

トレーサー測定法を用いたバナジウムおよび亜鉛を 投与したラットにおける血中動態解析

安井 裕之¹⁾, 安達 祐介¹⁾, 畚野 純¹⁾, 羽場 宏光²⁾,
中山 明弘²⁾, 蛭沼 利江子²⁾, 榎本 秀一²⁾, 桜井 弘¹⁾

(¹⁾京都薬科大学・代謝分析学教室*, (²⁾理化学研究所・加速器基盤研究室**)

Pharmacokinetic study on gastrointestinal absorption and disposition in the blood of ⁴⁸vanadium and ⁶⁵zinc in healthy rats using radiotracer method

Hiroyuki YASUI¹⁾, Yusuke ADACHI¹⁾, Jun FUGONO¹⁾, Hiromitsu HABA²⁾,
Akihiro NAKAYAMA²⁾, Rieko HIRUNUMA²⁾, Shuichi ENOMOTO²⁾ and Hiromu SAKURAI¹⁾

¹⁾Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

²⁾Cyclotron Center, RIKEN

In recent years, vanadium and zinc compounds are demonstrated to exhibit insulinomimetic effects in in vitro and in vivo experiments, and to treat both insulin-dependent type1 and insulin-independent type 2 diabetes mellitus. We have reported that vanadyl complexes normalize the blood glucose level of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats, and that zinc complexes decrease the blood glucose level of hereditary type 2 GK rats. To understand the action mechanism of vanadium and zinc treatment, in this study, we focused on investigating pharmacokinetics on gastrointestinal absorption and disposition in the blood of vanadium and zinc ions in healthy rats by administration of their radiotracers. Clearance curves of ⁴⁸V in the blood of rats receiving intravenous injection of vanadyl (⁴⁸VO²⁺) and vanadate (⁴⁸VO₄³⁻) ions were not significantly different in spite of administration of the different oxidation state and chemical species of vanadium, because of rapid reduction of vanadate to vanadyl in the blood and organs of rats. On the other hand, absorption of ⁴⁸VO₄³⁻ was found to be 3 fold higher than that of ⁴⁸VO²⁺, suggesting the chemical species-dependent mechanism on the gastrointestinal absorption of vanadium. Bioavailability of ⁶⁵Zn was estimated to be 0.27, which coincides well with the result in rats given non-tracer ZnCl₂, strongly indicating the need to develop zinc complexes with higher bioavailability exhibiting more hypoglycemic activity than zinc ion.

近年、生体微量元素と生活習慣病との関係が明らかにされつつある。バナジウム (V) と亜鉛 (Zn) は、多くの生理作用が見出されている微量元素であり、最近では、インスリン様の抗糖尿病作用が注目されている。我々は、インスリンの筋肉注射に代わり経口投与により効果を発揮する抗糖尿病薬として、VおよびZn錯体の開発を目指して基礎的に研究してきた¹⁻³⁾。VおよびZnによる血糖値正常化の作用機構を解明することを目的とし、まずVイオンおよびZnイオンを投与した健常ラットの血中動態について検討した。今回、⁴⁸Vおよび⁶⁵Znの放射性トレーサーを投与したラットの血中濃度をγ線により測定して動態解析を行った研究成果を報告する。

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

**所在地：埼玉県和光市広沢2-1 (〒351-0198)

実験方法

^{48}V 放射性トレーサーおよび ^{65}Zn 放射性トレーサーには、理化学研究所の加速器から得られる低エネルギーイオンビームをそれぞれTiおよびCu金属板上に照射して核反応をおこして製造した後、化学分離法により精製したシングルトレーサーを使用した。 ^{48}V のトレーサー溶液はTris-HCl緩衝液によりpH7.4に調製した生理食塩水を用いて作成した。トレーサー溶液中の ^{48}V の化学種は $^{48}\text{V}(\text{V})\text{O}_4^{3-}$ として存在しているため⁴⁾、化学種の違いによる検討を目的として、100 μM のアスコルビン酸Naを添加して ^{48}V の化学種を $^{48}\text{V}(\text{IV})\text{O}^{2+}$ へと還元した溶液を作成した⁴⁾。

実験動物には、8週令のWistar系雄性健常ラットを用いた。0.5 mLもしくは1 mLの $^{48}\text{VO}^{2+}$ 、 $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ および $^{65}\text{Zn}^{2+}$ のトレーサー溶液を静脈内もしくは経口投与したラットからエーテル麻酔下で経時的に採血した。試料中の ^{48}V および ^{65}Zn は γ 線カウンターにより定量し、得られた血中濃度曲線から薬物速度論にもとづいて動態パラメータ（血中濃度下面積：AUC，平均滞留時間：MRT，全身クリアランス： CL_{tot} ，および分布容積： Vd_{ss} ，吸収率：Fa，平均吸収時間：MAT）を算出し、VおよびZnの血中動態特性を評価した⁵⁾。以下にパラメータ算出に用いた式を記す。

$$\text{AUC} = \int_0^{\infty} C_b(t) dt = \frac{\text{Dose}}{\text{CL}_{\text{tot}}} \quad \text{MRT} = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot C_b(t) dt}{\int_0^{\infty} C_b(t) dt} = \frac{\text{Vd}_{\text{ss}}}{\text{CL}_{\text{tot}}}$$

$$\text{Fa} = (\text{AUC}_{\text{po}} / \text{AUC}_{\text{iv}}) \cdot (\text{Dose}_{\text{iv}} / \text{Dose}_{\text{po}})$$

$$\text{MAT} = \text{MRT}_{\text{po}} - \text{MRT}_{\text{iv}} \quad \text{Dose} : \text{投与量}, \text{po} : \text{経口投与}, \text{iv} : \text{静脈内投与をそれぞれ表す。}$$

結果と考察

^{48}V トレーサー溶液を静脈内および経口投与したラットにおける ^{48}V の血中濃度推移をFig. 1に示した。静脈内投与では、 $^{48}\text{VO}^{2+}$ 投与群と $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ 投与群の間で ^{48}V の血中濃度推移に違いは見られなかった。 ^{48}V の血中動態パラメータは、 $^{48}\text{VO}^{2+}$ 投与群では $\text{AUC} = 9.0 \pm 0.7 \%$ of dose·hr/mL， $\text{MRT} = 8.9 \pm 1.4$ hr， $\text{CL}_{\text{tot}} = 55 \pm 4$ mL/hr/kg，および $\text{Vd}_{\text{ss}} = 490 \pm 60$ mL/kgであり， $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ 投与群では $\text{AUC} = 9.8 \pm 0.7 \%$ of dose·hr/mL， $\text{MRT} = 9.2 \pm 1.3$ hr， $\text{CL}_{\text{tot}} = 51 \pm 4$ mL/hr/kg，および $\text{Vd}_{\text{ss}} = 470 \pm 50$ mL/kgであった。それぞれのパラメータについて両群間で有意差はな

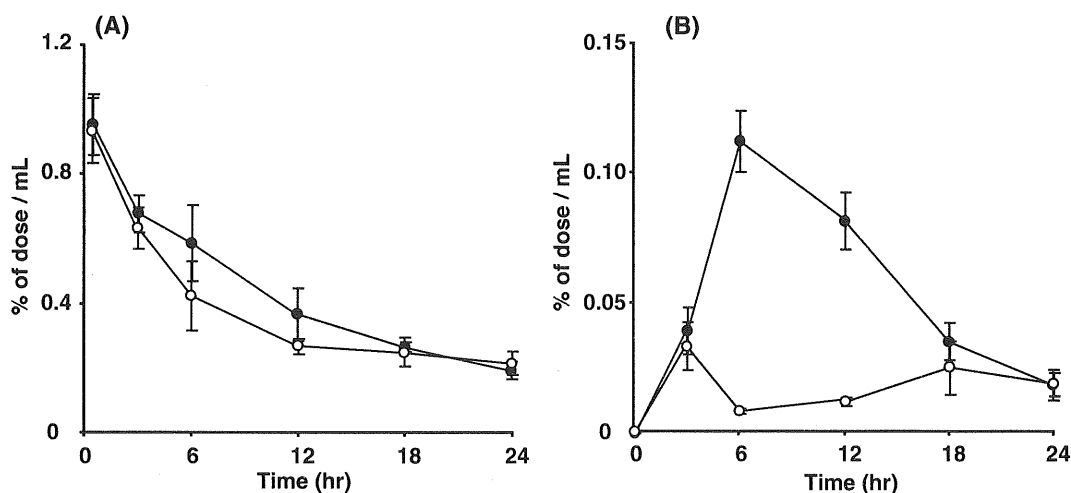


Fig. 1 Clearance curves of ^{48}V in the blood of rats given intravenously injection (A) and oral administration (B) of 500 μL of ^{48}V solution reduced with (○; $^{48}\text{V}(\text{IV})\text{O}^{2+}$) or without (●; $^{48}\text{V}(\text{V})\text{O}_4^{3-}$) 100 μM sodium ascorbate.

Data are expressed as the means \pm SDs for 4 rats.

った。両群の血中動態に違いが見られなかったのは、静脈内に投与された $^{48}\text{V}(\text{V})\text{O}_4^{3-}$ が血液中や組織中で速やかに $^{48}\text{V}(\text{IV})\text{O}^{2+}$ へと還元されたためと考えた。これまでに、5価Vをラットに腹腔内投与すると血液中や組織中で還元されて、大部分が4価Vとして体内に存在すること、および、投与されるVの酸化数の違いによってVの体内分布や濃度に大きな差がないことが見出されており^{6,7)}、これらの事実は今回の結果を支持している。生理的pHにおいて、アスコルビン酸やグルタチオンによって5価Vは4価Vへと速やかに還元されることが*in vitro*の実験により明らかとされているが⁸⁾、今回、*in vivo*においても5価Vから4価Vへの還元が短時間で進むことが示唆された。

一方、経口投与後の吸収動態では、両群の ^{48}V の血中濃度推移に大きな違いが観測され、 $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ 投与群における ^{48}V の血中濃度は $^{48}\text{VO}^{2+}$ 投与群のそれと比較して有意に上昇した。 ^{48}V の血中動態パラメータは、 $^{48}\text{VO}^{2+}$ 投与群では $\text{AUC} = 0.44 \pm 0.09$ % of dose·hr/mL, $\text{MRT} = 12 \pm 3$ hr, $\text{Fa} = 4.9\%$ 、および $\text{MAT} = 3.5$ hrであり、 $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ 投与群では $\text{AUC} = 1.4 \pm 0.2$ % of dose·hr/mL, $\text{MRT} = 10 \pm 2$ hr, $\text{Fa} = 15\%$ 、および $\text{MAT} = 1.2$ hrであった。Faの値から $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ 投与群の ^{48}V の吸収率は $^{48}\text{VO}^{2+}$ 投与群の吸収率と比べて3倍高いこと、また、MATの値から $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ 投与群の ^{48}V の吸収速度は $^{48}\text{VO}^{2+}$ 投与群の吸収速度と比べて3倍速いことが分かった。5価Vイオンであるバナデイトの消化管吸収に関してはアニオンチャンネルやリン酸のトランスポーターを介する輸送機構が提唱されているのに対して⁹⁾、4価Vイオンであるバナジルは単純拡散により取り込まれると示唆されている¹⁰⁾。この輸送機構の違いにもとづき、5価Vは4価Vより効率良く消化管から吸収されると考えられており、実際、5価Vの毒性は4価Vと比べて10倍高いことが知られている¹¹⁾。これらの事実は今回の結果を強く支持している。管腔内液中に含まれる還元性物質の濃度は低く、消化管内で5価V ($^{48}\text{VO}_4^{3-}$)は4価V ($^{48}\text{VO}^{2+}$)へと還元されにくいいため、経口投与される ^{48}V の化学種に依存して ^{48}V の吸収動態が大きく変化すると考えた。

次に、 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ トレーサー溶液を静脈内および経口投与したラットにおける ^{65}Zn の血中濃度推移をFig. 2に示した。 ^{65}Zn の血中動態パラメータは、静脈内投与群では $\text{AUC} = 2.4 \pm 0.3$ % of dose·hr/mL, $\text{MRT} = 0.99 \pm 0.16$ hr, $\text{CL}_{\text{tot}} = 210 \pm 20$ mL/hr/kg, および $\text{Vd}_{\text{ss}} = 210 \pm 30$ mL/kgであり、経口投与群では $\text{AUC} = 0.65 \pm 0.13$ % of dose·hr/mL, $\text{MRT} = 3.0 \pm 0.3$ hr, $\text{Fa} = 27\%$ 、および $\text{MAT} = 2.0$ hrであった。非トレーサーの ZnCl_2 を静脈内 (1 mg Zn/kg) もしくは経口 (10 mg Zn/kg) 投与した健常ラット血液中のZn濃度を原子吸光法により定量し、内因性のZnレベルを差し引いた後に動態解析した結果から、 ZnCl_2 投与後のZnのFaは24%、およびMATは2.2 hrと求められてお

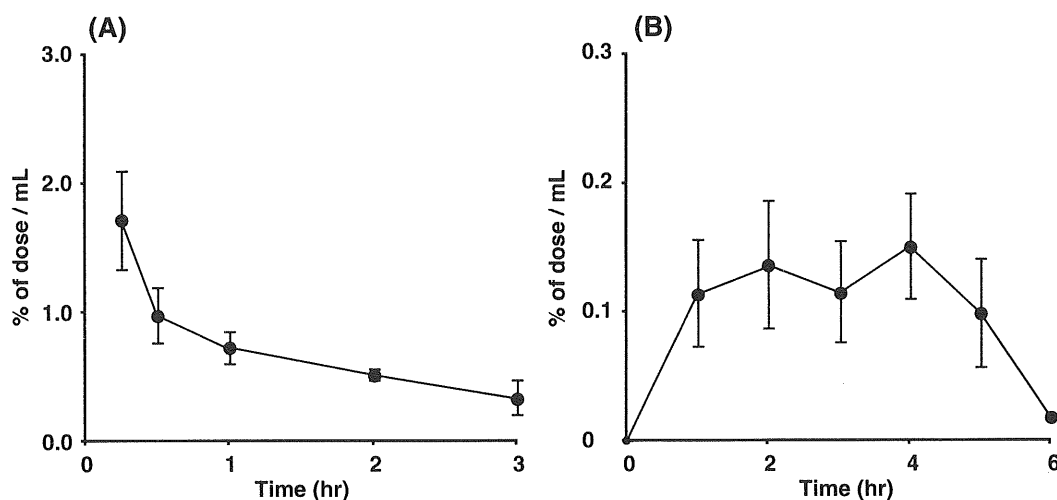


Fig. 2 Clearance curves of ^{65}Zn in the blood of rats given intravenously injection of 500 μL of ^{65}Zn solution (A) and oral administration of 1 mL of ^{65}Zn solution (B). Data are expressed as the means \pm SDs for 3 rats.

り¹²⁾、これらのパラメーター値は今回の結果と良好に一致した。投与するZnの化学種 (ZnCl₂) を同じくしたトレーサー法および非トレーサー法によるZnの動態解析の結果がほぼ一致したため、キャリアーを含まない⁶⁵Zn²⁺トレーサー溶液を用いた今回の結果は妥当と考えた。近年、複数のZnトランスポーターがクローニングされるなどZnの消化管吸収について活発に研究されているが¹⁰⁾、*in vivo*におけるZn²⁺投与後の吸収率は約25%とそれほど高くはないことが分かった。したがって、Zn化合物の経口投与により血糖値降下作用を発揮させるためには、より吸収効果の高いZn錯体の開発が必要であると考えた。

以上の結果から、⁴⁸Vおよび⁶⁵Znを用いたトレーサー測定法による微量金属イオンの血中動態解析の有用性が示された。今後は、VやZnの血糖値降下作用を高める作用をもつピコリン酸やマルトールなどの配位子を溶液中に共存させてトレーサーを錯体化し、同様に血中動態を検討する予定である。また、VはZnと比べて内因性Vの体内濃度が非常に低いため、⁴⁸Vの血中動態については非トレーサーを共存させたキャリアーの影響について調べる必要がある。

文 献

- 1) Sakurai, H. (2002) *The Chem. Rec.* 2: 237.
- 2) Sakurai, H., Kojima, Y., Yoshikawa, Y., Kawabe, K., and Yasui, H. (2002) *Coord. Chem. Rev.* 226: 187.
- 3) Sakurai, H., Yasui, H., and Adachi, Y. (2003) *Expert Opin. Investig. Drugs* 12: 1189.
- 4) Crans, D.C. and Tracey, A.S. (1998) *ACS Sympo. Series* 711: 2.
- 5) Yamaoka, K., Nakagawa, T., and Uno, T. (1978) *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6: 547.
- 6) Sakurai, H., Shimomura, S., Fukuzawa, K., and Ishizu, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 293.
- 7) 桜井 弘, 土屋浩一郎, 西田幹夫, 高田実弥, 小山陸夫 (1988) *微量栄養素研究* 5: 101.
- 8) Ding, M., Gannett, P.M., Rojanasakul, Y., Liu, K., and Shi, X. (1994) *J. Inorg. Biochem.* 55: 101.
- 9) L. C. Cantley Jr., M. D. Resh, and G. Guidotti (1978) *Nature* 272: 552.
- 10) A. Rolfs and M. A. Hediger (2001) *Curr. Opin. Gastroenterol.* 17: 177.
- 11) 桜井 弘, 田中英彦 共編 (1994) *生体微量元素*, 廣川書店, 東京: pp. 164.
- 12) J. Fugono, K. Fujimoto, H. Yasui, K. Kawabe, Y. Yoshikawa, Y. Kojima, and H. Sakurai (2002) *Drug Metabol. Pharmacokin.* 17: 340.