での分泌の寄与が大きいこと、そしてアニオン輸送系で輸送されることが示唆されている (O'Brien and Campoli-Richads, 1989; Bannwarth et al., 1994)。さらに MTX は、アニオン輸送系の阻害剤である probenecid の併用により、その薬物動態が影響されること (Bourke et al., 1975; Kates et al., 1976)、並びに腎尿細管上皮細胞での輸送が probenecid により阻害されることが、*in vitro* 実験系により明らかにされている (Bessegir et al., 1989; Saito et al., 1996)。これらのことから、E3040 が、上記のような薬物の腎尿細管における挙動に影響を与えることが考えられた。

本研究において、ACV あるいは MTX と E3040 の併用により、ACV と MTX いずれの血中濃度も、E3040 非併用群に比べて有意に高まることが示され、この要因はこれらの薬物の輸送系における相互作用による腎クリアランスの低下に起因することが明らかになった (Fig. 3, 5)。

以上のことから、E3040 は、ACV と MTX のようなアニオン系薬物の尿細管上皮細胞における輸送、すなわち管腔側への薬物の分泌を阻害することにより、これらの薬物の腎クリアランスを低下させ、さらには、薬物の体内動態にも影響を与え、薬物間相互作用を示すことが考えられた。この、腎尿細管における、これらの薬物の分泌の、E3040 併用による阻害機構については、次項の膜小胞を用いた実験系により検討を行った。

まとめ

本研究において、アニオン系物質である尿酸の腎尿細管における輸送が、E3040により阻害されたことから、他のアニオン系薬物の尿細管における輸送も同様に阻害することが考えられた。そこでアニオン系薬物であり、腎排泄型薬物のACV、MTXに対する、E3040併用の作用を検討した結果、E3040併用により、ACV、MTXの血漿中濃度は有意に上昇し、その上昇は腎クリアランスの低下によることが示唆された。

引用文献

- Bannwarth, B., Labat, L., Moride T. and Schaeferbeke, T.; Methotrexate in rhmatoid arthritis: An update.; *Drugs*, 47 : 25-50 (1994)
- Besseghir, K., Mosig, D. and Roch-Ramel, F.; Transport of methotrexate by in vitro isolated rabbit proximal tubule.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 250 : 688-695 (1989)
- Blomstedt, J. W. and Aronson, P. S.; pH gradient-stimulated transport of urate and *p*-aminohippurate in gog renal microvillus membrane vesicles.; *J. Clin. Invest.* , 65 : 931-934 (1980)
- Bourke, R. S., Chhada, G., Bremer, A., Watanabe, O. and Tower, D. B.; Inhibition of renal tublar transport of methotrexate by probenecid.; *Cancer Res.*, 35 : 110-116 (1975)
- Christian, C. D., Meredith, C. G. and Speeg, K. V.; Cimetidine inhibits renal procainamide clearance.; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 36 : 221-227 (1984)
- Christophidis, N., Louis, W. J., Lucas, I., Moon, W. and Vajda, F. J.; Renal clearance of methotrexate in man during high-dose oral and intravenous infusion therapy.; *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 6: 59-64 (1981)
- de Miranda, P., Krasny, H. C., Page, D. A. and Elion, G. B.; The didposition of acyclovir in differnt species.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 219 : 309-315 (1981)
- de Miranda, P. and Blum, M. R.; Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration.; *J. Antimicrob. Chemother.*, 12 (Suppl. B): 29-37 (1983)
- Frenia, M. L. and Long, K. S.; Methotrexate and nonsterodal antiinflammatory drug interaction.; *Ann. Pharmacother.*, 26 : 234-237 (1992)

- Fujioka, T., Mizuno, N., Morita, E., Motozono, H., Takahashi, K. and Yamanaka, Y.; Effect of age on the gastrointestinal absorption of acyclovir in rats.; *J. Pharm. Pharmacol.*, 43 : 465-469 (1991)
- Guggino, S. E., Martin, G. J. and Aronson, P. S.; Specificity and modes of the anion exchanger in dog renal microvillus membranes.; *Am. J. Physiol.*, 244 : F612-F621 (1983)
- Hori, R., Takano, M., Okano, T., Kitazawa, S. and Inui, K.-I.; Mechanism of *p*-aminohippurate transport by brush border and basolateral membrane vesicles isolated from rat kidney cortex.; *Biochem. Biophys. Acta*, 696 : 97-100 (1982)
- Iven, H., Brasch, H. and Engster, J.; Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate in rabbits.; *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 15 : 115-120 (1985)
- Kahn A. M., Branham S. and Weiman E. J.; Mechanism of urate and *p*-aminohippurate transport in rat renal microvillus membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.*, 245 , F151-158 (1983)
- Kates, R. Z., Tozer, T. N. and Sorby, D. L.; Increased methotrexate toxicity due to concurrent probenecid administration.; *Biochem. Pharmacol.*, 25 : 1485-1488 (1976)
- Liegler, D. G., Henderson, E. S., Hahn, M. A. and Oliverio, V. T.; The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate.; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 10 : 849-857 (1969)
- Maier, W. P., Leon-Perez, R. and Miller, S. B.; Pneumonitis during low-dose methotrexate therapy.; *Arch. Intern. Med.*, 146 : 602-603 (1986)
- Makhuli, M. J., Polkowski, C. A. and Grassl, S. T.; Organic anion transport in rabbit basolateral membrane vesicles.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273 : 146-153 (1955)
- O'Brien, J. J. and Campoli-Richards, D. M.; Acyclovir: an updated review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy.; *Drugs*, 37 : 233-309 (1989)

- Ohoka, K., Takano, M., Okano, T., Maeda, S. and Inui, K.-I.; *p*-aminohippurate transport in rat renal brush border membranes: a potential-sensitive transport system and an anion exchanger.; *Biol. Pharm. Bull.*, 16: 395-401 (1992)
- Runkel, R., Mroszczak, E., Chaplinm, M., Sevelius, H. and Segre, E.; Naproxen-probenecid interaction.; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24: 706 (1978)
- Saito, H., Masuda, S. and Inui, K.-I.; Cloning and functional characterization of novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in rat kidney.; *J. Biol. Chem.*, 271: 20719-20725 (1996)
- Seegmiller, J. E. and Grayzel, A. I.; Use of the newer uricosuric agents in the management of gout.; *J. Amer. Med. Ass.*, 173: 1076 (1960)
- Shimada, H., Moewes, B. and Burckhardt, G.; Indirect coupling to Na⁺ of *p*-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.*, 253: F795-F801 (1987)
- Smith, R. L. and Walker, D. D.; High-performance liquid chromatographic determination of acyclovir in serum.; *J. Chromatograph.*, 343: 203-207 (1985)
- Somogyi, A. and Heinzow, B.; Cimetidine reduces procainamide elimination.; *N. Engl. J. Med.*, 307: 1080 (1982)
- Somogyi, A., MacLean, A. and Heinzow, B.; Cimetidine-procainamide pharmacokinetic interaction in man: evidence of competition for tubular secretion of basic drugs.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 25: 339-345 (1983)
- Tanigawara, Y., Okumura, N., Hirai, M., Yasuhara, M., Ueda, K., Kioka, N., Komono, T. and Hori, R.; Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1).; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263: 840-845 (1992)

Wang, Y.-M. and Fujimoto, T.; Clinical pharmacokinetics of methotrexate in children.; *Clin.*

Pharmacokinetics 9: 335-548 (1984)

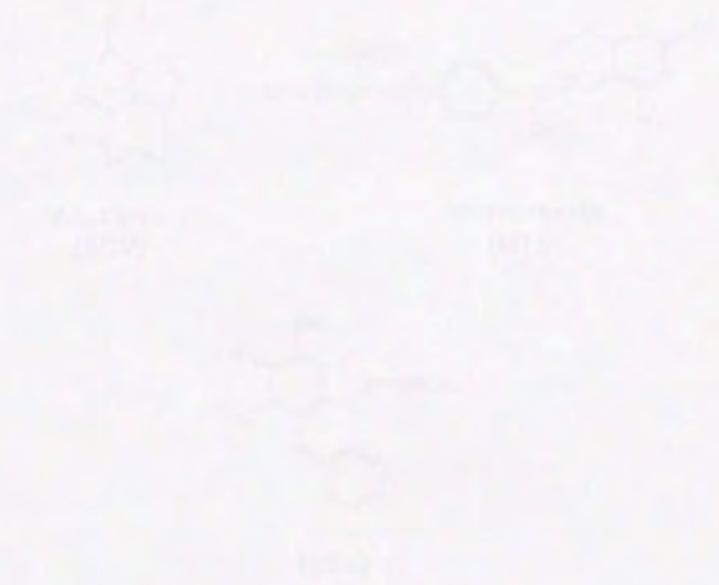
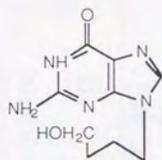
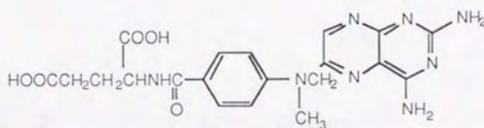


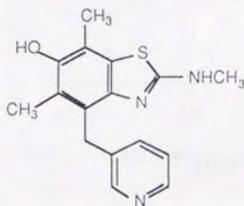
Fig. 1. Chemical structures of methotrexate (MTX), methylene hydrofolate (MHF) and dihydrofolate (DHF).



**Acyclovir
(ACV)**



**Methotrexate
(MTX)**



E3040

Fig. 1 Chemical structure of acyclovir (ACV),
methotrexate (MTX) and E3040

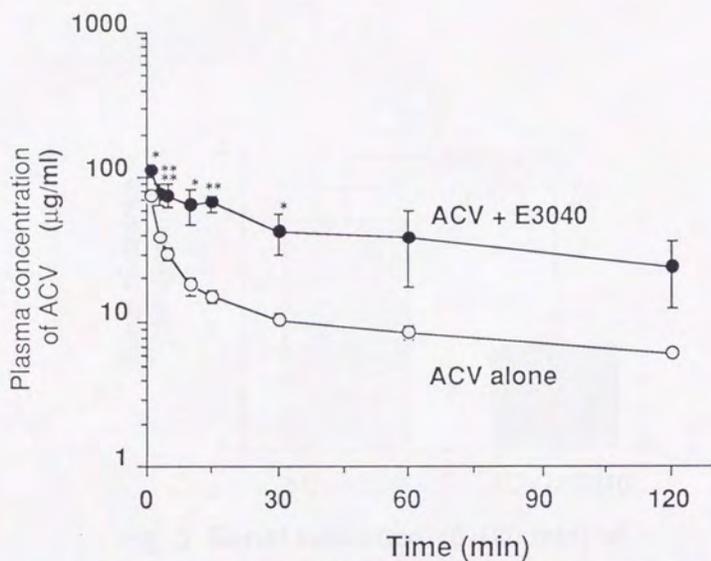


Fig. 2 Plasma concentration-time profiles of acyclovir (ACV) with (●) or without (○) 50 mg/kg i.v. administration of E3040 after i.v. administration of ACV (25 mg/kg). ACV was administered 1 min after the i.v. administration of E3040.

** , $p < 0.01$; * , $p < 0.05$ (mean \pm S.D.; $n=3$)

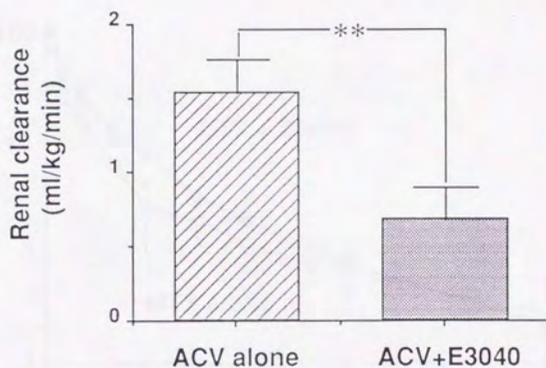


Fig. 3 Renal clearance (0-120 min) of aciclovir (ACV) after i.v. administration of ACV (25 mg/kg) with E3040 (50 mg/kg).

** $p < 0.01$ (mean \pm S.D.; $n=3$)

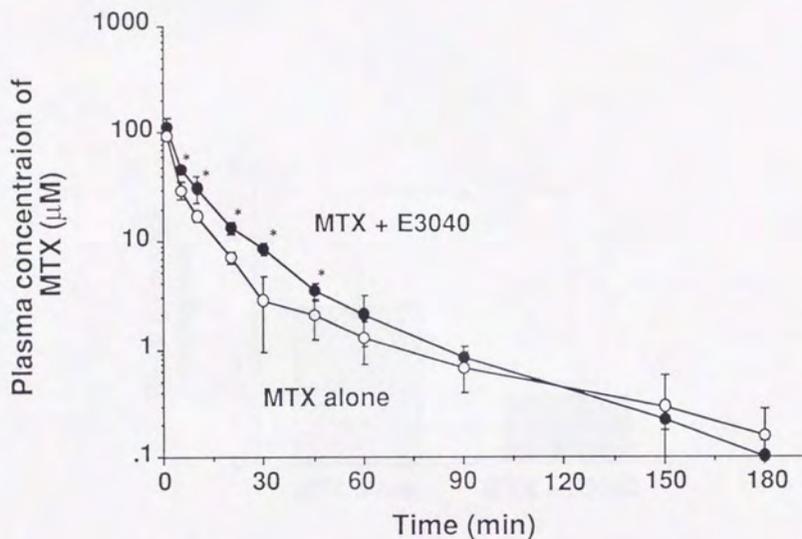


Fig. 4 Plasma concentration-time profiles of methotrexate (MTX) with (●) or without (○) 50 mg/kg i.v. administration of E3040 after i.v. administration of MTX (10 mg/kg). MTX was administrated 1 min after the i.v. administration of E3040.

*, $p < 0.05$ (mean \pm S.D.; $n=3$)

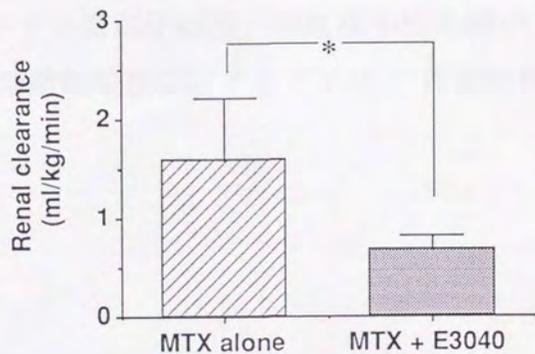


Fig. 5 Renal clearance (0-180 min) of methotrexate (MTX) after i.v. administration of MTX (10 mg/kg) with E3040 (50 mg/kg).
*, $p < 0.05$ (mean \pm S.D.; $n=3$)

第3章

3-2

ラット腎刷子縁膜、側底膜小胞を用いた
他薬剤輸送に対する E3040 の作用解析

緒言

尿酸、*p*-aminohippuric acid を始めとする有機アニオン系物質の輸送系が、腎近位尿管細管に存在することは、古くから知られており、第2章で述べた、尿酸の輸送機構を始めとして、*p*-aminohippuric acid をモデル薬物とした輸送系の解析が数多くなされてきた。側底膜および刷子縁膜に局在する有機アニオン輸送系の機構解析や、アニオン系薬物の輸送特性の解析に膜小胞を用いた実験系が用いられてきた (Hori et al., 1982; Kahn et al., 1983; Inui, et al. 1986; Pritchard, 1988; Ohaka et al, 1992; Makhuli et al., 1994)。同様に、腎尿管に存在する有機カチオン輸送に関しても同様の解析がなされている (Schaeli et al, 1983; Takano et al., 1984; hori et al., 1987; Wruight and Wunz, 1987; Otto et al., 1991)。

第2章において、E3040 は腎刷子縁膜でのアニオン系物質の尿酸の取込みを阻害すること、また前項において、E3040 とアニオン系薬物である acyclovir および methotrexate が *in vivo* において相互作用起すことを示した。そこで本研究では、腎尿管において、E3040 が、アニオン系薬物輸送に影響を与える可能性があると考え、刷子縁膜、および側底膜における尿酸以外のアニオン系薬物の膜輸送に対する E3040 の作用を、*p*-aminohippuric acid (PAH) をモデル薬物として膜小胞を用いて検討した。さらに、有機アニオン輸送系とともに、腎尿管に存在する有機カチオン輸送系に対する E3040 の影響について検討するために、モデル薬物として tetraethylammonium (TEA) を用いて、膜小胞への取込み実験を行った。

材料および方法

実験材料

使用薬物

E3040、E3040-Sulfate (E3040-Sul) はエーザイ (株) (東京) より、AA193は、中外製薬 (株) より、cimetidine は、スミスクライン・ピーチャム (東京) より提供された。probenicid、4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene (DIDS) は、Sigma. Co. (U. S. A.)より、HgCl₂、Mes (2-Morpholinoethanesulfonic acid)、Potassium Gluconate、sucrose、EDTA、mannitol、MgSO₄、KH₂PO₄、K₂HPO₄、HEPES (*N*-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid)、Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)、CaCl₂、マイクロ TP-テストワコー、アルカリ性フォスファ B-テストワコー、ATP、モリブデン酸アンモニウム、ascorbic acid、Scintisol EX-Hは、和光純薬 (株) (東京) より購入した。Ouabain (g-strophanthin) は東京化成工業 (株) (東京)、Percoll はファルマシア・バイオテック (株) (東京)、*p*-[glycyl-2-³H]-aminohippuric acid (4.88 Ci/mmol)、[1-¹⁴C] tetraethylammonium (3.36 mCi/mmol) は、DuPont NEN 社 (U. S. A.)より購入し、その他の全ての試薬は HPLC 用または、特級のものを使用した。

in vitro 腎刷子縁膜小胞、側底膜小胞取込み実験

腎皮質の摘出法

ラット腎皮質は、第 2 章に記述した方法と同様の方法で得た。

腎刷子縁膜小胞 (Brush Border Membrane Vesicles; BBMV) の調製

第2章に記述した方法と同様にカルシウム沈澱法により調製を行ない、腎刷子縁膜小胞を得た。

腎側底膜小胞 (Basolateral Membrane Vesicles; BLMV) の調製

Percoll 自己密度勾配形成遠心法に従って調製した (Sacktor et al., 1981)。以下に操作の概要を述べる。遠心分離は全て 4°C で行い、他の全ての操作は、氷冷下で行った。

得られた腎皮質に湿重量 (X g) の 5 倍容量 (5 X ml) の氷冷した Buffer C (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES-Tris; pH 7.5) を加え、Dounce Homogenizer (Wheaton 社、Type B; U. S. A.) によりホモジナイズし (10 strokes)、ホモジネートを冷却遠心機 (HIMAC Centrifuge SCR208; HITACHI; 東京) により、2,400 × g で 20 秒間遠心分離した。得られた上清を、前操作をさらにもう 2 回繰り返した。その上清をさらに 2,400 × g で 15 分間遠心分離した後、上清と fluffy layer を 20,500 × g で 20 分間遠心分離した。得られたペレット上の fluffy layer を巴斯ツールピペットで回収し、ガラス/テフロン ポッター型ホモジナイザーにより、49.5 ml の Buffer C を加え、1,000 r.p.m. の回転数で 10 回ホモジナイズし、懸濁した (crude plasma membrane; 東京)。これに Percoll 5.5 ml を加え、ガラス棒で良く攪拌した後、2 本のチューブに分け、超遠心機 (Automatic preparative ultracentrifuge 70P-72; HITACHI; 東京) により、48,000 × g で 20 分間遠心分離した。遠心分離後、各チューブの上層から 2 ml ずつ採取し、15 本ずつのフラクションを得た。それぞれのフラクションについて、側底膜局在酵素の (Na⁺ - K⁺) ATPase と、刷子縁膜局在酵素のアルカリフォスファターゼを測定し、刷子縁膜の混入が最小になるように側底膜画分を分取した。アルカリフォスファターゼ活性は、アルカリ性フォスファ B-テストワコーを用い、p-ニトロフェ

ニルリン酸基質法により測定し、 $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase活性は、Quigleyの方法により、ATPを基質として、生成するリン酸の量により活性を調べた(Quigley, 1969)。その結果、上層から16 mlを取り除き、 $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase活性の高い、次の4 ml(膜成分)を採取して側底膜画分として用いた。得られた側底膜画分に、Buffer Cを加えて全量25 mlとした後、 $100,000 \times g$ で120分間遠心分離した。得られた上に存在する白色のペレットに、Buffer B(100 mM mannitol, 20 mM HEPES-Tris buffer, pH 7.5)を加えて、ガラス/テフロンポッター型ホモジナイザーにより、1,000 r.p.m.の回転数で10回ホモジナイズし、再び $100,000 \times g$ で120分間遠心分離した。得られたペレットに適量の取込み実験用のBufferを加え、注射筒(27G \times 1/2; Terumo)を用いて吸引排出を繰返して懸濁させ、腎側底膜小胞(BLMV)懸濁液を得た。得られたBLMVの総タンパク質含量は、2~3 mg/mlであった。調製した膜小胞は、取込み実験まで、 -80°C で冷凍保存し、調製後、1週間以内に実験に供した。

膜小胞のタンパク質濃度は、マイクロTP-テストワコーを用い、ピロガロールレック法にて定量した。

取込み実験

各薬物の腎刷子縁膜小胞(BBMV)、腎側底膜小胞(BLMV)への取込みは、第2章に記述したとおり、迅速濾過法により行なった。

調製した膜小胞の懸濁液は、膜小胞、取込み薬物ごとに作成し、膜小胞調製時に懸濁に用いた。

各取込み実験の懸濁液の組成は、各実験の図表に示した。

結果

Fig. 1 に、得られた crude plasma membrane の各フラクションの ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase 活性とアルカリフォスファターゼ活性を示す。BLM の局在酵素である、($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase 活性は、フラクション no. 9 から no. 10 までが高値を示し、かつ BBM の局在酵素アルカリフォスファターゼ活性が低く、BLM の混在が少ないと判断し、このフラクションを BLM として採取した。最終的に得られた BLMV の ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase 活性は、皮質ホモジネートの活性の約 8-10 倍であり、十分に精製された BLMV が採取できたと考える。

まず、アニオン系およびカチオン系薬物の BBMV 取込みに対する E3040 および、阻害剤の効果を検討した。Fig. 2 に、BBMV への PAH 取込みに対する E3040 および、アニオン輸送阻害剤である、probenecid、DIDS の阻害曲線を示し、Table I に各薬物の PAH 取込みに対する IC_{50} を示す。各薬物ともに濃度依存性を示し、 IC_{50} は、それぞれ、57.0 μM 、834 μM および 33.4 μM であった。

さらに、アニオン輸送系と同様に BBMV に存在するカチオン輸送系に対する E3040 の効果を検討した。カチオン系薬物として、tetraethylammonium (TEA) を用い、対照薬物として、SH 阻害剤の HgCl_2 、カチオン輸送系への親和性が TEA より高いことが知られているカチオン系薬物のシメチジンを用いて、 H^+ 勾配存在下で TEA 取込みに対する阻害効果を測定した。Fig. 3 に、BBMV への TEA 取込みに対する各薬物の阻害曲線を、Table II に各薬物の TEA 取込みに対する IC_{50} を示す。シメチジンおよび HgCl_2 は、腎刷子縁膜小胞への H^+ 勾配存在下において TEA 取込みを阻害したが、E3040 では 100 μM の濃度においても TEA 取込みの阻害作用は観察されなかった。

次に、刷子縁膜と同様に側底膜側にも発現しているアニオン輸送系およびカチオン

輸送系に対する E3040 の効果を検討した。

Fig. 4 に、BLMV への PAH 取込みに対する E3040、E3040-Sul、probenecid および DIDS の阻害曲線を示し、Table III に各薬物の PAH 取込みに対する IC₅₀ を示す。BLMV への PAH 取込みは、probenecid、DIDS および E3040-Sul により濃度依存的に阻害されたが、E3040 では取込み阻害作用は観察されなかった。E3040-Sul の BLMV への PAH 取込みに対する IC₅₀ は 3641 μM であり、DIDS の 1097 μM に比べて、その阻害作用は弱かった。

Fig. 5 に、TEA の BLMV への取込みに対する E3040、E3040-Sul、シメチジンおよび HgCl₂ の阻害曲線を示し、Table IV に各薬物の TEA 取込みに対する IC₅₀ を示す。カチオン系薬物の TEA 取り込みに対して、シメチジンと HgCl₂ は濃度依存的に取込みを阻害したが、E3040 と E3040-Sul はいずれも阻害しなかった。

考察

前項の研究において、アニオン輸送系により腎尿細管における分泌されるアニオン系薬物の acyclovir、methotrexate の血漿中濃度を、E3040 が有意に上昇させ、この主な要因は、腎クリアランスの低下であることを示した。本研究では、E3040 のアニオン系薬物輸送系への阻害作用を調べるために、尿細管上皮細胞の刷子縁膜、側底膜小胞を用いて詳細に検討を行った。

BBMV における、PAH の取込みは、probenecid、DIDS により濃度依存的に阻害された。この阻害の程度は、報告値とはほぼ一致している (Hori et al., 1982)。一方、E3040 は、BBMV への PAH 取込みを probenecid、DIDS と同様に濃度依存的に阻害し、その阻害の強さは、DIDS と、probenecid の中間の強さを示すことがわかり (Fig. 2)、E3040 は、腎尿細管での PAH 輸送、すなわち、分泌の阻害を示すことが示唆された。

さらに、側底膜側にも存在するアニオン輸送系への E3040 の阻害の検討において、E3040 には 1000 μ M と高濃度でさえも、その取込みに対して、阻害を示さなかったが、アニオン系薬物である抱合代謝物の E3040-Sul は、BLMV への PAH 取込みに対する阻害効果を有すること、そしてその阻害効果は、DIDS に比べ弱いことが示された (Fig. 4)。以上のことから、E3040 と E3040-Sul は、腎刷子縁膜側でのアニオン系薬物輸送阻害効果を有するが、側底膜側でのアニオン系薬物輸送阻害は、E3040-Sul のみが弱い阻害効果を有することが示唆された。これらの結果は、E3040 および E3040-Sul により、PAH で代表されるアニオン系薬物の腎尿細管における輸送、すなわち分泌を阻害する可能性を示しており、前項の、acyclovir および methotrexate の腎クリアランスが E3040 併用により低下した現象を説明できると考える。

カチオン系薬物として、tetraethylammonium (TEA) を用いて行なった取込み実験において、刷子縁膜、側底膜ともに、カチオン輸送系に対する阻害剤として知られる、SH 基阻害剤の HgCl_2 、カチオン輸送系に対する親和性が TEA よりも強いシメチジンでは、BBMV、BLMV への TEA 取込みに対し、濃度依存的に阻害効果を示した。一方、E3040 および E3040-Sul は、BBMV、BLMV への TEA 取込みに対して阻害効果を示さなかった (Fig. 3.5)。このことは、E3040 は、*in vivo* において、カチオン系薬物に対し、少なくとも腎挙動における相互作用を示す可能性は極めて低いと考えられる。

膜小胞による実験系は、尿細管薬物輸送機構解析に有用であるばかりでなく、第 2 章において行なった、尿酸取込みに対する阻害作用の解析を始めとして、生体内物質や薬物の尿細管における、相互作用のスクリーニングおよび機構解析のために、簡便かつ有用な実験系であると考えられる。

まとめ

本実験において、E3040が腎尿細管上皮細胞における、アニオン系薬物の輸送を阻害することが証明でき、*in vivo*におけるアニオン系薬物とE3040の相互作用は、このアニオン輸送系に対するE3040の阻害によるものであることが、*in vitro*において証明された。一方、カチオン系薬物輸送には、E3040、E3040-Sulともに輸送阻害効果を有せず、従って、*in vivo*においても、E3040併用によって少なくとも、薬物の腎挙動に対し相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

引用文献

- Hori, R., Maegawa, H., Okano, T., Takano, M. and Inui, K.-I.; Effect of sulfhydryl reagents on tetraethylammonium transport in rat renal brush border membranes.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241 : 1010-1016 (1987)
- Hori, R., Takano, M., Okano, T., Kitazawa, S. and Inui, K.-I.; Mechanism of *p*-aminohippurate transport by brush border and basolateral membrane vesicles isolated from rat kidney cortex.; *Biochem. Biophys. Acta*, 696 : 97-100 (1982)
- Inui, K.-I., Takano, M., Okano, T. and Hori, R.; Role of chloride on carrier mediated transport of *p*-aminohippurate in rat renal basolateral membrane vesicles.; *Biochem. Biophys. Acta*, 855 : 425-428 (1986)
- Kahn, A. M., Branham, S. and Weinman, E. J.; Mechanism of urate and *p*-aminohippurate transport in rat renal microvillus membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.*, 245 : F151-F158 (1983)
- Makhuli, M. J., Polkowski, C. A. and Grassl, S. M.; Organic anion transport in rabbit renal basolateral membrane vesicles.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273 : 146-153 (1994)
- Ohoka, K., Takano, M., Okano, T., Maeda, S. and Inui, K.-I.; *p*-aminohippurate transport in rat renal brush border membranes: a potential-sensitive transport system and an anion exchanger.; *Biol. Pharm. Bull.*, 16 : 395-401 (1992)
- Otto, R., Hui, A. C., Yuan, G. and Gicomini, K. M.; Organic cation transport in human renal brush border membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.*, 261 : F443-F451 (1991)
- Pritchard, J. B.; Coupled transport of *p*-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.*, 255 : F597-F604 (1988)

- Quigley, J. P. and Gotterer, G. S.; Distribution of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -stimulated ATPase activity in rat intestinal mucosa.; *Biochem. Biophys. Acta*, 173 , 456-468 (1969)
- Sacktor B., Rosenbloom, I., Liang, C. T. and Cheng, L.; Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent L-glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles.; *J. Membrane Biol.*, 60: 63-71 (1981)
- Schaeli, C., Schild, L., Overney, J. and Roch-Ramel, F.; Secretion of tetraethylammonium by proximal tubules of rabbit kidney.; *Am. J. Physiol.* , 245 : F238-F246 (1983)
- Takano, M., Inui, K.-I., Okano, T., Saito, H. and Hori, R.; Carrier-mediated transport systems of tetraethylammonium in rat renal brush border membrane vesicles.; *Biochem. Biophys. Acta*, 773 : 113-124 (1984)
- Wright, S. H. and Wunz, T. M.; Transport of tetraethylammonium by rabbit renal brush-border and basolateral membrane vesicles.; *Am. J. Physiol.* , 253 : F1040-F1050 (1987)

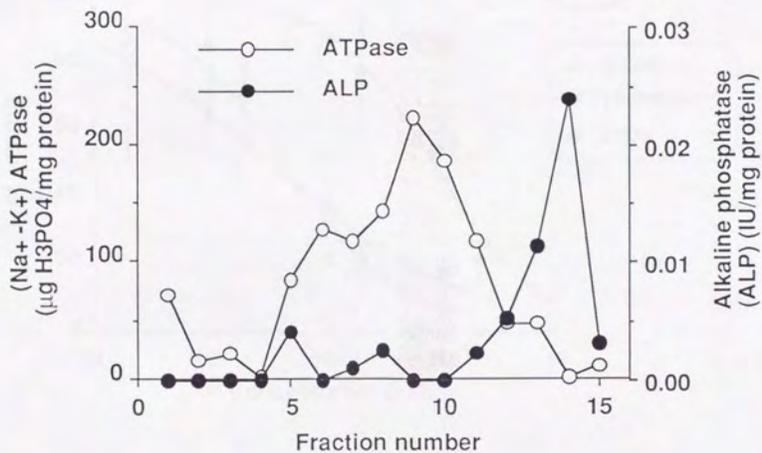


Fig. 1 Distribution of marker enzymes for basolateral and brush border membrane on percoll gradient.

The crude plasma membranes, suspended in 0.25 M sucrose/ 1 mM EDTA/ 10 mM HEPES-Tris (pH 7.5) / 10% (v/v) percoll, were centrifuged in a Hitach ultracentrifuge at $48,000 \times g$ for 30 min. The percoll gradient was collected from the top into 15 fractions of 2 ml.

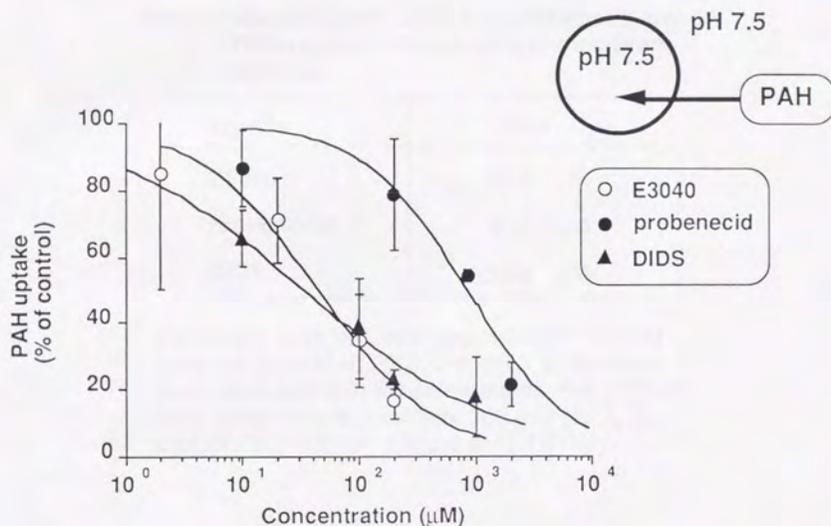


Fig. 2 Concentration dependence of the inhibition of *p*-aminohippuric acid (PAH) uptake by E3040, probenecid and DIDS in brush border membrane vesicles. Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5. Vesicles were incubated with the substrate mixture (180 μl) comprising 100 mM mannitol, 100 mM NaCl, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5, 2.0 μM [³H] PAH. (mean ± S.E.; n=3-4)
(DIDS : 4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene)

Table I IC₅₀ of E3040, DIDS and probenecid on PAH uptake in brush border membrane vesicles .

agents	IC ₅₀
E3040	57.0 μ M
probenecid	834 μ M
DIDS	33.4 μ M

Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5. Vesicles were incubated with the substrate mixture (180 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM NaCl, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5, 2.0 μ M [³H] PAH.

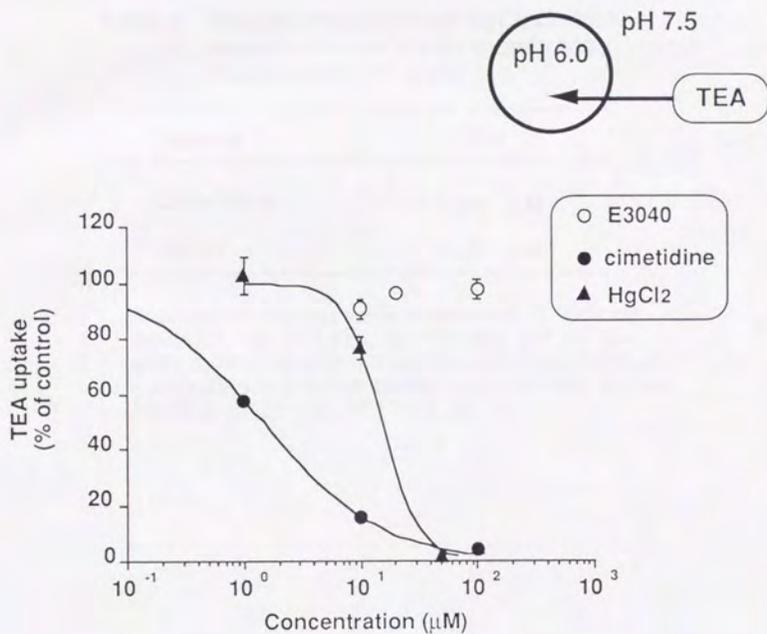


Fig. 3 Concentration dependence of the inhibition of tetraethylammonium (TEA) uptake by E3040, cimetidine and HgCl₂ in brush border membrane vesicles (with H⁺ gradient). Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM Mes, pH 6.0 and were incubated with the substrate mixture (180 μl) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.125 mM [¹⁴C] TEA, pH 7.5. (mean ± S.E.; n=4)

Table II IC₅₀ of cimetidine and HgCl₂ on TEA uptake in brush border membrane vesicles (with H⁺ gradient).

agents	IC ₅₀
cimetidine	1.44 μM
HgCl ₂	15.3 μM

Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM Mes, pH 6.0 and were incubated with the substrate mixture (180 μl) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.125 mM [¹⁴C] TEA, pH 7.5.

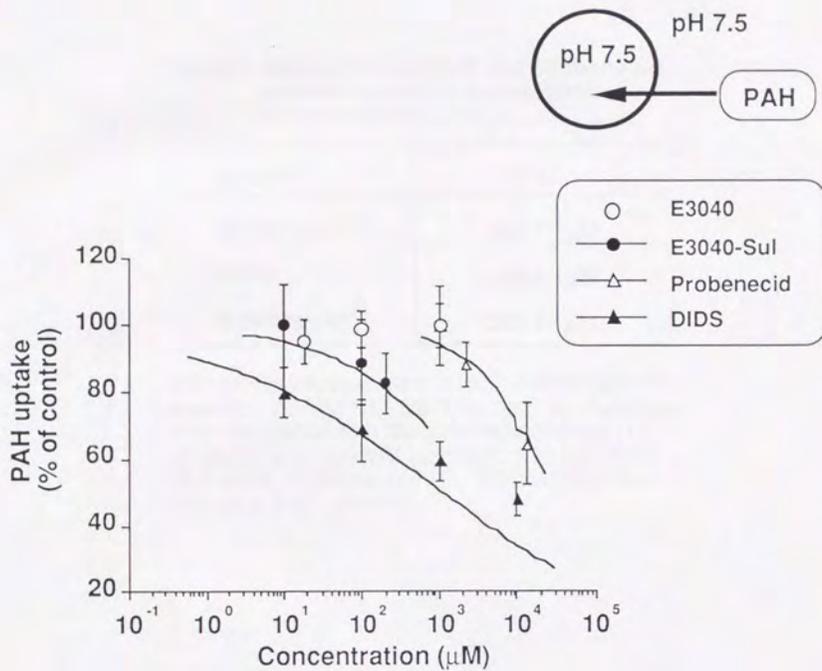


Fig. 4 Concentration dependence of the inhibition of the uptake of *p*-aminohippuric acid (PAH) by E3040, E3040-Sul, probenecid and DIDS in basolateral membrane vesicles.

Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5. Vesicles were incubated with the substrate mixture (180 μl) comprising 100 mM mannitol, 100 mM NaCl, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5, 2.0 μM [³H] PAH.

(mean ± S.E.; n=4-5)

Table III IC₅₀ of E-Sul, DIDS and probenecid on PAH uptake in basolateral membrane vesicles .

agents	IC ₅₀
E3040-Sul	3641 μ M
DIDS	1097 μ M
probenecid	22027 μ M

Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5. Vesicles were incubated with the substrate mixture (180 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM NaCl, 20 mM HEPES-Tris, pH 7.5, 2.0 μ M [³H] PAH. (mean \pm S.E.; n=4-5)

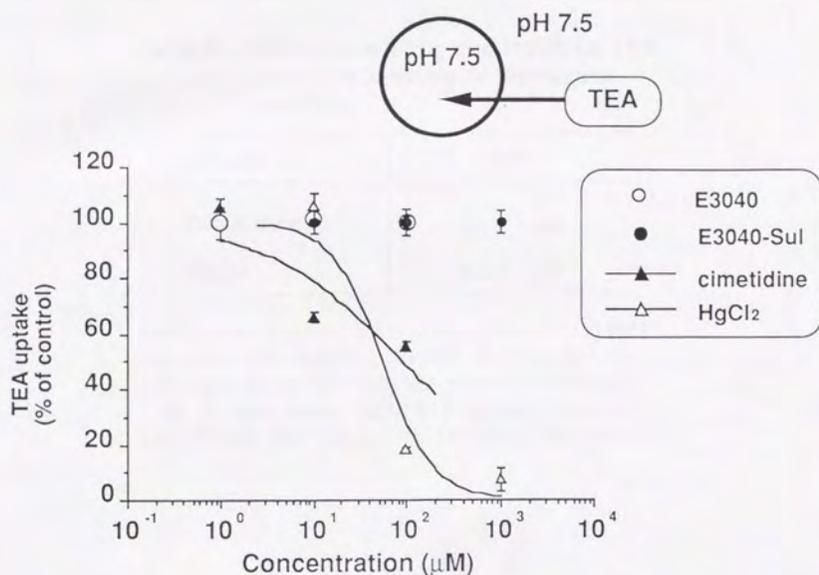


Fig. 5 Concentration dependence of the inhibition of the inhibition of tetraethylammonium (TEA) uptake by E3040, E3040-Sul, cimetidine and HgCl₂ in basolateral membrane vesicles. Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.5 and were incubated with the substrate mixture (180 μl) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.125 mM [¹⁴C] TEA, pH 7.5. (mean ± S.E.; n=3-4)

Table IV IC₅₀ of cimetidine and HgCl₂ on TEA uptake in basolateral membrane vesicles.

agents	IC ₅₀
cimetidine	90.0 μ M
HgCl ₂	54.6 μ M

Membrane vesicles were suspended in 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.5 and were incubated with the substrate mixture (180 μ l) comprising 100 mM mannitol, 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.125 mM [¹⁴C] TEA, pH 7.5.

総括

医薬品の開発において、医薬品はその品質、有効性ととも安全性の確立が必須条件になっている。しかしながら、市販後に重篤な副作用、毒性作用が報告され、発売中止になった医薬品も少なくない。また、抗ウイルス剤のソリブジンと、抗悪性腫瘍剤との併用投与による薬品相互作用作用は多数の死亡例が報道され、薬品の相互作用に関して、医薬品開発の段階において予想される相互作用に関して、臨床データとともに非臨床データをとる重要性が提唱されつつある。これらの前臨床における、副作用、相互作用の機構解析、さらには、副作用、相互作用予測は、動物や *in vitro* の系を用いた基礎的研究により、最終的には、患者へのより適切な副作用、相互作用回避の情報を医療の現場に提供することが重要と考えられる。現在、注目されている相互作用として、主として肝臓における代謝阻害による薬物濃度上昇による副作用の報告が数多くなされており、マイクロソーム、細胞系、分子生物学的なアプローチがなされている。一方、肝臓と同様に主要な薬物のクリアランス器官である腎臓においても、重篤な副作用は数多く報告されており、その機構解析と、相互作用予測に関する基礎的な研究が重要な課題となっている。

本研究では、炎症性腸疾患治療薬として開発された E3040 の臨床第 1 相試験において、プラセボ投与群に比べて実薬投与群で、低い血清中尿酸レベルが観察されたことから、E3040 の尿酸排泄促進作用 および予測される相互作用に関する基礎的検討を行なった。その検討において、E3040 が、ラットにおいて尿酸排泄促進作用を有すること、その作用が主として E3040 未変化体によることを示し、さらに、E3040 の尿酸排泄促進作用が、腎尿細管での糸球体濾過後の分泌前の、再吸収を抑制することによるという機構を明らかにした (第 1 章)。次に、*in vitro* 実験系において E3040 が腎刷子縁膜において尿酸と

ヒドロキシイオンとの対向輸送を抑制することを示し、*in vivo*での尿酸排泄促進作用が、腎尿細管における尿酸輸送阻害によることを示した(第2章)。さらに、尿酸と同じアニオン輸送系で輸送される薬物の腎排泄に対し、E3040が*in vivo*において相互作用を示すこと、さらに、腎アニオン輸送系をE3040が阻害するが、カチオン輸送系の阻害効果は有さないことから、アニオン輸送系により輸送されるアニオン系薬物の腎挙動にE3040が影響を及ぼす可能性が示唆された(第3章)。

本研究において、臨床治験中の薬物の腎排泄における相互作用に関して、事前に*in vitro*、*in vivo*の手法により、動物を用いて基礎的知見を得る方法論の構築が可能となった。今後、医薬品開発において腎排泄過程における相互作用が関係した副作用予測について、本研究のような方法論に基づいた、基礎的な知見が重要な薬品情報を提供するものと考えらる。

謝辞

本研究に際し、御指導と御鞭撻を賜りました東京大学医学部 伊賀立二教授に謹んで深謝致します。

本研究中、終始懇篤な指導を賜りました東京大学医学部 小滝一助教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に際し、多大な御教示を賜りました九州大学薬学部 澤田康文教授に謹んで感謝の意を表します。

膜小胞実験系において、御指導と有益な御助言を戴きました、北里大学薬学部 山田秀雄教授ならびに同伊藤智夫助教授に限りない感謝の意を表します。

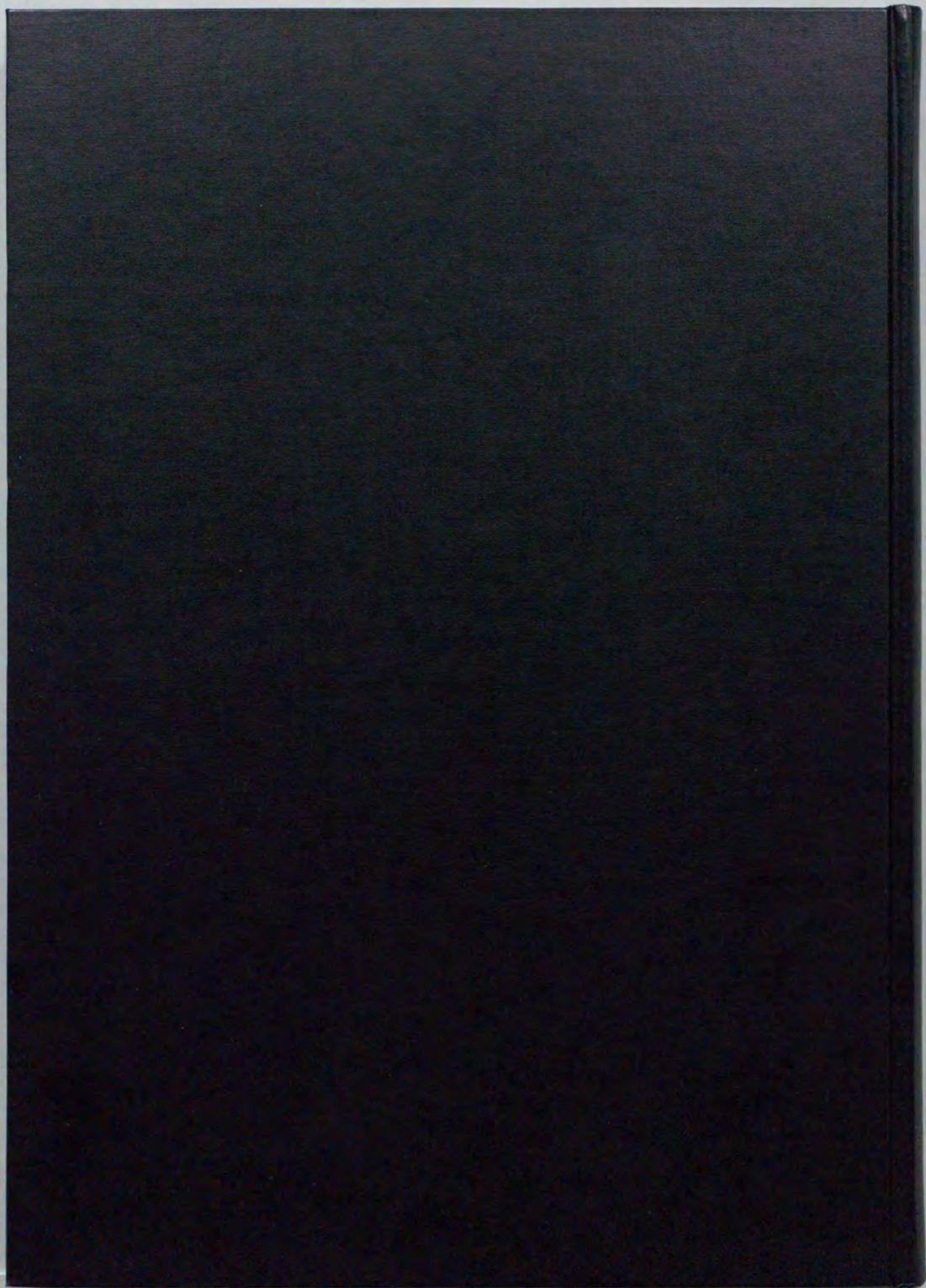
本研究中、多大な御協力を賜りました、エーザイ株式会社 村上 学氏ならびに振津尚夫氏に厚く感謝致します。

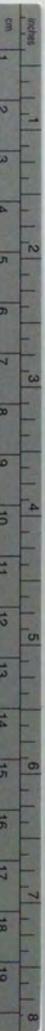
また、多くの御教示を戴きました東京大学医学部附属病院薬剤部の諸先生方に厚く感謝致します。

最後に、研究中、いつも変わらず応援し、援助してくれた両親に感謝致します。

平成9年1月19日

山田 治美





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

