

## インスリン作用を有するバナジウム錯体の動態解析 —BCM-ESR 法による metallokinetic analysis—

安井 裕之, 藤澤 弥恵, 田和 理市, 桜井 弘  
京都薬科大学・代謝分析学教室

### Pharmacokinetic analysis of insulin-mimetics vanadium complexes in rats —metallokinetic analysis by BCM-ESR method—

Hiroyuki Yasui, Yae Fujisawa, Riichi Tawa, and Hiromu Sakurai

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University*

Biological functions of vanadium have been investigated by many researchers. Especially, the insulin-like effect of vanadium is the most remarkable. Recently, vanadyl ion (+4 oxidation state of vanadium) and its complexes have been shown to normalize the blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic rats (STZ-rats). We have examined to find more effective vanadyl complexes with insulin-mimetic activity and prepared less toxic complexes with several types of coordination mode. Among them, vanadyl-methylpicolinate complex (VO-MPA) was found to exhibit higher insulin-mimetic activities and less toxic than other complexes as evaluated by both *in vitro* and *in vivo* experiments. Electron spin resonance (ESR) is available to measure the paramagnetic compounds in biological samples. We have developed the *in vivo* blood circulation monitoring-electron spin resonance (BCM-ESR) method to analyze the ESR signals due to paramagnetic metal ions and stable radicals in real time. In the present pharmacokinetic investigation to elucidate the relationship between the blood glucose normalizing effect and global disposition of vanadium, we report first the experiments, in which the BCM-ESR method was applied to evaluate the disposition of vanadyl states in circulating blood after intravenous administration to male Wistar rats. ESR spectra due to vanadyl state were obtained in circulating blood, and pharmacokinetic parameters for them were estimated by using the compartment model. The results of the experiments indicated that vanadium considerably distributed to peripheral tissues and eliminated from the body through urine, and the accumulation of vanadium in the tissue was enhanced by VO-MPA treatment. The long-acting property of VO-MPA was suggested by the incorporation and accumulation of vanadium in the bone. We conclude that the tissue distribution of vanadium is closely related with the antidiabetic activity of the vanadyl complex.

バナジウムは幅広い酸化状態をとり得る微量元素であり、近年では4価および5価バナジウムのインスリン様抗糖尿病作用が注目されている<sup>1)-4)</sup>。我々は、4価バナジウムイオン（バナジル）およびその錯体がインスリン依存性実験糖尿病ラットの血糖値を正常値に回復させることを報告して来た<sup>5)-9)</sup>。また、我々はフリーラジカルや金属イオンを含む常磁性化合物の循環血液中の挙動をリアルタイムで観測できる blood circulation monitoring-electron spin resonance (BCM-ESR) 法を提案している<sup>10)</sup>。最近、米国において糖尿病患者にバナジウムイオンを投与する臨床試験がはじまり、試験結果の報告もされて来た<sup>11)-15)</sup>。このような状況下で、インスリン様作用をもつバナジウム錯体の臨床応用を目指すには、錯体の毒性評価と体内動態の把握がまず必要である<sup>16)-18)</sup>。そこで、現在までに経口投与により最も有効な錯体として見出されているバナジウムメチルピコリネート<sup>19)</sup>について、ラットにおける体内動態を検討した。

## 実験方法

### 1. バナジル化合物の安定性

バナジウムメチルピコリネート (VO-MPA) および硫酸バナジウム (VS) の生理食塩水、アルブミン溶液、およびラット新鮮血液における安定性について室温および77KでESR測定を行い、シグナルの減衰とESRパラメータを解析した。

### 2. BCM-ESR法による metallokinetic analysis

Wistar系雄性ラットにペントバルビタールを腹腔内投与して、麻酔下で大腿静脈および動脈にカニューレを施してシリコンチューブと連結しESR測定用石英セルに接続した。VSもしくはVO-MPAをバナジウムとして0.5mg/kgの投与量で大腿静脈内に急速投与後、直ちにESR測定を行い、30秒毎に循環血液中のバナジル種をモニターした。バナジル種に基づくESR信号の強度を絶対検量線を用いて血中濃度に換算し、得られた血中濃度の時間推移をコンパートメントモデルに基づく薬物速度論によって解析した。

### 3. 尿中バナジウムの排泄動態のESRによる解析

VSもしくはVO-MPAをバナジウムとして0.5mg/kgの投与量でラットの尾静脈内に急速投与後、2時間毎に尿を採取して、両化合物の尿中濃度を77KのXバンドESR測定により定量して、両化合物の尿中排泄動態について検討した。

### 4. バナジウムの体内分布

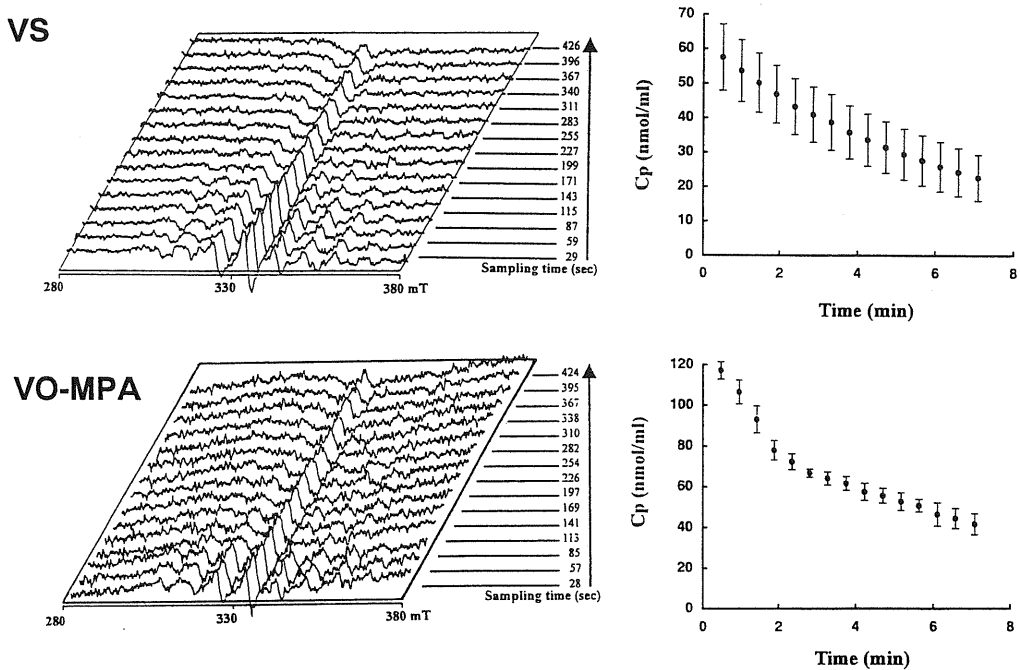
VSもしくはVO-MPAをバナジウムとして10mg/kgの投与量でラットの腹腔内に単回投与後、経時的に腹部大動脈から血液を採取し、同時に臓器を摘出して凍結乾燥した後、京都大学原子炉実験所において中性子放射化分析により各臓器中の総バナジウム量を定量して、両化合物の臓器移行動態について検討した。

## 結果と考察

VSおよびVO-MPAのインビトロにおける安定性は、生理食塩水、アルブミン溶液、およびラット

新鮮血液中の室温および低温測定により得た ESR パラメータ  $g$  値および超微細結合定数  $A$  値から判断した。全ての溶液中で両化合物の ESR 線型および信号強度の経時的変化は観測されなかった。したがって、血液中において両バナジル化合物はほとんど酸化や還元を受けず、安定であることが明らかとなった。

VS もしくは VO-MPA をバナジウムとして 0.5mg/kg の投与量でラットに急速静注し、BCM-ESR 法により測定した結果を Fig. 1 に示した。両化合物ともに、循環血液中にバナジル種に基づく 8 本線の ESR スペクトルを示し、シグナル強度は経時的に減衰した。血中濃度を compartment model<sup>20)</sup> に基づいて解析したところ、VS の血中濃度は one-compartment model により評価されたのに対して、VO-MPA では two-compartment model による評価が統計的により適切であった。バナジウム化合物の血中動態にはイオン型と錯体型との間で明らかな違いが観測され、イオン型は血中と組織間の分布過程が平衡であるのに対して、錯体型では分布過程が非平衡であった。すなわち、錯体型はイオン型と比較して血中と組織間における移行性がより緩やかであることが示唆された。



**Fig. 1** In vivo BCM-ESR method of vanadyl (VO (II)) state  
Rat received intravenous injection of VS (upper) or VO-MPA (bottom) at a dose of 0.5mg vanadium/kg body weight under anesthesia. ESR spectra were measured at room temperature.

最小二乗計算を利用したカーブフィッティングにより血中動態から算出された薬物速度論パラメータを Table 1 に示した。ここでは、VO-MPA のリード化合物であるバナジルピコリネート (VO-PA) の

**Table 1** Metallokinetic parameters of vanadyl complex

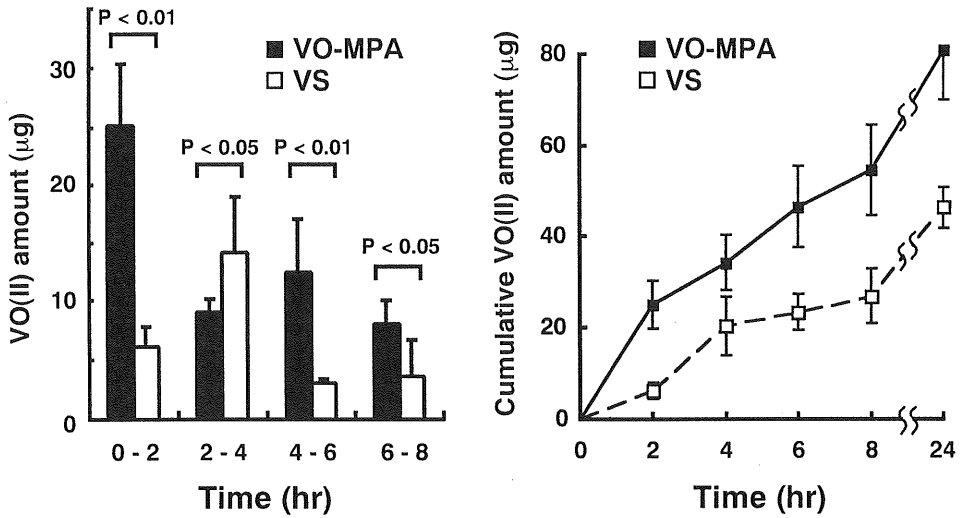
	$t_{1/2}$ (min)	Vd (mL/kg)	CL <sub>tot</sub> (mL/min/kg)	AUC (nmol·min/mL)	MRT (min)
VS	5.2±1.2	154±26	22.2±5.1	461±100	7.2±1.6
VO-PA	$t_{1/2}(\alpha)=0.4\pm0.2$	142±47	15.2±2.9	[ 23.5±5.0 ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ ) ]	9.3±1.7
	$t_{1/2}(\beta)=8.2\pm1.1$			[ 33.2±6.6 ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ ) ]	
VO-MPA	$t_{1/2}(\alpha)=0.5\pm0.1$	95±10	10.5±2.3	974±246	9.6±3.4
	$t_{1/2}(\beta)=7.2\pm2.6$			[ 49.7±12.5 ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ ) ]	

Rats were treated vanadyl complex (VS, VO-PA, or VO-MPA, V: 0.5mg/kg body weight) by *i.v.* injection under anaesthesia (n = 3).

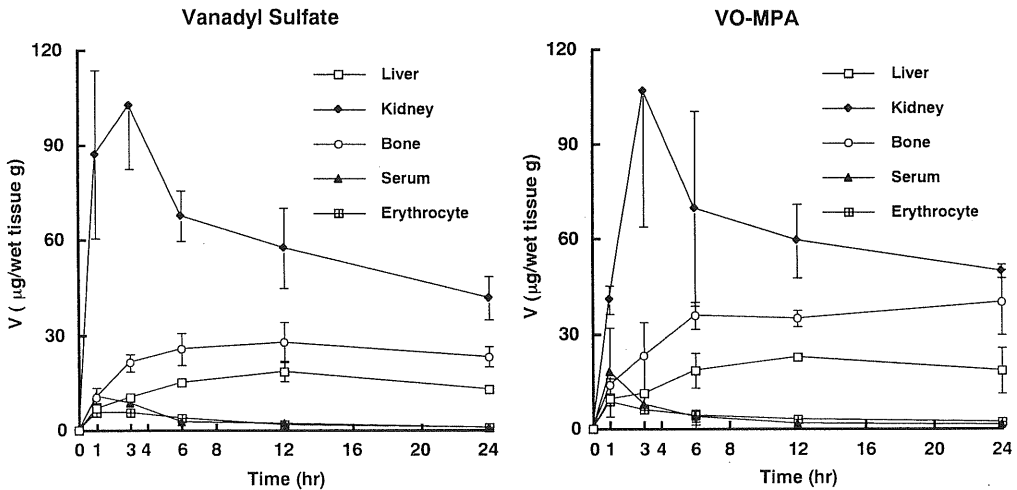
計算結果も掲載した。VO-PAについてはVO-MPAと同様にtwo-compartment modelによる評価がより適切であった。水/オクタノール間の分配係数により表されるバナジウム化合物の脂溶性はVS, VO-PA, VO-MPAの順番に増大することが確認されている。したがって、バナジウム化合物の脂溶性が増大するにつれて、平均滞留時間MRTおよび半減期t-halfの延長、血中濃度下面積AUCの増大、全身クリアランスCL<sub>tot</sub>と分布容積Vdの有意な減少が観測された。錯体型のバナジウム化合物はイオン型と比較して、循環血中からの消失が低下して血中滞留性が増大することが明らかとなった。

VSおよびVO-MPAの尿中排泄の結果をFig. 2に示した。両化合物をバナジウムとして0.5mg/kgの投与量でラットの尾静脈内に急速静注し、2時間毎に尿を採取して低温ESR測定によりバナジル種を定量した。尿中へのVSの最大排泄速度は、投与後2時間から4時間後の間に観測されたのに対して、VO-MPAの最大排泄速度は投与直後から2時間後の間までに観測された。また、24時間後までのバナジル種の尿中総排泄量は、VSが投与量の35%であったのに対して、VO-MPAでは投与量の61%であった。VO-MPAはVSと比較して疎水性が増大しているにもかかわらず、VSよりも速やかに、かつVSよりも多くの量が尿へと排泄されることが明らかとなった。したがって、イオン型と錯体型のバナジウム化合物の腎臓を介した尿中排泄過程には、化学形の違いにより生体側の認識機構が異なり、分泌や再吸収を含めた排泄機構に相違のある可能性が示唆された。

VSおよびVO-MPAの各臓器中への移行動態の結果をFig. 3に示した。両化合物をバナジウムとして10mg/kgの投与量でラットの腹腔内に単回投与後、経時的に腹部大動脈から血液を採取し、同時に臓器を摘出して凍結乾燥後、放射化分析法により総バナジウム量を定量した。両化合物ともに、各測定時間における組織中のバナジウム濃度は血清中や血球中と比較すると非常に高濃度であり、腎臓中が最も高く、次いで骨中、肝臓中の順であった。また、骨と肝臓における組織中濃度の時間推移は他の臓器と比較してより緩やかに減少しており、両化合物ともに組織中における滞留性は、骨中が最も長く、次いで肝臓中、腎臓中の順であった。腎臓においては、VSでは組織中濃度の速やかな上昇が観測されたのに対して、VO-MPAでは最大濃度はVSとほぼ等しいものの、濃度の上昇推移はより緩やかであった。



**Fig. 2** Clearance of vanadyl (VO (II)) state to the urine of rats  
 Urine was collected at every 2 hours from rats who received intravenous injection of VO-MPA (closed) or VS (open) at a dose of 0.5mg vanadium/kg body weight. Concentrations of vanadyl (VO (II)) state in the urine were determined by X-band ESR measured at 77K.



**Fig. 3** Time-dependent distribution of total vanadium in organs of normal rats  
 Rat received intraperitoneal injection of VS (left) or VO-MPA (right) at a dose of 10mg vanadium/kg body weight. Total vanadium in the organs was determined by neutron activation analysis. Points were expressed as the means  $\pm$  SDs for three rats.

我々は、錯体型のバナジウム化合物を投与した際には腎臓における急性毒性の発現がイオン型と比較して抑制されることを既に報告している<sup>8),19)</sup>。バナジウム化合物の腎移行性および腎臓内滞留性と腎毒性発現との関わりについては更に検討が必要と考えられる。一方、肝臓および骨においては、

VO-MPA の組織移行が VS と比較して増大しており、特に骨では VO-MPA の T<sub>max</sub> が24時間であることから錯体型のより長い骨内滞留性が示された。VO-MPA は、インスリン依存性実験糖尿病ラットの高血糖値を正常値に回復させるが、この作用は投与終了後も継続して効果を発揮することが示されている<sup>19)</sup>。VS による処置では観測されない、この VO-MPA の血糖値降下作用の持続性は、その体内動態の特徴、すなわち骨への蓄積に起因するのではないかと考えられてきたが<sup>19)</sup>、今回の実験結果はその概念を強く支持するものであった。

以上の結果より、4価バナジウム化合物はイオン型と錯体型の化学構造に依存して、バナジル種としての血中動態、尿中排泄、および臓器分布特性に変化の見られることが明らかとなった。すなわち、VO-MPA および VS は血液中ではともに4価バナジウムとして安定であるが、BCM-ESR 法により測定された *in vivo* の血中濃度推移、および尿中排泄には両化合物間で明らかな相違が観測され、VS と比較して VO-MPA は循環血液中からの消失の低下、循環血液中での滞留性の延長、尿中排泄の増加、特に骨における組織中滞留性の増加が示された。これより、バナジル錯体の血糖値降下作用の増強と効果の持続性には、それらの体内動態が密接に関係していることが示唆された。今回適用した BCM-ESR 法は、常磁性金属化合物の血中濃度をリアルタイムで定量できることから、常磁性化合物の生体における全身動態を評価するのに有用である。今後、BCM-ESR 法を用いたバナジウム以外の常磁性金属を含有する生体関連物質の体内動態解析 (metallokinetic analysis) への展開が期待される。

謝辞：バナジウムの中性子放射化分析でお世話になった京都大学原子炉実験所の高田実弥および松下緑治両博士に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) J. Meyerovitch, Z. Farfel, J. Sack and Y. Shechter (1987) : J. Biol. Chem. 262 : 6658
- 2) R. A. Pederson, S. Ramanadham, M. J. Buchan and J. H. McNeil (1989) : Diabetes 38 : 1390
- 3) J. H. McNeil, V. G. Yuen, H. R. Hoveyda and C. Orvig (1992) : J. Med. Chem. 35 : 1489
- 4) S. M. Brichard and J. C. Henquin (1995) : Trends in Pharmacol. Sci. 16 : 265
- 5) H. Sakurai, K. Tsuchiya, M. Nukatsuka and J. Kawada (1990) : J. Endocrinol. 126 : 451
- 6) H. Sakurai, K. Tsuchiya, M. Nukatsuka, J. Kawada, S. Ishikawa, H. Yoshida and M. Komatsu (1990) : J. Clin. Biochem. Nutr. 8 : 193
- 7) H. Watanabe, M. Nakai, K. Komazawa and H. Sakurai (1994) : J. Med. Chem. 37 : 876
- 8) H. Sakurai, K. Fujii, H. Watanabe and H. Tamura (1995) : Biochem Biophys. Res. Commun. 214 : 1095
- 9) M. Nakai, H. Watanabe, C. Fujiwara, H. Kakegawa, T. Satoh, J. Takada, R. Matsushita and H. Sakurai (1995) : Biol. Pharm. Bull. 18 : 719
- 10) K. Takechi, H. Tamura, K. Yamaoka and H. Sakurai (1997) : Free. Rad. Res. 26 : 483
- 11) N. Cohen, M. Halberstam, P. Shilimovich, C. J. Chang, H. Shmoon and L. Rossetti (1995) : Am. Soc.

Clin. Invest. 95 : 2501

- 12) A. B. Goldfine, D. C. Simonson, F. Folli, M. E. Patti and C. R. Kahn (1995) : J. Clin. Endocrinol. Metab. 80 : 3311
- 13) A. B. Goldfine, D. C. Simonson, F. Folli, M. E. Patti and C. R. Kahn (1995) : Mol. Cell. Biochem. 153 : 217
- 14) M. Halberstam, N. Cohen, P. Shilimovich, L. Rossetti and H. Shamon (1996) : Diabetes 45 : 659
- 15) G. Boden, X. Chen, J. Ruiz, G. D. V. van Rossum and S. Turco (1996) : Metabolism 45 : 1130
- 16) K. Fukui, H. Ohya-Nishiguchi, M. Nakai, H. Sakurai, H. Kamada (1995) : FEBS Lett. 368 : 31
- 17) A. P. Bevan, J. W. Burgess, J. F. Yale, P. G. Drake, D. Lachance, G. Baquiran, A. Shaver and B. I. Posner (1995) : Am. J. Physiol. 268 : E60
- 18) I. A. Setyawati, K. H. Thompson, V. G. Yuen, Y. Sun, M. Battell, D. M. Lyster, C. Vo, T. J. Ruth, S. Zeisler, J. H. McNeill and C. Orvig (1998) : J. Appl. Physiol. 84 : 569
- 19) S. Fujimoto, K. Fujii, H. Yasui, R. Matsushita, J. Takada and H. Sakurai (1997) : J. Clin. Biochem. Nutr. 23 : 113
- 20) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno (1981) : J. Pharmacobio-Dyn. 4 : 879