

三環系抗うつ薬イミプラミンとその活性代謝物  
デシプラミンの非線形体内動態

1990年

千葉雅人

三環系抗うつ薬イミプラミンとその活性代謝物デシプラミンの  
非線形体内動態

目 次

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 序論                                                                 | 1  |
| 第一章 Imipramineとその主要代謝物の高速液体クロマト<br>グラフィーによる微量同時定量法の検討              | 7  |
| 1-1 移動相の組成および抽出条件とクロマトグラム                                          | 10 |
| 1-2 定量精度                                                           | 19 |
| 1-3 小括                                                             | 23 |
| 第二章 Imipramine代謝に関与するP-450分子種の解明                                   | 24 |
| 2-1 In Vitro 代謝実験条件の確立                                             | 26 |
| 2-2 Imipramine代謝Kineticsの性差および誘導剤<br>による変化                         | 31 |
| 2-3 ラット肝ミクロソームにおけるImipramine<br>各代謝速度の性差と老化による代謝活性変動に<br>関する検討     | 48 |
| 2-4 Imipramine代謝における脱メチル化反応に<br>関与するP-450分子種の解明                    | 52 |
| 2-5 Imipramine代謝における環2位水酸化反応に<br>関与するP-450分子種の解明                   | 58 |
| 2-6 Imipramine代謝における平行代謝経路間<br>相互作用 (Parallel Pathway Interaction) | 64 |
| 2-7 小括                                                             | 70 |
| 第三章 ラット肝ミクロソームと遊離肝細胞における<br>In Vitro 代謝パラメータの比較                    | 72 |
| 3-1 遊離肝細胞を用いた代謝実験系での反応条件<br>の確立                                    | 73 |

|                                                    |                                                                             |       |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3-2                                                | 遊離肝細胞・肝ミクロソーム代謝実験系での<br>ImipramineおよびDesipramineの代謝Kineticsの<br>比較          | 7 6   |
| 3-3                                                | 小括                                                                          | 8 6   |
| 第四章 非線形体内動態を示すImipramineと活性代謝物                     |                                                                             |       |
|                                                    | Desipramineの速度論的モデル                                                         | 8 7   |
| 4-1                                                | Imipramine門脈内定速注入実験                                                         | 8 8   |
| 4-2                                                | ImipramineおよびDesipramineの胆汁排泄および<br>尿中排泄                                    | 9 4   |
| 4-3                                                | ImipramineおよびDesipramineの血漿中非結合率<br>および血漿／血中濃度比                             | 9 6   |
| 4-4                                                | Imipramine門脈内定速投与時のImipramine<br>およびDesipramineの定常状態血中濃度を同時<br>予測できる速度論的モデル | 1 0 0 |
| 4-5                                                | Quinidine併用によるImipramine代謝の<br>Kineticパラメータの変化を利用したモデルの<br>妥当性の検討           | 1 1 3 |
| 4-6                                                | 小括                                                                          | 1 3 3 |
| 第五章 非定常状態におけるImipramineとDesipramineの<br>生理学的モデルの構築 |                                                                             |       |
| 5-1                                                | ImipramineおよびDesipramineの各主要臓器に<br>対する平衡定数の測定                               | 1 3 6 |
| 5-2                                                | 定常状態での速度論的モデルの非定常状態<br>生理学的モデルへの拡張                                          | 1 3 9 |
| 5-3                                                | 非定常状態生理学的モデルを用いたImipramine<br>およびDesipramineのヒトでの体内動態の予測<br>(アニマル スケールアップ)  | 1 4 7 |
| 5-4                                                | 小括                                                                          | 1 5 7 |
|                                                    | 総括                                                                          | 1 6 4 |
|                                                    |                                                                             | 1 6 6 |

|        |     |
|--------|-----|
| 実験方法   | 170 |
| 参考文献   | 181 |
| 掲載雑誌目録 | 197 |
| 謝辞     | 198 |

## 序 論

生物薬剤学における薬物速度論の研究目的は、体内に取り込まれる薬物の吸収、分布、代謝、排泄 (Absorption · Distribution · Metabolism · Excretion) の速度過程を速度式で表現し、薬物の安全かつ効果的な投与計画、すなわち、投与経路、投与量、投与間隔などを予測することである。したがって、その研究の中心は体内動態を解析・予測できるモデル式の確立である。薬物の移行過程は必ずしも単純な物理化学的機構を反映しているものとは限らず、また、個々の過程が単純な数式で表現できたとしても、生体で起こる現象はこれら個々の過程を総合したものであるため、複雑な数式となる。このことは、薬物速度論においてはモデルの設定とその解析手段の確立が必要不可欠であることを意味している。

最初に薬物体内動態を定量的に表現したのは Teorell であった (1937 年)。解析に用いられたモデル式は血中濃度—時間曲線を指数関数の和で表現するものであり、この解析には必ずしもコンピュータを用いた数値解法を必要としなかった。これは、いわゆる、コンパートメントモデルと呼ばれている。モデルを構成している指数関数の数は、血中濃度—時間曲線をより正確に表わすため決められたものであり、コンパートメントの数、コンパートメントとそのコンパートメント間の速度定数は具体的な意味を持っていなかった。したがって、個々の患者における臨床上の所見 (たとえば心拍出量、腎機能の変動など) を血中濃度の予測に反映することができなかった。このことは、これらの生理学的パラメータがコンパートメントモデルの解析から得られたどのパラメータに相当するのか判断できないことを意味している。しかし、そのモデルの構築手順はきわめて汎用性があるため現在まで数多くの薬物に適用されてきた。

しかし、近年コンピュータの開発が進み、複雑な数値解法が容易に計算できるようになった。このような状況の下で、1968 年 Bischoff と Dedrick は、上述のコンパートメントモデルを発展させた、いわゆる、生理学的モデルの手法を確立した。このモデルは、生体を構成している各臓器ごとに一つのコンパートメントを割り当て、各コンパートメント間の薬物移行速度を具体的な臓器間血流量で表現している。そのためモデルを構成している臓器の数だけ連立した微分方程式を数値的に解く必

要があり、コンピュータの高度な計算能力がこのモデルによる解析の成功の鍵となった。また、このモデルを構成しているコンパートメント容積や血流量は用いられた実験動物固有の解剖学的パラメータであることから、これらの値をヒトの値に変換することによって、実験動物での体内動態をヒトに外挿することへの応用（アニマルスケールアップ）が可能であり、現在、生理学的モデルは薬物速度論において主要な解析法の一つとなっている。

生理学的モデルを構成しているパラメータのうち、薬物の臓器内分布に関しては、種差や年齢差といった分布様式などの詳しい検討が活発に行なわれている。一方、肝臓における薬物の代謝に関して、酵素学および生化学的観点から検討されている例は少ない。これは、生理学的モデルを研究しているグループが、あくまで薬物速度論の立場から速度定数の一つとして代謝速度を評価しているためであり、酵素学的にどのような酵素反応あるいは酵素分子種によって代謝が行なわれているかといった考察が乏しい。

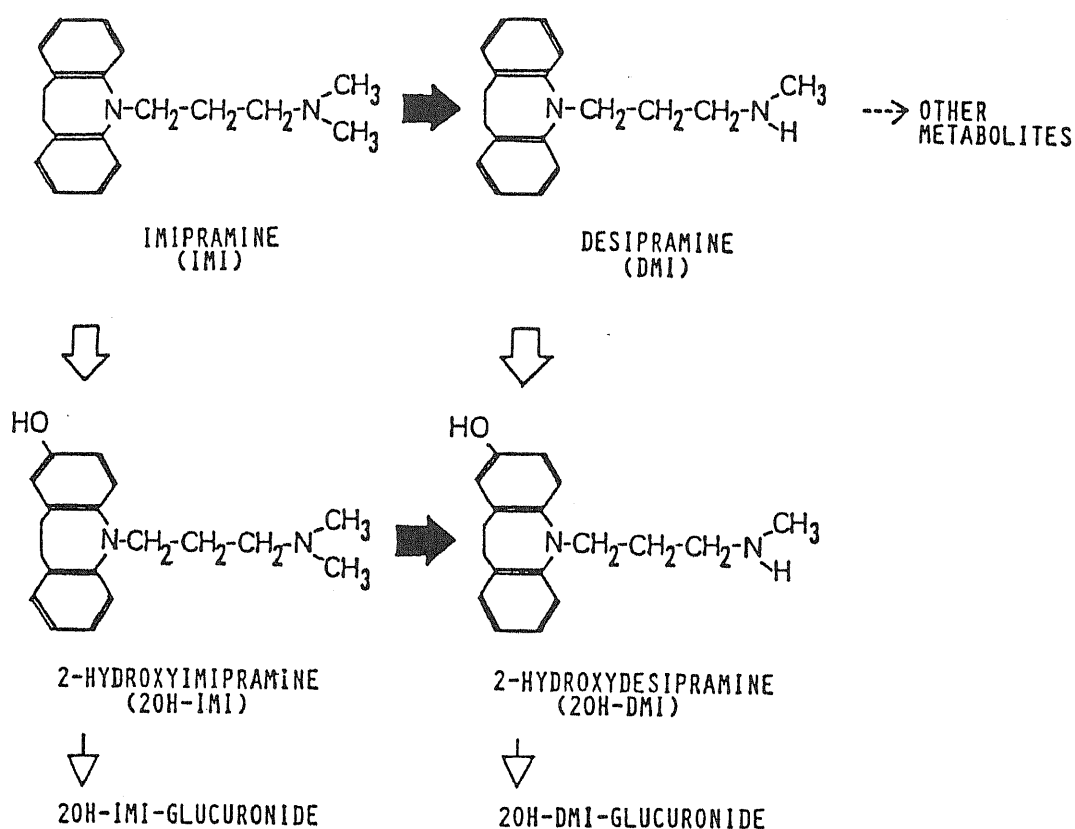
生物薬剤学の薬物代謝の研究分野は、現在、大きく2つに大別されている。すなわち、「薬物代謝研究」を中心に、*in vitro*での生化学的手法を用いて酵素学的レベルで研究を行なっているグループと、「薬物体内動態」を、主に*in vivo*での薬物体内動態を中心に解析している研究グループである。前者の研究グループの研究対象としている薬物代謝酵素は、多岐にわたっているが、薬物のPhase I代謝に関与しているP-450に関しては、その分子種を精製し、分子多様性、物理化学的性状、基質特異性、誘導性、性差、種差、年齢差を明かにすることを中心に研究が行なわれている。特に最近の分析技術、精製技術の進歩にともない、この分野の研究はより精密な分子生物学的検討、すなわち酵素タンパクの遺伝学的特性を調べることが活発に行なわれている。一方、後者の研究グループは、薬物の体内動態を精密に記述できるモデルの構築や体内動態を支配している要因の解明、薬物をより効率よく体内に送達できるシステムの開発に焦点がおかれている。このように両グループは、異なる視点からの研究結果を蓄積する傾向がある。しかし、生物薬剤学の最終目的が、薬物の体内動態、代謝、毒性を支配している要因を解明することによって、これらを予測できる投与指針を確立することであるとすれば、前者の研究のみでは薬物代謝の酵素化学的および分子生物学

的解明はなされるものの、in vitroでの知見がWhole bodyでの薬物体内動態にどの様に反映しているか定量的に予測することが不可能であり、また、後者の研究のみでは、得られた代謝パラメータに関する分子論的基盤が薄いという問題点がある。したがって、両研究グループの協力が今後の生物薬剤学の発展には不可欠であると考えられる。特に、投与された薬物から薬効を持った代謝物（活性代謝物）が代謝生成される場合、薬効および毒性を予測するためには投与された薬物のみならず代謝物の体内動態も同時に把握することが重要であり（Drayer, 1976）、両者の代謝を司る酵素学的検討が不可欠となる。

本研究では投与された薬物と代謝されることにより生成された活性代謝物の体内動態を同時に予測することを目的として酵素学的研究結果に立脚した速度論的モデルの構築を進めた。

対象薬物として三環系抗うつ薬 Imipramineを取りあげた。この薬物は臨床上用いられている三環系抗うつ薬のうち、最初に発見され現在でも繁用されている代表的な三環系抗うつ薬である。しかし、肝臓における初回通過効果が大きいことから、投与されたImipramineの体内動態は、肝臓の代謝活性に大きく影響を受けることが明らかにされている（Nagy & Johansson, 1975）。Imipramineのヒトおよびラットの主要代謝経路を Scheme 1 に示した（Dingell et al.,1963;Christiansen et al.,1967; Bickel & Weder,1968;Crammer et al.,1968;Sutfin et al.,1984）。この薬物はまず脂肪酸アルキル基がN-脱メチル化あるいはイミノジベンジル基の2位が水酸化を受け、Desipramine (DMI) および2位水酸化Imipramine (2OH-IMI) が生成される。さらに、これらの1次代謝物はそれぞれ2位水酸化反応およびN-脱メチル化反応をうけ共通の2次代謝物、2位水酸化Desipramine (2OH-DMI) が生成される。これらの反応は肝臓において Phase I 反応に関与している主要な薬物代謝酵素である Cytochrome P-450 によって触媒されていることが報告されている（von Bahr & Orrenius, 1971）。また、二つの2位水酸化代謝物 (2OH-IMI と 2OH-DMI) は、Phase II 反応を触媒している主要代謝酵素である UDP-glucuronyltransferase によってグルクロン酸抱合を受けることが知られている（Dingell et al.,1963;Christiansen et al.,1967; Bickel & Weder,1968;Crammer et al.,1968;Sutfin et al.,1984）。

Imipramineの代謝経路において特に注目されることは、その脱メチル



Scheme 1

## MAJOR PATHWAYS OF IMIPRAMINE METABOLISM IN RATS.

Open arrows show aromatic 2-hydroxylations and closed arrows, aliphatic N-demethylation.

化反応によって生成されるDMIにも強力な抗うつ作用があり、これ自身抗うつ薬として臨床に用いられていることである。三環系抗うつ薬の薬理効果の機序は、脳における神経伝達物質であるNoradrenalineとSerotoninの神経終末への再取り込みを抑制することによって、シナプス間隙での伝達物質濃度を上昇させることによって発現される。興味深いことに、ImipramineとDMIは、取り込みを抑制する神経伝達物質に対して、特異性を持っており、前者はSerotoninに対して、また、後者はNoradrenalineに対して選択的であることがラットの大脳皮質を用いた実験から明らかにされている(Raisman et al.,1979)。また、これらの神経伝達物質によって惹起される抗うつ作用は、Noradrenalineでは意欲高揚作用に、また、Serotoninは気分高揚作用に関係していると言われている(Carlsson,1976)。したがって、ImipramineとDMIでは、鬱病患者の治療において、異なる種類の抗鬱作用を発現している可能性が示唆されている(Kielhol,1978)。

さらに、Imipramineがヒトで服用された場合の体内動態における問題点として、ImipramineおよびDMIの血中濃度が投与量に対して非線形に上昇することが報告されている(Brosen et al.,1986)。このことは、ある投与量での血中濃度から異なる投与量での血中濃度を簡単な比例計算から予測できないことを意味しており、血中濃度を基にした投与計画を立てることが困難となる。また、この非線形性は患者の年齢(Bjerre et al.,1981)および遺伝的特性(Brosen et al.,1986)によって、その程度が変動することが報告されている。これらの事実は、Imipramineの肝臓での代謝活性が、臨床で用いられる投与量範囲で飽和すること、および、その活性が年齢および遺伝的要因によって影響を受けることを意味しており、肝臓における酵素学的研究がその体内動態を理解するためには不可欠である。

以上のことから、Imipramineは、本研究で目標としている点、すなわち、活性代謝物を同時予測できる生理学的モデルをin vitro代謝実験より得られる酵素学的知見から構築する上で、最も適したモデル薬物の一つである。また、本研究で構築されたモデルによってin vitroデータからin vivo体内動態の予測が可能であることが明かとなれば、今後、Imipramine同様活性代謝物を持つ薬物を用いた治療において、その体内動態を解析・予測する上でも重要な指針を与えることが期待される。

Imipramineの各主要代謝物の薬物代謝研究に基づいた薬物速度論的モデルの構築に当たり、まず最初に、Imipramineとその代謝物の同時定量法を確立する必要がある。本研究の第1章では、現在までに報告されている定量法を見直し、新たに高速液体クロマトグラフィーを用いた簡便かつ精度の高い微量同時定量法を開発した結果をまとめた。これを利用して、Imipramineのラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験より、Imipramine 代謝の各代謝反応の酵素学的特徴と、それに関与しているP-450分子種についての検討を行なった(第2章)。次に、*in vitro* 実験より得られた知見を *in vivo* での薬物速度論的モデルに反映させる前段階として、遊離肝細胞を用いた代謝実験から肝ミクロソームでの代謝 kinetics および代謝反応における酵素学的特徴が細胞レベルでも再現されていることを確認した(第3章)。以上の研究結果を元に定常状態での *in vivo* 薬物速度論的モデルの構築(第4章)と非定常状態での生理学的モデルの確立およびヒトの体内動態を予測するモデルへのアニマルスケールアップを行い(第5章)、各代謝反応の酵素、細胞レベルでの性質に基づく薬物体内動態の予測が可能であるか検討を行なった。

## 第1章 Imipramineとその主要代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる微量同時定量法の検討

Imipramineの体内動態の薬物速度論的解明には、既に序論で言及したように、Imipramine本体のみだけではなく、その代謝物(DMI、2OH-IMI、2OH-DMI)の微量同時定量法を確立する必要がある。従来、三環系抗うつ薬に関する定量法は、薬効との関連から、投与薬物本体およびそれと同様な抗うつ作用を持つ脱アルキル化体のモニタリングを主眼としたものが多い。現在までに知られている定量法の主なものをまとめると以下ようになる。

### 分光蛍光分析法(Spectrophotofluorimetry)

測定試料を抽出後、酸性水溶液中の三環系抗うつ薬の蛍光強度を測定する方法である(Moody et al., 1967, 1973)。試料中にいくつかの蛍光を持つ物質が共存する場合(Imipramineの主要代謝物であるDMI、環水酸化体にもImipramineと同じ励起波長で蛍光がある)には、測定値の特異性に疑問がある。

### 同位体希釈法(Isotope-Derivative Dilution Analysis)

この方法は、測定対象三環系抗うつ薬と比活性のわかっている放射性物質を定量的に反応させ、生成物を精製してその放射活性の希釈率から定量するものである。DMI(Hammer & Brodie, 1967)、Nortriptyline(Maguire et al., 1976)、Chlomipramine(Carnis et al., 1976)などの三環系抗うつ薬に関してその応用例が報告されているが、反応生成物をTLCによって、精製するために時間がかかり、またその選択性はTLC分離条件に制限されるため、分離能、迅速性及び簡便性に問題がある。

### 薄層クロマトグラフィー—デンシトメトリー法(Thin-Layer Chromatography-Densitometry)

測定試料をTLCで展開後、発色試薬で呈色し、分別定量する方法であり、ImipramineあるいはAmitriptyline(Breyer et al., 1976)、ImipramineとDMI(Fenimore et al., 1977)、AmitriptylineとNortriptyline(Faber et al., 1974; Haefelfinger, 1978)の定量法が報告されている。前述の同位体希釈

法同様、定量精度は主にTLCによる分離精度に依存している。

#### ガスクロマトグラフィー(Gas Chromatography)

Imipramineとその代謝物を選択的に抽出して定量する方法 (Weder & Bickel, 1968)、複数の内部標準物質を用いたAmitriptyline、Nortriptylineの同時定量法(Burch et al., 1979)、誘導体を生成して2級アミンを定量する方法 (Ervik et al., 1970)などが報告されている。これらの方法では、試料の前処理が繁雑であり、またその応用範囲は化合物の安定性、反応の選択性から限定される。

#### 高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography)

脂溶性の高い三環系抗うつ薬のHPLCによる定量法は、順相カラムを用いた有機溶媒を移動相とした方法が多く報告されている(Mellstrom & Tybring, 1977; Knox & Jurand, 1974; Greving et al., 1979; Brodie et al., 1977; Vandemark et al., 1978; Detaevernier et al., 1976)。対象化合物は3級アミンの三環系抗うつ薬とその脱アルキル化代謝物を同時定量するものであり、試料の前処理が必要でなく、また、分離選択能、簡便性に関して上述の定量法に比べ最も優れている。

ここに挙げた定量法のうち、特に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるものは、広範囲な三環系抗うつ薬の簡便なモニターリングの手段として、いくつかの三環系抗うつ薬が併用された場合の分離定量に適している。しかし、三環系抗うつ薬の代謝物を含めた体内機序を *in vitro* および *in vivo* 実験より詳細に調べるためには、環水酸化代謝物を含めた迅速かつ簡便な同時定量法が必要となる。前述した従来の順相系カラムを用いたHPLC法では、その環水酸化体に対する分離能・選択性が低く、これらの活性水酸化代謝物を同時定量する事が不可能であった。また、一般に、対象化合物の分離選択性に優れている逆相系のHPLCでは、脂溶性有機アミン化合物である三環系抗うつ薬の固定相への吸着が著しく、ピークの対称性、分離能が劣るため、微量定量には不適当であることが知られている(Sokolowski & Wahlund, 1980)。最近、この逆相系カラムの固定相への吸着性を改善する目的で、カウンターイオン試薬 (長鎖アルキルスルホン酸ナトリウム) を中～酸性移動相中に添

加し、薬物及び代謝物とイオンペアー相を形成させる理論(Bidlingmeyer, 1979)に基づいて分離定量を行なう方法が開発され、Amitriptyline および Nortriptyline の光学異性体の環水酸化代謝物の分離定量(Suckow & Cooper, 1982)、Imipramine とその主要代謝物の分離定量に対する応用例が報告された(Proelss et al., 1978; Lohmann et al., 1978; Suckow & Cooper, 1981)。しかし、この方法は、薬物に対する選択性、定量感度の点で問題はないが、カウンターイオン試薬が高価な上、カラムの耐久性に著しく影響を与える。また順相カラムの条件を用いてImipramineとその2位水酸化体およびDMIの同時定量法が報告されている(Sutfin & Jusko, 1979)が、1サンプルの定量時間に20分以上かかる。以上のことからこれらの方法は、多数の検体を処理する定量法には適当ではない。そこで今回、Sutfinらの用いた移動相の組成に検討を加え、多くの脂溶性化合物のHPLCによる定量に用いられているシリカゲル順相系カラムを用いて、安価で簡便かつ迅速な微量同時定量法を確立し、これまで報告された方法と比較検討を行なった。

## 1-1 移動相の組成および抽出条件とクロマトグラム

HPLC条件の検討にあたり、まず、Imipramineおよびその代謝物のUV吸収スペクトルを測定した。各薬物の吸収極大は、254 nm にあるが、低波長側 (<230nm) でより大きなUV吸収があった。しかし、目的とするHPLC系が順相であり、移動相として有機溶媒を基本組成としているため、これらの溶媒吸収カットオフ波長 (230 nm) 以下での測定は不可能であることから、254 nm を最適測定波長として、以下の検討を行なった。

HPLC移動相の基本組成は、前述の順相系での定量条件として最も利用されているメタノールおよびアセトニトリルの混合溶媒とした。混合比は、アセトニトリルの内容量が大きいほど各ピークの理論段数の上昇が認められたが、一方、メタノール量が減少するのに従い、環水酸化体の理論段数が低下した。今回定量条件の検討に用いられたシリカゲルカラム(Merck社製、SI-60、5  $\mu$  m)では(Acetonitril : Methanol)の混合比が 7:1 で、Imipramineおよび他の全ての代謝物に対し満足できる理論段数を与えた。三環系抗うつ薬の場合、有機溶媒のみの移動相では逆相系カラムの場合と同様、シリカゲル固定層に対する吸着性が強いことから、薬物および代謝物のピークがテーリングを起こし非対称性(Asymmetry Factor; ASF)が著しく高く、分離能の低下の要因となる。このASF上昇の改善として、移動相中へ塩基を添加することで、測定対象化合物の固定層への吸着を競合的に阻害し、溶離を早める方法が採用されている(Greving et al., 1979; Detaevernier et al., 1976)。そこで、この報告をもとに、今回採用した有機溶媒に濃度を変えて、塩基 (アンモニウムイオン) を添加し、各ピークの保持時間(Retention time:  $t_R$ )、ASF に与える影響を調べた。

### [1] 移動相の検討結果

Figure 1-1 には、アンモニア濃度とImipramineとその主要代謝物および内部標準物質 (Nortriptyline) 各ピークの保持時間およびASFの関係を示した。この結果から移動相中のアンモニア濃度の上昇とともに、 $t_R$ の減少とASFの改善が認められたが、アンモニア濃度が3% (v/v)

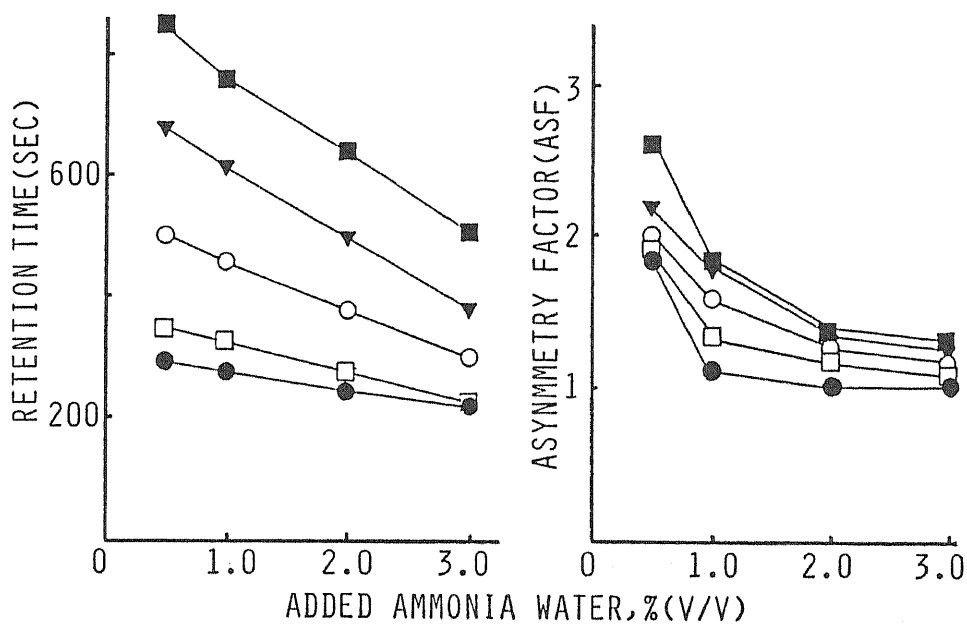


Figure 1-1

RETENTION TIME AND PEAK ASYMMETRY OF IMIPRAMINE AND ITS METABOLITES IN THE PRESENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF AMMONIUM IN THE EFFLUENT.

Eluent: 28 % Ammonia water in 7:3 acetonitrile-methanol.

Solid phase: Hiber SI-60, 5  $\mu$ M.

Samples: ●, Imipramine (500 ng); □, 2-hydroxyimipramine (500 ng); ○, nortriptyline [I.S.] (125 ng); ▼, desipramine (500 ng); ■, 2-hydroxy-desipramine (500 ng).

では、Imipramineと2OH-IMIの分離が低下した。これらの検討結果より、HPLC移動相の基本組成は、Acetonitrile:Methanol = 7:1 + 28 % Ammonia Water 2.0 % (v/v) として、以下の抽出条件の検討を行なった。

## [2] 抽出条件の検討結果

ImipramineやAmitriptylineなどの三環系抗うつ薬の主要代謝物の生体試料（血液、肝小胞体サスペンション、臓器ホモジネートなど）からの抽出溶媒として、主に、1. 5 % イソアミルアルコール含有ヘプタン (Suckow & Cooper, 1982)、1 % イソアミルアルコール含有ヘキサン (Vandemark et al., 1978; Proelss et al., 1978; Lohmann et al., 1978)、エーテル (Mellstrom & Tybring, 1977; Brodie et al., 1977; Suckow & Cooper, 1981) を用いた抽出例が報告されている。しかし今回は、比較的極性の高い環水酸化代謝物の同時定量を目的としているため、抽出溶媒として極性が高く、水の溶解度が高い有機溶媒ほどこれら環水酸化代謝物に対する抽出率が高くなることが期待される。そこで、上述の抽出溶媒に加えて、比較的極性が高く、水の溶解度が大きな酢酸エチル (Table 1-1 参照) を用いた場合の抽出率を比較検討した。

Table 1-1 今回比較検討した抽出溶媒の極性および水の溶解度

| 抽出溶媒     | 極性パラメータ値 | 水の溶解度 |
|----------|----------|-------|
| n-ヘプタン   | 0.2      | 0.010 |
| n-ヘキサン   | 0.1      | 0.010 |
| ジエチルエーテル | 2.8      | 1.3   |
| 酢酸エチル    | 4.4      | 9.8   |

\* 極性パラメータは文献 (波多野ら(p.10~12, 1985)) より転載。大きい値ほど極性が高い。

\* 水への溶解度は20℃での溶解度 (w%) を示した。

Table 1-2

RECOVERY AND ITS REPRODUCIBILITY OF IMIPRAMINE  
AND ITS METABOLITES EXTRACTED BY USING DIFFERENT  
ORGANIC SOLUTIONS FROM 0.3 ML ALIQUOTS  
OF RAT BLOOD

| ORGANIC<br>SOLUTION | COMPOUNDS <sup>a</sup>                             |                           |                           |                           |
|---------------------|----------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                     | IMI                                                | 2OH-IMI                   | DMI                       | 2OH-DMI                   |
| A                   | 79.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup><br>(2.74) <sup>c</sup> | 51.5 $\pm$ 6.6<br>(25.8)  | 69.1 $\pm$ 5.9<br>(17.0)  | 22.6 $\pm$ 4.3<br>(38.3)  |
| B                   | 59.1 $\pm$ 1.96<br>(3.32)                          | 27.1 $\pm$ 3.91<br>(14.4) | 11.4 $\pm$ 1.44<br>(12.7) | 57.9 $\pm$ 10.4<br>(18.0) |
| C                   | 86.8 $\pm$ 4.25<br>(4.89)                          | 36.2 $\pm$ 4.04<br>(11.2) | 57.6 $\pm$ 5.65<br>(9.81) | 78.3 $\pm$ 11.6<br>(14.8) |
| D                   | 81.8 $\pm$ 0.5<br>(1.20)                           | 88.3 $\pm$ 0.8<br>(1.83)  | 90.2 $\pm$ 3.1<br>(6.77)  | 91.5 $\pm$ 2.7<br>(5.82)  |

Organic solution;

A;1.5 % isoamylalchol in n-heptane

B;1.0 % isoamylalchol in n-heptane

C;Diethylether

D;Ethylacetate

<sup>a</sup> Abbreviations used in the table are as follows;  
IMI, imipramine;2OH-IMI, 2-hydroxyimipramine;  
DMI, desipramine;2OH-DMI, 2-hydroxydesipramine.

<sup>b</sup> Data represent Mean $\pm$ S.E. (n=3).

<sup>c</sup> Data in parenthesis represent C.V.  
(coefficient of variation, %) values.

これらの有機溶媒を用いて抽出率を調べた結果を Table 1 - 2 に示した。酢酸エチルを除く各抽出溶媒では、特に 2 OH - IMI と DMI に対する抽出率が悪く、また、1. 5 % イソアミルアルコール含有ヘプタンは、2 OH - DMI の抽出率および抽出再現性 (C.V.) を著しく低下させた。したがって、環水酸化体を含めた Imipramine の同時定量法の抽出溶媒としては、酢酸エチルが最適であることが明らかとなった。また三環系抗うつ薬の生体試料からのアルカリ抽出では、抽出サンプルの液性として、NaOH による強アルカリ性 (Mellstrom & Tybring, 1977; Brodie et al., 1977; Suckow & Cooper, 1982; Proelss et al., 1978; Lohmann et al., 1978) と炭酸緩衝液による pH 10 前後での抽出条件 (Suckow & Cooper, 1981) が報告されている。本研究の検討から、環水酸化体の抽出率は顕著にサンプルの液性によって影響を受け、NaOH でのアルカリ条件下では、炭酸緩衝液での pH 10 前後の抽出率に比べ約 1 / 3 程度に低下することが明らかとなった。これらの検討結果より、本研究では、抽出対象試料の液性を炭酸緩衝液によって pH 10 のアルカリ性とし、酢酸エチルによって抽出する方法を採用した。

### [3] 既存の HPLC 定量法との比較

これまでの検討から決定した抽出、定量条件に基づいて、生体試料から Imipramine と主要代謝物 (2 OH - IMI, DMI, 2 OH - DMI) を抽出した HPLC クロマトグラムを Figure 1 - 2 に示した。生体試料は、ラット血液 0.3 ml に Imipramine とその主要代謝物各 500 ng を添加したものをを用いた。また、同図には生体成分を含まない抽出クロマトグラムと化合物を含まないブランク試料のクロマトグラムを併せて示したが、これらのクロマトグラムの比較から明らかなように、いずれの化合物ピークに対して、生体成分からの妨害ピークは認められず、また、生体成分由来のフロントピークの化合物ピークへの影響も認められなかった。同時に、各化合物間での十分な分離能および各ピークの良い対称性が確認された。1 検体当りに要する溶離時間は 7 ~ 8 分間であり、現在までに報告されている環水酸化代謝物を含めた同時定量法 (Suckow & Cooper, 1981; Sutfin & Jusko, 1979) に比べ分析時間が約 1 / 3 程度短縮され、より迅速な定量法となった。また、カラム 1 本当たり約 1000 検体程度

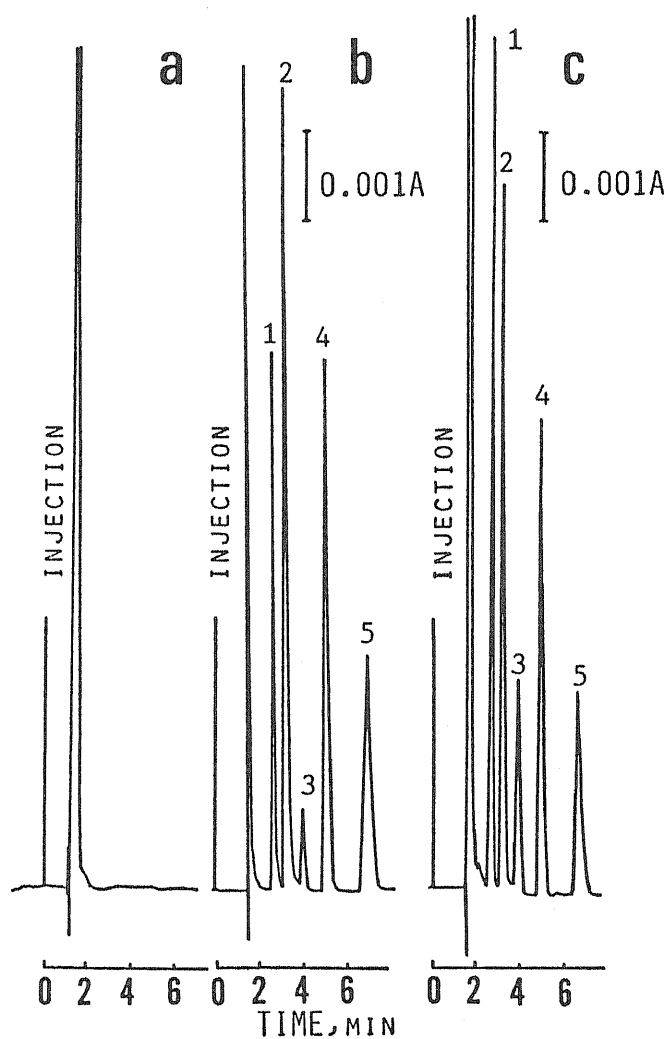


Figure 1-2

### SAMPLE CHROMATOGRAMS OF EXTRACTS.

The drugs labeled in the figures (b and c) are: imipramine (1), 2-hydroxyimipramine (2), the internal standard, nortriptyline (3), desipramine (4) and 2-hydroxydesipramine (5).

(a) drug-free 0.3 ml blood without internal standard.

(b) standard mixture containing 500 ng each drug.

(c) 0.3 ml spiked blood extract containing 500 ng each drug.

の定量が可能である。

Table 1 - 3 には、今回確立された H P L C 定量条件に基づく Imipramine およびその代謝物のクロマトグラムの各ピークに対して、クロマトグラム解析パラメータ (Kirkland, 1971) を計算し、既存のカウンターイオンを用いた定量法 (Table 1 - 3 の "方法 A" は Suckow & Cooper (1981) "方法 B" は Proelss et al. (1978)) のクロマトグラムより計算した) の値と、カラム効率および分離能に関して比較検討を行なった結果を示した。今回比較対象とした報告 A および B の方法は、逆相条件でイオンペアー技術を用いたものであり、化合物の溶出順序は、極性の高い化合物 (環水酸化体) ほど早く溶出する。良いコンディションでの  $k'$  値 ([2]) は 4 程度以下と考えられ、今回の方法と報告 A では、ほぼ全ての化合物でこの条件を満たしているが、報告 B では、Imipramine の  $k'$  値 ([3]) が大きく、固定相への吸着傾向が認められ、このことが非対称性 (ASF) の増加 ([3]) と理論段数 (N) の低下 ([4]) を引き起こしていると思われる。クロマトグラムピークの非対称性に関しては、全ての例で 1 を越えており、若干のテーリング傾向がみられたが、今回の方法では、その程度は 30 % 程度であり、他の方法と比べても良い対称性が認められた。クロマト理論における理論段数 (N; [4]) とは、クロマトグラムピークの理想溶出曲線であるガウス型曲線のバンドの拡がりの程度を表わすパラメータであり、この値が大きいほど拡がりが狭く鋭いピークであることを意味している (すなわちカラム内外での化合物の分散が小さい)。また、この値は一般に、カラムの長さが長いほど大きな値となるので、カラム本来の分離効率を異なる長さのカラム同士で比較する場合には、この値でそのカラムの長さを割った値である理論段相当高 (H; [5]) で比較検討されている。今回の方法では、特に Imipramine に対する N 値が大きく、報告 A および B での値の約 2 倍の値であった。また他の化合物に対する値も報告 A, B に比べて同程度以上であった。H 値は、高性能のカラムの条件である 0.01 - 0.2 mm の範囲 (原 & 辻, 1979) を満たしており、特に Imipramine、2 O H - I M I、I. S. (内部標準物質; Nortriptyline) では他の方法に比べ約 2 倍のカラム効率を示している ([5])。化合物間の分離能 ( $R_s$ ) は 2 つのピークの保持時間の差とバンド幅で計算される ([6])。ピークの溶出曲線が理想的なガウス型曲線であると仮定した場合、 $R_s$

Table 1-3 クロマトグラム解析パラメータ(Kirkland, 1971)の比較  
 <1>各方法の使用カラム、分離モード、移動相の移動速度

|             | 今回の方法 | 報告 A                           | 報告 B |
|-------------|-------|--------------------------------|------|
| 使用カラム       | SI-60 | $\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> |      |
| 分離モード       | 順相    | 逆相・イオンペア                       |      |
| 移動速度 (cm/s) | 0.260 | 0.25                           | 0.20 |

<2>各化合物の保持能(Capacity ratio: k')の比較

| 化合物                 | 今回の方法 | 報告 A | 報告 B |
|---------------------|-------|------|------|
| IMI                 | 0.69  | 5.21 | 3.59 |
| 2OH-IMI             | 1.10  | 1.52 | -    |
| I.S.(Nortriptyline) | 1.56  | 2.52 | 3.09 |
| DMI                 | 2.30  | 4.28 | 2.55 |
| 2OH-DMI             | 4.38  | 1.40 | -    |

<3>各化合物ピークの非対称性(Asymmetry Factor; ASF)の比較

| 化合物                 | 今回の方法 | 報告 A | 報告 B |
|---------------------|-------|------|------|
| IMI                 | 1.10  | 1.10 | 1.50 |
| 2OH-IMI             | 1.25  | 1.00 | -    |
| I.S.(Nortriptyline) | 1.25  | 1.50 | 1.25 |
| DMI                 | 1.20  | 1.33 | 1.38 |
| 2OH-DMI             | 1.33  | 1.10 | -    |

<4>各化合物の理論段数(Number of theoretical plates: N)の比較

| 化合物                 | 今回の方法 | 報告 A | 報告 B |
|---------------------|-------|------|------|
| IMI                 | 4000  | 2000 | 1400 |
| 2OH-IMI             | 1600  | 2100 | -    |
| I.S.(Nortriptyline) | 3600  | 1600 | 1800 |
| DMI                 | 3800  | 2800 | 2200 |
| 2OH-DMI             | 3000  | 4100 | -    |

<5>各化合物の理論段相当高(Height equivalent to a theoretical plate, HETP; H mm)

| 化合物                 | 今回の方法 | 報告 A | 報告 B |
|---------------------|-------|------|------|
| IMI                 | .0619 | .126 | .184 |
| 2OH-IMI             | .1590 | .117 | -    |
| I.S.(Nortriptyline) | .0687 | .153 | .142 |
| DMI                 | .0668 | .089 | .112 |
| 2OH-DMI             | .0829 | .061 | -    |

<6>各ピーク間の分離能(Resolution: Rs)

| 化合物     | 今回の方法 | 化合物     | 報告 A  | 化合物 | 報告 B  |
|---------|-------|---------|-------|-----|-------|
| IMI     | 1.89  | 2OH-IMI | 0.386 | DMI | 1.30  |
| 2OH-IMI | 2.39  | 2OH-DMI | 2.84  | NT  | 0.872 |
| NT      | 3.55  | NT      | 4.37  | IMI |       |
| DMI     | 3.75  | DMI     | 1.98  |     |       |
| 2OH-DMI |       | IMI     |       |     |       |

値が1の時は2つのバンドの重なりは $4\sigma$ であり、1.5であれば、十分な分離であると報告されている（重なりは1%以下、 $6\sigma$ ）。この観点から各方法の分離状態を検討すると今回の方法での各ピークの分離状態は十分であるのに対し、報告Aでは、2OH-IMIと2OH-DMIの分離が不十分であり、また、報告Bでは Nortriptyline と Imipramine 間のピークの重なりが認められる。これらの原因として、報告Aでは両者の $k'$ 値の近接と2OH-IMIの理論段数の低さに起因すると思われる、また、報告Bでは $k'$ 値の近接とDMIピークのテーリング（ASF値が大きい）が原因と考えられる。

以上の検討結果より、今回確立した方法は、目的とする化合物分離に関するカラム効率を決定する2つの大きな要因であるピーク位置の規定パラメータ（ $k'$ 、 $R_s$ ）とクロマトグラムピークの形状を規定するパラメータ（ASF、 $N$ あるいは $H$ ）において、十分満足する値を示し、他のカウンターイオンを用いた逆相条件での分離法に比べ優れており、迅速かつ簡便な環水酸化体を含めた同時定量法のHPLC条件としてきわめて有用であると判断された。

## 1-2 定量精度

定量精度は、一般に、(i) 抽出検量線の直線性(Linearity) (i i) 抽出再現性(Reproducibility) (i i i) 定量限界(Sensitivity) (i V) 抽出(回収)率(Recovery)などの観点から評価される。そこで、これまでの検討より確立された抽出法及びHPLC条件を用いて、生体試料中のImipramineとその主要代謝物を定量する際の定量精度について検討を行なった。

### [実験結果]

Table 1-4 には、抽出検量線に関して以降の *in vitro* および *in vivo* 実験に必要と思われる濃度範囲 (20 - 2000 ng/ml) での直線性を調べた結果を示した。その結果、各化合物に関して P.H.R. (Peak-Height-Ratio) とサンプル中の薬物量の間に良い相関性 ( $r > 0.999$ ) が確認された。また、定量過程の再現性の指標として、化合物濃度を変えた時の P.H.R. の C.V. 値 (Coefficient of Variation) を Table 1-5 に示した。この表からも明らかなように、C.V. 値は今回調べた濃度範囲で全ての化合物に関してほぼ 10% 以下であった。定量限界は、ピークの高さがベースラインの乱れ (Noise) の約 3 倍以上であるとした場合、Imipramine と 2 OH-IMI で約 3-4 ng、また、DMI と 2 OH-DMI では約 6-10 ng の薬物量を十分定量する事が可能であることがわかった。また、Table 1-6 には、各薬物濃度を *in vitro*、*in vivo* 実験で問題となる範囲内 (50~3200 ng/ml) で変えて、抽出率を検討した結果を示した。各化合物の抽出率は全濃度範囲でほぼ一定であり、90% 前後の値であった。このことから抽出率が高くその再現性がきわめて良いことが定量精度に反映していると考えられる。

Table 1-4

LINEAR REGRESSION DATA FOR CALIBRATION CURVES OF  
IMIPRAMINE AND ITS METABOLITES

| Compounds       | Slope    | y-Intercept <sup>a</sup> | r <sup>b</sup> |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|
| Imipramine      | 0.00513  | -0.0226                  | 0.9998         |
| 2OH-imipramine  | 0.00230  | -0.0224                  | 0.9995         |
| Desipramine     | 0.00165  | -0.0697                  | 0.9999         |
| 2OH-desipramine | 0.000727 | -0.0126                  | 0.9993         |

<sup>a</sup> Peak-height ratios are plotted on the y-axis,  
drug concentrations in ng/ml on the x-axis.

<sup>b</sup> Correlation coefficient.

Table 1-5

REPRODUCIBILITY OF THE ASSAY OF IMIPRAMINE AND  
ITS METABOLITES

| ng/ml                   | Coefficient of Variation, % |         |      |         |
|-------------------------|-----------------------------|---------|------|---------|
|                         | IMI <sup>a</sup>            | 2OH-IMI | DMI  | 2OH-DMI |
| 1000(1600) <sup>b</sup> | 3.19 <sup>c</sup>           | 5.83    | 2.74 | 3.04    |
| 600( 960)               | 2.47                        | 5.73    | 2.93 | 9.44    |
| 360( 576)               | 1.09                        | 12.7    | 2.79 | 11.7    |
| 216( 346)               | 6.61                        | 4.41    | 1.62 | 4.67    |
| 130( 207)               | 7.85                        | 6.67    | 4.04 | 6.84    |

<sup>a</sup> Abbreviations used in the table are as follows;  
IMI, imipramine; 2OH-IMI, 2-hydroxyimipramine; DMI,  
desipramine; 2OH-DMI, 2-hydroxydesipramine.

<sup>b</sup> Values in the parenthesis represent the concentrations of 2-hydroxydesipramine.

<sup>c</sup> N = 4.

Table 1-6

RECOVERY OF IMIPRAMINE AND ITS METABOLITES FROM  
0.3 ML ALIQUOTS OF RAT BLOOD AT THEIR VARIOUS  
CONCENTRATIONS

| Conc.<br>(ng/ml) | Compounds <sup>a</sup> |           |           |           |
|------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                  | IMI                    | 2OH-IMI   | DMI       | 2OH-DMI   |
| 50               | 90.6±1.1 <sup>b</sup>  | 95.6±2.4  | 96.3±4.5  | 90.0±5.6  |
| 100              | 90.1±3.9               | 94.3±2.2  | 90.3±5.9  | 91.1±4.3  |
| 200              | 92.0±2.2               | 96.3±4.1  | 93.5±4.8  | 93.3±2.9  |
| 400              | 91.9±6.1               | 92.7±5.8  | 94.1±6.7  | 95.0±2.7  |
| 800              | 94.6±5.0               | 96.8±10.1 | 93.3±8.7  | 95.6±6.6  |
| 1600             | 96.1±7.0               | 94.2±8.2  | 92.3±8.4  | 96.1±5.0  |
| 3200             | 94.9±4.9               | 95.1±7.9  | 91.1±12.6 | 94.4±11.1 |

<sup>a</sup> Abbreviations used in the table are as follows;  
IMI, imipramine; 2OH-IMI, 2-hydroxyimipramine;  
DMI, desipramine; 2OH-DMI, 2-hydroxydesipramine.

<sup>b</sup> Data represent mean values for recovery (%) with  
S.E. (n = 3).

### 1-3 小括

本章では、従来報告されている Imipramine とその脱アルキル化体 DMI の順相での HPLC 条件を改良し、高価なカウンターイオン試薬を使用しない環水酸化代謝物を含めた微量同時定量法を確立した。

抽出法に対する改良は、抽出溶媒に、極性が高く、水の溶解度が大きな酢酸エチルを採用したことによって、特に環水酸化代謝物の抽出率が顕著に向上した (Table 1-2 参照)。カウンターイオン試薬を用いた逆相条件での同時定量法である Suckow らの方法 (1981) に比べ、2 OH-IMI では 10%、2 OH-DMI では 30% 以上の抽出率の向上が認められた。また、定量精度に関して Suckow らの方法 (1981) と比較すると、全ての点で同程度以上の性能を示している (Table 1-3 参照)。また、本定量法を検討する際に参考とした Sutfine らの方法 (1979) に比べ、分析時間が 3 分の 1 に短縮され、多検体の定量法としての簡便性および迅速性の点で改良された。

以上のように、本研究で確立した Imipramine とその主要代謝物 (DMI、2 OH-IMI、2 OH-DMI) の同時定量法は、in vitro および in vivo における代謝実験を行なう上でこれまでの報告に比べ優れた方法であると結論できた。したがって、本定量法を用いることにより、Imipramine 体内機序に関するより詳細な情報が得られることが期待された。

## 第2章 Imipramine代謝に関与する P-450 分子種の解明

肝臓における代謝酵素活性は、投与された薬物の生体内運命を左右する最も重要な要因の一つである。したがって、ある薬物の体内動態を特徴づける酵素反応の性質を明らかにすることは、その薬物が臨床的に用いられる場合の投与指針や副作用発現の回避という観点から重要である。多くの種類の酵素が薬物代謝に関与しているが、中でも、第一相反応 (Phase I Reaction) を触媒する Cytochrome P-450 (P-450) や、第二相反応 (Phase II Reaction) を触媒する抱合酵素 (グルクロン酸抱合酵素、硫酸抱合酵素、グルタチオン抱合酵素など) が良く知られている。最近、生化学的・分子生物学的実験技術の向上とともに、これらの薬物代謝酵素には、分子多様性 (Multiplicity) が存在することが明らかとなってきた。特に、本研究において対象としている P-450 に関しては、Gonzalez の総論 (1989) に記述されているように、分子種構成や発生の遺伝的な解明が進んでいる。

酵素分子種は同一機構によって反応を触媒するが、分子種ごとにその基質特異性は一部オーバーラップするものの顕著な差があり、類似のアミノ酸配列と補欠分子族を有し、また、生化学的、物理化学的性質および誘導剤に対する感受性に差が認められている。したがって、ある薬物の代謝反応に関与する代謝酵素の性質を明らかにすることは、その反応形式の同定だけでは不十分であり、反応を触媒している分子種を特定することによって初めて臨床上有意義な情報になると考えられる。

Imipramine はヒトおよびラット肝臓において主に、序論 Scheme 1 で示した代謝経路で代謝消失することが知られている。主要代謝経路のうち環2位水酸化反応と脱メチル化反応は、P-450 による Phase I 反応であり、環2位水酸化代謝物の抱合反応はそのほとんどがグルクロニルトランスフェラーゼ (GT) によるグルクロン酸抱合の Phase II 反応であることが報告されている (Bickel & Weder, 1968; Sutfin et al., 1984; Dingell et al., 1963; von Bahr & Orrenius, 1971)。Imipramine の2つの主要代謝経路である環2位水酸化反応と脱メチル化反応の速度比は、動物種によって異なり、ヒトおよびラットでは脱メチル化反応が優位であったのに対し、ラビットおよびマウスでは環2位水酸化活性が高いことが明らかにされた (Dingell et al., 1963)。また、同文献では、Imipramine をラットおよびヒ

トに投与した場合とラビットおよびマウスに投与した場合とでは、血中DMIレベルに顕著な差が認められ、前者の方がより高い血中レベルを与えた。これはそれぞれの代謝活性の種差に基づくものであると考察されている。本研究では、Imipramineの代謝反応の種差発現のメカニズムの解明を目的としてはいないが、この報告は少なくともヒトでのImipramine体内動態機序解明の詳細な検討を行なう上で、ラットをヒトのモデル動物として用いることの妥当性を支持している。これらImipramineおよびその活性代謝物DMIのヒトでの体内動態の特徴は、ImipramineおよびDMI代謝に関与するP-450分子種の性質を明らかにすることによってより明確に解明されると考えられる。

本研究は、これら酵素学的レベルの情報をin vivoの速度論的モデルに組み込むことによって、臨床的に応用範囲の広い生理学的モデルの確立を最終目的としているため、臨床上問題となる要因（被験者の性別・年齢、酵素誘導剤の影響、薬物相互作用など）の代謝反応速度に与える影響について、ラット肝ミクロソームおよび精製P-450とその抗体を用いたin vitro実験より、以下詳細な検討を行なった。

## 2-1 In vitro 代謝実験条件の確立

### [1] 代謝速度に与える $Mg^{2+}$ 濃度の影響

ラット肝ミクロソームを用いた in vitro 実験を行なうためには、いくつかの人為的な実験条件を設定しなければならない。すでに前述したように、Imipramineの場合、そのミクロソーム上の代謝形式は、ヘムタンパク質である P-450 による分子状一酸素添加反応であるため、六単糖リン酸側路 (Hexose monophosphate shunt) を利用した電子生成系 (NADPH generating system) によって電子を供給しなければならない。ミクロソーム膜を安定化することによって、この電子を効率よく P-450 に伝達する要因として2価の陽イオンが重要な役割を果たしていることが知られている (Cinti, 1982; Peters & Fouts, 1970)。そこで本研究では、二価の陽イオンのうち、最もこの効果の大きいマグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) を用いて、反応液中の  $Mg^{2+}$  濃度と Imipramine、DMI、2OH-IMI からの一次代謝物の生成速度との関係を調べた。

### [実験結果]

Figure 2-1 に示したように、Imipramineと2OH-IMIの脱メチル化速度は、 $Mg^{2+}$  濃度の増加につれ、ベル型の上昇を示した。一方、ImipramineとDMIの環2位水酸化反応速度は、 $Mg^{2+}$  濃度に依存せずほぼ一定であった。また、この  $Mg^{2+}$  依存パターンは同一基質でも代謝経路 (ImipramineからのDMIと2OH-IMI) によって異なること (代謝経路依存性があること)、および、2つの対になる平行代謝経路間 (環2位水酸化反応と脱メチル化反応) で同じ依存性を示すことが明らかとなった。

### [考察]

Cinti (1982) によれば、代謝活性の  $Mg^{2+}$  濃度依存性はそのパターンにより基質によっておよそ三つのグループに分けられる (Cinti (1982) より転載した次ページ図参照)。

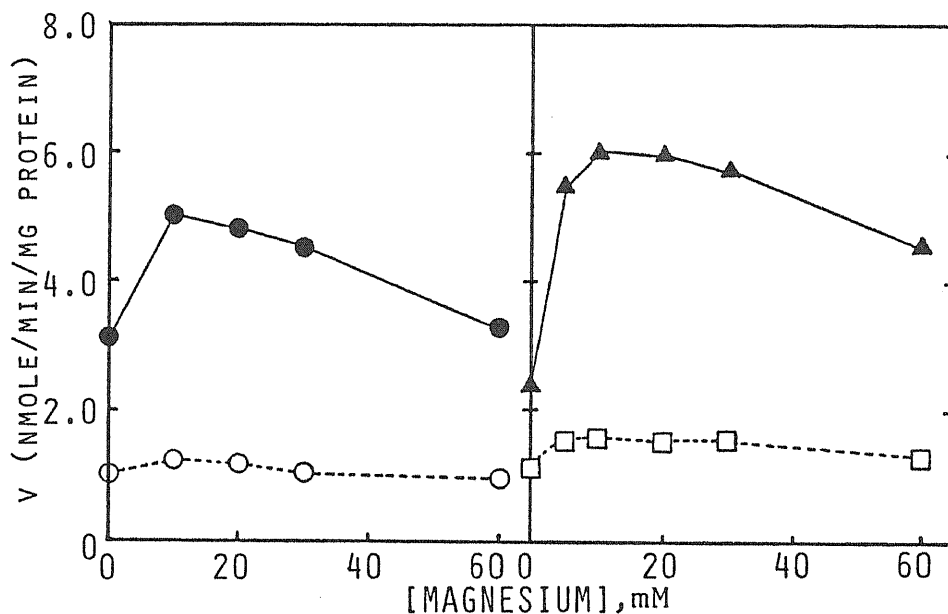
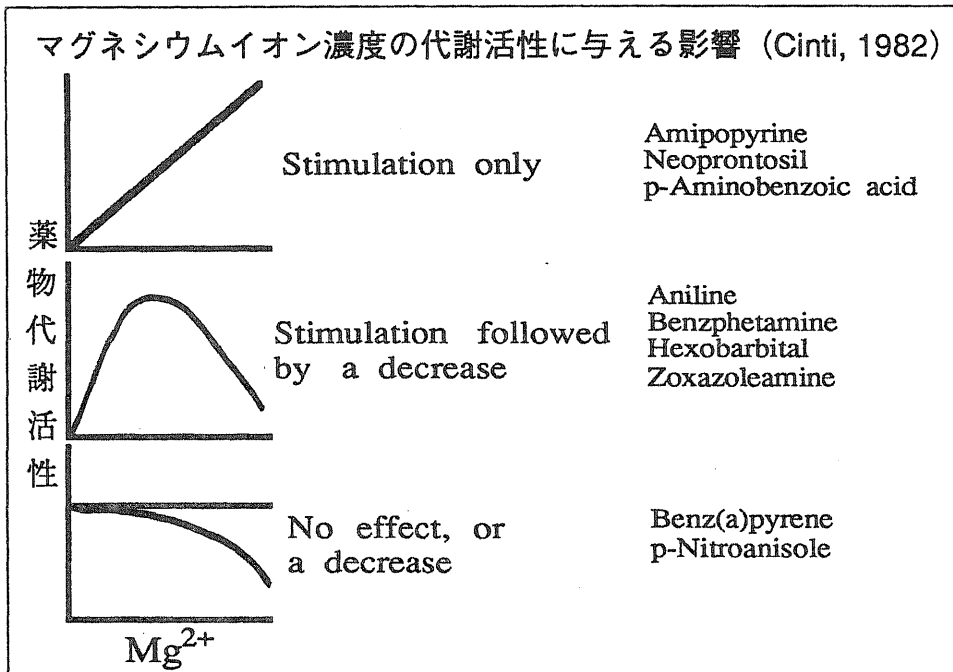


Figure 2-1

EFFECT OF EXOGENOUS MAGNESIUM CONCENTRATION ON METABOLIC VELOCITIES OF IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION (LEFT PANEL; ●), 2-HYDROXYLATION (LEFT PANEL; ○), DMI 2-HYDROXYLATION (RIGHT PANEL; □) AND 2OH-IMI N-DEMETHYLATION (RIGHT PANEL; ▲).

The concentration of imipramine, DMI and 2OH-IMI were 100, 10, 50 nmole/ml, respectively.



この依存パターンがそれぞれの代謝反応に関与する P-450 分子種に依存するものかは明かではないが、本研究によって得られる Imipramine 代謝に関する P-450 分子種の検討結果は、P-450 分子種の  $Mg^{2+}$  濃度依存性についても重要な知見を与えるものと思われる。さらに、興味深いことは、脱メチル化反応活性の至適  $Mg$  濃度 (10 mM) が、報告されている (Cinti, 1982; Murdoch & Heaton, 1968) 生理的な細胞内  $Mg$  濃度 (8 mM) とよく一致しており、*in vitro* 代謝実験から得られた定量的な情報を細胞レベル以上の実験系に外挿する際には、 $Mg^{2+}$  濃度は重要なデータの一つであると考えられる。

## [2] 反応時間の検討

P-450 代謝反応は NADPH generating system 存在下、NADP あるいは NADPH の添加によって開始される。Imipramine の代謝経路のように、一次代謝物からさらに 2 次代謝物を生成する反応経路が存在する場合には、生成物である 1 次代謝物が時間とともに消失し、代謝速度を低く見積ることになり、1 次代謝物生成速度の評価には、反応時間が

大きな影響を与える可能性がある。そこでImipramine、DMI、2OH-IMIを基質（各 $10\mu\text{M}$ ）としたときの反応速度とそれぞれの代謝物の生成量の関係を調べた。

#### [実験結果]

Figure 2-2 から明らかなように、Imipramineが基質の場合には、1次代謝物の生成量は、おおよそ60秒までは線形に増加する（生成速度が一定である）ことがわかった。一方、Imipramineからの2OH-DMIの生成は30秒では定量限度以下（DMIおよび2OH-IMI生成量の5%以下）であり、ほぼ1次代謝物の生成のみに限定できたが、60秒以降では2OH-DMIの生成が顕著に増加し、また、ImipramineからのDMI、2OH-IMIの生成も頭打ちになった。このことは、これらの代謝物の生成速度とそこから2次代謝物の生成速度がほぼ等しく、定常状態となっており、もはや、2次代謝物の生成反応を無視できないと考えられる。したがって、45秒以上の反応時間で得られた1次代謝物の生成量からその生成初速度を計算した場合、反応初速度を過小評価してしまうことが明かとなった。

#### [考察]

現在までに報告されているImipramineの *in vitro* 代謝実験に関する報告の多くは、各代謝物の分離定量手段が不十分であり、2次代謝物（2OH-DMI）生成の時間推移を調べていないため、60分間ものインキュベーション時間を採用している例がある (Skett et al., 1980, 1985)。したがって、これらの実験結果に基づく考察の信頼性は著しく低いものであると考えられる。本研究では、Imipramineの逐次型反応経路において、正確な反応初速度を求めなければならないため、以下の検討では反応時間として30秒を採用した。

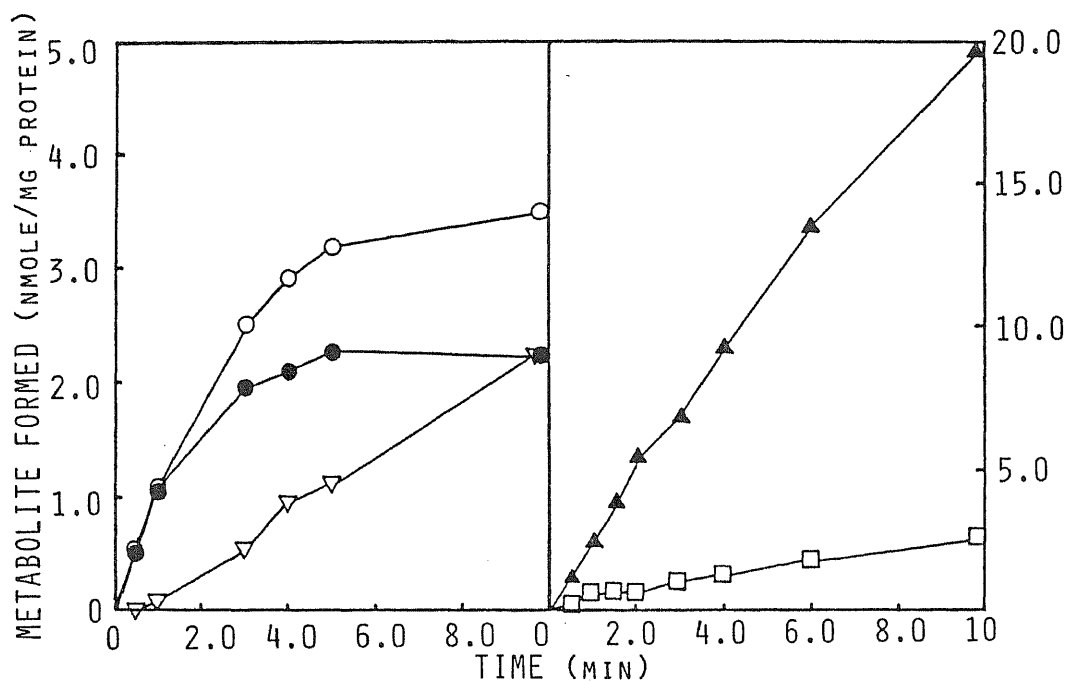


Figure 2-2

EFFECT OF INCUBATION TIME ON THE METABOLITE FORMATION FROM IMIPRAMINE (LEFT PANEL), DMI AND 2OH-IMI (RIGHT PANEL).

Key (left panel): DMI (●), 2OH-IMI (○), and 2OH-DMI (▽) formed from imipramine.

Key (right panel): 2OH-DMI formed from DMI (▲) or 2OH-IMI (□).

Each substrate concentration was 10 nmole/ml.

## 2-2 Imipramine代謝kineticsの性差および誘導剤による変化

Imipramine代謝に関与するP-450分子種を解明するため、まず、ミクロソームレベルでの代謝活性を検討した。P-450ではその分子種ごとの基質特異性はかなり緩く(今井ら、1982)、一つの代謝反応に複数の分子種が関与していることが多い。この場合、ある基質濃度[S]での代謝速度V[s]は異なる $K_{m,i}$ をもつ複数のMichelis-Menten式の和で表現される(式2-1)。

$$V[s] = \sum_{i=1}^n \frac{V_{\max,i} [s]}{K_{m,i} + [s]} \dots(2-1)$$

また一般に代謝速度と基質濃度の関係から Kinetic Parameters を算出するために用いられる Lineweaver-Burk プロットは、代謝速度が(2-1)式で表現される場合( $n>1$ )、直線とはならない。この場合 Lineweaver-Burk プロットから直接パラメータを正確に評価することは不可能である。したがって本研究では、得られた代謝速度と基質濃度の関係を直接(2-1)式にあてはめ、非線形最小自乗法(Simplex(Spendley,1962))によってパラメータを算出した。ミクロソームを用いた実験系から得られた Michaelis 定数 ( $K_m$  値) は、ミクロソーム膜への基質の非特異的な結合のため、基質とP-450が直接結合することによる基質結合スペクトル(Schenkman,1970)の解析から得られる解離定数 ( $K_s$  値) とは必ずしも一致せず、あくまでも見かけの値となる。しかし、Benz(a)pyrene (Lu et al.,1978)、Testosterone(Hyan et al.,1979)やWarfarin (Kaminsky et al.,1978)では精製された異なるP-450分子種間で再構成での $K_m$ 値が大きく異なることや、また、Biphenyl、7-EthoxyresorcinやAniline(Johnson et al.,1978)では、精製されたP-450分子種の再構成系での $K_m$ 値がミクロソームでの $K_m$ 値に極めて近い値を示した。さらに、 $\beta$ ブロッカー・Bunitrololの代謝に関して、Sudan IIIで誘導されたラット肝ミクロソームでの4位水酸化反応の $K_m$ 値 ( $907 \mu M$ ) と、誘導された主要P-450分子種であるP-450MC-1を用いた再構成実験での $K_m$ 値 ( $812 \mu M$ ) がきわめて良く一致した(仮家,1987)。したがって、ミクロソームを用いた実験系での速度論的パラメータは、その反応に関与しているP-450分子種の性質を定性的に反映していると考えられ

る。また、反応に関与しているP-450分子種の推定を行なう上では、異なる性における代謝速度論的パラメータの比較や、無処理ラット肝ミクロソームと誘導剤処理ミクロソームでのパラメータの比較から、より積極的なデータが得られると考えられる。

本研究では、無処理雌雄ラット肝ミクロソーム、誘導剤処理ラット肝ミクロソーム（Phenobarbital（PB）およびSudan III）を用いた。PBおよびSudan IIIは、肝ミクロソームのP-450分子種組成の変化を誘導する代表的な誘導剤である。Nebertらによるアミノ酸配列によるP-450分子種命名法によれば（1987）、前者によって誘導されるP-450分子種はP-450IIB1/IIB2ファミリーに分類されている（Gonzalez, 1989）。一方、後者はいわゆる3-メチルコラントレンやベンズパイレンなどの芳香族炭化水素と同じ分子種を誘導することが明かとなっており（Fujita et al., 1984）、誘導される分子種は、P-450 IA1ファミリーに属することが報告されている（Gonzalez, 1989）。本小節では、これらの肝ミクロソームを用いて、Imipramineからの1次代謝反応に関する詳細な速度論的検討を行ない、それぞれの反応に関与しているP-450分子種を推定することを目的とした。

### 〔1〕 無処理雌雄ラット肝ミクロソームでの Imipramine 代謝活性の性差

無処理雌雄ラット肝ミクロソームを用いたImipramineの *in vitro* 代謝 Kinetics の性差を調べた。

#### 〔実験結果・考察〕

Figure 2-3 および 2-4 は、基質濃度に対する代謝物生成速度の normal プロットを、また、Figure 2-5 および 2-6 にはその Lineweaver-Burk プロット（以下 LB プロット）を示した。LB プロットから明らかなように、雌ラット肝ミクロソームでの環2位水酸化反応以外の各代謝反応のLBプロットは直線とはならず、これらの代謝反応に関与するP-450分子種の複数性を示唆した。これらのデータから、Normalプロットの代謝速度を表現する最適なMichaelis-Menten式の数を、

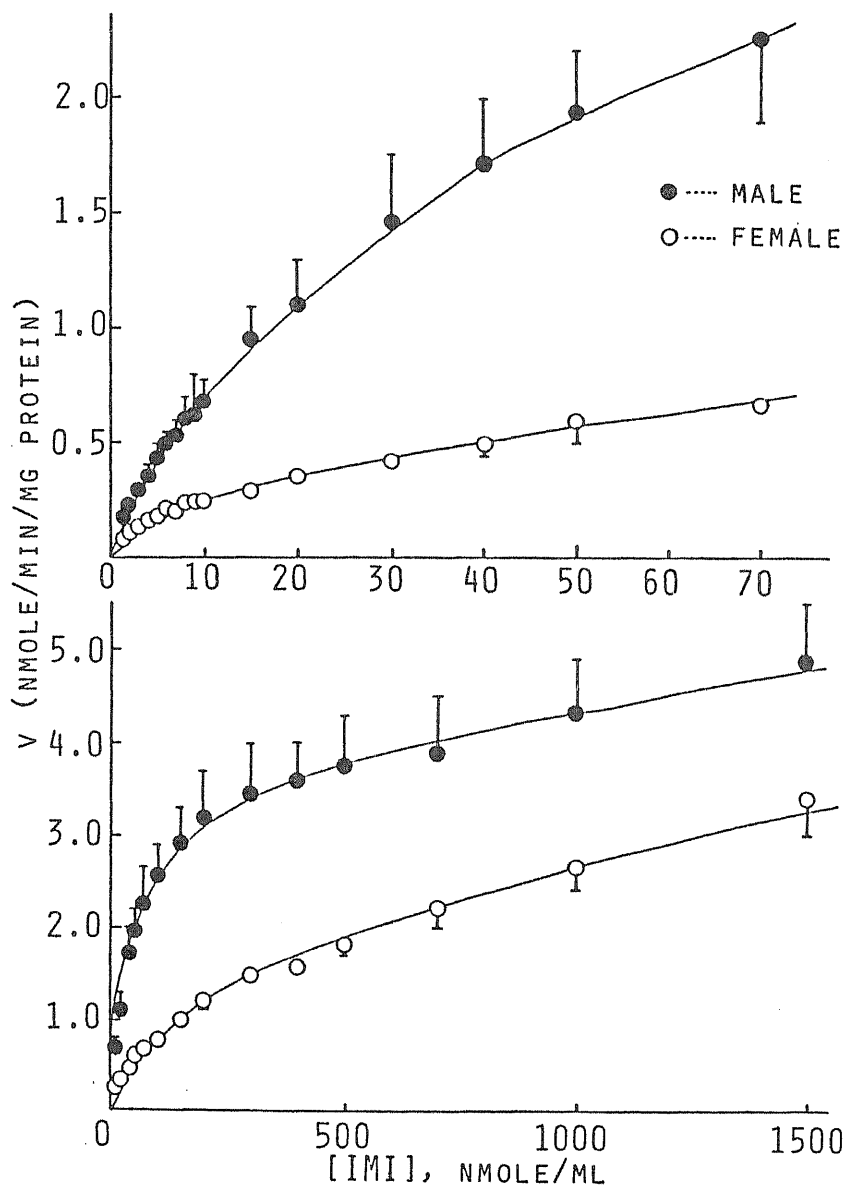


Figure 2-3

METABOLIC VELOCITIES OF IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION  
IN MALE (●) AND FEMALE (○) RAT LIVER MICROSOMES.

Each point and vertical bar represent the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

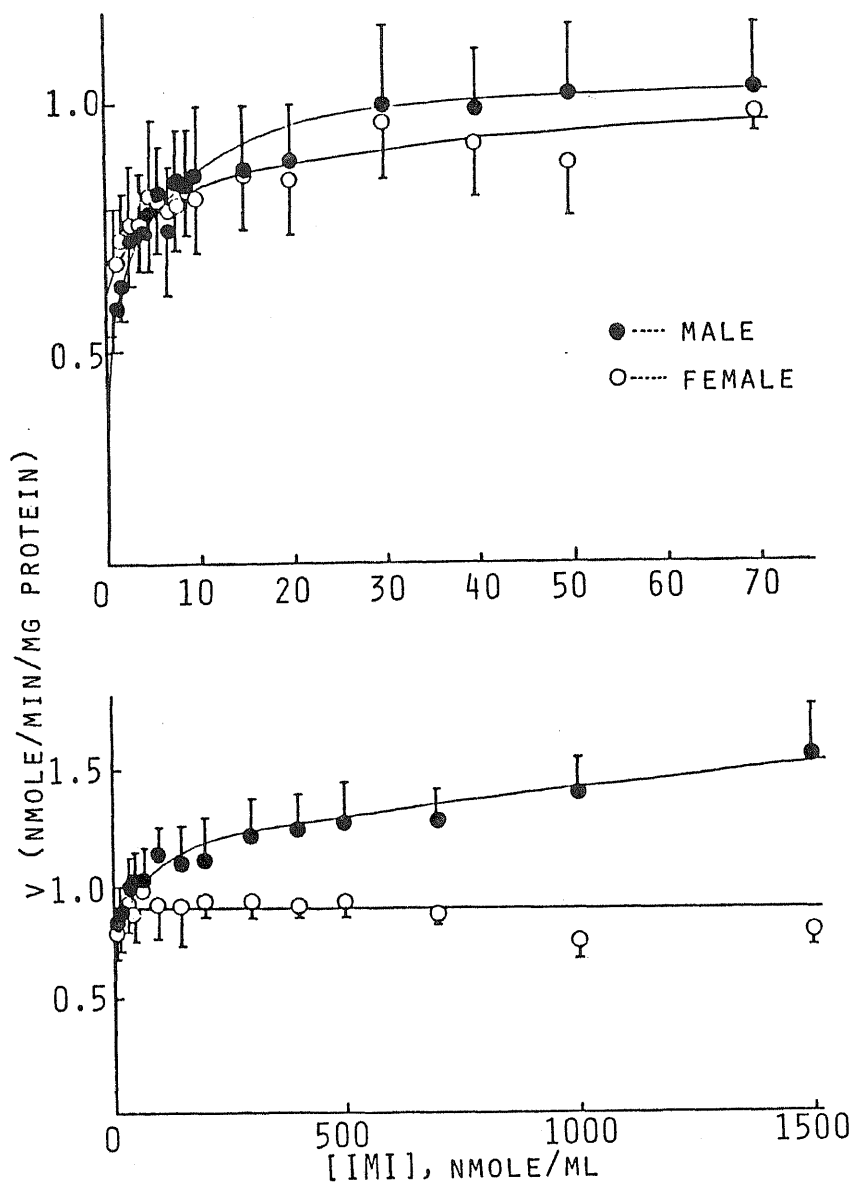


Figure 2-4

METABOLIC VELOCITIES OF IMPRAMINE 2-HYDROXYLATION  
IN MALE (●) AND FEMALE (○) RAT LIVER MICROSOMES.

Each point and vertical bar represent the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

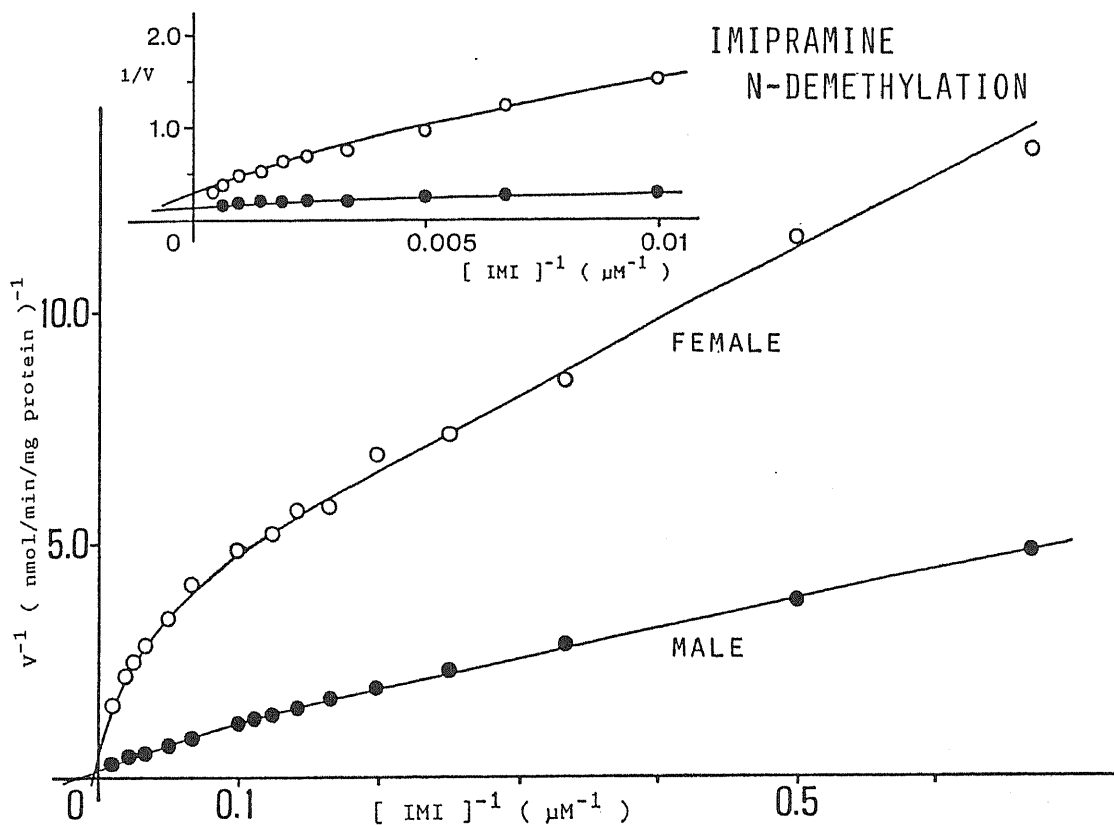


Figure 2-5

LINEWEAVER-BULK PLOT OF IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION  
IN MALE (●) AND FEMALE (○) RAT LIVER MICROSOMES.

This shows the results of one experiment typical of three.

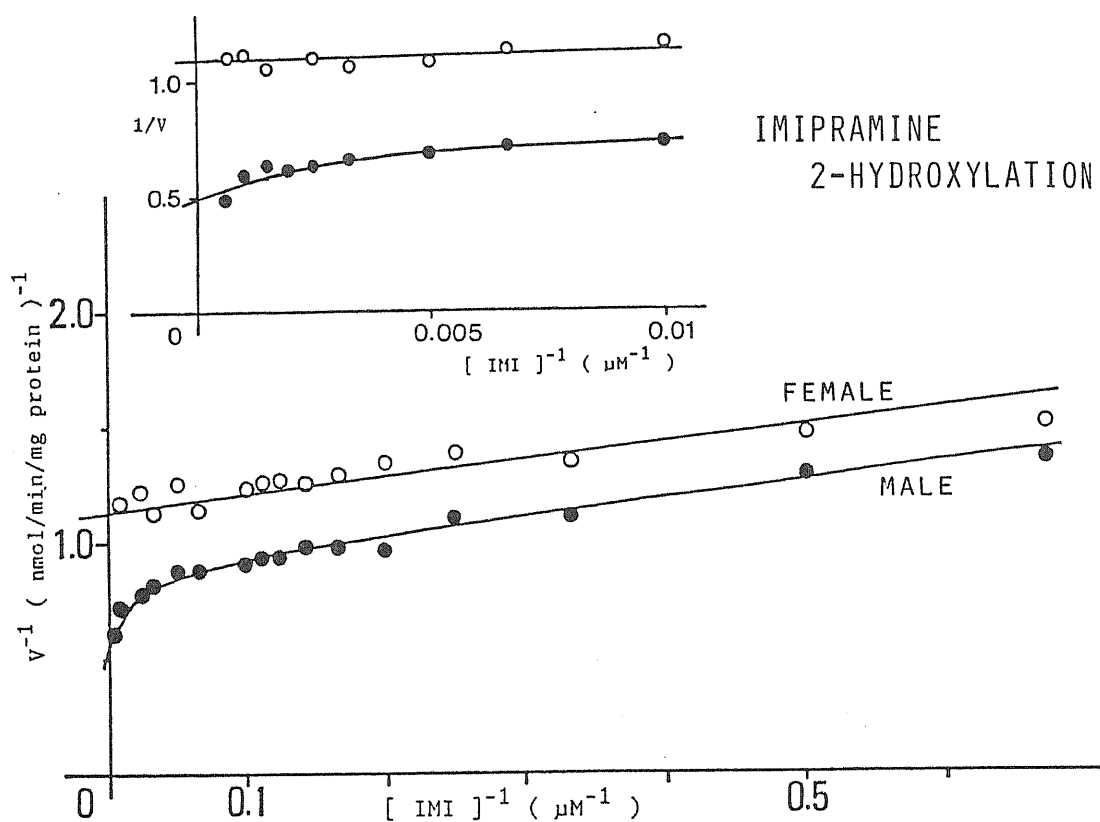


Figure 2-6

LINEWEAVER-BULK PLOT OF IMIPRAMINE 2-HYDROXYLATION  
IN MALE (●) AND FEMALE (○) RAT LIVER MICROSOMES.

This shows the results of one experiment typical of three.

非線形最小自乗法より計算された $K_m$ 、 $V_{max}$ 値に基づくシミュレーション結果と実測値の一致性から評価した。Table 2-1 にその結果を示した。複数のMichaelis-Menten式で代謝反応のKineticsが表現される場合、その式の数を相 (Phase) 数と呼び、 $K_m$ 値の小さい方から番号をつけた。また、異なるサンプル群での比較は、同桁数の $K_m$ 値を持つ相を同じ番号で記した。さらに、ある基質濃度での代謝速度に対する各相の寄与を今回調べた基質濃度範囲 (1.5 - 1500  $\mu M$ ) で計算した結果を Figure 2-7 に示した。N-脱メチル化反応は、両性で2相性を示した (Table 2-1)。この反応の性差の特徴は、全基質濃度範囲で性差が観察されるが (Figure 2-3)、高基質濃度領域で活性の雌雄差が小さくなる傾向があった (Figure 2-5)。各相の寄与率を示した Figure 2-7 から、雄の場合 Phase 1の寄与は50  $\mu M$ 以上で無視 (< 10%) でき、広い範囲で Phase 2 ( $K_m = 73 \mu M$ ) の活性が担っているが、一方、雌ではPhase 3の $K_m$ が大きいため (823  $\mu M$ )、雄に比較して広範囲で Phase 1が代謝活性に寄与しており、その寄与率が10%以下になるのは1000  $\mu M$ 以上であった。また、雄のPhase 2と雌のPhase 3の $V_{max}$ 値は雌雄間でほとんど等しい (Table 2-1 参照; 雄 4.15 vs. 雌 4.31 nmole/min/mg protein) ため、広い範囲での性差は雄Phase 2と雌Phase 3の $K_m$ 値の差 (Table 2-1 参照; 雄 73.0 vs. 雌 823  $\mu M$ ) に依存しており、雌のPhase 3が飽和するにしたがい、性差が消失していくことが明かとなった。

一方、環2位水酸化反応は、Table 2-1 より、雄で2相、雌では1相で解析され、 $K_m$ 値の低い相の間では、両性で有意な差は認められなかった。Figure 2-4 のNormalプロットから明らかなように、環2位水酸化反応に関しては広い範囲 (< 100  $\mu M$ ) で性差が認められないが、基質濃度が高くなるにしたがい、雄の代謝活性が雌より大きくなり、性差が顕著になった。これは、雌では phase 1が全濃度での代謝活性を担っているのに対し、雄では高濃度になるにしたがい $K_m$ 値の大きな (266  $\mu M$ ) Phase 3が関与してくることに起因していると考えられる。

Table 2-1

KINETIC PARAMETERS ( $K_m$  &  $V_{max}$ ) FOR N-DEMETHYLATION  
AND 2-HYDROXYLATION OF IMIPRAMINE IN CONTROL MALE  
AND FEMALE RATS<sup>a</sup>

| REACTION <sup>b</sup> | SEX            | PHASE                       |                  |               |                |              |                  |
|-----------------------|----------------|-----------------------------|------------------|---------------|----------------|--------------|------------------|
|                       |                | 1                           |                  | 2             |                | 3            |                  |
|                       |                | $K_m$                       | $V_{max}$        | $K_m$         | $V_{max}$      | $K_m$        | $V_{max}$        |
| NDL                   | M <sup>b</sup> | 2.06 <sup>c</sup><br>(0.45) | 0.210<br>(0.029) | 73.0<br>(5.0) | 4.15<br>(0.62) | --           | --               |
|                       | F              | 5.37<br>(0.93)              | 0.314<br>(0.048) | --            | --             | 823<br>(205) | 4.31<br>(0.80)   |
| 2HL                   | M              | 0.928<br>(0.153)            | 0.888<br>(0.153) | --            | --             | 266<br>(69)  | 0.631<br>(0.063) |
|                       | F              | 0.632<br>(0.108)            | 1.07<br>(0.10)   | --            | --             | --           | --               |

<sup>a</sup> Data represent mean ( $\pm$ S.E.) for 3 animals.

<sup>b</sup> NDL, N-demethylation; 2HL, 2-hydroxylation;  
M, male; F, female.

<sup>c</sup>  $K_m$ , Michaelis constant (nmole/ml);  $V_{max}$ , maximum  
velocity of the reaction (nmole/min/microsomal  
protein).

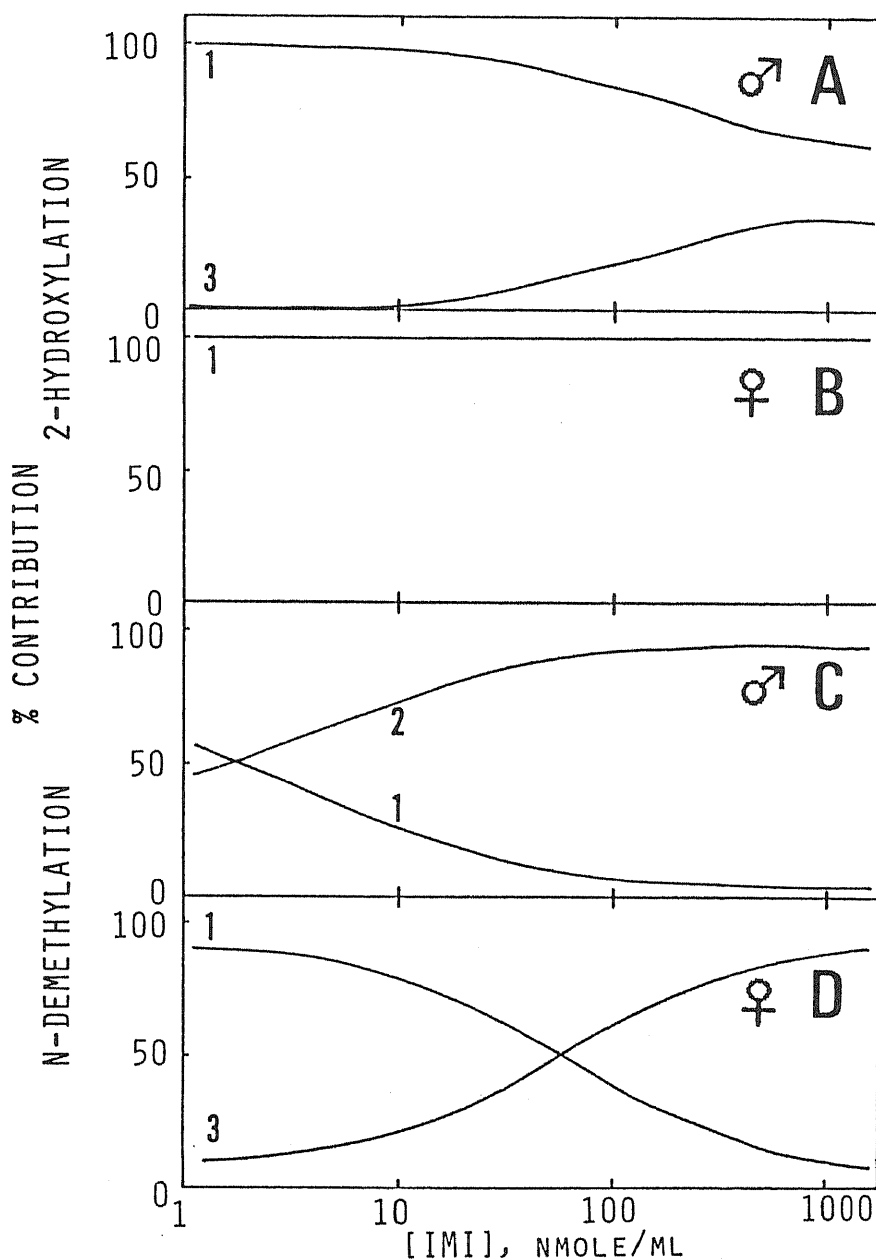


Figure 2-7

RELATIVE CONTRIBUTION OF METABOLIC VELOCITY OF KINETIC PHASE TO TOTAL VELOCITY OF IMIPRAMINE 2-HYDROXYLATION (A AND B) AND N-DEMETHYLATION (C AND D) IN MALE (A AND C) AND FEMALE (B AND D) RAT LIVER MICROSOMES.

Number next to each line shows the number of phase described in Table 2-1.

## [2] Phenobarbital および Sudan III 前処理ラット肝ミクロソームでの Imipramine 代謝 kinetics の比較

Phenobarbital (PB) および Sudan III (Fujita et al., 1984) は異なる P-450 分子種を増量させる代表的な誘導剤である。これらの誘導剤で前処理 (PB; 80 mg/kg/day i.p. 5 日間、Sudan III; 40 mg/kg/day i.p. 5 日間) したラット肝臓から調製したミクロソームを用いて、代謝 kinetics を調べた。

### [実験結果]

Figure 2-8 には Sudan III 処理雄ラット肝ミクロソームでの結果を、また、Figure 2-9 ~ 2-10 には PB 処理雌雄ラット肝ミクロソームでの結果を示した。また、非線形最小自乗法より得られたパラメータを Table 2-2 にまとめた。

雄における Sudan III 処理による速度論的パラメータの変動は、全ての反応経路に関して認められなかった (Figure 2-8、Table 2-2)。一方、PB 処理では、雌雄ラットで、パラメータの変動が認められた (Table 2-2)。雄の脱メチル化反応は、コントロール (無処理) では 2 相で解析されたが、PB 処理することにより 1 相で解析されるようになった (LB プロットが直線となる、Figure 2-9 参照)。また、その相の  $V_{max}$  値は、コントロールでの  $K_m$  値の高い方の相の約 1.5 倍であった。一方、雌ラットに対する PB 前処理の影響も、Figure 2-9 および Table 2-2 から明らかなように、相数の減少 (2 相から 1 相) となって表わされ、その相の  $K_m$  値は雄の PB 処理で得られた値と極めて近い値となった。すなわち、コントロールの状態で認められていた顕著な性差は、雌が PB 誘導を受けることによって消失した。この現象は、 $V_{max}$  の変化ではなく、 $K_m$  値の変化によることが明かとなった。

環 2 位水酸化反応に対する PB 処理の雄ラット肝ミクロソームにおける誘導効果は、相数の変化を伴わず、 $K_m$  値の高い方の相の  $V_{max}$  値が約 2.5 倍上昇し (Table 2-2 参照)、さらに、 $K_m$  値が低下 ( $266 \rightarrow 119 \mu M$ ) することにより、約  $40 \mu M$  付近で代謝速度の逆転が認められた。一方、雌では、新しい相の出現が認められ、その相の  $K_m$  値は雄ラットでの高い方の  $K_m$  値と比較的近いことから、高基質濃度で

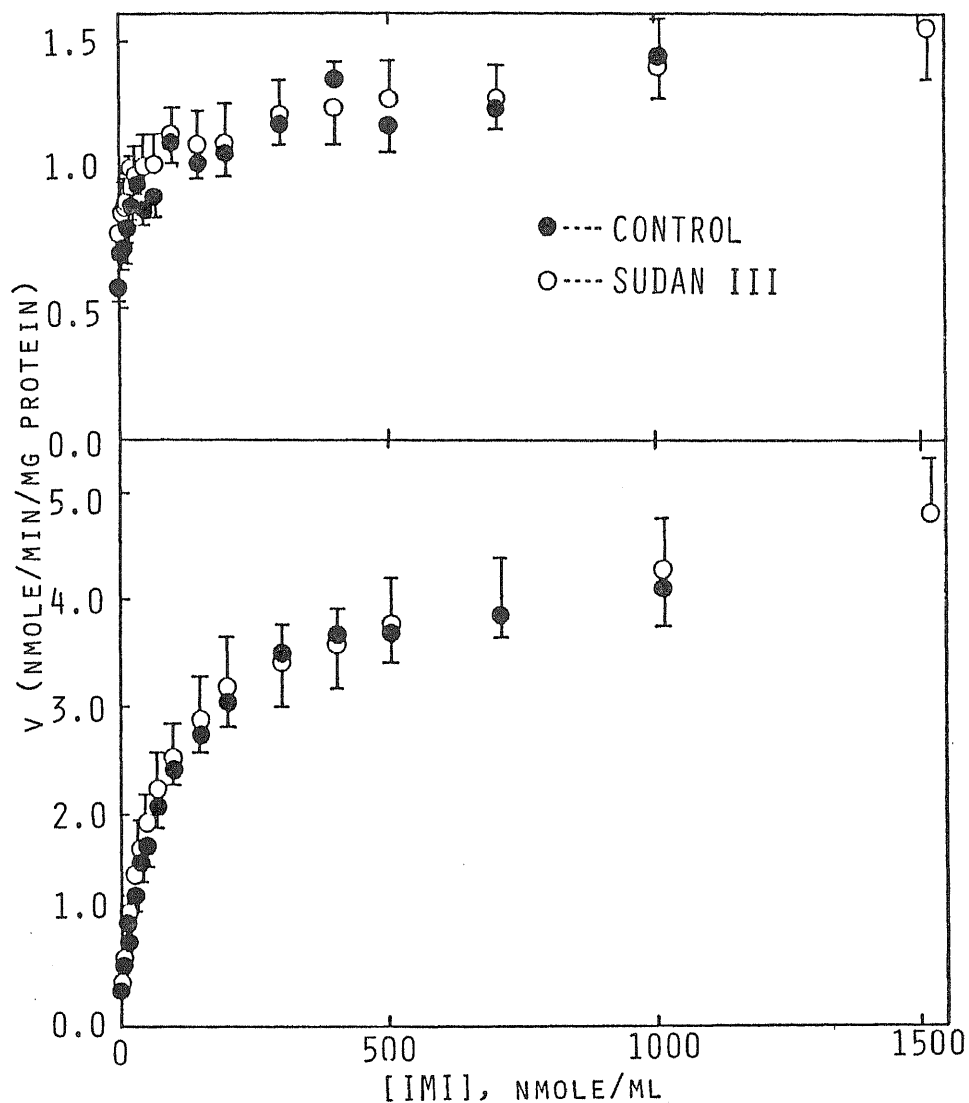


Figure 2-8

METABOLIC VELOCITIES OF IMIPRAMINE 2-HYDROXYLATION (UPPER PANEL) AND IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION (LOWER PANEL) IN CONTROL (●) OR SUDAN III-TREATED (○) MALE RAT LIVER MICROSOMES.

Each point and vertical bar represent the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

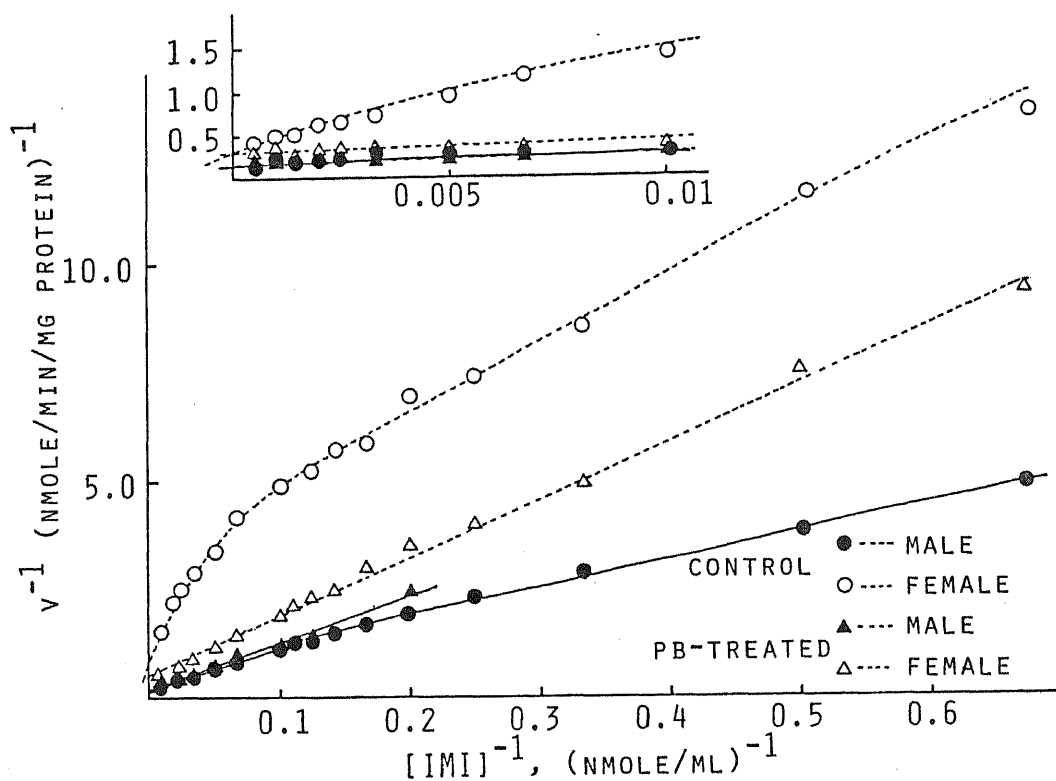


Figure 2-9

LINEWEAVER-BURK PLOT OF IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION IN CONTROL OR PHENOBARBITAL-TREATED MALE AND FEMALE RAT LIVER MICROSOMES.

This shows the results of one experiment typical of three.

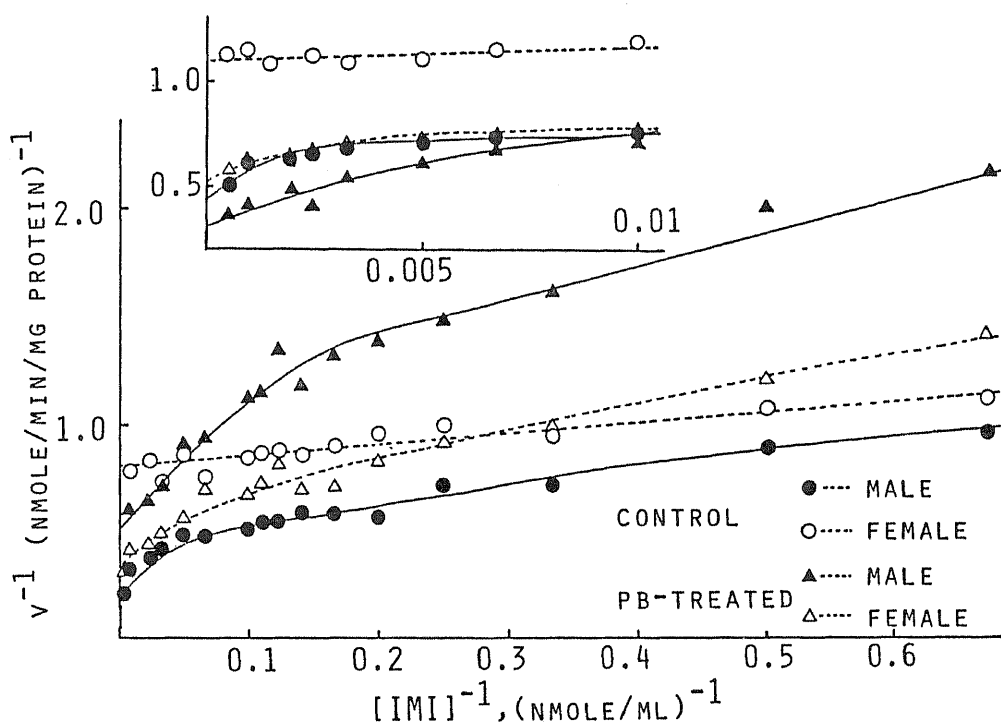


Figure 2-10

LINEWEAVER-BURK PLOT OF IMIPRAMINE 2-HYDROXYLATION IN CONTROL OR PHENOBARBITAL-TREATED MALE AND FEMALE RAT LIVER MICROSOMES.

This shows the results of one experiment typical of three.

Table 2-2

KINETIC PARAMETERS ( $K_m$  &  $V_{max}$ ) FOR N-DEMETHYLATION AND 2-HYDROXYLATION OF IMIPRAMINE IN CONTROL AND PHENOBARBITAL-TREATED MALE OR FEMALE RATS<sup>a</sup>

| REACTION <sup>b</sup> | SEX <sup>b</sup> | TREATMENT <sup>b</sup> | PHASE             |           |        |           |       |           |
|-----------------------|------------------|------------------------|-------------------|-----------|--------|-----------|-------|-----------|
|                       |                  |                        | 1                 | 2         | 3      |           |       |           |
|                       |                  |                        | $K_m$             | $V_{max}$ | $K_m$  | $V_{max}$ | $K_m$ | $V_{max}$ |
| NDL                   | M                | CONTROL                | 2.06 <sup>c</sup> | 0.210     | 73.0   | 4.15      |       |           |
|                       |                  |                        | (0.45)            | (0.03)    | ( 5.0) | (0.62)    |       |           |
|                       |                  | PB                     |                   |           | 69.6   | 6.52*     |       |           |
|                       | F                |                        |                   |           | ( 3.8) | (0.38)    |       |           |
|                       |                  | SIII                   | 3.79              | 0.298     | 96.9   | 4.14      |       |           |
|                       |                  |                        | (1.27)            | (0.067)   | (18.4) | (0.33)    |       |           |
| 2HL                   | M                | CONTROL                | 0.928             | 0.888     | 266    | 0.631     |       |           |
|                       |                  |                        | (0.153)           | (0.153)   | ( 69)  | (0.063)   |       |           |
|                       |                  | PB                     | 0.976             | 0.570     | 119    | 1.55*     |       |           |
|                       | F                |                        |                   |           | ( 28)  | (0.12)    |       |           |
|                       |                  | SIII                   | 0.756             | 0.655     | 101    | 0.730     |       |           |
|                       |                  |                        | (0.215)           | (0.088)   | ( 26)  | (0.067)   |       |           |
|                       | M                | CONTROL                | 0.632             | 1.07      |        |           |       |           |
|                       |                  |                        | (0.108)           | (0.10)    |        |           |       |           |
|                       |                  | PB                     | 1.19              | 1.19      | 83.7   | 1.00      |       |           |
|                       | F                |                        |                   |           | (34.2) | (0.14)    |       |           |
|                       |                  |                        | (0.11)            | (0.18)    |        |           |       |           |
|                       |                  |                        |                   |           |        |           |       |           |

<sup>a</sup>  $K_m$ , michaelis constant (nmole/ml);  $V_{max}$ , maximum velocity of the reaction (nmole/min/mg microsomal protein).

<sup>b</sup> NDL, N-demethylation; 2HL, 2-hydroxylation; M, male;

F, female; PB, phenobarbital-treated; SIII, sudan III.

<sup>c</sup> Data represent mean ( $\pm$ S.E.) for 3 animals.

\* Significantly different from the corresponding control value ( $p < 0.05$ ).

は雄ラットの活性に近付いていくことが明かとなった (Figure 2 - 10)。

#### [考察]

以上のImipramine代謝活性に与える誘導剤 (PB) の影響を検討した結果より、ラットをPBで前処理することによりV<sub>max</sub>値を 1.5 - 2.5 倍程度上昇させるだけではなく、K<sub>m</sub>値も変化することが明かとなった。K<sub>m</sub>値は一般に、その反応に関与している酵素 (あるいは本研究の場合、酵素分子種) に特有のものであると考えられるので、PBによるK<sub>m</sub>値の変化は、ミクロソームにおけるその反応に関与している酵素分子種の構成の変動を反映していると考えられる。In vitro 実験からある代謝反応が誘導剤による影響を受けるかどうかを検討する場合、一般には十分に高い基質濃度でのV<sub>max</sub>値の測定によって行なわれるが、今回、Imipramine代謝反応のPBによる影響を検討した結果より、誘導剤の影響がK<sub>m</sub>値の変動を引き起こした場合 (特に雌ラット肝ミクロソームでの脱メチル化反応)、たとえV<sub>max</sub>値に変化がなくとも、低基質濃度での代謝活性の大きな変動を招く結果となることがわかった。

Imipramineの誘導効果の基質濃度依存性を、PB処理とコントロールのミクロソームにおける各基質濃度の代謝速度比率 ( $V_{PB}/V_{CONTROL}$ ) で表現し、その結果を Figure 2 - 11 に示した。K<sub>m</sub>値に変化がなく、V<sub>max</sub>値が上昇した場合 (雌雄環2位水酸化反応および雄脱メチル化反応)、各基質濃度での代謝活性の比は、K<sub>m</sub>値の差によって高基質濃度になるにしたがい上昇し、V<sub>max</sub>値に達した後、一定の値 (コントロールとPB処理ラット肝ミクロソームでのV<sub>max</sub>値の比) となった。

これとは対照的に、雌におけるImipramine脱メチル化反応では、PB誘導によってV<sub>max</sub>値はほとんど変動しないが (コントロール;  $0.3 + 4.31 = 4.62$  vs. PB;  $3.81$ )、K<sub>m</sub>値が約10分の1に低下し ( $823$  から  $71.3 \mu M$ )、PB処理での代謝活性が飽和する基質濃度がコントロールでの値よりかなり低くなるため、低基質濃度領域での代謝活性の比の顕著な上昇が認められ、それ以後、誘導効果は消失していくパターンとなった。このことは、V<sub>max</sub>値を測定することによる誘導効果の程度の判断は必ずしも低基質濃度での代謝速度の変化の程度に反映していないことを意味している。多くの誘導実験による報告は、V<sub>max</sub>値のみ

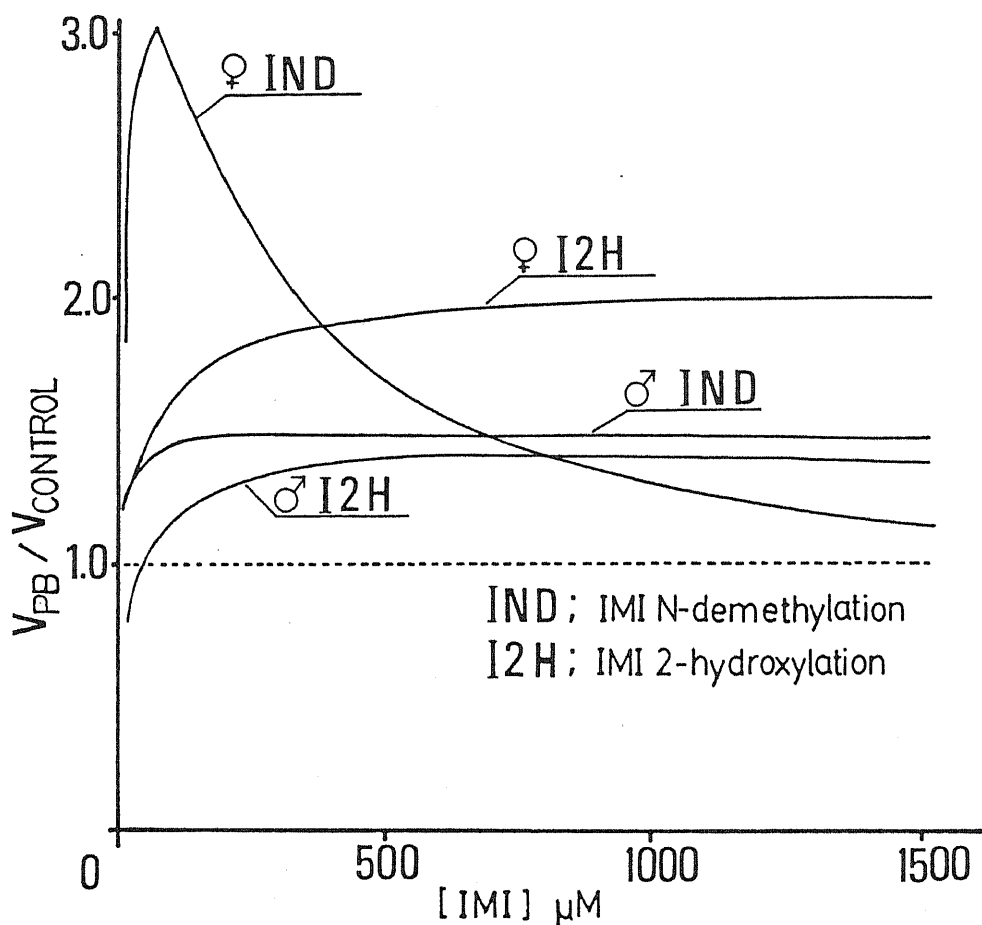


Figure 2-11

EFFECT OF IMIPRAMINE CONCENTRATION ON THE RATIO OF METABOLIC VELOCITY IN CONTROL TO THAT IN PHENOBARBITAL-TREATED MALE AND FEMALE RAT LIVER MICROSOMES.

を測定しており、対象としている代謝反応に関与している酵素量の増減に関して検討したものが多いが、一つの代謝反応にも複数の P-450 分子種が関与していることが明らかにされている現在、本研究のように臨床での薬物投与指針に与える情報を目指した *in vitro* 代謝実験では、コントロールでのデータのみならず、誘導剤による代謝活性の変動を調べる場合にも、詳細な Kinetics の必要性を示唆する結果となった。

## 2-3 ラット肝ミクロソームにおけるImipramine各代謝速度の性差と老化による代謝活性変動に関する検討

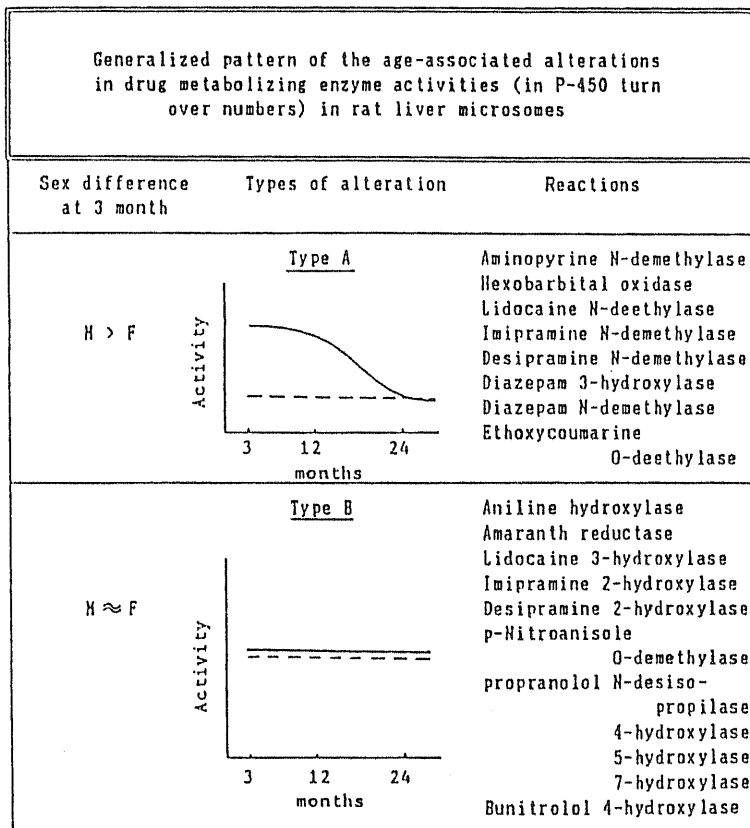
1、2節において、Imipramine各代謝経路に関与しているP-450分子種の性差及び誘導剤に対する感受性の特徴をKineticsから明らかにした。そこで各P-450分子種を推定する上で、より明確な指針を与えると考えられる各Imipramine代謝経路の反応速度の雌雄ラットでの老化による（3カ月から30カ月齢）変動を調べた。

### [実験結果]

Figure 2-12 には、Imipramine代謝経路のうち、主要な4つの代謝経路について雌雄ラット肝ミクロソームでの代謝活性の老化による変動を示した。Imipramineおよび2OH-IMIの脱メチル化活性は若齢時（3～12月齢）に顕著な性差を示したが、それ以後雌と同じレベルまで低下し、性差が消失した。一方、ImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応には若齢から老齢にかけて活性の顕著な変化および性差は認められなかった。

### [考察]

老齢化社会になりつつある現在、老齢患者と薬物代謝活性の関係を明らかにすることが必要となり、ラットをモデル動物とした多くの実験結果が報告されている(Fujita et al.,1983,1985a,1985b;Kitagawa et al.,1984)。これらの報告をまとめると、代謝活性の老化による変動パターンは、基質によって大きく二つのパターンに分けることができる（次ページ図参照、鈴木 1985 から引用）。すなわち、Aminopyrineの脱メチル化反応やHexobarbitalの酸化反応のように、若齢時（3カ月齢）には顕著な性差が認められたが、老化するに従い（25カ月齢以後）雄での代謝活性が急激に低下し、性差が消失するタイプ（タイプA）、Anilineの水酸化反応のように、若齢から老齢にかけて性差が認められず、また、代謝活性の大きな変動をともしないタイプ（タイプB）である。タイプAに属する代謝活性の雄ラットでの老化による代謝活性の変動（低下）のメカニズムに関しては、いくつかの説が報告されている。



すなわち、①総P-450含量の老化にともなう低下 (Kato & Takanaka, 1967; 1968)、②P-450に電子を供与する酵素であるNADPH Cytochrome c Reductase 活性の老化に伴う低下 (Schmucker et al., 1982)、③ミクロソーム膜の流動性の質的変化 (Stier et al., 1982; Armbrrecht et al., 1982) および④P-450分子種の構成比の老化にともなう変動 (Rikans & Notley, 1981; Fujita et al., 1982) などの機構が提唱されている。これらのうち、①②は Aniline 水酸化反応活性や Imipramine 環 2 位水酸化反応活性のように老化しても代謝活性の変動を示さない代謝経路 (タイプB) の存在を説明できない。また、Imipramine のように同一基質であっても脱メチル化反応と環 2 位水酸化反応間で異なる変動パターン (前者はA、後者はB) を示す実験事実を、膜の流動性がP-450と基質間の相互作用に影響を与える要因であるという観点 (③) からは説明できない。したがって、現在では④の説が有力である。事実、性差

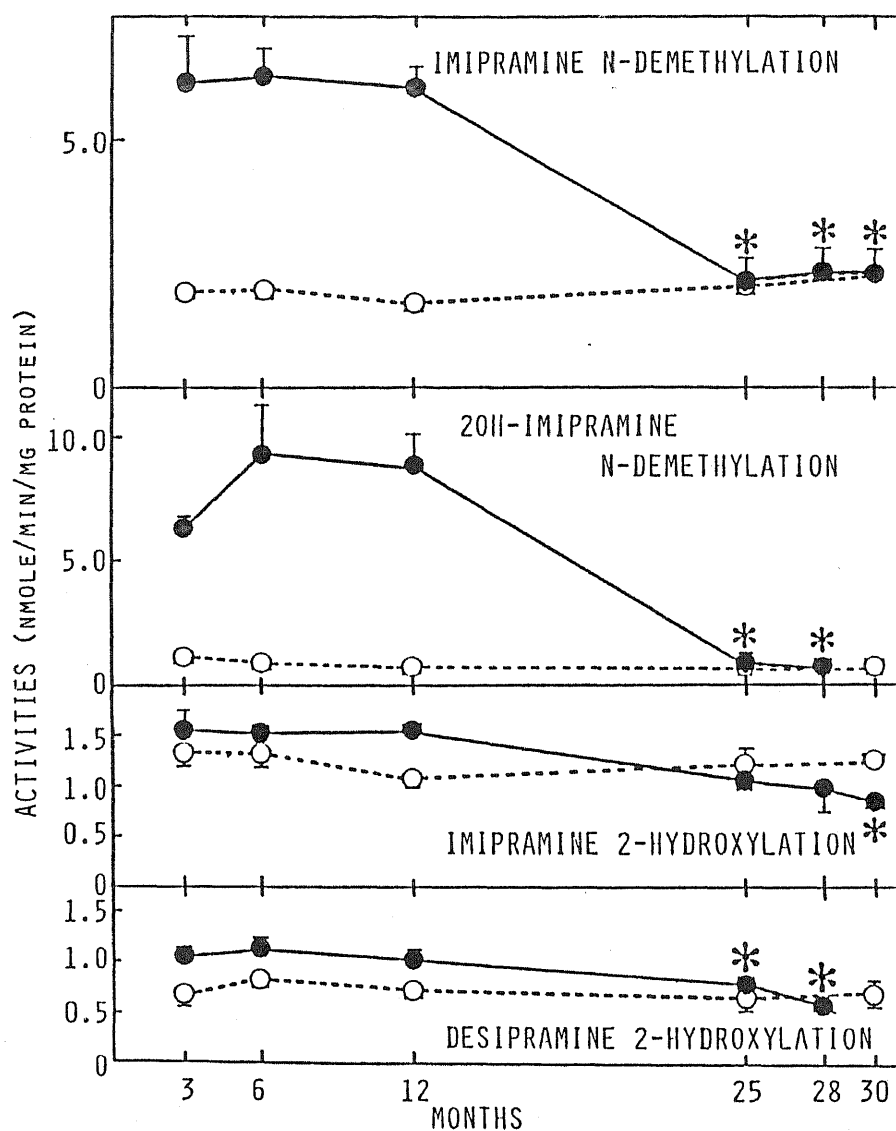


Figure 2-12

AGE-ASSOCIATED ALTERATIONS IN METABOLIC VELOCITIES OF N-DEMETHYLATION OF IMIPRAMINE AND 2OH-IMIPRAMINE, OR 2-HYDROXYLATION OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE IN MALE AND FEMALE RAT LIVER MICROSOMES.

Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

発現に関与し、また老化にともないそのミクロソーム中での存在量が低下していくP-450分子種が同定精製されている。このP-450分子種は精製した研究者によって様々な名称 (P-450 male [Kamataki et al.,1982;Kato & Kamataki,1982; Kamataki et al.,1985], RLM5[Jansson et al.,1985], h [Ryan et al.,1984], 2c [Waxman,1984], M-1[Matsumoto et al., 1986]) で呼ばれているが、本研究ではP-450m1と命名した (Fujita et al.,1989)。このP-450分子種量が雄で高く、また、老化によって減少するメカニズムは、現在のところ、明確な見解が得られていないが、ホルモンレベルとの因果関係が指摘されている。その例として、Testosteroneが脳下垂体からの雌性化ファクター (Feminization Factor; 成長ホルモンであると言われている (Mode et al.,1983)) の分泌の調節を行っており、さらにその分泌パターンの性差が肝臓の雌性化に影響をあたえている可能性を示唆する報告 (Eden,1979)がある。

これら、肝臓レベルでの薬物代謝活性の老化に伴う変動とヒトでの体内動態を関連付ける臨床データとして、Imipramineの変動について報告されている (Abernethy et al.,1985)。同文献では Imipramine のヒトにおける体内動態は、若齢被験者と老齢被験者間で有意に消失クリアランスが低下しているのに対し、DMI では、その消失が影響を受けないことが示されている。この試験の投与量ではImipramineの消失が、脱メチル化反応に基づいているのに対し、DMI は環2位水酸化反応が担っていると考えられる。したがって、この臨床上の試験結果は、本研究で得られたラット肝ミクロソームでの老化による代謝活性変動パターンの代謝経路依存性を反映していると思われる。

## 2-4 Imipramine代謝における脱メチル化反応に関与する P-450分子種の解明

前節までのラット肝ミクロソームを用いた代謝 Kinetics 実験から、Imipramine各代謝経路に関与しているP-450分子種の推定を行なった。本節〔1〕では、この推定をより確実にするため若齢雄性ラット肝ミクロソームで最も多量に存在し、また性差及び老化による代謝活性の変動を引き起こすP-450分子種であるP-450m1と雌性ラット肝ミクロソームの主要P-450分子種であるP-450分子種（ここではP-450F）の精製標品を用いた再構成系でのImipramine代謝経路の各代謝反応に対する触媒活性を調べた。また、本節〔2〕では、これらのP-450精製標品のうち、P-450m1に対する抗体を用いて、Imipramineの各1次代謝速度（脱メチル化反応、環2位水酸化反応）に対する阻害効果の比較検討と、若齢（3ヶ月齢）および老齢（28ヶ月齢）雄性ラット肝ミクロソームでのImipramine脱メチル化活性及び環2位水酸化活性に対するP-450抗体の阻害効果を調べ、Imipramine脱メチル化反応の性差及び老化による反応速度の変動に対するP-450m1の関与を明らかにし、また、2次代謝経路を含めた各代謝反応経路間での反応に関与しているP-450分子種の相同性および独立性に関する知見を得ることを目的とした。

### 〔1〕 P-450m1およびP-450Fを用いた再構成実験

本実験での再構成系は、精製P-450本体とNADPH Cyt.P-450還元酵素および Dilauroyl-Phosphatidyl Choline (DCLP) による非ベシクル系での電子伝達系によって作成した。再構成系での触媒活性はP-450分子種のその代謝反応に関与する可能性を調べるとともに、触媒能力の有無を判断する有用な手段であると考えられる。

### 〔実験結果〕

Figure 2-13 には、P-450m1とFを、また、基質としてImipramineおよびその1次代謝物2OH-IMI、DMIを用いた再構成系での各代謝反応に対する触媒活性を調べた結果を示した。雄において

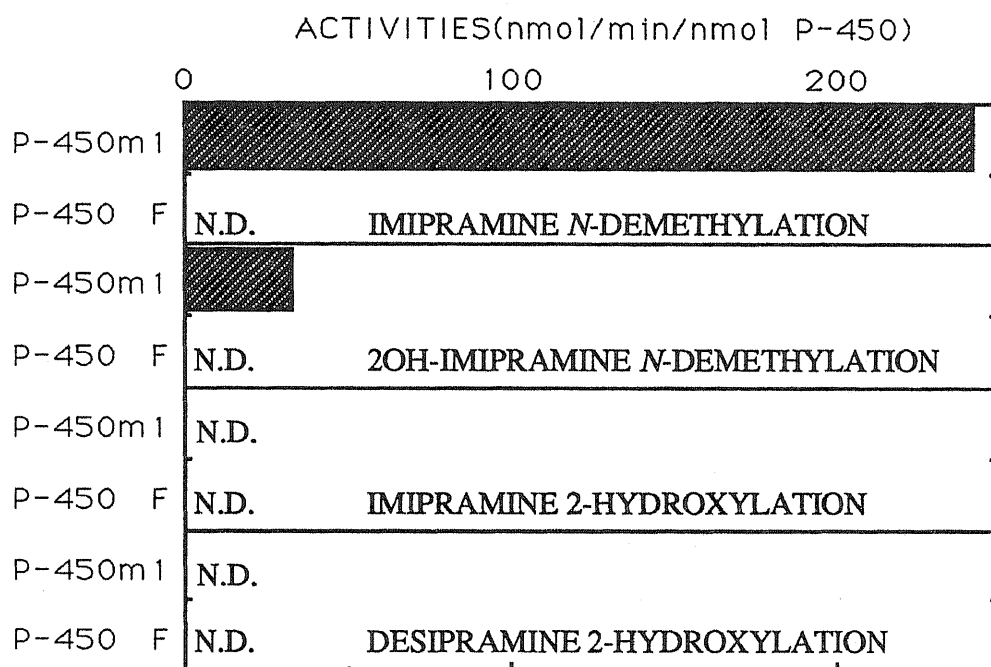


Figure 2-13

METABOLIC VELOCITIES IN RECONSTITUTED SYSTEMS CONTAINING PURIFIED P-450 SPECIES (P-450 m1 AND F).

N.D., not detected.

主要P-450分子種であるP-450m1は、Imipramineおよび2OH-IMIの脱メチル化反応を良く触媒したのに対し、ImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応は全く触媒しなかった。また、雌における主要P-450分子種であるP-450Fは、Imipramine代謝経路における全ての代謝活性に関与していないことが明かとなった。

再構成系における触媒活性の大きさから直接ミクロソームでの代謝活性を評価することはできないが、少なくとも再構成系で触媒能力が無いP-450分子種が、ミクロソームでの代謝反応に関与している可能性は極めて低いと考えられる。従って、P-450m1がImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応には関与せず、またP-450Fは全てのImipramine代謝反応に関与していないP-450分子種であると考察された。

## [2] 若齢および老齢ラット肝ミクロソームでの Imipramine 代謝活性に対する P-450m1抗体を用いた阻害実験

精製P-450を用いた再構成系でのImipramineおよび2OH-IMIの脱メチル化反応では、P-450m1が非常に高い触媒活性を示した。しかし、Imipramineの肝ミクロソームにおける代謝反応には、複数のP-450分子種が関与していることが示唆された（前節まで）ので、再構成実験の結果が、直接（定量的に）肝ミクロソームでの代謝活性には結びつかない。したがって、肝ミクロソームの代謝においては、P-450のある分子種がどの程度関与しているか、定量的に知るためにはその分子種の抗体(IgG)によってそのP-450分子種由来の代謝活性を阻害する実験方法が有用な手段であると考えられる。

### [実験結果]

Figure 2-14 には、P-450m1 抗体の蛋白量により、若齢雄性ラット肝ミクロソームでのImipramineの2つの一次代謝活性がどのように変動するかを示した。この結果から、阻害が飽和に達した時、脱メチル化活性はP-450m1により約80%阻害を受けたが、環2位水酸化反応には、ほとんど阻害がみられなかった。また、P-450m1抗体を5mg添加したときの阻害が加齢によってどの様に影響されるかを

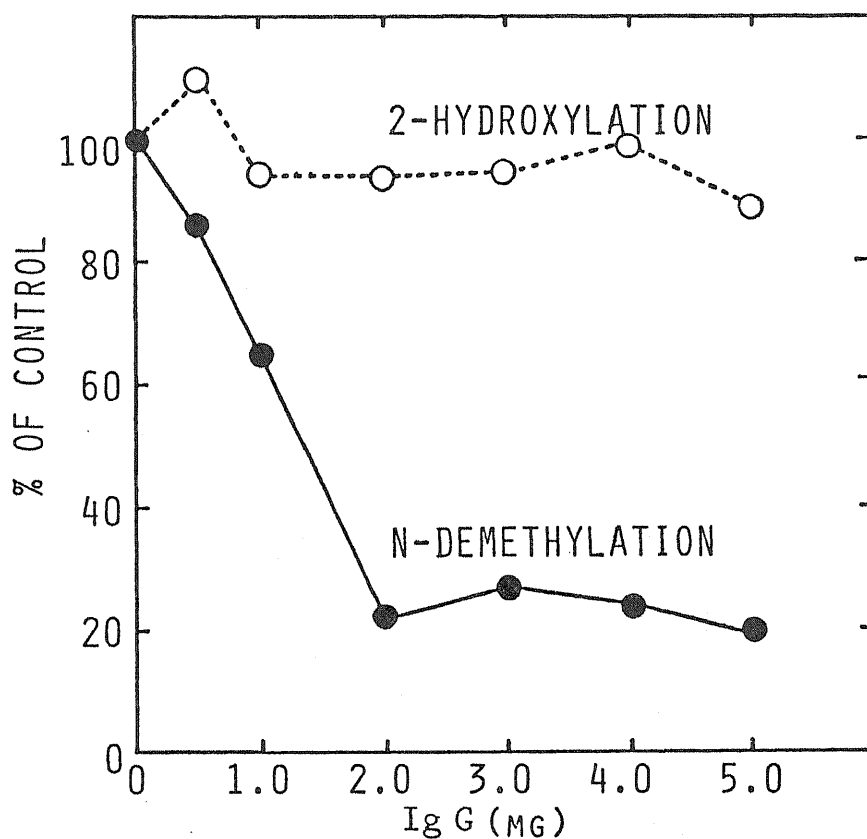


Figure 2-14

EFFECT OF ANTIP-450m1 ANTIBODY ON METABOLIC VELOCITIES OF IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION (●) AND 2-HYDROXYLATION (○) IN RAT LIVER MICROSOMES.

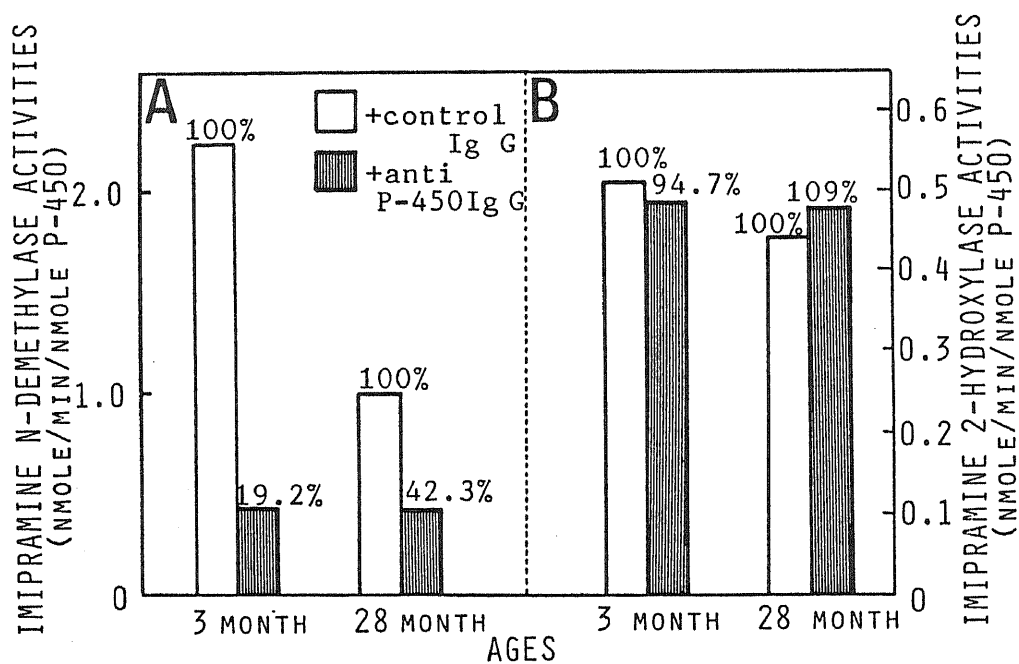


Figure 2-15

EFFECT OF ANTI P-450m1 ANTIBODY ON METABOLIC VELOCITIES OF IMIPRAMINE N-DEMETHYLATION (A) AND 2-HYDROXYLATION (B) IN LIVER MICROSOMES FROM 3-MONTH-OLD AND 28-MONTH-OLD MALE RATS.

Figure 2-15 に示した。雄性ラット肝ミクロソームでの脱メチル化活性は3節の検討より、加齢に拠って約1/3に低下する（3ヶ月齢→28ヶ月齢）ことが明らかにされた（本実験でのコントロール Ig G 添加時の代謝活性の変動と対応している）。本実験において P-450m1の添加により、3ヶ月齢では81%阻害されたのに比べ、28ヶ月齢では58%阻害と、阻害の程度が顕著に低くなったが、阻害されなかった活性値はほぼ等しく、雄ラット肝ミクロソームで認められた加齢による脱メチル化活性の低下がP-450m1量の減少に基づく活性の低下に起因していることが示された。一方、P-450m1に依存していないImipramine脱メチル化活性は年齢の影響を受けないことがわかった。また、環2位水酸化反応にはP-450m1が全く関与していないことが加齢による代謝活性の低下および若齢時の性差が発現しない原因であることが明かとなった。

〔考察（〔1〕および〔2〕）〕

本節〔1〕および〔2〕の検討結果より、第1節で明らかにされた雄性ラット肝ミクロソームにおけるImipramine脱メチル化反応での性差および第3節の実験より得られた加齢による脱メチル化活性の低下の原因がP-450m1の量的減少であることが酵素学的レベルの検討より明確に解明された。一方、環2位水酸化反応を触媒しているP-450分子種は、本節の検討からも、解明されなかったが、少なくとも、P-450m1、Fの各P-450分子種とは全く独立したP-450が触媒している点が明かとなった。

## 2-5 Imipramine代謝における環2位水酸化反応に関与する P-450分子種の解明

前節までの検討から雄性ラット肝ミクロソームでのImipramine代謝における脱メチル化反応は、主にP-450 m1によって触媒されていることが明らかとなった。一方、Imipramineに対して親和性の高い（ $K_m$ 値が小さい）反応であり、低基質濃度で主にImipramineおよびDMI自身の消失に優位に関係していると考えられる環2位水酸化反応を触媒しているP-450分子種を推定する決定的な検討結果は得られていない。

Imipramine服用時のImipramine に対する環2位水酸化代謝物（グルクロン酸抱合体を含む）の尿中排泄量の比率は被験者間で大きく2つのグループに分けられ、この比率が1.0に近いグループをEM (Extensive Metabolizer)、また、ほとんど0のグループはPM (Poor Metabolizer)と呼んで区別された (Brosen et al., 1986a)。このようにある特定の代謝活性が固体間で大きく2つのグループに分けられる代表的な例はDebrisoquine およびSparteineの水酸化活性が報告されている (Eichelbaum, 1982)。さらに、これら代謝活性のグループ間での差は、この両代謝反応を触媒している特定のP-450分子種の発現をコントロールしている遺伝子の有無に基づいていることが明らかにされ、このような代謝反応を遺伝的多様性 (Genetic Polymorphism) のある代謝反応であると呼ばれている (Eichelbaum, 1982)。

また、DMIに関しても、ヒト個人間における環2位水酸化反応速度がDebrisoquineとよく相関すること (Brosen et al., 1986a)、また、Debrisoquineに対するPMから得られた肝ミクロソームではDMIの代謝速度も極めて遅いこと (Spina et al., 1984; Davies et al., 1981)、さらに、DMIの水酸化活性はヒトおよびラット肝ミクロソームにおいてDebrisoquineにより競合的に阻害される (von Bahr et al., 1984) などの実験結果が報告されている。これらの実験結果から、ヒトにおいてはDMIの環2位水酸化反応は、主にDebrisoquineおよびSparteineで代表される代謝反応を触媒しているP-450分子種が関与していることが強く示唆されている。一方、Imipramineの環2位水酸化反応がDebrisoquine/Sparteine型の遺伝的多様性発現に関与しているP-450分子種に触媒されている可

能性を支持する報告は、前述したヒト *in vivo* での試験結果のみであり、その反応に関与する P-450 分子種を、*in vitro* レベルから直接示唆する実験結果は報告されていない。

ある特定の代謝経路が Debrisoquine/Sparteine 型の遺伝的多様性発現に関与している P-450 分子種に触媒されていることを調べるスクリーニング試験として、ヒトおよびラット肝ミクロソームを用いて、Sparteine の水酸化活性に対する阻害効果の程度を調べる方法が報告されており (Inaba et al., 1985)、同文献では、Nortriptyline、Propranolol および Quinidine などが極めて強い阻害効果を持っていることが示された。したがって、これらの薬物の阻害効果はある薬物の特定の代謝反応が Debrisoquine/Sparteine 型の遺伝的多様性発現に関与している P-450 分子種に触媒されている代謝反応であるかを評価する第一段階のスクリーニングに適していると考えられる。

そこで本節では、これらの強力な阻害剤である Nortriptyline (以下 NT)、Propranolol (PL) および Quinidine (QD) の Imipramine および DMI の環 2 位水酸化反応と Imipramine の脱メチル化反応に対する阻害効果を調べ、ラットにおける遺伝的多様性発現に関与している P-450 分子種が、Imipramine および DMI 代謝に関与している可能性について検討することを目的とした。

#### [実験結果]

Figure 2-16 には雄ラット肝ミクロソームでの Imipramine および DMI の各代謝速度に対する NT、PL および QD の併用 (阻害) 効果を示した。併用剤は、Imipramine および DMI の環 2 位水酸化反応を極めて強く阻害したのに対し、Imipramine の脱メチル化速度に対する阻害効果は PL では全く認められず、また、NT および QD では弱かった。さらに、これらの併用剤の一つである QD の Imipramine および DMI の環 2 位水酸化反応速度に対する阻害パターンを調べた Kinetics を Figure 2-17 に示したが、QD は両環 2 位水酸化反応に対し、競合的に強く阻害している (Competitive Inhibition) ことが明かとなった。

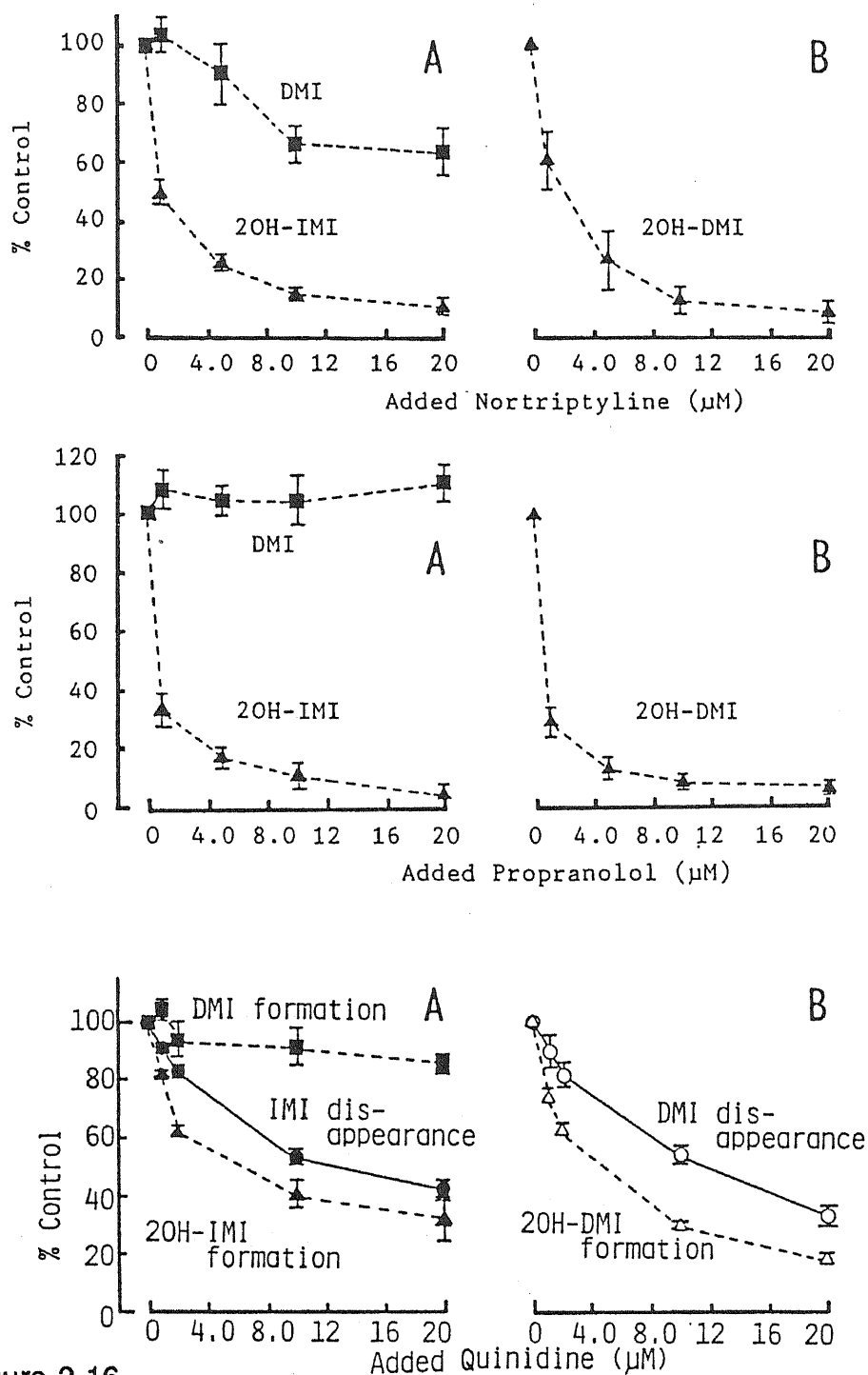


Figure 2-16

EFFECT OF NORTRIPTYLINE (UPPER PANELS), PROPRANOLOL (MIDDLE PANELS) AND QUINIDINE (LOWER PANELS) ON THE FORMATION RATES OF DESIPRAMINE AND 2OH-IMI FROM IMIPRAMINE (A) OR 2OH-DMI FROM DMI (B).

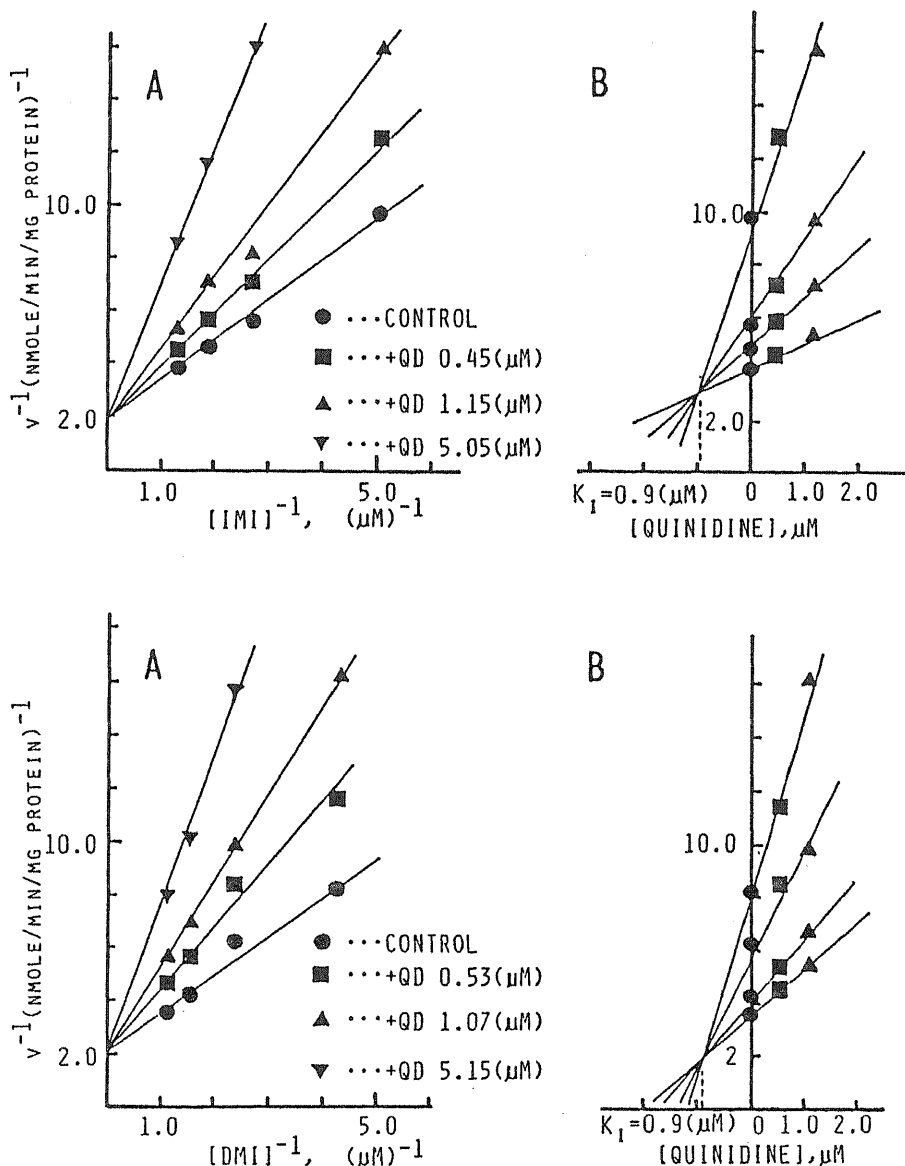


Figure 2-17

LINEWEAVER-BURK PLOT (A) AND DIXON PLOT (B) OF IMIPRAMINE (UPPER PANELS) AND DMI (LOWER PANELS) 2-HYDROXYLATION IN THE PRESENCE OF QUINIDINE IN RAT LIVER MICROSOMES.

# [考察]

DebrisoquineのヒトにおけるPMは、他のいくつかの薬物のある特定の代謝反応にもPMであることが知られている。下表にはその代謝活性の遺伝的多様性がDebrisoquineと良く相関することが知られているものを挙げた。

## 代謝活性にDebrisoquine／Sparteineタイプの遺伝的多様性が知られている薬物とその反応

| 薬物            | 代謝反応                   | 引用文献 |
|---------------|------------------------|------|
| Sparteine     | N-Oxidation            | a    |
| Phenacetin    | O-Deethylation         | a    |
| Phenformin    | p-Hydroxylation        | a    |
| Phenytoin     | p-Hydroxylation        | a    |
| Nortriptyline | trans-10-Hydroxylation | a    |
| Guanoxane     | 6-Hydroxylation        | a    |
|               | 7-Hydroxylation        | a    |
| Perhexiline   | Hydroxylation          | a    |
| Amitriptyline | 10-Hydroxylation       | b    |
| Desipramine   | 2-Hydroxylation        | c    |
| Propranolol   | 4-Hydroxylation        | d    |
|               | N-Desisopropylation    | d    |

引用文献：a;Eichelbaum, 1982, b;Mellstrom et al.,1983,  
c;C.von Bahr et al., 1984, d;Larrey et al.,1984

このように、ある薬物では遺伝的多様性を示す代謝経路をもつため、臨床において安全な投与指針を立てる上で、活性の変動を考慮する必要があり、それに関連した基礎的研究として、ヒト肝ミクロソームから遺伝的多様性の発現に関与しているP-450分子種が同定精製されている ([Distlerath & Guengerich,1984]ではP-450 db)。しかし、このような遺伝的多様性はラットでも観察され、Debrisoquineの水酸化活性がある

特定のラットの系統（DA）では他の系統のラットに比べて極めて低いことが報告された（Al-Dabbagh et al.,1981）。また、ラットにおいても Debrisoquine/Sparteine の水酸化活性を効率よく触媒する P-450 分子種が同定精製され（[Larrey et al.,1984]では P-450 UT-H）、ラットにおいてもヒト同様の P-450 分子種の遺伝的多様性にもとづく代謝活性の変動が存在することが明かとなった（Kupfer et al.,1982）。さらに、ラットより精製された P-450 UT-H に対する抗体を用いた阻害実験からラット肝ミクロソームでの Debrisoquine 水酸化活性は、この抗体によってほぼ 100% 阻害されることがわかった（Larrey et al., 1984）。したがって、本研究での実験結果より、Imipramine および DMI の雄ラット肝ミクロソームでの環2位水酸化反応は、この代謝速度が NT、PL、QD によって強く阻害され、またその阻害パターンが競合的であることから、ラットにおける遺伝的多様性発現に関与している P-450 UT-H によって主に触媒されている可能性が高いと考えられる。

## 2-6 Imipramine代謝における平行代謝経路間相互作用 (Parallel Pathway Interaction)

本章第1から5節までの酵素学的レベルからの詳細な検討からImipramineの雄性ラット肝ミクロソーム上での各代謝反応に関与しているP-450分子種の特定が行なわれた。1次代謝物から2次代謝物を生成する二次代謝反応の詳細なKineticsは検討しなかったが、老化にともなう代謝活性の変動パターン(第3節)、再構成実験系でのP-450 mlの触媒能力(第4節)、NT、PL、QDによる阻害効果(第5節)を調べた実験結果は、それぞれ対となる1次代謝反応の特徴を反映しており、関与しているP-450分子種の相同性が示唆された。

これら各代謝反応に関与するP-450分子種の間関係を見ると、Imipramine代謝における同種の(環2位水酸化反応 vs. 脱メチル化反応)代謝経路は、同一のP-450分子種が触媒しており、これらの代謝経路では異なる基質(Imipramineと1次代謝物)が同一のP-450分子種(P-450 mlあるいはP-450 UT-H)に対して競合的に関与していると考えられる。

そこで本節では以上の推測からImipramine代謝経路内での対になる代謝経路間での相互阻害関係を調べ、また、その阻害効果の強さ(阻害パターンと阻害定数( $K_i$ ))を評価することを目的とした。

### [実験結果]

Figure 2-18 (上図)にはImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応に対するDMIおよびImipramineの阻害効果を、また、Figure 2-18 (下図)にはImipramineおよび2OH-IMIの脱メチル化反応に対する2OH-IMIおよびImipramineの阻害効果を示した。実験結果よりこれらの代謝経路間には相互に競合的な阻害関係(Competitive Inhibition)が認められた。さらに、各代謝経路の代謝パラメータ( $K_m$ 、 $V_{max}$ 値)とその経路に対する阻害剤(1次代謝物)の阻害効果の強さ( $K_i$ 値)を同時に評価するため、阻害剤濃度を変えたときの基質濃度-代謝速度の関係を競合阻害を取り入れた(2-2)式にあてはめ、非

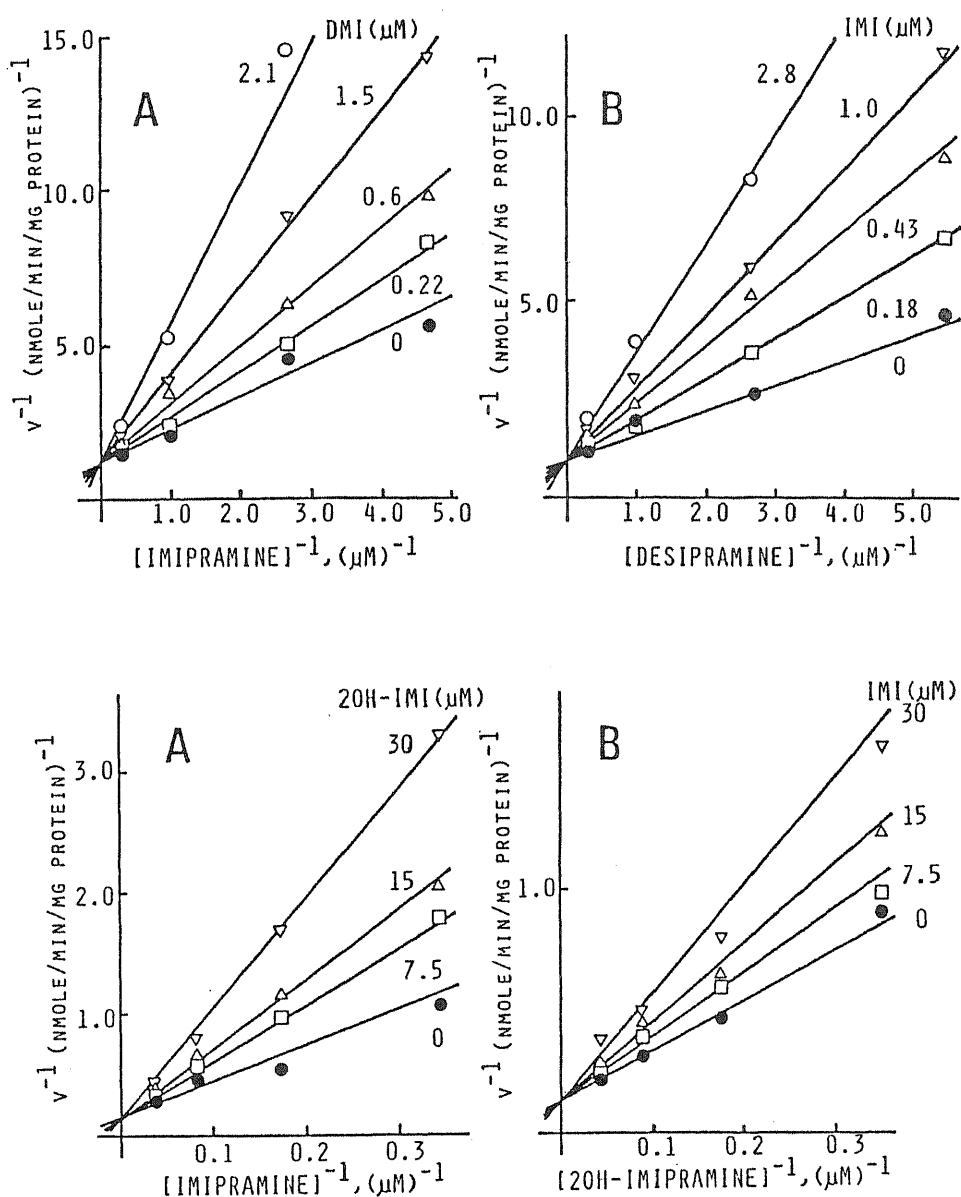


Figure 2-18

LINEWEAVER-BURK PLOTS FOR INTERACTIONS BETWEEN PARALLEL PATHWAYS (2-HYDROXYLATIONS [UPPER PANELS], N-DEMETHYLATIONS [LOWER PANELS]) IN IMIPRAMINE METABOLISM IN RAT LIVER MICROSOMES.

Table 2-3

METABOLIC PARAMETERS FOR IMIPRAMINE AND ITS  
METABOLITES AND THEIR INTERACTIONS  
IN RAT LIVER MICROSOMES<sup>a</sup>

| REACTION    | $V_{\max}^b$           | $K_m^c$   | $K_i^c$ (INHIBITOR) |
|-------------|------------------------|-----------|---------------------|
| IMI 2HL     | 1.09±0.13 <sup>d</sup> | 1.21±0.11 | 0.95±0.11 (DMI)     |
| DMI 2HL     | 1.21±0.10              | 0.99±0.11 | 1.20±0.10 (IMI)     |
| IMI NDL     | 6.09±0.79              | 18.3±3.6  | 14.3±2.1 (2OH-IMI)  |
| 2OH-IMI NDL | 9.53±0.85              | 25.3±6.5  | 29.7±2.8 (IMI)      |

<sup>a</sup> Abbreviations used in the table are as follows;  
2HL, 2-hydroxylation; NDL, N-demethylation;  
IMI, imipramine; DMI, desipramine.

<sup>b</sup> nmole/min/mg microsomal protein.

<sup>c</sup> nmole/ml.

<sup>d</sup> Data were expressed as mean±S.E. of 3 animals.

線形最小自乗法により各パラメータを算出した (Table 2-3)。

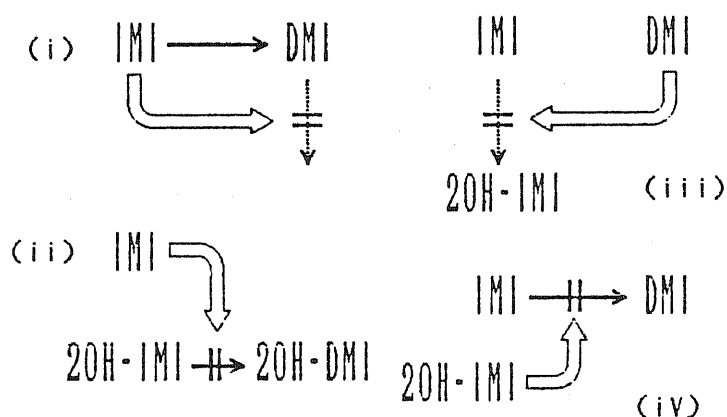
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad \dots(2-2)$$

ここで  $K_I$  は阻害定数、また  $[I]$  は阻害剤濃度である。Table 2-3 から、阻害剤自身の  $K_m$  値と、その阻害剤が阻害対象としている代謝反応への  $K_I$  値がほとんど等しく、Figure 2-18 で認められた競合的阻害関係がほぼ完全な競合的阻害関係であることが明かとなった。

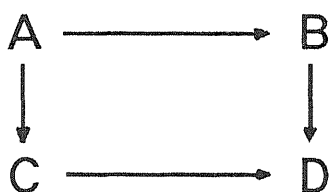
#### [考察]

一般に、親化合物とその代謝物が相互作用を起こす関係にある例は、数多く報告されている。これらの報告のうち特に肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験系で P-450 によって触媒されているものについてまとめると次のようになる (親化合物を A、その代謝物を B とする)。A から B になる代謝過程で A あるいは B が直接その触媒活性を低下させる場合がある。一般的に、前者は基質阻害 (Substrate Inhibition)、また後者は代謝物阻害 (Product Inhibition) と呼ばれ、前者の例として Aniline 水酸化 (Ebel, 1981)、Amitriptyline の脱メチル化反応 (窪田, 1988) が、また後者の例として 2 OH-DMI の DMI 環 2 位水酸化反応阻害効果 (von Bahr & Orrenius, 1971) が知られている。この阻害関係の特徴は、P-450 が触媒酵素の場合、A あるいは B が直接、P-450 の本来、分子状酸素が結合するサイトに不可逆的に結合し、その代謝能力を低下させている点である。一方、B がさらに C の代謝物になる逐次型の代謝経路をもつ場合、(A → B) と (B → C) の代謝過程を触媒している P-450 分子種の相同性によって、A および B が競合的な阻害関係を示すことがある。この場合、P-450 分子種の相同性を分子学的レベルから明らかにした上で、現象の解明を行なっている例はほとんど無いが、B あるいは C の生成速度を測定し、A から B あるいは B から C の代謝速度に与える B あるいは A の添加効果の Kinetics が競合的であることから、推測している例として、Testosterone が水酸化体の代謝反応に対して阻害する例 (A が B → C を阻害; Jacobson et al., 1969) や Aminopyrine の脱メチル化代謝物が Aminopyrine の脱メチル化反応を阻

害（BがA→Bを阻害；Bast & Noordhoek, 1980; Matsuyama et al., 1985）している例が報告されている。この他にも Diphenylhydantoin とその水酸化代謝物との相互関係（Borondy et al., 1972）、Phenylbutazone とその水酸化代謝物 Oxyphenbutazone との 阻害関係（Jahnchen & Levy, 1972）、Ethoxybenzamide とその脱エチル化代謝物（Salicylamide）の阻害関係（Lin et al., 1982）などが報告されており、これらの代謝物の併用は in vivo においても親化合物の体内からの消失速度を顕著に低下させることが報告されている（次章参照）。しかし、Diphenylhydantoin 以下の相互関係については詳細な Kinetics が調べられておらず、その阻害パターンが上記のどちらに属しているのか判断することができない。Imipramine に関しては、その代謝経路において対となる各代謝経路に 関与する P-450 分子種の相同性が本研究から明らかにされており、それを裏付ける結果として次の4つの親化合物—代謝物間相互作用が確認された（→；脱メチル化反応， $\cdots \rightarrow$ ；環2位水酸化反応、A→；A が矢印の先の代謝経路を阻害する関係を示す）。



(i) から (iv) のケースのうち、(i) および (ii) は前述の逐次型代謝経路（A→B→C）の場合に形式上当てはまるが、（A→B）と（B→C）に関与している P-450 分子種は独立している点で異なっている。また、(iii) および (iv) のケースは、阻害剤と阻害される代謝経路が同じ逐次型の代謝系路上に存在していない。したがって、Imipramine の代謝経路内に確認された親化合物—代謝物間相互関係は、次ページ左図の D にあたる共通した2次代謝物（2OH-DMI）が異なる二つの1次代謝物から生成される平行四辺形型の代謝経路において形成さ



れるユニークな相互関係であると考えられる。このような平行四辺形型の代謝経路はImipramineの他にLidocaineやDiazepamで知られており、両薬物では肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝 Kinetics でその対となる代謝経路間で競

合型の相互阻害関係が確認されている (Suzuki et al., 1984; 龍野、1985)。また、本節で得られた実験結果は、前節までの酵素学的検討から明らかにされたImipramine代謝経路内での対となる代謝経路に関与している P-450 分子種の相同性を裏付けるものであり、ImipramineおよびDMIの *in vivo* 体内動態を予測することを目的とした *in vitro* データからの速度論的モデルの構築には、*in vitro* 代謝実験より得られた反応初速度から算出された代謝パラメータの他に、競合的な阻害関係を表わす  $K_i$  値を導入しなければならない可能性が示唆された。

## 2-7 小括

第2章での実験結果は大きく分けて以下の2つの項目に要約できる。

### I. 各代謝経路（環2位水酸化反応・側鎖脱メチル化反応）を触媒しているP-450分子種の検討

雄ラット肝ミクロソームにおけるImipramine代謝経路における2種類の代謝反応にそれぞれ関与しているP-450分子種を酵素学的検討から明らかにした。

#### (1) Imipramineおよび2OH-IMI脱メチル化反応

ラット肝ミクロソームでの代謝活性の若齢時の顕著な性差（第2節〔1〕）及び雄ラット肝ミクロソームでの老化にともなう代謝速度の低下（第3節）、および誘導剤処理によっても代謝活性が顕著な影響を受けなかった（第2節〔2〕）ことから、この代謝経路が雄ラット肝臓の主要P-450分子種であるP-450m1によって触媒されていることが推測され、精製P-450分子種を用いた再構成実験およびそれに対する抗体による阻害実験（第4節）から確認された。

#### (2) ImipramineおよびDMI環2位水酸化反応

Debrisoquine型の遺伝的多様性に関連した薬物の代謝活性に対する特異的な阻害剤であるQuinidine、Nortriptyline、Propranololなどを用いた阻害実験より、ラット肝ミクロソームでの代謝活性の遺伝的多様性発現に関与しているP-450分子種であるP-450UT-Hが2位水酸化反応を触媒していることが示唆された（第5節）。

### II. 平行代謝経路間相互作用

上述の知見から明かとなったImipramineの肝代謝経路において、対となる代謝反応を触媒しているP-450分子種間の相同性に起因する相互阻害作用が認められた。これらの相互関係は、ImipramineおよびDMIの消失速度を低下させる方向に作用し、両化合物の体内動態に大きな

影響を及ぼす可能性が十分考えられる。また、in vivo の体内動態を予測できる速度論的モデルの速度式には in vitro 代謝実験の反応初速度から算出された代謝パラメータ ( $K_m$ 、 $V_{max}$ 値)に加え、対となる代謝経路間での相互作用(Parallel Pathway Interaction)を定量的に組み込むことの必要性が示唆された。

### 第3章 ラット肝ミクロソームと遊離肝細胞における In Vitro 代謝パラメータの比較

前章において明らかにされたImipramineの肝臓における代謝反応の kinetics および酵素学的特徴（平行代謝経路間相互作用）は、肝細胞において最も多量にP-450が局在している肝ミクロソームを用いて検討されたものである。肝ミクロソームは、多くの動物種から比較的容易に分画できる生体試料であるため、多くの研究者によって酵素反応を解析する酵素源として用いられているが、ここで得られたデータをin vivo における薬物動態へ外挿する場合には、以下の点が問題となる。

- ①肝ミクロソームを用いた代謝実験系では肝細胞膜（Plasma membrane）の薬物に対する透過障壁が無い。薬物の膜透過がin vivo での代謝消失の律速段階になる可能性がある。
- ②肝ミクロソームを用いた代謝実験では、細胞質液（Cytosol）を欠如しているので、この分画に局在する代謝酵素（グルタチオン抱合、硫酸抱合など）によって代謝される薬物では、その細胞レベルでの消失速度を過小評価する危険がある。また、ミクロソーム膜に局在する酵素が関与する場合でも（グルクロン酸抱合）、Cytosol分画に存在するCofactor（UDPGA）の人為的供給が無いと反応が進行しない。上記の代謝速度の過小評価に加え（Product Inhibition:第2章第6節参照）がある。
- ③肝細胞内の生理的なイオン濃度や、電子供給能力などが代謝反応を律速している可能性がある。

そこで本章では、今後、ImipramineおよびDMIの薬物速度論的モデルの構築を展開するため、肝ミクロソームを用いた代謝実験から得られたin vitro 代謝パラメータおよび代謝反応の特徴を、遊離肝細胞を用いた実験系での実験結果と比較検討し、肝ミクロソームで得られた値をin vivo へ外挿することの妥当性を確認することを目的とした。

### 3-1 遊離肝細胞を用いた代謝実験系での反応条件の確立

遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験系では、肝ミクロソームを用いた実験系とは異なり、P-450 やグルクロン酸抱合酵素活性に必要な電子・Cofactorの供給、2価陽イオン濃度などを人為的に調節する必要が無い。しかし、前章で触れたように、2次代謝物を生成するImipramineの場合では、代謝初速度を評価するための反応時間の設定は、1次代謝物生成初速度を正確に求めるためには、代謝実験系を問わず重要な検討課題である。

#### [実験結果]

Figure 3-1 には、反応時間とImipramineおよびDMIを基質としたときのそれぞれの代謝物生成量の関係を示した。Figure 3-1 から明らかなように、Imipramine及びDMIが基質の場合には、1次代謝物の生成量は、おおよそ30秒までは基質濃度に比例して増加する（生成速度が一定である）ことがわかった。一方、Imipramineからの2OH-DMI（遊離型+グルクロン酸抱合体の合計として計算）の生成は、30秒以内では定量限界以下（DMIおよび2OH-IMI生成量の5%以下）であり、Imipramineからの代謝物はほぼ1次代謝物のみに限定できた。しかし、2OH-DMIの生成は、60秒以降では顕著に増加し、また、ImipramineからのDMI、2OH-IMIの生成も頭打ちの傾向を示した。このことから、肝ミクロソームの場合と同様、遊離肝細胞を用いた *in vitro* 実験でも、30秒を越えた反応時間で得られた1次代謝物の生成量からその生成初速度を計算した場合、反応初速度を過小評価してしまうことが明かとなった。したがって、遊離肝細胞を用いた *in vitro* 実験系でも30秒の反応時間を採用した。

さらに、遊離肝細胞の代謝実験系における反応時間の検討の過程で、Imipramineの2位水酸化代謝物2OH-IMIは、抱合活性の無い肝ミクロソーム実験系とは異なり、0.1~1.5  $\mu$ Mの基質濃度範囲で、その90%以上がグルクロン酸抱合を受けていることが明らかになり（Table 3-1）、2OH-IMIの脱メチル化反応は、肝細胞を用いた実験系では無視できることがわかった。

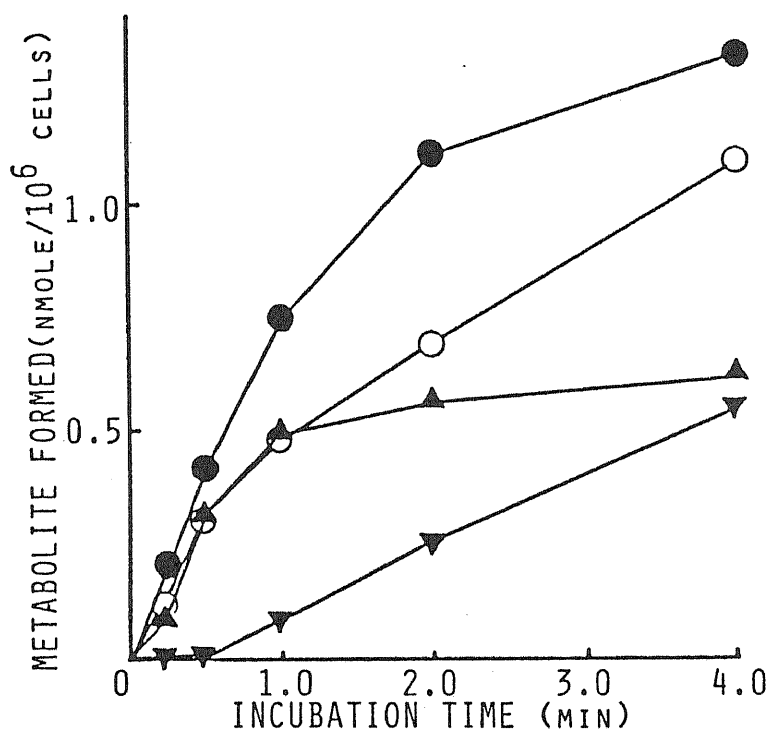


Figure 3-1

TIME COURSES OF FORMATIONS OF DESIPRAMINE, 2OH-IMI [FREE+GLUCURONIDE], AND 2OH-DMI [FREE+GLUCURONIDE] FROM IMIPRAMINE, OR 2OH-DMI [FREE+GLUCURONIDE] FROM DESIPRAMINE IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES.

Key: (●) desipramine; (▲) 2OH-IMI; (▼) 2OH-DMI formed from imipramine; (○) 2OH-DMI formed from desipramine. Incubations were performed in the reaction mixture containing  $1.0 \times 10^6$  cells/ml. The substrate concentration was 10 nmol/ml. Each point represents the mean of 3 determinations.

Table 3-1

GLUCURONIDATION ACTIVITIES FOR 2OH-IMIPRAMINE  
IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES

| Substrate<br>concentration <sup>a</sup> | Glucuronide<br>formed <sup>b</sup> | % conversion from<br>2OH-IMI to its conjugate |
|-----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 0.16                                    | 0.15                               | 91.3                                          |
| 0.44                                    | 0.42                               | 95.5                                          |
| 0.90                                    | 0.86                               | 95.6                                          |
| 1.50                                    | 1.54                               | 103                                           |

<sup>a</sup>Expressed as nmol/ml.

<sup>b</sup>Expressed as nmol glucuronide formed/30 sec.

### 3-2 遊離肝細胞・肝ミクロソーム代謝実験系でのImipramine およびDMIの代謝 kinetics の比較

ImipramineおよびDMIの薬物速度論的モデルに用いる代謝パラメータ ( $K_m$ 、 $V_{max}$ ) および前章で明らかにされた両薬物の2位水酸化経路間の相互作用 (平行代謝経路間相互作用) に関する阻害パターンおよび競合的阻害定数を、肝ミクロソームと遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験から算出した。本節では、

- ①ImipramineおよびDMIの代謝過程が、 $2OH-IMI$ とDMI、また、DMIに関しては $2OH-DMI$ の生成によって、説明できるか。
- ②各代謝経路の代謝物生成速度に関して、肝ミクロソームおよび遊離肝細胞の代謝実験系から得られたパラメータを比較し、肝ミクロソームより得られたパラメータを *in vivo* 代謝速度論的モデルの構築に利用できるかどうか。
- ③前章で明らかにされたImipramine代謝経路内での平行代謝経路間相互作用が肝細胞レベルで確認されるか。また、その阻害形式及び阻害定数の値が細胞レベルでも反映されているか。

以上の点について、若齢雄性ラットから調製された肝ミクロソームおよび遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験より比較検討した。

#### [1] ImipramineおよびDMIの代謝Kinetics

##### [実験結果]

Figure 3-2のA, Bには、肝ミクロソームでの、また、C, Dには遊離肝細胞を用いた代謝実験系でのImipramine代謝 Kinetics を示した。AおよびCは、*in vivo* で問題となる低基質濃度範囲 ( $0.2 - 2.0$  nmol/ml) でのImipramineの消失速度 (●) と、 $2OH-IMI$  (△)、DMI (□) の生成初速度を示した。また、BおよびDには、これらの生成に関するKineticsパラメータをできるだけ正確に算出するために、高基質濃度 ( $37$  nmole/ml) に及ぶ実験の結果を示した。Figure 3-2

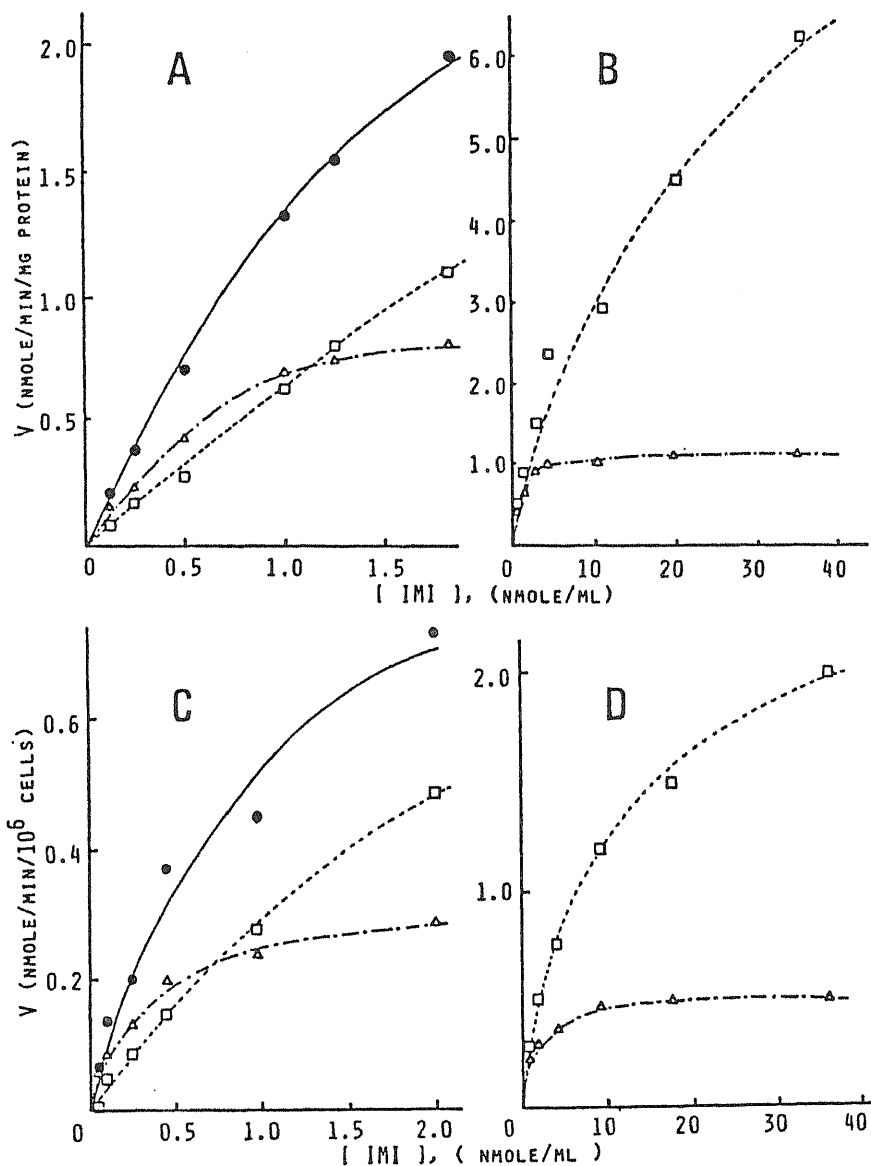


Figure 3-2

EFFECT OF IMIPRAMINE CONCENTRATION ON THE RATES OF DISAPPEARANCE OF IMIPRAMINE AND FORMATIONS OF 2OH-IMI AND DESIPRAMINE IN RAT LIVER MICROSOMES (UPPER) AND ISOLATED RAT HEPATOCYTES (LOWER).

Key: (●) disappearance rate of imipramine; (△) formation of 2OH-IMI; (□) formation of desipramine. Each figure shows the result of one experiment typical of three.

Table 3-2

KINETIC PARAMETERS OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE  
METABOLISM IN RAT LIVER MICROSOMES AND HEPATOCYTES<sup>a</sup>

| Formation              | Preparation <sup>a</sup> | Km <sup>b</sup> | Vmax                     | Vmax'                 |
|------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|
| 2OH-IMI                | M                        | 0.949±0.028     | 1.24±0.06 <sup>c</sup>   | 44.6±2.2 <sup>e</sup> |
|                        | C                        | 0.706±0.042     | 0.526±0.059 <sup>d</sup> | 51.5±5.8 <sup>f</sup> |
| DMI                    | M                        | 11.3±5.12       | 8.03±1.22 <sup>c</sup>   | 289±44 <sup>e</sup>   |
|                        | C                        | 8.19±0.55       | 2.01±0.14 <sup>d</sup>   | 197±14 <sup>f</sup>   |
| 2OH-DMI                | M                        | 0.957±0.084     | 1.26±0.12 <sup>c</sup>   | 45.4±4.3 <sup>e</sup> |
|                        | C                        | 1.45±0.20       | 0.567±0.027 <sup>d</sup> | 55.6±2.6 <sup>f</sup> |
| "Other<br>metabolites" | M                        | 1.92±0.21       | 0.335±0.091 <sup>c</sup> | 12.1±3.3 <sup>e</sup> |
|                        | C                        | 2.38±0.67       | 0.165±0.019 <sup>d</sup> | 16.2±1.9 <sup>f</sup> |

<sup>a</sup>Data were expressed as mean±S.E. of 3 experiments.

Abbreviations used in the table are as follows;

M, microsomes; C, isolated hepatocytes.

<sup>b</sup>Expressed as nmol/ml.<sup>c</sup>Expressed as nmol/min/mg microsomal protein.<sup>d</sup>Expressed as nmol/min/10<sup>6</sup> cells.<sup>e</sup>Vmax obtained for 1.0 mg microsomal protein was extrapolated to the Vmax' value (nmol/min/g liver) by using the mean of the observed value for the P-450 content per gramm of liver [29.7±3.08, mean±S.E., n=3] and the average P-450 content in the microsomes [0.825±0.085 nmol P-450/mg microsomal protein, mean±S.E., n=3] used in this study. The Vmax' was calculated as follows; Vmax'=Vmax x 29.7(nmol P-450/g liver) /0.825 (nmol P-450/mg microsomal protein).<sup>f</sup>Vmax obtained for 1.0 x10<sup>6</sup> cells was extrapolated to the Vmax' value (nmol/min/g liver) by using the reported content of hepatocytes in rat liver [9.8 x 10<sup>7</sup> cells/g liver] (Zahlten, R.N. & Stratman, F.W., 1974). The Vmax' was calculated as follows;Vmax'=Vmax x 9.8 x 10<sup>7</sup> (cells/g liver)/10<sup>6</sup>(cells).

A, C から、Imipramine の消失量は、ほぼその 1 次代謝物の生成量の和となり、本研究で調べた基質濃度範囲では他の代謝物の生成は、無視できることが明かとなった。また、Figure 3-2 B および D から、2 OH-IMI と DMI の生成に参与する P-450 分子種は、それぞれ、high-affinity-low-capacity と low-affinity-high-capacity の対照的な特徴を持つことが認められた。各代謝パラメータを非線形最小自乗法 Simplex を用いて算出した結果を Table 3-2 に示した。両代謝実験系で、DMI 生成の  $K_m$  および  $V_{max}$  値は、2 OH-IMI 生成に関する値の約 10 倍であり、肝ミクロソームでの特徴は遊離肝細胞において良く反映されていることが明かとなった。

同様に、Figure 3-3 A, B には、DMI の消失 (●) および 2 OH-DMI の生成 (△) に関して、肝ミクロソーム (A)、遊離肝細胞 (B) を用いた代謝実験系より調べた結果を示した。両代謝実験系において、DMI の代謝過程は、2 OH-DMI の生成だけでは 70~80 % 程度しか説明することができず、今回調べた代謝物以外の未同定代謝物が生成されていることが明かとなった。したがって、未同定の代謝物の生成を "other metabolites" として、その生成速度を [ (DMI の消失初速度) - (2 OH-DMI の生成初速度) ] として計算した (□)。非線形最小自乗法より算出された代謝パラメータを Table 3-2 に示した。DMI の 2 位水酸化反応の  $K_m$ 、 $V_{max}$  値は、Imipramine の 2 位水酸化反応の値と極めて近い値であった。また、2 OH-DMI および "other metabolites" の生成に関するパラメータは、Imipramine の代謝に関する脱メチル化反応と 2 位水酸化反応の酵素学的特徴と同様であり、また、肝ミクロソームと遊離肝細胞の両代謝実験系で良く一致してした。

#### [考察]

以上の検討から、低基質濃度領域 ( $0.1 \sim 2.0 \mu M$ ) での Imipramine の代謝初速度は、次式で表現されることが明かとなった。

$$\begin{array}{l} \text{Initial velocity} \\ \text{of} \\ \text{imipramine metabolism} \end{array} = \frac{V_{\max,1} \cdot [\text{IMI}]}{K_{m,1} + [\text{IMI}]} + \frac{V_{\max,2} \cdot [\text{IMI}]}{K_{m,2} + [\text{IMI}]} \dots (3-1)$$

同様に DMI に関して、

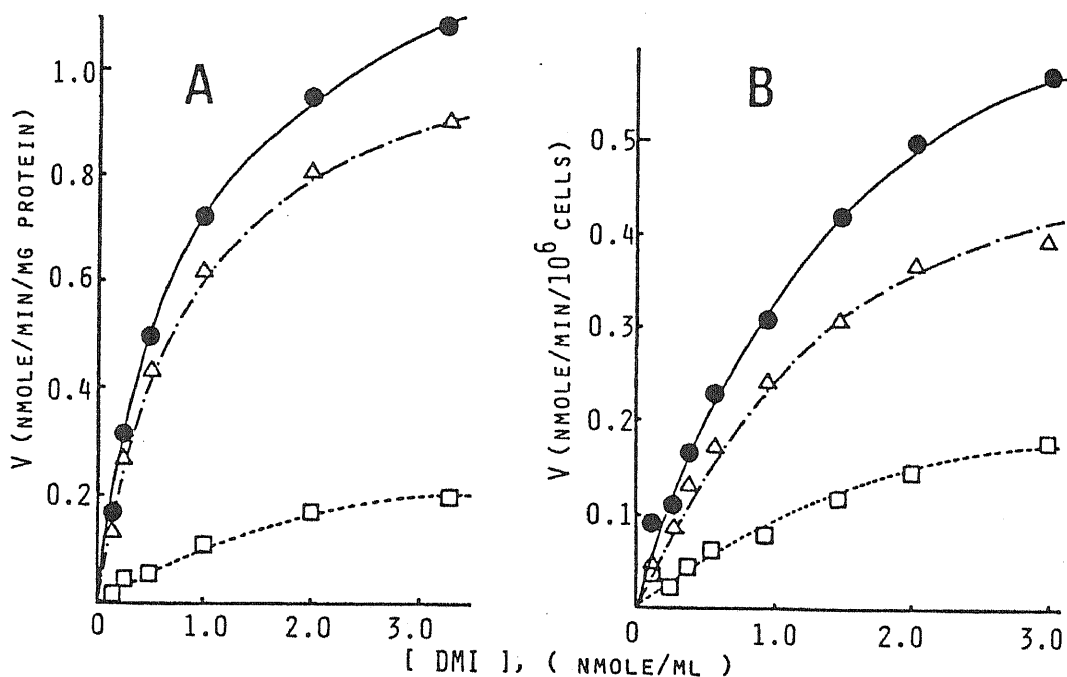


Figure 3-3

EFFECT OF DESIPRAMINE CONCENTRATION ON THE RATES OF DISAPPEARANCE OF DESIPRAMINE AND THE FORMATIONS OF 2OH-DMI AND THE ESTIMATED FORMATION OF "OTHER METABOLITES" IN RAT LIVER MICROSOMES (A) AND ISOLATED HEPATOCYTES (B).

Key:(●) disappearance of desipramine;(△)formation of 2OH-DMI;  
(□) estimated formation of "other metabolites".Each figure shows the result of one experiment typical of three. The formation rates of "other metabolites" were estimated as the rate of difference between disappearance of desipramine and formation of 2OH-DMI.

$$\begin{array}{c} \text{Initial velocity} \\ \text{of} \\ \text{desipramine metabolism} \end{array} = \frac{V_{\max,3} \cdot [\text{DMI}]}{K_{m,3} + [\text{DMI}]} + \frac{V_{\max,4} \cdot [\text{DMI}]}{K_{m,4} + [\text{DMI}]} \dots (3-2)$$

ここで、 $K_{m,1}$ 、 $V_{\max,1}$ ; 2 OH-IMI の生成初速度から算出された代謝パラメータ、 $K_{m,2}$   $V_{\max,2}$ ; DMI の生成初速度から算出された代謝パラメータ、 $K_{m,3}$   $V_{\max,3}$ ; 2 OH-DMI の生成初速度から算出された代謝パラメータ、 $K_{m,4}$   $V_{\max,4}$ ; "other metabolites" 生成初速度から算出された代謝パラメータ、 $[\text{IMI}]$ ; Imipramine の基質濃度、 $[\text{DMI}]$ ; DMI の基質濃度である。

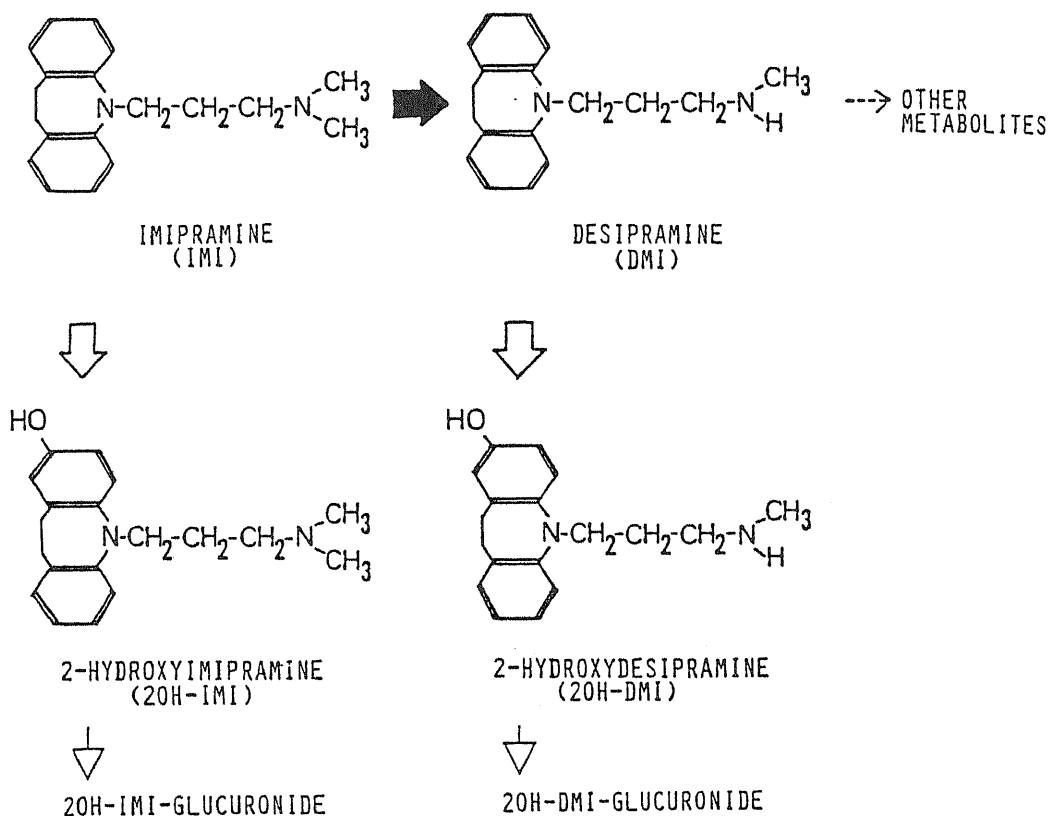
ここまでの検討から、Scheme 1 (序論) で示した Imipramine の代謝経路のうち、Imipramine から生成した 2 OH-IMI の脱メチル化反応は、細胞レベルの系では無視できること (3 章 1 節)、また、DMI の消失には 2 OH-DMI の生成のほか、"other metabolites" の生成を考慮しなければならないことが明らかとなり、生成物において、Imipramine は in vivo において Scheme 3-1 に示した代謝経路に従って代謝されていると考えられた。

## [2] Imipramine と DMI の 2 位水酸化反応経路間の平行代謝経路間相互作用

前章 (第 6 節) の肝ミクロソーム実験から明らかにされた Imipramine の in vitro 代謝反応経路における平行代謝経路間相互作用が、肝細胞レベルにおいて反映されていることを遊離肝細胞の代謝実験系を用いて調べた。

### [実験結果]

Figure 3-4 から明らかなように、肝ミクロソームを用いた実験結果同様、肝細胞においても両代謝経路間には競合的な阻害作用があることがわかった。また、Table 3-3 には、両代謝実験系での平行代謝経路間相互作用に関する代謝パラメータに関する実験結果を対比させて示した。これらのデータから肝ミクロソームでの両 2 位水酸化反応経路間の競合的な阻害定数は、肝細胞においてもほぼ同じ値として再現していることが明かとなった。



Scheme 3-1

MAJOR PATHWAYS OF IMIPRAMINE METABOLISM IN ISO-LATED RAT HEPATOCYTES AND *IN VIVO*.

Closed arrow shows aliphatic N-demethylation, and open arrows, aromatic 2-hydroxylations.

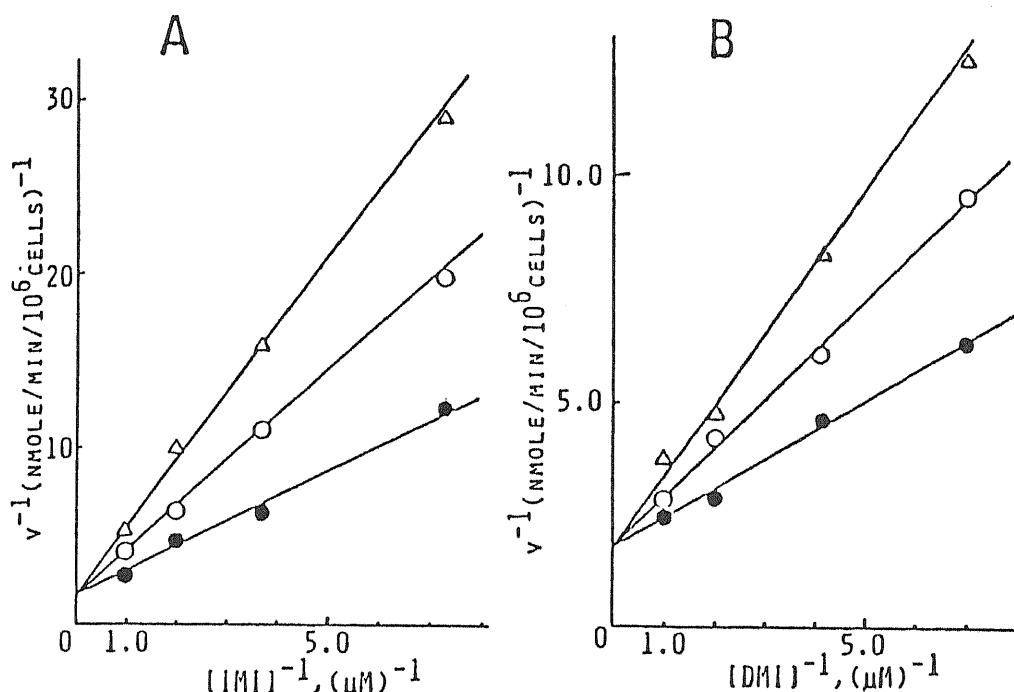


Figure 3-4

PANEL A: LINEWEAVER-BURK PLOTS OF IMIPRAMINE 2-HYDROXYLATION ACTIVITIES IN THE PRESENCE OF DESIPRAMINE IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES.

This shows the result of one experiment typical of three. The solid lines were drawn based on the computer derived parameters ( $K_m=0.91$  nmol/ml,  $V_{max}=0.636$  nmol/min/ $10^6$  cells,  $K_i=0.998$  nmol/ml). Key: (●) control (no desipramine added); (○) 0.83 nmol/ml of desipramine added; (△) 1.65 nmol/ml of desipramine added.

PANEL B: LINEWEAVER-BURK PLOTS OF DESIPRAMINE 2-HYDROXYLATION ACTIVITIES IN THE PRESENCE OF IMIPRAMINE IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES.

This shows the result of one experiment typical of three. The solid lines were drawn based on the computer derived parameters ( $K_m=1.44$  nmol/ml,  $V_{max}=0.603$  nmol/min/ $10^6$  cells,  $K_i=0.897$  nmol/ml). Key: (●) control (no imipramine added); (○) 0.71 nmol/ml of imipramine added; (△) 1.50 nmol/ml of imipramine added.

Table 3-3

MICHAELIS AND INHIBITORY CONSTANTS FOR IMIPRAMINE  
(IMI) AND DESIPRAMINE (DMI) 2-HYDROXYLATION IN RAT  
LIVER MICROSOMES AND ISOLATED HEPATOCYTES<sup>a</sup>

| Reaction <sup>b</sup> | Inhibitor | Prep. <sup>b</sup> | K <sub>m</sub> <sup>c</sup> | K <sub>i</sub> <sup>c</sup> |
|-----------------------|-----------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| IMI 2HL               | DMI       | M                  | 1.21±0.11                   | 0.951±0.110                 |
|                       |           | C                  | 0.787±0.052                 | 1.07±0.04                   |
| -----                 |           |                    |                             |                             |
| DMI 2HL               | IMI       | M                  | 0.992±0.108                 | 1.20±0.10                   |
|                       |           | C                  | 1.44±0.10                   | 0.883±0.021                 |

<sup>a</sup> Data are expressed as mean±SEM of 3 experiments.

<sup>b</sup> Abbreviations used in the table as follows;  
2HL, 2-hydroxylation; Prep., preparation;  
M, microsomes; C, isolated rat hepatocytes.

<sup>c</sup> Expressed in nmol/ml.

[考察]

前節のImipramineおよびDMIの消失速度に関する式(3-1、3-2式)は、生体系において代謝物が生成し共存する場合、それぞれの2位水酸化代謝物の生成初速度が、平行な代謝経路の関係にある基質によって競合的な阻害を受ける式に変更される可能性があることが示された。すなわち、

$$\begin{array}{l} \text{Initial velocity} \\ \text{of} \\ \text{imipramine metabolism} \end{array} = \frac{V_{\max,1} \cdot [\text{IMI}]}{K_{m,1} + \left( \frac{K_{m,1}}{K_I(D)} \right) \cdot [\text{DMI}] + [\text{IMI}]} + \frac{V_{\max,2} \cdot [\text{IMI}]}{K_{m,2} + [\text{IMI}]} \dots (3-3)$$

また、DMIの代謝初速度は、

$$\begin{array}{l} \text{Initial velocity} \\ \text{of} \\ \text{desipramine metabolism} \end{array} = \frac{V_{\max,3} \cdot [\text{DMI}]}{K_{m,3} + \left( \frac{K_{m,3}}{K_I(I)} \right) \cdot [\text{IMI}] + [\text{DMI}]} + \frac{V_{\max,4} \cdot [\text{DMI}]}{K_{m,4} + [\text{DMI}]} \dots (3-4)$$

ここで、 $K_m$ および $V_{\max}$ に関しては(3-1)～(3-2)式と同様であるが、 $K_I(D)$ ; DMIによるImipramine 2位水酸化反応に対する競合的阻害定数、 $K_I(I)$ ; ImipramineによるDMI 2位水酸化反応に対する競合的阻害定数が導入された。

### 3-3 小括

肝ミクロソーム、遊離肝細胞などの *in vitro* 代謝実験系と、肝灌流実験系、*in vivo* での薬物代謝速度を比較検討し、遊離肝細胞を用いた代謝実験の方が、より *in vivo* の値に近い値を与えることが報告されている (Billings et al., 1977; Erickson et al., 1976; Rane et al., 1977; Hayes et al., 1976)。一方、肝ミクロソームを用いた実験系でも、その反応条件を肝細胞レベルでの条件に設定することによって、肝ミクロソーム-遊離肝細胞-*in vivo* の各実験系で良い対応が可能であることが報告されている (Lin et al., 1980)。遊離肝細胞は、細胞固有の代謝条件を有しており、細胞膜の透過障壁の存在など、より *in vivo* に近い条件で *in vitro* 代謝実験が可能である反面、Viability の高い遊離肝細胞を得ることが、特に大型の実験動物 (ヒトを含めて) では困難であるという欠点がある。

一方、肝ミクロソームは、多くの実験者にとって、比較的容易に調製できる生体試料であり、薬物の肝臓での代謝に関するデータの蓄積も大きい。したがって、肝ミクロソームを用いた代謝kineticsが、肝細胞レベルに外挿できることが明らかになれば、多岐にわたる薬物代謝に関する情報が *in vivo* においても反映されていることが期待できる。Imipramine およびDMIの代謝に関して、本章の比較実験から明らかにされたように、肝ミクロソーム-遊離肝細胞間で、その代謝パラメータの良い対応および代謝反応上の特徴 (平行代謝経路間相互作用) の対応が確認され、前章での *in vitro* 代謝反応の特徴 (性差、年齢差、誘導剤の影響など) は、*in vivo* でも反映されている可能性が示唆された。また、Imipramine およびDMIの2位水酸化反応間での競合的阻害作用が肝細胞レベルで確認されたことから、*in vivo* において両基質が共存する場合には、反応初速度から評価される両水酸化代謝速度では、両基質の消失速度を過大評価することになり、*in vivo* での速度論的モデルの構築には、この阻害関係を組み込むこと (3-3 および 3-4 式) の必要性が確認された。一方、肝ミクロソームで確認された脱メチル化反応間の競合的阻害関係は、イミプラミンから生成した2OH-IMIが90%以上抱合を受けてしまう (Table 3-1) ことから、この経路での平行代謝経路間相互作用は、細胞レベルで無視できることが新たに知見として得られた。

## 第4章 非線形体内動態を示すImipramineと活性代謝物 DMI の速度論的モデル

既に序論で述べたように、本研究の最終目的は細胞分画レベルでの代謝実験系から得られた薬物代謝活性のデータを用いて、Whole body (in vivo) レベルでの体内動態を解析・予測できる速度論的モデルの構築である。三環系抗うつ薬Imipramineの場合、Imipramineから生成するDMIは、Imipramineと同様の向精神作用をもつ活性代謝物である。従って、Imipramineの薬効を予測する場合、Imipramine自身だけではなく、DMIの体内動態もTDM (Therapeutic Drug Monitoring; 効果的治療を目指した薬物血中濃度モニタリング) において考慮すべきであることが指摘されている (Gram et al., 1975; Potter et al., 1981; Sutfin et al., 1984)。このことから、本研究で目指す速度論的モデルは、Imipramine投与時のImipramineおよびDMI 両薬物の血中濃度及び臓器内濃度 (特に標的器官としての脳内濃度) を同時に予測できるモデルでなければならない。

一般に、薬物を単回投与した場合、血中薬物濃度は時間の関数として表現され、体内の各臓器、組織中薬物濃度も時間とともに変化する。一方、定速注入による投与では時間の経過とともに、体内の各部分の薬物濃度はいずれの部分もそれぞれ特有の一定値 (変化速度は0) となる。この時、体内動態は定常状態 (Steady-State) に達していると呼ばれる。定常状態では、[体内の薬物注入速度] = [体内からの薬物消失速度] の関係が成立しているので、薬物消失の無い臓器は、注入速度への寄与を考慮する必要がない。このことは、定常状態での体内動態の数式的取扱は、非定常状態での取扱に比べてきわめて簡単になることを意味している。本章では、ImipramineおよびDMI の速度論的モデル構築の方法として、in vitro代謝実験より得られた代謝パラメータがin vivo 定常状態での速度論式に適用できるかを目的とした。

#### 4-1 Imipramineの門脈内定速注入実験

薬物の投与計画を立てる上で特に問題となる体内動態は、投与量（速度）に対して（定常状態）血中薬物濃度が非線形に変化することである。Figure 4-1 にはヒトで報告されているImipramineの経口からの反復服用時の服用量とImipramine、DMI 定常状態血中濃度の関係を文献（Brosen et al., 1986）より転載した。Figure 4-1 から明らかなように、Imipramine服用時の定常状態Imipramine、DMI 濃度はImipramine服用量に対して、明かな非線形性を示している。また、この非線形性はDMIの方がより顕著であった。

Imipramineの場合、代謝物DMIも薬効を持つため、投与されたImipramineのみならず、DMIがImipramine投与量に対して非線形に変動すると、その薬効・副作用をコントロールして投与計画を立てることが困難になる。したがって、両薬物の体内動態を同時に予測できる速度論的モデルが得られれば、臨床でのImipramineおよびDMIの体内動態を理解することに大きく貢献できるものと思われる。

そこで、ヒトにおいて認められたこれらの関係・特徴がモデル動物においても再現されることを確かめるため、本節では、若齢雄性ラットを用いて実験を行なった。

##### [実験結果]

薬物投与方法として、投与速度が定量的に規定できる定速注入法を採用し、投与経路として経口投与に相当する門脈内投与を行なった。Figure 4-2 には、門脈内への定速注入持続時間とImipramineおよびDMIの血中濃度の関係を示した。Figure から明らかなようにImipramineおよびDMI血中濃度は、5～5.5時間の持続注入によって、ほぼ定常状態に達することが明かとなった。したがって、以後の実験結果における定常状態血中濃度は6、6.5、7時間の血中濃度の平均値とした。Figure 4-3 には、この時の注入時の注入速度と定常状態ImipramineおよびDMI濃度の関係を示した。図から明らかなように、Imipramineの定

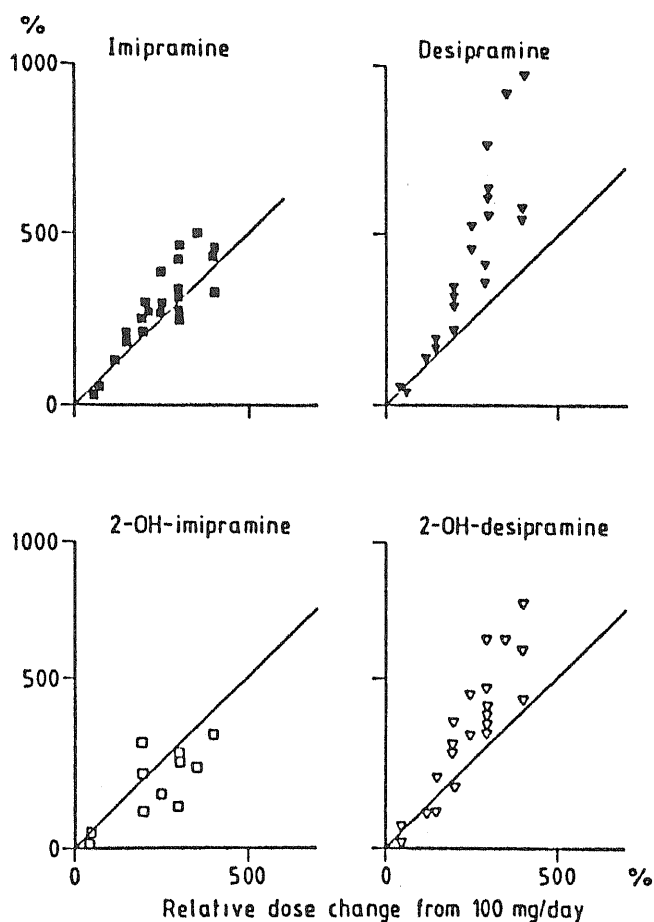


Figure 4-1

Changes in plasma levels of imipramine and its metabolites during administration of different doses of imipramine. *Ab-scissa:*  $(\text{dose}/100 \text{ mg}) \times 100\%$ . *Ordinate:*  $(\text{observed plasma concentration}/\text{plasma concentration at } 100 \text{ mg imipramine per day}) \times 100\%$ . (2-OH-imipramine concentration was not measurable in all patients at 100 mg/day)

(Brøsen K. et al., 1986)

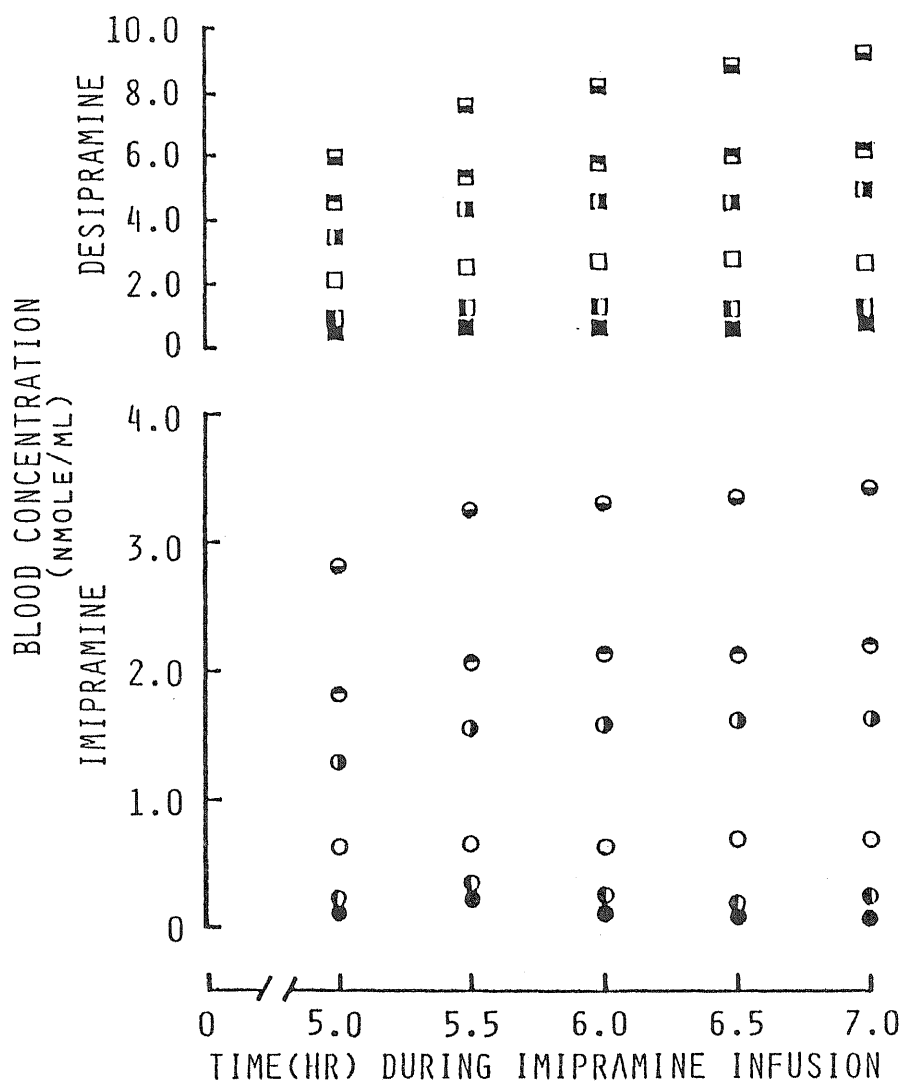


Figure 4-2

MEAN BLOOD CONCENTRATIONS VS. TIME PROFILE FOR IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE DURING INTRAPORTAL INFUSION OF IMIPRAMINE.

Mean blood concentrations of imipramine (circles) and desipramine (squares) were determined during the rate of imipramine infusion of 25 (●,■), 50 (◐,◑), 100 (○,□), 150 (◑,◐), 200 (◐,◑), and 250 (◑,◐) nmol/min.

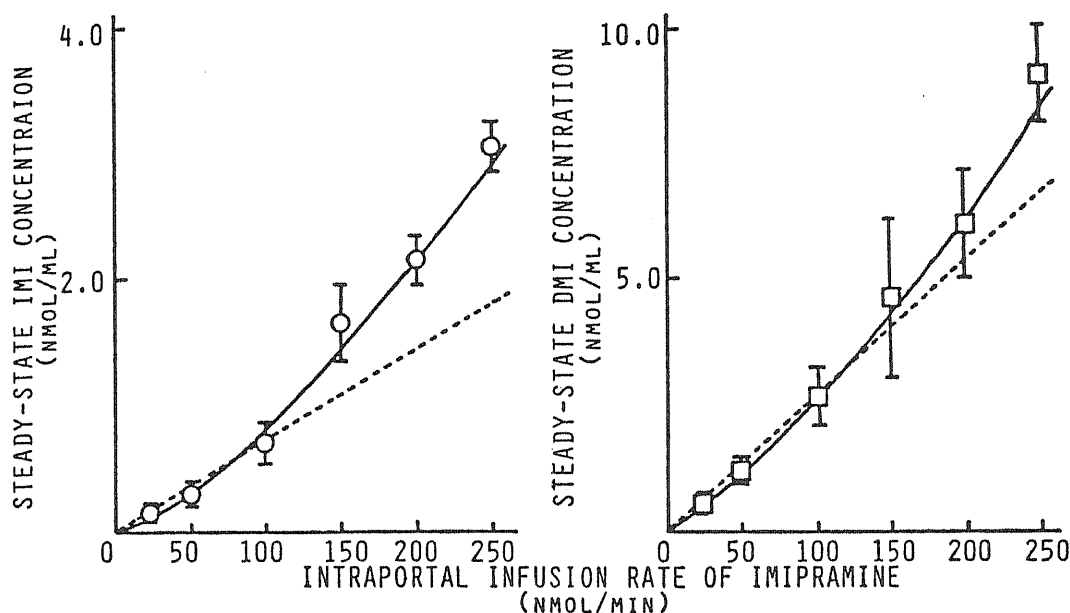


Figure 4-3

#### EFFECT OF THE RATE OF INTRAPORTAL INFUSION OF IMIPRAMINE ON THE STEADY-STATE IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE CONCENTRATIONS.

Steady-state concentrations of imipramine and desipramine were determined during the various rate of intraportal imipramine infusion. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 3~4 rats. The solid curves and broken lines were best-fit ones obtained from nonlinear regression analysis using equations  $y=A \cdot x^B$  and  $y=A \cdot x$ , respectively. In these equations,  $x$  represents the infusion rate of imipramine, and  $y$ , steady-state concentrations of imipramine and desipramine. The best-fit equations for imipramine are  $y = 0.00158x^{1.36}$  (AIC = -8.3) and  $y = 0.00730x$  (AIC = 11.0) and those for desipramine are  $y = 0.0134x^{1.16}$  (AIC = -19.2) and  $y = 0.0271x$  (AIC = -8.8).

速注入速度と定常状態血中濃度の関係は非線形であった。

## 4-2 ImipramineおよびDMIの胆汁中排泄および尿中排泄

本章のはじめですでに言及したように、定常状態では、薬物の投与速度（ $I$ ）は体内からの薬物消失速度と等しくなる。すなわち、代謝、胆汁中排泄および尿中排泄によって体内から消失する薬物では、

$$I = R_M + R_B + R_U \quad \cdots (4-1)$$

が成り立つ。ここで、 $R_M$ 、 $R_B$ 、 $R_U$ はそれぞれ代謝(Metabolism)、胆汁中排泄(Biliary Excretion)、尿中排泄(Urinary Excretion)による消失速度を示している。したがって、定常状態での質量保存式を基にImipramineおよびDMIの速度論的モデルをつくる第一段階は、投与速度（すなわち、全消失速度）のうち、胆管、腎臓の排泄経路を経由するImipramineおよびDMIを測定しなければならない。そこで、ImipramineあるいはDMIを静脈内に、投与速度を変えて定速注入し、採取した胆汁および尿中から回収されたImipramineとDMIの量を用いてこれらの経路による消失過程の寄与を調べた。

### [実験結果・考察]

Imipramine およびDMIの胆汁中および尿中排泄率をTable 4-1に示した。ImipramineおよびDMIの胆汁中および尿中排泄速度の投与速度に対する割合の和は、それぞれ、1.5%以下であり、これらの経路によって、両薬物が消失する過程は無視できる（ $R_M = R_U = 0$ ）ことが明かとなった。すなわち、（4-1）式は、

$$I = R_M \quad \cdots (4-2)$$

と表現され、前節で確認されたImipramine門脈内投与時のImipramineおよびDMIの非線形性は代謝消失過程に起因していることが明かとなった。

Table 4-1

URINARY AND BILIARY EXCRETIONS OF  
IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE<sup>a</sup>

| Compound   | IR <sup>b</sup> | BER <sup>c</sup> | BER/IR           | UER <sup>d</sup> | UER/IR           |
|------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Imipramine | 25              | 0.186<br>(0.064) | 0.745<br>(0.256) | 0.083<br>(0.020) | 0.332<br>(0.081) |
|            | 50              | 0.574<br>(0.229) | 1.150<br>(0.600) | 0.205<br>(0.004) | 0.409<br>(0.009) |
|            | 100             | 1.010<br>(0.540) | 1.010<br>(0.540) | 0.291<br>(0.009) | 0.291<br>(0.009) |
|            | 150             | 1.400<br>(0.560) | 0.931<br>(0.375) | 0.579<br>(0.090) | 0.386<br>(0.060) |
|            | 25              | 0.049<br>(0.007) | 0.198<br>(0.016) | 0.107<br>(0.018) | 0.428<br>(0.072) |
|            | 50              | 0.242<br>(0.042) | 0.484<br>(0.028) | 0.170<br>(0.028) | 0.340<br>(0.056) |
|            | 75              | 0.297<br>(0.134) | 0.440<br>(0.018) | 0.430<br>(0.045) | 0.573<br>(0.061) |
|            | 130             | 0.161<br>(0.010) | 0.124<br>(0.009) | 1.400<br>(0.060) | 1.080<br>(0.050) |

<sup>a</sup> Data are expressed as mean(+S.E.) of 3 experiments.

<sup>b</sup> Intravenous infusion rate of imipramine or desipramine, nmol/min.

<sup>c</sup> Biliary excretion rate of imipramine or desipramine, nmol/min.

<sup>d</sup> Urinary excretion rate of imipramine or desipramine, nmol/min.

#### 4-3 ImipramineおよびDMIの血漿中非結合率および 血漿／血中薬物濃度比

前節の実験結果から、本章第1節で示された門脈内Imipramine投与速度と定常状態Imipramine・DMI濃度の非線形な関係 (Figure 4-3) は、主に肝臓における代謝消失過程に起因していることが明らかとされた。薬物が門脈内に投与された場合、定常状態における血中薬物濃度 ( $C_{ss}$ ) は、その薬物の投与速度 ( $I$ )、血中非結合率 ( $f_B$ ) および遊離型薬物に対する (遊離型) 肝固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を用いて、

$$C_{ss} = \frac{I}{f_B \cdot CL_{int}} \quad \dots(4-3)$$

(4-3) 式で表わされる。本式は (4-2) 式での肝代謝速度  $R_M$  を  $f_B \cdot CL_{int} \cdot C_{ss}$  で置き換えることによって誘導された。したがって、ImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度のImipramineの投与速度に対する非線形な上昇は、 $f_B \cdot CL_{int}$  の値の変動が要因であると考えられる。ここで、 $CL_{int}$  はMichaelis-Menten 式と関連付けられ、肝臓における代謝能力を意味している (Rane et al., 1977)。一方、 $f_B$  は血漿中の非結合率 ( $f_p$ ) と血漿－血中薬物濃度比 (PB ratio: Plasam-to-blood concentration ratio) の積として計算される値である。そこで、本節では、代謝過程のモデルの計算に必要なImipramine・DMIの血中非結合率を算出した。また、ImipramineあるいはDMIのみをラット血液に添加し、測定したin vitro実験値と、本章第1節での門脈内定速注入実験を行なった際に採取した血液でのex vivo実験値を比較することにより、結合に関する相互作用の有無を検討した。

##### [実験結果]

Figure 4-4 には、ImipramineおよびDMIの血漿－血中薬物濃度比 (左図)、血漿中非結合率 (右図) を、血中あるいは血漿中薬物濃度を変化させ測定した結果を示した。また、得られた値をTable 4-2 に示した。Figure 4-4 から、両薬物の各パラメータはそれぞれの血中あるいは血漿中薬物濃度に対して、ほぼ一定であった。また、in vitro 実験での値 (●、■) と ex vivo 実験での値 (○、□) は、ほぼ同じ

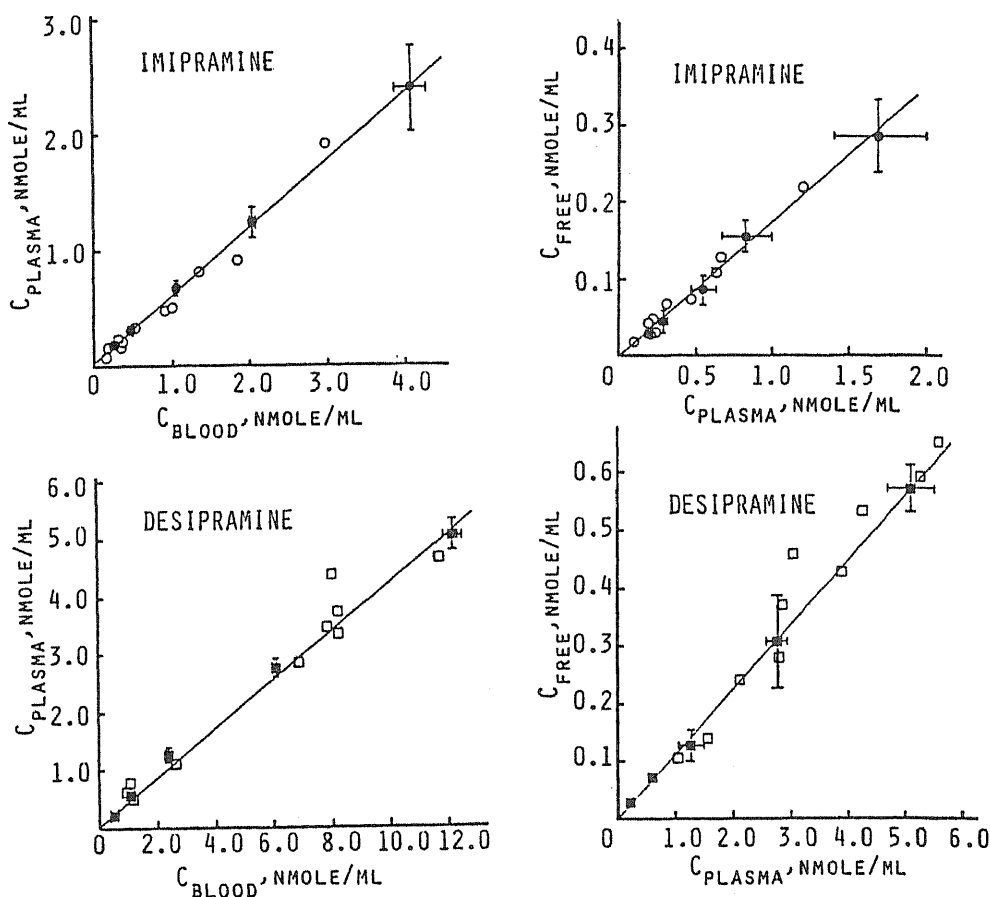


Figure 4-4

#### PLASMA-TO-BLOOD CONCENTRATION RATIO AND FREE FRACTION IN PLASMA OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE.

The relationships between whole blood and plasma concentrations (left panels) and those between plasma and free concentrations (right panels) of imipramine (upper panels) and desipramine (lower panels) were determined. Each solid line is the best linear regression fit to the in vitro data. Key: (○, □) data obtained from ex vivo studies; (●, ■) data obtained from in vitro studies.

Table 4-2

PLASMA-TO-BLOOD CONCENTRATION RATIO AND FREE FRACTIONS OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE IN BLOOD OBTAINED FROM *IN VITRO* AND *EX VIVO* EXPERIMENTS<sup>a</sup>

| Compounds | Experiment      | $C_p/C_b^b$ | $f_p^c$ | $f_B^d$             |
|-----------|-----------------|-------------|---------|---------------------|
| IMI       | <i>in vitro</i> | 0.544       | 0.186   | 0.107 <sup>e</sup>  |
|           |                 | (0.029)     | (0.016) | (0.007)             |
|           | <i>ex vivo</i>  | 0.566       | 0.193   | 0.107               |
|           |                 | (0.025)     | (0.009) | (0.005)             |
| <hr/>     |                 |             |         |                     |
| DMI       | <i>in vitro</i> | 0.443       | 0.119   | 0.0544 <sup>e</sup> |
|           |                 | (0.015)     | (0.007) | (0.0027)            |
|           | <i>ex vivo</i>  | 0.450       | 0.117   | 0.0535              |
|           |                 | (0.024)     | (0.005) | (0.0032)            |

<sup>a</sup> Data are expressed as mean ( $\pm$ S.E.).

<sup>b</sup> Plasma-to-blood concentration ratio.

<sup>c</sup> Free fraction in plasma.

<sup>d</sup> Free fraction in blood calculated from the equation,  $f_B = C_p/C_B \times f_p$ .

<sup>e</sup> Data used for the simulation studies (see Table 4-3).

であり (Table 4-2)、今回調べた血中薬物濃度範囲 (Imipramine:0.1-4.0;DMI:0.2-12 (nmole/ml)) では、両薬物の血漿蛋白結合に関する相互作用は確認されなかった。

#### [考察]

ImipramineおよびDMIは、血漿中において、血漿タンパク質であるアルブミンや $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質 (AGP) と結合していることが知られている (Borgaetal.,1977;Piafskyetal.,1977;Javaidetal.,1982;Freilich & Giardina,1984;Schley et al.,1985;Suzuki et al.,1985)。とくに、AGPは、ImipramineやDMIなどの塩基性薬物と高い親和性で結合し (Piafsky, 1980; Pike et al.,1981;Reidenberg & Drayer,1984)、また、この結合サイトは多くの塩基性薬物で共通しており、薬物間で結合を競合することが報告されている (Muller & Stillbauer,1983;Brunner & Muller,1987)。したがって、ImipramineおよびDMIがin vivoにおいて血中に共存する場合、お互いに血漿中非結合率に影響を与えている可能性がある。また、その結合容量が低い場合、in vivoで問題となる血漿中薬物濃度で、非線形な結合を示す可能性も考えられる。しかし、本節での実験結果からは今回調べた濃度範囲ではこれらの可能性を否定することができ、(4-3)式における $C_{ss}$ とIとの非線形な関係は、 $f_b$ の変動に起因するものではなく、薬物代謝能力 (遊離型薬物に対する肝固有クリアランス) 本来の性質に基づくものであると結論された。

#### 4-4 Imipramine門脈内定速投与時のImipramineおよびDMIの 定常状態血中濃度を同時予測できる速度論的モデル

前節までの実験結果よりImipramineおよびDMIのin vivo体内動態は、その肝臓における代謝能力を反映したものであることが明かとなった。本節では、本章第1節で調べたImipramineの門脈内定速注入速度と定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度の非線形な関係(Figure 4-3)を予測できる速度論的モデル、すなわち、Imipramineの門脈内投与速度から定常状態ImipramineおよびDMI濃度を計算できる速度論的モデルの構築を行なった。

##### [1] 速度論的モデルと速度式の誘導

肝臓内での代謝消失に関与する基質濃度は、肝流出液中の非結合型薬物濃度に等しいと仮定できる場合\*1、定常状態下でのImipramineの門脈内投与速度(R)と肝流出液中血中濃度( $C_{out}^{IMI}$ )の関係は、(4-3)式での $C_{ss}$ を $C_{out}^{IMI}$ で置き換えることによって、

$$R = CL_{int}^{IMI} \cdot f_B \cdot C_{out}^{IMI} \quad \dots(4-4)$$

で表わされる。 $f_B$ はImipramineの血中非結合率、代謝に関与する基質濃度は、 $f_B \cdot C_{out}^{IMI}$ である。また、薬物が門脈内に定速注入されたときの定常状態血中濃度( $C_{ss}$ )は、その肝流出液中濃度( $C_{out}$ )と等しいので(Wagner,1985)、(4-4)式は、次の(4-5)式によって表現される。

$$R = CL_{int}^{IMI} \cdot f_B \cdot C_{ss}^{IMI} \quad \dots(4-5)$$

---

\*1 肝臓内での薬物濃度は肝臓を一つの良く攪拌されたタンクと仮定した "Well-Stirred Model(Pang & Rowland,1977)" で良く説明できることが多くの薬物において報告されている(Pang & Rowland, 1977; Ahmad et al., 1983; Jones et al., 1984; Edwards et al., 1984)。本研究ではImipramineおよびDMIの肝内動態にこのモデルが適用できると仮定した。

ここで、 $CL_{int}^{IMI}$  はImipramineの代謝消失に関する肝固有クリアランスである。また、定常状態では、(薬物投与速度) = (薬物の全消失速度)の関係が成り立つので、 $R$  はImipramineの全代謝消失速度と等しくなる。

In vivo で観測された肝固有クリアランス ( $CL_{int,in vivo}^{IMI}$ ) の非線形性は、任意の個数のミカエリス-メンテン式で表現される。

$$CL_{int,in vivo}^{IMI} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i,in vivo}^{IMI}}{K_{m,i,in vivo}^{IMI} + f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} \quad \dots(4-6)$$

ここで、 $K_{m,i,in vivo}^{IMI}$  および  $V_{max,i,in vivo}^{IMI}$  は、in vivo代謝パラメータである。同様にDMIの in vivo 生成速度 ( $V_{2,in vivo}$ ) と消失速度の間にも次の関係が成り立つ。

$$V_{2,in vivo} = \left( \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i,in vivo}^{DMI}}{K_{m,i,in vivo}^{DMI} + f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} \right) \cdot f_B \cdot C_{ss}^{DMI} \quad \dots(4-7)$$

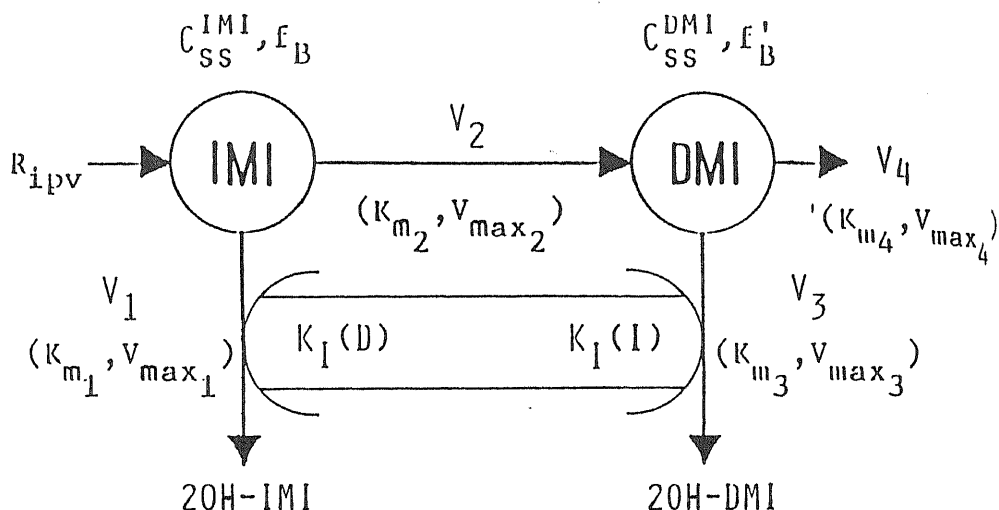
一方、全章までのin vitro代謝実験の研究結果からImipramineの代謝消失速度は、環2位水酸化反応と脱メチル化反応の代謝速度の和で表現される (3-3式)。したがって、Imipramineに対するin vitro 肝固有クリアランス ( $CL_{int,in vitro}^{IMI}$ ) は、

$$CL_{int,in vitro}^{IMI} = \frac{V_{max,1}}{K_{m,1} + \frac{K_{m,1}}{K_I(D)} f_B \cdot C_{ss}^{DMI} + f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} + \frac{V_{max,2}}{K_{m,2} + f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} \quad \dots(4-8)$$

が成立する。さらに、定常状態では、中間代謝物の生成と消失に関して (代謝物の生成速度) = (代謝物の消失速度) が成立しているので、DMIの生成速度を  $V_2$  とすると、前章 (3-4) 式から、

$$V_2 = \frac{V_{max,3} \cdot f_B \cdot C_{ss}^{DMI}}{K_{m,3} + \frac{K_{m,3}}{K_I(I)} f_B \cdot C_{ss}^{IMI} + f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} + \frac{V_{max,4} \cdot f_B \cdot C_{ss}^{DMI}}{K_{m,4} + f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} \quad \dots(4-9)$$

が成立する。Scheme 3-1 に基づいたモデルスキームを Scheme 4-1 に示した。(4-8) および (4-9) 式と Scheme 4-1 を構成する各代謝パラメータの意味は Scheme 4-1 の下に載せた。ここで仮に、in vitro での代謝パラメータがそのまま in vivo に適用できるとした



Scheme 4-1

KINETIC MODEL FOR IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE  
ELIMINATION WITH "PARALLEL PATHWAY INTERACTION"

Nomenclature for Scheme 4-1

---

|                |                                                                                                                       |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $R_{ipv}$      | Intraportal infusion rate of imipramine, nmol/min.                                                                    |
| $C_{ss}^{IMI}$ | Steady-state concentration of imipramine, nmol/ml.                                                                    |
| $C_{ss}^{DMI}$ | Steady-state concentration of desipramine, nmol/ml.                                                                   |
| $f_B$          | Free fraction of imipramine in blood.                                                                                 |
| $f'_B$         | Free fraction of desipramine in blood.                                                                                |
| $V_1$          | Saturable rate ( $V_{max_1}$ ; nmol/min, $K_{m_1}$ ; nmol/ml) of conversion from imipramine to 2-hydroxyimipramine.   |
| $V_2$          | Saturable rate ( $V_{max_2}$ ; nmol/min, $K_{m_2}$ ; nmol/ml) of conversion from imipramine to desipramine.           |
| $V_3$          | Saturable rate ( $V_{max_3}$ ; nmol/min, $K_{m_3}$ ; nmol/ml) of conversion from desipramine to 2-hydroxydesipramine. |
| $V_4$          | Saturable rate ( $V_{max_4}$ ; nmol/min, $K_{m_4}$ ; nmol/ml) of conversion from desipramine to "other metabolites".  |
| $K_I(I)$       | Constant for competitive inhibition of desipramine 2-hydroxylation by imipramine, nmol/ml.                            |
| $K_I(D)$       | Constant for competitive inhibition of imipramine 2-hydroxylation by desipramine, nmol/ml.                            |

---

場合、4-8 および 4-9 式をそれぞれ 4-6 および 4-7 式に代入して、

$$CL_{int,in vivo}^{IMI} = \frac{V_{max,1}}{K_{m,1} + \frac{K_{m,1}}{K_I(D)} \cdot f_B' \cdot C_{ss}^{DMI} + f_B' \cdot C_{ss}^{IMI}} + \frac{V_{max,2}}{K_{m,2} + f_B' \cdot C_{ss}^{IMI}} \dots (4-10)$$

$$V_{2,in vivo} = V_2 = \frac{V_{max,3} \cdot f_B' \cdot C_{ss}^{DMI}}{K_{m,3} + \frac{K_{m,3}}{K_I(I)} \cdot f_B' \cdot C_{ss}^{IMI} + f_B' \cdot C_{ss}^{DMI}} + \frac{V_{max,4} \cdot f_B' \cdot C_{ss}^{DMI}}{K_{m,4} + f_B' \cdot C_{ss}^{DMI}} \dots (4-11)$$

と式を立てられ、R に対する  $C_{ss}^{IMI}$  と  $C_{ss}^{DMI}$  を Bi-section 法より計算することが可能である（本節 [2] および [3] 参照）。

以下の小節では、肝ミクロソーム実験より得られた代謝パラメータを用いたシミュレーションと実測値の関係から、in vitro 代謝パラメータが in vivo に適用できるかの検討を行なった。

## [2] In vitro 代謝実験から得られたパラメータの in vivo に適用できるパラメータへの変換

本節 [1] で構築されたモデルに対する式（4-10 および 4-11 式）に代入する in vitro 代謝パラメータは、対象実験動物の全肝臓当りの活性に変換したものでなければならない。そこで本小節では常法によりパラメータ値の変換を行なった結果を示した。

### [実験結果]

代謝パラメータの  $V_{max}$  値について変換した。ここで、肝ミクロソーム 1 mg たんぱく質当りの  $V_{max}$  値は、本研究で用いられた肝ミクロソームでの 1 mg たんぱく質当りの P-450 含量 ( $0.825 \pm 0.085$ , mean  $\pm$  S.E. [nmol P-450/mg microsomal protein]) と、肝ホモジネート 1 g 当りの含量 ( $29.7 \pm 3.08$ , mean  $\pm$  S.E. [nmol P-450/g liver]) をもとに次式によって肝臓 1 g 当りの  $V_{max}$  値 ( $V_{max}'$ ) に外挿される (Sugita et al., 1981; Igari et al., 1982)。

$$\begin{aligned} V_{max}' &= \left( \frac{\text{nmole}}{\text{min} \cdot \text{mg microsomal protein}} \right) \cdot \left( \frac{\text{nmole P-450}}{\text{g liver}} \right) \cdot \left( \frac{\text{mg microsomal protein}}{\text{nmole P-450}} \right) \\ &= V_{max} \cdot 29.7 \cdot \left( \frac{1}{0.825} \right) \end{aligned}$$

実際には、4章1節でImipramineの門脈内投与速度と定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度の関係を調べたラットでの平均肝重量(7.7 g)でさらに $V_{max}'$  値を肝全体の値に補正した。

一方、 $K_m$ および $K_i$ 値に関しては、肝細胞内での非結合型薬物濃度が、肝流出液中の非結合型薬物濃度に等しく、この濃度が、代謝反応の基質濃度になる前述の"Well-Stirred Model"を仮定しているの、in vitro代謝Kineticsを行なった際の反応液中での肝ミクロソームへの結合を補正する必要がある。Figure 4-5には、反応液中の薬物濃度と非結合型薬物濃度の関係を示した。非結合率は濃度に依存せず一定であり、その傾きから算出された非結合率は、Imipramineで 0.453、DMIで 0.409であった。したがって、in vitro代謝Kineticsから得られた Michaelis定数 ( $K_m$ 値) は次式を用いて in vivo での  $K_m$ 値 ( $K_m'$ ) に補正される。

$$\begin{aligned} \text{Imipramine: } K_m' &= 0.453 \times K_m \\ \text{DMI: } K_m' &= 0.409 \times K_m \quad \cdot \cdot (4-12) \end{aligned}$$

Table 4-3 には、(4-12) 式に基づき第3章のTable 3-2 ~ 3-3 に示した肝ミクロソームの代謝Kineticsから得られた代謝パラメータを in vivo 速度論的モデルに代入できる値に補正した値を示した。Table には、(4-3) 節で求めた Imipramine 及びDMIの血中非結合率を併せて載せた。これらの値は、前節のモデル式 (4-10 および 4-11 式) に代入され次節でのシミュレーションに使用した。

### [3] シミュレーションと実測値との比較

#### [実験結果・考察]

Figure 4-6 には、(4-10) ~ (4-11) 式に in vitro 代謝実験より得られた代謝パラメータを代入して計算されたImipramineの門脈内定速注入実験でのImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度のシミュレーションカーブと4章1節で調べた実測値との関係を示した。実線(—)は2位水酸化反応間に平行代謝経路間相互作用を考慮した場合、また、破線(··)は(4-9)式及び(4-10)式において平

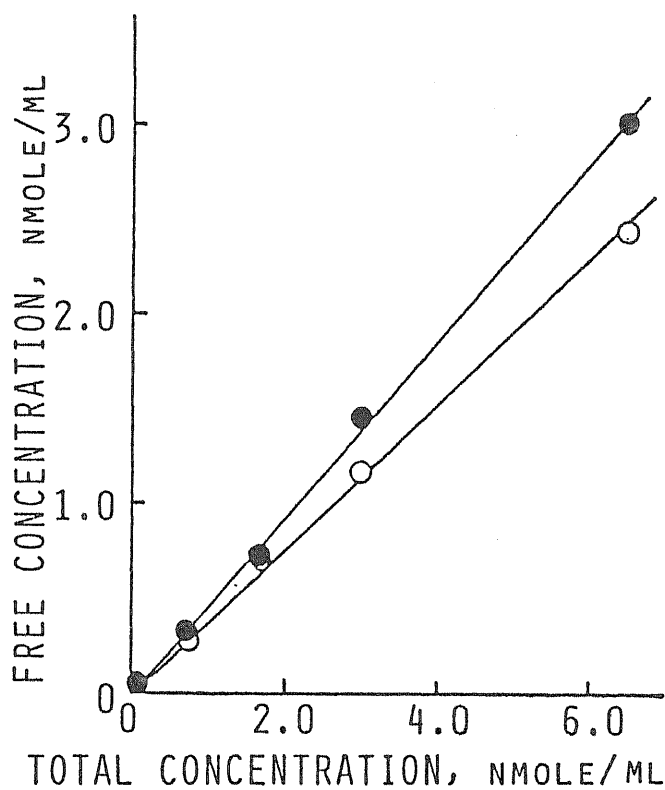


Figure 4-5

NONSPECIFIC BINDING OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE TO RAT LIVER MICROSOMES.

Each figure show a typical result of 3 experiments.

Key:(●)imipramine; (○) desipramine.

Table 4-3

## PARAMETERS USED FOR SIMULATION

|                  |                   |                        |
|------------------|-------------------|------------------------|
| $Km_1 = 0.430^a$ | $Vmax_1 = 343^b$  | $Km_1/K_I(D) = 1.07^c$ |
| $Km_2 = 5.12^a$  | $Vmax_2 = 2225^b$ | $Km_3/K_I(I) = 1.05^c$ |
| $Km_3 = 0.391^a$ | $Vmax_3 = 350^b$  | $f_B = 0.107^d$        |
| $Km_4 = 0.785^a$ | $Vmax_4 = 93^b$   | $f_B' = 0.0544^d$      |

- <sup>a</sup> Data were obtained from Table 3-2. Correction for nonspecific binding to microsomal reaction mixture was made (see text). Expressed as nmol/ml.
- <sup>b</sup> Data were obtained from Table 3-1, and were extrapolated to whole liver value by multiplying average liver weight (7.7 g) used in the studies (Figure 4-2).
- <sup>c</sup> Average of the ratio of Michaelis constant of inhibited pathway to the competitive inhibition constant in individual samples (see Table 3-3).
- <sup>d</sup> Free fraction of imipramine and desipramine in blood obtained from *in vitro* study (see Table 4-2).

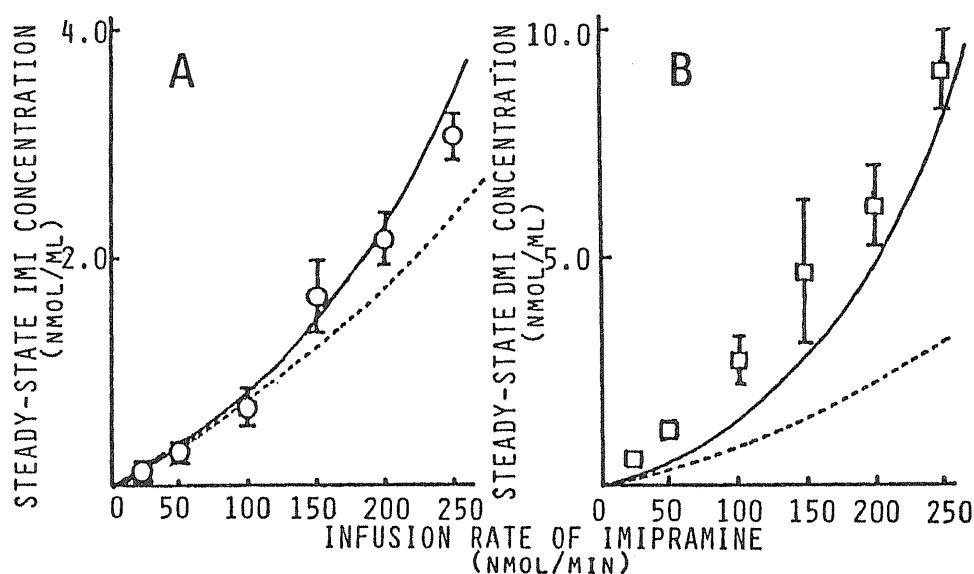


Figure 4-6

SIMULATIONS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE INTRAPORTAL INFUSION RATE OF IMIPRAMINE AND STEADY-STATE IMIPRAMINE (A) AND DESIPRAMINE (B) CONCENTRATIONS BASED ON A KINETIC MODEL USING *IN VITRO* METABOLIC PARAMETERS.

Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 3~4 rats.

Key: (···) simulation curve based on the kinetic model using the *in vitro* metabolic parameters (listed in Table 4-3) without the metabolic interaction: (—) simulation curve based on the kinetic model using *in vitro* metabolic parameters (listed in Table 4-3) with the metabolic interaction.

行代謝経路間相互作用を入れない場合 ( $K_1(I)=K_1(D)=\infty$ ) のシミュレーションカーブである。Figure より明らかなように、シミュレーションカーブは実際に観察された平行代謝経路間相互作用 (第2章第6節・第3章第2節参照) をモデルに取り入れた方が実測値により近付くことがわかった。平行代謝経路間相互作用をモデルに考慮することによって Imipramine の投与速度の高いところでの Imipramine および DMI の Imipramine 投与速度に対する非線形な上昇が予測され、また、平行代謝経路間相互作用を取り入れた場合の予測値 (実線) と取り入れない場合の予測値 (破線) との格差は、DMI の定常状態血中濃度で Imipramine より顕著であった。このことから、in vivo における Imipramine 投与速度と定常状態 Imipramine・DMI の血中濃度の非線形な関係には明かに平行代謝経路間相互作用が関与しており、また、定常状態の血中 DMI 濃度は、Imipramine の血中濃度より大きくこの相互作用の影響を受けていることが示唆された。

以上、本研究結果より前述した構築手順の仮定、すなわち、

- ① Imipramine と DMI の肝臓内での薬物代謝に関する基質濃度は、肝臓流出液中非結合型薬物濃度に等しい (” Well-Stirred Model ” ) 。
- ② in vitro 実験による代謝パラメータで in vivo 代謝速度を評価できること。
- ③ in vitro 代謝実験から明かとされた平行代謝経路間相互作用が in vivo でも反映されていること。

が、Imipramine と DMI の体内動態を論じる場合、妥当であると結論された。

#### [ 4 ] 平行代謝経路間相互作用の定常状態 Imipramine および DMI 血中濃度および Imipramine 肝代謝における各代謝速度に与える影響の検討

In vitro 代謝実験から得られた代謝パラメータを用いたシミュレーションと実測値の比較から、以下の点が明かとなった。

- モデル内に2位水酸化反応経路間に競合的な相互作用（平行代謝経路間相互作用）を考慮することによって、予測された定常状態 Imipramine およびDMI 血中濃度が上昇し、実測値に近付くこと、また、門脈内Imipramine投与速度に対する定常状態ImipramineおよびDMI 血中濃度の関係は、平行代謝経路間相互作用を考慮した場合、より非線形であること。

- 平行代謝経路間相互作用を考慮した時としない時の予測された定常状態血中濃度は、DMI でImipramineより大きく差が認められた（Figure 4-6 B）。すなわち、DMI の血中濃度は Imipramine に比べ、より平行代謝経路間相互作用をモデル内に組み込むことの影響を受けること。

本節では、さきに構築した速度論的モデルを構成している各代謝経路の代謝速度と遊離型肝固有クリアランスを調べた。

Scheme 4-2 には、平行代謝経路間相互作用を考慮した場合（実線）と、しない場合（破線）に分け、代謝速度及び遊離型肝固有クリアランスの門脈内Imipramine投与速度に対する関係を示した。スキームのそれぞれのパラメータの添え字は Scheme 3-1 のそれとおなじである。代謝経路上のそれぞれのパネル（A, A' からE, E'）はその経路の代謝活性の速度過程を示している。また、各代謝系路上のCL値はそれぞれの代謝速度と基質濃度から次式によって計算した。

$$CL_1 = \frac{V_1}{f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} \quad \text{or} \quad CL_2 = \frac{V_2}{f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} \quad \dots(4-13)$$

$$CL_3 = \frac{V_3}{f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} \quad \text{or} \quad CL_4 = \frac{V_4}{f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} \quad \dots(4-14)$$

Imipramineの門脈内投与速度（panel A）は、定常状態でのいかなる投与速度においても2位水酸化反応速度（パネルB、 $V_1$ ）と脱メチル化反応速度（パネルC、 $V_2$ ）の和に等しくなる。また、同様に、脱メチル化反応速度（パネルC、 $V_2$ ）は2OH-DMIの生成速度（パネルD、 $V_3$ ）と「他の代謝物」の生成速度（パネルE、 $V_4$ ）の和と等しくなるはずである。

ImipramineとDMIの代謝において相互作用が無い場合を考えると、Imipramineの2位水酸化反応に関する（遊離型）固有クリアランス（ $CL_1$ 、パネルB'の破線）、DMIの2位水酸化反応に関する（遊離型）固有クリアランス（ $CL_3$ 、パネルD'破線）およびDMIからの「他の代謝物」の生成に関する（遊離型）固有クリアランス（ $CL_4$ 、パネルE'の破線）は、Imipramineの門脈内投与速度（ $R$ ）の上昇とともに減少することが予測された。これは、それぞれの代謝に関与しているhigh-affinity-low-capacityな酵素速度論上の性質によるものである（Table 3-2）。

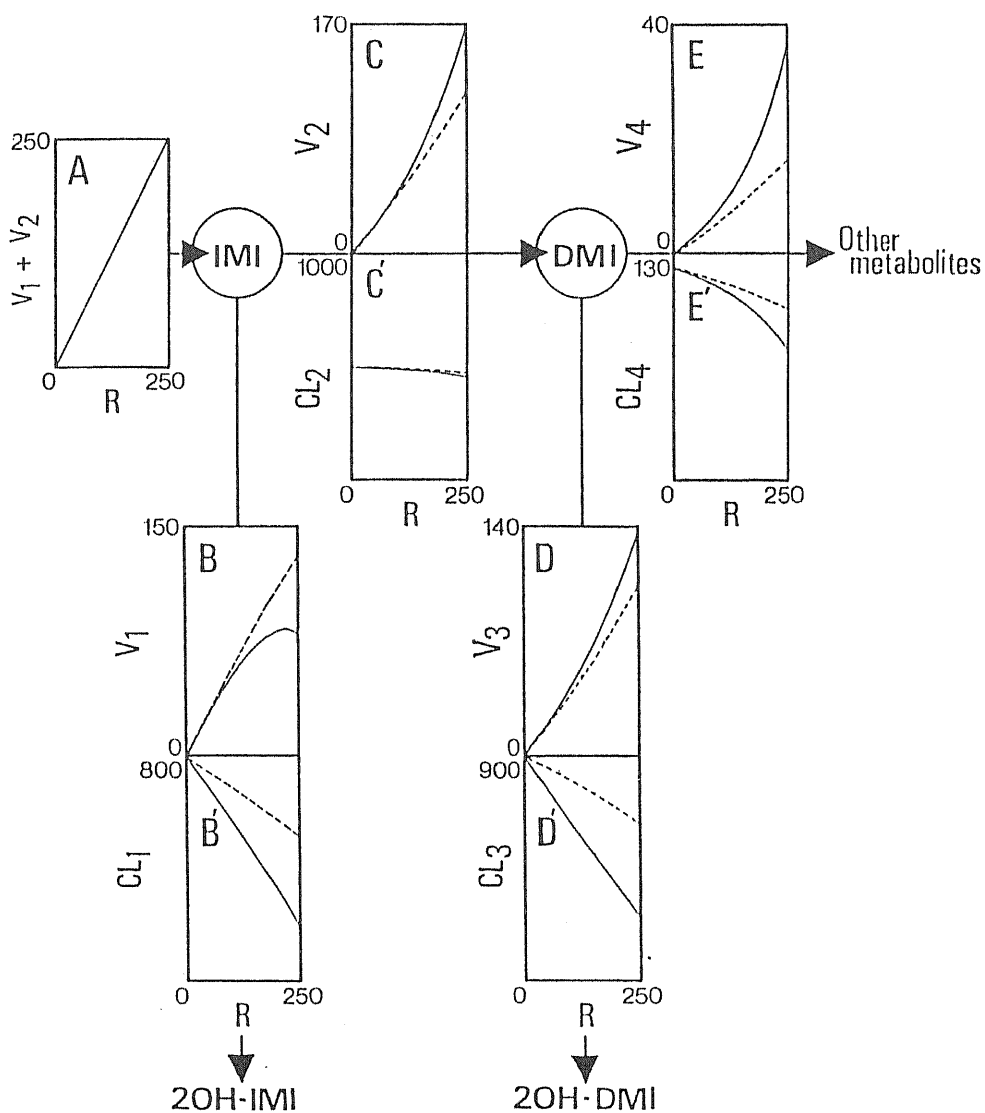
一方、Imipramineの脱メチル化反応に関する（遊離型）固有クリアランス（ $CL_2$ 、パネルC'の破線）はそのlow-affinity high-capacityな酵素速度論上の性質（Table 3-2）から、ほとんど一定である。各代謝経路に関与している代謝酵素の速度論上の性質に起因する（遊離型）固有クリアランスのこれらの変動は、 $R$ の上昇に連れてImipramineとDMIの定常状態濃度が平行代謝経路間相互作用を考慮しなくても、わずかな非線形性を示す予測の原因となっている（Figure 4-6の破線）。

ここで、ImipramineとDMIの2位水酸化反応経路間に競合的な代謝相互作用を考慮すると、両代謝経路に関する（遊離型）固有クリアランスをさらに低下させることが予測された。相互作用が考慮された場合の両2位水酸化反応経路間の（遊離型）固有クリアランス（ $CL_1$ と $CL_3$ ）は特にImipramineの投与速度が高いところで、相互作用が無いとした場合の値に比べ低くなった（パネルB'とD'の実線 対 破線）。

また、相互作用が存在する場合のDMIの生成速度は $R$ の上昇に対して非線形に上昇した（ $V_2$ 、パネルC 実線）。これは、Imipramineの2位水酸化反応速度の低下（ $V_1$ 、パネルB）を補い、 $R$ とImipramineの注入速度の間の線形な関係（パネルA）を再現するためであると考えられる。

平行代謝経路間相互作用は、Imipramineに比べ、DMIの定常状態濃度の実測値と予測値の間の差をより小さくする結果となった（Figure 4-6の実線）が、これは、相互作用がImipramineの定常状態濃度を予測する上ではImipramineに関する（遊離型）固有クリアランスを低下させるだけであった。

一方、DMIの動態に関して、DMIの生成速度（ $V_2$ ）とDMIに



Scheme 4-2

SCHEMATIC REPRESENTATION OF ALTERATIONS IN EACH METABOLIC RATE AND INTRINSIC CLEARANCE FOR FREE DRUGS OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE BY EACH METABOLIC PATHWAY.

Metabolic pathways of imipramine are the same as shown in scheme 4-1. The definitions of symbols refer to the legend of scheme 4-1. Each panel (A,A'-E,E') on a metabolic pathway represents the rate process of the metabolic activity of the corresponding pathway. The solid and broken lines in each figure represent the results of simulations when "parallel pathway interaction" is incorporated and when no interaction is assumed, respectively.

対する肝固有クリアランス ( $CL_3$  と  $CL_4$ ) の関係は、4-14 式から、

$$C_{ss}^{DMI} = \frac{V_2}{f_B(CL_3 + CL_4)} \quad \dots(4-15)$$

で表現される。したがって、DMI の定常状態血中濃度には、(1) R の上昇に対する DMI 生成速度 ( $V_2$ ) のより非線形な上昇 (2) DMI の 2 位水酸化反応に関する (遊離型) 固有クリアランス ( $CL_3$ ) の低下 (3) 速度論上の性質と平行代謝経路間相互作用によって引き起こされた定常状態 DMI 濃度の上昇に基づく「他の代謝物」の生成に関する (遊離型) 固有クリアランス ( $CL_4$ ) の低下といった Imipramine より多くの要因の変動が関係していることに起因していると考えられた。

#### 4-5 Quinidine併用によるImipramine代謝の Kinetic パラメータの変化を利用したモデルの妥当性の検討

臨床において薬物が単独に用いられることは希である。薬物が併用されたときのImipramineの定常状態体内動態の変動を予測する場合、代謝活性に対する阻害効果と血中非結合率に対する影響に分けて検討しなければならない。

前節での検討より、ImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度には両薬物の2位水酸化反応間の相互作用（平行代謝経路間相互作用）が大きく関与しており、相互作用の有無が特にDMIの定常状態血中濃度に大きく変動を与えていることが明らかにされた（Figure 4-6）。また、相互作用は両薬物の2位水酸化反応間に関与しているP-450分子種が共通していることによって発現していることが示唆されている（第2章6節および第3章2節〔2〕）ので、このP-450分子種の触媒活性に影響を与える薬剤の併用は、Imipramineおよび特にDMIの定常状態血中濃度に大きな変動を与えることが予想される。他薬剤の併用がImipramineおよびDMIの代謝活性に与える影響に関しては、既に第2章5節において肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験より調べた。その結果、ヒトおよびラットで、薬物代謝活性の遺伝的多様性を示す薬物であるPropranolol、Quinidine、Nortriptylineが併用された場合、ImipramineおよびDMIの2位水酸化反応に対して、強い阻害効果を示し、QuinidineおよびPropranololの場合にはその阻害効果は2位水酸化反応に対し、選択的であった（Figure 2-16）。そこで本節ではImipramineおよびDMIの2位水酸化反応に対して選択的に阻害する効果の強いQuinidineをモデル薬物とし、ImipramineとQuinidineが同時に門脈内に定速注入されたときの定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度に与える影響を調べた。

また、QuinidineがImipramineおよびDMIの2位水酸化反応を選択的に阻害している関係を前節で構築されたモデルに組み込み、両定常状態血中濃度の予測値と実測値の比較を行い、速度論的モデルの拡張とその妥当性を検討した。さらに本節では、肝灌流実験系を用いてImipramineおよびDMIの各代謝物の生成速度に関してQuinidine併用による変

動を調べ、拡張された速度論的モデルに基づく予測された変動との比較検討からもそのモデルの妥当性を確認した。

# [1] QuinidineによるImipramineおよびDMI 定常状態血中濃度の変動

## [実験結果]

異なる投与速度でImipramineを門脈内に定速注入した時の、Quinidine併用による定常状態ImipramineおよびDMI 血中濃度の変化について調べた結果をFigure 4 - 7 に示した。定常状態ImipramineおよびDMI 血中濃度はQuinidineの併用によってコントロール時の3 - 4 倍に上昇した。また、定常状態はコントロール時と同様、約6時間の定速注入によって達成されていることがわかった。したがって、以降定常状態血中濃度は門脈内定速注入開始後6、6.5、7.0時間での血中濃度の平均した値とした。Imipramineの門脈内定速注入速度と定常状態ImipramineおよびDMI 血中濃度の関係をFigure 4 - 8 に示した。Figure 4 - 8 実線は第4章第1節で既に表示したImipramine単独門脈内定速注入時の各血中濃度を、また、Figure 破線はQuinidine併用時の投与速度と各定常状態血中濃度の関係を示している。Figure から明らかなようにImipramineの定常状態血中濃度の投与速度との関係は、コントロールでの非線形性がQuinidine併用によって線形に近付くことが明かとなった。一方、DMIの定常状態血中濃度とImipramine投与速度との関係はQuinidine併用によって、より非線形性が強調されることが明かとなった。そこで以下の小節ではQuinidine併用によるこれらImipramineおよびDMI 定常状態血中濃度のImipramine投与速度に対する関係が異なった変動を示す要因を解明することと、Quinidine併用による相互作用を考慮した速度論的モデルの構築を行なった。

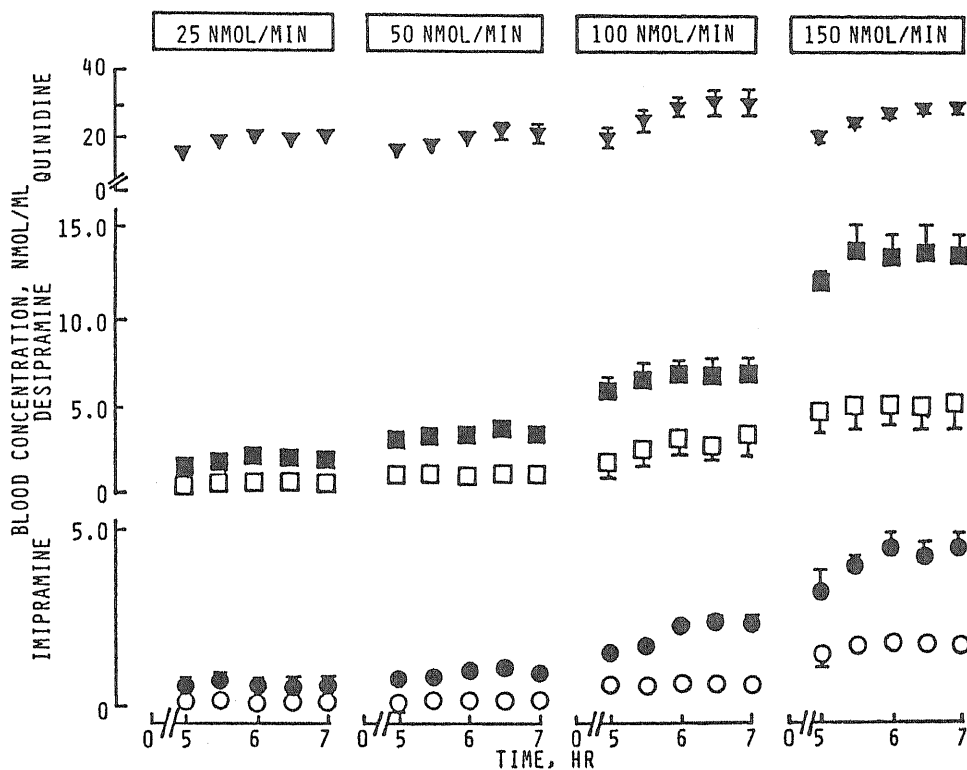


Figure 4-7

MEAN BLOOD CONCENTRATION VS. TIME PROFILE FOR IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE DURING INTRAPORTAL INFUSION OF IMIPRAMINE ALONE (OPEN SYMBOLS) OR WITH QUINIDINE (CLOSED SYMBOLS).

Each point and vertical bar represent the mean  $\pm$  S.E. of three rats. The data for control experiments were obtained from Figure 4-2.

Key: (○, ●) imipramine; (□, ■) desipramine; (▼) quinidine.

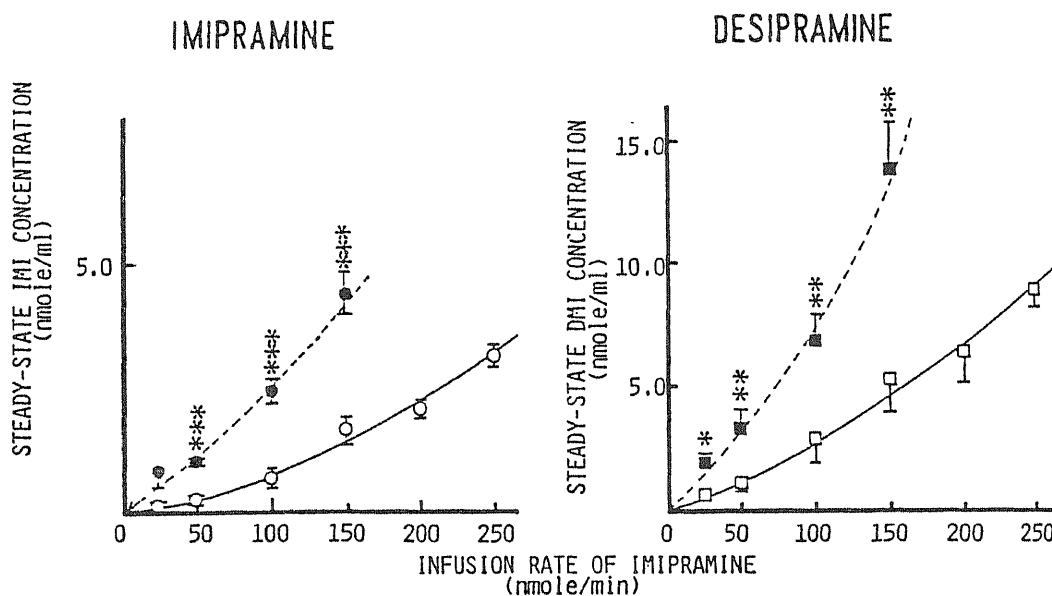


Figure 4-8

EFFECT OF THE RATE OF INFUSION OF IMIPRAMINE ON THE STEADY-STATE IMIPRAMINE (OPEN SYMBOLS) AND DESIPRAMINE (SQUARES) CONCENTRATION IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF QUINIDINE.

Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 3~4 rats. Key: (●, ■) steady-state concentration during intraportal infusion with quinidine; (○, □) steady-state concentration during intraportal infusion without quinidine. Significantly different (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ) from the control value.

## [2] ImipramineおよびDMIの血中非結合率に対するQuinidineの影響

ImipramineおよびDMIは、血漿中において血漿タンパク質であるアルブミンの他に癌や炎症といった急性疾患と関連して、血中で増加する物質（急性相反応物質）の一種である $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP)と結合していることは、すでに本章3節で言及したが、本節で取り上げたQuinidineもAGPと強く結合していることが報告されている (Nilsen et al., 1978)。この蛋白への結合は、アルブミンに比べ親和性が高く、また、結合サイトを共有しているため、ImipramineあるいはDMIのAGPに対する結合を他の塩基性薬物が競合的に阻害することも報告されている（4章3節参照）。したがって、AGPに結合する可能性がある他の薬剤の併用に拠って、ImipramineおよびDMIの血中非結合率が影響を受けることが考えられる。そこで、Quinidineが併用されたときのImipramine門脈内定速注入実験（第4章第5節 [1]）で得られた血液サンプル中の各薬物の血中非結合率を調べた。

### [実験結果・考察]

Figure 4-9 には、コントロールと Quinidine併用時の血漿と血中薬物濃度との関係（PB比）および血漿中非結合型薬物濃度の血漿中薬物濃度との関係を示した。また、Table 4-4 には、ex vivo でのPB比と $f_p$ 値、および計算された $f_b$ 値を示した。Figure 4-9 および Table 4-5 から、両パラメータは Quinidine併用時においても血中あるいは血漿中ImipramineおよびDMI濃度に対してほぼ一定であった。また、両薬物のPB比および $f_p$ 値は Quinidine併用によって上昇し、計算された $f_b$ 値は有意に上昇していることが明かとなった。

以上の検討結果より、Quinidine併用時のモデル構築では、Quinidine共存によるImipramineおよびDMIの $f_b$ 値の変動を考慮しなければならないことが明かとなった。

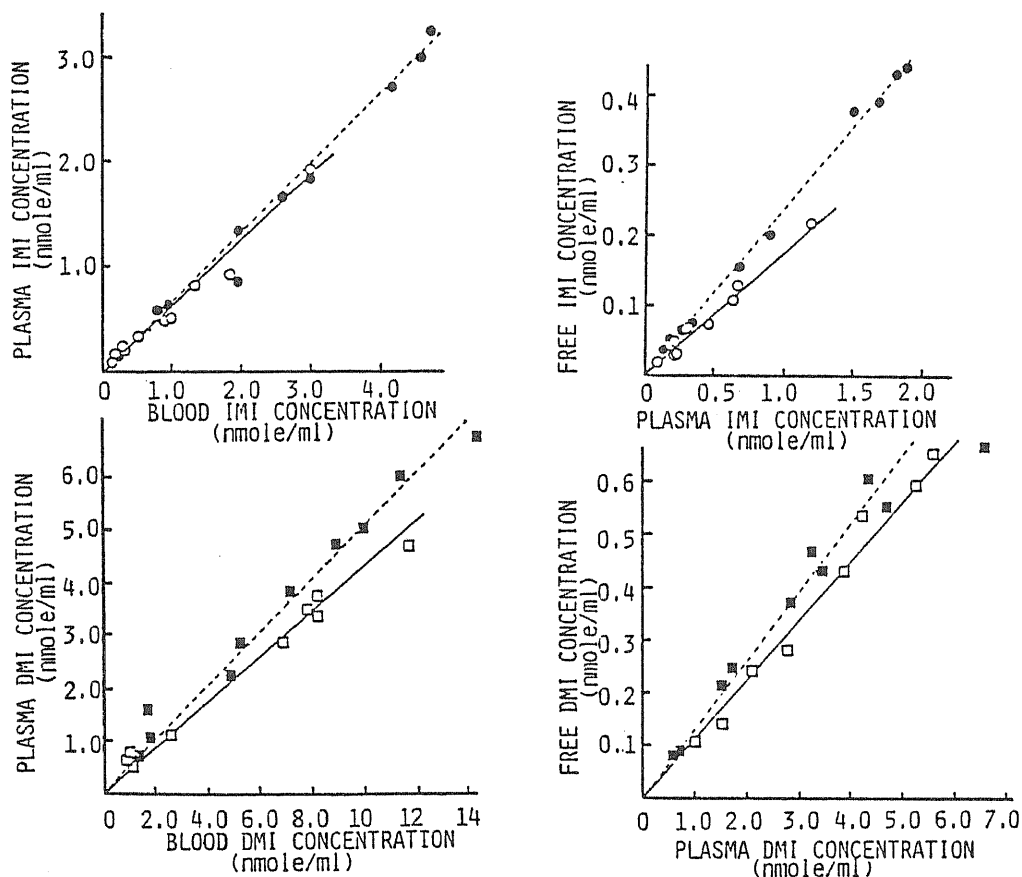


Figure 4-9

EFFECT OF THE PRESENCE OF QUINIDINE ON THE RELATIONSHIP BETWEEN WHOLE BLOOD AND PLASMA CONCENTRATION (LEFT PANELS), AND BETWEEN PLASMA AND FREE CONCENTRATION (RIGHT PANELS) OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE.

Key: (○, ●) data for imipramine; (□, ■) data for desipramine; (○, □) data obtained from ex vivo experiments in the absence of quinidine (taken from figure 4-4); (●, ■) data obtained from ex vivo experiments in the presence of quinidine.

Table 4-4

**EX VIVO FREE FRACTION OF IMIPRAMINE, DESIPRAMINE  
AND QUINIDINE IN BLOOD SAMPLES OBTAINED FROM  
IN VIVO INTERACTION STUDIES (FIGURE 4-11)<sup>a</sup>**

| Compound  | Presence<br>of<br>quinidine <sup>b</sup> | C <sub>p</sub> /C <sub>B</sub> <sup>c</sup> | f <sub>p</sub> <sup>d</sup> | f <sub>B</sub> <sup>e</sup> |
|-----------|------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| IMI       | -                                        | 0.566<br>(0.025)                            | 0.193<br>(0.009)            | 0.107<br>(0.005)            |
|           | +                                        | 0.601<br>(0.029)                            | 0.232**<br>(0.007)          | 0.143**<br>(0.007)          |
|           |                                          |                                             |                             |                             |
| DMI       | -                                        | 0.450<br>(0.024)                            | 0.117<br>(0.005)            | 0.0535<br>(0.0032)          |
|           | +                                        | 0.526<br>(0.038)                            | 0.135*<br>(0.005)           | 0.0704**<br>(0.0033)        |
|           |                                          |                                             |                             |                             |
| Quinidine |                                          | 0.667<br>(0.029)                            | 0.474<br>(0.022)            | 0.313<br>(0.014)            |

<sup>a</sup> Data are expressed as mean ( $\pm$ S.E.).

<sup>b</sup> Data in the absence of quinidine were obtained from Table 4-2 for the comparison.

<sup>c</sup> Plasma-to-blood concentration ratio.

<sup>d</sup> Free fraction in plasma.

<sup>e</sup> Free fraction in blood.

\* Significantly different from the respective value without quinidine ( $p < 0.05$ ).

\*\* Significantly different from the respective value without quinidine ( $p < 0.005$ ).

### [3] 肝灌流実験によるImipramineおよびDMI代謝速度のQuinidineによる変動の評価

Quinidine併用による肝臓でのImipramineおよびDMI代謝速度の変動を肝灌流実験より検討した。肝灌流実験には、QuinidineがImipramineおよびDMIの血漿蛋白結合率およびPB比を変動させることが明かされているので〔2〕、血漿蛋白及び赤血球を含まない灌流液を用い、肝臓への酸素供給を十分に行なう目的で30 ml/minの灌流速度を採用した。肝流入液中Imipramine濃度は0.3 nmol/mlとし、肝流出液中および胆汁液中のImipramineおよびその主要代謝物の排泄速度を測定した（2位水酸化代謝物はその抱合体を $\beta$ -glucuronidase/sulfataseで切断し、遊離型薬物の排泄速度として測定した）。

#### [実験結果・考察]

Figure 4-10には肝灌流実験より得られた結果の典型的な一例を示した。コントロール実験ではImipramineのみを110分間定速注入したのに対し、Quinidine併用実験ではQuinidineを90 nmol/minの速度でImipramineの門脈内定速注入開始50分から併用した。Figureから明らかなように、Imipramineおよび各主要代謝物の排泄速度は約25分で定常状態に達していた。ImipramineおよびDMIの定常状態排泄速度はQuinidine併用によって約2倍に上昇していたのに対し、2OH-IMIの排泄速度は約1/2に低下していた。また、2OH-DMIの排泄速度はQuinidine併用によって、ほとんど影響を受けなかった。これら各排泄（代謝）速度のQuinidineによる影響の受け方の差は、本節〔6〕においてQuinidine併用時の速度論的モデルによる各代謝速度の変動に関する予測と比較検討を行ない、モデルの妥当性の確認を行なった。

### [4] 肝ミクロソームを用いたQuinidineのImipramineおよびDMI 2位水酸化反応に対する阻害効果の定量的評価

Quinidineをはじめ、PropranololやNortriptylineなど、ヒトおよびラットにおいて薬物代謝活性の遺伝的多様性を示す代謝反応を持つ薬物によってImipramineおよびDMIの2位水酸化反応は選択的に阻害をう

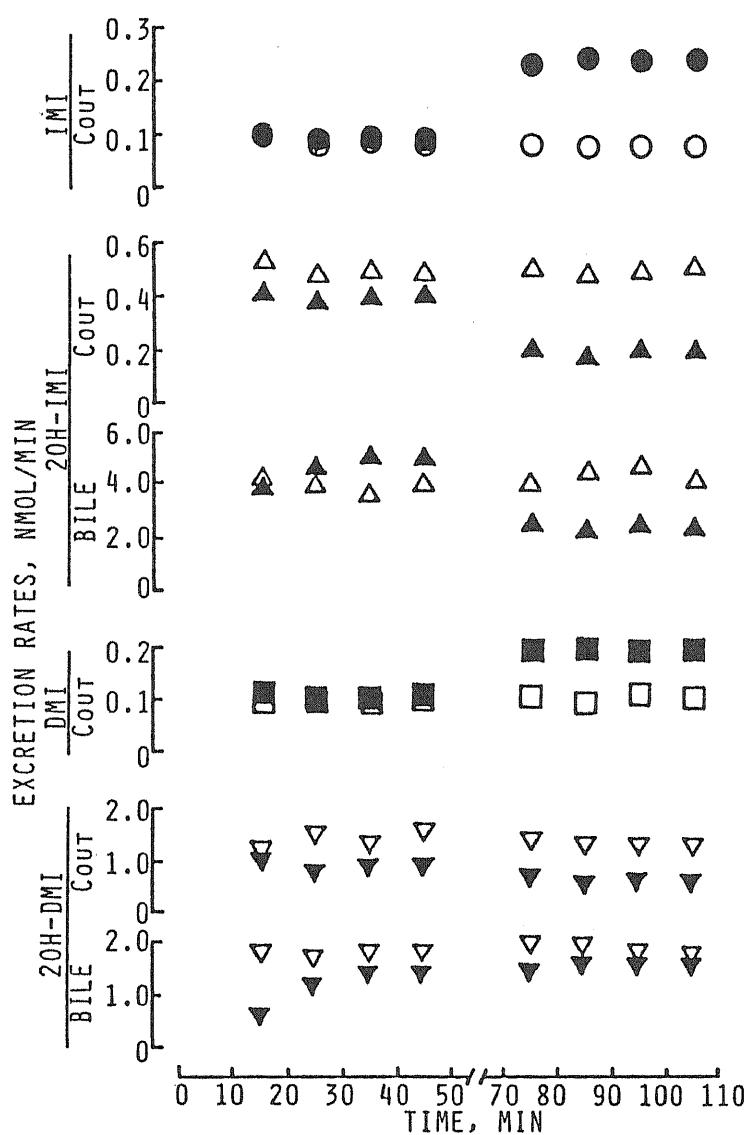


Figure 4-10

EXCRETION RATE VS. TIME PROFILE FOR IMIPRAMINE AND ITS METABOLITES IN THE EFFLUENT AND BILE OF ISOLATED PERFUSED RAT LIVER PREPARATION.

Imipramine was infused at a rate of 9.0 nmol/min either alone (open symbols) or with quinidine at a rate of 90 nmol/min after 50 min onset of imipramine infusion (closed symbols).

けることは既に明かにされた（第2章5節）。また、Quinidineによる両2位水酸化活性に対する阻害パターンは完全に競合的であった

（Figure 2-17）。以上の知見からImipramine及びDMIの2位水酸化反応に関与しているP-450分子種は共通しており、また、ヒトおよびラットにおいて薬物代謝活性の遺伝的多様性発現に関与している分子種（P-450UT-H）が触媒している可能性が示唆された（第2章5節）。本小節ではQuinidineの両2位水酸化反応に対する阻害効果を速度論的モデルに組み入れるため、速度論的パラメータを調べた。

### 〔実験結果〕

Table 4-5にはQuinidineの両2位水酸化反応に対する競合的阻害定数（ $K_i'$ ）を肝ミクロソーム反応液中非結合率（ $0.474 \pm 0.058$ ,  $\text{mean} \pm \text{S.E.}, n=3$ ）で補正した値を示した。Table 4-5から明らかなようにQuinidineの両2位水酸化活性に対する阻害定数と阻害された2位水酸化反応の $K_m$ 値の比はほぼ1.0であることがわかった。したがって、Quinidineによる2位水酸化反応に対する阻害効果は3-2〔2〕節で平行代謝経路間相互作用をモデルに組み入れた場合の阻害を示す項と併せて組み込むことが可能であり、（3-3）および（3-4）式の各2位水酸化活性の阻害剤濃度としてQuinidineの濃度を加えるだけでQuinidine併用時のモデル式に拡張できることがわかった。

## 〔5〕 モデルの構築

### 〔式の誘導〕

コントロールでのImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度を同時に予測できる速度論的モデルの構築方法（4-5章）に基づき、Quinidine併用時のImipramine門脈内定速注入時の定常状態Imipramine・DMI血中濃度を同時に予測できる速度論的モデルの構築を行なった。前小節での考察から、阻害剤であるQuinidineは、Imipramine 2位水酸化反応に対するDMI、あるいは、DMI 2位水酸化反応に対するImipramineの平行代謝経路間相互作用におけるそれぞれの阻害剤濃度に遊離型Quinidine濃度を加えることによって構築できることが明かとなった。すなわ

Table 4-5

COMPETITIVE INHIBITION CONSTANTS FOR 2-HYDROXY-  
LATION OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE  
BY QUINIDINE<sup>a</sup>

| Substrate   | Ki          | Ki', <sup>b</sup> | Km'/Ki', <sup>c</sup> |
|-------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| Imipramine  | 0.878±0.080 | 0.414±0.038       | 1.01                  |
| Desipramine | 0.888±0.056 | 0.426±0.027       | 0.966                 |

<sup>a</sup> Data are expressed as mean±S.E.

<sup>b</sup> Ki' = Ki x 0.474.

<sup>c</sup> Km'/Ki' represents the ratio of the Michaelis constants of the inhibited pathway to Ki'.

ち、Quinidine併用時のモデルは、第4章第4節における(4-8)～(4-9)式にQuinidineの遊離型濃度を加えた次式(4-16)～(4-18)式によって表現される。

$$R = CL_{int}^{IMI} \cdot f_B \cdot C_{ss}^{IMI} \quad \dots(4-16)$$

$$CL_{int, in vitro}^{IMI} = \frac{V_{max,1}}{K_{m,1} + R(I) \cdot (f_B \cdot C_{ss}^{DMI} + f_B' \cdot C_{ss}^Q) + f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} + \frac{V_{max,2}}{K_{m,2} + f_B \cdot C_{ss}^{IMI}} \quad \dots(4-17)$$

$$V_2 = \frac{V_{max,3} \cdot f_B' \cdot C_{ss}^{DMI}}{K_{m,3} + R(D) \cdot (f_B \cdot C_{ss}^{IMI} + f_B' \cdot C_{ss}^Q) + f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} + \frac{V_{max,4} \cdot f_B \cdot C_{ss}^{DMI}}{K_{m,4} + f_B \cdot C_{ss}^{DMI}} \quad \dots(4-18)$$

これらの式において  $C_{ss}^Q$  ; 定常状態 Quinidine 濃度、 $f_B'$  ; Quinidine の血中非結合率を表わしている。また、Quinidine による Imipramine および DMI 2 位水酸化反応に対する (反応液中の Quinidine 非結合率で補正された) 競合的阻害定数をそれぞれ  $K_I(I-Q)$ ,  $K_I(D-Q)$  とした時、(4-17) 式と (4-18) 式における  $R(I)$  と  $R(D)$  は、それぞれ  $K_{m,1}/K_I(D) = K_{m,1}/K_I(I-Q)$  と  $K_{m,3}/K_I(I) = K_{m,3}/K_I(D-Q)$  を意味している。

#### [シミュレーション結果・考察]

各式を構成している速度論的パラメータを Table 4-6 にまとめて示した。また、Figure 4-11 にはこれらのパラメータと上記モデル式を用いて、本章第6節[1]で調べた Quinidine 併用時の Imipramine 投与速度と定常状態 Imipramine・DMI 血中濃度の関係を予測した結果を示した。ここで遊離型 Quinidine 濃度は Figure 4-7 に示した実測された Quinidine 濃度の上限と下限 (5, 10 nmol/ml) とした。Figure 4-11 破線は平行代謝経路間相互作用のみを考慮したときのシミュレーションを、また、実線 a および b は、遊離型 Quinidine 濃度を 5 および 10 nmol/ml とした時のシミュレーションカーブを示している。図から明らかなように、Imipramine に対する Quinidine の併用効果 (A) は、Quinidine 濃度が高くなる (相互作用が強くなる) ほどコントロールに比べ線形の関係が強くなるのに対し、DMI 定常状態血中濃度の予測 (B) は、Quinidine 併用によって、より非線形性が強調される結果となった。これらの予測は実測された関係 (本章5節[1]) と良く一致していた。

Table 4-6

## KINETIC PARAMETERS USED FOR SIMULATION

---

|                   |                   |                       |
|-------------------|-------------------|-----------------------|
| $Km_1 = 0.430^a$  | $Vmax_1 = 340^b$  | $f_B = 0.107^d$       |
| $Km_2 = 5.12^a$   | $Vmax_2 = 2202^b$ | $f_{B,Q} = 0.143^d$   |
| $Km_3 = 0.391^a$  | $Vmax_3 = 346^b$  | $f_{B'} = 0.0535^d$   |
| $Km_4 = 0.785^a$  | $Vmax_4 = 92^b$   | $f_{B,Q'} = 0.0704^d$ |
| $R_I(I) = 1.00^c$ | $R_I(D) = 1.00^c$ | $f_{B''} = 0.313^d$   |

---

<sup>a</sup> Data were obtained from Table 4-3.

<sup>b</sup>  $Vmax$  obtained for 1.0 g liver (listed in Table 3-2) was extrapolated to the the value for whole liver by multiplying of average liver weight (7.62 g) used in *in vivo* interaction studies (Figure 4-7).

<sup>c</sup> The ratios of  $Km$  value for inhibited pathway to  $K_I$  value of inhibitor were estimated to be almost identical (see Table 4-5). Therefore, the common value for "parallel pathway interaction" and selective inhibition by quinidine was used in each 2-hydroxylation pathway (i.e.  $R_I(I) = Km_1/K_I(D) = Km_1/K_I(I-Q)$ ;  $R_I(D) = Km_3/K_I(I) = Km_3/K_I(D-Q)$ ).

<sup>d</sup> Data were obtained from Table 4-4. The value of  $f_B$  and  $f_{B'}$  were used for the simulations in the absence of quinidine and those of  $f_{B,Q}$ ,  $f_{B,Q'}$  and  $f_{B''}$  were used for the simulations in the presence of quinidine.

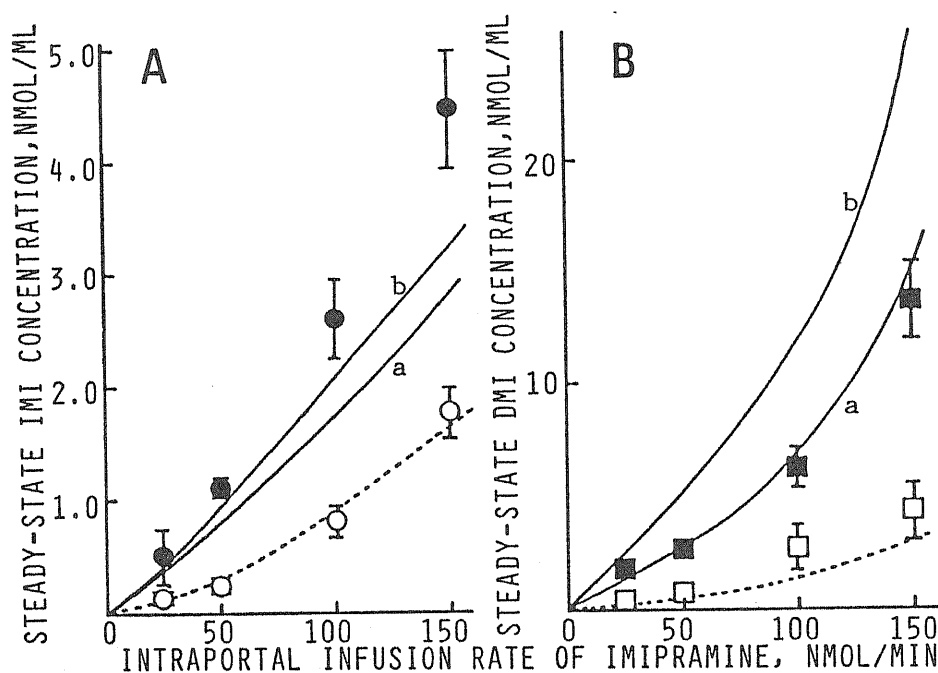


Figure 4-11

SIMULATIONS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN INTRAPORTAL INFUSION RATE OF IMIPRAMINE AND STEADY-STATE IMIPRAMINE (A) AND DESIPRAMINE (B) CONCENTRATION IN THE PRESENCE (CLOSED SYMBOLS) OR ABSENCE OF QUINIDINE (OPEN SYMBOLS) BASED ON A KINETIC MODEL (SCHEME 4-4).

Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 rats. Data for control were obtained from figure 4-3. Simulation curves were calculated by the equations (4-16)~(4-18) using in vitro kinetic parameters (listed in Table 4-6). The broken lines represent the results of simulations when parallel pathway interaction is incorporated in the model. The solid lines, (a) and (b), represent the results of simulations when selective inhibitory effects of quinidine are also incorporated assuming that the unbound quinidine concentrations are 5.0 and 10.0 nmol/ml, respectively.

以上のことから、本章4節で確立されたコントロールでのImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度を同時予測できる速度論的モデルは、本小節での検討結果から、Quinidineが併用された場合でも各血中濃度が同時予測でき、より臨床的な応用が可能であることが確認された。

- [6] Quinidineの定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度および  
in vivo 定常状態でのImipramine肝代謝における各代謝速度に  
与える影響  
(定常状態速度論的モデルに基づくシミュレーション)

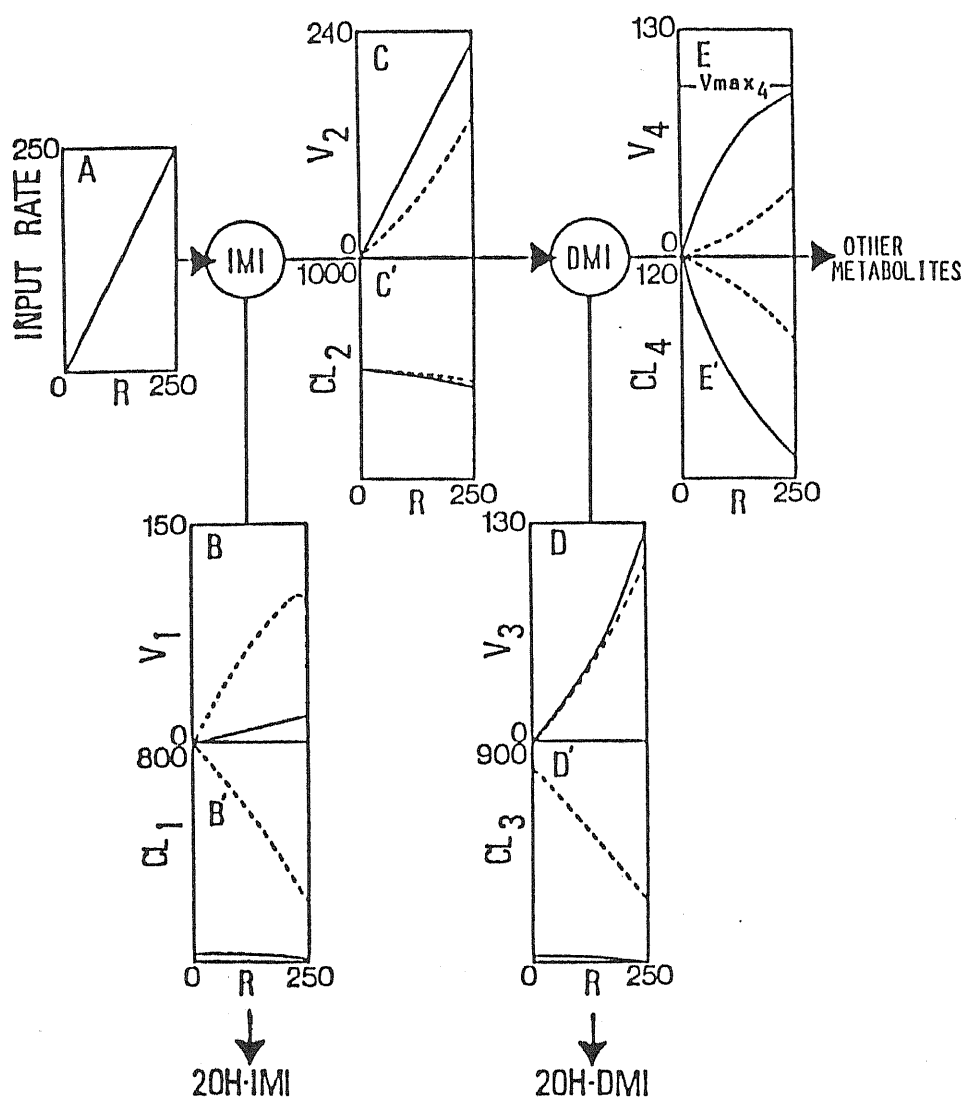
前小節までの検討結果より、Quinidine併用時のImipramineとDMIの定常状態体内動態の変動の特徴として、以下の点が明かとなった。

- Imipramineの門脈内投与速度と定常状態Imipramine血中濃度の関係はQuinidine併用によって線形の関係に近づく。
- Imipramineの門脈内投与速度と定常状態DMI血中濃度の関係はQuinidine併用によって非線形の関係が強調される。

本小節では、先の小節において構築された速度論的モデルを構成している各代謝経路の代謝速度と遊離型肝固有クリアランスのQuinidine併用による変動を調べた。Scheme 4-3には、平行代謝経路間相互作用のみを考慮したコントロール(破線)と、Quinidineを併用した場合(実線)に分け、門脈内Imipramine投与速度に対する代謝速度と遊離肝固有クリアランスの関係を示した。また、(遊離型)肝固有クリアランス(CL)と代謝速度(V)の各代謝経路との関連をScheme 4-4に示した。スキームのそれぞれのパラメータの添え字はNomenclatureにまとめた。代謝経路上のそれぞれのパネル(A, A' からE, E')はその経路の代謝活性の速度過程を示している。

Imipramineの門脈内投与速度(R, panel A)は、定常状態でのいかなる投与速度においても2位水酸化反応速度(パネルB、 $V_1$ )と脱メチル化反応速度(パネルC、 $V_2$ )の和に等しいはずである。また、定常状態においては、脱メチル化反応速度(パネルC、 $V_2$ )は2OH-DMIの生成速度(パネルD、 $V_3$ )と「他の代謝物」の生成速度(パネルE、 $V_4$ )の和と等しくなるはずである。

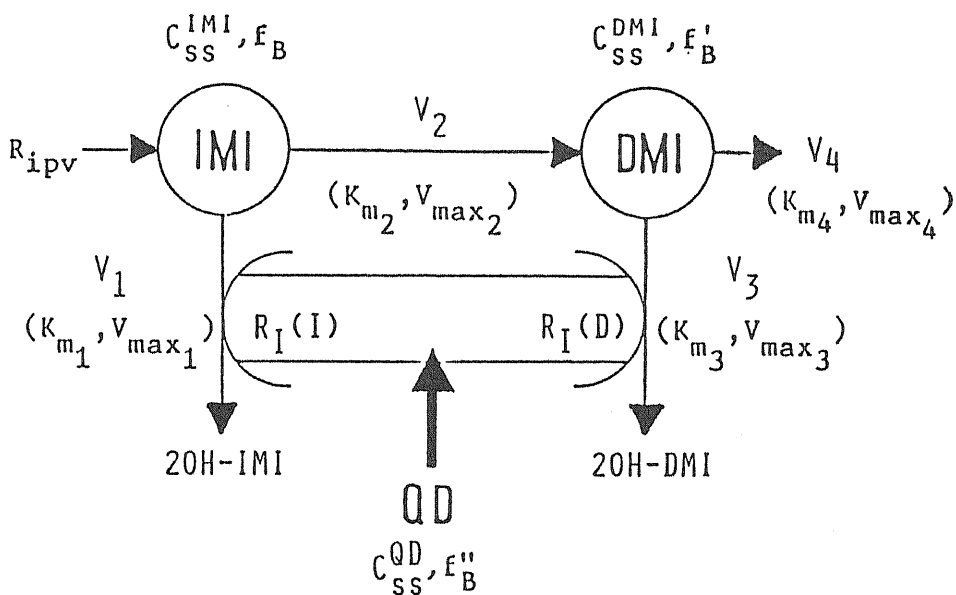
平行代謝経路間相互作用のみが発現しているコントロールでは、R



Scheme 4-3

SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE EFFECT OF QUINIDINE ON THE ALTERATIONS IN EACH METABOLIC RATE AND INTRINSIC CLEARANCE FOR FREE DRUGS OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE BY EACH METABOLIC PATHWAY.

Metabolic pathways of imipramine are the same as shown in scheme 4-4. The definitions of symbols refer to the legend of scheme 4-4. Each panel (A,A'-E,E') on a metabolic pathway represents the rate process of the metabolic activity of the corresponding pathway. The solid and broken lines in each figure represent the results of simulations when only "parallel pathway interaction" is incorporated and when the selective inhibitory effect of quinidine (unbound quinidine concentration = 10 nmol/ml) are incorporated, respectively.



Scheme 4-4

KINETIC MODEL FOR IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE ELIMINATION WHERE "PARALLEL PATHWAY INTERACTION" AND INHIBITORY EFFECT OF QUINIDINE ARE TAKEN INTO ACCOUNT.

QD means quinidine, and other definitions of symbols refer to Nomenclature described in the section of "NOMENCLATURE FOR SCHEME 4-4"(next page).

# Nomenclature for Scheme 4-4

---

|             |                                                                                                                     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $R_{ipv}$   | Intraportal infusion rate of imipramine, nmol/min.                                                                  |
| $Css^{IMI}$ | Steady-state concentration of imipramine, nmol/ml.                                                                  |
| $Css^{DMI}$ | Steady-state concentration of desipramine, nmol/ml.                                                                 |
| $Css^{QD}$  | Steady-state concentration of quinidine, nmol/ml.                                                                   |
| $f_B$       | Free fraction of imipramine in blood in the presence of quinidine.                                                  |
| $f_B'$      | Free fraction of desipramine in blood in the presence of quinidine.                                                 |
| $f_B''$     | Free fraction of quinidine in blood.                                                                                |
| $V_1$       | Saturable rate ( $V_{max1}$ ; nmol/min, $K_{m1}$ ; nmol/ml) of conversion from imipramine to 2-hydroxyimipramine.   |
| $V_2$       | Saturable rate ( $V_{max2}$ ; nmol/min, $K_{m2}$ ; nmol/ml) of conversion from imipramine to desipramine.           |
| $V_3$       | Saturable rate ( $V_{max3}$ ; nmol/min, $K_{m3}$ ; nmol/ml) of conversion from desipramine to 2-hydroxydesipramine. |
| $V_4$       | Saturable rate ( $V_{max4}$ ; nmol/min, $K_{m4}$ ; nmol/ml) of conversion from desipramine to "other metabolites".  |
| $K_I(I)$    | Constant for competitive inhibition of desipramine 2-hydroxylation by imipramine, nmol/ml.                          |
| $K_I(D)$    | Constant for competitive inhibition of imipramine 2-hydroxylation by desipramine, nmol/ml.                          |
| $K_I(I-Q)$  | Constant for competitive inhibition of imipramine 2-hydroxylation by quinidine, nmol/ml.                            |
| $K_I(D-Q)$  | Constant for competitive inhibition of desipramine 2-hydroxylation by quinidine, nmol/ml.                           |
| $R_I(I)$    | $= K_{m1}/K_I(D) = K_{m1}/K_I(I-Q).$                                                                                |
| $R_I(D)$    | $= K_{m3}/K_I(I) = K_{m3}/K_I(D-Q).$                                                                                |

---

と Imipramine 2 位水酸化反応速度の関係は上に凸である (パネル B'、破線) が、Quinidine 併用によってほぼ直線の関係となった。このことは Imipramine の脱メチル化速度の R に対する関係にも反映し、パネル A の直線関係を再現するため  $V_2$  も R に対して直線関係となった。

一方、Imipramine の 2 位水酸化反応に対する CL は Quinidine による競合的な阻害によって  $K_m$  値が大きくなり、R に対してほぼ一定となった (パネル B'、実線)。また、Imipramine の脱メチル反応は本来の  $K_m$  および  $V_{max}$  値が大きいので、Quinidine 併用時でも R に対して線形関係を維持していることが予想された (パネル C'、実線)。

Imipramine の定常状態血中濃度 ( $C_{ss}^{IMI}$ ) は、

$$C_{ss}^{IMI} = \frac{R}{f_B(CL_1 + CL_2)} \dots (4-19)$$

で表現される。Quinidine 併用によって  $CL_1$  および  $CL_2$  の両固有クリアランスは R に対してほぼ一定となることから、 $C_{ss}^{IMI}$  は R の増加につれて直線的に上昇することが予測された。

一方、DMI の 2 位水酸化反応は、Imipramine の 2 位水酸化活性と同様、Quinidine によって競合的に阻害を受け、その CL は大きく低下し、R に対してほぼ一定となる (パネル D'、実線)。また、DMI からの「他の代謝物」の生成速度 ( $V_4$ ) は、本来の  $V_{max}$  値が低いいため頭打ちとなることが予想された (パネル E、実線)。したがって、R に対して線形に上昇する  $V_2$  (パネル C、実線) の関係を維持するため、活性が頭打ちとなった  $V_4$  を補うことによって、 $V_3$  は R に対して下に凸の関係となる (パネル D、実線)。

Imipramine 同様、DMI の  $C_{ss}^{DMI}$  は、

$$C_{ss}^{DMI} = \frac{V_2}{f_B(CL_3 + CL_4)} \dots (4-15)$$

で表現される。この式において  $V_2$  は R に対してほぼ線形に上昇する (パネル C、実線) が、 $CL_4$  は R の上昇につれて顕著に低下する (パネル E'、実線)。したがって、R と定常状態 DMI 血中濃度の関係は、Quinidine の併用によって非線形な関係が強調される予測となることが考察された。

本小節による予測は、肝灌流実験で得られた Imipramine および DMI の 2 位水酸化速度の Quinidine 併用による変動と対応する事ができる。すでに、第 4 章 5 節 [3] で示したように、両 2 位水酸化速度は Quini-

dineに対し、異なる影響を受けた。すなわち、Imipramineの2位水酸化速度は約 $1/2$ になったのに対し、DMIの2位水酸化速度は影響を受けなかった (Figure 4-10)。この実験結果はモデルによる予測 (Scheme 4-3、パネルBおよびDの実線 vs. 破線) と良く一致しており、本節で確立された速度論的モデルは、ImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度を同時に予測できただけではなく、その代謝過程の変動も予測できることが明かとなった。

現在、ヒトおよびラットにおいて薬物代謝活性あるいは体内動態が遺伝的な多様性を示す40種類以上の薬物が報告されており、これらの薬物は広範囲にわたっていることから (Inaba et al.,1985)、ヒトにおいてその2位水酸化反応が遺伝的多様性を示す、典型的な薬物であるImipramine およびDMI (Brosen et al.,1986b; Steiner et al.,1987; Otton et al.,1984) が併用される可能性は極めて高いと考えられる。したがって、本小節で確立された速度論的モデルは、ヒトにおける適切な代謝パラメータおよび非結合率を代入すればそのまま、臨床での的確な投与指針を立てることに利用することが可能である。

また、本小節の目的は、前節で確立されたImipramineの速度論的モデルの妥当性を、薬物代謝活性に変動を与えた状況下でも、in vitro 代謝実験からのパラメータを用いて in vivo 定常状態血中濃度の予測が可能であるか検討することにより確認することであった。薬物代謝活性の人為的な変動として、ImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応に競合的な阻害剤であるQuinidineを併用し、そのときの体内動態の変化を追跡した。その結果、本小節 [3] に示した肝灌流実験での各水酸化体の生成速度の変動と各代謝経路の代謝速度の変動に関するシミュレーションとの一致 [6]、定常状態血中濃度の実測値と予測値と一致 [5] から、本研究で確立した速度論的モデルの妥当性が改めて確認された。

## 4-6 小 括

本章でのモデル構築とその妥当性確認の研究の流れを以下にまとめた。

### モデルの構築 (主に 4-1 ~ 4-4)

- ①定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度はImipramineの門脈内定速注入速度に対して非線形な関係であった (Figure 4-3)。



- ②in vitro代謝Kinetics より得られた各代謝経路の反応初速度から算出された $K_m$ および $V_{max}$ 値を用いて、定常状態での速度論的モデルを構築し、ImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度を予測したところ、実測値に比べ顕著に低かった (Figure 4-6 破線)。



- ③In vitro代謝実験より明らかにされたImipramine代謝反応の特性,すなわち、平行代謝経路間相互作用を考慮した。



- ④平行代謝経路間相互作用を考慮したモデルによる予測値は良く実測値を反映していた (Figure 4-6 実線)。この時、平行代謝経路間相互作用を考慮したことによって、DMIの定常状態血中濃度はImipramineの濃度に比べより顕著にこの相互作用の影響を受けていることが明かとなった。



- ⑤上記のモデルにおいてin vivoでのImipramineの各代謝速度および肝固有クリアランスを計算したところ、Imipramineの血中濃度は平行代謝経路間相互作用によってその消失のクリアランスのみが低下しているのに対し、DMIの血中濃度は消失のクリアランスだけではなく、生成速度 (Imipramineの脱メチル化速度) も影響を受けていることが予想され、このことが④で言及した影響の受け方の違いとなっていることが示唆された。(第4章4節 [4])。

## モデルの妥当性の確認 (Quinidine併用時の体内動態変動の予測)

- ①ImipramineおよびDMIの定常状態血中濃度はQuinidineの併用によってコントロールに比べ顕著に上昇した。また、Imipramineの血中濃度とRの関係は線形の関係に近づいた。一方、DMIの血中濃度とRの関係はより非線形の関係が強調された (Figure 4-8)。



- ②QuinidineによるImipramineおよびDMIの2位水酸化反応に対する競合的な阻害関係・阻害定数およびQuinidineによるImipramineおよびDMIの血中非結合率の変動をコントロールで確立された (平行代謝経路間相互作用を考慮している) モデルに導入し、両定常状態血中濃度を予測したところ、実測値と比較的良く一致した (Figure 4-11の実線a, b)。



- ③上記のモデルに基づき、Quinidine併用時のImipramineの各代謝速度および肝固有クリアランスを計算したところ、Imipramineの消失に関係している2つの肝固有クリアランス (2位水酸化反応と脱メチル化反応) はRに対してほぼ一定となっているが、一方、DMIの消失に関与している「他の代謝物」生成の肝固有クリアランスはRの上昇に対して顕著に低下していることが明かとなった (Scheme 4-3)。このことが、①のQuinidine併用時の両薬物の定常状態血中濃度のRに対する関係の異なる変動パターンに反映していることが推測された。



- ④さらに、Quinidine併用によるImipramineおよびDMIの2位水酸化速度の変動を上記のモデルに基づいて予測した。その結果、Imipramineの2位水酸化速度はQuinidine併用によって、顕著に低下したのに対し、DMIの2位水酸化速度はQuinidineによって影響を受けていないことが予測された (Scheme 4-3)。これらの予測は、肝灌流実験において両水酸化代謝物の排泄速度の変動 (Figure 4-10) と極めて良く一致しており、本章で構築された速度論的モデルの妥当性が確認された。

以上の流れにしたがって、本章では、Imipramineを門脈内に定速投与した時の定常状態ImipramineおよびDMI 血中濃度を予測できるモデルをin vitro代謝実験より得られたkineticパラメータとImipramine・DMI代謝における特性（平行代謝経路間相互作用）から構築した。さらに、薬物代謝活性の人為的な変動として、ImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応に競合的な阻害剤であるQuinidineを併用し、そのときの体内動態の変化をコントロールと同じ手法で予測した結果、実測値と良く一致したことよりモデルの妥当性が確認された。

## 第5章 非定常状態におけるImipramineとDMIの生理学的モデルの構築

前章で確立された定常状態での速度論的モデルは薬物 (Imipramine) が、体内 (門脈内) に定速注入され、定常状態の条件が達成されたときのものである。すなわち、Imipramineが経口より、反復投与されたとき、Imipramineおよびその活性代謝物DMIの血中濃度が時間に対して、一定となったときの投与速度と血中濃度の関係を予測・解析できることを意味している。この場合、体内動態を記述する速度式は、薬物の収支関係に限定できるため、きわめて簡単な式で表現することができた。

一方、薬物が単回投与されたときの血中濃度は、時間の経過と共に変動し、この血中濃度－時間推移を予測するためには、薬物が主に分布する各臓器に関して、速度式を立てなければならない。この各速度式の構築の手順は、Bishoff と Dedrick によって確立され、一般に、各臓器容積とそれを支配している血管の血流量などの生理学的パラメータを必要とすることから、生理学的モデル (Physiologically Based Pharmacokinetic Model) と呼ばれる (Himmelstein & Lutz, 1979; Gerlowski & Jain, 1983)。その特徴は、

- ①モデルを構築している速度論的パラメータのうち、薬物の移行を表わすものは、その単位として血流量を基準としたものであり、全て、具体的な意味を持っている。
- ②対象とする薬物 (およびその代謝物) に限定したモデル構築を行なう (解剖学的パラメータを除いて、対象薬物固有のパラメータである)。
- ③対象とする薬物の血中濃度だけではなく、薬効に関連した臓器 (いわゆる標的臓器) 内薬物濃度の時間推移を予測することを目的としている。
- ④実験動物レベルで構築されたモデルをヒトにスケールアップすることが可能である (アニマルスケールアップ)。すなわち、ヒトにおける対象薬物の標的臓器内薬物濃度の時間推移を予測することによって投与指針を立てる上で極めて有用である。

などが挙げられる。Table 5-1 には、現在までに確立された生理学的

モデルのうち、本研究と同様、肝臓での薬物消失速度を肝細胞分画を用いた in vitro 代謝Kineticsのパラメータを組み込んでいるもの限定してまとめた。

Table 5 - 1 肝細胞分画を用いた in vitro 代謝Kineticsから構築された生理学的モデル

| 薬物                  | 動物         | 肝細胞分画                 | 文献 |
|---------------------|------------|-----------------------|----|
| Ara-C <sup>*1</sup> | human      | human homogenate      | ①  |
| Ethanol             | rat        | rat homogenate        | ②  |
| Ethoxybenzamide     | rat,rabbit | rat,rabbit microsomes | ③  |
| Hexobarbital        | rat        | rat microsomes        | ④  |
| Thiopental          |            |                       |    |
| Tolbutamide         | rat        | rat microsomes        | ⑤⑥ |
| Sulfonamide         |            |                       |    |
| Diazepam            | rat,man    | rat microsomes        | ⑦⑧ |

\*1-  $\beta$ -D-arabirofuranosylcytosine;①Dedrick et al.,1972; ②Dedrick & Forrester,1973;③Lin et al.,1982;④Igari et al.,1982;⑤Sugita et al.,1981;⑥Sugita et al.,1982;⑦Igari et al.,1983;⑧Igari et al.,1984

本章では、対象薬物として取り上げたImipramineを、単回経口（門脈内）投与したときの、血中及び臓器内濃度－時間推移に関する生理学的モデルの構築を行なった。Imipramineをモデル薬物とした場合、その目標とするモデルは、

- Imipramineが投与されたときの、活性代謝物DMIの体内動態、特に、向精神作用の標的臓器としての脳内濃度の時間経過に対する変化を同時に予測できること。
- ラットでの体内動態からヒトにスケールアップを行い、ヒト脳内濃度の時間推移を予測できること。

を、満足する必要がある。また、以上の各予測に対して、ラット肝ミク

ロソームレベルで確認された平行代謝経路間相互作用がどの程度影響を与えているか検討することによって、Whole Body での生理学的モデルの構築における in vitro 代謝実験で得られた知見の重要性を改めて確認した。

## 5-1 ImipramineおよびDMIの各主要臓器に対する平衡定数の測定

本章において確立することを目的としている生理学的モデルは、Imipramine を単回（門脈内）投与したときの動脈中および主要臓器、特に、向精神薬の標的臓器である脳内ImipramineおよびDMI濃度の時間推移を予測できるモデルである。この場合、前章での定常状態のモデルに使用した肝臓におけるImipramineおよびDMIの薬物代謝消失に関する式に加えて、各主要臓器での薬物濃度－時間推移を表現する微分方程式を立てる必要がある（Himmelstein & Lutz, 1979; Gerlowski & Jain, 1983）。すなわち、脳、肺、動脈血・静脈血プール、心臓、脾臓、脾臓、消化管、腎臓、筋肉、脂肪組織、皮膚などの非消失器官に関して、（5-1）式が成立する。

$$V_{org} \cdot \frac{dC_{org}}{dt} = (C_{int,org} - C_{out,org}) \cdot Q_{org} \quad \dots(5-1)$$

ここで、 $V_{org}$ : 対象臓器の解剖学的容積、 $C_{org}$ : 対象臓器内薬物濃度、 $C_{in,org}$ : 対象臓器へ流入する血液中薬物濃度、 $C_{out,org}$ : 対象臓器から流出する血液中薬物濃度、 $Q_{org}$ : 対象臓器を流れる血液量である。この式において、各臓器の流出液中薬物濃度（ $C_{out,org}$ ）は一般に（肺を除いて）実測が不可能なので、臓器内薬物濃度（ $C_{org}$ ）と $C_{out,org}$ の間に平衡定数（ $K_{p,org}$ ）を導入して関連づける。すなわち、

$$K_{p,org} = \frac{C_{org}}{C_{out,org}} \quad \dots(5-2)$$

の関係を（5-1）式に代入して、（5-1）式は、

$$V_{org} \cdot \frac{dC_{org}}{dt} = (C_{int,org} - \frac{C_{org}}{K_{p,org}}) \cdot Q_{org} \quad \dots(5-3)$$

と書き換えることができる。 $K_{p,org}$ の算出方法としていくつかの方法が報告されている（Lin et al., 1982）。すなわち、

- ① In vivo において単回静脈内投与後の $\beta$ 相において実験動物を屠殺、各臓器内濃度と静脈内濃度の関係から補正式を用いて算出する方法
- ② 臓器試料を用いて平衡透析法から算出する in vitro 法

③静脈内に薬物を定速注入したとき、定常状態で、動物を屠殺し、動脈血中濃度と各臓器内濃度の比から  $K_{p,org}$  を評価する方法

である。本研究では補正式を必要とせず直接パラメータを評価できる③の方法を採用した。すなわち、(5-3)式が定常状態において(左辺) = 0なので、

$$C_{in,org} = \frac{C_{org}}{K_{p,org}} \quad \therefore K_{p,org} = \frac{C_{org}}{C_{in,org}} \quad \dots(5-4)$$

となり、(5-4)式から直接  $K_{p,org}$  が評価できる。

一方、消失臓器である肝臓での臓器内濃度-時間推移式は、Evansらがプロプラノロールの肝臓内分布に適用した式を採用した (Evans et al., 1973)。この式では、肝臓内で薬物が臓器内オルガネラに結合した濃度 ( $C_{bound,liver}$ ) と遊離型濃度 ( $C_{free,liver}$ ) に分けて存在し、 $C_{free,liver}$  が肝流出液中遊離型薬物濃度 ( $C_{out,liver}$  に  $f_B$  を掛けた濃度) に等しく、かつ、代謝反応に関与する基質濃度である ("Well-stirred model" の仮定 (Pang & Rowland., 1977))。すなわち、つぎの(5-5)式が成立していることを仮定している。

$$V_{liver,total} \cdot C_{org,liver} = V_{liver,tissue} \cdot C_{bound,liver} + V_{liver,water} \cdot C_{free,liver} \quad \dots(5-5)$$

ここで、 $V_{liver,total}$ ; 肝臓容積、 $V_{liver,tissue}$ ; 肝臓オルガネラ容積、 $V_{liver,water}$ ; 肝臓水分容積、 $C_{org,liver}$ ; 肝臓内薬物濃度、 $C_{bound,liver}$ ; 肝臓内でオルガネラに結合している薬物濃度、 $C_{free,liver}$ ; 肝臓内水分に分布している薬物濃度である。(5-5)式の両辺を時間に対して微分し、時間推移式とする。また、この時、 $C_{free,liver} = C_{out,liver} \cdot f_B$  の関係を代入する。

$$V_{liver,total} \cdot \frac{dC_{org,liver}}{dt} = V_{liver,tissue} \cdot \frac{dC_{bound,liver}}{dt} + V_{liver,water} \cdot \frac{dC_{free,liver}}{dt} \quad \dots(5-6)$$

$$\therefore V_{liver,tissue} \cdot \frac{dC_{bound,liver}}{dt} + V_{liver,water} \cdot \frac{dC_{free,liver}}{dt} = (C_{in,liver} - C_{out,liver}) \cdot Q_{liver} - J_{met}(f_B \cdot C_{out,liver}) \quad \dots(5-7)$$

(5-7)式において  $J_{met}(f_B \cdot C_{out,liver})$  は前章(4-10)～(4-11)式に示した代謝による消失速度を表わしており、その基質濃度が  $f_B \cdot C_{out,liver}$  であることを意味している。また、(5-7)式にお

いて  $C_{\text{bound,liver}}$  が  $C_{\text{free,liver}} (=f_B \cdot C_{\text{out,liver}})$  の関数  $A(f_B \cdot C_{\text{out,liver}})$  (例えば Langmuir-type の結合式など) で表現できる場合、その時間に対する次の微分式で置き換えることができる。

$$V_{\text{liver,tissue}} \cdot f_B \cdot \frac{dA(C_{\text{out,liver}})}{dt} + V_{\text{liver,water}} \cdot f_B \cdot \frac{dC_{\text{out,liver}}}{dt} = (C_{\text{in,liver}} - C_{\text{out,liver}}) Q_{\text{liver}} - J_{\text{met}} (f_B \cdot C_{\text{out,liver}}) \dots (5-8)$$

このことから、肝臓における時間推移式を完成するためには、肝流出液中遊離型薬物濃度と、肝臓組織への結合型薬物濃度の関係を求めなければならない。

以上の考察から、本節では非消失器官に関しては平衡定数 ( $K_{p,\text{org}}$ ) を、また、肝臓に関しては、in vivo における肝静脈採血法 (Yokota et al., 1976) を用いて肝流出液中遊離型薬物濃度を測定し、肝流出液中遊離型薬物濃度と肝臓組織への結合型薬物濃度の関係を調べた。各定数は、静脈内に Imipramine および DMI を投与速度を変えて定速注入し、定常状態でラットを屠殺したのち、動脈血中 (肝臓に関しては肝静脈血中) 薬物濃度と臓器内濃度の関係から評価した。

### [実験結果]

Figure 5-1 には Imipramine および DMI の主要臓器 (肝臓と脳を除く) 内濃度と動脈血中濃度の関係を示した。この図に示した各臓器への両薬物の分布は血中濃度に対して比例的な関係 (線形) で近似できた。したがって、これらの臓器に対する平衡定数を、臓器内濃度に対する血中濃度の回帰直線の傾きから評価した (Table 5-2 A)。一方、脳および肝臓への両薬物の分布を Figure 5-2 に示した。両臓器への分布の内、脳への Imipramine の分布および肝臓への Imipramine および DMI の分布は、それぞれ血中濃度および肝静脈血中濃度に対して非線形であったが、脳への分布は血中濃度に対して非線形な上昇を、また、肝臓に対しては結合の飽和が観測されたので、脳では Hill 式を、また、肝臓へは Langmuir-type の結合式を仮定して、非線形最小自乗法を用いて結合に関するパラメータを推定した (Table 5-2 B)。

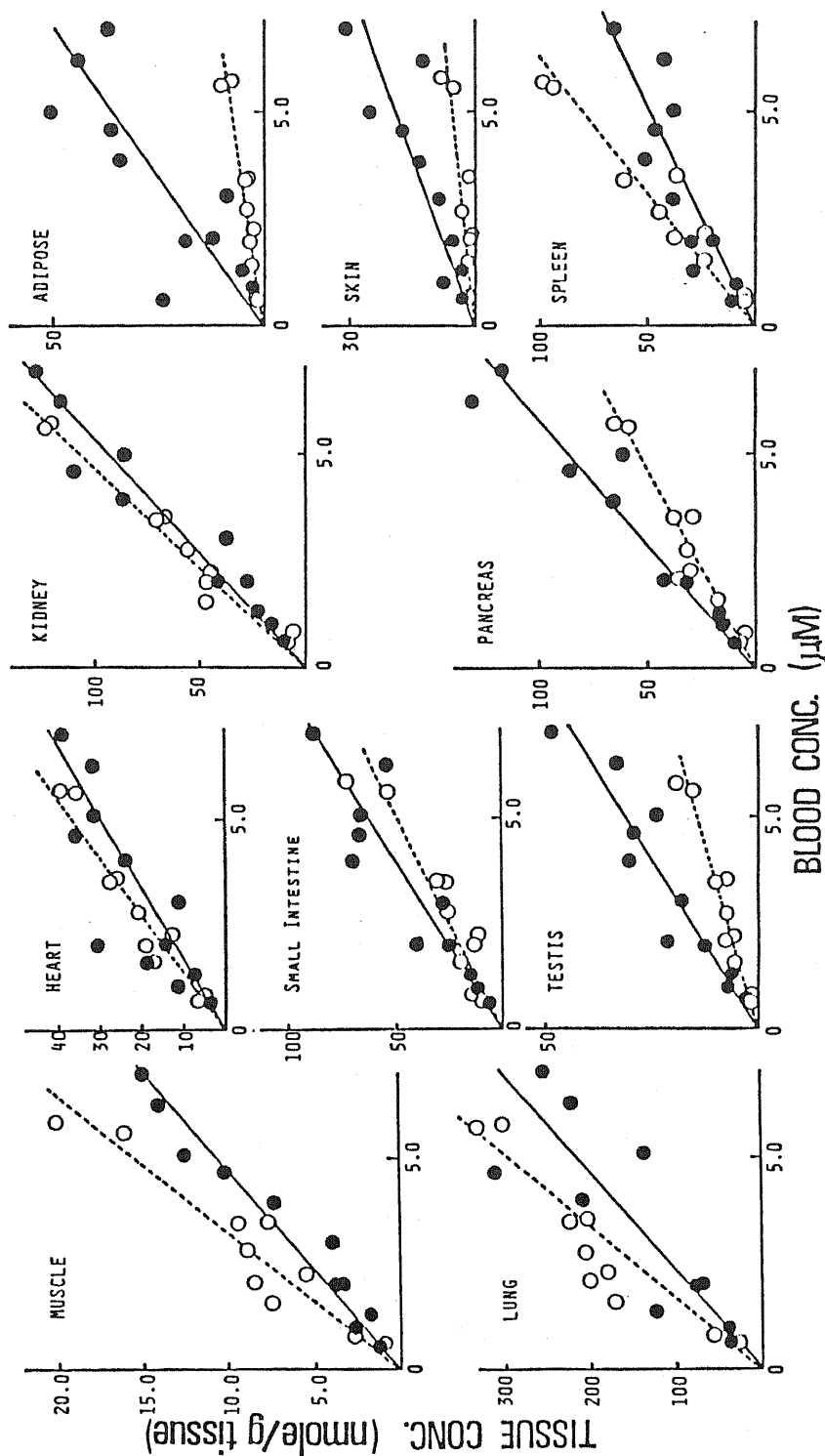


Figure 5-1  
EFFECTS OF BLOOD CONCENTRATIONS OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE ON THEIR CONCENTRATIONS  
IN ADIPOSE, LUNG, MUSCLE, SPLEEN, KIDNEY, PANCREAS, HEART, G.I. TRACT, AND SKIN

Key: (●) imipramine; (○) desipramine concentration. The solid and broken lines are best-fit ones obtained from the linear regression analysis using the equation  $y = A \cdot x$ , where  $x$  represents the blood concentration,  $y$ , the tissue concentration, and  $A$ , the linear partition coefficient for imipramine and desipramine, respectively.

Table 5-2A

LINEAR TISSUE-TO-BLOOD PARTITION COEFFICIENTS FOR  
IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE

| Tissue  | Kp <sup>a</sup> |      | Tissue    | Kp <sup>a</sup> |      |
|---------|-----------------|------|-----------|-----------------|------|
|         | IMI             | DMI  |           | IMI             | DMI  |
| Adipose | 6.95            | 1.18 | Kidney    | 18.7            | 21.2 |
| Lung    | 43.8            | 62.2 | Pancreas  | 16.9            | 10.5 |
| Brain   | - <sup>b</sup>  | 5.42 | Heart     | 6.03            | 7.21 |
| Muscle  | 2.11            | 1.02 | G.I.tract | 12.3            | 9.69 |
| Spleen  | 9.48            | 15.6 | Skin      | 3.63            | 1.02 |

<sup>a</sup> Kp value(tissue-to-blood partition coefficient) was calculated from the following linear regression line described in Figure 5-1;  $C(\text{tissue}) = Kp \times C(\text{blood})$ .

<sup>b</sup> Relation between tissue binding of imipramine for the brain and the blood imipramine concentrations showed a nonlinearity(see Figure 5-2). Therefore, nonlinear tissue binding parameters were shown in table 5-2B.

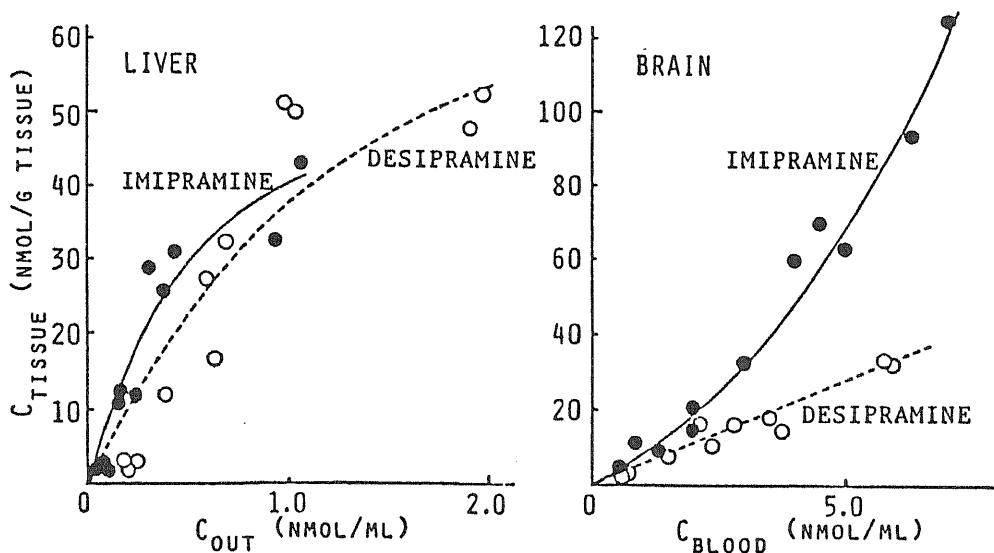


Figure 5-2

EFFECTS OF HEPATIC VENOUS OR BLOOD CONCENTRATION OF IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE ON THEIR LIVER OR BRAIN CONCENTRATION.

Key: (●) imipramine; (○) desipramine concentration. Imipramine and desipramine concentration in the liver against their hepatic venous concentration were fitted by Langmuir equation, and imipramine concentration in the brain against its blood concentration was analyzed by Hill's equation (see the legend of Table 5-2B). The relationship between desipramine concentration in the brain and its blood concentration was estimated by linear regression analysis as described in the legend of Figure 5-1.

Table 5-2B

**NONLINEAR TISSUE BINDING PARAMETERS FOR  
IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE**

| Tissue | Compound    | CA<br>(nmol/ml)     | Kd                  | n                 |
|--------|-------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| Liver  | imipramine  | 61.8 <sup>a</sup>   | 0.0592 <sup>a</sup> | -                 |
|        | desipramine | 101.8 <sup>a</sup>  | 0.0955 <sup>a</sup> | -                 |
| Brain  | imipramine  | 935000 <sup>b</sup> | 5400 <sup>b</sup>   | 1.48 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>CA (binding capacity) and Kd (dissociation constant) for the liver were estimated from the following equation by the nonlinear least square method "simplex";

$$C(\text{tissue}) = f_B \times C_{\text{out,ss}} + CA \times f_B \times C_{\text{out,ss}} / (Kd + f_B \times C_{\text{out,ss}})$$

where  $C_{\text{out,ss}}$  represents the steady-state hepatic venous concentration.

<sup>b</sup>CA, Kd and n(Hill's coefficient) for brain were estimated from the following equation by the nonlinear least square method "simplex";

$$C(\text{tissue}) = f_B \times C_{\text{ss}} + CA \times (f_B \times C_{\text{ss}})^n / [(f_B \times C_{\text{ss}})^n + Kd]$$

where  $C_{\text{ss}}$  represents the steady-state systemic concentration.

### [考察]

両薬物の分布に関して以上の実験から、脂溶性薬物であるImipramineとDMIは、protein-richな組織（筋肉など）より、fat-richな組織（脂肪組織など）に高い平衡定数で分布すること、また、Propranolol（Gault et al.,1983）やDiazepam（Roerig et al.,1984）と同様、肺に対して極めて高い親和性が確認され、これらの臓器がImipramineおよびDMIの体内分布に極めて重要な役割を持っていることが明らかにされた。さらに、標的臓器である脳内分布に関して、Imipramineでは血中濃度に関して非線形な上昇が認められた。このことから、薬効を推定する上で、血中濃度の投与量に対する非線形性に加えて、標的臓器内への非線形な分布も考慮すべき要因であることが明かとなった。

## 5-2 定常状態での速度論的モデルの非定常状態生理学的モデルへの拡張

本節では、第4章で確立された定常状態でのImipramineおよびDMIの速度論的モデルを、前節で調べた主要臓器への各薬物の分布に関する知見と、ラットの各臓器容積及び血流量に関する情報を基に、非定常状態での生理学的モデルに拡張した。本研究において確立することを目的とする生理学的モデルをFigure 5-3に示した。Imipramineは肝臓に小腸から流入する血流、すなわち門脈血中に一定時間(20分)定速注入された。Imipramineは肝臓において前節Scheme 4-1に示した代謝経路によってDMIを生成、あるいは、環2位水酸化反応によって代謝消失する。Imipramineおよび生成したDMIは肝静脈血流を通り、大静脈血に合流し、心臓から肺を通して大動脈血中に出現する。サンプリングは下肢動脈から採血することによって大動脈血中濃度の時間推移を測定した。また、大動脈血は標的臓器である脳をはじめ、各主要臓器に分配流入する。この生理学的モデルを構成している速度式は前節(5-3)および(5-8)式を基に、次のように表現される(各式中のパラメータの意味はそれらの値とともにTable 5-3に示した)。

●動脈コンパートメントに関して ( $i=IMI$  or  $DMI$ )

$$V_A \frac{dC_{A,i}}{dt} = Q_{LU} \frac{C_{LU,i}}{K_{p,LU,i}} - (Q_{BR} + Q_{HE} + Q_{LA} + Q_{PA} + Q_{SP} + Q_{GI} + Q_{KI} + Q_{MU} + Q_{AD} + Q_{SK}) \cdot C_{A,i} \dots (5-9)$$

●肺コンパートメントに関して ( $i=IMI$  or  $DMI$ )

$$V_{LU} \frac{dC_{LU,i}}{dt} = Q_{VE} \cdot C_{VE,i} - Q_{LU} \cdot \frac{C_{LU,i}}{K_{p,LU,i}} \dots (5-10)$$

●心臓、脾臓、脾臓、消化管、腎臓、筋肉、脂肪、皮膚コンパートメントに関して ( $k=HE, PA, SP, GI, KI, MU, AD, SK$ ;  $i=IMI$  or  $DMI$ )

$$V_k \frac{dC_{k,i}}{dt} = Q_{A,i} \cdot C_{A,i} - Q_k \cdot \frac{C_{k,i}}{K_{p,k,i}} \dots (5-11)$$

●静脈血コンパートメントに関して ( $Q_{LI}=Q_{LA}+Q_{PA}+Q_{SP}$ ,  $i=IMI$  or  $DMI$ )

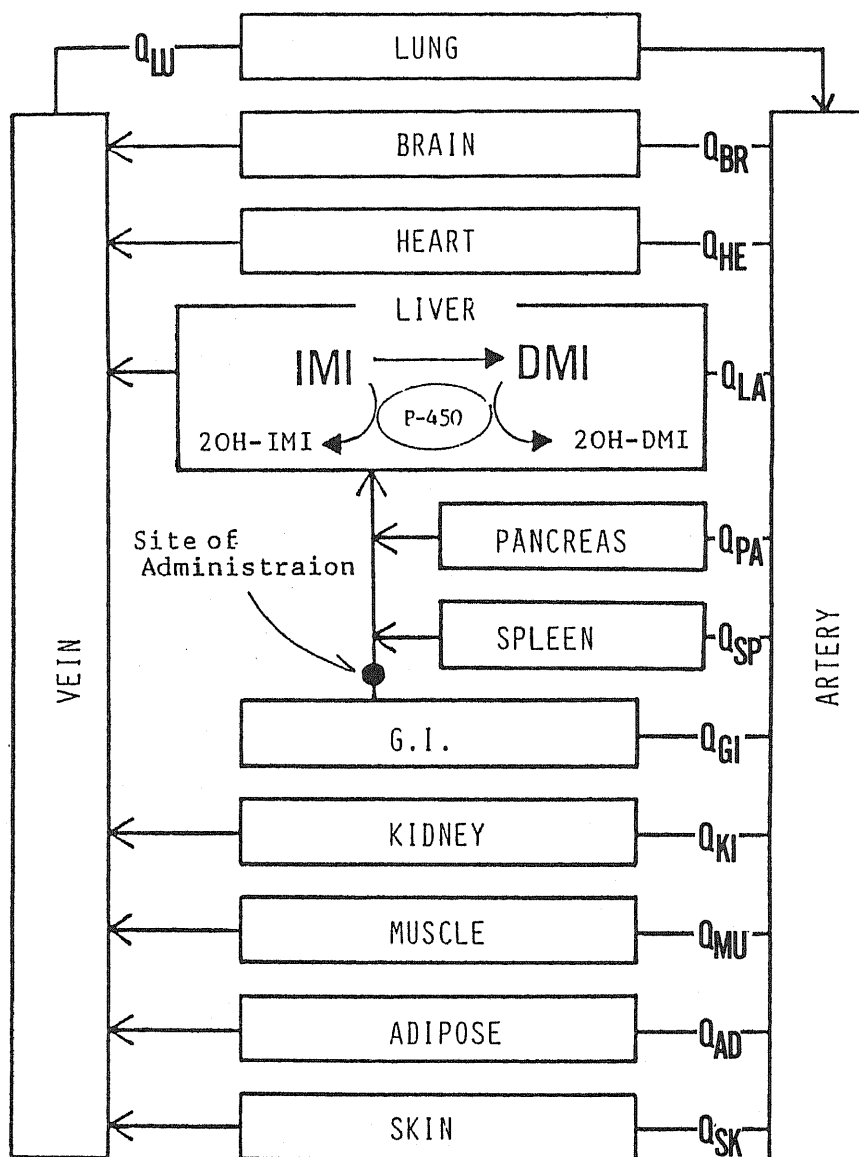


Figure 5-3

SCHEMATIC DIAGRAM OF THE 13 COMPARTMENT PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODEL DEVELOPED FOR IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE.

Table 5-3

## PARAMETERS FOR PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODEL OF IMIPRAMINE IN RATS

| Parameters for drug distribution                                                                                                                             |                             |                    |                                          |                  |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------------------|------------------|-------|
| Tissue                                                                                                                                                       | Volume <sup>a</sup><br>(ml) |                    | Blood flow rate <sup>a</sup><br>(ml/min) |                  |       |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Linear partition coefficient <sup>b</sup>                                                                                                                    |                             |                    |                                          |                  |       |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Venous blood                                                                                                                                                 | V <sub>E</sub>              | 13.6               | Q <sub>VE</sub>                          | 44.5             |       |
| Arterial blood                                                                                                                                               | V <sub>A</sub>              | 6.8                | Q <sub>A</sub>                           | 44.5             |       |
| Adipose                                                                                                                                                      | V <sub>AD</sub>             | 10.0               | Q <sub>AD</sub>                          | 1.8              |       |
| Lung                                                                                                                                                         | V <sub>LU</sub>             | 1.2                | Q <sub>LU</sub>                          | 44.5             |       |
| Brain                                                                                                                                                        | V <sub>BR</sub>             | 1.2                | Q <sub>BR</sub>                          | 1.1              |       |
| Muscle                                                                                                                                                       | V <sub>MU</sub>             | 125.0              | Q <sub>MU</sub>                          | 6.8              |       |
| Spleen                                                                                                                                                       | V <sub>SP</sub>             | 1.0 <sup>d</sup>   | Q <sub>SP</sub>                          | 1.0 <sup>d</sup> |       |
| Kidney                                                                                                                                                       | V <sub>KI</sub>             | 2.0                | Q <sub>KI</sub>                          | 11.4             |       |
| Pancreas                                                                                                                                                     | V <sub>PA</sub>             | 1.0 <sup>d</sup>   | Q <sub>PA</sub>                          | 1.0 <sup>d</sup> |       |
| Heart                                                                                                                                                        | V <sub>HE</sub>             | 1.0                | Q <sub>HE</sub>                          | 4.2              |       |
| G.I. tract                                                                                                                                                   | V <sub>GI</sub>             | 11.1               | Q <sub>GI</sub>                          | 12.0             |       |
| Skin                                                                                                                                                         | V <sub>SK</sub>             | 43.7               | Q <sub>SK</sub>                          | 4.5              |       |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Nonlinear tissue binding parameter <sup>e</sup>                                                                                                              |                             |                    |                                          |                  |       |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Brain                                                                                                                                                        |                             |                    | CA, BR, IMI                              | 935000           |       |
|                                                                                                                                                              |                             |                    | n                                        | 1.48             |       |
| Liver                                                                                                                                                        | V <sub>LI</sub>             | 9.9 <sup>f</sup>   | Q <sub>LI</sub>                          | 14.0             |       |
|                                                                                                                                                              | (V <sub>LI,water</sub>      | 5.47) <sup>g</sup> |                                          | CA, LI, IMI      | 61.8  |
|                                                                                                                                                              | (V <sub>LI,tissue</sub>     | 2.23) <sup>g</sup> |                                          | CA, LI, DMI      | 101.8 |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Parameters for free fractions in blood <sup>h</sup> f <sub>B</sub> = 0.109                      f <sub>B</sub> ' = 0.0522                                    |                             |                    |                                          |                  |       |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Parameters for metabolism <sup>h</sup>                                                                                                                       |                             |                    |                                          |                  |       |
|                                                                                                                                                              | Km                          |                    | Vmax                                     |                  |       |
|                                                                                                                                                              | (nmol/ml)                   |                    | (nmol/min/whole liver)                   |                  |       |
|                                                                                                                                                              | Km <sub>1</sub>             | 0.430              | Vmax <sub>1</sub>                        | 343              |       |
|                                                                                                                                                              | Km <sub>2</sub>             | 5.12               | Vmax <sub>2</sub>                        | 2225             |       |
|                                                                                                                                                              | Km <sub>3</sub>             | 0.391              | Vmax <sub>3</sub>                        | 350              |       |
|                                                                                                                                                              | Km <sub>4</sub>             | 0.785              | Vmax <sub>4</sub>                        | 93               |       |
| <hr/>                                                                                                                                                        |                             |                    |                                          |                  |       |
| Parameters for metabolic interaction <sup>h</sup> Km <sub>1</sub> /K <sub>I</sub> (D) = 1.07                      Km <sub>3</sub> /K <sub>I</sub> (I) = 1.05 |                             |                    |                                          |                  |       |

<sup>a</sup>Parameters obtained from the literature (Lin et al., 1982) except for spleen and pancreas.

<sup>b</sup>Data obtained from Table 5-2A.

<sup>c</sup>Nonlinear binding parameters were listed below.

<sup>d</sup>Obtained from the literature (Sugita et al., 1982).

<sup>e</sup>Data obtained from Table 5-2B.

<sup>f</sup>Average liver weight used in the study for physiologically modeling.

<sup>g</sup>Fraction of water content of the liver (0.71) was obtained from the literature (Evans et al., 1973), i.e. V<sub>LU,water</sub> = 0.71 x 7.7, and V<sub>LU,tissue</sub> = 7.7 - V<sub>LU,water</sub>.

<sup>h</sup>Data obtained from Table 4-8.

$$V_{VE} \frac{dC_{VE,i}}{dt} = Q_{BR} \cdot \frac{C_{BR,i}}{K_{p,BR,i}} + Q_{HE} \cdot \frac{C_{HE,i}}{K_{p,HE,i}} + Q_{LI} \cdot \frac{C_{LI,i}}{K_{p,LI,i}} + Q_{KI} \cdot \frac{C_{KI,i}}{K_{p,KI,i}} \\ + Q_{MU} \cdot \frac{C_{MU,i}}{K_{p,MU,i}} + Q_{AD} \cdot \frac{C_{AD,i}}{K_{p,AD,i}} + Q_{SK} \cdot \frac{C_{SK,i}}{K_{p,SK,i}} + Q_{LU} \cdot \frac{C_{LU,i}}{K_{p,LU,i}} \dots (5-12)$$

●標的臓器である脳コンパートメントに関してImipramineでは非線形性が確認された (Figure 5-2 および Table 5-2 B) ので、分布に関して Hill 式を仮定した。

$$V_{BR} \frac{dC_{BR,IMI}}{dt} = Q_A \cdot C_{A,IMI} - Q_{BR} \cdot \frac{C_{BR,IMI}}{K_{p,BR,IMI}} \dots (5-13)$$

ここで  $K_{p,BR,IMI}$  は、

$$K_{p,BR,IMI} = \frac{f_B + C_{A,IMI} \cdot f_B^n \cdot C_{A,IMI}^{n-1}}{K_{d,BR,IMI} + (f_B \cdot C_{A,IMI})^n}$$

また、DMI に関しては (5-11) 式と同様に式を立てることができる。

●肝臓コンパートメントに関しては、Imipramine および DMI とともに平衡定数に肝静脈血中濃度に対する非線形性が確認されたので (Figure 5-2)、前節 (5-7) および (5-8) 式から肝組織への結合型薬物濃度に肝静脈血中遊離型薬物濃度 ( $f_B \cdot C_{out,LI,IMI}$  or  $f_B \cdot C_{out,LI,DMI}$ ) に基づく Langmuir 式を  $f(IMI)$  あるいは  $f(DMI)$  とすると、

$$\frac{df(IMI)}{dC_{out,LI,IMI}} \cdot f_B \cdot \frac{dC_{out,LI,IMI}}{dt} = I + C_{AR} \cdot Q_{LA} + Q_{GI} \cdot \frac{C_{GI}}{K_{p,GI}} + Q_{SP} \cdot \frac{C_{SP}}{K_{p,SP}} \\ + Q_{PA} \cdot \frac{C_{PA}}{K_{p,GI} P_A} - C_{out,LI,IMI} \cdot Q_{LI} - R(IMI) \dots (5-14)$$

ここで  $\frac{df(IMI)}{dC_{out,LI,IMI}}$  は、

$$\frac{df(IMI)}{dC_{out,LI,IMI}} = V_{LI,water} + V_{LI,tissue} \cdot \frac{C_{A,IMI}}{(K_{d,LI,IMI} + f_B \cdot C_{out,LI,IMI})^2}$$

で表される。また、 $I$  は Imipramine の門脈内への投与速度であり、一定投与時間 (本研究では 20 分) 以後、 $I = 0$  である。また、 $R(IMI)$  は Imipramine の代謝消失速度を表しており第 4 章の (4-8) 式から、

$$R(IMI) = f_B \cdot CL_{int}^{IMI} \cdot C_{out,LI,IMI} = \frac{V_{max1} \cdot f_B \cdot C_{out,LI,IMI}}{K_{m1}(1 + \frac{f_B \cdot C_{out,LI,DMI}}{K_I(D)}) + f_B \cdot C_{out,LI,IMI}} + \frac{V_{max2} \cdot f_B \cdot C_{out,LI,IMI}}{K_{m2} + f_B \cdot C_{out,LI,IMI}} \dots (5-15)$$

である。(5-15) 式中のパラメータは(4-8) 式のそれと同じである。また、DMI は、同様に、

$$\frac{df(DMI)}{dC_{out,LI,DMI}} \cdot f_B \cdot \frac{dC_{out,LI,DMI}}{dt} = \frac{V_{max2} \cdot f_B \cdot C_{out,LI,IMI}}{K_{m2} + f_B \cdot C_{out,LI,IMI}} - R(DMI) - C_{out,LI,DMI} Q_{LI} \quad (5-16)$$

ここで  $\frac{df(DMI)}{dC_{out,LI,DMI}}$  は、Imipramine と同様、

$$\frac{df(DMI)}{dC_{out,LI,DMI}} = V_{LI,water} + V_{LI,tissue} \cdot \frac{CA_{LI,DMI}}{(K_{d,LI,DMI} + f_B \cdot C_{out,LI,DMI})^2}$$

と書ける。(5-16) 式中  $R(DMI)$  は、DMI の代謝消失速度を意味しており、第4章(4-9) 式から、

$$R(DMI) = V_2 = f_B \cdot CL_{int}^{DMI} \cdot C_{out,LI,DMI} = \frac{V_{max3} \cdot f_B \cdot C_{out,LI,DMI}}{K_{m3}(1 + \frac{f_B \cdot C_{out,LI,IMI}}{K_I(I)}) + f_B \cdot C_{out,LI,DMI}} + \frac{V_{max4} \cdot f_B \cdot C_{out,LI,DMI}}{K_{m4} + f_B \cdot C_{out,LI,DMI}} \dots (5-17)$$

である。以上の(5-16) および(5-17) 式中代謝に関する各パラメータは第4章の(4-9) 式と同じである。Imipramine および DMI、それぞれ13個、計26個のコンパートメントに関して、26の連立微分方程式を構築した。各血中及び組織中Imipramine および DMI 濃度は、この連立微分方程式を数値的に積分することによって計算された。数値積分は非線形性微分方程式の数値解法に安定である Adams-Moulton 法の予測子-修正子法を FORTRAN で記述し、東京大学大型計算機センター (HITACHI M-680) にプログラムしたものを使用した。各微分方程式を構成している各速度論的パラメータをTable 5-3 にまとめて示した。

### [計算結果・考察]

数値積分によって得られた各薬物の血中及び主要臓器（脳、筋肉、脂肪、心臓、膵臓、脾臓、消化管、肝臓、肺、腎臓）中濃度の時間推移を Figure 5-4 に示した。図中実線は肝ミクロソームおよび遊離肝細胞で認められた Imipramine および DMI の 2 位水酸化反応間の平行代謝経路間相互作用をモデル式 (5-15) および (5-17) 式に考慮したときの、また、図中破線は考慮しなかった時の計算値を示した。Figure 5-4 から明らかなように肝臓における代謝経路間の相互作用は DMI の予測値に対し顕著に上昇させる効果があり、より実測値に近付けたのに対し、Imipramine の予測値にはほとんど影響を与えなかった。以上のことから肝臓における平行代謝経路間相互作用の知見を生理学的モデルに組み込むことは Imipramine の単回投与後の血中及び組織中濃度-時間推移の予測にはほとんど影響を与えなかったのに対し、DMI の血中、および、特に標的臓器である脳内濃度-時間推移の予測に大きく影響を与えること、すなわち、この平行代謝経路間相互作用を考慮していない生理学的モデルによる予測では薬効を過小評価することが明かとなった。

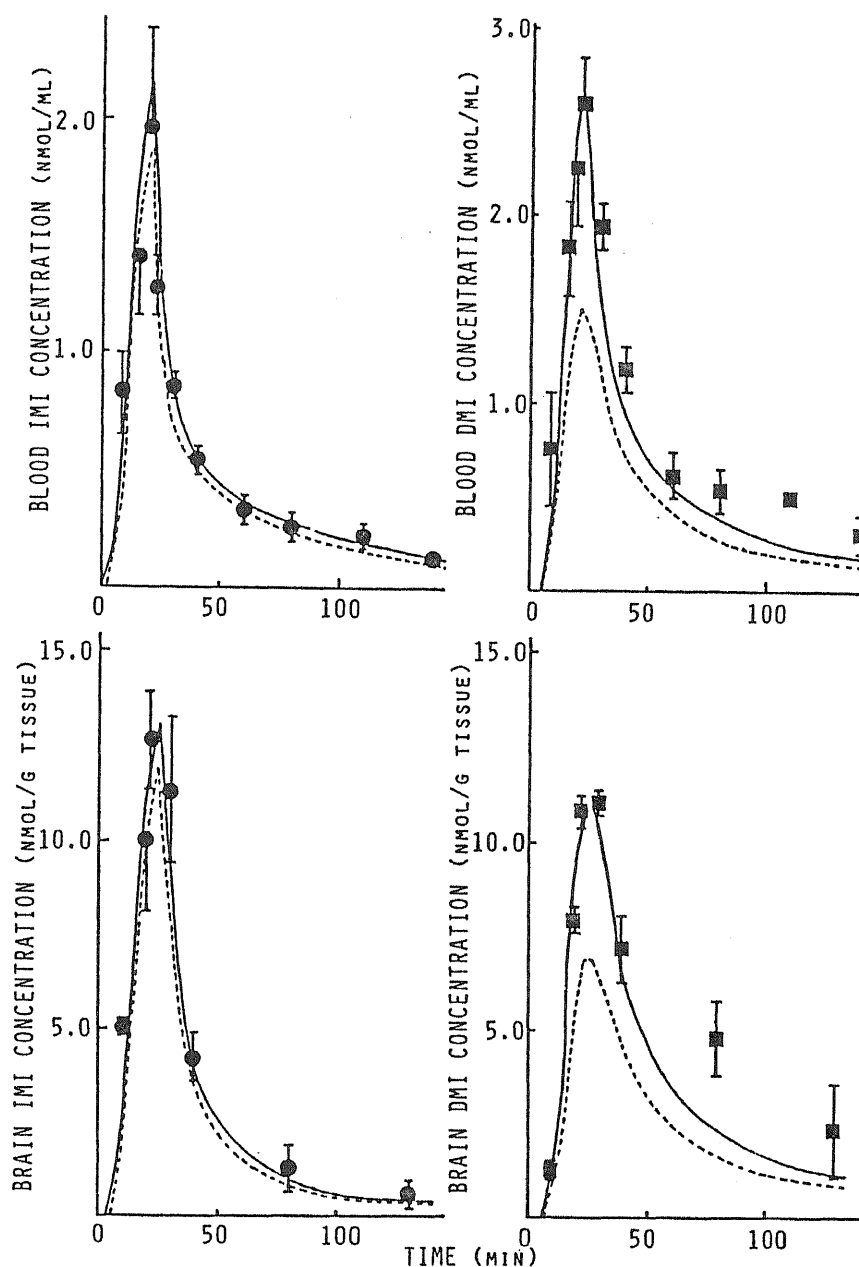


Figure 5-4

PREDICTED (LINES) AND OBSERVED (CLOSED SYMBOLS) IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE CONCENTRATION IN ARTERY, BRAIN, MUSCLE, ADIPOSE, HEART, PANCREAS, SPLEEN, G.I. TRACT, LIVER, LUNG AND KIDNEY DURING AND AFTER 20-MIN INTRAPORTAL INFUSION OF IMIPRAMINE TO RATS.

Key: (●) imipramine; (■) desipramine concentration. Solid and broken lines represent the simulation assuming the presence and absence of metabolic interaction between 2-hydroxylations of imipramine and desipramine. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 3~4 rats.

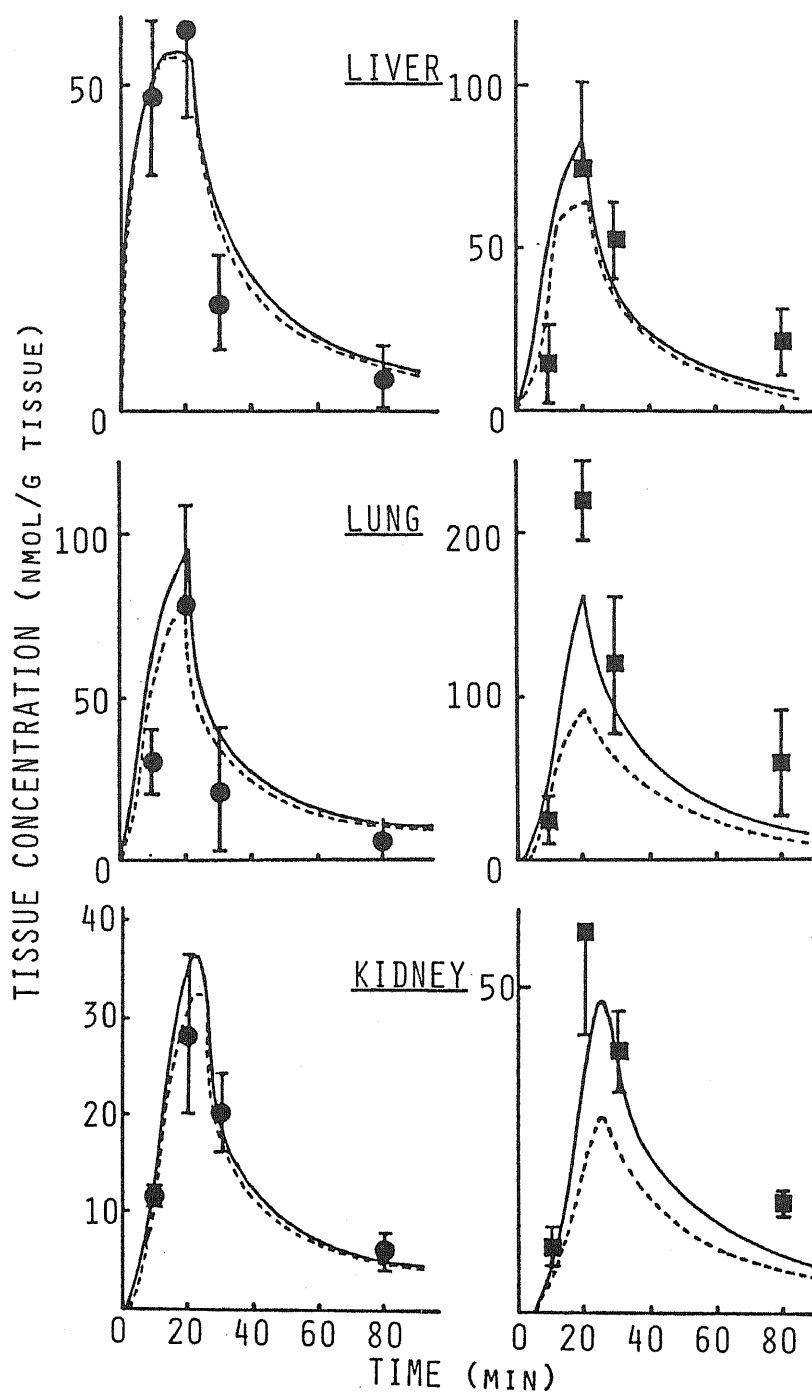


Figure 5-4 (continued)

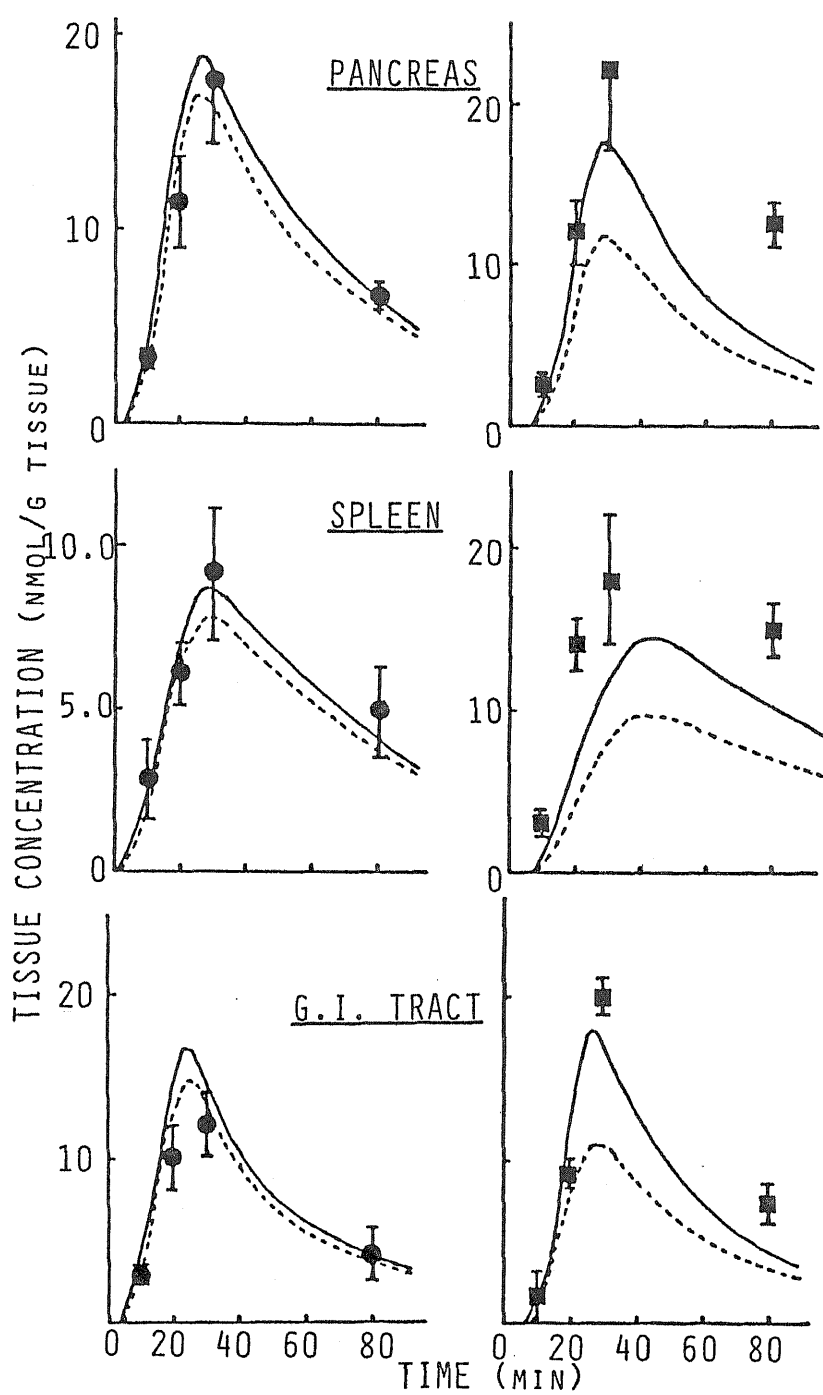


Figure 5-4 (continued)

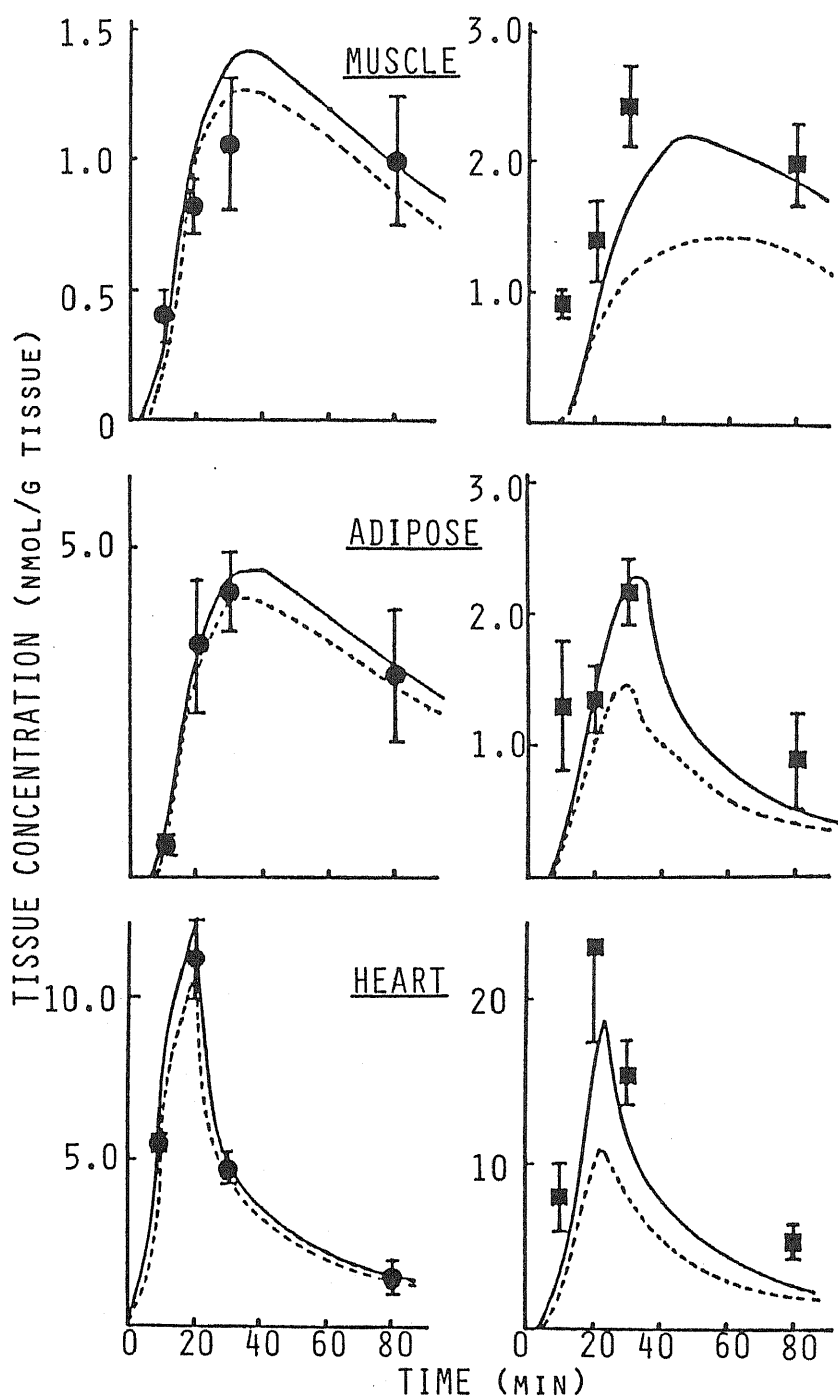


Figure 5-4 (continued)

### 5-3 非定常状態生理学的モデルを用いたImipramineおよびDMI のヒトでの体内動態の予測（アニマル スケールアップ）

本章のはじめにすでに言及したように、本研究の最終目的は、動物レベルで確立した薬物速度論的モデルからヒトでの体内動態を予測することであり、様々な臨床ケースにおいて適切な投与指針を確立する上で、有用なモデルを確立することである。したがって、モデルを構成する各速度論的パラメータが、生理学・生化学・解剖学といった具体的な意味を持っているほど、これらのパラメータの変動と体内動態の関連を解析・予測することが可能となる。前章で確立した動物レベルでの生理学的モデルは、動物レベルでの具体的に意味のあるパラメータによって構築されている。したがって、これら動物（ラット）でのパラメータをヒトでの値に変換（スケールアップ）すれば、そのままヒトでの体内動態を予測できるモデルに拡張することができると考えられる。実際、 $\beta$ -ラクタム抗生物質（Sawada et al., 1984）、Cephazorine（Tsuji et al., 1985）、Quinidine（Harashima et al., 1986）およびPhenytoinなどの薬物（Sawada et al., 1985）では、ラットあるいはラビットで確立された生理学的モデルをヒトの体内動態を予測できるモデルに拡張し、そのスケールアップの手法の妥当性が確認された。そこで本章では、前章においてラットで確立されたImipramineおよびDMIの生理学的モデルからヒトの体内動態を予測できるモデルに拡張し、Imipramineが単回投与された場合のImipramineおよびDMIの血中濃度-時間曲線を予測し、実測された時間曲線と比較することによって、ヒトでの体内動態を予測するために拡張された生理学的モデルの妥当性を確認することを目的とした。

#### 〔計算結果・考察〕

動物レベルでの生理学的モデルをヒトに拡張する場合、必要とされているパラメータの変換（スケールアップ）は、

- ①分布臓器の解剖学的重量および支配している血流量のヒトの値への変換
- ②血中非結合率の差に基づく平衡定数の変換
- ③肝臓における代謝活性のヒトでの値への変換

である。①は、多くの文献によって標準体重（70 kg）の男性について報告されている。一方、②に関しては、組織分布がその細胞間質液に限定されているいくつかの抗生物質に関しては、その容積の差を考慮しなければならないことが報告されているが（Tsuji et al.,1983,1985）、Imipramineを初め多くの脂溶性薬物に関してはその分布が組織中の脂肪への非特異的な結合が平衡定数の主な決定要因であるため、血中における蛋白結合の種差だけを考慮すれば良いことが報告されている（Sawada et al.,1985）。また、③に関しては、薬物代謝酵素P-450分子種に種差が存在し、また、代謝活性が大型動物ほど低くなっていることが知られていることから、実際のスケールアップにはヒトでの生体試料を用いたin vitro代謝実験が不可欠であると考えられる。Table 5-4には、ラットとヒトの主要臓器の重量および血流量の文献値を対比して掲載した。また、Table 5-5にはラットの実験で得られたImipramineおよびDMIの主要臓器への平衡定数（5-1のTable 5-2参照）とヒトおよびラットでの血中非結合率で補正したヒトにおける平衡定数の推定値を示した。さらに、Table 5-6には報告されたImipramineおよびDMIのヒト肝臓ミクロソームでのin vitro代謝実験から得られた各代謝経路の代謝パラメータをラットでの値（5-2のTable 5-3参照）と対比して掲載した。これらの値を前節で構築した連立微分方程式に代入し、ヒトに50 mgのImipramineが60分間にわたり静脈内に定速注入された時の血漿中（静脈内）濃度-時間曲線および脳内Imipramine・DMI濃度-時間曲線を予測した（Figure 5-5）。血漿中濃度に関しては報告されている3人の患者（M.Z., I.E., G.K.）での結果（Nagy & Johansson, 1975）を併せて示した。この図からも明らかなように、予測されたImipramineの血漿中濃度-時間推移は、3患者で実測された値を極めて良く予測することができた。また、DMIの血漿中濃度-時間推移は、実測された患者M. Z. での値より低く予測されたが、他の2患者（I.E. およびG.K.）では、DMI濃度が定量限界以下（2 ng/ml）であったという報文中のコメントから、平均的なレベルが予測されていると考えられる。したがって、平行代謝経路間相互作用を考慮して確立された動物レベルでの生理学的モデルは、その構成しているパラメータをヒトの値に変換することによって、ヒトの体内動態に拡張することが可能であり、また、臨床的に用いられた時のImipramineおよびDMIの血漿中濃度の

Table 5-4

PHYSIOLOGICAL PARAMETERS FOR MODELING  
IN THE 0.25 KG RAT AND THE 70 KG MAN

| Tissue    | Volume (ml)      |                    | Blood flow rate(ml/min) |                    |
|-----------|------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
|           | Rat <sup>a</sup> | Human <sup>b</sup> | Rat <sup>a</sup>        | Human <sup>b</sup> |
| Brain     | 1.2              | 1500               | 1.1                     | 700                |
| Lung      | 1.2              | 600                | 44.5                    | 4620               |
| Liver     | 7.7              | 3900               | 14.0 <sup>c</sup>       | 1500 <sup>c</sup>  |
| G.I.tract | 11.1             | 3180               | 12.0                    | 1100               |
| Pancreas  | 1.0              | 200                | 1.0                     | 200                |
| Spleen    | 1.0              | 200                | 1.0                     | 200                |
| Heart     | 1.0              | 300                | 4.2                     | 240                |
| Kidney    | 2.0              | 300                | 11.4                    | 1240               |
| Muscle    | 125.0            | 30000              | 6.8                     | 600                |
| Adipose   | 10.0             | 10000              | 1.8                     | 200                |
| Skin      | 43.7             | 3000               | 4.5                     | 60                 |
| Artery    | 6.8              | 1700               | 44.5                    | 4620               |
| Vein      | 13.6             | 3390               | 44.5                    | 4620               |

<sup>a</sup>Obtained from Table 5-3.

<sup>b</sup>Obtained from the literatures (Igari et al.,1983; Harashima et al.,1985).

<sup>c</sup> $Q_{LI} = Q_{GI} + Q_{SP} + Q_{PA}$ .

Table 5-5

**CALCULATED TISSUE-TO-BLOOD CONCENTRATION RATIOS OF  
IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE IN MAN<sup>a</sup>**

| Tissue    | Partition coefficient  |              |
|-----------|------------------------|--------------|
|           | Imipramine             | Desipramine  |
| Brain     | 4.27-12.5 <sup>b</sup> | 21.5 ( 5.42) |
| Muscle    | 3.37 ( 2.1)            | 4.04 ( 1.02) |
| Skin      | 5.8 ( 3.63)            | 4.04 ( 1.02) |
| Lung      | 70.0 (43.8)            | 246.7 (62.2) |
| G.I.tract | 19.7 (12.3)            | 38.4 ( 9.69) |
| Heart     | 9.6 ( 6.03)            | 28.6 ( 7.21) |
| Kidney    | 29.9 (18.7)            | 84.1 (21.2)  |
| Adipose   | 11.1 ( 6.95)           | 4.68 ( 1.18) |

<sup>a</sup>Linear partition coefficients (Kp) were converted into the values which can be used in Man (Kp,man) by the following equation;

$$Kp,man = Kp \times (f_{B,man}/f_B)$$

where  $f_{B,man}$  was free fraction in blood in man, and  $f_B$  was free fraction in blood in rats.

Free fractions in human blood for imipramine and desipramine were reported to be 0.171, and 0.207, respectively (Ciraulo et al.,1988). Free fractions in rat blood were obtained from Table 5-3.

Data in parenthesis were Kp values in rats described in Table 5-3.

<sup>b</sup>Estimated values for Kp of imipramine in man was predicted to be 4.27-12.5 at systemic arterial concentration of 30-300 ng/ml.

Table 5-6

COMPARISONS OF METABOLIC PARAMETERS FOR  
IMIPRAMINE METABOLISM IN RATS AND HUMAN<sup>a</sup>

| Reaction              | Species | K <sub>m</sub> <sup>b</sup> | K <sub>m</sub> <sup>b,c</sup> | V <sub>max</sub> <sup>d</sup> | V <sub>max</sub> <sup>e</sup> |
|-----------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| IMI 2HL <sup>a</sup>  | Rat     | 0.948                       | 0.430                         | 1.24                          | 3396                          |
|                       |         | (0.028)                     | (0.013)                       | (0.06)                        | (219)                         |
|                       | Human   | 17.0                        | 6.95                          | 0.072                         | 10109                         |
| IMI NDL <sup>a</sup>  | Rat     | (2.16)                      | (0.88)                        | (0.011)                       | (1556)                        |
|                       |         | 11.3                        | 5.12                          | 8.03                          | 22028                         |
|                       | Human   | (1.7)                       | (0.77)                        | (1.22)                        | (3346)                        |
| DMI 2HL <sup>a</sup>  | Rat     | 91.7                        | 41.5                          | 0.485                         | 68094                         |
|                       |         | (7.6)                       | (3.4)                         | (0.092)                       | (12917)                       |
|                       | Human   | 0.957                       | 0.391                         | 1.26                          | 3465                          |
| DMI other metabolites | Rat     | (0.084)                     | (0.034)                       | (0.12)                        | (327)                         |
|                       |         | 17.0                        | 6.95                          | 0.072                         | 10109                         |
|                       | Human   | (2.16)                      | (0.88)                        | (0.011)                       | (1556)                        |
| DMI other metabolites | Rat     | 1.92                        | 0.785                         | 0.335                         | 920                           |
|                       |         | (0.21)                      | (0.087)                       | (0.091)                       | (250)                         |
|                       | Human   | - <sup>f</sup>              | - <sup>f</sup>                | - <sup>f</sup>                | - <sup>f</sup>                |

<sup>a</sup>Data for rats were based on Table 3-2, and those for human were obtained from the literature (Spina & Koike, 1986). Abbreviations used in the table are as follows; 2HL, 2-hydroxylation; NDL, N-demethylation.

<sup>b</sup>Expressed as nmol/ml. <sup>c</sup>K<sub>m</sub>'=K<sub>m</sub> x (free fraction of imipramine or desipramine in rat liver microsomal reaction mixture [0.453 for imipramine; 0.409 for desipramine] described in the legend of Table 4-3). The same corrections for nonspecific binding in the human liver microsomal reaction mixtures were performed. <sup>d</sup>Expressed as nmol/min/mg microsomal protein.

<sup>e</sup>V<sub>max</sub> (nmol/min/mg protein) was extrapolated to the V<sub>max</sub>' value (nmol/min/whole liver) was performed as described in the legend of Table 3-1; V<sub>max</sub>'(for rats)= V<sub>max</sub> x 29.7(nmol P-450/g liver) x 9.9(g/whole liver) / 0.825(nmol P-450/mg protein). The P-450 content per gramm of rat liver and that in the rat liver microsomes were assumed to be the same in the samples obtained from human liver. Then, V<sub>max</sub>'(for human)= V<sub>max</sub> x 29.7 x 3900 (g/human whole liver) / 0.825.

<sup>f</sup>Data for the formation of the other metabolites in human liver microsomes were not available. Therefore, this metabolic pathway was assumed not to exist.

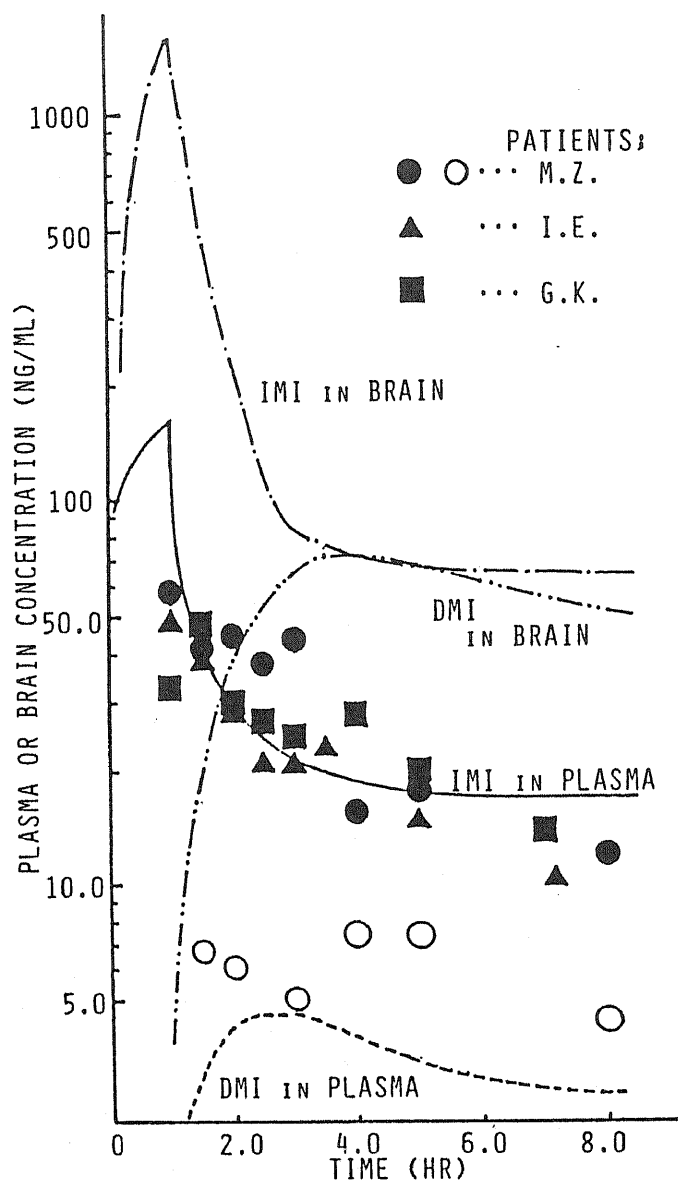


Figure 5-5

PREDICTED (LINES) IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE CONCENTRATIONS IN VENOUS PLASMA AND BRAIN, AND OBSERVED VENOUS PLASMA CONCENTRATIONS (SYMBOLS) IN MAN.

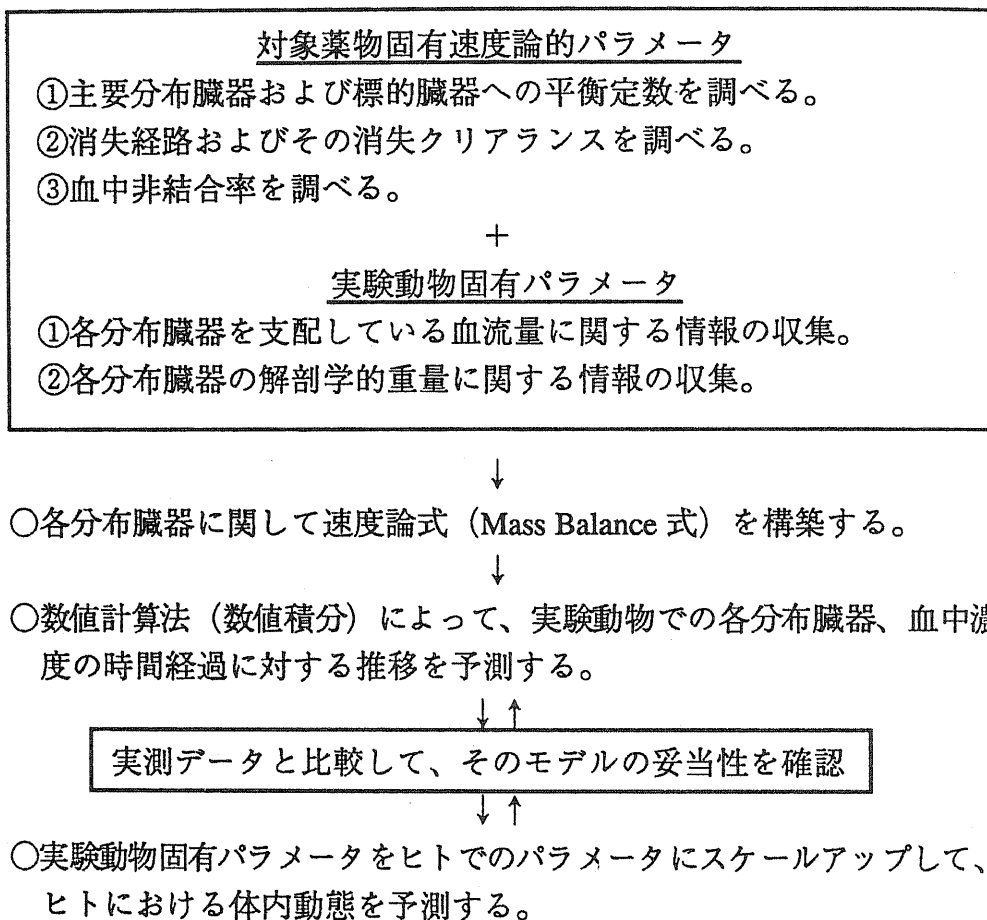
Observed data for venous plasma concentrations of imipramine (closed symbols) and desipramine (open symbols) of three separate adult patients after 1.0-hr intravenous infusion of 50 mg imipramine were shown (data taken from the literature; Nagy & Johansson, 1975). Body weight was presumed to be 70 kg. Desipramine concentrations in plasma of I.E. and G.K. were not detected.

時間推移と予測値との比較からその妥当性が確認された。また、脳内濃度の予測から、Imipramineが静脈内に定速注入された時の薬効を示す本体は、血漿中濃度だけから推定すると、主にImipramineであると考えられるが、予測された脳内Imipramine (Figure 5-4 ; - - -) およびDMI濃度 (---) は、投与開始後3時間以降ほぼ等しくなっていることから、活性代謝物DMIの体内挙動も薬効を予測する上では無視できないことが推察された。これは、ヒトでの脳への分配係数が、DMIでは、約20であるのに対し、Imipramineでは4から12程度であり (Table 5-5)、DMIの方が、Imipramineに比べ約2から5倍程度脳に分布しやすいためである推測された。

実際、ヒトにおいてImipramineを服用したときの抗精神作用を予測するとき、血中でのImipramineおよびDMI濃度と薬理効果の間には明確な相関関係が存在しないこと (Gram et al.,1976)、さらに、副作用との間にも相関性が無いこと (Whyte et al.,1976) が報告されている。これは血中のDMI濃度がImipramine濃度よりもかなり低い、あるいは、検出されなくても、実際には脳内にDMIが高い濃度で分布していることが原因の一つであると考察された。

## 5-4 小 括

本章で確立された生理学的モデルの構築に採用された手順を以下にまとめた。



以上の手順によってImipramine単回投与後のImipramineおよび代謝物DMIの体内動態を予測する生理学的モデルが、動物レベルでの酵素学的薬物代謝実験より得られたImipramineおよびDMIの肝臓における代謝上の特徴 (平行代謝経路間相互作用) をモデルに組み込むことにより、消失に関する速度過程が記述され、さらに、本章5-2で調べられた主要臓器への分布の特徴 (非線形な肝臓及び脳への分布) を考慮することによって構築され、実測された血中および主要臓器内濃度-時間推移と比較することによってその妥当性が確認された。また、常法にしたがっ

たアニマルスケールアップの手法を採用することによって、ヒトでの体内動態を予測できる生理学的モデルに拡張され、ヒト被験者に投与された時の血漿中濃度－時間推移と比較することによってその妥当性が確認された。

## 総 括

### I Imipramineとその主要代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる同時微量定量法の検討（第1章）

アルカリ条件下酢酸エチルでのサンプル抽出と、アンモニアを添加したアセトニトリル-メタノール移動相を用いた順相カラムでのHPLC法により、Imipramineおよび代謝物の迅速かつ高精度の微量同時定量法が確立され、以後の研究に適用した。

### II Imipramine代謝に関与するP-450分子種の解明（第2章）

#### a) Imipramine脱メチル化反応について

Imipramineの脱メチル化反応は、雄ラットでの主要なP-450分子種であるP-450m1によって主に触媒されている。このP-450分子種の量的な差異および変動が、この代謝活性の若齢時の性差および雄ラットでの加齢に伴う低下の原因であることが明らかとなった。

#### b) Imipramine 2位水酸化反応について

ImipramineおよびDMIの環2位水酸化反応は、脱メチル化とは独立したP-450分子種が関与しており、そのP-450分子種は、間接的な推測ではあるが、ラットおよびヒトで代謝活性の遺伝的多様性発現に関与しているP-450分子種（ラットではUT-H）であると考察された。また、両2位水酸化経路に共通したP-450分子種の関与が示唆され、このことによって両代謝経路間で代謝阻害の関係が期待された。

### c) 平行代謝経路間相互作用について

Imipramineの平行関係にある代謝経路間において、それぞれの基質が対となる代謝反応の活性を競合的に阻害した。この相互阻害関係を平行代謝経路間相互作用 (Parallel pathway interaction) と名付けた。Whole body でのImipramineの体内動態における肝臓での代謝では、特にImipramineとDMIの2位水酸化反応間の相互作用が両者の体内動態に影響を与えている可能性が示唆された。また、この関係はImipramineと同様の代謝経路を持つLidocaineやDiazepamでも確認されていることより、このような平行関係にある代謝経路を持つ薬物では一般的な関係であると考えられた。

## III ラット肝ミクロソームと遊離肝細胞におけるIn Vitro 代謝パラメータの比較 (第3章)

コントロール雄ラット肝ミクロソームで得られたImipramine代謝 kineticsの特徴、すなわち、Imipramineの脱メチル化反応は low-affinity-high-capacity であり、環2位水酸化反応は high-affinity-low-capacityであることが、定量的に遊離肝細胞実験系でも再現された。また、コントロール雄ラット肝ミクロソームで認められたImipramine およびDMI 2位水酸化反応間の平行代謝経路間相互作用は遊離肝細胞実験系でも再現された。一方、Imipramineの2位水酸化代謝物である2OH-IMIは、ほとんど抱合を受けてしまうため、脱メチル化反応間の平行代謝経路間相互作用は無視できると推測された。

## IV 非線形体内動態を示す Imipramine と活性代謝物DMIの速度論的モデル (第4章)

### a) 速度論的モデルの構築

コントロール雄ラット肝ミクロソームでの代謝 kinetics および平行代謝経路間相互作用を基に構築された定常状態での薬物速度論

的モデルによって、Imipramineを門脈内に定速注入したときの定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度とImipramine投与速度の非線形な関係を予測できた。このことは肝ミクロソームでの代謝実験による知見が*in vivo*における体内動態に定量的に反映されていること、およびモデル構築の仮定が妥当であることを意味しており、*in vitro*実験でのP-450分子種および酵素学的研究結果がWhole Bodyでの体内動態を予測する上できわめて重要であることが明かとなった。

#### b) モデルの妥当性の検討 (Quinidine 併用実験)

コントロールの条件で確立されたモデルの妥当性を改めて確認するため、ImipramineおよびDMIの両2位水酸化代謝活性に対し特異的な阻害剤 (Quinidine) をImipramineと併用し、定常状態ImipramineおよびDMI血中濃度の変動を*in vitro*代謝パラメータに基づく上述のモデルによって予測した。その結果、予測値と実測値の良い一致が認められ、速度論的モデルの妥当性を支持する結果となった。

### V 非定常状態におけるImipramineとDMIの生理学的モデルの構築 (第5章)

定常状態で確立されたImipramineおよびDMIの血中濃度とImipramine投与速度の関係を予測できる薬物速度論的モデルは、両薬物の主要臓器への分布に関する情報を得て、Imipramineが門脈内に単回投与されたときの血中及び標的臓器である脳内ImipramineおよびDMI濃度の時間推移を予測できる生理学的モデルに拡張され、また、その妥当性が確認された。さらに、本研究での最終目的であるヒトでの体内動態を予測できるモデルの確立には、ラットを用いた肝ミクロソームでの代謝実験による知見 (平行代謝経路間相互作用) とヒトでの生理学的および解剖学的情報からのスケールアップによって可能であることが明かとなった。

本研究で採用された研究手順は、ある薬物が開発されたときの薬剤学的研究指針を与えるものである。一般に、薬物速度論は、薬物の体内動態を単に記述する数式の構築に偏重しているが、本研究では、速度論的モデルの構築過程において常に酵素学的基盤に裏付けられた知見を参照し、それが *in vivo* 体内動態においてどのように反映しているかを明かとした。このモデルによる Imipramine と DM I 体内動態の同時予測は、肝臓での *in vitro* 代謝実験より確認された投与薬物とその一次代謝物 (DM I) の消失代謝経路間に相互阻害関係がある (平行代謝経路間相互作用) ことを明かとしたことによってはじめて可能となった。また、対象薬物が薬効上重要な代謝物を生成する場合のモデルケースとして、投与薬物とその代謝物の体内動態を同時に予測できるモデルが確立されたことは、現在報告されている速度論的モデルに他に例を見ず、重要な指針を与えるものである。

## 実験方法

### [1] 実験動物

#### ① コントロールラット肝ミクロソーム代謝実験

Wistar 系 6～7 週齢雌雄ラット (200～235 g) を使用した。

#### ② 加齢にともなう代謝活性の変動に関する代謝実験

SPF(Specific Pathogen Free)条件下で、東京都老人総合研究所で飼育された Fischer 344 系雌雄ラット (3ヶ月齢～30ヶ月齢) の肝臓を使用した。

#### ③ フェノバルビタール前処理ラット肝ミクロソーム代謝実験

Wistar 系 7 週齢雌雄ラット (230～245 g) に 80 mg/kg/day でフェノバルビタール生理食塩水溶液を腹腔内に 5 日間連続投与後、6 日目に実験に使用した。

#### ④ スタンⅢ前処理ラット肝ミクロソーム代謝実験

Wistar 系 8 週齢雄ラット (240～255 g) に 40 mg/kg/day でスタンⅢコーンオイル溶液を腹腔内に 5 日間連続投与後、6 日目に実験に使用した。

#### ⑤ 遊離肝細胞代謝実験・定常状態での in vivo 投与実験

Wistar 系 6～7 週齢雄ラットを使用した。

#### ⑥ 肝血流実験

Wistar 系 9 週齢雄ラット (295～310 g) を使用した。

#### ⑦ 生理学的モデルの構築

Wistar 系 7～8 週齢雄ラット (235～255 g) を使用した。

以上の Wistar 系ラットは全て(株)高杉実験動物より購入し、(株)オリエンタル酵母の飼育試料 (CE-2) で最低1週間飼育後実験に供した。

### [2] 試薬

#### ① イミプラミンとその代謝物

本研究で使用したイミプラミンとDMIは、Sigma Chemical Company

(St.Louis)より購入した塩酸塩をそのまま使用した。両薬物の2位水酸化体である2位水酸化イミプラミンは(株)藤沢薬品工業より、また、2位水酸化デシプラミンの塩酸塩は(株)チバガイギーより提供を受けた。

## ②生化学的試薬

Glucose-6-phosphate(G-6-P)、G-6-P dehydrogenase、NADPH は(株)オリエンタル酵母より、Collagenase は Boehringer company (Mannheim) より、 $\beta$ -glucuronidase (type H-1) は Sigma Chemical Company (St.Louis) より購入した。

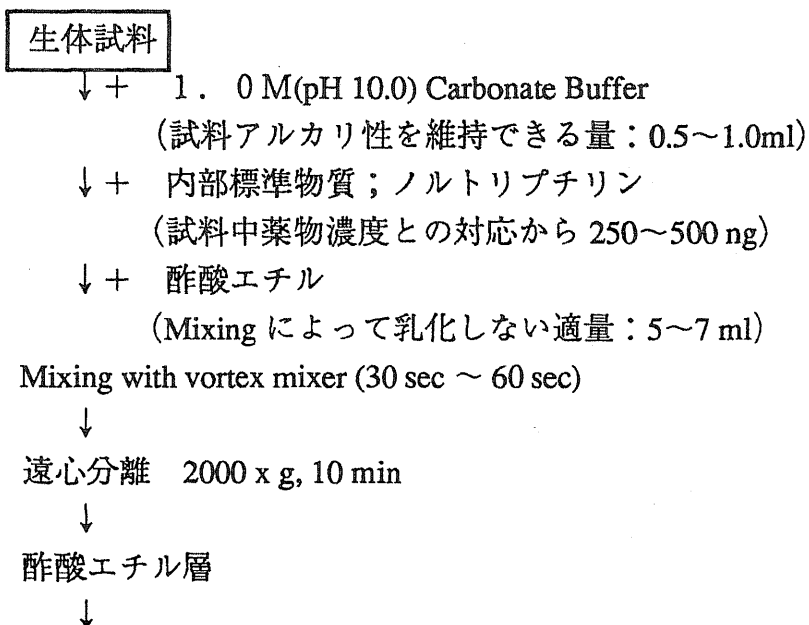
## ③その他の試薬

主に(株)和光純薬より、分析あるいは特級試薬を購入した。

# [3] 高速液体クロマトグラフィーを用いたイミプラミンとその代謝物の微量同時定量法

## ①抽出法

イミプラミンおよびその代謝物の高回収率、高再現性のある抽出法は第1章1節で検討した。基本的には全ての生体試料の抽出に採用した。以下にそのスキームを示す。



減圧留去 (40℃)

↓ + メタノール; 100  $\mu$  l

超音波処理後 mixing

↓

高速液体クロマトグラフィー

## ② HPLC 条件

|       |                                                     |                                                          |
|-------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 使用機器  | ポンプ                                                 | 日本分光 TWINCLE型高速液体クロマト<br>グラフィー                           |
|       | 検出器                                                 | 日本分光 UVIDEC II 型紫外分光光度計<br>検出器                           |
|       | 記録計                                                 | 島津卓上型自動平衡記録計                                             |
|       | 試料導入                                                | レオダイン社製サンプルインジェクター                                       |
|       | 恒温層                                                 | M-3 型サーモボックス (サーモニクス<br>社製)                              |
| 分離カラム | SI-60 (5 $\mu$ m)                                   | プレパックドカラム (メルク社製<br>Hiber RT-250-4, 25 cm x 4.6 mm i.d.) |
| 移動相   | アセトニトリル:メタノール (3:1, v/v) +28%<br>アンモニア水 (2.5%, v/v) |                                                          |
| 流速    | 2.0                                                 | ml/min                                                   |
| カラム温度 | 40~50                                               | ℃                                                        |
| 測定波長  | 254                                                 | nm                                                       |

## ③ イミプラミンとその代謝物とキニジンの同時定量条件

本論第4章第5節での、生体試料中キニジン濃度は、移動相の組成を次のように変更し、イミプラミンおよびその代謝物と同一条件での同時定量が可能であった。

|     |                                                     |  |
|-----|-----------------------------------------------------|--|
| 移動相 | アセトニトリル:メタノール (5:1, v/v) +28%<br>アンモニア水 (2.0%, v/v) |  |
|-----|-----------------------------------------------------|--|

#### [4] ラット肝ミクロソームを用いた in vitro 代謝実験および P-450 精製標品を用いた再構成実験

##### ①ラット肝ミクロソーム調製法

ラットを断頭後、速やかに肝臓を摘出し、differential centrifugation 法 (Omura & Sato, 1964) により肝ミクロソームを調製した。得られたミクロソームペレットは、0.15M/pH7.4 Tris緩衝液に懸濁し、ポリエチレン製バイアルに約1 mlずつ分取した後に液体窒素を用いて瞬間凍結した。このミクロソーム懸濁液は-70℃で保存し、必要に応じて解凍して実験に使用した。ミクロソーム蛋白濃度の測定は、Lowry らの方法 (1951) に従って行なった。

##### ②反応条件 (反応条件の確立は第2章1節を参照)

イミプラミンあるいは、その代謝物およびそれらを組み合わせた基質溶液、NADPH-generating-systemを含む反応溶液 (下表参照) を、好氣的条件下、37℃で5分間インキュベーションした。この反応液中に20  $\mu$ mol NADPHを加えることによって反応を開始した。さらに30秒間のインキュベーションを行なった後に、氷冷した1.0M/pH 10.0 Carbonate 緩衝液を加え、直ちに氷冷する事によって反応を停止した。反応液中の代謝物の濃度は上述のHPLC定量法に基づき測定した。生成した各代謝物の量をインキュベーション時間 (30秒) で除して、その代謝物の生成速度とした。

##### 1.0 ml 反応液中の組成

|              |                             |         |
|--------------|-----------------------------|---------|
| 100 mM       | Glucose-6-phosphate (G-6-P) | 0.1 ml  |
| 100 I.U.     | G-6-P dehydrogenase         | 0.02 ml |
| 100 mM       | MgCl <sub>2</sub>           | 0.1 ml  |
| 5 mg/ml      | Microsomes                  | 0.2 ml  |
| Substrate    |                             | 0.25 ml |
| 0.15M/pH 7.4 | Tris-HCl buffer             | 0.33 ml |

##### ③P-450 精製標品を用いた再構成実験

以下の組成から再構成系を作成し、上記の反応条件によって活性を測定した。P-450 (0.1 nmol/ml), fp2 (0.4 U/ml), DLPC (5  $\mu$ g/ml), sodium cholate (0.1 mg/ml), G6P (20 mM), G6PDH (1.5 U/ml), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), Substrate.

## [5] ラット遊離肝細胞を用いた in vitro 代謝実験

### ①ラット遊離肝細胞の調製法

ラット遊離肝細胞は Moldeus および Seglen らによって確立された方法に従った (Moldeus et al., 1978; Seglen et al., 1976)。ラットは、50 mg/kg ペントバルビタール麻酔後、開腹した。門脈より灌流液流入用カニューレ (16 G 留置針ポリエチレンチューブ) を挿入固定後、胸腔を開き左心房より灌流液流出用カニューレ (14 G 留置針ポリエチレンチューブ) を肝静脈方向へ挿入した。下行大静脈を右腎静脈と大静脈結合上部で結索した。結索後、肝臓を取りはずし、灌流液だめ上部に固定し、肝細胞調製用灌流液を門脈から肝静脈方向へ還流した。灌流液 A (組成は下表に示した) を約 10 分間 once-through で灌流した後、collagenase を含む灌流液 B を肝臓の状態を観察しながら 10～15 分間リサイクル灌流した。この間、灌流液の流速は 25～30 ml/min を維持した。灌流液による消化が完了した後、肝臓を pH 7.4 albumin-free Hank's 液中で未消化の組織から細胞を分散させた。細胞懸濁液はガーゼでろ過した後、50 x g, 3 min の遠心により上清を捨てることによって、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。洗浄後の細胞は 0.4 % Trypan blue 染色によって viability を調べ、90 % 以上の Viability を示した調製サンプルのみ実験に使用した。

#### 遊離肝細胞調製用灌流液

| A                                                    |         | B                                                    |           |
|------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|-----------|
| NaCl                                                 | 137 mM  | NaCl                                                 | 137 mM    |
| KCl                                                  | 5.4 mM  | KCl                                                  | 5.4 mM    |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.5 mM  | CaCl <sub>2</sub>                                    | 5.0 mM    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 0.42 mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.5 mM    |
| HEPES                                                | 10 mM   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 0.42 mM   |
| EGTA                                                 | 0.5 mM  | HEPES                                                | 10 mM     |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 4.2 mM  | NaHCO <sub>3</sub>                                   | 4.2 mM    |
| Glucose                                              | 5.0 mM  | Collagenase                                          | 0.5 mg/ml |
| adjusted to pH 7.2 by NaOH                           |         | adjusted to pH 7.5                                   |           |

### 遊離肝細胞洗浄用 Hank's 緩衝液

|                                      |      |    |                                                      |      |    |
|--------------------------------------|------|----|------------------------------------------------------|------|----|
| NaCl                                 | 137  | mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O  | 0.5  | mM |
| KCl                                  | 5.4  | mM | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O | 0.42 | mM |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 1.27 | mM | NaHCO <sub>3</sub>                                   | 4.2  | mM |
| MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O | 1.00 | mM | glucose                                              | 5.0  | mM |
| MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O | 0.83 | mM |                                                      |      |    |
| adjusted to pH 7.2 by NaOH           |      |    |                                                      |      |    |

### ②反応条件（詳細は第3章1節を参照）

肝ミクロソームでの反応条件と同様（[4]－②）、5分間のプレインキュベーションの後、37℃に保温した基質溶液を添加することによって反応を開始した。30秒間の反応後、約90℃の熱湯（1.0 ml）を加えた後直ちに試験管を加熱する事によって反応を停止した。生成した各代謝物は後述した酵素（ $\beta$ -glucuronidase）による2位水酸化抱合体の加水分解後、前述のHPLCによる定量法によって測定した。

### ③ImipramineおよびDMIの2位水酸化体の抱合体の酵素的加水分解

予試験からImipramineおよびDMIのグルクロン酸抱合体の加水分解の条件を確立した。遊離型の2位水酸化体は加水分解中に酸化分解を受けるため抗酸化剤としてアスコルビン酸の添加が必要であった。加熱によって反応を停止した反応液に、2000 unit  $\beta$ -Glucuronidase/98 unit Sulfatase および抗酸化剤として3% (v/v) アスコルビン酸を含む1.0 M/pH 5.0 acetate 緩衝液を1.0 ml 添加し、25℃ 16時間インキュベーションすることによって抱合体を加水分解した。

## [6] 定常状態での in vivo 投与実験

### ①動物手術法

ラットはエーテル麻酔下において手術を行なった。血液の採取のため30 I.U. のヘパリンを含む生理食塩水で満たされたポリエチレンカニューレ（PE-50）を下肢動脈に挿入した。門脈内定速注入には同じくヘパリン-生理食塩水溶液を含むポリエチレンカニューレ（PE-

10) を門脈（回腸－盲腸静脈）に挿入しアロンアルファで固定した。この方法は、門脈血流を妨げることがなく、また、薬液が肝臓に流入する前に良く門脈血と混合する点で他の方法より優れている。これらの処置を施したラットはエーテル麻酔から覚醒後、約1時間経ってから実験に供した。

## ②門脈内定速注入投与と血液採取方法

門脈内に定速注入したときの血中Imipramine およびDMI濃度と門脈内Imipramine投与速度との関係は、各ラットに 25, 50, 100, 150, 200, 250 (nmol/min) の速度でImipramineを 0.72(ml/hr) で定速注入し、投与開始後、1, 2, 3, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 時間において採取した血液サンプル中Imipramine およびDMI濃度を測定することによって調べた。投与予試験から両薬物の定常状態は投与後約5時間で達成されることが明かとなったので、上記のサンプル時間中5, 5.5, 6, 6.5, 7 時間での薬物濃度の平均値をそれぞれの投与速度での定常状態血中濃度とした。また、本実験の終了後、各ラットでの血液（約4 ml）を動脈から採取し、ex vivo での血中－血漿中薬物濃度比および血漿中非結合率を算出した。

## ③胆汁および尿中排泄速度の評価

Imipramineを静脈内に定速注入したときのImipramineおよびDMIの胆汁中および尿中排泄を調べる実験は、胆管及び膀胱にポリエチレンチューブ（それぞれ PE-10 および PE-260）を挿入して各生体試料を採取した。実験中の尿量はマンニトールを 800 ( $\mu$ mol/hr) で定速注入することによって増加した。胆汁及び尿は5分間の間隔でin toto で採取し、35～40 と 40～45分のサンプルでの排泄速度の平均値をそれぞれの投与速度での定常状態排泄速度とした。

## ④血漿中非結合率の測定法と血中非結合率の計算

ラットから心臓採血によって新鮮血を採取（約1.3 ml）し、2 ml ずつ5等分した。ImipramineあるいはDMIの高濃度生理食塩水液をそれぞれの血液試料に添加して、最終濃度がImipramineの場合、0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 (nmol/ml) また、DMIの場合、0.5, 1.0, 2.0, 6.0,

12.0(nmol/ml)となるように調整した。これらのサンプルを37℃で20分間インキュベーションしたのち、その一部(0.1ml)を採取し、血中濃度( $C_B$ )を測定した。残りは1200 x gで5分間遠心分離することにより血漿を採取した。その一部(0.1ml)を血漿中濃度( $C_P$ )として測定した。さらに血漿サンプルは平衡透析セルを用いて血漿中非結合率を測定した。平衡透析セルは半透膜(Spectrapor 2)で2つのchamberに分けられ、それぞれ2 mlの容積をもつものを使用した。一方に血漿サンプルを、また、他方には0.15M/pH 7.4 リン酸緩衝液を入れ、37℃で8時間インキュベーションすることによって平衡が達成された。平衡後、両Chamberの薬物濃度の比から血漿非結合率( $f_P$ )を算出した。血中非結合率( $f_B$ )は、 $f_P$ に血漿中—血中薬物濃度比( $C_P/C_B$ )を掛けることによってin vitroの値を算出した。また、②の実験から得られた血液サンプルに関しても同様に、血中非結合率を算出し、ex vivoでの値を評価した。

## [7] ラット肝灌流実験

### ①手術法と灌流法

ラットに対する手術手技は前述の遊離肝細胞調製のための手術法([6]—①)と同様である。灌流は、in situの状態で行った。すなわち、肝臓を門脈から肝臓を通り、肝静脈へ流れるonce-through single passで行なった。すなわち、酸素—二酸化炭素混合ガス(95:5)で飽和させたImipramineあるいはImipramineとQuinidineを含んでいる灌流液を流した。灌流液は血球成分を含んでいないため十分な酸素供給を行なうため30 (ml/min)の流速で流した(Sugano et al.,1978)。肝臓の灌流中のviabilityは、遺漏酵素であるGOT活性の安定性(10~20 units/ml, Karmen単位)、胆汁の生成量(5  $\mu$ l/min以上)および灌流出液中薬物濃度の定常状態から確認された。

### ②灌流液組成

|                   |        |                                 |        |
|-------------------|--------|---------------------------------|--------|
| NaCl              | 115 mM | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.2 mM |
| KCl               | 5.9 mM | CaCl <sub>2</sub>               | 2.5 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.2 mM | NaHCO <sub>3</sub>              | 25 mM  |

|                                  |         |         |        |
|----------------------------------|---------|---------|--------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1.2 mM  | Glucose | 300mg% |
| Sucrose                          | 400 mg% |         |        |

### ③薬物投与法とサンプルの採取

灌流液中Imipramine濃度は0.3 (nmol/ml) とした。コントロール実験ではこの灌流液を110分間灌流した。一方、Qunidineの併用による各代謝物の生成速度に対する影響を調べた実験では、Qunidineを90 (nmol/min) の速度でImipramine投与開始50分から併用した。投与期間中、肝臓流出液は15, 25, 35, 45, 75, 85, 95, 105分において、また、胆汁は10分間のin totoによる採取によって、各サンプル中に排泄されたImipramineおよびその代謝物（2位水酸化代謝物は抱合体を加水分解して遊離型として評価した）を測定した。

## 〔8〕非定常状態での生理学的モデルの構築

### ①血中—臓器間平衡定数の測定

ペントバルビタールで麻酔したラットを開腹後、肝静脈にポリエチレンカニューレ (PE-10) を挿入した (Yokota et al., 1976)。さらに、下肢動脈及び静脈にポリエチレンカニューレ (PE-50) を挿入固定し、それぞれ採血用およびImipramineあるいはDMI定速注入用とした。麻酔下、ImipramineあるいはDMIを下肢静脈より定速注入し、60分後、肝静脈血液と下肢動脈血液を採取し、各サンプル中薬物濃度を測定した。測定サンプル採取後、ただちに、腹腔内に液体窒素を流入した。ラットを氷上で解凍しながら、脳、肺、心臓、小腸、脾臓、膵臓、腎臓、骨格筋、皮膚、肝臓の順に生体サンプルを採取し、適量の生理食塩水でホモジェネート後、その一部を抽出サンプルとして各臓器内薬物濃度を測定した。肝臓を除く臓器の平衡定数は、動脈血中薬物濃度に対する臓器内濃度の比により、また、肝臓では肝静脈内薬物濃度に対する肝臓内濃度比から算出した。

### ②血中および臓器内薬物濃度の時間推移の測定

ラットにエーテルで麻酔後、門脈（投与用）および下肢動脈（採血用）にポリエチレンカニューレを挿入後、門脈より20 mg/kgのImi-

pramineを20分間定速注入した。血中濃度—時間推移を調べた実験では投与開始後、10, 20, 22, 30, 40, 60, 80, 120, 140分、脳内濃度は投与開始後、10, 20, 22, 30, 40, 80, 120分で、また、他の臓器については投与開始後、10, 20, 30, 80分において、速やかに上述の①の方法によって各臓器を採取し、血中あるいは臓器内薬物濃度を測定した。

## [9] 計算法のまとめ

### ①非線形最小自乗法 (SALS) による代謝パラメータの算出法

本研究において非線形最小自乗法は、おもに肝ミクロソームを用いた代謝 kinetics を調べた実験から、その代謝パラメータを算出することに用いられた。すなわち、代謝速度 ( $v$ ) と基質濃度 ( $S$ ) の関係に両逆数プロット (Lineweaver-Burk plot) を行い、その代謝経路を説明できるミカエリスーメンテンの数を評価し、代謝速度を  $n$  個のミカエリスーメンテン式の和で表わしたものをモデル関数として定義した。非線形最小自乗法のアルゴリズムは東京大学大型計算機センターのフレームコンピュータ (HITACHI M-680H) の数値計算ライブラリーに登録されている SALS (Statistical Analysis of Least Square method) の修正マーカート法を用いた。計算の際の初期微分幅は1000分の1を採用した。残差平方和の weight は (代謝速度) の自乗分の1を用いた。

### ②繰り返し計算による定常状態血中濃度の数値的解法 (Bi-section 法)

第4章で確立された定常状態血中濃度と門脈内投与速度の関係を算出する方法として、与えられた1次式の独立変数を数値的に解析する Bi-section 法を採用した。この方法は Mais ら (1974) によって、Fortran 言語によりそのフローチャートが公表されたものを今回、Basic に翻訳して使用した。すなわち、従属変数が独立変数の増加あるいは減少に対して単調に増加あるいは減少する関数であると仮定できる場合、初期値から計算された従属変数と実際の値との比率を元に、独立変数を増加あるいは減少させて再度従属変数値を計算する。この計算を繰り返して行なうことによって、目的とする一次

式を満たす独立変数値を推定することが可能である。この方法に基づき、第4章(4-8)～(4-9)式でのImipramineの門脈内投与速度を従属変数としたときの血中ImipramineおよびDMI濃度を独立変数とした一次式を数値的に解き、投与速度が与えられたときの一次式を満足する独立変数(ImipramineおよびDMI血中濃度)を算出した。

### ③数値積分法(Adams-moulton予測子-修正子法)による生理学的モデルの血中および臓器内濃度-時間推移の予測

数値積分法は第5章においてImipramineが門脈内に定速注入されたときのImipramineおよびDMIの血中をはじめ主要臓器の薬物濃度の時間推移を算出するため、26個の連立微分方程式を数値的に解くことに利用した。この場合、一般のパーソナルコンピューター(16ビットPC-9801など)では、時間がかかるため、千葉大学情報処理センターのフレームコンピュータ(HITACHIM280H)に、Fortran言語で記述した数値計算アルゴリズムを構築した。本研究では、その連立微分方程式内に非線形な式を含むため、一般の数値積分アルゴリズムであるRunge-KuttaあるいはRunge-Kutta-Gill法では十分な非線形性を計算することができなかった。したがって、非線形領域での収束性を改良したAdams-Bashforth法を元に、さらに、収束の安定性を向上させるためMoultonによる予測子-修正子法を導入したアルゴリズムを採用した(Adams-Moultonの予測子-修正子法)。数値積分の積分幅は、フレームコンピュータをTSSから利用したときの最大CPU利用時間の上限を越えない範囲として100分の1秒を採用した。

## 参考文献

- Abernethy, D.R., Greenblatt, D.J., and Shader, R.I. Imipramine and desipramine disposition in the elderly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232, 183-188 (1985)
- Ahmad, A. B., Bennett, P.N. and Rowland, M., Models of hepatic drug clearance: Discrimination between the "well-stirred" and "parallel-tube" models. *J. Pharm. Pharmacol.*, 35, 219-224 (1983)
- Akaike, H., A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Aut. Contr.*, 19, 716 (1974)
- Al-Dabbagh, S.G., Idle, J.R., and Smith, R.L., Animal modeling of human polymorphic drug oxidation-the metabolism of debrisoquine and phenacetin in rat inbred strains. *J. Pharm. Pharmacol.*, 33, 161-163 (1981)
- Armbrrecht, H.J., Birmbaum, L.S., Zenser, T.V. and Davis, B.B., Changes in hepatic microsomal fluidity with age. *Exp. Gerontol.*, 17, 41-48 (1982)
- Bast, A. and Noordhoek, J., Product inhibition during the hepatic microsomal N-demethylation of aminopyrine in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 19-24 (1980)
- Bickel, M.H., and Weder, H.J., The total fate of a drug: Kinetics of distribution, excretion, and formation of 14 metabolites in rats treated with imipramine. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 173, 433-463 (1968)
- Bidlingmeyer, B.A., Deming, S.N., Price, W.P., Sachok, B., and Petrusek, M., Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 186, 419-434 (1979)
- Billings, R.E., McMahon, R.E., Ashmore, J. and Wagle, S.R., The metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. A comparison with in vivo drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions. *Drug Metab. Dispos.*, 5, 518-526 (1977)
- Bischoff, K.B., and Dedrick, R.L., Thiopental pharmacokinetics. *J. Pharm. Sci.*, 57, 1346-1351 (1968)
- Bjerre, M., Gram, L.F., Kragh-Sorensen, P., Kristensen, B., Pedersen, O.L., Moller, M., and Thayssen, P. Dose-dependent kinetics of imipramine in elderly patients. *Psychopharmacol.*, 75, 354-357 (1981)

Borga, O., Piafsky, K.M., and Nilsen, O.G., Plasma protein binding of basic drugs I. Selective displacement from alpha-1-acid glycoprotein by tris(2-butoxyethyl)phosphate. Clin. Pharmacol. Ther., 22, 539-544 (1977)

Borondy, P., Chang, T., and Glazko, A.J., Inhibition of diphenylhydantoin (DPH) hydroxylation by 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin(p-HPPH). Fed. Proc., 31, 582abs, (1972)

Breyer, U., and Villumsen, K., Measurement of plasma levels of tricyclic psychoactive drugs and their metabolites by UV reflectance photometry of thin layer chromatograms. Eur. J. Clin. Pharmacol., 9, 457-465 (1976)

Brodie, B.B., Chasseaud, L.F., and Hawkins, D.R., Separation and measurement of tricyclic antidepressant drugs in plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 143, 535-539 (1977)

Brosen, K., Klysner, R., Gram, L.F., Otton, S.V., Bech, P., and Bertilsson, L., The steady-state concentrations of imipramine and its metabolites in relation to the sparteine/ debrisoquine polymorphism. Eur. J. Clin. Pharmacol., 30, 679-684(1986a)

Brosen, K., Otton, S.V., and Gram, L.F., Imipramine demethylation and hydroxylation: Impact of the sparteine oxidation phenotype. Clin. Pharm. Ther., 40, 543-549 (1986a)

Brunner, F., and Muller, W.E., The stereoselectivity of the 'single drug binding site' of human alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid). J. Pharm. Pharmacol., 39, 986-990 (1987)

Burch, J.E., Raddats, M.A., and Thompson, S.G., Reliable routine method for the determination of plasma amitriptyline and nortriptyline by gas chromatography. J. Chromatogr., 162, 351-366 (1979)

Carlsson, A., The contribution of drug research to investigating the nature of endogenous depression. Pharmakopsychiat Neuropsychopharmakol., 9, 2-10 (1976)

Carnis, G., Godbillon, J., and Metayer, J.P., Determination of clomipramine in plasma or urine by the double-radioisotope derivative technique. Clin. Chem., 22, 817-823 (1976)

- Christiansen, J., Gram, L.F., Kofod, B., and Rafaelsen, O.J. Imipramine metabolism in man. A study of urinary metabolites after administration of radioactive imipramine. *Psychopharmacologia (Berl)*, 11, 255-264 (1967)
- Cinti, D.L., Agents activating the liver microsomal mixed function oxidase system. 2.4 Divalent cations. In J.B. Schenkman and D. Kupfer (eds) *Hepatic cytochrome P-450 mono-oxygenase system*. pp.722-726, Pergamon Press, Oxford (1982)
- Crammer, J.L., Scott, B., Woods, H., and Rolfe, B. Metabolism of <sup>14</sup>C-imipramine. I. Excretion in the rat and man. *Psychopharmacologia (Berl)* 12, 263-277 (1968)
- Davies, D.S., Kahn, G-C., Murray, S., Brodie, M-J., and Boobies, A.R., Br. *J. Clin. Pharmacol.*, 11, 89 (1981)
- Dedrick, R.L., Forrester, D.D., and Ho, D.H.W., In vitro- In vivo correlation of drug metabolism-Deamination of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 1-16 (1972)
- Dedrick, R.L., and Forrester, D.D., Blood flow limitations in interpreting Michaelis constants for ethanol oxidation in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 22, 1133-1140 (1973)
- Detaevernier, M.R., and Ehrsson, H., The separation of some tricyclic antidepressants by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 128, 204-207 (1976)
- Dingell, J.V., Sulser, F., and Gillette, J.R., Species difference in the metabolism of imipramine and desmethylimipramine (DMI). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 143, 14-22 (1963)
- Distlerath, L.M., and Guengerich, F.P., Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 348-352 (1984)
- Drayer, D.E. Pharmacologically active drug metabolites: Therapeutic and toxic activities, plasma and urine data in man, accumulation in renal failure. *Clin. Pharmacokinet.*, 1, 426-443 (1976)
- Ebel, R.E., Hepatic microsomal aniline p-hydroxylase: Substrate inhibition by aniline. *Drug. Metab. Dispos.*, 9, 578-579 (1981)

- Eden, S., Age and sex related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 105, 555 (1979)
- Edwards, D.J., Evidence favoring the venous equilibrium model for hepatic clearance of (S)-(-)-propranolol. *J. Pharm. Sci.*, 73, 1498-1499 (1984)
- Eichelbaum, M., Defective oxidation of drugs: Pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin. Pharmacokin.*, 7, 1-22 (1982)
- Erickson, R.R., and Holtzman, J.L., Kinetic studies on the metabolism of ethylmorphine by isolated rat hepatocytes from adult rats. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1501-1506 (1976)
- Ervik, M., Walle, T., and Ehrsson, H., Quantitative gas chromatographic determination of nanogram levels of desipramine in serum. *Acta Pharm. Suec.*, 7, 625-634 (1970)
- Evans, G.H., Wilkinson, G.R., and Shand, D.G., The disposition of propranolol. IV. A dominant role for tissue uptake in the dose-dependent extraction of propranolol by the perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 186, 447-454 (1973)
- Farbar, D.B., Mulder, C., and Man In TVeld, W.A., A thin-layer method for the determination of amitriptyline and nortriptyline in plasma. *J. Chromatogr.*, 100, 55-61 (1974)
- Fenimore, D.C., Meyer, C.J., Davis, C.M., Hsu, F., and Zlatkis, A., High performance thin-layer chromatographic determination of psychopharmacologic agents in blood serum. *J. Chromatogr.*, 142, 399-406 (1977)
- Freilich, D.I., and Giardina, E.V., Imipramine binding to alpha-1-acid glycoprotein in normal subjects and cardiac patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 35, 670-674 (1984)
- Fujita, S., Kitagawa, H., Chiba, M., Suzuki, T., Ohta, M. and Kitani, K., Age and sex associated differences in the relative abundance of multiple species of cytochrome P-450 in rat liver microsomes. A separation by HPLC of hepatic P-450. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1861 (1985)
- Fujita, S., Kitagawa, H., Ishizawa, H., Tatsuno, J., Suzuki, T., and Kitani, K., Functional feminization of male rat liver with old age. *J. Pharm. Dyn.*, 8, s-166 (1985)

- Fujita, S., Kitagawa, H., Tsai, S.G., Suzuki, M., Matsunaga, T., Tatsuno, J., Kato, M., Nishihara, E., Funamura, M., and Suzuki, T. Age-associated change in hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activities. *J. Pharm. Dyn.*, 6, s-89 (1983)
- Fujita, S., Peisach, J., Ohkawa, H., Yoshida, Y., Adachi, S., Uesugi, T., Suzuki, M., and Suzuki, T., The effect of sudan III on drug metabolizing enzymes. *Chem-Biol. Interactions*, 48, 129-143 (1984)
- Fujita, S., Tatsuno, J., Kawai, R., Kitagawa, H., Suzuki, T., and Kitani, K., Age-associated alteration in lidocaine metabolism is position selective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 117-122 (1985)
- Funae, Y., Imaoka, S., Simultaneous purification of multiple forms of rat liver microsomal cytochrome P-450 by high-performance liquid chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 842, 119-132 (1985)
- Gault, R.Z., Ledewyn, S., D'Athis, P., and Tillement, J.P., Binding of propranolol and indocyanopindolol to isolated cells, homogenates and plasma membranes of rat liver, lung, kidney and heart. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3375-3380 (1983)
- Gerlowski, L.E., and Jain, R.K., Physiologically based Pharmacokinetic modeling: Principles and Applications. *J. Pharm.Sci.*, 72, 1103-1127 (1983)
- Gonzalez, F.J., The molecular biology of cytochrome P-450s, *Pharmacological reviews*, 40, 243-288 (1989)
- Gram, L.F., Reisby, N., Ibsen, I., Nagy, A., Dencker, S.J., Beck, P., Petersen, G.O., and Christiansen, J., Plasma levels and antidepressive effect of imipramine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19, 318-324 (1975)
- Greving, J.H., Bouman, H., Jonkman, J.H.G., Westenberg, H.G.M., and Zeeuw, R.A.D., Analysis of quaternary ammonium compounds and basic drugs based on ion-pair adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 186, 683-690 (1979)
- Guengerich, F.D., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V., and Kaminsky, L.S., Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450: Electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of the isozymes isolated from treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry*, 21, 6019-6030 (1982)

Haefelfinger, P., Determination of amitriptyline and nortriptyline in human plasma by quantitative thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 145, 445-451 (1978)

Hammer, W.H. and Brodie, B.B., Application of isotope derivative technique to assay of secondary amines: Estimation of desipramine by acetylation with  $^3\text{H}$ -acetic anhydride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 157, 503-508 (1967)

Harashima, H., Sawada, Y., Sugiyama, Y., Iga, T., and Hanano, M., Prediction of serum concentration time course of quinidine in human using a physiologically based pharmacokinetic model developed from the rat. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 9, 132-138 (1986)

Hayes, J. S., and Brendel, K., N-demethylation as an example of drug metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1495-1500 (1976)

Himmelstein, K.J., and Lutz, R.J., A review of the applications of Physiologically based pharmacokinetic modeling. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 7, 127-145 (1979)

Hyan, D.E., Thomas, P.E., Korzeniwaski, D., and Levin, W., Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.*, 254, 1365-1374 (1979)

Igari, Y., Sugiyama, Y., Awazu, S., and Hanano, M., Comparative physiologically based pharmacokinetics of hexobarbital, phenobarbital, and thiopental in the rat. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 10, 53-75 (1982)

Igari, Y., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., and Hanano, M., In vitro and in vivo assessment of hepatic and extrahepatic metabolism of diazepam in the rat. *J. Pharm. Sci.*, 73, 826-828 (1984)

Igari, Y., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., and Hanano, M., Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 11, 577-593 (1983)

Inaba, T., Jurima, M., Mahon, W.A., and Kalow, W., In vitro inhibition studies of two isozymes of human liver cytochrome P-450- Mephenytoin p-hydroxylase and sparteine monooxygenase. *Drug Metab. Dispos.*, 13, 443-448 (1985)

Jacobson, M., Levin, W. and Kuntzman, R., Testosterone inhibition of 6-, 7- and 16-hydroxytestosterone metabolism by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 18, 2253-2262 (1969)

Jahnchen, E., Levy, G., Inhibition of phenylbutazone elimination by its metabolite oxyphenbutazone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 141, 963-965 (1972)

Jasson, I., Mole, J., and Schenkman, J.B., Purification and characterization of a new form (RLM2) of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated rat. *J. Biol. Chem.*, 260, 7048-7093 (1985)

Javid, J.I., Hendricks, K., and Davis, J.M., alpha-1-acid glycoprotein involvement in high affinity binding of tricyclic antidepressants to human plasma. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1149-1153 (1982)

Johnson, E.F., Schwab, G.E., and Muller-Eberhard, U., Multiple forms of cytochrome P-450: Catalytic differences exhibited by two homogeneous forms of rabbit cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.*, 15, 708-718 (1978)

Jones, D.B., Morgan, D.J., Mihaly, G.W., Webster, L.K., and Smallwood, R.A., Discrimination between the venous equilibrium and sinusoidal models of hepatic drug elimination in the isolated perfused rat liver by perturbation of propranolol protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229, 522-526 (1984)

Kamataki, T., Maeda, K., Shimada, M., Kitani, K., Nagai, T. and Kato, R., Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233, 222-228 (1985)

Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Nagai, T., and Kato, R., Evidence for the involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in the occurrence of sex-related difference of drug metabolism in the rat. *Life Sci.*, 31, 2603-2610 (1982)

Kaminsky, L.S., Fasco, M.J., and Guengerich, F.P., Comparison of different forms of purified cytochrome P-450 from rat liver by immunological inhibition of regio- and stereoselective metabolism of warfarin. *J. Biol. Chem.*, 255, 85-91 (1980)

- Kato, R., and Kamataki, T., Cytochrome P-450 as a determinant of sex difference of drug metabolism in the rat. *Xenobiotica*, 12, 787-800 (1982)
- Kato, R., and Takanaka, A., Effect of phenobarbital on electron transport system, oxidation and reduction of drugs in liver microsomes of different ages. *J. Biochem.*, 63, 406-408 (1967)
- Kielholz, P. Clinical review on depressive disease. In *Depressive Disorders*, ed. by E. Lindenlaub, pp. 1-6, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1978
- Kirkland, J.J., *Modern Practice of liquid chromatography*, Ed. J.J. Kirkland, Wiley, New York (1971)
- Kitagawa, H., Fujita, S., Suzuki, T., and Kitani, K., Alteration of relative abundance of hepatic microsomal cytochromeP-450 isozymes and microsomal drug metabolizing enzyme activities. *J. Pharm. Dyn.*, 7, s-83 (1984)
- Kitagawa, H., Fujita, S., Suzuki, T., and Kitani, K., Disappearance of sex difference in rat liver drug metabolism in old age. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 579-581 (1985)
- Knox, J.H. and Jurand, J., Separation of tricyclic psychosedative drugs by high-speed ion-pair partition and liquid- solid adsorption chromatography. *J. Chromatogr.*, 103, 311-326(1975)
- Kupfer, A., Al-Dabbagh, S.G., Ritchie, J.C., Idle, J.R., and Smith, R.L., Spectral binding studies of the polymorphically metabolized drugs debrisoquine, sparteine, and phenformin by cytochrome P-450 of normal and hydroxylation deficient rat strains. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3193-3199 (1982)
- Larrey, D., Distlerath, L.M., Dannan, G.A., Wilkinson, G.R. and Guengerich, F.P., Purification and characterization of the rat liver microsomal cytochrome P-450 involved in the 4-hydroxylation of debrisoquine, a prototype for genetic variation in oxidative drug metabolism. *Biochemistry*, 23, 2787-2795 (1984)
- Lin, J. H., Sugiyama, Y., Awazu, S., and Hanano, M. Kinetic studies on the deethylation of ethoxybenzamide. A comparative study with isolated hepatocytes and liver microsomes of rat. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 2825-2830 (1980)

Lin, J.H., Sugiyama, Y., Awazu, S., and Hanano, M., In vitro and in vivo evaluation of the tissue-to-blood partition coefficient for physiological pharmacokinetic models. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 10, 637-647 (1982)

Lin, J.H., Sugiyama, Y., Awazu, S., and Hanano, M., Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained in vitro as well as on physiological data, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 10, 649-661 (1982)

Lohmann, H.J., Proelss, H.F., and Miles, D.G., A simple high pressure liquid chromatographic method for the simultaneous determination of common tricyclic antidepressant drugs in serum. *Clin. Chem.*, 24, 1006-1007 (1978)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)

Lu, A.Y.H., Levin, W., Vore, M., Conney, A.H., Thakker, D.R., Holder, G., and Jerina, D.M., Metabolism of benzo(a)pyrene by purified liver microsomal cytochrome P-448 and epoxide hydrolase. In *Carcinogenesis*, 1, Polynuclear aromatic hydrocarbons: Chemistry, metabolism, and carcinogenesis, ed by Freudenthal, R.I.

Maguire, K.P., Raddats, M.A., and Thompson, S.G., Rapid radioisotopic procedure for the determination of nortriptyline in plasma. *Clin. Chem.*, 22, 761-764 (1976)

Matsumoto, T., Emi, Y., Kawabata, S., and Omura, T., Purification and characterization of three male-specific and one female-specific forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 100, 1359-1371 (1986)

Matsuyama, K., Tanaka, T., Noda, A., Goto, S., and Iguchi, S., Product inhibition of aminopyrine N-demethylation in isolated hepatocytes. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 8, 193-198 (1985)

Mellstrom, B., Bertilsson, L., Lou, Y-C., Sawe, J. and Sjoqvist, F., Amitriptyline metabolism: Relationship to polymorphic debrisoquine hydroxylation, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 34, 516-520 (1983)

Mellstrom, B., and Tybring, G., Ion-pair liquid chromatography of steady-state plasma levels of chlomipramine and demethylchlomipramine. *J. Chromatogr.*, 143, 597-605 (1977)

- Mode, A., Norstedt, G., Eneroth, P., and Gustafsson, J-A., Purification of liver feminizing factor from rat pituitaries and demonstration of its identity with growth hormone. *Endocrinology*, 113, 1250-1260 (1983)
- Moldeus, P., Hogberg, J., and Orrenius, S. Isolation and use of liver cells. In: *Methods in enzymology* vol. 52 (Eds. Fleischer, S. and Packer, L.), pp. 60-71, Academic Press, New York (1978)
- Moody, J.P., Tait, A.C., and Todrick, A., Plasma levels of imipramine and desmethylinipramine during therapy. *Br. J. Psychiat*, 113, 183-193 (1967)
- Moody, J.P., Whyte, S.F., and Naylor, G.J., A simple method for the determination of protriptyline in plasma. *Clin.Chim.Acta*, 43, 355-359 (1973)
- Muller, W.E., and Stillbauer, A.E., Characterization of a common binding site for basic drugs on human alpha-1-acid glyco-protein (orosomucoid). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 322, 170-173 (1983)
- Murdoch, J.A., and Heaton, F.W., Subcellular distribution of metals (sodium, potassium, calcium, and magnesium) in rat liver, kidney, and intestinal mucosa., *Comp. Biochem.Physiol.*, 26, 121-128 (1968)
- Nagy, A., and Johansson, R., Plasma levels of imipramine and desipramine in man after different routes of administration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 290, 145-160 (1975)
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E. f., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., and Waterman, M.R., The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6, 1-11 (1987)
- Nilsen, O.G., Leren, P.L., Aakesson, I., and Jacorsen, S., Binding of quinidine in sera with different levels of triglycerides, cholesterol and orosomucoid protein. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 871-876 (1978)
- Omura, T., and Sato, R., The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378 (1964)
- Otton S.V., Inaba, T., and Kalow, W., Competitive inhibition of sparteine oxidation in human liver by tricyclic antidepressants and other drugs. *Life Sci.*, 32, 795-800 (1984)

- Pang, K.S. A review of metabolite kinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 13, 633-662 (1985)
- Pang, K.S., and Rowland, M., Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "Well-stirred" model and a "Parallel Tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzym-atic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 5, 625-653 (1977)
- Peters, M., and Fouts, J., The influence of magnesium and some other divalent cations on hepatic microsomal drug metabolism in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 533-544 (1970)
- Piafsky, K.M., Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin. Pharmacokin.*, 5, 246-262 (1980)
- Piafsky, K.M., and Borga, O., Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha-1-acid glycoprotein for individual variation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22, 545-549 (1977)
- Pike, E., Skuterud, B., Kierulf, P., Fremstadt, D., Sayed, S.M.A., and Lunde, P.K.M., Binding and displacement of basic, acidic, and neutral drugs in normal and orosomucoid-deficient plasma. *Clin. Pharmacokin.*, 6, 367-374 (1981)
- Potter, W.Z., Calil, H.M., Sutfin, T.A., Zavadil III, A.P., Jusko, W.J., Rapoport, J., and Goodwin, F.K., Active metabolites of imipramine and desipramine in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 31, 393-401 (1982)
- Proelss, H.F., Lohmann, H.J., and Miles, D.G., High-performance liquid-chromatographic simultaneous determination of commonly used tricyclic antidepressants. *Clin. Chem.*, 24/11, 1948-1953 (1978)
- Raisman, Rita., Briley, M. and Langer, S.Z. Specific tricyclic antidepressant binding sites in rat brain. *Nature*, 281, 148-150
- Rane, A., Wilkinson, G. R., and Shand, D. G., Prediction of hepatic extraction ratio from in vitro measurement of intrinsic clearance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 200, 420-424 (1977)
- Reidenberg, M.M., and Drayer, D.E., Alteration of drug-protein binding in renal disease. *Clin. Pharmacokin.*, 9(Suppl. 1), 18-26 (1984)
- Roerig, D.L., Dahl, R.R., Dawson, C.A., and Wang, R.I.H., Effect of plasma protein binding on the uptake of methadone and diazepam

in the isolated perfused rat lung. Drug Metab. Dispos., 12, 536-542 (1984)

Ryan, D.E., Iida, S., Wood, A.W., Thomas, R.E., Lieber, C.S. and Levin, W., Characterization of three highly purified cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats., J. Biol. Chem., 259, 1239-1250 (1984)

Sawada, Y., Hanano, M., Sugiyama, Y., and Iga, T., Prediction of the disposition of beta-lactam antibiotics in humans from pharmacokinetic parameters in animals. J. Pharmacokin. Biopharm., 12, 241-261 (1984)

Sawada, Y., Hanano, M., Sugiyama, Y., and Iga, T., Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. J. Pharmacokin. Biopharm., 13, 477-492 (1985)

Schenkman, J.B., Studies on the nature of the Type I and Type 2 spectral changes in liver microsomes. Biochemistry, 9, 2081-2091 (1970)

Schmucker, D.L., Wang, R.K., and Kwong, P., Liver and Aging (Kintani, K ed.), pp. 75, Elsevier Biomedical Press (1982)

Sheiner, L.B., Beal, S.L., Rosenberg, B., and Marathe, V.V., Forecasting individual pharmacokinetics. Clin. Pharmacol. Ther., 26, 294 (1979)

Sheiner, L.B., Rosenberg, B., and Marathe, V.V., Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. J. Pharmacokin. Biopharm., 5, 445-480 (1977)

Sheiner, L.B., and Beal, S.L. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. J. Pharmacokin. Biopharm., 9, 635-651 (1981)

Sheiner, L.B., and Beal, S.L. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. I. Michaelis-Menten method: Routine clinical pharmacokinetic data. J. Pharmacokin. Biopharm., 8, 553-572 (1980)

Sheiner, L.B., and Beal, S.L., Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters III. Mono-exponential model: Routine clinical pharmacokinetic data. J. Pharmacokin. Biopharm., 11, 303-320 (1983)

Shley, J., and Muller-Oerlinghausen, B., Investigation of the binding of various tricyclic neuroleptics and antidepressants to alpha-1-acid glycoprotein. *J. Pharm. Pharmacol.*, 38, 102-106 (1985)

Skett, P., Mode, A., Rafter, J., Sahlin, L., and Gustafsson, J.-A., The effects of gonadectomy and hypophysectomy on the metabolism of imipramine and lidocaine by the liver of male and female rats. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 2759-2762 (1980)

Skett, P., and Paterson, P., Sex difference in the effects of microsomal enzyme inducers on hepatic phase I drug metabolism in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 3533-3536 (1985)

Sokolowski, A., and Wahlund, K.-G., Peak tailing and retention behaviour of tricyclic antidepressant amines and related hydrophobic ammonium compounds in reversed-phase ionpair liquid chromatography on alkyl-bonded phases. *J. Chromatogr.*, 189, 299-316 (1980)

Spendley, W., Hext, G.R. and Himsforth, F.R., Sequential application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation. *Technometrics*, 4, 441-461 (1962)

Spina, E., Birgersson, C., von Bahr, C., Ericsson, O., Mellstrom, B., Steiner, E., and Sjoqvist, F., Phenotypic consistency in hydroxylation of desmethylinipramine and debrisoquine in healthy subjects and in human liver microsomes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 36, 677 (1984)

Spina, E., and Koike, Y., Differential effects of cimetidine and ranitidine on imipramine demethylation and desmethylinipramine hydroxylation by human liver microsomes. *Eur. J. Clin. Pharm.*, 30, 239-242 (1986)

Steiner, E., Dumont, E., Spina, E., and Dahlqvist, R., Inhibition of desipramine 2-hydroxylation by quinidine and quinine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 43, 577-581 (1987)

Stier, A., Finch, S.A.E., Greinert, R. and Muller, R., *Liver and Aging* (Kitani, K ed.), pp. 3, Elsevier Biomedical Press (1982)

Suckow, R., and Cooper, T.B., Simultaneous determination of amitriptyline and their respective isomeric 10-hydroxy-metabolites in plasma by liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 230, 391-400 (1982)

- Suckow, R., and Cooper, T.B., Simultaneous determination of imipramine, and their 2-hydroxy metabolites in plasma by ionpair reversed-phase high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Pharm. Sci.*, 70, 257-261 (1981)
- Sugano, T., Suda, K., Shimada, M., and Ohino, N., Biochemical and ultrastructural evaluation of isolated rat liver systems perfused with a hemoglobin-free medium. *J. Biochem.*, 83, 995-1007 (1978)
- Sugita, O., Sawada, Y., Sugiyama, Y., Iga, T., and Hanano, M., Prediction of drug-drug interaction from in vitro plasma protein binding and metabolism. A study of tolbutamide-sulfonamide interaction in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 3347-3354 (1981)
- Sugita, O., Sawada, Y., Sugiyama, Y., Iga, T., and Hanano, M., Physiologically based pharmacokinetics of drug-drug interaction: A study of tolbutamide-sulfonamide interaction in rats. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 10, 297-316 (1982)
- Sutfin, T.A. and Jusco, W. J., High-performance liquid chromatographic assay for imipramine, desipramine and their 2-hydroxylated metabolites. *J. Pharm. Sci.*, 68, 703-705 (1979)
- Sutfin, T.A., DeVane, C.L. and Jusko, W., The analysis and disposition of imipramine and its active metabolites in man. *Psychopharmacology*, 82, 310-317 (1984)
- Suzuki, T., Fujita, S., and Kawai, R., Precursor-Metabolite interaction in the metabolism of lidocaine. *J. Pharm. Sci.*, 73, 136-138 (1984)
- Suzuki, Y., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., and Hanano, M., Assessment of the contribution of alpha-1-acid glycoprotein to the serum binding of basic drugs using serum treated with sulphosalicylic acid and DEAE-cellulose. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, 712-717 (1985)
- Teorell, T., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 57, 205 (1937)
- Tsuji, A., Nishide, K., Minami, H., Nakashima, E., Terasaki, T., and Yamana, T., Physiologically based pharmacokinetic model for cefazolin in rabbits and its preliminary extrapolation to man. *Drug Metab. Dispos.*, 13, 729-739 (1985)
- Tsuji, A., Yoshikawa, T., Nishide, K., Minami, H., Kimura, M., Nakashima, E., Terasaki, T., Miyamoto, E., Nightingale, C.H., and Yamana, T., Physiologically based pharmacokinetic model for beta-

- lactam antibiotics I: Tissue distribution and Elimination in rats. *J. Pharm. Sci.*, 72, 1239-1251 (1983)
- Vandemark, F.L., Adams, R.F., and Schmidt, G.J., Liquid Chromatographic procedure for tricyclic drugs and their metabolites in plasma. *Clin. Chem.* 24/1, 87-91 (1978)
- Wagner, J.G., Szpunar, G.J., and Ferry, J.J., A nonlinear physiologic pharmacokinetic models. I. Steady-state. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 13, 73-92 (1985)
- Waxman, D.J., Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c. *J. Biol. Chem.*, 259, 15481-15490 (1984)
- Weder, H.J., and Bickel, M.H., Separation and identification of imipramine and its metabolites from biological samples by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 37, 181-189 (1968)
- Yokota, M., Iga, T., Awazu, S., and Hanano, M., Simple method of hepatic venous blood sampling in the rat. *J. Appl. Physiol.*, 41, 439-441 (1976)
- Zahlten, R.N., and Stratman, F.W., The isolation of hormone-sensitive rat hepatocytes by a modified enzymatic technique. *Arch. Biochem. Biophys.*, 163, 600-608 (1974)
- von Bahr, C., and Orrenius, S., Spectral studies on the interaction of imipramine and some of its oxidized metabolites with rat liver microsomes. *Xenobiotica*, 1, 69-78 (1971)
- von Bahr, C., Astrom, A., Birgersson, C., Blank, A., Ericsson, O., and Spina, E., Hydroxylation of desmethylimipramine (DMI) and debrisoquine (D) in human and rat liver in vitro. In Boobis, A.R., Caldwell, J., De Matteis, F. and Elcombe, C.R. (eds) *Microsomes and Drug Oxidation*, pp. 370-379 (1984)

今井嘉郎、肝ミクロソームのP-450の分子多様性と分類名、細胞工学 6、No. 2、 17-27 (1987)

今井嘉郎、佐藤了、肝ミクロソームのチトクロームP-450分子多様性と反応の多様性、代謝 19,3-15 (1982)

仮家 悟、修士論文 (1986)

窪田玉緒、修士論文 (1988)

鈴木徳治 老化に伴うラット肝異物（がん原物質を含む）代謝能力の変動とその要因の解明 昭和59年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書、pp.127-137 (1985)

龍野 淳、修士論文 (1985)

波多野博行、牧野圭祐、中野勝之訳 Krstulovic, A.M. & Brown, P. R. 著、逆相高速液体クロマトグラフィ、東京化学同人

## 掲載雑誌目録

●第2章は、以下の論文を基に記述した。

M. Chiba, E. Nishihara, S. Fujita and T. Suzuki, Position selective sex difference in imipramine metabolism in rat liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 898-900 (1985)

M. Chiba, S. Fujita, K. Kitani and T. Suzuki, Age-associated alteration in imipramine metabolism is position selective, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 2628-2630 (1986)

M. Chiba, S. Fujita and T. Suzuki, Parallel pathway interaction in imipramine metabolism in rat, *J. Pharm. Sci.*, 77, 944-947 (1988)

S. Fujita, R. Morimoto, M. Chiba, K. Kitani and T. Suzuki, Evaluation of the involvement of a male specific cytochrome P-450 isozyme in senescence-associated decline of hepatic drug metabolism in male rats, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3925-3931 (1989)

●第3章は、以下の論文を基に記述した。

M. Chiba, S. Fujita and T. Suzuki, Kinetic properties of the metabolism of imipramine and desipramine in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 39, 367-372, (1990)

●第4章は、以下の論文を基に記述した。

M. Chiba, S. Fujita and T. Suzuki, Pharmacokinetic correlation between in vitro hepatic microsomal enzyme kinetics and in vivo disposition of imipramine and desipramine in rats, *J. Pharm. Sci.*, 79, in press (1990)

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究の発表の機会を御与え下さると共に、本論文の御校閲を賜り、終始御懇切な御指導御鞭撻を頂いた千葉大学薬学部医療薬剤学講座 生物薬剤学研究室 鈴木徳治教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本論文の御校閲を賜り、終始御懇切な御指導御鞭撻を頂いた千葉大学薬学部薬効・安全性学講座 佐藤哲男教授、渡辺和夫教授、同医療薬剤学講座 仲井由宣教授、同衛生薬学講座 今成登志男教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究遂行にあたり終始温かい御指導御鞭撻を頂きました千葉大学薬学部医療薬剤学講座 藤田正一助教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

また、本研究遂行にあたり、加齢ラットの研究に御協力下さいました東京都老人総合研究所臨床第一生理学研究室室長 木谷健一博士に心から感謝致します。

さらに本研究の遂行に際し、御協力下さいました、川合良成博士、西原恵里氏、柳井清美氏、窪田玉緒氏、仲佐啓詳氏、森本玲子氏、緒方淳人氏、福島由子氏はじめ千葉大学薬学部生物薬剤学研究室の卒業生の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、深い愛情を持って今日の礎を築いて下さいました母 静代と祖母 初江に心から感謝致します。