

**Cinnarizine および flunarizine により誘発される
薬物性 parkinsonism の発現機構に関する研究**

1997 年

假 家 悟

目 次

序 論	1
第1章 Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の定量法の確立	6
第1節 Cinnarizine の新規代謝物の同定	7
第2節 Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の HPLC による定量法	13
小 括	19
実験の部	20
第2章 Cinnarizine と flunarizine の in vitro での代謝	23
第1節 ラット肝ミクロゾームによる代謝	24
第2節 ヒト肝ミクロソームによる代謝	40
第3節 ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームによる代謝	45
小 括	49
実験の部	51
第3章 Cinnarizine および flunarizine の行動薬理学的作用の比較	55
第1節 Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の行動薬理学的作用	56
第2節 Apomorphine により誘発される常同行動の抑制効果	62
小 括	68
実験の部	69

第4章 Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物のドーパミン レセプターおよびムスカリン性アセチルコリンレセプターへの 結合	71
第1節 ラット線条体ドーパミン D2 レセプター (D2-R) への結合	72
第2節 ラット線条体ムスカリン性アセチルコリンレセプター (mACh-R) への結合	77
第3節 Parkinsonism 惹起力の評価	81
小 括	83
実験の部	84
第5章 Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の体内動態と 脳内移行性	86
小 括	101
実験の部	102
総 括	104
参考文献	108
掲載雑誌目録	119
主査および副査名	120
謝 辞	121

序 論

カルシウム拮抗薬は、平滑筋や心筋に存在するカルシウムチャンネルに作用し、細胞内へのカルシウムイオンの流入を抑制することにより、筋弛緩作用を示す。カルシウム拮抗薬は、その構造の違いより4つのタイプに分類されている (Table 1)。Nifedipine に代表される 1,4-ジヒドロピリジン系の化合物は、末梢の血管平滑筋の弛緩作用が強く、主に高血圧の治療に頻用されている。長いアルキル側鎖を有する verapamil は、末梢の血管平滑筋よりも心筋に選択的に作用することから、抗不整脈薬として使用されている。また、ベンゾジアゼピン類似構造を有する diltiazem は、両者の中間的な作用を示す。一方、ピペラジン環を有する cinnarizine および cinnarizine にフッ素を導入した誘導体である flunarizine は、脳血管のカルシウムチャンネルに選択的に作用し、心臓および血圧にほとんど影響することなく脳血管を拡張し、脳血流量を増加させる。臨床的には、cinnarizine は1日 75~150mg、flunarizine は1日 10 mg の投与量で、脳梗塞後遺症、脳出血後遺症および脳動脈硬化症によるめまい、頭痛、頭重感、肩こり等の諸症状の改善効果を示す [2-4]。

Table 1 Classification of calcium antagonists [1]

1) 1,4-Dihydropyridine derivatives

Nifedipine, Nicardipine, Nilvadipine, Nitrendipine, Nisoldipine, Manidipine, Benidipine, Barnidipine, Amlodipine, Efonidipime, Felodipine,

2) Phenylalkylamine derivatives

Verapamil

3) Benzodiazepine derivatives

Diltiazem

4) Piperazine derivatives

Cinnarizine, Flunarizine

1986 年頃より、cinnarizine や flunarizine の服用患者に parkinsonism など錐体外路系の副作用が発現することが報告されるようになった [5-7]。Parkinsonism は運動減少筋硬直症候群であって、臨床像としては、振戦 (tremor)、筋硬直 (rigidity)、無動 (akinesia) を三主徴とするほか、姿勢保持障害や唾液分泌過多、多汗などの自律神経症状もみられる。Parkinsonism は、大脳基底核の黒質線条体においてドーパミン作動性ニューロンの活性が低下し、相対的にコリン作動性ニューロンの活性が優位になった時に発現する [8, 9]。黒質は、中脳の底に近く大脳脚の背方に接している幅の広い灰白質で、メラニンに富む神経細胞であり、ドーパミン作動性ニューロンを線条体へ送る。線条体 (striatum) は、大脳半球の深部で間脳の近くにある灰白質の塊であって、尾状核 (caudate nucleus) と被殻 (putamen) からなる。

薬物が引き起こす parkinsonism としては、haloperidol や chlorpromazine などの抗精神病薬の例が古くから知られている。抗精神病薬の精神分裂病に対する効果は、中脳辺縁系および中脳皮質系におけるドーパミン拮抗作用による。しかし、抗精神病薬のドーパミン拮抗作用は黒質線条体系にも及び、線条体のドーパミンレセプターを遮断することによりドーパミン作動性ニューロンの活性を低下させ副作用として parkinsonism を生じる [10-13]。一方、reserpine などはニューロン末端でドーパミンを遊離・枯渇させることにより、parkinsonism を引き起こす。Cinnarizine および flunarizine は、フェニルアルキルアミン構造を有し、抗精神病薬と構造上の類似性が高く、抗精神病薬と同様の機序で parkinsonism を惹起する可能性が考えられる。Flunarizine に関しては、種々の実験より、ドーパミンレセプターへの関与が示されている [14, 15]。一方、cinnarizine については、その関与は明らかではない。

薬物による毒性 (副作用) 発現の機構を考察するためには、その薬物の体内動態、特に代謝過程について明らかにする必要がある。例えば、抗てんかん薬の carbamazepine 投与時に生ずる精神神経系の副作用は、代謝物の 10,11-エポキシド体によることが知られている [16, 17]。薬物の代謝は、第一相の酸化、還元、加水分解とそれに引き続く第二相の抱合反応からなる。この第一相の反応の中でも最も大きな割合を占めるのが cytochrome P450 (P450) による酸化反応である [18, 19]。P450 は肝臓のミクロゾーム画分に最も多く存在し、脂溶性物質に酸素を導入し体外に排泄されやすい形に変換する。P450 により代謝を受ける薬物は多種多様であり、その数も著しく多い [20]。P450 が多種類の

薬物の代謝に関与しうる理由は、多くの分子種 (isoenzyme)が存在し、また、おのこの分子種自身の基質特異性が比較的低いためである。現在、ヒトの薬物代謝に関わるものだけでも約 20 種の分子種が知られており [21]、これらは、アミノ酸配列の相同性から CYP1 から CYP4 までの 4 つのファミリーに分類されている (Table 2)。個々のファミリーはさらに CYP2A や CYP2B の様にサブファミリーに細分類され、一つのサブファミリーは 1 ～ 5 種の分子種から構成されている。

Table 2 Human cytochrome P450 enzymes involved in the drug metabolism [21]

Family	Subfamily	Isoenzyme
CYP1	CYP1A	CYP1A1
		CYP1A2
CYP2	CYP2A	CYP2A6
	CYP2B	CYP2B6
	CYP2C	CYP2C8
		CYP2C9/10
		CYP2C18
		CYP2C19
	CYP2D	CYP2D6
	CYP2E	CYP2E1
CYP3	CYP3A	CYP3A3/4
		CYP3A5
		CYP3A7
CYP4	CYP4A	CYP4A9
	CYP4B	CYP4B1

Cinnarizine の代謝に関しては、Soudijn ら [22] が雄ラットを用いた *in vivo* の検討より、雄ラットの尿中の主代謝物は benzhydrol とそのグルクロン酸抱

合体であり、糞中の主代謝物は 1-(diphenylmethyl)-piperazine と benzophenone であると報告している。また、Dell ら [23] のウサギを用いた in vivo の検討では、尿中の主代謝物は benzhydrol のグルクロン酸抱合体であった。一方、flunarizine の代謝に関しては、Meuldermans ら [24] が in vivo の検討より、雄ラットでは bis(4-fluorophenyl)methanol が、雌ラットとイヌでは hydroxyflunarizine が主代謝物であると報告している。さらに、Lavrijsen ら [25] は雌雄ラット、イヌ、およびヒトの肝ミクロゾームまたは遊離肝細胞を用いた in vitro の検討より、雌ラット、イヌおよびヒトの主代謝物は hydroxyflunarizine であることを見出した。しかし、両薬物の代謝に関する報告は少なく、特に代謝反応に関与する酵素種や速度論的な情報についての報告はこれまでにない。

Flunarizine による parkinsonism の発現率は、全投与患者の 10～50% にもなり [26]、その症例報告も多い。一方、cinnarizine に関しては、投与量が flunarizine の 10～20 倍（モル換算）多いにもかかわらず、その症例報告は flunarizine に比べて少ない。Parkinsonism の発現率が異なる原因として、両薬物の代謝過程、脳内への移行性、レセプターへの結合性などの相違が考えられる。本研究では、主にラットを用い cinnarizine、flunarizine およびそれらの代謝物についてこれらの性質を比較することにより、両薬物による parkinsonism 発現機構ならびに発現率の相違について考察するために、次に示す各項目に関する検討を行った。

1. Cinnarizine と flunarizine の代謝を検討するために、cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による簡易定量法を確立した。さらに、cinnarizine を基質としてラット肝ミクロゾームと反応させた時に、HPLC のクロマトグラム上で検出された未知代謝物の構造を同定した（第 1 章）。

2. Wistar 系雌雄ラット、DA 系雌ラットおよびヒトの肝ミクロゾームとヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームを用いて、cinnarizine と flunarizine の一次代謝の速度論的検討と代謝反応に関与する P450 分子種について検討した（第 2 章）。

3. 錐体外路系の運動調節機能に及ぼす cinnarizine と flunarizine の作用を、代謝がヒトと類似していた Wistar 系雌ラットを用いて比較した。さらに、ドーパミンレセプターの選択的なアゴニストである apomorphine を用い、ドーパミンレセプターに対する cinnarizine および flunarizine の遮断効果を *in vivo* で比較した（第3章）。

4. ラット線条体の粗膜画分を用い、cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物のドーパミンレセプターとムスカリン性アセチルコリンレセプターに対する親和性を調べることにより、parkinsonism の惹起力を推定した（第4章）。

5. ラットに cinnarizine または flunarizine を連続投与し、血漿中および線条体中の未変化体および代謝物濃度を測定して、連続投与時の体内動態を調べた。さらに cinnarizine、flunarizine およびそれらの代謝物の線条体中濃度と血漿中濃度との比を計算し、脳内移行性について比較検討した（第5章）。

本論文は、これらの方法と結果を詳述し、考察を加えたものである。

第1章 Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の定量法の確立

薬物の体内動態を解析するためには、信頼性の高い生体試料中の薬物や代謝物濃度測定法の確立が必要である。Cinnarizine については、ガスクロマトグラフィー [27] と高速液体クロマトグラフィー(HPLC) [28, 29] による血漿中濃度の定量法が報告されている。しかし、cinnarizine の代謝物の定量法に関する報告はない。一方、flunarizine については、HPLC [30-32] による血漿中濃度の定量法が報告されている。また、flunarizine の代謝物に関しては、ラジオ HPLC による各種試料（血漿、胆汁、尿、糞）中濃度の定量法が報告されているが [24]、標識化合物を用いた方法であり、簡便な方法ではない。従って、本研究遂行にあたって、cinnarizine および flunarizine の代謝物の迅速で簡便な定量法の確立が必要不可欠であると考えられた。

本章では、ラットおよびヒトの肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝実験により、cinnarizine および flunarizine の代謝特性を詳細に調べるために、cinnarizine とその 5 種の代謝物および flunarizine とその 4 種の代謝物を HPLC を用いて簡便かつ迅速にそれぞれ同時定量する方法を検討した。また、定量法を検討するにあたり、cinnarizine を基質としてラット肝ミクロゾームと反応させた時に、HPLC のクロマトグラム上で検出された未知代謝物の同定を行った。

第1節 Cinnarizine の新規代謝物の同定

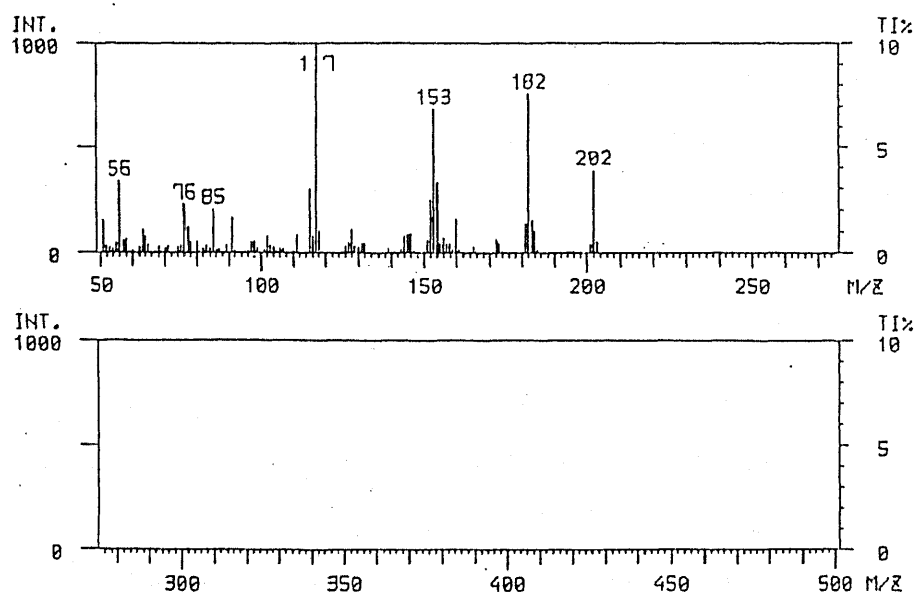
Cinnarizine を基質として NADPH 存在下にラット肝ミクロゾームと反応させた時に、HPLC のクロマトグラム上で未知代謝物と考えられるピークが検出された。この未知代謝物を有機溶媒で抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) および HPLC により単離精製して、そのマススペクトル、NMR スペクトルおよび UV スペクトルを合成標品と比較することにより構造を同定した。

【実験結果・考察】

Cinnarizine の未知代謝物の EI マススペクトルを Fig. 1 (A) に示した。分子イオンピークは検出されなかったが、 m/z 182 および 202 にそれぞれ 4-hydroxyphenyl-phenylmethyl 基および cinnamylpiperazine 基に由来すると考えられるフラグメントイオンピークが検出された。さらに、cinnarizine の未知代謝物の NMR スペクトル (Fig. 2 A) においては、6.7 ppm に phenyl 基のオルト位のプロトンに由来するシフトピークが検出された。これらのことより、未知代謝物は cinnarizine のジフェニルメチル基のベンゼン環 4 位が水酸化された 1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine と推定された。これらのスペクトルは、合成標品 1-[(4-hydroxyphenyl)-phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine のものと一致した (Fig.1, 2)。また、cinnarizine の未知代謝物の UV スペクトル (Fig.3) および HPLC の保持時間 (Fig.4) も、いずれも合成標品と一致した。以上のことより、cinnarizine の未知代謝物は cinnarizine のジフェニルメチル基のベンゼン環 4 位が水酸化された 1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine であると同定した。

Cinnarizine の代謝に関する研究は、Soudijn ら [22] の雄ラットを用いた *in vivo* による検討と、Dell ら [23] のウサギを用いた *in vivo* の検討が報告されているのみである。その中で Soudijn ら [22] は、雄ラットの糞中代謝物の一つとして、1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)-piperazine 経路の 2 次代謝物と考えられる p-hydroxybenzophenone を見いだしている。本研究においては、ラット肝ミクロゾームによる 1 次代謝物として 1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine を初

(A) unknown metabolite



(B) 1-[(4-hydroxyphenyl)-phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine

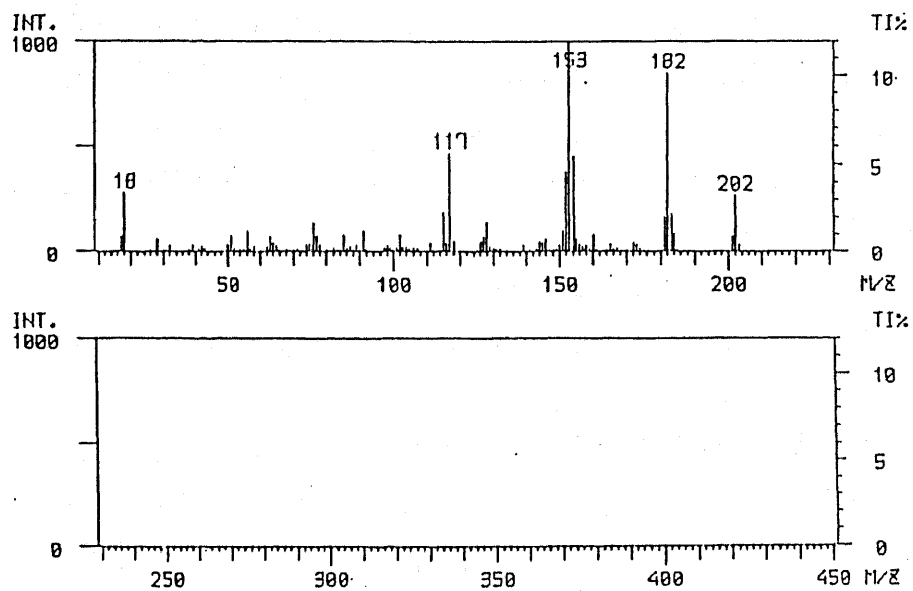
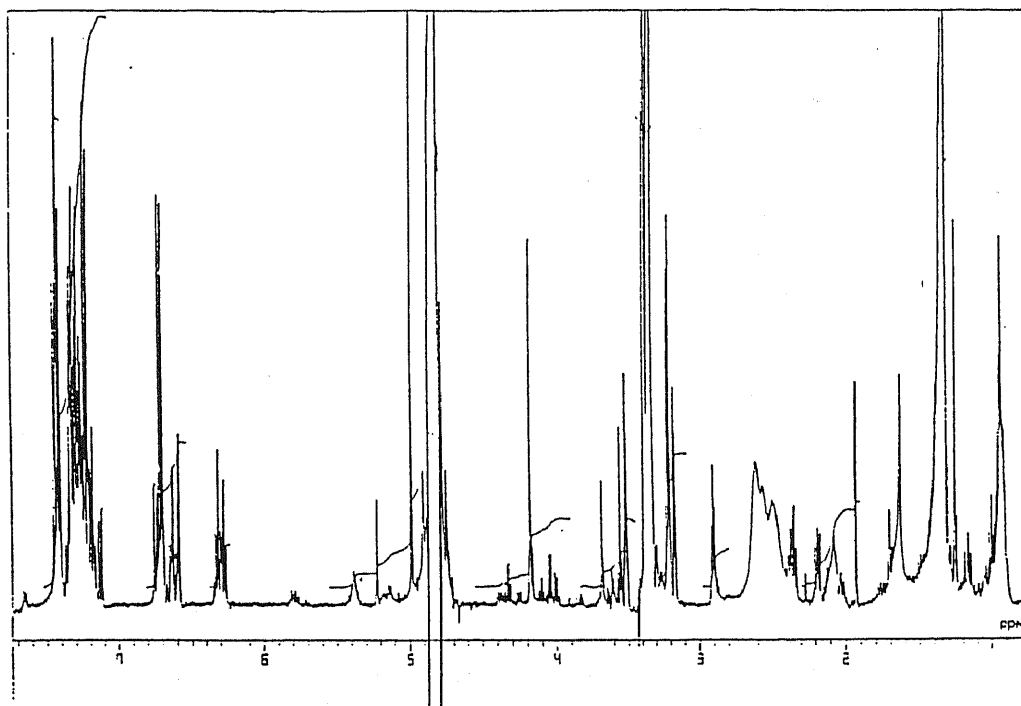


Fig. 1 EI mass spectrum of an unknown metabolite of cinnarizine in rats, as compared with that of authentic compound.

(A) unknown metabolite



(B) 1-[(4-hydroxyphenyl)-phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine

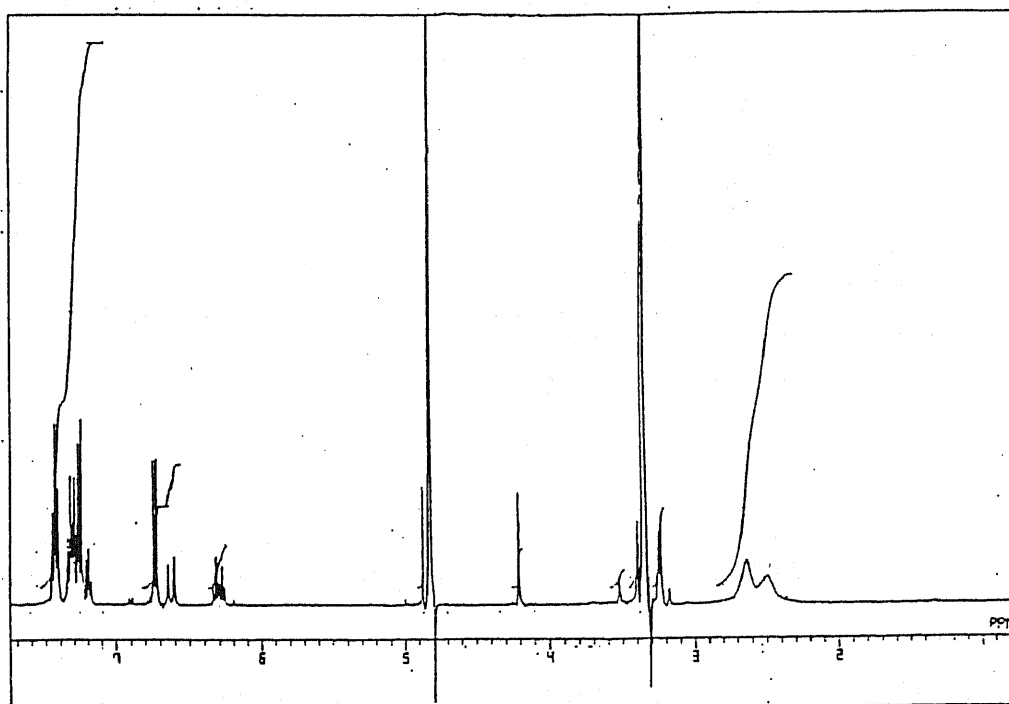
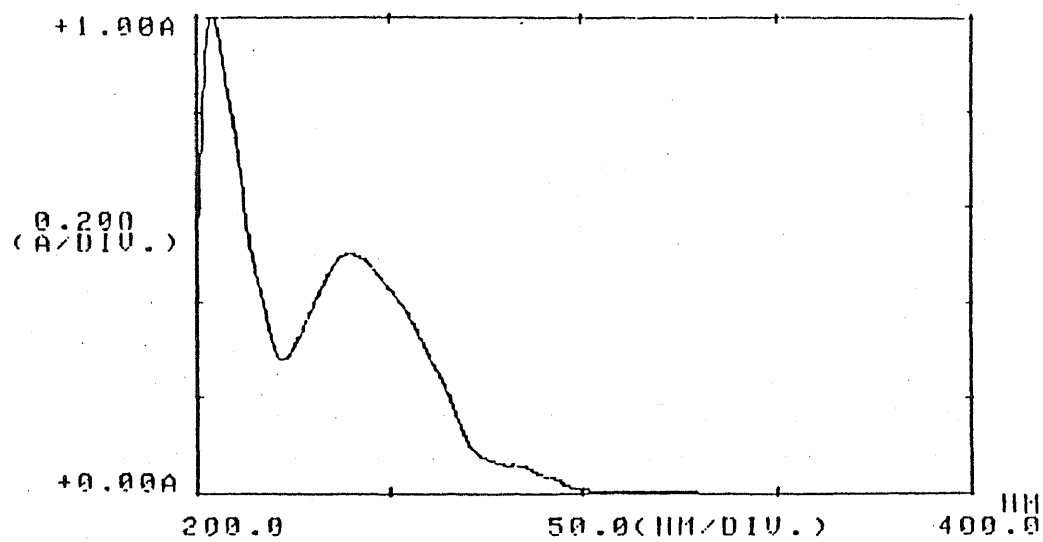


Fig. 2 NMR spectrum of an unknown metabolite of cinnarizine in rats, as compared with that of authentic compound.

(A) unknown metabolite



(B) 1-[(4-hydroxyphenyl)-phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine

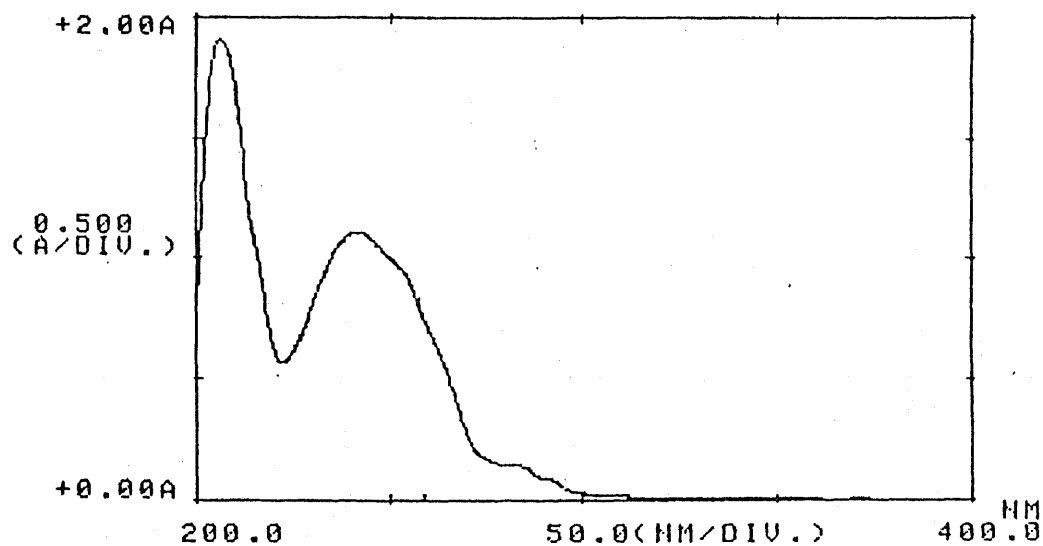


Fig. 3 UV spectrum of an unknown metabolite of cinnarizine in rats, as compared with that of authentic compound.

(A) unknown metabolite



(B) 1-[(4-hydroxyphenyl)-phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine

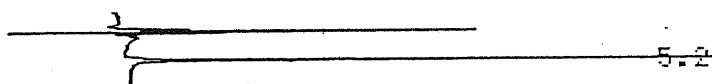


Fig. 4 HPLC chromatogram of an unknown metabolite of cinnarizine in rats, as compared with that of authentic compound.

めて単離同定した。

第2節 Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の HPLC による定量法

Cinnarizine とその5種の代謝物、および flunarizine とその4種の代謝物を HPLC を用いて簡便かつ迅速にそれぞれ同時定量する方法を検討した。

【実験結果・考察】

2-1 Cinnarizine およびその代謝物の定量法

肝ミクロゾーム懸濁液中の cinnarizine およびその代謝物を弱塩基性(pH10)下、n-ヘキサン：アセトン (9 : 1, v/v) で抽出した。抽出溶媒としては、n-ヘキサン単独では、cinnarizine の水酸化体の抽出率が著しく低くなるため、n-ヘキサンとアセトンの混液を使用した。抽出物の分離は、移動相にアセトニトリルとリン酸緩衝液 (50mM, pH3.7) の混合溶液を使用し、ODS を充填したカラムを用いた (詳細については実験の部参照)。

Fig.5 には、ラット肝ミクロゾーム懸濁液(1mg protein, 1ml)に既知量の cinnarizine およびその代謝物を添加し、抽出処理後 HPLC にて測定した例を示す。Cinnarizine およびその代謝物のピーク間で十分な分離が得られた。また、1分析あたりの所要時間は約 16 分であった。

Cinnarizine とその5種の代謝物 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5) は、いずれも 0.02-5 μ M の範囲で良い直線性 ($r \geq 0.999$) を示した。日内および日間の変動係数はいずれも 8.2%以下であり、良い再現性が得られた (Table 3)。また、定量限界は、cinnarizine、C-1、C-2 および C-4 については 0.005 μ M であり、C-5 は 0.01 μ M、C-3 は 0.02 μ M であった。

以上、cinnarizine とその5種の代謝物の迅速かつ簡易な定量法を確立した。特に、cinnarizine の代謝物の定量法としては、本方法が最初のものである。

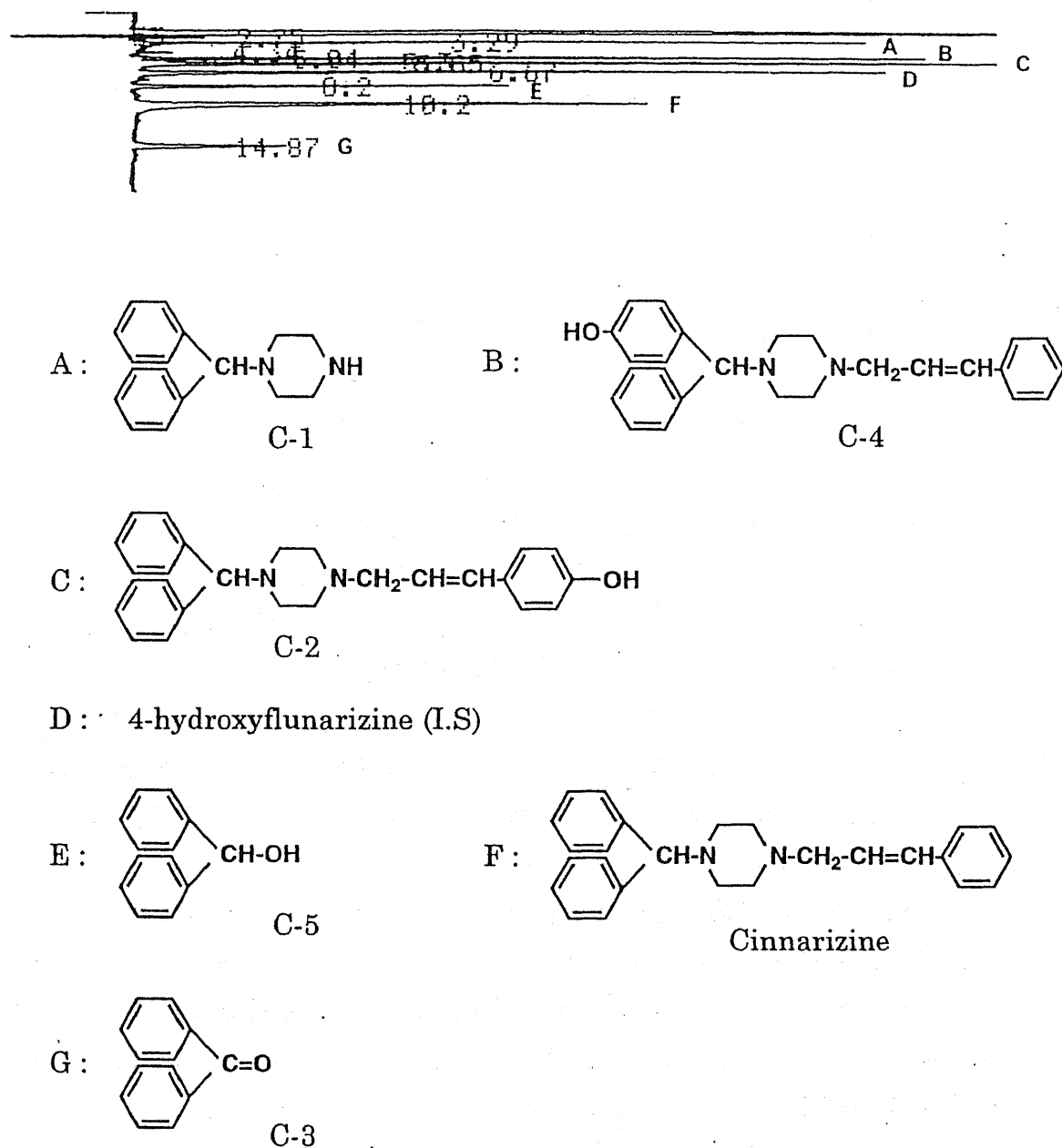


Fig. 5 HPLC chromatogram and chemical structures of cinnarizine and their metabolites.

C-1 : 1-(diphenylmethyl)piperazine

C-2 : 1-(diphenyl-methyl)-4-[3-(4'-hydroxyphenyl)-2-propenyl]piperazine

C-3 : benzophenone

C-4 : 1-[(4-hydroxyphenyl)-phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine

C-5 : benzhydrol

Table 3 Coefficient of variation and detection limit for cinnarizine and their metabolites in rat liver microsomes

Compound	Coefficient of variation (%)						detection limit (μ M)
	Inter-assay			Intra-assay			
	0.1 μ M	0.5 μ M	2 μ M	0.1 μ M	0.5 μ M	2 μ M	
Cinnarizine	2.7	4.0	4.8	5.2	1.5	2.2	0.005
C-1	5.8	3.9	2.7	6.7	4.0	3.2	0.005
C-2	5.4	3.5	2.9	1.1	1.1	1.5	0.005
C-3	5.4	6.7	2.7	3.1	7.0	2.5	0.020
C-4	3.9	5.3	4.6	6.9	6.1	5.0	0.005
C-5	3.6	5.2	3.7	8.2	1.5	2.2	0.010

Inter-assay and intra-assay variations were obtained from four experiments, respectively.

2-2 Flunarizine およびその代謝物の定量法

肝ミクロゾーム懸濁液中の flunarizine およびその代謝物を cinnarizine の場合と同様に弱塩基性(pH10)下、n-ヘキサン：アセトン (9：1, v/v) で抽出した。抽出物の分離は、アセトニトリルとリン酸緩衝液 (50mM, pH3.5) の混合溶液を移動相とし、ODS カラムを用いて行った (詳細については実験の部参照)。

Fig.6 は、ラット肝ミクロゾーム懸濁液(1mg protein, 1ml)に既知量の flunarizine およびその代謝物を添加し、抽出処理後 HPLC に付した時のクロマトグラムである。Flunarizine およびその代謝物のピーク間で十分な分離が得られ、1分析あたりの所要時間は約 17 分であった。

Flunarizine とその 4 種の代謝物 (F-1, F-2, F-3, F-5) は、いずれも 0.02-5 μ M の範囲で良い直線性 ($r \geq 0.999$) を示した。日内および日間の変動係数はいずれも 9.0%以下であり、良い再現性が得られた (Table 4)。また、定量限界は、flunarizine、F-1 および F-2 については 0.005 μ M、F-5 は 0.02 μ M、F-3 は 0.03 μ M であった。

以上、flunarizine とその 4 種の代謝物の迅速かつ簡易な定量法を確立した。特に代謝物に関しては、これまでの標識化合物を用いたラジオ HPLC による方法に比べ、本定量法は非常に簡便な方法であると考えられる。

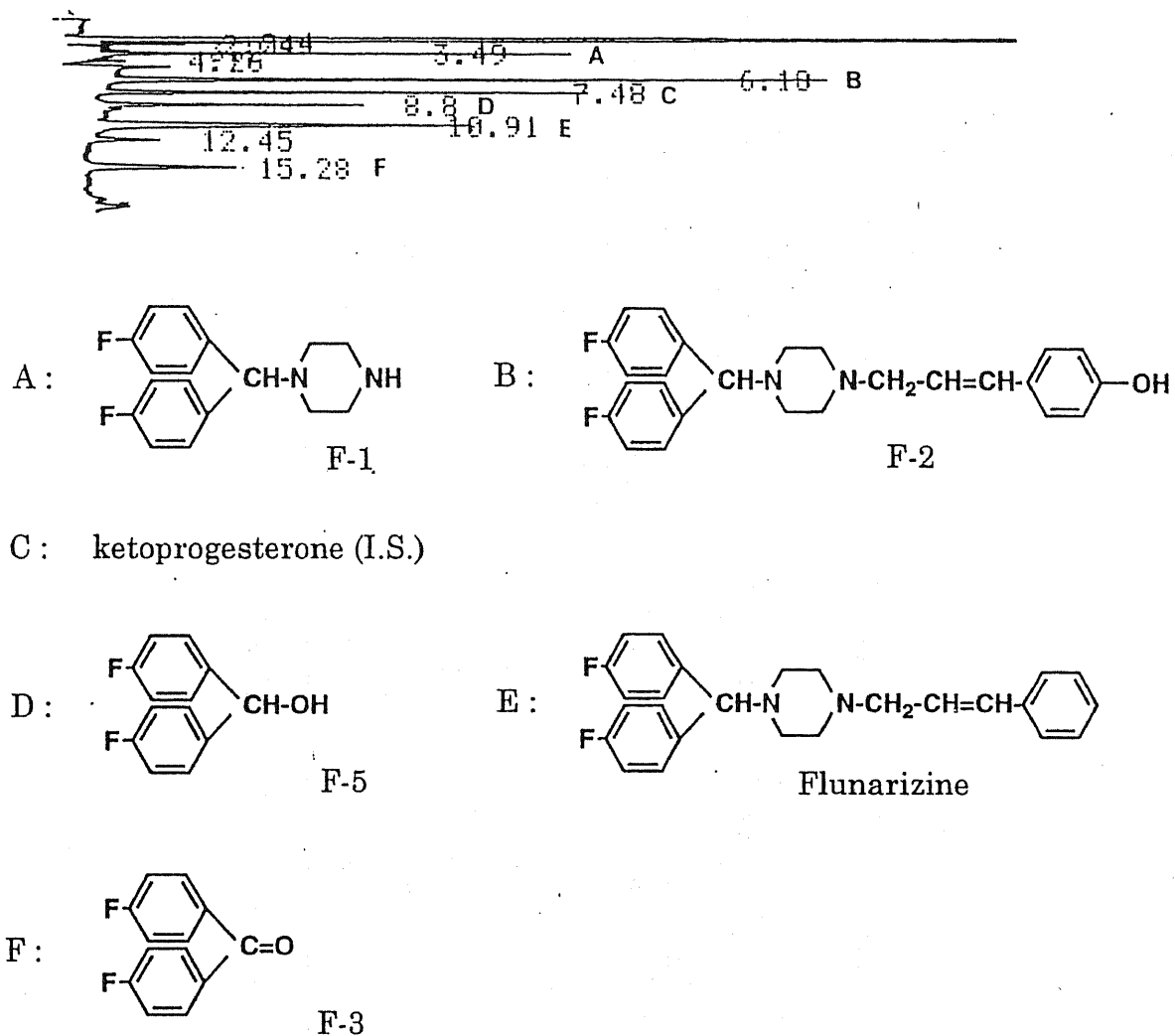


Fig. 6 HPLC chromatogram and chemical structures of flunarizine and their metabolites.

F-1 : 1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]piperazine

F-2 : 1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]-4-[3-(4'-hydroxyphenyl)-2-propenyl]-piperazine

F-3 : 4,4'-difluorobenzophenone

F-5 : bis(4-fluorophenyl)-methanol

Table 4 Coefficient of variation and detection limit for flunarizine and their metabolites in rat liver microsomes

Compound	Coefficient of variation (%)						detection limit (μ M)
	Inter-assay			Intra-assay			
	0.1 μ M	0.5 μ M	2 μ M	0.1 μ M	0.5 μ M	2 μ M	
Flunarizine	7.0	5.4	3.2	9.0	6.0	5.7	0.005
F-1	3.5	6.7	1.2	2.9	7.4	3.0	0.005
F-2	2.1	5.7	2.5	3.8	6.9	4.3	0.005
F-3	7.8	6.5	7.1	6.5	5.3	6.9	0.030
F-5	2.3	7.3	2.8	3.6	5.1	4.1	0.020

Inter-assay and intra-assay variations were obtained from four experiments, respectively.

小 括

ラット肝ミクロゾームの反応液より、cinnarizine の新規 1 次代謝物である 1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine を初めて単離同定した。

さらに、cinnarizine とその 5 種の代謝物および flunarizine とその 4 種の代謝物を HPLC を用いて簡便かつ迅速にそれぞれ同時定量する方法を確立した。いずれも、cinnarizine および flunarizine の代謝特性を詳細に調べるために、有用な定量法であると考えられた。

実験の部

1. 実験動物

8週令の Wistar 系雄性ラット（日本 SLC 株）を用いた。

2. 試薬

Cinnarizine、1-(diphenylmethyl)piperazine (C-1)、1-(diphenylmethyl)-4-[3-(4'-hydroxyphenyl)-2-propenyl]piperazine hydrochloride (C-2)および 1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine (C-4) はエーザイ株より供与された。

Flunarizine hydrochloride、1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]piperazine (F-1)、1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]-4-[3-(4'-hydroxyphenyl)-2-propenyl]piperazine dihydrochloride (F-2) および bis(4-fluorophenyl)methanol (F-5) は協和発酵工業株より供与された。

Benzophenone (C-3)、benzhydrol (C-5)、4,4'-difluorobenzophenone (F-3) および 11-ketoprogesterone は和光純薬工業株より購入した。

その他の試薬は、高速液体クロマトグラフ用または特級試薬を和光純薬工業株より購入した。

3. 実験機器

代謝物のスペクトルの測定には次のものを用いた。

UV スペクトル：島津 UV-160 型紫外可視分光光度計

マススペクトル：日本電子 JMS-DX300 型

NMR スペクトル：日本電子 JNM-GX400 型

HPLC の装置は次のものを用いた。

ポンプ：島津 LC-6A 型 カラムオーブン：島津 CTO-6A 型

検出器：島津 SPD-6A 型紫外分光光度計

計算器：島津 C-R1B 型クロマトインテグレーター

4. ラット肝ミクロゾームの調製

ラット肝ミクロゾームは、Omura と Sato の方法 [33] により調製した。得られたミクロゾームペレットは 100mM リン酸緩衝液 pH7.4 に懸濁し、-80℃

で保存した。タンパク濃度の定量は、Lowry らの方法 [34] に従い、標準物質として牛血清アルブミン（シグマ社製）を用いた。

5. Cinnarizine の新規代謝物の同定

Cinnarizine を NADPH 存在下に Wistar 系雄ラット肝ミクロゾーム (1mg/ml) と 30 分間反応させた。反応液に 1M 炭酸緩衝液 (pH10) を加えた後、代謝物を n-ヘキサン：アセトン (9 : 1, v/v) で抽出した。有機溶媒を減圧留去後、残渣をメタノールに溶解し、シリカゲル (Kieselgel 60 F254, Merck 社製) を用いた薄相クロマトグラフィー (TLC) で分画した。展開溶媒には、クロロホルム：メタノール：アンモニア水 (100 : 10 : 1, v/v) を用いた。次いで、TLC 板より未知代謝物のバンド (R_f 値=0.75) をかき取り、メタノールで抽出後、HPLC に付した。HPLC では、Asahipak ODP-50 カラム (6mm i.d. × 150mm, 旭化成工業株) を 40 °C で用い、移動相としてアセトニトリル：50mM リン酸緩衝液 pH3.7 (35 : 65, v/v) を流速 1.2 ml/min で使用した。未知代謝物の溶出ピークを分取し、アセトニトリルを減圧留去後、1M 炭酸緩衝液 (pH10) を加え、n-ヘキサン：アセトン (9 : 1, v/v) で抽出した。有機溶媒を減圧留去し、機器分析用サンプルを得た。

6. Cinnarizine およびその代謝物の定量法

ラット肝ミクロゾーム懸濁液 1ml に既知量の cinnarizine およびその代謝物を添加し、1M 炭酸緩衝液 (pH10) 0.5ml と内部標準として 20 μ M 4-hydroxyflunarizine (F-2) メタノール溶液 10 μ l を加えた後、n-ヘキサン：アセトン (9 : 1, v/v) 6 ml で抽出した。1600×g で 10 分間遠心分離し、有機層を分取した。ロータリエバポレータで有機層を減圧留去後、残渣をメタノール 100 μ l に溶解し、HPLC に付した。HPLC での分離分析は、以下の条件で行った。

カラム；カプセルパック C 18 (4.6mm i.d.×25cm, 資生堂株)

カラム温度；40 °C

移動相；アセトニトリル：50mM リン酸緩衝液 pH3.7 (45 : 55, v/v)

流速； 1.2 ml/min

検出； 210 nm

7. Flunarizine およびその代謝物の定量法

内部標準に 11-ketoprogesterone を用い、移動相にアセトニトリル：50mM リン酸緩衝液 pH3.5 (45 : 55, v/v) を用いた以外は「6. Cinnarizine およびその代謝物の定量法」と同様に行った。

第2章 Cinnarizine と flunarizine の in vitro での代謝

薬物の毒性を考える上で、代謝過程は重要な要因の一つである。代謝により、薬物は無毒化される場合もあれば、活性化されることもある。また、代謝過程には、大きな種差や性差が存在することが良く知られている。従って、実験動物を用いて薬効や毒性実験を行うに当たっては、できるだけ代謝様式が人に近い動物を用いて行うべきであり、研究の初期の段階で、ヒトを含めた種々の動物における当該薬物の代謝過程を比較検討する必要がある。

Cinnarizine の代謝に関しては、Soudijn ら [22] が雄ラットを用いた in vivo の検討より、雄ラットの尿中の主代謝物は benzhydrol とそのグルクロン酸抱合体であり、糞中の主代謝物は 1-(diphenylmethyl)piperazine と benzophenone であると報告している。また、Dell ら [23] は、ウサギでは尿中の主代謝物は benzhydrol のグルクロン酸抱合体であることを見出している。一方、flunarizine の代謝に関しては、Meuldermans ら [24] の in vivo の検討において、雄ラットでは bis(4-fluorophenyl)methanol が、雌ラットとイヌでは hydroxyflunarizine が主代謝物であった。さらに、雌雄ラット、イヌ、およびヒトの肝ミクロゾームまたは遊離肝細胞を用いた in vitro の検討より、Lavrijsen ら [22] は雌ラット、イヌおよびヒトの主代謝物は hydroxyflunarizine であると報告した。しかし、両薬物の代謝に関与する酵素種や速度論的な情報はない。

本章では、cinnarizine と flunarizine による parkinsonism の発現機構ならびに両薬物による発現率の相違を検討するための第1のステップとして、Wistar 系雌雄ラット、DA 系雌ラットおよびヒトの肝ミクロゾームとヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームを用いて、cinnarizine と flunarizine の一次代謝の速度論的解析を行うと共に代謝反応に関与する P450 分子種について検討した。

第1節 ラット肝ミクロゾームによる代謝

2つの薬物の代謝率を比べる方法の一つとして、*in vitro* の代謝実験で求められる速度論的パラメータ (K_m , V_{max}) の比較がある。また、この速度論的パラメータは、ある薬物の代謝経路が複数存在する場合、どれが主要な代謝経路であるかを推測するうえで、重要な情報を与えてくれる。そこで、Wistar 系雌雄ラットの肝ミクロゾームを用い、cinnarizine および flunarizine の *in vitro* における一次代謝物生成反応の速度論的パラメータを求め、両薬物の代謝について比較検討した。次いで、代謝反応に対する阻害剤の効果を調べた後、さらに CYP2D サブファミリーの欠損モデルである DA 系雌ラット [35-37] を用い、cinnarizine および flunarizine の代謝反応における CYP2D サブファミリーの関与について検討した。

【実験結果・考察】

1-1 Cinnarizine および flunarizine の代謝経路

Wistar 系雄ラットの肝ミクロゾームと Cinnarizine を NADPH 生成系存在下、37 °C で 20 分まで反応させ生成する代謝物の量を経時的に測定した (Fig. 7)。Cinnarizine のピペラジン環の脱アルキル化体である 1-(diphenylmethyl)-piperazine (C-1) と benzophenone (C-3)、シンナミル基のベンゼン環 4 位の水酸化体 (C-2) およびジフェニルメチル基 4 位の水酸化体 (C-4) の生成は、約 10 分まで反応時間に比例して増加した。一方、benzhydrol (C-5) の生成量は、下に凸な曲線となったことより、C-5 は 2 次代謝物である可能性が考えられた。

同様に flunarizine については (Fig. 8)、ピペラジン環の脱アルキル化体である 1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]piperazine (F-1) と 4,4'-difluorobenzophenone (F-3) およびシンナミル基のベンゼン環 4 位の水酸化体 (F-2) の生成は、約 10 分まで反応時間に比例して増加した。Bis(4-fluorophenyl)methanol (F-5) の生成量は、下に凸な曲線となったことより、F-5 は 2 次代謝物である可能性が考えられた。

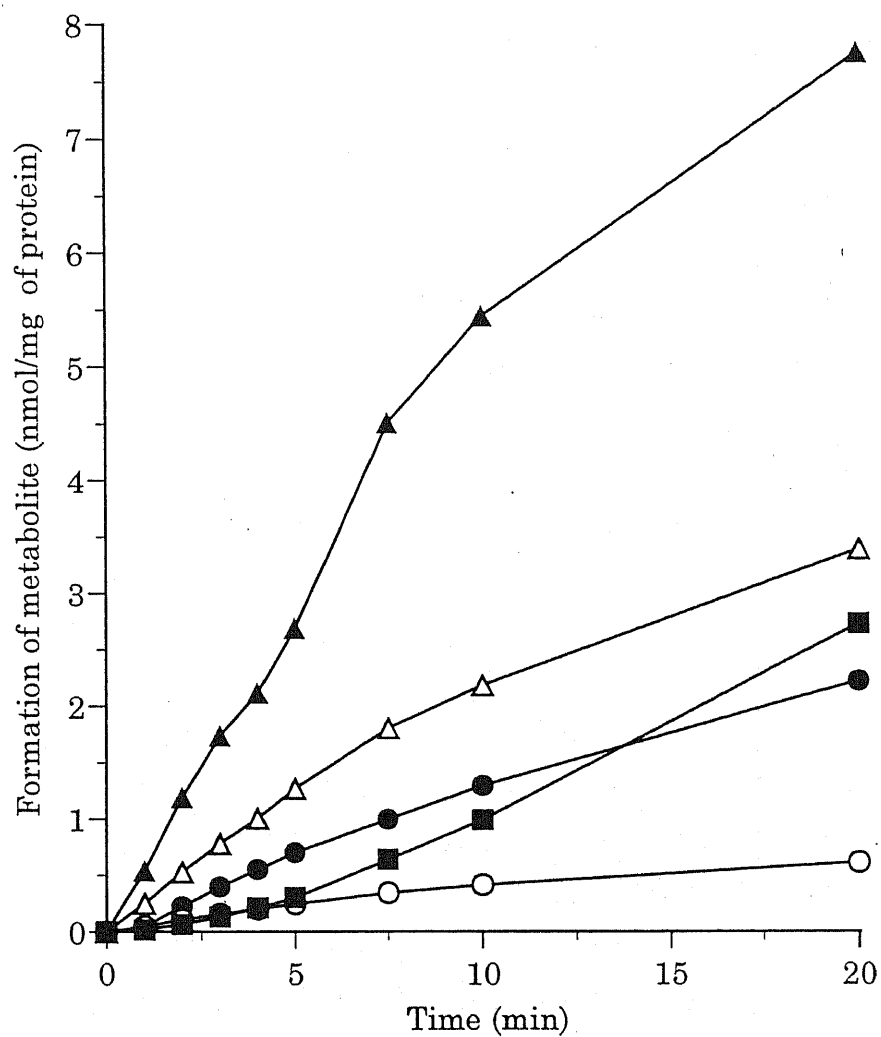


Fig. 7 Time course of cinnarizine metabolism in liver microsomes from male Wistar rats.

Incubation was performed using 50 μ M of cinnarizine and 1mg/ml of microsomal protein. Each value represents an average of two separate determinations. Key : C-1 (●), C-2 (○), C-3 (▲), C-4 (△), C-5 (■)

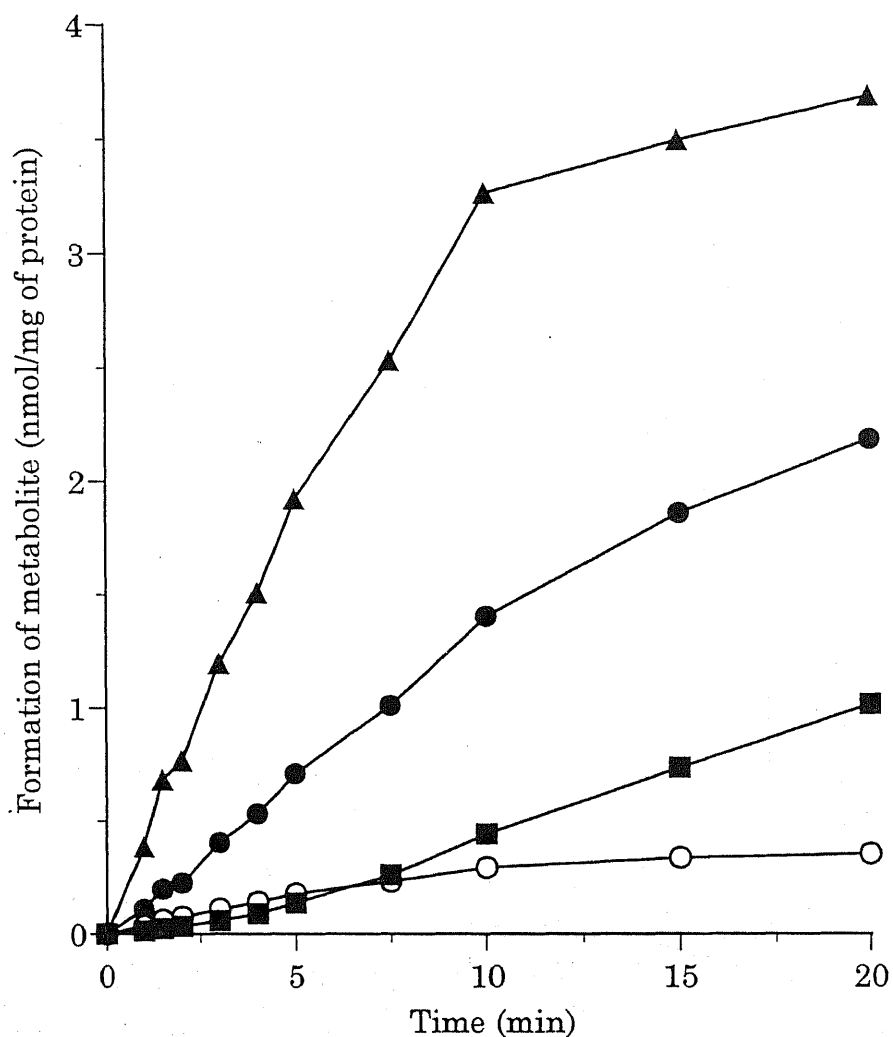


Fig. 8 Time course of flunarizine metabolism in liver microsomes from male Wistar rats.

Incubation was performed using 50 μ M of flunarizine and 1mg/ml of microsomal protein. Each value represents an average of two separate determinations. Key : F-1 (●), F-2 (○), F-3 (▲), F-5 (■)

Cinnarizine の代謝における C-5 の生成については、ウサギ *in vivo* において benzophenone (C-3) が benzhydrol (C-5) に還元される [38] ことより、ラットの肝ミクロゾームにおいても C-3 が還元的代謝を受けて C-5 が生成したと考えられた。F-5 に関しては、Table 5 に示したように、F-3 を基質 (10 μ M) としてラット肝ミクロゾームと反応させると F-5 が生成し、この反応は NADPH 依存的であった。ラット肝ミクロゾームにおけるケトン基を有する薬物のアルコール体への還元的代謝については、bromazepam の代謝物である 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine の還元的代謝の例 [39] などが報告されている。このケトン基の還元的代謝にはカルボニル還元酵素が関与していると考えられている [40] ことより、C-5 および F-5 の生成反応にもカルボニル還元酵素が関与していると推定された。以上のことより、ラット肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine の代謝経路を Fig. 9 のように推定した。

1-2 速度論的パラメータの算出

Wistar 系雌雄ラットの肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine の一次代謝物生成反応の速度論的パラメータを求めた。cinnarizine および flunarizine の基質濃度としては、0.5-320 μ M を用いた。Cinnarizine に関しては、雌雄ともに水酸化(C-2, C-4)の K_m 値は、脱アルキル化(C-1, C-3)の K_m 値に比べ小さかった (Table 6)。雄の C-1、C-3 および C-4 の V_{max} 値は、雌の値に比べ大きく、特に C-3 の V_{max} 値には、13.5 倍の性差が認められた。一方、C-2 の V_{max} 値には性差はなかった。Flunarizine については、雌雄ともに水酸化(F-2)の K_m 値は、脱アルキル化(F-1, F-3)の K_m 値に比べ小さかった (Table 7)。雄の F-1 および F-3 の V_{max} 値は、雌の値に比べ約 3.5 および 5 倍大きかったが、F-2 の V_{max} 値には性差は認められなかった。

Cinnarizine および flunarizine の各代謝物の速度論的パラメータより、代謝全体に対する各代謝反応の寄与を推定し得るパラメータとして固有クリアランス (CL_{int} , V_{max} / K_m) を算出した (Table 8)。雌ラットにおいて、cinnarizine、flunarizine とともに水酸化(C-2, C-4, F-2)の CL_{int} 値は、脱アルキル化(C-1, C-3, F-1, F-3)の値よりも大きく、雌ラットでは水酸化反応が主要な代謝経路であると推定された。一方、雄ラットにおいては、雌ラットに比べ脱アルキル化の

Table 5 Reductive activities of F-3 in liver microsomes from male Wistar rats

Cofactor	Activity (pmol/min/mg)
None	45 ± 4
NADPH	156 ± 14 **
NADPH-generating system	709 ± 154 **

Activities were assayed at F-3 concentration of 10 μ M. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three determinations.
 ** Significantly different from "None" ($p < 0.01$).

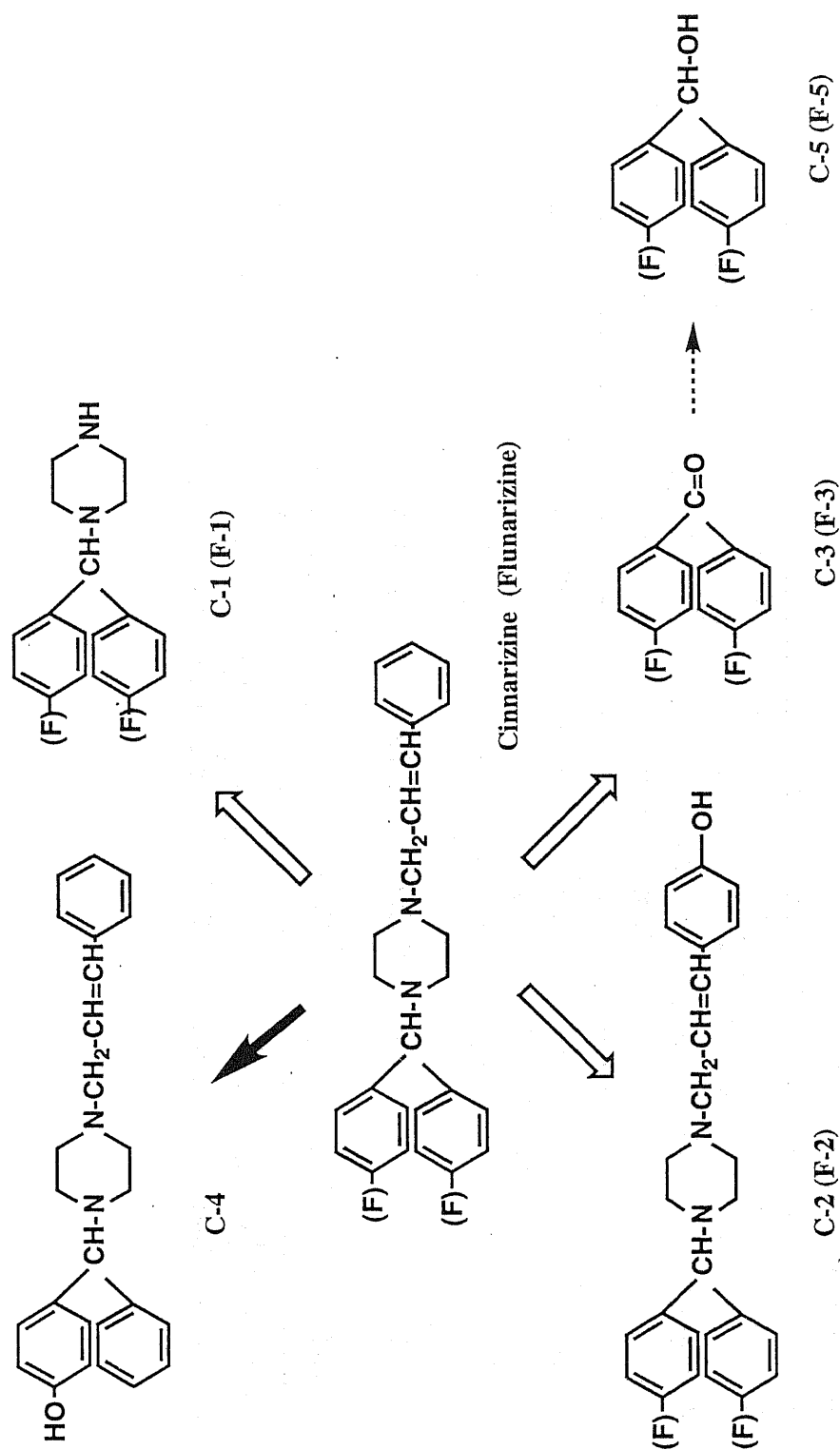


Fig.9 Metabolic pathways of cinnarizine and flunarizine in rat liver microsomes. Open arrows are common primary metabolic pathways for cinnarizine and flunarizine. A closed arrow is a primary metabolic pathway only for cinnarizine. A broken arrow is a secondary metabolic pathway.

Table 6 Michaelis parameters for cinnarizine metabolic activities in liver microsomes from male and female Wistar rats

Metabolite	Male		Female	
	Km (μ M)	Vmax (pmol/min/mg)	Km (μ M)	Vmax (pmol/min/mg)
C-1	42.1 $\pm$ 0.6	134.5 $\pm$ 23.5	36.6 $\pm$ 0.9 **	53.8 $\pm$ 3.0 *
C-2	5.1 $\pm$ 0.4	60.4 $\pm$ 3.2	2.4 $\pm$ 0.1 **	60.2 $\pm$ 3
C-3	23.5 $\pm$ 3.5	1620.0 $\pm$ 262.0	41.8 $\pm$ 1.9 **	120.2 $\pm$ 2 **
C-4	17.1 $\pm$ 0.7	197.4 $\pm$ 5.4	1.2 $\pm$ 0.1 **	26.2 $\pm$ 1 **

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three to four determinations. * , ** Significantly different from mean values of male rats (p < 0.05 and p < 0.01, respectively).

Table 7 Michaelis parameters for flunarizine metabolic activities in liver microsomes from male and female Wistar rats

Metabolite	Male		Female	
	Km (μ M)	Vmax (pmol/min/mg)	Km (μ M)	Vmax (pmol/min/mg)
F-1	40.0 $\pm$ 7.3	288.6 $\pm$ 24	77.8 $\pm$ 11.3 *	45.3 $\pm$ 4.3 **
F-2	6.3 $\pm$ 0.4	50.8 $\pm$ 5.4	4.0 $\pm$ 0.7 *	44.2 $\pm$ 3.3
F-3	64.3 $\pm$ 14.0	234.1 $\pm$ 31	86.2 $\pm$ 13.1	67.1 $\pm$ 9.4 **

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three to four determinations. *, ** Significantly different from mean values of male rats (p < 0.05 and p < 0.01, respectively).

Table 8 Intrinsic clearance for the metabolites of cinnarizine and flunarizine in liver microsomes from Wistar rats

Metabolite	Vmax / Km (ml/min/g)	
	Male	Female
C-1	3.19 ± 0.54	1.47 ± 0.04
C-2	12.12 ± 1.22	25.67 ± 1.11
C-3	68.67 ± 1.83	2.90 ± 0.22
C-4	11.57 ± 0.33	21.48 ± 1.03
Total sum	95.6	51.5
F-1	5.87 ± 0.54	0.63 ± 0.17
F-2	8.09 ± 0.58	11.49 ± 1.21
F-3	3.66 ± 0.22	0.78 ± 0.07
Total sum	17.6	12.9

Each value represents the mean ± S.E. of three to four determinations.

CLint 値が大きく、脱アルキル化反応の寄与が大きいと考えられた。特に cinnarizine のピペラジン環 1 位の脱アルキル化(C-3)の CLint 値が最も大きく、flunarizine の対応する代謝物である F-3 生成反応の値の約 19 倍であった。さらに、flunarizine の全代謝物の CLint 値の総和は、cinnarizine と比べ雄ラットで約 1/5、雌ラットで約 1/4 であったことより、flunarizine は cinnarizine に比べ代謝を受けにくいと考えられた。

1-3 阻害剤の効果

Wistar 系雄ラットの肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine の代謝活性に及ぼす各種阻害剤の添加効果を Table 9 および Table 10 に示した。Cinnarizine および flunarizine の 1 次代謝反応は、いずれも NADPH 非存在下では全く進行せず、一酸化炭素および SKF525-A により有意に抑制されたことより、本反応には P450 が関与していると考えられた。さらに、Wistar 系雌ラットで主代謝反応であった cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位の水酸化活性 (C-2, F-2)が、CYP2D サブファミリーの基質である sparteine および metoprolol [41, 42]の添加により低下したことより、C-2 および F-2 の生成反応には CYP2D サブファミリーが関与していると推定された。また、metoprolol による C-2 および F-2 の生成反応の阻害様式は、いずれも競合阻害であった (Fig. 10 および Fig. 11)。

1-4 Dark Agouti 系ラット肝ミクロゾームでの代謝

Dark Agouti (DA)系ラットは、debrisoquine 4 位水酸化活性が低く、CYP2D サブファミリーに属する P450 分子種の機能が遺伝的に低いことが知られている [35-37]。

前項の阻害剤を用いた実験により、C-2 および F-2 の生成反応には CYP2D サブファミリーが関与していることが示唆された。そこで、DA 系雌ラットの肝ミクロゾームによる cinnarizine および flunarizine の代謝活性を調べた (Table 11)。Cinnarizine および flunarizine の基質濃度は、Wistar 系ラットでの検討により、シンナミル基の芳香環 4 位の水酸化活性 (C-2, F-2) が最大反応速度 (V_{max}) に到達していると推定される $16\mu\text{M}$ とした。DA 系雌ラットの

Table 9 Effects of inhibitors on cinnarizine metabolic activities in liver microsomes from male Wistar rats

Inhibitor	Activity (%)			
	C-1	C-2	C-3	C-4
Complete	100	100	100	100
without NADPH	0 (0.0)**	0 (0.0)**	0 (0.0)**	0 (0.0)**
CO/O ₂ (4 : 1)	31 (4.4)**	43 (3.1)**	16 (1.6)**	29 (2.5)**
SKF 525-A 50μM	40 (2.0)**	25 (1.4)**	54 (0.5)**	30 (1.2)**
200μM	18 (0.5)**	6 (2.9)**	17 (0.4)**	9 (0.4)**
Sparteine 50μM	91 (4.4)	53 (3.5)**	90 (2.0)	90 (1.9)
200μM	92 (1.5)	45 (2.7)**	90 (4.0)	86 (1.9)
Metoprolol 50μM	92 (1.1)	79 (1.2)*	104 (4.3)	93 (0.8)
200μM	91 (1.2)	64 (2.3)*	107 (1.6)	88 (1.2)

In the "Complete" system, cinnarizine (50μM) was incubated with liver microsomes in the presence of an NADPH-generating system. Each value represents a relative activity (%), mean of three determinations) to the activity for the "Complete" system. Activities in the absence of inhibitor (100%) for C-1, C-2, C-3 and C-4 were 269, 60, 314 and 322 pmol/min/mg, respectively. Each value in parenthesis represents S.E. *, ** Significantly different from "Complete" system (p < 0.05 and p < 0.01, respectively).

Table 10 Effects of inhibitors on flunarizine metabolic activities in liver microsomes from male Wistar rats

Inhibitor	Activity (%)		
	F-1	F-2	F-3
Complete	100	100	100
without NADPH	0 (0.0)**	0 (0.0)**	0 (0.0)**
CO/O ₂ (4 : 1)	33 (7.7)**	23 (2.3)**	23 (4.6)**
SKF 525-A 50μM	47 (2.6)**	33 (3.1)**	32 (1.4)**
200μM	24 (0.8)**	0 (0.0)**	11 (1.0)**
Sparteine 50μM	103 (6.0)	63 (1.4)**	92 (3.9)
200μM	96 (6.4)	55 (4.5)**	93 (6.9)
Metoprolol 50μM	93 (10.3)	88 (0.6)**	92 (5.9)
200μM	101 (9.9)	66 (4.3)**	96 (6.0)

In the "Complete" system, flunarizine (50μM) was incubated with liver microsomes in the presence of an NADPH-generating system. Each value represents a relative activity (%), mean of three determinations) to the activity for the "Complete" system. Activities in the absence of inhibitor (100%) for F-1, F-2 and F-3 were 191, 39 and 171 pmol/min/mg, respectively. Each value in parenthesis represents S.E. ** Significantly different from "Complete" system (p < 0.01).

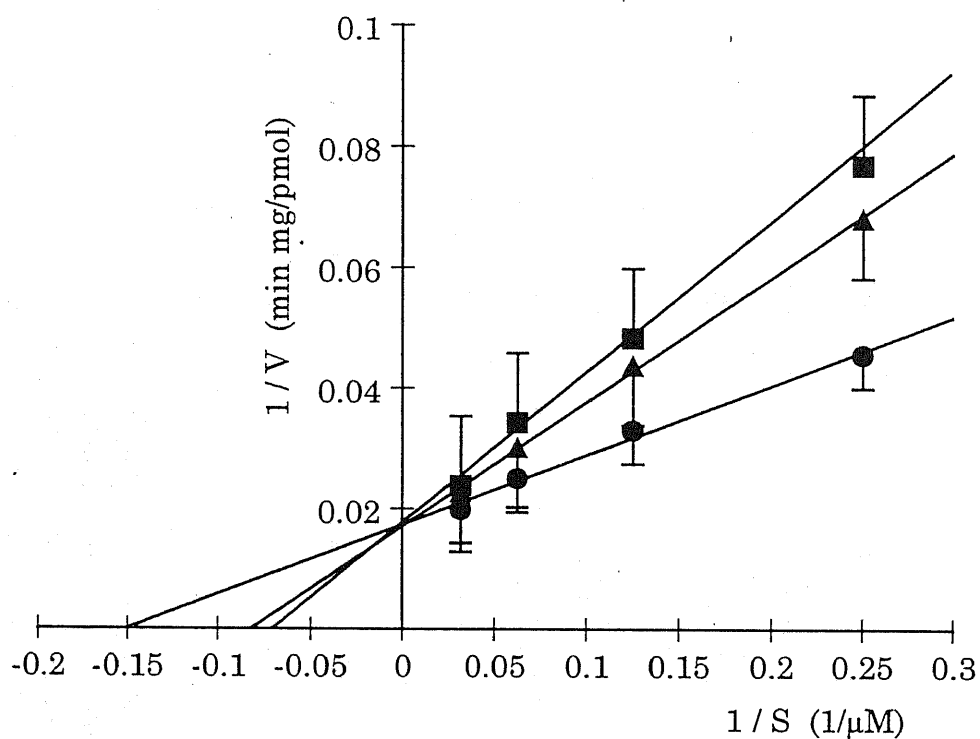


Fig. 10 Effect of metoprolol on cinnarizine 4-hydroxylase activities in liver microsomes from male Wistar rats .

Concentrations of the inhibitor were 0 (●), 50 (▲) and 100 μ M (■). Each value represents the mean $\pm$ S.E. (N=3).

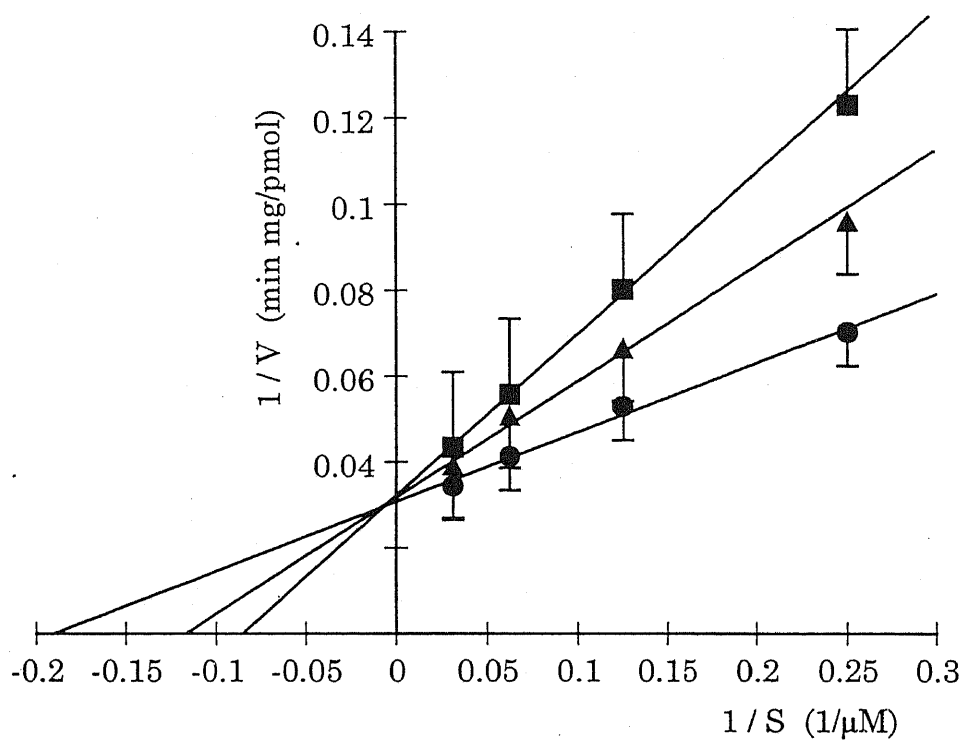


Fig. 11 Effect of metoprolol on flunarizine 4-hydroxylase activities in liver microsomes from male Wistar rats .

Concentrations of the inhibitor were 0 (●), 50 (▲) and 100 μM (■). Each value represents the mean $\pm$ S.E. (N=3).

Table 11 Oxidative activities of cinnarizine and flunarizine in rat liver microsomes

Metabolite	Activity (pmol/min/mg)	
	female Wistar	female DA
C-1	11.0 $\pm$ 0.9	23.7 $\pm$ 3.0 **
C-2	53.3 $\pm$ 2.7	14.0 $\pm$ 0.7 **
C-3	26.8 $\pm$ 2.1	46.6 $\pm$ 4.0 **
C-4	24.9 $\pm$ 1.6	2.0 $\pm$ 0.1 **
F-1	12.5 $\pm$ 4.9	54.9 $\pm$ 5.0 **
F-2	36.0 $\pm$ 1.2	4.0 $\pm$ 0.2 **
F-3	5.8 $\pm$ 2.5	29.5 $\pm$ 3.2 **

Activities were assayed at cinnarizine or flunarizine concentration of 16 μ M. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of four determinations. ** Significantly different from corresponding activities of female Wistar rats ($p < 0.01$).

C-2 および F-2 の生成活性は、Wistar 系雌ラットに比べ、いずれも有意に低かった。このことより、C-2 および F-2 の生成には CYP2D サブファミリーの関与が推定された。一方、脱アルキル化活性 (C-1, C-3, F-1, F-3) は、DA 系雌ラットが Wistar 系雌ラットに比べいずれも有意に高かった。さらに、cinnarizine のジフェニルメチル基の芳香環 4 位の水酸化活性 (C-4) も、DA 系雌ラットで有意に低い値を示したが、Wistar 系ラット肝ミクロゾームの本活性が sparteine あるいは metoprolol により低下しなかったことより、C-4 の生成には CYP2D 以外のサブファミリーの関与が考えられた。

第2節 ヒト肝ミクロゾームによる代謝

前節の結果より、cinnarizine および flunarizine の Wistar 系雌ラット肝ミクロゾームでの代謝は低基質濃度領域 (32 μ M 以下) では、シンナミル基の芳香環 4 位の水酸化活性 (C-2, F-2) が主反応であり、この代謝反応には CYP2D サブファミリーが関与していると推定された。

本節ではヒト肝ミクロゾームを用い、cinnarizine および flunarizine の代謝活性を測定し、CYP2D6 含量および debrisoquine 4 位水酸化活性との相関を調べた。さらに、CYP2D サブファミリーの選択的阻害剤である quinidine [43] による阻害効果も検討した。

【実験結果】

2-1 Cinnarizine および flunarizine の代謝活性と debrisoquine 4 位水酸化活性ならびに CYP2D6 含量との相関

ヒト肝ミクロゾームとしては、剖検サンプルより調製し、その P450 含量が 0.21-0.51 nmol/mg of protein の範囲であった 10 例を用いた。ヒト肝ミクロゾームでの cinnarizine および flunarizine の代謝活性と、debrisoquine の 4 位水酸化活性ならびに CYP2D6 含量との相関を Table 12 と Fig. 12 に示した。代謝活性は、cinnarizine では C-2 生成活性が最も高く、次いで C-1, C-3, C-4 の順であった。Flunarizine では、F-1, F-2 および F-3 の順で生成活性が高かった。Cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位の水酸化活性 (C-2, F-2) は、debrisoquine の 4 位水酸化活性ならびに CYP2D6 含量と高い相関を示した (いずれも $r \geq 0.90$, $p < 0.001$)。一方、シンナミル基の芳香環 4 位水酸化以外の cinnarizine および flunarizine の代謝活性と debrisoquine 4 位水酸化活性または CYP2D6 含量との相関性は低かった。

Table 12 Oxidative activities of cinnarizine and flunarizine in human liver microsomes

Metabolite	Activity ^{a)} (pmol/min/mg)	Correlative coefficient ^{b)}	
		(r-1)	(r-2)
C-1	35.4 ± 17.5	0.617	0.409
C-2	52.6 ± 19.5	0.949 ***	0.919 ***
C-3	19.3 ± 8.6	0.736 *	0.583
C-4	7.4 ± 2.7	0.602	0.683 *
F-1	37.4 ± 15.9	0.686 *	0.460
F-2	23.9 ± 8.4	0.895 ***	0.928 ***
F-3	18.0 ± 10.3	0.589	0.318

a) Each value represents the mean ± S.E. (n=10).

b) r-1 and r-2 are correlative coefficients with debrisoquine 4-hydroxylase activity and CYP2D6 content, respectively (* p < 0.05, *** p < 0.001).

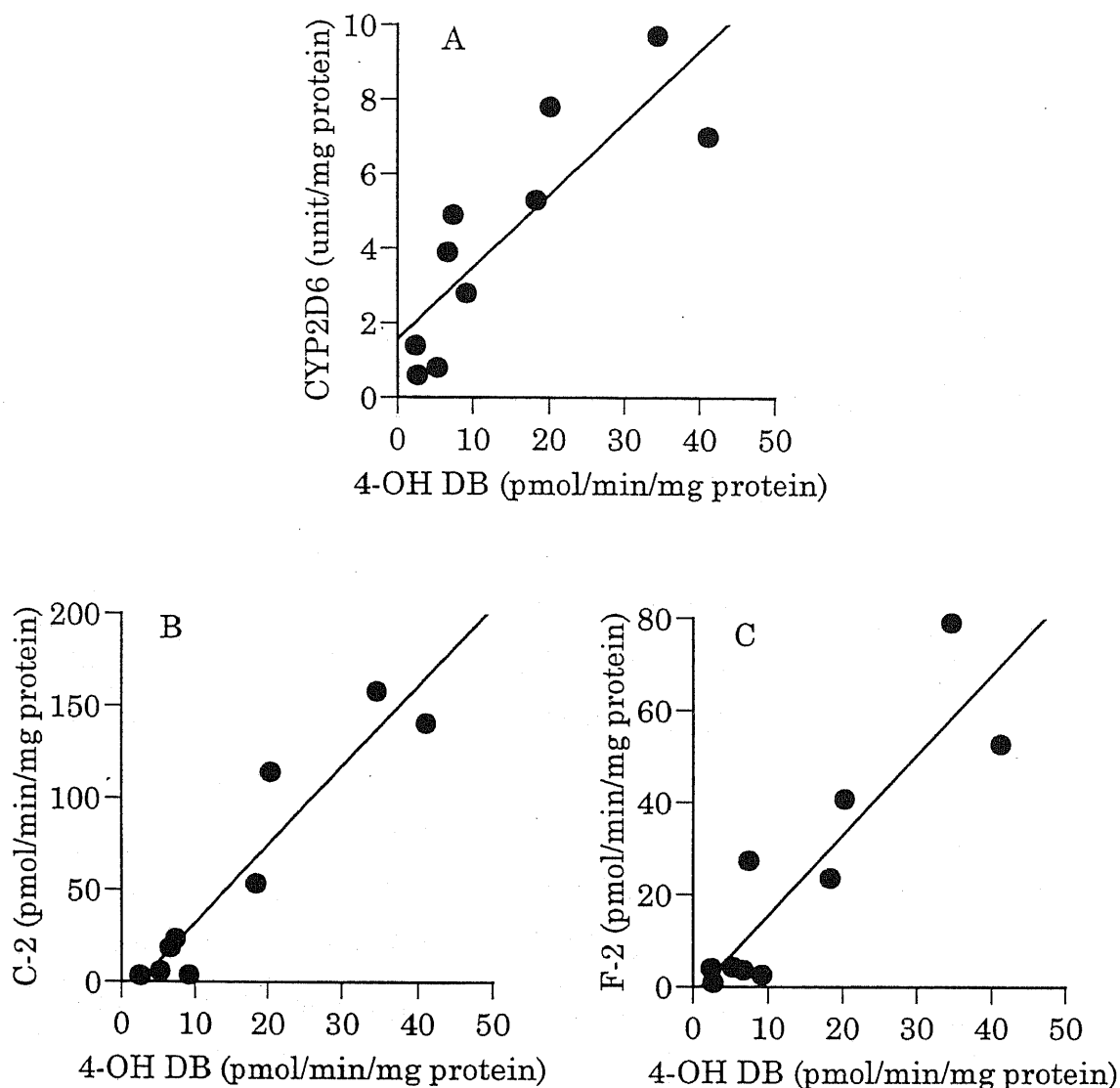


Fig. 12 Correlation of the CYP2D6 content and the ring-hydroxylase activity at the cinnamyl moiety of cinnarizine and flunarizine with the debrisoquine 4-hydroxylase (4-OH DB) activity in human liver microsomes

Mean activities of the ring-hydroxylation forming C-2 and F-2, and of DB 4-hydroxylation were 52.6 ± 19.5 , 23.9 ± 8.4 and 15.8 ± 4.0 pmol/min/mg of protein, respectively. A) represents the correlation of CYP2D6 content and DB 4-hydroxylation ($Y=0.193X+1.559$, $r=0.846$). B) represents the correlation of C-2 formation and DB 4-hydroxylation ($Y=4.29X-11.11$, $r=0.949$). C) represents the correlation of F-2 formation and DB 4-hydroxylation ($Y=1.74X-2.01$, $r=0.895$).

2-2 Quinidine による阻害効果

Cinnarizine および flunarizine のシンナミル基芳香環 4 位の水酸化反応 (C-2, F-2) における CYP2D サブファミリーの関与をさらに明らかにするために、CYP2D サブファミリーの選択的阻害剤である quinidine [43] の添加効果を調べた (Fig. 13)。C-2 および F-2 の生成活性は、quinidine の添加 (5 μ M) により有意に低下した。一方、その他の代謝物生成反応は、いずれも quinidine の影響を受けなかった。

【考察】

C-2 および F-2 の生成活性が CYP2D6 含量および debrisoquine 4 位水酸化活性と高い相関を示したこと、ならびに両代謝活性が quinidine により大きく低下したことより、ヒト肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応には、CYP2D6 が関与していると考えられた。CYP2D6 は haloperidol, propranolol, dextromethorphan など 40 種余りの薬物の代謝に関与し、遺伝多型を示すことが知られている [20, 44]。CYP2D6 の欠損者の割合は、欧米人では約 7 % と比較的高いが [45]、日本人では 0.5 % 以下である [46, 47]。しかし、これまでに cinnarizine および flunarizine の代謝における CYP2D6 の関与についての知見はない。また、cinnarizine や flunarizine による parkinsonism の発現と CYP2D6 の遺伝多型との関係も明らかでない。

ヒト肝ミクロゾームによる cinnarizine および flunarizine の代謝パターンは、Wistar 系雄ラットよりも Wistar 系雌ラットに類似していた。Flunarizine に関してこの知見は、Lavrijsen ら [25] が雌雄ラットおよびヒトの肝ミクロゾームまたは遊離肝細胞を用いた *in vitro* の検討より、ヒトの代謝パターンは雌ラットに類似し、その主代謝物は hydroxyflunarizine であるとする報告と一致した。このことより、以後の研究で cinnarizine および flunarizine による parkinsonism 発現の機構を検討して行くに当たっては、雄ラットよりも雌ラットを使用する方が適当であると考えられた。

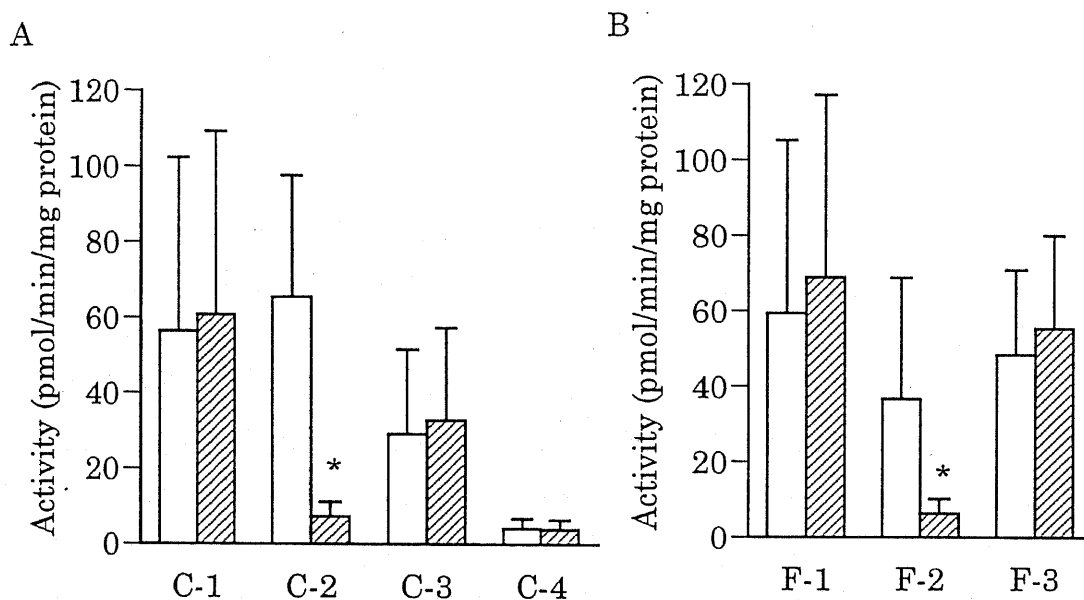


Fig. 13 Effect of quinidine on oxidative metabolism of cinnarizine and flunarizine in human liver microsomes.

Open and hatched column (mean $\pm$ S.E., each $n=4$) are control and quinidine-added ($5 \mu\text{M}$) groups, respectively. A) and B) show effects of quinidine on metabolism of cinnarizine and flunarizine, respectively. Statistical significance was calculated by Student's t -test.

* Significantly different from the control values ($p < 0.05$).

第3節 ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞マイクロゾームによる代謝

近年、ヒトの P450 を異種細胞に発現させ、薬物代謝に関する情報を得るための技術が発達し、身近なものとなってきた。P450 を発現させる異種細胞としては、酵母やヒト肝癌由来 HepG2 細胞など様々なものが利用されている [48]。その中でも、ヒト B リンパ芽球細胞系は P450 の発現量が多く、かつ導入形質 (P450) が細胞の継代によって変化しない安定発現系として評価されている [49]。

本研究では、ヒト B リンパ芽球細胞系に発現させた、10 種類のヒト P450 遺伝子発現系マイクロゾームを用い、cinnarizine および flunarizine の代謝活性を測定し、両薬物の代謝反応に関与する P450 分子種の同定を試みた。

【実験結果・考察】

3-1 Cinnarizine および flunarizine の代謝活性

10 種類のヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞マイクロゾームを用い、基質濃度 50 μ M で cinnarizine および flunarizine の代謝活性を測定した結果を Table 13 に示した。

10 種類の分子種のうち CYP2D6 のみが、cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応 (C-2, F-2) を触媒した。ヒト肝マイクロゾームを用いた実験により、C-2 および F-2 の生成活性が CYP2D6 含量および debrisoquine 4 位水酸化活性と高い相関を示し、さらに両代謝活性が quinidine により大きく低下したことより、ヒト肝マイクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応には、CYP2D6 が関与していると考えられた。ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞マイクロゾームを用いた本実験により、C-2 および F-2 の生成反応における CYP2D6 の関与が直接的に証明された。

Cinnarizine のジフェニルメチル基の水酸化活性 (C-4) は、CYP2B6 のみで認められた。CYP2B6 の薬物代謝における役割は未だ明確ではないが、抗癌剤の cyclophosphamide の代謝に関与し、また phenobarbital により誘導される分子種である可能性が考えられている [50]。

Table 13 Oxidative activities of cinnarizine and flunarizine by human CYP enzymes

Metabolite	Activity (pmol/min/pmol CYP)									
	CYP 1A1	CYP1A2	CYP 2A6	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP2C19	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP3A4
C-1	-	0.05	-	-	-	0.37	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	-	-	-	0.94	-	-
C-3	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
C-4	-	-	-	1.33	-	-	-	-	-	-

F-1	0.57	-	0.02	-	-	0.77	-	-	-	-
F-2	-	-	-	-	-	-	-	0.63	-	-
F-3	0.02	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-

Each value represents the mean of three independent experiments. Detection limits were 5 pmol/ml for C-1, C-2, C-4, F-1, F-2 ; 20 pmol/ml for C-3 ; 30 pmol/ml for F-3. -, not detectable.

Cinnarizine の脱アルキル化活性 (C-1 または C-3) は、CYP2C9 および CYP1A2 で検出され、flunarizine の脱アルキル化活性 (F-1 または F-3) は、CYP2C9、CYP1A1 および CYP2A6 で検出された。CYP1A1 が flunarizine の脱アルキル化のみを触媒し、一方、活性は低いものの CYP1A2 が cinnarizine の脱アルキル化のみを触媒したことは興味深い。両分子種の活性中心へのこれらの薬物の結合にジフェニルメチル基のフッ素が影響しているのかもしれない。Flunarizine の脱シンナミル化活性 (F-1) は、CYP1A1 において比較的高い値を示したが、通常ヒト肝における CYP1A1 含量は非常に低い [51, 52] ことから、cinnarizine および flunarizine の脱シンナミル化 (C-1, F-1) には、tolubutamide の代謝に関与する [53] CYP2C9 が主に関与している可能性が考えられた。

CYP2C8、CYP2C19、CYP2E1 あるいは CYP3A4 は、いずれの活性も示さなかった。

3-2 速度論的パラメータの算出

CYP2D6 および CYP2B6 を用いて、cinnarizine および flunarizine の水酸化反応の速度論的パラメータ (K_m , V_{max}) を求め、固有クリアランス値 (CL_{int} , V_{max} / K_m) を算出した (Table 14)。Cinnarizine および flunarizine の基質濃度としては、 $.5\text{--}320\text{ }\mu\text{M}$ を用いた。

CYP2D6 による cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の水酸化反応 (C-2, F-2) の K_m 値は $2\text{--}4\text{ }\mu\text{M}$ 、 CL_{int} 値は $0.14\text{--}0.31\text{ ml/min/nmol}$ であり、CYP2B6 による C-4 生成反応 (K_m : $17.2\text{ }\mu\text{M}$, CL_{int} : 0.1 ml/min/nmol) に比べ低い K_m 値と高い CL_{int} 値を示した。Cinnarizine および flunarizine のヒトにおける定常状態の血漿中濃度がそれぞれ $0.4\text{--}0.8\text{ }\mu\text{M}$ [54, 55] および $0.05\text{--}0.4\text{ }\mu\text{M}$ [56, 57] であることより、CYP2D6 は cinnarizine および flunarizine の代謝において、主要な働きを担っていると考えられた。

なお、脱アルキル化反応の速度論的パラメータについては、高基質濃度域において非酵素的な分解物の影響が相対的に大きく、算出できなかった。

Table 14 Kinetic parameters for metabolic activities of cinnarizine and flunarizine by CYP2B6 and CYP2D6

Enzyme	Metabolite	K _m (μ M)	V _{max} (pmol/min/pmol CYP)	CL _{int} (V _{max} /K _m)
CYP2B6	C-4	17.2 (17.8, 16.7)	1.75 (1.73, 1.77)	0.10 (0.10, 0.11)
CYP2D6	C-2	2.44 (3.05, 1.97)	0.72 (0.75, 0.70)	0.31 (0.25, 0.36)
CYP2D6	F-2	3.59 (3.08, 4.34)	0.49 (0.50, 0.47)	0.14 (0.16, 0.11)

Each value represents the mean of two determinations using different lots of lymphoblastoid cell microsomes. Numbers in parentheses show each value.

小 括

Cinnarizine と flunarizine による parkinsonism の発現機構ならびに両薬物による発現率の相違を検討するための第 1 段階として、Wistar 系雌雄ラット、DA 系雌ラットおよびヒトの肝ミクロゾームとヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームを用いて、cinnarizine と flunarizine の一次代謝の速度論的検討と代謝反応に関与する P450 分子種について検討し、以下の知見を得た。

- 1) ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝実験において、cinnarizine および flunarizine の 1 次代謝反応は、いずれも NADPH 非存在下では全く進行せず、一酸化炭素および SKF525-A により抑制されたことより、本反応には P450 が関与していることが示唆された。
- 2) ラット肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine の低基質濃度域での主代謝反応は、シンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応 (C-2, F-2) であった。
- 3) ラット肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine の脱アルキル化反応 (C-1, C-3, F-1, F-3) には、顕著な性差が認められた。
- 4) ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝実験より求めた固有クリアランス値 (V_{max} / K_m) より、flunarizine は cinnarizine に比べ代謝を受けにくいものと考えられた。
- 5) 阻害剤および DA 系ラットを用いた実験より、ラット肝ミクロゾームでの C-2 および F-2 の生成には CYP2D サブファミリーの関与が示唆された。
- 6) ヒト肝ミクロゾームでの cinnarizine および flunarizine 代謝パターンは、Wistar 系雄ラットよりも Wistar 系雌ラットに類似していた。
- 7) C-2 および F-2 の生成活性が CYP2D6 含量および debrisoquine 4 位水酸化活性と高い相関を示したことから、ならびに両代謝活性が quinidine により大き

く低下したことより、ヒト肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応には、CYP2D6 が関与していると考えられた。

8) ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームを用いた代謝実験より、C-2 および F-2 の生成には CYP2D6 が関与し、C-4 の生成には CYP2B6 が関与していることが示された。

9) ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームを用いた代謝実験より、cinnarizine および flunarizine の脱アルキル化反応は、複数の分子種により触媒されることが分かった。

以上述べた結果から、ヒトにおける cinnarizine および flunarizine の代謝においては、特に低基質濃度領域で CYP2D6 が触媒するシンナミル基の芳香環 4 位の水酸化が主要な反応であることがわかった。また、その代謝パターンは、Wistar 系雄ラットよりも雌ラットに類似していたことより、cinnarizine および flunarizine による parkinsonism 発現の機構を検討するに当たっては、雄ラットよりも雌ラットを使用する方が適当であると考えられた。

実験の部

1. 実験動物

8週令の雌雄の Wistar 系ラットおよび DA 系雌ラットは日本 SLC (株)より購入した。

2. 試薬

Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の入手については、第 1 章の実験の部に記した。

Debrisoquine hemisulfate および 4-hydroxydebrisoquine hemisulfate は日本ロッシュ(株)より供与された。

10 種類のヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾーム(CYP1A1, -1A2, -2A6, -2B6, -2C8, -2C9, -2C19, -2D6, -2E1, -3A4) およびベクターのみを含むコントロールミクロゾームは、Gentest 社より購入した。

Glucose-6-phosphate (G-6-P)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) および NADP⁺はオリエントアル酵母(株)より購入した。

SKF 525-A は Research Biochemicals Inc.、metoprolol tartrate および quinidine hydrochloride は Sigma 社、sparteine sulfate および 11-ketoprogesterone は和光純薬工業(株)よりそれぞれ購入した。

その他の試薬は、市販の高速液体クロマトグラフ用または特級試薬を使用した。

3. 実験機器

第 1 章の実験の部に記した。

4. 肝ミクロゾームの調製

ラット肝ミクロゾームの調製については、第 1 章の実験の部に記した。

ヒトの肝ミクロゾームは、10 人の日本人男性 (2-72 歳、平均 45.4 歳) の剖検サンプルから調製した [58]。

5. Cytochrome P450 含量の測定

Omura と Sato の方法 [33] に従い、還元型一酸化炭素結合差スペクトルから求めた。

6. ラット肝ミクロゾームでの F-3 の代謝

Wistar 系雄ラットの肝ミクロゾームを使用し、次の 3 種の反応混液を調製した。1)ミクロゾームタンパク 1 mg を含む 1 ml の 100mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 2) 1)に 5mM の NADPH を含む反応混液 3) 1)に 10 mM G-6-P、2 units G-6-PDH、4 mM MgCl₂ および 0.5mM NADP⁺を含む反応混液。反応混液を 37 °C にて 5 分間プレインキュベート後、F-3 のメタノール溶液 10 µl を添加し (最終濃度 10 µM) 反応を開始させた。インキュベーションは 37 °C にて 5 分間行い、1M 炭酸緩衝液 (pH10) 0.5ml を加え反応を停止した。生成した F-5 を第 1 章に記した方法で定量し、代謝活性を測定した。

7. ラットおよびヒト肝ミクロゾームでの cinnarizine および flunarizine 代謝活性の測定

0.5-320 µM の cinnarizine あるいは flunarizine、10 mM G-6-P、2 units G-6-PDH、4 mM MgCl₂ および 1 mg のミクロゾームタンパクを含む 1 ml の 100mM リン酸緩衝液 pH7.4 の反応混液を調製した。37 °C にて 5 分間プレインキュベート後、NADP⁺ を添加し (最終濃度 0.5 mM) 反応を開始させた。インキュベーションは 37 °C にて 5 分間行い、1M 炭酸緩衝液 (pH10) 0.5ml を加え反応を停止した。生成した代謝物を第 1 章に記した方法で定量し、代謝活性を測定した。

8. 代謝阻害実験

阻害剤は、最終濃度が SKF 525-A および sparteine では 50 または 200 µM、metoprolol で 50、100 または 200 µM、quinidine では 5 µM となるようにミクロゾームを含む反応混液に添加した。

9. ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームでの cinnarizine および flunarizine 代謝活性の測定

50 μ M の cinnarizine または flunarizine、5 μ mol G-6-P、1 unit G-6-PDH、250 pmol NADP⁺ および 2 μ mol MgCl₂ を含む 0.45 ml の 100mM リン酸緩衝液 pH7.4 (CYP2A6 と CYP2C9 の場合は 100 mM Tris-HCl 緩衝液を使用) の混液を調製した。混液を 37 $^{\circ}$ C にて 3 分間のプレインキュベートした後、0.05 ml のヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾーム (0.5 mg protein, 4-107 pmol P450) を添加して反応を開始させた。インキュベーションは 37 $^{\circ}$ C にて 5 分間行い、1M 炭酸緩衝液 (pH10) 0.25ml を加え反応を停止した。次いで、内部標準として cinnarizine の場合は 20 μ M 4-hydroxyflunarizine (F-2) メタノール溶液 10 μ l、flunarizine の場合は 100 μ g/ml 11-ketoprogesterone メタノール溶液 10 μ l を加えた。n-ヘキサン:アセトン (9 : 1, v/v) 3 ml を加えボルテックスミキサーで 1 分間混合した後、1600 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、有機層を分取した。ロータリーエバポレーターで有機層を減圧留去後、残渣を 100 μ l の移動相に溶解し、HPLC に付した。HPLC の条件はラットおよびヒト肝ミクロゾームの場合と同様である。

10. Debrisoquine 4 位水酸化活性の測定 [59]

50 μ M の debrisoquine、10 mM G-6-P、1 unit G-6-PDH、10 mM MgCl₂ および 0.5 mg のミクロゾームタンパクを含む 0.5 ml の 154mM リン酸緩衝液 pH7.4 を反応混液とした。37 $^{\circ}$ C にて 5 分間プレインキュベート後、NADPH を添加し (最終濃度 0.5 mM) 反応を開始させた。インキュベーションは 37 $^{\circ}$ C にて 5 分間行い、12N 水酸化ナトリウム 0.5ml を加え反応を停止した。生成物を酢酸エチルにて抽出後、内部標準物質として glycinoxylidide を添加し、0.01 N 硫酸によって水相へ逆抽出した。酢酸エチルを除去したのち、0.01 N 水酸化ナトリウムで中和し、蒸発乾固後、蒸留水に溶かし HPLC に付した。HPLC による定量は、カラムに Inertsil ODS を用い、カラム温度 40 $^{\circ}$ C で行った。移動相にアセトニトリル : 0.1M リン酸緩衝液 pH3.0 (15:85, v/v) を用い、流速は 1.0 ml/min とした。UV による検出は 210 nm で行った。

11. CYP2D6 含量の測定

CYP2D6 含量は、抗ラット P450 UT-H (CYP2D1)抗体を用いたイムノブロットにより測定した [60]。ラット肝ミクロゾーム中の 5 pmol の P450 の染色強度を 1 unit とした。

12. 非線形最小二乗法による速度論的パラメータの算出

代謝の速度論的パラメータ (K_m , V_{max}) は、山岡ら [61] の非線形最小二乗法プログラム “Multi”を用いた、Simplex 法で求めた。

第3章 Cinnarizine および flunarizine の行動薬理学的作用の比較

Parkinsonism の症状は、錐体外路系の障害（ドーパミン活性の低下）に基づく運動量および運動協調性の低下を特徴とする [9]。臨床において、flunarizine の投与量は cinnarizine の 1/10 から 1/20（モル換算）にもかかわらず、flunarizine 服用患者における parkinsonism の発現頻度は、cinnarizine 服用患者におけるよりも高い。

実験動物における両薬物の運動障害作用を比較した研究としては、宮崎ら [62] がマウス、ラットおよびイヌを用いた高投与量（数百～数千 mg/kg）での毒性試験のなかで、一般症状として自発運動の減少が見られ、その作用は flunarizine の方が強いことを報告している。両薬物の運動量および運動協調性に及ぼす作用を直接比較した研究としては、山田ら [63] が、マウスを用い、回転籠法、アニメックス法、回転棒法、懸垂法および斜面法により、flunarizine の方が運動量および運動協調性の低下作用が強いことを示している。マウスにおける cinnarizine および flunarizine の体内動態に関する知見はなく、両薬物の運動量と運動協調性に及ぼす作用の差が、体内動態的要因によるものか、薬理学的活性の違いによるものかは推定できない。

本章では、ヒトと代謝のパターンが類似していた Wistar 系雌ラットを用い、cinnarizine または flunarizine 連続投与時の両薬物の錐体外路系の運動調節機構に及ぼす作用を比較した。

さらに、cinnarizine および flunarizine は、フェニルアルキルアミン構造を有し、抗精神病薬と構造上の類似性が高いことより、抗精神病薬と同様に線条体のドーパミンレセプターを遮断して parkinsonism を惹起する可能性が考えられる。そこで、ドーパミンレセプターの選択的なアゴニストである apomorphine [64] を用い、ドーパミンレセプターに対する cinnarizine および flunarizine の遮断効果を *in vivo* で比較した。

第1節 Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の行動薬理学的作用

ヒトと代謝のパターンが類似していた Wistar 系雌ラットを用い、cinnarizine または flunarizine 連続投与時の両薬物の運動量と運動協調性に及ぼす作用を比較した。薬理作用としては、カタレプシー惹起作用、運動協調性に対する作用および行動活性をそれぞれ high bar test 法、回転棒法 (rotarod 法) およびオープンフィールド法で測定した。

カタレプシーとは、動物が持続的に異常な姿勢を一定時間とり続けることを指し、これを測定するには、水平に渡した棒にマウスやラットの前肢をかけさせるなどして、このような無理な姿勢を 30 秒以上保持する場合をカタレプシー陽性と判断する (high bar test 法) [65]。なお、抗精神病薬のカタレプシー惹起作用は parkinsonism 誘発効果と相関関係を示すことが知られている [66, 67]。

回転棒法は、parkinsonism など錐体外路作用や筋弛緩作用などの評価に用いられる [68, 69]。水平に支えられた回転棒上に動物を回転と逆向きに置くと、正常動物は一定時間回転にあわせて歩行することができるが、運動協調性の障害があれば容易に落下するようになる。

オープンフィールド法は、マウスやラットの探索行動やその他の常動行動の変化を観察する方法である [65]。装置は、直径 60 cm の底面を 19 区画に区切ったバケツ状のものであり、一定時間内に区画を横切った数 (ambulation) と立ち上がり動作 (rearing) を運動量として評価する。

【実験結果・考察】

Wistar 系雌ラットに cinnarizine (20~400 $\mu\text{mol/kg}$) または flunarizine (5~40 $\mu\text{mol/kg}$) を 1 日 1 回 15 日間連続経口投与した。薬物を 1, 5, 10 および 15 回目投与 24 時間後にカタレプシー惹起作用 (Table 15) および運動協調性に対する作用 (Table 16) を測定した。Flunarizine については、10 $\mu\text{mol/kg}$ 以上の投与量でカタレプシーの惹起および運動協調性の低下が認められたが、cinnarizine では、400 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群において 10 日以降に 6 匹中 1 匹にこれらの効果が認められたのみであった。10 日目の結果より算出したカタレプシーの惹起および運動協調性抑制作用における ED_{50} は、flunarizine で 23.5 および

Table 15 Cataleptogenic effects of cinnarizine and flunarizine in female Wistar rats

Treatment	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Incidence of catalepsy			
		1 day	5 day	10 day	15 day
Vehicle	—	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
Cinnarizine	20	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
	100	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
	200	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
	400	0 / 6	0 / 6	1 / 6	1 / 6
Flunarizine	5	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
	10	0 / 6	2 / 6	1 / 6	2 / 6
	20	0 / 6	2 / 6	3 / 6	2 / 6
	40	1 / 6	3 / 6	4 / 6	2 / 6

Table 16 Effects of cinnarizine and flunarizine on rotarod performance in female Wistar rats

Treatment	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Time off rod (sec)			
		1 day	5 day	10 day	15 day
Vehicle		120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)
Cinnarizine	20	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)
	100	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)
	200	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)
	400	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	107 $\pm$ 14 (5/6)	104 $\pm$ 16 (5/6)
Flunarizine	5	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)	120 $\pm$ 0 (6/6)
	10	110 $\pm$ 10 (5/6)	88 $\pm$ 20 (4/6)	83 $\pm$ 24 (4/6)	86 $\pm$ 22 (4/6)
	20	120 $\pm$ 0 (6/6)	119 $\pm$ 1 (5/6)	90 $\pm$ 19 (4/6)	103 $\pm$ 17 (5/6)
	40	107 $\pm$ 10 (4/6)	69 $\pm$ 20 (2/6)	51 $\pm$ 23 (2/6)	86 $\pm$ 21 (4/6)

Each value represents the mean $\pm$ S.E.(N=6). Each value in parenthesis represents number of rats achieved 120 seconds rod time / number of rats tested.

25.0 $\mu\text{mol/kg}$ であったが、cinnarizine では 400 $\mu\text{mol/kg}$ 以上であった (Table 17)。

さらに、薬物を 15 回目投与 24 時間後にオープンフィールド法により行動活性を観察した (Table 18)。Flunarizine は 10 $\mu\text{mol/kg}$ 以上の投与量で運動量 (ambulation) を有意に抑制したが、cinnarizine では、いずれの用量においても抑制効果は認められなかった。

以上の結果より、flunarizine は cinnarizine に比べ Wistar 系雌ラットにおけるカタレプシー惹起作用、運動協調性抑制作用および行動活性抑制作用が強く、ヒトにおいて parkinsonism を引き起こす可能性が高いことが示された。

Table 17 ED50 value for cinnarizine and flunarizine on catalepsy and rotarod performance

Treatment	ED50 ($\mu\text{mol/kg}$)	
	catalepsy	rotarod
Cinnarizine	400 <	400 <
Flunarizine	23.5	25.0

Table 18 Effects of cinnarizine and flunarizine on ambulation and rearing of Wistar female rats in open-field test

Treatment	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	ambulation		rearing
Vehicle		53.5 $\pm$ 4.6		10.0 $\pm$ 1.5
Cinnarizine	20	57.8 $\pm$ 8.3		11.8 $\pm$ 2.8
	100	51.0 $\pm$ 9.9		13.3 $\pm$ 3.3
	200	61.5 $\pm$ 7.4		12.3 $\pm$ 1.7
	400	43.8 $\pm$ 9.8		6.8 $\pm$ 2.3
Flunarizine	5	44.8 $\pm$ 3.8		10.7 $\pm$ 1.5
	10	20.8 $\pm$ 3.3	**	6.0 $\pm$ 1.5
	20	31.0 $\pm$ 3.8	**	6.8 $\pm$ 1.6
	40	36.7 $\pm$ 5.7	*	6.8 $\pm$ 1.3

Each value represents the mean $\pm$ S.E. (N=6). Significant difference from vehicle group was determined with Mann-Whitney U-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

第2節 Apomorphine により誘発される常同行動の抑制効果

抗精神病薬により、parkinsonism が惹起されることは古くから知られており、その発症機序は、抗精神病薬が黒質線条体系のドーパミンレセプターを遮断するためと考えられている [10-13]。Flunarizine および cinnarizine は、ピペラジン環をもつフェニルアルキルアミン構造を有し、抗精神病薬と構造上の類似性が高いことより、両薬物は抗精神病薬と同様にドーパミンレセプターを遮断して、parkinsonism を引き起こす可能性が考えられる。

ドーパミンレセプターの選択的なアゴニストである apomorphine をラットに投与すると、探索行動の増加、床をさかんに嗅ぐ (sniffing)、ケージをなめる (licking) などの常同行動が発現する。この常同行動は、抗ドーパミン作用が強く、副作用として parkinsonism を引き起こすことが知られている haloperidol や perphenazine などにより顕著に抑制される [65]。本節では、apomorphine による常動行動を通して、in vivo におけるドーパミンレセプターに対する flunarizine および cinnarizine の遮断効果を比較した。

【実験結果】

2-1 Cinnarizine または flunarizine 単回投与時の apomorphine 誘発常同行動の抑制効果

Wistar 系雌ラットに cinnarizine (100, 500 および 2000 $\mu\text{mol/kg}$, p.o.) または flunarizine (25, 50 および 100 $\mu\text{mol/kg}$, p.o.) 投与 2 時間後に apomorphine (2mg/kg, i.p.) を投与し、常同行動を観察し、Costall と Naylor の方法 [70] に従ってスコア化した。

Apomorphine により誘発される常同行動に及ぼす flunarizine および cinnarizine 投与の効果を、それぞれ Fig. 14 および Fig. 15 に示した。溶媒のみを投与した対照群に比べ、cinnarizine 100 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群で apomorphine 投与後 30～35 分、500 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群で 25～30 分、2000 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群で 30～40 分にそれぞれ有意な抑制が観察されたが、明確な投与量依存性は認められなかった (Fig. 14)。一方、25, 50 および 100 $\mu\text{mol/kg}$ の flunarizine 投与により、常同行動は対照群に比べ、いずれの測定時間においても用量依存的に

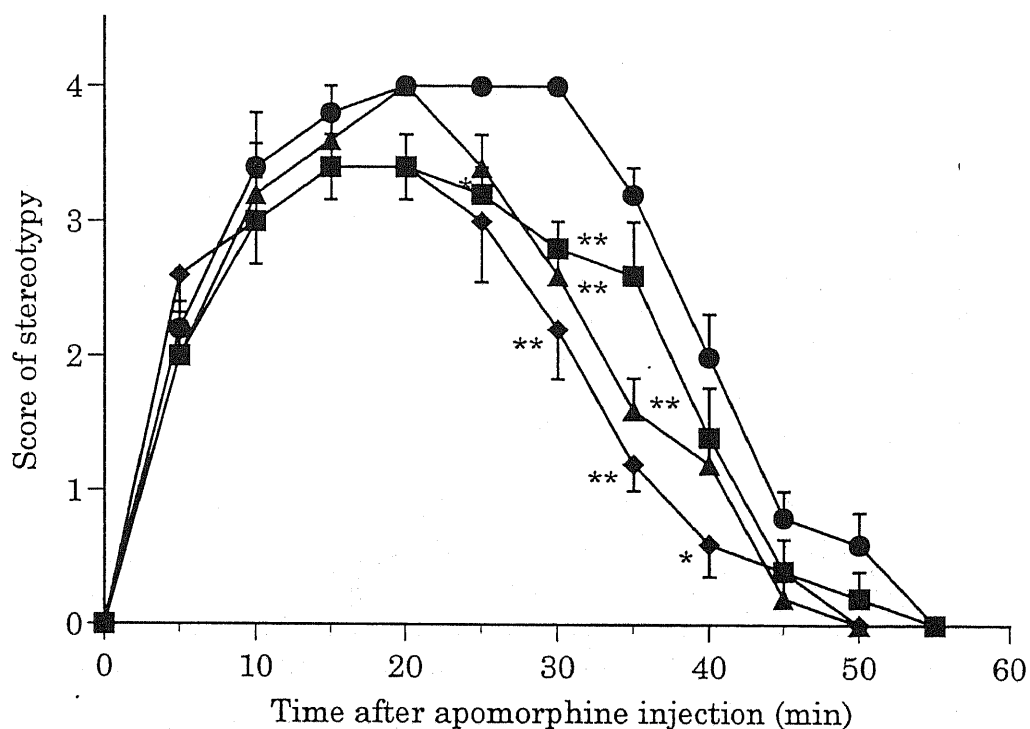


Fig. 14 Time course of the score of stereotypy induced by apomorphine following cinnarizine administration.

Apomorphine at a dose of 2 mg/kg was given intraperitoneally to rats 2 hours after oral administration of 0 (●), 100 (▲), 500 (■) and 2000 (◆) $\mu\text{mol/kg}$ cinnarizine. The intensity of stereotypy was scored by the method of Costall and Naylor [70]. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (N=5). The statistical significance as compared to control (●) was estimated by Mann-Whitney U-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

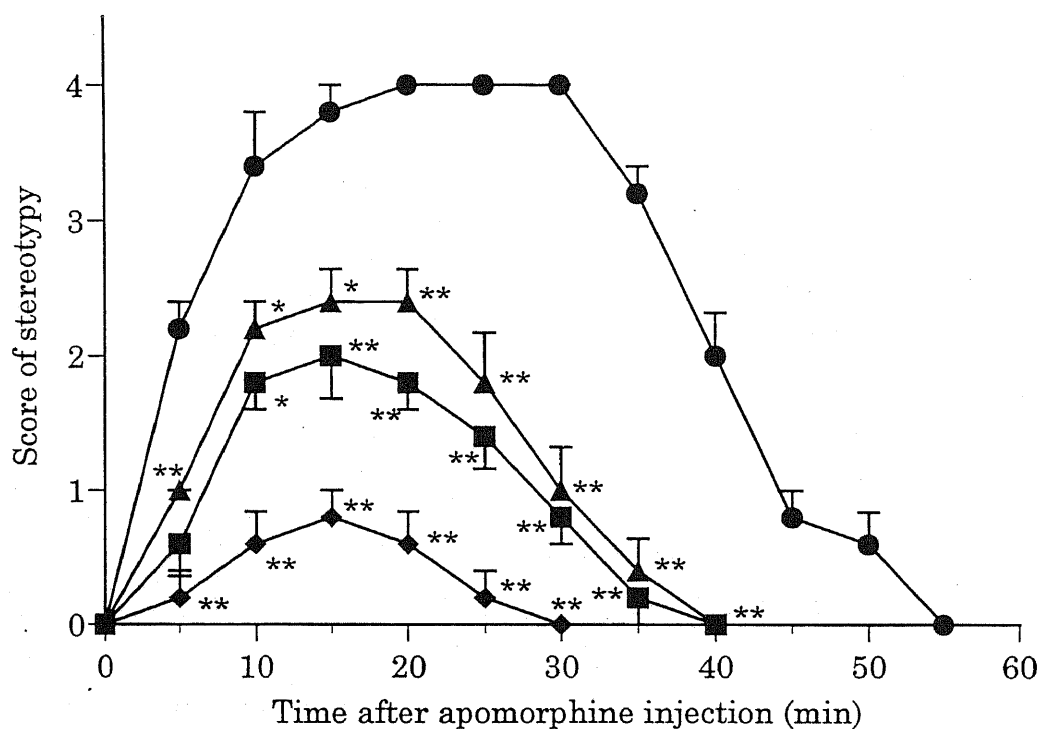


Fig. 15 Time course of the score of stereotypy induced by apomorphine following flunarizine administration.

Apomorphine at a dose of 2 mg/kg was given intraperitoneally to rats 2 hours after oral administration of 0 (●), 25 (▲), 50 (■) and 100 (◆) $\mu\text{mol/kg}$ flunarizine. The intensity of stereotypy was scored by the method of Costall and Naylor [70]. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (N=5). The statistical significance as compared to control (●) was estimated by Mann-Whitney U-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

有意に抑制された (Fig. 15)。

2-2 Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の apomorphine 誘発常同行動の抑制効果

Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine 20 $\mu\text{mol/kg}$ を 1 日 1 回 1, 5, 10 または 15 日間連続経口投与し、各最終投与の 24 時間後に apomorphine (2mg/kg, i.p.) を投与して常同行動を観察した。常同行動のスコアの最大値は、flunarizine 投与では経時的に小さくなったが、cinnarizine 投与では影響がなかった (Fig. 16)。

【考察】

Flunarizine のドーパミンレセプターに対する作用に関しては、マウスの apomorphine 誘発ケージ・クライミング、methamphetamine 投与による運動亢進、片側線条体破壊マウスの apomorphine または methamphetamine 誘発旋回運動をいずれも抑制することが報告されている [71]。また、ラジオレセプターアッセイにより、flunarizine はラット線条体ドーパミンレセプターに結合することが確かめられている [14, 15]。一方、cinnarizine に関しては、cinnarizine の連続投与でラット線条体のドーパミンレセプター量が増加したとする報告 [72] がある一方で、cinnarizine はマウスの amphetamine 投与による運動亢進を抑制せず [73]、cinnarizine のドーパミンレセプターへの関与については、いまだ明らかではない。本節では、ドーパミンレセプターの選択的なアゴニストである apomorphine [64] を用い、ラット in vivo において、ドーパミンレセプターに対する cinnarizine および flunarizine の遮断効果を比較した。

Flunarizine の単回投与 2 時間後において、apomorphine により誘発される常同行動に対する flunarizine の抑制効果は強く、しかも用量依存的であった。一方、cinnarizine の抑制効果は、flunarizine に比べ著しく弱く、cinnarizine 2000 $\mu\text{mol/kg}$ 投与時における抑制効果は、その 1/80 の用量に相当する flunarizine 25 $\mu\text{mol/kg}$ 投与時よりも弱かった。このことより、flunarizine の parkinsonism 惹起作用は、cinnarizine に比べて強いことが示唆された。

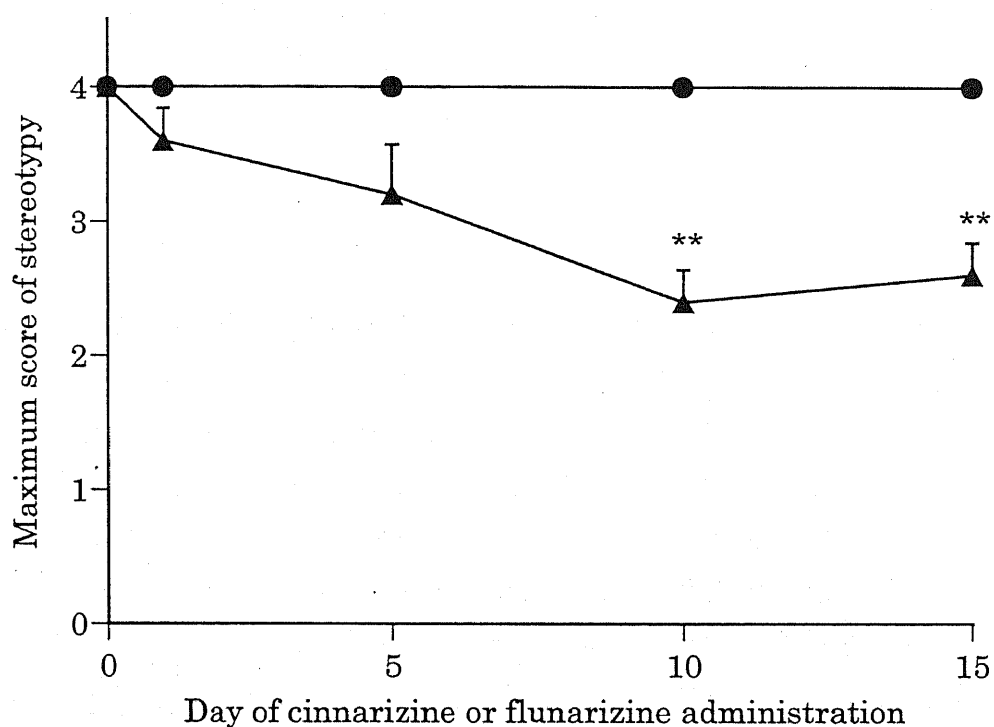


Fig. 16 Time course of maximum score of apomorphine induced stereotypy after repeated oral administration of cinnarizine or flunarizine.

Rats were injected once a day with cinnarizine or flunarizine (20 μ mol/kg). Apomorphine (2mg/kg) was given intraperitoneally to rats 24 hours after oral administration of cinnarizine (●) or flunarizine (▲). Each value represents the mean $\pm$ S.E. (N=5). The statistical significance as compared to control (0 day) was estimated by Mann-Whitney U-test. ** $p < 0.01$.

また、flunarizine を連続投与した場合、投与 24 時間後の apomorphine により誘発される常同行動に対する flunarizine の抑制効果は、投与日数の増加により強くなった。これは、flunarizine の連続投与により、薬物が体内に蓄積することにより、常同行動の抑制効果も強くなったためと考えられた。

Cinnarizine と flunarizine の常同行動抑制効果の差は、両薬物の線条体におけるドーパミンレセプターへの結合親和性の差によるものと考えられるが、線条体中の両薬物濃度の差に起因している可能性もある。また、parkinsonism の発現には、母化合物のみならず、これらの代謝物の関与も考慮に入れなければならない。従って、両薬物の線条体への移行性の違い、線条体中濃度を左右する代謝や吸収率の違い等の体内動態についても詳細に比較検討する必要がある。

小 括

ヒトと代謝のパターンが類似していた Wistar 系雌ラットを用い、cinnarizine または flunarizine の錐体外路系の運動調節機構に及ぼす作用を比較した。さらに、ドーパミンレセプターの選択的なアゴニストである apomorphine を用い、ドーパミンレセプターに対する cinnarizine および flunarizine の遮断効果を *in vivo* で比較し以下の知見を得た。

1) Wistar 系雌ラットにおいて flunarizine は cinnarizine に比べカタレプシー惹起作用、運動協調性抑制作用および行動活性抑制作用が強く、ヒトにおいて parkinsonism を引き起こす可能性が高いことが示された。

2) Cinnarizine および flunarizine は apomorphine により誘発される常同行動を抑制することより、cinnarizine および flunarizine が誘発する parkinsonism は、両薬物によるドーパミンレセプターの遮断によると推定された。また、その遮断作用は、flunarizine が cinnarizine よりも強いと考えられた。

以上、flunarizine は cinnarizine よりもドーパミンレセプターの遮断作用が強く、parkinsonism を引き起こす作用が強いことが Wistar 系雌ラットを用いた *in vivo* 実験で明らかとなった。

実験の部

1. 実験動物

10～13 週令の Wistar 系雌ラット（日本 SLC 株）を用いた。動物は実験期間を通して一定環境下（室温 23～25℃、明期：午前 7 時～午後 7 時）で飼育し、固型飼料（オリエンタル酵母株、MF）および水は自由に摂取させた。

2. 試薬

Flunarizine hydrochloride および apomorphine hydrochloride は Sigma 社より、cinnarizine およびアラビアゴム末は和光純薬工業株より購入した。

その他の試薬は、市販の特級試薬を使用した。

3. 実験機器

回転棒法による運動協調性の測定には、株夏目製作所製 KN-75 型 rotarod（棒の直径 9 cm）を用いた。

4. カタレプシー惹起作用、運動協調性に対する作用および行動活性の測定

1 群 6 匹の Wistar 系雌ラットに cinnarizine (20～400 $\mu\text{mol/kg}$) または flunarizine (5～40 $\mu\text{mol/kg}$) を 1 日 1 回 15 日間連続経口投与した。Cinnarizine および flunarizine は、5 % (w/v) アラビアゴムに懸濁し、5ml/kg の容量でゾンデを用いて強制的に経口投与した。カタレプシー惹起作用および運動協調性に対する作用は、薬物投与 1, 5, 10 および 15 回目の 24 時間後に測定し、行動活性に対する作用は薬物投与 15 回目の 24 時間後に測定した。

1) カタレプシー惹起作用

高さ 12-16 cm で水平に渡した鉄棒（直径 3 mm）にラットの前肢をかけさせ、この姿勢を 30 秒以上保持した場合をカタレプシー陽性とした。

2) 運動協調性に対する作用

Rotarod 装置の棒の回転数を毎分 8 回転とし、ラットをのせ 2 分間まで観察し、落下時間を測定した。試験は 3 回行い、中間値をそのラットの落下時間とした。

3) 行動活性に対する作用

直径 60 cm の底面を 19 区画に区切ったバケツ状の装置にラットを入れ、

3 分間の間に区画を横切った回数 (ambulation) と立ち上がり動作 (rearing) を行った回数を測定した。

5. Apomorphine により誘発される常同行動の抑制効果

Cinnarizine および flunarizine は、5 % (w/v) アラビアゴムに懸濁し、5ml/kg の容量でゾンデを用いて強制的に経口投与した。Apomorphine は生理食塩水に溶解し、5ml/kg の容量で腹腔内に投与した。

Cinnarizine または flunarizine 単回投与時の常同行動抑制効果は、ラットに cinnarizine (100, 500 および 2000 $\mu\text{mol/kg}$) または flunarizine (25, 50 および 100 $\mu\text{mol/kg}$) 投与 2 時間後に apomorphine (2mg/kg) を投与し、常同行動を観察した。

Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の常同行動抑制効果は、1 群 5 匹の Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine 20 $\mu\text{mol/kg}$ を 1 日 1 回 1, 5, 10 または 15 日間連続投与し、各最終投与の 24 時間後に apomorphine (2mg/kg) を投与して常同行動を観察した。

常同行動の観察は、ラットを木くずを敷いた透明なプラスチックケージ (縦 25×横 50×高さ 20 cm) に入れ、60 分間にわたって、5 分ごとに 90 秒間行った。常同行動は、Costall と Naylor の方法 [70] に従って次のようにスコア化した。0 : 生理食塩水投与ラットと同様の行動、1 : 断続的 sniffing (臭いかぎ運動) あるいは持続的探索行動、2 : 持続的 sniffing および断続的探索行動、3 : 持続的 sniffing、断続的 licking (なめる行動)、断続的 gnawing (かじる行動) および断続的 biting (噛む行動) が認められ、探索行動は短期間しか認められない。4 : 持続的 licking、持続的 gnawing および持続的 biting が認められ、探索行動は認められない。

第4章 Cinnarizine およ flunarizine とそれらの代謝物のドーパミンレセプターおよびムスカリン性アセチルコリンレセプターへの結合

Parkinsonism は、黒質線条体系においてドーパミン作働性ニューロンの活性が低下し、相対的にコリン作働性ニューロンの活性が優位になった時に発現する [8, 9]。薬物が副作用として引き起こす parkinsonism としては、抗精神病薬の例が良く知られている [10, 11]。抗精神病薬は、線条体のドーパミン D2 レセプター (D2-R) を遮断することにより、ドーパミン作働性ニューロンの活性を低下させ parkinsonism を引き起こす。また抗精神病薬は同時にムスカリン性アセチルコリンレセプター (mACh-R) の遮断作用も有しており、この抗コリン作用が強いものほど parkinsonism の発現頻度が低いことが知られている [74, 75]。すなわち、抗精神病薬が合せ持つ D2-R 遮断作用と mACh-R 遮断作用の相対的な強さの違いにより、抗精神病薬の parkinsonism 惹起力が決定される [11, 13, 74]。このような考えに基づき、cinnarizine および flunarizine による parkinsonism 発現の機構を調べる目的で、両薬物とそれらの代謝物のラット線条体の D2-R および mACh-R への結合性について比較検討した。

第1節 ラット線条体ドーパミン D2 レセプター (D2-R) への結合

遺伝子工学の進歩に伴い、現在までドーパミンレセプターは5種類のサブタイプ (D1, D2, D3, D4, D5) がクローニングされている [76-80] が、構造上の特徴と薬理学的リガンド要求性から D1 群 (D1, D5) と D2 群 (D2, D3, D4) の2つに分類されている [81, 82]。D1-R は主に線条体、側坐核、嗅結節に、D5-R は海馬と視床下部に存在し、いずれもアゴニストの刺激によりアデニル酸シクラーゼ活性を促進する。D2-R は線条体、側坐核、嗅結節に局在し、アゴニストの刺激によりアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する。D3-R は側坐核、カレハ小島、嗅結節などに分布し、D4-R は大脳皮質前頭葉などに分布しているが、両レセプターの関連している細胞内伝達機構については未だ明らかでない。

ドーパミンによる行動薬理的な調節は、D1 レセプターサブファミリーと D2 レセプターサブファミリーの協調作用により行われる [83, 84] が、抗精神病薬が引き起こす parkinsonism は、線条体の D2-R の遮断によるものと考えられている [13, 85]。

Flunarizine については、すでにラジオレセプターアッセイにより、flunarizine はラット線条体 D2-R に結合し、D1-R には結合しないことが確かめられている [14, 15]。一方、cinnarizine や両薬物の代謝物のドーパミンレセプターの結合性については未だ明らかではない。

本節では、D2-R に高い親和性を有する [^3H]YM-09151-2 [86] をリガンドとして用いたラジオレセプターアッセイにより、cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物のラット線条体 D2-R への結合性を比較検討した。なお [^3H]YM-09151-2 は、D4-R に対しても高い親和性を有する [78, 85] が、D4-R が線条体にほとんど分布しないこと [78, 82] と、D2-R のみに対して選択的なリガンドが手に入らなかったためこのリガンドを用いた。

【実験結果・考察】

[^3H]YM-09151-2 の D2-R への結合に対する、cinnarizine とその代謝物の阻害効果を代表的な抗精神病薬 (haloperidol, chlorpromazine および thioridazine) の結果とともに Fig. 17 に示した。Flunarizine とその代謝物についても同様な阻害曲線を求め、Fig. 18 に示した。Cinnarizine および

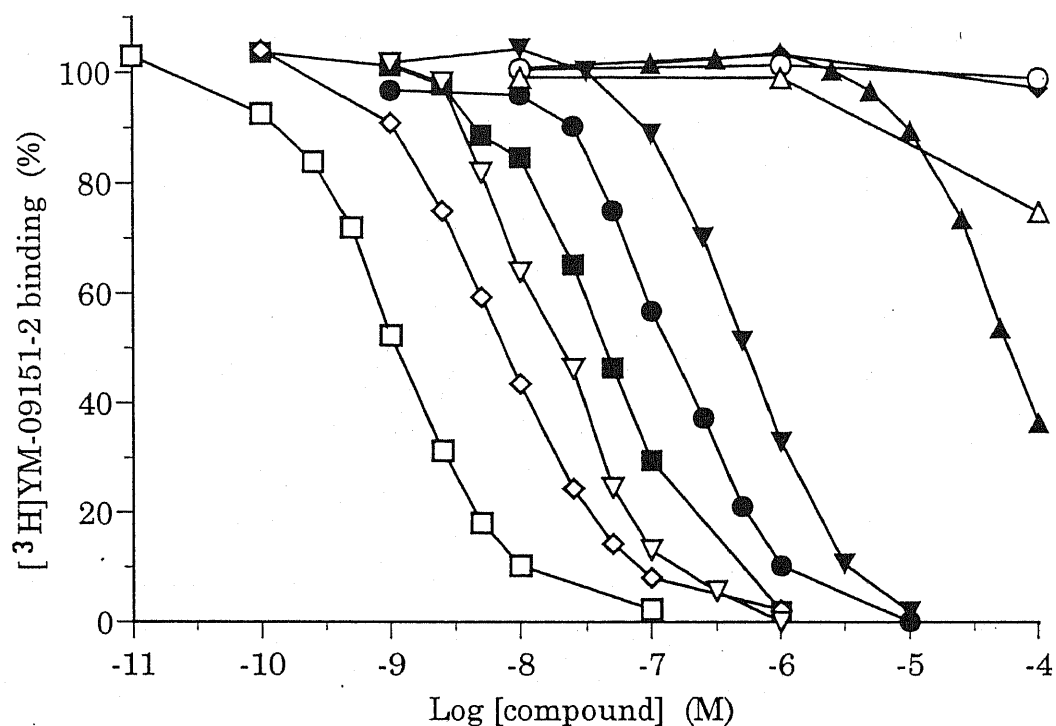


Fig. 17 Competition curves for the inhibition of $[^3\text{H}]$ YM-09151-2 binding by cinnarizine, its metabolites and typical neuroleptics in rat striatal membranes.

The membranes (0.1mg/ml) were incubated with 0.1nM $[^3\text{H}]$ YM-09151-2 and varying concentration of compounds for 20 min at 37°C. Control binding was measured in the absence of compounds. Data points are the means of three independent experiments, each performed in duplicate. ●, Cinnarizine ; ▲, C-1 ; ■, C-2 ; ◆, C-3 ; ▼, C-4 ; ○, C-5 ; △, CNP ; □, haloperidol ; ◇, chlorpromazine ; ▽, thioridazine.

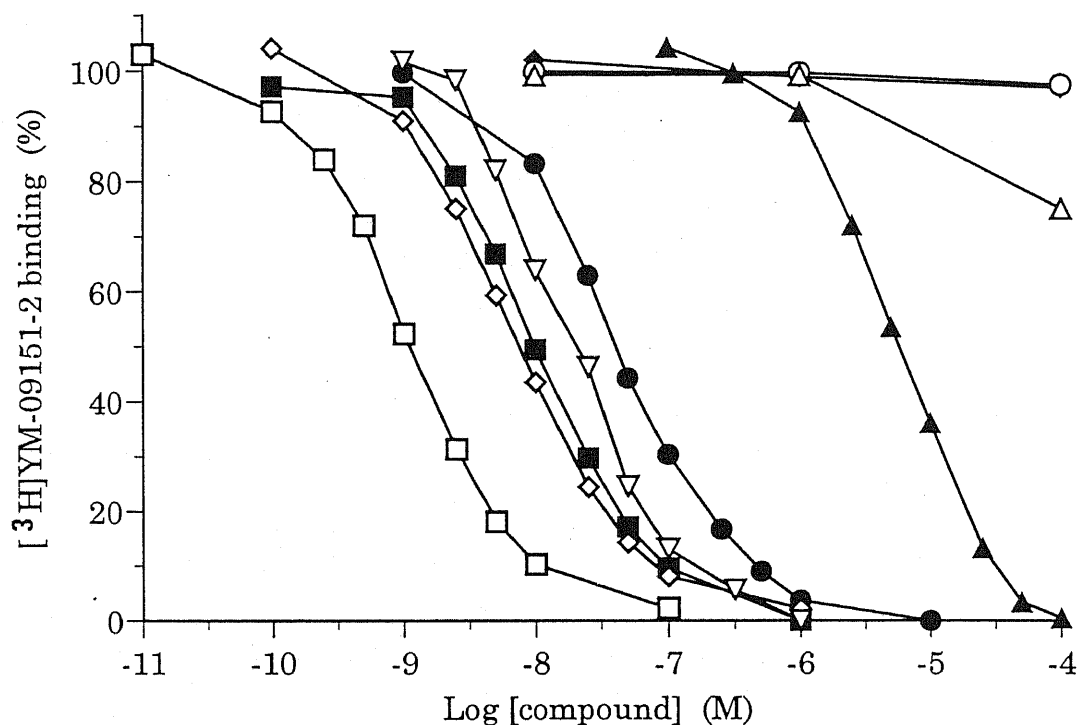


Fig. 18 Competition curves for the inhibition of $[^3\text{H}]$ YM-09151-2 binding by flunarizine, its metabolites and typical neuroleptics in rat striatal membranes.

The membranes (0.1mg/ml) were incubated with 0.1nM $[^3\text{H}]$ YM-09151-2 and varying concentration of compounds for 20 min at 37°C. Control binding was measured in the absence of compounds. Data points are the means of three independent experiments, each performed in duplicate. ●, Flunarizine ; ▲, F-1 ; ■, F-2 ; ◆, F-3 ; ○, F-5 ; △, CNP ; □, haloperidol ; ◇, chlorpromazine ; ▽, thioridazine.

flunarizine の代謝物としては、第 2 章の代謝研究で使用した代謝物 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, F-1, F-2, F-3, F-5) の他に、C-3 あるいは F-3 が生成する脱アルキル化反応におけるもう一方の生成物である cinnamylpiperazine (CNP) についても検討した。得られた阻害曲線の Hill plot より IC_{50} を求め、さらに Cheng と Prusoff の方法 [87] で K_i 値を算出した (Table 19)。

Hill 係数は、いずれも約 1 であった。 K_i 値は cinnarizine の 13.2 nM に対し flunarizine は 3.96nM であり、cinnarizine に比べ flunarizine の方が D2-R に対し 3.3 倍高い親和性を示した。またシンナミル基のベンゼン環 4 位の水酸化体である C-2 および F-2 の K_i 値はそれぞれ 3.87 および 0.908 nM であり、ともに母化合物よりもそれぞれ 3.4 倍および 4.4 倍高い親和性を示した。これらの K_i 値は抗精神病薬 thioridazine の 1.75 nM に匹敵する値であった。一方、cinnarizine のジフェニルメチル基の芳香環の水酸化体 C-4 の D2-R に対する親和性は cinnarizine の約 1/4 であった。脱アルキル化体 (C-1, C-3, C-5, F-1, F-3, F-5, CNP) については、親和性が母化合物よりも著しく低いか、または全く作用しなかった。D2-R に対する親和性は、 $F-2 > C-2 > flunarizine > cinnarizine > C-4 > F-1 > C-1$ の順に高かった。

以上の結果より、flunarizine は cinnarizine に比べ D2-R 遮断作用が強く、flunarizine は cinnarizine に比べ parkinsonism 惹起作用が強いと考えられた。また、シンナミル基のベンゼン環 4 位の水酸化体 (C-2, F-2) の D2-R に対する親和性はそれぞれの母化合物よりも高かったことより、parkinsonism の発現には代謝物も関与している可能性が考えられた。

Table 19 Competition by cinnarizine, flunarizine, their metabolites and typical neuroleptics for [³H]YM-09151-2 binding in rat striatal membranes

Compound	Ki (nM)	n _H
Cinnarizine	13.2 ± 0.4	1.16 ± 0.03
C-1	5261 ± 151	1.19 ± 0.06
C-2	3.87 ± 0.03	1.02 ± 0.01
C-3	> 8760	N.D.
C-4	46.0 ± 3.3	1.18 ± 0.09
C-5	> 8760	N.D.
Flunarizine	3.96 ± 0.08	1.01 ± 0.02
F-1	517 ± 22	1.36 ± 0.05
F-2	0.908 ± 0.06	1.00 ± 0.02
F-3	> 8760	N.D.
F-5	> 8760	N.D.
CNP	> 8760	N.D.
Thioridazine	1.75 ± 0.13	1.08 ± 0.02
Chlorpromazine	0.675 ± 0.088	0.96 ± 0.04
Haloperidol	0.125 ± 0.029	0.98 ± 0.02

Each value represents the mean ± S.E. of three independent experiments conducted in duplicate. Hill coefficients were obtained from the competition curves by Hill plot. The inhibition constants (Ki) were calculated from IC₅₀ values by the method of Cheng and Prusoff [87]. N.D., not determined.

第2節 ラット線条体ムスカリン性アセチルコリンレセプター (mACh-R) への結合

ドーパミンレセプターと同様に、mACh-R についても現在まで5種類のサブタイプ (M1, M2, M3, M4, M5) がクローニングされている [88-90]。線条体における M1 から M5 の存在割合は、それぞれ 35、12、6、45 および 0.8% と報告されている [91]。しかし、どのサブタイプが抗精神病薬による parkinsonism の発現と関係しているかは不明である [92]。一方、mACh-R の非選択的なリガンドである [³H]quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB) の線条体 mACh-R への結合を阻害する作用が強い抗精神病薬ほど parkinsonism の発現率が低いことが示されている [74, 75]。Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の mACh-R への結合性に関する知見がないことから、本節では [³H]QNB をリガンドとして用いたラジオレセプターアッセイにより、cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物のラット線条体 mACh-R への結合性を比較検討した。

【実験結果・考察】

[³H]QNB の mACh-R への結合に対する cinnarizine とその代謝物の阻害効果を代表的な抗精神病薬 (haloperidol, chlorpromazine および thioridazine) の結果とともに Fig. 19 に示した。Flunarizine とその代謝物についても同様な阻害曲線を作成した (Fig. 20)。Table 20 に示すように Hill 係数は、いずれも約 1 であった。Cinnarizine の K_i 値は 493 nM であり、flunarizine の 1287 nM に比べ 2.6 倍高い親和性を示した。C-1, C-2, F-1 および F-2 の親和性は母化合物の 1.6 - 3.7 倍であった。一方、C-4 の親和性は cinnarizine の約 1/2 であり、他の代謝物は mACh-R に対し全く作用しなかった。mACh-R に対する親和性は、C-2 > C-1 > F-2 > cinnarizine > F-1 > C-4 > flunarizine の順に高かった。

以上の結果より、cinnarizine は flunarizine に比べ mACh-R 遮断作用が強く、cinnarizine は flunarizine に比べ parkinsonism 発現の抑制作用がより強いと考えられた。

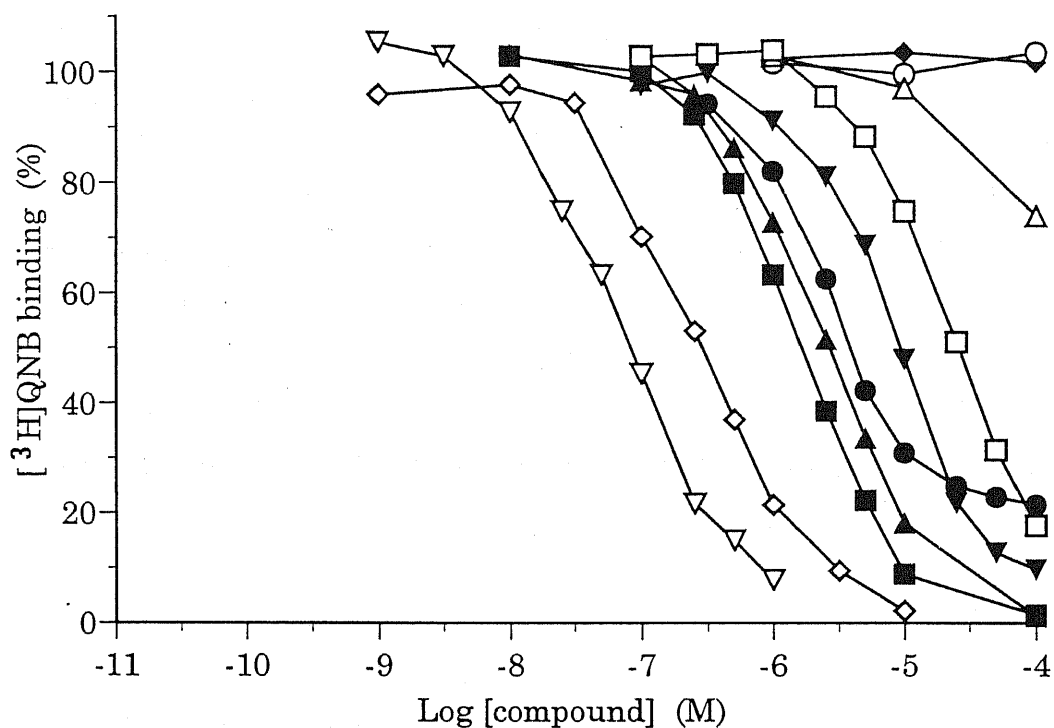


Fig. 19 Competition curves for the inhibition of [^3H]QNB binding by cinnarizine, its metabolites and typical neuroleptics in rat striatal membranes.

The membranes (0.1mg/ml) were incubated with 0.1nM [^3H]QNB and varying concentration of compounds for 20 min at 37°C. Control binding was measured in the absence of compounds. Data points are the means of three independent experiments, each performed in duplicate. ●, Cinnarizine ; ▲, C-1 ; ■, C-2 ; ◆, C-3 ; ▼, C-4 ; ○, C-5 ; △, CNP ; □, haloperidol ; ◇, chlorpromazine ; ▽, thioridazine.

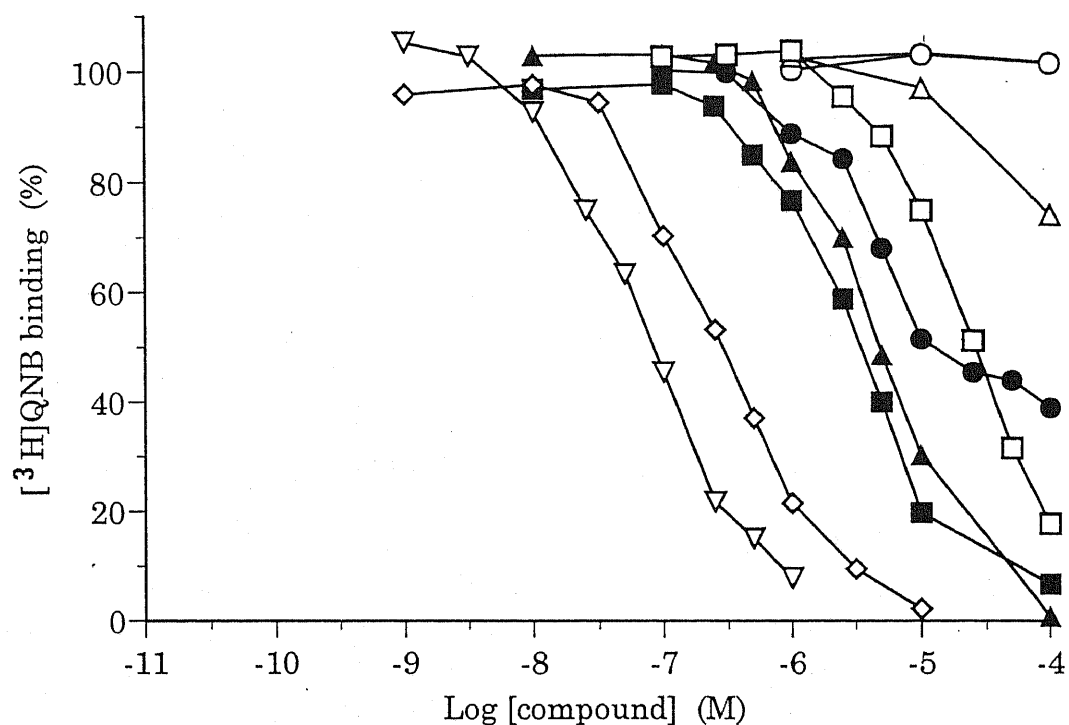


Fig. 20 Competition curves for the inhibition of [³H]QNB binding by flunarizine, its metabolites and typical neuroleptics in rat striatal membranes.

The membranes (0.1mg/ml) were incubated with 0.1nM [³H]QNB and varying concentration of compounds for 20 min at 37°C. Control binding was measured in the absence of compounds. Data points are the means of three independent experiments, each performed in duplicate. ●, Flunarizine ; ▲, F-1 ; ■, F-2 ; ◆, F-3 ; ○, F-5 ; △, CNP ; □, haloperidol ; ◇, chlorpromazine ; ▽, thioridazine.

Table 20 Competition by cinnarizine, flunarizine, their metabolites and typical neuroleptics for [^3H]QNB binding in rat striatal membranes

Compound	Ki (nM)	n _H
Cinnarizine	439 ± 31	0.97 ± 0.09
C-1	316 ± 22	1.08 ± 0.05
C-2	205 ± 16	1.12 ± 0.06
C-3	> 11738	N.D.
C-4	1131 ± 103	1.08 ± 0.08
C-5	> 11738	N.D.
Flunarizine	1287 ± 66	0.94 ± 0.08
F-1	563 ± 19	1.18 ± 0.06
F-2	352 ± 11	0.99 ± 0.03
F-3	> 11738	N.D.
F-5	> 11738	N.D.
CNP	> 11738	N.D.
Thioridazine	9.79 ± 0.81	1.02 ± 0.02
Chlorpromazine	34.7 ± 2.3	0.93 ± 0.03
Haloperidol	3158 ± 82	1.24 ± 0.01

Each value represents the mean ± S.E. of three independent experiments conducted in duplicate. Hill coefficients were obtained from the competition curves by Hill plot. The inhibition constants (Ki) were calculated from IC₅₀ values by the method of Cheng and Prusoff [87]. N.D., Not determined.

第3節 Parkinsonism 惹起力の評価

薬物により誘発される parkinsonism は、線条体における D2-R 遮断作用が mACh-R 遮断作用に比べ相対的に強いものほど生じやすいと考えられる [11, 13, 74]。従って、両レセプターの遮断作用の相対的な強さを両レセプターに対する K_i 値の比 (mACh/D2) で表すと、この比の値がより大きく、かつ D2-R に対する親和性が大きい化合物ほど、低い濃度でより選択的に D2-R を阻害し、parkinsonism を惹起しやすいと推定される。

本節では、先に求めた cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の両レセプターに対する K_i 値より mACh/D2 比を計算し、cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の parkinsonism 惹起力を推定した。

[実験結果・考察]

Table 21 に cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の D2-R および mACh-R に対する親和性の比 (mACh/D2) を示した。この比の値がより大きく、かつ D2-R に対する親和性が高い (Table 19) 化合物ほど、低い濃度でより選択的に D2-R を阻害し、parkinsonism を惹起しやすいと考えられる。D2-R に対する親和性の高さと mACh/D2 比の大きさの順は flunarizine と C-2 以外は同じであった。Flunarizine と C-2 については、D2-R に対する K_i 値がそれぞれ 3.96 および 3.87 nM と親和性はほぼ同じであったが、flunarizine の mACh/D2 比の値が C-2 に比べて約 6 倍大きかったことより、parkinsonism の惹起力も flunarizine の方が C-2 よりも大きいと考えられた。これらの指標をもとに、parkinsonism の惹起力を $F-2 > \text{flunarizine} > C-2 > \text{cinnarizine} > C-4 > F-1 > C-1$ の順と推定した。

ラジオレセプターアッセイの結果より、flunarizine は cinnarizine よりも parkinsonism の惹起作用が強いと考えられた。また、parkinsonism の発現には母化合物ばかりでなく、CYP2D6 による酸化生成体であるシンナミル基の芳香環 4 位の水酸化体 (C-2, F-2) も活性代謝物として関与する可能性が示唆された。

Table 21 Estimation of parkinsonism inducement by cinnarizine, flunarizine and their metabolites as a balance of affinities for mACh-R and D2-R

Compound	mACh / D2	Compound	mACh / D2
Cinnarizine	37.3	Flunarizine	325
C-1	0.06	F-1	1.09
C-2	53.0	F-2	388
C-3	N.D.	F-3	N.D.
C-4	24.6	F-5	N.D.
C-5	N.D.	CNP	N.D.
Thioridazine	5.59	Haloperidol	25264
Chlorpromazine	51.4		

mACh/D2 value were calculated by division of the mean K_i values of compounds for mACh-R by those for D2-R. N.D., not determined.

小 括

Cinnarizine および flunarizine による parkinsonism 発現の機構を調べる目的で、両薬物とそれらの代謝物のラット線条体の D2-R および mACh-R への結合性について比較検討し、以下の知見を得た。

1) Flunarizine は cinnarizine に比べて D2-R 遮断作用が強く、また mACh-R 遮断作用が弱かったことより、flunarizine は cinnarizine に比べ parkinsonism の惹起作用がより強いと考えられた。

2) CYP2D6 による酸化成績体である C-2 および F-2 の D2-R に対する親和性は、それぞれの母化合物よりも高く、parkinsonism の発現には代謝物も関与している可能性が考えられた。

3) D2-R と mACh-R に対する親和性の比 (mACh/D2)、および D2-R に対する K_i 値より、parkinsonism の惹起力を $F-2 > flunarizine > C-2 > cinnarizine > C-4 > F-1 > C-1$ の順と推定した。

これらの薬物および代謝物が、臨床での parkinsonism の発現にどの程度寄与しているかを評価するためには、さらにこれらの化合物の生体内濃度を考慮に入れる必要があると考えられた。

実験の部

1. 実験動物

12 週令の Wistar 系雌ラット（日本 SLC 株）を用いた。

2. 試薬

Flunarizine hydrochloride は Sigma 社より、cinnarizine は和光純薬工業(株)より購入した。Cinnamylpiperazine (CNP) はエーザイ(株)より供与された。その他の cinnarizine および flunarizine の代謝物の入手については、第 1 章の実験の部に記した。

[³H]YM-09151-2 (83.9 Ci/mmol)、[³H]QNB (38.8 Ci/mmol) および液体シンチレーター Econofluor-2 は New England Nuclear から購入した。

Haloperidol、chlorpromazine hydrochloride、atropine sulfate および poly-L-lysine hydrobromide (分子量 30,000-50,000) は和光純薬工業(株)より購入した。

Thioridazine hydrochloride は Sigma 社より、(+)-butaclamol は Research Biochemicals Inc. より購入した。

組織溶解剤 Soluene 350 は、パッカード・ジャパンより購入した。

その他の試薬は、市販の特級試薬を使用した。

3. 実験機器

放射能の測定は、Beckman 社の LS-1800 型液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. 線条体粗膜画分の調製

ラットを断頭後すばやく線条体を取り出した。8 から 12 匹分の線条体をプールし、20 倍量の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.4 でホモジナイズした後、4 °C の条件下、12,000 × g で 20 分間遠心した。ペレットを 30 倍容の同緩衝液に懸濁後、再遠心し、得られたペレットを同緩衝液（30 倍容）に再懸濁して、-80 °C で保存した。タンパク濃度の定量は、Lowry らの方法 [34] に従い、標準物質として牛血清アルブミン（Sigma 社製）を用いた。

5. D2-R のラジオレセプターアッセイ

0.1 nM [^3H]YM-09151-2、120 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl_2 、1 mM CaCl_2 および 0.1 mg の線条体粗膜画分タンパクを含む 1 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) の反応混液を調製した。10⁻¹¹-10⁻³M の濃度範囲で薬物または代謝物を添加した後、37°C で 20 分間インキュベートした。レセプターと結合したリガンドと遊離リガンドの分離は、0.1% poly-L-lysine で前処理したワットマン GF/B ガラスフィルターを使用した吸引濾過法で行った。フィルターは、氷冷した 4 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) ですばやく 4 回洗浄した。レセプターに結合したリガンド量は、フィルターに吸着した粗膜画分を 0.8 ml の Soluene-350 で可溶化 (室温、30 分間) 後、10 ml の Econofluor-2 を加え、液体シンチレーションカウンターで測定した。放射能から算出した係数効率、約 50% であった。非特異的結合量は、10 μM の (+)-butaclamol を用いて求めた。

6. mACh-R のラジオレセプターアッセイ

[^3H]QNB をリガンドとし、10⁻¹¹-10⁻³M の濃度範囲で薬物または代謝物を添加し、D2-R のラジオレセプターアッセイと同様にしてレセプター結合量を測定した。なお、非特異的結合量は、10 μM の atropine を用いて求めた。

第5章 Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の体内動態と脳内移行性

前章のラジオレセプターアッセイの結果より、flunarizine は cinnarizine よりも parkinsonism の惹起作用が強いこと、また、parkinsonism の発現には母化合物ばかりでなく、CYP2D6 による酸化成績体であるシンナミル基の芳香環4位の水酸化体 (C-2, F-2) も活性代謝物として関与する可能性が示唆された。しかし、これらの薬物および代謝物が、臨床での parkinsonism 発現にどの程度寄与するかを評価するためには、さらにこれらの化合物の生体内濃度を考慮に入れる必要があると考えられた。

実験動物で、cinnarizine または flunarizine の血中動態を検討した報告としては、Allewijn [93] が Wistar 系雄ラットに cinnarizine 0.63~40mg/kg (1.7~108 $\mu\text{mol/kg}$) を単回経口投与した時の血中濃度を測定している。Flunarizine については、Michiels ら [94] が Wistar 系雄ラットを用い、20 mg/kg (50 $\mu\text{mol/kg}$) 単回、および 20 mg/kg/day 9日間連続経口投与し、また Waki ら [32]は Fischer 系雌ラットに 3 mg/kg (7.5 $\mu\text{mol/kg}$) 静脈内投与し、それぞれ血漿中濃度を報告している。しかし、両薬物の in vivo の体内動態を直接比較した知見はない。一方、血中代謝物に関しては、Meuldermans ら [24] がイヌに flunarizine を投与後の代謝物の血中濃度の推移データを示しているのみである。

本章においては、肝ミクロゾームを用いた代謝実験において、代謝の様相がヒトと類似していた Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine を連続投与し、血漿中および線条体中の未変化体および代謝物濃度を測定して、連続投与時の体内動態を調べた。さらに cinnarizine、flunarizine およびそれらの代謝物の＜線条体中濃度／血漿中濃度＞比を計算し、脳内移行性について比較検討した。

なお C-1 と F-1 については、内因性物質によるブランクピークとの分離・識別が不十分であったため測定しなかった。

【実験結果】

1. Cinnarizine あるいは Flunarizine 連続投与時の未変化体および代謝物の血漿中および線条体中濃度

雌ラットに cinnarizine または flunarizine を 20 $\mu\text{mol/kg/day}$ 、30 日間連続投与した時の未変化体および代謝物の血漿中濃度推移を Fig. 21 に、線条体中濃度推移を Fig. 22 に示した。30 日間連続投与後の血漿中濃度は flunarizine > F-2 > cinnarizine > F-3 > C-2 の順に高く、線条体中濃度は F-2 $\geq$ flunarizine > F-3 $\geq$ cinnarizine > C-2 の順に高かった。血漿中および線条体中の cinnarizine、C-2 および F-2 濃度は、連続投与 10～15 日ではほぼ定常状態に達していると考えられたが、flunarizine は 30 日目においてもなお上昇傾向を示していた。F-3 は連続投与 15 日目までは検出されず 30 日目に初めて検出された。一方、C-3、C-4、C-5 および F-5 は検出されなかった。平均値より算出した血漿中および線条体中の flunarizine 濃度/cinnarizine 濃度比 と F-2 濃度/C-2 濃度比 を Table 22 に示した。血漿中の flunarizine 濃度/cinnarizine 濃度比 は、連続投与 10 日目までは約 2.5 であったが、cinnarizine が定常状態に達していると考えられる 15 日および 30 日では、その比が 3.5 および 6.1 に上昇した。一方、F-2 濃度/C-2 濃度比 は、いずれの投与日数においてもほぼ同じ値であった (Table 22A)。また、線条体中の濃度比も、血漿中の濃度比と同様の傾向を示した (Table 22B)。

2. Cinnarizine あるいは flunarizine 投与量の未変化体および代謝物濃度に及ぼす影響

ところで、実際の臨床でのヒトへの投与量は、cinnarizine は flunarizine の 10～20 倍の高用量である。そこで、Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine を種々の投与量で 10 日間連続投与した。Cinnarizine を 20, 50, 100 $\mu\text{mol/kg/day}$ 、flunarizine を 5, 10, 20 $\mu\text{mol/kg/day}$ それぞれ 10 日間連続投与した時の未変化体および代謝物の血漿中濃度を Fig. 23 に、線条体中濃度を Fig. 24 に示した。いずれの濃度も投与量の増加とともに、ほぼ直線的に上

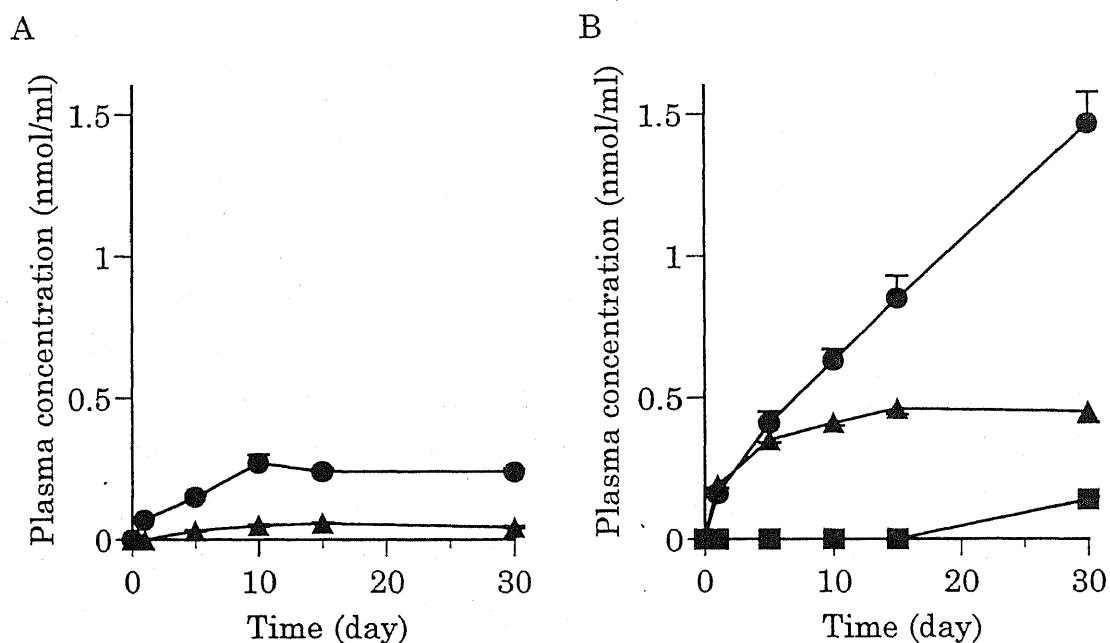


Fig. 21 Time courses of plasma concentrations of cinnarizine, flunarizine and their metabolites after repeated oral administration of cinnarizine or flunarizine in rats.

Female Wistar rats (10-14 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine at a daily dose of 20 $\mu\text{mol/kg}$ for 1, 5, 10, 15 and 30 days. The concentrations of cinnarizine, C-2, flunarizine, F-2 and F-3 were determined 24 hour after the final dose. A) Cinnarizine(●), C-2 (▲) ; B) Flunarizine (●), F-2 (▲), F-3 (■). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of five animals.

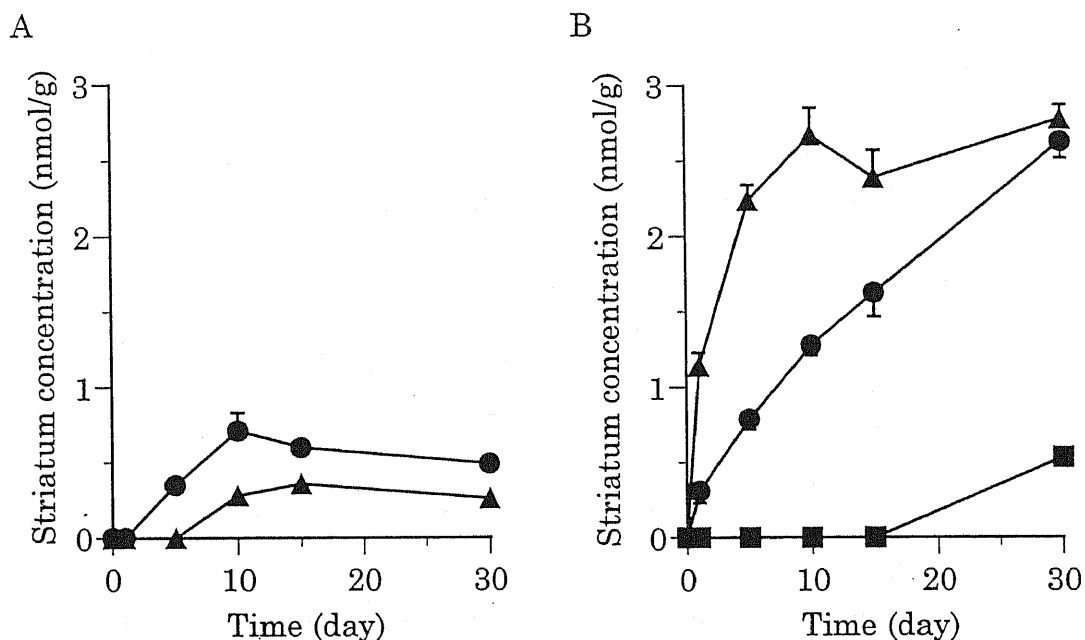


Fig. 22 Time courses of striatum concentrations of cinnarizine, flunarizine and their metabolites after repeated oral administration of cinnarizine or flunarizine in rats.

Female Wistar rats (10-14 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine at a daily dose of 20 $\mu\text{mol/kg}$ for 1, 5, 10, 15 and 30 days.

The concentrations of cinnarizine, C-2, flunarizine, F-2 and F-3 were determined 24 hour after the final dose. A) Cinnarizine (●), C-2 (▲) ; B) Flunarizine (●), F-2 (▲), F-3 (■). Each point represents the mean $\pm$ S.E. of five animals.

Table 22 Ratios of flunarizine to cinnarizine concentration (FZ/CZ) and F-2 to C-2 concentration (F-2/C-2) in (A) plasma and (B) striatum

(A) Plasma

	1 day	5 day	10 day	15 day	30 day
FZ / CZ	2.32	2.73	2.33	3.54	6.13
F-2 / C-2	—	11.3	8.37	8.07	10.2

(B) Striatum

	1 day	5 day	10 day	15 day	30 day
FZ / CZ	—	2.26	1.80	2.71	5.31
F-2 / C-2	—	—	9.54	6.64	10.6

Female Wistar rats (10-14 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine in a daily dose of 20 μ mol/kg for 1, 5, 10, 15, and 30 days. The concentrations of cinnarizine, C-2, flunarizine and F-2 were determined at 24 hour after the final dose. Each value was calculated from the mean concentration of five rats. — : not available.

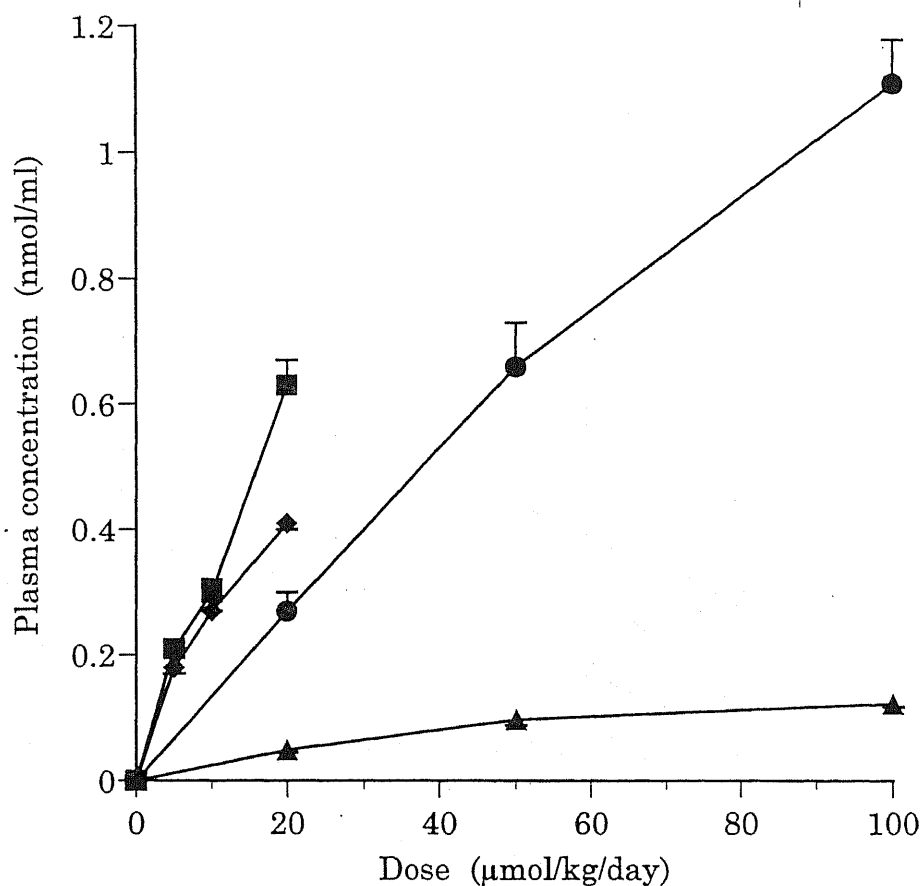


Fig. 23 Plasma concentrations of cinnarizine, flunarizine and their metabolites after repeated oral administration of cinnarizine or flunarizine in rats.

Female Wistar rats (10-12 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine at various doses once a day for 10 days. The concentration of cinnarizine (●), C-2 (▲), flunarizine (■) and F-2 (◆) were determined at 24 hour after the final dose. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of five animals.

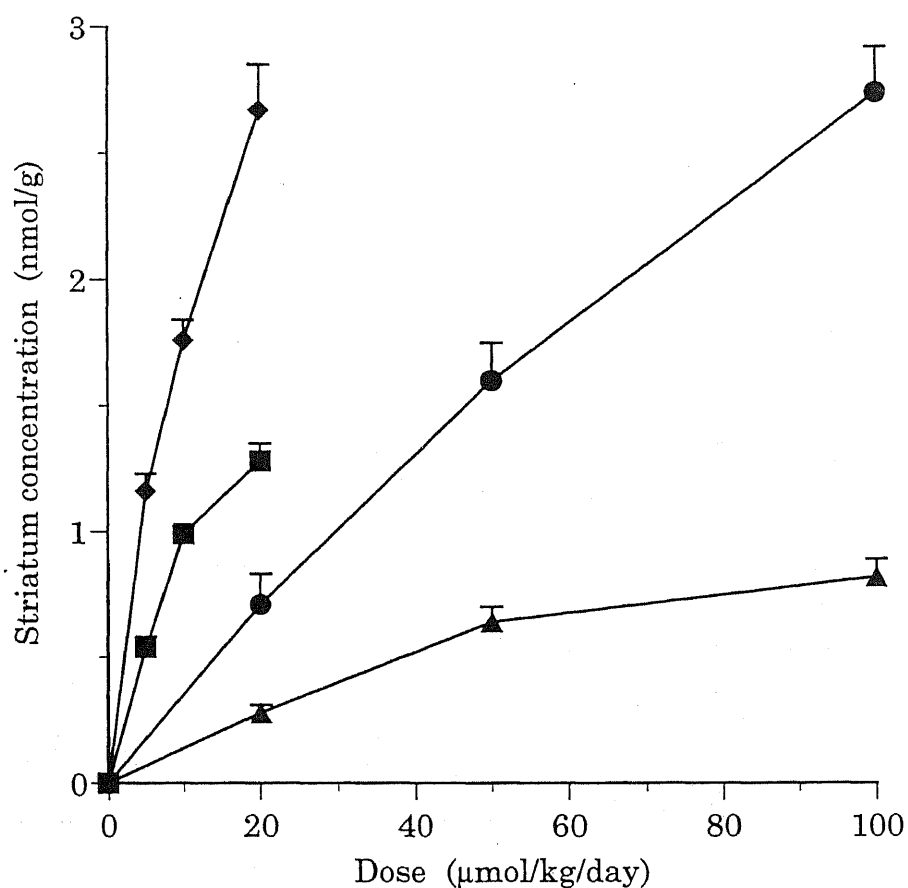


Fig. 24 Striatum concentrations of cinnarizine, flunarizine and their metabolites after repeated oral administration of cinnarizine or flunarizine in rats.

Female Wistar rats (10-12 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine at various doses once a day for 10 days. The concentration of cinnarizine (●), C-2 (▲), flunarizine (■) and F-2 (◆) were determined at 24 hour after the final dose. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of five animals.

昇した。また、平均値より算出した血漿中および線条体中の flunarizine 濃度 / cinnarizine 濃度比 と F-2 濃度 / C-2 濃度比 を Table 23 に示した。flunarizine の 5 または 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の血漿中および線条体 flunarizine 濃度は、それぞれその 10 倍量に相当する cinnarizine の 50 または 100 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の cinnarizine 濃度の約 1/3 であった。また、flunarizine 5 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の flunarizine 濃度は、その 20 倍量に相当する cinnarizine 100 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の cinnarizine 濃度の約 1/5 であった。

3. Wistar 系ラットにおける flunarizine 体内動態の性差

Wistar 系ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験で、cinnarizine および flunarizine の代謝には性差が認められた。そこで、ヒトで parkinsonism の発現率が高い flunarizine をとりあげ、ラットでの *in vivo* における性差について検討した。

雄および雌ラットに flunarizine を 20 $\mu\text{mol/kg/day}$ 、15 日間連続投与した時の、未変化体および代謝物の血漿中ならびに線条体中濃度を Table 24 に示した。雄ラットにおける flunarizine の血漿中および線条体中濃度はいずれも雌ラットの約 1/4 であり、F-2 の濃度はいずれも雌ラットの約 1/5 であった。また、雄ラットでは F-3 が主要代謝物であった。

4. Cinnarizine、flunarizine およびそれら代謝物の脳内移行性

1.~3.の結果より算出した線条体中濃度 / 血漿中濃度比を Table 25 に示した。Cinnarizine および flunarizine の線条体中濃度 / 血漿中濃度比は、それぞれ 2.46 ± 0.09 (mean $\pm$ S.E.; N=30) と 2.25 ± 0.11 (N=40) であり、有意差は認められなかった。C-2 と F-2 については、それぞれ 6.11 ± 0.17 (N=25) と 6.17 ± 0.16 (N=41) であり、有意差はなかった。また、cinnarizine と C-2、flunarizine と F-2 をそれぞれ比較すると、C-2 および F-2 の線条体中濃度 / 血漿中濃度比は、それぞれ cinnarizine および flunarizine より共に約 2.5 倍大きかった (ともに $p < 0.01$)。

Table 23 Ratios of flunarizine to cinnarizine concentration (FZ/CZ) and F-2 to C-2 concentration (F-2/C-2) in (A) plasma and (B) striatum

(A) Plasma

	FZ(5) / CZ(50)	FZ(10) / CZ(100)	FZ(5) / CZ(100)
FZ / CZ	0.32	0.27	0.19
F-2 / C-2	1.80	2.08	1.38

(B) Striatum

	FZ(5) / CZ(50)	FZ(10) / CZ(100)	FZ(5) / CZ(100)
FZ / CZ	0.34	0.36	0.20
F-2 / C-2	1.81	2.15	1.41

Female Wistar rats (10-12 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine at various doses for 10 days. The concentrations of cinnarizine, C-2, flunarizine and F-2 were determined at 24 hour after the final dose. Each value was calculated from the mean concentration of five rats. The value in parenthesis represents dose ($\mu\text{mol/kg/day}$) of cinnarizine or flunarizine.

Table 24 Sex differences in (A)plasma and (B)striatum concentrations of flunarizine and its metabolites in rats

(A) Plasma (nmol/ml)

	Flunarizine	F-2	F-3
Female	0.85 ± 0.08	0.46 ± 0.04	N.D.
Male	0.20 ± 0.02 **	0.09 ± 0.01 **	0.24 ± 0.02 **
Female/Male	4.25	5.11	—

(B) Striatum (nmol/g)

	Flunarizine	F-2	F-3
Female	1.63 ± 0.16	2.39 ± 0.18	N.D.
Male	0.38 ± 0.03 **	0.53 ± 0.05 **	0.88 ± 0.08 **
Female/Male	4.29	4.51	—

Wistar rats of both sexes (10-13 weeks old) were orally given 20 µmol/kg/day flunarizine for 15 days. The concentrations of flunarizine, F-2 and F-3 were determined 24 hour after the final dose. Each value represents the mean ± S.E. of five (female) or six (male) rats. N.D., not detectable. ** Significantly different from mean values of female rats (p<0.01).

Table 25 Ratios of striatum to plasma concentration (S / P) for cinnarizine, flunarizine and their metabolites in rats

Compound	S / P	Compound	S / P
Cinnarizine	2.46 ± 0.09 (30)	Flunarizine	2.25 ± 0.11 (40)
C-2	6.11 ± 0.17 (25) **	F-2	6.17 ± 0.16 (41) **
		F-3	3.97 ± 0.29 (11) **

Wistar rats of both sexes (10-14 weeks old) were orally given cinnarizine or flunarizine at various doses for 1, 5, 10, 15 and 30 days. The concentrations of the compounds were determined at 24 hour after the final dose. Values are expressed as mean ± S.E. Values in parentheses represent the number of rats. ** Significantly different from mean values of corresponding mother compound (p<0.01).

【考察】

代謝のパターンがヒトと類似していた Wistar 系雌ラットに、cinnarizine または flunarizine を $20\text{ }\mu\text{mol/kg/day}$ 、30 日間連続経口投与し血漿中の未変化体および代謝物の濃度を測定した。投与量 $20\text{ }\mu\text{mol/kg/day}$ は、先に行ったカタレプシー惹起試験および rotarod 試験における、flunarizine の ED_{50} （それぞれ 23.5 と $25.0\text{ }\mu\text{mol/kg/day}$ ）に近い量であり、ヒトの臨床用量の cinnarizine は約 $2.5\sim 5$ 倍、flunarizine は約 50 倍に相当する投与量である。Cinnarizine または flunarizine の $20\text{ }\mu\text{mol/kg/day}$ 投与により、血漿中の cinnarizine、C-2 および F-2 は、連続投与 $10\sim 15$ 日ではほぼ定常状態に達していると考えられたが、flunarizine は 30 日目においてもさらに上昇傾向を示していたことより、flunarizine は体内からの消失が遅いと考えられた (Fig. 21)。また、連続投与 30 日後における血漿中の flunarizine 濃度は、cinnarizine 濃度の約 6 倍高かった (Table 22)。薬物の血漿中濃度を決定する要因として、吸収、分布、代謝および排泄がある。ラットに cinnarizine または flunarizine を 20mg/kg （各 54 および $50\text{ }\mu\text{mol/kg}$ に相当）単回経口投与した時の吸収率は、cinnarizine で約 75% [95]、flunarizine で約 80% [94] であり、両薬物の吸収率はほぼ同程度と考えられる。排泄に関しては、flunarizine は尿および胆汁中にほとんど排泄されず [24]、cinnarizine も尿中排泄の少ない [22] ことが示されている。Cinnarizine の胆汁中排泄についての知見はないが、cinnarizine も flunarizine と同様に胆汁排泄は少なく、これら薬物の大部分が代謝物となり排泄され则认为られる。また、両薬物の分布容積を直接比較するためのデータはないが、両薬物の構造の類似性と、今回の実験において cinnarizine と flunarizine の線条体中濃度／血漿中濃度比が近似していることから、分布容積には大きな違いはないものと推測できる。従って、cinnarizine と flunarizine の血漿中濃度の大きな違いは、主に代謝の違いによるものであり、cinnarizine が flunarizine よりも代謝を受けやすいためであると考えられた。血漿中濃度を決定している主要因は代謝過程であるとする考えは、flunarizine を投与した雄ラットの血漿中 flunarizine 濃度が、雌ラットの約 $1/4$ であったことから支持される (Table.24)。

Parkinsonism の発現に当たっては、血漿中濃度よりも作用部位である線条体中の薬物濃度が問題となる。先に行ったラット線条体を用いたラジオレセプ

ターアッセイにより、cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物である、C-2、C-4 および F-2 がドーパミンレセプターを遮断して parkinsonism を惹起する可能性が示された。特に、C-2 および F-2 はそれぞれ薬物本体 (cinnarizine および flunarizine) よりもその作用が強いと考えられた。従って、これらの化合物の血漿中から線条体への移行性の評価は、cinnarizine と flunarizine による parkinsonism の発現頻度の違いをもたらす原因究明の重要な鍵の一つと考えられる。今回のラットでの実験においては、cinnarizine と flunarizine の線条体への移行率は同じであり、対応する代謝物である C-2 と F-2 の移行率にも差は認められなかった (Table 25 ; C-4 は未検出)。よって、cinnarizine と flunarizine で parkinsonism の発現頻度が異なる原因として、未変化体の線条体への移行性は関係しないものと考えられた。一方、C-2 および F-2 は、それぞれ cinnarizine および flunarizine に比べ約 2.5 倍線条体への移行率が高かった。従って、cinnarizine および flunarizine は、シンナミル基のベンゼン環の水酸化によりドーパミンレセプターへの親和性ばかりでなく、線条体への移行性も高くなることが示され、parkinsonism の発現には代謝過程が重要な役割を担っているものと考えられた。また今回の実験において、20 $\mu\text{mol/kg/day}$ 連続投与 30 日後における線条体中濃度は、最も parkinsonism の惹起作用が強いと考えられる F-2 が最も高く flunarizine とほぼ同等の値を示し、cinnarizine 濃度の約 6 倍、C-2 濃度の約 11 倍であった。このことより、flunarizine 服用患者で cinnarizine 服用患者よりも parkinsonism の発現頻度が高い原因として F-2 が副作用の発現に関与している可能性が示唆された。

ところで、実際の臨床でのヒトへの投与量は、cinnarizine は flunarizine の 10~20 倍の高用量であり、臨床の場合においてはラットに同用量を投与した時のように flunarizine および F-2 の血漿中濃度が cinnarizine や C-2 よりも高くなるとは限らない。そこで、Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine を種々の投与量で 10 日間連続投与し、血漿中の未変化体および代謝物 (C-2, F-2) の濃度比をそれぞれ比較した (Table.23)。Flunarizine の 5 または 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の血漿中 flunarizine 濃度は、それぞれその 10 倍量に相当する cinnarizine の 50 または 100 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の血漿中 cinnarizine 濃度の約 1/3 であった。また、flunarizine 5 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の血漿中 flunarizine 濃度は、その 20 倍量に相当する cinnarizine 100 $\mu\text{mol/kg/day}$ 投与時の血漿中 cinnarizine 濃度の約 1/5 であった。しかし、連続

投与 10 日目で cinnarizine 濃度がほぼ定常状態に達しているのに対し、flunarizine 濃度は投与日数を増すとさらに上昇すると推測されることから (Fig. 21)、定常状態においては flunarizine 濃度/cinnarizine 濃度比はさらに大きい値になると考えられた。一方、F-2 の濃度は、flunarizine の投与量が cinnarizine の 1/10 または 1/20 であるにもかかわらず、C-2 濃度の 1.4~2.1 倍高く、F-2 は C-2 に比べて、2 次代謝も含めて体外に排泄されにくいと推測された。

ヒトにおける cinnarizine または flunarizine の血中動態に関する報告は少なく、両薬物を直接比較したデータはない。ヒトにおける flunarizine の定常状態での血漿中濃度について荒木ら [57] は、健常人 4 名に flunarizine を 10mg、1 日 1 回 (21 $\mu\text{mol/day}$) 57 日間連続投与した場合、およそ 5~6 週で定常状態に達し、50~100 ng/ml (0.12-0.25 nmol/ml) の間で日内変動するとしている。また、cinnarizine については Hernandez ら [55] が、健常人 6 名に cinnarizine を 1 回 75mg、1 日 2 回 (407 $\mu\text{mol/day}$) 15 日間連続投与した場合、15 日目にはすでに定常状態に達し、150~300 ng/ml (0.41-0.81 nmol/ml) の間で日内変動することを示している。少ない例数で試験方法も異なることや、また flunarizine [56]、cinnarizine [27] とともに血漿中濃度には 20~30 倍以上という非常に大きな個人差が認められることより、安易に比較することはできないが、cinnarizine は flunarizine に比べ約 20 倍の高用量を投与しても、定常状態の血漿中濃度は約 3 倍程度しか高くないと思われた。先に行ったラットにおける薬理実験およびラット線条体を用いたラジオレセプターアッセイから、flunarizine は cinnarizine に比べ強い parkinsonism 惹起作用があると推定された。従って、flunarizine 濃度に対し 3 倍程度の濃度では、parkinsonism の発現する危険性は、flunarizine 投与時のほうが高いと推測された。また、ヒトの flunarizine の血中代謝物については、未発表のデータであるが、flunarizine の連続投与時に flunarizine と同濃度~約 1/7 の濃度の F-2 が検出されている [96]。ラットにおいての血漿から線条体中への移行率は、flunarizine の約 2.5 倍大きかったことより (Table 25)、ヒトにおいても線条体中の F-2 濃度は flunarizine 濃度と同レベルである可能性が示唆された。従って、flunarizine 服用患者での parkinsonism の発現には、未変化体だけではなく代謝物 (F-2) も関与している可能性が大きいと考えられた。

以上、ラットに cinnarizine または flunarizine を連続投与した結果より、

flunarizine および F-2 は、cinnarizine および C-2 よりも体外に排泄されにくいと考えられた。また、両薬物はシンナミル基のベンゼン環 4 位の水酸化により、ドーパミン D2 レセプターへの親和性と共に線条体への移行性も増加することから、parkinsonism 発現には CYP2D6 が関与する代謝過程が重要な役割を担っていると考えられた。

小 括

代謝の様相がヒトと類似していた Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine を連続投与し、血漿中および線条体中の未変化体および代謝物濃度を測定して、連続投与時の体内動態を調べた。さらに cinnarizine、flunarizine およびそれらの代謝物の線条体中濃度／血漿中濃度比を計算し、脳内移行性について比較検討し、以下の知見を得た。

1) 連続投与 30 日後における血漿中の flunarizine 濃度は cinnarizine 濃度の約 6 倍高く、F-2 濃度は C-2 濃度の約 10 倍高かったことより、flunarizine および F-2 は、cinnarizine および C-2 よりも代謝を受けにくく、体外に排泄されにくいと考えられた。

2) cinnarizine と flunarizine の線条体への移行率はほぼ同じであり、また対応する代謝物である C-2 と F-2 の移行率にも差は認められなかった。従って、cinnarizine と flunarizine で parkinsonism の発現頻度が異なる原因として、線条体への移行性は関係しないものと考えられた。

3) C-2 および F-2 の線条体への移行率は、それぞれの母化合物よりも高く、parkinsonism 発現には CYP2D6 が関与する代謝過程が重要な役割を担っていると考えられた。

実験の部

1. 実験動物

日本 SLC (株)より購入した 10~14 週令の Wistar 系雌ラットおよび 11~13 週令の Wistar 系雄ラットを用いた。動物は実験期間を通して一定環境下（室温 23~25℃、明期：午前 7 時~午後 7 時）で飼育し、固型飼料（オリエンタル酵母(株)、MF）および水は自由に摂取させた。

2. 試薬

Flunarizine hydrochloride は Sigma 社より、cinnarizine およびアラビアゴム末は和光純薬工業(株)より購入した。

Cinnarizine および flunarizine の代謝物に関しては、第 2 章の実験の部に記した。

その他の試薬は、市販の特級試薬を使用した。

3. 薬物の投与

Cinnarizine または flunarizine を 5 % (w/v) アラビアゴム水溶液に懸濁し、ゾンデを用いて強制的に経口投与した。

4. 薬物連続投与時の未変化体および代謝物の血漿中および線条体中濃度

Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine を 20 $\mu\text{mol/kg}$ 、1 日 1 回、1, 5, 10, 15 および 30 日間連続投与した（1 群 5 匹）。最終投与 24 時間後に断頭し、血液および線条体を採取した。血液は常法により血漿分離し、線条体（20~40mg）は氷冷した蒸留水 1ml でホモジナイズした。血漿（0.2ml）中および線条体懸濁液中の cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物濃度は肝ミクロゾーム中濃度の測定法（第 1 章参照）に準じて測定した。なお C-1 と F-1 は内因性物質によるブランクピークとの分離・識別が不十分であったため測定しなかった。

5. 薬物投与量の影響

Wistar 系雌ラットに cinnarizine を 20, 50 および 100 $\mu\text{mol/kg}$ 、flunarizine を 5, 10 および 20 $\mu\text{mol/kg}$ 、それぞれ 1 日 1 回、10 日間連続投与し、4.と同様

の方法で血液および線条体中の薬物および代謝物濃度を測定した（1群5匹）。

6. Wistar 系ラットにおける性差

Wistar 系雄ラットに flunarizine を 20 $\mu\text{mol/kg}$ 、1 日 1 回、15 日間連続投与し、4.と同様の方法で血液および線条体中の薬物および代謝物濃度を測定した（1群6匹）。

7. 脳内移行性

上記 4.～6.の結果より線条体中濃度と血漿中濃度との比を計算した。

総 括

1. Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物の定量法の確立 (第 1 章)

1) ラット肝ミクロゾームの反応液より、cinnarizine の新規 1 次代謝物である 1-[(4-hydroxyphenyl)phenylmethyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine (C-4) を単離同定した。

2) Cinnarizine とその 5 種の代謝物および flunarizine とその 4 種の代謝物を HPLC を用いて簡便かつ迅速にそれぞれ同時定量する方法を確立した。

2. Cinnarizine と flunarizine の in vitro での代謝 (第 2 章)

1) ラット肝ミクロゾームを用いた in vitro 代謝実験において、cinnarizine および flunarizine の 1 次代謝反応は、いずれも NADPH 非存在下では進行せず、一酸化炭素および SKF525-A により抑制されたことより、本反応には P450 が関与していることが明らかとなった。

2) ラット肝ミクロゾームにおける cinnarizine および flunarizine の低基質濃度域での主代謝反応は、シンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応 (C-2, F-2 生成反応) であった。阻害剤および DA 系ラットを用いた実験より、ラット肝ミクロゾームによる C-2 および F-2 の生成には CYP2D サブファミリーの関与が示唆された。

3) ラット肝ミクロゾームを用いた in vitro 代謝実験より求めた固有クリアランス ($V_{\max} / K_m$) より、flunarizine は cinnarizine に比べ代謝を受けにくいものと考えられた。

4) ヒト肝ミクロゾームにおける C-2 および F-2 の生成活性は CYP2D6 含量および debrisoquine 4 位水酸化活性と高い相関を示したこと、ならびに両代謝活性が quinidine により大きく低下したことより、ヒト肝ミクロゾームにおけ

る cinnarizine および flunarizine のシンナミル基の芳香環 4 位水酸化反応には、CYP2D6 が関与していると考えられた。また、ヒト肝ミクロゾームでの cinnarizine および flunarizine 代謝様相は、Wistar 系雄ラットよりも Wistar 系雌ラットに類似していた。

5) ヒト P450 遺伝子発現リンパ芽球細胞ミクロゾームを用いた代謝実験より、C-2 および F-2 の生成には CYP2D6、C-4 の生成には CYP2B6 の関与が示された。Cinnarizine および flunarizine の脱アルキル化反応は、複数の分子種により触媒された。

3. Cinnarizine および flunarizine の行動薬理学的作用の比較 (第 3 章)

1) ヒトと代謝のパターンが類似していた Wistar 系雌ラットにおいて、flunarizine は cinnarizine に比べカタレプシー惹起作用、運動協調性抑制作用および行動活性抑制作用が強く、ヒトにおいて parkinsonism を引き起こす可能性の高いことが示された。

2) Cinnarizine および flunarizine は apomorphine により誘発されるラットの常同行動を抑制したことより、cinnarizine および flunarizine が誘発する parkinsonism は、両薬物によるドーパミンレセプターの遮断によると推定された。また、その遮断作用は、flunarizine が cinnarizine よりも強いと考えられた。

4. Cinnarizine および flunarizine とそれらの代謝物のドーパミンレセプターおよびムスカリン性アセチルコリンレセプターへの結合 (第 4 章)

1) Flunarizine は cinnarizine に比べてドーパミン D2 レセプター (D2-R) 遮断作用が強く、またムスカリン性アセチルコリンレセプター (mACh-R) 遮断作用が弱かったことより、flunarizine は cinnarizine に比べ parkinsonism の惹起作用がより強いと考えられた。

2) CYP2D6 による酸化成績体である C-2 および F-2 の D2-R に対する親和性は、それぞれの母化合物よりも高く、parkinsonism の発現には代謝物も関与している可能性が考えられた。

3) D2-R と mACh-R に対する親和性の比 (mACh/D2)、および D2-R に対する K_i 値より、parkinsonism の惹起力を $F-2 > \text{flunarizine} > C-2 > \text{cinnarizine} > C-4 > F-1 > C-1$ の順と推定した。

5. Cinnarizine または flunarizine 連続投与時の体内動態と脳内移行性 (第5章)

1) 代謝の様相がヒトと類似していた Wistar 系雌ラットに cinnarizine または flunarizine を連続投与し、連続投与時の体内動態を調べた。連続投与 30 日後における血漿中の flunarizine 濃度は cinnarizine 濃度の約 6 倍高く、F-2 濃度は C-2 濃度の約 10 倍高かったことより、flunarizine および F-2 は、cinnarizine および C-2 よりも代謝を受けにくく、体外に排泄されにくいと考えられた。

2) Cinnarizine と flunarizine の線条体への移行率はほぼ同じであり、また対応する代謝物である F-2 と C-2 の移行率にも差は認められなかった。従って、cinnarizine と flunarizine で parkinsonism の発現頻度が異なる原因として、線条体への移行性は関係しないものと考えられた。

3) C-2 および F-2 の線条体への移行性は、それぞれの母化合物よりも高く、parkinsonism 発現には CYP2D6 が関与する代謝過程が重要な役割を担っていると考えられた。

本研究では、主にラットを用い cinnarizine と flunarizine の代謝過程、両薬物およびそれらの代謝物の脳内への移行性、レセプターへの結合性などの性質を比較検討することにより、両薬物による parkinsonism 発現機構ならびに発現率の相違について考察した。

雌ラットを用いた in vivo 薬理実験および in vitro のラジオレセプターアッ

セイより、flunarizine は cinnarizine に比べ parkinsonism の惹起力が強いことが示された。また代謝物に関しては、parkinsonism の惹起力は脱アルキル化により著しく低下し、CYP2D6 が関与するシンナミル基のベンゼン環4位の水酸化（C-2, F-2）により増加すると考えられた。雌ラットを用いた連続投与試験より、flunarizine および F-2 は、cinnarizine および C-2 よりも体内に蓄積しやすいことが示された。また、C-2 および F-2 は、それぞれの母化合物よりも線条体への移行性は大きかった。これらのことより、両薬物の parkinsonism の発現には、特に CYP2D6 が関与する代謝過程が重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究は、臨床で実際に発生した薬物による副作用について、その機構を薬理学的および体内動態学的なアプローチにより明らかにした。特に、薬物の毒性発現に関与する代謝過程の重要性を示し、医薬品開発研究における体内動態学の重要性を示唆した。医薬品開発時や臨床の場合においては、薬物本体の薬理作用や体内動態に主眼が置かれ、ややもすると代謝物については見逃されることがある。しかし、本研究で示したように、代謝物が副作用発現の重要な要因になる場合があり、常に代謝物の薬理作用と体内動態にも着眼する必要性がある。また、特に代謝過程には大きな種差が存在することより、医薬品開発の早い段階より、ヒト肝ミクロゾームや遺伝子発現系ミクロゾームなどを用いてヒトの代謝を明らかにし、さらに、本研究で Wistar 系雌ラットを用いたように、ヒトの代謝様相と類似した動物種を用いて薬理試験や毒性試験を行う必要があると考える。

参考文献

1. 南勝, 遠藤泰, 吉岡充弘, 斎藤秀哉: カルシウム拮抗薬の作用機序と副作用. 薬局 40 : 1291-1298, 1989.
2. Singh BN: The mechanism of action of calcium antagonists relative to their clinical applications. Br J Clin Pharmacol 21 : 109S-212S, 1986.
3. Godfraind T, Towse G and Van Nueten JM: Cinnarizine : a selective calcium entry blocker. Drugs of Today 18 : 27-42, 1982.
4. Holms B, Brogden RN, Heel RC, Speight TM and Avery GS: Flunarizine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs 27 : 6-44, 1984.
5. Chouza C, Scaramelli A, Caamano JL, De Medina O, Aljanati R and Romero S: Parkinsonism, tardive dyskinesia, akathisia, and depression induced by flunarizine. Lancet 1 : 1303-1304, 1986.
6. Capella D, Laporte JR, Castel JM, Tristan C, Cos A and Morales-Olivas FJ: Parkinsonism, tremor, and depression induced by cinnarizine and flunarizine. Br Med J 297 : 722-723, 1988.
7. Micheli F, Pardal MF, Gatto M, Torres M, Paradiso G, Parera IC and Giannaula R: Flunarizine- and cinnarizine-induced extrapyramidal reactions. Neurology 37 : 881-884, 1987.
8. Borison RL and Diamond BI: Neuropharmacology of the extrapyramidal system. J Clin Psychiatry 48 : 7-12, 1987.
9. Kaufman DM: Involuntary movement disorders. Clinical Neurology for Psychiatrists. (3 ed.) : pp358-409, Grune and Stratton, 1990.
10. Marsden CD and Jenner P: The pathophysiology of extrapyramidal side-effects of neuroleptic drugs. Psychol Med 10 : 55-72, 1980.
11. Richelson E: Neuroleptic affinities for human brain receptors and their

- use in predicting adverse effects. *J Clin Psychiatry* 45 : 331-336, 1984.
12. 海老原進一郎, 高木康行, 高木誠 : 薬物性 parkinsonism. *Clin Neurosci* 3 : 1350-1353, 1985.
13. 藤原豊, 富田博秋 : ドパミン受容体. *神経進歩* 37 : 443-458, 1993.
14. Asanuma M, Ogawa N, Haba K, Hirata H and Mori A: Calcium antagonist flunarizine hydrochloride affects striatal D2 dopamine receptors in the young adult and aged rat brain. *Arch Gerontol Geriatr* 13 : 271-278, 1991.
15. 小川紀雄, 浅沼幹人, 高上晴彦, 佐藤博彦, 貫名至 : 塩酸フルナリジンの線条体D2ドーパミンレセプターに対する作用. *臨床神経学* 30 : 1221-1226, 1990.
16. Schoeman JF, Elyas AA, Brett EM and Lascelles PT: Correlation between plasma carbamazepine-10,11-epoxide concentration and drug side-effects in children with epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 26 : 756-764, 1984.
17. Patsalos PN, Stephenson TJ, Krishna S, Elyas AA, Lascelles PT and Wiles CM: Side-effects induced by carbamazepine-10,11-epoxide. *Lancet* 2 : 496, 1985.
18. Guengrich FP: Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* 266 : 10019-10022, 1991.
19. Porter T and Coon MJ: Cytochrome P-450. *J Biol Chem* 266 : 13469-13472, 1991.
20. Spatzenegger M and Jaeger W: Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *DrugMet Rev* 27 : 397-417, 1995.
21. 千葉寛 : ヒト P450 分子種同定 : 臨床薬理学及び医薬品開発における意義. *薬物動態* 10 : 391-402, 1995.
22. Soudijn W and van Wijngaarden I: The metabolism and excretion of

cinnarizine by rats. Life Sci 7 : 231-238, 1968.

23. Dell HD and Fiedler J: Determination of renal excreted benzhydrol and its glucuronide. Potential metabolites of diphenylmethylether and diphenylmethylaniline derivatives. Fres Z Anal Chem 284 : 126-127, 1977.

24. Meuldermans W, Hendrickx J, Hurkmans R, Swysen E, Woestenborghs R, Lauwers W and Heykants J: Excretion and metabolism of flunarizine in rats and dogs. Arzneim-Forsch/DrugRes 33 : 1142-1151, 1983.

25. Lavrijsen K, Van Hondt J, Van Dyck D, Hendrickx J, Bockx M, Hurkmans R, Meuldermans W, Le Jeune L, Lauwers W and Heykants J: Comparative metabolism of flunarizine in rats, dogs and man : an in vitro study with subcellular liver fractions and isolated hepatocytes. Xenobiotica 22 : 815-836, 1992.

26. 葛原茂樹, 幸原伸夫, 大川義弘, 布施滋, 山之内博 : Ca 拮抗剤フルナリジンにより誘発されたパーキンソニズム, 抑うつ状態, akathisia : 31 症例の検討. 臨床神経 29 : 681-686, 1989.

27. Morrison PJ, Brasbrook ID and Rogers HJ: Plasma cinnarizine levels resulting from oral administration as capsule or tablet formulation investigated by gas-liquid chromatography. Br J Clin Pharmacol 7 : 349-352, 1979.

28. Hundt HKL, Brown LW and Clark EC: Determination of cinnarizine in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 183 : 378-382, 1980.

29. Puttemans M, Bogaert M, Hoogewijs G, Dryon L, Massart DL and Vanhaelst L: Determination of cinnarizine in whole blood and plasma by reversed phase HPLC and its application to a pharmacokinetic study. J Liq Chromatogr 7 : 2237-2251, 1984.

30. Nieder M and Jaeger H: High-performance liquid chromatographic assay of flunarizine in plasma and its application to biopharmaceutic investigation. J Chromatogr 380 : 443-449, 1986.

31. Torchin CD, Kapetanovic IM, Yonekawa WD and Kupferberg HJ: High-performance liquid chromatographic assay of flunarizine, (E)-1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine, in plasma of epileptic patients. *J Chromatogr* 426 : 444-448, 1988.
32. Waki H and Ando S: Column liquid chromatography of calcium channel blockers. *J Chromatogr* 492 : 408-412, 1989.
33. Omura T and Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239 : 2370-2378, 1964.
34. Lowry OH, Roseborough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951.
35. Dabbagh SG, Idle JR and Smith: Animal modelling of human polymorphic drug oxidation - the metabolism of debrisoquine and phenacetin in rat inbred strains. *J Pharm Pharmacol* 33 : 161-164, 1981.
36. Kahn GC, Rubenfield M, Davis DS, Murray S and Boobis AR: Sex and strain differences in hepatic debrisoquine 4-hydroxylase activity of the rat. *Drug Metab Dispos* 13 : 510-516, 1985.
37. Barham HM, Lennard MS and Tucker GT: An evaluation of cytochrome P450 isoform activities in the female Dark Agouti (DA) rat : relevance to its use as a model of the CYP2D6 poor metaboliser phenotype. *Biochem Pharmacol* 47 : 1295-1307, 1994.
38. Robinson D and Williams RT: The metabolism of benzophenone. *Biochem J* 68 : 584, 1958.
39. Swada H and Hara A: Studies on metabolism of bromazepam. VI. Reduction of 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine, a metabolite of bromazepam, in the rabbit, rat, and guinea pig. *Drug Metab Dispos* 6 : 205-212, 1978.

40. 今村順茂：ケトン基を有する薬物の還元的代謝. 薬物動態 5 : 263-271, 1990.
41. Inaba T, Nakano M, Otton SV, Mahon WA and Kalow W: A human cytochrome P-450 characterized by inhibition studies as the sparteine - debrisoquine monooxygenase. *Can J Physiol Pharmacol* 62 : 860-862, 1984.
42. Gut J, Catin T, Dayer P, Kronbach T, Zanger U and Meyer UA: Debrisoquine/Sparteine -type polymorphism of drug oxidation. Purification and characterization of two functionally different human liver cytochrome P-450 isozymes involved in impaired hydroxylation of the prototype substrate bufuralol. *J Biol Chem* 261 : 11734-11743, 1986.
43. Kobayashi S, Murray S, Watson D, Sesardic D, Davies DS and Boobis AR: The specificity of inhibition of debrisoquine 4-hydroxylase activity by quinidine and quinine in the rat is the inverse of that in man. *Biochem Pharmacol* 38 : 2795-2799, 1989.
44. Gonzalez FJ and Idle JR: Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. Present status and future potential. *Clin Pharmacokinet* 26 : 59-70, 1994.
45. Alvan G, Bechtel P, Iselius L and Gundert-Remy U: Hydroxylation polymorphism of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol* 39 : 533-537, 1990.
46. Horai Y, Nakano M, Ishizaki T, Ishikawa K, Zhou HH, Zhou BJ, Liao CL and Zhang LM: Metoprolol and mephenytoin oxidation polymorphisms in Far Eastern Oriental subjects : Japanese versus mainland Chinese. *Clin Pharmacol Ther* 46 : 198-207, 1989.
47. Nakamura K, Goto F, Ray WA McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR and Branch RA: Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 38 : 402-408, 1985.
48. Waterman MR and Johnson EF: *Methods in Enzymology* 206, pp85-145, Academic Press Inc(San Diego), 1991.

49. 山添康: ヒト P450 の発現とその利用の分子生物学的問題点. 薬物動態 10 : 386-390, 1995.
50. Chang TKH, Weber GF, Crespi CL and Waxman DJ: Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 53 : 5629-5637, 1993.
51. Wheeler CW, Park SS and Guenthner TM: Immunochemical analysis of a cytochrome P-4501A1 homologue in human lung microsomes. *Mol Pharmacol* 38 : 634-643, 1990.
52. Murray BP, Edwards RJ, Murray S, Singleton AM, Davies DS and Boobis AR: Human hepatic CYP1A1 and CYP1A2 content, determined with specific anti-peptide antibodies, correlates with the mutagenic activation of PhIP. *Carcinogenesis* 14 : 585-592, 1993.
53. Relling MV, Aoyama T, Gonzales FJ and Meyer UA: Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther* 252 : 442-447, 1990.
54. Castaneda-Hernandez G, Hoyo-Vadillo C, Herrera JE, Salazar LA, Ortiz C and Hong E: Accumulation of cinnarizine, a calcium entry blocker, following usual dosage regimens. *Proc West Pharmacol Soc* 34 : 421-424, 1991.
55. Castaneda-Hernandez, Vargas-Alvarado Y, Aguirre F and Flores-Murrieta FJ: Pharmacokinetics of cinnarizine after single and multiple dosing in healthy volunteers. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 43 : 539-542, 1993.
56. Heykants J, De Cree J and Horig Ch: Steady-state plasma levels of flunarizine in chronically treated patients. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 29 : 1168-1171, 1979.
57. 荒木五郎, 斉藤達郎, 石井昭男, 出口隆志: KW-3149 (塩酸フルナリジン) の第 I 相試験成績. 基礎と臨床 16 : 1901-1907, 1982.
58. Kitada M, Hasunuma Y, Rikihisa T and Kanakubo Y: Enhancement of

aniline hydroxylation in human liver microsomes. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 51 : 101-116, 1986.

59. Masubuchi Y, Fujita S, Chiba M, Kagimoto N, Umeda S and Suzuki T: Impairment of debrisoquine 4-hydroxylase and related monooxygenase activities in the rat following treatment with propranolol. Biochem Pharmacol 41 : 861-865, 1991.

60. Distlerath LM, Reilly PE, Martin MV, Davis GG, Wilkinson GR and Guengerich FP: Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. J Biol Chem 260 : 9057-9067, 1985.

61. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T and Uno T: A pharmacokinetics analysis program (MULTI) for microcomputer. J Pharmacobio-Dyn 4 : 879-885, 1981.

62. 宮崎栄治, 原卓司, 西川智, 池上二郎, 大黒友路 : KW-3149 の安全性に関する研究. 基礎と臨床 16 : 1735-1747, 1982.

63. 山田耕二, 二藤真明, 久保和博, 塩崎静男, 周藤勝一, 中溝喜博 : Flunarizine の一般薬理学的研究. 基礎と臨床 16 : 1878-1891, 1982.

64. Keibabin JW and Calne DB: Multiple receptors for dopamine. Nature 277 : 93-96, 1979.

65. 高柳一成 : 臨床薬物治療大系-2 : 薬理学・非臨床薬効評価. pp93-128, 情報開発研究所 (東京), 1987.

66. Costall B and Naylor RJ: Neuroleptic and non-neuroleptic catalepsy. Arzneimittel-Forsch/DrugRes 23 : 674-683, 1973.

67. Costall B and Naylor RJ: Is there a relationship between the involvement of extrapyramidal and mesolimbic brain areas with the cataleptic action of neuroleptic agents and their clinical antipsychotic effect ?. Psychopharmacol 32 : 161-170, 1973.

68. Dunham NW and Miya TS: A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46 : 208-209, 1957.
69. Kuribara H, Higuchi Y and Tadokoro S: Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. *Jap J Pharmacol* 27 : 117-126, 1977.
70. Costall B and Naylor RJ: On the mode of action of apomorphine. *Eur J Pharmacol* 21 : 350-361, 1973.
71. Ozaki A, Ikegami A, Yoshidomi M, Yamashita A and Sukamoto T: Behavioral and biochemical effects of a novel calcium antagonist, KB-2796, on the central dopaminergic system. *Eur J Pharmacol*, 200 : 311-317, 1991.
72. Casellas N, Ferrani B, Cutillas B and Mahy N: Characterization of D2-dopamine receptor modification in rat striatum after calcium channel blocker treatment. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 12 : 609-611, 1990.
73. Grebb JA: Nifedipine and flunarizine block amphetamine-induced behavioral stimulation in mice. *Life Sci* 38 : 2375-2381, 1986.
74. Miller RJ and Hiley CR: Anti-muscarinic properties of neuroleptics and drug-induced parkinsonism. *Nature* 248 : 596-597, 1974.
75. Snyder S, Greenberg D and Yamamura HI: Antischizophrenic drugs and brain cholinergic receptors. Affinity for muscarinic sites predicts extrapyramidal effects. *Arch Gen Psychiatry* 31 : 58-61 1974.
76. Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA and Civelli O: Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336 : 783-787, 1988.
77. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML and Schwartz JC: Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347 : 146-151, 1990.
78. Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik

HB and Civelli O: Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350 : 610-614, 1991.

79. Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM and Niznik HB: Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350 : 614-619, 1991.

80. Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HHM, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR and Civelli O: Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347 : 76-80, 1990.

81. Strange PG: New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int* 22 : 223-236, 1993.

82. 井上敦子, 仲田義啓, 植田弘師 : ドパミン受容体. *薬局* 48 : 53-61, 1997.

83. Carlson JH, Bergstrom DA and Walters JR: Stimulation of both D1 and D2 dopamine receptors appears necessary for full expression of postsynaptic effects of dopamine agonists : a neurophysiological study. *Brain Res* 400 : 205-218, 1987.

84. Waddington JL, Daly SA, Downes RP, Deveney AM, Mccauley PG and O'boyle KM: Behavioural pharmacology of 'D-1-like' dopamine receptors : further subtyping, new pharmacological probes and interactions with 'D-2-like' receptors. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 19 : 811-831, 1995.

85. Lahti RA, Evans DL, Stratman NC and Figur LM: Dopamine D4 versus D2 receptor selectivity of dopamine receptor antagonists : possible therapeutic implications. *Eur J Pharmacol* 236 : 483-486 1993.

86. Terai M, Hidaka K and Nakamura Y: Comparison of [3H]YM-09151-2 with [3H]spiperone and [3H]raclopride for dopamine D-2 receptor binding to rat striatum. *Eur J Pharmacol* 173 : 177-182, 1989.

87. Cheng YC and Prusoff WH: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22 : 3099-3108, 1973.
88. Bonner TI, Buckley NJ, Young AC and Brann MR: Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237 : 527-532, 1987.
89. Peralta EG, Winslow JW, Peterson GL, Smith DH, Ashkenazi A, Ramachandran J, Schimerlik MI and Capon DJ: Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* 236 : 600-605, 1987.
90. Bonner TI, Young AC, Brann MR and Buckley NJ: Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1 : 403-410, 1988.
91. Yasuda Rp, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spagnola BV and Wolfe BB: Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors : Distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 43 : 149-157, 1993.
92. Bolden C, Cusack B and Richelson E: Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 260 : 576-580, 1992.
93. Allewijn FTN: The distribution of cinnarizine and its metabolites in the rat. *Life Sci* 7 : 989-994, 1968.
94. Michiels M, Hendriks R, Knaeps F, Woestenborghs R and Heykants J: Absorption and tissue distribution of flunarizine in rats, pigs and dogs. *Arzneim-Forsch/DrugRes* 33 : 1135-1142, 1983.
95. On the excretion and metabolism of cinnarizine in the Wistar rat after oral administration. *Janssen Research Report* R516/2, 1972.

96. 石井昭男, 大石孝義, 小林弘幸, 宇治康明: 塩酸フルナリジンのヒトにおける体内動態について. 協和発酵工業株式会社社内資料, 1983.

論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Kariya S, Isozaki S, Narimatsu S and Suzuki T: Oxidative metabolism of cinnarizine in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 44 : 1471-1474, 1992.
2. Kariya S, Isozaki S, Narimatsu S and Suzuki T: Oxidative metabolism of flunarizine in rat liver microsomes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 78 : 85-95, 1992.
3. 假家悟, 磯崎貞夫, 成松鎮雄, 鈴木徳治 : フルナリジンおよびシンナリジンによるアポモルヒネ誘発常同行動の抑制効果. *神経精神薬理* 14 : 703-708, 1992.
4. Narimatsu S, Kariya S, Isozaki S, Ohmori S, Kitada M, Hosokawa S, Masubuchi Y and Suzuki T: Involvement of CYP2D6 in oxidative metabolism of cinnarizine and flunarizine in human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 193 : 1262-1268, 1993.
5. Kariya S, Isozaki S, Masubuchi Y, Suzuki T and Narimatsu S: Possible pharmacokinetic and pharmacodynamic factors affecting parkinsonism inducement by cinnarizine and flunarizine. *Biochem Pharmacol* 50 : 1645-1650, 1995.
6. Kariya S, Isozaki S, Uchino K, Suzuki T and Narimatsu S: Oxidative metabolism of flunarizine and cinnarizine by microsomes from B-lymphoblastoid cell lines expressing human cytochrome P450 enzymes. *Biol Pharm Bull* 19 : 1511-1514, 1996.

主査および副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	堀江利治
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	渡辺和夫
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	北田光一
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	山本恵司
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	千葉寛

謝 辞

本研究に際し、懇切な御指導と御鞭撻を賜りました千葉大学薬学部堀江利治教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究中、詳細かつ有益な御指導と御助言を賜りました千葉大学薬学部鈴木徳治名誉教授ならびに岡山大学薬学部成松鎮雄教授（前千葉大学薬学部助教授）に衷心より感謝の意を表します。

代謝研究において、貴重な試料の提供ならびに有益な御助言を賜りました千葉大学医学部附属病院薬剤部北田光一教授、同大森栄助教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究に御協力戴きました千葉大学薬学部榊渕泰宏講師ならびに細川晋氏に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、多大な御協力と御鞭撻を賜りました前東京通信病院薬剤部磯崎貞夫博士ならびに東京通信病院薬剤部内野克喜博士に心から感謝申し上げます。

1997 年 6 月

假家 悟