薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (10) 759-763 (1990)

ウィルソン病治療薬トリエチレンテトラミンのラットにおける 消化管吸収と尿中排泄

小林道也, 菅原 満, 斉藤浩司, 井関 健, 宮崎勝巳*

北海道大学医学部附属病院薬剤部

Intestinal Absorption and Urinary Excretion of Triethylenetetramine for Wilson's Disease in Rat

Michiya KOBAYASHI, Mitsuru SUGAWARA, Hiroshi SAITOH,
Ken ISEKI and Katsumi MIYAZAKI*

Department of Pharmacy, Hokkaido University Hospital, School of Medicine,
Hokkaido University, Nishi-5-chome, Kita-14-jo, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

(Received April 25, 1990)

Triethylenetetramine·2·HCl (trientine, TE) is an orphan drug for the treatment of Wilson's disease. There has been no reports regarding the absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body. In the current study, the absorption and excretion of TE in rats were examined. The observed mean percentage amount of TE absorbed at the jejunum and ileum with the loop method for 1 h was 42.0% and 22.5%, respectively. Tight junction blocking agent inhibited the absorption of TE from the jejunum loop with 27%, but the absorption of TE from the ileum loop was not affected by this blocking agent. Therefore, the main absorption route for TE might be permeation across the plasma membrane of intestinal epithelial cells. TE and amikacin, a polycationic compound like TE, bound to the brush border membrane (BBM) of rat small intestine in the absence of inorganic ions such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} . But the binding of TE to BBM was inhibited markedly under the physiological concentration of these ions. The bioavailability of TE was below 10% and the plasma levels of TE in non-fasted rats were significantly lower than that observed in fasted rats. The urinary excretion of unchanged TE during 24 h was only 3.5% of the orally administered dose. However, the urinary excretion of total TE including metabolites, though they have not been identified, was 35.7%. These results suggest that low bioavailability of TE might be due to the rapid metabolism in the body after absorption from the gastrointestinal tract.

Keywords—triethylenetetramine; Wilson's disease; intestinal absorption; urinary excretion; bioavailability; metabolism; amikacin

現在ウィルソン病治療薬としては、体内の銅イオン (Cu^{2+}) とキレートを形成し、 Cu^{2+} の排泄を促進する D-ペニシラミンや、トリエチレンテトラミン・二塩酸塩 (トリエンチン) が用いられている。このうち、本邦では D-ペニシラミンが従来第一選択薬として用いられてきたが、腎毒性等の副作用が強いためにトリエンチンの有用性が次第に認められつつあるのが現状である。さらに近年アメリカ FDA においてトリエンチンが orphan drug (希用薬) として認可されたことから、このものの使用頻度はさらに高くなると思われるが、体内動態に関する知見はほとんど得られていない。

すでに著者らはトリエンチンの体液中定量法を確立し、¹⁾ 同時にこの方法を用いてラットにおける単回経口投与後の生物学的利用率が極めて低い (5.6, 5.7, 16.4%, $n=3$) ことを明らかにしているが、¹⁾ その理由については不明である。したがって今回、トリエンチンのより有効な投与方法を確立するための基礎的知見を得ることを目的として、ラットにおける消化管吸収及び尿中排泄について検討を行った。

実 験 の 部

1. 試薬 トリエンチンは化学用 triethylenetetramine (和光純薬) を Walshe らの方法²⁾に従って二塩酸塩

として精製したものをを用いた。蛍光試薬 fluorescamine は日本ロシュ社、アミカシン及び 2,4,6-triaminopyrimidine はシグマ社から購入した。他の試薬はいずれも市販の試薬特級を和光純薬工業(株)より購入した。

2. Gastric Mucin に対する結合実験 Cavallito らの方法⁹⁾に準拠して行った。すなわち 10 cm の透析チューブ (Spectrapor, M.W. Cutoff 12000—14000, Spectrum Medical Industries Inc.) に、pH 6.5 に調製した modified Ringer 溶液⁴⁾ (m.R.) で調製した 500 μ M トリエンチン及び 0.5% gastric mucin 溶液の各 5 ml を入れて両端を閉じた。次いでチューブを 100 ml の m.R. (透析外液) 中で 25°C の条件下で振盪し経時的に透析外液を 2 ml ずつ採取し、同時に m.R. を同量補充した。対照実験は gastric mucin の代わりに m.R. 5 ml を加えた。なお m.R. の代わりにクエン酸-塩酸緩衝液 (生理的等張, pH 2.0) を用いて同様に実験した。

3. 動物実験 Wistar 系雄性ラット (体重 250—300 g) を用い、使用前に約 16 時間絶食した。

1) ラット小腸刷子縁膜に対する結合実験——Kessler らの Ca 沈澱法⁵⁾に準拠してラット小腸刷子縁膜 (BBM) を単離し、緩衝液 (100 mM D-Mannitol, 20 mM MES-Tris pH 6.5) に BBM 蛋白濃度として 4—5 mg/ml となるように懸濁した。結合実験は 0.2 ml の BBM 懸濁液に 0.8 ml の薬液を加え、25°C 30 分間振盪した後 25°C 29000 $\times g$ にて 20 分間遠沈し、その上清を測定試料とした。

2) ラット小腸ループ法による吸収実験——ラットをペントバルビタール (30 mg/kg) 麻酔下で開腹し、常法に従って空腸上部及び回腸部に約 10 cm の小腸ループを作成した。これにトリエンチンの m.R. 溶液 (100 μ g/ml: 456 μ M) 1 ml をそれぞれ注入し、1 時間後にループを摘出して内液を回収するとともに 3 ml の m.R. で洗浄した後全量を 5 ml とし、これを測定試料とした。また洗浄後の腸管の粘膜をスライドガラスで注意深くかきとり、この擦過物に 20 mM の sodium lauryl sulfonate 溶液を 1 ml 加えてフロン製ホモジナイザーでホモジネートし、全量 5 ml として粘膜蓄積量を測定した。さらに、tight junction blocker として報告されている⁶⁾ 2,4,6-triaminopyrimidine (TAP) を共存 (4.56 mM) させて同様にループ実験を行った。

3) 食餌の影響——i) 十二指腸投与: 絶食処理をしたラットをペントバルビタール麻酔下で開腹後、幽門下部を結紮し十二指腸内にトリエンチン生理食塩水溶液 (25 mg/kg, 0.5—0.7 ml/body) を注入した。

ii) 経口投与: 非絶食及び絶食処理をしたラットにエーテル麻酔下で胃ゾンデを用いてトリエンチン (25 mg/kg, 0.5—0.7 ml/body) を投与した。

iii) 静脈内投与: ペントバルビタール麻酔下で頸静脈にトリエンチン (1 mg/ml, 0.1 ml/body) を投与した。

各ラットより心臓から 0.5 ml ずつ経時的に採血し、トリエンチンの血漿中濃度を測定した。血漿トリエンチン濃度推移の one compartment open モデル式へのあてはめは MULTI⁷⁾ を用いた。血漿濃度曲線下面積 (AUC) は台形法で求め、生物学的利用率は式 (1) を用いて計算した。

$$\text{生物学的利用率} = \frac{\text{経口投与後あるいは十二指腸投与後の AUC}}{\text{静脈内投与後の AUC}} \times 100 \quad (1)$$

4) 尿中排泄量の測定——ラットにエーテル麻酔下胃ゾンデを用いて経口的にトリエンチン (25 mg/kg, 0.5—0.7 ml/body) を投与し、ガラス製代謝ケージ内で 24 時間蓄尿した。なお水は自由に与え、蓄尿容器には防腐剤として 1 ml のトルエンを添加した。

4. 分析法 トリエンチンの定量は先に報告した体液中定量法¹⁾に準拠して行った。

1) 血漿, 尿, 小腸粘膜組織——血漿, 尿及び小腸粘膜ホモジネート試料 0.2 ml に 0.1 ml の蒸留水, 0.4 ml のアセトニトリルを加え除蛋白を行い、遠心分離 (1000 $\times g$, 5 min) 後、その上清 0.5 ml を定量に供した。

2) 尿中代謝物——Brown らの尿中ポリアミン定量法⁸⁾に準拠して 6 N HCl で 100°C 16 時間加熱し、アセチル体等を完全に加水分解処理したものを尿試料とした。なおこの条件下ではトリエンチンは分解されていないことを確認した。代謝物は加熱処理した尿中の総トリエンチン量から未処理尿中の未変化体量を差し引いて求めた。なお蛋白の定量は Lowry らの方法⁹⁾に準拠して行い、標準物質としてウシ血清アルブミンを用いた。

結 果 と 考 察

Gastric Mucin に対する結合

トリエンチンと gastric mucin との結合をみた透析実験の結果を Fig. 1 に示す。pH 6.5 及び pH 2.0 において、gastric mucin 共存下でトリエンチンの透過量は対照と比較して差は見られず、トリエンチンは gastric mucin に対してほとんど結合しないことが明らかとなった。このことは、胃及び腸内でトリエンチンは分泌粘液と結合していないことを示唆するものである。従来アミン化合物のうち、一部の四級アンモニウム化合物はムチンと結合し、このことが消化管からの吸収率が悪い一因として指摘されている。¹⁰⁾ しかしながらトリエンチンの

Fig. 1. Effect of Gastric Mucin on the Dialysis of Trientine

(A) Citrate-HCl buffer (pH 2.0), (B) modified Ringer solution (pH 6.5).
Trientine concn., 500 μ M; mucin concn., 0.5%. ●, control; ○, with mucin. Results are expressed as the mean of 2 experiments.

場合には、生物学的利用率の低い要因としてムチンとの結合は関与していないことが示唆された。

小腸刷子縁膜に対する結合

これまで多くのアミン化合物は BBM と強く結合することが知られている¹¹⁾ことから、アミン化合物の一種であるトリエンチンのラット BBM に対する結合と結合に及ぼす無機イオンの影響について検討を行った。また比較の目的で、リポソーム膜に強く結合することが報告されている¹²⁾アミノ糖抗生物質(アミカシン)についても同様に結合実験を行い結果をまとめて Table I に示した。トリエンチンは無機イオン非存在下ではアミカシンと同程度に強く結合した。しかしながら、生体内に存在する程度の Na イオン 100 mM を添加すると結合は激減し、この現象はイオン種の異なる Li^+ においても同様であった。また、2 価のイオンは 1 価のイオンよりも強く結合を阻害した (Na^+ , K^+ 対 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+})。これらのことはトリエンチンの BBM に対する結合が静電的なものであることを示唆している。これに対して、経口投与では吸収が極めて悪いアミカシンは Li^+ 及び Na^+ 100 mM 共存下においてもトリエンチンに比べて大きな結合性を示した。このことはアミカシンの低い消化管吸収性の一因が膜に対する強い結合性であることを示唆するものであり、トリエンチンにおいても消化管内のイオン強度が大きく低下した場合には、アミノ糖抗生物質と同様に消化管膜に強く結合し、吸収が抑制されるものと考えられる。またトリエンチンと錯体を形成する銅イオンをトリエンチンと同濃度共存させると、アミカシンの BBM に対する結合は全く影響されないのに比べ、トリエンチンは完全に結合阻害を受けた。これはトリエンチンと銅との錯体形成によるトリエンチンの分子内構造変化に起因すると考えられ、この化合物の体内での膜透過性を考察する上で興味深い知見と思われる。

小腸からの吸収

ラット小腸ループからの消失の結果を Fig. 2 に示す。トリエンチンの 1 時間における平均の吸収率は空腸上部で 42.0%, 回腸部で 22.5% であり有意な差がみられた。さらに TAP を共存させて同様の実験を行った結果、

TABLE I. Effect of Various Ions on Trientine and Amikacin Binding to Rat Intestinal Brush-border Membrane

	Percent of control Trientine	Amikacin
Li 100 mM	0	21.4
Na 100 mM	5.3	41.0
Na 10 mM	75.4	—
K 10 mM	76.7	—
Mg 10 mM	24.4	16.7
Ca 10 mM	16.7	15.7
Mg 50 μ M	96.9	—
Ca 50 μ M	98.1	—
Cu 50 μ M	0	100
Control	100	100
(nmol/mg prot.)	(30.3 $\pm$ 2.1)	(29.9 $\pm$ 1.2)

Trientine and amikacin concn., 50 μ M. Results are expressed as the mean of 6 experiments with S.D. (control) and 2 experiments (others).

Fig. 2. Absorption Behaviors of Trientine from Rat Intestinal Loops

Trientine concn., 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.456 mM); TAP concn., 571 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4.56 mM). Drugs are dissolved in modified Ringer solution (pH 6.5). ■, tissue accumulation; □, net absorption. Results are expressed as the mean of 4–5 experiments with S.E.M.

a) significantly different from jejunum control, $p < 0.05$; b) $p < 0.02$.

TABLE II. Bioavailability and Peak Concentration (C_{max}) of Trientine after Oral and Intraduodenal Administration (25 mg/kg Weight) in Rats

	Bioavailability (%) 4 h	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Oral administration (fasted)	6.56 ± 1.69	8.03 ± 3.31
Oral administration (non-fasted)	2.31 ± 1.48	2.96 ± 1.98
Intraduodenal administration	17.65 ± 5.78	23.93 ± 11.71

Results are expressed as the mean of 3 experiments with S.D.

空腸上部においてのみ吸収が阻害され、回腸部では全く影響は現れなかった。しかしながら空腸上部における阻害率は全吸収量の 27% であり、消化管におけるトリエンチンの吸収過程は小腸の上皮細胞膜の透過が主であり、tight junction 透過過程の寄与は小さいことが示唆された。

食餌による吸収挙動の変化

静脈内投与並びに絶食及び非絶食時の経口投与、十二指腸投与後の血漿中トリエンチン濃度推移をそれぞれ Fig. 3, 4 に示した。また 4 時間後の生物学的利用率と最高血漿中濃度を Table II に示した。非絶食時の経口投与後の血漿中濃度推移は絶食時と比較して有意に低く、食餌による吸収の抑制が認められた。さらに十二指腸投与の場合、絶食時の経口投与よりも速い吸収と良好な生物学的利用率を示した。このことはトリエンチンの吸収が胃排泄によって影響を受けることを示唆している。また、吸収部位に高濃度のトリエンチンが存在することによって吸収性の増加及び生物学的利用率の上昇がみられたものと考えられる。これら一連の BBM への結合や吸収挙動の結果から、ヒトに経口投与する場合には、食餌摂取の有無や食餌内容、特に金属イオンの種類や濃度

Fig. 3. Time Course of Plasma Concentration of Trientine after Intravenous Administration (100 $\mu\text{g}/\text{body}$) in Rats

Results are expressed as the mean of 3 experiments with S.D.

Fig. 4. Time Course of Plasma Concentration of Trientine after Oral and Intraduodenal Administration (25 mg/kg Weight) in Rats

□, intraduodenal administration; ●, oral administration (fasted); ○, oral administration (non-fasted). Results are expressed as the mean of 3 experiments with S.D.

a) significantly different from oral administration (fasted), $p < 0.05$; b) $p < 0.02$.

によって吸収が大きく変動することが充分に予想される。このことは先に報告した患者間における血漿中濃度推移の著しい差異の要因としても考えられることであり、今後服薬方法を確立していく上で有用な知見と思われる。

尿中排泄挙動

Table III に示したごとく、トリエンチン経口投与後 24 時間に排泄された尿中未変化体は投与量の 3% であったが、加水分解尿中のトリエンチンの総量は約 35% と多く、小腸ループを用いた吸収実験の結果と良く一致するものであった。すなわちこれらの結果より、トリエンチン経口投与後の低い血漿中濃度は吸収性が低いことによるものだけではなく、代謝を受けることにも基づいているものと考えられる。ここで代謝物の同定は今回行っていないが、トリエンチンと類似構造を有する生体内ポリアミン（スペルミン、スペルミジン等）がアセチル化を受けることが知られていることから、¹³⁾ トリエンチンも同様にアセチル体として尿中に排泄されていることが充分に予想される。

以上の結果からトリエンチンの経口投与後の吸収は食餌内容によって大きく変動することが考えられる。したがって今後は食前、食後投与時の吸収性や無機イオンを多量に含む薬剤や食餌（制酸剤、ミルク、ドリンク剤等）の影響等を詳細に検討する必要があるものと思われる。

TABLE III. Urinary Excretion of Trientine and Metabolites for 24 h after Oral Administration of Trientine (25 mg/kg Weight) in Rats

	Urinary excretion	
	μg	Percent of dose
Trientine	281 ± 10.6	3.1 ± 0.1
Metabolites	2930 ± 84.0	32.6 ± 0.9
Total	3210 ± 94.6	35.7 ± 1.1

Results are expressed as the mean of 3 experiments with S.D.

引用文献

- 1) K. Miyazaki, S. Kishino, M. Kobayashi, K. Iseki, S. Arashima, S. Matsumoto, T. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1035 (1990).
- 2) H. B. F. Dixon, K. Gibbs, J. M. Walshe, *Lancet*, **i**, 853 (1972).
- 3) C. J. Cavallito, T. B. O'Dell, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **47**, 169 (1958).
- 4) S. G. Schulz, R. E. Fuisz, P. F. Curran, *J. Gen. Physiol.*, **49**, 849 (1966).
- 5) M. Kessler, O. Acuto, C. Storelli, H. Murer, M. Müller, G. Semenza, *Biochem. Biophys. Acta*, **506**, 136 (1978).
- 6) J. H. Moreno, *J. Gen. Physiol.*, **66**, 97 (1975).
- 7) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 8) N. D. Brown, R. B. Sweet, J. A. Kintzios, H. D. Cox, B. P. Doctor, *J. Chromatogr.*, **164**, 35 (1979).
- 9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 10) R. M. Levine, M. R. Blair, B. B. Clark, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **114**, 78 (1955).
- 11) H. Saitoh, S. Kawai, K. Miyazaki, T. Arita, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 176 (1988); H. Saitoh, S. Kawai, K. Iseki, K. Miyazaki, T. Arita, *ibid.*, **40**, 776 (1988); H. Saitoh, M. Ebina, S. Fukuda, K. Iseki, K. Miyazaki, T. Arita, *ibid.*, **41**, 459 (1989).
- 12) M. Kubo, M. F. Gardner, K. Y. Hostetler, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3761 (1986).
- 13) M. M. Abdel-Monem, K. Ohno, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1195 (1977).