◇◇ミニレビュー◇◇ (平成 11 年度 日本薬物動態学会年会シンポジウムより)

インスリン様作用を示す 4 価バナジウム錯体の体内動態特性 —BCM-ESR 法と放射化分析法による Metallokinetic Analysis—

安井 裕之, 桜井 弘

Pharmacokinetic Analysis of Insulin-mimetic Vanadyl Complexes in Rats —Metallokinetic Analysis by BCM-ESR Method and Neutron Activation Analysis—

HiroYuki YASUI and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto

Summary: Among a wide variety of biological functions of vanadium, the insulin-like effect of vanadium is the most interesting and important. Vanadyl ion (+4 oxidation state of vanadium) and its complexes have been shown to normalize the blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic rats (STZ-rats). During our investigations on vanadyl complexes with several types of coordination mode, vanadyl-6methylpicolinate complex ($\text{VO}(\text{6MPA})_2$) was found to exhibit an excellent insulin-mimetic activity without toxicity as evaluated by both *in vitro* and *in vivo* experiments. Electron spin resonance (ESR) is available to measure the paramagnetic species in biological samples. We have developed the *in vivo* blood circulation monitoring-ESR (BCM-ESR) method to analyze the ESR signals due to paramagnetic metal ions and stable organic radicals in real time. In the present study, we applied this method to analyze the disposition of paramagnetic vanadyl species in the circulating blood in rats in order to know the relationship between the blood glucose normalizing effect and global disposition of vanadium. ESR spectra due to vanadyl species were detected in the circulating blood of rats, and their pharmacokinetic parameters were estimated using compartment models. The results indicated that vanadyl species were distributed to the peripheral tissues and eliminated from the body through the urine. The exposure of vanadyl species in the blood was enhanced by $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ treatment. In addition, the distribution of vanadium in several organs was examined by neutron activation analysis (NAA). Vanadium accumulation in the bone was suggested to relate with the long-term insulin-mimetic effectiveness of $\text{VO}(\text{6MPA})_2$. Based on these results, we concluded that the metallokinetic character of vanadyl complexes is closely related with the structure and insulin-mimetic activity of the complexes.

Key words: BCM-ESR, Neutron activation analysis, Vanadyl complex, Insulin-mimetics, Blood disposition, Pharmacokinetics, Tissue distribution, Urinary excretion

——やすい ひろゆき——

安井裕之: 京都薬科大学代謝分析学教室, 助手, 薬学博士.

1964 年京都市生まれ, 1989 年京都大学薬学部卒業後, 同大学大学院修士課程に進学. 1995 年同大学大学院博士課程修了後, 京都薬科大学助手に採用され, 現在に至っています.

京大時代から現在まで一貫して, 新しい分析手法と解析方法を盛り込んだ動態研究に従事してきました. この間に HPLC, FIA, Microdialysis, SPR (BIACORE), GC, ESR, Chemiluminescence, ICP-MS, NAA, Multi-tracer など様々な分析装置や分析法に出会ってきました. 測定の対象である化学分子も光学異性体などの有機物質から, イオンや錯体の金属無機物質や, 活性酸素や NO(一酸化窒素)などのフリーラジカル種へと幅広く展開してきています. 今後も「これまで目に見えなかったものを, 目に見えてくるようにする」学問である analytical chemistry を自分の研究の原点として, 創薬の開発や生命現象の解明に貢献できる動態研究を実践していきたいと考えています.

京都薬科大学 代謝分析学教室 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

はじめに

バナジウムは幅広い酸化状態をとりうる微量元素であり、様々な生理作用を有することが知られている¹⁻⁴⁾。とりわけ、4価および5価バナジウムのインスリン様抗糖尿病作用が注目されている⁵⁻⁸⁾。我々は、生体中で存在する際のバナジウムの化学形が4価状態であることを明らかにし、4価バナジウムイオン(バナジル)およびその錯体がI型(インスリン依存性)実験糖尿病ラットの高血糖値を正常値に回復させることを報告してきた⁹⁻¹³⁾。

最近、米国においてI型およびII型の糖尿病患者に4価または5価のバナジウムイオンを投与した臨床試験の結果が報告された¹⁴⁻¹⁸⁾。一方、バナジル錯体は、I型およびII型の糖尿病モデル動物を用いた実験結果から、イオン型の硫酸バナジウムと比較してより高いインスリン様作用を有することが明らかにされている¹⁹⁻²⁰⁾。このような成果に基づいて、バナジル錯体の臨床応用が期待されている。将来、バナジル錯体の臨床応用を目指すには錯体の有効性や安全性を確立するとともに、錯体投与時に観測される高いインスリン様効果や持続的な血糖値正常化作用を錯体の体内動態特性と関連づけて把握する必要がある²¹⁻²³⁾。さらに*in vivo*で観測される血糖値正常化作用と同時に、バナジル錯体が構造に依存した体内動態特性を示すかどうかを明らかにすることができれば、より高活性なバナジル錯体の開発につながると考えられる。

これまでに我々は、常磁性化合物の血中動態をリアルタイムで研究する方法としてBCM-ESRを開発してき

た。本研究においては、バナジル錯体の血中動態ならびに組織分布を検討するためにBCM-ESRと中性子放射分析法を用いることとした。バナジル錯体には、これまで経口投与により有効な錯体として見いだされたバナジル-6-メチルピコリネート($\text{VO}(\text{6MPA})_2$)²⁴⁾と、そのリード化合物であるバナジルピコリネート($\text{VO}(\text{PA})_2$)¹²⁾を選んだ(**Fig. 1**)。

バナジル化合物の安定性

バナジル-6-メチルピコリネート($\text{VO}(\text{6MPA})_2$)、バナジルピコリネート($\text{VO}(\text{PA})_2$)、および硫酸バナジウム(VS)の生理食塩水、アルブミン溶液、ラット新鮮血液およびラット尿中における*in vitro*の安定性について、室温および77 KでESR測定を行い、シグナルの減衰とESRパラメータ(g値および超微細結合定数A値)の変化を調べた。その結果、全ての溶液中において3種類のバナジル化合物は経時的なESRスペクトルの線型、および信号強度の変化を示さなかったため、血液中ではほとんど酸化還元反応を受けず、安定に存在することがわかった²⁵⁾。

BCM-ESR法による血中濃度のMetallokinetic analysis

バナジル錯体は常磁性を示すため、BCM-ESR法を適用して血中動態を検討した²⁶⁻²⁹⁾。健常Wistar系雄性ラットにペントバルビタールを腹腔内投与して、麻酔下で大腿静脈および動脈にカニューレーションを施してシリコンチューブと連結しESR測定用石英セルに接続した。VS、 $\text{VO}(\text{PA})_2$ もしくは $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ をバナジウムとして0.5 mg/kgの投与量で大腿静脈内に急速投与後、直ちにESR測定を行い、30秒毎に循環血液中のバナジル種をモニターした。全ての化合物で、循環血液中にバナジル種に基づく8本線のESRスペクトルが観測され、シグナル強度は経時的に減衰した。バナジル種に基づくESR信号の強度を絶対検量線を用いて血中濃度に換算し、得られた血中濃度の時間推移をコンパートメントモデル³⁰⁾に基づいて解析した結果を**Fig. 2**に、算出された薬物速度論パラメータを**Table I**に示した²⁵⁾。

血液中で存在するバナジウムの化学形が4価状態であることから、循環血液中におけるバナジル化合物の減衰は血液中での酸化還元によるものではなく、組織への分布や体外への消失によるものと考えた。VSの血中濃度は1-コンパートメントモデルにより解析されたのに対して、 $\text{VO}(\text{PA})_2$ や $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の血中濃度は2-コンパートメントモデルにより解析された。イオン型であるVSは血中と組織間の分布過程が平衡であるのに対して、錯体型である $\text{VO}(\text{PA})_2$ や $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ は分布過程が非平衡であった。すなわち、錯体型はイオン

Fig. 1 Structures of vanadyl complexes
 $\text{VO}(\text{PA})_2$: Bis(picolinato)oxovanadium (IV)
 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$: Bis(6-methylpicolinato)oxovanadium (IV)

Fig. 2 Time courses for the concentration of vanadyl species (VO^{2+}) in the blood monitored by BCM-ESR method. Rats were intravenously administered VS, $\text{VO}(\text{PA})_2$, or $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ at a dose of 0.5 mg (9.8 μmol) of vanadium/kg body weight under anesthesia. ESR spectra were measured at room temperature.

型と比較して血中と組織間における移行性がより緩やかであることが示された。また、 $\text{VO}(\text{PA})_2$ の β 相がVSの消失相とほぼオーバーラップしたことより、投与した $\text{VO}(\text{PA})_2$ は組織内でイオン型に解離している可能性が示唆された(**Fig. 2**)。一方、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の血中動態にはVSや $\text{VO}(\text{PA})_2$ と比較して明かな違いが観測された(**Fig. 2**)。水/オクタノール間の分配係数($P_{o/w}$)により表されるバナジル化合物の脂溶性はVS, $\text{VO}(\text{PA})_2$, $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の順番に増大する($P_{o/w}$ value: $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ (0.60) > $\text{VO}(\text{PA})_2$ (0.33) > VS (0.03))²⁴⁾。したがってバナジル化合物の脂溶性の増大につれて、血中濃度下面積AUCの増大、平均滞留時間MRTおよび半減期 $t_{1/2}$ の延長、全身クリアランス CL_{tot} と分布容積Vdの有意な減少が観測された(**Table I**)。バナジル錯体はイオン型と比較して循環血中からの消失が低下して血中滞留性が増大することが明らかとなり、バナジル化合物の化学構造に依存した血中動態の変動が示された。この動態特性は、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ のより高い血糖降下作用に関係し

ていると考えられる。しかしながら、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ がVSと比較して約20倍も高い $P_{o/w}$ を示すにもかかわらず血液—組織間の移行性がより緩やかである結果を説明するには、血液および組織中でのバナジウム化合物とタンパクとの結合性や化学形について詳細に調べる必要がある^{31,32)}。

中性子放射化分析法による体内分布の解析

血液や臓器中における総バナジウム量の測定には中性子放射化分析法(neutron activation analysis: NAA)^{13,33)}や誘導結合プラズマ質量分析法(inductively coupled plasma-mass spectrometry: ICP-MS)が有効である。ここでは、NAA法により測定した総バナジウムの臓器分布について述べる。VSもしくは $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ をバナジウムとして10 mg/kgの投与量で健常Wistarラットに経口で単回投与し、経時的に腹部大動脈から血液を採取した。生理食塩水で灌流することにより脱血した後、摘出した各臓器(肝臓、腎臓、骨)を凍結乾燥した。各臓器中の総バナジウム量は京都大学原子炉実験所においてNAAにより定量した。VSおよび $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の各臓器内濃度の経時変化を**Fig. 3**に、モーメント解析法³⁴⁾に基づいて濃度推移から算出された薬物速度論パラメータを**Table II**に示した。**Table II**において、組織移行性を表すKpは「血清中のAUC」に対する「臓器中のAUC」の比として、組織滞留性を表す ΔMRT は「臓器中のMRT」と「血清中のMRT」との差として算出した。

VSと $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ はともに総バナジウム量は腎臓が最も高く、ついで骨、肝臓、血液の順に見い出された。また、両化合物ともに組織中における滞留性は骨が最も長く、ついで腎臓、肝臓、血液の順であった。特に骨における $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の組織中濃度の時間推移は、投与後24時間から48時間にかけて上昇しており、錯体型バナジウムが骨へ蓄積する傾向が明確に示された。 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ はI型実験糖尿病ラットの高血糖値を正

Table I Metallokinetic parameters of vanadyl compounds

	$t_{1/2}$ (min)	Vd (mL/kg)	CL_{tot} (mL/min/kg)	AUC (nmol·min/mL)	MRT (min)
VS	5.2±1.2	154±26	22.2±5.1	461±100 [23.5±5.0] ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	7.2±1.6
$\text{VO}(\text{PA})_2$	$t_{1/2}(\alpha)=0.4\pm0.2$ $t_{1/2}(\beta)=8.2\pm1.1$	142±47	15.2±2.9	651±130 [33.2±6.6] ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	9.3±1.7
$\text{VO}(\text{6MPA})_2$	$t_{1/2}(\alpha)=0.5\pm0.1$ $t_{1/2}(\beta)=7.2\pm2.6$	95±10	10.5±2.3	974±246 [49.7±12.5] ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	9.6±3.4

V compounds: 0.5 mg V/kg body weight by intravenous injection under anaesthesia.

*, **: significantly different at the 5% and 1% level of ANOVA, respectively

Fig. 3 Time-dependent distribution of total vanadium in organs of normal rats after single oral administration of VS (left) or VO(6MPA)₂ (right)

Vanadyl complexes were orally administered at a dose of 10 mg (196 μmol) vanadium/kg body weight. Total vanadium in the organs was determined by neutron activation analysis.

Points were expressed as the means ± SDs for three rats.

Table II Metallokinetic parameters for total vanadium in organs after single oral administration

Tissue	Serum		Erythrocytes		Bone		Liver		Kidney	
Vanadyl complex	VS	VO (6 MPA) ₂	VS	VO (6 MPA) ₂	VS	VO (6 MPA) ₂	VS	VO (6 MPA) ₂	VS	VO (6 MPA) ₂
C _{max} (μg/wet g)	0.71	1.30	0.18	0.61	0.54	1.59	0.36	0.89	1.29	3.46
T _{max} (hr)	3.0	6.0	3.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
AUC (μg·hr/wet g)	10.3	15.9	1.26	6.54	26.2	45.7	10.6	17.1	42.4	71.5
MRT (hr)	12.5	11.1	12.7	12.4	23.8	26.0	20.7	19.7	20.8	22.5
K _p	—	—	0.12	0.41	2.54	2.87	1.03	1.08	4.12	4.50
ΔMRT (hr)	—	—	0.2	1.3	11.3	14.9	8.2	8.6	8.3	11.4

常値に回復させるが、この作用は投与終了後も継続して効果を発揮する²⁴⁾。VS による処置では観測されない、この VO(6MPA)₂ の血糖値正常化作用の持続性はその体内動態の特徴、すなわち VO(6MPA)₂ の骨への蓄積に起因するのではないかと推測してきたが^{24,35)}、NAA による結果はその概念を強く支持した。

腎臓においては VS および VO(6MPA)₂ はともに検討した臓器の中では最高濃度 (C_{max}) を示し、組織移行性 (K_p) も最大であった。我々は、バナジル錯体を投与すると急性腎毒性の発現がイオン型と比較して抑制されることを既に報告した^{12,24,33)}。バナジル化合物の腎移行性および腎臓内滞留性と腎毒性発現との関係を明らかにするためには、更に詳細な検討が必要である。

赤血球以外の各組織における VO(6MPA)₂ の AUC

は、VS の AUC と比較して 1.5–1.7 倍程度高くなった。これは、経口投与後の消化管からの VO(6MPA)₂ の bioavailability が VS と比べて高いことを反映している。VO(6MPA)₂ は他のバナジル錯体とは異なり、低用量の経口投与においても十分な血糖降下作用を発揮する²⁴⁾。この一因として bioavailability の上昇が推測されていたが、NAA による結果はその推察を支持した。

バナジルの尿中排泄の ESR による解析

VS, VO(PA)₂ もしくは VO(6MPA)₂ をバナジウムとして 0.5 mg/kg の投与量でラットの尾静脈内に急速投与後、2 時間毎に尿を採取して、3 化合物の尿中濃度を 77 K の X-バンド ESR 測定により定量して尿中排泄動態について検討した (Fig. 4)²⁵⁾。

Fig. 4 Renal clearance of vanadyl species (VO^{2+}) to the urine of rats

The urine was collected every 2 hour from rats which were intravenously administered VS, $\text{VO}(\text{PA})_2$, or $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ at a dose of 0.5 mg (9.8 μmol) of vanadium/kg body weight.

Concentrations of vanadyl species (VO^{2+}) in the urine were determined by X-band ESR at 77 K.

*, **: significantly different at the 5% and 1% level of ANOVA, respectively.

VS や $\text{VO}(\text{PA})_2$ の尿中への最大排泄速度は投与後 2 時間から 4 時間にかけて観測されたのに対して、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の最大排泄速度は投与直後から 2 時間にかけて観測された。また、24 時間のバナジル種の尿中総排泄量は VS が投与量の 35%、 $\text{VO}(\text{PA})_2$ が投与量の 53% であったのに対して $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ では投与量の 61% であった。 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ は VS や $\text{VO}(\text{PA})_2$ と比較して脂溶性が増大しているにもかかわらず、VS や $\text{VO}(\text{PA})_2$ よりも速やかにより多く尿中へ排泄されることが明らかとなった。尿中クリアランス(全身クリアランス×尿中排泄率)を比較すると、VS は $7.8 \pm 1.8 \text{ ml/min/kg}$ 、 $\text{VO}(\text{PA})_2$ は $8.1 \pm 1.5 \text{ ml/min/kg}$ 、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ は $6.4 \pm 1.4 \text{ ml/min/kg}$ であり有意な差は見られなかったが、全てがラットの糸球体濾過速度 (5.2 ml/min/kg) よりも大きな値を示した。バナジル化合物の腎移行性が高い事実も併せて考えると、尿中排泄速度の違いは腎臓内における濃度推移に大きく依存していることが示唆された。放射性同位体のバナジウムを用いた動態実験の結果から、血液中のバナジウムの MRT が約 6 分と非常に短いのにに対して腎臓中の MRT が数時間であり、バナジウムの尿中排泄には腎臓内からの消失が大きく関与していることが示されている²³⁾。バナジル錯体を投与後の腎臓における急性毒性発現の抑制効果については既に述べたが、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ の結果は腎臓からのより速やかな除去機構を反映していると考えられ、これは錯体型による毒性低下の事実を支持した。しかし、イオン型と錯体型のバナジル化合物の腎臓を介した尿中排泄過程には、化学形に依存した生体側の認識機構や、分泌および再吸収を含めた排泄機構に違い

があると考えられるため、今後の検討課題としたい。

おわりに

以上の結果より、バナジル化合物はイオン型と錯体型の化学構造に依存して、バナジル種としての血中動態、臓器分布性、および尿中排泄が変動することを明らかにした。すなわち、 $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ および VS は血液中ではともにバナジル種として安定であるが、BCM-ESR および NAA により測定された *in vivo* の血中濃度推移、臓器内濃度推移、および尿中排泄推移には両化合物間で明らかな相違が観測され、VS と比較して $\text{VO}(\text{6MPA})_2$ は循環血液中からの消失の低下、循環血液中での滞留性の延長、尿中排泄の増加、骨における顕著な滞留性の増加が示された。バナジル錯体の血糖値降下作用の増強と効果の持続性には、それらの体内動態が密接に関与していることが示唆された。様々な配位子を用いてバナジル錯体の化学構造を変えることにより、錯体の体内動態特性を薬効の側面から考えて有利な方向へと変化させることができれば、より高い抗糖尿病活性を持つバナジル錯体の開発に結びつけられると思われる。今後も多くのバナジル錯体の動態パラメータと物性パラメータについて集積する必要がある。また、糖尿病モデル動物における各バナジル錯体の動態特性についても検討していく必要がある。

今回適用した BCM-ESR は、常磁性物質の血中濃度をリアルタイムで測定できるため、常磁性金属化合物やフリーラジカル種の生体における全身系動態を評価するのには極めて有用な分析方法である。我々の研究室では、バナジウム以外の常磁性金属やフリーラジカルを含

む生体関連物質の血中動態解析 (metallokinetic analysis, spinnokinetic analysis) へ BCM-ESR を幅広く適用する研究を展開している。

謝辞 バナジウムの中性子放射化分析でお世話になった京都大学原子炉実験所の高田実弥先生, 松下緑治先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sakurai H., Tsuji A.: Antidiabetic action of vanadium complexes in animals: Blood glucose normalizing effect, organ distribution of vanadium, and mechanism for insulin-mimetic action. in Nriagu, J. O., (ed); *Vanadium in the Environment, Part 2: Health Effects*, Wiley Inc.: New York, 1998; pp 297-315.
- 2) Sakurai H., Fujisawa Y., Fujimoto S., Yasui H. and Taki-no T.: Role of vanadium in treating diabetes. *J. Trace Elem. in Exp. Med.* **12**: 393-401 (1999).
- 3) 桜井 弘: バナジウムと糖尿病. 微量栄養素研究 **16**: 1-12 (1999).
- 4) Thompson K. H., McNeill J. H. and Orvig C.: Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem. Rev.* **99**: 2561-2571 (1999).
- 5) Meyerovitch J., Farfel Z., Sock J. and Shechter Y.: Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. *J. Biol. Chem.* **262**: 6658-6662 (1987).
- 6) Pederson R. A., Ramanadham S., Buchan M. J. and McNeil J. H.: Long-term effects of vanadyl-treatment on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* **38**: 1390-1395 (1989).
- 7) McNeill J. H., Yuen V. G., Hoveyda H. R. and Orvig C.: Bis (maltolato) oxovanadium (IV) is a potent insulin mimetic. *J. Med. Chem.* **35**: 1489-1491 (1992).
- 8) Brichard S. M. and Henquin J. C.: The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**: 265-270 (1995).
- 9) Sakurai H., Tsuchiya K., Nukatsuka M., Sofue M. and Kawada J.: Insulin-like effect of vanadyl ion on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Endocrinol.* **126**: 451-459 (1990).
- 10) Sakurai H., Tsuchiya K., Nukatsuka M., Kawada J., Ishikawa S., Yoshida H. and Komatsu M.: Insulin-mimetic action of vanadyl complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **8**: 193-200 (1990).
- 11) Watanabe H., Nakai M., Komazawa K. and Sakurai H.: A new orally active insulin-mimetic vanadyl complex: bis (pyrrolidine-N-carbodithioato) oxovanadium (IV). *J. Med. Chem.* **37**: 876-877 (1994).
- 12) Sakurai H., Fujii K., Watanabe H. and Tamura H.: Orally active and long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex: Bis (picolinato) oxovanadium (IV). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 1095-1101 (1995).
- 13) Nakai M., Watanabe H., Fujiwara C., Kakegawa H., Satoh T., Takada J., Matsushita R. and Sakurai H.: Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: Studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 719-725 (1995).
- 14) Cohen N., Halberstam M., Shilimovich P., Chang C. J., Shamoon H. and Rossetti L.: Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **95**: 2501-2509 (1995).
- 15) Goldfine A. B., Simonson D. C., Folli F., Patti M. E. and Kahn C. R.: Metabolic effects of sodium metavanadate in human with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 3311-3320 (1995).
- 16) Goldfine A. B., Simonson D. C., Folli F., Patti M. E. and Kahn C. R.: *In vivo* and *in vitro* studies of vanadate in human and rodent diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biochem.* **153**: 217-231 (1995).
- 17) Halberstam M., Cohen N., Shilimovich P., Rossetti L. and Shamoon H.: Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects. *Diabetes* **45**: 659-666 (1996).
- 18) Boden G., Chen X., Ruiz J., Van Rossum G. D. V. and Turco S.: Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **45**: 1130-1135 (1996).
- 19) Sakurai H., Fujii K., Fujimoto S., Fujisawa Y., Takechi K. and Yasui H.: Structure-activity relationship of insulin-mimetic vanadyl complexes with VO(N₂O₂) coordination mode. *ACS Sympo. Series* **711**: 344-352 (1998).
- 20) Fujisawa Y. and Sakurai H.: Evidence for the improvement of noninsulin-dependent diabetes mellitus in KKA^y mice with daily oral administration of bis (6-methylpicolinato) oxovanadium (IV) complex. *Chem. Pharm. Bull.* **47**: 1668-1670 (1999).
- 21) Fukui K., Ohya-Nishiguchi H., Nakai M., Sakurai H. and Kamada H.: Detection of vanadyl-nitrogen interaction in organs of the vanadyl-treated rat: Electron spin echo envelope modulation study. *FEBS Lett.* **368**: 31-35 (1995).
- 22) Bevan A. P., Burgess J. W., Yale J. F., Drake P. G., Lachance D., Baquiran G., Shaver A. and Posner B. I.: *In vivo* insulin mimetic effects of pV compounds: Role for tissue targeting in determining potency. *Am. J. Physiol.* **268**: E60-E66 (1995).
- 23) Setyawati I. A., Thompson K. H., Yuen V. G., Sun Y., Battell M., Lyster D. M., Vo C., Ruth T. J., Zeisler S., McNeill J. H. and Orvig C.: Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats. *J. Appl. Physiol.* **84**: 569-575 (1998).
- 24) Fujimoto S., Fujii K., Yasui H., Matsushita R., Takada J. and Sakurai H.: Long-term acting and orally active vanadyl-methylpicolinate complex with hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **23**: 113-129 (1997).
- 25) Yasui H., Takechi K. and Sakurai H.: Metallokinetic analysis of disposition of vanadyl complexes as insulin-mimetics in rats using BCM-ESR method. *J. Inorg. Biochem.* **78**: 185-196 (2000).
- 26) Takechi K., Tamura H., Yamaoka K., Sakurai H.: Pharmacokinetic analysis of free radicals by *in vivo* BCM (blood circulation monitoring)-ESR method. *Free. Rad. Res.* **26**: 483-496 (1997).
- 27) Sakurai H., Takechi K., Tsuboi H. and Yasui H.: ESR characterization and metallokinetic analysis of Cr(V) in the blood of rats given carcinogen chromate (VI) compounds. *J. Inorg. Biochem.* **76**: 71-80 (1999).

- 28) Sakurai H., Sano H., Takino T. and Yasui H.: A new type of orally active insulin-mimetic vanadyl complex: Bis (1-oxy-2-pyridinethiolato) oxovanadium (IV) with VO(S₂O₂) coordination model. *Chem. Lett.* **1999**: 913-914. (1999).
- 29) Sakurai H., Sano H., Takino T. and Yasui H.: An orally active antidiabetic vanadyl complex, bis (1-oxy-2-pyridinethiolate) oxovanadium (IV), with VO(S₂O₂) coordination mode; *in vitro* and *in vivo* evaluation in rats. *J. Inorg. Biochem.* (in press)
- 30) Yamaoka K., Tanigawara Y., Nakagawa T., Uno T.: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobio-Dyn.* **4**: 879-885 (1980).
- 31) Kiss E., Garribba E., Micera G., Kiss T. and Sakurai H.: Ternary complex formation between VO(IV)-picolinic acid or VO(IV)-6-methylpicolinic acid and small blood serum bioligands. *J. Inorg. Biochem.* **78**: 97-108 (2000).
- 32) Kiss T., Kiss E., Garribba E. and Sakurai H.: Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J. Inorg. Biochem.* (in press)
- 33) Sakurai H., Watanabe H., Tamura H., Yasui H., Matsushita R. and Takada J.: Insulin-mimetic vanadyl-dithiocarbamate complexes. *Inorg. Chim. Acta* **283**: 175-183 (1998).
- 34) Björkman S., Stanski D. R., Harashima H., Dowrie R., Harapat S. R., Wada D. R. and Ebling W. F.: Tissue distribution of fentanyl and alfentanil in the rat cannot be described by a blood flow limited model. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **21**: 255-279 (1993).
- 35) Fukui K., Fujisawa Y., Ohya-Nishiguchi H., Kamada H. and Sakurai H.: *In vivo* coordination structural changes of a potent insulin-mimetic agent, bis (picolinato) oxovanadium (IV), studied by electron spin-echo envelope modulation spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* **77**: 215-224 (1999).