

日本財団補助金による 2000年度日中医学学術交流促進事業

⑤. 在留中国人研究者研究助成

(21) ラットにおける糖尿病治療薬ビグアニドの体内動態、排泄機構及び乳酸アシドーシスとの関連

ラットにおける糖尿病治療薬ビグアニドの体内動態、排泄機構および 乳酸アシドーシスとの関連

王 徳勝

東京大学大学院薬学研究科製剤設計学教室

要旨：経口糖尿病治療薬 biguanide 剤の再評価は近年進まれている。本研究では metformin, buformin, phenformin などを biguanide モデル化合物とし、ラットにおける i.v. infusion 系で体内動態を検討し、biguanide 化合物の重篤な副作用である乳酸アシドーシスのラット評価系を作った。体内動態の検討時に用いた最小 dose において腎クリアランス (CL_{renal}) はイヌリンのクリアランスよりはるかに大きいため、ビグアニド化合物は腎において能動的に排泄を受けることが示唆された。またラット oct1 (roct1) をクローニングし、CHO 細胞を用いて発現細胞を作成し、取込み輸送実験を行った。速度論解析した結果、K_m 値は metformin, buformin, phenformin それぞれ 513, 46.1, 5.20 μM であった。また OCT ファミリーの典型基質である tetraethylammonium (TEA) の roct1 発現細胞の取込みに対する阻害実験を行った結果、阻害定数 K_i はそれぞれ 393, 52.7, 15.9 μM と K_m に近い結果を得た。これにより、三つのビグアニド化合物はいずれも oct1 の基質であることが明かとなった。rOct1 は主に肝臓の血管側に発現し、ビグアニド化合物は roct1 により肝臓に積極的に取り込まれることが示唆された。またビグアニド投与により血中乳酸濃度の上昇は主に肝臓でのミトコンドリア呼吸鎖の阻害によるもので、roct1 を介する肝臓への取込みは乳酸アシドーシスとの関連も示唆された。しかし、in vivo 実験から得た腎固有クリアランス (CL_{int}) は metformin>buformin>phenformin の順であり、roct1 の輸送能力の指標である V_{max}/K_m 値は phenformin>buformin>metformin であり、腎固有クリアランスと逆でした。従って、roct1 以外のメカニズムがこれら化合物の腎排泄能力の違いを決定することが示唆された。

キーワード ビグアニド、乳酸アシドーシス、有機カチオントランスポーター (OCT)

【目的】

ビグアニドはインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) の経口治療薬として古くから使われてきたが、临床上乳酸アシドーシスなど重篤な副作用を引き起こすため、その使用は制限されている。しかし近年、metformin をはじめビグアニド剤の再評価が進まれている。ビグアニドはヒトにおいて腎排泄型であることが知られているが、ラットにおける動態は不明である。また乳酸アシドーシスの機序および腎排泄機構に関する情報もほとんど得られていない。本研究は各ビグアニド剤のラットにおける体内動態と乳酸値上昇作用の違いおよび腎排泄機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

【動物】SD ラット、雄性、8 週令、体重 250-280g

【Infusion】大腿静脈カニューレー、infusion for 4hr, 1.5 ml/250g rat/hr, inulin 20mg/kg/hr, mannitol 500 mg/kg/hr co-infusion

【HPLC 条件】Column: mBondapak (10 mm, 300×3.9 mm I.D.), mobile phase: 0.01 M phosphate buffer (pH6.5):acetonitrile=30:70, UV detection: 236 nm, flow rate: 1.0 ml/min

【乳酸値測定】ラット尾静脈から採血し、8%の HClO₄ で処理した後、乳酸測定キット (Sigma) で乳酸値を測定した。

【rOct1 発現細胞の作製】ラット oct1 (roct1) cDNA を RT-PCR 法により肝臓から cloning し、発現ベクター pcDNA3.1 に組み込み、CHO 細胞に transfection した。

【基質の定量】TEA は 14C-TEA を用い、取込み量をシンチレーションカンターで定量した。ビグアニド化合物は HPLC で定量した。

【結果および考察】Metformin は 25、50、100、175、250 mg/kg/hr、buformin は 2.5、5.0、12.5、25、50 mg/kg/hr、phenformin は 1.0、2.5、5.0、12.5、25 mg/kg/hr の dose において infusion 定常状態下経時的に採血し、血中乳酸値を測定した。各化合物は濃度依存的に乳酸値が上昇し、IC₅₀ はそれぞれ 118、9.5、2.5 μg/ml であった。また Metformin と buformin はそれぞれ 2.5、5.0、12.5、25、50mg/kg/hr、phenformin は 1.0、2.5、5.0、12.5、25mg/kg/hr の dose において infusion 定常状態下での各化合物の血中濃度、1 時間ごとに尿、胆汁排泄量を測定した。その結果、各化合物において非線形体内動態が示し、それぞれの最小 dose において尿排泄量は metformin 80.8%, buformin 72.3%, phenformin 25.9%であり、胆汁中の排泄は測定限度以下であった。この結果は今まで報告されたヒトにおける検討結果はほぼ一致である。また最小 dose における腎クリアランス (CL_{renal}) はそれぞれ 1497、1381、1078 ml/kg/hr であり、腎固有クリアランスはそれぞれ 2088、1752、642 ml/kg/hr であった。腎クリアランスは糸球体濾過率 (GFR) の指標であるイヌリンクリアランスの 520 ml/kg/hr よりはるかに高く、腎で能動的な排泄を受けることが分かった。ヒトにおいて metformin と cimetidine との併用により metformin 血中濃度が上昇すると報告されたので、そこでラットにおいても検討した。0.9 mg/kg/hr の infusion dose において metformin だけ投与時の CL_{renal} の 2780 ml/kg/hr に対し、cimetidine 50 mg/kg/hr の共投与下の CL_{renal} は 576 mg/kg/hr と約 1/5 に低下した。Cimetidine はラットにおいて有機アニオントランスポーター 3 (oat3) と有機カチオントランスポーター 1 (oct1) により輸送されると報告され、metformin は roct1 により輸送される可能性が示唆された。そこでラット肝臓から RT-PCR 法により roct1 をクローニングし、発現ベクター pcDNA3.1 に組み込んで chinese hamster ovary (CHO) 細胞に transfection した。rOct1 の発現は northern blot により確認し、取込み活性は oct ファミリーの典型基質である tetraethylammonium (TEA) の取込みにより確認した。速度論的解析により、K_m 値は 84 μM で今までの報告を大差はなかった。そこで roct1 発現細胞を用い、ビグアニド各化合物の取込みを行った。Metformin、buformin、

phenformin において K_m はそれぞれ 393、52.7、15.9 μM で、 V_{max} は 1424、294、152 pmol/min/mg protein であった。さらに TEA と同じトランスポーターによる輸送されるかを検討するため、各化合物の roct1 に対する TEA 取込みの阻害効果を検討した。 K_i 値はそれぞれ 513、46.1、5.20 μM と K_m 近い値であった。これで三つの化合物とも roct1 の基質であり、roct1 により細胞中に取り込まれることが明らかとなった。ビグアニドの投与により血中乳酸値の上昇は主に肝ミトコンドリアでの呼吸鎖の阻害により嫌気性産物の乳酸の蓄積によると近年報告されている。Oct ファミリーは肝臓において oct1 の発現が一番高く、roct1 の輸送能力を表す V_{max}/K_m 値はそれぞれ 3.62、5.59、9.55 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ で、phenformin>buformin>metformin の順である。この結果は乳酸値上昇の結果と一致しており、roct1 血管側からの能動的な輸送によりビグアニドは血中から肝臓に入って、呼吸鎖を阻害し乳酸アシドーシスを引き起こす可能性が示唆された。

しかし、roct1 V_{max}/K_m の順は腎固有クリアランスとの順が逆であり、ビグアニド化合物の腎での排泄機構は roct1 で完全に説明できなくなり、roct1 以外のメカニズムがこれら化合物の腎排泄能力の違いを決定することが示唆された。ラット腎臓では、roct1 だけでなく、roct2、roct3 も近位尿細管に発現し、カチオン性の内因性および外因性物質の腎排泄を司ると報告されており、しかも roct2 の発現量は roct1 より多く、roct2 and/or roct3 がビグアニド化合物の腎排泄に主に関与する可能性が考えられる。また、管腔側に roctn1 と roctn2 により分泌および再吸収を受ける可能性も否定できない。今後ラット腎スライス、遊離肝細胞を用いた取込み輸送実験、roct1 ノックアウトマウス、roct2 ノックアウトマウスおよび roct1 and roct2 ダブルノックアウトマウスの検討によりさらに検討を加え、ビグアニド系化合物の体内分布、排泄機構を明らかにし、さらに human OCT1 (hOCT1)、hOCT2、hOCT3 細胞発現系、ヒト遊離肝細胞、ヒト腎スライスなどの in vitro 実験系の検討により動物からヒトへと bridging し、新規経口糖尿病治療薬の開発に貢献したい。