

病態時における薬物体内動態変動因子の基礎的解析 と臨床応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30572

病態時における薬物体内動態変動因子の
基礎的解析と臨床応用

松下 良

平成7年10月

博士論文

病態時における薬物体内動態変動因子の
基礎的解析と臨床応用

金沢大学大学院自然科学研究科

松下 良

本論文は以下の論文を総括したものである。

- 1) Nakashima, E., Ishikawa, F., Sato, H., Deguchi, Y., Tamai, I., Matsushita, R., Ichimura, F. and Tsuji, A., J Pharm Sci, Kinetics of peritoneal drug transport in rats: an application of the pore theory of transcapillary exchange, Vol 77, No. 6, 481-8 (1988).
- 2) Deguchi, Y., Nakashima, E., Ishikawa, F., Sato, H., Tamai, I., Matsushita, R., Tofuku, Y., Ichimura, F. and Tsuji, A., J Pharm Sci, Peritoneal transport of β -lactam antibiotics: effects of plasma protein binding and the interspecies relationship, Vol 77, No. 7, 559-64 (1988).
- 3) 松下良, 出口芳春, 横川弘一, 中島恵美, 市村藤雄, 薬剤学, フェニトインとバルブロ酸のIn Vitroにおける人血清アルブミン結合相互作用に及ぼすパルミチン酸の影響, Vol 49, No. 3, 221-6 (1989).
- 4) 松下良, 出口芳春, 中島恵美, 市村藤雄, 谷口昂, 渡部礼二, 臨床薬理, 新生児, 小児, 肥満小児におけるTobramycinの母集団パラメータの算出とベイジアン法を用いた新生児の個別投与設計への適用, Vol 20, No. 3, 573-80 (1989).
- 5) Ichimura, F., Matsushita, R., Tsuji, A. and Deguchi, Y., J Pharm Sci, Mutual interaction between bilirubin and cefazolin in binding to human serum albumin [letter], Vol 79, No. 11, 1041-2 (1990).
- 6) Nakashima, E., Matsushita, R., Takeda, M., Nakanishi, T. and Ichimura, F., Drug Metab Dispos, Comparative pharmacokinetics of cefoperazone and cephadrine in untreated streptozotocin diabetic rats, Vol 20, No. 5, 730-5 (1992).
- 7) 中島恵美, 木戸日出喜, 松下良, 金田直美, 市村藤雄, 山口成良, TDM研究, グラフ法を用いた剤形変更に伴うフェニトインの個別投与設計, Vol 10, No. 2, 159-65 (1993).
- 8) Nakashima, E., Matsushita, R., Kido, H., Nakamura, M., Asahi, M. and Ichimura, F., Ther Drug Monit, Systematic approach to a dosage regimen for phenytoin based on one-point, steady-state plasma concentration., Vol 17, No. 1, 12-8 (1995).
- 9) Nakashima, E., Matsushita, R., Iida, Y., Ohshima, T. and Ichimura, F., Pharm Res, Age-related Changes in Pharmacokinetic Parameters of Phenytoin after Liver Resection in Rats, In press (1995).
- 10) Nakashima, E., Matsushita, R., Oshima, T., Tsuji, A. and Ichimura, F., Drug Metab Dispos, Quantitative relationship between structure and peritoneal membrane transport based on physiological pharmacokinetic concepts for acidic drugs, In press (1995).
- 11) Nakashima, E., Matsushita, R., Kanada, N. and Ichimura, F., J Pharm Pharmacol, Kinetic evidence for facilitated peritoneal transport of benzoic acid in rats, Accepted (1995).

【目次】

第I編 序論

第II編 加齢に伴う分布容積とクリアランスの変動

第一章 緒言

第二章 Cefazolin と bilirubin の血清蛋白結合相互作用

第三章 Tobramycin の母集団パラメータの算出と新生児への個別投与設計

第四章 考察

第III編 肝機能変化に伴う血清中薬物濃度の変動

第一章 緒言

第二章 グラフ法による phenytoin の個別投与設計

第三章 肝部分切除ラットにおける phenytoin の体内動態

第四章 血清蛋白結合相互作用

第五章 考察

第IV編 腎機能変化に伴うクリアランスの変動

第一章 緒言

第二章 糖尿病時における全身クリアランスの変動

第三章 薬物の腹膜透過モデルの確立

第一節 腹膜透析時における透析液体積，浸透圧と薬物濃度変化

第二節 薬物の腹膜透過クリアランスへの血清蛋白結合率の影響

第四章 薬物の脂溶性と腹膜透過クリアランスの関係

第一節 酸性薬物の脂溶性と腹膜透過クリアランスの関係

第二節 腹膜透過クリアランスの用量依存性

第五章 アニマルスケールアップ法による腹膜透過クリアランスの予測

第六章 考察

第V編 結論

第VI編 謝辞

第VII編 実験の部

第I編 序論

医薬品を適正に使用するにあたっては、患者個々に適切な薬剤を、適切な投与量と投与時間で投与する必要がある。しかし、同じ投与量を用いても人によって効果が異なってしまうという個人差の問題は、薬の投与設計をする上で最も難しい問題の一つである。この個人差を克服するために薬物血中濃度測定に基づく薬物治療モニタリング (TDM) が臨床の場に広く普及している。

TDMによって、副作用を未然に防ぎ、患者個々の有効血中濃度を得るためには、個体・病態に応じて変動する体内動態パラメータを明らかにし、その変動を的確に捉えることが必要となる。しかし、患者への採血回数の制限により、患者の投与設計を行う上での基本的な薬物動態の情報を十分に得ることは容易でないのが現状である。また、近年高度先進医療の拡充に伴って、例えば、未熟児、肝癌等による肝切除患者、糖尿病発症後の腎不全患者への薬物投与が日常的に行われるようになり個々の患者の体内動態の変化も複雑化する傾向にある。

これらの問題を改善していくためには、population pharmacokinetics^{1,2}による解析が有用である。本方法は、個人毎の薬物動態を考えるのではなく、対象の属する母集団の薬物動態を論じる方法である。この方法では血清中薬物濃度データがひとりあたり1～3点と少なくとも多くの患者データを集めることにより母集団として十分な情報量があれば解析可能であり、臨床薬物動態学の新しい解析方法として注目されている。本方法では、個体間の変動因子を回帰式あるいは場合分け等で層別する事によりその度合いを定量化でき、このデータを利用して個別投与設計が可能となる。しかし、population pharmacokinetics解析により個体間変動を精度よく予測するためには、あらかじめ薬物の体内動態変動因子がわかっている必要がある。そのため、薬物の体内動態変動因子を発見し、そのメカニズムの解明を行うことが一方で重要な課題となる。従って、動物実験等による機構論に根ざした基礎解析を行いその結果を臨床にフィードバックすることが必須である。

薬物の体内動態変動因子の変動を系統的、定量的に表すためには、薬物の分布容積 (Vd) とクリアランス (CL)、半減期 ($t_{1/2}$)、バイオアベイラビリティ (F) 等の基本

的なパラメータに対する変動因子の影響を検討するのが有用である。特に Vd と CL については維持投与量や、初回負荷量の設定に重要なパラメータであり、その変動因子を解明することは投与設計の立案に寄与することになる。

そこで本研究では、第一に臨床で日常の TDM から得られるデータを用い population pharmacokinetics 解析を行う。第二に動物実験を主とした基礎解析を行う。その両方の解析により Vd と CL についての個体間の変動因子を明らかにし、その予測方法の確立と妥当性を検討することを目的とした。すなわち Vd については血清蛋白非結合型分率 (fp) および細胞外液量について、CL については、fp、肝代謝能および腎機能等の影響因子に注目し、それらの変動に大きく影響する加齢時、肝機能変化時、腎機能変化時に分けて検討を行った。薬物としては、臨床で汎用されるセファロスポリン系抗生物質、アミノ配糖体抗生物質、抗てんかん薬、バルビツール酸系催眠薬を対象とした。

第II編 加齢に伴う分布容積とクリアランスの変動

第一章 緒言

薬物の体内動態の年齢差の原因としては肝における代謝や腎における排泄の差が良く知られている。特に新生児や小児については、胎児期には未発達であった肝の薬物代謝酵素が出生により急速に増加する³。発達過程における個人差も大きく、未熟児ではグルクロン酸抱合能の薬物代謝酵素の活性の発達が遅れている。Chloramphenicol 投与患児では、このことが原因で発症する grey syndrome の例が知られている⁴。肝機能や腎機能の発達に伴う Vd と CL の変動を予測して個々の患児に適した投与計画を立案するためには、その要因を分析する必要がある。薬物の fp は、その分布、排泄を決定づける重要な変動因子であり、その変動を定量的に解析することは重要である。特に新生児、未熟児では血清蛋白量が少ないので薬の血清蛋白との結合率は低いことが多い。更に未熟児の場合は血清 bilirubin 値も高いので、薬と bilirubin との間に相互作用が起こり、血液脳関門の未発達による核黄疸の増強や薬理作用が増強されることが知られている^{5,7}。薬物の Vd の変動要因である細胞外液量は年齢、肥満度に応じて変化することが知られており、特に新生児は成人に比べ体重あたりの細胞外液量が大きく個人差も大きい。これまでに生理学的薬物速度論の手法を用いて新生児および小児における cefazolin と tobramycin の体内分布機構が検討されており、新生児における tobramycin の分布容積は小児の約 1.5 倍で、かつ個人差も大きいことが報告されている^{8,9}。また肥満小児においては、実体重よりも、理想体重と脂肪組織量を考慮して、患児毎に投与量を設定した方が良い事が明らかにされている⁹。

また、Deguchi ら¹⁰は、新生児においてセファロsporin系抗生物質である cefazolin の Vd が患児によって 2 倍以上変動し、またその変動が生体内物質である血清 bilirubin 濃度と相関する事を報告している。しかし、小児における fp と細胞外液量の個人差を予測しうる方法は、未だ十分に得られていない。そこで本研究において著者は、加齢により Vd が変動する要因である fp が cefazolin と bilirubin が相互に蛋白結合を阻害することによって生ずることをヒト血清アルブミン (HSA) を用いて in vitro の血清蛋白結合実験により定量的に検討した。

細胞外液量に関しては、主に血清および細胞外液のみに分布されると考えられているアミノ配糖体抗生物質 tobramycin について、新生児、小児、肥満小児を通して求められる母集団パラメータの算出を試みた。アミノ配糖体抗生物質の投与については、副作用である耳毒性、腎毒性が問題となるため临床上その治療域が狭く薬物速度論を用いた助言とモニタリングの重要性が指摘されている³。また、個々の患児に対し最適な投与設計を行うためには、患児個別の Vd や CL を求める必要があるが容易でない。特に新生児については採血回数は少ないほど望ましい。これらの条件を満たすためより簡便に投与設計を行う方法として、近年広く臨床に応用されつつあるベイジアン法の適用が考えられる^{2,11,12}。アミノ配糖体へのベイジアン法の適用例がいくつか報告されており¹³⁻¹⁵有用性が認められているが、新生児、小児、肥満小児を通して tobramycin の母集団パラメータを求め、それらのデータをベイジアン法に適用した例は見られない。そこで tobramycin について新生児から小児に渡って蓄積したデータをもとに全低年齢層患児を通しての母集団パラメータを求め、その結果を用いて新生児におけるベイジアン法を用いた個別投与設計法の有用性を検討した。

第二章 Cefazolin と bilirubin の血清蛋白結合相互作用

Cefazolin と bilirubin の *in vitro* における血清蛋白結合相互作用を定量的に検討した。蛋白結合実験は限外濾過法を用いた。Bilirubin 一定濃度存在下における cefazolin の HSA に対する結合率の変化を Scatchard plot¹⁶した結果を、図 2-1 に示す。Cefazolin の血清蛋白結合親和性は、bilirubin 共存下により用量依存的に阻害された。一方 cefazolin 一定濃度存在下における bilirubin の HSA に対する血清蛋白結合率の変化を Scatchard plot した結果を図 2-2 に示す。Bilirubin の血清蛋白結合親和性は、cefazolin の共存下で用量依存的に阻害された。Cefazolin と bilirubin が HSA 分子上で競合阻害すると仮定すれば、式 (1-1,1-2) を用いて cefazolin と bilirubin それぞれの会合定数 (K_a , K_b) が得られる。非線形最小二乗法プログラム NONLIN¹⁷を用いて図 2-1, 2-2 のデータを同時あてはめすることにより K_a , K_b を求めた。

$$C_b = K_a(nP_t - B_b - C_b)C_f \quad (2-1)$$

$$B_b = K_b(nP_t - C_b - B_b)B_f \quad (2-2)$$

C_b と B_b は、cefazolin と bilirubin の HSA への結合型濃度、 C_f と B_f は、cefazolin と bilirubin の HSA への非結合型濃度、 P_t は albumin 総濃度、 n は結合数を表す。同時あてはめにより得られた曲線を図 2-1, 2-2 に実線で示す。その結果 K_a , K_b , n は、それぞれ、 $1.62 \times 10^4 \pm 282 \text{ M}^{-1}$, $1.88 \times 10^7 \pm 0.46 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 0.978 ± 0.001 と推定された。その値は、cefazolin および bilirubin 単独の血清蛋白結合実験の報告^{18,19}とよく一致していた。Jacobsen ら²⁰により、bilirubin の HSA 上の結合部位はループ 3-4 の 240 番目の lysine 残基を含む部位であることが知られているが、cefazolin の詳細な結合部位はわかっておらず、本結果より同一部位への結合であることが示唆された。

第三章 Tobramycin の母集団パラメータの算出と新生児への個別投与設計

1) 方法

1-1) 対象

母集団パラメータの見積もりは、金沢大学医学部附属病院、石川県立中央病院および国立療養所医王病院に入院中の腎機能の正常な新生児 14 名¹⁰、小児 6 名⁸、肥満小児 5 名⁹の感染患児または、感染が疑われる患児（表 2-1）を対象にした。測定に先立ち小児の場合は両親および本人、新生児の場合は両親にその主旨を説明し理解と承諾を得た。母集団パラメータを求めた各患児の血清中 tobramycin 濃度データを図 2-3 に示す。また、算出した母集団パラメータを使用して 5 名の新生児（表 2-2）に、新たに治療を行った。

1-2) 投与および採血方法

今回新たに治療が行われた新生児 5 名の投与方法を以下に示す。まず、平均 2.57 ± 0.15 mg/kg のブドウ糖液で希釈した tobramycin (Tobracin, シオノギ製薬) を前腕静脈に留置したカテーテルから定流量ポンプ (STC-521, テルモ株式会社) を用いて 30 分間点滴静注した。次に 4 時間後または 12 時間後に微量採血管 (マイクロティナ, No. 5960, Becton Dickinson and Company) で足底穿刺法により採血した。採血した血液は、60 分以上室温放置後遠心して血清を分離した。分離した血清は測定まで冷凍保存した。

その後、投与 12 時間目の採血データと患児の体重から繰り返し投与時の投与量を、最高血清中濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ を越えないよう設定した。そして単回投与後少なくとも 1 日経過した後、設定した投与量を 30 分間点滴静注により 12 時間毎に 5 回繰り返し投与した。採血時刻は投与開始時を起点として 12, 13.5, 36, 37.5, 60 時間後とし、点滴開始後 1.5, 12 時間目の値を、それぞれ peak level, trough level とした。

1-3) 解析方法

1-3-a) 母集団パラメータの推定

血清中 tobramycin 濃度変化を表すモデルとして、式(2-3), (2-4) に示す点滴静

注を含む1コンパートメントモデルを用いた。図2-3より投与開始1時間以後の血清中濃度推移の傾きが、ほぼ1コンパートメントモデルに近似できる。

$$0 < t_i < t_0$$

$$CC_{ij} = \frac{R_{inf,j}}{CL_j} \left(1 - e^{-CL_j t_i / Vd_j / 1000} \right) \quad (2-3)$$

$$0 < t_0 < t_i$$

$$CC_{ij} = \frac{R_{inf,j}}{CL_j} \left(1 - e^{-CL_j t_0 / Vd_j / 1000} \right) e^{-CL_j (t_i - t_0) / Vd_j / 1000} \quad (2-4)$$

ここで CC_{ij} は、患児jの個別パラメータを用いて得られる時間 t_i における推定血清中濃度($\mu\text{g/ml}$)、 $R_{inf,j}$ 、 t_0 、 CL_j 、 Vd_j は、それぞれ患児jの点滴速度($\mu\text{g/min}$)、点滴時間(min)、クリアランス(ml/min)、分布容積(l)を表す。

回帰モデル式は、Kelmanら¹⁵の方法に準じてCLあるいは、分布容積Vdと体重の間に比例関係を組み込んだ式(式(2-5)、(2-6)、以下直線回帰モデルと略す)と、新たにべき関数関係の式(式(2-7)、(2-8)、以下指数回帰モデルと略す)を仮定した。この各モデルの適合性を尤度比検定により検討した。

$$\hat{CL}_j = \theta_1 BW_j \quad (2-5)$$

$$\hat{Vd}_j = \theta_3 BW_j \quad (2-6)$$

$$\hat{CL}_j = \theta_1 BW_j^{\theta_2} \quad (2-7)$$

$$\hat{Vd}_j = \theta_3 BW_j^{\theta_4} \quad (2-8)$$

ここで、 BW_j は患児jの体重(kg)、 θ_r ($r=1, 2, 3, 4$)は固定効果を表すパラメータ、 \hat{CL}_j 、 \hat{Vd}_j は、患児jのCL、Vdの推定値を示す。

個体間変動、個体内変動の誤差モデルは、以下の式を用いた。パラメータおよび測定値の分布型は正規分布を仮定した。

$$CL_j = \hat{CL}_j (1 + \eta_{CL,j}) \quad (2-9)$$

$$Vd_j = \hat{Vd}_j (1 + \eta_{Vd,j}) \quad (2-10)$$

$$CO_{ij} = CC_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (2-11)$$

ここで $\eta_{CL,j}$ は CL の個体間変動に基づく誤差を表し、平均0、分散

VAL(CL)である。

同様に、 $\eta_{Vd,j}$ は Vd の個体間変動に基づく誤差を表し、平均 0、分散 VAL(Vd) である。一方、 CO_{ij} 、 CC_{ij} は、患児 j の時間 t_i における血清中 tobramycin 濃度の実測値および推定値であり、個体内変動に基づく誤差 ϵ_{ij} を含む。 ϵ_{ij} は、平均 0、分散 VAL(ϵ) である。CL、 Vd について相対誤差を仮定したのは、各患児毎にノンコンパートメント解析により CL、 Vd を求めたところ、各患児間の変動幅が大きく、また体重が重くなるに従って偏差が大きくなる傾向が見られたためである。血清中 tobramycin 濃度に関しては、今回解析に用いた実測値の変動幅が 0.77 - 5.82 $\mu\text{g/ml}$ と大きくなかったため絶対誤差モデルを仮定した。

対象とする母集団を以下の 4 つの場合に (解析 A, B, C, D) に分けて解析した。解析 A では、全患児 (表 2-1, 図 2-3) を対象に直線回帰モデルを用いて母集団パラメータを算出した。解析 B は新生児のみを対象に直線回帰モデルを用いて母集団パラメータを算出した。解析 C では、肥満小児を含む小児のみを対象に直線回帰モデルを用いて母集団パラメータを算出した。解析 D では全患児を対象に指数回帰モデルを用いて母集団パラメータを算出した。

肥満小児の体重は、Kato ら²¹ の理想体重換算式をもとに次の換算式を用いて補正した値を用いた。

$$\text{肥満小児の補正体重} = 0.4 \times (\text{実体重} - \text{理想体重}) + \text{理想体重} \quad (2-12)$$

母集団パラメータは、NONMEM²² を用いて算出した。

1-3-b) ベイジアン法による個別パラメータの推定

個別パラメータ CL_j 、 Vd_j の推定は、目的関数 (Obj) に (2-13) 式を用いてベイジアン法プログラム MULTI2(BAYES)²³ により行った。

$$\text{Obj}_j = \frac{(CO_{ij} - CC_{ij})^2}{\text{VAR}_i(\epsilon)} + \frac{(\hat{CL}_j - CL_j)^2}{\hat{CL}_j^2 \text{VAR}_i(CL)} + \frac{(\hat{Vd}_j - Vd_j)^2}{\hat{Vd}_j^2 \text{VAR}_i(Vd)} \quad (2-13)$$

ここで、 $\text{VAR}_i(\epsilon)$ は、測定値 CO_{ij} の誤差分散を表す。パラメータの事前分布には、解析 D により得られた母集団パラメータを使用した。ただし測定値の分散については絶対誤差を、CL、 Vd に関しては相対誤差を仮定した。

1-4) 新生児の個別投与設計

1-4-a) ベイジアン法による血清中 tobramycin 濃度の予測性に及ぼす採血時間の影響

解析 D により得られた母集団パラメータと個々の患児で得られた血清中 tobramycin 濃度測定値 1 点および患児の体重を用いて、ベイジアン法により個別パラメータを推定する際の至適採血時間を検討した。対象患児は表 2-1 に示す新生児のうち投与開始後 12 時間まで採血されていた 7 名である。4, 8, 12 時間それぞれの採血時間の測定値を用いて推定した個別パラメータから予測した血清中濃度と実測値の比較を行った。評価に用いたデータは、1, 1.5, 4, 8, 12 時間のポイントで予測に用いたデータも含んでいる。予測値と実測値の比較は偏りとして mean prediction error (ME) を、精度として mean absolute error (MAE) と root mean squared error (RMSE) の指標を用いて行った²⁴。

1-4-b) 繰り返し投与時の投与設計

5 名の新生児 (表 2-2) を対象とし、tobramycin 1 回投与後、12 時間目の測定値 1 点と患児の体重および解析 D によって得られた母集団パラメータを用いてベイジアン法により個別パラメータを算出し、繰り返し投与時の血清中 tobramycin 濃度を予測した。

2) 結果

2-1) 母集団パラメータの推定

得られた母集団パラメータを母集団および使用モデル別に、表 2-3 に示す。解析 A では、平均値として、 $\hat{C}L_j = 1.50 BW_j$, $\hat{V}d_j = 0.421 BW_j$ という結果が得られたが、同じ母集団を対象として指数回帰モデルを用いた場合 (解析 D) には $\hat{C}L_j = 1.01 BW_j^{1.25}$, $\hat{V}d_j = 0.527 BW_j^{0.843}$ という結果が得られた。解析 A と D で目的関数 (OBJ) の値を比較すると、解析 A では、-84、解析 D では -164 と、解析 D の値が有意に低かった。このことは、広い年齢層にわたる場合は指数回帰モデルがモデル適合性が良いことを示している。

2-2) 新生児の個別投与設計への適用

2-2-a) ベイジアン法による血清中 tobramycin 濃度の予測性に及ぼす採血時間の影響

採血時間として4, 8, 12 時間それぞれ1点を用いてベイジアン法により血清中 tobramycin 濃度を予測した。その予測値と実測値の比較結果を表 2-4 に示す。

ベイジアン推定に用いた採血点間では、ME の結果より、12 時間目の採血点を用いた場合最も偏りが少ないことがわかった。

2-2-b) 繰り返し投与時の投与設計

解析 D により母集団パラメータを用いてベイジアン法による新生児の繰り返し投与時における投与設計を行った結果のうちの2例を図2-4に示す。表2-2に示す患児 2, 3 について初回投与時 (図左) および繰り返し投与時 (図右) の血清中 tobramycin 濃度の予測値と実測値はそれぞれよく一致した。他の3名についても同様な結果が得られた。

今回の投与設計が行われた新生児 5 名について得られた ME は、peak level では $0.46 \mu\text{g/ml}$ ($-0.15, 1.07$), trough level では、 $-0.08 \mu\text{g/ml}$ ($-0.19, 0.04$)であった。MAE は、peak level では $0.66 \mu\text{g/ml}$ ($0.23, 1.09$), trough level では、 $0.14 \mu\text{g/ml}$ ($0.06, 0.23$)であった。RMSE は、peak level では $0.82 \mu\text{g/ml}$ ($-0.10, 1.74$), trough level では、 $0.19 \mu\text{g/ml}$ ($-0.02, 0.41$)であった。ただし括弧内は95% 信頼区間を示す。本結果より、peak level おいて、ME の平均値には $0.46 \mu\text{g/ml}$ とわずかに正の偏りが見られた。またRMSE の値の95% 信頼区間の上限は $1.74 \mu\text{g/ml}$ と治療濃度に比してやや大きい値となり、投与設計時に注意を要すると思われる。しかし、trough level は良く予測されており、本方法によって新生児の血清中 tobramycin 濃度がほぼ精度良く予測できることが示唆された。

第四章 考察

本編では、新生児、小児における体内動態変動因子のうち、特に血清蛋白結合率、体重に注目してその Vd と CL に対する影響を定量化した。

まず、新生児において高値を示すことがある血清中の bilirubin と cefazolin の血清蛋白結合相互作用について検討した。そして、相互に競合阻害するという仮定により両者の結合定数が算出できた。この事は、生体内で相互に阻害関係にあることを強く示唆している。また、本データは bilirubin 値の高い新生児の治療の際に cefazolin と bilirubin の血清蛋白結合相互作用を予測するための基礎データとなるとともに、その Vd の変動を予測するための有力な情報となると考えられる。

新生児、小児、肥満小児の tobramycin 1 回投与後の血清中濃度推移のデータを用いて、この年齢を通しての母集団パラメータを算出した結果、広範囲な年齢層においては体重と Vd および CL の間には直線回帰モデルより指数回帰モデルの適合性が良く、指数回帰モデルの有用性が示唆された。このことは Friis-Hansen²⁵が、細胞外液量が体重と指数回帰関係にあるとした経験式を提示していることから支持される。

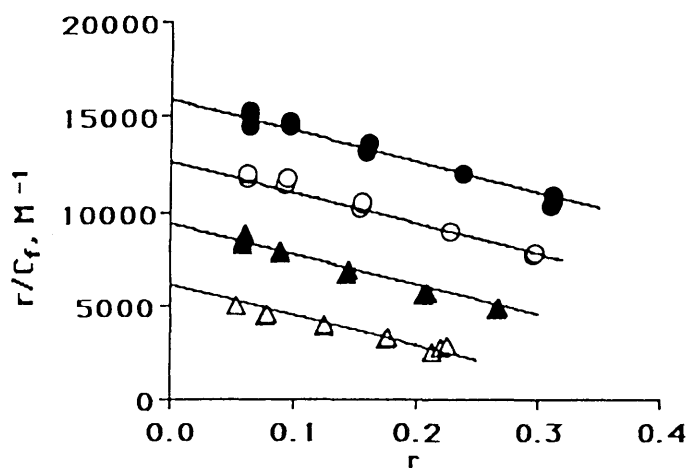
一方、Kelman ら¹⁵は母集団を新生児群と小児群に分け、直線回帰モデルを用いて gentamicin の母集団パラメータを算出している。我々の解析 B の結果は (表 2-3) は、 $\theta_1(\text{ml}/\text{min}/\text{kg})$, $\theta_2(\text{l}/\text{kg})$ についての Kelman らの報告値 (平均 1.2, 0.42) とほぼ同じ値を示した。また、解析 B と D を用いて、新生児の繰り返し投与の予測性に及ぼす使用母集団パラメータの影響を比較したが有意差は認められなかった。従って、新生児群と小児群を分けて母集団パラメータを求め、そのパラメータを各群の投与設計に応用するならば、指数回帰モデルを用いなくても十分、投与設計は可能であるが、その境界領域ではどのパラメータを使用するのが良いか問題が残る。著者の指数回帰モデルは新生児から肥満小児をも含む小児全般に渡って統一的なパラメータを使用できるため、新生児と小児の境界領域の患児の場合にも、特別に考慮することなく個別パラメータを求められることが期待される。

解析 D の母集団パラメータを用いてベイジアン法を適用する場合の採血時間の影響を検討した結果、新生児について tobramycin 投与後 12 時間目の採血点を用いると偏りが最も少なく、有用であることが示唆された。12 時間目の値は

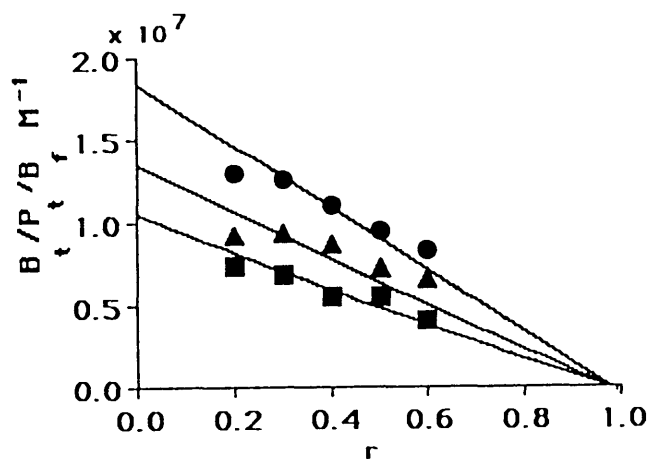
trough levelでの蓄積性の指標となるという点を考慮すると、新生児における個別パラメータの推定には tobramycin 投与後 12 時間目の採血点を用いるのが良いと判断される。しかしベイジアン法による個別投与設計を、新生児の繰り返し投与の場合に適用した結果、推定濃度は実測値とほぼ良く一致しているものの peak level ではわずかに過大に予測する傾向を示した。この理由としては、今回薬物速度論モデルとして 1 コンパートメントモデルを採用したことが考えられる。Murray ら²⁶は tobramycin に関して 2 コンパートメントモデルのほうが 1 コンパートメントモデルより予測性が良いと報告している。しかしながら、MAE, RMSE の予測精度の結果から 1 コンパートメントモデルでも本検討範囲内では十分有用性が高いことがわかった。

肥満小児については理想体重を用いて計算を行った。これはアミノ配糖体抗生物質の主たる分布領域である細胞外液の用量が、脂肪組織においては他の組織の 40% にすぎないことが報告されているからである²⁷。したがって著者の方法は肥満小児について肥満度を考慮することにより十分適用できることが期待される。

以上の検討の結果、個々の患児の 1 点の採血データと体重値から患児個別の血清中 tobramycin 濃度をベイジアン法を用いて予測する本方法は、頻回採血が困難な新生児において特に有用であるとともにアミノ配糖体抗生物質に特有の腎毒性、耳毒性の回避の一助となると考えられる。



☒ 2-1 Scatchard plots of the binding of cefazolin to HSA in presence or absence of various molar ratios of bilirubin. (Bt:Pt). The points represent experimental results, and the solid lines were generated from eq 2-1 using $K_a = 16200 \text{ M}^{-1}$ and $n = 0.978$. The molar ratios of Bt:Pt were: (●) 0; (○) 0.2; (▲) 0.4; and (△) 0.6.



☒ 2-2 Scatchard plots of the binding of bilirubin to HSA in presence or absence of various molar ratios of cefazolin. The points represent the mean of the experimental results ($n = 2-3$) and the solid lines were generated from eq 2-2 using $P_t = 3 \times 10^5 \text{ M}$, $K_a = 16200 \text{ M}^{-1}$, $K_b = 1.88 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $n = 0.978$. The molar ratios of cefazolin to HSA were: (●) 0; (▲) 1.0; and (■) 2.0.

表 2-1

Patient Characteristics for the Population Pharmacokinetic Analysis

	Newborn ^{a)} infants	Normal ^{b)} children	Obese ^{c)} children
Number of patients	14	6	5
Males/Females	13/1	2/4	4/1
Age ^{d)}	8.6±6.6 days	6.8±3.4 yr	6.8±3.0 yr
(range)	(2-28)	(3.0-12.3)	(1.8-9.3)
Body weight ^{d)} , kg	2.304±0.720	19.6±7.3	42.2±18.8
(range)	(1.355-3.769)	(13.4-29.8)	(22.4-63.0)
Ideal body weight ^{d)} , kg	—	—	25.0±9.9
(range)	—	—	(13.0-35.5)
Scr ^{d)} , mg/dl	0.68±0.35	0.68±0.08	0.62±0.15
(range)	(0.22-1.45)	(0.60-0.80)	(0.40-0.80)
BUN ^{d)} , mg/dl	9.7±6.6	16.0±3.7	12.6±2.2
(range)	(1.0-24.5)	(12.0-22.0)	(9.0-14.6)
Dose, mg/kg	2.0, 2.5	2.0	1.51-2.00
Total number of data points	69	36	30

Scr: serum creatinine, BUN: blood urea nitrogen.

^{a)} Ref. 10, ^{b)} Ref. 8, ^{c)} Ref. 9, ^{d)} Mean ± SD

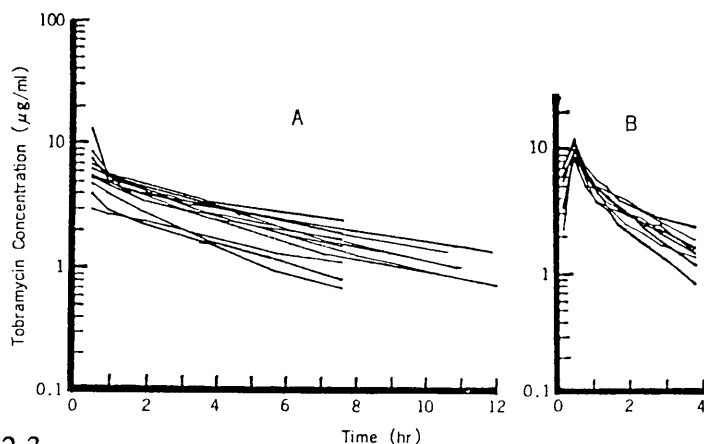


图 2-3

Serum concentration-time profiles after a 30 min iv drip infusion of tobramycin in newborn infants (panel A) and children (panel B). Detailed patient characteristics are listed in Table 2-1.

表 2-2

Patient Characteristics for the Evaluation of the Bayesian Analysis

Patient No.	1	2	3	4	5
Sex	M	M	F	M	M
Body weight at birth, g	1360	3505	1690	2018	1716
Age, day	4	6	10	9	10
Body weight in study, g	1230	3532	1500	1812	1562
Scr, mg/dl	1.9	1.0	1.5	0.8	0.9
BUN, mg/dl	17	5	25	4	3
Dose at 1st iv infusion, mg/kg	2.44	2.41	2.67	2.76	2.56
Dose during multiple dosing, mg/kg	2.44	2.46	2.33	2.21	2.24
Total number of data points	2	4	5	5	4

Scr: serum creatinine, BUN: blood urea nitrogen.

表 2-3

Results of Population Pharmacokinetic Analysis^{a)}

Analysis	A	B	C	D
Population	Newborn infants + Children	Newborn infants	Children	Newborn infants + Children
Model	Linear	Linear	Linear	Power
θ_1 , ml/min/kg	1.50	1.23	2.23	1.01
θ_2				1.25
θ_3 , l/kg	0.421	0.475	0.308	0.527
θ_4				0.843
VAR (CL)	0.194	0.0584	0.0310	0.0435
VAR (Vd)	0.0488	0.0227	0.00733	0.0209
VAR (ϵ), ($\mu\text{g/ml}$) ²	0.0615	0.0553	0.0329	0.0434
OBJ	-84 ^{b)}	-64	-109	-164 ^{b)}

^{a)} θ_i represents the fixed effect parameter. VAR (CL) and VAR (Vd) represent the variances of inter-individual variations of CL and Vd, respectively. VAR(ϵ) represents the variance of intra-individual variations.

^{b)} The difference of objective function (OBJ) between analysis A and D is greater than critical value of 10.60 of χ^2 distribution ($P < 0.005$, degree of freedom 2).

表 2-4

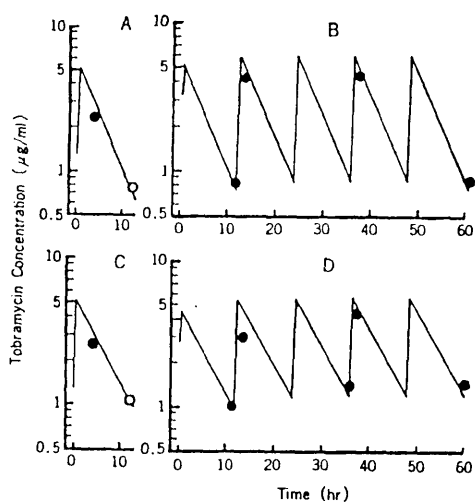
Effect of Sampling Time on Predictive Performance of the Bayesian Method

Sampling Time (hr)	ME	MAE	RMSE
	mean (95% c. i.) ($\mu\text{g/ml}$)	mean (95% c. i.) ($\mu\text{g/ml}$)	mean (95% c. i.) ($\mu\text{g/ml}$)
4	-0.26 (-0.35, -0.17) *	0.28 (0.21, 0.36)	0.36 (0.13, 0.60)
8	-0.16 (-0.27, -0.06) *	0.27 (0.20, 0.34)	0.34 (0.11, 0.57)
12	-0.10 (-0.22, 0.02)	0.28 (0.20, 0.35)	0.36 (0.11, 0.60)

Values in parentheses are lower and upper 95% confidence interval.

* Paired t-test, $P < 0.01$.

图 2-4



Typical serum tobramycin concentration-time profiles after a single dose and drug in multiple dosing in newborn infants. Panel A shows the serum tobramycin concentrations for the patient No.2 after a single dose (2.41 mg/kg). Panel B shows the serum tobramycin concentrations for the patient No.2 during multiple dosing every 12 hr (2.46 mg/kg). Panel C shows the serum tobramycin concentrations for the patient No.3 after a single dose (2.67 mg/kg). Panel D shows the serum tobramycin concentrations for the patient No.3 during multiple dosing every 12 hr (2.33 mg/kg). The patient numbers correspond to that in Table 2-2. The open circles represent the points used to estimate the individual parameters. The closed circles are the observed concentrations and the curves were drawn by eq 2-3 and eq 2-4 using the parameters estimated by the Bayesian method.

第 III 編 肝機能変化に伴う血清中薬物濃度の変動

第一章 緒言

生体内からの脂溶性の高い薬物のクリアランスに主に関与しているのは肝臓であり肝機能変化による血清中濃度の変動が問題となる。一般的には、 f_p が上昇すると、肝におけるクリアランスが増大する傾向にあるがこの特徴は、薬物によって一様でない。個々の臓器クリアランス (CL_{org}) は、その組織中での薬物の真の処理能力 (組織固有クリアランス: CL_{int}^u) , 組織へ流入する血流速度 (Q) , f_p によって決定され、その関係式は式 (3-1) で表される²⁸。

$$CL_{org} = \frac{Q \cdot CL_{int}^u \cdot f_p}{Q + CL_{int}^u \cdot f_p} \quad (3-1)$$

式 (3-1) より明らかなように、種々の薬物は、 $CL_{int}^u \cdot f_p$ と Q の、大小関係から血流律速とクリアランス律速の薬物に分けられる。 Q が $CL_{int}^u \cdot f_p$ より小さいときは、 CL_{org} は CL_{int}^u や f_p には依存しない。即ち血流律速となる。逆に $CL_{int}^u \cdot f_p$ が Q より小さいときは、 $CL_{org} \equiv CL_{int}^u \cdot f_p$ となり、 CL_{org} は、 f_p と $CL_{int}^u \cdot f_p$ の変化に影響を受けることがわかる。 CL_{int}^u の変動因子としては、高い薬物濃度によって酵素反応や担体輸送が飽和する場合 (非線形性) の他、薬物間相互作用、動物種、年齢、性別および疾患の影響などがあげられる。一方 f_p の変動因子としては、薬物濃度の変化、薬物間相互作用、病態、手術、妊娠、年齢、種差などがあり、患者個別にパラメータを求めることが望ましい。

抗てんかん薬として臨床上汎用されている phenytoin は、クリアランス律速である事が知られている。また、肝硬変患者の血清クリアランスが肝機能正常者に比べ上昇するという傾向が報告されている²⁹。これは f_p の上昇による CL の増加が肝細胞酵素活性の低下をうわまわっている事が一因と考えられる。更に、phenytoin は、治療のための血清中濃度範囲が $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ と狭く、また治療域内で代謝過程に飽和が見られるため、投与量と血清中濃度の関係は非線形を示すなど投与量の決定が困難な薬剤の一つである。このような薬物の投与量 (D) と定常状態での血清中濃度 (C_{ss}) の関係は最大代謝速度 (V_{max}) とミカエリス定数

(Km) を用いて次式で記述される³⁰.

$$D = \frac{V_{\max} \cdot C_{ss}}{K_m + C_{ss}} \quad (3-2)$$

定常状態における血清中濃度データを用いて、投与設計を行う為には患者個々の Vmax, Km を推定する必要がある。式 (3-2) より少なくとも投与量の異なる定常状態の血清中濃度データが 2 点あれば、患者個別のパラメータが求められる。式 (3-2) を逆数プロットすることによりグラフ上で Vmax, Km を算出できる方法が Ludden らをはじめ多くの研究者により提示されている³¹⁻⁴⁰。しかし、臨床では、定常状態の血清中濃度を 2 点得ることは難しく、特に phenytoin の様な半減期の長い薬物では、投与設計の空白期間が生じることになる。この事を解決するために population pharmacokinetics⁴¹ およびその結果を用いた個別パラメータ推定法のベイジアン法が phenytoin に適応されている⁴²。Phenytoin に対して population pharmacokinetics 解析が行われた例としては、主に外国人を対象とした Sheiner⁴¹, Grasela⁴³, Miller⁴⁴ らの、日本人のみを対象とした堀⁴⁵, 湯川ら⁴⁶の報告がある(表 3-1)。そこで本編では、まず第二章で、既に得られている母集団パラメータを利用して、Ludden らの方法の問題点を克服し定常状態における 1 点の血清中濃度データから患者個々の phenytoin の代謝パラメータ推定する方法の開発を行った(グラフ法)。また、臨床に応用しやすいようにグラフ化することにより視覚化も試み利用者の便宜をはかった。

堀ら⁴⁵の算出した母集団パラメータでは、その個体間変動の見積もりにおいても Vmax 値については 10-40%, Km については 40-70% の未知又は特定できない因子がある。Km 及び fp 値は、薬物間相互作用や血清中内因性物質によって変化する。Vmax に対しては体重、年齢、酵素量によって変動すると考えられる。phenytoin の場合の主たる代謝経路は 5 位のフェニル基の水酸化であり、それを媒介する酵素である肝の cytochrome P-450 の活性に影響を与える因子を考慮する必要がある³⁰。これらの変動因子を特定できれば、各個人のより適合した投与設計を行えると考えられる。

Leppik ら⁴⁷ は老齢患者における phenytoin の投与設計については基礎的検討例が少なく未だ確立されていないと述べている。動物実験ではラットにおいて生後 1 日から 8 週齢までの幼少期の phenytoin の分布の変動については研究されて

いるが⁴⁸ 8週齢以上になったときの体内動態の変動については検討されていない。また、phenytoinの体内動態の変動因子としてはその主たる処理臓器である肝臓の変化が影響を与える条件の場合は投与設計も注意する必要があると思われる。加齢による β -ラクタム抗生物質⁴⁹や塩基性薬物⁵⁰について体内動態パラメータの変動が考えられ、特に分布動態について詳しく報告されている。しかし、クリアランス律速でかつ代謝に飽和過程がある薬物について加齢による影響を検討した例は少ない。一方、ヒトにおいてはphenytoinの代謝には飽和過程が存在することが知られているがラットにおいては血清中動態が非線形性を示したという報告^{51,52}や線形であるとして解析した報告^{48,53}がある。そこで定常状態下での投与設計においても重要なパラメータであるCL又はVmaxに注目し、その代謝パラメータ値が加齢によって変動するか検討した。

主に肝で代謝される薬物は肝障害時にその体内動態が変化する。PhenytoinについてもItohら⁵³が肝障害モデルラットと腎障害モデルラットを用いて体内動態が遅延することを報告している。近年、肝切除手術が臨床では頻繁に行われているが、しかしphenytoinの肝部分切除によるクリアランスの変動については検討された例は少ない。肝臓の重量が変動する場合のモデル動物として肝部分切除ラット⁵⁴を用い、phenytoinの体内動態の変化及び肝の再生に伴う肝cytochrome P-450の回復について8週齢と50週齢ラットを用いて検討した。phenytoinの個別投与設計を行う上で重要なのは患者個々のパラメータ値をいかにして予測するかであり、個々のパラメータ値を反映する指標を検索するため、各種生化学検査値とラット個々の代謝パラメータ(Vmax)との相関関係をあわせて検討した。そこで第三章では、phenytoinの投与設計において体内動態パラメータVmax, Km, fpに対して体重、加齢、肝切除等がいかに影響するかを定量的に明らかにすることを目的とした。

fpの変動は、phenytoinの代謝パラメータ(Vmax, km)の変動を惹起すると考えられる。多くのでんかん患者は、抗てんかん薬の併用療法を受けており、特にphenytoinとvalproic acidの併用療法は多い。phenytoinとvalproic acidは、ともに血清蛋白結合率が高く、しかも血清蛋白結合に関して相互作用があることが知られている⁵⁵⁻⁵⁸。しかし、valproic acidと同じ脂肪酸の構造を持つ遊離脂肪酸(FFA)によりphenytoinのfpがどの様に変動するかは知られていない。一方、内因性物質である遊離脂肪酸(FFA)は、いくつかの酸性薬物に対して、その血清

蛋白との結合性を变化させることが知られており⁵⁹⁻⁶², valproic acid が FFA によって血清蛋白上から追い出されることが報告されている⁶³⁻⁶⁶. しかし, phenytoin と valproic acid の相互作用に及ぼす FFA の影響を検討した例は未だ報告されていない. 血清中の FFA 値は, 絶食, 労働, 糖尿病, 感染症等のさまざまな条件下で変動しやすいことが知られており病態での phenytoin の体内動態パラメータの変動を予測する上で重要である^{63,67}. 本編の第四章では, FFA 中の主な構成成分である palmitic acid を用いて, FFA の phenytoin と valproic acid 血清蛋白結合相互作用におよぼす影響の検討した.

1)方法

1-1)患者データの特徴

対象は金沢大学医学部附属病院神経科精神科を受診され、過去3年間の TDM 日常業務から得られた患者データで1回目と2回目の phenytoin 血清中濃度測定時に体重変化のなかった場合 34 例の患者データを用いた。データのその他の特徴は、表 3-2 に示した。

得られた血清中濃度データは、同一投与量を1カ月以上服薬している患者データであり、採血時間は服薬後少なくとも2-4時間経過したものである。

アレビアチン末の F を求めるために、以下の換算式を誘導した。

$$\frac{D_F}{C_{ss,F}} + \frac{D_F}{K_m} = \frac{F_P}{F_F} \left(\frac{D_P}{C_{ss,P}} + \frac{D_P}{K_m} \right) \quad (3-3)$$

$$\frac{V_{max}}{D_P} = F_P \left\{ \frac{C_{ss,F}}{C_{ss,P}} \left(\frac{V_{max}}{F_F D_F} - 1 \right) + 1 \right\} \quad (3-4)$$

ここで、 C_{ss} は、定常状態における血清中 phenytoin 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)、 D は、投与量 (mg/kg/day) であり、添字の P は散剤 (アレビアチン末) が投与されていた場合、 F は同一患者において細粒剤変更後の場合であることを示す。 V_{max} , K_m の単位はそれぞれ mg/day 、および $\mu\text{g/ml}$ である。ただし、細粒剤はほぼ完全に吸収されることが報告されているため⁴⁵ $F_F = 1$ とした。式 (3-3)、(3-4) から得られた値は、0.864, 0.845 であった (図 3-1, 3-2)。ただし、同一患者において剤形変更前後で phenytoin の体内動態パラメータは変わらないとしている。対象患者は、phenytoin の散剤を服用後、細粒剤に変更された 27 例の患者である。年齢は 36 ± 13 才、体重は 60 ± 13 kg、散剤の投与量は 281 ± 41 mg/day 、細粒剤の投与量は 265 ± 39 mg/day であった。この値は、堀ら⁴⁵の報告値と一致する。よって、本章では、アレビアチン末の F を 0.85 とした。

1-2)シミュレーションデータの作成

V_{max} , K_m , D について Box-Muller 法⁶⁸により正規乱数を発生させ 1000 個のデータセットを作成した。 V_{max} , K_m の平均値 (6.26 mg/day/kg , 2.98 $\mu\text{g/ml}$) および標

準偏差 (1.06, 1.10) は堀らの報告値⁴⁵を用いた。投与量は 4.18 ± 1.15 mg/day を用いた。シミュレーションの方法は Toscano の方法⁶⁹に従って行った。個々の D - C_{ss} のデータセットの作成は式 (3-5) から算出した。

$$C_{ss} = \frac{K_m \cdot D}{V_{max} - D} \quad (3-5)$$

ただし、以下の条件 ($1 < K_m < 25$ μ g/ml, $0 < C_{ss} < 50$ μ g/ml, $0 < D$ mg/day/kg, $0 < V_{max}$ mg/day/kg) から外れたデータは除外した。データの平均個数は 828 ± 9 個である (n = 3)。

C_{ss} には、試料採取時および測定値の誤差を考慮した一様乱数で変動係数 10 % の誤差を付けた値とした。

1-3) 予測方法

Ludden らの方法³³に従い D/C_{ss} に対して D をプロットすると、目的の C_{ss} を得るための phenytoin の投与量を得ることができる。代謝パラメータ (V_{max}, K_m) のうちいずれか一方を母集団パラメータの平均値に固定することにより 1 点の D - C_{ss} から個人のパラメータを推定できる。(図 3-3)

つまり、

方法 1 は、K_m 値を母集団パラメータの平均値に固定し、母集団パラメータの平均値でプロットした直線に最初のポイントを通り平均値の直線に平行に線を引く。Y 軸の切片が、その患者の V_{max} (V_{max}') となる方法である。

方法 2 は、V_{max} 値を母集団パラメータの平均値に固定し、母集団パラメータの平均値でプロットした直線の Y 軸との交点と最初のポイントを通る直線を引く。この直線の傾きの絶対値が、その患者の K_m (K_m') となる方法である。

方法 1 または 2 で、個々の K_m' ないしは V_{max}' を計算した後、希望する C_{ss} (C_{ss,2}) を得るための D を求める。予測のための C_{ss,2} は、 $5 < C_{ss,2} < 20$ μ g/ml で、一様乱数を発生させて作成した。シミュレーションによってあらかじめ得られた C_{ss,2} と予測値の差が 5 μ g/ml 以内であれば予測許容範囲内であるとした。

Sheiner らの求めた欧米人での母集団パラメータ⁴¹についても同様な検討を行った。

1-4) 投与設計法適応規準の推定

1 点の血清中濃度データよる phenytoin の投与設計法の予測精度を上げるために本方法の適応範囲を新たに決定した。第 1 に phenytoin の投与量が最大代謝能に近い場合には、 $V_{max} - D_2$ 値が小さくなり、phenytoin 血清中濃度の予測誤差が大きくなる。その量的な関係を明らかにするために患者データの投与設計法適応規準 (D と V_{max} または V_{max}' との関係) について検討した。第 2 に、患者データの投与設計法適応規準 (V_{max}' および K_m' の範囲の設定) の推定を行った。 K_m を母集団平均パラメータに固定した場合、シミュレーションデータ群を V_{max}' の母集団平均値を中心にして 1 SD ごとの範囲に区切って、それぞれの範囲で予測率を計算した。平均予測率が 80 % を超える場合の V_{max}' と K_m' の範囲を求めた。 V_{max} を母集団平均パラメータに固定した場合も K_m を母集団平均パラメータに固定した場合と同様に行った。

1-5) 評価方法

予測性の評価には、ME, MAE, RMSE²⁴を用いた。また、ベイジアン法による予測は、Higuchi らの開発したベイジアン推定プログラム (PEDA)⁷⁰ を利用した。母集団パラメータには堀らの値⁴⁵を用いた。

2) 結果

2-1) 患者データの投与設計法適応基準の推定

患者データの投与設計法適応規準 (D と V_{max} または V_{max}' との関係) について検討した。 K_m を固定した場合は、 $V_{max}' < 0.83$ で予測率が 80 % を越えた。一方 V_{max} を固定した場合は、 $V_{max} < 0.88$ であった。次に、患者データの投与設計法適応規準 (V_{max}' および K_m' の範囲の設定) の推定を行った結果を表 3-3 に示す。これから、 K_m を母集団平均パラメータに固定した場合の平均予測率が 80 % を超える V_{max}' の範囲は、 $mean - 3 SD < V_{max}' < mean + 1 SD$ 、 V_{max} を母集団平均パラメータに固定した場合の平均予測率が 80 % を超える K_m' の範囲は、 $mean - 2 SD < K_m' < mean + 2 SD$ であった。

本法において血清中 phenytoin 濃度を予測する際には、母集団パラメータの K_m を固定して予測する方法と、 V_{max} を固定して予測する方法があることは先にも述べた。これまでどちらの方法を使ったほうが予測精度が高くなるのかという点についてはあいまいな点が多かった。本法において血清中 phenytoin 濃度を予測する際、表 3-3 によって適切な患者データの投与設計法適応規準を設定すればこれらの規準をもとにしてサンプル母集団をいくつかのデータセットに分けることができる。図

3-4はこのことをグラフ化したものである。 $\text{mean} - 3 \text{SD} < V_{\text{max}}' < \text{mean} + 1 \text{SD}$ と、 $\text{mean} - 2 \text{SD} < K_m' < \text{mean} + 2 \text{SD}$ との直線で区切られた領域を①②③④⑤⑥と番号付けした。 ①②③④の範囲は K_m を母集団平均パラメータに固定する方法と V_{max} を母集団平均パラメータに固定する方法の両方、あるいはいずれかで高い予測性が得られる範囲である。 シミュレーションデータセットについて①②③④の範囲に入るデータを対象として、それぞれの範囲に入るデータで K_m を母集団平均パラメータに固定した場合と V_{max} を母集団平均パラメータに固定した場合で予測率を計算し、両者を比較した。この結果を表3-4に示した。 ①③④の範囲では、 K_m を母集団平均パラメータに固定した方法の方が V_{max} を母集団平均パラメータに固定した方法よりも予測率が高く、 ②の範囲では V_{max} を母集団平均パラメータに固定した方法の方が予測率が高いことがわかった。

サンプル母集団による患者データの投与設計法適応規準の設定及び予測方法の優先性の検討結果から、図3-5を考案した。ここで、用いている判断基準を表3-5にまとめた。さらに Sheiner らの得た母集団パラメータ⁴¹でも同様の検討を行った結果得られた判断基準も示す。

2-2) グラフ法による実測データの retrospective な解析

本グラフ法の有用性を TDM 日常業務から得られたデータを用いて retrospective に評価した。また、1点の測定値をもとに phenytoin の個別投与設計を行う方法としてその有用性が多く報告されているベイジアン法⁷¹と比較検討した。

表3-2に示すのべ35例を対象に K_m を母集団平均パラメータに固定した場合（方法1）、 V_{max} を母集団平均パラメータに固定した場合（方法2）、ベイジアン法を用いた場合、図3-5により35例中で投与と判定された25例の場合、およびこの25例で、ベイジアン法を用いた場合の5つのケースについて、予測率、ME、MAE、RMSE²⁴を計算し、予測精度の比較を行った（表3-6）。図3-5を用いた方法のほうが K_m を母集団平均パラメータに固定した場合、あるいは、 V_{max} を母集団平均パラメータに固定した場合よりも予測精度が優れていた。またベイジアン法にも匹敵する予測精度が得られた。

3) 考察

有効な薬物療法のため、より少ない血清中薬物濃度データから投与設計を行なう

方法の確立が望まれてきた。この目的においては、従来からベイジアン法²⁷⁾の有用性が言及されてきている。しかし、最近ではTDMの業務量も増大し、かつ複雑なものになってきているので、グラフ法もまた複雑な計算を避けることができる等、有用な面が多いと考えられる。そこで、本臨床研究では、簡便で信頼性の高いphenytoinの投与設計法を確立するためグラフ法による1点の投与量-血清中濃度データから次回投与量の算出を行なう方法の改良を試みた。改良点は、表3-5に示したような患者データの投与設計法適応規準を設定したことである。患者データの投与設計法適応規準としてKmを母集団平均パラメータに固定する場合は $D_2 < 0.83 \cdot V_{max}'$ 、 V_{max} を母集団平均パラメータに固定する場合は $D_2 < 0.88 \cdot V_{max}$ を導いた。またさらに安全性を考慮したグラフ法における患者データの投与設計法適応規準として、患者データの投与設計法適応規準(Kmを母集団平均パラメータに固定する場合は、 $mean - 3SD < V_{max}' < mean + 1SD$ 、 V_{max} を母集団平均パラメータに固定する場合は $mean - 2SD < V_{max}' < mean + 2SD$)も追加した。

Kmを母集団平均パラメータに固定する方法と V_{max} を母集団平均パラメータに固定する方法の選択はこれまでも議論の対象となってきた⁴²⁾。 V_{max} の変動要因は肝臓での代謝酵素活性の個体差であり、またKmは肝臓での代謝酵素との親和性の指標であり、同一動物種内では変化しないと考えられる。しかし、みかけの親和性は肝臓内で酵素に作用する薬物濃度に左右されることから、血清中濃度を指標とした時は、薬物の肝抽出率や遊離型薬物濃度の違いによる個体間変動を伴うことが予想される。これまで、Kmを母集団平均パラメータに固定する方法と V_{max} を母集団平均パラメータに固定する方法の優劣はあいまいなものが多かった。

そこで、本章で推定した患者データの投与設計法適応規準を考慮してKmを母集団平均パラメータに固定する方法と V_{max} を母集団平均パラメータに固定する方法の優先性について検討したところ、表3-4に示すようにKmを母集団平均パラメータに固定する方が対象ポイント数こそ減るものの、 V_{max} を母集団平均パラメータに固定するよりも予測精度が高いことがわかった。これらの結果から著者は図3-5の本方法を考案し、この図3-5に基づいたグラフ法によってサンプル母集団の予測精度を検討したところ予測性が80%を越え有用性が高いことが示唆された。このグラフ法の有用性を実測データを用いてretrospectiveに検討したところ(表3-6)、ベイジアン法と同等の予測精度を得ることができたので、用いた母集団パラメータおよび患者データの投与設計法適応規準の妥当性が示唆された。ここで患者データの投

与設計法適応規準を満たさず、グラフ法の適用外と判定された35例中の10例についてはベイジアン法の適用や測定値の再検査を行なう等による詳細な検討が必要である。この実測データを用いたグラフ法の有用性の検討は retrospective なものであり、積極的に有効血清中濃度の範囲に入れるための投与設計法を行なった訳ではないので、さらに prospective な検討を加えてグラフ法の有用性および患者データの投与設計法適応規準の妥当性を確認することがこれからの課題である。

本グラフ法の特徴の1つは、図3-4のように患者データの投与設計法適応規準をグラフ化したことにより、異常データの除外を簡便にし、さらにいくつかの重要な情報を視覚的にまた直感的に知る事ができるようにしたことである。例えば、図3-4で⑤の範囲の右上方にプロットされた患者は投与量に比して血清中濃度が低い例であり、ノンコンプライアンスの疑いがあると考えられる。また、⑥の範囲に入る患者では、その患者に固有の V_{max} が小さいために僅かの投与量の変化でも血清中濃度が大きく変わり、投与設計の際に特に注意が必要な例であると考えられる。これらの例のようにただ単に異常データとして除外できるだけでなく除外しなければならなかった原因がある程度わかれば、それ以降の患者の薬物療法にも有効である。また、過去に phenytoin の代謝の人種差が報告されているので⁴³、さらにこのグラフ法の有用性を欧米人の母集団パラメータを使って検討したところ、このグラフ法の予測性は、欧米人の場合では90%以上であることが分かった。この事から欧米人の phenytoin 投与設計に際しても欧米人の母集団パラメータを用い、日本人とは別の欧米人の場合の適切な患者データの投与設計法適応規準を設定すればこのグラフ法は十分に有用である事が示唆された。

患者データの投与設計法適応規準値や K_m' , V_{max}' の範囲を決定する際に、今回は、予測誤差が $\pm 5 \mu\text{g/ml}$ 以内である事を規準とした。過去には、 $\pm 3 \mu\text{g/ml}$ を指標にした報告がある⁷²。今回 $C_{ss,2}$ の範囲を $5 < C_{ss,2} < 20 \mu\text{g/ml}$ で決定した事を考えると臨床応用では最低限許容できる範囲ではないかと考えられる。

このグラフ法を使用する際の制限事項については、まず V_{max} や D の値を体重あたりで計算するため、患者の正確な体重データが必要な事である。さらに1回目の血清中濃度と2回目の血清中濃度の差 ($C_{ss,2} - C_{ss,1}$) が $10 \mu\text{g/ml}$ 以上であるときは予測精度が悪くなる傾向があるので $5 < C_{ss,2} - C_{ss,1} < 10$ の範囲で予測すべきである。

また、phenytoin は他の薬物と併用する事も多い。投与量設定中に併用薬の変更が無い症例についてのみ本臨床研究では評価している。つまり、1回目と2回目の投

与の間では、その患者のパラメータは変わらないと仮定しているので、1回目と2回目の間で併用薬の種類や量が変わると予測できない可能性があるので注意が必要である。更に、今回の臨床研究は成人だけを対象にしたので、15才以下の小児においては加齢に伴って K_m は大きくなり、体重あたりの V_{max} は減少するという⁴⁵ 報告があるので注意を要する。

第三章 肝部分切除ラットにおける加齢と肝再生時の phenytoin の体内動態

1-1) Phenytoin のfpの変動に及ぼす加齢の影響

薬物の体内動態を決定する重要な因子である fp の非線形性の有無及び加齢による影響を検討した。血清中 phenytoin 総濃度に対する fp の変化を図 3-6 に示した。本実験の測定濃度範囲内で総血清中薬物濃度を变化させた時 8 週齢，50 週齢共に fp は濃度に依存しなかった。また，fp は 8 週齢に比較して 50 週齢のほうが有意に高い値を示した。また，8 週齢ラットの値は Itoh ら⁵³の報告値 0.227 と一致していた。

1-2) 加齢によるラットの phenytoin の体内動態変化

加齢により体内動態に差があるかを検討するため 8 週齢と 50 週齢のラットに phenytoin 20 mg/kg または 2 mg/kg を投与後の血清中薬物濃度推移の結果を図 3-6 に示した。血清中薬物濃度は 90 分以後において 8 週齢のラットの方が有意に低くなった。また，血清中薬物濃度推移は，共に非線形性を示した。

1-3) 体内動態パラメータ値 (Km, Vmax) の見積りと加齢による変動

血清中薬物濃度推移が非線形代謝過程を含む 2-コンパートメントモデルに従うとして(図3-7)，式(3-6)，(3-7)にラット個別の血清中薬物濃度データに非線形最小二乗法プログラムNONLIN¹⁷を用いて同時あてはめを行い各パラメータ値を算出した。

ただし，この場合中枢コンパートメントの代謝は遊離薬物濃度にかかると仮定した。

$$\frac{dC_1}{dt} = -k_{12}C_1 - \frac{V_{\max}C_1f_p}{V_1(K_m + C_1f_p)} + k_{21}C_2 \frac{V_2}{V_1} \quad (3-6)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k_{12}C_1 \frac{V_1}{V_2} - k_{21}C_2 \quad (3-7)$$

ただし，Vmax：最大代謝速度 (μg/min/kg)，Km：ミカエリス-メンテン定数 (μg/ml)，V1：中枢コンパートメントの分布容積 (ml/kg)，V2：末梢コンパートメントの分布容積 (ml/kg)，C1：中枢コンパートメントの濃度 (μg/ml)，C2：末梢コンパートメントの濃度 (μg/ml)，k12：速度定数 (1/min)，k21：速度定数 (1/

min) である。

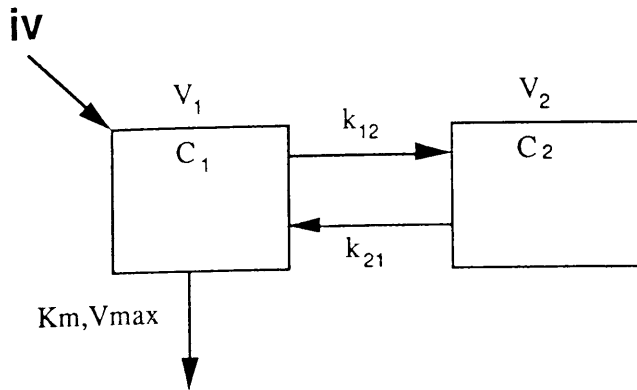


図3-7 Schematic representation of 2 compartment model with Michaelis-Menten processes
V: volume of distribution, C: drug concentration, V_{max} : maximum elimination rate, K_m :
Michaelis constant, K_{12} and K_{21} : apparent 1st order elimination rate constants.
Subscript 1 and 2 indicate the central and peripheral compartment, respectively.

得られた値を表 3-7 に、計算曲線を図 3-6 に示した。同時あてはめをした実線は実測値とよく一致していた。肝代謝酵素の親和性の指標である K_m 値は 50 週齢でやや低い値が得られたが加齢による影響は少なかった。また、肝代謝酵素活性の指標である V_{max} 値は個体当たりで比較するとほぼ同等の値が得られた。一方、 V_1 については 50 週齢の方が 2.3 倍高い値が得られた。しかし、体重 (BW) 当たりで換算した 50 週齢の V_{max}/BW は 8 週齢の値の 52% まで減少した。一方、体重当りに換算した V_1/BW には差は見られなかった。

1-4) 生理的、血液生化学検査値の加齢による変化

加齢による生理的特徴を知るために体重、肝重量、 f_p 、肝機能の指標となる各種生化学検査値及び phenytoin の主な代謝酵素である肝 cytochrome P-450 の測定した結果を表 3-8 に示した。肝機能の指標として血清中 aspartate aminotransferase 活性 (AST)、血清中 alanin aminotransferase 活性 (ALT)、血清中 albumin 濃度、遊離脂肪酸 (FFA)、総 bilirubin 値を測定した。体重は 8 週齢に比較して 50 週齢では 1.9 倍、肝重量は 1.3 倍、AST は 1.4 倍と有意に増加した。50 週齢の血清中 albumin 濃度は 8 週齢に比較して減少傾向を示したが、FFA、bilirubin、肝 cytochrome P-450 は増加傾向にあった。8 週齢の AST 値は Itoh ら⁵³の報告とほぼ同等であった。50 週

齢に関しては、AST 値は、急性肝障害モデルラットで報告されている 1700 Karmen's Unit よりは十分低い値であった⁵³。

1-5) 肝部分切除による fp への影響

fp 値の肝部分切除による変化を 8 週齢，50 週齢共に図 3-6 に示した。本実験の測定濃度範囲内で総血清中濃度を变化させても 8 週齢，50 週齢共に虚偽手術ラットと肝部分切除ラットで濃度に依存せず 0.20 - 0.30 の間で一定であった。また，無処置群と差はみられなかった。

1-6) 肝部分切除によるラットの体内動態変化

8 週齢と 50 週齢のラットに肝部分切除あるいは虚偽手術を施した。ラットに手術を施してから 10 日後に phenytoin 20 mg/kg を投与し，血清中濃度推移を測定した。結果を 8 週齢の肝部分切除ラット，虚偽手術ラット群については図 3-6-a に，50 週齢の肝部分切除及び虚偽手術ラット群は図 3-6-b に示した。虚偽手術ラット群は，無処置の 8 週齢ラットとほぼ同じ推移を示したが，8 週齢の肝部分切除ラットは血清中薬物濃度推移が個体別に異なった。50 週齢の虚偽手術ラット群は，無処置の 50 週齢ラットとほぼ同じ推移を示したが，肝部分切除ラット群は，血清中薬物濃度推移に遅延がみられ 600 分後では血清中薬物濃度は 8 µg/ml 前後であった。

1-7) 肝部分切除による生理的，血液生化学検査値の変化

生化学検査値を表 3-8 に示した。8 週令で虚偽手術ラット群と肝部分切除ラット群間で肝重量は虚偽手術ラットに比較して 91 % まで回復し，また FFA は 1.3 倍，AST は 2.2 倍，bilirubin は 2.1 倍と有意に上昇した。ALT，血清中 albumin 濃度は増加傾向にあり，肝 cytochrome P-450 は減少傾向にあった。50 週齢について虚偽手術ラット群と肝部分切除ラット群間で比較すると AST は 4.6 倍，ALT は 2.1 倍，fp は 1.4 倍虚偽手術ラットに比較して有意に上昇し，肝重量，肝 cytochrome P-450 は 76 %，74 % と有意に減少した。

1-8) Vmax 値の評価及び各種生化学検査値との関係

血清中薬物濃度推移の個体間変動を予測する上で臨床上得られる生化学検査値が指標となりえるか検討するため，式 (3-6)，(3-7) を使用して 8 週齢，50 週齢の肝部

分切除ラット，虚偽手術ラット群における phenytoin の pharmacokinetic parameters を個々のラットについて算出した。ただし， K_m ， k_{12} ， k_{21} は無処置群と変動がないと仮定し，8週齢，50週齢のラットの値に固定し，パラメータとしては V_{max} 及び V_1 のみを非線形最小二乗法プログラム NONLIN¹⁷ を用いて求めた。 V_{max} の単位を $\mu\text{g}/\text{min}$ としたとき，各種生化学検査値に対してプロットした結果 AST，ALT，bilirubin，肝 cytochrome P-450，fp に傾き及び相関係数に有意性が認められた（図 3-8）。

2) 考察

図 3-6 より phenytoin のラットにおける血清中濃度推移は，8週齢，50週齢共に非線形性の傾向を示した。Ashley⁵² らが SD 系雄性ラット 250-360 g について 10 mg/kg 又は 40 mg/kg を投与後に投与量依存性を見出しているのと同じである。Itoh⁵³，Kato⁴⁸ らがラットの血清中 phenytoin 動態は場合線形であると報告しているのは投与量を 10 mg/kg と設定したためであり，今回，著者が投与量を 10 mg/kg でなく，20 mg/kg としたことにより phenytoin の非線形性が明確にとらえられたものと思われる。In vitro の系では雌性ラットの肝ミクロゾームを用いた実験より K_m 値は $92.1 \mu\text{M}$ と報告されているが⁷³ この値より今回 in vivo で得られた値は若干低値を示した。In vivo で得た値は人為的な操作の少ない分だけより現実を反映していると考えられる。又，人で報告されている値^{41,45} に近い値を得たということは，ヒトの加齢を含めた非線形性の phenytoin 代謝の研究のためのモデルとしてラットが有用である事がわかった。50週齢のラットの方が8週齢に比べて血清中からの消失が遅いことがわかった。8週齢のラットと50週齢のラットの体内動態パラメータのうち V_{max} ($\mu\text{g}/\text{min}$) 及び K_m に差が見られず， V_1 に差がみられた事より，個体あたりの酵素活性には加齢で差がなく V_1 が増加したため代謝が遅延したと推察された。この事は，定常状態で投与量設定を行う際には式 (3-2) より V_{max} のみが関与することとなり，体重増加にあわせて投与量を増やすと過剰投与になる危険性を示唆している。また，fp は加齢により有意に上昇したが，これは加齢により血清中 albumin 濃度が減少したためと考えられる。phenytoin と fp に影響を与えられ FFA の変動は認められなかった。

図 3-6 の結果から肝部分切除を施した 8週齢ラットに血清中薬物濃度推移に個体差がみられた。ラットによっては血清中薬物濃度が虚偽手術群に比べて高かった。

一方、肝部分切除を施した 50 週齢ラットは血清中薬物濃度推移が殆ど減衰しなかった。これらの原因としてまず肝重量の差が考えられる。今回、肝部分切除ラット群の肝重量は術後 10 日で虚偽手術ラット群の 91 % にまで回復していた。ラットでは肝部分切除してから肝の再生がはじまり元の重量にまで回復するのに Higgins⁵⁴ らは 7-14 日間、Hansen⁷⁴ らは 10 日間と報告しており、彼らの報告値と一致した。また、再生肝の肝 cytochrome P-450 は虚偽手術を施した 8 週齢ラットの 92 % まで回復し、虚偽手術群と有意差は認められなかった。よって、8 週齢の場合は血清中薬物濃度推移の個体差や消失の遅延が肝重量の再生能力の差とは考えにくい。しかし、肝部分切除ラットを用いた antipyrine の報告では、10 日後に肝重量がほぼ戻っているにもかかわらず、antipyrine の CL が回復していない事が報告されている⁷⁵。よって phenytoin の場合も肝重量が元に戻ると同時に薬物代謝能が完全に回復していない可能性も考えられる。一方、50 週齢ラット、肝重量の回復は虚偽手術ラットの肝重量と比較して有意に低く、8 週齢ラットの回復が 91 % だったのに対して 76 % であった。これは、肝重量の回復能力が 8 週齢ラットに比べて 50 週齢ラットのそれが低下していることを示しており、それに伴って肝 cytochrome P-450 の薬物代謝能の回復も遅延していると考えられ、その結果血清中 phenytoin 濃度の減衰率が虚偽手術ラット群に比べ低下したと推察される。

虚偽手術を施した 8 および 50 週齢ラットは第 3 章で得られた無処置の 8 および 50 週齢ラットと同じ血清中薬物濃度推移を示した。また、得られた各種生化学検査値等 (表 3-8) を比較すると AST, fp 以外の検査値に有意差は認められておらず、10 日後には開腹したことによる手術の影響がないことが確認できた。個々の肝 cytochrome P-450 と Vmax との相関性を検討したところ、傾き及び相関係数に有意性が得られた。一般に再生肝はタンパク量の減少によって酵素量が減少しているため、薬物代謝能は低下していると考えられている⁷⁶。よって、肝 cytochrome P-450 が減少していることも十分考えられる。ラット個々の Vmax 値と各種生化学検査値との相関性については、図 3-8 の結果から AST, ALT と Vmax 値の間に負の傾きを持つ相関関係が認められた。

以上、今回の我々の研究の中では Vmax を予測するとき主に指標となる因子は、肝 cytochrome P-450, AST, ALT, fp の 4 つであった。実際、臨床の場での応用考えた場合は簡便性より、AST, ALT を測定して phenytoin の代謝能の回復の指標となると思われる。しかし、メカニズム等を検討するためには、肝 cytochrome P-450

等との因果関係もこれから検討していかなければならない。

1) Phenytoin と valproic acid の HSA 結合相互作用に及ぼす palmitic acid の影響

300 から 1500 μM までの palmitic acid 存在下, 300 μM HSA 溶液における phenytoin の fp の変化を, valproic acid を 700 μM 添加時と無添加時について検討した. Phenytoin の fp を HSA に対する palmitic acid の比 (PA/HSA) のモル比の関数として図 3-9 に示した. Valproic acid が存在しない場合, phenytoin の fp は PA/HSA モル比 5.0 の場合を除いて約 0.40 と一定であった. 一方, valproic acid 存在下, palmitic acid を添加しない状態で既に phenytoin の fp は 0.40 から 0.57 へと有意に上昇し, palmitic acid を添加しても PA/HSA モル比が 2.0 までは約 0.60 と一定であった. しかし, PA/HSA モル比が 3.3 以上では phenytoin の fp は, 0.45 まで減少し, phenytoin の fp が有意に減少した. これは, 見かけ上, valproic acid による phenytoin の HSA 結合追い出し効果が減少したことを示す. さらに palmitic acid を添加しても phenytoin の fp の変化は認められなかった.

この現象を明確にするために valproic acid の遊離型濃度に対する phenytoin の fp をの関係について検討した. Palmitic acid を添加していない場合と 1500 μM 添加している場合 (PA/HSA モル比 = 5.0) のそれぞれについての結果を図 3-10 に示した. Valproic acid の遊離型濃度が約 180 μM および 400 μM で, phenytoin の fp は palmitic acid により減少し, palmitic acid が phenytoin の fp を減少させるという結果が得られた. このことは, palmitic acid が存在する場合に phenytoin の fp の変化が valproic acid のみに依存しているのではなく palmitic acid の共存も影響していることを示している.

2) 他の抗てんかん薬 (carbamazepine, phenobarbital, primidon) と valproic acid の HSA 結合相互作用におよぼす palmitic acid の影響

図 3-9 と同様の変化が他の抗てんかん薬の場合もみられるかを検討した(図 3-11). Valproic acid が添加されていない場合の primidon と carbamazepine の fp は, いずれの PA/HSA モル比に対してもほぼ一定であった(0.93, 0.44). Phenobarbital についてのみ PA/HSA モル比の増加について 0.68 から 0.75 へと, わずかな上昇傾向がみられた. 一方, valproic acid 700 μM 添加によって phenobarbital と carbamazepine の fp はそれぞれ 0.73 から 0.82, 0.44 から 0.56 と有意に上昇した. Primidon ではほとんど変化を示

さなかった。しかし phenytoin でみられたような, valproic acid が存在する場合に PA/HSA の比率によって phenytoin の fp が顕著に減少するという現象は, carbamazepine, phenobarbital, primidon とみられなかった。

3) 考察

本章では, phenytoin と valproic acid の HSA 結合相互作用に及ぼす palmitic acid の影響を検討した。まず, valproic acid 存在下で phenytoin の fp が, PA/HSA モル比 3.3 以上で顕著に減少するという知見を得た(図 3-9)。このような palmitic acid 量の増加に伴う fp の顕著な現象は他の抗てんかん薬 carbamazepine, phenobarbital, primidon ではみられなかった(図 3-11)。

一方, valproic acid 非存在下では phenytoin の fp が PA/HSA モル比で 0 から 5.0 まで 0.40 とほぼ一定であったが, この結果(図 3-9)は, Rudman ら⁶⁰ の, in vitro の系において phenytoin の HSA に対する結合が PA/HSA モル比 3.5 では, palmitic acid 非存在下に比し, わずかしか減少しなかったという結果と一致している。また Borgå ら⁷⁷ の, 健常人に対して phenytoin Na 5 mg/kg 一回経口投与後, 負荷運動を課した後の血漿中 FFA 値が, 負荷前に比べ 2-3 倍 (FFA/アルブミンモル比は, 1.8-4.2) に増加しているにも関わらず, phenytoin の fp が有意に変化しなかったという結果も十分説明しうる。

また, palmitic acid 非存在下において phenytoin の fp が valproic acid 700 μ M 添加によって有意に上昇したが, この現象は Kober ら⁵⁶ が, HSA 小球体を用いた実験により valproic acid と phenytoin がアルブミン分子上の同一結合部位において競合阻害関係にあると述べている結果と同じである。

Valproic acid 700 μ M 存在下 PA/HSA モル比 3.3 以上の場合に, phenytoin の fp が顕著に減少するという事実についての一考察として, 図 3-12 に示すような各結合部位で親和性に変化が生ずる機構を考えて解析を試みた。図 3-12 は, 本章の研究の実験条件下で, phenytoin の結合領域 Sjöholm ら⁷⁸ の分類による site III (Warfarin) 以外にも, その領域とは独立した結合部位が存在すると仮定したもので, それぞれの親和性を K_1, K_2 で表した。結果の部には示さなかったが二つ以上の結合サイトを持つという過程を確かめるため, phenylbutazone による HSA 結合置換効果を測定した。

Phenylbutazone は, phenytoin と同様に site III に結合することが知られている。そこで phenylbutazone 600 - 1200 μ M および phenytoin 80 μ M を, HSA 300 μ M 溶液中に

添加した条件でも約 35 % の phenytoin が HSA に結合していることがわかった。これにより本実験条件下で site III 以外の phenytoin 結合部位の存在が考えられた。そこで site III に結合している phenytoin が主に valproic acid によって競合阻害を受け、一方、site III 以外の結合領域に結合している phenytoin が主に palmitic acid によって影響をうけると仮定して、phenytoin と HSA 分子の結合様式を図 3-12 の様に図示した。ここでは、palmitic acid, valproic acid が共に存在しない場合を (A), palmitic acid が存在せず valproic acid が 700 μM 存在する場合を (B), valproic acid の非存在および 700 μM 存在下においてそれぞれ palmitic acid が 1500 μM 添加された場合を (C) および (D) として HSA 分子への phenytoin の結合様式を四つの代表的な条件別に模式図化している。

今回の実験系では HSA 分子に対する phenytoin の結合は線形性であると考えられたため近似的に次式が成り立つ。

$$C_b = \left(n_1 K_{a1} + \sum_{i=2}^m n_i K_{ai} \right) P C_f \quad (3-8)$$

ただし、 C_b は、phenytoin の結合型薬物濃度、 C_f は phenytoin の遊離型薬物濃度、 P は、HSA 濃度、 n_1, K_{a1} は site III における結合部位数（ここでは $n_1 = 1$ ）、および結合定数、 n_i, K_{ai} は、site III 以外の i 番目の結合領域における結合部位数および結合定数で $\sum_{i=2}^m n_i K_{ai}$ はその総和を示す。また簡略化のため $n_1 K_{a1} P = K_1$, $\sum_{i=2}^m n_i K_{ai} P = K_2$ と置く。

ここで、phenylbutazone 900 μM のみ存在時の phenytoin の f_p が、主に site III 以外の結合領域の結合性を反映していると考えて、図 3-9 の結果を式 (3-2) に代入して得られる連立方程式を解くことにより K_1, K_2 は、1.030, 0.495 と計算される。また図 3-12 の結合様式に従って phenytoin の f_p が変化したものと仮定し A から B では K_1 が K_1' に変化し、A から C では K_2 が K_1' に変化したと考えると K_1', K_2' は 0.269, 0.835 と計算される。これらの結果から K_1' が K_2' の値を用いて条件 D での phenytoin の f_p を算出すると 0.475 という値が得られた。この値は図 3-9 で得られた 0.444 ± 0.033 と一致し、図 3-12 の模式図の妥当性を示唆している。Palmitic acid の増加に伴う K_2 値の増加については、Maruyama⁷⁹ らが HSA の各結合部位に対する各種脂肪酸の影響を平衡透析法および円二色性スペクトルを用いて検討した際に、palmitic acid 等の長鎖脂肪酸が HSA のコンフォメーション変化をひき起こしている

と述べている。このことから本実験条件下においてもHSAがコンフォメーション変化をおこしてK₂すなわち結合部位数あるいは親和性が変化した可能性が十分考えられるが、本現象の詳細なメカニズムについての、実験的証拠については今後の検討が必要である。

今回、著者は valproic acid による phenytoin の HSA 結合追い出し効果が palmitic acid の存在により見かけ上減少するという知見を得た。これは palmitic acid による valproic acid 追い出しに伴って本来増加すると思われた phenytoin の fp が逆に減少するという結果であり興味深い。以上の検討は全て臨床上で起こりうる濃度条件下で行ったが、今後臨床例を通じて更に検討する必要があると思われる。

第五章 考察

本編では、肝機能変化に伴う血清中薬物濃度の変動を主に肝で代謝されクリアランス律速であるphenytoinについて、その代謝パラメータの臨床における予測方法と、その変動因子について検討した。

Luddenら³³の方法ではphenytoinの半減期が長いいため数週間投与設計ができない空白期間が生ずる問題点がある。そこで第二章ではLuddenらのグラフ法を改変し、日本人と欧米人の別々の母集団パラメータを利用することにより、患者個別の代謝パラメータ(V_{max} , K_m)を決定し、定常状態における1点の血清中濃度から次の血清中濃度を予測する方法を新たに確立した。そして実測データを用いてretrospectiveな検討により本方法の妥当性を検証した。その結果ベイジアン法と同等の予測精度を得る事がわかった。また、臨床に応用しやすいように視覚化も行った。本方法は、定常状態の1点の血清中phenytoin濃度データをプロットしただけで、その患者の示す体内動態の特徴が分かるようになっているのも特徴の一つである。

第三章では、まず加齢によりphenytoinの体内動態に変化が見られるか否かを検討した。加齢により血清中濃度推移に差が認められた。しかし、データ解析の結果、体内動態パラメータ値には加齢による影響が認められなかった。8週齢から50週齢の V_{max} ($\mu\text{g}/\text{min}$)を予測すると過大評価となり、体重だけを指標にして投与することが危険であることが示された。次に、肝部分切除によりphenytoinの体内動態に変化が見られるか検討し、個々の固有の体内動態パラメータ値($V_{max}(\mu\text{g}/\text{min})$)を反映する変動因子について検討した。肝部分切除手術により血清中濃度推移に8週齢はバラツキがみられ、50週齢は殆ど減衰しなかった。虚偽手術を施したラットは8週齢、50週齢共に無処置ラットと同様な推移を示した。肝部分切除を施した8週齢ラットは10日後に肝重量が虚偽手術を施したラットの91%まで回復し、50週齢ラットは76%まで回復した。50週齢ラットの方が肝の再生能力が低いことが示された。それに伴い肝代謝能の回復も遅延していると思われる。また、個々の V_{max} 値と肝cytochrome P-450, AST, ALT, に良い相関性が得られた。AST, ALTについては残余肝細胞での合成の増加によって上昇するという機序が報告されているのでAST, ALTは肝部分切除後(肝移植等の手術後)の V_{max} 値を反映する重要な変動因子であることが示唆された。また、phenytoinの主な代謝が、cytochrome P-450によることから、肝cytochrome P-450活性が V_{max} 値を反映する変動因子である事

は妥当であると考えられる。

第四章では、HSAを用いた実験により FFAが増加すると一旦増加した phenytoin の fp が減少することを見いだした。この事は、クリアランス律速である phenytoin の代謝および分布には fp が大きく関与していることを考えると有用な phenytoin の体内動態変動因子の解明になったと考えられる。従って、phenytoin と valproic acid が、併用した患者で、絶食、労働、糖尿病、感染症等により FFA が変化する場合は、phenytoin の fp が変動する可能性があるので注意が必要であると思われる。

表 3-1 フェニトインの母集団パラメータ

報告者	Sheiner ⁴¹	Grasela ⁴³	Miller ⁴⁴	湯川 ⁴⁶	堀 ⁴⁵
報告年	1980	1983	1987	1989	1990
対象	欧米人	欧米人, 日本人	黒人	日本人	日本人
V_{max} (mg/kg/day)	7.22	—	6.5	—	6.26 (≥15才) 11.9 - 0.376 · AGE (<15才)
(mg/day)	—	$415 \left(\frac{BW}{70}\right)^{0.6}$	—	$369 \left(\frac{BW}{60}\right)^{0.55}$	—
$\omega_{V_{max}}$ (CV%)	23.8	11.0	20.3	18.6	37
K_m (μg/mL)	4.44	3.8 (≥15才) 2.2 (<15才)	3.4	3.67 (≥15才) 3.08 (<15才)	2.98 (≥15才) 1.27 + 0.114 · AGE (<15才)
ω_{K_m} (CV%)	54.1	56.0	73.0	57.4	37
σ_D (mg/kg/day)	0.25	—	—	—	0.96
(CV%)	—	12.0	28.0	11.4	—

$\omega_{V_{max}}$: V_{max} の個体間変動の変動係数

ω_{K_m} : K_m の個体間変動の変動係数

σ_D : 投与量の個体内、残差変動の標準偏差または変動係数

BW : 体重

AGE : 年齢

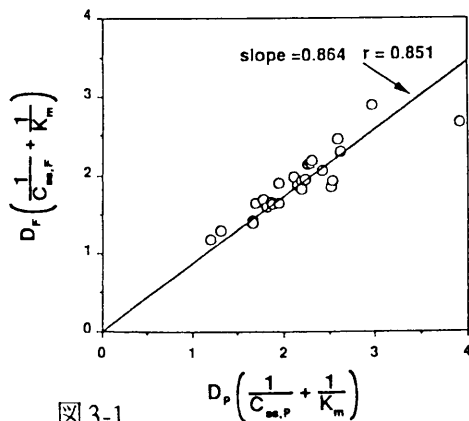


図 3-1
Estimation of bioavailability of phenytoin powder form in case of Michaelis constant (K_m) fixed to 2.98 (μg/ml).
 D : Daily dose of phenytoin (mg/kg/day);
 C_{ss} : steady state concentration of phenytoin (μg/ml).
Subscripts P and F indicate the dosage forms of powder and fine granule, respectively.

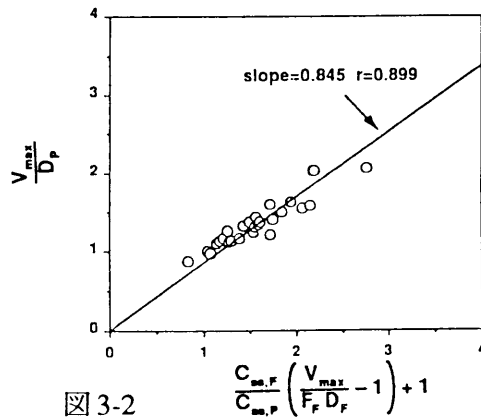


図 3-2
Estimation of bioavailability of phenytoin powder form in case of maximum elimination rate (V_{max}) fixed to 6.26 (mg/kg/day).

表 3-2 Details of patients

Number of patients	34
Number of C_{ss} -D pairs	35
Sex ratio (male/female)	18/16
Age (years)	36 ± 12^a
Weight (kg)	61 ± 12^a
C_{ss} (mg/L)	12 ± 5^a
Dosage (mg/day)	270 ± 40^a

^a Mean \pm SD.

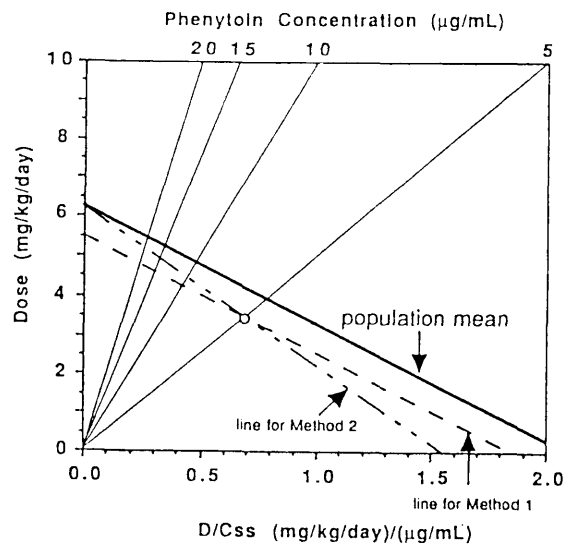


图 3-3

Graphic estimation of dose required to achieve a specific steady-state phenytoin serum concentration as described in the text.

○: one-point steady-state serum concentration-dose pair of phenytoin. Line of population mean is drawn using the reported mean parameters⁴⁵. Lines for methods 1 and 2 are drawn through the points initially determined.

表 3-3 Number of predictions and percentages with errors < 5 mg/l under various ranges of parameters. Three simulations were performed by using the reported population parameters⁴⁵.

Range of V_{max}' or K_m'	Number of predictions	% accurate predictions
Method 1^a		
$0 < V_{max}' \leq (\text{mean} - 3SD)$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
$(\text{Mean} - 3SD) < V_{max}' \leq (\text{mean} - 2SD)$	4.3 ± 5.1	92.6 ± 12.8
$(\text{Mean} - 2SD) < V_{max}' \leq (\text{mean} - SD)$	63.7 ± 5.1	97.3 ± 2.4
$(\text{Mean} - SD) < V_{max}' \leq (\text{mean})$	172.7 ± 14.0	96.4 ± 0.6
$(\text{Mean}) < V_{max}' \leq (\text{mean} + SD)$	166.3 ± 9.5	90.5 ± 1.3
$(\text{Mean} + SD) < V_{max}' \leq (\text{mean} + 2SD)$	76.7 ± 5.7	67.5 ± 7.2
$(\text{Mean} + 2SD) < V_{max}' \leq (\text{mean} + 3SD)$	35.3 ± 9.0	42.3 ± 3.5
$(\text{Mean} + 3SD) < V_{max}'$	49.7 ± 30.2	5.5 ± 1.9
Method 2^b		
$0 < K_m' \leq (\text{mean} - 2SD)$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
$(\text{Mean} - 2SD) < K_m' \leq (\text{mean} - SD)$	68.0 ± 7.0	94.2 ± 2.8
$(\text{Mean} - SD) < K_m' \leq (\text{mean})$	195.3 ± 24.6	83.2 ± 1.5
$(\text{Mean}) < K_m' \leq (\text{mean} + SD)$	160.3 ± 17.8	81.9 ± 4.4
$(\text{Mean} + SD) < K_m' \leq (\text{mean} + 2SD)$	88.0 ± 4.6	80.5 ± 7.6
$(\text{Mean} + 2SD) < K_m' \leq (\text{mean} + 3SD)$	46.3 ± 6.0	73.6 ± 5.7
$(\text{Mean} + 3SD) < K_m'$	82.7 ± 6.1	64.2 ± 6.2

^a The value of K_m was fixed to the population mean (2.98 mg/l) in eq 3-2. Individual V_{max}' was compared with the population mean and multiple SD⁴⁵.

^b The value of V_{max} was fixed to the population mean (6.26 mg/kg/day) eq 3-2. Individual K_m' was compared with the population mean and multiple SD⁴⁵.

表 3-4 Percentages with errors < 5 mg/l in various areas of Fig. 3-4.

Area number in Fig. 2	% accurate predictions	
	Method 1 ^a	Method 2 ^b
1	93 ± 2	83 ± 3
2	45 ± 1	89 ± 5
3	100	0
4	98 ± 2	68 ± 6

The simulations were performed by using the reported population parameters⁴⁵.

^a The value of K_m was fixed to the population mean (2.98 mg/l) in eq. 3-2.

^b The value of V_{max} was fixed to the population mean (6.26 mg/kg/day) in eq 3-2.

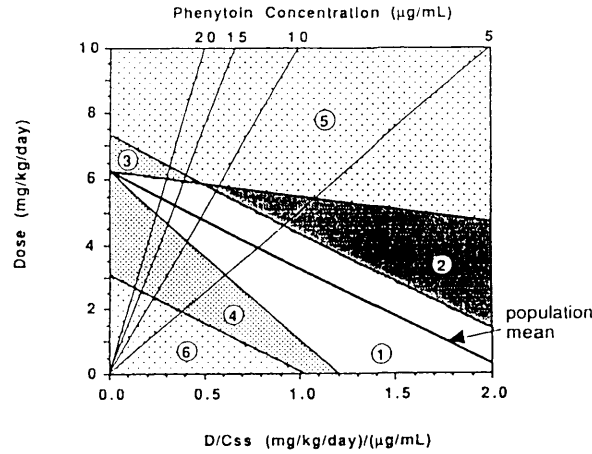


图 3-4

Graphic representation of areas divided by the ranges of Michaelis-Menten parameters for Japanese⁴⁵ as described in the text.

Conditions in numbered area (1): $0.77 < K_m' \leq 5.18$ with the condition of $V_{max} = 6.26$, and $3.08 < V_{max}' \leq 7.32$ with the condition of $K_m = 2.98$; (2): $0.77 < K_m' \leq 5.18$ with the condition of $V_{max} = 6.26$, and $7.32 \leq V_{max}'$ with the condition of $K_m = 2.98$; (3): $K_m' \leq 0.77$ with the condition of $V_{max} = 6.26$ and $V_{max}' \leq 7.32$ with the condition of $K_m = 2.98$; (4): $5.18 < K_m'$ with the condition of $V_{max} = 6.26$ and $3.08 < V_{max}' \leq 7.32$ with the condition of $K_m = 2.98$; (5): $7.32 < V_{max}'$ with the condition of $K_m = 2.98$ and $K_m' \leq 0.77$ with the condition of $V_{max} = 6.26$; (6): $V_{max} \leq 3.07$ with the condition of $K_m = 2.98$.

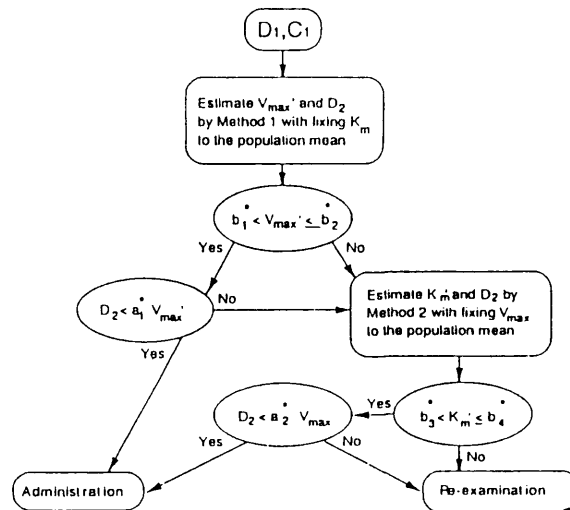


图 3-5

Systematic approach for graphic estimation of dose required to achieve a specific steady-state phenytoin serum concentration as described in the text. An asterisk indicates that the parameter is listed in Table 3-5.

表 3-5 Parameters for systemic approach in Fig. 3-5.

	Parameter	Population	
		Ref. 45	Ref. 41
Population mean	K_m (mg/L)	2.98	4.22
	V_{max} (mg/day/kg)	6.26	7.22
Maximum ratio of D_2 to V_{max}'	a_1	0.83	0.78
Maximum ratio of D_2 to V_{max}	a_2	0.88	0.92
Minimum value of V_{max}'	b_1 (mg/day/kg)	3.07	2.06
Maximum value of V_{max}	b_2 (mg/day/kg)	7.32	8.94
Minimum value of K_m'	b_3 (mg/L)	0.77	4.44
Maximum value of K_m'	b_4 (mg/L)	5.19	11.65

表 3-6 Prediction performance evaluation

Methods	Number of predictions	% accurate predictions	ME (95% c.i. ^a) (mg/L)	MAE (95% c.i.) (mg/L)	RMSE (95% c.i.) (mg/L)
All patients ^a					
Method 1	35	68.6	3.34 (-1.28 to 7.97)	6.80 (1.74 to 11.86)	12.8 (-1.96 to 27.65)
Method 2	35	74.3	-0.31 (-2.04 to 1.43)	3.76 (1.58 to 5.92)	4.99 (0.60 to 9.34)
Bayesian	35	60.0	-10.23 (-26.63 to 6.18)	12.78 (-3.84 to 29.40)	45.9 (-19.85 to 111.73)
Predicted patients ^c					
Proposed Method	25	84.0	-1.22 (-2.78 to 0.34)	2.85 (0.95 to 4.75)	3.50 (0.36 to 6.63)
Bayesian	25	76.0	-3.07 (-5.35 to -0.79)	3.78 (1.32 to 6.26)	4.46 (0.53 to 8.40)

^a Patients in Table 3-2.

^b The 95 % confidence intervals(c.i.) of the mean.

^c Predicted by systematic approach in Fig. 3-5.

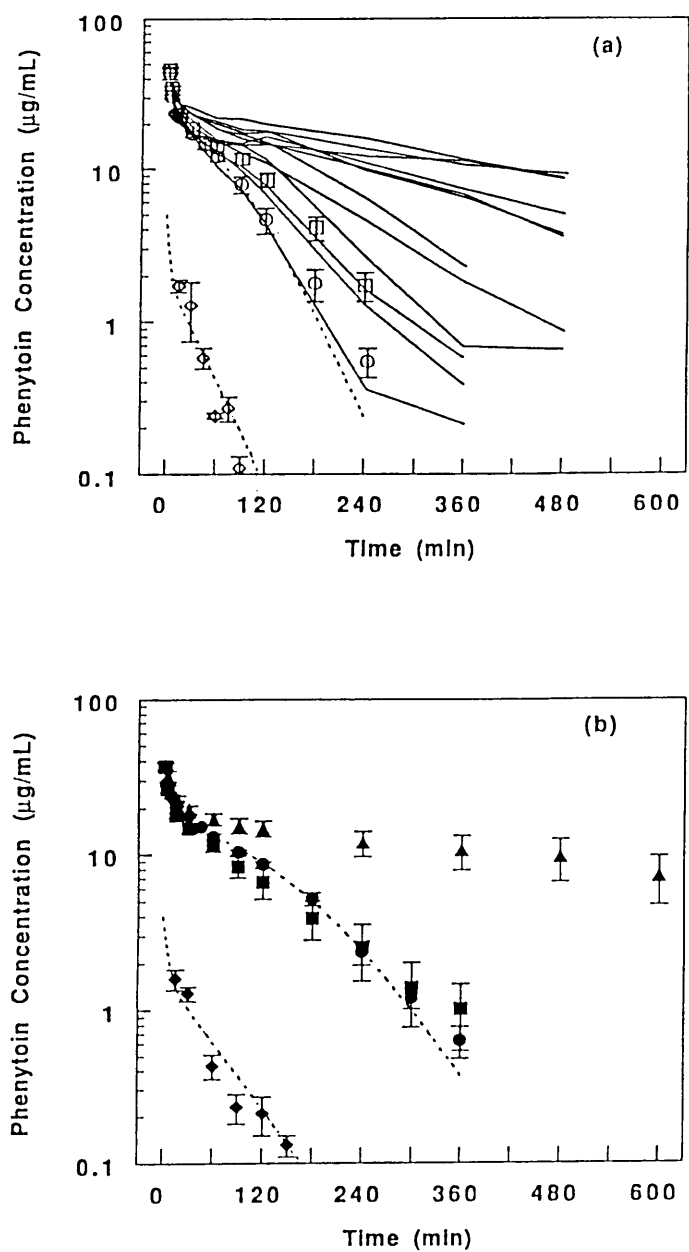


图 3-6
 Plasma phenytoin concentrations after 2- (\diamond) and 20-mg/kg (\circ) intravenous bolus dose to 8-week (a) and 50-week (b) old rats. Dotted lines were obtained by a nonlinear least squares regression analysis using the computer program NONLIN¹⁷ fitting observed data in normal rats to eqs. 3-6 and 3-7. In the case of partially hepatectomized 8-week-old rats, individual data were presented (lines). Each point represents the normal (\circ), sham operated (\square), and the partially hepatectomized (Δ) rats for 8-week (open symbol) and 50-week (closed symbol) old rats. Mean \pm SE, n = 3-7.

表 3-7

Estimated pharmacokinetic parameters of phenytoin in 8- and 50-week-old rats ^a

pharmacokinetic parameters		8-week-old	50-week-old
K_m ^b	($\mu\text{g/mL}$)	2.36 \pm 0.34	1.81 \pm 0.25
V_{max} ^c	($\mu\text{g/min}$)	67.5 \pm 4.8	64.9 \pm 4.0
V_1 ^d	(mL)	111 \pm 7	257 \pm 14
k_{12} ^e	(min^{-1})	0.114 \pm 0.021	0.0788 \pm 0.0129
k_{21} ^e	(min^{-1})	0.108 \pm 0.010	0.0749 \pm 0.0068
V_{max}/BW ^f	($\mu\text{g/min/kg}$)	244 \pm 26	126 \pm 18
V_1/BW	(mL/kg)	401 \pm 41	499 \pm 69

a mean \pm SD ; each value was obtained by a nonlinear least squares regression using the computer program (NONLIN)¹⁷ fitting the observed data to Eqs. 3-6 and 3-7.

b Michaelis Menten constant

c Maximum elimination rate

d Distribution volume of central compartment

e Apparent 1st order elimination rate constant

f BW (Body Weight)

表 3-8 Pathophysiological characteristics of normal, sham operated and partially hepatectomized 8- and 50-week-old rats

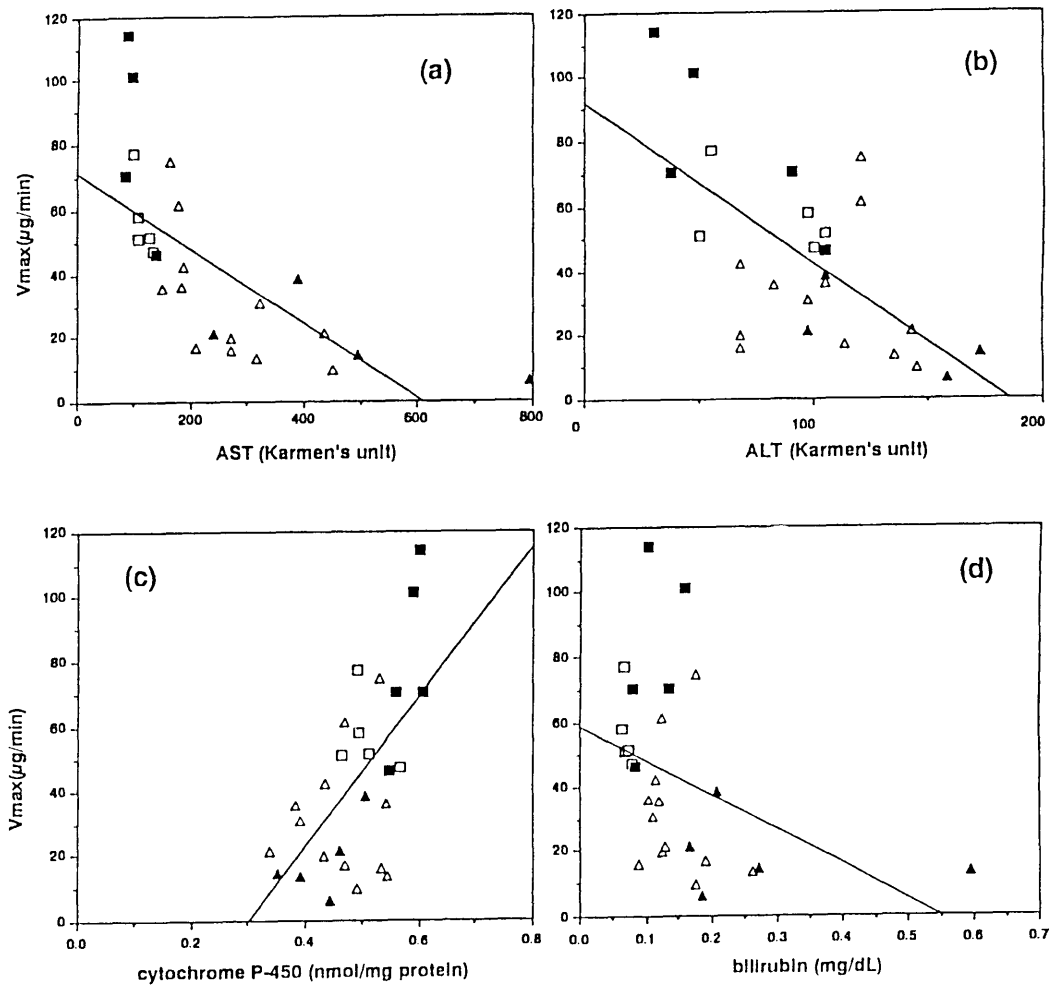
	8-week-old			50-week-old		
	Normal mean (SEM, n)	Sham Operated mean (SEM, n)	Hepatectomized mean (SEM, n) ^a	Normal mean (SEM, n) ^b	Sham Operated mean (SEM, n)	Hepatectomized mean (SEM, n) ^a
Body Weight (g)	277 (4, 33)	309 (4, 5)	295 (5, 12)	515 (15, 20) *	495 (16, 5)	508 (21, 5)
Liver Weight (g)	10.7 (0.3, 33)	9.56 (0.5, 5)	8.71 (0.12, 12) **	13.6 (0.6, 20) *	12.5 (0.8, 5)	9.48 (0.61, 5) **
Serum transaminase activity						
AST (Karmen's Unit)	143 (12, 13)	117 (7, 5)	262 (29, 12) *	204 (17, 10) *	104 (12, 4)	480 (117, 4) **
ALT (Karmen's Unit)	49 (5, 13)	82 (12, 5)	105 (8, 12)	50 (4, 10)	62 (15, 5)	133 (19, 4) **
Serum free fatty acid (mEq/L)	1.01 (0.09, 13)	0.78 (0.04, 5)	1.01 (0.06, 12) **	1.16 (0.11, 12)	0.95 (0.06, 5)	1.53 (0.26, 5)
Serum total bilirubin (mEq/L)	0.11 (0.03, 13)	0.07 (0.00, 5)	0.14 (0.01, 12) *	0.147 (0.021, 12)	0.11 (0.02, 5)	0.29 (0.08, 5)
Serum albumin (g/dL)	3.66 (0.12, 13)	2.99 (0.33, 5)	3.21 (0.19, 12)	3.37 (0.10, 12)	3.28 (0.20, 4)	3.14 (0.10, 3)
Hepatic cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.555 (0.019, 11)	0.51 (0.02, 5)	0.46 (0.02, 12)	0.61 (0.03, 10)	0.58 (0.01, 5)	0.43 (0.03, 5) *
Plasma unbound fraction	0.249 (0.007, 29)	0.23 (0.01, 9)	0.27 (0.01, 14)	0.299 (0.011, 25) *	0.24 (0.01, 7)	0.34 (0.04, 5) **

^a t -test between sham operated and partially hepatectomized rats.

^b t -test between 8- and 50-week old rats.

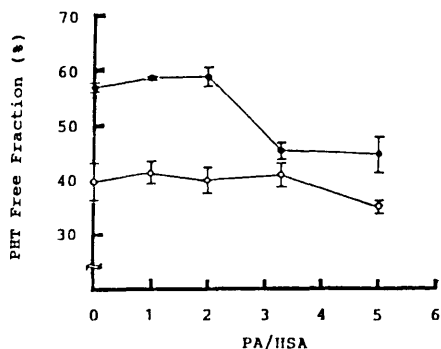
* Values are significantly different ($p < 0.01$).

** Values are significantly different ($p < 0.05$).

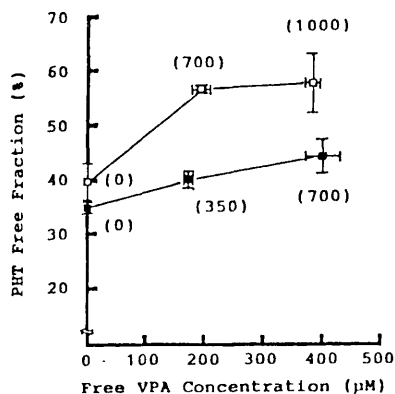


☒ 3-7

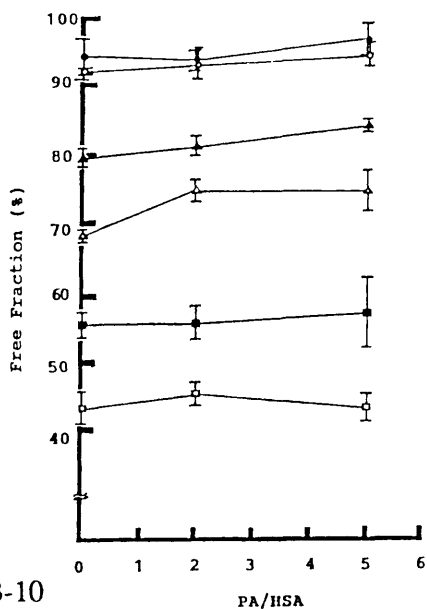
Comparison of maximum elimination rate (V_{max}) with biochemical parameters, AST (a), ALT (b), cytochrome P-450 (c), bilirubin (d) in partially hepatectomized and sham operated 8- and 50-week-old rats at 10-day interval after each operation. Each point represents the sham operated (\square) and the partially hepatectomized (Δ) rats for 8-week (open symbol) and 50-week (closed symbol) old rats. Solid line represents the simple linear regression line.



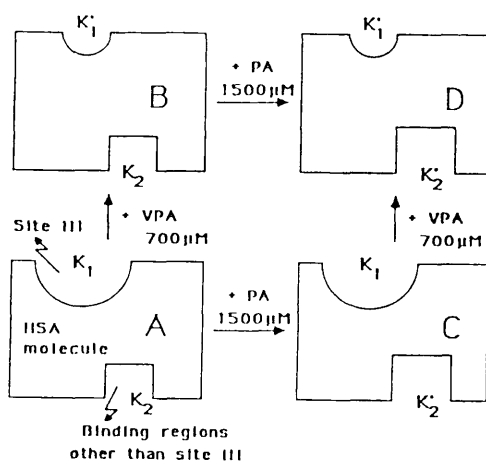
3-8 Effect of Increasing Concentrations of PA on HSA Binding of PHT
All solutions were 300 μM HSA
The total PHT concentration used was 80 μM. Each value is the mean ± S. D. (n=3-8). The data are shown in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of 700 μM total VPA concentration.



3-9 Relationship between Free Fraction of PHT and Free VPA Concentration in 300 μM HSA Solution
The total PHT concentration used was 80 μM. Each value is the mean ± S. D. (n=6-8). The total concentration of VPA (μM) is given in parentheses. The data are shown in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of 1,500 μM PA.



3-10 Effect of Increasing Concentrations of PA on HSA Binding of CBZ, PB and PRM
All solutions were 300 μM HSA
The total drug concentration used was 40, 170 and 50 μM for CBZ, PB and PRM, respectively. Each value is the mean ± S. D. of three experiments. The data are shown in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of 700 μM total VPA concentration. Key: □, CBZ; △, PB; ○, PRM.



3-11 Diagrammatic Representations of PHT Binding to HSA in the Absence and in the Presence of PA 1,500 μM and/or VPA 700 μM
The concentrations are situated as 300 μM HSA and 80 μM total PHT.

第IV編 腎機能変化に伴うクリアランスの変動

第一章 緒言

多くの薬物の主な処理臓器としては、前編で言及した肝臓の他に腎臓があげられる。本編ではクリアランスの概念を基本として腎臓の機能変化に伴う様々な変動因子の解明を試みた。

病態により腎排泄速度は様々に変化する。特に、初期の糖尿病時には、糸球体濾過速度の亢進することが報告されている⁸⁰。しかしながら、全身クリアランス (CL_{tot}) の変化における腎クリアランス (CL_r) の割合は明らかでなく、糖尿病時における薬物体内動態の変化の要因解析は不十分である。そこで、ラットに streptozotocin を投与して作成した糖尿病モデルを用いて薬物の体内動態に及ぼす変動因子解析を行った。薬物としては、肝および腎で細胞レベルでの膜透過機構が詳細に検討されているセファロスポリン系抗生物質の cefoperazone (CPZ) と cephadrine (CED) を用いた。両薬物ともほとんど代謝は受けず cefoperazone は胆汁排泄型、cephadrine は尿中排泄型の挙動を示す。

Insulin 依存性糖尿病患者の約半数が慢性腎不全で死亡している⁸¹。この末期腎不全患者では、体内の老廃物や水分を緩徐に除去するための腎機能代替法が必要である。従来から血液透析という人工の膜を用いた透析が行われていたが、患者が数時間にもわたって拘束され、また中分子量 (分子量 1500 程度) の老廃物を除去できない等の問題があった。Popovich ら⁸² は、1976 年に透析膜として患者の腹膜を利用することを考案し、更にこの方法を簡便に行えるようにシステム化した CAPD (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) 療法を開発した⁸³。この方法は上記血液透析の問題点を解決し患者の社会復帰を可能にした画期的療法で、日本でも多くの患者がこの恩恵にあずかっている。一方問題点としては、腹腔へ透析液を導入するためのカテーテルを留置することによる腹膜炎の発症があげられる。この治療に抗生物質が投与される。また、最近、腹膜は老廃物の除去に用いられるほか、胃癌、卵巣癌等を治療するための抗癌剤の投与部位として注目されている⁸⁴。腹腔内に投与された薬物の薬効が有効かつ安全に発揮されるためには、腹腔内の薬物挙動および血液中への薬物移行に関する情報は重要である。したがって、薬物の腹膜透過性を定量的に研究することの意義は大きい。水溶性物質や高分子物質を用いて腹膜透過

の薬物速度論的研究がされるようになってきている。特に、Flessnerら⁸⁵⁻⁸⁷は、pore theoryを用いた毛細血管透過性や組織中の物質の拡散性などの生理学的に意味の持ったパラメータを使い、distributed modelに基づいて物質の腹膜透過を記述することに成功している。しかし、彼らの理論では、腹膜透析時の透析液の体積変化は、簡単な指数式でしか記述されていない。また、腹膜透過理論に基づき薬物の動態のみならず透析液の体積や浸透圧変化も考慮して論じたものがほとんど見あたらないのが現状である。CAPD療法時には透析液に高張液を用いることにより水分の除去を行っている。水分の除去、および調節は、CAPD療法時には重要な問題である。薬物の腹膜透過動態については、薬物毎に個々の患者について検討された報告はあるが、適切な投与を行うためには、その動態について定量的に表現する統一的なパラメータを提示し、その有用性について検討することが必要である。以上より、著者はラットを用いて透析治療上重要な因子である水分の除去され易さも同時に解析できる薬物の腹膜透過解析モデルの確立を試みた。本研究では、そのパラメータとして腹膜透過クリアランス(Pd)を提示したが、様々なfpをもつセファロスポリン系抗生物質を選択して、Pdに及ぼすfpの影響も検討した。また薬物の腹膜透過機構を明らかにするために、酸性薬物について薬物の脂溶性とこのPdが関係を検討した。Torresら⁸⁸は腹腔での薬物の残存率と脂溶性の関係が述べられているが、CLと脂溶性の関係は明らかではない。Pdと物理化学的定数の関係については、Satoら⁸⁹がキノロンカルボン酸系抗菌薬においてそのPdとn-octanol/りん酸緩衝液間分配係数(Papp)との関係を検討しているが、特に正の相関関係は見いだされてはいない。しかし、これはPappが1以下の比較的脂溶性の低いものについて見た結果であり、さらに高脂溶性の薬物については検討されていない。PdとPappの関係が明らかになれば薬物の物理化学的定数のみからその薬物の腹膜透過性を予測でき、臨床の場に有用な情報の提供が可能になる。本編では酸性薬物の中でも、Pappが2近辺にあるacetaminophenと、Toon⁹⁰や、Steiner⁹¹により、薬物の脂溶性と体内動態を表すパラメータとの相関関係が見いだされているバルピツール酸系催眠薬について検討した。

また最近 benzoic acid について、小腸で carrier mediated transport が存在することが発見された⁹²。最近の研究では、腹腔からの薬物の消失に肝臓表面の寄与があることが報告^{93,94}されており、腹膜上でも受動拡散以外の輸送系があるか検討することは興味深い。もし、薬物の担体輸送系が腹膜上にも存在するならば、Pdに用量依存性

がみられることも考えられる。そこで、腹膜の担体輸送の初歩的検討として benzoic acid の腹膜透過の用量依存性を検討した。

最後に、以上の結果をふまえアニマルスケールアップの手法を用いて動物実験で得られた cefazolin (CEZ) の Pd が腎不全患者へ外挿が可能であるかを検討することにより、本パラメータ (Pd) の臨床への応用の可能性について検証した。

1) Streptozotocin 処置によるラットの生理的、血液生化学検査値の変化

7 週齢の SD 系雄性ラットに streptozotocin 60 mg/kg を尾静脈内投与し 35 週後特徴を、streptozotocin 無処置群（対照群）と比較した（表 4-1）。血清中、胆汁中の glucose 値が streptozotocin 処置群（糖尿病群）で 2 倍以上増加しており、糖尿病状態になっていることがわかった。体重が糖尿病群で増加しているにも関わらず肝重量、胆汁流量に変化は認められなかったが、胆汁酸は 2 倍増加していた。血清 albumin 値は糖尿病群でわずかではあるが有意に減少した。胆汁の浸透圧は糖尿病群で上昇したが、一方尿中の浸透圧は減少した。胆汁の浸透圧が上昇したのは胆汁酸や glucose の上昇が寄与したとことによると考えられ、Watkins ら⁹⁵も同様な結果を報告している。代謝ケージを利用した実験より糖尿病群では、水分消費量および尿排泄量が対照群の 8 倍に増加していた。血清 creatinine 値は、糖尿病群と対照群で差は見られなかった。GPT は糖尿病群で有意に上昇したが、急性ウイルス性肝炎モデルである D-galactosamin 処置ラットや四塩化炭素処置慢性肝障害モデルラットの報告値⁹⁶に比べその値は小さく、本糖尿病群は肝細胞の障害が示唆されるが肝不全までにはいたっていなかったと思われる。

2) 糖尿病モデルラットにおけるセファロスポリン系抗生物質の体内動態

42 週齢糖尿病モデルラットに cefoperazone, cephradine を 40 mg/kg 静注し得られた血清中濃度推移の結果を図 4-1, 4-2 に示す。両薬物とも糖尿病群は対照群と比較して血清中濃度有意に低下していた。薬物投与前後の胆汁流量と胆汁中薬物排泄速度を測定したところ、cefoperazone については糖尿病群の方が胆汁中薬物排泄速度が速い傾向がみられた（図 4-3, 4-4）。また、両群とも cefoperazone 投与によって胆汁流量が増加した。一方 cephradine については胆汁中薬物排泄速度には 45 分までは両群に差は認められなかった。それ以降は糖尿病群の方が有意に低かった。しかし、投与後の胆汁排泄率は糖尿病群と対照群で 15 ± 3 , 8.9 ± 0.6 % と両群に差は見られなかった。また、cephradine については胆汁流量の変化はみられなかった。2 時間での尿中排泄率は、cefoperazone については、対照群の 4 ± 2 % から糖尿病群で 35 ± 11 % と 9.6 倍に、cephradine については対照群の 17 ± 10 % から糖尿病群で 64 ± 4 % と 3 倍に上昇した。表 4-2 にモーメント解析により得られた cefoperazone と cephradine

の pharmacokinetic parameters (CL, Vdss, MRT) を示す。両薬物とも MRT は、対照群に比べ糖尿病群は有意に減少した。Cefoperazone の Vdss/BW は糖尿病群で 1.4 倍有意に増加しており、cephradine の個体あたりの Vdss については、Vdss/BW が糖尿病群で増加傾向があるが有意差はみられなかった。一方、cefoperazone の Vdss は糖尿病群と対照群でそれぞれ $212 \pm 22, 161 \pm 15$ ml (mean \pm SE) と有意差は見られなかったのに対し、cephradine の Vdss は糖尿病群と対照群でそれぞれ $277 \pm 33, 142 \pm 23$ ml と有意差が見られた。

CLtot は、CLtot/BW、体重あたりの胆汁排泄クリアランス (CLbile/BW)、体重あたりの腎クリアランス (CLr/BW = CLtot/BW - CLbile/BW) については、両薬物とも糖尿病群で対照群より有意に増加した。CLtot は、両薬物とも糖尿病群の方が増加傾向にあったが有意差はみられなかった。また、cefoperazone の CLtot に対する CLbile の寄与率は 60% なのに対して、cephradine のそれは 20% であり薬物による排泄型の差が見られた。fp は、両薬物とも糖尿病群と対照群で差は見られなかった。

3) 考察

Cefoperazone と cephradine の CLtot/BW が糖尿病群で増加した。この原因は、cefoperazone の場合は、主に CLbile/BW、一部 CLr/BW の増加が原因であると考えられる。Watkins ら⁹⁵ は streptozotocin 処置ラットで未変化体として胆汁中に排泄されることが知られている ouabain が CLbile/BW の増加だけでなく尿中排泄量が増加する事を報告しており、本研究の結果と一致する。肝胆管腔側細胞膜においては、 β -ラクタム系抗生物質を有機アニオンと認識する輸送系が存在すると考えられている⁹⁷。肝胆管腔側細胞膜小胞へのアニオン構造を持つ β -ラクタム抗生物質のひとつである cefpiramide の取り込みは、bilirubin, bromosulfophthalein (BSP), probenecid 等の有機アニオン化合物や胆汁酸である taurocholate と競合的に阻害されることが報告されている。また cefpiramide の肝胆管腔側細胞膜小胞における取り込みの阻害効果が cefoperazone で 50% あることが報告されていることから cefoperazone も cefpiramide と同様なメカニズムで、肝胆管腔側へ輸送されていると考えられる。今回、胆汁中の胆汁酸濃度は糖尿病群で有意に増加していたことから糖尿病群での CLbile は胆汁酸との競合阻害によって減少すると考えられる。しかし、実際は cefoperazone の CLbile が糖尿病群で 1.0 ml/min 高くなっていた。糖尿病群での CLbile の亢進の原因

は、むしろ cefoperzone によって胆汁流量が増加した事 (図4-3) が原因かもしれない。Watkins ら⁹⁸は、BSP について胆汁流量が増加することを報告している。いずれにしても糖尿病による CLbile の亢進メカニズムに関しては今後更に検討が必要と思われる。一方、cephradine については、胆汁排泄の CLtot に対する寄与率も小さく、CLbile の変化も糖尿病で見られないことより、主に CLr の亢進が CLtot の増加の主な原因であると考えられる。主に未変化体のまま尿中に排泄される薬物 atenolol⁹⁹, cefazolin⁸⁰は streptozotocin 処置ラットで糸球体濾過速度の亢進に伴い CLr が増加することが報告されており、cephradine の場合も糸球体濾過速度の増加が主な原因であると推定される。

Cefoperazone の Vdss/BW が対照群と比較して糖尿病群で増加し、cephradine では有意差が認められなかった。Nadai ら⁸⁰は streptozotocin 処理ラットで cefazolin の fp が血清中の FFA や糖化蛋白の増加に伴い60%増加することを報告しているが、本研究では、cefoperazone, cephradine とともに fp の変化は認められなかった。正常ラットの fp は cefazolin で0.12, cefoperazone で0.44, cephradine で0.82 と、cefoperazone や cephradine が cefazolin より血清蛋白の結合性が低く糖尿病による血清蛋白の質的、量的変化の影響が少なかったためと考えられる。Ilstrup ら¹⁰⁰は、alloxan 処置 12 週間後の糖尿病モデルラットは体重が一致する対照群と比較して細胞外液量が40%増加することを報告している。糖尿病による細胞外液量の増加はセファロsporin系抗生物質の Vdss/BW の増加を引き起こすと考えられ、著者の結果と一致する。一方、Saikawa ら¹⁰¹は ¹⁴C-cefoperazone を用いた実験で、cefoperazone を静注したとき腎臓、肝臓への分布が他の臓器に比較して高く、筋肉および脂肪への分布が低いことを明らかにしている。処理臓器への薬物の移行性の変化や筋肉、脂肪量の減少はセファロsporin系抗生物質の Vdss/BW に影響すると考えられる。以上より、糖尿病による cefoperazone および cephradine の Vdss/BW の変化の原因としては細胞間液量の増加および処理臓器への薬物の分布の増加が考えられる。

以上、糖尿病により胆汁排泄型セファロsporin系抗生物質は胆汁排泄の促進と尿中排泄量の増加により、腎排泄型は尿中排泄量の増加により、血清中薬物濃度の低下が促進されることがわかった。このため、初期の糖尿病患者に対してはセファロsporin系抗生物質の抗菌活性が十分得られない可能性があり、投与設計上注意が必要であることがわかった。

第三章 薬物の腹膜透過モデルの確立

第一節 腹膜透析時における透析液体積，浸透圧と薬物濃度変化

1) 理論

モデル構築においては以下の四つの仮定を立てた。

1. 腹膜上では，溶質の腹腔から血中への透過時に反発がある。
2. 腹膜の物質移動は，diffusion と convection の和で表される。
3. 透析液は常に良く攪拌された状態にある。
4. 腹膜透過するのは，遊離型薬物のみである。

Kedem と Katchalsky によって，等温下において，生体膜を介して接する2つのコンパートメント間の水の体積流 (J_v) は，その系における静水圧差と有効浸透圧によって式 (4-1) の様に表されることが示された¹⁰²。

$$J_v = L_p S (\Delta P - \sigma_i RT \Delta C_i) \quad (4-1)$$

ただし， $L_p S$ は水力学的伝導係数 (ml/min/atm)， ΔP は静水圧差 (atm)， σ_i は反発係数， R はガス定数 (atm ml/K/mol)， T は絶対温度 (K)， ΔC_i は物質 i の濃度差である。

さらに Rippe ら¹⁰³ は，式 (4-1) を拡張し，腹膜の体積流の変化は以下の式で表されることを示した。

$$J_v = L_p S \left(\Delta P - \sigma_{prot} \Delta \pi_{prot} - \sum \sigma_s^i RT I_s^i \Delta C_s^i \right) - L \quad (4-2)$$

σ_{prot} と $\Delta \pi_{prot}$ は，膠質の反発係数と浸透圧差， σ_s^i ， I_s^i と ΔC_s^i はそれぞれ，溶質 i の反発係数，van't Hoff 係数，腹膜間濃度差 (mol/ml)， L は，腹腔からのリンパ流量 (ml/min) を表す。

ΔP ， σ_{prot} ， $\Delta \pi_{prot}$ ， L は，腹膜透析時は定数と考えられるので，これらをひとつの混合パラメータ J_0 と表す。

$$J_0 = L_p S (\Delta P - \sigma_{prot} \Delta \pi_{prot}) - L \quad (4-3)$$

式(4-3)より式(4-2)は、式(4-4)として表される。

$$J_v = J_0 - L_p S \sum \sigma_i RT I_i \Delta C_i \quad (4-4)$$

また、NaやClに代表される溶質の腹腔から血液側へのフラックス(J_s)は、 J_v が比較的小さい場合、静水圧と浸透圧差と溶質の腹膜間での濃度差が driving force となり以下の式によって convection と diffusion の和として記述される。

$$J_s = J_v (1 - \sigma_s) \frac{(C_s^D + C_s^S)}{2} + P_s \Delta C_s + LC_s^D \quad (4-5)$$

C_s^D と C_s^S は、透析液中および血清中の溶質濃度を、 P_s と ΔC_s は、溶質のみかけの腹膜透過クリアランス(ml/min)と溶質の透析液と血清中の濃度差(mol/ml, $C_s^D - C_s^S$)を示す。腹腔でのリンパ流の主な機能は、高分子物質の腹腔への排出であるので、式(4-5)中の LC_s^D の寄与は少ないと考えられ、式(4-6)の様に近似できる。

$$J_s = J_v (1 - \sigma_s) \frac{(C_s^D + C_s^S)}{2} + P_s \Delta C_s \quad (4-6)$$

腹腔内投与後の薬物のフラックス(J_d)は、溶質のフラックスと同様に以下のように表現できる。

$$J_d = J_v (1 - \sigma_d) \frac{(C_d^D + f_p C_d^S)}{2} + P_d \Delta C_d \quad (4-7)$$

σ_d は薬物の反発係数、 C_d^D と C_d^S は、透析液中および血清中の薬物濃度を、 P_d と ΔC_d は、薬物のみかけの腹膜透過クリアランス(ml/min)と薬物の透析液と血清中の濃度差(mol/ml, $C_d^D - f_p C_d^S$)を示す。

本実験系では、血清の組成および透析液の組成を考えると晶質浸透圧を構成している成分のほとんどはNaとClであるので、NaClの濃度が C_s に近似できる。そこで今後 $\sum \sigma_i RT I_i \Delta C_i$ を $\sigma_s RT I_s \Delta C_s$ とする。透析液中(C_{osm}^D)および血清中(C_{osm}^S)の浸透圧は以下の様に表される。

$$C_{\text{osm}}^D \equiv I_s C_s^D + I_d C_d^D \quad (4-8)$$

$$C_{\text{osm}}^S \equiv I_s C_s^S + I_d f_p C_d^S \quad (4-9)$$

I_d は薬物の van't Hoff 定数を示す。

以上より，透析液の体積変化(V^D)，浸透圧変化(C_{osm}^D)，薬物の透析液中濃度変化(C_d^D)は，以下の式で表される。

$$\frac{dV^D}{dt} = -J_0 + L_p \text{SRT} (\sigma_s I_s \Delta C_s + \sigma_d I_d \Delta C_d) \quad (4-10)$$

$$\frac{d(V^D C_{\text{osm}}^D)}{dt} = V^D \left(\frac{dC_{\text{osm}}^D}{dt} \right) + C_{\text{osm}}^D \left(\frac{dV^D}{dt} \right) = - (J_s I_s + J_d I_d) \quad (4-11)$$

$$\frac{d(V^D C_d^D)}{dt} = V^D \left(\frac{dC_d^D}{dt} \right) + C_d^D \left(\frac{dV^D}{dt} \right) = -J_d \quad (4-12)$$

この式 (4-10), (4-11), (4-12) を変形すると以下の式が得られる。

$$\frac{dV^D}{dt} = -J_0 + L_p \text{SRT} \sigma_s \Delta C_{\text{osm}} \quad (4-13)$$

$$\frac{dC_{\text{osm}}^D}{dt} = \left[J_v \left\{ (1 + \sigma_s) C_{\text{osm}}^D - (1 - \sigma_s) C_{\text{osm}}^S \right\} / 2 - P_s \Delta C_{\text{osm}} \right] / V^D \quad (4-14)$$

$$\frac{dC_d^D}{dt} = \left[J_v \left\{ (1 + \sigma_d) C_d^D - (1 - \sigma_d) f_p C_d^S \right\} / 2 - P_d \Delta C_d \right] / V^D \quad (4-15)$$

ただし， $f_p C_d^S$ が C_d^D の 1/10 以下の時は，式 (4-15) は，式 (4-16) の様に近似できる。

$$\frac{dC_d^D}{dt} = \left\{ J_v (1 + \sigma_d) / 2 - P_d \right\} C_d^D / V^D \quad (4-16)$$

2) 結果

ラットに高張，等張，低張（浸透圧比 2, 1, 0.5）な透析液を腹腔内に投与後の透析液の体積（図 4-5）と浸透圧（図 4-6）変化の時間推移の結果を示す。体積マーカーとして分子量 200000 の blue dextran (BD) を用いたが，回収率が， $98.7 \pm 2.2\%$ であり充分その使用に耐えるものであった。また，血清中浸透圧は， 0.3 Osm/kg と一定であった。式 (4-4) と (4-7) を用いて非線形最小二乗法プログラム NONLIN¹⁷ により高張，等張，低張な透析液を用いた場合のデータを同時あてはめを行い $L_p S; 4.69 \pm 0.19 \text{ ml/min/atm}$, $P_s; 0.728 \pm 0.048 \text{ ml/min}$, $J_0; 0.0183 \pm 0.0015 \text{ ml/min}$ を得た。その

fitting curve を図 4-5, 6 に実線に示す. fitting line は実測値を良く説明していた.

Sulfisoxazole と benzoic acid は, 消化管吸収において, その膜透過における solvent drag 効果 (溶媒牽引) の重要性が示唆されている薬物であることに注目し¹⁰⁴, 本章におけるモデル薬物として, その腹膜透過性について検討した. Solvent drag とは, 溶媒の流れに乗って溶質が移動する現象である. 薬物の腹膜透過における solvent drag の効果については, Lau ら¹⁰⁵が, 1.5 %, 4.5 % ブドウ糖透析液の使用時において, theophylline, phenobarital, tobramycin の腹膜透過クリアランスに差が無く, 体積流の影響が見られないことを報告しているが, これまでに薬物の腹膜透過性と水の移動の関係については速度論的に評価した報告は無かった.

等張液に sulfisoxazole または benzoic acid を 100 µg/ml になるよう調製し腹腔内に投与した後の透析液中薬物濃度推移の結果を図 4-7 に示す. 2 時間までの薬物濃度は, 両者とも 1 次で減衰していた. そして, sulfisoxazole のほうが benzoic acid より腹腔からの減衰が遅かった. 一方, 透析液に高張液と等張液を用いた場合を sulfisoxazole (図 4-8) および benzoic acid (図 4-9) について示した. 透析液中 sulfisoxazole 濃度は, 高張液の場合上に凸の曲線を, 低張液の場合下に凸の曲線を描いて減衰しているが, benzoic acid では, 高張液と低張液で減衰速度の差は見られなかった. 両薬物量の経時変化をとると, 逆に sulfisoxazole は, 高張液と低張液で差は見られないが, benzoic acid に差が見られた. この事より, sulfisoxazole では, solvent drag 効果はなく, benzoic acid では solvent drag 効果が見られる可能性が示唆された.

Sulfisoxazole の fp は, 本章実験条件下(10-100 µg/ml) で, 0.027 - 0.083 まで変化し, 非線形の動態を示した. そこで非線形最小二乗法 NONLIN プログラム¹⁷により以下の式にあてはめ, パラメータを算出した.

$$C_b = nPC_f(K_d + C_f) + \alpha C_f \quad (4-17)$$

C_b , C_f は, 血清蛋白に対する sulfisoxazole, 結合同型, 非結合同型濃度, n は結合部位数, P は, アルブミン濃度(470 µM), K_d は解離定数, α は非特異的結合定数を示す. 得られた n , K_d , α は, それぞれ, 1.22 ± 0.14 , $21.9 \pm 5.9 \mu\text{M}$, 0.167 ± 0.173 (mean \pm SD) であった. 一方 benzoic acid は本実験条件下(0.5 - 5 µg/ml) では, 線形の fp = 0.53 ± 0.04 (mean \pm SD) を示した.

血清中薬物濃度の透析液中の薬物濃度に対する比は sulfisoxazole , benzoic acid ともに 0.044, 0.055 と血清中濃度は無視できるほどであった。よって、式 (4-15) の代わりに式 (4-16) を用い、式 (4-13), (4-14) と、図 4-5, 6, 7, 8, 9 のデータに同時あてはめを行い各薬物の σ_d , Pd を得た (表 4-3)。

腹膜における薬物の反発係数と透過性に関する検討した。薬物を全く含まない等張の透析液を用いたときの体積変化を J_{vc} とし、この透析液に薬物を 20 mM 加えたときの体積変化を J_v とすると式 (4-10) から次式が成り立つ。

$$J_{vc} - J_v = L_p SRT \sigma_d I_d C_d^D \quad (4-18)$$

式 (4-18) を σ_d について解くと

$$\sigma_d = (J_{vc} - J_v) L_p SRT I_d C_d^D \quad (4-19)$$

sulfisoxazole, benzoic acid の反発係数または、van't Hoff 定数をそれぞれ、 σ_{BA} , σ_{SIX} または、 I_{BA} , I_{SIX} とすると Rippe ら¹⁰³は、次式が成り立つとしている。

$$\frac{\sigma_{BA}}{\sigma_{SIX}} = \frac{(J_{vc} - J_{v,BA}) I_{BA}}{(J_{vc} - J_{v,SIX}) I_{SIX}} \quad (4-20)$$

薬物を全く含まない等張の透析液を用いたときおよび、この透析液に薬物 (sulfisoxazole, benzoic acid) を 20 mM 加えたときの初期の (0-20 min) 体積変化を見た結果を図4-10に示す。それぞれの傾きが各々 J_{vc} , sulfisoxazole の J_v , benzoic acid の J_v をあらわし、0.0105, -0.0102, -0.0172 ml/min と見積もられた。式 (4-20) より $\frac{\sigma_{BA}}{\sigma_{SIX}}$ は、0.16 と計算され sulfisoxazole のほうが benzoic acid より腹膜で反発されやすいことが確認された。

薬物の腹膜透過性に対する血流速度の影響を検討した。組織毛細血管中の血液が十分に攪拌されている場合、Pd は、臓器クリアランス理論²⁸により薬物の固有腹膜透過クリアランス (P_{dm}) と腹膜の血流速度 (Q) によって式 (4-21) の様に表される。

$$\frac{1}{f_p P_d} = \frac{1}{Q} + \frac{1}{f_p P_{dm}} \quad (4-21)$$

ただし、腹腔における非攪拌層の影響は無く、capillary bed と体循環コンパートメン

トでの fp は変わらないと仮定した。

腹膜での Q を評価するために $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて、以下の検討を行った。 $^3\text{H}_2\text{O}$ を腹腔内投与後の透析液中および血清中濃度推移のデータについて $^3\text{H}_2\text{O}$ の透析液からの消失速度とその濃度勾配の傾きより $^3\text{H}_2\text{O}$ のクリアランス (CLw) を見積もった。CLw は 2.38 ± 0.30 ml/min であった。これは、ラット腹膜の有効血流速度が 3-4 ml/min であること¹⁰⁶を考えればほぼ妥当な値であり、CLw を血流速度の指標とすることができた。

$^3\text{H}_2\text{O}$ の腹膜透過過程が血流律速であることを考えれば、血流を変化させることにより CLw を変えることができ、CLw と Pd の関係から薬物の腹膜透過過程が血流律速か腹膜透過律速であるかを評価できる。そこで、腸間膜系の血管を任意に結紮して透析を行い、CLw と Pd との関係について実験した (図4-11)。この結果より、benzoic acid の Pd は、CLw の変化に影響を受けやすく、sulfisoxazole の Pd は、CLw の変化にほとんど影響を受けないことがわかった。これより少なくとも、sulfisoxazole は、膜透過律速であることがわかった。

本モデルが透析液体積および浸透圧変化を十分記述できるかを検討するために、初期の透析液体積および浸透圧を高張液 (25 ml, 0.55 Osm/kg)、低張液 (45 ml, 0.15 Osm/kg) に変えて benzoic acid 100 $\mu\text{g/ml}$ を腹腔内投与後の透析液体積、浸透圧、benzoic acid 濃度が、表 4-3 のパラメータを用いた本モデルで予測可能か検討した結果を図 4-12 に示した。決定係数は、透析液体積、浸透圧、benzoic acid 濃度についてそれぞれ 0.999, 0.989, 0.979 であり、予測曲線は実測値を充分説明しており本モデルの妥当性が支持された。

3) 考察

本章では、腹膜透析時の透析液体積、浸透圧および透析液中薬物濃度を記述できるモデルの確立を行った。今回モデル薬物として sulfisoxazole, benzoic acid の pKa はそれぞれ 5.1, 4.2 であるので、透析液中および生体内ではほとんどイオン型として存在している。各種腹膜透過パラメータを求めるに当たって、 σ_s をネコの腹膜透過実験で得られた 0.01 という値をそのまま用いた¹⁰³。 σ_s は、腹膜の表面積には依存しないと考えられるのでこの仮定は妥当なものと思われる。曲線あてはめにより得られた、 LpS, J_0 は、ラットの L を 0.0026 ml/min とすると $\Delta P - \sigma_{\text{prol}} \Delta \pi_{\text{prol}}$ は、3.4 mmHg と計算され、ラットの報告値 (4.4 mmHg)¹⁰⁷、ネコの報告値 (10-15 mmHg)¹⁰³ とほぼ

同等であった。Sulfisoxazole, benzoic acid の反発係数の見積もりについては表 4-3 の値から得られた $\frac{\sigma_{BA}}{\sigma_{SIX}}$ は、0.07 であったが、図 4-10 より得られた 0.16 とやや異なつた。この原因としては、 σ_{SIX} の 0.991 を過大評価したのが一因と考えられる。

クリアランスの定義より腹腔内投与後の総腹膜クリアランスは (CL_d) は、以下の式で表される。

$$CL_d = J_d / C_d^D \quad (4-22)$$

式 (4-12) を用いて式 (4-22) を変形すると、

$$CL_d = \left\{ J_v (1 - \sigma_d) (C_d^D + f_p C_d^S) / 2 + P_d \Delta C_d \right\} / C_d^D \quad (4-23)$$

よって、 CL_d は、 J_v と $\frac{C_d^D}{C_d^S}$ の関数となるので、透析後の時間によって変化すると考えられる。 $C_d^D \gg f_p C_d^S$ の場合式 (4-23) は (4-24) に簡略化される。

$$CL_d = J_v (1 - \sigma_d) / 2 + P_d \quad (4-24)$$

式 (4-23) より、 CL_d は、 J_v 、 σ_d 、 P_d の関数になることがわかる。そして、透析液と血清の浸透圧差がなくなり透析液体積の変化が無くなったあとは CL_d は P_d に近似されることがわかる。Sulfisoxazole については、その σ_d が、大きいため、solvent drag 効果が見られなかったと思われる。一方、benzoic acid の場合は、 σ_d が小さいが、 J_v に比べ P_d の寄与 (diffusion) が大きいため、小腸において benzoic acid で観測されたような顕著な solvent drag 効果が腹膜では benzoic acid について見られないと推定される。一方、 P_d への Q の寄与については、式 (4-21) より sulfisoxazole ではほとんど無く benzoic acid では、一部あることが推定された。この事より少なくとも sulfisoxazole は、膜透過律速であると考えられる。この様に、水分の移動に関する考察も薬物の腹膜透過動態と同時に評価できる点が本モデルの特徴である。以上より、薬物の腹膜透過を記述でき、かつ透析液の体積変化および浸透圧変化 (図 4-12) も表現できるモデルを確立できた。

第二節 薬物の腹膜透過クリアランスへの血清蛋白非結合型分率の影響

1) 理論

血清蛋白結合パラメータの見積もりは, cefazolin, cefatrizine (CFT), ceftriaxone (CTRX) については, 非線形の挙動を示したので以下の式にあてはめた.

$$C_b = \frac{nK_s PC_f}{(1 + K_s C_f)} + \alpha C_f \quad (4-25)$$

K_s は会合定数 (M^{-1}) を示す.

静脈内薬物投与後の血清中薬物濃度 (C_d^s) 推移は以下の2コンパートメントモデル式で記述できるとした.

$$C_d^s = A_1 e^{-\lambda_1 t} + A_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (4-26)$$

ただし, A_1 , A_2 , λ_1 , λ_2 は, ハイブリッドコンスタントである.

他の理論については, 第一節に準じた.

2) 結果

本節で用いた6種類のセファロsporin系抗生物質 (cefatrizine, cefazolin, cefpiramide (CPM), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone, cefaloridine (CER)) の fp と式 (4-25) により得られた結合パラメータの結果を表 4-4 に示した. また, 非線形性を示した cefazolin, cefatrizine, ceftriaxone については総濃度に対する fp の関係を図 4-13 に示す. 6種類のセファロsporin系抗生物質は, 20 mg/kg 静注後の血清中濃度の変動範囲 (1 - 400 $\mu\text{g/ml}$) において fp が 0.08 から 0.60 と広く分布しており蛋白結合による腹膜透過の変動を見るのに適した薬物群であるといえる.

6種類のセファロsporin系抗生物質をそれぞれ 20 mg/kg 静注後の透析液体積と浸透圧の経時変化の結果を示す (図 4-14). 抗生物質間でデータに差が見られなかったため全データを平均してプロットした. 実線は, 式 (4-13), (4-14) を用いて sulfisoxazole, benzoic acid で得られた LpS , Ps , J_0 (表 4-3) を用いてシミュレーションしたものである. 実線は実測値を良く説明しているため, 本節の検討では, 表 4-3 のデータをそのまま用いた.

6種類のセファロスポリン系抗生物質をそれぞれ20 mg/kg 静注後の血清中および透析液中薬物濃度の経時変化の結果を示す(図4-15)。いずれの薬物も血清中濃度推移は2相性を示した。まず、式(4-26)により、各種抗生物質の血清中濃度データを非線形最小二乗法によりあてはめた。得られたパラメータを表4-6に示す。そして、式(4-13), (4-14), (4-15)と式(4-26)を用いて各種抗生物質のPdと σ_d を非線形最小二乗法プログラムにより同時あてはめにより算出した(表4-5)。

3) 考察

本節ではセファロスポリン系抗生物質の腹膜透過についてのfpの影響を検討し、非結合型薬物のみが腹膜を透過するとした著者のモデルで十分、透析液体積、浸透圧、透析液中薬物濃度変化を十分説明できることがわかった。Flessnerら⁸⁷は、ラットについて $[^{25}\text{I}]\text{BSA}$ が血清中から腹腔へ腹膜の組織を介して移行することを報告している。彼らは、albuminの様な巨大分子でも経組織ルートかpinocytosisにより腹膜を移行すると述べている。血清albuminに薬物が結合することによって、薬物の腹膜透過性が亢進する可能性が考えられるが表4-5に示すPdは、albuminの値(0.018 ml/min)の5から17倍大きいのでalbuminに結合した薬物が透過していても検出できなかったと考えられる。以上よりAlbumin-mediated transportが腹膜でも存在するという証拠は今回得られなかった。今回用いたセファロスポリン系抗生物質のPdは、0.09 - 0.3 ml/minであった。水溶性物質のpolyethylene glycol(分子量900)やsucrose(分子量342)のラットの腹膜透過性は、0.07, 0.3 ml/minと報告されている⁸⁶。セファロスポリン系抗生物質は、pH7.4ではアニオンになっており分子量は416-613であるので、得られた値は妥当なものと思われる。今回実験に使用したセファロスポリン系抗生物質の σ_d は、かなり高いものであった。これを確認するために、sulfisoxazoleとbenzoic acidの時と同様に、高濃度(20 mM)のcephaloridine, cefazolinを腹腔内投与した後の透析液体積の20 minの変化をみると、cefazolinのほうがcephaloridineより1.5倍体積の変化が大きいことを確認した。消化管吸収においてもセファロスポリン系抗生物質の反発係数は、0.9程度と高いこととも一致する¹⁰⁴。Cephaloridineの反発係数が比較的低かったのは、3位の側鎖に正に荷電した部位があることが原因と思われる。

第四章 薬物の脂溶性と腹膜透過クリアランスの関係

第一節 酸性薬物の脂溶性と腹膜透過クリアランスの関係

1) 理論

基本的には第二章と同じ理論を用いている。ただし、本章では等張な透析液を用いたので、 J_v は P_d に比べ 1/10 以下となり、式 (4-15) は、次式に近似できる。

$$\frac{dC_d^D}{dt} = -P_d(C_d^D - f_p C_d^S) / V^D \quad (4-27)$$

つまり、 σ_d の変化の寄与する率は、薬物の濃度変化速度に比べて小さく、今回は P_d だけに注目できる実験系であるといえる。

腹腔内薬物投与後の血清中薬物濃度は以下の式で表されるとした。

$$C_d^S = A(e^{-\alpha t} - e^{-\beta t}) \quad (4-28)$$

ただし、 A, α, β は、血清中薬物濃度を記述するためのハイブリッドコンスタントである。

P_d の実態を明らかにするためには、その値が何に影響されているかを考察することは重要である。 P_d と Q の関係式は第三章と同じ式 (4-21) を用いて解析した。 P_{dm} は、 f_p や Q の影響が除かれた分だけ、より膜の脂溶性分配との相関を見るのに妥当なパラメータであると考えられる。 Q の値は、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて求めた CL_w 値 2.38 mL/min を用いた。

2) 結果

2-1) バルビツール酸系薬物の腹膜透過クリアランス (P_d) の算出

2-1-a) f_p の決定

様々な脂溶性を持つ barbital, metharbital, phenobarbital, pentobarbital, thiopental, thiamylal について今回 P_d を求めるために、腹膜透過の変動因子のひとつである f_p

を求めた。各薬物ごとにfp値はthiamylalの0.3からbarbitalの0.9と大きく異なっていたが、全ての薬物のfpは血清中総薬物濃度が100 μ g/ml以下で線形性であった(表4-7)。

2-1-b) 透析液中薬物濃度推移とPdの見積り

図4-16に、バルビツール酸系薬物の透析液中薬物濃度推移と血清中薬物濃度推移を示した。透析液中薬物濃度は、それぞれ初期濃度を100%とすると12分後でbarbital 73.2%, metharbital 43.1%, phenobarbital 52.9%, pentobarbital 40.4%, thiopental 19.4%, thiamylal 18.6%が透析液中に残っており、初期における薬物の消失の割合が薬物ごとに異なっていた。metharbital, phenobarbital, pentobarbitalは、初期は急な、終末相でゆるやかな2相性の消失を、thiopental, thiamylalは、初期、中期、終末相でそれぞれ傾きが異なっている3相性の消失を示していた。

図4-16の値を用いて各薬物の透析液中薬物濃度、データへの同時あてはめを行い、Pd、 σ_d を計算した。実測値と計算値とは全体的に一致していたが、thiopentalとthiamylalでは30分前後において低い値で計算されていた(図4-16)。この原因としては、脂溶性が高いthiopentalとthiamylalは、一旦、脂肪や組織に速やかに分布し、その後、再分配されてくるためと考えられる。

今回得られた薬物の σ_d およびPdの値をキノロンカルボン酸系抗菌薬の結果とともに表4-7に示した。Pdは、norfloxacinの0.184 ml/minからthiamylalの5.69 ml/minまでの値を段階的にとることがわかった。

2-3) PappとPdの関係

表4-7に、Pappの値を示した。4から523まで変化することがわかった。そこで、図4-17-aにPappとPdの関係を示した。Log PappとPdの対数の間には正の相関が認められた。更に式(4-21)で示される、PdmとPappの関係を図4-17-bにプロットした。

両者の間には以下の関係式が相関係数0.990で成り立つ。

$$P_{dm} (\text{ml} / \text{min}) = 0.88 \cdot (P_{app})^{0.46} \quad (4-29)$$

このことは、膜の脂溶性分配の理論に合っていることを示している。つまり、薬物の脂溶性を測定することでその薬物の腹膜透過性をある程度予測できることが示唆

された。

3) 考察

本節では、酸性薬物の腹膜透過性と、血流速度、蛋白結合、脂溶性の関係を関連づけることを試みた。そして、生理学的薬物速度論の考えを腹膜の薬物透過についても適用できた。

新たにバルビツール酸系薬物でPdを求め、0.97 から5.7 ml/minの値をとることがわかった。Thiopentalやthiamylalの $f^s P_{dm}$ 値は6.5および5.4 ml/minであった。これは腹膜の有効血流量(2.34 ml/min)の2-3倍以上であり、高い脂溶性をもつバルビツール酸系薬物は血流速度の可能性が示唆された。キノロンカルボン酸系抗菌薬についての $f^s P_{dm}$ 値は0.025 から0.23 ml/minの値を取る。これらは有効腹膜血流速度の1/10であり、低脂溶性の薬物は、クリアランス速度である可能性が示唆された。しかし、キノロンカルボン酸系抗菌薬の中にはcinoxacinの様に予測値と実測値が3倍以上異なるものも見られる。この変動は脂溶性以外の要因によると考えられる。以上より式(4-21)と(4-29)から以下の式を新たに導入した。

$$P_d = 0.2 + \frac{Q \cdot (P_{app})^{0.5}}{Q + f^s \cdot (P_{app})^{0.5}} \quad (4-30)$$

この式の実測値に対する相関係数は0.992と高かった。式(4-30)を用いることにより酸性薬物のPdは、少なくとも65%以下の誤差で予測できる。このモデルはさらに多くの薬物で検証する必要があるが、薬物の分配係数を用いることにより、Pdを実測しなくても腹膜透過性が推定できることという可能性が示唆されたことは意義深い。

第二節 腹膜透過クリアランスの用量依存性

1) 理論

本編の第三章第二節に従う。

2) 結果

Benzoic acid を腹腔内に 100 $\mu\text{g/ml}$ 投与した結果 (表 4-3) と、式 (4-30) から推定された Pd を比較すると実測値は予測値より 4 倍大きな値をとった。

Benzoic acid の Pd について用量依存性があるか検討するために、ラットに benzoic acid を 20, 50, 200, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 腹腔内投与後の透析液中および血清中 benzoic acid 濃度推移を検討した結果を図 4-19 に示す。対照として、式 (4-30) で Pd が良く予測可能な phenobarbital も同様な検討を行った。Phenobarbital については透析液濃度の減衰の傾きは用量によって変化していないのに対し、benzoic acid については低容量になるにしたがって傾きが大きくなる傾向があった。

薬物の Pd を求める上で重要なパラメータである fp を求めた。Benzoic acid の fp は、0.4 から 0.8 へと変化することがわかった (図 4-18)。式 (4-25) を用いて非線形最小二乗法により結合定数 (K_a , n , α) が、それぞれ $3139 \pm 247 \text{ M}^{-1}$, 0.94 ± 0.06 , 0.103 ± 0.010 (mean \pm SD) と得られた。ただし、albumin 濃度は 470 μM とした。一方 phenobarbital と acetaminophen の fp は、実験濃度範囲内 (1-100 $\mu\text{g/ml}$) で線形であり、それぞれ、 0.687 ± 0.021 , 0.674 ± 0.051 であった。

得られた血清蛋白結合パラメータを用いて、式 (4-13), (4-14), (4-27), (4-28) より非線形最小二乗法により、各用量における Pd を算出した (表 4-8)。Phenobarbital の Pd は用量依存性は見られなかったが、benzoic acid については、20 $\mu\text{g/ml}$ は、1000 $\mu\text{g/ml}$ の場合の Pd の約 3 倍であり用量依存性が認められた。

3) 考察

結果 (表 4-3) と、式 (4-30) から推定された Pd を比較すると実測値は予測値より 4 倍大きな値が得られた。また、benzoic acid と同程度の Papp を持つ lomefloxacin についてはその様な傾向は見られなかった。この Pd は benzoic acid と同等の分子量でより脂溶性の高い acetaminophen よりも大きかった。また、benzoic acid について用量依存性が観測された。以上のことより benzoic acid のラットにおける腹膜透過ク

リアランスは、その脂溶性や分子量から予測される以上に大きいことが示された。このことは、benzoic acid の腹膜透過性について脂溶性分配以外の輸送機構が関与していることを示唆している。Benzoic acid については、Tsuji らが⁹² Caco-2 cellを用いた実験等により、小腸においてモノカルボン酸構造特異的な能動輸送機構があることを示している。この事から腹膜上にも薬物の能動輸送系が存在するかもしれない。この点については今後他のモノカルボン酸基を持つ物質での検討等を加え実証していく必要がある。

1) 理論

基本的には本編第三章と同じであるが、慢性腎不全患者の透析液中薬物濃度の予測は、透析液と血清中の浸透圧差が少ないこと、等張液を透析液を用いたことにより J_v の寄与が無視できることから、式 (4-15) を簡略化した以下の式を用いた。

$$\frac{dC_d^D}{dt} = -P_d(C_d^D - f_p C_d) / V^D \quad (4-31)$$

そして、式 (4-26) , (4-31) を用いて透析液中薬物濃度の予測を行った。

2) 結果

セファロスポリン系抗生物質の腹膜透過性の種差を検討するために cefazolin を使用して、マウス、家兎についてラットと同様な腹膜透過実験を行った。その結果得られた、血清蛋白結合、腹膜透過、血清中動態パラメータを表4-4, 5, 6 に示した。見積もられた P_d (ml/min) は、マウスで 0.0397, ラットで 0.217, 家兎で 1.52 であった。Cefazolin の P_d と体重との関係をプロットした結果を図 4-20 に示した。体重と P_d の指数回帰の結果は、

$$P_d (\text{ml} / \text{min}) = 0.687 \cdot (\text{BW})^{0.828} \quad (4-32)$$

であった。

この式から推定された 34 kg の慢性腎不全患者の P_d は、12.7 ml/min であった。図 4-21 に、34 kg の慢性腎不全患者に cefazolin を 1 g 静注した後の 1.5 % dextran を含む腹膜透析液 透析液 (透析液体積 1 l, 等張液) 適用中の血清および透析液中 cefazolin 濃度推移の結果を示した。実線は、 $P_d = 12.7 \text{ ml/min}$ を用いて式 (4-26) (4-31) から、透析液中 cefazolin 濃度推移を予測した結果である。実測値と良く一致しており、十分本方法で患者の腹膜透析液中薬物濃度が予測できることが示された。

3) 考察

Dedrick ら¹⁰⁶ は、尿素や inulin についての腹膜透過について $(\text{BW})^{0.74}$, $(\text{BW})^{0.62}$ と

報告している。尿素や inulin の腹膜透過性は、腹膜の表面積である体重の $2/3$ 乗と関連していると考えられる。したがって、今回、式(4-31)で得られた指数項の0.828は、cefazolinの腹膜透過も腹膜の表面積に比例することを示唆している。今回、cefazolinについてPdの予測が可能であったことは、cefazolinの腹膜透過についてはアニマルスケールアップ法による臨床応用の可能性があることが示された。

本編では、病態時の腎機能変化時の薬物の体内動態変動に着目し、糖尿病と、腹膜透析について、クリアランスの概念を基本としてその際におこる様々な変動因子を解明した。また、腹膜透析については動物実験ので確立されたパラメータの妥当性をアニマルスケールアップの手法により臨床に応用できることを明らかにした。

まず、糖尿病での薬物の体内動態変動因子解析をラットに streptozotocine を投与して作製した糖尿病モデルで行った。その結果、主排泄経路の異なる、cefoperazone と cephadrine の両方で観測された糖尿病による CL_{tot} の亢進は、胆汁排泄型の cefoperazone は、 CL_{bile} と CL_r の増加また、腎排泄型の薬物である cephadrine は、 CL_r の増加が主な原因であることが分かった。

慢性腎不全患者の代替排泄機構として利用されている腹膜透析に注目し、著者は、その際利用される腹膜上の薬物の透過され易さと、透析治療上重要な因子である水の除去能を同時に解析できる腹膜透過解析モデルをラットについて確立した。ここで腹膜での透析のされやすさを表す指標として腹膜透過クリアランス (P_d) というパラメータを提示した。このパラメータは薬物の血清中濃度推移、 f_p 、 Q 等の変動を充分記述できるパラメータであることをセファロsporin系抗生物質等を用いた実験で明らかにした。また酸性薬物について薬物の脂溶性とこの P_d が指数相関関係にあることがわかった。この指数関係式より、薬物の腹膜透過性が、薬物の物理化学的性質により推定できる可能性が示唆された。しかし、benzoic acid は脂溶性分配だけでは説明できない別の腹膜透過機構が関与している可能性が示唆された。今後この機構を解明していくことにより、より透析効率を上げる手法が確立できるかもしれない。以上の結果を踏まえアニマルスケールアップの手法を用いて動物実験で得られた cefazolin の P_d が腎不全患者へ外挿が可能であり提示したパラメータが臨床的にも有用であることがわかった。

表 4-1 Characterization of STZ-induced diabetes in Sprague-Dawley rats

Values represent means \pm SE. The number of experiments is given in parentheses.

Parameter	Control	Diabetic
Body weight (g)	654 \pm 35 (8)	300 \pm 22 (8) ^a
Liver weight (g)	17.1 \pm 1.0 (8)	15.2 \pm 0.9 (8)
Bile glucose (mg/dl)	50 \pm 10 (8)	118 \pm 19 (8) ^a
Plasma glucose (mg/dl)	246 \pm 11 (8)	544 \pm 49 (8) ^a
Plasma albumin (g/dl)	3.7 \pm 0.1 (8)	3.3 \pm 0.2 (8) ^a
Plasma creatinine (mg/dl)	0.50 \pm 0.04 (8)	0.59 \pm 0.05 (8)
GPT (KU)	206 \pm 20 (8)	233 \pm 37 (8)
Bile acid (mmol/liter)	29.8 \pm 3.2 (8)	63.5 \pm 3.9 (8) ^a
Bile pH	7.89 \pm 0.09 (3)	8.13 \pm 0.13 (3)
Bile osmolality (mOsm/kg)	305 \pm 2 (3)	340 \pm 9 (3) ^a
Basal bile flow (μ l/min)	20.3 \pm 2.3 (8)	22.3 \pm 2.5 (8)
Urine pH	6.98 \pm 0.24 (8)	6.36 \pm 0.33 (7)
Urine osmolality (mOsm/kg)	1363 \pm 160 (8)	611 \pm 29 (7) ^a
Urine output (ml/24 hr)	13.6 \pm 1.9 (8)	115 \pm 26 (6) ^a
Water intake (ml/24 hr)	14.8 \pm 2.2 (8)	110 \pm 26 (6) ^a

^a Values are significantly different from control.

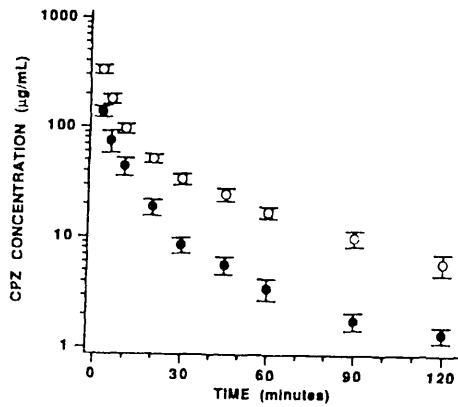


图 4-1 Effect of diabetes on the plasma disappearance of CPZ.

Symbols and vertical bars represent the means \pm SE of four diabetic (●) and control (○) rats each administered CPZ.

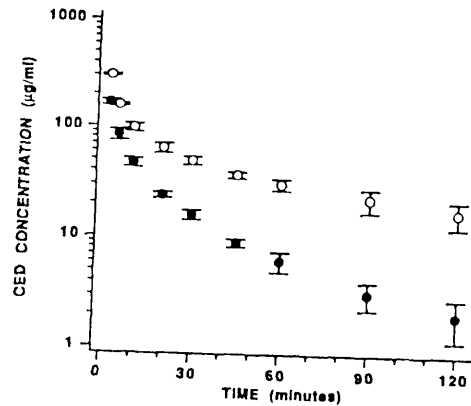


图 4-2 Effect of diabetes on the plasma disappearance of CED.

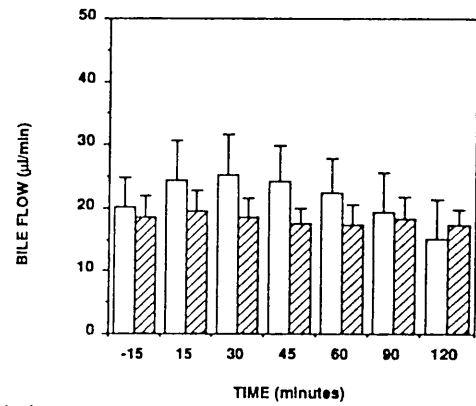
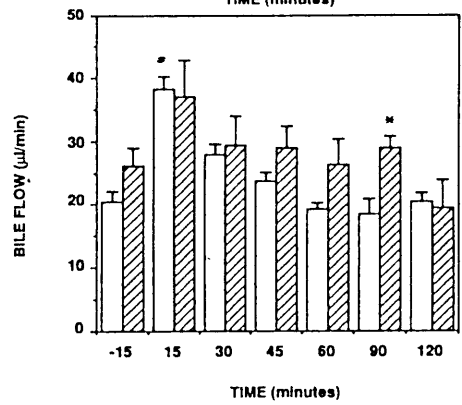
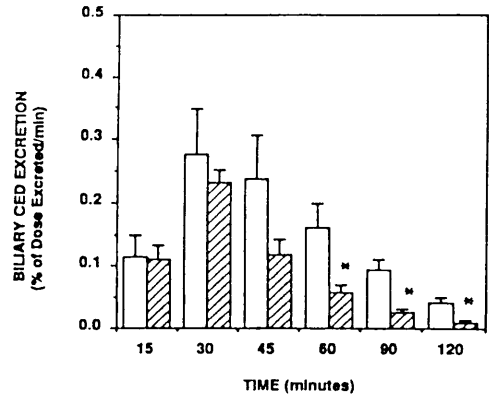
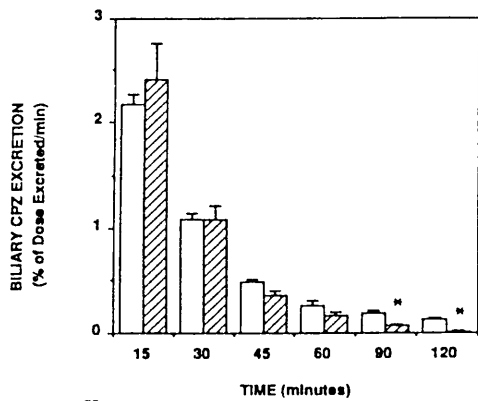
Symbols and vertical bars represent the means \pm SE of four diabetic (●) and control (○) rats each administered CED.

表 4-2 Effect of STZ-induced diabetes on pharmacokinetic parameters for CPZ and CED

Values represent means \pm SE of four rats unless otherwise stated.

Parameters	CPZ		CED	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic
Vd_{11} (ml/kg)	320 \pm 13	488 \pm 49 ^a	426 \pm 24	545 \pm 90
CL_{tot} (ml/min)	5.97 \pm 0.82	8.72 \pm 1.06	4.04 \pm 1.08	5.56 \pm 1.01
CL_{bile} (ml/min)	4.44 \pm 0.47	5.76 \pm 0.51	0.78 \pm 0.2	0.51 \pm 0.08
MRT (min)	37.1 \pm 5.1	19.2 \pm 2.4 ^a	80.2 \pm 19.3	27.4 \pm 4.9 ^a
f_p	0.44 \pm 0.06	0.49 \pm 0.03 (N = 3)	0.82 \pm 0.01	0.83 \pm 0.02

^a Values are significantly different from control.



☒ 4-3 Effect of diabetes on the biliary excretion of CPZ.

Bars in top panel represent the means \pm SE of four diabetic (hatched column) and control (open column) rats each administered CPZ. Bottom panel shows the bile flow rate before and after CPZ administration for the indicated intervals. *, significantly different from control; #, significantly different from basal bile flow (paired *t* test).

☒ 4-4 Effect of diabetes on the biliary excretion of CED.

Bars in top panel represent the means \pm SE of four diabetic (hatched column) and control (open column) rats each administered CED. Bottom panel shows the bile flow rate before and after the CED administration for the indicated intervals. *, significantly different from control.

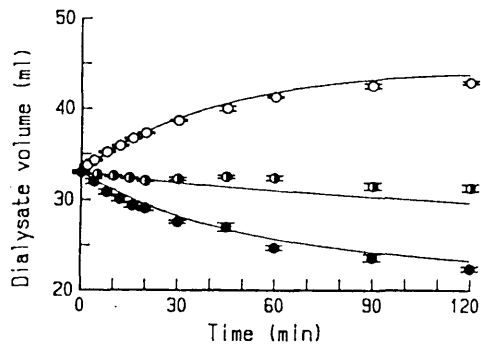


Figure 4-5 Time courses of the dialysate volume after instillation of the hypertonic (○), isotonic (◻), or hypotonic (●) dialysate in rats. Each point and vertical bar represent the mean \pm SEM ($n = 6-7$). Solid lines show the computer-generated simulation curves using the hydrodynamic parameters estimated by a nonlinear least-squares regression analysis.

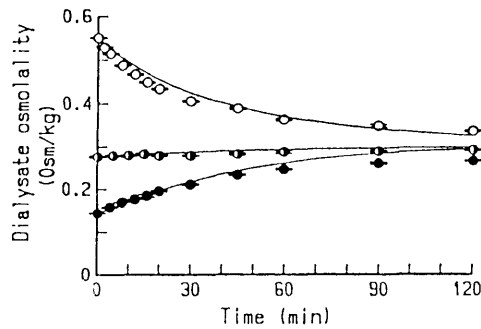


Figure 4-6 Time courses of the dialysate osmolality after instillation of the hypertonic (○), isotonic (◻), or hypotonic (●) dialysate in rats. Each point and vertical bar represent the mean \pm SEM ($n = 6-7$). Solid lines show the computer-generated simulation curves using the hydrodynamic parameters estimated by a nonlinear least-squares regression analysis.

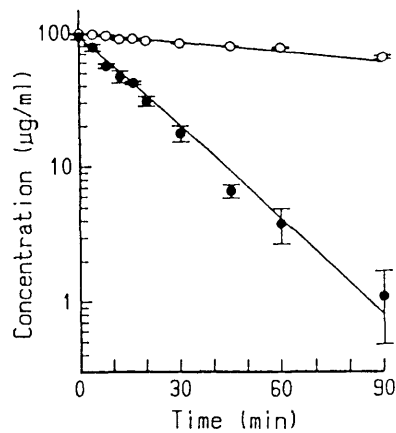
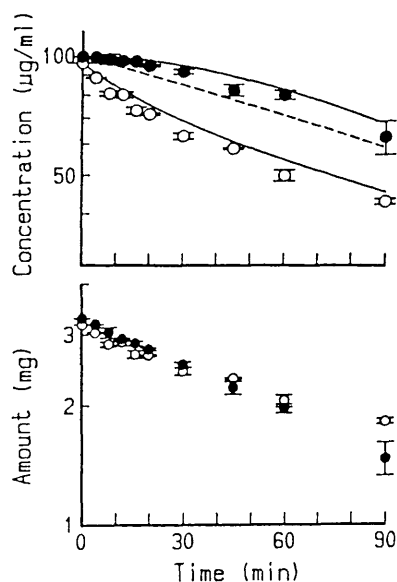
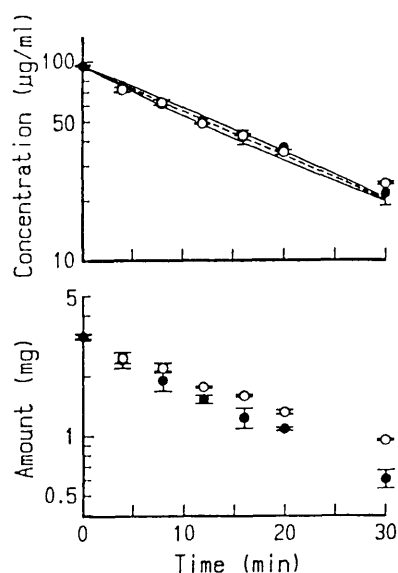


Figure 4-7 Disappearance curves of sulfisoxazole (○) and benzoic acid (●) from the peritoneal cavity after instillation of the isotonic dialysate in rats. Each point and vertical bar represent the mean \pm SEM ($n = 4-9$). Solid lines show the computer-generated simulation curves using the hydrodynamic parameters estimated by a nonlinear least-squares regression analysis.



⊠ 4-8 Disappearance curves of sufisoxazole from the peritoneal cavity after instillation of the hypertonic (○) or hypotonic (●) dialysate in rats, expressed in terms of drug concentration (upper panel) and amount (lower panel) in the dialysate. Each point and vertical bar represent the mean \pm SEM (n = 4-9). Solid lines show the computer-generated simulation curves using the hydrodynamic parameters estimated by a nonlinear least-squares regression analysis. The position of the isotonic fluid curve presented in Fig 4-7 is indicated by a dashed line.



⊠ 4-9 Disappearance curves of benzoic acid from the peritoneal cavity after instillation of the hypertonic (○) or hypotonic (●) dialysate in rats, expressed in terms of drug concentration (upper panel) and amount (lower panel) in the dialysate. Each point and vertical bar represent the mean \pm SEM (n = 4-9). Solid lines show the computer-generated simulation curves using the hydrodynamic parameters estimated by a nonlinear least-squares regression analysis. The position of the isotonic fluid curve presented in Fig 4-7 is indicated by a dashed line.

表 4-3 Estimated Hydrodynamic Parameters for Peritoneal Transport of Sulfisoxazole and Benzoic Acid in 250-g Rats^a

Hydrodynamic Parameter	Sulfisoxazole	Benzoic Acid
LpS , mL min ⁻¹ atm ⁻¹ ^b	4.69 ± 0.19 ^b	
P_a , mL min ⁻¹ ^c	0.728 ± 0.048 ^d	
J_0 , mL min ⁻¹ ^d	0.0183 ± 0.0015 ^d	
P_d , mL min ⁻¹ ^e	0.215 ± 0.004 ^h	1.71 ± 0.02 ^h
σ_d ^f	0.991 ± 0.090 ^h	0.0699 ± 0.0579 ^h

^a Mean ± SD; each value was obtained by a nonlinear least-squares regression analysis using the computer program NONLIN (ref 17). ^b The hydraulic conductivity. ^c The apparent capillary membrane permeability of sodium chloride. ^d Represents $J_0 = L_p S (\Delta P - \sigma_{prot} \Delta \pi_{prot}) - L$ (see text for details).

^e The apparent capillary membrane permeability of the drug. ^f The reflection coefficient of the drug. ^g Obtained by simultaneously fitting the observed data (Fig 4-5 and 4-6) to eqs 4-13 and 4-14. ^h Obtained by simultaneously fitting the observed data (Fig 4-5~4-9) to eqs 4-13, 4-14 and 4-16.

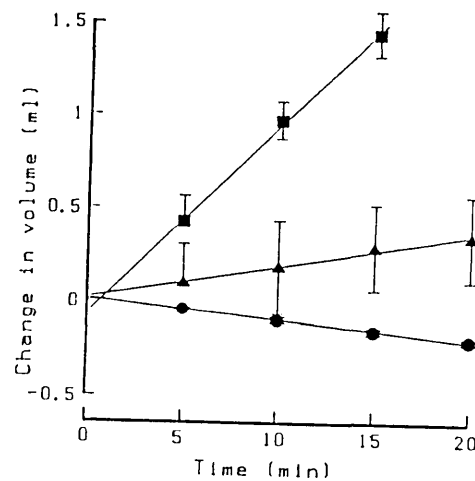


图 4-10

Time courses of the dialysate volume after instillation of the isotonic dialysate in the absence (●) and in the presence of 20 mM sulfisoxazole (■) or benzoic acid (▲) in rats. Each point and vertical bar represent the mean ± SEM (n = 6-8). Solid lines were generated by a linear least-squares regression analysis.

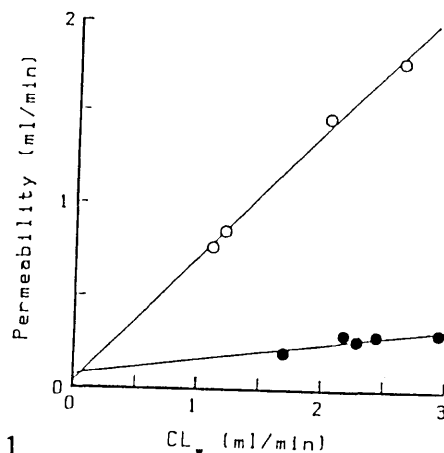


图 4-11

Relationship between the apparent capillary membrane permeability (P_a) of sulfisoxazole (●) and benzoic acid (○) and peritoneal clearance of tritiated water (CL_w) in rats. Each point represents an individual experiment of peritoneal dialysis using isotonic dialysate containing a drug (100 μg/mL) and tritiated water (60 nCi/mL).

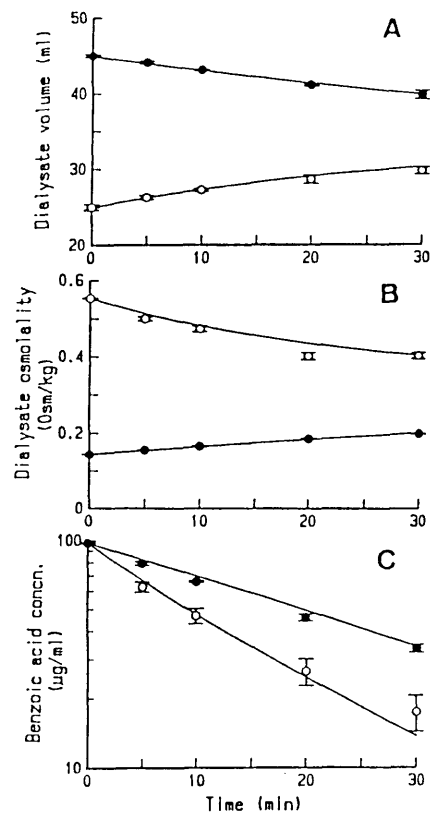


Fig 4-12 Time courses of the dialysate volume (panel A), osmolality (panel B), and concentration of benzoic acid (panel C) after instillation of the hypertonic (○) or hypotonic (●) dialysate in rats under different initial conditions (20 ml and 0.55 Osm/kg for hypertonic, and 45 ml and 0.15 Osm/kg for hypotonic). Each point and vertical bar represent the mean \pm SEM (n = 6-7). Solid lines show the computer-generated simulation curves using the hydrodynamic parameters listed in Table 4-3.

表 4-4

Binding Parameters^a of Cephalosporins with Plasma Proteins

Antibiotic	Species	n^b	K_a, M^{-1}^b	α	f_p
Cefatrizine ^c	Rat	0.666 ± 0.055	43100 ± 6740	0.065 ± 0.072	0.080 ~ 0.570 ^d
Cefazolin	Mouse	—	—	—	0.564 ± 0.014 ^e
	Rat	0.858 ± 0.082	8501 ± 1570	0.263 ± 0.025	0.216 ~ 0.658 ^d
	Rabbit	0.775 ± 0.396	21900 ± 10100	0.500 ± 0.770	0.108 ~ 0.560 ^d
	Human ^c	—	—	—	0.477 ± 0.046 ^f
Cefpiramide	Rat	—	—	—	0.409 ± 0.054 ^g
Ceftazidime	Rat	—	—	—	0.445 ± 0.047 ^h
Ceftriaxone	Rat	0.599 ± 0.071	14860 ± 3700	0.237 ± 0.028	0.188 ~ 0.688 ^d
Cephaloridine	Rat	—	—	—	0.571 ± 0.049 ^e

^a The binding parameters were estimated by using eq 4-25. ^b An albumin concentration of 470 μ M was used for calculation. ^c Determined using serum sample obtained at various times after intravenous administration at doses of 20 mg/kg (rats) and 1 g (human). ^d Calculated in the range of total serum concentration of 20-350 μ g/ml (CFT) and 1-1000 μ g/ml (CEZ and CTRX) using the binding parameters. ^e The mean \pm SD in the range of total serum concentration of 1-400 μ g/ml. ^f The mean \pm SD in the range of total serum concentrations of 132-255 μ g/ml. ^g The mean \pm SD in the range of total serum concentrations of 1-100 μ g/ml.

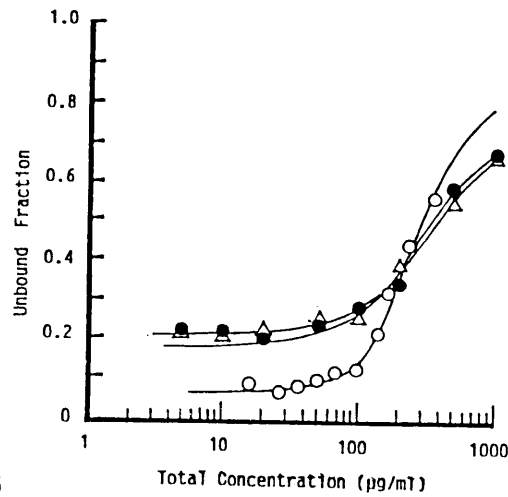


图 4-13 Relationship between the mean serum unbound fraction ($n = 3$) and the total serum concentration of CEZ (Δ), CFT (\circ), and CTRX (\bullet) in rats. The solid lines were generated from eq 4-24 using the binding parameters listed in Table 4-4.

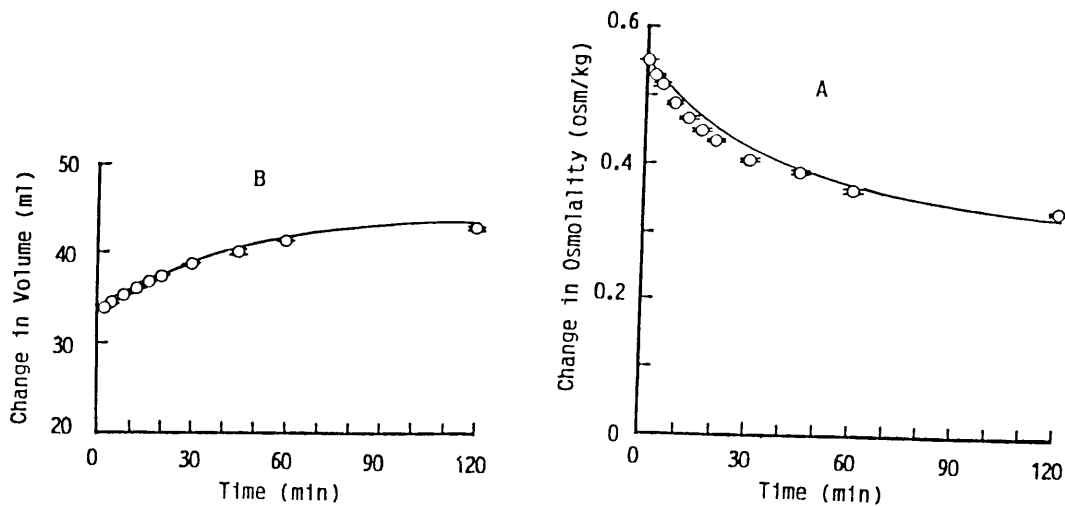


图 4-14 The changes in osmolality (A) and volume (B) of the dialysate solution (0.551 Osm/kg and 33 ml) in the rat peritoneal cavity. The points are the experimental values (mean \pm SEM, $n = 6-40$). The lines were generated from eq 4-13 for panel (A) and eq 4-14 for panel (B).

表 4-5

Kinetic Parameters^a of the Peritoneal Transport of Cephalosporins

Parameter	Mice	Rats	Rabbits	Human Patient
$LpS\sigma_a$, mL/min/atm	0.0187 ± 0.0016	0.0469 ± 0.0019	0.312 ± 0.008	—
R , atm·L/K/mol	0.082	0.082	0.082	—
T , K	310	310	310	—
J_0 , mL/min	0.000124 ± 0.000024	0.0184 ± 0.0015	0.000921 ± 0.00087	—
P_a , mL/min	0.683 ± 0.073	0.728 ± 0.048	5.511 ± 0.29	—
P_d , mL/min	—	—	—	—
Cefatrizine	—	0.155 ± 0.018	—	—
Cefazolin	0.0397 ± 0.002	0.217 ± 0.016	1.52 ± 0.44	12.7 ^b
Cefpiramide	—	0.091 ± 0.010	—	—
Ceftazidime	—	0.331 ± 0.016	—	—
Ceftriaxone	—	0.105 ± 0.011	—	—
Cephaloridine	—	0.275 ± 0.012	—	—
σ_a	—	—	—	—
Cefatrizine	—	0.998 ± 0.081	—	—
Cefazolin	0.999 ± 0.033	0.985 ± 0.115	0.828 ± 0.516	—
Cefpiramide	—	0.922 ± 0.068	—	—
Ceftazidime	—	0.779 ± 0.084	—	—
Ceftriaxone	—	0.974 ± 0.094	—	—
Cephaloridine	—	0.378 ± 0.055	—	—

^a Mean ± SD estimated using NONLIN. ^b The value extrapolated using the relationship shown in Fig 4-20 to a 34-kg body weight patient.

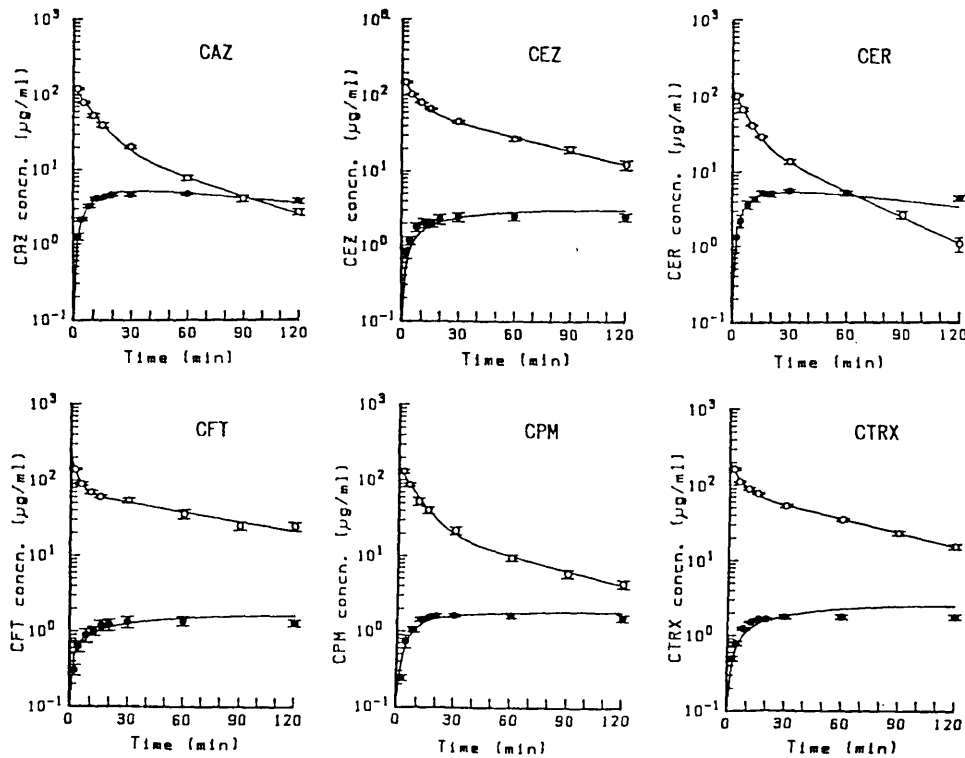


图 4-15

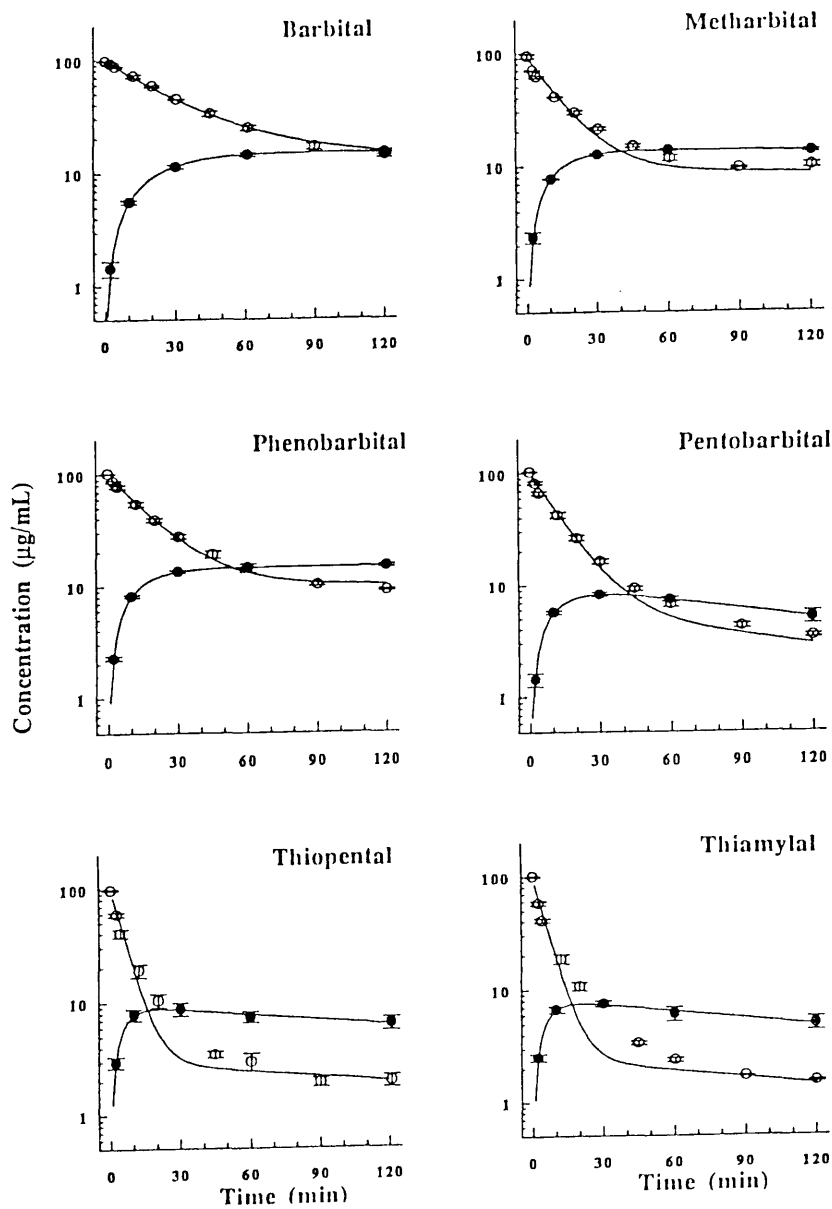
Serum (○) and dialysate (●) concentration-time profiles of CAZ, CEZ, CER, CFT, CPM, and CTRX and a 20-mg/kg iv bolus dose to rats. The lines in the serum data were generated from a biexponential equation using the parameters listed in Table 4-6. The lines in the dialysate were generated from eqs 4-13, 4-14, 4-15 using the parameters listed in Tables 4-4 and 4-5.

表 4-6

Pharmacokinetic Parameters^a of Cephalosporins in Accordance with a Biexponential Equation^b

Antibiotic	Species	Dose, mg/kg	A_1 , µg/mL	A_2 , µg/mL	λ_1 , min ⁻¹	λ_2 , min ⁻¹
Cefatrizine	Rat	20.0	134 ± 54	68.6 ± 7.6	0.322 ± 0.152	0.0100 ± 0.0014
Cefazolin	Mouse	20.0	155 ± 39	55.3 ± 8.9	0.205 ± 0.063	0.0194 ± 0.0019
	Rat	20.0	107 ± 14	66.0 ± 5.6	0.155 ± 0.031	0.0140 ± 0.0100
	Rabbit	20.0	143 ± 14	26.0 ± 4.6	0.115 ± 0.014	0.0193 ± 0.0018
	Human	29.4	140 ± 9.5	152 ± 3.7	0.106 ± 0.017	0.0004 ± 0.0001
Cefpiramide	Rat	20.0	121 ± 14	24.2 ± 5.0	0.114 ± 0.017	0.0147 ± 0.0024
Ceftazidime	Rat	20.0	104 ± 13	23.5 ± 7.1	0.102 ± 0.020	0.0185 ± 0.0032
Ceftriaxone	Rat	20.0	111 ± 18	83.4 ± 5.7	0.192 ± 0.045	0.0140 ± 0.008
Cephaloridine	Rat	20.0	99 ± 8	27.7 ± 1.8	0.155 ± 0.009	0.0270 ± 0.0075

^a Mean ± SD estimated using NONLIN. ^b Defined by eq 4-26.



☒ 4-16 Model fitted (lines) versus observed serum (●) and dialysate (○) concentrations after intraperitoneal administration of six acidic drugs to 250 g rats. Mean \pm SE, $n = 3-4$. Each line was obtained by a nonlinear least squares regression analysis using the computer program NONLIN¹⁷ fitting all observed data to eqs. 4-13, 4-14 and 4-27 incorporating the parameters estimated for eq 4-28.

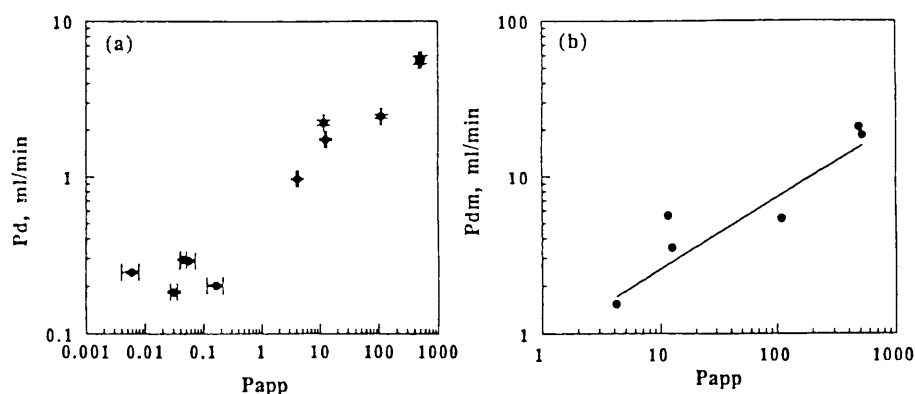


图 4-17 The relationship between apparent partition coefficient (P_{app}) and apparent peritoneal capillary membrane permeability (P_d) (a), or intrinsic permeability (P_{dm}) across the capillary membrane of acidic drugs (b). The apparent partition coefficients were measured at 37°C in n-octanol/50 mM phosphate buffer (pH 7.4). In the left panel (a), the reported values of quinolonecarboxylic acids were also presented⁸⁹. The values of P_{dm} were estimated by applying to eq 4-21. The line indicates the best fit of eq 4-30 (b).

表 4-7

Physicochemical and physiological parameters of acidic drugs.

Drugs	Apparent partition coefficient at pH 7.4, at 37°C		Serum unbound fraction f_p ^b	Apparent capillary membrane permeability P_d ^b		
	P_{app} ^a			observed	predicted based on equation 4-30	
Cinoxacin	0.006 ± 0.002	^c	0.100	^d	0.245 ± 0.005	0.277
Norfloxacin	0.031 ± 0.004	^c	0.857	^d	0.184 ± 0.003	0.366
Lomefloxacin	0.045 ± 0.005	^c	0.719	^d	0.294 ± 0.003	0.399
Enoxacin	0.055 ± 0.017	^c	0.655	^d	0.289 ± 0.004	0.420
Ofloxacin	0.165 ± 0.051	^c	0.772	^d	0.202 ± 0.003	0.559
Barbital	4.19 ± 0.19		0.901 ± 0.005		0.97 ± 0.01	1.35
Metharbital	11.6 ± 0.1		0.645 ± 0.090		2.23 ± 0.09	1.97
Phenobarbital	12.6 ± 0.6		0.687 ± 0.021		1.74 ± 0.03	1.95
Pentobarbital	110 ± 3		0.530 ± 0.011		2.45 ± 0.07	3.34
Thiopental	493 ± 23		0.311 ± 0.031		5.60 ± 0.32	5.89
Thiamylal	523 ± 26		0.290 ± 0.023		5.69 ± 0.33	6.24

^a Octanol-water partition coefficient.

^b Values were determined in 250-g rats.

^c Values reported ref. 89.

^d Values reported ref. 116.

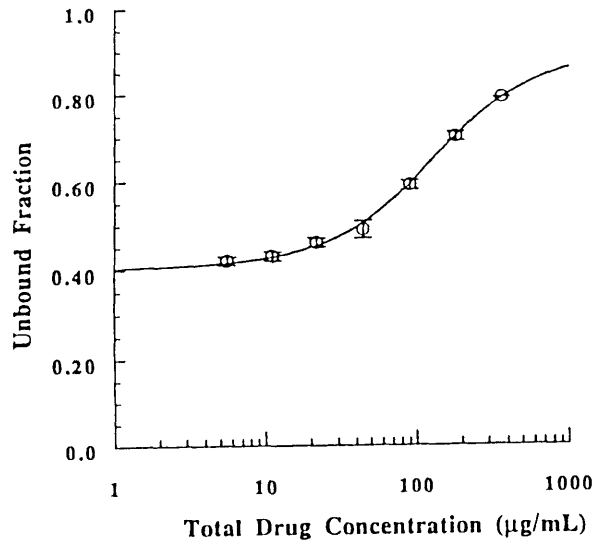


Fig 4-18 The relationship between unbound fraction and total concentration of benzoic acid for rat serum in vitro. Each value represents the mean \pm SE (n=3). Solid line shows the curve fitting line.

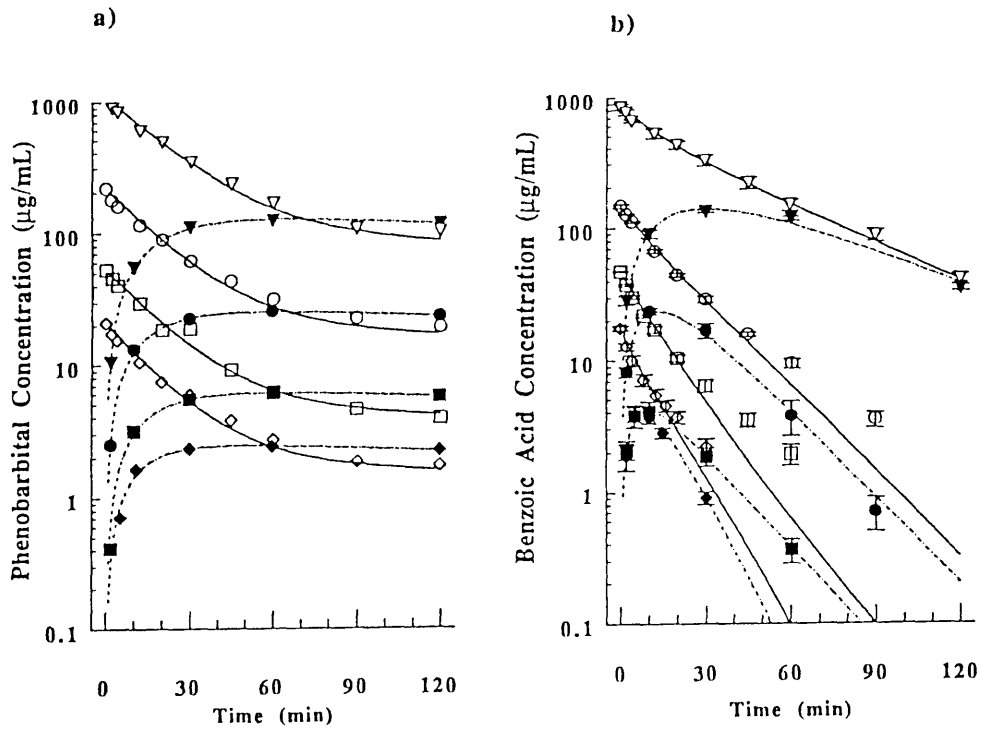


Fig 4-19 Model fitted (lines) versus observed serum (closed symbols) and dialysate (open symbols) concentrations after intraperitoneal administration of phenobarbital (a) and benzoic acid (b) to rats. Initial concentration of drugs in dialysate are 20 (\diamond), 50 (\square), 200 (O), and 1000 (∇) μ g/ml. Each line was obtained by a nonlinear least squares regression analysis (NONLIN¹⁷) fitting all observed data to eqs 4-13, 4-14 and 4-27 incorporating the parameters estimated for eq 4-28. Each value of benzoic acid represents the mean \pm SE (n = 3-4).

表 4-8 Physicochemical and physiological parameters of acidic drugs.

Drugs	Molecular weight	Apparent partition coefficient in octanol-water at pH 7.4, 37°C	Initial concentration in dialysate	Apparent capillary membrane permeability
		P_{app}	$\mu\text{g/ml}$	P_d^a ml/min
Benzoic acid	122.12	0.047 ± 0.016	20	3.68 ± 0.21
			50	2.74 ± 0.11
			100	1.71 ± 0.02 ^b
			200	2.11 ± 0.05
			1000	1.29 ± 0.02
Phenobarbital	226.26	12.6 ± 0.6	20	1.74 ± 0.15
			50	1.61 ± 0.07
			200	1.55 ± 0.04
			1000	1.43 ± 0.03
Acetoaminophen	151.16	2.02 ± 0.02	100	0.726 ± 0.017
Lomefloxacin	351.35	0.045 ± 0.005 ^c	100	0.294 ± 0.003 ^c

Values are mean ± SD.

^a Values were determined in 250-g rats.

^b Values reported Table 4-3.

^c Values reported ref. 89.

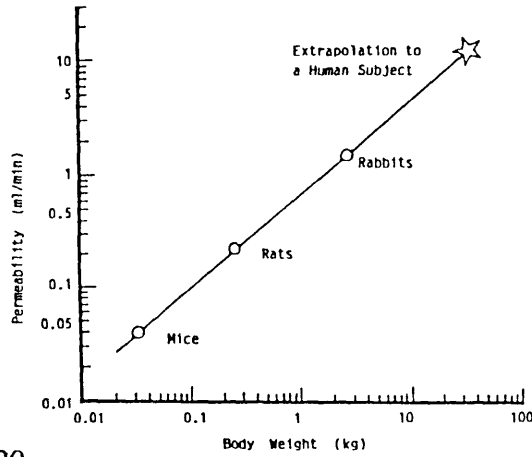


图 4-20 The relationship between the permeability clearance of CEZ (P_d) and the body weights of mice, rats, and rabbits. The line was generated from $P_d = 0.687 \times (\text{body weight})^{0.826}$. The value found by extrapolating the line to a 34-kg body weight patient is marked (\star).

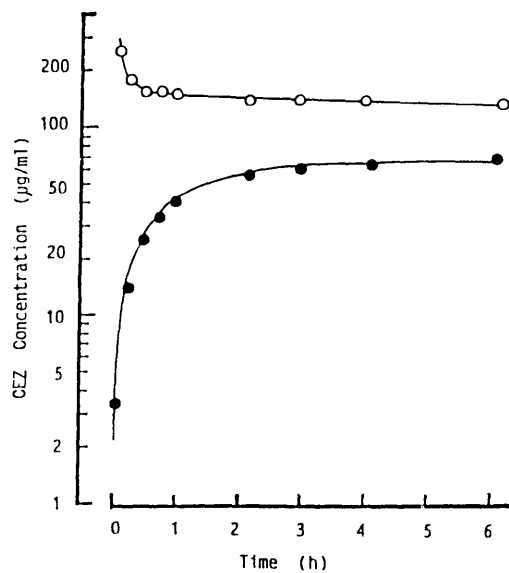


图 4-21 Serum (○) and dialysate (●) concentration-time profiles after an intravenous dose (1 g) of CEZ to a patient. Serum concentration data was analyzed by using a biexponential equation. The line for the dialysate concentration shows the prediction curve generated from eqs 4-26 and 4-31.

本研究では、病態時における薬物の体内動態変動因子を V_d と CL について明らかにし、その予測方法の確立と妥当性を臨床応用への可能性も含めて検討した。

加齢に伴う V_d と CL の変動因子の一つである f_p の変動について cefazolin と血清蛋白に結合した bilirubin との相互作用を *in vitro* 実験系で定量的に明らかにした。また、新生児、小児期における V_d と CL の変動が、体重の変動に相関することに注目し、新生児、小児、肥満小児における tobramycin の母集団パラメータの算出および、得られた母集団パラメータを用いベイジアン法により患児の1点の血清中 tobramycin 濃度データと体重情報のみより新生児の個別投与設計を行い繰り返し投与5回までは十分実用可能であることを明らかにした。

肝機能変化に伴う薬物の血清中濃度の変動については、非線形肝代謝型薬物である phenytoin について、加齢、肝切除等がどの程度 V_{max} 、 K_m 、 f_p に対して影響するかを動物実験を基に検討した。その結果、加齢については、8 および 50 週齢のラットで比較したところ、 V_{max} ($\mu\text{g}/\text{min}$) 及び K_m に差が見られなかった。この事から定常状態下における投与量設定には V_{max} のみが関与することとなり、加齢による体重増加にあわせて投与量を増やすと過剰投与になる危険性が示唆された。肝部分切除モデルラットの肝再生時における phenytoin の V_{max} は、個体差が大きかった。この変動は、ALT、AST 値および cytochrome P-450 の量と良く相関することがわかった。更に、phenytoin の代謝パラメータの変動因子である f_p の変動を検討し、見かけ上、palmitic acid により valproic acid による phenytoin の HSA 結合追い出し効果が減少するという現象を見いだした。これらの成果に基づいて、既に得られている母集団パラメータを利用して、患者個別の代謝パラメータ (V_{max} 、 K_m) を定常状態における1点の血清中濃度から推定する方法を確立した。本方法は、その適用できる範囲を決定したことが特徴である。また、臨床への応用性を考慮し算出手順をグラフ化した。この事により、1点の定常状態血清中 phenytoin 濃度データをグラフ上にプロットすれば、個々の患者の体内動態の特徴が迅速にわかるようになった。

腎機能変化時における CL の変動については、糖尿病モデルラットを用いた実験より cefoperazone と ceprhadine の両者で糖尿病による CL_{tot} の亢進が観測された。この理由として胆汁排泄型の cefoperazone は、 CL_{bile} と CL_r の増加、腎排泄型の薬物

である cephradine は、CLr の増加が主な原因であることを明らかにした。また、糖尿病の合併症としておこる腎不全の治療法の一つである腹膜透析時の薬物動態について検討した。まず、透析治療上重要な因子である水分の除去効率も同時に解析できる薬物の腹膜透過解析モデルをラットを用いて確立した。次にバルビツール酸系催眠薬を含む酸性薬物について薬物の脂溶性と腹膜透過クリアランス (Pd) が指数相関関係にあることを見いだした。この関係式より、薬物の腹膜透過性を薬物の脂溶性から推定できる可能性が示された。しかし、benzoic acid については実測した Pd が予測値より高く、脂溶性分配による以外の透過機構の存在が示唆された。これらの結果をふまえ、腹膜炎治療時に汎用されるセファロスポリン系抗生物質についてその腹膜透過の変動因子として fp が重要な因子であることを明らかにし、本件球で新たに導入した Pd がヒトへのアニマルスケールアップが可能であることを示した。この事は動物を用いた基礎実験で理論立てられたパラメータが臨床的にも有用であることを明らかにした点で意義深い。

以上、本研究により臨床で汎用されるセファロスポリン系抗生物質、アミノ配糖体抗生物質、抗てんかん薬、バルビツール酸系催眠薬の Vd と CL の変動因子を明らかにし、その臨床応用性についても明らかにした。また、その結果をふまえて患者の個別投与設計法を確立した。今回得られた薬物の体内変動因子に関する知見は、临床上薬物を適正に使用する上での有効な情報となると考えられる。

本研究を遂行するに際し、終始御懇甚なるご指導ご鞭撻を賜りました金沢大学医学部附属病院薬剤部市村藤雄教授ならびに金沢大学薬学部辻 彰教授に深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益なご指導とご助言をいただきました、金沢大学医学部附属病院薬剤部中島恵美助教授、横川弘一副薬剤部長、旭 満里子副薬剤部長に深謝します。

さらに、有益なご助言とご協力を戴いた石川済生会金沢病院東福要平院長、サンセリテ木戸クリニック木戸日出喜院長、金沢大学医学部神経精神医学教室中村充彦博士、渡部医院渡部礼二院長、国立金沢病院小児科越田理恵博士、金沢大学薬学部玉井郁巳講師、富山医科薬科大学附属病院薬剤部佐藤 均助手、静岡県立大学薬学部出口芳春助手、金沢大学医学部附属病院薬剤部石崎純子技官、竹田和喜技官、金沢大学薬学部石川英司修士、竹内みゆき学士、中村里美学士、金沢大学医学部附属病院薬剤部、飯田康紀修士、竹田正美修士、金田直美修士、中西剛明学士、今津哲哉学士、をはじめ金沢大学医学部附属病院薬剤部の皆様に厚く感謝の意を表します。

また、NONMEMの使用方法についてご教示いただいた神戸大学医学部附属病院薬剤部谷川原祐介助教授に感謝致します。

なお、本研究に使用した試料を提供していただいた、協和発酵、三共、塩野義製薬、大日本製薬、田辺製薬、富山化学工業、日本新薬、日本チバガイギー、日本ロシュ、萬有製薬、藤沢薬品、明治製菓、山之内製薬、および吉富製薬の諸社にお礼申し上げます。

第 VII 編 実験の部

第 II 編の実験

1) Cefazolin と bilirubin の血清蛋白相互作用 (第 II 編 第二章)

1-1) 試薬

Cefazolin sodium (CEZ)	藤沢薬品
HSA, Fraction V, essentially fatty acid free	Sigma Chemical Co.
Bilirubin	和光純薬工業
Horseradish peroxidase, Type II, essentially salt free powder	Sigma Chemical Co.

1-2) 実験方法

Cefazolin の HSA への蛋白結合実験法

HSA の濃度は 0.623 mM とし cefazolin は, 1.18 - 9.03 mM まで, Sørensen buffer (pH 7.4) に溶解した. Bilirubin は, 0.1 M NaOH に 5.0 - 15.0 mM の濃度になるよう溶解した. そして, 25 μ l cefazolin 溶液, 25 μ l bilirubin 溶液, 25 μ l を 1 ml の HSA 溶液に加えた. HSA の最終濃度は 0.58 mM, cefazolin 0.042 - 0.21 mM, bilirubin は 0.116 - 0.348 mM であり, bilirubin と albumin のモル比は 0.2 - 0.6 とした. Bilirubin 溶液は分解を防ぐため暗所で保存した.

蛋白結合実験は限外濾過法により限外濾過器(MPS-3, セントリフリー, アミコン社) を使用して行った. サンプル調製後, 37 °C, 20 分でインキュベーションし, 45° のアングルロータ(RA-360型) 付恒温遠心器 (久保田商事, KR-702 型) を用いて 37 °C で 5 分 (1000 g) 遠心し濾液を得た. 濾液の cefazolin の濃度を HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で測定した.

機器	LC-6A システム	島津製作所
分析カラム	Shim-pack CLC-ODS (150mmX6mm id)	島津製作所
移動相	13% acetonitrile : 87% 0.01M ammonium acetate	
波長	270 nm	

Bilirubin のHSA への蛋白結合実験法

Cefazolin と同様にサンプルを調製し、Jacobsen らの方法¹⁰⁸ に従い、過酸化水素水と西洋わさび過酸化酵素を加えることにより、bilirubin の酸化速度により bilirubin のHSA への結合を測定した。

2) 血清中 tobramycin 濃度の測定 (第 II 編 第三章)

血清中 tobramycin 濃度の測定は、蛍光偏向イムノアッセイ法(TDXシステム, ダイナボット) により行った。本測定法による測定値の変動係数は10%以下であった。

3) データ解析法および使用機器 (第 II 編)

NONLIN¹⁷を用いた、非線形最小二乗法解析および NONMEM²²を用いた population pharmacokinetics 解析には大型電子計算機 (FACOM M-760/20, 金沢大学総合情報処理センター) を使用した。

MULTI2(BAYES)²³を用いたベイジアン推定には、オフィスコンピュータ N5200 モデル 05 (NEC) を用いた。

第 III 編の実験

1) 使用薬物 (第 III 編 第二章)

患者に投与された phenytoin (PHT) の剤形, 商品名およびメーカーは, 散剤はアレビアチン末 (大日本製薬), 細粒剤はアレビアチン細粒 (大日本製薬), 錠剤は, アレビアチン錠 (大日本製薬) ヒダントール錠 (藤永製薬, 三共株式会社) ヒダントールF錠 (藤永製薬) コミタール錠 (バイエル薬品, 武田薬品工業), コミタールL錠 (バイエル薬品, 武田薬品工業) である。

2) 測定方法 (第 III 編 第二章)

血清中 phenytoin 濃度は蛍光偏向イムノアッセイ法により測定した (TDXシステム, ダイナボット)。この測定法による変動係数は10%以下であった。

3) 肝部分切除ラットにおける phenytoin の体内動態に関する実験

3-1) 使用動物

Wistar 系 (日本 SLC) 雄性ラットを使用した。

3-2) 使用した試薬

Phenytoin sodium (アレビアチン注射液)	大日本製薬
Phenytoin	ナカライテスク
Amobarbital sodium (イソミタルソーダ)	日本新薬
エマルゲン 913	花王株式会社
アルブミン B テストワコー	和光純薬
エステーエー テストワコー	和光純薬
NEFA C テストワコー	和光純薬
ビリルビン B II テストワコー	和光純薬
一酸化炭素	日本酸素

その他の試薬は全て市販の特級品を使用した。

3-3) 装置及び計算機器

ボールマンゲージ	夏目製作所
pH メータ: PHM 64	Radiometer 社
分光光度計: UV-260	島津製作所
動物実験, 肝器還流用恒温チャンバー	ホンダ科学
遠心機: KR-702	久保田商事
KS-5200C	久保田商事
KM-15200	久保田商事
L8-55 Ultracentrifuge	Beckman
遠心濃縮機: CST-015C	島津製作所
ホモジナイザー: Potter 型ホモジナイザー	高島商店
恒温槽: Water Bath Incubator BT-23	ヤマト科学

3-4) 定量法

Ichimura ら^{96,109}の測定法に準じ HPLC で測定した。ただし, 20 mg/kg 投与の時の移動相は 0.01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Methanol= 45 : 55 としたが (検出限界 0.2

μg/ml) , 2 mg/kg 投与の場合は, 移動相は 0.01 M NaH₂PO₄ · 2H₂O: Methanol= 50 : 50とした (検出限界 0.04 μg/ml) .

機器	LC-6A システム	島津製作所
分析カラム	Shim-pack CLC-ODS (150 mm X 6 mm i.d.)	島津製作所
波長	230 nm	
流速	1 ml/min	

3-5) 生理的, 血液生化学検査

Wistar 系ラットは薬物の血清中濃度推移の実験終了後, カニューレから血液を採取した. 血液サンプルは遠心分離後 (3000 rpm, 10 分間) 血清中 albumin 濃度, AST, ALT, FFA, bilirubin を測定するまで, -80 °C で凍結保存した. 測定には各種測定用市販キットを使用した.

3-6) 血清蛋白結合実験

第 II 編 1-2) 項の実験方法に従い限外濾過法により行った. ただし, 実験終了後得た血清を用い, phenytoin の methanol 溶液を少量添加してサンプルは調整した (最終濃度が methanol 濃度で 0.6 % 以下⁵⁵) .

3-7) 肝ミクロゾーム分画法¹¹⁰

実験終了後肝臓を生理食塩水で灌流した後重量を測定した. 肝臓の種々の部位から切りとり合計約 1 g を正確に秤量した. 0.25 M sucrose 6 ml を加えてホモジネートした. ホモジネート液は, 9000 g, 20 分間遠心した. 上清をとり, さらに 105000 g, 60 分間遠心した. 上清は捨て, ペレット (ミクロゾーム分画) をクリーンアップするため, Tris KCl Buffer で再懸濁させ, 再び 105000 g, 60 分間遠心した. 上清を捨てペレットに懸濁用緩衝液を 2 ml 加えて懸濁させた. この内の 800 μl を酵素液として使用した. 調製はサンプルを氷冷しながら行った.

3-8) Cytochrome P-450 活性の測定法

大村の方法¹¹¹に従った. 肝ミクロゾーム内の mg protein 量当たりで肝 cytochrome P - 450 を表わした.

3-9) 肝ミクロゾーム内の protein 量の測定

肝ミクロゾーム 100 μ l を使用して、ローリー法¹¹²により測定した。

3-10) 加齢実験

3-10-a) 手術

8 週令, 50 週令の無処置の Wistar 系雄性ラットを用いた。ラットを diethyl ether 麻酔後, 手術板に手足を縛って固定し大腿動脈, 大腿静脈にカニューレーションを施し (動脈はポリエチレンチューブ SP 31, 静脈はポリエチレンチューブ SP 45), heparin (100 unit/ml) を満たしたシリンジ (1.0 ml) をつなぎ, 血液凝固を防いだ。その後, ボールマンゲージに固定して 2 時間後に薬物動態実験を行った。なお, ラットの生理的条件を統一するために実験開始時間は午前 9 - 11 時とした。

3-10-b) 薬物投与

アレビアチン注射液 (phenytoin - Na, 大日本製薬) を用い, 大腿静脈より phenytoin として 20 mg/kg, 又は, 2 mg/kg を投与後, 大腿動脈より血液をサンプリングした。

3-11) 肝部分切除及び, 虚偽手術法

肝部分切除法は Higgins⁵⁴ らの方法に従い行った。ラットは 8 週令, 50 週令の無処置の Wistar 系雄性ラットを用いた。ラットを diethyl ether 麻酔後, メスを用いて剣状突起の所から正中線に沿って皮膚を 2-3 cm 切開した。切除する 3 葉 (右葉, 左葉, 方形葉) を押し出し縫合糸で肝臓の根元で血管の血流を止めないように縛り 3 葉を切除した。その後, 速やかに縫合した。虚偽手術は肝臓を外に押し出すまで同様な操作を行い, その後肝臓を傷つけないように再び体内に戻し速やかに縫合した。それぞれのラットを別々のゲージに入れて飼育し 10 日後に実験に供した。

4) 血清蛋白結合相互作用に関する実験

(第 III 編第四章)

4-1) 試料及び試薬

HSA (essentially fatty acid free)	Sigma Chemical Co.
Phenytoin	大日本製薬
Primidon	大日本製薬
Sodium valproate	協和発酵
Phenobarbital	三共
Carbamazepine	日本チバガイギー
Phenylbutazone	日本チバガイギー
Palmitic acid	Sigma Chemical Co.

4-2) 試料の調製

緩衝液として Sørensen buffer (0.13 M phosphate, pH 7.4) を用い、HSA 濃度は 300 μM とした。Palmitic acid は、あらかじめ ethanol に溶解し、最終濃度が 300, 600, 1000, 1500 μM になるよう HSA 溶液に添加した。有機溶媒の影響を最小にするために溶液中の ethanol 濃度は常に 1% (v/v) 以下に保った。なお、HSA および palmitic acid の濃度は、臨床的に観察されうる条件内に設定した。

Valproic acid は、Sørensen buffer に溶解した後その 5 μl を HSA 溶液 1.0 ml に最終濃度が 350, 700, 1000 μM になるよう添加した。Phenytoin は、methanol に溶解した後最終濃度が 80 μM になるように HSA 溶液に添加した。methanol 濃度は Monks らの方法⁵⁵に従い常に 0.6% (v/v) 以下になるよう設定した。他の抗てんかん薬についても同様な方法を適用した。ただし最終濃度はそれぞれ carbamazepine 40 μM , phenobarbital 170 μM , primidon 50 μM とした。実験上の薬物の濃度設定は臨床上起こりうる範囲内に留めた。

4-3) 薬物の fp の決定

第 II 編 1-2) 項の実験方法に従い限外濾過法により行った。

4-4) 薬物定量法

HSA を用いた実験での phenytoin および carbamazepine の限外濾過液中濃度は HPLC を用いて測定した。

Phenytoin の測定は第 III 編の実験 3-4) 項に準じた。相関係数は、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上で 0.99 以上であった。

Cefoperazone, cephadrine は、カラムスイッチング法により HPLC で測定した。
Cefoperazone, cephadrine の CV 値は、1.56 µg/ml で 2.9%, 3.0 % であった。
また、1 - 400 µg/ml の範囲で相関係数 0.999 と良い直線性を示した。

機器 LC-6A, LC-9A システム 島津製作所

カラム

プレカラム Shim-pack SPC-RP1 (30 mm X 4 mm i.d.) 島津製作所

分析カラム Shim-pack CLC-ODS (150 mm X 6 mm i.d.) 島津製作所

移動相

前処理 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)

分析 cefoperazone, 20 % acetonitrile : 80% 0.01 M ammonium acetate

分析 cephadrine, 12 % acetonitrile : 88% 0.01 M ammonium acetate

波長

cefoperazone 266 nm

cephadrine 254 nm

1-3) Streptozotocin 処理

7 週齢の SD 系ラット (Charls River) に 0.1 M citrate buffer (pH 4.2) に溶解した streptozotocin 60 mg/kg を尾静脈から投与した後 35 週経過したラットを糖尿病群とした。同週齢対照群には、緩衝液のみを投与した。

1-4) 胆汁流速の測定

Watokins ら⁹⁵の方法に従った。

1-5) 代謝実験

代謝ケージ (夏目製作所, KN646(B)) (23 ± 5 °C) に 24 時間放置したときの体重, 摂水量, 尿量, 尿の pH を測定した。

2) 薬物の腹膜透過モデルの確立 (第 IV 編 第三章)

2-1) 使用動物

Wistar 系雄性ラット 250 ± 20 g (日本 SLC) を用いた。

2-2) 使用薬物

Benzoic acid Na (BA)	和光純薬
Sulfisoxazole (SIX)	Sigma Chemical Co.
Blue Dextran 2000	Pharmacia LKB
$^3\text{H}_2\text{O}$ (比活性 1 mCi/ml)	Amersham

2-3) 透析液

pH 7.4 Krebs-Ringer 液を使用した。NaCl によって浸透圧の調整を行い、食塩等価が 1.8, 0.9, 0.45 の 3 種の透析液を調製し、それぞれ高張液、等張液および低張液とした。

2-4) 動物実験

体重 250 g \pm 20 g の Wistar 系雄性ラットを diethyl ether 麻酔し、腹部中央部の正中線上を 3 mm 切開し、腹腔内に、透析液の注入、採取のために、先端部を 3.5 cm に切りとったポリエチレン製カテーテル (Nelaton Catheter, SAFEED Fr. 12, テルモ) を三方活栓にとりつけて挿入した。薬物濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、blue dextran 濃度が 0.2% になるように調製した、pH 7.4 の等張な Krebs Ringer 液を透析液として、37°C に温め、腹腔内に 33 ml を投与した。

透析液の半量を投与した時を 0 分として、経時的に透析液と血液を採取した。

透析液はカテーテルから 0.45 ml を採取した。血液は頸静脈から 0.5 ml 採取した。実験終了後、透析液を回収し pH を測定した。全血液を頸動脈から採取した。

2-5) 薬物透過性と CL_w の関係

ラットの腸間膜系の血管を任意の場所、強さで結紮し、腹部を縫合した後、各薬物と $^3\text{H}_2\text{O}$ (2 $\mu\text{Ci}/\text{rat}$) を含んだ等張液を 33 ml 注入した。経時的に血液および透析液を採取し、薬物および $^3\text{H}_2\text{O}$ 濃度を測定した。

2-6) fp を求める実験法

In vivo の実験では、実験終了後に採取した血清 0.8 ml をサンプルとし、第 II 編 1-2) 項の実験方法に従い限外濾過法により行った。

In vitro の実験では、無処置のラットから採取した血清に薬物を添加し検体と

した。以下、in vitroの実験と同様に行った。蛋白結合実験は、採血後12時間以内に行った。

2-7) 定量法

2-7-1) 透析液体積の計測

分子量が大きく、腹腔内から消失しない blue dextran (分子量 200000) 濃度を体積の指標とした。各時刻における透析液を、適宜希釈し、620 nm における吸光度を分光光度計 (UV-260, 島津製作所) で測定して blue dextran 濃度を求めた。0 分における透析液体積を 33mL とした。

2-7-2) 透析液浸透圧の測定

氷点降下式の浸透圧計 (Model 3D-II, Advanced Instruments) で測定した。

2-7-3) pH の測定

複合ガラス電極を装備した pH メーター (pHM64, Radiometer 社) を用いて測定した。

2-7-4) 薬物の定量法

血清中 benzoic acid 濃度の定量は、HPLC を用いてメタノール抽出法で行った。検量線の場合は、blank の血清 50 μ l と benzoic acid 濃度既知の生理食塩水溶液 50 μ l を、検体の場合は、検体の血清 50 μ l と生理食塩水 50 μ l をそれぞれ、1.5 ml のスピッツに分注した。Methanol を 100 μ l 加えて 30 秒間、よく攪拌し、0 $^{\circ}$ C で 30 分間、静置する。12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をとり、0.45 μ m のメンブランフィルターで蛋白を除去し、その濾液を HPLC で定量した。

透析液中の benzoic acid の定量は、検体の blue dextran を、遠心型蛋白結合試験器 (MPS-3, アミコン) で除去した後 HPLC で直接測定した。血清中の benzoic acid の定量性は、0.78 μ g/ml 以上で、相関係数 0.998 であった。

機器	LC-6A システム	島津製作所
分析カラム	Shim-pack CLC-ODS (150 mm X 6 mm i.d.)	島津製作所
移動相	25 % CH ₃ CN in 0.01M phosphate buffer (pH 3.0)	
測定波長	237 nm	

流速 1 ml/min

Sulfisoxazolの薬物濃度測定については、Suberら¹¹⁴の方法に従いHPLCで測定した。

機器 LC-6A システム 島津製作所

分析カラム Shim-pack CLC-ODS (150 mm X 6 mm i.d.) 島津製作所

移動相 40 % MeOH in 0.01M citrate buffer (pH 4.0)

測定波長 300 nm

流速 1 ml/min

³H₂O は、液体シンチレータ (ACS II, Amersham) を加えた後、液体シンチレーションカウンタ (LSC - 700, Aloka) で放射活性を測定した。

3) 薬物の腹膜透過クリアランスへの fp の影響 (第 IV 編 第三章)

3-1) 使用薬物

Cephaloridine (CER) 塩野義製薬

Ceftazidime pentahydrate (CAZ) 明治製菓

Cefpiramide sodium (CPM) 山之内製薬

Cefazolin sodium (CEZ) 塩野義製薬

Ceftriaxone 2Na · 3.5H₂O (CTR) 日本ロシユ

Cefatrizine propylene glycolate (CFT) 万有製薬

3-2) 薬物測定法

上記6種の薬物は、カラムスイッチング法によりHPLCで測定した。

機器 LC-6A, LC-9A システム 島津製作所

カラム

プレカラム Shim-pack SPC-RP1 (30 mm X 4 mm i.d.) 島津製作所

分析カラム Shim-pack CLC-ODS (150 mm X 6 mm i.d.) 島津製作所

移動相

前処理 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)

分析条件 (分析用移動相, 測定波長) は、表 7-1 に示す。

4) 薬物の脂溶性と腹膜透過クリアランスの関係 (第 IV 編 第四章)

4-1) 使用薬物および試薬

p-acetamidophenol (acetaminophen)	和光純薬
Barbital Na	和光純薬
Metharbital (ゲモニール)	大日本製薬
Phenobarbital Na	和光純薬
Pentobarbital Na	ナカライテスク
Thiopental Na (ラボナール)	田辺製薬
Thiamylal Na (イソゾール)	吉富製薬
Benzoic acid	和光純薬
Sulfisoxazol	Sigma Chemical Co.
Antipyrin	和光純薬
5-(p-methyl-phenyl)-5-phenylhydantoin (MPPH)	Aldrich Chemica Co.l
Primidon (マイソリン)	大日本製薬

4-2) n-octanol/pH7.4 50mMりん酸緩衝液分配係数(Papp)を算出する実験法
辻らの方法¹¹⁵にしたがった。

4-3) 薬物の定量法

Acetaminophen, バルビツール酸系催眠薬の測定は HPLC を用いて行った。前処理法は phenytoin の測定方法 (第 III 編 3-4)項参照) に準じた。各薬物とも血清サンプルでは 1.56 µg/ml 以上で良い定量性が得られた。

機器	LC-6A システム	島津製作所
分析カラム	Shim-pack CLC-ODS (150 mm X 6 mm i.d.)	島津製作所

分析条件 (内標準物質, 測定波長, 移動相) は, 表 7-2 に示す。

5) アニマルスケールアップ法による腹膜透過クリアランスの予測

(第 IV 編, 第五章)

5-1) 使用動物

家兎は, 日本白色系 (2.6 - 2.7 kg, 日本 SLC), マウスは ddY系 (32 - 37 g, 日本

SLC)を用いた。

5-2) 透析実験

ラットの場合に準じたが，透析液の体積はヒトにおける体積を 2000 ml とし，(体重)^{0.7}の関数としてスケーリングし，マウスで 9 ml，家兎で 200 ml とした。ヒトの腹膜透析液は，Dianeal 1.5 (日本トラベノール) を使用した。

6) データ解析法および機器 (第 IV 編)

NONLIN¹⁷を用いた非線形最小二乗法解析には大型電子計算機 (FACOM M-760/20, 金沢大学総合情報処理センター) を使用した。

各データのシミュレーションや整理には，PC-9801RA (NEC)，Macintosh II ci (アップルコンピュータ) 等のコンピュータを用いた。

表7-1

High performance liquid chromatography conditions for determination of cephalosporins

Drugs	Wave length (nm)	Mobile phase
Cefatrizine	270	9% acetonitrile : 91% 0.01M ammonium acetate
Cefazolin	270	13% acetonitrile : 87% 0.01M ammonium acetate
Cefpiramide	240	25% acetonitrile : 74% 0.01M tetrabutylammonium bromide : 1% acetic acid
Ceftazidime	270	7% acetonitrile : 93% 0.01M ammonium acetate
Ceftriaxone	274	60% acetonitrile : 30% 0.025M phosphate buffer (pH 7.4) : 10% 0.01M cethyltrimethylammonium bromide
Cephaloridine	240	15% acetonitrile : 85% 0.01M ammonium acetate

表7-2

High performance liquid chromatography conditions for determination of acidic drugs

Drugs	Internal standard	Wave length (nm)	Mobile phase
Acetaminophen	Barbital	230	20% Methanol : 80% 0.01M NaH ₂ PO ₄
Barbital	Antipyrin	230	25% Methanol : 75% 0.01M NaH ₂ PO ₄
Metharbital	Primidon	230	40% Methanol : 60% 0.01M NaH ₂ PO ₄
Phenobarbital	Primidon	230	35% Methanol : 65% 0.01M NaH ₂ PO ₄
Pentobarbital	MPPH ^a	220	55% Methanol : 45% 0.01M NaH ₂ PO ₄
Thiopental	MPPH	230	55% Methanol : 45% 0.01M NaH ₂ PO ₄
Thiamylal	MPPH	230	60% Methanol : 40% 0.01M NaH ₂ PO ₄

a; MPPH: 5-(*p*-methyl-phenyl)-5-phenylhydantoin

引用文献

- 1 Sheiner, L.B., Rosenberg, B. and Marathe, V.V., *J Pharmacokinet Biopharm*, **5**, 445-79 (1977).
- 2 Sheiner, L. B., Beal, S. and Rosenberg, B., *Clin Pharmacol Ther*, **26**, 294-305 (1979).
- 3 Milsap, R.L., Hill, M.R. and Szeffler, S.J. *Special pharmacokinetic consideration in children*, 10-1 - 10-32 (Applied Therapeutics Inc., Spokane, WA, 1992).
- 4 Lietman, P.S., *Clin Pharmacol*, **6**, 1551-62 (1979).
- 5 Diamond, I. and Schmid, R., *J Clin Invest*, **45**, 678-89 (1966).
- 6 Oie, S. and Levy, G., *J Pharm Sci*, **68**, 6-9 (1979).
- 7 Oie, S. and Levy, G., *J Pharm Sci*, **68**, 1-6 (1979).
- 8 Koshida, R., Nakashima, E., Ichimura, F., Nakano, O., Watanabe, R., Taniguchi, N. and Tsuji, A., *J Pharmacobiodyn*, **10**, 436-42 (1987).
- 9 Koshida, R., Nakashima, E., Taniguchi, N., Tsuji, A., Benet, L. Z. and Ichimura, F., *Pharm Res*, **6**, 486-91 (1989).
- 10 Deguchi, Y., Koshida, R., Nakashima, E., Watanabe, R., Taniguchi, N., Ichimura, F. and Tsuji, A., *J Pharm Sci*, **77**, 674-8 (1988).
- 11 堀了平, 奥村勝彦, 斎藤一文字, 安原真人, 越川富雄, 橋田亨, 奥野武彦, 中川照真, 山岡清, *臨床薬理*, **15**, 535-44 (1984).

- 12 家入一郎, 樋口駿, 吉川学, 青山敏信, 堀岡正義, *薬剂学*, **47**, 224-32 (1987).
- 13 Burton, M.E., Brater, D.C., Chen, P.S., Day, R.B., Huber, P.J. and Vasko, M.R., *Clin Pharmacol Ther*, **37**, 349-57 (1985).
- 14 Burton, M.E., Chow, M.S.S., Platt, D.R., Day, R.B., Brater, D.C. and Vasko, M.R., *Clin Pharm*, **5**, 143-9 (1986).
- 15 Kelman, A. W., Thomson, A.H., Whiting, B., Bryson, S.M., Steedman, D.A., Mower, G.E. and Samba-Donga, L.A., *Br J Clin Pharmacol*, **18**, 685-92 (1984).
- 16 Scatchard, G., *Ann N Y Acad Sci*, **51**, 660-72 (1949).
- 17 Metzler, C. M., Flfring, G. L. and McEwen, A. J. *A user's manual for NONLIN and associated programs*. (The Upjohn Co. Kalamazoo, Mich, 1974).
- 18 Briand, C., Sarrazin, M., Peyrot, V., Gilli, R., Bourdeaux, M. and Sari, J. C., *Mol Pharmacol*, **21**, 92-9 (1982).
- 19 Kragh Hansen, U., *Pharmacol Rev*, **33**, 17-53 (1981).
- 20 Jacobsen, C., *Biochem J*, **171**, 453-9 (1978).
- 21 加藤昌太良, 中原佐和子, 足立公一, *小児科臨床*, **31**, 689-92 (1978).
- 22 Beal, S.L. and Sheiner, L.B. *Users Basic Guide* , (The Technical Report of the Div. of clinical Pharmacology, University of California, San Francisco CA, 1980).
- 23 Yamaoka, K., Nakagawa, T., Tanaka, H., Yasuhara, M., Okumura, K. and Hori, R., *J Pharmacobio-Dyn*, **8**, 246-56 (1985).

- 24 Sheiner, L. B. and Beal, S. L., *J Pharmacokinet Biopharm*, **9**, 503-12 (1981).
- 25 Friis-Hansen, B., *Pediatrics*, **28**, 169-181 (1961).
- 26 Murray, K.M., Bauer, L.A. and Koup, J.R., *Clin Pharm*, **5**, 411-4 (1986).
- 27 Morse, W. I. and Soeldner, J.S., *Metabolism*, **12**, 99-107 (1963).
- 28 Rowland, M. and Benet, L.Z., *J Pharmacokinet Biopharm*, **1**, 123-35 (1973).
- 29 加藤隆一, 臨床藥物動態学, pp 197 (南江堂, 東京, 1992).
- 30 Tozer, T.N. and Winter, M.E. *Phenytoin*, 25-1 - 25-44 (Applied Therapeutics Inc., Spokane, WA, 1992).
- 31 Richens, A. and Dunlop, A., *Lancet*, **2**, 247-8 (1975).
- 32 Lund, L. and Alvan, G., *Lancet*, **2**, 1305-6 (1975).
- 33 Ludden, T. M., Hawkins, D. W., Allen, J. P. and Hoffman, S. F., *Lancet*, **1**, 307-8 (1976).
- 34 Martin, E., Tozer, T. N., Sheiner, L. B. and Riegelman, S., *J Pharmacokinet Biopharm*, **5**, 579-96 (1977).
- 35 Rambeck, B., Boenigk, H. E., Dunlop, A., Mullen, P. W., Wadsworth, J. and Richens, A., *Ther Drug Monit*, **1**, 325-33 (1979).
- 36 Mullen, P.W., *Clin Pharmacol Ther*, **23**, 228-32 (1978).
- 37 Chiba, K., Ishizaki, T., Miura, H. and Minagawa, K., *J Pediatr*, **96**, 479-84 (1980).

- 38 Robinson, F. C., Warner, R. N. and Gonzalez, M. A., *Neurology*, **31**, 761-3 (1981).
- 39 Robinson, F. C. and Mayer, P. R., *Ther Drug Monit*, **4**, 225-8 (1982).
- 40 Armijo, J. A. and Cavada, E., *Ther Drug Monit*, **13**, 507-10 (1991).
- 41 Sheiner, L. B. and Beal, S. L., *J Pharmacokinet Biopharm*, **8**, 553-71 (1980).
- 42 Aoyama, T., Yukawa, T., Higuchi, S., Nakao, Y. and Horioka, M., *Yakuzaigaku*, **47**, 49-55 (1987).
- 43 Grasela, T. H., Sheiner, L. B., Rambeck, B., Boenigk, H. E., Dunlop, A., Mullen, P. W., Wadsworth, J., Richens, A., Ishizaki, T., Chiba, K. and et, a. l., *Clin Pharmacokinet*, **8**, 355-64 (1983).
- 44 Miller, R., Rheeders, M., Klein, C. and Suchet, I., *SAMT*, **72**, 188-190 (1987).
- 45 堀了平, 奥村勝彦, 北澤式文, 神代昭, 齊藤侑也, 樋口駿, 水柿道直, 山路昭, 力久忠昭, 谷川原祐介, *薬剂学*, **50**, 292-9 (1990).
- 46 Yukawa, E., Higuchi, S. and Aoyama, T., *Chem Pharm Bull Tokyo*, **37**, 3363-6 (1989).
- 47 Leppik, I.E., *Epilepsia*, **33**, S32-S40 (1992).
- 48 Kato, Y., Hirate, J., Sakaguchi, M., Ueno, I. and Horikoshi, I., *J Pharmacobio-Dyn*, **10**, 166-72 (1987).
- 49 Tsuji, A., Yoshikawa, T., Nishide, K., Minami, H., Kimura, M., Nakasima, E., Terasaki, T., Miyamoto, E. and Nightingale, C.H., *Drug Metab Dispos*, **13**, 729-39

- (1985).
- 50 Yokogawa, K., Nakashima, E. and Ichimura, F., *Drug Metab Dispos*, **18**, 258-63 (1990).
- 51 Gerber, N. and Wagner, J.G., *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **3**, 455 (1972).
- 52 Ashley, J.J. and Levy, G., *J Pharmacokinet Biopharm*, **1**, 99-102 (1973).
- 53 Itoh, T., Sawada, Y. , Lin, T. H., Iga, T. and Hanano, M., *J Pharmacobio-Dyn.*, **11**, 289-308 (1988).
- 54 Higgins, G. M. and Anderson, R. M., *Arch Pathol.*, **12**, 186-200 (1931).
- 55 Monks, A., Boobis, S., Wadsworth, J. and Richens, A., *Br J Clin Pharmacol*, **6**, 487-92 (1978).
- 56 Kober, A., Olsson, Y. and Sjöholm, I., *Mol Pharmacol*, **18**, 237-42 (1980).
- 57 Cramer, J. A. and Mattson, R. H., *Ther Drug Monit*, **1**, 105-16 (1979).
- 58 Dahlqvist, R., Borgå, O., Rane, A., Walsh, Z. and Sjoqvist, F., *Br J Clin Pharmacol*, **8**, 547-52 (1979).
- 59 Solomon, H. M., Schrogie, J. J. and Williams, D., *Biochem Pharmacol*, **17**, 143-51 (1968).
- 60 Rudman, D., Bixler, T. J. d and Del Rio, A. E., *J Pharmacol Exp Ther*, **176**, 261-72 (1971).
- 61 Spector, A. A., Santos, E. C., Ashbrook, J. D. and Fletcher, J. E., *Ann N Y Acad Sci*,

- 226, 247-58 (1973).
- 62 Wilding, G., Feldhoff, R. C. and Vesell, E. S., *Biochem Pharmacol*, **26**, 1143-6 (1977).
- 63 Patel, I. H. and Levy, R. H., *Epilepsia*, **20**, 85-90 (1979).
- 64 Monks, A. and Richens, A., *Br J Clin Pharmacol*, **8**, 187-9 (1979).
- 65 Zimmerman, C. L., Patel, I. H., Levy, R. H., Edwards, D., Nelson, S. D. and Hutchinson, M., *Epilepsia*, **22**, 11-7 (1981).
- 66 Albani, F., Riva, R., Procaccianti, G., Baruzzi, A. and Perucca, E., *Epilepsia*, **24**, 65-73 (1983).
- 67 Bowdle, T. A., Patel, I. H., Levy, R. H. and Wilensky, A. J., *Eur J Clin Pharmacol*, **23**, 343-7 (1982).
- 68 Box, GEP. and Muller, ME., *Ann Math Statist*, **29**, 610-1 (1958).
- 69 Toscano, J. P. and Jameson, J. P., *Clin Pharm*, **5**, 396-402 (1986).
- 70 Higuchi, S., Aoyama, T. and Horioka, M., *J Pharmacobiodyn*, **10**, 703-18 (1987).
- 71 Vozeh, S., Muir, K. T., Sheiner, L. B. and Follath, F., *J Pharmacokinet Biopharm*, **9**, 131-46 (1981).
- 72 Murphy, J. E., Bruni, J. and Stewart, R. B., *Am J Hosp Pharm*, **38**, 348-54 (1981).
- 73 Blake, D.A., Collins, J.M., Miyasaki, B.C. and Cohen, F., *Drug metab Dispos*, **6**, 246-250 (1978).

- 74 Hansen, B.A. and Poulsen, H.E., *Scan J Clin Lab Invest*, **46**, 233-7 (1986).
- 75 Poulsen, H.E. and Pilsgaard, H., *Liver*, **5**, 196-9 (1985).
- 76 Fouts, J.R., *Int Pharmacol Meeting*, **6**, 257 (1962).
- 77 Borgå, O., Juhlin Dannfeldt, A. and Dahlqvist, R., *Pharmacology*, **16**, 37-43 (1978).
- 78 Sjöholm, I., Ekman, B., Kober, A., Ljungstedt Pahlman, I., Seiving, B. and Sjodin, T., *Mol Pharmacol*, **16**, 767-77 (1979).
- 79 Maruyama, K., Awazu, S., Nishigori, H. and Iwatsuru, M., *Chem Pharm Bull Tokyo*, **34**, 3394-402 (1986).
- 80 Nadai, M. , Yoshizumi, H. , Kuzuya, T. , Hasegawa, T. , Johno, I. and Kitazawa, S., *Drug Metab Dispos*, **18**, 565-70 (1990).
- 81 Podolsky, S. *Clinical Diabetes, Modern Management* , xvii (Appleton-Century-Crofts, New York, 1980).
- 82 Popovich, R.P., Moncrief, J.W., Decherd, J.F., Bomar, J.J.B. and Pyle, W.K., *Am Soc Artif Intern Organs*, **64**, Abstracts (1976).
- 83 Popovich, R.P., Moncrief, J.W., Nolph, K.D., Ghods, A.J., Twardowski, Z.J. and Pyle, W.K., *Ann Intern Med*, **88**, 449 (1978).
- 84 Schneider, J.G., *Obstet-Gynecol-Clin-North-Am*, **21**, 195-212 (1994).
- 85 Flessner, M. F., Dedrick, R. L. and Schultz, J. S., *Am J Physiol*, **246**, r597-607 (1984).

- 86 Flessner, M. F., Dedrick, R. L. and Schultz, J. S., *Am J Physiol*, **248**, f413-24 (1985).
- 87 Flessner, M.F., Dedrick, R.L. and Schultz, J.S., *Am J Physiol*, **248**, h15-25 (1985).
- 88 Torres, I. J., Litterst, C. L. and Guarino, A. M., *Pharmacology*, **17**, 330-40 (1978).
- 89 Sato, H., Ishikawa, F., Okezaki, E., Nagata, O., Nakashima, E., Deguchi, Y.,
Ichimura, F. and Tsuji, A., *Chem Pharm Bull Tokyo*, **36**, 3180-5 (1988).
- 90 Toon, S. and Rowland, M., *J Pharmacol Exp Ther*, **225**, 752-63 (1983).
- 91 Steiner, S. H., Moor, M. J. and Bickel, M. H., *Drug Metab Dispos*, **19**, 8-14 (1991).
- 92 Tsuji, A., Takanaga, H., Tamai, I. and Terasaki, T., *Pharm Res*, **11**, 30-7 (1994).
- 93 Flessner, M. F. and Dedrick, R. L., *J Am Soc Nephrol*, **5**, 116-20 (1994).
- 94 Nishida, K., Sato, N., Sasaki, H. and Nakamura, J., *J Pharm Pharmacol*, **46**, 867-870
(1994).
- 95 Watkins III, J. B. and Dykstra, T. P., *Drug Metab Dispos*, **15**, 177-83 (1987).
- 96 Ichimura, F., Deguchi, Y., Yokogawa, K. and Nakashima, E., *Chem Pharm Bull
Tokyo*, **35**, 2030-7 (1987).
- 97 Tamai, I. , Maekawa, T. and Tsuji, A., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **253**, 537-544 (1990).
- 98 Watkins III, J. B. and Noda, H., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **239**, 467-473 (1986).
- 99 Mehva, R., *J Pharm Sci*, **80**, 207-11 (1991).

- 100 Ilstrup, K.M., Keane, W.F. and Michels, L.D., *Life Sci*, **29**, 717-24 (1981).
- 101 Saikawa, I., Takai, A., Nakashima, Y., Ikegami, T., Hayakawa, H., Takagi, T. and Yamauchi, H., *Jap J Antibiotics*, **33**, 1084-96 (1980).
- 102 Kedem, O. and Katchalsky, A., *Biochim Biophys Acta*, **27**, 229-46 (1958).
- 103 Rippe, B, Perry, M. A. and Granger, D. N., *Microvasc Res*, **29**, 89-102 (1985).
- 104 Karino, A., Hayashi, M., Awazu, S. and Hanano, M., *J Pharmacobio-Dyn*, **5**, 670-7 (1982).
- 105 Lau, A.H., Chow-Tung, E., Assadi, F.K., Fornell, L. and John, E., *Pharmacology*, **31**, 284-8 (1985).
- 106 Dedrick, R.L., Flessner, M.F., Collins, J. M. and Schultz.J.S., *Am Soc Artif Internal Organs*, **5**, 1-5 (1982).
- 107 Randerson, D.H. and Farrell, P.C., *Am Soc Artif Internal Organs*, **3**, 140-6 (1980).
- 108 Jacobsen, J. and Wennberg, R. P., *Clin Chem*, **20**, 783 (1974).
- 109 市村藤雄, 横川弘一, 山名月中, 辻彰, 倉田孝一, 木戸日出喜, 伊藤達彦, 山口成良, *薬剤学*, **43**, 50-60 (1983).
- 110 Kamataki, T. and Kitagawa, H., *Jpn J Pharmacol*, **24**, 195-203 (1974).
- 111 Omura, T. and Sato.R., *J Biol Chem*, **239**, 2370-8 (1964).
- 112 Lowry, O.H., Roseberough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J Biol Chem*, **193**,

265-75 (1951).

- 113 Grasela, D.M. and Rocci, Jr.M.L., *J Pharm Sci*, **73**, 1874 (1984).
- 114 Suber, R.L., Lee, C., Torosian, G. and Edds, G.T., *J Pharm Sci*, **70**, 981 (1981).
- 115 Tsuji, A., Kubo, O., Miyamoto, E. and Yamana, T., *J Pharm Sci*, **66**, 1675-9 (1977).
- 116 Okezaki, E., Terasaki, T., Nakamura, M., Nagata, O., Kato, H. and Tsuji, A., *Drug Metab Dispos*, **16**, 865-74 (1988).

