Pirmenol (CI-845) の血漿蛋白結合—とくに α_1 -acid glycoprotein (AAG) 濃度との相関—

植 田 孝 子* 小 林 真 一* 安 原 一*

(受付: 1991 年 2 月 15 日)

Plasma Protein Binding of Pirmenol: The Relationship between Plasma Concentration of α_1 -Acid Glycoprotein and Pirmenol

Takako UEDA Shinichi KOBAYASHI and Hajime YASUHARA

Department of Pharmacology, School of Medicine, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

Pirmenol is a newly developed antiarrhythmic drug. The binding of pirmenol to albumin, AAG, in vitro or in vivo was studied using the ultrafiltration method. Regarding the in vitro study, pirmenol bound to a single class binding site of purified human serum AAG (AAG-P), which was characterized by a higher affinity (K_d was 1.14×10^{-6} M) than that of human serum albumin (HSA, K_d was not detectable). The percent of binding of pirmenol to AAG-P and HSA was mainly related to the concentration of AAG-P. Regarding the in vivo study: a single dose of 75, 100, and 150 mg, of pirmenol was administered to 16 patients with ventricular arrhythmia. The peak plasma concentrations were 0.606 ± 0.32 , 0.875 ± 0.44 , or 1.29 ± 0.49 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The binding percent was 63-87% in the plasma and the relationship between the binding/free pirmenol concentration ratio and the AAG concentration in the plasma was shown to be the relation constant 0.48 with $P < 0.01$. The plasma concentration of AAG in these patients was almost within normal range and also the pirmenol concentration in plasma was lower; therefore, the relation constant was a low value. On the other hand, plasma concentrations of AAG in 174 volunteers (21-98 yrs) showed a good correlation between age and plasma concentrations of AAG ($r=0.78$, $P < 0.01$). These data suggest that the free fraction of pirmenol in plasma may be influenced by pathological conditions and age, due to a change in plasma AAG concentration.

Key words: protein binding, α_1 -acid glycoprotein, pirmenol

緒 言

Pirmenol は, Vaughan-Williams 分類の Class

Ia に属する新しい抗不整脈薬で, 各種実験動物¹⁾あるいはヒト^{2,3)}での不整脈に対して, 有効と報告されている. 電気生理学的には quinidine, disopyramide 等の class Ia 抗不整脈薬に類似した性質を有するとされている. Pirmenol は経口投与で

* 昭和大学医学部第二薬理学教室

〒142 東京都品川区旗の台 1-5-8

の bioavailability が高く、血中薬物濃度半減期も 7~9.4 時間と比較的長いこと⁴⁾が特徴とされている。Pirmenol のヒト血漿中蛋白結合率は 83~90% との報告があり、本薬は化学構造的に disopyramide と類似した塩基性薬物であることから、塩基性薬物と特異的に結合する血漿蛋白 α_1 -acid glycoprotein (AAG) との結合率が問題になってくる²⁾。

そこで、今回著者らは pirmenol の血漿蛋白結合に及ぼす AAG の影響について、精製したヒト AAG を用い in vitro で、さらに、不整脈患者を対象に in vivo で検討したので報告する。また、174 人の成人血漿中 AAG 濃度を測定し、加齢と AAG 濃度との相関についても検討したので報告する。

方 法

1. 蛋白結合試験

1) in vitro

Type P AAG (AAG-P) または Human serum albumin (HSA) を 0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.4 に溶解した溶液 800 μ l と pirmenol を 0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.4 に溶解しおのおの濃度に調整した溶液 200 μ l を試験管内にて、37°C 30 分間インキュベーションしたのち、限外ろ過法により結合型分画および遊離型分画に分離した⁵⁾。

ヒト血清または血漿 800 μ l と pirmenol を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、おのおの濃度に調整した溶液 200 μ l を試験管内にて 37°C 30 分間インキュベーションしたのち、限外ろ過法により同様に分離した。

2) in vivo

心室性期外収縮患者 16 例 (男 10 例, 女 6 例) を対象に pirmenol 75, 100, 150 mg を単回経口投与し, 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 時間後に採取した血漿を、限外ろ過法にて、結合型、遊離型薬物分画に分け、おのおのの薬物濃度およびアルブミン (ALB), AAG 濃度を測定し解析した。また、成人ボランティア 174 例 (男 90 例, 女 84 例, 年齢 22~98 歳) の血漿中 ALB および AAG 濃度を測定した。

なお、患者を対象とした試験は名古屋大学医学部第一内科学教室およびその関連施設で実施された。また、成人ボランティアにおける ALB および AAG の測定に際し、昭和大学医学部臨床試験審査委員会からの承認を得、かつ事前に被検者の同意を得て行った。

2. AAG 精製方法

A. M. Gillis らの方法⁶⁾により精製した。まず、ヒト AAG (Sigma Chemical Co., 純度 99%) 100 mg を脱イオン水 10 ml に溶解し、その溶液を透析膜の中に入れ、3000 ml の脱イオン水中、室温にて 2 時間 30 分透析した。透析後、凍結乾燥し、Type C AAG を得た。この Type C AAG 100 mg を 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 4.1, 50 ml およびエタノール、アセトン溶液 (9:1) 200 ml に溶解し、5°C で 2 時間、適時振とうさせながら放置後、6,000 $\times g$ にて 30 分間遠心操作を行った。沈殿部分を 4 ml 冷エタノールで洗浄後、6,000 $\times g$, 30 分間の遠心操作を行い、得られた沈殿に再度前記と同様の操作を施した後、得られた沈殿を凍結乾燥し、Type P AAG (AAG-P) として、実験に用いた。

3. 限外ろ過法

ULTRACENT 30 (Toyo Soda Co.) を使用し、上部にインキュベーション後の溶液または、患者より採取した血漿 800 μ l を注入し、2,000 rpm で 15 分間遠心分離操作を行い、ろ過により、遊離型分画を約 200 μ l 採取し、この分画の薬物濃度を遊離型薬物濃度 (C_u) とした。このとき、フィルターへの薬物の吸着がないことを確認した。

4. 薬物濃度測定法

おのおのの薬物濃度は HPLC 法にて測定した。ULTRACENT 30 に分注したおのおのの溶液の薬物濃度を総薬物濃度 (C_t)、ろ過後の溶液の薬物濃度を遊離型薬物濃度 (C_u) として、結合型薬物濃度 (C_b) を次式より求めた。

$$C_b(M) = C_t(M) - C_u(M)$$

前項で得られた C_t , C_b , C_u の値から、下記の式より R を求め、AAG-P と pirmenol (0.44~5.0 μ g/ml) との結合容量 (n : 1mol の結合部位に結合する薬物の mol 濃度) および解離定数 (K_d) を

Scatchard plots により解析した.

$$R = C_b(M)/\text{protein}(M)$$

5. ALB および AAG 測定方法

心室性期外収縮の患者および成人ボランティア血漿中 ALB 濃度はクリニメイト (第一化学薬品株式会社), AAG 濃度は N-抗血清 α_1 -acid glycoprotein (ベーリングベルケ社) を用い, ROCHE 社製 COBAS FARA にて測定した.

6. 統計処理

危険率の計算は Student t-test, 相関係数については IBM PC 98 対応ソフト Sigma plots を用いて解析した.

成 績

In vitro における pirlmenol の AAG-P に対する結合試験

Scatchard plots により, 解理定数 (K_d) および結合容量 (n) を求めた結果を Tab. 1 に示した. 50 mg/dl AAG-P に対する K_d 値は, 1.14×10^{-6} M であり, 結合定数は 0.88 であったが, 4.5 g/dl HSA に対して Scatchard plots は x 軸と平行になり, K_d および n 値は求めることはできなかった. また, 50 mg/dl AAG-P に対する pirlmenol の Scatchard plots が 2 相性を示さなかったことより, AAG-P の pirlmenol 結合部位は 1 種であると考えられる. そこで AAG-P 溶液の濃度変化にともなう pirlmenol の結合率の変化について検討した. Pirlmenol 溶液の濃度を 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 または 5.0 $\mu\text{g/ml}$ に調整し, AAG-P をそれぞれ 50, 100, 150 mg/dl として実験に用いた場合の結合率の変化を Fig. 1 に示した. Fig. 1(a) に示すように pirlmenol はいずれの濃度を用いても, AAG-P 濃度の上昇に伴い結合率の増加を認めるが, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ のときその結合率の変化はもっと

Tab. 1 Dissociation Constants (K_d) and Number of Binding Sites (n) for Pirlmenol to AAG-P or HSA

	K_d	n
AAG-P 50 mg/dl	1.14×10^{-6} M	0.88
HSA 4.5 g/dl	n. d.	n. d.

Fig. 1 Pirlmenol の AAG-P に対する結合実験における (HSA 非存在下) (a) 結合率変化. 用いた pirlmenol 濃度はそれぞれ $\circ$ 0.5 $\mu\text{g/ml}$, $\bullet$ 1.0 $\mu\text{g/ml}$, $\triangle$ 1.5 $\mu\text{g/ml}$, $\blacktriangle$ 3.0 $\mu\text{g/ml}$, $\square$ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ で示した. $n=4$. (b) 結合型/遊離型 pirlmenol 濃度比と AAG-P 濃度の相関性. $r=0.84$, $P<0.001$.

も顕著となり 50 mg/dl AAG-P のときに 63%, 100, 150 mg/dl AAG-P 溶液ではそれぞれ 75, 87% と直線的に増加している. また, これらの結果を結合比すなわち結合型薬物濃度/遊離型薬物濃度 (B/F) と AAG-P 濃度との相関図として比較してみたものが, Fig. 1(b) である. 相関係数 (r) は 0.84 と非常に高い相関を示し, 危険率は $P<0.001$ であった. さらに 4.5 g/dl HSA と 50 または 100 mg/dl AAG-P を共存させ, pirlmenol の AAG-P に対する結合率の変化について検討した (Fig. 2). AAG-P 単独に比べ, 4.5 g/dl HSA 共存下における各濃度の pirlmenol の結合率は上昇したが, Fig. 2 (b) に示すように pirlmenol の B/F 比は AAG-P 濃度に非常に高い相関を

Fig. 2 Pirmenol の AAG-P に対する結合実験における (4.5 g/dl HSA 存在下) (a) 結合率変化. 用いた pirmenol 濃度は ○ 0.5 µg/ml, ● 1.0 µg/ml, △ 1.5 µg/ml, ▲ 3.0 µg/ml で示した. $n=3$ (b) 結合型/遊離型 pirmenol 濃度比と AAG-P 濃度との相関性. $r=0.995$, $P<0.001$.

示した ($r=0.995$, $P<0.001$). また, pirmenol 溶液をそれぞれ 0.5, 1.0, 1.5 および 3.0 µg/ml に調整し, Sigma 社製 HSA 4.5 g/dl, プール血清またはプール血漿を用いてその結合率の変化について検討した (Fig. 3). プール血漿の ALB, AAG 濃度は 4.4 g/dl, 52.5 mg/dl であり, プール血清ではそれぞれ 4.2 g/dl, 73.5 mg/dl であった. Pirmenol はいずれの濃度を用いても HSA に対しては約 30% の結合率を示し, プール血漿およびプール血清に対しては ALB 濃度と関係なく, AAG 濃度に依存してその結合率は上昇を認めた.

In vivo における pirmenol の蛋白結合試験

Pirmenol 75, 100, 150 mg を単回経口投与した心室性期外収縮患者16例における血漿中結合型お

Fig. 3 In vitro における pirmenol の 4.5 g/dl HSA, plasma または serum に対する結合率変化. 記号は Fig. 2(a) に同じ.

Fig. 4 100 mg pirmenol を単回経口投与された患者の血漿中総 pirmenol 濃度 (○), および遊離型 pirmenol 濃度 (●) の経時の変化.

よび遊離型 pirmenol 濃度を投与直後より 24 時間後まで経時的に測定した. Fig. 4 には 100 mg 投与患者 1 例の結果を示したが, 75, 100 または 150 mg いずれの投与量を用いても pirmenol は Fig. 4 に示すように 2 時間から 3 時間後に最高血中濃度に達し (それぞれ 0.61 ± 0.32 , 0.88 ± 0.44 , 1.29 ± 0.49 µg/ml), 血漿中で 63 から 87% の蛋白結合率を示した. Pirmenol の結合比 (B/F) に対する血漿中 ALB 濃度との相関性について検討した結果, $r=-0.47$ ($P<0.01$) と負の相関を示した (Fig. 5). また, 血漿中 AAG 濃度に対しては $r=0.44$ ($P<0.01$) と血漿中 ALB 濃度に対するのとは逆に正の相関を示した (Fig. 6)

血漿中 ALB または AAG 濃度と加齢との相関性についての検討

22 歳から 98 歳までの成人ボランティア 174 例

Fig. 5 血漿中結合型/遊離型 pirlmenol 濃度比と ALB 濃度との相関性. 16 人の患者より経時的に集めた血漿をサンプルに用いた. $r = -0.47$, $P < 0.01$.

Fig. 6 血漿中結合型/遊離型 pirlmenol 濃度比と AAG 濃度との相関性. サンプルは Fig. 5 と同じ. $r = 0.44$, $P < 0.01$.

の血漿中 ALB および AAG 濃度を測定した結果, 加齢と ALB 濃度との間には, $r = -0.702$ ($P < 0.01$) と負の相関が (Fig. 7), AAG 濃度との間には $r = 0.78$ ($P < 0.01$) と正の, いずれも高い相関が認められた (Fig. 8).

考 察

Pirlmenol は lidocaine, quinidine および disopyramide などの抗不整脈薬と同様に弱塩基性薬物であることから AAG と選択的に結合を示すと考えられている. Ganguly ら⁷⁾, Kerkay⁸⁾ らは, Sigma 社製 AAG は, その精製時に好脂性物質, 重金属などが混入したおそれがありそれらの物質は薬物との結合を阻害する可能性があるとして示唆している. 本研究においても Sigma 社製 AAG 50 mg/dl 溶液と 50 mg/dl AAG-P 溶液にそれぞれ調

Fig. 7 血漿中 ALB 濃度と年齢との相関性. $r = -0.70$, $P < 0.01$, $n = 174$.

Fig. 8 血漿中 AAG 濃度と年齢との相関性. $r = 0.78$, $P < 0.01$, $n = 174$.

整した pirlmenol 溶液を加え, 前述したとおりの結合試験を行った結果, Sigma 社製 AAG 溶液よりも AAG-P 溶液のほうが, より高い結合率を示したため今回 in vitro の試験において Gillis らの方法⁶⁾により作成した AAG-P を用いた. Scatchard plots 法による解析の結果から求めた pirlmenol の K_d 値は, 同様の試験方法を用いて求めたところの quinidine の K_d 値 ($7.1 \times 10^{-8} M$) よりは高く, lidocaine の値 ($2.0 \times 10^{-5} M$) よりは低く disopyramide に近い $1.14 \times 10^{-6} M$ という値を示した. また, n 値が 0.88 であり Scatchard plots が直線を示したことより disopyramide および lidocaine と同様に⁵⁾その AAG に対する結合部位は一つであると考えられる. また, 結合比 (B/F) と AAG-P 濃度との相関が非常に高く, in vitro においては HSA の存在下においてもその相関係数 $r = 0.995$ と非常に高かった. この結果は Hammill らの報告²⁾と同様のものであると考えられる. しかし, 今回の患者を対象に行った試験の結果から

は, pirlmenol の AAG に対する結合比と血漿中 AAG 濃度の相関係数は低く, Hammill らの報告とは一致しなかった. これは, 今回用いた pirlmenol の血漿中濃度が Hammill らの用いた濃度 ($1.0 \sim 3.8 \mu\text{g/ml}$) より低かった ($0.01 \sim 1.98 \mu\text{g/ml}$) ためと, AAG 濃度も正常を越えない範囲であったことの両者に起因するものであると考えられる. しかし, 174 例 (22 歳から 98 歳) の血漿中アルブミン, AAG 濃度に対する年齢の影響を検討した結果は, Veering らの報告⁹⁾とは異なり, AAG と加齢の間に正の相関を認めた ($r=0.78$, $P<0.01$). Veering らの被験者 68 例に対し, われわれの被験者は 174 例と約 2.5 倍であり, 集団の大きさの違いによる統計学上の処理による相違とも考えられるが, 成績に示したように加齢とともに AAG 濃度が上昇する傾向が認められた. また悪性腫瘍や炎症性疾患を併発している症例においては AAG 濃度が上昇しているとの報告もある¹⁰⁾. 一方, 肝硬変を併発している症例¹¹⁾, 乳幼児の場合¹²⁾には著しく AAG 濃度が減少しているとの報告もあり, 詳細については今後の課題である. 以上の結果から, 臨床において pirlmenol を投与する場合, 十分な薬効を得るためには年齢, 病態による AAG 濃度の変化を考慮し, 遊離型薬物濃度の測定にも配慮する必要があると考えられる.

結 論

1) Pirlmenol は AAG-P に対し選択的に結合し, その解離定数は $1.14 \times 10^{-6} \text{ M}$, 結合容量は, 0.88 であった.

2) 心室性期外収縮患者 16 例の血漿中 pirlmenol 蛋白結合率は $77.5 \pm 7.5\%$ であり, その結合の割合は血漿中 AAG 濃度の増加とともに上昇傾向を認めた.

3) 22 歳から 98 歳までの成人血漿中 ALB および AAG 濃度測定結果より, 加齢に対する相関係数はそれぞれ $r=-0.702$, $r=0.78$ であった.

患者血漿サンプル採取にあたり, 藤田保健衛生大学医学部内科学教室外畑巖先生をはじめ, 名古屋大学医学部

第一内科教室関連施設の先生方にご協力をいただき, 感謝いたします.

文 献

- 1) Steffe, T. J., Mertz, T. E., Hastings, S. G. et al.: CI-845 (pirlmenol hydrochloride): A new orally effective long-acting antiarrhythmic agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**: 50-57 (1980).
- 2) Hammill, S. C., Shand, D. G., Routledge, P. A. et al.: Pirlmenol, a new antiarrhythmic agent: initial study of efficacy, safety and pharmacokinetics. *Circulation*, **65**: 369-374 (1982).
- 3) Lee, T. G., Goldberg, A. D., Chang, T. et al.: Pharmacokinetics and efficacy of pirlmenol hydrochloride in the treatment of ventricular dysrhythmia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**: 632-637 (1983).
- 4) Hammill, S. C., Shand, D. G., Harrell, F. E. et al.: Pirlmenol kinetics and effective oral dose. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**: 686-691 (1982).
- 5) 植田孝子, 内田英二, 小林真一ほか: Quinidine, disopyramide および lidocaine と精製ヒト α_1 -acid glycoprotein との結合について. *薬物動態*, **3**: 739-746 (1988).
- 6) Gillis, A. M., Yee, Y.-G. and Kates, R. E.: Binding of antiarrhythmic drugs to purified human α_1 -acid glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.*, **34**: 4279-4282 (1985).
- 7) Ganguly, M., Carnighan, R. H. and Westphal, U.: Steroid-protein interactions. XIV. Interaction between human α_1 -acid glycoprotein and progesterone. *Biochemistry*, **6**: 2803-2814 (1967).
- 8) Kerkay, J. and Westphal, U.: Steroid-protein interactions. XXI. Metal ion inhibition of association between progesterone and α_1 -acid glycoprotein. *Archiv. Biochem. Biophysics*, **129**: 480-489 (1969).
- 9) Veering, B. T. H., Burm, A. G. L., Souverijn, J. H. M. et al.: The effect of age on serum concentrations of albumin and α_1 -acid glycoprotein. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **29**: 201-206 (1990).
- 10) Kremer, J. M. H., Wilting, J. and Janssen, L. H. M.: Drug binding to human α_1 -acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.*, **40**: 1-46 (1988).
- 11) Barry, M., Keeling, P. W. N. and Weir, D.: Severity of cirrhosis and the relationship of α_1 -acid glycoprotein concentration to plasma protein binding of lidocaine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**: 366-370 (1990).
- 12) Notarianni, L. J.: Plasma Protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clin. Pharmacokinet.*, **18**: 20-36 (1990).