ウリカーゼ活性に及ぼす 4-Hydroxypyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine の影響¹⁾酒井 清, 西畑利明, 西野隆雄, 高松早基子
大阪薬科大学²⁾Effect of 4-Hydroxypyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine on Uricase Activity¹⁾KIYOSHI SAKAI, TOSHIAKI NISHIHATA, TAKAO NISHINO and SAKIKO TAKAMATSU
Osaka College of Pharmacy²⁾

(Received February 2, 1976)

Oral administration of 4-hydroxypyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (H.P.P.) to various species of animals was found to show sex difference in its blood level, excretion time, and serum uric acid value. Therefore, effect of H.P.P. on uricase activity was examined by using mice. Various concentrations of H.P.P. were applied to the homogenate and first and second fractions prepared from mouse liver, and their uricase activity was measured. It was thereby found that the sex difference in the decrease of serum uric acid and effective period after oral administration of H.P.P. were due, in part, to the difference in the degree of uricase activation by H.P.P. Discussions were also made on the difference in blood level and excretion time after administration of H.P.P.

マウス, ラット, 家兎等の哺乳類実験動物は, プリン代謝の最終産物が尿酸であるヒトに比べ, その一部が異なり水に易溶性のアラントインにまで代謝されて排泄されるために痛風, Lesch-Nyhan 症候群などのいわゆる高尿酸血症を認めることができないが, 現在これらの実験動物を用い高尿酸血症モデルを作成するためにウリカーゼ (EC1.7.3.3. Urate: oxygen oxidoreductase) 活性を何んらかの方法で抑制しアラントイン排泄型から尿酸排泄型に変える試みが行なわれている.³⁾

著者らは先に⁴⁾ キサンチンオキシダーゼ (EC1.2.3.2. Xanthine: oxygen oxidoreductase) の作用を抑制するといわれる痛風治療剤 4-hydroxypyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (H.P.P.) の各種剤形を家兎に経口投与し, その剤形が薬効におよぼす影響を検討したところ, いずれの剤形においても, その血中濃度, 排泄時間, 血清尿酸値などに性差があることを認めた. このためこれらの現象が H.P.P. のウリカーゼ活性に対する作用にも関連性を有するのではないかと考え, H.P.P. がウリカーゼ活性に及ぼす影響について検索を加えた.

試料および実験方法

実験動物としては, 体重 25—30 g の dd 系マウスを用い, 断頭後その肝臓を摘出し, 氷冷蒸留水にてすみやかに洗浄したのち, ろ紙片にて液をぬぐい秤量した. 秤量後周囲を氷冷しつつ乳鉢中で細く切り碎き, ついで乳棒で適当に磨砕したのち 9 倍量の氷冷 0.25M 蔗糖液を加えてテフロン製ホモジナイザーにて 1000 R.P.M., 1.5 分均一化しホモジネートとした. ホモジネートよりの各分画の分離法については種々の報告があるが, Schneider, Little field ら, Keller らの方法⁵⁾ にしたがひ, ホモジネートを久保田冷却遠心分離機 KR-66 型および 65P 型日立分離用超遠心機を用い分画遠心した. すなわち, まず 10 分間 600×*g* で遠心し, 未破壊細胞, 細胞核および赤血球などを沈殿せしめ, この沈殿物を 0.25M 蔗糖液適量で懸濁し再度 10 分間 600×*g* で遠心

1) 第 24 回日本薬学会近畿支部総会で発表, 松原, 1974 年 11 月.

2) Location: 2-10-65, Kawai, Matsubara-city, Osaka.

3) 山本 格, 岩木秀夫, 野口 豊, 岩田平太郎, 第 4 回薬物活性シンポジウム, 長崎, 1975 年 10 月.

4) 酒井 清, 徳山利夫, 杉本明子, 醍醐皓二, 薬剤学, 33, 179 (1973).

5) a) W.C. Schneider, *J. Biol. Chem.*, 176, 259 (1948); b) J.W. Littlefield, E.B. Keller, J. Gross, P.C. Zamecnic, *J. Biol. Chem.*, 217, 111 (1955); c) E.B. Keller, P.C. Zamecnic, *J. Biol. Chem.*, 221, 45 (1956).

した。以上2回に得た上清を合わせて10分間 $18000 \times g$ で遠心分離し、この沈殿物を $0.25M$ 蔗糖液適量で懸濁し、さらに10分間 $18000 \times g$ で遠心した沈殿物を第一分画とした。 $18000 \times g$ で前後2回遠心して得た上清を合わせ60分間 $105000 \times g$ で遠心分離した沈殿物を $0.25M$ 蔗糖液適量で懸濁し再度60分間 $105000 \times g$ で遠心分離した沈殿物を第二分画とした。

ウリカーゼ活性の測定法は Schneider ら⁶⁾ の方法に Truscoe ら⁷⁾ の方法を考慮し、各試料の $0.25M$ 蔗糖液に終濃度が 0.1% になるように Triton X-100 を添加し30分間室温に放置したのち、終濃度が 1.25 mM より 50 mM になるように $0.1M$ NaOH の可及的少量で溶解した H.P.P. の溶液を添加した。ついで30分間 37° に保った恒温槽中で incubate した溶液 0.1 ml に $0.2M$ Tris 緩衝液 (pH 9.5) 0.2 ml を加え蒸留水にて 3 ml とし、これに $0.025M$ NaOH に溶解した $0.0125M$ 尿酸溶液 0.01 ml を添加し、ただちに 292.5 nm における吸光度を測定し、10分間の尿酸減少率より計算した。(1単位は毎分 25° , pH 8.5 で $1\mu\text{mole}$ の尿酸をアラントインへ転化させる量)

結 果

終濃度 1.25 mM より 50 mM までの H.P.P. を含む各種試料を調製し、H.P.P. が雌雄マウス肝臓ホモジネートのウリカーゼ活性に及ぼす影響を検討したところ、その6例平均値 $\pm S.E.$ として Fig. 1 の如き結果が得られた。ホモジネートの場合、試料と同様に操作した H.P.P. を加えない対照のウリカーゼ活性を100とすると雄性では、 1.25 mM において 120% という活性化のピークが認められ、 2.5 mM では 117% 、 5 mM では 107% 、 10 mM からは H.P.P. の濃度が増すにしたがい抑制が強く認められた。雌性においては、 1.25 mM では 112% 、 2.5 mM では 109% 、 5 mM からは雄性和同じく H.P.P. の濃度が増すにしたがい抑制が強く認められた。

第一分画の場合においても、ホモジネートの場合と同様な傾向がみられたが、第二分画では、その活性が小さく活性度に対する影響は実験的に測定することができなかった。

以上のように H.P.P. の低濃度においては、ホモジネート、第一分画のいずれにおいてもウリカーゼの活性化がみられたが、雌性に比べ雄性の方がその影響は大きく認められた。

なお、同濃度の H.P.P. を作用させた雌雄マウス各試料のウリカーゼ活性値間には、有意 ($p < 0.05$) の性差が得られた。

考 察

著者らは前報⁴⁾ 以来尿酸生成に関する H.P.P. の作用機序について各種動物を使用して追求してきた。H.P.P. のキサンチンオキシダーゼに対する作用については、すでに諸外国のみならずわが国においても種々な報告⁸⁾ があるが、ウリカーゼに対する作用についてはあまりみられなく、わずかに Truscoe ら⁷⁾ が牡牛腎臓のアセトンパウダーを用い、その影響をみているにすぎないようである。前報⁴⁾ において雌雄家兔に H.P.P. を投与した場合、血中濃度、排泄時間、血清尿酸値および血清尿酸値低下時間などに差が認められたことより、ウリカーゼ活性に対してもなんらかの性差があるのではないかと考え、今回は種々の実験条件を考慮の上、マウスを用い、その活性度を実験した。予想した如く雌雄いずれもホモジネート、第一分画とも 1.25 mM の濃度において活性化

Fig. 1. Effect of H.P.P. on Uricase Activity of Mouse Liver Homogenate

Values are expressed as means $\pm S.E.$ in six experiments.
 x—x: male o—o: female

6) W.C. Schneider, G.H. Hogeboom, *J. Biol. Chem.*, **195**, 161 (1952).

7) R. Truscoe, V. Williams, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 165 (1968).

8) a) 伊佐真之, 林 五郎, 甲和良夫, 日薬理誌, **64**, 108 (1968); b) H. Iwata, I. Yamamoto, K. Muraki, E. Goda, *Ist Symp. on Drug Metabolism and Action*, Chiba, Nov. 1969; c) 御巫清允, “痛風,” 改訂第2版, 金原出版, 東京, 1971, p. 161.

のピークが認められた。また、雄性ホモジネートの場合はやや高濃度よりと思われたが、他は 5 mm 以上の濃度においては雌雄とも濃度が増すにしたがい抑制が強く認められた。このことより H.P.P. によるウリカーゼの活性化には至適濃度があり、少量では活性化がみられるが大量ではむしろ抑制的に働き、その生体内濃度によりウリカーゼに対する作用も異なるのではないかと考えられるとともに、性による生体内諸条件の違いにより酵素の感受性にも差があるのではないかと考えられた。すなわち、通常血清尿酸値に有意の差が認められるのは、雌雄動物の肝臓中のウリカーゼ含量の差異⁹⁾より考え、雄性に比べ雌性の方が体内において尿酸よりアラントインへの代謝速度が速いためではないかと推察されるが、H.P.P. 投与後雄性が雌性に比べ、前報⁴⁾において実験に用いたカプセル剤、顆粒剤、錠剤および懸濁液剤のいずれの剤形においても血清尿酸値の減少率が多少大きく、血清尿酸値低下時間も長かったことは雄性の方が H.P.P. によるウリカーゼの活性化率が大きく、そのため尿酸よりアラントインへ酸化される速度およびその量的問題が大きな要素として考えられた。

今回の実験では H.P.P. 投与後の血中濃度の上昇度、排泄時間の性差とウリカーゼ活性との直接関連性は認めることができなかったが、H.P.P. はキサンチンオキシダーゼにより血中ですみやかにアロキサンチンへ酸化される。アロキサンチンもキサンチンオキシダーゼの阻害剤である上、その排泄速度は H.P.P. に比べ緩やかであり蓄積性も有している。¹⁰⁾ しかしながら、そのキサンチンオキシダーゼ阻害作用は、H.P.P. の方がはるかに強い。^{8a)} おそらく雌雄により H.P.P. からアロキサンチンへの酸化速度あるいは H.P.P. およびアロキサンチンの排泄能の差などが考えられ、両者の体内分布量の時間的比率などが血中濃度、排泄時間などに関係を有しているのではないかと考察されるので、この点に関しては今後さらに検討する必要があると考えられた。

結 論

マウスなどの実験動物に H.P.P. を経口投与した場合、その血清尿酸減少率および有効時間に雌雄により差がみられるのは H.P.P. によるウリカーゼの活性化度に相違があることが一要素であると認められた。

9) a) J.L. Leeling, G.F. Lata, *Endocrinology*, **77**, 1075 (1965); b) 酒井 清, 西畑利明, 西野隆雄, 高松早基子, 未発表データ。

10) G.B. Elion, A. Kovensky, G.H. Hitchings, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 863 (1966).