ラジオレセプターアッセイによる中枢神経作用薬の微量定量法の確立とラットにおける体内動態解析への応用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中島, 恵美, 竹田, 正美, 石崎, 純子, 横川, 弘一, 松下, 良, 市村, 藤雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/6252

Jpn. J. Hosp. Pharm.
一 般 論 文
19(2) 111 — 118 (1993)

ラジオレセプターアッセイによる中枢神経作用薬の微量定量法の確立とラットにおける体内動態解析への応用

中島恵美，竹田正美，石崎純子，横川弘一，松下　良，市村藤雄*
金沢大学医学部附属病院薬剤部†

Development of Radioreceptor Assay for Microdetermination of Drugs Acting on the Central Nervous System and its Application to a Pharmacokinetics in Rats

EMI NAKASHIMA, MASAMI TAKEDA, JUNKO ISHIZAKI,
KOICHI YOKOGAWA, RYO MATSUSHITA, FUJIO ICHIMURA*
Hospital Pharmacy, School of Medicine, Kanazawa University†

(Received September 8, 1992
Accepted October 27, 1992)

Simple and sensitive methods are developed for microdetermination of drugs acting on the central nervous system. The assay employs the partially purified synaptosomal membrane isolated from rat brain. In the assay, ^{3}H-Quinuclidinyl benzylate competes with drugs for binding to the receptor. The detection limit for scopolamine was 20 ng/ml. This method was applied for the measurement of other drugs acting on the central nervous system. The values of IC_{50} were lower than 0.1 μg/ml in biperiden, trihexyphenidyl, levomepromazine, and promethazine.

The method has been used to determine plasma levels in 9-week-old and 21-week-old rats after i.v. injection of 1 mg/kg scopolamine. The blood levels of scopolamine at each time after the administration are significantly different between 9-week-old and 21-week-old rats. The values of V_{dss} determined in 21-week-old rats were significantly increased as compared to the 9-week-old rats, whereas CL_{tot} were not changed.

Keywords——radioreceptor assay; neuroleptic drugs; pharmacokinetics; rats; aging

緒　　言

中枢神経作用薬は広く臨床に使用され，効果が認められているが，血中濃度と薬理効果発現との関係はほとんど確立されていない[1-4]．中枢性抗コリン剤のスコポラミンもヒトにおけるファーマコキネティクスとファーマコダイナミクスが一致しないことが報告されている[2]．また，その毒性は加齢によって強まることも指摘されている．しかし，その原因は不明で動物実験による体内動態変動要因の解析データも不足している．

これらの薬物は一般に投与量が少なく小動物を用いた体内動態解析のためには，微量試料中の低濃度の薬物を定量できる簡単で感度の良い方法が

* 金沢市宝町13-1; 13-1, Takara-machi, Kanazawa, 920 Japan

必要となる．高感度で簡便な薬物定量法として，放射性リガンドと薬物のレセプターに対する競合反応を利用したラジオレセプターアッセイ（以下RRA）が知られており，pg/ml～ng/ml オーダの抗コリン剤が定量できることが近年報告されている[5-8]．また，各種の中枢神経作用薬の中にはムスカリンレセプターと結合するものがあり[9]これらの薬物においても同一のRRAによって定量できる可能性があるが，実例は報告されていない．更に，これまでのRRAでは定量のために1～2ml の試料が必要であることが多く，小動物を用いた実験では使用範囲が限られている．このため本研究では，微量試料を用いたRRAの確立を試みた．また，今回確立したRRAを用いて，スコポラミンのラットにおける体内動態の加齢変動について検討することとした．

実験方法

1. 試薬及び装置

〔^{3}H〕-(－)-Quinuclidinyl benzylate（以下，〔^{3}H〕-QNB）（放射活性 50Ci/mmol）は Amersham International Ltd.（Bucks, UK），臭化水素酸スコポラミンは Sigma Chemical Co.（ST. Louis, MO）からそれぞれ入手した．その他の試薬はすべて和光純薬㈱（大阪）より入手した．他の中枢神経作用薬は医療薬として市販されているものを用いた．液体シンチレーションカウンターは Aloka LSC-3500（Aloka Co.，東京）を使用した．

2. スコポラミンの定量

2-1. レセプター標品の調製

Wistar 系雄性ラット（体重 200～400g）の全脳を摘出し，氷冷した 0.32M シュクロース液を10%（w/v）となるように加えホモジネートした．ホモジネート液を 4°C，1,000g で10分間遠心分離後上清を採取し，これに 0.32M シュクロース液を加えて更に 4°C，27,000g で 20 分間超遠心器で分離した．上清を除去後，沈殿を 0.32M シュクロース液に懸濁させた．その後，4°C，27,000g で20分間超遠心器で分離し，沈殿をラットの脳シナプトソーム分画とした．得られたシナプトソーム分画を蛋白濃度が750μg/ml になるよう 50mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で希釈しレセプター標品とした．蛋白濃度の定量は Bio Rad 社（N. Y）の方法により測定した．

2-2. 抽出方法

血清からのスコポラミンの抽出は，L. Stoll らの方法をもとにした[5]．シラノール処理した10ml の栓付き褐色試験管に 25μl の血清試料（またはブランク血清），50mM のリン酸緩衝液（pH 7.4）（またはスコポラミン標準溶液）25μl，クロロホルム 3ml を加えて15分間撹拌した．4°C，2,000g で10分間遠心分離後，クロロホルム層を採取し 37°C で蒸発乾固し，50mM リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解して RRA の試料とした．

2-3. RRA

血清試料にレセプター標品を蛋白量が150μg になるように加え，25°C，10分間プレインキュベートした．〔^{3}H〕-QNB を最終濃度が 0.5nM，最終容積は 1.2ml になるように加えた．更に，25°C で 60 分間インキュベート後，Whatman glass fiber GF/B フィルターを用いてレセプターに結合した〔^{3}H〕-QNB と遊離型〔^{3}H〕-QNB を分離した．フィルターは約 3ml の 50mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で 3 回洗浄後バイアル瓶に回収した．シンチレーション溶液（ACS-Ⅱ，Amersham）10ml を加えて撹拌後一夜放置し，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．

2-4. データ処理[10]

大過剰のスコポラミン（100μg/ml）存在下での〔^{3}H〕-QNB の結合は非特異的結合（N）とし，この値を全結合量（B）から引いた値を特異的結合量とした．スコポラミン非存在下の結合量を B_0 とすると，結合率は $(B-N)/(B_0-N)$ で与えられる．スコポラミンの濃度に対して結合率を直接プロットするとシグモイド型の曲線になる．

標準曲線の直線化のために次式によって logit-log 変換を行い，スコポラミンの検量線とした．

$$A = \log C$$

ただし，$A : \ln y/(1-y)$

y：結合率

c：スコポラミンの全濃度

である．

検体中のスコポラミン濃度は検量線に〔^{3}H〕-QNB の結合率を内挿することにより求めた．

3. 他の中枢神経作用薬の定量

スコポラミン以外の中枢神経作用薬についても〔^{3}H〕-QNB を用いて RRA による定量を行った．

薬物は，抗コリン剤のビペリデン（BP），トリヘキシフェニジル（TP），向精神薬のハロペリドール（HP），レボメプロマジン（LMP），クロミプラミン（CMP），抗ヒスタミン剤のプロメタジン（PMT），および抗オピオイド剤のペンタゾシン（PTZ）を用いた．

各薬物の溶液 0.4ml にレセプター標品を蛋白量が 300μg になるように加えた．37°C，30分間プレインキュベートし，その後〔^{3}H〕-QNB を最終濃度が 0.1nM になるように加えた．更に，37°C で60分間インキュベートした．以下の操作はスコポラミンの時と同様に行った．

4. 動物実験

9週齢と21週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた．ペントバルビタール麻酔下スコポラミン1mg/kg を大腿静脈から投与した．経時的に血液 0.2 ml を頸静脈から採血した．血清に分離後 RRA により血清中濃度を測定した．各測定点は同一試料を3回測定した平均値で示した．

5. データ解析

時間に対する血清中濃度のデータはモーメント解析法に従って解析した[11]．データの統計的処理には Student-t 検定を用い，有意差は危険率 $p<0.05$ で示した．

結　　果

1. スコポラミンの定量

1) 検量線の作成

血漿中の夾雑物を除去するため，有機溶媒によるスコポラミンの抽出を検討した．pH 7.4 の 50 mM リン酸緩衝液に溶解したスコポラミンを直接 RRA で測定したものと，血清を加えた試料からクロロホルムでスコポラミンを抽出後 RRA で測定したものを比較した．シナプトソームに対する〔^{3}H〕-QNB の結合率をスコポラミンの濃度に対してプロットして得た標準曲線を Fig. 1-a に示す．5ng/ml 以上では，スコポラミンの濃度に依存して〔^{3}H〕-QNB の結合は阻害された．標準曲線の直線化をはかるために Fig. 1-a を logit-log プロットしたところ（Fig. 1-b），0.01～1μg/ml の範囲でいずれも良好な直線関係が得られた．リン酸緩衝液を直接定量した場合とクロロホルム抽出を行った場合の A と log C の関係は各々，式（2）および式（3）のように得られた．

$$A=-12.9+1.66 \log c \quad \cdots\cdots (2)$$

$$A=-12.8+1.95 \log c \quad \cdots\cdots (3)$$

両式は傾き，切片ともによく一致していた．また，リン酸緩衝液に溶解したものの相関係数は 0.998，抽出したものでは0.999であった．標準曲線を logit-log 変換して直線化を行うとき，低濃度および高濃度側ではバラツキが大きくなるため結合率は30～90%の間であることが望ましい．この条件を満たす濃度範囲を定量限界とするとスコポラミンの定量限界は 20ng/ml であった．

2) 回収率と精度

クロロホルムにより抽出したときの回収率と精度について検討した．クロロホルムで抽出後 RRA により測定したときの回収率と C.V. 値を Table 1 に示した．回収率は120.6～81.7%の範囲内であったが，スコポラミンの濃度が10ng/ml では，C.V. 値が 30% を越えていた．

2. RRA の他の中枢神経作用薬への適用

抗コリン作用があり，ムスカリンレセプターに結合することが報告されている中枢神経作用薬を対象に〔^{3}H〕-QNB を用いた RRA の適用の可能性を検討し，その結果を Fig. 2 に示した．各薬物の検量線の傾き(a)，切片(b)，相関係数（r）および各薬物の50%阻害濃度（IC_{50}）を Table 2 に掲げた．濃度の範囲に差はあるがいずれの薬物においても〔^{3}H〕-QNB の結合率と薬物濃度の間には相関係数，0.985～0.999の良好な直線関係が得られた．抗コリン剤は ng/ml オーダの範囲の定量が可能であるが，他の中枢神経作用薬の定量限界は PMT で 5ng/ml，LMP で 20ng/ml，HP と CMP では 500ng/ml，PTZ は 2000ng/ml であ

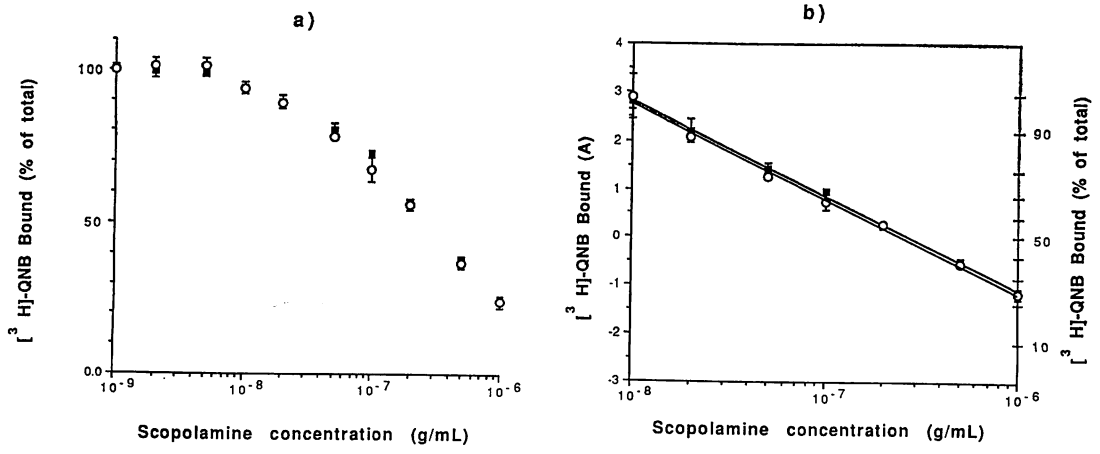

Fig. 1. Calibration Curve of Scopolamine by RRA
a) Standard plots, b) Logit-log plots
Each point represents mean±S.E.M., n=9
○ : Scopolamine solution was prepared with phosphate buffer.
■ : Scopolamine solution with 25μl serum was extracted with chloroform.
A=ln y/(1-y). y indicates the percentage of bound [^{3}H]-QNB to the synaptosomal membrane.

Table 1. Recovery and Precision of the RRA for Scopolamine

scopolamine concentration (g/mL)	Recovery(%)	C.V(%)
1.0×10^{-6}	120.6 ± 5.4	13.3
5.0×10^{-7}	102.7 ± 4.7	13.1
2.0×10^{-7}	102.1 ± 4.9	13.6
1.0×10^{-7}	89.6 ± 2.9	9.7
5.0×10^{-8}	101.3 ± 8.3	21.8
2.0×10^{-8}	81.7 ± 7.6	24.6
1.0×10^{-8}	98.5 ± 13.1	39.8

Scopolamine solution with 25μl serum was extracted by chloroform for RRA.
mean ± S.E.M. of more than 7~10 tests is presented.

った.

3. ラットにおける血清中濃度の測定と体内動態の解析

確立した定量法を用いて，ラットにおけるスコポラミンの体内動態を検討した．静脈内投与後の血清中薬物濃度の時間曲線を Fig.3に，薬物速度論的パラメータを Table 3 に示す．9週齢ラットに比較して21週齢のラットはスコポラミンの消失が遅く，血清中の薬物濃度は投与後有意に高い値を示した（$p<0.05$）．β相の半減期は9週齢で

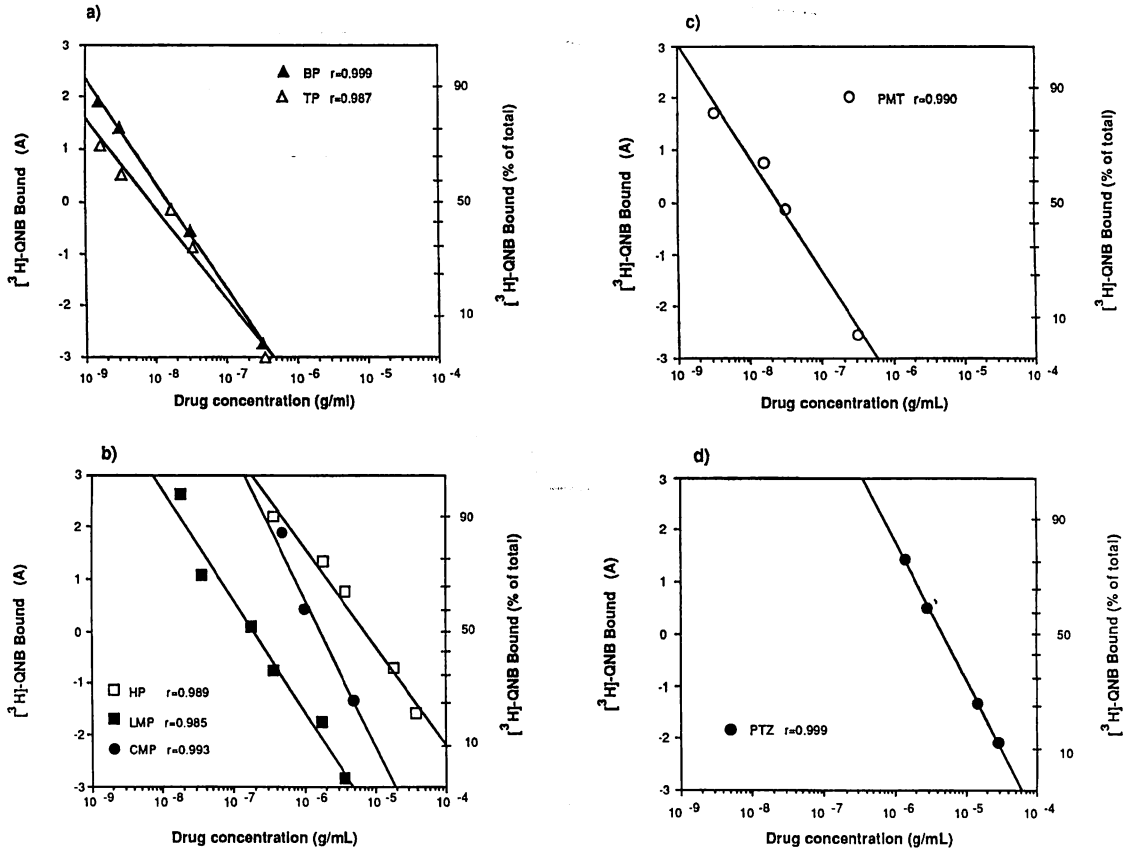

Fig. 2. Logit-log Plots Determined by RRA for Drugs Acting Central Nervous System
Each point represents mean±S.E.M., n=3
a) anticholinergic agents; BP: Biperiden; TP: Trihexyphenidyl
b) antipsychotic drugs; HP: Haloperidol; LMP: Levomepromazine; CMP: Clomipramine
c) PMT: Promethazine
d) PTZ: Pentazocine
A=ln y/(1-y). y indicates the percentage of bound [^{3}H]-QNB to the synaptosomal membrane.

26.5分，21週齢では36.7分であり，加齢により延長しMRTも有意に延長した（$p<0.05$）．定常状態分布容積（V_{dss}）は加齢により増加した．全身クリアランス（CL_{tot}）は加齢による変化が認められなかった．

考　　察

本実験ではRRAにより，血清 25μl を用いて 20ng/ml～1μg/ml の濃度範囲のスコポラミンの定量法が確立できた．スコポラミン濃度が 10ng/ml 以下では C.V.値が 30% を越え，良い精度が得られなかった．

スコポラミン以外の他の中枢神経作用薬に関しても〔^{3}H〕-QNB をリガンドとして用いた RRA により定量できることがわかった．抗コリン剤では ng/ml オーダまで定量が可能であったが，CMP，HPおよび PTZ では 100ng/ml～1μg/ml 以上の濃度が必要であった．しかし，PMT, LMP

Table 2. Parameters Describing Logit-log Plots for Drugs Determined by RRA

Drug	Eq.(1) a	b	γ	IC_{50} (g/mL)
Biperiden (BP)	-15.82	-2.020	0.999	1.48×10^{-8}
Trihexyphenidyl (TP)	-13.98	-1.731	0.987	8.40×10^{-9}
Haloperidol (HP)	- 9.76	-1.900	0.989	7.32×10^{-6}
Levomepromazine (LMP)	-14.29	-2.129	0.985	1.94×10^{-7}
Clomipramine (CMP)	-19.30	-3.104	0.993	6.07×10^{-7}
Promethazine (PMT)	-16.50	-2.174	0.990	2.55×10^{-8}
Pentazocine (PTZ)	-14.28	-2.676	0.999	4.62×10^{-6}

X : drug concentration, g/mL
Y : ln(y/1-y) ; y : [^{3}H] QNB bound ratio
Eq. (1) : Y= a + b·logX
γ : correlation coefficient
IC_{50} : concentration of the drugs which inhibits binding by 50%

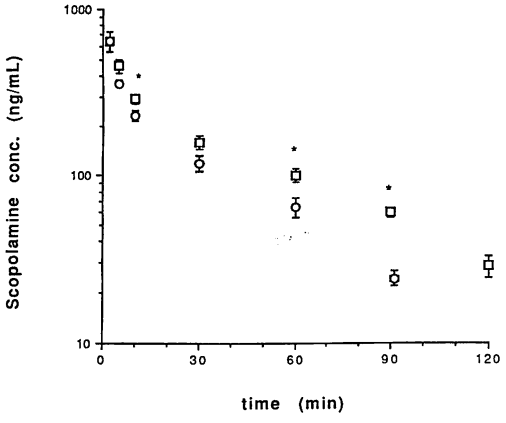

Fig. 3. Semilogarithmic Serum Concentration-time Profiles following an i. v. Injection of 1 mg/kg Scopolamine in 9- and 21-week-old Rats

At least three rats were used to determine the dose level per time point. The data led pharmacokinetic parameters are listed in Table 1.

○, 9-week-old rats; □, 21-week-old rats.

* Significantly different ($p<0.05$) from the mean value of the 9-week-old rats.

では 10ng/ml の定量が可能であり，0.993 以上の相関係数が得られた．

RRA による感度は測定する薬物のレセプターに対する親和性によりほぼ決まる．〔^{3}H〕-QNB はムスカリンレセプターの特異的なリガンドであるが，抗コリン作用を有する向精神薬の定量にも応用が可能であった．それぞれのレセプターに特異的なリガンドを使用すれば更に高感度での定量が可能と考えられる[12]．

しかし以上のことは，測定しようとする薬物以外に放射性リガンドのレセプターに対する結合を阻害する薬物が存在すると RRA による定量ができないことを示している．特に，臨床に適用するときは，多剤を併用している場合が多いので注意が必要である．しかし，データとしてここに示さなかったが，本法を用いて10人の抗てんかん薬を投与されている患者の血清のブランク値を測定したところ，〔^{3}H〕-QNB の結合率は90%以上あり，抗てんかん薬は定量障害とはならないことが示唆された．このことについては更に例数を増やして検討する予定である．

以上の定量法を用いラットにおけるスコポラミ

Table 3. Physiological and Pharmacokinetic Parameters for Rats of Different Ages

Parameters	9-week-old rats (n=5)	21-week-old rats (n=6)
Body weight (g)	314 ± 3	459 ± 10 *
Total Volume of distribution (ml)	874 ± 75	1270 ± 90 *
Total body clearance (ml/min)	26.0 ± 1.6	25.7 ± 1.4
Mean residence time (min)	33.6 ± 2.0	49.8 ± 2.9 *

mean ± S.E.M. is presented.
* Significantly different ($p<0.05$) from the mean value for the 9-week-old rats.

ンの体内動態を検討した結果，加齢によりスコポラミンの消失相における半減期が長くなっていることがわかった．その原因として加齢により V_{dss} が増加し β 相の半減期が延長したためと考えられた．加齢によりラットの V_{dss} が増加することを我々は抗コリン剤のビペリデンで認めている[13]．この原因は加齢によってラットの体脂肪量が増加したためと考えられた．スコポラミンの場合も同様のことが原因と思われる．スコポラミンの抗コリン効果は老人に強く現れることが報告されており[1]，また受容体数の変動が起こることが知られている[14,15]．しかし，その血中濃度との関係は殆ど明らかにされておらず，最適治療のために血中濃度を一定に保つべきか，それとも休薬期間が必要かについての考察も見当たらない．今回の結果から，老人においてはスコポラミンの血中濃度は減少しにくく，休薬期間を取りにくいことが予想された．

以上，今回確立されたRRAは小動物を用いた体内動態の研究のみならず臨床にも利用できる有用な定量法であると思われる．今後，更に組織内濃度の定量にも応用し，標的臓器である脳内濃度の時間変化の解析が可能になれば中枢神経作用薬のファーマコキネティクスとファーマコダイナミクスの関係解明に有用であると考えられる．

謝辞 本研究は，中富健康科学振興財団助成金および，1990年金沢大学医学部老人医療基金の一部によってなされた．感謝の意を表します．

引用文献

1) D. B. Campbell, *Psychopharmacology*, 100, 433-450 (1990).
2) J. Kanto, E. Kentala, T. Kaila, K. Pihlajamäki, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 33, 482-486 (1989).
3) J. Kanto, U. Klotz, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 32, 69-78 (1988).
4) Y. F. Cheng, L. K. Paalzow, *J. Pharm. Pharmacol.*, 42, 566-571 (1990).
5) L. Stoll, P. Fleckenstein, D. Riemann, W. E. Müller, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 64, 59-68 (1989).
6) K. Ensing, W. G. in't Hout, P. Halma, H. M. J. Klinkers, G. J. Ensing, R. A. de Zeeuw, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 38, 106-111 (1988).
7) N. M. Cintron, Y. Chen, *J. Pharm. Sci.*, 76, 328-332 (1987).
8) L. Aaltonen, J. Kanto, E. Iisalo, K. Pihlajamäki, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 613-617 (1984).
9) H. Shimizu, N. Hata, H. Ogata, and M. Toru, *Ann. Rep. Pharmacopsychiat. Res. Found.*, 17, 140-147 (1986).
10) 島田典招，"医薬品開発のためのファーマコキネティックス実験法"，花野学ら編，ソフトサイエンス社，東京，1985，pp. 134-159.
11) K. Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 6, 547-558 (1978).
12) J. Krska, G. Sampath, A. Shah, S. D. Soni, *Brit. J. Psychiatry*, 148, 187-193 (1986).
13) K. Yokogawa, E. Nakashima, F. Ichimura,

Drug Metab. Dispos., **18**, 258-263 (1990).
14) R. Majocha, R. J. Baldessarini, *Life Sci.*, **35**, 2247-2255 (1984).
15) B. Lerer, M. Stanley, *Brain Res.*, **344**, 211-219 (1985).