スルファジメトキシンの腸管吸収に及ぼす血清蛋白結合の置換効果

今村順茂,* 揚村浩文, 小田切優樹

熊本大学薬学部

Displacing Effect of Serum Protein Binding on Intestinal Absorption of Sulfadimethoxine

YORISHIGE IMAMURA,* HIROFUMI AGEMURA,
and MASAKI OTAGIRI

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

(Received July 18, 1988)

The displacing effect of serum protein binding on the intestinal absorption of sulfadimethoxine (SDM) in rabbits was examined by using *N*⁴-acetylsulfadimethoxine (*N*⁴-AcSDM), a major metabolite of SDM, as a displacing drug. *N*⁴-AcSDM markedly decreased the *in vitro* serum protein binding of SDM, while many drugs including phenylbutazone and salicylic acid did not display such a marked decreasing-effect. The intravenous administration of *N*⁴-AcSDM clearly decreased the *in situ* intestinal absorption of SDM. As expected, the intravenously administered *N*⁴-AcSDM enhanced the serum concentration of unbound SDM in the common jejunal vein. However, the intravenously administered *N*⁴-AcSDM caused no change in the transfer of SDM across the intestinal membrane. These results indicate that the displacement of serum protein binding can become one of factors decreasing the intestinal absorption of SDM.

Keywords—sulfadimethoxine; intestinal absorption; rabbit jejunum; *in situ* recirculation technique; *N*⁴-acetylsulfadimethoxine; serum protein binding; displacing effect

薬物の血清蛋白結合は薬物の組織分布や腎排泄を変化させ、ひいては薬効・毒性に影響を及ぼすことが多くの研究報告で明らかにされている。¹⁾ しかしながら、薬物の腸管吸収に血清蛋白結合がどのように関与しているかまだほとんど分かっていない。従来から消化管膜を透過した薬物分子は、血清蛋白質と結合し、また血流を介してただちに運びさられるため、その部位での非結合形薬物濃度は低く、消化管膜の両側で絶えず大きな濃度勾配が維持されていると考えられている。ところが、薬物と血清蛋白質との結合が他の薬物によって強く置換される場合や、血清蛋白質の急激な減少が認められる場合には、漿膜側の非結合形薬物濃度が著しく上昇し粘膜側と漿膜側の濃度勾配が小さくなるため、薬物の腸管吸収が減少する可能性が考えられる。

最近著者らは、持続性サルファ剤であるスルファジメトキシン (SDM) の血清蛋白結合が、その主代謝物である *N*⁴-アセチルスルファジメトキシン (*N*⁴-AcSDM) によって強く置換されることをウサギを用いて明らかにしてきた。²⁾ そこで本研究では、この SDM と *N*⁴-AcSDM との間で認められる強い蛋白結合置換現象に着目し、SDM の腸管吸収に及ぼす血清蛋白結合の置換効果について詳細な検討を試みた。

実験の部

実験材料 1) 薬物——本研究で用いた薬物は以下に示す各社より恵与されたもの、又は市販のものを使用した。SDM (第一製薬), フェニルブタゾン (日本チバガイギー), フロセミド (興和), サリチル酸 (小野薬品), クロルプロパミド (小野薬品), イブプロフェン (日清製薬), プロベネシド (科研製薬), メフェナム酸 (吉富製薬), ケトプロフェン (科研製薬), インドメタシン (日本シイベルヘグナー), プロコロム (武田薬品)。 *N*⁴-AcSDM は宇野らの方法³⁾ に準じて SDM から合成し、融点, 元素分析及び赤外吸収 (IR) スペクトルにより確認したものをを用いた。その他の試薬類は市販の特級品を使用した。

2) 実験動物——雄性日本種白色ウサギ (体重 2.5—3.0 kg) を 36—42 時間絶食した後使用した。ただし絶食期間中でも水は自由に与えた。

蛋白結合実験 蛋白結合実験は限外濾過法⁴⁾に従って行った。

1) *In Vitro* での血清蛋白結合の測定——試料血清の調製: あらかじめウサギより得られた血清の 9 容に、最終薬物濃度が所定濃度になるように薬物溶液の 1 容を添加したものを試料血清とした。実験操作: ビスキングチューブ (サイズ, 8/32) の一端を縫合糸で結び袋状とし、他端を輪ゴムで限外濾過装置に固定し、室温で約 90 分間乾燥させた。限外濾過装置のチューブ内に試料血清 1.2 ml を入れ、3000 rpm で 40 分間遠心分離した。得られた濾液 0.1 ml 中の SDM 濃度を定量し、血清蛋白結合率を算出した。なお遠心分離は 4°C で行った。

2) 総空腸静脈での血清蛋白結合の測定——*In situ* 腸管吸収実験における所定の時間に総空腸静脈から約 6 ml の血液を採取した。その血液を室温で 1 時間放置後、3000 rpm で 15 分間遠心分離し試料血清を得た。実験操作: *In vitro* での血清蛋白結合の測定の場合と同様に行った。血清及び濾液中の SDM 濃度を定量し、血清蛋白結合率を算出した。

***In Situ* 腸管吸収実験** Goto らの *in situ* 腸管還流法⁵⁾を一部改変した方法で行った。

1) 還流液及び N^4 -AcSDM 注射液の調製——還流液は SDM (500 μ g/ml) 及びフェノールレッド (内容指示薬, 10 μ g/ml) を 1/15 M 等張リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解して調製した。また N^4 -AcSDM 注射液は、 N^4 -AcSDM を等モルの水酸化ナトリウムとともに生理食塩液に溶解して調製した。

2) 実験操作——ウサギをウレタン (1.4 g/kg) で麻酔し正中線にそって開腹した後、空腸部位に 50 cm の間隔でカニューレを挿入し縫合糸で結紮固定した。腸内容を生理食塩液で十分に洗浄除去した後、カニューレを還流ポンプに接続し還流を開始した。なお還流液の液量は 150 ml とし 30 ml/min の速度で還流させた。経時的に 1.0 ml の還流液を採取し、SDM とフェノールレッドの定量を実施した。

3) N^4 -AcSDM の静脈内投与—— N^4 -AcSDM は *in situ* 腸管吸収実験開始 1 時間目に 50 mg/kg の投与量で耳介静脈内に投与した。なおウサギに N^4 -AcSDM を静脈内投与した場合において、血清中に SDM は検出されず、ウサギの体内では脱アセチル化反応は起こっていないことが確認された。

4) 空腸動脈及び空腸静脈からの血液の採取——*In situ* 腸管吸収実験において、 N^4 -AcSDM 静脈内投与 10 分前と 10 分後に、吸収部位の空腸動脈と空腸静脈からそれぞれ 0.5 ml ずつ血液を採取した。血液は直ちに 0.01% サボニン溶液 2.0 ml を加え十分に溶血させた後、血液中 (全血中) の SDM 濃度の定量を実施した。

***In Situ* 腸管分泌実験** 最近著者らによって報告された方法⁶⁾に従って行った。開腹手術は *in situ* 腸管吸収実験の場合と全く同様に行った。等張リン酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.4) が 6 ml/min の速度で上部カニューレから腸管腔へ流入し、下部カニューレから流出してくるようには還流ポンプを接続した。SDM (投与量 50 mg/kg) を静脈内投与した後、流出してくる等張リン酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.4) を 5 分ごとに採取し、その容量と SDM 濃度の測定を行った。

摘出反転腸管実験 McElnay らの方法⁷⁾を一部改変した方法⁸⁾で行った。

1) 薬物溶液の調製——薬物溶液は SDM (500 μ g/ml) 又は N^4 -AcSDM (500 μ g/ml) をタイロッド液 (栄養液) に溶解することにより調製した。

2) 実験操作——ウサギの腸管 (空腸) を摘出し、生理食塩液中で注意深く反転させ、実験装置に結紮固定した。反転させた腸管の内側に N^4 -AcSDM 溶液 7.0 ml を入れた後、37°C に保った SDM 溶液 (70 ml) 中に浸し酸素を送り込んだ。実験開始後、内液を経時的に 0.1 ml ずつ採取し、SDM の定量を行った。

定量法 SDM の定量は Bratton-Marshall 法⁹⁾に従って行った。 N^4 -AcSDM の濃度は、総 (未変化体 + N^4 -アセチル体) SDM 濃度から SDM 濃度をさし引いて求めた。なお総 SDM 濃度は、沸騰水浴中で 1 時間加水分解後 Bratton-Marshall 法⁹⁾により定量した。還流液中のフェノールレッドの定量は、1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて発色させ、波長 555 nm で吸光度を測定する方法で行った。

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. *In Vitro* での SDM の血清蛋白結合に及ぼす N^4 -AcSDM と各種薬物の影響

SDM とウサギ血清との *in vitro* での蛋白結合が、 N^4 -AcSDM 又は各種薬物を添加するとどのように変化するか検討した。その結果が Table I にまとめて示されている。これらの結果から明らかなように、 N^4 -AcSDM は SDM の血清蛋白結合を著しく減少させたが、各種薬物の中でこのような著しい減少効果を示すものは見当らなかった。

2. SDM の *in Situ* 腸管吸収に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

In situ 腸管還流法により, SDM の腸管吸収に及ぼす N^4 -AcSDM の影響を調べた. Fig. 1 は還流液中の SDM の残存率の対数を時間に対してプロットした代表的な例を示したものである. 還流液中の SDM の残存率は, 実験開始 1 時間目に N^4 -AcSDM を静脈内投与すると, 生理食塩液を静脈内投与した結果から予想される値よりも明らかに増加した. このことは, SDM の腸管吸収が N^4 -AcSDM を静脈内投与すると減少することを示している. しかしこの効果は 30 分程度しか持続せず, 一時的なものであった.

3. SDM の腸管からの吸収速度に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

Fig. 2 は *in situ* 腸管還流法による SDM の腸管吸収を模式的に示したものである. いま N^4 -AcSDM を静脈内投与前の SDM の吸収速度を R_a , 空腸動脈と空腸静脈における SDM の血液中 (全血中) 濃度をそれぞれ C_A , C_V , 及び血流速度を F とすると, 次式が成り立つ.

$$R_a = F(C_V - C_A) \quad (1)$$

同様に, N^4 -AcSDM を静脈内投与後の SDM の吸収速度を R_a' , 空腸動脈と空腸静脈における SDM の血液中 (全血中) 濃度をそれぞれ C_A' , C_V' , 及び血流速度を F' とすると次式が成り立つ.

$$R_a' = F'(C_V' - C_A') \quad (2)$$

ここで N^4 -AcSDM の静脈内投与が血流速度に影響を及ぼさないと仮定すると, 式 (1) と式 (2) より次式が得られる.

Fig. 1. Effect of Intravenously Administered N^4 -AcSDM on the *in Situ* Intestinal Absorption of SDM

Dose of N^4 -AcSDM, 50 mg/kg. This figure shows typical data.

TABLE I. Effect of N^4 -AcSDM and Various Drugs on the *in Vitro* Binding of SDM to Rabbit Serum

SDM, N^4 -AcSDM or various drugs	% bound
SDM alone	98.5
SDM + N^4 -AcSDM	70.4
SDM + phenylbutazone	96.1
SDM + salicylic acid	95.1
SDM + furosemide	95.8
SDM + chlorpropamide	93.1
SDM + ibuprofen	98.4
SDM + probenecid	98.4
SDM + mefenamic acid	96.6
SDM + ketoprofen	94.0
SDM + indomethacin	97.7
SDM + bucolome	94.2

Concentration of SDM, 100 μ g/ml. Concentration of N^4 -AcSDM or various drugs, 100 μ g/ml.

Fig. 2. Schematic Diagram of the *in Situ* Intestinal Absorption of SDM

TABLE II. Effect of Intravenously Administered N^4 -AcSDM on Absorption Rate of SDM

	N^4 -AcSDM	Saline
$C_v - C_a$ ($\mu\text{g/ml}$)	24.2 ± 4.1	20.2 ± 3.5
$C_v' - C_a'$ ($\mu\text{g/ml}$)	15.2 ± 2.1	23.3 ± 5.3
R_a'/R_a	$0.66 \pm 0.07^a)$	1.14 ± 0.14

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 rabbits.

a) Significantly different from saline, $p < 0.05$. Dose of N^4 -AcSDM, 50 mg/kg.

$$\frac{R_a'}{R_a} = \frac{C_v' - C_a'}{C_v - C_a} \quad (3)$$

この式は、空腸動脈と空腸静脈の血液中（全血中）の SDM 濃度が分かれば、 N^4 -AcSDM を静脈内投与前に対する投与後の SDM の吸収速度の比が求まることを意味している。そこで式 (3) に従って、 N^4 -AcSDM を静脈内投与前に対する投与後の SDM の吸収速度の比を求めた。なお対照実験として、生理食塩水を静脈内投与前に対する投与後の SDM の吸収速度の比についても調べた。その結果 Table II に示すように、生理食塩水を静脈内投与したときの

SDM の吸収速度の比は 1.14 ± 0.14 となったのに対し、 N^4 -AcSDM を静脈内投与したときの SDM の吸収速度の比は 0.66 ± 0.07 と明らかに 1 よりも小さい値を示すことが判明した。またこれらの値の間には有意差が認められた。これらの結果は、SDM の吸収速度が N^4 -AcSDM の静脈内投与により減少することを示唆している。

4. SDM の *in Situ* 腸管分泌に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

静脈内投与された薬物はその一部が腸管の脈管系から腸管腔へ分泌されることが知られている。¹⁰⁾ 薬物の腸管腔への分泌には、血清中の非結合形薬物濃度が関与するが、それ以外にも血流速度、膜透過性及び腸管粘膜での代謝などの因子が関与しているものと考えられる。ところで前述したように、SDM の腸管吸収は N^4 -AcSDM を静脈内投与すると減少するが、もしその原因が血清中の非結合形 SDM 濃度の上昇に基づくものであるならば、SDM の腸管腔への分泌は N^4 -AcSDM を静脈内投与すると増加するものと予想される。一方、その原因が血流速度や膜透過性の減少、もしくは腸管粘膜におけるアセチル化¹¹⁾の増大に基づくものであるならば、SDM の腸管腔への分泌は N^4 -AcSDM を静脈内投与するといずれも減少するものと予想される。そこで SDM の腸管腔への分泌に及ぼす N^4 -AcSDM 静脈内投与の影響を *in situ* 腸管分泌実験法により検討した。その結果 Fig. 3 に示すように、SDM の腸管腔への分泌は N^4 -AcSDM を静脈内投与すると明らかに増加した。したがって、SDM の腸管吸収が N^4 -AcSDM の静脈内投与により減少する原因は、非結合形 SDM 濃度の上昇によるものであることが強く示唆された。

5. SDM の腸管膜透過性に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

SDM の腸管膜透過性に及ぼす N^4 -AcSDM の影響を摘出反転腸管実験法により検討した。その結果 Fig. 4 から明らかなように、腸管の粘膜側から漿膜側への SDM の透過量は、 N^4 -AcSDM の存在下においてほとんど変化しなかった。したがって、 N^4 -AcSDM は SDM の腸管膜透過性に影響を及ぼさないことが確かめられた。

6. 総空腸静脈における SDM の血清蛋白結合に及ぼす N^4 -AcSDM の影響

SDM の腸管吸収に及ぼす血清蛋白結合の置換効果を明らかにするためには、腸管吸収に直接に関与する吸収部位の血管内での血清蛋白結合を調べることが重要と思われる。しかし、*in situ* 腸管還流法における吸収部位の血管である空腸静脈からは、極めて少量の血液しか採取できず、血清蛋白結合実験を実施できなかった。そこで空腸静脈よりも太い血管である総空腸静脈から血液の採取を行い、SDM の血清蛋白結合に及ぼす N^4 -AcSDM の影響を調べた。なお N^4 -AcSDM を静脈内投与したとき、SDM の腸管吸収の減少が約 30 分間続いているの

Fig. 3. Effect of Intravenously Administered N^4 -AcSDM on the *in Situ* Intestinal Secretion of SDM

Dose of N^4 -AcSDM, 50 mg/kg. This figure shows typical data.

Fig. 4. Effect of N^4 -AcSDM on Transfer of SDM across the Intestinal Membrane

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 rabbits. $\circ$, SDM alone; $\bullet$, with N^4 -AcSDM.

TABLE III. Serum Protein Binding of SDM in Common Jejunal Vein at 10 min before and after Intravenous Administration of N^4 -AcSDM

	Before	After
Total ^{a)} SDM concn. (μ g/ml)	113.8 $\pm$ 12.5	52.7 $\pm$ 3.2 ^{b)}
Unbound SDM concn. (μ g/ml)	2.1 $\pm$ 0.6	32.5 $\pm$ 2.5 ^{c)}
% bound	98.3 $\pm$ 0.4	38.5 $\pm$ 2.0 ^{c)}

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 rabbits.

a) bound + unbound. b) Significantly different from "Before", $p < 0.005$. c) Significantly different from "Before", $p < 0.001$.

で、非結合形 SDM 濃度の経時変化を調べることが必要と思われる。しかし今回は、血液の経時的な採取が困難である理由から、 N^4 -AcSDM を静脈内投与 10 分後における非結合形 SDM 濃度のみを調べた。その結果を Table III に示すが、SDM の血清蛋白結合は N^4 -AcSDM を静脈内投与すると著しく減少することが明らかである。また非結合形 SDM 濃度は、 N^4 -AcSDM を静脈内投与すると、 $2.1 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ から $32.5 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ へと約 15 倍も上昇することが判明した。

考 察

SDM の腸管吸収は N^4 -AcSDM を静脈内投与すると減少することが *in situ* 腸管吸収実験の結果から明らかになった (Fig. 1, 2)。これは N^4 -AcSDM が SDM を血清蛋白質の結合部位から強く置換することにより引き起こされるものと考えられる。事実、総空腸静脈における非結合形 SDM 濃度は、 N^4 -AcSDM を静脈内投与すると約 15 倍も上昇することが確められた (Table III)。なお SDM の腸管吸収に関与している空腸静脈での非結合形 SDM 濃度は、総空腸静脈のように他の空腸静脈からの血液の流入がないため、 N^4 -AcSDM の静脈内投与によ

り、更に顕著な上昇が認められるものと思われる。

ところで N^4 -AcSDM は SDM の代謝物であるため、¹²⁾ 代謝によって生成された N^4 -AcSDM が SDM の血清蛋白結合に影響を及ぼす可能性がある。しかし、*in situ* 腸管吸収実験において N^4 -AcSDM を静脈内投与前の総空腸静脈での血清中の N^4 -AcSDM 濃度、すなわち SDM の代謝によって生じた N^4 -AcSDM の濃度は $10.2 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ ($n=5$) であり、この濃度は N^4 -AcSDM を静脈内投与後の N^4 -AcSDM 濃度 ($301.5 \pm 8.6 \mu\text{g/ml}$, $n=5$) と比べて著しく低く、SDM の血清蛋白結合にはほとんど影響を及ぼさないものと考えられた。

SDM の吸収速度に及ぼす N^4 -AcSDM の影響を調べる実験において、 N^4 -AcSDM の静脈内投与は血流速度に影響を及ぼさないものと仮定した。本実験では実際に血流速度を測定していないが、 N^4 -AcSDM に血流速度を変化させるような薬理作用がないこと、及び N^4 -AcSDM の静脈内投与による SDM の腸管吸収の減少が、血流速度の減少に基づくものでないことが *in situ* 腸管分泌実験の結果から予想されることからこのように仮定した。しかしいづれにしても、 N^4 -AcSDM の静脈内投与が血流速度に影響を及ぼさないかどうか詳細な検討を要する。

以上のように SDM の腸管吸収は、血清蛋白結合の置換が起こると減少することが明らかとなった。一般に経口投与された薬物は、吸収部位の血管内において体内の他の部位の血管内よりも高濃度に存在し、そのため薬物と血清蛋白質との結合は飽和状態に達している場合が多いと考えられる。このような場合は、高い血清蛋白結合性を示す他の薬物を静脈内投与すると、本研究で認められたような薬物の腸管吸収の減少が引き起こされる可能性がある。しかしながら、その減少効果は一時的なものであり、臨床的な面からはそれほど問題にならないように思われる。

引用文献

- 1) a) B. K. Martin, *Nature* (London), **207**, 274 (1965); b) M. C. Meyer, D. E. Guttman, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895 (1968); c) J. J. Vallner, *ibid.*, **66**, 447 (1977); d) 瀬崎 仁, 堀 了平 監訳, "S. H. Curry: からだの中の薬の動き—薬物の生体内挙動と速度論," 廣川書店, 東京, 1980, pp. 79—92.
- 2) Y. Imamura, H. Mori, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 274 (1983).
- 3) 宇野豊三, 上田道広, 薬誌, **80**, 1785 (1960).
- 4) Y. Imamura, M. Sonoda, K. Arimori, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 463 (1979).
- 5) S. Goto, O. Tsuzuki, S. Iguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 944 (1971).
- 6) Y. Imamura, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3400 (1977).
- 7) J. C. McElnay, P. F. D'Arcy, O. Throne, *Int. J. Pharm.*, **7**, 83 (1980).
- 8) Y. Imamura, K. Arimori, M. Sonoda, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2169 (1982).
- 9) A. C. Bratton, E. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1939).
- 10) a) K. Arimori, M. Nakano, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 324 (1985); b) J. F. Valentine, D. C. Brater, G. J. Krejs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 177 (1986).
- 11) M. Yasuhara, H. Kobayashi, T. Kimura, S. Muranishi, H. Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **1**, 122 (1978).
- 12) R. H. Adamson, J. W. Bridges, M. K. Kibby, S. R. Walker, R. T. Williams, *Biochem. J.*, **118**, 41 (1970).