薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (4) 345—349 (1988)

迅速及び緩徐アセチル化型ウサギにおけるスルファジメトキシンの
血漿中濃度と組織分布に及ぼすプロベネシドの影響

今村順茂,* 森 博幸, 小田切優樹
熊本大学薬学部

Effect of Probenecid on Plasma Concentration and Tissue Distribution
of Sulfadimethoxine in Fast and Slow Acetylator Rabbits

YORISHIGE IMAMURA,* HIROYUKI MORI, and MASAKI OTAGIRI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1, Oe-honmachi, Kumamoto 862, Japan

(Received October 22, 1987)

The effect of probenecid on the plasma concentration and tissue distribution of sulfadimethoxine (SDM) was examined by using fast and slow acetylator rabbits. The intravenously co-administered probenecid significantly increased the tissue distribution of SDM in fast acetylator rabbits, resulting in the reduction of plasma concentration of SDM. On the other hand, the intravenously co-administered probenecid had no effect on the plasma concentration and tissue distribution of SDM in slow acetylator rabbits. Furthermore, the intravenous co-administration of *N*⁴-acetylsulfadimethoxine, which is a major metabolite of SDM and strongly displaces SDM from its serum protein binding sites, significantly increased the tissue distribution of SDM in fast acetylator rabbits, resulting in the reduction of plasma concentration of SDM. These findings indicate that the acetylation capacity for SDM is an important factor determining the effect of probenecid on the plasma concentration and tissue distribution of SDM in rabbits.

Keywords—sulfadimethoxine; probenecid; acetylation capacity; *N*⁴-acetylsulfadimethoxine; plasma concentration; tissue distribution

最近著者ら¹⁾は、ウサギにスルファジメトキシシン (SDM) とプロベネシドを併用静脈内投与すると、プロベネシドが SDM の主代謝物である *N*⁴-アセチルスルファジメトキシシン (*N*⁴-AcSDM)²⁾ の血漿中濃度を上昇させることにより蛋白結合置換効果を増強させ、SDM の血清蛋白結合を間接的に減少させることを明らかにした。

更に著者ら³⁾は、SDM とプロベネシドを併用静脈内投与した際に観察される SDM の血清蛋白結合の減少及び SDM の血漿中濃度の低下の程度が、ウサギのアセチル化能力と密接な関係があることを明らかにし、すでにその結果の一部を報告した。

今回更に、SDM の血漿中濃度に及ぼすプロベネシドの効果が、ウサギのアセチル化能力によって異なることを詳しく検討するとともに、SDM の組織分布に及ぼすプロベネシドの影響を、迅速及び緩徐アセチル化型ウサギ (以下それぞれ FA ウサギ及び SA ウサギと略す) を用いて検討したところ、いくつかの興味ある知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実験材料 1) 薬物——SDM は第一製薬株式会社から購入したものを、またプロベネシドは科研製薬株式会社から恵与されたものをそのまま使用した。*N*⁴-AcSDM は宇野らの方法⁴⁾に従って SDM から合成した。その他の試薬類はすべて市販の特級品を用いた。

2) 実験動物——雄性白色ウサギ (2.0—3.5 kg) を 36—42 時間絶食した後使用した。

In Vivo 実験 1) SDM の静脈内投与——SDM (50 mg/kg) を等モルの水酸化ナトリウムを加えて生理食塩液 3 ml に溶かし、耳介静脈内に急速投与した。

2) プロベネシド又は *N*⁴-AcSDM の併用静脈内投与——プロベネシド (25 mg/kg) 又は *N*⁴-AcSDM (25

mg/kg) を等モルの水酸化ナトリウムを加えて生理食塩液 3 ml に溶かし, SDM の静脈内投与後ただちに, 耳介静脈内に急速投与した。

3) 採血法——SDM を静脈内投与後, ヘパリン添加注射器を用いて, 耳介静脈より経時的に 1 ml ずつ採血した。血液はただちに遠心分離 (3000 rpm, 15 分間) し血漿を得た。

4) 血漿中の SDM 濃度の定量——血漿 0.2 ml に蒸留水 2.0 ml を加えてよく混和した後, 10% トリクロロ酢酸溶液 1.5 ml を加えて除蛋白を行った。これを 3000 rpm で 10 分間遠心分離し上清を得た。上清 1.0 ml に 0.5 N HCl 2.0 ml を加えた後, Bratton-Marshall 法⁹⁾ に準じて発色させ, 波長 539 nm で吸光度を測定した。あらかじめ作製した検量線から血漿中の SDM 濃度を求めた。

SDM のアセチル化率の算出 SDM (50 mg/kg) を静脈内投与後, 2 時間目に採血を行い血漿を得た。SDM のアセチル化率は, この血漿中の総 SDM 濃度と N^4 -AcSDM 濃度から算出した。

1) 血漿中の総 SDM 濃度——血漿 0.2 ml に蒸留水 2.0 ml を加えてよく混和した後 10% トリクロロ酢酸溶液 1.5 ml を加えて除蛋白を行った。これを 3000 rpm で 10 分間遠心分離し上清を得た。上清 1.0 ml に 0.5 N HCl 2.0 ml を加えた後, 沸騰水浴中で 60 分間加水分解を行った。冷後, Bratton-Marshall 法⁹⁾ に準じて発色させ, 波長 539 nm で吸光度を測定した。あらかじめ作製した検量線から血漿中の総 SDM 濃度を求めた。

2) 血漿中の N^4 -AcSDM 濃度——血漿中の総 SDM 濃度と前述の方法に従って求めた血漿中の SDM 濃度の差を血漿中の N^4 -AcSDM 濃度とみなした。なお SDM を静脈内投与 2 時間目における血漿中には, N^4 -AcSDM 以外の代謝物は含まれていないことを, 岡本の方法⁹⁾によりあらかじめ確認した。

組織分布実験 単独静脈内投与時においては SDM 50 mg/kg を, 併用静脈内投与時においては SDM 50 mg/kg とプロベネド又は N^4 -AcSDM 25 mg/kg を耳介静脈内に急速投与した。薬物投与後 2 時間目に瀉血して殺し, ただちに肝臓, 腎臓及び空腸を摘出した。各組織の SDM 分布量は Fellig らの方法⁷⁾に従って求めた。まず組織の湿重量を測定した後, 組織 1 g 当り 3.5 ml の割合で蒸留水を加えてホモジナイズした。ついで 75% トリクロロ酢酸溶液を組織 1 g に対して 0.5 ml の割合で加え再びホモジナイズした。得られたホモジネートを 3000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を汙過後, 汙紙を少量の蒸留水で洗い流し, 汙液を得た。残渣は少量の蒸留水を加えて懸濁した後, 再び遠心分離し前述と同様の操作により汙液を得た。これらの汙液を合わせて全量を測った。

汙液 2.0 ml に蒸留水 2.0 ml とクロロホルム 5.0 ml を加えてよく振盪した後, クロロホルム層 3.0 ml を分取した。これに 1% アンモニア水 5.0 ml を加えよく振盪した後, 2000 rpm で 5 分間遠心分離し層分離を行った。ついでアンモニア水層 3.0 ml を分取し, これに 3 N HCl 1.0 ml を加え Bratton-Marshall 法⁹⁾に準じて発色させた。発色色素を *n*-ブタノールで抽出し, 波長 539 nm で吸光度を測定し, あらかじめ作製した検量線から汙液中の SDM 濃度を求めた。SDM の組織分布量は次式から算出した。

$$\text{組織分布量} = \frac{C \cdot V}{W} \quad (\mu\text{g/g wet weight})$$

ここで C は汙液中の SDM 濃度, V は汙液量及び W は組織の湿重量である。

非結合形 SDM 濃度の測定 著者らの考案したビスキングチューブを用いる限外汙過法に従って行った。⁸⁾ ビスキングチューブの一端を縫合糸で結び袋状とし, 他端を輪ゴムで限外汙過装置に固定し室温で乾燥させた。チューブ内に試料血漿 1.2 ml を入れ 4°C, 3500 rpm で 40 分間遠心分離した。得られた汙液 0.1 ml 中の非結合形 SDM 濃度を求めた。

統計処理 得られた実験値は平均値±標準誤差で表示し, 有意差の検定は Student の t 検定を適用した。

結 果

1. ウサギにおける SDM のアセチル化率

ウサギに SDM を静脈内投与し, 2 時間目における血漿中の SDM のアセチル化率を調べた。SDM のアセチル化率の分布を示すヒストグラムが Fig. 1 に示されている。

SDM のアセチル化率の分布は, スルファメサジンやスルファダイアジンのアセチル化率の分布^{9,10)}で認められるような明確な 2 峰性は示さなかったが, 一応 2 つのピークが観察されたので, 以後の実験ではアセチル化率 25% 以上を FA ウサギ, 25% 未満を SA ウサギとみなした。このように分類すると, FA ウサギは全体の 75.6%, SA ウサギは全体の 24.4% となり, Gordon ら⁹⁾によるスルファメサジンを用いた実験結果とほぼ一致すること

が判明した。なお実際に以後の実験で用いた FA ウサギと SA ウサギの SDM のアセチル化率の平均値は、それぞれ $42.5 \pm 6.9\%$ 及び $14.5 \pm 1.5\%$ であった。

2. SDM の血漿中濃度に及ぼすプロベネシドの影響

SDM の血漿中濃度に及ぼすプロベネシドの影響を、FA ウサギと SA ウサギを用いて比較検討した。Fig. 2 に示すように、FA ウサギにおいては、プロベネシドを併用静脈内投与すると、SDM の血漿中濃度が有意に低下することが明らかとなった。しかしながら、SA ウサギにプロベネシドを併用静脈内投与しても、SDM の血漿中濃度はほとんど変化しなかった (Fig. 3)。

3. SDM の血漿中濃度に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

FA ウサギに SDM を単独静脈内投与した場合と、 N^4 -AcSDM を併用静脈内投与した場合の SDM の血漿中濃度の経時変化が Fig. 4 に示されている。SDM の血漿中濃度は、FA ウサギにプロベネシドを併用静脈内投与した場合と同様に、 N^4 -AcSDM を併用静脈内投与すると有意に低下することが判明した。

4. SDM の組織分布に及ぼすプロベネシドの影響

SDM の肝臓、腎臓及び空腸への分布に及ぼすプロベネシドの影響を、FA ウサギと SA ウサギを用いて比較検討した。その結果が Table I にまとめて示されている。FA ウサギにおいては、プロベネシドを併用静脈内投与すると、SDM の組織分布が有意に増大することが分かった。特にその効果は、空腸で顕著であった。一方 SA ウサギでは、SDM を単独静脈内投与した場合と、プロベネシドを併用静脈内投与した場合との間で、SDM の組織分布に有意な差異は観察されなかった。

5. SDM の組織分布に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

Table II は、SDM の肝臓、腎臓及び空腸への分布に及ぼす N^4 -AcSDM の影響を、FA ウサギを用いて検討

Fig. 1. Frequency Distribution of Acetylation Capacity for SDM in Rabbits

□, fast acetylators; ▨, slow acetylators; $n=119$.

Fig. 2. Effect of Probenecid on Plasma Concentration of SDM after Intravenous Bolus Injection to Fast Acetylators Rabbits

○, SDM alone; ●, with probenecid.
Values represent the means $\pm$ S.E. of 4 rabbits.
Significantly different from SDM alone, a) $p < 0.01$;
b) $p < 0.005$; c) $p < 0.001$.

Fig. 3. Effect of Probenecid on Plasma Concentration of SDM after Intravenous Bolus Injection to Slow Acetylators Rabbits

○, SDM alone; ●, with probenecid.
Values represent the means $\pm$ S.E. of 4 rabbits.

Fig. 4. Effect of N^4 -AcSDM on Plasma Concentration of SDM after Intravenous Bolus Injection to Fast Acetylators Rabbits

○, SDM alone; ●, with N^4 -AcSDM.
Values represent the means $\pm$ S.E. of 4 rabbits.
Significantly different from SDM alone, a) $p < 0.05$;
b) $p < 0.01$; c) $p < 0.001$.

した結果を示したものである。SDM の肝臓、腎臓及び空腸への分布は、 N^4 -AcSDM を併用静脈内投与すると、いずれも有意に増大することが確認された。

考 察

ヒトや実験動物に2種類の薬物を併用投与すると、薬物と薬物間のみならず、薬物と代謝物間で相互作用が引き起こされることが知られている。¹¹⁻¹³⁾たとえばワルファリンと抱水クロラルを併用投与すると、ワルファリンが抱水クロラルの主代謝物であるトリクロ酢酸によって血清蛋白質の結合部位から置換されるため、抗血液凝固作用が増強されることが報告されている。¹¹⁾

最近著者ら¹⁾は、ウサギに SDM とプロベネシドを併用静脈内投与すると、代謝物を介した蛋白結合置換現象が引き起こされることを報告した。すなわち Fig. 5 に模式図で示すように、プロベネシドが SDM の主代謝物である N^4 -AcSDM の尿細管分泌を阻害することにより、その血漿中濃度を上昇させ、SDM の血清蛋白結合を間接的に減少させることを明らかにした。なお N^4 -AcSDM が尿細管分泌を受けることは、すでに Arita ら¹⁴⁾により明らかにされており、またウサギにおける N^4 -AcSDM の血漿中からの消失がプロベネシドを併用静脈内投与すると遅延されることも確かめられている。¹⁾

ところで SDM を静脈内投与 2 時間目における血漿中の N^4 -AcSDM 濃度は、プロベネシドを併用静脈内投与

TABLE I. Effect of Probenecid (PBC) on Tissue Distribution of SDM in Fast and Slow Acetylators Rabbits

Tissue	Tissue distribution ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
	SDM alone	With PBC
Fast acetylators rabbit		
Liver	6.8 ± 2.5	$10.8 \pm 1.4^a)$
Kidney	16.9 ± 3.4	$21.5 \pm 1.4^a)$
Jejunum	11.7 ± 1.9	$21.1 \pm 4.5^b)$
Slow acetylators rabbit		
Liver	21.4 ± 5.9	25.6 ± 4.8
Kidney	29.9 ± 3.7	32.3 ± 2.7
Jejunum	13.3 ± 3.4	17.3 ± 3.4

Values represent the means $\pm$ S.E. of 5 rabbits.
Significantly different from SDM alone, a) $p < 0.05$;
b) $p < 0.005$.

TABLE II. Effect of N^4 -AcSDM on Tissue Distribution of SDM in Fast Acetylators Rabbits

Tissue	Tissue distribution ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
	SDM alone	With N^4 -AcSDM
Liver	5.5 ± 1.1	$10.4 \pm 2.5^b)$
Kidney	14.5 ± 1.9	$22.9 \pm 3.6^b)$
Jejunum	10.8 ± 4.8	$16.9 \pm 4.8^a)$

Values represent the means $\pm$ S.E. of 5 rabbits.
Significantly different from SDM alone, a) $p < 0.05$; b) $p < 0.005$.

Fig. 5. Mechanism of the *in Vivo* Protein Binding Interaction between SDM and Probenecid (PBC) in Rabbits

すると、FA ウサギと SA ウサギのいずれにおいても上昇するが、その程度は SA ウサギで $22.3 \pm 3.2 \mu\text{g/ml}$ ($n=3$) であるのに対し、FA ウサギでは $68.7 \pm 4.7 \mu\text{g/ml}$ ($n=3$) と顕著であることが分かった。また FA ウサギにおいて認められる $N^4\text{-AcSDM}$ 濃度の上昇の程度は、すでに著者らによって明らかにされている *in vitro* での蛋白結合実験の結果から、¹⁾ SDM をその結合部位から置換するのに十分であった。これらの事実は、SDM が十分に $N^4\text{-AcSDM}$ に代謝される FA ウサギにおいてのみ、 $N^4\text{-AcSDM}$ によって SDM がその結合部位から置換されることを示唆している。実際 FA ウサギにおいては、SDM を静脈内投与 2 時間目における血漿中の非結合形 SDM 濃度が、プロベネシドを併用静脈内投与すると $11.0 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ から $18.6 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$ へ有意に上昇することが確かめられた ($n=4$, $p < 0.05$)。

一般に薬物が血清蛋白質の結合部位から他の薬物によって置換されると、組織分布の増大とそれに伴う血漿中濃度の低下が観察される。そこで $N^4\text{-AcSDM}$ に代謝される割合の大きい FA ウサギと、 $N^4\text{-AcSDM}$ に代謝される割合の小さい SA ウサギを用いて、SDM の血漿中濃度と組織分布に及ぼすプロベネシドの影響を比較検討した。

その結果 FA ウサギでは、プロベネシドの併用静脈内投与により SDM の血漿中濃度が有意に低下し、また組織分布が有意に増大することが明らかになった (Fig. 2, Table I)。一方 SA ウサギでは、プロベネシドを併用静脈内投与しても SDM の血漿中濃度と組織分布にほとんど変化が認められなかった (Fig. 3, Table I)。これらの結果から、SDM とプロベネシドの生体内相互作用は $N^4\text{-AcSDM}$ を介した蛋白結合の置換効果に基づくことが判明した。更に FA ウサギに $N^4\text{-AcSDM}$ を静脈内投与した場合に、SDM の血漿中濃度が低下し、組織分布が増大することもこのことを支持している (Fig. 4, Table II)。

以上のように本研究では、SDM とプロベネシドを併用静脈内投与した場合に、アセチル化能力の大きいウサギにおいてのみ、SDM の血漿中濃度の低下と組織分布の増大が観察されることを明らかにした。このことは、ウサギにおける SDM とプロベネシドの生体内相互作用に、個体差が存在することを意味している。従来からヒトや実験動物においては、薬物の生体内動態に大きな個体差が存在することが指摘されており、一部はその原因も明らかにされている。しかしながら、薬物相互作用の個体差については、まだ十分な検討が加えられていない。本研究において得られた結果は、薬物相互作用における個体差の問題を検討する上で、有用な基礎資料になるものと考えられる。

引用文献

- 1) Y. Imamura, H. Mori, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 274 (1983).
- 2) R. T. Williams, *Fed. Proc.*, **26**, 1029 (1967).
- 3) Y. Imamura, H. Mori, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1768 (1983).
- 4) 宇野豊三, 上田道広, *薬誌*, **12**, 1785 (1960).
- 5) A. C. Bratton, E. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1939).
- 6) 岡本三郎, *最新医学*, **15**, 142 (1960).
- 7) J. Fellig, J. Westheimer, *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 738 (1968).
- 8) Y. Imamura, M. Sonoda, K. Arimori, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 463 (1979).
- 9) G. R. Gordon, A. G. Shafizadeh, J. H. Peters, *Xenobiotica*, **3**, 133 (1973).
- 10) P. du Souich, D. Lalka, A. J. Mclean, A. Vicuna, J. L. McNay, *J. Lab. Clin. Med.*, **92**, 290 (1978).
- 11) E. M. Sellers, J. Koch-Weser, *New Engl. J. Med.*, **283**, 827 (1970).
- 12) Y. Imamura, E. R. Loo, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1967 (1984).
- 13) 今村順茂, 松浦昭朗, 小嶋祐一郎, 末永綾香, 小田切優樹, *薬物動態*, **2**, 155 (1987).
- 14) T. Arita, R. Hori, M. Takada, S. Akuzu, A. Misawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 570 (1972).