S1-12

5-フルオロウラシルの腸管膜透過：輸送機構 および *in vitro*, *in situ*, *in vivo* 間の定 量的関係

○松久 英二, 湯浅 博昭, 渡辺 淳
名古屋市立大学薬学部薬剤学教室

Intestinal Transport of 5-Fluorouracil: Transport Mechanism and Quantitative *In Vitro-In Situ-In Vivo* Correlation

Eiji MATSUHISA, Hiroaki YUASA, and Jun WATANABE

Department of Biopharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

【目的】経口抗癌剤として臨床的に用いられている 5-フルオロウラシル (5-FU) の生物学的利用率は変動が大きいことが知られているが、消化管吸収および初回通過代謝との関わりは十分に明らかにされていない^{1,2)}。また、5-FUの小腸上皮での輸送についてはNa⁺依存的な担体輸送が関与することが報告されているが^{3,4)}、その詳細については不明である。そこで我々は、ラットでの *in vitro* 実験 (反転腸管, 刷子縁膜小胞) および *in situ* 灌流実験により5-FUの腸管膜透過機構について検討するとともに、生物学的利用率の問題について消化管吸収の面から取り組むため、*in vivo* 実験 (胃腸管内動態解析, 血漿中濃度データの解析) による吸収の評価を行い、各実験系間の吸収ないし膜透過パラメーターの関係について検討をした。

【実験方法】Wistar系雄性ラット (約300 g) を用いて以下の実験を行った。ラットは、*in vitro* 刷子縁膜小胞系および *in vivo* 経口投与実験では一晩絶食させ、その他の実験では非絶食とした。また、³H]5-FUおよび非吸収性マーカーとして¹⁴C]inulinを用い、放射能の測定により定量を行った。

In vitro 刷子縁膜小胞系⁵⁾：小腸上中部からCa²⁺沈殿法により調製した刷子縁膜小胞を用いて、迅速濾過法により5-FUの初期取り込み (10秒) を測定した (25°C)。

In vitro 反転腸管法^{6,7)}：小腸上中部よりラット 1 匹あたり約2 cmの反転腸管を10~15個調製し、5-FUの初期取り込み (1分) を測定した (37°C, 100 cycles/min)。

In situ 灌流実験⁷⁻⁹⁾：小腸中央部10 cmを流速0.15 ml/minで1回灌流して、定常状態での流出灌流液を採取し、5-FUの消失量から吸収を評価した。

In vivo 経口投与実験 (胃腸管内動態解析)¹⁰⁾：ラットに5-FU (1.5 nmol/0.15 ml/rat) を経口投与後、経時的に屠殺し、胃および小腸を摘出して、胃および小腸内残存率を測定した。残存率データを一次の胃排出過程と腸管吸収過程からなる線形モデルにより解析し、腸管吸収速度定数 (k_a) および胃排出速度定数 (k_g) を求めた。

In vivo 経口投与実験（血漿中濃度データの解析）：ラットに5-FU（1.5 nmol/0.15 ml/rat）を経口あるいは静脈内投与した後、経時的に血液を採取し、血漿中濃度を測定した。血漿中濃度データは、1次の吸収過程を伴う1-コンパートメントモデルで解析し、見かけの吸収速度定数（ ka' ）および吸収率（ Fa ）を求めた。経口投与実験データの解析の際には、分布、消失に関するパラメーターを静脈内投与実験により得られた値で固定した。

In vitro, in situ 実験データのモデル解析：ミカエリス-メンテン型の担体輸送と受動輸送からなるモデルを取り込み速度あるいは吸収率と濃度との関係に当てはめ、最大輸送速度（ J_{max} ）、ミカエリス定数（ K_m ）、受動輸送係数（ $CL_{a,d}$ ）を求めた。なお、反転腸管、灌流系では、水相中の拡散抵抗を考慮するため、非攪拌水層を組み込んだモデルを用いて解析を行った。

【結果・考察】

腸管膜透過機構：反転腸管での5-FU（0.01 mM）の Na^+ 存在下での取り込みは、 K^+ 置換した時に比べ4倍程度大きく、顕著な Na^+ 依存性を示した（Fig. 1）。また、 Na^+ 存在下での5-FUの取り込みクリアランスはD-glucose（0.5 mM）に匹敵するものであり、顕著な濃度依存性を示した。さらに、5-FUの取り込みはチミン、ウラシルなどのピリミジン類により阻害されたが、プリン類、ヌクレオシド類によっては阻害されなかったことから、ピリミジン類に特異的な担体輸送が関与していると考えられる。以上の結果は文献情報とも一致した^{3,4)}。

一方、刷子縁膜小胞での5-FUの取り込みは Na^+ 依存性がみられず、5-FUの取り込みクリアランスは Na^+ 存在下でのD-glucose（0.5 mM）の取り込みクリアランスよりはるかに小さかった（Fig. 2）。弱いながらも濃度依存性、類似物質による阻害が認められたことから、担体輸送の関与は否定できないが、刷子縁膜小胞での5-FUの担体輸送能は反転腸管に比べて著しく低いと考えられる。

反転腸管法、刷子縁膜小胞系に加えて、*in situ* 灌流系で得られた5-FUの腸管膜透過

Fig. 1 Na^+ -Dependent Uptake of 5-FU in Rat Intestinal Everted Sacs: Comparison with the Uptake of D-Glucose
Mean $\pm$ S.E. (n=3); 0.5 mM D-glucose; 0.01 mM 5-FU; uptake measurement at 1 min; a) $p < 0.01$.

Fig. 2 Na^+ -Independent Uptake of 5-FU in Rat Brush Border Membrane Vesicles: Comparison with the Uptake of D-Glucose
Mean $\pm$ S.E. (n=3); 0.5 mM D-glucose, 0.01 mM 5-FU; uptake measurement at 10 sec; a) $p < 0.01$.

パラメーターをTable 1 にまとめた。反転腸管と*in situ* 灌流系とでは、 K_m 値はほぼ一致しており、また、両実験系ともに線形領域（濃度 $\ll K_m$ ）での担体輸送能を表す輸送係数（ $CL_{a,c}=J_{max}/K_m$ ）は受動輸送係数（ $CL_{a,d}$ ）より1桁大きく、線形領域では担体輸送が主であることが示された。しかし、刷子縁膜小胞では K_m 値が反転腸管での値の10倍以上大きく、親和性の低下が示唆された。また、刷子縁膜小胞での $CL_{a,c}$ は $CL_{a,d}$ とほぼ等しく、担体輸送の寄与が小さいことが示唆された。このように、 K_m 値、 $CL_{a,c}$ と $CL_{a,d}$ とのバランスという観点からも、刷子縁膜小胞での5-FUの担体輸送能が著しく低いことが明らかとなった。これらの結果は、刷子縁膜での5-FUの担体輸送において、 Na^+ 以外にも重要な役割を果たしている要因があることを示唆するものである。

In vitro, in situ, in vivo 間の定量的関係：経口投与後（1.5 nmol/0.15 ml/rat）の5-FUの胃腸管内動態解析の結果、 k_a は k_g より20倍程度大きく、5-FUの経口吸収が胃排出律速となっている可能性が示唆された（Table 2）。このことは、血漿中濃度データの解析により得られた見かけの吸収速度定数（ k_a' ）が k_a とほぼ一致したことから確認された。一方、本実験で推定される5-FUの腸管腔内濃度は0.01 mM以下であり、担体輸送は線形領域にあると考えられる。そこで、 k_a と腸管腔内容積（ V , 24 μ l/cm）の積として得られた見かけの膜透過クリアランス（ $CL_{a,app}$ ）を*in situ* 1回灌流法および*in vitro* 反転腸管法で得られた線形領域での膜透過クリアランス（ $CL_{a,c} + CL_{a,d}$ ）と比較した結果、これらはほぼ一致しており、*in vitro, in situ, in vivo* 間に定量的に良好な対応関係があることが示された。

Table 1

Kinetic Parameters of the Intestinal Transport of 5-FU in Rats

	J_{max} (nmol/min/cm)	K_m (mM)	$CL_{a,c}$ (μ l/min/cm)	$CL_{a,d}$ (μ l/min/cm)
Perfusion (N)	4.59 ± 0.97	0.126 ± 0.035	36.2 ± 4.8	3.1 ± 0.4
Perfusion (U)	3.00 ± 1.06	0.043 ± 0.035	70.5 ± 39.9	2.3 ± 0.1
Everted sacs	0.74 ± 0.24 (nmol/min/mg)	0.025 ± 0.018	29.6 ± 13.6 (μ l/min/mg)	5.9 ± 0.6 (μ l/min/mg)
BBMVs	1.43 ± 0.98	0.332 ± 2.18	4.7 ± 1.8	2.9 ± 0.6

Data are represented as the computer-fitted parameter with S.D. (perfusion) or S.E. (everted sacs). N, non-anesthesia; U, urethane anesthesia (1.13 g/kg, i.p.).

Table 2

Kinetic Parameters for the Gastrointestinal Absorption of 5-FU in Rats

Method	k_g ($\min^{-1}$)	k_a ($\min^{-1}$)	$CL_{a,app}$ (μ l/min/cm)
<i>In vivo</i>	0.058 ± 0.003	2.212 ± 0.192	53.1
<i>In situ</i> (non-anesthesia)	—	—	39.3 ^a
<i>In situ</i> (urethane)	—	—	72.8 ^a
<i>In vitro</i> (everted sacs)	—	—	35.5 ^a

The k_g and k_a are represented as the computer-fitted parameters with S.E. $CL_{a,app}$, apparent membrane permeability clearance as the product of k_a and the average intestinal lumen volume of 24 μ l/cm. ^a, $CL_{a,c} + CL_{a,d}$ from Table 1.

【まとめ】5-FUの担体輸送について、反転腸管では Na^+ 依存性能動輸送というこれまでの報告を支持する結果を得たが、刷子縁膜小胞では Na^+ 依存性を裏付けることができなかった。

た。したがって、5-FUの担体輸送には、 Na^+ 以外にも重要な役割を担う要因があるものと考えられる。このように、輸送機構については検討の余地があるが、反転腸管での膜透過パラメーターは、*in situ*, *in vivo* でのパラメーターと良好に一致することが示された。

【ABSTRACT】

The intestinal transport mechanism of 5-fluorouracil (5-FU) was investigated in rats using *in vitro* techniques, everted sacs and brush border membrane vesicles (BBMVs), and *in situ* perfusion technique. The gastrointestinal absorption of 5-FU was also evaluated *in vivo* by the analysis of gastrointestinal disposition and plasma concentration in order to examine the quantitative *in vitro-in situ-in vivo* correlation in the absorption. In everted sacs, the uptake of 5-FU was Na^+ - and concentration-dependent, and inhibited by pyrimidines, but not by purines and nucleosides. These results are consistent with previous reports,^{3,4)} and suggest the involvement of pyrimidines-specific carrier-mediated transport in the intestinal transport of 5-FU. It was also shown that the kinetic parameters were close to those in *in situ* perfusion. However, in BBMVs, Na^+ dependency in the uptake of 5-FU was not confirmed. Although a slight concentration dependency and inhibition by pyrimidines were observed, the contribution of carrier-mediated transport appeared to be far smaller than that in everted sacs. Thus, it was suggested that, in addition to Na^+ , some other factor may also play an important role in the intestinal transport of 5-FU. On the other hand, oral absorption of 5-FU was shown to be gastric emptying-limited at a low dose, where the carrier-mediated transport is presumed to be in the linear phase (cocentration $\ll$ Michaelis constant) and most efficient. The apparent membrane permeability clearance (*in vivo*) was in agreement with those in perfusion (*in situ*) and everted sacs (*in vitro*) at comparative concentrations. In conclusion, the carrier-mediated transport of 5-FU was confirmed to be Na^+ -dependent in everted sacs, but not in BBMVs. There may be some other factor than Na^+ may also be required for the transport of 5-FU. It was also shown that there is a good quantitative *in vitro* (everted sacs)-*in situ-in vivo* correlation in the intestinal absorption of 5-FU.

【REFERENCES】

- 1) R. B. Diasio and B. E. Harris., *Clin. Pharmacokin.*, **16**, 215-237 (1989).
- 2) N. Christophidis et al., *Clin. Pharmacokin.*, **3**, 330-336 (1978).
- 3) L. S. Schanker and D. J. Tacco., *Biochem. Biophys. Acta.*, **56**, 469-473 (1962).
- 4) P. Smith et al., *Pharm. Res.*, **5**, 598-603 (1988).
- 5) H. Yuasa et al., *Pharm. Res.*, **10**, 400-404 (1993).
- 6) H. Yuasa et al., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 452-455 (1987).
- 7) H. Yuasa et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **856**, 219-230 (1986).
- 8) H. Yuasa et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **938**, 189-198 (1988).
- 9) H. Yuasa et al., *Pharm. Res.*, **10**, 884-888 (1993).
- 10) H. Yuasa et al., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 264-271 (1989).