

低体温療法時における薬物体内動態の 変動要因解明に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 宮元 敬天

[目的] 低体温療法は American Heart Association ガイドライン 2010 において、心停止蘇生後症候群患者に対する治療法として推奨されている。低体温療法中には不整脈やシバリング、感染症などの合併症が生じるため、これらの予防や治療のために様々な薬物が投与される。しかし、低体温時においては薬物の血漿中濃度の上昇などが数多く報告されている。低体温療法時における薬物治療を効果的かつ安全に行うためには、薬物体内動態の変動要因を総合的に把握する必要がある。

そこで本研究では、消失過程の異なる各種モデル化合物を用い、肝臓内動態への温度低下の影響を肝灌流実験および肝ホモジネートを用いた実験より検討した。次いで、低体温モデルラットを用いた *in vivo* 実験を行い、これらモデル化合物の低体温時における体内動態へ及ぼす投与量の影響を明らかにした。さらに、低体温療法時に実際に使用されている midazolam の低体温時の体内動態に関して、分布および代謝過程に着目し解析した。

[方法] 動物 : Wistar 系雄性ラット (*in vivo* 実験: 250-300 g, その他: 180-210 g)。温度 : 37°C を正常体温とし、低体温では体表を冷却し 34, 32, 28°C とした。薬物 : phenolsulfonphthalein (PSP: 肝代謝型)、4-nitrophenol (4-NP: 肝代謝型)、indocyanine green (ICG: 胆汁排泄型)、FITC-dextran (FD-4: 尿中排泄型)、midazolam (MDZ: 肝代謝型)。肝灌流実験 : Mortimore 法に従ってラットの肝臓を灌流し、門脈より薬液を急速投与し、投与直後より静脈側流出液および胆汁を経時的に採取した。ラット肝ホモジネート実験 : ラットより肝臓を摘出し作製した肝ホモジネートに薬液を加え、各温度で 15 分間インキュベーションしサンプルを採取した。In vivo 実験 : 大腿動脈および胆管にカニューレを施したラットの頸静脈より薬液を投与し、経時的に血液および胆汁を採取した。実験終了時に膀胱より尿を回収した。ラットへパトサイトによる代謝実験 : ラットの肝臓にコラゲナーゼ灌流を施し、へパトサイトを単離した。へパトサイト懸濁液に薬液を加え、各温度で 5 分間インキュベーションしサンプルを採取した。血清タンパク遊離型分率 : ラット血清に薬液を加え透析膜内に封入した後、各温度で 18 時間透析した。透析膜内外の MDZ 濃度を測定し、遊離型分率を算出した。

[結果・考察]

I. 低温時における各種モデル化合物の肝臓内動態の評価

本研究で用いるモデル化合物は主に肝臓から消失するため、温度などの実験条件を容易に設定可能な肝灌流実験やラット肝ホモジネート実験を行い、モデル化合物の肝臓内動態への温度低下の影響を解析した。

肝代謝型薬物である PSP の静脈側流出液中濃度-時間曲線より求められる曲線下面積は温度低下に伴い増大した。さらに肝抽出率 (E_b) や未変化体 PSP の胆汁排泄速

度が減少したことから、低温時に肝取り込みトランスポーターである Organic anion transporter (Oat)や胆汁排泄に関わる Multidrug resistance P-glycoprotein 2 (Mdr2)の活性低下が示唆された。PSP 代謝物の累積胆汁排泄量は 28°Cで 37°Cの半分以下であり、PSP の代謝を担う UDP-glucuronosyltransferase (UGT)活性低下が考えられた。

CYP2E1 で代謝される 4-NP の E_h は灌流液温に比例し減少した(Fig.1)。一方、ラット肝ホモジネート中からの 4-NP 消失速度と 4-NP 濃度から求められる K_m は温度低下の影響を受けないが V_{max} は減少し、CYP2E1 活性の低下が明らかとなった。

ICG の E_h は 98%以上と非常に高く、温度低下の影響を受けなかった。しかし、累積胆汁排泄量は低温時に大きく減少しており、胆汁排泄に関わる Multidrug resistance associated protein 2 (Mrp2)活性低下が考えられた。

以上の結果より、低温時には薬物トランスポーターや肝臓の薬物代謝酵素活性が低下し、薬物の肝臓内動態が変化することが明らかとなった。

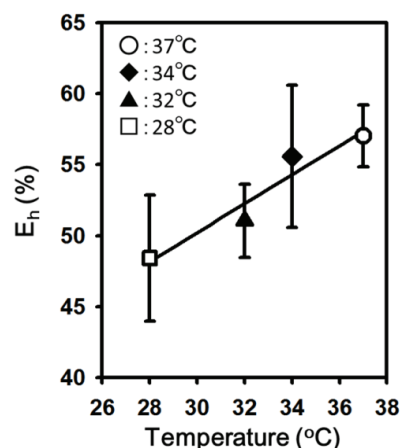


Fig.1 Relationship between temperature and E_h of 4-NP after bolus injection in the single-pass rat liver perfusion system.

II. 消失過程の異なる各種モデル化合物の低体温時における体内動態へ及ぼす投与量の影響

薬物トランスポーターや薬物代謝酵素活性は、投与量を増大させることで飽和が起こり、薬物動態が非線形を示すことが知られている。そこで、消失過程の異なる各種モデル化合物の低体温時における体内動態へ及ぼす投与量の影響を検討した。

PSP を 0.5, 1, 2 mg でラットに静脈内投与した際の血漿中濃度-時間曲線下面積は、投与量に比例し増大しており、この投与量の範囲内では非線形性は認められなかった。PSP の各消失経路のクリアランスを算出したところ、胆汁排泄クリアランスの体温低下に伴う変化には投与量による差は認められなかった。1, 2 mg 投与時では、37°Cと比較し 32°Cの腎クリアランス(CL_r)と代謝クリアランス(CL_m)は大きく低下したが、0.5 mg 投与時では、他の投与量ほど変化しなかった。PSP の尿細管分泌には Oat が関わり、代謝過程には UGT が関わっている。0.5 mg 投与時にはこれらの過程が飽和していないため、 CL_r および CL_m がほとんど減少しなかったと考えられる。

ICG をラットに 0.2, 1, 2 mg 静脈内投与した際の CL_{tot} は体温が 32, 28°Cに低下するとそれぞれ 37°Cの約 50%, 30%に低下していたが、投与量による違いは認められなかった。 E_h の高い ICG の肝クリアランスは血流量に依存するため、体温低下による血流量減少に伴い CL_{tot} が低下したと考えられる。また、ICG の平均胆汁中排泄時間は体温低下に伴い延長する傾向が認められた。

主に糸球体濾過により尿中に排泄される FD-4 の CL_{tot} はいずれの投与量においても 28°Cで 37°Cの約半分に減少した。従って、体温が 28°Cに低下すると腎血流量が著しく低下し、糸球体濾過による排泄が抑制されると考えられる。

以上の結果から、消失過程の違いにより、低体温時における薬物体内動態に及ぼす投与量と体温低下の影響が異なることが示された。

III. 低体温時における midazolam の体内動態変動要因の解析

これまでは消失過程の異なるモデル化合物の低体温時における体内動態について検討してきた。本章では低体温療法時に鎮静薬として実際に用いられている MDZ の体内動態へ体温低下が及ぼす影響を分布および代謝過程に着目し解析した。

MDZ は肝臓で代謝され消失する薬物である。そこでラットへパトサイトを用いた *in vitro* 代謝実験により、ラットで MDZ の代謝を担う CYP3A2 活性への温度低下の影響を評価した。MDZ 濃度とパトサイト懸濁液中からの MDZ の消失速度から求めた K_m は低温時に大きく変わらなかったが、 V_{max} は 28°C で 37°C の約半分であった。また、 V_{max}/K_m より算出される肝固有クリアランス ($CL_{h,int}$) が 32, 28°C で 37°C から約 20% 低下していた。

低体温モデルラットを用いた *in vivo* 実験を行い MDZ の体内動態を解析したところ、体温の低下に伴い MDZ の血漿中濃度が上昇した。MDZ の CL_{tot} は 37°C と比較して 32°C で 73%、28°C で 47% に減少していた。また、 CL_{tot} は $CL_{h,int}$ と比較し大きく低下していた。2-コンパートメントモデル解析において、MDZ の中心および末梢コンパートメントの分布容積が低体温時に減少した。従って、代謝および分布過程の変化が MDZ の体内動態に影響していると考えられる。MDZ の作用臓器である脳および消失臓器である肝臓中の MDZ 濃度を測定した。MDZ の組織移行性を組織 - 血漿中濃度比により評価したところ、脳では低体温時に MDZ の移行が著しく抑制されたが、肝臓では大きく影響を受けなかった (Fig.2)。

血清タンパク遊離型 MDZ 分率を算出したところ、32, 28°C において 37°C の半分まで低下した。血清タンパク結合率の変化が MDZ の分布性を支配する大きな要因であることが示唆された。

さらに、MDZ をラットに静脈内投与した際の生理学的モデルを構築し、本研究で得られたパラメータを基に 37, 32°C における血漿中 MDZ 濃度変化のシミュレーションを比較的精度よく行うことが出来た。

以上の結果より、低体温時における代謝および分布過程の変化が、MDZ の体内動態を支配する要因であることが明らかとなった。

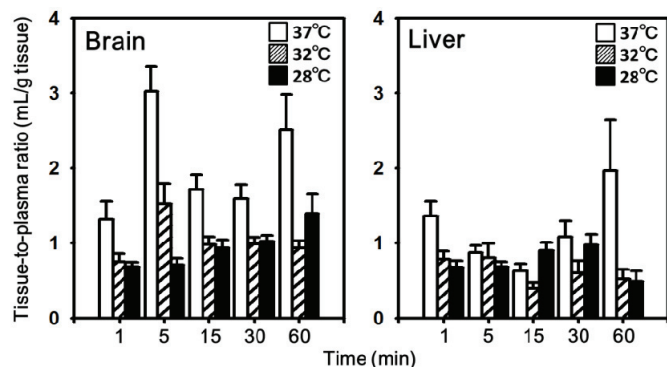


Fig.2 Tissue-to-plasma ratio of MDZ at brain and liver after i.v. administration to rats at a dose of 5 mg/kg under different body temperature.

[結論] 低体温時における薬物体内動態の変動要因を各種実験系より系統的に解析したところ、低体温時における血流量などの生理学的変化や薬物トランスポーターや薬物代謝酵素などの生化学的変化が薬物体内動態に影響することが示された。さらに、体温低下時には薬物の組織移行性が変化するため、作用部位の薬物濃度予測に基づく投与設計の必要性が考えられた。また、薬物の消失過程の違いより、低体温時における体内動態に及ぼす投与量の影響が異なることが明らかとなった。本研究結果は低体温療法時における薬物動態変化の予測に繋がる有益な基礎情報であると考えられる。

[基礎となった学術論文]

1) **Miyamoto H.**, Miyake H., Yoshikawa N., Hirata H., Ohwaki Y., Fumoto S., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**, 848-854 (2012)