

トリエン銅 (II) 錯体の動態解析
- BCM-EPR法による metallokinetic analysis -

安井 裕之, 地野 晴美, 桜井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

**Pharmacokinetic analysis of copper (II) -trien complex in rats
- metallokinetic analysis by BCM-EPR method -**

Hiroyuki YASUI, Harumi CHINO, and Hiromu SAKURAI
*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry,
Kyoto Pharmaceutical University*

Copper (Cu) is an essential trace element and constitutes the active center of the redox Cu-enzymes such as Cu,Zn-SOD, ceruloplasmin and cytochrome *c* oxidase. Wilson disease, which is a hereditary disease due to defect in the metabolism of Cu, has been shown to be caused by excessive accumulation of Cu in the body. Chelating ligands such as *D*-penicillamine have been clinically used to treat Wilson disease in terms of removing endogenous Cu from the body. Triethylenetetramine (trien) is now administered to the patients because of its lower side effects. Although pharmacokinetics of trien has been investigated by many researchers, the disposition of Cu (II) -trien complex and *in vivo* stability of the complex are insufficiently examined. Thus, we tried to elucidate the relationship between the chelating effect and global disposition of the Cu-complexes.

Electron paramagnetic resonance (EPR) is available to measure the paramagnetic compounds in biological samples. We have developed the *in vivo* blood circulation monitoring-electron paramagnetic resonance (BCM-EPR) method to analyze the EPR signals due to paramagnetic metal ions and stable radicals in real time. We report here the results of the BCM-EPR method which was applied to evaluate the disposition of Cu (II) states in circulating blood after intravenous administration of Cu (II) -complexes to male Wistar rats.

EPR spectra due to Cu (II) species were obtained in the circulating blood, and metallokinetic para-

* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

meters for them were estimated by using the compartment models. On the basis of the results that Cu (II)-trien considerably distributes to peripheral tissues, and after then re-distributes to the circulating blood as the complex form, we conclude that the stable residence of Cu (II)-trien in the blood and tissues relates with its higher stability constant ($\log K_{\beta}=20.1$) and coordination structure (N_4 coordination mode and distorted square-planar) of the complex.

ウィルソン病は、常染色体上の遺伝子変異に起因する先天性の銅代謝異常疾患である¹⁾。本疾患では、肝臓内の銅の貯蔵と輸送系に障害が生じるために、過剰の銅が肝臓・腎臓・脳などの各組織に蓄積して、肝硬変・振戦・進行性痴呆などを発症する²⁾。治療には、体内の銅イオンとキレートを形成して銅(II)の排泄を促進するD-ペニシラミンが一般的に投与されてきたが、腎毒性や血小板減少などの重篤な副作用のために長期投与には支障をきたす。そこで、より副作用の少ないトリエチレンテトラミン・二塩酸塩(トリエン)がD-ペニシラミンに代わるウィルソン病治療薬として用いられている³⁾⁻⁵⁾。

配位子であるトリエンの体内動態は明らかにされているが⁶⁾⁻⁷⁾、体内での銅除去効果およびトリエン銅(II)錯体の体内動態についてはほとんど知られていない。今回、銅(II)が常磁性金属であることに着目して、循環血液中における常磁性物質の挙動を測定できるBCM-EPR (Blood circulation monitoring-electron paramagnetic resonance) 法⁸⁾⁻¹⁰⁾によりトリエン銅(II)錯体の血中動態を解析した。

実験方法

1. トリエン銅(II)錯体およびジエン銅(II)錯体の合成と物性

トリエン銅(II)錯体 (triethyltetramine-Cu(II) complex : Cu-trien) およびジエン銅(II)錯体 (diethyltriamine-Cu(II) complex : Cu-dien) を既報に従って合成した¹¹⁾。得られた両銅(II)錯体の物性を調べるために、元素分析、EPRスペクトル、可視吸収スペクトルを測定した。

2. 銅(II)錯体の安定性

Cu-trienおよびCu-dienの生理食塩水、牛血清アルブミン溶液、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EPR測定を行い、経時的なEPR信号の減衰とEPRパラメータを解析した。

3. 銅(II)-アルブミン錯体と配位子(trienおよびdien)との相互作用

アルブミンと銅(II)錯体との相互作用を検討するために、0.5 mMのアルブミンと1 mMの塩化銅(II)との溶液中に配位子(trienもしくはdien:終濃度として1 mM)を添加する前後でEPRスペクトルと可視吸収スペクトルを測定し、EPRパラメータの変動と吸収スペクトルの変化を観測した。

4. BCM-EPR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ーションを施してシリコンチューブと連結しEPR測定用石英セルに接続した。Cu-dienもしくはCu-trienを銅(II)として100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重の投与量で大腿静脈内に急速投与後、直ちにEPR測定を行い、30秒毎に循環血液中の銅(II)をモニターした。銅(II)に基づくEPR信号の強度を、それぞれの銅(II)錯体をラット新鮮血に溶解させて作成した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^{12), 13)}。

結果と考察

元素分析, 室温および77Kで測定した銅 (II) 錯体のEPRパラメータ, および可視吸収スペクトルより, Cu-dienは金属:配位子の結合比が1:1の N_3O 配位のsquare-planar型錯体であり, Cu-trienは金属:配位子の結合比が1:1の N_4 配位のdistorted square-planar型錯体であった。

Cu-trienおよびCu-dienのインビトロ系における安定性は, 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77K測定により得たEPR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。全ての溶液中で両銅 (II) 錯体のEPR線型および信号強度の経時変化は観測されなかった。したがって, 血液中においてCu-trienおよびCu-dienはほとんど酸化や還元を受けずに, 錯体構造を安定に保持することが明らかとなった。

アルブミンと塩化銅 (II) との混液にtrienもしくはdienを添加する前後でのEPRパラメータと可視吸収スペクトルの変化から, trienおよびdienとともに銅 (II) -アルブミン錯体から銅 (II) イオンを引き抜いてそれぞれの銅 (II) 錯体を形成するが, 配位子-銅 (II) -アルブミンから成るternary錯体は本実験条件下では形成されないと判断した。それぞれの銅 (II) 体とアルブミンとは弱い相互作用により結合すると示唆された。

Cu-trienもしくはCu-dienを銅 (II) として $100 \mu\text{mol/kg}$ 体重の投与量でラットに急速静注し, BCM-EPR法により測定した結果をFig. 1に示した。両錯体ともに, 循環血液中に銅 (II) に基づく4本線

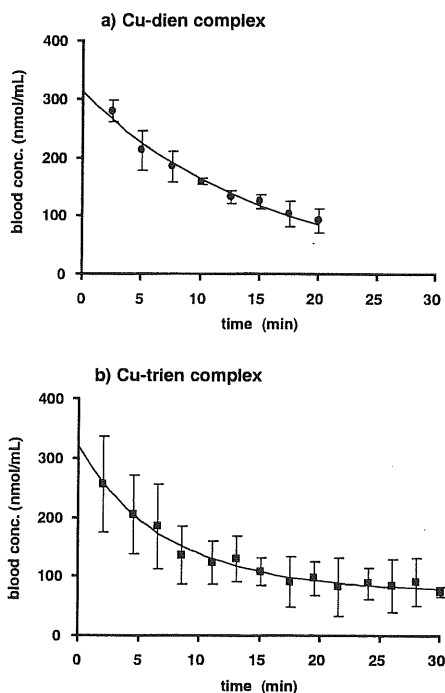


Fig. 1 Clearance curves of Cu (II) state in the circulating blood of rats monitored by BCM-EPR method. Rat received intravenous injection of Cu-dien (upper) or Cu-trien (bottom) at a dose of $100 \mu\text{mol cop- per/kg}$ body weight under anesthesia ($n=3$). EPR spectra were measured at room temperature.

のEPRスペクトル¹⁴⁾を示し、信号強度は経時的に減衰した。血中濃度をcompartment modelに基づいて解析したところ、Cu-dienの血中濃度はone-compartment modelにより評価されたのに対して、Cu-trienではtwo-compartment modelによる評価がより適切であった。銅(II)の血中動態にはCu-trienとCu-dienとの間で明らかな違いが観測され、Cu-trienでは血中と組織間の双方向の移行性が示された。

最小二乗計算を利用したカーブフィッティング¹²⁾により血中動態から薬物速度論パラメータを算出し、Cu-trienおよびCu-dienの血中動態特性をFig. 2にまとめた。Cu-dienが血液中では安定であったにも関わらず、循環血液中から速やかに消失したのは、各組織へ取り込まれた後に組織中で錯体が分解されるためと考えた。一方、Cu-trienが血中と組織間の双方向の移行性を示したのは、血液に加えて組織中においても錯体として安定に存在するためと考えた。このことは、投与されたトリエンが組織中に蓄積した銅(II)とキレートした後に、銅(II)錯体として循環血液中に再分布することを示唆している。錯体の安定度定数($\log K_{\beta}$)はCu-dienでは15.9、Cu-trienでは20.1と報告されている¹⁵⁾。従って、銅(II)錯体の安定度定数の増大に伴い、組織中における銅(II)錯体の安定性が上昇すると考えた。

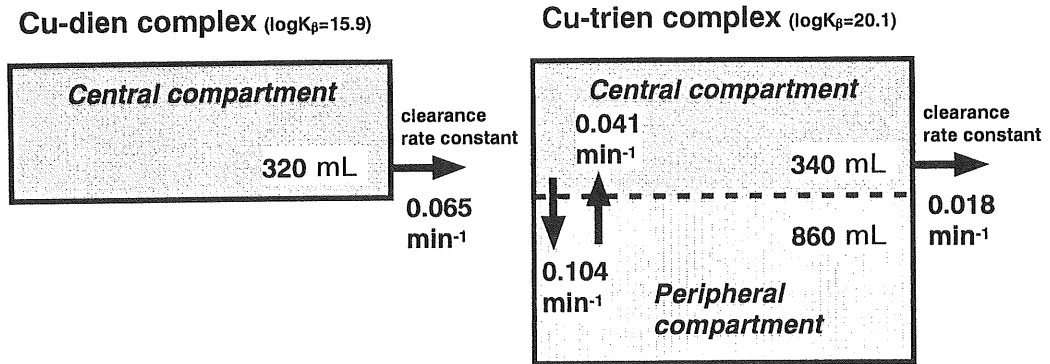


Fig. 2 Schematic representation of metallokinetic analysis of Cu-complexes on the basis of compartment models.

以上の結果より、銅(II)錯体の血中動態特性は錯体の配位型や安定度と関係することが示唆された。トリエンの銅(II)除去効果には、組織中でも安定な錯体として存在し、血液中に再分布するといったトリエン銅(II)錯体の体内動態が密接に関係していることが明らかとなった。

今後、Cu-trienの尿中排泄を検討して、錯体構造を安定に保持したまま循環血液中から体外へと排泄されるかどうかを調べる必要がある¹⁶⁾。また、体内に銅を蓄積する実験動物である銅負荷ラットやウィルソン病モデル動物のLECラットにトリエンを投与して、蓄積した内因性の銅とトリエンとの結合により形成されるCu-trien錯体の体内動態を評価することが次の課題である。

文 献

- 1) 桜井 弘, 田中 久 (1993) 生物無機化学, 廣川書店, 東京: pp. 17
- 2) 久保田春寿, 桜井 弘, 高木修造, 橋本圭二 (1995) 無機医薬品化学, 廣川書店, 東京: pp. 65
- 3) J. M. Walshe (1982) Lancet 27: 643
- 4) I. H. Scheinberg, M. H. Jaffe, I. Sternlib (1987) N. Eng. J. Med. 317: 209
- 5) H. Sone, M. Maeda, K. Wakabayashi, N. Takechi, M. Mori, T. Sugimura, M. Nagao (1996) Hepatology 23: 764
- 6) 小林道也, 菅原 満, 斎藤浩司, 井関 健, 宮崎勝巳 (1990) 薬学雑誌 110: 759
- 7) K. Iseki, M. Kobayashi, A. Ohba, Y. Li, Y. Togashi, N. Takeichi (1992) Biopharm. Drug Dispos. 13: 273
- 8) K. Takechi, H. Tamura, K. Yamaoka and H. Sakurai (1997) Free. Rad. Res. 26: 483
- 9) H. Sakurai, K. Takechi, H. Tsuboi, and H. Yasui (1999) J. Inorg. Biochem. 76: 71
- 10) H. Yasui, K. Takechi, and H. Sakurai (2000) J. Inorg. Biochem. 78: 185
- 11) N. F. Curtis and D. A. House (1965) J. Chem. Soc. 6194
- 12) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno (1981) J. Pharmacobio-Dyn. 4: 879
- 13) 山岡 清 (1984) マイコンによる薬物体内動態解析法, 南江堂, 東京: pp. 30
- 14) 桜井 弘 (1989) ESRスペクトルの実際, 廣川書店, 東京: pp. 125
- 15) A. E. Martell (1982) Critical Stability Constants, vol. 2 Amines
- 16) 和田 攻 (1985) 金属とヒト, 朝倉書店, 東京: pp. 100