薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
113 (2) 167-175 (1993)

カンプトテシン誘導体とヒト血漿タンパクとの相互作用

黒野幸久,* 宮島 誠, 池田 憲

名古屋市立大学薬学部

Interaction of Camptothecin Derivatives with Human Plasma Proteins *in Vitro*

Yukihisa KURONO,* Makoto MIYAJIMA, and Ken IKEDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
Tanabe-dori 3-1, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

(Received September 29, 1992)

The interactions of camptothecin (CPT) and its derivatives (CPT-11 and SN-38) with human plasma proteins (serum albumin (HSA) and α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP)) were studied mainly by means of ultraviolet and fluorescence spectroscopy. The binding constants of lactone ring-opened forms (A form) of CPT and CPT-11 with HSA were larger than those of the intact lactone forms (L form). In the case of SN-38, there was no difference in the constants between A form and L form. The binding constant of CPT (A form) with HSA was larger than those of CPT-11 and SN-38. The presence of cisplatin, which is presumed to be coadministered with CPT derivatives, did not affect the interaction of CPT derivatives with HSA. Only L form of CPT-11 among the CPT derivatives examined interacted with α_1 -AGP, followed by quenching the fluorescence of α_1 -AGP.

Keywords—protein binding; human serum albumin; α_1 -acid glycoprotein; camptothecin; cisplatin; competition

緒 言

ヒト血清アルブミン (HSA) と種々の薬物の結合が薬物の生体内における分布, 代謝, 薬効の発現及び併用投与時の薬物相互作用などの挙動に重要な役割を果たしている. その結合の詳細を検討することは薬物の生体内での挙動を予測する上で重要なことである. 近年 HSA のアミノ酸配列の一次構造が明らかにされ¹⁾数多くの研究室から HSA と薬物の相互作用に関する報告がなされている.²⁻⁶⁾ またごく最近 HSA の高次構造が明らかにされ,^{7,8)} 今後さらに詳細な検討が加えられることが予想される.

本研究では薬物として, 中国原産の喜樹 (*Camptotheca acuminata*) の葉や樹皮などに含有されるアルカロイドである camptothecin (CPT)⁹⁾ 及びその半合成誘導体である CPT-11 と SN-38 を用いた (Chart 1). CPT は強い抗腫瘍活性を有する薬物であるが, 強い骨髄抑制と出血性膀胱炎等の毒性発現のため臨床的に応用されていない.⁹⁻¹²⁾ CPT-11 は (株) ヤクルト本社医薬品部で合成された誘導体で, その高い抗腫瘍活性を維持しつつ毒性の軽減が図られている. CPT-11 が生体内で代謝され SN-38 となり, より高い活性が現れる. また CPT 並びに CPT 誘導体はラクトン環を有し, pH に依存して開環あるいは閉環反応を起こす. CPT-11 は pH 7.4 で開環体 (A 体) の平衡時の存在比は約 95% である. しかし開環体は閉環体 (L 体) に比べ活性が低下すると報告されている.^{13,14)}

Chart 1

以上のような点に留意して CPT 誘導体のタンパク結合に関する基礎的なデータを得る目的で、3種の薬物の閉環体 (L 体)、開環体 (A 体) について HSA に対する結合パラメーターを分光光度法によって決定した。HSA に対する結合部位がすでに知られている薬物を使って CPT 誘導体の結合部位の識別、同定を試みた。また HSA と同様に、血漿中での薬物結合に寄与している α_1 -酸性糖タンパク (α_1 -AGP)¹⁵⁻¹⁷⁾ に対するこれらの薬物の結合パラメーターを決定した。さらに臨床で用いる場合に併用する可能性が高いと考えられ、かつ HSA に対して結合することが報告されている抗腫瘍剤 cisplatin (*cis*-dichlorodiammineplatinum (II))¹⁸⁻²⁰⁾ が共存した場合のこれらの薬物の HSA への結合性の変化を測定した。

実 験 の 部

試料及び試薬 HSA (Sigma 社製, Fraction V, lot 36F-9333, 76F-9353) を Chen の方法²¹⁾ によって脱脂精製したものを用いた。HSA の分子量を 69000 とし、その濃度は UV 278 nm における分子吸光係数 (ϵ) 3.66×10^4 ($M^{-1} cm^{-1}$)^{22,23)} を用いて決定した。 α_1 -AGP (Human, Sigma 社製, lot 57F-9319) は購入したものを精製することなく用いた。 α_1 -AGP の分子量は 44100²⁴⁾ とし、その濃度は UV 278 nm における分子吸光係数 (ϵ) 3.94×10^4 ($M^{-1} cm^{-1}$)²⁵⁾ を用いて決定した。

CPT (lot 610703), CPT-11 (lot K003) 及び SN-38 (lot 100904R) はヤクルト本社より恵与されたものを精製することなく用いた。Cisplatin (Aldrich 社製, lot 10529CV) 及び phenylbutazone (PB, Aldrich 社製, lot 04023AM) は市販品を精製することなく使用した。Clofibric acid (CA) は Jones らの方法²⁶⁾ で合成したものを用いた。

緩衝液として他に記載がなければ pH 7.4 1/15 M リン酸緩衝液を NaCl を用いてイオン強度を 0.2 に調整して用いた。温度は 25°C で実験を行った。

なお分光光度計には日立 UV-200-20 型及び島津 UV-260 型を用いた。蛍光光度計には島津 RF-520 型を使用した。

吸収 (UV) スペクトルの測定及び解析 CPT 誘導体 (2.0×10^{-5} M のリン酸緩衝溶液) は 350—390 nm に極大波長を有し、種々の濃度の HSA を加えることにより UV スペクトルが変化する。この変化が HSA と CPT 誘導体との相互作用によるもので、モル比が 1:1 の complex を形成していると仮定すると Chart 2 のような平衡が成立し、結合定数 (K_c) は (1) 式で表される。

Chart 2

$$K_c = \frac{C_b}{(P_t - C_b)(C_t - C_b)} \quad (1)$$

$$C_t = C_b + C_f \quad (2)$$

ここで P_t は総 HSA 濃度, C_t は総薬物濃度, C_b は結合型薬物濃度, C_f は非結合型薬物濃度である. また $P_t \ll C_t$ の条件で実験を行い, Benesi-Hildebrand の式 (3)²⁷⁾ を用いて解析を行った.

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{K_c \Delta \epsilon C_t} \cdot \frac{1}{P_t} + \frac{1}{\Delta \epsilon C_t} \quad (3)$$

ここで A と A_0 は, タンパク P_t に基づく吸光度が無視できる波長における, 反応混合溶液の吸光度と薬物のみの溶液の吸光度をそれぞれ表している. また $\Delta \epsilon$ は HSA との結合型と非結合型の薬物の分子吸光係数の差である. 左辺と $1/P_t$ をプロットして得られた直線の切片と傾きから K_c と $\Delta \epsilon$ を決定した.

実験は 3 ml の HSA を含む緩衝液に高濃度の薬物溶液を適量加えることにより行った. CPT, SN-38 の L 体は dioxane 溶液, CPT-11 の L 体は蒸留水に溶かしたものをを用いた. A 体はすべて 0.1 N NaOH 溶液を用いた. 混合液に含まれる dioxane 濃度は常に 1% (v/v) になるようにした.

また結合部位の推定及び cisplatin の影響を調べる実験では, PB, CA, cisplatin を HSA と 1:1 に混合した溶液に CPT 誘導体溶液を加えて UV スペクトルを観察した.

蛍光スペクトルの測定及び解析 CPT 誘導体はすべて水溶液で強い蛍光を示す物質であり, それぞれの励起波長及び蛍光極大波長を Table I に示した. これらの波長で HSA あるいは α_1 -AGP との結合によって起こる蛍光スペクトルの変化を測定した. このとき混合液に含まれる dioxane 濃度は常に 0.5% (v/v) になるようにした. また α_1 -AGP の蛍光を利用する場合はトリプトファン残基のみが励起される 300 nm を励起波長として選び,²⁸⁾ 薬物との結合による蛍光スペクトルの変化を測定した. 必要に応じて内部濾過効果の補正^{28,29)}を次式に従って行った.

TABLE I. Excitation and Emission Wavelengths of CPT Derivatives in pH 7.4 Phosphate Buffer Used for the Analysis

Compound	Ex (nm)	Em (nm)
CPT ^{a)}	380	440
CPT-11	368	433
SN-38 ^{a)}	385	530

a) Containing 0.5% (v/v) dioxane.

$$F_{\text{true}} = F_{\text{obs}} \times \text{antilog} \left(\frac{d_A + d_B}{2} \right) \quad (4)$$

ここで F_{true} 及び F_{obs} はそれぞれ真の蛍光強度及び見かけの蛍光強度 (実測値) である. また d_A 及び d_B はそれぞれ励起及び蛍光波長における吸光度である. データの解析は吸光度を蛍光強度に置き換えて Benesi-Hildebrand の方法 ((3) 式) を用いて行った.

結 果

1. CPT 誘導体と HSA との相互作用

1-1. CPT と HSA との相互作用 CPT は水溶液中で Chart 3 に示すような平衡を保って存在している. この平衡移動の半減期 ($0.693/(k_1' + k_2)$; $k_1' = k_1 [\text{H}_2\text{O}]$) は約 1 時間であった.³⁰⁾ Fig. 1 (a) は CPT (溶解直後) の L 体の吸収スペクトルが HSA の添加により変化することを示したもので, CPT の L 体が HSA と結合していることを示している. この吸光度変化から Benesi-Hildebrand の方法 (Fig. 1 (b)) を用いて結合定数 (K_c) = $6.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ が求められた (Table II).

Fig. 2 は pH 7.4 で平衡 (Chart 3) に達した CPT (A 体が 95%) を用いて, 蛍光法により HSA

Chart 3

Fig. 1. (a) Effects of HSA Concentration on UV Absorption of CPT (L Form) in pH 7.4 Phosphate Buffer ($\mu=0.2$) at 25°C and (b) Benesi-Hildebrand Plot for the Interaction of CPT (L Form) with HSA (Data from (a))

(a) Conc. of CPT was 2.0×10^{-5} M; Conc. of HSA were: 1, 0 M; 2, 5.2×10^{-5} M; 3, 1.0×10^{-4} M; 4, 2.1×10^{-4} M; 5, 3.6×10^{-4} M; 6, 5.2×10^{-4} M.

(b) The absorbances at 370 nm were used for the analysis.

TABLE II. Association Constants for the Binding of CPT Derivatives to HSA at pH 7.4 and 25°C

CPT derivatives	$K_c \times 10^{-4} \text{ (M}^{-1}\text{)}$	
	L form	A form
CPT	0.67	47
CPT-11	Small	0.18
SN-38 ^{a)}	1.8	1.4

a) Obtained from the fluorescence spectroscopy; $[\text{SN-38}]_0 = 5.0 \times 10^{-7}$ M.

との相互作用を調べたもので、この変化を解析して K_c を求め、その値を Table II に示した。

1-2. CPT-11 と HSA との相互作用

CPT-11 は L 体では HSA を加えても UV ス

ペクトルの変化は観察されず、HSA との相互作用は非常に弱いものと思われた。しかし A 体では UV スペクトルの変化が観察され、結合定数 (K_c) は $1.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であった。

1-3. SN-38 と HSA との相互作用

SN-38 は L 体、A 体ともに HSA との結合に基づく

Fig. 2. Effects of HSA Concentration on Fluorescence Intensity of CPT (A Form) in pH 7.4 Phosphate Buffer ($\mu=0.2$) at 25°C
[CPT]₀ = 1.0×10^{-6} M.

Fig. 3. Effects of HSA Concentration on Fluorescence Intensity of SN-38 (L Form (●) and A Form (○)) in pH 7.4 Phosphate Buffer ($\mu=0.2$) at 25°C
 $[\text{SN-38}]_0 = 5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Fig. 4. Effects of Clofibric Acid on UV Absorption of SN-38 (A Form)·HSA Solution in pH 7.4 Phosphate Buffer ($\mu=0.2$) at 25°C
 $[\text{SN-38}]_0 = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{HSA}]_0 = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$;
 $[\text{CA}]_0 = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; —, SN-38 alone; ---, SN-38+HSA; — · —, SN-38+HSA+CA.

UV スペクトルの変化が観察され, Benesi-Hildebrand の式に基づいて結合定数を決定した (L 体, $K_c = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; A 体, $K_c = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). しかし SN-38 単独溶液 ($2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, HSA 非共存下) では, 母液 (SN-38 含有 dioxane 溶液) を緩衝液に混合後数分で白沈が生じる傾向があった。これは SN-38 の溶解度が低いためであると考えられたため, 低い濃度 ($5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) で測定が可能な蛍光光度法で同様な実験を行った。Fig. 3 にその結果を示し, 得られた結合定数 (K_c) を Table II に示した。

2. CPT 誘導体の HSA 上の結合部位

HSA には複数の薬物結合部位が存在することはよく知られている。Kurono ら^{6,31,32)}は HSA の酵素類似作用に着目し, 重要な薬物結合部位として Tyr-411 近傍を R-site, Lys-199 と Trp-214 近傍を U-site と命名した。また R-site と U-site は, Sudlow ら⁵⁾が蛍光プローブを用いて報告した site-II, site-I にそれぞれ対応している。そこで CPT 誘導体の HSA への結合部位を推定するため, R-site と U-site に結合することが知られている薬物としてそれぞれ clofibric acid (CA)³³⁾ と phenylbutazone (PB)⁴⁰⁾ を選び, CPT 誘導体と HSA との complex の UV スペクトルに及ぼす両薬物の影響を調べた。

Fig. 4 は SN-38 (A 体)・HSA complex について CA の影響を調べたものである。CA は complex のスペクトルに影響を及ぼさないことが分かる。PB についても同様に影響を及ぼさないことが分かった。また CPT の L 体と A 体, CPT-11 の A 体そして SN-38 の L 体でも図には示していないが CA, PB とともに影響を及ぼさないことが分かった。

3. α_1 -AGP と CPT 誘導体との相互作用

Fig. 5 は CPT-11 (L 体) の蛍光強度が, α_1 -AGP を加えていくことにより減少していくことを示している。この結果から結合定数 $4.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ が得られた。しかし CPT-11 の A 体及び SN-38 の L 体, A 体では α_1 -AGP を加えても蛍光に変化がみられず, α_1 -AGP と結合しないものと考えられた。

Fig. 5. Effects of α_1 -AGP Concentration on Fluorescence Intensity of CPT-11 (L Form) in pH 7.4 Phosphate Buffer ($\mu=0.2$) at 25°C
[CPT-11] $_0=5.0\times 10^{-7}$ M.

TABLE III. Effect of Cisplatin on the Relative Fluorescence Intensity (R.F.I.) of SN-38 and HSA Solution^{a)}

SN-38	Incubation time ^{b)} (h)	R.F.I. (%)		
		SN-38 alone	SN-38 + HSA	SN-38 + HSA + cisplatin
L form	0	100	127.9	127.8
	48	100	129.4	129.6
A form	0	100	96.1	96.0
	48	100	91.9	92.0

a) pH 7.4 phosphate buffer containing 0.1 M NaCl and 0.5% (v/v) dioxane; [SN-38] $_0=5.0\times 10^{-7}$ M; [HSA] $_0=2.5\times 10^{-5}$ M; [cisplatin] $_0=2.5\times 10^{-5}$ M. b) at 37°C.

Fig. 6. Effects of Cisplatin on UV Absorption of CPT-11 (A Form)·HSA Solution in pH 7.4 Phosphate Buffer (Containing 0.1 M NaCl) at 25°C

(a) immediately after mixing of cisplatin and HSA; (b) 48 h after mixing of cisplatin and HSA at 37°C.

[CPT-11] $_0=2.0\times 10^{-5}$ M; [HSA] $_0=2.0\times 10^{-4}$ M; [cisplatin] $_0=2.0\times 10^{-4}$ M; —, CPT-11 alone; ---, CPT-11+HSA; —·—, CPT-11+HSA+cisplatin.

またタンパク α_1 -AGP のトリプトファン残基に基づく蛍光 (励起波長 300 nm, 蛍光極大波長 343 nm) に及ぼす CPT-11 (L 体) の影響も調べた. CPT-11 はトリプトファン残基の蛍光を消光し, その現象を解析し結合定数 3.9×10^4 M $^{-1}$ を得た.

4. HSA と CPT 誘導体との相互作用に及ぼす Cisplatin の影響

Cisplatin は現在使用されている作用の最も強い抗腫瘍剤の 1 つであり, CPT-11 が臨床応用された場合に併用される可能性が高いと考えられる. Cisplatin は HSA と不可逆的に結合することが知られているため,¹⁸⁻²⁰⁾ HSA への結合に関して両薬物が互いに影響しあうか否かを調べることは重要である.

Fig. 6 は CPT-11·HSA complex の形成に及ぼす cisplatin の影響を UV スペクトルを利用して調べたものである. Cisplatin と HSA の反応はゆっくり進行することが知られているため, 混合直後のものと 37°C で 48 時間 incubation を行ったもの²⁰⁾の両方について調べた. また Cl イオンの存在により HSA への結合性が変化すると報告されているため,²⁰⁾ NaCl 濃度が 0.1 M となるようにしたリン酸緩衝液を用いた. Fig. 6 の結果は cisplatin と HSA の結合は CPT-11 と HSA の結合に影響を与えないことを示している.

Table III は蛍光強度を用いて SN-38 について同様に cisplatin の影響を調べたものである. SN-

38 は前述したように溶解度が低いため蛍光法を利用した。

考 察

1. CPT 誘導体と HSA との相互作用

UV 吸収スペクトル変化において 375 nm 付近に等吸収点が観察されたこと (Fig. 1 (a)) 及び Benesi-Hildebrand プロットが直線になったこと (Fig. 1 (b)) は, CPT と HSA が 1:1 の complex を形成するとした仮定の妥当性を示しているものと思われる。

Fig. 1, 2 に示した結果から計算された結合定数 K_e を比較すると (Table II), CPT のラクトン環が開いた A 体の方が L 体よりも約 70 倍強く結合することが分かる。

CPT-11 について得られた K_e の値 ($1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) を CPT のものと比較してみると 1/100 以下の値となっている。これは CPT-11 に導入された 10 位の置換基 (4-ピペリジノ-ピペリジノカルボニルオキシ基) が, 正に荷電するために HSA へ結合しにくくなるためと考えられる。

SN-38 と HSA との相互作用について吸光光度法 (結果 1-3 の項参照) と蛍光法 (Table II) で求めた結合定数の値はよく一致している。SN-38 は CPT や CPT-11 とは違い A 体と L 体間で結合定数に差がみられなかった。結合定数は CPT-11 の場合 ($1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) の約 10 倍であった。CPT-11 は血中に投与されると速やかに分解され SN-38 となること及びラクトン環の開閉が薬効に影響すること^{13,14)}等を考え合わせると, 本研究結果は CPT-11 を医薬品として評価する際に有用な知見となるものと思われる。すなわち CPT-11 は, 活性体 (SN-38) が HSA と結合して体内を循環し, 標的部位に運搬されるものと考えられる。

2. α_1 -AGP と CPT 誘導体との相互作用

一般に α_1 -AGP は塩基性薬物と強く結合することが知られている。¹⁵⁻¹⁷⁾ 9 位の置換基が塩基性でかつラクトン環が閉じており, 負に荷電していない CPT-11 の L 体のみが α_1 -AGP と結合するものと思われる。

α_1 -AGP の薬物結合部位は 1 つだけであるとされている。³⁴⁾ しかしそのアミノ酸配列上の位置はまだ知られていないが, トリプトファン残基の蛍光が変化していたということ ($K_e = 3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) は, 結合部位にこの残基が関与していることを示唆している。

3. HSA と CPT 誘導体との相互作用に及ぼす Cisplatin の影響

Fig. 6 の結果は cisplatin と CPT-11 の HSA への結合部位が異なることを示している。Cisplatin の HSA への結合部位は SH 基であり Cys-34 が第一結合部位であるとされている²⁰⁾ので, CPT-11 の結合部位はこの周辺ではないと考えられる。Table III の結果も同様に cisplatin と SN-38 の HSA への結合部位は異なることを示している。これらの結果よりタンパク結合の面からみる限り, cisplatin と CPT-11 の併用投与によって両薬物の毒性あるいは副作用が増大する可能性は少ないものと考えられる。

謝辞 CPT 誘導体を恵与された (株) ヤクルト本社に謝意を表します。本論文作成上, ご協力頂いた (株) ヤクルト本社開発課 萩原久男氏及び第一製薬 (株) 小松博史博士に感謝致します。

引用文献及び注

- 1) J. R. Brown, "Albumin Structure, Function and Uses," ed. by V. M. Rosenoer, M. Oratz, M. A. Rothschild, Pergamon Press, Oxford, 1977, pp. 27-51.
- 2) J. J. Vallner, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 447 (1977).
- 3) U. Kragh-Hansen, *Pharmacol. Rev.*, **33**, 17 (1981).
- 4) a) K. J. Fehske, W. E. Müller, U. Wollert, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 687 (1981); b) K. J.

- Fehske, U. Schlafer, U. Wollert, W. E. Müller, *Mol. Pharmacol.*, **21**, 387 (1981).
- 5) a) G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.*, **11**, 824 (1975); b) *Idem*, *ibid.*, **12**, 1052 (1976).
 - 6) 池田 憲, 黒野幸久, 薬誌, **106**, 841 (1986).
 - 7) a) D. C. Carter, X. M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, T. Y. Miller, *Science*, **244**, 1195 (1989); b) D. C. Carter, X. M. He, *ibid.*, **249**, 302 (1990).
 - 8) X. M. He, D. C. Carter, *Nature* (London), **358**, 209 (1992).
 - 9) M. E. Wall, M. C. Wani, C. F. Cook, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3888 (1966).
 - 10) J. A. Gottlieb, A. M. Guarino, J. B. Call, V. T. Oliverio, J. B. Block, *Cancer Chemother. Rep.*, **54**, 461 (1970).
 - 11) C. G. Moertel, A. J. Schutt, R. J. Reitemeier, R. G. Hahn, *Cancer Chemother. Rep.*, **56**, 95 (1972).
 - 12) F. M. Muggia, P. J. Creaven, H. H. Hensen, M. H. Cohen, O. S. Selawry, *Cancer Chemother. Rep.*, **56**, 515 (1972).
 - 13) M. C. Wani, P. E. Ronman, J. T. Lindley, M. E. Wall, *J. Med. Chem.*, **23**, 554 (1980).
 - 14) 永田 洋, 深田允子, 野竹邦弘, 横倉輝男, 務台方彦, 愛知医大誌, **11**, 286 (1983).
 - 15) K. M. Piatsky, *Clin. Pharmacokin.*, **5**, 246 (1980).
 - 16) S. Glasson, R. Zini, P. D'Athis, T. P. Tillement, J. R. Boissier, *Mol. Pharmacol.*, **17**, 187 (1980).
 - 17) P. R. Jackson, G. T. Tucker, H. F. Woods, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 295 (1982).
 - 18) B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, *Nature* (London), **205**, 698 (1965).
 - 19) O. F. Long and A. J. Repta, *Biopharm. Drug Dispos.*, **2**, 1 (1981).
 - 20) R. Momburg, M. Bourdeaux, M. Sarrazin, M. Chauvet, C. Briand, *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 691 (1987).
 - 21) R. F. Chen, *J. Biol. Chem.*, **242**, 173 (1967).
 - 22) G. E. Means, M. L. Bender, *Biochemistry*, **14**, 4989 (1975).
 - 23) Y. Kurono, K. Ichioka, K. Ikeda, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 432 (1983).
 - 24) E. L. Smith, D. M. Brown, H. E. Weimer, R. J. Winzler, *J. Biol. Chem.*, **185**, 569 (1950).
 - 25) K. Schmid, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 60 (1953).
 - 26) W. G. M. Jones, J. M. Thorp, W. S. Waring, Brit. Pat., 860303 (1961) [*Chem. Abstr.*, **55**, 24680b (1961)].
 - 27) H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703 (1949).
 - 28) 杉山雄一, “医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法,” 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二編, ソフトサイエンス社, 東京, 1985, pp. 337—381.
 - 29) C. F. Chignell, “Methods in Pharmacology,” vol. 2, ed. by C. F. Chignell, Appleton-Century-Crofts, New York, 1972, pp. 33—62.
 - 30) Chart 3 の各速度定数の値は次のようにして計算できる。

$$k_1' + k_2 = 0.693 \text{ h}^{-1} \quad (5)$$

$$k_1'/k_2 = [A]_{\text{eq}}/[L]_{\text{eq}} = 0.95/0.05 = 19 \quad (6)$$

ここで $[A]_{\text{eq}}$ と $[L]_{\text{eq}}$ は平衡時での A 体と L 体の濃度である。(5), (6) 式より $k_1' = 6.59$

$\times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($k_1 = k_1'/[\text{H}_2\text{O}] = 1.19 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ M}^{-1}$) と $k_2 = 3.47 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ が得られた.

- 31) Y. Kuroono, H. Yamada, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 296 (1982).
- 32) Y. Ozeki, Y. Kuroono, T. Yotsuyanagi, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 535 (1980).
- 33) Y. Kuroono, N. Ohta, T. Yotsuyanagi, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2345 (1981).
- 34) W. E. Müller, S. Rick, F. Brunner, "Protein Binding and Drug Transport," ed. by J. P. Tillement and E. Lindelaub, Schattauer, Stuttgart, 1986, pp. 29—44.