

**モルヒネの PK・PD に及ぼす炎症および NSAIDs
併用に関する研究**

**木村 嘉明
2017 年7月**

博士論文

モルヒネの PK・PD に及ぼす炎症および NSAIDs 併用に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

薬学専攻

臨床薬物情報学研究室

学籍番号 1328052003

氏名 木村 嘉明

主任指導教員名 荒井 國三

目次

第 1 章 序論	3
第 2 章 ラット炎症性モデルにおける Morphine PK および PD の検討	6
第 1 節 緒言	6
第 2 節 アジュバンド関節炎モデルラットの作製と全身炎症の評価	6
第 3 節 アジュバンド関節炎モデルラットにおける UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 活性	7
第 4 節 アジュバンド関節炎モデルラットにおけるタンパク結合率	8
第 5 節 アジュバンド関節炎モデルラットにおける Morphine 輸送体の変化	9
第 6 節 アジュバンド関節炎モデルラットにおける Morphine 血中濃度	9
第 7 節 アジュバンド関節炎モデルラットにおける Morphine 鎮痛効果	10
第 8 節 考察	11
第 3 章 Morphine の体内動態(PK)に及ぼす Diclofenac の影響	12
第 1 節 緒言	12
第 2 節 ラット肝ミクロゾームにおける Diclofenac の Morphine の UGT 活性の阻害定数	13
第 3 節 Morphine および Morphine-3-glucuronide (M3G) の血漿中濃度	15
第 4 節 Diclofenac 併用時の Morphine および M3G の尿中排泄および胆汁中排泄	15
第 5 節 Morphine の遊離型分率に及ぼす Diclofenac の影響	16
第 6 節 考察	16
第 4 章 Morphine の鎮痛効果 (PD) におよぼす Diclofenac の影響	19
第 1 節 緒言	19
第 2 節 Morphine の鎮痛効果	19
第 3 節 Morphine の体内動態と薬理作用の比較	20
第 4 節 考察	21
第 5 章 Morphine の PK-PD におよぼす高濃度 Diclofenac の影響	22
第 1 節 緒言	22
第 2 節 高濃度 Diclofenac による Morphine および M3G の血漿中濃度	22
第 3 節 高濃度 Diclofenac による Morphine の鎮痛効果	24
第 4 節 考察	26
第 6 章 雌性ラットにおける Morphine の PK-PD におよぼす Diclofenac の影響	27
第 1 節 緒言	27
第 2 節 Morphine および M3G の血漿中濃度推移	27
第 3 節 Morphine の鎮痛効果	31
第 4 節 考察	33

第 7 章 実験の部	34
引用文献	41
謝辞	44

第 1 章 序論

癌は日本における死因の第 1 位であり、年間約 37 万人が癌により死亡している¹⁾。近年、人口の高齢化とともに、日本における癌の罹患患者数、癌による死亡者数が増加しており、継続的に医療を受けている患者は、2 人に 1 人は、癌に罹患すると推計されている²⁾。そのため、癌は我が国にとって重要な問題といえる。また癌治療の際に問題となるのが、癌患者の 70%が経験するといわれる癌性疼痛である。

癌性疼痛は、腫瘍細胞の浸潤により組織が損傷される、あるいは腫瘍に伴う種々の不快を伴う苦痛全体のことをさす。この痛みは身体的苦痛だけではなく、心理的、社会的、精神的にも影響を及ぼし患者の QOL を低下させる。すなわち、癌性疼痛に対して鎮痛薬を適正に使用し、痛みをコントロールすることは、患者の QOL を維持、向上させる上で、重要である。

世界保健機関 (World Health Organization; WHO) は 1986 年に、癌の痛みからの解放を目指して「癌性痛緩和のガイドライン: Cancer Pain Relief」を発表した。このガイドラインは誰でもできる痛みの治療法を普及させることにより、全世界のあらゆる国に存在する癌患者を痛みから解放することを意図して作成され、鎮痛薬使用の基本 5 原則や、WHO 方式 3 段階除痛ラダーが示されている。「鎮痛薬使用の 5 原則」においては、①経口的に、②時刻を決めて正しく、③除痛ラダーにそって効力の順に、④患者ごとの個別的な量で、⑤その上で細かい配慮を、とされている。また、「WHO 方式 3 段階除痛ラダー」では、第一段階: 非オピオイド鎮痛薬 ± 鎮痛補助剤、第二段階: 弱オピオイド鎮痛薬 ± 非オピオイド鎮痛薬 ± 鎮痛補助剤、第三段階: 強オピオイド鎮痛薬 ± 非オピオイド鎮痛薬 ± 鎮痛補助剤というように示し、患者の痛みに応じて使用する鎮痛薬を推奨している。各段階で使用される鎮痛薬については、**Table 1** に示す³⁾。癌性疼痛緩和においては、基本原則を守った投与を行う限り依存性はほとんど認められず、疼痛治療には医療用麻薬の積極的使用が推奨されているが、日本における医療用麻薬使用量は、先進諸国と比較すると少ないのが現状である。しかし患者の QOL の維持、向上のためには、鎮痛薬、麻薬を適正使用することができる医薬品情報の蓄積が重要である。

モルヒネ (Morphine: Mor) は、古くから臨床で使用されているアヘンアルカロイドのひとつであり、WHO 方式 3 段階除痛ラダーでは、第 3 段階に位置付けられている強オピオイドである。特に、在宅緩和ケアでは、末期癌患者の約 80%が経験するといわれる疼痛の管理において重要な役割を果たしている。Mor は、ヒトにおいて、約 90%が肝臓で UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase ; UGT) によりグルクロン酸抱合され、鎮痛作用を有する活性代謝物であるモルヒネ-6-グルクロニド (Morphine-6-

glucuronide;M6G)と鎮痛作用を有さない不活性代謝物であるモルヒネ-3-グルクロニド (Morphine-3-glucuronide; M3G)を生じることが知られている。

一方、癌患者で生じる痛みストレスは、免疫系を抑制し、感染症や癌の進展、またときには発がんに関与する遺伝子などに影響する。また、最初は単純な痛みでも長く放置すると痛みの程度は大きくなり、やがて隣接部位へと拡大し、さらに離れた場所に関連痛を惹起する⁴⁾。癌性疼痛の主な原因としては神経障害性疼痛、骨転移痛、消化管閉塞、腹部膨満、炎症などがある。癌性疼痛の初期段階では、癌の進展、転移、浸潤に伴い患部に集積したマクロファージ、好中球、その部位の血管内皮細胞から放出されるプロスタグランジンにより生じる炎症性の痛みがほとんどであり、進行した癌性疼痛においても炎症は持続している。

Morの体内動態は炎症により影響を受ける可能性が考えられる。例えば μ -カラゲニン投与による局所炎症によって、血液 - 脳関門 (BBB) の P 糖タンパク質の発現量が増加し、その結果モルヒネの脳への取り込みが減少し、モルヒネによる鎮痛作用の減弱がみられたという報告がある⁵⁾。また完全フロイトアジュバントの投与による全身性の炎症により、種々のトランスポーターの発現や機能が変化するという報告もある。例えば肝細胞に発現しモルヒネの胆汁中排泄を担う P 糖タンパク質は、アジュバント投与によってその活性が低下すると報告されている⁶⁾。また、UGT についても炎症時に発現量が減少するとの報告がある⁷⁾。さらに、炎症時には血漿中 α_1 -酸性糖タンパク質 (α_1 -acid glycoprotein ; AAG)が増加することが報告されている⁸⁾。これらから炎症により Mor 体内動態が変化する可能性が考えられ、Mor 鎮痛効果にも影響を与える可能性が考えられる。

さて、炎症性疼痛を対して使用する非ステロイド性抗炎症薬 (Non - steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs)は WHO 方式がん疼痛治療法の第 1 段階から使用され、癌が進行して痛みが強くなると、モルヒネを中心とするオピオイドと併用されてより高い鎮痛効果を発揮する³⁾。

癌性疼痛緩和の際に Mor と併用される NSAID s のジクロフェナク (Dic) はヒト in vitro で Mor の主要代謝酵素である UGT を著しく阻害することが報告されている⁹⁾。このことから、Dic の併用により UGT による Mor の代謝が阻害され、Mor の体内動態が変化し、それに起因して Mor の薬理作用に影響を与える可能性がある。

しかし、臨床においては、Mor と Dic に相互作用があるという認識はなく、中枢で作用する Mor と、末梢で作用する Dic による作用点の違いによる鎮痛効果の相加・相乗効果を期待して使用しているのが現状である。そこで本研究では 癌の病状の一つである炎症が Mor の PK と PD への影響を調べるとともに、in vivo で Mor と Dic を併用した際の

Mor の体内動態と薬理作用の変化ならびにその機構を、ラットを用いて検討した.

Table 1. 癌性疼痛緩和に使用される薬剤

薬剤群	代表薬	代替薬
非オピオイド鎮痛薬	アスピリン アセトアミノフェン イブプロフェン インドメタシン	ジクロフェナク コリン・マグネシウム・トリサルチレート ^{a)} ジフルニサル ^{a)} ナプロキセン フルルピプロフェン
弱オピオイド鎮痛薬	コデイン	デキストロプロポキシフェン ^{a)} ジヒドロコデイン アヘン末 トラマドール
強オピオイド鎮痛薬	モルヒネ	メサドン ^{b)} ヒドロモルフォン ^{a)} オキシコドン レボルファノール ^{a)} ペチジン ^{c)} ブプレノルフィン ^{d)} フェンタニル

a: 日本では入手できない薬剤

b: 日本では経口剤のみ入手可能な薬剤

c: 癌性疼痛による継続的な使用は推奨されていないが他のオピオイドが入手できない国があるため表に残された薬剤

d: 経口投与で著しく効果が減弱する薬剤

第 2 章 ラット炎症性モデルにおける Morphine PK および PD の検討

第 1 節 緒言

癌性疼痛の主な原因としては神経障害性疼痛，骨転移痛，消化管閉塞，腹部膨満，炎症などがある．炎症性疼痛の動物モデルとして Complete Freund's adjuvant (CFA) を投与し、関節炎だけでなく、全身性の炎症が引き起こされるアジュバント関節炎モデル、紅藻類から得られた多糖類の粹物性ゴムで、起炎物質のカラゲニンを投与するモデル、ラットをウシの II 型コラーゲン投与するコラーゲン関節炎モデルなどがある．今回は、その炎症時に薬物代謝酵素や種々のトランスポーターの発現や機能に関する変動について報告があるアジュバント関節炎モデルを用いて Mor の体内動態を検討した．

第 2 節 アジュバント関節炎モデルラットの作製と全身炎症の評価

アジュバント関節炎モデルにおける、von Frey test による痛覚過敏 (**Figure I (A)**)、後ろ足の腫脹 (**Figure I (B)**)、体重 (**Figure I (C)**) の測定結果を示す．アジュバント関節炎ラットでは、アジュバント投与 14 日目に痛覚過敏および腫脹の増大が見られた．また、アジュバント関節炎モデルは 12 日目からコントロール群に比べて有意に体重減少が見られた．CFA 投与群では痛覚過敏、後ろ足腫脹の増大、体重減少という全身炎症時に特有の症状が確認され、これは過去の報告⁶⁾と一致していることから、アジュバント関節炎モデルの作製法は確立できたと判断した．

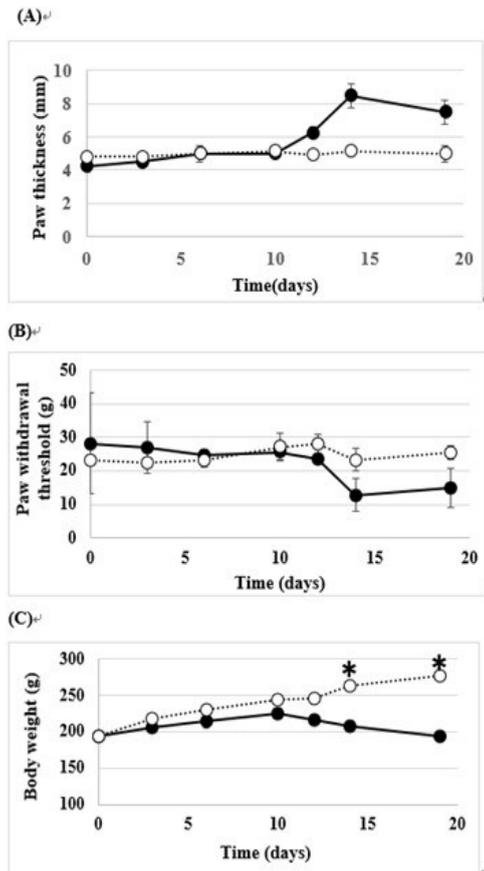


Figure 1. Adjuvant-induced arthritis generates paw edema (A), mechanical hyperalgesia (B), and weight loss (C).

Data represent mean \pm SD, (n = 3). ● CFA-treated, ○ Control, * Statistically significant differences compared with control rats ($p < 0.05$).

第3節 アジュバント関節炎モデルラットにおける UGT 活性

Michaelis-Menten plot を Figure 2 に V_{max} および K_m を Table 2 に示す. アジュバント関節炎モデルラットではコントロール群に比べて V_{max} および K_m が低下し, UGT 活性の低下が見られた. ラットへのリポサッカライド(LPS) 投与による炎症で, Mor の主代謝酵素である UGT の活性が低下するという報告があり⁷⁾, アジュバント投与による全身炎症によっても同様な現象が起こったものと考えられる.

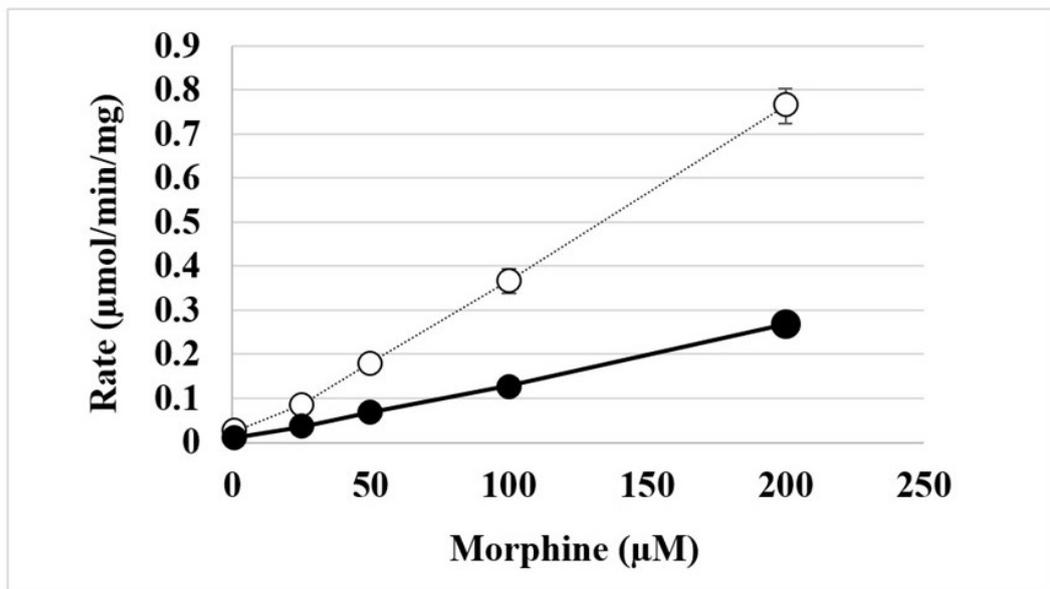


Figure 2. Representative plot of velocity versus morphine concentration for the formation of 3-glucuronidation of morphine in rat liver microsomes.

The solid lines are computer-generated curves for best fit. Data represent mean \pm SD.
 ○Control, ●AA

Table 2. Michaelis-Menten parameters for 3-glucuronidation of morphine by rat liver microsomes

	Vmax(mmol/min/mg)	Km(μmol/L)
Control	286.7	75.93
Adjuvant arthritis-treated rat	26.62	19.94

第 4 節 アジュバント関節炎モデルラットにおけるタンパク結合率

アジュバント関節炎モデルラットにおける Mor 遊離型分率を **Figure 3** に示す. Mor 遊離型分率はコントロール群では 84.9%, アジュバント関節炎モデルラットでは 63.9%となり, アジュバント関節炎モデルラットではコントロール群に比べて Mor 遊離型分率が低下した. これは炎症により $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質の産生が増加し⁸⁾, 塩基性薬物である Mor のタンパク結合率が増加したためと考えられる.

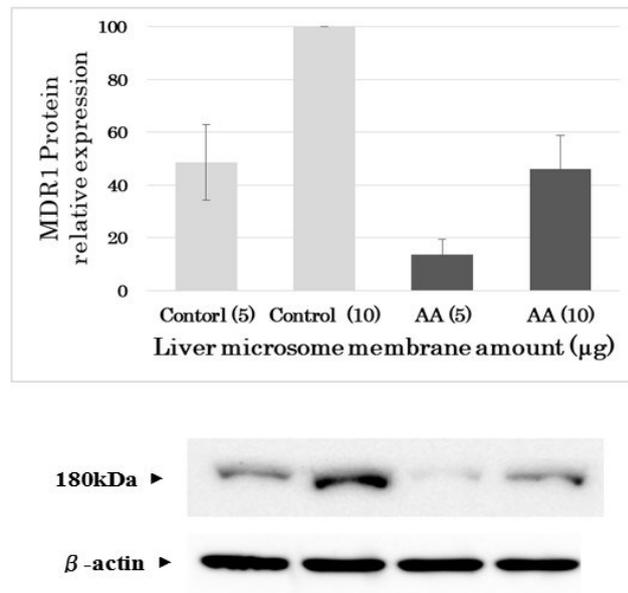


Figure 4. Changes in relative protein levels of MDR1 in microsomal proteins from livers of AA rats.
 Densitometric quantification of MDR1 was performed and expression values were normalized to β -actin. Representative blots of two independent experiments are shown. (n=3) □Control, ■AA

第 5 節 アジュバント関節炎モデルラットにおける Morphine 輸送体の変化

アジュバント関節炎モデルラットにおける肝 MDR1 のタンパク発現変化を **Figure 4** に示す。アジュバント関節炎モデルラットにおいて肝 MDR1 発現量は、コントロール群と比較して減少していた。これは過去の報告⁶⁾と一致した。

第 6 節 アジュバント関節炎モデルラットにおける Morphine 血中濃度

Mor 血中濃度推移を **Figure 5 (A)**，M3G 血中濃度推移を **Figure 5 (B)** に示す。また，Mor の薬物動態パラメーターを **Table 3 (a)** に，M3G の薬物動態パラメーターを **Table 3 (b)** に示す。アジュバント関節炎モデルにおいて，Mor および M3G の血中濃度はコントロール群と有意差が見られなかった。

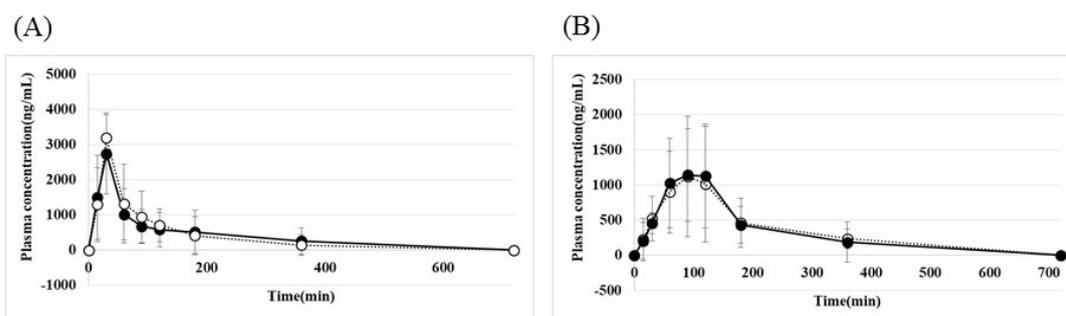


Figure 5. Plasma concentration time course of morphine (A) and morphine-3-glucuronide (B) in adjuvant-induced arthritis rats after a single administration of morphine (5 mg/kg).
Data represent mean \pm SD (n=3). ●AA, ○Control; *Statistically significant differences compared with control groups, $p < 0.05$.

Table 3. Pharmacokinetics parameter of morphine (a) and morphine-3-glucuronide (b) after a single administration of morphine (5 mg/kg) in adjuvant-induced arthritis rats.

(a) morphine

	AUC (mg/mL/min)	MRT (min)	VRT (min·min)	t1/2 (min)	Cl _{tot} (L/hr/kg)	V _{dss} (L/kg)
Control	197.7	135.3	6,953	102.1	0.02238	3,986
Adjuvant arthritis-treated rat	247.7	116.0	9,911	199.8	0.01542	3,721

(b) morphine-3-glucuronide

	AUC (mg/mL/min)	MRT (min)	VRT (min·min)	t1/2 (min)
Control	197.7	135.3	6,953	102.1
Adjuvant arthritis-treated rat	197.7	142.3	8,044	126.2

第7節 アジュバント関節炎モデルラットにおける Morphine 鎮痛効果

アジュバント関節炎モデルにおける Mor 鎮痛効果の経時変化を **Figure 6 (A)**, これより得られたモルヒネ鎮痛効果の AUC を **Figure 6 (B)**に示す. アジュバント関節炎モデルでは Mor 投与 30~60 分後, コントロール群では 30 分後において鎮痛効果が最大となった. アジュバント関節炎モデルにおける Mor 鎮痛効果の AUC (Area Under the blood

concentration-time Curve) はコントロール群の 4.0 倍で、アジュバント関節炎モデルではモルヒネ鎮痛効果がより大きく現れた。

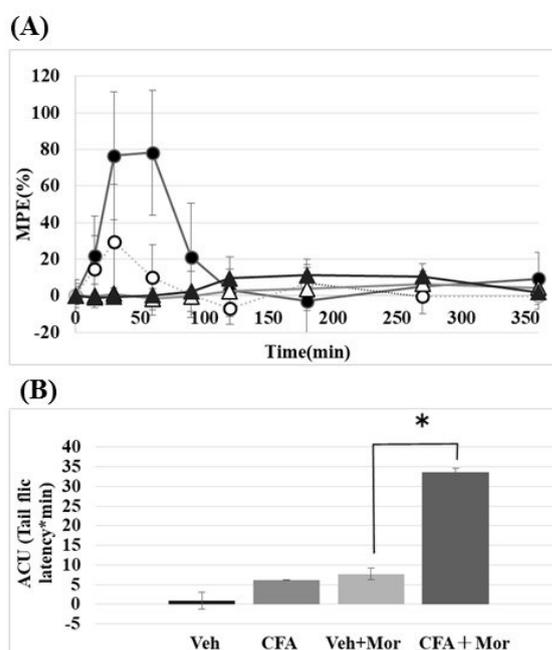


Figure 6. Antinociceptive effects of morphine are presented as MPE (%) over time (min). CFA+Mor (●), Veh+Mor (○), CFA (▲), Veh (△) (A) and AUC for the tail flick test (B). AUC calculations were performed using the trapezoidal method. Data represent mean \pm SD (n = 5). *Statistically significant differences compared with control groups, $p < 0.05$.

第 8 節 考察

アジュバント関節炎モデルでは、Mor 代謝酵素である UGT 活性の低下、組織移行に関与する Mor 遊離型分率の低下、Mor 胆汁中排泄を行う肝 MDR 1 の発現低下が見られた。これらは過去の報告と一致する結果であった^{6), 7), 8)}。しかし、Mor および M3G の血中濃度は炎症モデルとコントロールで差は見られなかった。以上より、アジュバント関節炎モデルにおいて、Mor の体内動態に影響する可能性のある UGT 活性の低下、Mor 遊離型分率の低下、肝 MDR 1 の発現低下に関わらず、鎮痛効果が得られる Mor 投与量では Mor の体内動態は変化しないことが明らかになった。これより癌などの慢性炎症の病態変化では Mor 体内動態は変化しない可能性が示唆された。またアジュバント関節炎モデルにおいて、Mor 血中濃度は変化しないにも関わらず、Mor 鎮痛効果は増強した。既にアジュバント関節炎モデルにおいても、中枢神経系における μ オピオイド受容体の発現が増加し、Mor 感受性が増強したとの報告がある¹⁰⁾。今回の結果はこの報告と一致したものと考えられる。

第 3 章 Morphine の体内動態(PK)に及ぼす Diclofenac の影響

第 1 節 緒言

痛みには、体性組織への機械的刺激が原因で発生する体性痛および臓器の炎症や閉塞、腫瘍による圧迫などが原因で発生する内蔵痛を含む「侵害受容性疼痛」と、末梢、中枢神経の直接的損傷に伴って発生する「神経障害性疼痛」の 2 種類がある。侵害受容性疼痛にはオピオイドや NSAID s などの非オピオイド鎮痛薬が有効であるが、神経障害性疼痛にはオピオイド、非オピオイド鎮痛薬が効きにくく、鎮痛補助剤との併用が有効とされる。鎮痛補助剤には抗うつ薬、抗てんかん薬、抗不整脈薬、局所麻酔薬、NMDA 拮抗薬、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬、ステロイド、ビスホスホネート系などがあり、単独では顕著な鎮痛作用を有さないが、鎮痛薬と併用することにより鎮痛効果を高め、特定の状況下においてのみ鎮痛効果を示す。痛みの病態に応じて、鎮痛薬、鎮痛補助薬、あるいは両者の併用が選択される¹¹⁾。

これらのモルヒネと併用される NSAID s や鎮痛補助剤がヒトのマイクロゾーム UGT を阻害するとの報告がある⁹⁾。これらをモルヒネ併用すると、モルヒネの代謝が阻害され血中濃度が上昇して鎮痛効果の増強や副作用出現が変化する可能性があるが *in vivo* では検討されていない。そこで、ラットを用いて、NSAID s の Dic のモルヒネの体内動態へ影響を検討した。

また、Dic は血漿タンパク結合率が 90 %以上と高く、アルブミン (Albumin ; Alb) と結合性が強いことが報告されている¹²⁾。そのためアスピリンなどタンパク結合の高い薬剤を併用することで Dic のタンパク結合率が低下することが報告されている¹²⁾。一方、Mor のタンパク結合率は 35 %であり、Alb および γ -グロブリン (γ -globulin) に結合する¹³⁾。モルヒネのタンパク結合率が低いものの、Dic と Mor の併用により Mor のタンパク結合率が低下して体内動態が変動する可能性がある。そこでラット血漿を用い、Mor のタンパク結合に Dic が影響するかを検討した。

第 2 節 ラット肝マイクロゾームにおける Diclofenac の Morphine の UGT 活性の阻害定数

反応速度の逆数と基質 (併用薬剤) についてプロットし、Dixon plot を作製した。(Figure7) これより Dic の UGT 阻害定数 K_i は、 $19.9\mu\text{M}$ で阻害様式は拮抗阻害であることが分かった。

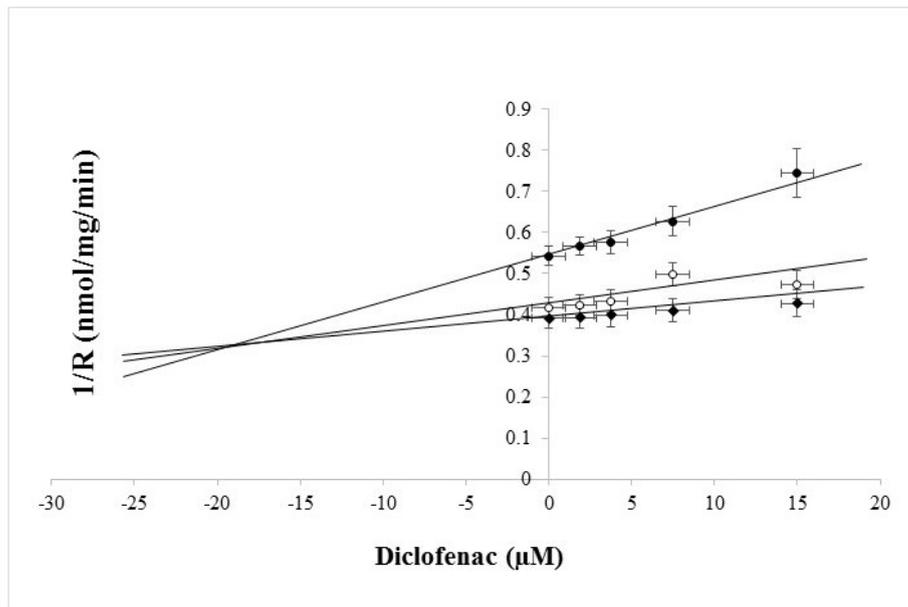


Figure 7. Effect of morphine glucuronosyltransferase activities in rat liver microsomes

●, 50 μM morphine; ○, 100 μM morphine; ◆, 200 μM morphine. Lines were drawn by linear regression analysis. (n = 4)

第3節 Morphine および M3G の血漿中濃度

Dic の投与量とタイミングは, MorとDic の体内動態における相互作用の予備的検討について検討した報告¹⁴⁾ を参考に行った.

Figure 8 (a) には, Dic非併用群 (Mor群) とDic (5mg/kg) 併用群 (Mor+Dic群) のMor皮下投与後、180分までの Mor 血漿中濃度推移を, **Table 4** にはその際の Morの体内動態パラメーターを示す. また **Figure 8 (b)** には, Dic非併用群 (Mor群) とDic (5 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic 群) のMor皮下投与後 360 分までの M3G 血漿中濃度推移を, **Table 4** にはその際のM3Gの体内動態パラメーターを示す.

Dic併用群では Mor群と比較して, Morの血漿中濃度が, Mor投与後, 15, 30 分で有意に上昇し, 体内動態パラメーターについては最高血漿中濃度 (Cmax) および血漿中濃度一時間曲線下面積 (area under the blood concentration-time curve ; AUC) が有意に上昇, 分布容積 (volume of distribution ; Vd) 及び全身クリアランス (total clearance ; CLtot) が有意に低下した. また, M3G の血漿中濃度についても, Dic 併用群で Mor 群と比較して, Mor 投与後 90 分以降で有意に上昇し, 体内動態パラメーターについては最高血漿中濃度到達時間 (Tmax) , Cmax, AUC が有意に上昇した.

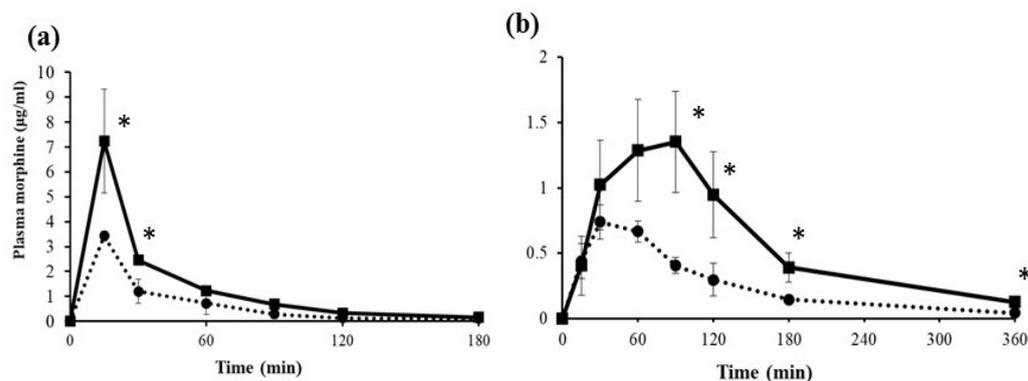


Figure 8. Plasma morphine (a) and morphine-3-glucuronide (b) concentration following subcutaneous administration in vehicle- and diclofenac- pretreated rats.
 ●, Morphine; ■, Morphine + Diclofenac. Each symbol and bar represents the mean \pm SD of the three rats. *, Significantly different from control rats ($p < 0.05$).

Table 4. Pharmacokinetic parameters calculated from plasma concentrations of morphine after subcutaneous administration (5mg/kg) in rats pretreated with vehicle or diclofenac (5 mg/kg, intraperitoneal)

(a) Morphine		
Parameter	Vehicle	Diclofenac
Tmax (min)	15.0 \pm 0.002	15.0 \pm 0.002
Cmax (μ g/ml)	3.90 \pm 0.180	7.2 \pm 0.189*
AUC (mg/ml-min)	0.132 \pm 0.0368	0.282 \pm 0.0247*
t1/2 (min)	22.0 \pm 0.472	21.0 \pm 0.389
Vd (L/kg)	2.70 \pm 0.970	1.40 \pm 0.337*
CLtot (L/hr/kg)	0.033 \pm 0.00953	0.018 \pm 0.00152*
(b) M3G		
Parameter	Vehicle	Diclofenac
Tmax (min)	30.0 \pm 15.5	90.0 \pm 15.4
Cmax (μ g/ml)	0.74 \pm 0.0091	1.35 \pm 0.00322*
AUC (mg/ml-min)	0.098 \pm 0.00923	0.232 \pm 0.00442*
t1/2 (min)	21.7 \pm 0.211	20.3 \pm 0.213

T_{1/2 α} ; distribution half-life, T_{1/2 β} ; elimination half-life, AUC; area under the blood concentration-time curve, CL_{tot}; total body clearance, V_{dss}; steady-state volume of distribution, V₁; distribution volume in central compartment, V₂; distribution volume in peripheral compartment, k₁₀; k₁₂; k₂₁; kinetic constants. Values are means \pm SD. * $P < 0.05$ vs. control group. *, Significantly different from control rats ($p < 0.05$; n = 3).

第4節 Diclofenac 併用時の Morphine および M3G の尿中排泄および胆汁排泄

Figure 9 (a) (b) には、胆管カニューレション (Bile duct cannulation ; BDC) 処置を行わず、腸管循環されている状態で、Dic非併用群 (Mor 群と Dic (5 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic 群) の Mor (5mg/kg) 皮下投与後 12 時間までの Mor(a) および M3G(b) の累積尿中排泄を示す。

Morの累積尿中排泄量は、Mor 投与後3時間までの Mor 尿中排泄率が Mor+Dic 群で有意に低くなった。また有意差はみられなかったが、Mor 投与後 6 時間、12 時間までの Mor 尿中排泄量も低くなる傾向がみられた。一方で、M3G の累積尿中排泄量にも有意な変動は見られなかった。

Figure 9 (c) (d) には、BDC 処置を行い、腸管循環を受けない状態で、Dic 非併用群 (Mor 群) と Dic (5 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic 群) の Mor (5 mg/kg) 皮下投与後6 時間までのMor(c) および M3G (d) の累積胆汁中排泄を示す。

Morの累積胆汁中排泄量は、投与後 1.5, 3, 4.5, 6 時間までで、それぞれ、Mor 群 Mor+Dic 群、すべての時間において、Morの胆汁中排泄量に有意な変動は見られなかった。一方、M3G の累積胆汁中排泄量に有意な変動は見られなかった。

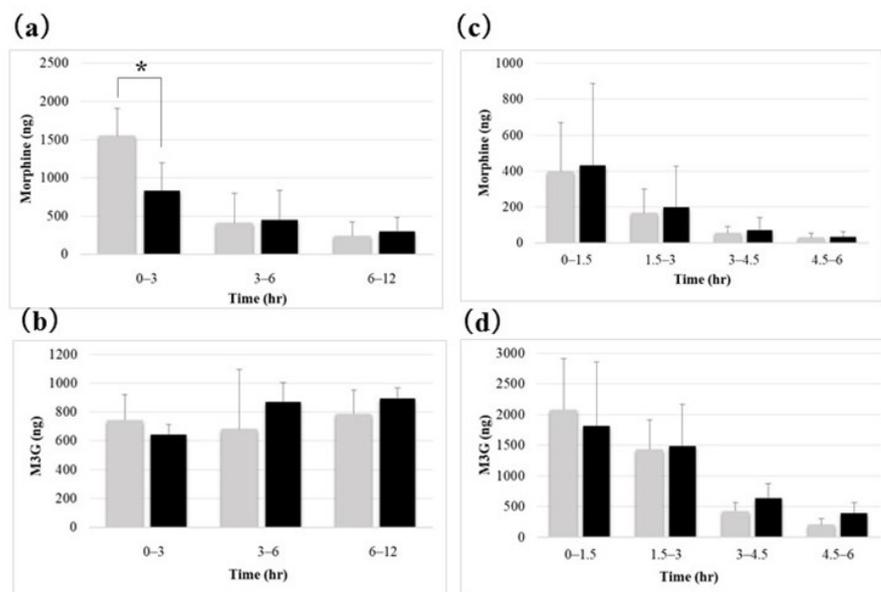


Figure 9. Urinary (a, b) and biliary (c, d) levels of morphine and morphine-3-glucuronide (M3G). Levels of morphine (a, c) and M3G (b, d) were determined after subcutaneous administration of 5 mg/kg morphine in rats. ■, Morphine; □, Morphine + Diclofenac. Each symbol and bar represents the mean \pm SD of the six rats. *, Significantly different from control rats ($p < 0.05$).

第5節 Morphine の遊離型分率に及ぼす Diclofenac の影響

Figure 10 には, Dic (0.9 mg/mL) 存在下または非存在下での Mor7.5 μ g/mL (A) または 4 μ g/mL (B) の遊離型分率を示す. (A) における Mor 濃度は Dic 併用群での C_{max} を, (B) における Mor 濃度は Dic 非併用群での C_{max} を想定したものである. Mor の遊離型分率は Dic 非存在下で, それぞれ 76.3% (Mor 7.5 μ g/mL), 81.8% (Mor 4.0 μ g/mL), Dic 存在下で, それぞれ 77.46% (Mor 7.5 μ g/mL), 80.9% (Mor 4.0 μ g/mL) と, Dic 添加による有意な変動は見られなかった.

第6節 考察

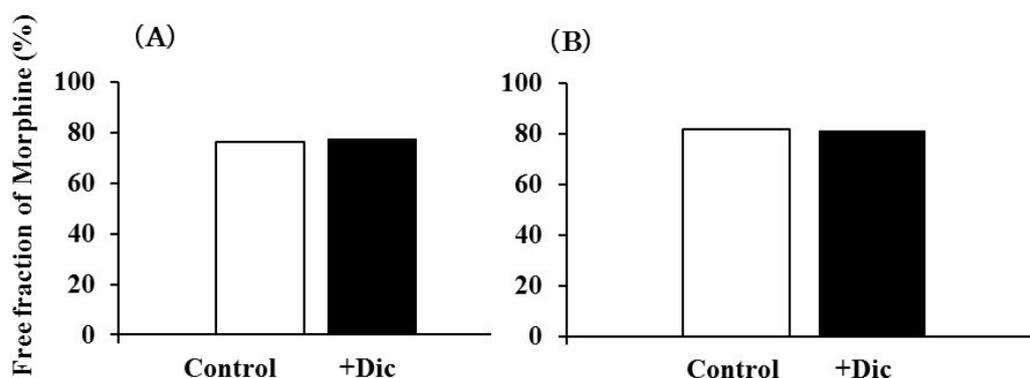


Figure 10. Free fraction of Mor at 7.5 μ g/mL (A) or 4.0 μ g/mL (B) with or without Dic (0.9 mg/mL). □: Mor(control), ■: Mor+Dic

Dic併用時の Morの血漿中濃度は, Dic非併用時のものに比べ, C_{max}, AUC とともに 1.8 倍程度と有意な上昇が見られた. このことから, Dicにより UGT の阻害が起こり, Mor の代謝が遅延した可能性が示唆された. しかし, Dic併用時の M3G の血漿中濃度についても Dic併用群で, 非併用群に比べ C_{max} が 1.8 倍程度, AUC が 2.3 倍程度と有意に上昇していた. この結果はDicによりMorの UGT の阻害が起こっていないことが示唆された. M3Gの血中濃度が上昇した可能性として肝もしくは腎, あるいはその両方における M3G の排泄経路を阻害する可能性が考えられた.

そこで Dic による Mor および M3G の尿中および胆汁中排泄への影響を検討するために, Mor および M3G の尿中排泄および胆汁中排泄の検討を行った. その結果, Dic併用時の Morの尿中排泄量は, Mor投与後 3 時間までで, Dic 非併用群と比べ 46%程度と有意な低下が見られ, また Mor 投与後 6 時間, 12時間までのものについても有意な変動は見られなかったが, Dic 非併用群と比べそれぞれ 34%程度, 28%程度低下しており, 低下傾向が見られた. 一方で, M3Gの尿中排泄についてはすべての時間において有意な変動が見られな

かった。Dic併用時の Mor および M3G の胆汁中排泄量はすべての時間帯において、Dic 併用群とDic非併用群で有意な変動が見られなかった。

以上の結果から、Dicの投与量 (5 mg/kg) ではラット in vivoにおいて UGT を阻害する可能性が低く、Mor の腎排泄経路を阻害する可能性が示唆された。UGT ではなく、Mor の腎排泄経路を阻害することで、Mor の血漿中濃度が有意に上昇し、それが UGT により代謝されることで、結果としてDic 併用群において、本来、UGT が阻害されるのであれば低下するはずの M3G の血漿中濃度が有意に上昇したと考えられた。Morと同様にグルクロン酸抱合により代謝されるコデインにおいても in vitro において Dicとの併用により、コデイン代謝 UGT が阻害されるという結果が出ているが、in vivo においてはこの 2 剤は相互作用を起こさないという報告があり、本研究の結果と類似した結果となっている¹⁵⁾。しかし Mor の腎排泄に関与するトランスポーター等については詳細が不明であり、今後の検討課題である。また、Dic は、シクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase ; COX) を阻害し、プロスタグランジン (Prostaglandin;PG) の生成を阻害することで腎血流量を低下させる。それにより Morの尿中への排泄量が低下した可能性が考えられる。しかし、Dic 併用群および非併用群における尿量に有意差はなく、また、M3G の尿中排泄にも変動がないことから、今回の検討における影響は少ないと考えた。

Dic 添加時の Morのタンパク結合率の変動は、本検討の結果より Morの濃度にかかわらず有意な変動は見られなかった。また、Dic非添加時の Morの遊離型分率は 76.3 ,81.8 %であった。ヒトの遊離型分率は 65%であり¹³⁾、この差は、これは種差によるものと考えられる。したがって Dicによって Mor のタンパク結合率が変動することにより相互作用が起こる可能性は低いことがわかった。

本章では、Dic による Mor の体内動態変動要因を検討した。Figure 11に示すように、Dic 併用時の Mor 血漿中濃度の上昇は、Dic による UGT の阻害ではなく、Morの腎排泄経路の阻害に伴う Morの尿中排泄の低下に起因すると考えられる。また、Dic を併用しても Morのタンパク結合率は変動しないことがわかった。

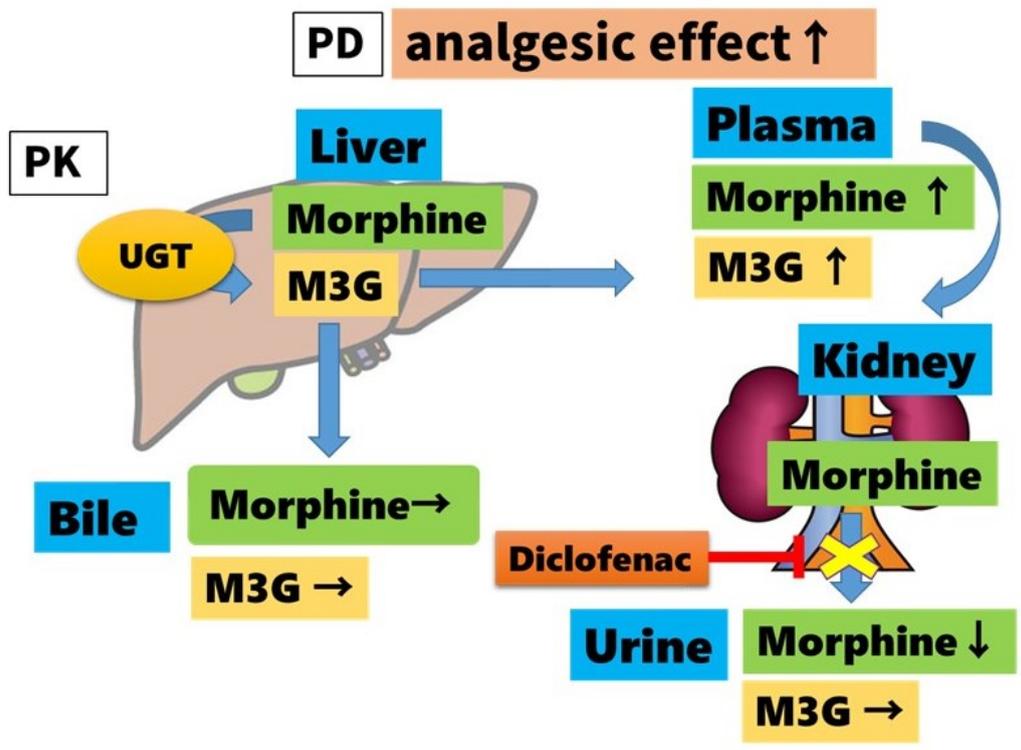


Figure 11. Summary of this study

第 4 章 Morphine の鎮痛効果(PD)におよぼす Diclofenac の影響

第 1 節 緒言

オピオイド性鎮痛薬として臨床で汎用されている Mor は、高度の癌性疼痛、特に骨転移による疼痛の緩和の際に Dic と併用される。しかし、これらの薬剤間での PK に関する相互作用については考えられておらず、末梢と中枢での作用点の違いによる鎮痛効果の相加・相乗効果を期待して使用されている。第 3 章で、ラットにおいて、Dic の併用により、Mor の血漿中濃度が上昇、すなわち、Mor と Dic の相互作用の可能性を示唆し、それは Mor の主要代謝酵素である UGT の阻害ではなく、Mor の腎排泄経路の阻害に起因する可能性があることを明らかにした。また、Dic を併用しても Mor のタンパク結合率は変動しないことがわかった。そこで、Dic 併用時の Mor の鎮痛効果について検討した。

第 2 節 Morphine の鎮痛効果

Figure 12 (a) には、薬剤非投与群 (Cont 群)、Dic 単剤投与群 (Dic 群)、Dic 非併用群 (Mor 群) および Dic (5 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (5 mg/kg) 群) における Mor 投与 360 分間までの Mor の鎮痛効果を示す。また Figure 12 (b) には、Dic 非併用群 (Mor 群) および Dic (5mg/kg) 併用群 Mor +Dic(5 mg/kg) 群における効果時間曲線下面積 (Area under the effect curve; AUEC) を示す。Cont 群については、薬剤の投与を行わず、他の群と同じタイミングで測定を行っている。Mor+Dic(5 mg/kg) 群では Mor 群と比較して、Mor による鎮痛効果が Mor 投与後 60, 90 分で有意に高くなり、AUEC についても Mor+Dic (5 mg/kg) 群で Mor 群と比較して有意に高くなった。また Dic 群では Cont 群と比較して、Mor による鎮痛効果に有意差は見られなかった。

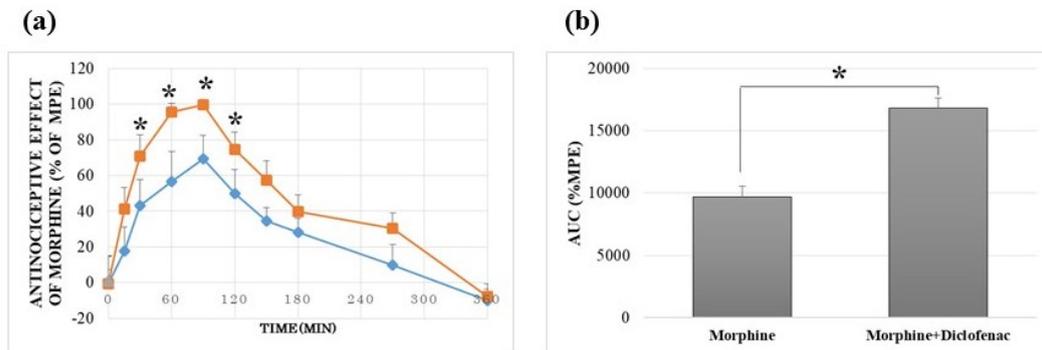


Figure 12. Effects of diclofenac on the anti-nociceptive effect of morphine in rats as measured by Von Frey threshold. Rats were treated with morphine (5 mg/kg s.c.) after the intraperitoneal administration of vehicle or diclofenac. ◆, Morphine; ■, Morphine + Diclofenac.

Points are mean \pm SE (n = 6 rats). * $P < 0.05$ (Morphine vs. Morphine + Diclofenac). MPE; maximum possible effect. Area under the effect curve of only morphine and morphine + diclofenac treated male rats.

第 3 節 Morphine の体内動態と鎮痛効果作用の関係

Figure 13 に、Mor 群 (A) および Mor+Dic 群 (B) における Mor の血漿中濃度推移と鎮痛効果の関係を示す。Mor 群および Mor+Dic 群ともに、曲線が左回りのヒステリシスを描き、Cmax と最大鎮痛効果到達時間にタイムラグが存在することが示された。

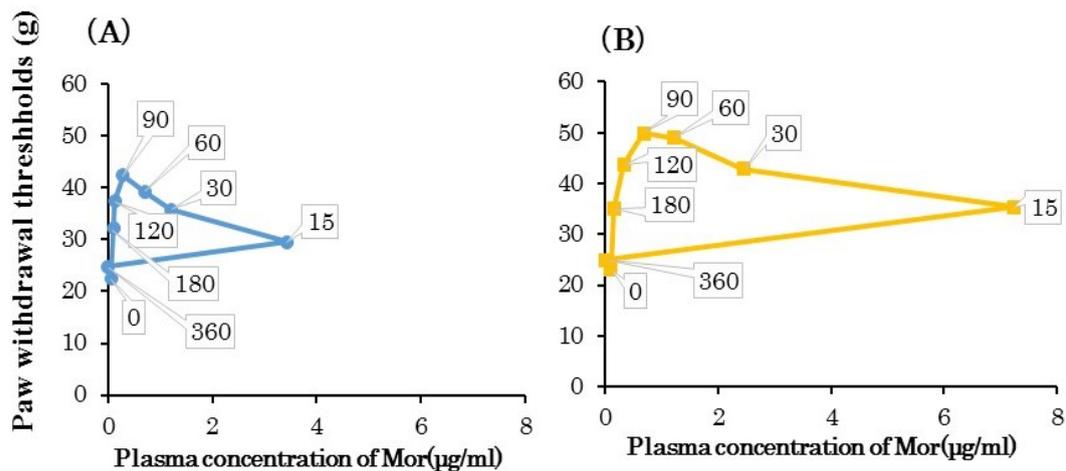


Figure 13. Plasma concentration of Mor-effect curves of only Mor treatment rats (A) and Mor and Dic treatment rats. The number in the balloon shows time.

● :Mor (control), ■ :Mor+Dic

第4節 考察

本研究第3章において、Dic の併用により Mor および M3G の血漿中濃度が有意に上昇し、それは Dic による Mor の腎排泄経路の阻害に起因する可能性が示唆された。Mor の血漿中濃度が上昇したことにより、Mor による鎮痛効果も増強するのではないかと考えた。そこで、本章では Dic 投与時の Mor の鎮痛効果推移の検討を行った。

Dic の併用により、Dic 非併用群と比べ、Mor による鎮痛効果が Mor 投与後 15, 30, 60, 90, 120, 270 分で有意に増強した。これは Dic 併用により、Mor の血漿中濃度が上昇したと相関しており、Dic 併用による Mor の鎮痛効果の上昇は Mor の血漿中濃度の上昇に起因する可能性が示唆された。Dic についても軽度の癌性疼痛における鎮痛に用いられるように鎮痛作用があるが、Dic 単剤投与群と薬剤非投与群を比較すると退避反応潜時に有意な変動は見られなかった。Dic は抗炎症効果により鎮痛効果を発揮する薬剤であり、今回のような炎症が起こっていないラットにおいては鎮痛効果を発揮しないと考えられる。

Mor の血漿中濃度推移と鎮痛効果の関係は、Cmax と最大鎮痛効果到達時間にタイムラグが存在していることがわかる。Mor は脳内で μ 受容体に結合することで下行性痛覚抑制系を賦活化し、鎮痛作用を発現する。また、脳内へ移行し薬理作用を発現するためには血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を通過しなければならない。一方で、Mor は水溶性が高く、生理的 pH ではイオン系で存在している。すなわち、Mor は BBB を通過しにくく、脳内へ移行し作用を発現するにはある程度の時間がかかると考えられる。これらのことから、本検討において Mor の Cmax と最大鎮痛効果到達時間にタイムラグが生じたのは Mor の脳内移行に時間を要したことに起因していることが示唆された¹⁶⁾。

第 5 章 Morphine の PK-PD におよぼす高濃度 Diclofenac の影響

第 1 節 緒言

第 3 章, および第 4 章では, ラットにおいて Dic の併用により Mor の血漿中濃度が上昇, 鎮痛効果が増強, すなわち Mor と Dic の相互作用の可能性を示唆した. また, M3G の血漿中濃度の上昇, Mor の尿中排泄量の低下といった結果や, M3G の胆汁及び尿中排泄, Mor の胆汁中排泄に変化がなかったという結果から, Dic による Mor の血漿中濃度及び鎮痛効果の増強は UGT の阻害が関与する可能性が低く, Mor の腎排泄経路の遅延が関与している可能性があることを明らかにした. しかし, ヒト *in vitro* における結果では, Dic は UGT 活性を著しく阻害しており, *in vivo* において阻害作用がないとは考えにくい. そこで, Dic の投与量を 5 mg/kg から 30 mg/kg に増量させることで, UGT の阻害作用が出現し, Mor の体内動態及び薬理作用に影響を与えるかを明らかにするため, 高濃度 Dic 併用時の Mor の血漿中濃度及び鎮痛効果を検討した.

第 2 節 高濃度 Diclofenac による Morphine および M3G の血漿中濃度

Figure 14 に, Dic 非併用群 (Mor 群) と Dic (5mg/kg or 30 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg) 群) の Mor 皮下投与後 180 分までの Mor 血漿中濃度推移を Table 5 にはその際の Mor の体内動態パラメーターを示す. また Figure 15 には, Dic 非併用群 (Mor 群) と Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic 群) の Mor 皮下投与後 360 分までの M3G 血漿中濃度推移を Table 6 にはその際の M3G の体内動態パラメーターを示す.

Mor+Dic (30 mg/kg) 群では Mor +Dic (5 mg/kg) 群と比較して, Mor の C_{max} , AUC は上昇傾向, V_d , CL_{tot} が低下傾向にあるものの有意差は見られなかった. また M3G についても, Mor+Dic (30 mg/kg) 群において M3G の排泄が遅延する傾向が見られたが, 血漿中濃度推移, 体内動態パラメーターともに有意差は見られなかった.

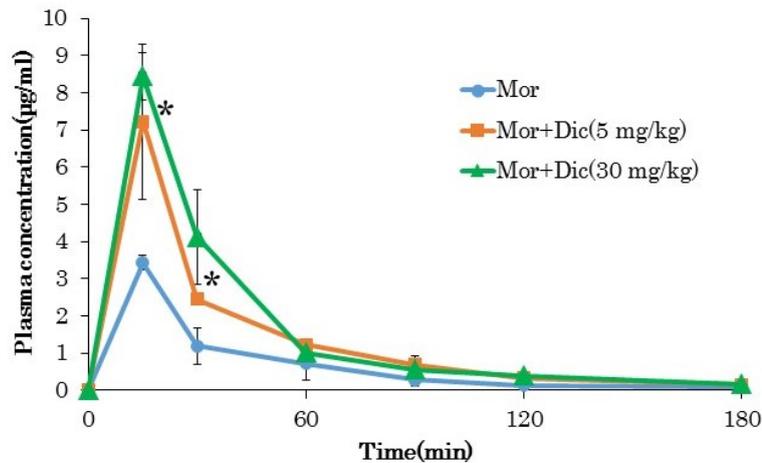


Figure 14. Plasma concentration-time courses of Mor in 10-week-old male rats blood dialysate after a single administration of Mor (5mg/kg) with/without Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg).

Each symbol and bar represents the mean \pm SD of 3 rats.

● :Mor (control), ■ : Mor+Dic(5 mg/kg), ▲ : Mor+Dic(30 mg/kg)

* : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor v.s. Mor+Dic(5 mg/kg))

† : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30mg/kg))

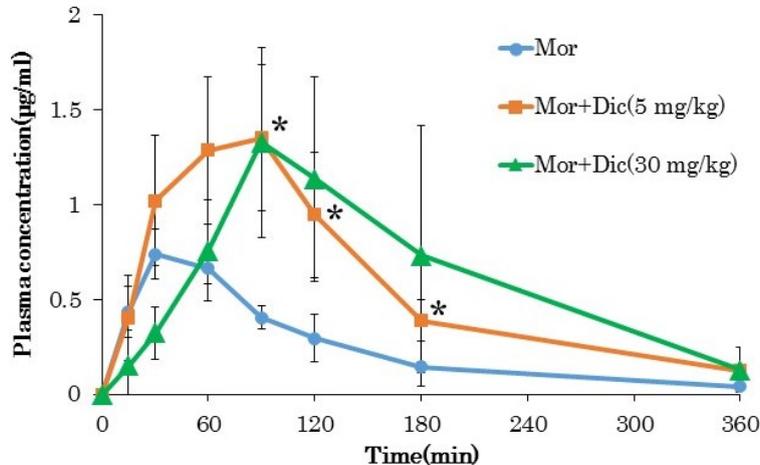


Figure 15. Plasma concentration-time courses of M3G in 10-week-old male rats blood dialysate after a single administration of Mor (5mg/kg) with/without Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg).

Each symbol and bar represents the mean \pm SD of 3 rats.

● :Mor (control), ■ : Mor+Dic(5 mg/kg), ▲ : Mor+Dic(30 mg/kg)

* : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor v.s. Mor+Dic(5 mg/kg))

† : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

Table 5. Pharmacokinetics parameter of Mor after a single administration of Mor (5mg/kg) with/without Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg) in 10-week-old male rats.

Parameter	Mor群 (control)	Mor+Dic(5 mg/kg)群	Mor+Dic(30 mg/kg)群
Tmax (min)	15	15	15
Cmax (µg/ml)	3.9	7.2*	8.5
AUC (µg/ml·min)	150	282*	309
t1/2 (min)	22	21	22
Vd (L/kg)	2.7	1.4 *	0.79
CLtot (L/hr/kg)	0.033	0.018*	0.016

* : Significantly different at $P < 0.05$. (control v.s. Mor+Dic(5 mg/kg)) n=3

† : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

Table 6. Pharmacokinetics parameter of M3G after a single administration of Mor (5mg/kg) with/without Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg) in 10-week-old male rats.

Parameter	Mor群 (control)	Mor+Dic(5 mg/kg)群	Mor+Dic(30 mg/kg)群
Tmax (min)	30	90 *	90
Cmax (µg/ml)	0.74	1.35*	1.33
AUC (µg/ml·min)	98	232*	247
t1/2 (min)	22	20	20

* : Significantly different at $P < 0.05$. (control v.s. Mor+Dic(5 mg/kg)) n=3

† : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

第3節 高濃度 Diclofenac による Morphine の鎮痛効果

Figure 16 には、薬剤非投与群 (Cont 群), Dic 単剤投与群 (Dic 群), Dic 非併用群 (Mor 群), Dic (5 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (5 mg/kg)群) および Dic (30 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (30mg/kg) 群) における Mor 投与 360 分間までの Mor の鎮痛効果を、Figure 17 には Dic 非併用群 (Mor 群), Dic (5mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (5 mg/kg)群) および Dic (30 mg/kg) 併用群 (Mor+ Dic (30 mg/k)群) における AUCE を示す. Mor+Dic (30 mg/kg) 群では Mor+Dic (5 mg/kg) 群と比較して Mor による鎮痛効果に有意差は見られ

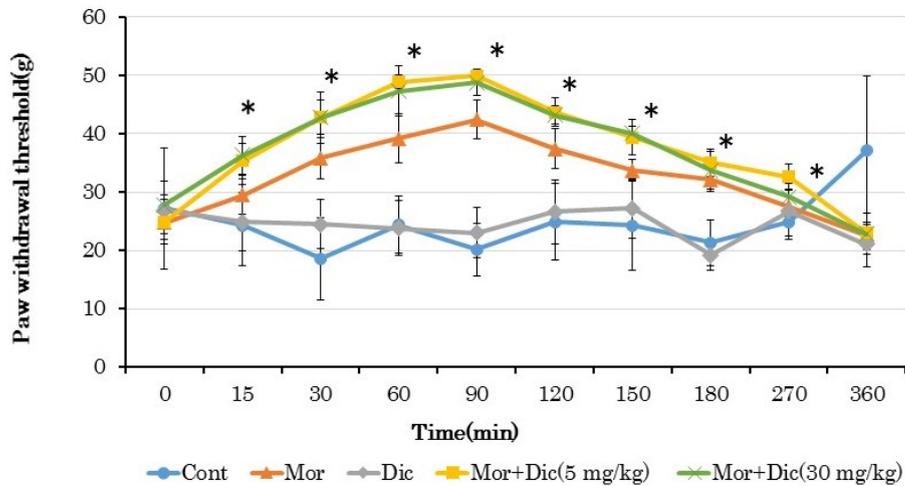


Figure 16. Time-effect curves of no treatment male rats, only Mor or Dic treatment male rats and Mor and Dic (5 mg/kg or 30 mg/kg) treatment male rats. Each symbol and bar represents the mean \pm SD of 6 rats.
 ● : Cont, ▲ : Mor, ◆ : Dic, ■ : Mor+Dic(5 mg/kg), × : Mor+Dic(30 mg/kg)
 * : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor v.s. Mor+Dic(5 mg/kg))
 † : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

なかつた。

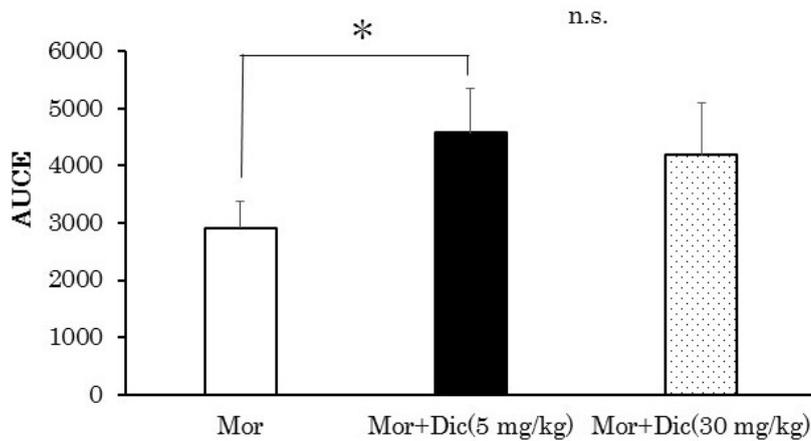


Figure 17. Area under the effect curve of only Mor treatment male rats and Mor and Dic treatment male rats.

Each symbol and bar represents the mean \pm SD of 6 rats.
 □ : Mor, ■ : Mor+Dic(5 mg/kg), ▨ : Mor+Dic(30 mg/kg)
 * : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor v.s. Mor+Dic)
 † : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))
 ‡ : Significantly different at $P < 0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

第4節 考察

Dic がラット肝ミクロゾームの Mor の代謝酵素 UGT を著しく阻害する。しかし、in vivo では Dic の併用により、Mor の血漿中濃度は有意に上昇、M3G の血漿中濃度も有意に上昇したものの、UGT 阻害が明確に表れなかった。また、Dic の併用により Mor の腎排泄が阻害されるという結果を得た。In vivo で Dic による UGT の阻害が見られなかった原因として、Dic を 5mg/kg の濃度で併用した場合、UGT を阻害する濃度に到達していない可能性を考え、Dic の投与量を 30 mg/kg に増加させた。Dic の投与量を増加させたところ、Mor の血漿中濃度推移は上昇傾向が見られたものの、有意差は見られず、M3G の血漿中濃度についても、排泄遅延の傾向が見られたものの有意差は見られなかった。また、Mor の鎮痛効果についても Dic 増量前と比べ、有意差は見られなかった。しかし、特に M3G の血漿中濃度推移では、有意差は見られなかったものの遅延する傾向が見られた。それが UGT の一部阻害に起因している可能性が考えられる。本検討においては、Dic (30 mg/kg) 併用時の Mor および M3G の尿中排泄、胆汁中排泄については検討しておらず、今後の検討課題である。

本章では、Dic の投与量増加による UGT 阻害作用発現の有無、それによる Mor の体内動態および鎮痛効果への影響を検討し、Dic 投与量の増加は UGT の一部阻害を示唆したが、体内動態パラメーターに有意差はなく、Dic は、ラット in vivo において UGT を阻害しない可能性が高いことが示唆された。しかし、更なる検討が必要であると考えられる。

第 6 章 雌性ラットにおける Morphine の PK・PD におよぼす Diclofenac の影響

第 1 節 緒言

モルヒネによる痛覚抑制効果には性差があることが知られており^{17), 18), 19)}, またその性差による Mor の感受性の差はヒトよりもラットにおいて大きく, Mor に対する感受性は雄性ラットで高いことが報告されている²⁰⁾. このように雄性ラットで Mor の感受性が高くなる原因として, 雌性ラットにおいては女性ホルモンにより M3G の生成能が高い可能性が示唆されている²⁰⁾. また雌性ラットにおいて, Dic の投与タイミングをずらして Mor と併用することで BBB における Mor の排泄トランスポーターである P 糖タンパク質 (P-glycoprotein ; P-gp) が増加し, Mor による鎮痛効果が減弱するという報告もある^{5), 21)}. すなわち, 雄性ラットにおいて見られなかった Dic による UGT の阻害作用が雌性ラットにおいては見られる可能性や, Dic の投与タイミングによって, Mor の鎮痛効果が減弱する可能性がある. そこで雌性ラットにおいて Dic 併用時の Mor の体内動態, 鎮痛効果の変動を明らかにするために, Dic 併用時の Mor および M3G の血漿中濃度推移および Mor の鎮痛効果推移を検討した.

第 2 節 Morphine および M3G の血漿中濃度

Figure 18 には, 雌性ラットにおける Dic 非併用群 (Mor 群) と Dic (5mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (5mg/kg) 群)、Dic (30mg/kg) 同時併用群, (Mor+Dic (30 mg/kg) 同時群) および Dic (30 mg/kg) 分離併用群 (Mor +Dic (30 mg/kg) 分離群) の Mor 皮下投与後 180 分までの Mor 血漿中濃度推移を、また、Mor 皮下投与後 360 分までの M3G 血漿中濃度を示す。

雌性ラットでは、Mor の血漿中濃度は全群で有意な変動は見られず、M3G の血漿中濃度推移については Dic を併用することで有意に上昇した。また Mor+Dic (30 mg/kg) 同時群と Mor+Dic (30 mg/kg) 分離群を比較すると、Dic (30 mg/kg) 分離群で Mor 投与後 15, 30 分に M3G の血漿中濃度が有意に上昇した。

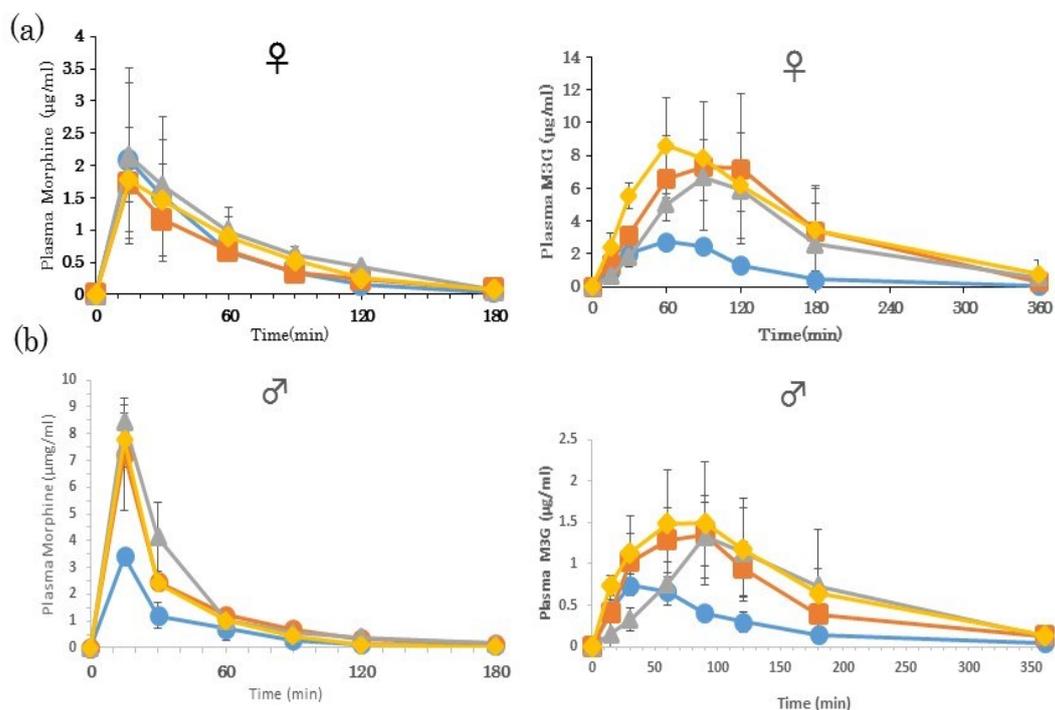


Figure 18. Plasma morphine (a) and morphine-3-glucuronide (b) concentration following subcutaneous administration in vehicle- and diclofenac- pretreated rats.

●, Morphine; ■, Morphine + 5mg/kg Diclofenac administered concurrently, ▲, Morphine + 30mg/kg Diclofenac administered concurrently, ◆, Morphine + 30mg/kg Diclofenac administered at 3hr. Each symbol and bar represents the mean \pm SD of the three rats.

* : Significantly different from control rats ($p < 0.05$).

Figure 19 には、雄性および雌性ラットにおける Dic 非併用群 (Mor 群) と Dic (5 mg/kg) 併用群 (Mor+Dic (5mg/kg) 群), Dic (30 mg/kg) 同時併用群, (Mor +Dic (30 mg/kg) 同時群および Dic (30 mg/kg) 分離併用群 (Mor+Dic (30 mg/kg) 分離群) の Mor 皮下投与後 180 分までの Mor および M3G の血漿中濃度推移の比較を示す。Mor の血漿中濃度推移については、雌性では、雄性に比べ、Mor 単独投与では低い傾向が認められた。また、Dic の影響は、第 2 章、第 3 章、第 4 章で示したように有意な変化が認められたが、雌性においては有意な変動は見られなかった。Dic 大量投与でも同様な結果が認められた。

M3G の血漿中濃度推移については、雌性では、雄性に比べ、Mor 単独投与では高い結果となった。また、Dic の併用は、雄性は大きな影響が認められなかったが、雌性では有意な上昇が認められた。Dic 大量投与でも同様な結果が認められた。

体内動態パラメーターは、Mor については **Table7** に、M3G についても **Table8** に示す。Dic

の投与量を増加することで Mor の AUC に増加傾向、CL_{tot} に低下傾向が見られるものの有意差は見られなかった。

M3G の血漿中濃度推移については Dic を併用することで有意に上昇したが、体内動態パラメーターに有意差はなかった。また Mor+Dic(30 mg/kg)同時群と Mor+Dic(30 mg/kg)分離群を比較すると、Dic(30 mg/kg)分離群で Mor 投与後 15, 30 分に M3G の血漿中濃度が有意に上昇したが、体内動態パラメーターに有意差はなかった。

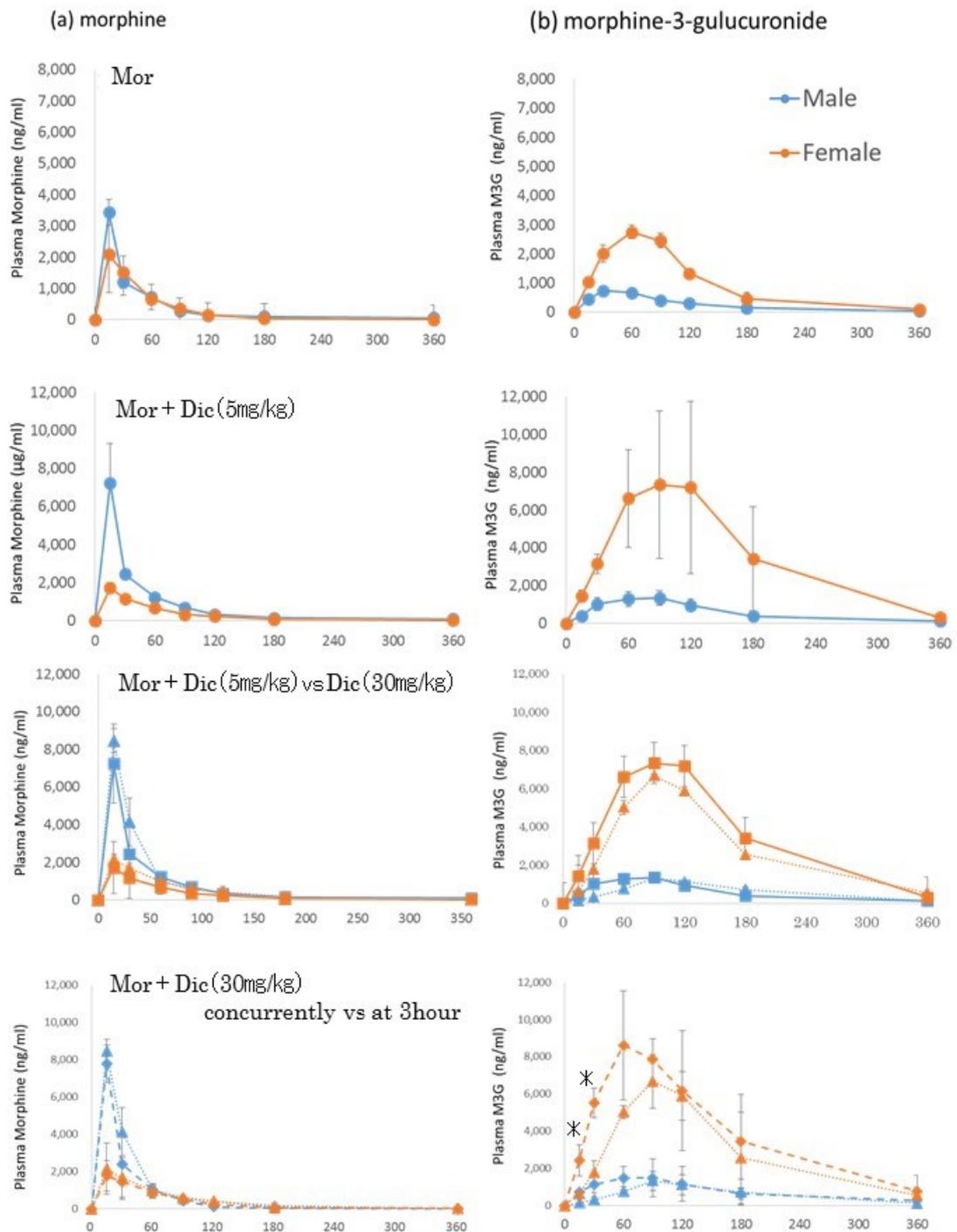


Figure 19. Plasma morphine (a) and morphine-3-glucuronide (b) concentration following subcutaneous administration in vehicle- and diclofenac-pretreated rats. * : Significantly different at $P < 0.05$. Mor+Dic (30mg/kg concurrently vs at 3hour)

Table 7. Pharmacokinetics parameter of Mor after a single administration of Mor(5mg/kg) with/without Dic(5mg/kg), both Mor and Dic(30mg/kg) concurrently and Mor 3hr post Dic(30mg/kg) treatment in 10-week-old female rats.

Parameter	Mor群	Mor+Dic (5 mg/kg)群	Mor+Dic (30 mg/kg) 同時群	Mor+Dic (30 mg/kg) 分離群
Tmax (min)	15	15	15	15
Cmax (µg/ml)	2.1	1.7	2.1	1.8
AUC (µg/ml·min)	108	107	152	131
t1/2 (min)	45	40	40	40
Vd (L/kg)	2.4	3.5	2.4	3.0
CLtot (L/hr/kg)	0.046	0.047	0.033	0.038

* : Significantly different at $P<0.05$. (control v.s. Mor+Dic(5 mg/kg)) n=3

† : Significantly different at $P<0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

Table 8. Pharmacokinetics parameter of M3G after a single administration of Mor(5mg/kg) with/without Dic(5mg/kg), both Mor and Dic(30mg/kg) concurrently and Mor 3hr post Dic(30mg/kg) treatment in 10-week-old female rats.

Parameter	Mor群	Mor+Dic (5 mg/kg)群	Mor+Dic (30 mg/kg) 同時群	Mor+Dic (30 mg/kg) 分離群
Tmax (min)	60	90	90	60
Cmax (µg/ml)	2.7	7.3 *	6.7	8.6
AUC (µg/ml·min)	357	1329	1127	1558
t1/2 (min)	34	28	29	28

* : Significantly different at $P<0.05$. (control v.s. Mor+Dic(5 mg/kg)) n=3

† : Significantly different at $P<0.05$. (Mor+Dic(5 mg/kg) v.s. Mor+Dic(30 mg/kg))

第3節 Morphine の鎮痛効果

Figure 20(A) には、雌性ラットにおける薬剤非投与群 (Cont 群), Dic 単剤投与群 (Dic 群), Dic 非併用群 (Mor 群), Dic (5mg/kg)併用群 (Mor+Dic(5mg/kg)群), Dic (30 mg/kg)

同時併用群(Mor+Dic(30mg/kg)同時群) および Dic(30mg/kg)分離併用群 (Mor+Dic(30mg/kg)分離群) における Mor 投与 360 分間までの Mor の鎮痛効果を示す. Cont 群については, 薬剤の投与を行わず, 他の群と同じタイミングで測定を行っている. また **Figure 20(B)**には, Dic 非併用群(Mor 群), Dic(5 mg/kg)併用群 (Mor+Dic(5 mg/kg)群), Dic(30 mg/kg) 同時併用群 (Mor+Dic(30 mg/kg)同時群) および Dic(30 mg/kg)分離併用群(Mor+Dic(30 mg/kg)分離群)における AUEC を示す.

Dic(5 mg/kg)を併用することによって, Mor 群に比べ Mor 投与後 90 分, 180 分での鎮痛効果が有意に高くなり, AUEC についても有意に高くなった. また Dic の投与量を増加させても Mor の鎮痛効果に有意差はなかったが, 一方で, Dic の前投与により, Mor の鎮痛効果が有意に減弱した. これらの AUEC についても投与量により有意差はなかったが, 前投与により有意に低くなった.

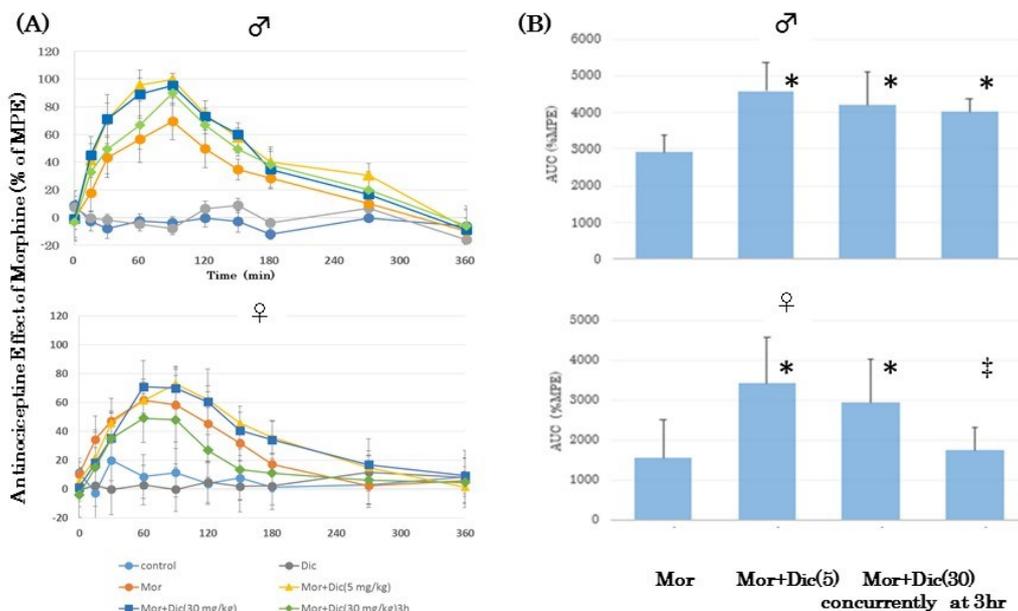


Figure 20. Effects of diclofenac on the anti-nociceptive effect of morphine in rats as measured by Von Frey threshold. Rats were treated with morphine (5 mg/kg s.c.) after the intraperitoneal administration of vehicle or diclofenac(5 mg/kg, 30mg/kg concurrently, 30mg/kg at 3h) . Points are mean \pm SE (n = 6 rats). MPE: maximum possible effect. Area under the effect curve of only morphine and morphine + diclofenac treated male and female rats.*:Significantly different at $P < 0.05$ (Mor vs. Mor + Dic) . ‡:Significantly different at $P < 0.05$ (Mor + Dic (30mg/kg) concurrently vs at 3hr).

第4節 考察

本章では雌性ラットにおいて Dic 投与時の Mor および M3G の血漿中濃度ならびに Mor による鎮痛効果の変動の検討を行った。

その結果、Dic 併用時の Mor 血漿中濃度および、体内動態パラメーターに有意な変動は見られなかった。一方で、Dic (5 mg/kg) の併用により M3G の血漿中濃度は Mor 単剤群に比べ有意に高くなったが、体内動態パラメーターについては、C_{max} 以外有意差は見られなかった。このことから、雌性ラットにおいては、Dic を併用することにより、Mor の代謝および排泄には影響がなく、一方で M3G の排泄経路を阻害している可能性が考えられた。しかし、本検討では Dic を併用した際の Mor および M3G の尿中排泄については検討を行っていないため、これらについての検討が必要であると考えられる。また、雄性ラットにおける結果と比較して、Mor の血漿中濃度が低く、M3G の血漿中濃度が高くなっていることから、雌ラットにおいては UGT 活性が高く M3G の生成能が高い可能性を示唆した報告を裏付けている²⁰⁾。

Dic 併用による Mor の鎮痛効果について、また Dic の投与タイミングを Mor と同時ではなく、Mor 投与の3時間前にすることで Mor の鎮痛効果が同時投与と比べ有意に低下した。この現象は雄ラットではみられなかった。これは Dic により、BBB における P-gp 発現が増加し、Mor による鎮痛効果が減弱するという報告²¹⁾の結果と一致しており、この現象に性差があることを明らかにした。今後 Mor の脳内濃度等や、BBB における P-gp の発現について検討する必要がある。

Dic を併用した際の Mor の血漿中濃度と鎮痛効果の結果を比較すると Dic 非併用群と比べ、Mor の血漿中濃度に差がないにも関わらず、Mor の鎮痛効果が増強していることがわかる。この結果は雄性ラットでの結果とは異なった結果となった。異なる系統や性別間においては、Mor の血漿中濃度は鎮痛効果と相関しないという報告もあり^{22, 23)}、雄性ラットと雌性ラットの結果を比較することはできない。このことから雌性ラットにおいては、雄性ラットと異なり、Mor の鎮痛効果と Mor の血漿中濃度が相関しない可能性がある。また M3G が Mor の鎮痛効果に拮抗するという報告や^{24, 25, 26, 27)}、性差には性腺ステロイドが関連しているという報告もあり²⁸⁾、今後、雌性ラットにおける Mor の鎮痛効果と関連する要因を検討する必要があると考えられる。

第7章 実験の部

7-1) 試薬・使用機器

モルヒネ塩酸塩は武田薬品工業(Osaka, Japan)から購入した。M3Gは九州大学薬学部山田英之教授より恵与された。Diclofenac, naloxone, uridine 5'-diphosphoglucronic acid (UDPGA), および alamethicin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から購入した。以下特に断らない限り、試薬は特級を用いた。

7-2) 第2章 ラット炎症性モデルにおける Morphine PK および PD の検討

実験動物

Lewis 系雄性ラット(日本 SLC 株式会社)を使用した。実験開始まで自由飲水・自由摂食下で飼育した。また動物実験は本学宝町キャンパス実験動物倫理指針に基づき、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して行った。

アジュバント関節炎モデルラットの作製と評価

10mg/mL 完全フロイトアジュバント (CFA) の作製は Mycobacterium tuberculosis (Biosciences) 100mg に 1mg/mL Complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) 10mL を加えて懸濁し、121°Cで15分間滅菌処理を行った。使用するまで4°Cで保存した。

Lewis 系雄性ラット(7週齢)の尾根部(尾の付け根から約1cmの位置)に10mg/mL 完全フロイトアジュバントを0.6mL皮内投与した。全身炎症の評価はいかの3点で行った

- ① 炎症性痛覚過敏の評価 (Von Frey test):CFA投与後0,3,6,10,12,14,19日後にラット後足底に機械刺激を与え、逃避行動が見られた時の刺激の大きさを5回ずつ測定した(Von Frey test). 最大値と最小値を除く3つの値の平均値を用いた。ラットの怪我を防ぐためにCut off値は50gに設定した。
- ② 腫脹の測定:CFA投与後0,3,6,10,12,14,19日後に、ラット後足底近位1/3部をノギスを用いて測定した。
- ③ 体重測定:CFA投与後0,3,6,10,12,14,19日後に、ラットの体重を測定した。

ラット後足底近位 1/3 部の肥厚がもとの 2 倍以上となったものを全身炎症が発現したアジュバント関節炎モデルラットとみなし、以下の実験に使用した。(CFA 投与後 14~19 日の間で以下の実験を行った。)

7-2-2) UGT 活性の測定

(a)ラット肝ミクロゾームの調製

ラットから肝臓を取り出し、肝重量の約3倍容の氷冷したホモジナイズ用緩衝液(0.1M Tris-HCl/0.1M KCl/1mM EDTA(pH7.4))を加え、ホモジナイズした。ホモジネートを4℃, 9,000gで15分間遠心分離し、得られた沈殿にホモジナイズ用緩衝液を加えホモジナイズし、4℃, 10,500gで90分間遠心分離した。得られた沈殿にホモジナイズ用緩衝液を加え、4℃, 9,000gで60分間遠心分離し、沈殿に肝重量の1倍容の懸濁用緩衝液(TGE buffer:10mM Tris-HCl/20%glycerol/1mM EDTA(pH7.4))を加えホモジナイズし、使用直前まで-80℃で保存した。タンパク定量はBio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad)を用いて行った。サンプル20μLに発色試薬を200μL加え、620nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad)を用いて測定した。タンパク質量はBSA (Bio-Rad)を用いて作成した検量線により求めた。

(b) UGT 活性の測定

ラット肝ミクロソーム5μg, モルヒネ, UGT 阻害剤 (ジクロフェナク)を含む反応液を37℃で約2分間プレインキュベーションした。100mM uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA) 10μLを加え反応を開始し、37℃で30分間インキュベーションした。過塩素酸100μLを加え、反応を停止後、10,000gで10分間遠心して上清100μLをとり、HPLCでM3G生成量を測定した。

〈反応液〉

	final conc
MgCl ₂	5mM
Tris-HCl buffer(pH7.4)	50mM
ラット肝ミクロソーム	0.5mg/mL
アラメチシン	33μM
モルヒネ	50,100,200μM
阻害剤 (ジクロフェナク)	

(c) 阻害定数 Ki の算出

阻害剤濃度はジクロフェナク 0,1.875,3.75,7.5,15μM, モルヒネ濃度は50,100,200μMの3段階でそれぞれ反応速度を測定した。Dixon plot を作製して阻害定数をSigmaPlot 13 (Hulinks, Tokyo)を用いて算出した

7-2-3) Morphine タンパク結合率の検討

湯村らの方法²⁹⁾を参考に、ラット血漿およびモルとネ (2.5 μ M) を含むサンプル 1.2mL を 37°C で 1 時間インキュベートし、反応液を総濃度測定用として 100 μ L 分取後、残りを限外ろ過器(Centrifree)にアプライし 37°C, 2,000 g (9400 rpm) で 30 分間遠心し、遊離型濃度測定用としてろ液を採取した。それぞれの画分の Mor 濃度を HPLC により測定した。血漿における遊離形分率 (f) は以下の式により算出した。

$f=C_f/C_t$ (C_f : 遠心分離後のサンプル中薬物濃度、 C_t : 遠心分離前のサンプル中薬物濃度)

7-2-4) 輸送体タンパク質発現量の測定

川瀬らの方法⁶⁾に従い、肝膜画分を Mem-PER eukaryotic membrane protein extraction reagent kit (Thermo, Massachusetts)をもちいて調整した。肝膜画分 10 μ g タンパク質に相当する各サンプルを 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて、分離を行った。SDS-PAGE 終了後、分離したタンパク質を転写バッファーを用いて転写装置(ATTO)で PVDF メンブレン(Bio-Rad)に転写した。その後 PVDF メンブレンを BB (Blocking Buffer : TS(Transfar Buffer : 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15M NaCl) with 5% (W/V) スキムミルク)に浸して室温で 1 時間振とうした。その後 PVDF メンブレンを抗 MDR1 ラビットモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology)とアクチン mouse anti- β -actin (clone B11V08) (Acris Antibodies, California, USA) で 4°Cで一晩反応させた。PVDF メンブレンを洗浄後、HRP 標識抗ラビット IgG ロバポリクローナル抗体(Amersham LIFE SCIENCE)と室温で 1 時間反応させた。PVDF メンブレンを洗浄後、Western Lightning(Perkin Elmer)を用いて発色させ、Fluor-S でシグナル検出を行った。検出されたバンドのシグナル強度は、MRD1 の β -actin に対する比をそれぞれの発現量として Image J により定量した。

7-2-6) Morphine 濃度および M3G 濃度の測定

エーテル麻酔下でラットの頸静脈から採血を行った。Mor 5 mg/kg を皮下投与後 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 360, 720 分において、10 U/ml ヘパリン処理したシリンジを用いて 300 μ L 採血した。採取した血液は 4°C, 5,000g で 7 分間遠心し、上清(血漿)を採取した。血漿サンプルは測定に用いるまで-80°Cで保存した。

内部標準 (Internal standard ; IS)としてナロキソン(Naloxone ; Nal)を使用した。Mor および M3G は共に 1 mg/mL となるように、Nal は 4 μ g/mL となるように精製水で溶かし、それぞれ保存溶液として-30°Cで保存し、サンプル処理時に精製水で希釈して使用した。長谷川らの方法³⁰⁾を一部改編し、以下の方法で前処理を行った。前処理に用いたサンプルは定量範囲内 (1000~50 ng/ml) に入るよう予め精製水で希釈したものを用いた。サン

プル 200 μ L に 4 μ g/ml NaI 水溶液 20 μ L を加え、10 秒間ボルテックスした。その後メタノール 3 mL と精製水 3 mL, acetonitrile/ 10mmol/l phosphate buffer (10 : 90 v/v pH2.1) 2 mL, 0.5 mol/l ammonium sulfate buffer (pH9.3) 3 mL でコンディショニングした InertSep®個相抽出カートリッジ(GL Science Inc., Tokyo, Japan.)に処理サンプルを全量アプライし、5 mmol/l ammonium sulfate buffer (pH9.3) 4 mL で洗浄し、acetonitrile/ 10mmol/l phosphate buffer (10 : 90 v/v pH2.1) 2 mL で溶出し、50 μ L を HPLC により解析した。分離カラムは TSKgel ODS-80TM., Tokyo, Japan) を用い、移動相は 0.1 M sodium dihydrogen phosphate buffer、流速 (0.5ml/min) で行った

検出には電気化学的検出器 ((Coulochem II; Esa Inc., Chelmsford, MA, USA))を用いた。M3G の濃度測定は長谷川らの方法を一部改変し、以下の方法で前処理を行った。前処理に用いたサンプルは定量範囲内 (1000~50 ng/ml) に入るよう予め精製水で希釈したものをを用いた。サンプル 200 μ L に 4 μ g/ml NaI 水溶液 20 μ L を加えボルテックスした。その後メタノール 3 mL と精製水 3 mL, acetonitrile/ 10mmol/l phosphate buffer (10 : 90 v/v pH2.1) 2 mL, 0.5 mol/l ammonium sulfate buffer (pH9.3) 3 mL でコンディショニングした InertSep®個相抽出カートリッジに処理サンプルを全量アプライし、5 mmol/l ammonium sulfate buffer (pH9.3) 4 mL で洗浄し、acetonitrile/10mmol/phosphate buffer (10 : 90 v/v pH2.1) 2 mL で溶出し、50 μ L を HPLC で解析した。検出には蛍光検出器 (RF-535) (excitation: 210 nm; emission: 350 nm)を用いた。

データ解析は、Chromato-PRO (ランタイムインスツルメンツ) を用いて行った

7-2-7) Mor 鎮痛効果の検討 (Tail flick test)

モルヒネの鎮痛作用は、ラット尾部に照射熱刺激を与える装置 (Ugo Basile, Italy) を用い、その照射開始から回避反応を起こすまでの時間を疼痛閾値とする tail-flick test によって測定した。モルヒネの鎮痛作用の評価は、tail-flick 反応の阻害を示す最大有効反応率である percent maximum possible effect (%MPE) で表し、 $[(T1-T0)/(T2-T0)] \times 100$ の式により算出した。なお、T0 値および T1 値にはそれぞれ同一ラットにおける投薬前および投薬後の反応時間 (sec) を、T2 値には cut-off time (30.1sec) を入力した。また、マウスの熱刺激部位における損傷を最小限にとどめるために、熱刺激時間を最長で 10 秒までとした。実験は一群を 3 匹として行ない、算出された %MPE 値は平均値 (Mean) および標準誤差 (Standard Error of the Mean :S.E.M.) で表した。

7-2-8) 統計学的処理

統計処理は、血漿中濃度、体内動態パラメーター、胆汁中排泄量、尿中排泄量については対応のない t 検定を適用し、鎮痛効果推移については 2 元配置分散分析および sidak の方法を用いて $P < 0.05$ を有意差ありとした。

7-3) 第 3 章 Morphine の体内動態(PK)に及ぼす Diclofenac の影響

7-3-1) UGT 活性の測定

(a) ラット肝ミクロゾームの調製

7-2-2) (a) と同様の方法で調製した。

(b) タンパク定量

7-2-2) (b) と同様の方法で求めた。

(c) UGT 活性の測定 (in vitro)

7-2-2) (c) と同様の方法で行った。

(d) 阻害定数 K_i の算出

7-2-2) (d) と同様の方法で行った。

7-3-2) Morphine 濃度および M3G 濃度の測定

Morphine の濃度測定

7-2-6 と同様の方法で行った。

M3G の濃度測定

7-2-6 と同様の方法で行った。

7-3-3) Diclofenac 併用時の Morphine および M3G 血漿中濃度推移の検討実験

ラットの頸静脈をエーテル麻酔下で露出させ、Dic 5 mg/kg もしくは 30 mg/kg を腹腔内投与し、1 分後に Mor 5 mg/kg を皮下投与した。雌性ラットについてのみこれ以外に、Dic 30 mg/kg を腹腔内投与し、3 時間後に Mor 5mg/kg を皮下投与する方法を追加した。

採血を露出させた頸静脈から行い、Mor 投与後 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 360, 720 分にエーテル麻酔下にて、ヘパリン処理したシリンジを用いて 300 μ L 採血した。

採取した血液は、4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm で 7 分間遠心し、上清（血漿）を採取した。血漿サンプルは測定に用いるまで -30 $^{\circ}$ C で保存した。シリンジのヘパリン処理は、採血前に 10 U/ml ヘパリンをシリンジで吸い取り、針先をヘパリンで満たしておいた。

7-3-4) Diclofenac 併用時の Morphine および M3G の尿中排泄量の検討実験

ラットに、Dic 5 mg/kg を腹腔内投与し、1 分後に Mor 5 mg/kg を皮下投与後、代謝ケージを用いて採尿した。尿は予め重量を計測したチューブに回収した。採尿時間は、Mor 投与後 3, 6, 12 時間とし、チューブは on ice の状態で採尿できるよう固定した。得られた尿サンプルはチューブごと秤量し、空のチューブの重量を差し引いて尿サンプルの重量を算出した。また、尿の比重は 1 g/ml とした。採取した尿サンプルは、測定に用いるまで -30 °C で保存した。

7-3-5) Diclofenac 併用時の Morphine および M3G の胆汁中排泄量の検出実験

ラットをエーテル麻酔下、背位を固定し、上腹部中央を切開し、胆管にポリエチレンチューブ (Polyethylene TubeSP-10, I.D. 0.28 mm, O.D. 0.61 mm) を挿入し、縫合糸で胆管とチューブを固定し、腹部を縫合した。その後、Dic 5 mg/kg を腹腔内投与し、1 分後に Mor 5 mg/kg を皮下投与後、6 時間まで経時的に胆汁採取を行った。胆汁は予め重量を計測したチューブに回収した。胆汁の採取時間は Mor 投与後 1.5 時間間隔で行った。胆汁回収用のチューブは on ice の状態で採取できるように固定した。得られた胆汁サンプルはチューブごと秤量し、空のチューブの重量を差し引いて胆汁サンプルの重量を算出した。また、胆汁の比重は 1 g/ml とした。採取した胆汁サンプルは、測定に用いるまで -30 °C で保存した。

7-3-6) 薬物速度論的解析

薬物速度論的パラメータは MULTI コンピュータープログラムを用いて、モデル非依存的解析により求めた³¹⁾。投与後無限大までの血漿中濃度-時間下面積 (AUC) は最終採血時点までは台形法にて算出し、全身クリアランス (CL_{tot}) は Dose/AUC、平均血中滞留時間 (MRT) は AUMC (一次モーメント曲線下面積) /AUC、定常状態の分布容積 (V_{dss}) は CL_{tot}x MRT より算出した。

7-4) 第 4 章、第 5 章 第 6 章の実験

第 4 章 Morphine の鎮痛効果 (PD) におよぼす Diclofenac の影響

第 5 章 Morphine の PK-PD におよぼす高濃度 Diclofenac の影響

第 6 章 雌性ラットにおける Mor の PK・PD におよぼす Diclofenac の影響

動物実験

Fischer 系雄性 or 雌性ラット 10 週齢 (日本 SLC 株式会社) を使用した。実験開始まで自由飲水・自由摂食下で飼育した。また、動物実験は本学宝町キャンパス実験動物倫理指針に基づき、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛

の軽減に関する基準」, 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して行った.

7-5) Diclofenac 併用時の Morphine 鎮痛効果推移の検討実験

ラットを Von Frey 式感覚測定装置のケージに入れ, 環境に慣れさせるために 15 分放置した後, 雄性ラットについては Dic 5 mg/kg もしくは 30 mg/kg を腹腔内投与し, 1 分後に Mor 5 mg/kg を皮下投与した. 雌性ラットについては, 雄性ラットの投与方法に加え, Dic 30 mg/kg を腹腔内投与し, 3 時間後に Mor 5 mg/kg を皮下投与する方法も追加した. Mor 投与後 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 270, 360 分に Von Frey 式感覚測定装置により Mor の鎮痛効果を測定した.

7-6) 統計学的処理

統計処理は, 血漿中濃度, 体内動態パラメーター, 胆汁中排泄量, 尿中排泄量については対応のない t 検定を適用し, 鎮痛効果推移については 2 元配置分散分析および sidak の方法を用いて $P < 0.05$ を有意差ありとした.

引用文献

- 1) 平成27年（2016）．人口動態統計（確定数）の概況 性別にみた死亡順位（第10位まで）別 死亡数．死亡率（人口10万人対）・構成割合 厚生労働省
http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei15/dl/10_h6.pdf
- 2) 平成26年（2014）患者調査の概況 主な傷病の総患者数 厚生労働省
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/05.pdf>
- 3) 特定非営利活動法人 日本緩和医療学会 緩和医療ガイドライン委員会 編
がん疼痛の薬物療法に関するガイドライン（2014年版）
<http://www.jspm.ne.jp/guidelines/pain/2014/index.php>
- 4) 細川豊志（2005）疼痛管理 医学のあゆみ. 215: pp987-993.
- 5) Melissa J. Seelbach, Tracy A. Brooks, Richard D. Egleton, Thomas P. Davis. Peripheral inflammatory hyperalgesia modulates morphine delivery to the brain: a role for P-glycoprotein. *J.Neurochemistry*, 102, 1677-1690 (2007).
- 6) Kawase AI, Norikane S, Okada A, Adachi M, Kato Y, Iwaki M. Distinct alterations in ATP-binding cassette transporter expression in liver, kidney, small intestine, and brain in adjuvant-induced arthritic rats. *J Pharm Sci*, 103, 2556-2564 (2014).
- 7) Chen YL, Florentin I, Batt AM, Ferrari L, Giroud JP, Chauvelot-Moachon L. Effects of interleukin-6 on cytochrome P450-dependent mixed-function oxidases in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 44, 137-148 (1992).
- 8) Stolina M, Bolon B, Middleton S, Dwyer D, Brown H, Duryea D, Zhu L, Rohner A, Pretorius J, Kostenuik P, Feige U, Zack D. The evolving systemic and local biomarker milieu at different stages of disease progression in rat adjuvant-induced arthritis. *J Clin Immunol*. 29, 158-74 (2009).
- 9) Hara Y, Nakajima M, Miyamoto K, Yokoi T, Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine, *Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 103-112 (2007).
- 10) González-Rodríguez S, Hidalgo A, Baamonde A, Menéndez L. Spinal and peripheral mechanisms involved in the enhancement of morphine analgesia in acutely inflamed mice. *Cell Mol Neurobiol* 30, 113-21 (2010).
- 11) 日本ペインクリニック学会（2005） 鎮痛補助剤
http://www.jspc.gr.jp/gakusei/gakusei_cure_03_03.html
- 12) ボルタレン錠 IF（2012年12月改定 第13版）
- 13) モルヒネ塩酸塩水和物 IF（2012年改訂 第6版）
- 14) Wada M, Yokota C, Ogata Y, Kuroda N, Yamada H, Nakashima K, Sensitive HPLC-

- fluorescence detection of morphine labeled with DIB-Cl in rat brain and blood microdialysates and its application to the preliminary study of the pharmacokinetic interaction between morphine and diclofenac, *Anal Bioanal Chem*, 391, 1057-1062 (2008).
- 15) Susanne A, Claudia M, Christoph B, Ute H, Thomas M, Ernst-Ulrich G, Gerd M, Diclofenac does not interact with codeine metabolism in vivo: A study in healthy volunteers, *BMC Clinical Pharmacology*, 2, 1472-6904 (2002).
- 16) Adriana MDR, Alma RCA, Marcela H, Jose RML, Francisco JLM, Effect of metamizol on morphine pharmacokinetics and pharmacodynamics after acute and subchronic administration in arthritic rats, *European Journal of Pharmacology*, 645, 94-101(2010).
- 17) Benjamin K, Sonya GW, Jeffrey SM, Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289, 1370-1375 (1999).
- 18) Deleo JA, Rutkowski MD, Gender differences in rat neuropathic pain sensitivity is dependent on strain, *Neurosci Lett*, 282, 197-199 (2000).
- 19) Mogil JS, Chesler EJ, Wilson SG, Juraska JM, Sternberg WF, Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype, *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 375-389 (2000).
- 20) Lanning B, Anna R, Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats, *Pain*, 95, 65-74 (2002)
- 21) Lucy SC, Lauren MS, Brandon JT, Yifeng Z, Mei-Li L, Kristin MD, Patrick TR, Thomas PD, P-glycoprotein modulates morphine uptake into the CNS: A role for the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug diclofenac, *PLOS ONE*, 9, e88516(2014).
- 22) Sarton E, Olofsen E, Romberg R, den Hartigh J, Kest B, Nieuwenhuijs D, Burm A, Teppema L, Dahan A, Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers, *Anesthesiology*, 93, 1245-1254(2000).
- 23) Magdalena M, Eva S, M. Jesus O, Jose FH, Clara CF, Genetic variability in morphine sensitivity and tolerance between different strains of rats, *Brain Research*, 866, 109-115 (2000).
- 24) Smith MT, Watt JA, Cramond T, Morphine-3-glucuronide-a potent antagonist of morphine analgesia, *Life Sci*, 47, 579-585(1990).
- 25) Frances B, Gout R, Monsarrat B, Cros J, Zajac JM, Further evidence that morphine-6 beta-glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine, *J Pharmacol Exp Ther*, 262, 25-31(1992).
- 26) Gong QL, Redner J, Bjorkman R, Redner T, Morphine-3-glucuronide may functionally

antagonize morphine-6-glucuronide induces antinociception and ventilator depression in the rat, *Pain*, 48, 249-255(1992).

27) Faura CC, Olaso MJ, Garcia CC, Horga JF, Lack of morphine-6-glucuronide antinociception after morphine treatment. Is morphine-3-glucuronide involved? , *Pain*, 65, 25-30(1996).

28) Fillingim RB, Ness TJ, Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses, *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 485-501(2000).

29) 揚村 浩文 , 小原 該一 , 下園 拓郎 , 本屋 敏郎 , 中村 和男 , 下堂 薫 権洋 , 山口 辰哉 , 石橋 丸應. フェニトイン,バルプロ酸,サリチル酸の in vitro 血清蛋白結合における相互作用. *病院薬学*, 15, 88-92 (1989).

30) Hasegawa Y, Kishimoto S, Takahashi H, Inotsume N, Takeuchi Y, Fukushima S, Altered expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver affects the disposition of morphine and its glucuronide conjugate in a rat model of cholestasis. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61, 1205–1210 (2009).

31) Yamaoka K, Nakagawa T. A nonlinear least squares program based on differential equations, MULTI (RUNGE), for microcomputers. *J Pharmacobiodyn.* 8, 595-606 (1983).

謝辞

本研究を遂行するに際し、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました、金沢大学医薬保健研究域薬学系 臨床薬物情報学研究室 荒井國三 教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、厚く御礼申し上げます。

また、本研究に関する懇切丁寧なご指導、ご助言を賜りました、金沢大学医薬保健研究域薬学系 臨床薬物情報学研究室 松下良 教授、石崎純子 准教授、大柳賀津夫講師（現北陸大学薬学部准教授）、菅幸生助教、無量井昴樹（六回生）、柴田実香（六回生）ならびに金沢大学医薬保健研究域医学系 機能解剖学分野 尾崎紀之 教授 に心よりお礼申し上げます。

本研究の実験に際し、様々な実験機器や場所を貸していただき、また、御協力頂きました金沢大学医薬保健研究域 医学系 機能解剖学分野の皆様へ深く感謝いたします。

加えて、犠牲となった数多くの実験動物に深く感謝し、冥福を祈ります。

公私にわたり温かい御指導、御助言、御協力頂きました金沢大学臨床薬物情報学研究室の皆様、互いに切磋琢磨した同期学友に深く感謝いたします。

最後になりましたが、金沢大学医薬保健研究科薬学専攻博士課程を受講するにあたりよき理解者となり、多大なご支援を頂きました家族に深く感謝しました。

