スルフイソミジンの *in Vitro* 蛋白結合データより *in Vivo* における結合率の推定¹⁾

金尾義治, 井口定男,^{2a)} 永富英之^{2b)}

九州大学薬学部,^{2a)} 天神クリニック^{2b)}

Prediction of the *in Vivo* Protein Binding Ratio from the
in Vitro Data of Sulfisomidine¹⁾

YOSHIHARU KANEO, SADA O IGUCHI^{2a)} and HIDEYUKI NAGATOMI^{2b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University^{2a)} and Tenjin Clinic^{2b)}

(Received October 15, 1973)

A new method which can predict the *in vivo* binding ratio from the *in vitro* data is proposed. The binding of sulfisomidine with bovine serum albumin was examined using the ultrafiltration method, and the binding constant (K) and the maximum binding number (n) for sulfisomidine were found to be independent of the protein concentration. The values of n and K in the diluted sera obtained from 20 patients with chronic rheumatoid arthritis were measured *in vitro* using the equilibrium dialysis method. From these data, the *in vivo* binding ratio at any plasma concentration of sulfisomidine was calculated theoretically without using large quantities of samples. It was noticed that the higher the plasma concentration of the drug became, the more remarkable the individual variations were. This new method seems to be very useful for the comparative study of the human drug-protein binding.

薬物の蛋白結合に関する研究はすでに従来より数多く報告されさまざまな角度から検討がなされている。しかしヒトや動物の生体内の実態の解明を企図した研究は比較的少数である。この領域の研究では Anton や山田らの業績が特に注目される。すなわち Anton³⁾ は最近種々の疾病をもつ患者の血漿にサルファ剤を添加して *in vitro* で結合性の検討を行なっているが、その結果患者の血漿におけるサルファ剤結合率は健康人と較べると著しく低下している例がみられ、また個体間において有意差が存在すると報告している。一方山田ら⁴⁾ は主として結核患者の血清と PAS との結合率の検討を行なっており、やはり有意の個体差の存在を認めている。

さて一般に血漿蛋白と薬物の結合は可逆的なもので、結合型と非結合型との間には平衡関係が存在しこの平衡状態は蛋白および薬物の濃度、温度、pH さらにまた実験方法等により影響を受けるものである。従来の研究の多くは平衡透析法を使用しており、希釈した血漿あるいは血清を用いて結合率を測定しているが、これは厳密な批判をすれば単なる化学的平衡の一断面を見ているにすぎず、生体内における状態との関連を求めるとすれば十分満足できる検討法とはいえない訳である。

そこで今回著者らはより信頼性の高い方法を求めて検討を行なったが、この際依拠すべき指標はやはり物理化学的パラメータ以外にはありえず、従来の研究と同様に最大結合点数 n 、結合定数 K の測定をまず実施した。しかしながら単に n 、 K の値の算出に止まらず、新しい試みとして *in vitro* で得られた n 、 K を用いて生体内における“生の結合率”の算出を理論的に行なってみた。生体試料の直接的な分析により直ちに満足すべき正確な結果を得ることは実際上きわめて困難であるが故、今回のごとく *in vitro* の実験値より *in vivo* における結合率を予見し得る方法を検討することはきわめて有意義と考えられる。なお今回は薬物としてはスルフイソミジンを使用し、蛋白は牛血清アルブミンおよびヒト血清を用いた。

1) 日本薬学会第 93 年会, 東京, 1973 年 4 月, 一部発表。

2) Location: a) Katakasu, Higashi-ku, Fukuoka; b) Tenjin, Chuo-ku, Fukuoka.

3) A.H. Anton, *Clin. Pharmacol. & Therap.*, **9**, 561 (1968); *idem*, *Science*, **180**, 974 (1973).

4) Y. Yamada, *Keio J. Med.*, **19**, 1 (1970).

実 験 の 部

実験試料

1. 薬物 日本薬局方スルフィソミジンを再結晶して使用した (mp 243°).

2. 蛋白 牛血清アルブミン (BSA fraction V, Armour 社製) を用いた. ヒト血清は健康人ならびに慢性関節リウマチ患者のものを用いた.

牛血清アルブミンについては水分含量をみるため, 100° で恒量に達するまで乾燥し減量を測定して純度補正を行なった. またヒト血清については日立蛋白計により総蛋白量を測定し, 次にセルローズ電気泳動器, 自記濃度積算計 (東京光電製) を用いてアルブミン分画の割合を測定, この 2 つのデータからアルブミン量を算出した.⁵⁾ なおアルブミンの分子量はいずれも 69000 とした.⁶⁾ 以上の薬物および蛋白は 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 等張) で溶解, ヒト血清の場合は希釈して検液を調製した.

限外ろ過法

あらかじめ煮沸して膨潤しておいたセルローズチューブ (24/32 型, Visking 社製) をまず片方を縫合絹糸でしばり遠心脱水する. これにスルフィソミジン溶液 (7.18×10^{-4} — 3.59×10^{-5} M) および BSA 溶液計 6 ml を入れ他端を縫合絹糸でしばって長さ 10 cm にする. このチューブをアクリルフィルターをはめこんだステンレス遠沈管にセットし, 4° の低温室内で 5000 rpm, 1 hr 遠心分離して約 0.4 ml の限外ろ液を得た. このろ液 0.25 ml を精密に取りスルフィソミジン濃度を定量し, 初期濃度から差し引いて結合型薬物濃度を求めた. 遠心分離中のロータ室の温度は遠心開始後約 20 min で 7—8° まで上昇し, 以後はほぼ一定であったので, この温度を限外ろ過の温度とした. なお別に蛋白を加えない対照実験を行なっている液濃度の補正を実施した.

平衡透析法⁷⁾

セルローズチューブにスルフィソミジン溶液 3 ml (初期濃度 1.44×10^{-4} — 7.18×10^{-4} M) およびヒト血清 1 ml 計 4 ml を入れ両端をしばり 8 cm の長さにする. このチューブを 30 ml マイヤーフラスコにセットし pH 7.4 リン酸緩衝液 10 ml 中に浸す. この容器を 37° の恒温水そう中 120 回/min で 4 hr 振とうし, チューブ外液のスルフィソミジン濃度を定量して結合量を算出した. この場合も別に蛋白を入れない対照実験によりろ液濃度の補正を行なった. なお本法では約 2 hr で平衡に達することを確認している.

スルフィソミジンの定量

Bratton-Marshall 法⁸⁾ により行なった.

データ計算法

データ解析は Klotz ら⁹⁾ の方法に従って行なった.

$$r = \frac{nK[D_f]}{1 + K[D_f]} \quad (1)$$

変形して

$$1/r = \frac{1}{nK} \cdot \frac{1}{[D_f]} + \frac{1}{n} \quad (2)$$

すなわち実験により遊離薬物濃度 $[D_f]$ および蛋白 1 分子当りの結合量 r を求めて $1/[D_f]$, $1/r$ をプロットすればグラフから結合定数 K , 最大結合点数 n を求めることができる.

このようにして求めた n , K およびアルブミン濃度 $[P_T]$ から以下の式によれば血漿中の任意の薬物濃度 $[PL]$ における蛋白結合率を算出することができるはずである. すなわち血漿中の薬物は遊離型と結合型から成り立っているからまず式 (3) が成立する.

$$[PL] = [D_f] + [PD] \quad (3)$$

また $[PD]$ は式 (4) であらわされる.

$$[PD] = r[P_T] \quad (4)$$

(3) および (4) より

$$[PL] = [D_f] + r[P_T] \quad (5)$$

(5) を (1) へ代入して式 (6) を得る.

5) サルファ剤と結合する血漿蛋白は主として albumin である. F.J. DiCarlo, S.G. Malament, L.J. Haynes, G.E. Phillips, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **5**, 61 (1963).

6) 伊勢村寿三, 細胞化学シンポジウム, **3**, 1 (1954); 曾良忠雄, “蛋白質化学 3 巻,” 赤堀四郎編, 共立出版, 東京, 1955, pp. 343—396.

7) 中垣正幸, 古賀直文, 寺田 弘, 薬誌, **83**, 586 (1963).

8) 佐藤徳郎, 福山富太郎, 化学の領域, **33**, 149 (1958).

9) I.M. Klotz, “蛋白質化学 4 巻,” 水島三一郎編, 共立出版, 東京, 1956, pp. 15—63.

$$\frac{[PL] - [D_f]}{[P_T]} = \frac{nK[D_f]}{1 + K[D_f]} \quad (6)$$

ここに $[P_T]$ はアルブミン濃度, $[PD]$ は結合型薬物濃度をあらわす. $[D_f]$ について式 (6) を整理すると次の 2 次方程式が得られる.

$$K[D_f]^2 + (1 + nK[P_T] - K[PL])[D_f] - [PL] = 0 \quad (7)$$

(7) に実験より得られた $n, K, [P_T]$ を代入し, $[PL]$ に対しては志向する任意の薬物濃度をあてはめると, その $[PL]$ に対応する $[D_f]$ の値が求められる.¹⁰⁾ したがって任意の薬物濃度 $[PL]$ における結合率 β を次式により算出しうることになる.

$$\beta = \frac{[PL] - [D_f]}{[PL]} \times 100(\%) \quad (8)$$

実験結果および考察

まず最初に限外ろ過法を用い 7—8° で BSA とスルフィソミジンの蛋白結合を測定した. この際 BSA 濃度を $1.95, 3.89, 5.84 \times 10^{-4} \text{M}$ の 3 段階にして, 蛋白濃度による測定値の変動について検討を試みたが, これらの条件はいずれも比較的蛋白濃度が高いので限外ろ過法に依ったものである. 結果は式 (2) に従ってプロットし最小自乗法を用いて直線を当てはめたところ 3 者とも比較的良好な一致を示し, 蛋白濃度による変動はあまり見られないことが判明した (Fig. 1). 一方この直線から得られる n, K の値は BSA 濃度が高くなると n が減少し, K が増加する傾向がみられた (Table I). これは $1/r$ 軸の切片が 0 に近いところにあるため微小な変化で n, K の値が比較的顕著に影響を受けるた

Fig. 1. Binding of Sulfisomidine to Various Concentrations of BSA, Ultrafiltration Method (pH 7.4, 7—8°)

□: $5.84 \times 10^{-4} \text{M}$
○: $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$
●: $1.95 \times 10^{-4} \text{M}$

Fig. 2. Binding Ratio of Sulfisomidine

□: experimental values $5.84 \times 10^{-4} \text{M}$
○: experimental values $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$
●: experimental values $1.95 \times 10^{-4} \text{M}$
—: theoretical curves calculated from the data of $5.84 \times 10^{-4} \text{M}$ BSA, $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$ BSA and $1.95 \times 10^{-4} \text{M}$ BSA
---: theoretical curves calculated from the data of $1.95 \times 10^{-4} \text{M}$ BSA

TABLE I. Binding Constant and Maximum Binding Number for Sulfisomidine

BSA conc. (M)	n	$K (\text{M}^{-1})$
1.95×10^{-4}	4.5	0.75×10^3
3.89×10^{-4}	4.0	0.83×10^3
5.84×10^{-4}	2.2	1.5×10^3

ultrafiltration method (pH 7.4, 7—8°)

10) $n, K, [P_T], [PL]$ はいずれも正数である. そこで式 (7) を解くと常に正, 負一組の実根が得られ, その正数解を $[D_f]$ の値とした.

めだと考えられる。

そこで次にこのようなパラメータ (n, K) の変動がこれら数値に基づいて算出される蛋白結合率にどの程度の差異をもたらすか具体的に知るために、蛋白結合率の算出検討を行なった。Fig. 2 において各プロットはそれぞれ実測値をあらわし、実線は各 BSA 濃度の n, K 値を用いて式 (7) および (8) から求めた理論曲線である。また点線は BSA 濃度 $1.95 \times 10^{-4} \text{M}$ のときの n, K 値をもとに、他の 2 つの BSA 濃度すなわち $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$, $5.84 \times 10^{-4} \text{M}$ における蛋白結合率をいずれも理論的に算出したものである。これによると BSA 濃度 $1.95 \times 10^{-4} \text{M}$ のデータをもとにして出した結合率は $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$ のとき 1—1.5%, $5.84 \times 10^{-4} \text{M}$ のとき 1.3—6% ほど高くなっている。しかしこの程度の差異は蛋白結合率算出の実験では通常見られる変動と見なしても差支えなく、したがってこのような方法により希釈した蛋白溶液あるいは血清を用いて、もとの状態すなわち生の蛋白結合率を推定することは可能で十分妥当性があるものと考えられる。

次に本法をヒト血清における蛋白結合性の検討に応用した。すなわち臨床検査の一環として慢性関節リウマチ患者血清の薬物に対する結合性を吟味する必要があったので、なるべく少量の血清で目的を達するには本法がふさわしいと判断し、その応用を試みたものである。平衡透析法 (pH 7.4, 37°) により測定した 20 名の患者血清とスルフィソミジンの物理化学的パラメータを Table II に示す。

このデータをもとにスルフィソミジン血漿中濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ および $200 \mu\text{g/ml}^{11)}$ のときの蛋白結合率を算出した (Fig. 3—4)。これによると血漿中濃度が $50 \mu\text{g/ml}$ の時は結合率はアルブミン濃度に比例して増加するが ($p < 0.01$)、比較的血漿中濃度が高くなってくると次第に相関が薄れる傾向が観察され蛋白結合性に個体差があらわれてくるように思われた。

TABLE II. Binding of Sulfisomidine to Human Serum "Albumin"

Subject ^{a)}	T.P. ^{b)} g/dl	Al ^{c)} g/dl	n	$K \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$	$nK \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$	* ^{d)}
M.N	8.0	3.5	1.18	1.53	1.80	1
M.O	7.6	5.0	0.91	2.74	2.49	2
C.H	7.4	4.9	1.25	1.80	2.25	1
C.K	7.6	3.9	1.35	1.78	2.40	2
H.O	8.0	5.3	0.98	2.37	2.32	1
S.S	6.8	4.5	1.32	1.70	2.23	1
T.B	8.4	5.1	1.19	1.51	1.80	3
K.K	7.8	4.8	1.00	2.04	2.04	1
H.H	7.8	4.4	1.56	1.42	2.21	1
T.M	7.4	4.6	0.94	2.21	2.01	3
S.T	7.4	4.2	1.22	1.87	2.28	2
F.U	7.6	4.6	1.08	1.85	1.98	1
K.H	7.6	5.0	1.20	1.84	2.22	1
K.N	7.8	5.5	1.02	2.18	2.22	1
A.H	7.8	4.9	1.18	1.68	1.97	2
T.T	9.0	5.0	1.30	1.57	2.04	2
M.O	7.8	4.6	1.27	1.66	2.11	1
A.S	7.2	4.7	0.88	2.41	2.13	1
S.N	8.0	5.2	1.09	1.84	2.00	1
T.I	8.0	5.0	0.93	2.16	2.00	1

a) Subjects are patients of chronic rheumatoid arthritis.

b) total serum protein

c) serum albumin

d) degree of disease (1: slight, 2: medium, 3: serious)

- 11) J.A. Prior, S. Saslaw, *J. Lab. Clin. Med.*, **38**, 420 (1951). (通常の投与量では最高血中濃度は $120 \mu\text{g/ml}$ 程度である。)

Fig. 3. Correlation between Serum Albumin Concentration and Binding Ratio of Sulfisomidine

[PL]=50 µg/ml $p < 0.01$

Fig. 4. Correlation between Serum Albumin Concentration and Binding Ratio of Sulfisomidine

[PL]=200 µg/ml $p < 0.05$

結

論

限外ろ過法では希釈しない血清（漿）を用いて蛋白結合を測定できる利点がある反面、試料を多量必要とする欠点がある。¹²⁾ また平衡透析法では血清（漿）を希釈せざるを得ないため単なる化学的平衡の一断面をみているに過ぎず、さらには初期薬物濃度を同一にしても平衡後の濃度が異なればもはや同一条件で検討したことにならない欠陥がある。そこで今回は *in vitro* 実験により得られた物理化学的パラメータ (n, K) を用い理論的に *in vivo* における結合率を算出する方法を提出した。本法によれば多量の生体試料を必要とすることなく、任意の血中濃度における結合率を求めることが可能で、ヒトの蛋白結合性の比較検討を実施する場合などにはきわめて利用価値が高い。

謝辞 本研究にあたり一部資料の提供ならびに援助をいただいた福岡・天神クリニック臨床検査室主任 松下先生に深く感謝します。なお、当教室、熊丸富美子氏の協力にあわせて謝意を表します。

12) 掛見喜一郎, 瀬崎 仁, 池田桂子, 薬剤学, 28, 101 (1968); M.C. Meyer, D.E. Guttman, *J. Pharm. Sci.*, 57, 895 (1968).