

業務研修会（平成 12 年 10 月 21 日、名古屋）

Debra K. Gardner: “Bloodstream Infections in a Neonatal Intensive Care Unit: 12 Year’s Experience with an Antibiotic Control Program”（NICU における血行性感染症：抗生剤管理プログラムの 12 年間の経験）厚生省医薬安全総合研究事業特別講演（平成 12 年 10 月 24 日、名古屋）

Debra K. Gardner: “Development of a Clinical Pharmacy Practice in the Neonatal Intensive Care Unit”（新生児 ICU における臨床薬剤業務実践の発展）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師病棟業務研修会特別講演（平成 12 年 10 月 27 日、京都）

Karim A. Calis: “Providing Patient – Specific Drug Information”（個々の患者に応じた医薬品情報の提供）厚生省医薬安全総合研究事業学術講演会特別講演（平成 13 年 1 月 11 日、福岡）

Karim A. Calis: “Providing Patient – Specific Drug Information”（個々の患者に応じた医薬品情報の提供）厚生省医薬安全総合研究事業学術講演会特別講演（平成 13 年 1 月 12 日、長崎）

Karim A. Calis: “Providing Patient – Specific Drug Information”（個々の患者に応じた医薬品情報の提供）厚生省医薬安全総合研究事業学術講演会特別講演（平成 13 年 1 月 16 日、熊本）

Paula A. Thompson: “Advances in the Treatment of Chronic Heart Failure: Systolic Dysfunction”（慢性心不全の薬物療法における進歩：収縮機能不全について）厚生省医薬安全総合研究事業シンポジウム「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」特別講演（平成 13 年 1 月 28 日、名古屋）

Paula A. Thompson: “Chronic Heart Failure: Overview of Pathophysiology and Treatment”（慢性心不全：病態生理および治療法の概観）厚生省医薬安全総合研究事業病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 1 月 31 日、島根）

Paula A. Thompson: “Pharmacotherapy: Special Consideration in the Geriatric Patient”（高齢患者における薬剤治療上の注意点）厚生省医薬安全総合研究事業病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 2 月 9 日、岡山）

Gordon S. Sacks: “Drug Nutrient Interactions in Critically Ill Patients”（専門的ニュートリションサポートを受けている患者における薬と輸液の相互作用）厚生省医薬安全総合研究事業シンポジウム「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」特別講演（平成 13 年 1 月 28 日、名古屋）

Gordon S. Sacks: “Nutritional Management of Oncology Patients”（癌患者の栄養管理）厚生省医薬安全総合研究事業病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 2 月 2 日、筑波）

Gordon S. Sacks: “Nutritional Management of Oncology Patients”（癌患者の栄養管理）厚生省医

薬安全総合研究事業病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 2 月 6 日、千葉）

David M. DiPersio: “Pharmaceutical Care in the United States: Expanding Roles of the Pharmacist in Medical Practice”（アメリカにおけるファーマシューティカルケア：医療現場で広がっている薬剤師の役割）厚生省医薬安全総合研究事業学術講演会特別講演（平成 13 年 2 月 15 日、東京）

Shirley Reitz: “Clinical Practice Guidelines: The Pharmacist’s Role”（臨床業務ガイドライン：薬剤師の役割）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 2 月 19 日、名古屋）

Shirley Reitz: “Antimicrobial Switch Therapy in Community-Acquired Pneumonia”（市中肺炎の抗生物質スイッチ療法）厚生省医薬安全総合研究事業特別講演（平成 13 年 2 月 20 日、名古屋）

Shirley Reitz: “Clinical Practice Guidelines: The Pharmacist’s Role”（臨床業務ガイドライン：薬剤師の役割）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 2 月 23 日、京都）

Shirley Reitz: “Clinical Practice Guidelines: The Pharmacist’s Role”（臨床業務ガイドライン：薬剤師の役割）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師病棟業務指導研修会特別講演（平成 13 年 2 月 26 日、三重）

Barry L. Carter: “The Improve Study: How Do We Interpret the Results?（調査結果をいかに解釈し活用すべきか？）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師による患者ケア業務研修会特別講演（平成 13 年 3 月 2 日、札幌）

Barry L. Carter: “The Improve Study: How Do We Interpret the Results?（調査結果をいかに解釈し活用すべきか？）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師による患者ケア業務研修会特別講演（平成 13 年 3 月 8 日、秋田）

Barry L. Carter: “The Improve Study: How Do We Interpret the Results?（調査結果をいかに解釈し活用すべきか？）厚生省医薬安全総合研究事業薬剤師による患者ケア業務研修会特別講演（平成 13 年 3 月 9 日、仙台）

平成 10 年度

（鍋島 班）

野田幸裕、鍋島俊隆「薬物依存の形成メカニズム—遺伝子変異マウスを用いた薬理学的アプローチ」、第 3 回「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム（平成 10 年 10 月 30 日、名古屋）

（宮崎 班）

宮崎勝巳「薬物の生体内動態における構造相関（第 46 報）-薬物の消化管吸収に及ぼす経腸栄養

剤の影響」、第 118 回日本薬学会 (平成 10 年 4 月、京都)

宮崎勝巳「薬物の消化管吸収における経腸栄養剤の影響」、第 8 回日本病院薬学会 (平成 10 年 9 月、横浜)

(岩本 班)

西村信弘、岩本喜久生、他：第 13 回国際薬理学会議 (平成 10 年 7 月)

直良浩司、岩本喜久生、他：第 13 回国際薬理学会議 (平成 10 年 7 月)

一川暢宏、岩本喜久生、他：第 58 回世界薬学会議 (平成 10 年 9 月)

西村信弘、岩本喜久生、他：日本薬学会第 119 年会 (平成 11 年 3 月)

直良浩司、岩本喜久生、他：日本薬学会第 119 年会 (平成 10 年 7 月)

(水柿 班)

水柿道直「GC/MS によるプロスタグランジン代謝体の微量定量とその臨床応用」、第 46 回質量分析総合検討会 (シンポジウム) (平成 10 年 5 月、群馬)

水柿道直「プロスタノイドの超微量定量とその医療への展開」、分析化学の明日を考える会 (招待講演) (平成 10 年 6 月、東京)

水柿道直 特別講演「脂質と健康」
市民講演会：石巻薬剤師会 (平成 10 年 9 月、石巻市)

菱沼隆則、工藤義城、古関優子、山崎、研、水柿道直「Thromboxane / prostacyclin バランス及び血漿脂肪酸組成等に及ぼす DHA 含有カプセル剤摂取の影響」、日本脂質栄養学会 第 7 回大会 (平成 10 年 9 月、仙台)

横尾友隆、山崎、研、富岡佳久、菱沼隆則、水柿道直「脂肪酸によるペルオキシソーム増殖薬活化受容体の活性化と医薬品相互作用」、日本脂質栄養学会 第 7 回大会 (平成 10 年 9 月、仙台)

山崎、研、小原恵美子、菱沼隆則、水柿道直「培養細胞のプロスタノイド産生に及ぼす EPA 及び DHA の効果」、日本脂質栄養学会 第 7 回大会 (平成 10 年 9 月、仙台)

平成 11 年度

(鍋島 班)

1) 鍋島俊隆、野田幸裕、間宮隆吉、宮本嘉明、山田清文、尾池雄一、山村研一 CBP 変異マウスを用いたモルヒネ依存の形成メカニズムの解析、第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会、北海道 (1999)。

2) Ren, X., Mamiya, T., Noda, Y., Oike, Y., Yamamura, K. and Nabeshima, T.: CBP knockout mice showed a reduced morphine withdrawal syndrome and altered gene expressions. Soc.

Neurosci. Abst., 25, 36. (1999).

(宮崎 班)

小林道也、藤本道夫、西村幸穂、井上 悟、井関 健、宮崎勝巳「薬物の体内動態における構造相関 (第 48 報) -多剤排出蛋白を介した PSP の腎排泄-」、第 119 回日本薬学会 (平成 11 年 3 月、徳島)

小林道也、藤本道夫、西村幸穂、井上 悟、井関 健、宮崎勝巳「LEC ラット腎における多剤排出蛋白質欠損の可能性」、第 9 回日本 LEC ラット研究大会 (平成 11 年 6 月、札幌)

(岩本 班)

西村信弘、岩本喜久生、他：第 13 回国際薬理学会議 (平成 10 年 7 月)

直良浩司、岩本喜久生、他：第 13 回国際薬理学会議 (平成 10 年 7 月)

一川暢宏、岩本喜久生、他：第 58 回世界薬学会議 (平成 10 年 9 月)

西村信弘、岩本喜久生、他：日本薬学会第 119 年会 (平成 11 年 3 月)

直良浩司、岩本喜久生、他：日本薬学会第 119 年会 (平成 10 年 7 月)

(大石 班)

武田百合、古田和歌子、千堂年昭、片岡泰文、大石了三：造影剤による肺障害発現における一酸化窒素の役割。日本薬学会 119 年会、徳島、1999 年 3 月

富永宏治、古田和歌子、千堂年昭、片岡泰文、大石了三：更年期モデル動物では造影剤による肺障害が増悪する。日本薬学会 120 年会、岐阜、2000 年 3 月

(水柿 班)

Yamada, M., Kohagura, K., Ito, O., Abe, E., Omata, K., Ito, S., Suzuki, N., Nakamura, H., Hishinuma, T. and Mizugaki, M.: Analysis of dihydroeicosatrienoic acids by electrospray ionization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry., Experimental Biology '99, NY, U.S.A., Apr. 17-21, 1999.

鈴木直人、菱沼隆則、水柿道直：LC/MS/MS を用いたヒト尿中ロイコトリエン E4 の定量、第 47 回質量分析総合検討会検討会、大阪、1999 年 5 月 12 日-14 日

Hishinuma, T., Suzuki, N., Nakamura, H., Omata, K., Abe, E., Ito, S. and Mizugaki, M.: Analysis of epoxyeicosatrienoic acids by electrospray ionization-liquid chromatography tandem mass spectrometry., 11th International Conference on cytochrome P450. Sendai, Japan, Aug. 29-Sep. 2, 1999.

菱沼隆則、塚本宏樹、山崎研、鈴木健一、水柿道直：糖尿病患者における 2 型及び 3 型トロンボキサン産生比の検討、日本脂質栄養学会第 8 回

大会, 福山, 1999年9月9日.

村井ユリ子、鈴木直人、菱沼隆則、水柿道直：
「LC/MS/MS法による8-epi-Prostaglandin F2alpha
微量定量法の確立とヒト試料への応用」第38回
日本薬学会東北支部大会（1999年10月、仙台）

山崎 研、小原恵美子、菱沼隆則、水柿道直：
「培養細胞のプロスタノイド産性に及ぼすEPA
及びDHAの効果」日本脂質栄養学会第7大会
（1998年9月、仙台）

Hishinuma, T., Suzuki, N. and Mizugaki, M.：
Microdetermination of leukotriene using LC/MS and
its clinical application. Midyear Clinical Meeting,
ASHP, Orlandl, USA. Dec, 1999.

(谷川原 班)

Y. Tanigawara: Population PK/PD and Formulation
Design, Strategies for Optimizing Oral Drug Delivery:
Scientific to Regulatory Approaches, Kobe, April
1999.

Y. Tanigawara: Population Pharmacokinetic and
Pharmacodynamic Approach for Global Drug
Development, Formulation Optimization and Clinical
Pharmacology, Tokyo, April 1999.

Y. Tanigawara: The Role of P-glycoprotein in Drug
Disposition, 6th International Congress of Therapeutic
Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Cairns,
September 1999.

谷川原祐介：Docetaxel の体内動態と臨床薬理，
第37回日本癌治療学会，岐阜，1999年10月。

谷川原祐介：ブリッジング評価における統計学的
考察—PK/PDを中心に—，第7回計量生物セ
ミナー，1999年10月。

平成12年度

(鍋島 班)

(1) 野田幸裕，任修海，亀井浩行，間宮隆吉，鍋島
俊隆：Morphine の依存形成に対する
dehydroepiandrosterone sulfate の抑制作用：脳内シ
グナル伝達系の関与、第30回日本神経精神薬理
学会年会（仙台，2000.10.26-27）

(2) Noda, Y., Mamiya, T., Nagai, T., Ren, X. and
Nabeshima, T.: The mechanisms of morphine
dependence and its withdrawal syndrome: study in
mutant mice. The 9th International Catecholamine
Symposium（京都，2001.3.31-4.5）

(宮崎 班)

？

(岩本 班)

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：
甘草含有漢方エキス製剤によるトルブタミドの
溶出阻害、日本薬学会第120年会（平成12年3
月）

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：
トルブタミドの消化管吸収機構；Caco-2細胞を用

いた解析、第15回日本薬物動態学会年会（平成
12年10月）

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：
小柴胡湯によるトルブタミドのCaco-2細胞単層
膜透過性の亢進、第39回日本薬学会・日本病院
薬剤師会中国四国支部学術大会（平成12年10
月）

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：
Caco-2細胞におけるトルブタミド輸送機構およ
び小柴胡湯の影響、日本薬学会第119年会（平成
11年3月）

直良浩司、岩本喜久生、他：日本薬学会第121
年会（平成13年3月）
(大石 班)

(1) 古田和歌子、中川慎介、住村智子、千堂年昭、
片岡泰文、大石了三：造影剤による血管内皮細胞
透過性亢進における一酸化窒素の役割。日本薬学
会121年会、札幌、2000年3月

(水柿 班)

鈴木直人、菱沼隆則、水柿道直：LC/MS-MSを用
いたヒト尿中12-HETEの定量とその性差。日本
薬学会第120年会。岐阜，2000年3月28（火）。31
（金）

2. 中村浩規，菱沼隆則，澤井高志，水柿道直：リ
ウマチ患者におけるプロスタノイド産生量に対
する薬剤の影響。第8回クリニカルファーマシー
シンポジウム。仙台，2000年7月1日（土）。2日
（日）

3. 菱沼隆則，Bruce R. Canaday，水柿道直。：
Pharmaceutical care and practice in North Carolina,
USA., 第8回クリニカルファーマシーシンポジ
ウム。仙台，2000年7月1日（土）。2日（日）

4. Hishinuma T., Suzuki N., Aiba S., Tagami H.,
Mizugaki M. Urinary Leukotriene E4 Excretion in
Patients with Atopic Dermatitis.
60th International Congress of FIP., Vienna, Austria,
August 26 - 31, 2000

5.水柿道直，菱沼隆則：3型プロスタノイドの超
微量定量法の確立とその臨床応用 日本脂質栄
養学会第9回大会。（日本脂質栄養学会ランズ賞学
術賞受賞講演）東京，2000年9月8日（金）。9
日（土）

6. 菱沼隆則，鈴木直人，塚本宏樹，水柿道直：気
管支喘息患者におけるロイコトリエン及びトロ
ンボキサン産生と病態との関連。日本脂質栄養
学会第9回大会。東京，2000年9月8日（金）。9
日（土）。

7. 菱沼隆則，鈴木直人，塚本宏樹，水柿道直：ト
ロンボキサン代謝物のLC/MS-MSによる定量法
の開発と臨床応用，第10回日本病院薬学会年会，
京都，2000年10月7日（土）。8日（日）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

(1) 発明の名称：薬物依存形成抑制剤

発明者：鍋島俊隆、野田幸裕

特許出願人：鍋島俊隆、明治製菓株式会社

特許出願日：平成8年2月14日

整理番号：98465（特願平8-26772）

(2) 発明の名称：麻薬性鎮痛剤の依存・耐性形成抑制剤

発明者：鍋島俊隆、吉井光信、塩谷正

特許出願人：鍋島俊隆、第一製薬株式会社

特許出願日：平成8年8月6日

特許番号：6107330

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

モルヒネ耐性および依存形成に関する研究

主任研究者 鍋島 俊隆 名古屋大学医療薬学・医学部附属病院薬剤部長

研究要旨：モルヒネの適正使用を促進するために、モルヒネに対する依存形成のメカニズムの解明および薬物依存の予防・治療薬の開発に関する基礎研究を行った。モルヒネを連続投与したマウスにオピオイド受容体アンタゴニストのナロキソンを投与すると退薬症状が認められ、モルヒネに対する依存形成が示唆された。カテコールアミンの合成酵素である tyrosine 水酸化酵素(TH)遺伝子変異マウスおよび転写調節因子 cyclic AMP response element binding protein (CREB) のコアクチベーター CREB 結合タンパク(CBP)遺伝子変異マウスでは、これらの退薬症状は著明に減弱した。従って、モルヒネによる薬物依存に脳内カテコールアミンおよび CREB/CBP を介した転写調節が重要な役割を果たしていることが示唆された。Phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram およびニューロステロイドの一種であるデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩(DHEAS)は、モルヒネの鎮痛効果に影響及ぼさなかったが、モルヒネの耐性および依存形成を抑制した。以上の結果より、モルヒネの依存の予防薬として phosphodiesterase IV 阻害薬と DHEAS の可能性が示唆された。

A. 研究目的

モルヒネはがん性疼痛の緩和療法に用いられる麻薬性鎮痛薬であるが、ヒトや動物に連用すると依存が形成されることが知られている。臨床においてモルヒネの連用による依存形成を心配して、がん性疼痛に対してモルヒネの使用を躊躇する場合がある。この場合、患者は激しい痛みに苦しむこととなり、QOL は著しく低下する。したがって、モルヒネによる依存形成のメカニズムの解明、あるいは薬物依存の予防・治療薬の開発は患者の QOL の改善や医薬品の適正使用に大いに貢献するものと考えられる。

本研究では、下記3項目について検討した。

(1) モルヒネ依存におけるカテコールアミンの合成酵素である tyrosine 水酸化酵素(TH)および転写調節因子 cyclic AMP response element binding protein (CREB) のコアクチベーター CREB 結合タンパク(CBP)の役割を解明するために、これらをコードする遺伝子変異マウスを用いて、モルヒネの依存形成能が変化するかどうか検討した。

(2) モルヒネ依存における cyclic AMP の役割を解明するために、モルヒネ依存に対する cyclic AMP 特異的 phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram の作用を検討した。

(3) モルヒネの鎮痛効果、耐性および依存形成に対するニューロステロイドの一種であるデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩(DHEAS)の効果とそのメカニズムについて検討した。

B. 研究成果のまとめ

(1) 遺伝子変異マウスを用いたモルヒネ依存に関する研究（平成 10 年度）

モルヒネを連続投与した野生型マウスにナロキソンを投与すると、投与直後より逃避躍動行動、前肢振戦および立ち上がり行動が顕著に発現した。一方、TH 遺伝子変異マウスおよび CBP 遺伝子変異マウスではナロキソン誘発逃避躍動行動、前肢振戦の発現回数が野生種と比較して有意に減少した(Fig. 1)。したがって、モルヒネの依存形成過程には、脳内カテコールアミンおよび CREB/CBP 系が重要な役割を果たしていることが示唆された。

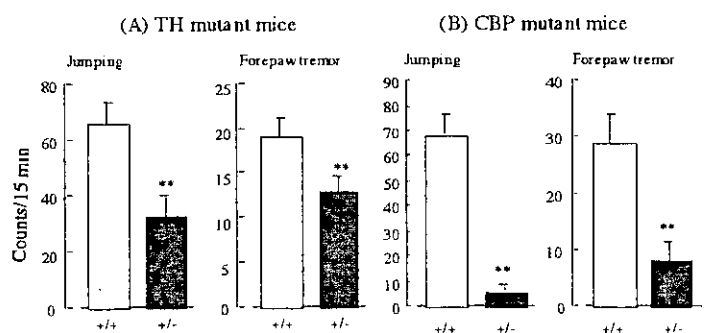


Fig 1 Naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms in TH mutant (A) and CBP mutant mice (B) **P < 0.01 vs wild-type

(2) モルヒネの鎮痛効果、耐性および依存形成に対する Phosphodiesterase IV 阻害薬 rolipram の効果（平成 11 年度）

モルヒネは単回投与後には μ オピオイド受容

体と共役した Gi/o タンパクを介して adenylate cyclase(AC)を抑制し、脳内 cyclic AMP 量は減少する。一方、モルヒネを連続投与したマウスにナロキソンを投与すると、逃避躍動行動などの禁断症状が発現し、脳内 cyclic AMP 量は著明に増加する。Phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram をモルヒネと併用投与すると、モルヒネ単回投与後の cyclic AMP の低下は消失したが、鎮痛効果は変化しなかった。モルヒネ連続投与により誘発される耐性発現は rolipram の併用投与により減弱した。さらに、ナロキソン誘発モルヒネ退薬症状の発現と脳内 cyclic AMP の増加および c-FOS 蛋白の発現は、rolipram の併用投与により有意に減少した (Fig. 2)。以上の結果より、モルヒネの耐性および依存形成過程には、cyclic AMP を介したシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることが示唆された。

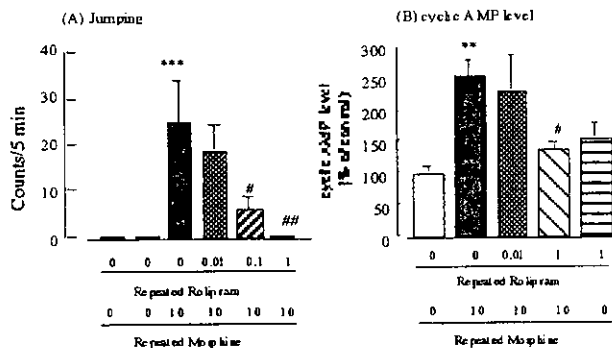


Fig 2 Effect of rolipram on naloxone-precipitated morphine withdrawal symptom (A) and increase in cyclic AMP level in the brain (B) **P<0.01, ***P<0.001 vs wild-type #P<0.05 ##P<0.01 vs morphine alone

(3) モルヒネの鎮痛効果、耐性および依存形成に対する DHEAS の効果 (平成 12 年度)

DHEAS はモルヒネの鎮痛効果には影響しなかったが、連続投与による耐性形成を抑制した。このモルヒネ耐性抑制作用は、シグマ₁受容体アンタゴニストである NE-100 によって拮抗され、DHEAS はシグマ₁受容体を介してモルヒネの依存形成を抑制することが示唆された。さらに、DHEAS はナロキソン誘発性のモルヒネ退薬症状を抑制し、c-fos mRNA および皮質のリン酸化 ERK2 の増加をほぼ完全に抑制した (Fig. 3)。したがって、DHEAS はシグマ₁受容体を介してモルヒネの耐性および依存形成に抑制的に作用す

ることが示唆された。DHEAS の依存抑制作用の詳細なメカニズムは不明であるが、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)シグナル伝達系が関与していることが示唆された。

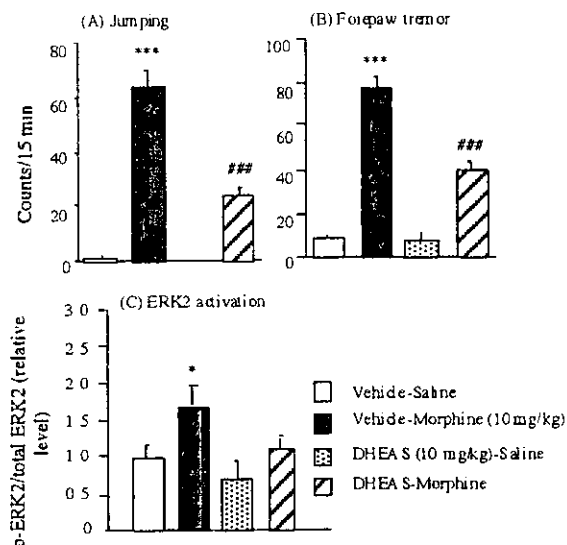


Fig 3 Effect of DHEAS on naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms (A and B) and activation of ERK2 in mice (C) *P<0.05, ***P<0.001 vs vehicle-saline ##P<0.001 vs vehicle-morphine

C. 結論

本研究により次ぎのことが明らかとなった。

- (1) モルヒネの依存形成過程には、脳内カテコラミンおよび CREB/CBP 系が重要な役割を果たしている。
- (2) モルヒネの耐性および依存形成過程には cyclic AMP を介したシグナル伝達系が重要な役割を果たしている。
- (3) ニューロステロイド DHEAS はシグマ₁受容体を介してモルヒネの耐性および依存形成に抑制的に作用する。
- (4) Phosphodiesterase IV 阻害薬 rolipram および DHEAS はモルヒネの耐性および依存の予防薬として可能性がある。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Noda, Y., Miyamoto, Y., Mamiya, T., Kamei, H., Furukawa, H., and Nabeshima, T.: Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly J Pharmacol. Exp. Ther., 286, 44-51(1998).

- (2) Noda, Y., Mamiya, T., Nabeshima, T., Nisbi, M., Higashioka, M. and Takeshima, H.: Loss of antinociception induced by naloxone benzoylhydrazone in nociceptin receptor-knockout mice. *J. Biol. Chem.*, 273, 18047-18051(1998)
- (3) Yamamura, K., Ohta S., Yano, K., Yotsuyanagi, Y., Okamura, T. and Nabeshima, T.: Oral mucosal adhesive film containing local anesthetics: in vitro and clinical evaluation. *J. Biomed Mater Res.*, 43, 313-317(1998)
- (4) Nishii, K., Matsushita, N., Sawada, H., Sano H., Noda, Y., Mamiya T., Nabeshima, T., Nagatsu, I., Hata, T., Kiuchi K., Yoshizato, H., Nakashima, K., Nagatsu, T. and Kobayashi, K.: Motor and learning dysfunction during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission. *J. Neurosci. Res.*, 54, 450-464(1998)
- (5) Itoh, A., Noda, Y., Mamiya, T., Hasegawa, T. and Nabeshima, T.: A therapeutic strategy to prevent morphine dependence and tolerance by coadministration of cAMP-related reagents with morphine. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 20, 619-625(1998)
- (6) Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K. and Yamamura K.: Truncated CBP protein leads to classical rubinstein-taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Gen.*, 8, 387-396(1999)
- (7) Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K. and Yamamura, K.: Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: Implication for a dominant negative mechanism. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 387-396 (1999)
- (8) Kitaichi, K., Noda, Y., Miyamoto, Y., Numaguchi, A., Osawa, H., Hasegawa, T., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Involvement of the serotonergic neuronal system in phencyclidine-induced place aversion in rats. *Behav. Brain Res.*, 103, 105-111 (1999)
- (9) Nakao, M., Ogura, Y., Hasegawa, T., Satake, S., Itoh I., Yoshimine, N., Iguchi, A., Takagi, K., Nakane, S., Ishizuya, O and Nabeshima, T.: Usefulness of weight-dispersing mattresses in preventing pressure sores at the sacral bone in elderly patients. *J. Appl. Therap. Res.*, 2, 177-185 (1999)
- (10) Yamada, K., Komori, Y., Tanaka, T., Senzaki, K., Nikai T., Sugihara H., Kameyama T. and Nabeshima, T.: Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats *Neuroscience*, 88, 281-294 (1999)
- (11) Iida, R., Saito, K., Yamada, K., Basile, A., Sckikawa K., Takemura, M., Fujii, H., Wada H., Seishima M. and Nabeshima, T.: Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5 infected mice with a targeted deletion of the TNF- α gene. *FASEB. J.*, 14, 1023-1031 (2000)
- (12) Noda, Y., Kamei, H., Kamei, Y., Nagai T., Nishida, M. and Nabeshima, T.: Neurosteroids ameliorate conditioned fear stress: An association with sigma₁ receptors. *Neuropsychopharmacology*, 23, 276-284 (2000)
- (13) Noda, Y., Kamei, H., Mamiya, T., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Repeated phencyclidine treatment induces negative symptom-like behavior in forced swimming test in mice: Imbalance of prefrontal serotonergic and dopaminergic functions. *Neuropsychopharmacology*, 23, 375-387 (2000)
- (14) Hamdy, M.H., Mamiya, T., Noda, Y., Sayed, M., Assi, A-A, Gomaa, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: A selective phosphodiesterase IV inhibitor, rolipram blocks both withdrawal behavioral manifestations, and c-Fos protein expression in morphine dependent mice. *Behav. Brain Res.*, 118, 85-93 (2001)
- (15) Mamiya, T., Noda, Y., Ren, X., Hamdy, M., Furukawa, S., Kameyama, T., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: Prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, 132, 1111-1117 (2001)
- (16) Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M. and Nabeshima, T.: Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor ϵ_1 subunit. *J. Neurosci.*, 21, 750-757 (2001)
- (17) Noda, A., Noda, Y., Ichihara, K., Mamiya, T., Nagai, T., Sugiura, S., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Phencyclidine impairs latent learning in mice: interaction between glutamatergic systems and sigma₁ receptors. *Neuropsychopharmacology*, 24, 451-460 (2001)
- (18) Mori, A., Noda, Y., Mamiya, T., Miyamoto, Y., Nakajima, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Phencyclidine-induced discriminative stimulus is mediated via phencyclidine binding sites on the N-

methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex, not via signal receptors. Behav. Brain Res., 119, 33-40 (2001)

2. 学会発表

(1) 野田幸裕、鍋島俊隆「薬物依存の形成メカニズムー遺伝子変異マウスを用いた薬理的アプローチ」、第3回「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム(平成10年10月30日、名古屋)

(2) 鍋島俊隆、野田幸裕、間宮隆吉、宮本嘉明、山田清文、尾池雄一、山村研一「CBP変異マウスを用いたモルヒネ依存の形成メカニズムの解析」第26回日本トキシコロジー学会学術年会、北海道(1999).

(3) Ren, X., Mamiya, T., Noda, Y., Oike, Y., Yamamura K. and Nabeshima, T. CBP knockout mice showed reduced morphine withdrawal syndrome and altered gene expressions. Soc. Neurosci. Abst., 25, 36. (1999).

(4) 野田幸裕、任修海、亀井浩行、間宮隆吉、鍋島俊隆：Morphineの依存形成に対するdehydroepiandrosterone sulfateの抑制作用：脳内シグナル伝達系の関与、第30回日本神経精神薬理学会年会(仙台, 2000.10.26-27)

(5) Noda, Y., Mamiya, T., Nagai, T. Ren, X. and Nabeshima, T.: The mechanisms of morphine dependence and its withdrawal syndrome: study in mutant mice. The 9th International Catecholamine Symposium (京都, 2001. 3.31-4.5)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

(1) 発明の名称：薬物依存形成抑制剤

発明者：鍋島俊隆、野田幸裕

特許出願人：鍋島俊隆、明治製菓株式会社

特許出願日：平成8年2月14日

整理番号：98465(特願平8-26772)

(2) 発明の名称：麻薬性鎮痛剤の依存・耐性形成抑制剤

発明者：鍋島俊隆、吉井光信、塩谷正

特許出願人：鍋島俊隆、第一製薬株式会社

特許出願日：平成8年08月06日

特許番号：6107330

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

（分担）総合研究報告書

「薬物の溶解性と消化管内 pH 変動を考慮した薬物吸収予測システムの構築」

・ 消化管吸収率の予測と薬物相互作用、吸収促進等の予測の評価。

分担研究者 宮崎 勝巳 北海道大学医学部附属病院 教授・薬剤部長

研究要旨

胃内から小腸へ移行するまでの消化管内 pH 変動を考慮した薬物の吸収予測システムを確立した。次いで、この装置を使用することにより、平成 10 年度の研究で認められた脂溶性薬物の吸収抑制効果を予測することが可能であった。

また、消化管内での薬物相互作用をも予測することが可能であった。このことは、ヒト腎培養細胞を本システムに組み込むことを検討することにより、平成 11 年度の本研究で明らかにした腎における薬物相互作用をも予測できうることを示唆する結果であった。

A. 研究目的

経口投与された薬物は胃内において強酸条件 (PH1)、次いで小腸において弱酸/中性条件 (pH6.8) という急激な pH 変化にさらされる。このため難溶性薬物（固体状態）や強酸状態で分解する薬物あるいは pH の急激な変動に伴い溶解度が著しく低下する薬物等の吸収性については、これまでの実験系 (*in situ* 還流法, Caco-2 膜透過法等) で評価することはできない。このため、本研究では消化管内の pH 変動を考慮した *in vitro* 系の薬物吸収評価法を確立し、様々な薬物（難溶性薬物、輸送担体を介する薬物、新規化合物、特殊製剤）を用いて本実験系の適用範囲ならびに限界について考察した。さらに、2 種以上の薬剤を同時に併用する際の薬物相互作用が臨床上問題となっているが、本実験系でこれらの現象を再現できるか否かについても検討した。

B. 研究方法

胃から溶出した薬物が腸へ移行して吸収され

るモデルを再現するため、図 1 に示した装置を考案し作成した。チャンバーは WPI 社製の mini perfusion chamber (Milli-12) を用い、溶出槽、pH 調整槽はガラスバイアルを加工して作製した。胃内の pH を想定した薬物溶出液は局方第一液に準拠し、薬物溶出液の pH を 6.0 に調整する pH 調整液、およびアクセプター側の灌流液の組成は Caco-2 透過実験時に緊用される緩衝液を用いた。また、ドナー側からの流出率、ならびに Caco-2 透過率は、それぞれ 5 分おきにサンプリングして測定することとした。

用いた薬物は易溶性薬物として、カフェイン、セフジニル、シメチジン、エノキサシン、レボフロキサシン、メトプロロール、オザグレル、ラニチジン、リトドリン、テオフィリンを、また難溶性薬物としてはアルベンダゾールを、さらに脂肪（イントラリボス）による吸収促進効果の検討薬物には、グリセオフルビン、ナプロキセン、ブランドカストを用いた。

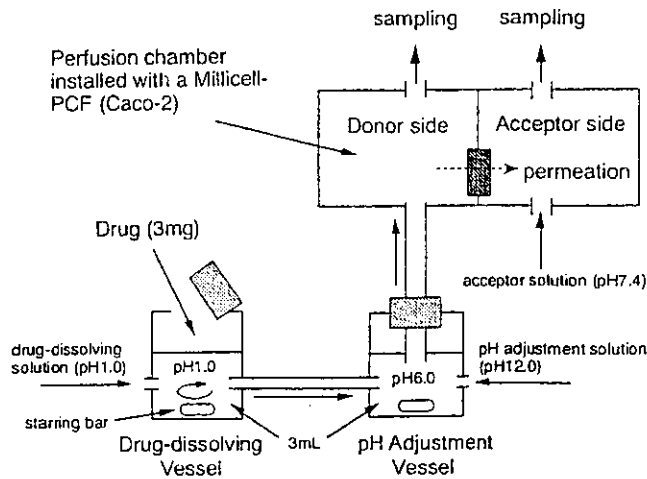


図1 pH変動を考慮した消化管吸収予測装置

新規特殊製剤はアルベンダゾールの固体分散体を調製し使用した。その他使用した薬物は、各実験の項に示した。薬物は全て HPLC にて定量した。

C. 研究結果

1. 易溶性薬物の Caco-2 透過率とヒトにおける吸収率との相関

図1の装置を用い、臨床で使用されている易溶性薬物の Caco-2 透過率を調べた。なお、ヒトにおける吸収率は文献値から引用した。その結果、図2に示したように薬物の透過率と吸収率の間には比較的良い相関が見られた。すなわち、Caco-2 透過率が 0.1%以上ではヒトの体内で薬物がほぼ完全に吸収され、また透過率が 0.01%の間においては吸収率と良好な直線関係が得られた (図2右)。

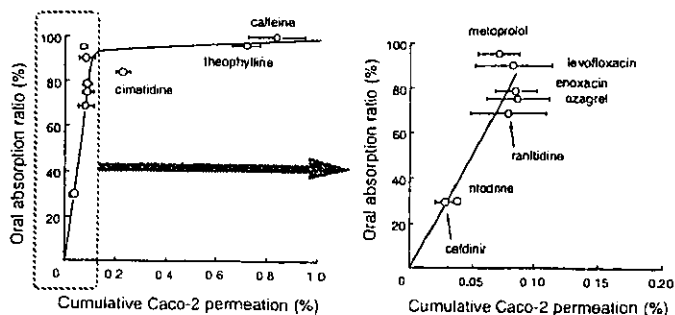


図2 Caco-2 透過率とヒトの吸収性との相関

これらの結果から、今回構築した装置を用いる

ことにより易溶性薬物の消化管吸収を予測することが十分可能であることが示された。

2. 難溶性薬物の本実験系への適用

難溶性の塩基性薬物アルベンダゾールをヒトに経口投与すると、胃内では速かに溶解するが十二指腸に移行した際に析出し、これが吸収率の低下と変動を招く要因であることが知られている。本装置を用いて検討したところ、6例中の5例は吸収率も低く、また変動が著しかった。このことは、ヒトにおける吸収挙動をよく反映することを示している。

3. エスカゾール錠ならびに固体分散体制剤との比較

アルベンダゾールを製剤化した市販エスカゾール錠とアルベンダゾール原末の膜透過率を比較した。その結果、エスカゾール錠は様々な添加物が加わっているものの、消化管吸収を増加させていないことが示唆された。

一方、当研究室ではすでに、アルベンダゾールの固体分散体制剤を作成してウサギに投与した場合、溶解度の増加に基づく消化管吸収性の改善が認められることを報告している。そこで、アルベンダゾールの固体分散体制剤を用い、本実験系が製剤的改良を施したときの吸収率の改善を予測可能であるか否かを検討した。対照として物理的混合物を使用した。その結果、固体分散体制剤はドナー側へのアルベンダゾールの溶出率を著しく増加させ、それに伴い Caco-2 透過率の上昇ならびに変動係数の減少が見られた。この結果は、ウサギを用いた *in vivo* における結果と一致するものであった。

4. 新規化合物の吸収性の評価

すでに市販されているものの消化管吸収に関する詳しい知見が公表されていない ONO-1078

(一般名：プラナルカスト)の消化管吸収率を予測し、本実験系が未知の新規化合物の吸収性を評価しうるか否かを検討した。その結果、後日入手した ONO-1078 のヒトにおける吸収率に関する情報（吸収率は約 13%）と一致した。本実験系は新規化合物のヒトにおける吸収率を十分に推測できることが示唆された。

5. 輸送担体を介して吸収される薬物についての検討

これまでに使用した薬物はいずれも受動拡散によって吸収されるものであり、担体を介して能動輸送される、 β -ラクタム系抗生物質（セファレキシン、セフチブテン）を本実験系に適用し、担体輸送される薬物の吸収性評価の可否について検討した。その結果、セファレキシンの吸収率は低く見積もられる結果となり、また、セフチブテンは若干低く見積もられた。したがって輸送担体を介して吸収される薬物の吸収性評価は、今回構築した実験系および実験条件では困難であると考えられる。今後は輸送担体の K_m 値と Caco-2 表面の薬物の経時的な濃度に関する因子である流速の検討などが必要であると思われる。

6. 消化管における薬物相互作用の評価

1) 制酸剤併用によるニューキノロン系薬物の吸収率低下

レボフロキサシンと金属カオチン含有制酸剤であるアルミゲルとを併用した場合、レボフロキサシンはアルミゲルに吸着し、相対的バイオアベイラビリティは約 50%にまで低下することが報告されている。したがって、ここではレボフロキサシンと乾燥アルミゲルを用いて透過率の変化を調べた。その結果、15mg 併用群は非添加群と比べて 27%の減少が認められた。

2) 鉄製剤の併用によるセフジニルの吸収率の低下

セフジニルは、鉄製剤と併用した場合、消化管内でキレートを形成し、セフジニルの吸収が著しく低下することが知られている。一方、その他の β -ラクタム系抗生物質では、鉄製剤併用による吸収率の低下は現在までに報告されていない。そこでセフジニルならびにセファレキシンを用いて、鉄製剤を同時に薬物溶出槽に添加したときの Caco-2 透過率の変化について検討した。その結果セフジニル 3 mg と同時に硫酸第一鉄アンモニウム 9 mg あるいは 15mg を薬物溶出槽に添加したときの、セフジニルの Caco-2 透過率は減少し、15mg 添加群では約 80%の減少が観察された（図 3）。次にセファレキシンを用いて同様の検討を行った結果、セフジニルで観察されたような Caco-2 透過率の低下は全く見られなかった。これらの結果より、本吸収予測システムは消化管における相互作用による吸収の低下を予測できることが示唆された。

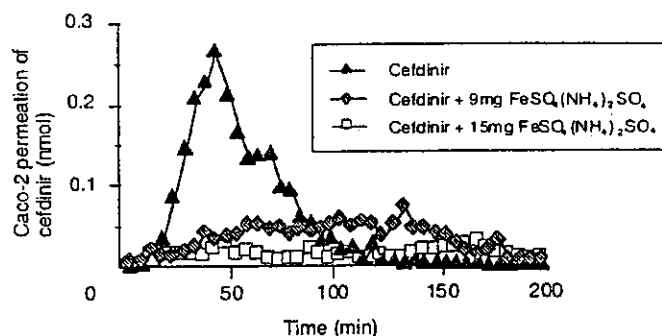


図 3 鉄製剤によるセフジニルの吸収低下

7. 脂肪による脂溶性薬物の吸収促進

脂溶性に富む食事摂取によって吸収促進が報告されているグリセオフルビン、ナプロキセン、プラナルカストは、本吸収予測システムにおいて脂肪（イントラリボス）の添加によって Caco-2 透過率が増大した。したがって、高脂肪食による吸収促進を予測することが可能であった。

D. 考察

本厚生科学研究費補助金によって、著者らは平成 10 年度には、薬物の吸収性変化に及ぼす経腸

栄養剤の影響を検討した。その結果脂肪を含む栄養剤は脂溶性薬物の吸収を促進あるいは抑制することを見いだした。現在、ヒトにおける薬物の吸収性の評価には様々な方法が用いられている。しかしながら、ヒトと動物間の種差の問題、消化管内 pH 変動に伴う溶解性の変動、あるいは消化管内での溶解性の変動に基づく吸収性の変化など、多くの問題点をクリアした簡便な消化管吸収の評価系は確立されていない。今回新たに開発した方法は、易溶性薬物、難溶性薬物、吸収性が未知であった薬物、さらには吸収性を改良した特殊製剤において、十分にその吸収性を予測することが可能であった。さらに平成10年度の研究において認められた難溶性、脂溶性薬物の吸収性の変動を本システムによって予測可能であることが示唆された意義は大きいと言える。

著者らはさらに平成11年度の本研究においては、消化管と同じ性質を持つと思われる腎近位尿管細管刷子縁膜の透過性における薬物相互作用について検討を行った。ウルツ病治療薬のトリエンチンの膜透過には特殊輸送担体が存在すること、およびこの輸送が併用薬（70ピト、アセタゾールアミド）により増大することを見いだした。すなわち、トリエンチンの膜透過（再吸収）が抑制されることが認められた。今後、本年度の研究によって確立した吸収予測システムのチャンパーに腎培養細胞を用いることによって腎における膜透過の相互作用が予測可能か否かを確認することは薬物の適正使用の観点から重要となると思われる。

本吸収予測システムに適応可能なヒト腎培養細胞の検討には多くの実験的検証が必要なことから、本年度の研究においては、消化管内におけるヒトでの薬物相互作用について検討した。その結果臨床的に認められている相互作用例を再現することが可能であった。したがって、薬物相互作用等の医薬品適正使用の評価系として極めて

有用な予測システムであることが強く示唆された。

E. 結論

1. 経腸栄養剤の脂肪成分に特に強い親和性を有する薬物の消化管吸収は抑制されることが明らかとなった（平成10年度研究）
2. ウルツ病治療薬トリエンチンは腎尿管に存在する分泌輸送担体に認識されることを見いだした。さらにトリエンチンの尿中排泄は70ピト、アセタゾールアミドとの相互作用によって抑制されることを明らかにした（平成11年度研究）
3. pH変動を考慮した薬物吸収評価系を構築した。本実験系は易溶性薬物、脂溶性薬物のヒトにおける吸収性を予測できた。（平成12年度研究）
4. 本予測システムは消化管吸収における相互作用を予測できた。（平成12年度研究）
5. 本予測システムは平成10年度研究の結果を再現することが可能であった。（平成12年度研究）

F. 研究発表

1. 論文発表

1) N. Kohri, Y. Yamayoshi, K. Iseki, N. Sato, S. Todo, and K. Miyazaki, Effect of gastric pH on the bioavailability of albendazole in rabbits: Pharm. Pharmacol. Commun.1998,4, 267-270

2) 井関健、川端志津、金内美妃、宮崎勝巳「経腸成分栄養療法実施時の薬物吸収変化」病院薬学 25(1),15-21 (1999)。

3) K. Iseki, M. Sugawara, K. Sato, I. Nassani, T. Hayakawa, M. Kobayashi, and K. Miyazaki,

Multiplicity of the H⁺-dependent transport mechanism of dipeptide and anionic β-lactam antibiotic ceftibuten in rat intestinal brush-border membrane: J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289, 66-71

4) M. Kobayashi, H. Fuzisaki, M. Sugawara, K. Iseki, and K. Miyazaki: The presence of an Na⁺/spermine antiporter in the rat renal brush-border membrane: J. Pharm. Pharmacol., 51 (3):279-284 (1999)

5) M. Kobayashi, H. Fuzisaki, M. Sugawara, K. Iseki, and K. Miyazaki: Effects of Interactions between drugs on the renal excretion of trientine in rats-acetazolamide and furosemide increase trientine excretion: Pharm. Re., 16(12):1888-1892(1999)

6) N. Kohri, Y. Yamayoshi, H. Xin, K. Iseki, N. Sato, S. Todo, and K. Miyazaki, Improving the oral bioavailability of albendazole in rabbits by the solid dispersion technique: J. Pharm. Pharmacol. 1999, 51, 159-164

7) K. Iseki, M. Sugawara, K. Sato, I. Nassani, T. Hayakawa, M. Kobayashi, and K. Miyazaki, Multiplicity of the H⁺-dependent transport mechanism of dipeptide and anionic β-lactam antibiotic ceftibuten in rat intestinal brush-border membrane: J. Pharmacol. Exp. Med. 1999, 289, 66-71

8) M. Kobayashi, N. Sato, M. Sugawara, K. Iseki, and K. Miyazaki, Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract: Int. J. Pharmaceu. 2001, in press.

1. 学会発表

1) 1998年3月 第118回日本薬学会(京都)
「薬物の生体内動態における構造相関-薬物の消化管吸収に及ぼす経腸栄養剤の影響-」金内美妃、浅子 恵、井関 健、宮崎勝巳

2) 1998年9月 第8回日本病院薬学会(横浜)
「薬物の消化管吸収における経腸栄養剤の影響」金内美妃、浅子 恵、井関 健、宮崎勝巳

3) 1999年3月 第119回日本薬学会(徳島)
「薬物の体内動態における構造相関(第48報)-多剤排出蛋白を介したPSPの腎排泄-」小林道也、藤本道夫、西村幸穂、井上 悟、井関 健、宮崎勝巳

3) 1999年3月 第9回日本LEC研究大会(札幌)
「ラット腎における多剤排出蛋白欠損の可能性」小林道也、藤本道夫、西村幸穂、井上 悟、井関 健、宮崎勝巳

4) 2001年3月 第121回日本薬学会(札幌)
「消化管内pH変動を考慮した薬物評価系の改良と消化管内薬物相互作用の評価」
小林道也、佐田憲昭、立浪綾子、坪井 暲、菅原 満、井関 健、宮崎勝巳

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業） 分担総合研究報告書

常用医薬品の病態時における薬物動態および相互作用に関する研究

分担研究者 岩本喜久生 島根医科大学医学部附属病院教授・薬剤部長

研究要旨 平成10, 11, 12年度において以下のそれぞれ1), 2), 3)の研究成果を得た。

1) 動物実験による基礎研究により、経口糖尿病薬トルブタミドと小柴胡湯との相互作用および腎障害時におけるオフロキサシンの唾液腺移行などの体内動態の変動およびアセタゾラミドの中樞系での定量法確立等について検討した。その結果、トルブタミドの消化管吸収は小柴胡湯併用により亢進しそれにより血糖降下作用が増強されること、オフロキサシンの唾液中排泄は腎障害により増大することを明らかにし、さらに、感度・精度ともに優れた脳組織・CSF中アセタゾラミド濃度定量法を新規に確立した。

2) 硝酸ウラニルで惹起させた急性腎障害ラットにおけるシプロフロキサシンの血漿中半減期は正常ラットに比べ約2倍に延長し、全身クリアランスは約1/4に低下した。一方、四塩化炭素惹起による急性肝障害ラットでは半減期は約1.5倍に延長し、クリアランスは約1/2に低下した。いずれの病態時においても、シプロフロキサシンの脳内濃度は正常時に比べ血中濃度上昇に対応して有意に上昇したが、脳内濃度/血清中非結合形濃度の比は正常時に比べて減少することが明らかとなり、これらの病態時には非結合形薬物の中樞移行性が低下することが明らかとなった。これらの病態時におけるシプロフロキサシンの中樞毒性の予測には、血中濃度やその蛋白結合率以外の要因も考慮すべきことが示唆された。

3) 西洋薬あるいは合成薬と常用される漢方エキス製剤として小柴胡湯を選び、*in situ*実験によりラット胃内容排出速度およびトルブタミドの胃吸収におよぼす小柴胡湯の影響について検討した。小柴胡湯の前処置あるいは併用により、試験食餌投与後40分におけるラットの胃内容排出速度は対照群の約7割に低下すること、これには小柴胡湯の用量依存性が認められないこと、しかしながら、トルブタミドの胃吸収には対照群との間で差が認められないことを明らかにした。以上の結果から、小柴胡湯はラットの胃内容排出機能を抑制する作用を有するものの、トルブタミドの胃吸収そのものには影響をおよぼさないことが示唆され、すでに得ている*in vivo*実験での小柴胡湯併用によるトルブタミドのバイオアベイラビリティ低下現象を支持する成績であると考えられる。

A. 研究目的

平成10年度

医薬品適正使用のために有用な情報となる薬物相互作用および病態時での薬物体内動態変動について詳細に検討する目的で、最近の常用薬剤あるいは薬効や副作用等で問題視されている薬剤を選定し、ラットを用いる薬物動態学的手法により基礎研究を行った。

平成11年度

シプロフロキサシンは最も常用されるキノロン系抗菌薬の一つであり、他のキノロン薬と同様に、投与後、大半が未変化体のままで尿中排泄されるが、他薬に比べて腎外消失の寄与も無視し得ないことが知られている。さらに、キノロン薬全般については、臨床使用時、その中樞移行による痙攣、錯乱、抑うつ等の中樞性副作用の発現に対する注意が喚起されている。従って、腎障害あるいは肝障害時におけるキノロン薬の体内動態、とくに中樞移行性の変化について精査するための基礎研究は、本薬剤の安全性に重点を置く適正使用の確保の点で極めて重要な課題である。本研究は、シプ

ロフロキサシンを用いて、急性腎障害、急性肝障害モデルラットを作成し、シプロフロキサシンの血中薬物動態と脳内移行性におよぼすこれらの病態の影響について検討した。

平成12年度

漢方製剤は慢性疾患に対して長期連用され、近年では他の西洋薬あるいは合成薬などと併用されるケースが多くなっている。漢方製剤と他の医薬品との相互作用に関する研究は、小柴胡湯単独あるいはインターフェロン製剤との併用による間質性肺炎などの副作用の発現や増悪が最近報告されて以来、ようやく注目されつつあるが、これらに関する基礎研究の成果が十分に蓄積されているとはいえない現状である。本研究では、多剤併用時の医薬品適正使用に有用な情報を得る目的で、常用の漢方製剤のうち小柴胡湯を選び、本製剤と経口糖尿病用薬であるトルブタミドの消化管吸収過程における薬物相互作用について、とくに小柴胡湯の胃排出挙動およびトルブタミドの胃吸収挙動におよぼす影響について精査した。

B. 研究方法 平成10年度

1. トルブタミドと小柴胡湯との相互作用

10週令SD系雄性ラットにトルブタミド (50mg/kg) 単独あるいは小柴胡湯エキス末 (300mg/kg) との併用で経口投与した後、血漿中トルブタミド濃度およびグルコース濃度を経時的に測定した。

2. 腎障害時におけるオフロキサシンの体内動態

5/6腎結紮術を施し (対象群はシャム手術のみ) た12~14週令ラットに気管挿管、頸静脈・大腿静脈・耳下腺および顎下腺唾液開口部カニュレを施した。ピロカルピン持続投与による唾液分泌刺激条件下でオフロキサシン (5mg/kg) 急速静注投与した後、血漿および各唾液を経時的に採取し、各試料中オフロキサシン濃度を測定した。

3. 中枢組織中アセタゾラミド定量法の確立

アセタゾラミドを10週令ラットから得た血漿あるいは血清 (0.1~100 μ g/ml)、脳組織 (0.05~50 μ g/g) およびCSF (0.025~50 μ g/ml) 試料に内部標準としてのスルファダイアジンとともに添加して改良型HPLC法にて測定し、その定量性について検討した。さらに、ラット脳毛細血管内皮細胞培養実験系での定量法についても検討した。

平成11年度

1. 急性腎障害・肝障害ラットの作成

Giacominiらの方法に準じて、キノロン薬投与実験の5日前にラット尾静脈より生理食塩液に溶解させた硝酸ウラニル 5 mg/kgを投与することにより、急性腎障害モデルを作成した。一方、キノロン薬投与実験の24時間前にオリーブ油に溶解させた四塩化炭 1 mL/kgをラットに経口投与することにより、急性肝障害モデルを作成した。それぞれの対照群には生理食塩液およびオリーブ油のみをそれぞれ同一の方法で投与したラットを用いた。

2. シプロフロキサシン投与実験

シプロフロキサシンとうよの前日 (約20時間前)、ラット頸静脈カニュレ留置術を施した。塩酸シプロフロキサシンを生理食塩液に溶解させ、シプロフロキサシンとして10, 20, 30 mg/kgの用量にて対照群に、また10 mg/kgの用量にて腎障害および肝障害群に、前述のカニュレより急速静注した。投与後、120分まで経時的にカニュレより約0.1 mLずつ採血し、直ちに血漿画分を分取した。120分の最終採血点のあと、血清蛋白結合率測定用の血液試料および脳組織を採取した。脳組織は、小脳、脳幹、硬膜、脈絡叢、主要血管およびくも膜下血管を除去したものを秤量した。

3. 急性障害モデルラットの血液生化学検査等

血清クレアチニン、尿中窒素、ALT、AST濃度は、Refloronにて測定した。血清アルブミン濃度は市販キットを使用するBCG法により測定した。

4. 血中および脳組織中薬物濃度の定量

全血中、血漿中、血清中、限外濾過液中および脳組織中薬物濃度は、既に開発済みのHPLC法により定量

した。除去不能として残存する脳内微小血管によるコンタミ薬物量は、既に確立している補正式を用いて実測値から除くことにより、正確な脳組織中薬物濃度を算定した。

5. データ解析

血漿中シプロフロキサシン濃度の経時変化の解析は非線形最小自乗法回帰解析プログラムMULTIを用いて行い、消失半減期、全身クリアランス、中央コンパートメント分布容積、末梢コンパートメント分布容積などの動態パラメータを算定した。一方、分布平衡達成後の脳内シプロフロキサシン移行性は補正脳内濃度/血清中非結合形濃度の比で評価した。

平成12年度

1. 胃内容排出速度測定実験

前投与液として1%アラビアゴム懸濁液単独あるいは小柴胡湯エキス顆粒 (250, 500, 750 mg/kg用) を含有したものを用いた。試験食餌としてメチルセルロース (400 cps, 2 w/v%) 水溶液に非吸収性マーカーのフェノールレッド (0.05 w/v%) およびトルブタミド (12.5 mg/mL) を添加したものを用いた。無麻酔下10週令SD系雄性ラットに前投与液 (2 mL/kg) をゾンデ針にて胃内に投与し、1時間後に試験食餌 (4 mL/kg) を胃内に注入した。試験食餌注入直後、20分あるいは40分後にラットを屠殺し、腹大動脈より血液採取後ただちに噴門および幽門を切除し胃を全摘出した。摘出したラットの胃に残存するフェノールレッド量は、既報処理法を一部改良してアルカリ処理後ホモジナイズし、トリクロル酢酸混和後の遠心分離上清の再アルカリ化を経て、560 nmにおける吸光度測定により定量した。胃内容排出速度は試験食餌投与直後のラット胃を標準としてその残存フェノールレッド量を基準に胃から腸管への排出率として算出した。

2. 胃ループ吸収実験

ラットを実験前24時間絶食 (さらに1時間は飲水も中止) しエーテル麻酔下開腹し幽門を結紮した。開腹部を簡易縫合したラットを個別ケージに戻し30分後にトルブタミド懸濁液 (1% バレイショデンプン含有生理食塩液中) を単独あるいは小柴胡湯 (500 mg/mL) とともにゾンデ針にてラット胃内に注入 (4 mL/kg) した。注入後20, 40, 60分にラットを屠殺し腹大動脈より血液採取後、幽門部および噴門部を結紮・切除することにより、胃を摘出した。胃内に幽門からpHメーター極細電極を挿入し、胃内pHを測定した。胃内容物を取り出し遠心分離上清中のトルブタミド濃度胃内での溶出濃度とした。一方、血液より血清を得、血清中トルブタミド濃度を定量するとともに血清の一部を限外濾過し、ろ液中薬物濃度を測定しトルブタミドの結合形分率を求めた。

C. 研究結果

平成10年度

1. トルブタミド単独群および小柴胡湯併用群とも、血漿中トルブタミド濃度の経時変化は吸収lag-timeを有する2-コンパートメントモデルに最適化することが

明らかとなった。併用によりトルブタミド吸収相におけるC_{max}は上昇し、T_{max}は短縮することが認められ、小柴胡湯による吸収促進効果が推察された。さらに、吸収相における血中トルブタミド濃度上昇効果は血中グルコース濃度低下作用の増強として現れた。

2. まず、今回施行した部分的腎結紮術が腎機能障害モデルと成り得ることを確認した。オフロキサシンの全身クリアランスは対象群に比べ腎障害群では約1/2に低下すること、一方、唾液中／血漿中濃度比の上昇による唾液腺クリアランスは約3倍に増大することが明らかとなった。また、唾液中薬物濃度に腺差（耳下腺>顎下腺）が存在することも認められた。

3. 今回確立した新規HPLC定量法により、血漿・血清・脳組織・CSFの何れの試料においても十分な感度および精度でアセタゾラミドを定量することができ、中枢移行動態などを精査しうる準備ができた。また、毛細血管内皮細胞培養実験系においてもリザーバー両側の試料に対して上記定量法を一部改変して使用可能であることが判明した。

平成11年度

1. 急性腎障害および急性肝障害モデル作成の評価

硝酸ウラニル投与ラットでは血清クレアチニンおよび尿中窒素のレベルが正常群の10倍以上の高値を示し、血清アルブミンレベルは正常群に比べ約20%低値を示した。ALTおよびASTレベルは正常群と差は認められなかった。一方、四塩化炭素投与ラットでは、ALTおよびASTレベルが正常群のそれぞれ約70倍、50倍の高値を示した。その他の生化学検査値は正常群と同等であった。以上の検査結果から、硝酸ウラニルおよび四塩化炭素投与により、それぞれ急性腎障害および急性肝障害が惹起されていることが確認された。

2. 血漿中シプロフロキサシン動態

急性腎障害群、急性肝障害群、対照群とも急速静注後のシプロフロキサシンの血漿中濃度の経時的推移はbiexponentialな消失を示した。硝酸ウラニル惹起腎障害ラットでは対照群に比べ、いずれの時点においても約2～5倍以上の血漿中濃度を示した。一方、四塩化炭素惹起肝障害ラットでは、正常群に比べ、有意に高い血漿中濃度推移を示すものの、腎障害群ほど顕著な上昇ではなかった。血漿中濃度推移の解析の結果、正常群に比べ、腎障害群では、消失半減期が約2倍に延長、全身クリアランスが約25%に低下、中央および末梢コンパートメント分布容積が約50%に減少、また、肝障害群では、半減期が約1.5倍に延長し、クリアランスが約50%に低下することが明らかとなった。

限外濾過法による血清蛋白結合率測定の結果、いずれの障害群とも、シプロフロキサシンの血清蛋白結合率は、正常群の約6～7割に低下することが明らかとなった。ただし、障害群での血清中薬物総濃度は正常群の約2～5倍であった。

3. 病態モデルラットにおけるシプロフロキサシンの中枢移行性

正常群に比べ、投与120分後の脳内シプロフロキサシン濃度は、腎障害群および肝障害群においてそれ

ぞれ約3倍および2倍へと上昇を示した。しかし、移行性の指標である脳内濃度／血清中比結合形濃度の比で比較すると、腎障害群および肝障害群では正常群のそれぞれ約35%、25%減少することが明らかとなった。さらに、正常群ラットに3水準のシプロフロキサシン用量を投与後の血清中非結合形薬物濃度と脳内濃度との合い差には有意な比例関係が存在することを明らかにした。その相関関係図上に、腎障害ラットおよび肝障害ラットでのデータをプロットすると、いずれの障害群とも相関の回帰直線より下方に外れ、とくに腎障害群でその傾向が顕著であることがわかった。

平成12年度

1. 胃内容排出速度におよぼす小柴胡湯の影響

試験食餌投与後20分の胃内容排出速度は対照群と小柴胡湯前処置群との間で差は無く、両群とも約35%であったが、40分後のそれは対照群が81%であるのに対して小柴胡湯群では58%（対照群の71.6%）と有意に減少し、小柴胡湯による胃内容排出機能の抑制が観察された。小柴胡湯の用量を3水準に変えて検討したところ、いずれの投与量においても対照群の約70%に低下するのみで用量依存性は認められなかった。一方、腹大動脈中トルブタミド濃度は、対照群に比べ小柴胡湯前処置群で若干低下する傾向を示し、いずれの時点においても血中薬物濃度は胃内容排出速度と正の相関関係を示すことも明らかとなった。小柴胡湯前処置群における胃内pHは、対照群（約1.8）に比べいずれの時間においても高値（約2.5～3.5）を示した。

2. トルブタミドの胃吸収におよぼす小柴胡湯の影響

幽門結紮ラットを用いるin situ胃吸収実験法により検討した結果、投与後20分における血清中トルブタミド濃度は、小柴胡湯併用群が単独群に比較してやや低値を示したが、40分以降では逆に高値で上昇傾向が観察された。しかし、60分までのAUCには、併用群でやや大きくなる傾向があるものの両群間での有意差は存在しなかった。さらに、本実験条件下でのトルブタミドの血清蛋白結合率は約92%であり、小柴胡湯併用の影響は認められなかった。

D. 考察

平成10年度

小柴胡湯の併用によるトルブタミドの消化管からの初期吸収速度の僅かながら有意な増大が血糖効果作用とよく対応すると考えられる。

腎障害モデルラットでは、オフロキサシン体内動態の全身クリアランスが低下し、逆に唾液中移行性の上昇による唾液腺クリアランスの増大が代償的に現われると考えられる。

今回新規に確立したアセタゾラミドの血中濃度および中枢組織中濃度の同時定量法は、本薬物の中枢移行動態を精査するには最適の定量法であると考えられる。

平成11年度

硝酸ウラニル投与および四塩化炭素投与により惹起した急性腎障害および肝障害ラットは今回のキノロン薬の体内動態および中枢移行性に関する基礎研究に十分使用しうる病態モデルであると考えられた。

他のキノロン薬に比べ、シプロフロキサシンの腎外クリアランスはかなり寄与率が高く、動物種およびヒトでの蛇管の差異はあるもののそれは全身クリアランスの約40~50%を占めると報告されている。従って、本薬物の腎障害および肝障害モデルラットでの研究は極めて重要な意味を有する。今回の肝障害モデルラットでは、腎障害モデルラットに比べて、シプロフロキサシンの血中からの消失延長すなわち全身クリアランス低下への影響は相対的に小さくあらわれたものの、本薬物の全身クリアランスにおける肝クリアランスの寄与の大きさが確認された。いずれの障害群においても、血中シプロフロキサシン総濃度の上昇にともなう脳内薬物濃度の増大が認められたが、血清非結合形濃度に着目したデータ解析では、正常群の脳内濃度/非結合形濃度比よりも低値を示した。すなわち、急性腎障害群および肝障害群のいずれにおいても、正常群に比べて、シプロフロキサシン脳内濃度は血中濃度の上昇に対応して増加するものの、その血清中非結合形分画の中枢移行性は逆に低下することが示唆された。今後、それぞれのしょうがい・病態時での血液-脳関門の薬物透過性の変化およびそれにおよぼす障害・病態時での内因性物質の変動の影響などについても精査することが望まれる。

平成12年度

胃内容物排出試験において小柴胡湯懸濁液を前処置としたのは、試験食餌との同時投与では対照群にくらべ胃内容が高粘度となるのでその影響を解消するためであった。小柴胡湯前処置による胃内容物排出速度の低下は胃内pHの上昇に加えて、恐らく中枢神経系を介する胃収縮機能の抑制作用によるものと考えられる。本実験での胃内容物排出速度の低下効果の主要因は小柴胡湯に含有される生姜の指標成分である[6]-gingerolによるものと推察される。胃内容物排出速度と血中トルブタミド濃度との間に密接な相関関係が認められ、排出速度が大なるほど高い血中濃度を示したことから、胃内容物排出速度は経口投与後の血中トルブタミド濃度を支配しうる要因の一つであると考察される。

トルブタミドはその化学的性質より胃からも吸収されうると考えられたので、幽門結紮ラットによるin situ胃吸収におよぼす小柴胡湯併用の影響を調査したところ、吸収率に対応するパラメータであるAUCでは併用の影響が認められなかった。本実験条件下での胃吸収によるAUCは、研究者らが既報したin vivo経口投与後のトルブタミドのAUCの僅か約10%程度にしか相当しないことから、この薬物の主たる吸収部位は小腸であることが明確となった。

E. 結論

平成10年度

1. 小柴胡湯と他剤との併用時には、薬物相互作用の可能性を考慮すべきである。
2. 腎障害時にキノロン薬を投与する際は体内動態変化に十分注意すべきである。
3. 新規定量法により、アセタゾラミドの中枢移行性に関して薬物動態学的検討を行える基盤ができた。

平成11年度

急性腎障害および急性肝障害により、シプロフロキサシンの血中動態プロファイルは大きく変動し、顕著な全身クリアランス低下および消失遅延を受け、正常群に比べ数倍のケ中脳度上昇をもたらすこと、腎障害群でその影響はより顕著に出現することが明らかとなった。さらに、いずれの障害群におびても、その血中薬物濃度上昇に対応する脳内薬物濃度の上昇が認められたが、血清非結合形薬物の中枢移行性は逆に低下することが明らかとなった。これらの研究成果は、病態時におけるキノロン薬の中枢性副作用の防止などの適正使用に資する情報となりうる。

平成12年度

小柴胡湯による前処置はラット胃内容物排出機能に対して抑制的に作用し、その胃内容物排出抑制作用が血中トルブタミド濃度の低下を導くことが明らかとなった。また、ラットにおけるトルブタミドの消化管吸収に対する胃吸収の寄与は小さく、しかも小柴胡湯の併用は胃吸収にはほとんど影響をおよぼさないことが明らかとなった。併用によるトルブタミドのバイオアバイラビリティ低下の成績(既報)および小腸吸収過程における相互作用をCaco-2細胞膜系で精査した最近の成績(発表予定)などとともに、本研究での知見は臨床における小柴胡湯の他剤との併用に対して有用な示唆を与えるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura, N., Naora, K., Hirano, H., Iwamoto, K.: Effect of Sho-saiko-to on the pharmacokinetics of tolbutamide in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 231-236 (1998).

Ding, G., Naora, K., Nagasaki, S., Hirano, H., Iwamoto, K.: Excretion of ofloxacin into saliva in rats with renal failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 287, 31-36 (1998).

Ichikawa, N., Naora, K., Hirano, H., Iwamoto, K.: Quantitation of acetazolamide in rat plasma, brain tissue, and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17, 1415-1421 (1998).

Naora, K., Ichikawa, N., Hirano, H., Iwamoto, K.: Distribution of ciprofloxacin into the central nervous system in rats with acute renal or hepatic failure. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 609-616 (1999).

Nishimura, N., Naora, K., Hirano, H., Iwamoto, K.: A chinese traditional medicine, Sho-saiko-to(Xiao-Chaihu-Tang), reduces the bioavailability of tolbutamide after oral administration in rats. *Am. J. Chin. Med.*, 27, 355-363 (2000).

Nishimura, N., Naora, K., Hirano, H., Iwamoto, K.: Effects of Sho-saiko-to(Xiao Chai Hu Tang), a chinese traditional medicine, on the gastric function and absorption of tolbutamide in rats. *Yakugaku-Zasshi*, 121, 153-159 (2001).

2. 学会発表

Nishimura, N., Naora, K., Hirano, H., Iwamoto, K.: Changes in gastric emptying and gastrointestinal absorption of tolbutamide by Sho-saiko-to in rats. 13th International Congress of Pharmacology, July, 1998.

Naora, K., DFing, G., Nagasako, S., Hirano, H., Iwamoto, K.: Excretion of ofloxacin into saliva in rats with renal failure. 13th International Congress of Pharmacology, July, 1998.

Ichikawa, N., Naora, K., Hirano, H., Iwamoto, K.: CNS distribution of acetazolamide in rats with renal dysfunction induced by uranyl nitrate. 58th International Congress of FIP, August, 1998.

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：ラットにおけるトルブタミドの消化管吸収におよぼす小柴胡湯の影響；胃内における相互作用の検討、日本薬学会第119年会、平成11年3月。

直良浩司、李秋紅、平野栄作、岩本喜久生、奥西秀樹：オフロキサシンの唾液中排泄機構；ラット唾液中移行におよぼすプロベネシドおよびシメチジンの影響、日本薬学会第119年会、平成11年3月。

Iwamoto, K., Ichikawa, N., Naora, K., Hirano, H.: Effects of renal dysfunction on the permeability of acetazolamide across the blood-brain-barrier in rats. 59th International Con-

gress of FIP, September, 1999.

Li, Q., Naora, K., Hirano, H., Okunishi, H., Iwamoto, K.: Lipophilicity determines distribution of quinolone antibiotics in rats. 第38回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、平成11年10月。

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：甘草含有漢方エキス製剤によるトルブタミドの溶出阻害、日本薬学会第120年会、平成12年3月。

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：トルブタミドの消化管吸収機構；Caco-2細胞を用いた解析、第15回日本薬物動態学会年会、平成12年10月。

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：小柴胡湯によるトルブタミドのCaco-2細胞単層膜透過性の亢進、第39回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、平成12年10月。

西村信弘、直良浩司、平野栄作、岩本喜久生：Caco-2細胞におけるトルブタミド輸送機構および小柴胡湯の影響、日本薬学会第121年会、平成13年3月。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総合研究報告書

医薬品有害作用に関する基礎的研究

分担研究者 大石 了三 九州大学医学部附属病院薬剤部教授

研究要旨 抗アレルギー薬と造影剤の有害作用に関する基礎的研究を行った。抗アレルギー薬、とくにエバスタチンには強いドパミン取り込み阻害作用があることが *in vitro* および *in vivo* で明らかとなった。また、オキサトミドにもドパミン取り込み阻害作用があり、機能的に相反するドパミン受容体遮断作用とほぼ拮抗していることが明らかになった。この作用は錐体外路症状の発現の制御に重要である。

造影剤は臨床使用に際し、高品質のバイアル製剤でも、ディスプレイシリンジへの移し替え操作と注入速度に依存して、シリコン由来の微粒子汚染が引き起こされ、これは造影剤による肺浮腫の増悪因子であることが判明した。造影剤による肺浮腫は一酸化窒素（NO）合成酵素阻害剤L-NMMAにより増悪し、硝酸イソソルビドにより抑制された。ヒト微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* の検討でも造影剤は濃度依存的に血管内皮細胞の sodium fluorescein に対する透過性を亢進した。イオキサグレル酸による透過性亢進は、ニトロプルシドナトリウムの前処置により有意に抑制され、L-NMMAの前処置により著明に増悪した。また、造影剤は血管内皮細胞のNO産生を濃度依存的に抑制した。以上の結果より、ヨード造影剤の血管透過性亢進作用にNOが抑制的役割を示し、ヨード造影剤自身もNO産生を抑制することが明らかとなった。さらに、卵巣摘出ラットでは造影剤による肺障害の程度が有意に増悪し、エストラジオール投与により抑制され、更年期が造影剤による肺障害の危険因子であること、エストラジオール補充は副作用の軽減化に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

1. 抗アレルギー薬のドパミン取り込み阻害作用

抗ヒスタミン薬にはドパミン（DA）取り込み阻害作用を示すものが多く、この作用は抗コリン作用とともに抗パーキンソン病作用の発現機序と考えられている。抗アレルギー薬のオキサトミドは強い抗DA作用があるにもかかわらず、錐体外路症状の発現が低くその理由は明らかではない。本研究では、抗ヒスタミン作用を有する臨床で使用頻度の高い抗アレルギー薬のDA取り込み阻害作用について検討した。

2. ヨード造影剤の品質

ヨード造影剤は尿路撮影、血管造影、CTなどのX線造影検査に広く使用されている。現在、主流となっている非イオン性造影剤の副作用は、以前のものに比べればその発

生率はかなり減少しているが約3%に見られており、0.04%は重篤な副作用である。極めて多い使用件数を考えると重篤な副作用発生件数は年間数千例以上にも達する。しかも、これらの発現機序は不明の点が多く副作用の予防対策も十分でない。そこで、造影剤の臨床使用時に発生する不溶性微粒子汚染の現状を把握した。体内に注入されたこのような微粒子は血管内で塞栓あるいは血管内皮を傷害することにより有害作用を発現する危険性がある。

3. ヨード造影剤の肺浮腫

とくに血管床に富む肺は微粒子による影響を受けやすい臓器であり、造影剤による肺浮腫発現は重篤な副作用の一つである。そこで、微粒子汚染の造影剤の肺浮腫に及ぼす影響をラットを用いて検討した。さらに、肺血管透過性亢進に対するNOの役割

に着目し、造影剤による肺障害に対する関与を *in vivo* で検討した。さらに、ヒト微小血管内皮細胞を用いて *in vitro* でも検討した。

女性の更年期は造影剤による副作用の発生頻度が高いと言われている。一方、エストロゲンは血管内皮の NO 産生量に影響を及ぼすことが判明している。そこで、患者側の要因を探索することを目的に更年期モデルとして卵巣摘出モデル動物を作成し、更年期における造影剤の肺障害発現とエストラジオールの効果についても検討した。

B. 研究方法

1. 抗アレルギー薬のドパミン取り込み阻害作用

ラット線条体から得たシナプトソーム画分 800 μ l を試験管に入れ、37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベーションした後、HEPES 緩衝液で調製した [3 H]DA 100 μ l (最終濃度 10 nM) と被検薬液 100 μ l を同時に加え反応を開始した。37 $^{\circ}$ C、5 分間の反応を行った後、反応液をメンブランフィルターを通して吸引ろ過し、3 回洗浄後、ACS-II を加え、一晩放置後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。なお 0 $^{\circ}$ C の条件下で得られた放射活性を非特異的結合の放射活性とした。

DA transporter に対する種々の抗アレルギー薬の作用は、0 $^{\circ}$ C、60 分間におけるラット線条体シナプトソーム画分への [3 H]GBR12935(1 nM) 結合で調べた。なお 30 μ M の GBR12909 存在下で得られた放射活性を非特異的結合の放射活性とした。

さらにマウスを用いて、L-dopa 誘発興奮行動、apomorphine 誘発自発運動量の亢進、haloperidol 誘発カタレプシーに対する作用をもとに行動薬理的に検討した。

2. 造影剤の不溶性微粒子の測定

バイアル製剤を 100mL のディスポーザブルシリンジに移し替えた後、CT 用自動注入装置を用いて、1、2、3 mL/秒の注入速度で全量をガラス容器に押し出した。不溶性微粒子数は、液中微粒子カウンター (APSS-200、PMS 社製) により測定し、日本薬局方に従い容器当り 10 μ m 以上の個数 6,000 個、25 μ m 以上の個数 600 個を評価基準とした。

3. 造影剤による肺浮腫

造影剤投与一定時間後、肺を摘出し、湿重量及び乾燥重量により水分含量を求めた。Na⁺、K⁺ 含量は肺乾燥重量測定後、硝酸-60%過塩素酸 (2:1) により肺を灰化させて試料を調製し、原子吸光度法によって測定した。対照は生理食塩水投与群とし、シリコン油を一定量添加した造影剤及びシリコン油単独の影響についても同様に調べた。

4. 肺血管透過性に及ぼす造影剤の影響 (*in vivo*)

エバンスブルーと造影剤を静脈内投与後、肺動脈から生理食塩水を灌流することにより血管内のエバンスブルーを取り除き、肺を摘出した。ホルムアミド抽出法により肺組織中のエバンスブルー濃度を測定した。NO 合成酵素阻害剤 L-NNA 及び NO 基質 L-アルギニンの前処置は造影剤投与 15 分前に行った。また、別途に摘出した肺を直ちに 20%ホルマリン中性液で固定し、パラフィン処理を施して、切片標本を作成した。常法によりヘマトキシリン-エオジン染色を施し、染色標本を作成した。

4. ヒト微小血管内皮細胞透過性に及ぼす造影剤の影響 (*in vitro*)

プレートにインサートをおき、そのインサートの膜内に微小血管内皮細胞を培養した。NO 関連薬物の非存在下あるいは存在下で造影剤を 30 分間負荷し、洗浄後、sodium fluorescein を添加し、5、10、15 分後にプレート内に透過した量を測定して、その値から透過係数を求めた。

また、培養した微小血管内皮細胞に造影剤を 30 分間負荷し、その後 15 分間に産生される NO₂ の量を高速液体クロマトグラフィーを用いたジアゾ化反応吸光度法により測定した。さらに、プレートに微小血管内皮細胞を培養し、光学顕微鏡で観察しながら造影剤を負荷し、10、30、60 分後に正常な細胞の割合を測定した。

5. 更年期モデル動物における造影剤による肺障害

雌性ラットの両側卵巣を摘出し、28 日後にエバンスブルーの肺血管透過性を調べた。また、術後 7 日目より 1 週間毎にエストラジオール (ペラニン・デボー注) を大腿筋肉内へ注射し、その効果を調べた。