クレンチアゼムの蛋白結合に関する研究

福島 健, 仲村 進, 伊藤 豊*, 高市 雄之

田辺製薬株式会社 薬物代謝研究所, 薬理研究所* 〒335 埼玉県戸田市川岸2-2-50

Key words : Clentiazem, Protein binding, Human plasma protein, Human serum albumin, α_1 -Acid glycoprotein

Studies on the protein binding of clentiazem

Takeshi FUKUSHIMA, Susumu NAKAMURA, Yutaka Ito*, and Osasi TAKAITI
Research Laboratory of Drug Metabolism, Pharmacological Research Laboratory*,
Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
2-2-50, Kawagishi, Toda, Saitama, 335, Japan

Summary

The binding of clentiazem to human plasma protein and to three purified proteins were measured *in vitro*. The effect of interaction with various other drugs, which might be used for combined therapy, on the binding of clentiazem was also measured. The percentage of clentiazem bound to human plasma protein was found to be constant (ca. 90%) at the concentration range of 20~10,000ng/ml. It would be thought that clentiazem was mainly bound to the albumin fraction of plasma and the binding characteristics of clentiazem to albumin was non-specific. No interference of the various other drugs on the binding of clentiazem to plasma protein were found.

序

クレンチアゼム ((+)(2S, 3S)-3-acetoxy-8-chloro-5-(2-(dimethylamino) ethyl)-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4-(5H)-one maleate, TA-3090) は、ジルチアゼムの8位に塩素原子を導入したジルチアゼムの誘導体であり、田辺製薬(株)にて開発中の新規 Ca 拮抗薬である。本薬物は摘出血管 Ca 収縮に対する緩解作用、また高血圧モデル動物において、ジルチアゼムよりも持続的な降圧作用、ならびに冠血流量および椎骨動脈血流量増加作用が認められている¹⁻³⁾。今回、クレンチアゼムの体内動態研究の一環として、ヒト血漿蛋白および各種精製蛋白への結合率、アルブミンならびに α_1 -酸性糖蛋白への結合様式、さらにクレンチアゼムの蛋白結合に及ぼす臨床上の予想併用薬の影響について検討した。

実験材料および実験方法

1. 化合物および試薬

^{14}C -クレンチアゼムはアマシャムインターナショナル (Buckinghamshire, U.K.) にて合成された (Lot No. CFQ5242)。比放射能は1.84 MBq/mg、放射化学的純度は薄層クロマトグラフィーで検討した結果98%であった。標識体は必要に応じ非標識体で希釈して実験に供した。予想併用薬のジクマロールは Aldrich より、フロセミドは東京化成から、またジゴキシン、アスピリンはナカライテスクより購入した。デノパミン、アテノロール、カプトプリル、イデベノンは当社有機化学研究所で合成された。グリペンクラミドはオイグルコン錠 (山之内製薬)、チクロピジンはパナルジン錠 (第一製薬) より抽出したものを

用いた。精製蛋白のヒト血清アルブミン (HSA)、ウシ血清アルブミン (BSA) およびヒト α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AGP) は Sigma 社より購入した。

2. ヒト血漿

健常成人男子志願者6名 (平均年齢41歳、平均体重65kg) から採取した血液を、遠心分離 (4℃, 3,500rpm, 10分) することにより血漿を得た。

3. 限外濾過膜への吸着

ヒト血漿を限外濾過膜 (セントリーフリー, MPS-3, アミコン) で濾過して得られた濾液に、4種の濃度の ^{14}C -クレンチアゼム溶液10 μl (最終濃度: 20, 100, 1,000, 10,000ng/ml) を加え、37℃で10分間インキュベート後、限外濾過を行った。濾過前後での放射能を測定することにより、各濃度での限外濾過膜に対する吸着率を算出した。

4. 血漿蛋白への結合

^{14}C -クレンチアゼムのヒト血漿蛋白への結合率を限外濾過膜を用いて測定した。ヒト血漿1mlを試験管に採り、37℃で5分間プレインキュベートした後、 ^{14}C -クレンチアゼム水溶液の10~20 μl を加えた。 ^{14}C -クレンチアゼムの濃度はヒト血漿中の最終濃度が20, 50, 100, 300, 1,000, 3,000および10,000ng/mlとなるように調製した。37℃で5分間インキュベートし、その100 μl にシンチレーター (クリアゾル, ナカライテスク) を加え放射能を測定した。次いで、残りをセントリーフリーに注入し、37℃にて5分間、3,000rpmで遠心することにより限外濾過し、その濾液の100 μl の放射能を前記同様にして測定した。血漿蛋白結合率は Graben, R.D.⁴⁾ らが用いた次式により求めた。

$$\text{結合率}(\%) = \frac{(\text{濾過前の溶液の放射能} - \text{濾過の放射能}) \times (100 - \text{吸着率}(\%))}{\text{濾過前の溶液の放射能}} \times 100$$

なお、今回用いた標識体の比放射能 (1.84MBq/mg) から定量限界は100ng/ml と計算された。そのため、クレンチアゼム濃度が50ng/ml 以下の結合率は、血漿を数本のセントリーフリーに分けて限外濾過を行い、各濾液の一定量を合して放射能を測定することにより求めた。

6. 血漿蛋白結合の可逆性

ヒト血漿1mlに ^{14}C -クレンチアゼムの試験溶液を加え (血漿中の ^{14}C -クレンチアゼム濃度は0.1 $\mu\text{g/ml}$)、37℃で10分間インキュベート後、0.1mlを放射能の測定用に分取し、次いで残りの血漿にメタノール3mlを加えて振盪、遠心分

離 (3,000rpm, 4℃, 10分) して上清を分取した。残渣にメタノール 3 ml を加え, 前記同様の操作を行い上清を分取した。上清を合わせ, その一部の放射能を測定した。さらに, 残渣に 1 N NaOH 2 ml を加え溶解後, 3 M TCA 1 ml を加えて, 再度蛋白を凝固させた。80%メタノール 3 ml を加え振盪後, 遠心分離して上清を分取した。この操作をさらに 2 回行い, 各上清の一部の放射能を測定した。残渣は蛋白溶解剤 (Solue ne 350, Packard) 1 ml を加え, 加温溶解後, 放射能を測定した。

6. 精製蛋白への結合

HSA, BSA および α_1 -AGP は 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し, 結合実験時の最終濃度がそれぞれ 40 mg/ml, 40 mg/ml および 1 mg/ml になるように調製した。これらの濃度は健康人あるいは健康なイヌの血漿中濃度に相当する。また, ^{14}C -クレンチアゼムは 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し, 実験時の最終濃度が 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.03 $\mu\text{g/ml}$ および 0.3 $\mu\text{g/ml}$ になるように調製した。

蛋白溶液の一定量を 37℃ で 5 分間ブレインキュベート後, 所定の濃度に調製した ^{14}C -クレンチアゼム溶液の一定量を加えた。5 分間インキュベートした後, その一部の放射能を測定し, 残りの溶液は前記同様に処理して蛋白結合率を求めた。なお, 限外濾過膜への吸着補正は前記同様に行った。

7. 結合様式

^{14}C -クレンチアゼムの最終濃度が 0.05~400 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で, HSA に対する結合率を限外濾過法により求めた。また, ^{14}C -クレンチアゼムの 0.05~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲における α_1 -AGP に対する結合率を前記と同様に求めた。

クレンチアゼムの各濃度における結合率より, クレンチアゼムの結合型濃度 (Cb) および非結合型濃度 (Cf) を算出し, Langmuir プロット (1 式) および Scatchard プロット (2 式) により結合様式を解析した。なお, HSA および α_1 -AGP の分子量はそれぞれ 66,500 および 44,100 とした⁵⁾。

$$(1) \quad r = n \cdot K \cdot C_f / (1 + K \cdot C_f)$$

$$(2) \quad r / C_f = n \cdot K - K \cdot r$$

r : 蛋白 1 分子に結合したクレンチアゼムの分子数

n : 蛋白分子の結合サイト数, K : 会合定数

8. 薬物相互作用

クレンチアゼムとの相互作用を検討するため被検薬としてジゴキシン (最終濃度: 5 ng/ml), ジクマロール (最終濃度: 150 ng/ml), グリベンクラミド (最終濃度: 150 ng/ml), フロセミド (最終濃度: 5 ng/ml), チクロピジン (最終濃度: 1 $\mu\text{g/ml}$), カプトプリル (最終濃度: 1.5 $\mu\text{g/ml}$), アテノロール (最終濃度: 700 ng/ml), デノバミン (最終濃度: 100 ng/ml), イデベノン (最終濃度: 1 $\mu\text{g/ml}$) を用いた。被検薬は血漿 1 ml に対して 10~20 μl を添加し, 上記の濃度となるように調製した。37℃ にて 5 分間ブレインキュベートした後, ^{14}C -クレンチアゼムの濃度が 100 ng/ml になるように加えた。クレンチアゼム添加後の処理は上記と同様に行い, クレンチアゼムの結合率を求めた。

結 果

1. 限外濾過膜への吸着

限外濾過膜への吸着率は Table I に示したように, クレンチアゼム濃度の上昇に伴い減少した。これらの濃度と吸着率との関係を最小二乗法により求めた結果, 次式の関係が得られた。したがって, クレンチアゼムの任意の濃度における限外濾過膜への吸着率は, この式によって算出できると考えられた。

$$\text{吸着率 (\%)} = 49.635 - 8.0893 \times \text{Log (クレンチアゼム濃度 (ng/ml))} \quad r = 0.93$$

Table I Adsorption to ultrafiltration membrane

clentiazem conc. ($\mu\text{g/ml}$)	adsorption (%)
0.02	39.1
0.1	32.3
1	27.7
10	16.2

Each value represents the mean value for 2 experiments.

Table II Binding of ^{14}C -clentiazem to human plasma protein

clentiazem conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Bound fraction (%)
0.02	87.9 $\pm$ 1.3
0.05	90.8 $\pm$ 0.9
0.1	90.2 $\pm$ 0.7
0.3	90.5 $\pm$ 1.1
1	90.9 $\pm$ 1.2
3	90.8 $\pm$ 0.5
10	90.4 $\pm$ 0.8

Each value represents the mean $\pm$ S.D. for 6 experiments.

以下に示す蛋白結合率は、この式を用いて吸着率を求め補正した。

2. ヒト血漿蛋白への結合

ヒト血漿蛋白に対する結合率を Table II に示した。 ^{14}C -クレンチアゼムのヒト血漿蛋白に対する結合率は、クレンチアゼムの濃度が20ng/ml のときに若干低い値を示したが、10,000ng/ml までのいずれの濃度においても約90%と一定であった。

3. 血漿蛋白結合の可逆性

メタノールによる ^{14}C -クレンチアゼムのヒト血漿からの抽出率を Table III に示した。メタノールへの放射能の抽出率は添加放射能の98.4%に達し、さらに1N NaOH および3M TCA 処理後にメタノール抽出された放射能を含めると99.2%が抽出され、残渣中の放射能は0.5%にすぎなかった。

4. 精製蛋白への結合

クレンチアゼムの各種精製蛋白に対する結合率を Table IV に示した。クレンチアゼムの3種の濃度 (0.01, 0.03, 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) における HSA に対する結合率は、それぞれ49.5%, 55.8%および51.2%であり、クレンチアゼム濃度のいずれにおいてもほぼ同じであった。また、BSA に対する結合率は55.7%, 53.3%および57.8%と HSA に対する結合率より若干高かったが、HSA の場合と同様、各濃度間で差は認められなかった。また、 α_1 -AGP に対するクレンチアゼムの結合率は15.5~20.3%であった。

Table III Reversibility of binding of ^{14}C -clentiazem to human plasma protein by methanol extraction method

Sample No.	MeOH ext. (%)*	MeOH ext. (%)**	Total ext. (%)	Residue (%)
1	98.2	0.9	99.1	0.6
2	98.6	0.7	99.3	0.5
3	98.3	0.8	99.1	0.5
mean $\pm$ S.D.	98.4 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	99.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0

* : The percentage of 80% MeOH extracts

** : The percentage of 80% MeOH extracts after treatment with 0.1N NaOH and 3M TCA

Table IV Protein binding of ^{14}C -clentiazem to purified proteins (%)

protein	conc. (mg/ml)	Bound fraction (%)		
		0.01*	0.03*	0.3*
HSA	40	49.5 $\pm$ 3.2	55.8 $\pm$ 3.1	51.2 $\pm$ 1.4
BSA	40	55.7 $\pm$ 0.9	53.3 $\pm$ 3.9	57.8 $\pm$ 1.9
α_1 -AGP	1	19.0 $\pm$ 3.6	15.5 $\pm$ 5.3	20.3 $\pm$ 6.2

*Concentration of clentiazem ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

(mean $\pm$ S.D. n=3)

Fig. 1 The relationship between clentiazem concentration (μM) and the ratio of the concentration of free drug (Cf) to bound drug (Cb)

Fig. 2 Plots of clentiazem and HSA interaction
 r : The moles of bound drug per a mole of protein
 Cf : The concentration of free drug (μM)

5. 結合様式

クレンチアゼムの濃度を変化させたときのクレンチアゼムと HSA, あるいは $\alpha 1$ -AGP との結合における結合型薬物濃度 (Cb) と非結合型薬物濃度 (Cf) の比 (Cb/Cf) の関係を Fig. 1 に示した。

HSA において Cb/Cf 値は, クレンチアゼムの濃度の上昇にかかわらず, ほぼ一定であった。一方, $\alpha 1$ -AGP においては, クレンチアゼムの濃度の増加に伴い, 二相性の低下を示した。これ

らの結果から, クレンチアゼムの HSA への結合は非特異的であり, $\alpha 1$ -AGP に対しては特異的に結合することが示唆される。

これらのことを確認するため, Langmuir および Scatchard プロットによる解析を行った。Fig. 2 にクレンチアゼムの HSA への結合の関係を, Langmuir プロットおよび Scatchard プロットで表した。Langmuir プロットでは, クレンチアゼムの非結合型薬物濃度 (Cf) と HSA に結合する分子数 (r) の間に線形性が認められ

Fig. 3 Plots of clentiazem and α_1 -AGP interaction

r : The moles of bound drug per a mole of protein

Cf : The concentration of free drug (μ M)Table V Effect of other drugs on the binding of 14 C-clentiazem (100 ng/ml) to human plasma protein

drugs		Bound fraction (%)
control		90.2 $\pm$ 0.7
Ticlopidine	(1 μ g/ml)	91.1 $\pm$ 0.8
Dicumarol	(150 ng/ml)	90.8 $\pm$ 1.0
Glibenclamide	(150 ng/ml)	91.9 $\pm$ 1.0
aspirin	(300 μ g/ml)	89.6 $\pm$ 1.0
control		92.6 $\pm$ 0.3
Idebenon	(1 μ g/ml)	92.1 $\pm$ 0.4
Atenolol	(700 ng/ml)	92.8 $\pm$ 0.5
Furosemide	(5 ng/ml)	92.5 $\pm$ 0.8
Digoxin	(5 ng/ml)	91.8 $\pm$ 0.5
Denopamine	(100 ng/ml)	92.1 $\pm$ 0.8
Captopril	(1.5 μ g/ml)	92.2 $\pm$ 0.4

Since experiments were divided into two groups,

each control value was in each experiment.

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 6 experiments.

た. また, Scatchard プロットにおいては, r の増加に対して, r/C_f はほぼ一定であった. このような挙動を示す薬物の結合は非特異的な結合と考えられ⁶⁾, クレンチアゼムの HSA に対する結合も非特異的であると考えられた.

Fig. 3 にクレンチアゼムの α_1 -AGP に対する結合を, Langmuir プロットおよび Scatchard

プロットで示した. クレンチアゼムの非結合型薬物濃度(C_f)に対する r 値は低濃度域 (1~10 μ g/ml) では線形性を示し, 高濃度域では非線形性を示した. また, r 値の増加に伴い, r/C_f 値が直線的に低下することから, クレンチアゼムが α_1 -AGP の特異的な結合サイトに結合することが示唆された. 結合サイト数 (n) は約0.4であり,

会合定数 (k) は直線の傾きから求めた結果 $3.43 \times 10^4 M^{-1}$ であった。以上の結果から、クレンチアゼムのアルブミンへの結合様式は非特異的であり、 α_1 -AGP に対しては特異的であると考えられる。

6. 薬物相互作用

クレンチアゼムのヒト血漿蛋白との結合に対し、併用が予想される各種薬物による影響を検討し、その結果を Table V に示した。実験に用いたクレンチアゼムの濃度は、 ^{14}C -クレンチアゼムの比放射能に基づく限外濾過法による結合率測定の定量限界である $100 ng/ml$ とした。一方、ヒトにおけるクレンチアゼム $50 mg$ 経口投与時の C_{max} は約 $30 ng/ml$ であった⁷⁾。そのため、被検薬の濃度もそれぞれの示す C_{max} の約 3 倍となるように設定した。各種併用薬共存下でのクレンチアゼムのヒト血漿蛋白結合率は対照値と同程度であり、検討した併用薬はクレンチアゼムの蛋白結合率に対して影響を及ぼさなかった。

考 察

一般的に塩基性薬物は α_1 -AGP に対する結合率が高く、酸性薬物ではアルブミンへの結合率が高いことが知られている⁸⁾。しかしながら、塩基性薬物である ^{14}C -クレンチアゼムの HSA および BSA への結合率 (約 50%) は α_1 -AGP への結合率 (約 15~20%) よりも高かった。したがって、クレンチアゼムの血漿中における主要結合蛋白種はアルブミンであると判断され、さらに α_1 -AGP への結合も血漿蛋白結合率に寄与すると考

えられる。また、HSA や α_1 -AGP 以外にも、 γ -グロブリン、 β -リポ蛋白への結合がわずかであるが認められている (未発表データ)。クレンチアゼムの血漿蛋白結合は、血漿に添加したほとんどの放射能がメタノールにより抽出されたことから、可逆的な結合であると考えられる。

クレンチアゼムのヒト血漿蛋白への結合率は、 $20 \sim 10,000 ng/ml$ の濃度範囲で約 90% とほぼ一定であった。主要結合蛋白種であるアルブミンへのクレンチアゼムの結合様式は、Langmuir および Scatchard プロットによる解析から、特異的な結合サイトを持たない非特異的な結合であると考えられた。薬物が血漿蛋白に対し特異的な結合サイトをもつ場合、薬物の濃度上昇に伴い、蛋白結合率の減少が観察される。しかしながら、クレンチアゼムの主要結合蛋白種がアルブミンであり、その結合様式が非特異的であるために、クレンチアゼムの濃度上昇に伴うヒト血漿蛋白結合率の減少が認められなかったと考えられる。

クレンチアゼムの血漿蛋白結合に対して臨床上で併用が予想される薬物は影響しなかった。クレンチアゼムは上述したように主にアルブミンと結合し、その結合様式が非特異的であることから、予想併用薬によって影響されなかったものと考えられる。

本研究により、病態時で変動しやすい α_1 -AGP よりもアルブミンへ主に結合すること、また、臨床上併用の可能性がある他の薬物によってその結合が影響されないこと、などクレンチアゼムの血漿蛋白結合の特徴が明らかにされた。

文 献

- 1) Narita, H., Murata, S., Yabana, H., Kikkawa, K., Sugawara, Y., Aki-moto, Y. and Nagao, T.: Long-lasting hypotensive and antihypertensive effects of a new 1,5-benzothiazepine calcium antagonist in hypertensive rats and renal hypertensive dogs. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **38**: 4, 515-520 (1988).
- 2) Murata, S., Kikkawa, K., Yabana, H. and Nagao, T.: Cardiovascular effects of a new 1,5-benzothiazepine calcium antagonist in anesthetized dogs. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **38**: 4, 521-525 (1988).
- 3) Kikkawa, K., Murata, S. and Nagao, T.: Calcium antagonistic and spasmolytic activities of a new 1,5-benzothiazepine derivative in isolated canine and monkey arteries. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **38**: 4, 526-531 (1988).
- 4) Graben, R.D. and Parsons, D.L.: Effects of a perfluorochemical blood

- substitute on diazepam binding by human albumin. *J. Pharm. pharmacol.*, **40** : 684-688 (1988).
- 5) Maruyama, T., Otagiri, M., and Schulman, S.G. : Binding characteristics of coumarin anticoagulants to human α_1 -acid glycoprotein and human serum albumin. *Int. J. Pharm.*, **59** : 137-143 (1990).
 - 6) 小田切優樹, 杉山雄一 : 薬物のタンパク結合実験法, 廣川書店, pp.23-26 (1991).
 - 7) 弘田雄三, 河村慧四郎, 林佐栄子, 森岡淳夫, 寺崎由香, 北山博一, 野田和夫 : TA-3090の臨床第一相試験 (第一報) —経口単回投与試験—, *臨床医薬*, **7** : 1891-1908 (1991).
 - 8) 小田切優樹, 杉山雄一 : 薬物のタンパク結合実験法, 廣川書店, pp.1-22 (1991).