

マイクロダイアリシス法を用いた薬物動態のIn Vivo 評価に関する研究

中嶋, 幹郎

<https://doi.org/10.11501/3099947>

出版情報：九州大学, 1994, 博士（薬学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：

第3章 マイクロダイアリス法を用いたラットに於ける methotrexate (MTX) の *in vivo* 経皮吸収動態の検討⁸⁰⁾

前章では、脂溶性薬物である VPA の経皮吸収動態を、経皮マイクロダイアリス法によって *in vivo* レベルで検討し、VPA の経皮吸収速度の解析に成功した。

一般に実用化されている経皮吸収剤のほとんどは、ニトログリセリンの様な脂溶性薬物である^{74, 75)}。しかし、脂溶性の低い薬物に於ても、経皮的適用が望まれている薬物も少なくはない。

その様な薬物の一つに methotrexate (MTX) が上げられる。MTX は、白血病或いは骨肉腫の治療薬として繁用されているが、最近、難治性の皮膚病である乾癬にも有効性が認められ、MTX の経口療法が行われている⁸¹⁾。しかし、MTX を投与する場合には、骨髄抑制、肝、肺及び胃腸障害を初めとする全身性副作用が随伴し、副作用回避のため therapeutic drug monitoring (TDM) を実施しながら、慎重に投与しなければならない。MTX の構造式を Fig. 18 に示す。

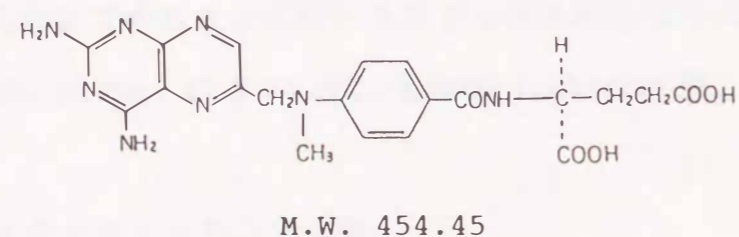


Fig. 18. Chemical Structure of MTX

VanScott ら⁸²⁾ は、MTX 投与後の全身性副作用軽減を目的に、乾癬患者への MTX 経皮適用を試みたが、MTX 自身の皮膚透過性の低さから経皮適用は無効であったと報告している。前章に於て、著者は、経皮吸収促進剤の HPE-101 が VPA の経皮吸収性を著しく上昇させることを実証した。

そこで本章では、ラットに於ける MTX の経皮吸収動態に対する吸収促進剤 HPE-101 の併用効果を、*in vivo* 経皮マイクロダイアリス法を用いて、皮膚内 MTX 濃度の変化から検討することとした。また、同時にラットの頸静脈に透析プローブを挿入し、MTX 経皮適用による全身血中 MTX 濃度の変化を、血中マイクロダイアリス法により併せて検討したので以下に詳述する。

第1節 MTX の経皮吸収に対する HPE-101 の促進効果

第1章及び第2章同様、透析プローブを *in vivo* 適用する前に、測定の対象とした MTX について、本動物実験と同じ灌流液の流速 1.0 ul/min、温度 37 °C の条件下に於ける *in vitro* 回収率を測定した。本章でも、動物実験に用いる透析プローブについて、MTX の透析プローブロット間に於ける回収率の変動性を検討する目的で *in vitro* 回収率の測定を行い、得られた *in vitro* 回収率に基づく皮膚内ならびに血中 MTX の絶対量の算出は行わず、また、その値に基づく透析液中データの補正も行わないこととした。その結果、経皮吸収実験に使用した透析プローブ (CMA/10、透析膜の長さ 10 mm) に於ける MTX の *in vitro* 回収率の平均値は 46% であった。また、この MTX の *in vitro* 回収率の変動係数は 9% と小さかった。このことより、本章に於て測定の対象とした MTX の透析プローブからの回収率には、ほとんど透析プローブのロット間での差異が存在せず、本研究で使用した透析プローブからは、MTX の回収がほぼ一定の割合で行われることが確認できた。

前章では、吸収促進剤 HPE-101 の添加濃度を 3% と設定して、ラットに於ける VPA の経皮吸収に対する HPE-101 の促進効果の検討を行い、3% HPE-101 の併用により VPA の経皮吸収速度が約 80 倍増大することを実証した。一方、HPE-101 の経皮吸収促進効果はその添加濃度に依存することが報告³¹⁾ されている。

そこで本章では、ラットに於ける MTX の経皮吸収に対する吸収促進剤 HPE-101 の添加濃度の影響を 3% 以下の種々添加濃度に於て、経皮マイクロダイアリス法により検討した。

MTX 溶液 (2.5 mM) 2 ml を経皮適用し、10 時間後までに皮膚透析液中に回収された MTX の総回収量に対する HPE-101 の添加濃度の影響を Fig. 19 に示す。グラフには得られた MTX 総回収量の平均値 ± 標準偏差を示している。

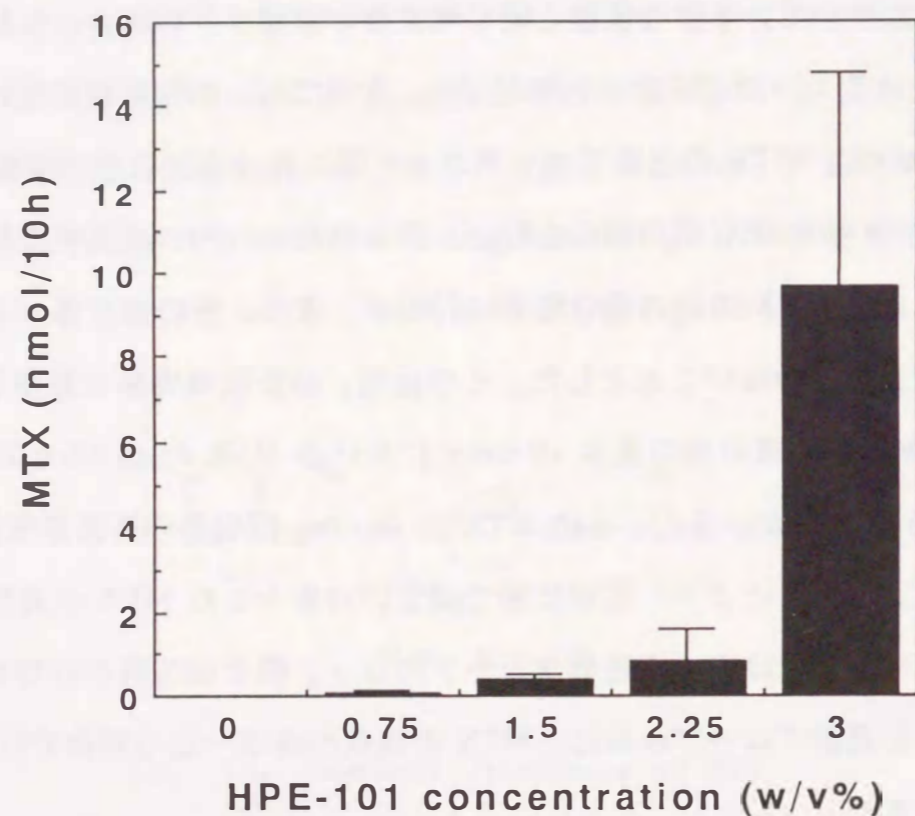


Fig. 19. Effect of HPE-101 Concentration on the Total Recovery of MTX in the Dermal Dialysate from 0 to 10 h after Dermal Application of MTX (2.5 mM) with HPE-101 at Varying Concentrations, 0%, 0.75%, 1.5%, 2.25% and 3% in Rats Data represent the mean ± S.D., n=4.

皮膚内から回収された透析液中の MTX の総回収量は、HPE-101 の添加濃度が 0.75%、1.5%、2.25% 及び 3% に於て、非添加時と比較し、それぞれ約 5 倍、18 倍、42 倍及び 500 倍顕著に増大した。MTX 経皮吸収に対する HPE-101 の促進効果には、HPE-101 の添加濃度が高くなるに従って、皮膚透析液中に於ける MTX 総回収量が著しく増大していく傾向が認められた。特に、その効果は、HPE-101 の添加濃度が 2.25% から 3% へ上昇したところで MTX 総回収量が急激に増大するシグモイド型のパターンを示し、HPE-101 の添加濃度が 3% の場合に最も顕著であった。

一般的に経皮吸収促進剤の促進効果は、添加濃度が高まるに従って徐々に強まり、一定の添加濃度に達するとその効果に飽和が生じるといった直線的な濃度依存性を示すことが知られている⁸³⁻⁸⁵⁾。HPE-101 についても、Yano ら³¹⁾は、indomethacin のラットに於ける *in vivo* 経皮吸収に対する促進効果を、その 24 時間尿中回収量の比較によって検討し、HPE-101 の添加濃度が 3% までは添加濃度に比例して indomethacin の経皮吸収量は直線的に増大したが、3% 以上に添加濃度を上げて経皮吸収量の増大が認められない、所謂「頭うち現象」を報告している。MTX 経皮吸収に対する HPE-101 の促進効果がシグモイド型のパターンを示した原因の一つとしては、HPE-101 の促進効果が強まるに従って、皮膚角質層などに対する組織障害性等が大きくなり、MTX の経皮吸収量が増大した可能性も推測されるが、実験終了後、薬液を適用していた皮膚表面を肉眼的に観察した範囲では、各 HPE-101 添加濃度間に於て皮膚表面に変化は認められなかった。MTX と indomethacin に対する HPE-101 の経皮吸収促進作用の相違は、被験薬物間の物性或いは薬理活性の相異などに起因するとも考えられるが、この点については今後詳細に検討する必要がある。

ラットに於ける MTX の経皮吸収に対する HPE-101 の添加濃度の影響を 3% 以下の濃度に於て検討した結果、HPE-101 の添加濃度が 3% の場合に、その吸収促進効果が最も顕著であることが示された。そこで次に、VPA の場合と同様

に HPE-101 の添加濃度を 3% に設定して、ラットに於ける MTX の経皮吸収動態の時間的变化に対する吸収促進剤 HPE-101 の併用効果を、経皮マイクロダイアリシス法により検討した。

MTX 溶液 (2.5 mM) 2 ml を単独ならびに 3% HPE-101 併用下でラットに経皮適用した際、皮膚内から回収された透析液中 MTX 濃度の適用後 12 時間までの経時変化を Fig. 20 に示す。マイクロダイアリシス法によって得られる薬物濃度は、透析液を回収した一定時間内での平均濃度を示しており、グラフには得られた MTX 濃度の平均値 ± 標準偏差を示している。

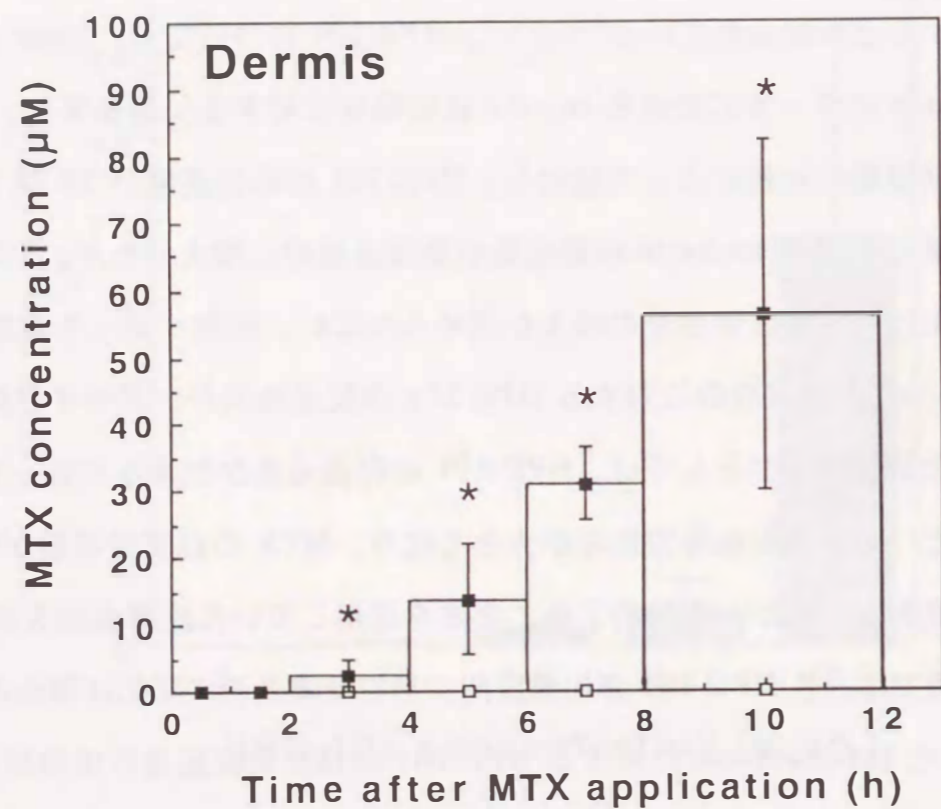


Fig. 20. MTX Concentration-Time Profiles in the Dialysate Collected from Dermis after Dermal Application of MTX (2.5 mM) with (■) or without (□) 3% HPE-101 in Rats
Data represent the mean ± S.D., n=4-5.
Significantly different from the control: * p<0.02.

MTX 単独で経皮適用した場合、皮膚内から回収された透析液中には、0~1 時間のフラクションから 8~12 時間のフラクションまで、いずれもわずかながら MTX が検出された。その際 MTX 濃度は、適用後 4 時間以降のフラクションからプラトーとなるパターンを示し、最高値を示した 8~12 時間のフラクションでの値は 0.06 µM であった。一方、3% HPE-101 と MTX を併用して経皮適用した場合には、0~2 時間までのフラクションでは MTX 単独経皮適用時と比較し透析液中 MTX 濃度の上昇は認められなかったが、適用後 2 時間以降のフラクションからは MTX 濃度の有意な上昇 (p<0.02) が認められた。その濃度推移は、2~4 時間のフラクションまでは緩やかに上昇し、その後 12 時間までは急激に上昇するというパターンを示した。また、MTX 濃度は、MTX を単独経皮適用した際と同様に 8~12 時間のフラクションに於て最も高値 (56 µM) を示し、その値は MTX を単独で経皮適用した場合と比較し約 940 倍も有意に高かった。このことより、MTX の皮膚内への吸収量が、3% HPE-101 の併用により著しく増大したことがわかった。

経皮吸収促進剤としての HPE-101 の効果は、脂溶性の高い VPA の皮膚内への吸収より、脂溶性の低い MTX の皮膚内への吸収に対して顕著であることが示された。また、3% HPE-101 を併用した際、皮膚透析液中 MTX 濃度の上昇は、経皮適用 12 時間後に於てもプラトーには達しなかった。前章で述べた如く、皮膚透析液中 VPA 濃度は、3% HPE-101 併用時に於ても経皮適用後 4 時間以降にはプラトーとなるパターンを示した。この点は、脂溶性の高い VPA と脂溶性の低い MTX の経皮吸収動態に対する 3% HPE-101 の併用効果に於て最も異なる点である。経皮適用された薬物の皮膚組織への溶解性は、viable skin に於ても、また皮膚角質層に於ても薬物の脂溶性の増大に依存することが報告^{8,6)}されている。このことを考慮すると、3% HPE-101 併用時に於ては、脂溶性の高い VPA の方が MTX に比べ速く皮膚を透過し、吸収が短い時間でプラトーに達したものと考察する。3% HPE-101 併用時の皮膚透析液中 MTX 濃度は、透析液をサンプリン

グした経皮適用 12 時間後までにプラトーに達しなかったため、本論文に於ては MTX の経皮吸収速度の算出は行わなかった。

本論文では、MTX を経皮適用した際の皮膚内の MTX 濃度の検討を主題としているが、同時に経皮吸収され全身循環血中へ移行した MTX 濃度についても血中マイクロダイアリス法により併せて検討している。

ラット頸静脈に透析プローブ挿入後、MTX 溶液 (2.5 mM) 2 ml を単独ならびに 3% HPE-101 併用下でラットに経皮適用した際、血中から回収された透析液中 MTX 濃度の適用後 12 時間までの経時変化を Fig. 21 に示す。グラフには得られた MTX 濃度の平均値 ± 標準偏差を示している。

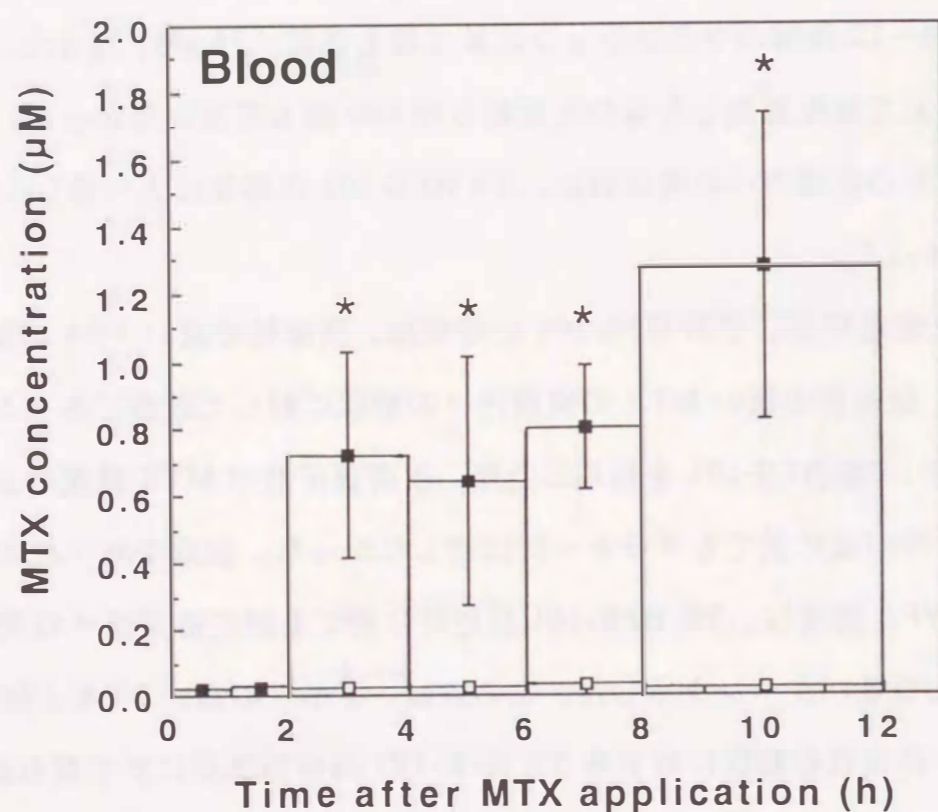


Fig. 21. MTX Concentration-Time Profiles in the Dialysate Collected from Blood after Dermal Application of MTX (2.5 mM) with (■) or without (□) 3% HPE-101 in Rats
Data represent the mean ± S.D., n=4-5.
Significantly different from the control: * p<0.02.

MTX を単独で経皮適用した場合に於ても、血中から回収された 0~12 時間までの全透析フラクションで MTX が検出された。しかし、血中での MTX 濃度は、適用直後から 12 時間低値を示し、経皮適用 8~12 時間のフラクション値に於ても 0.03 µM であった。本論文の *in vivo* 経皮吸収実験により、MTX 単独の経皮適用では、MTX は全身循環血中へほとんど移行しないことが示唆された。一方、3% HPE-101 を併用した場合、血中から回収された透析液中 MTX 濃度の上昇は、経皮適用後 0~2 時間までは認められなかったが、2 時間以降のフラクションに於ては有意に認められた (p<0.02)。血中 MTX 濃度は、その皮膚内濃度の上昇と同様に 3% HPE-101 の併用によって上昇し、8~12 時間の透析フラクション値は非併用時に比べ約 43 倍有意に高値 (1.3 µM) を示した。臨床使用に於て MTX の治療域は 1 µM 前後であるが、3% HPE-101 を併用した場合、経皮的適用であっても MTX 濃度が治療域レベルにまで達したことは興味深い知見といえる。

以上の結果より、脂溶性の低い MTX の経皮吸収性も 3% HPE-101 の併用によって著しく改善されることが、*in vivo* 経皮マイクロダイアリス法により皮膚内 MTX 濃度変化を直接測定することによって明らかにできた。更に、経皮吸収促進剤としての HPE-101 の効果は、脂溶性の高い VPA より、脂溶性の低い MTX の経皮吸収に対して顕著であることが示唆された。また、MTX 経皮適用時の血中 MTX 濃度を血中マイクロダイアリス法により同時に測定することによって、HPE-101 を併用した局所適用時には、血中 MTX 濃度が治療域レベルにまで上昇可能であることがわかった。

ところで、乾癬は遺伝的素因をもった人に各種の環境要因が加わって発熱する再熱性の皮膚疾患であり、治療には通常ステロイド剤が用いられるが、重症の全身膿疱性乾癬等の場合には、ステロイド抵抗性を示し難治性となる。この重症型乾癬の治療に MTX が使用されている⁸¹⁾。Fry ら⁸⁷⁾ は、MTX 投与後の全身性副作用軽減を目的に、乾癬患者への MTX 経皮適用を試み、9 例中 7 例に有効性

が認められたと報告している。一方、本章の冒頭にも述べた VanScott ら⁸²⁾は乾癬患者への MTX 経皮適用を試みたが無効であったと報告している。本論文でも、MTX を経皮適用する際、吸収促進剤を併用しない場合は MTX の皮膚内及び血中濃度は極めて低いことが明らかとなった。上述の2つの臨床報告の矛盾に関して、VanScott らのケースでは、試験条件その他の要因により皮膚からの MTX の吸収率が低く、治療効果が現われなかったものと考えられる。

本論文では、通常、経皮吸収され難い MTX の経皮吸収性が HPE-101 の併用により著しく改善されることを認めた。本知見は、皮膚刺激性のない適当な経皮吸収促進剤を併用すれば、乾癬に対して MTX が経皮的に適用可能であることを示唆している。

第2節 小括

ラットに於ける MTX の経皮吸収動態に対する吸収促進剤 HPE-101 の併用効果を、経皮及び血中マイクロダイアリス法を用いて、皮膚内 MTX 濃度と全身血中 MTX 濃度の変化から併せて検討した。

その結果、MTX 単独で経皮適用した場合には、MTX の皮膚内及び血中濃度は極めて低いこと。しかし VPA の場合と同様、添加濃度 3% の HPE-101 を併用した MTX の経皮適用の際には、MTX の皮膚内への吸収量が著しく増大し、血中 MTX 濃度が治療域レベルにまで上昇可能であることがわかった。更に、脂溶性の低い MTX の経皮吸収性は、3% HPE-101 の併用によって脂溶性の高い VPA の経皮吸収性に比べ顕著に改善されることが示された。

本論文では、通常、経皮吸収され難い MTX の経皮吸収性が HPE-101 の併用により著しく改善されることを明らかとし、皮膚刺激性のない適当な経皮吸収促進剤を併用すれば、乾癬に対する MTX の経皮適用が有効である可能性を証明することができた。

第3節 実験の部

1 試料ならびに試薬

MTX は日本レダリーより、HPE-101 は前述（第2章の第4節、1）と同様に久光製薬より供与されたものを使用した。MTX の FPIA 用試薬セットはダイナボットより購入した。リン酸一ナトリウム（無水）、リン酸二ナトリウム（無水）及び EtOH は前述（第2章の第4節、1）と同様なものを使用した。また、ウレタン、リンゲル液及び水は前述（第1章の第6節、1）と同様なものを使用した。

2 実験動物

前述（第1章の第6節、2）と同様な Wistar 系雄性ラットを用いた。

3 マイクロダイアリス装置

前述（第2章の第4節、3）と同様なマイクロダイアリス装置を用いた。

4 MTX の定量

MTX は TDX アナライザー（Abbott 製）を用いた FPIA 法⁸⁸⁾により定量した。蛍光化された MTX は励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm で測定した。

5 *In vitro* 回収率実験

サンプルチューブを MTX のリンゲル溶液（25 μ M）1.5 ml で満たし、温度を 37 $^{\circ}$ C に保持した後、その中に流速 1.0 μ l/min で灌流中の透析プローブを挿入した。挿入 1 時間後から透析液を 30 分間隔で 3 サンプル採集すると同時に、透析液サンプリング時間の間中点に於て、サンプルチューブより 30 μ l の試料を採取し、得られた試料を適用に希釈して MTX 濃度を測定した。

MTX の *in vitro* 回収率は下記の式から算出した。

$$\text{In vitro 回収率 (\%)} = \frac{\text{透析液中 MTX 濃度}}{\text{リンゲル溶液中 MTX 濃度}} \times 100$$

6 *In vivo* マイクロダイアリシス実験

6.1 投与薬液

MTX 溶液はリン酸緩衝液 (pH 5) と EtOH を 2:3 の割合で混合した 60% (v/v) EtOH 溶液を用い 2.5 mM になるように調製した。HPE-101 添加 MTX 溶液の場合は、更に 0.75%、1.5%、2.25% または 3% (w/v) 濃度になるように HPE-101 を加え調製した。

6.2 経皮及び血中マイクロダイアリシス実験

ラットをウレタン 1.5 g/kg の腹腔内投与による麻酔下、腹部皮毛を電気バリカン (動物用 900 型) で除毛した後、前述 (第 1 章の第 6 節、6.3) の方法により、IV ガイドを用いて流速 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流中の透析プローブをラットの頸静脈に挿入した。次いで、第 2 章の第 1 節に述べた方法により、L 字型経皮用ガイドカニューレを用いて流速 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流中の別の透析プローブをラットの皮膚内へ埋め込んだ。皮膚内へ透析プローブ埋め込み完了後、自製のガラスリザーバー (内径 20 mm) をアロンアルファ A (三共製) にて腹部に装着し、1 時間後に薬液 2 ml を充填した。薬液適用後 12 時間まで、透析液を経時的 (0~1 時間、1~2 時間、2~4 時間、4~6 時間、6~8 時間 及び 8~12 時間) に亘り皮膚内及び血中より同時に回収し、MTX 濃度を測定した。

皮膚内 MTX 量に対する HPE-101 の添加濃度の影響検討の場合は、経皮マイクロダイアリシス実験のみ行った。皮膚内へ透析プローブ埋め込み完了 1 時間後、濃度の異なる HPE-101 (0%、0.75%、1.5%、2.25% 及び 3%) を添加した MTX の 60% EtOH 溶液 2 ml をガラスリザーバーに充填し、薬液適用後 10 時

間までの透析液を採集し、MTX 濃度を測定した。

7 統計処理

得られた実験値の有意差の検定は Mann-Whitney の *U* 検定を使用した。

第4章 マイクロダイアリス法を用いた家兎に於ける valproate (VPA) の *in vivo* 血漿蛋白結合の検討^{70, 89)}

生体に投与された大部分の薬物は、種々の生体内蛋白質、特に血清アルブミンと結合性を有しており、一般的に薬物の薬理効果と副作用は蛋白と結合していない非結合型薬物濃度と関係すると考えられている。従って、医薬品の生体内動態を検討する場合には、その血漿蛋白との結合性を定量的に評価することが重要である^{17, 18)}。

現在、薬物の血漿蛋白結合を検討する目的で一般的に用いられている実験法は、平衡透析法と限外ろ過法であるが⁹⁰⁻⁹⁶⁾、前者は、平衡に達するまで長時間を要するため蛋白変性の可能性があり、また不安定な薬物の測定には適さないという欠点を有している¹⁷⁾。一方、後者も、比較的短時間で結合の測定が可能であるという利点を有してはいるが、ろ過中の試料容積の減少に伴う蛋白濃度の上昇により、結合平衡のずれが生じる危険性が指摘されている¹⁷⁾。加えて、上述の実験法は、厳密には *in vivo* の条件下で、直接的かつ連続的に血漿中非結合型薬物濃度を定量できる手法とはいえない。

これに対してマイクロダイアリス法は、序論で触れた如く、透析プローブを血管中に挿入することによって、血漿中の非結合型薬物のみを回収できる *in vivo* サンプリング法であり、1) 実験動物を屠殺せずに1個体から経時的に多数の試料が採取できる。2) 試料採取時に血液の損失がない。3) 得られた試料中には酵素の混入がなく、試料サンプル中での代謝による量的変化が認められない。4) 試料のクリーンアップ操作を必要とせず、直接分析機器に適用できる等の利点を有しているため、薬物-血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法としての適用が期待できる。

マイクロダイアリス法を血漿中遊離薬物濃度の *in vivo* 定量法として用いる際には、まず被験薬物の透析プローブからの回収率を測定し、その値に基づき、

血漿中に於ける薬物濃度を補正算出する必要がある。最近、Scottら²⁵⁾は、acetaminophenの血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法として、本マイクロダイアリス法が有用であることを報告しているが、*in vivo* に於ける acetaminophenの透析プローブからの回収率は、リンゲル液を用いた簡便な *in vitro* 実験により算出しているにすぎない。しかし、*in vitro* 実験により得られる薬物回収率は、必ずしも *in vivo* に於ける薬物回収率を正確に反映するものではないことが示唆されている⁵⁷⁻⁶¹⁾。

このような背景の下、本章では、マイクロダイアリス法の薬物-血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法としての有用性を確立することを目的に、家兎に於けるVPAの血漿蛋白結合をモデルとして、VPAの *in vitro* 回収率に対する種々の実験条件の影響を精査し、マイクロダイアリス法によって血漿中遊離VPA濃度を定量する場合の最適な *in vitro* 回収率の算出条件について検討した。更に、得られた回収率を基に、マイクロダイアリス法によるVPAの *in vivo* 血漿蛋白結合率を算出し、その結果を限外ろ過法から得られた結果と比較したので以下に詳述する。

第1節 1次消失モデル実験装置を用いた透析プローブからのVPAの *in vitro* 回収率の検討

マイクロダイアリス法によってサンプリングされた薬物が、透析プローブの透析膜と吸着するか否かは、マイクロダイアリス実験を行う場合に考慮すべき問題の一つである。この吸着性の問題は、VPAの様な脂溶性の高い薬物に於ては特に重要と考えられる。ここでは、まずこの吸着性の問題について検討するため、1次消失過程を示す *in vitro* 実験装置を構築し、1次消失過程に於けるVPAの濃度変化を透析プローブの透析膜を介して回収された透析液中のVPA濃度変化と比較した。

ビーカー中及び透析液中に於ける VPA の濃度変化を Fig. 22 (A) に示す。グラフには得られた VPA 濃度の平均値を示している。

1次消失過程を構築したビーカー中の VPA のリンゲル溶液に於ける VPA の消失速度定数は $0.46 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ($n=4$) であった。一方、透析液中に於ける VPA の濃度変化も 1次で消失し、その消失速度定数は $0.43 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ ($n=4$) であり、ほぼビーカー中での VPA の消失速度定数の値と一致した。もし、VPA と透析プロローブの透析膜間に吸着が存在すれば、両者の消失速度定数は異なってくるが、本実験に於て両者間には全く差が認められなかった。このことより、*in vitro* 状態に於ては VPA が透析プロローブの透析膜と吸着していないことを実証した。

Fig. 22 (A) に示した *in vitro* 1次消失実験の結果より、その実験時間内での透析プロローブからの VPA 回収率を計算した。その結果を Fig. 22 (B) に示すが、各々 VPA の *in vitro* 回収率は実験時間内に於てほぼ一定した値を示し、平均値は約 80% であった。

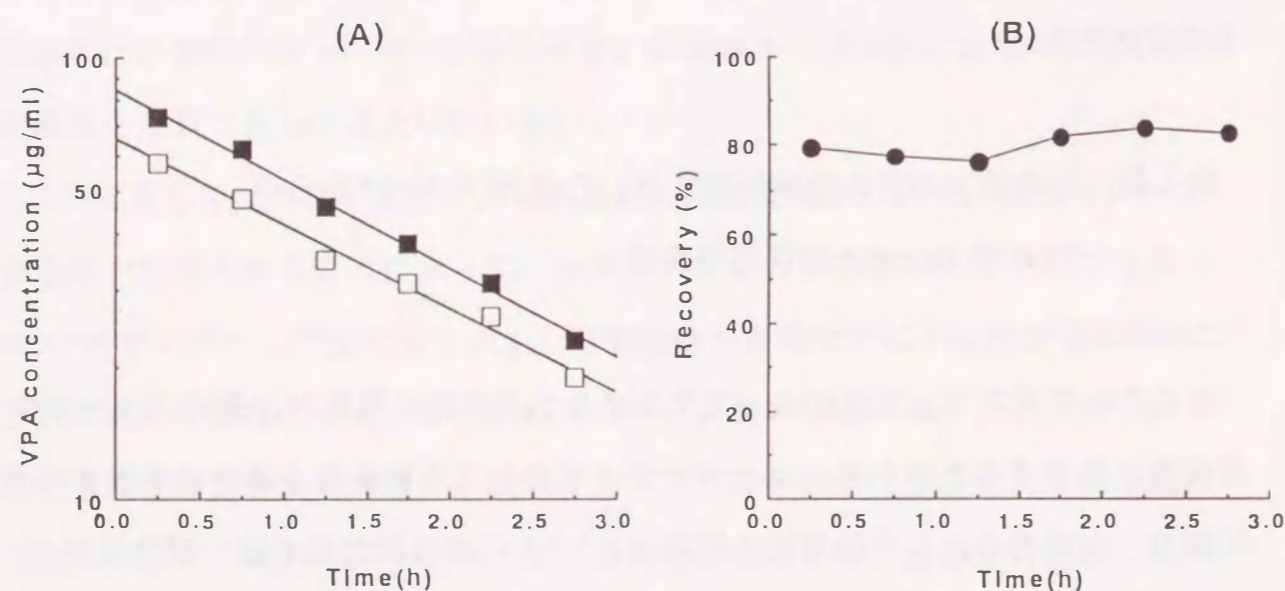


Fig. 22. Concentration-Time Profiles of VPA in Beaker (■) and in Dialysate (□) (A) *In Vitro* Relative Recovery of VPA (●) at Each Sampling Period (B) Points represent the mean, $n=4$.

以上の結果より、VPA をマイクロダイアリシス法を用いて *in vitro* でサンプリングした際、VPA は透析プロローブの透析膜と吸着することなく、濃度変化がある状態でも一定の回収率でサンプリングされることを実証した。このことから、VPA の様な脂溶性の高い薬物をサンプリングする際に於ても、マイクロダイアリシス法は有用なサンプリング手段となり得ることを認めた。

第2節 透析プロローブによる VPA の *in vitro* 回収率

マイクロダイアリシス法を VPA の血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法として用いるためには、本法によって血漿中遊離 VPA 濃度の正確な値を定量できることが重要となる。ここでは、VPA の *in vitro* 回収率に対する種々の実験条件の影響を精査し、マイクロダイアリシス法によって血漿中遊離 VPA 濃度を定量する場合の最適な *in vitro* 回収率の算出条件について検討した。

2-1 溶媒の影響

被験薬物の血漿中遊離濃度の補正算出を目的に、その *in vitro* 回収率を求める際、溶媒として汎用されているリンゲル液^{25, 27-28}、*in vivo* 実験に用いる家兎の血漿及び濃度の違う家兎血清アルブミン溶液 (1%、3%、4% 及び 5%) について、それぞれ透析プロローブからの VPA の *in vitro* 回収率を測定した。被験 VPA 溶液の濃度は全て 250 µg/ml とし、温度は 37 °C に設定した。また血流の動的状態を *in vitro* 状態で構築するために、小型の星状スターラーを用いて 700 rpm でよく攪拌し、本 *in vitro* 回収率実験を実施した。

上記実験条件下に於て、リンゲル液、家兎血漿ならびに 1%、3%、4% 及び 5% 家兎血清アルブミン溶液から求めた VPA の *in vitro* 回収率と、それぞれの溶液中の総 VPA 濃度に対する遊離 VPA 濃度の割合を表わす free fraction 値を

Table 5 に示す。

Table 5. *In Vitro* Relative Recovery of VPA by
a Microdialysis Probe

Matrix ^{a)}	n	Free fraction ^{b)}	Recovery ^{c)} (%)
Ringer's solution	14	1.00	34.3 ± 2.6
1% Albumin solution	5	0.72	33.1 ± 2.8 [#]
3% Albumin solution	6	0.32	26.9 ± 3.6 ^{*,#}
4% Albumin solution	6	0.22	25.2 ± 2.6 ^{*,#}
5% Albumin solution	6	0.11	25.7 ± 4.6 ^{*,#}
Plasma sample	14	0.44	15.8 ± 1.2 ^{**}

a) All VPA concentrations were adjusted to 250 µg/ml.
Each matrix was maintained at 37°C and well stirred at
700 rpm by a star headed stirrer.

b) The free fraction is the ratio of the free VPA
concentration to the total VPA concentration in each
matrix. Values represent the mean.

c) Values represent the mean ± S.D.
Significantly different from Ringer's solution: * p<0.01,
** p<0.001.

Significantly different from plasma sample: # p<0.01.

VPA の *in vitro* 回収率は、リンゲル液 > 家兔血清アルブミン溶液 > 家兔血漿の順で増大した。リンゲル液からの VPA の *in vitro* 回収率が 34.3% と最も高値を示したのに対して、家兔血漿からの VPA の *in vitro* 回収率は 15.8% と最も低く、リンゲル液を用いた場合と家兔血漿を用いた場合では、VPA の *in vitro* 回収率が有意に違うこと (p<0.001) が認められた。このことより、VPA の *in vitro* 回収率は、血清アルブミン等の膠質物質の存在による影響を受け、変化することがわかった。一方、家兔血清アルブミン溶液からの VPA の *in vitro* 回収率に関しては、アルブミン濃度が高くなるに従って、回収率が低下する傾向が認められた。しかし、添加濃度が 3% を超えた家兔血清アルブミン溶液に於ては、アルブミン濃度が高くなるに従って、溶液中の総 VPA 濃度に対する遊離 VPA 濃度の割合を表わす VPA の free fraction 値が減少していったにも拘わらず、VPA の *in vitro* 回収率はほとんど一定となり、その値は 25~27% であった。この結果は、添加濃度が 3% を超えた家兔血清アルブミン溶液からの VPA の *in vitro* 回収率は、アルブミン溶液中の VPA の *in vitro* 蛋白結合率の変動による影響を受けないことを示唆している。更に本研究では、各々家兔血清アルブミン溶液中での VPA の free fraction 値が、家兔血漿中での値と比較し大きく異なっていることが認められた。この家兔血清アルブミン溶液と家兔血漿に於て VPA の *in vitro* 蛋白結合率が異なる点については、平衡透析法により 4% ヒト血清アルブミン溶液とヒト血漿に於て VPA の *in vitro* 蛋白結合率が異なることを示した Albani ら^{9,5)} の報告と一致するところである。また、本 *in vitro* 回収率実験に用いた家兔血漿中のアルブミン濃度は 5% であったが、この家兔血漿中アルブミン濃度を参考に定めた 5% 家兔血清アルブミン溶液からの VPA の *in vitro* 回収率が 25.7% であったのに対して、家兔血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率は 15.8% と有意に低値 (p<0.01) を示した。本知見は、被験薬物の *in vitro* 回収率を求める際、溶媒選択が極めて重要であることを示唆するものである。

2-2 濃度、温度及び攪拌の影響

2-1に於て、VPAの *in vitro* 回収率が、回収率測定に用いた溶媒間で著しく異なることが明らかとなった。そこで、リンゲル液と家兎血漿について、更にVPA濃度、温度及び攪拌条件のVPAの *in vitro* 回収率に及ぶ影響を検討した。

温度 37 °C、攪拌回数 700 rpm の条件下で、250 µg/ml、125 µg/ml 及び 50 µg/ml の VPA 濃度に於てリンゲル液及び家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率を Table 6 に示す。なお Table には、それぞれの溶液中の総 VPA 濃度に対する遊離 VPA 濃度の割合を表わす free fraction 値を併せて示している。

Table 6. Effect of Concentration Range of VPA on Its *In Vitro* Relative Recovery by a Microdialysis Probe

Matrix ^{a)}	Concentration (µg/ml)	n	Free fraction ^{b)}	Recovery ^{c)} (%)
Ringer's solution	250	14	1.00 ^{d)}	34.3 ± 2.6 ^{d)}
	125	4	1.00	32.6 ± 0.9
	50	4	1.00	36.1 ± 3.3
Plasma sample	250	14	0.44 ^{d)}	15.8 ± 1.2 ^{d)}
	125	4	0.28	16.3 ± 0.8
	50	4	0.22	15.5 ± 0.8

a) Each matrix was maintained at 37°C and well stirred at 700 rpm by a star headed stirrer.

b) The free fraction is the ratio of the free VPA concentration to the total VPA concentration in each matrix. Values represent the mean.

c) Values represent the mean ± S.D.

d) Duplicated from Table 5.

いずれの溶媒に於ても、VPAの *in vitro* 回収率は、溶液中のVPA濃度変化による影響を受けないことを確認した。本知見は、本章の第1節に於て示されたマイクロダイアリシス法によるサンプリングは、VPAのリンゲル溶液からの一次消失に伴う濃度変化を正確に再現でき、VPAの *in vitro* 回収率はサンプリング時間内に於て一定であるとの結果とよく符合している。また、家兎血漿からのVPAの *in vitro* 回収率は、2-1に於て示された家兎血清アルブミン溶液からの *in vitro* 回収率の場合と同様、血漿中のVPAの *in vitro* 蛋白結合率の変動による影響を受けないことが示唆された。

VPA濃度 250 µg/ml、攪拌回数 700 rpm の条件下で、温度 37 °C、25 °C 及び 50 °C に於てリンゲル液及び家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率を Table 7 に示す。なお、家兎血漿中の総 VPA 濃度に対する遊離 VPA 濃度の割合を表わす free fraction 値は、いずれの温度に於てもほぼ一定 (0.44) であった。

Table 7. Effect of Temperature on *In Vitro* Relative Recovery of VPA by a Microdialysis Probe

Matrix ^{a)}	Recovery (%) ^{b)}		
	37°C	25°C	50°C
Ringer's solution	34.3 ± 2.6 ^{c)}	33.6 ± 2.5	40.5 ± 2.5*
Plasma sample	15.8 ± 1.2 ^{c)}	15.1 ± 1.2	17.4 ± 0.9

a) All VPA concentrations were adjusted to 250 µg/ml. Each matrix was well stirred at 700 rpm by a star headed stirrer.

b) Values represent the mean ± S.D., n=4-14.

c) Duplicated from Table 5.

Significantly different from 37°C: * p<0.05.

いずれの溶媒に於ても、温度 25 °C の時の VPA の *in vitro* 回収率は、温度 37 °C の時の回収率と比べた場合変化なかったが、温度 50 °C の時の VPA の *in vitro* 回収率は高くなる傾向が認められ、この傾向は、特にリンゲル液に於て顕著であった。

Benveniste^{5,7)} は、透析プローブからの $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の *in vitro* 回収率に対する温度の影響について検討し、温度を上昇させることによって $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の *in vitro* 回収率が有意に増大すると報告している。本論文の VPA の *in vitro* 回収率に於ても、37 °C からの温度低下時には変化が認められなかったものの、37 °C からの温度上昇時にはこれまでの報告と符合する変化が認められた。更に、VPA の *in vitro* 回収率の温度変化による影響は、溶媒として家兎血漿を用いた場合に比べ、リンゲル液を用いた場合に於て大きかった。

VPA 濃度 250 µg/ml、温度 37 °C の条件下で、攪拌回数 700 rpm、300 rpm 及び 0 rpm に於てリンゲル液及び家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率を Table 8 に示す。なお、家兎血漿中の総 VPA 濃度に対する遊離 VPA 濃度の割合を表わす free fraction 値はいずれの攪拌回数に於てもほぼ一定 (0.44) であった。

Table 8. Effect of Stirring Speed on *In Vitro* Relative Recovery of VPA by a Microdialysis Probe

Matrix ^{a)}	Recovery (%) ^{b)}		
	700 rpm	300 rpm	0 rpm
Ringer's solution	34.3 ± 2.6 ^{c)}	17.2 ± 4.8*	15.5 ± 2.6**
Plasma sample	15.8 ± 1.2 ^{c)}	13.3 ± 0.9*	13.0 ± 0.5*

a) All VPA concentrations were adjusted to 250 µg/ml.

Each matrix was maintained at 37°C.

b) Values represent the mean ± S.D., n=4-14.

c) Duplicated from Table 5.

Significantly different from 700 rpm: * p<0.01, ** p<0.001.

いずれの溶媒に於ても、攪拌回数を 700 rpm から 0 rpm へと減少することによって、VPA の *in vitro* 回収率は有意に低くなった。その減少率は、溶媒としてリンゲル液を用いた場合に於ては 34.3% から 15.5% への約 50% の著しい低下 (p<0.001) を示したのに対して、家兎血漿を用いた検討では 15.8% から 13.0% へ約 20% の低下 (p<0.01) を示したに止まった。VPA の *in vitro* 回収率の攪拌条件による影響は、温度変化による影響と同様に、溶媒として家兎血漿を用いた場合に比べリンゲル液を用いた場合に於て大きかった。この原因の一つとして、家兎血漿に於ては、血清アルブミン等の膠質物質が透析プローブの透析膜を介した灌流液中への VPA 分子の透過を妨げている可能性が考えられ、その結果 VPA の *in vitro* 回収率は攪拌条件の影響を受け難くなっていたものと推測される。また、どちらの溶媒に於ても、300 rpm という中間に位置する攪拌回数下での VPA の *in vitro* 回収率は、攪拌していない 0 rpm 時の回収率とさして変わらないという興味深い知見が得られた。

Scott ら²⁵⁾ は、マイクロダイアリシス法をラットの血漿中遊離 acetaminophen 濃度の *in vivo* 定量法として用いる際に、*in vivo* に於ける血流の動的状態に近い *in vitro* 実験系を構築する目的で、回転数 50 rpm の浸振条件下に於ける透析プローブからの acetaminophen の *in vitro* 回収率を検討し、リンゲル液及びラット血漿から求めた acetaminophen の *in vitro* 回収率は変わらなかったと報告している。また、theophylline の *in vitro* 回収率に関しても、Telting-Diaz ら²⁷⁾ により、同じ実験条件下に於ける同様な結果が報告されている。本論文の攪拌回数 700 rpm の条件下で求めた VPA の家兎血漿からの *in vitro* 回収率が、リンゲル液からの *in vitro* 回収率に比較し有意に低値 ($p < 0.001$) であったとする知見は、Scott ら²⁵⁾ 及び Telting-Diaz ら²⁷⁾ の報告とは異なっており注目される知見である。この原因の一つとして、Scott ら及び Telting-Diaz らにより求められた acetaminophen ならびに theophylline の *in vitro* 回収率は、透析プローブを浸している溶液の攪拌が不十分な状態で測定されていた可能性が推測される。

以上の結果より、マイクロダイアリシス実験に於ける透析プローブからの VPA の *in vitro* 回収率は、VPA 濃度変化による影響は受けないものの、回収率測定に用いる溶媒の種類、温度変化ならびに攪拌条件によって種々影響を受けることが明らかとなった。

第3節 血中濃度推移

家兎へ VPA 43 mg(0.3 mmol)/kg 静脈内投与後、耳介静脈より経時的に血液を採取すると同時に、家兎大腿静脈へ挿入しておいた透析プローブから血液透析液を採集し、VPA の体内動態を血液採取法と血中マイクロダイアリシス法により比較検討した。また、血液採取により得た血漿は2つに分け、1つからは総 VPA 濃度、1つからは限外ろ過により遊離 VPA 濃度を求めた。

家兎に於ける血漿中総 VPA 濃度、限外ろ液中遊離 VPA 濃度ならびに透析液中 VPA 濃度の経時変化を Fig. 23 に示す。グラフには得られた VPA 濃度の平均値 ± 標準偏差を示している。また、Table 9 には、Fig. 23 に示すそれぞれの VPA 濃度の時間的推移から求めた各薬物速度論的パラメーターの値を示す。

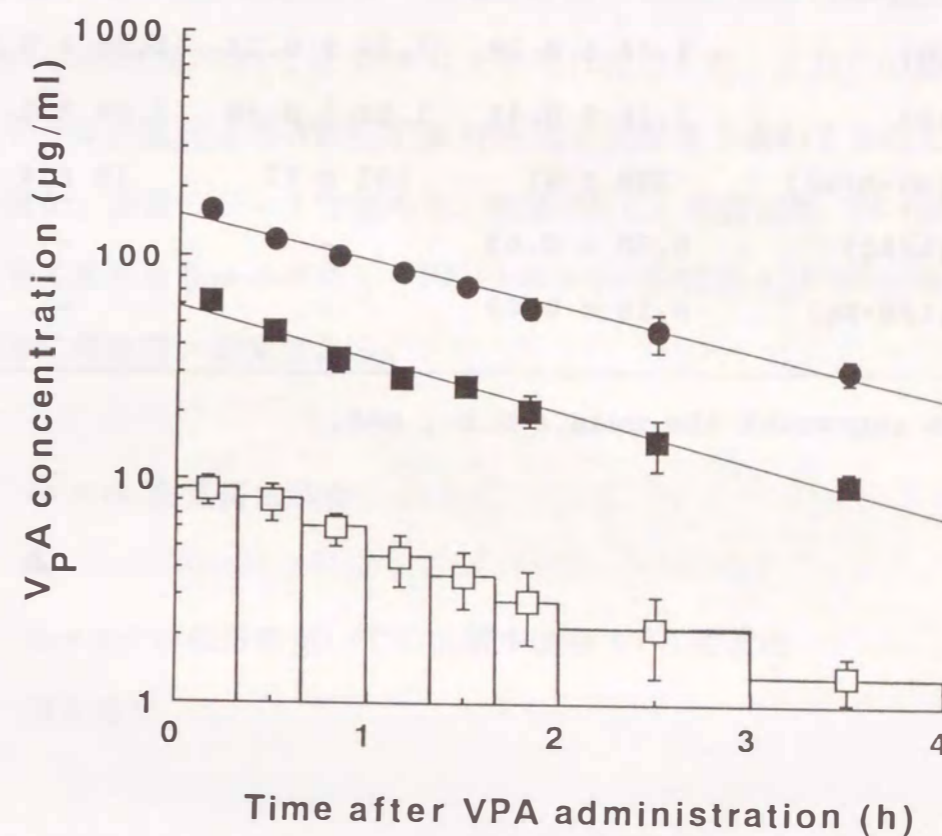


Fig. 23. Concentration-Time Profiles of Total VPA (●) in Plasma, Free VPA (■) in Ultrafiltrate and Free VPA (□) in Dialysate after I.V. Administration of VPA (43 mg/kg) to Rabbits. Data represent the mean ± S.D., n=5.

Table 9. Pharmacokinetic Parameters of Total VPA in Plasma, Free VPA in Ultrafiltrate and Free VPA in Dialysate after I.V. Administration of VPA (43 mg/kg) to Rabbits

Parameter	Total VPA in plasma	Free VPA in ultrafiltrate	Free VPA in dialysate
Co ($\mu\text{g/ml}$)	157 \pm 15	61 \pm 3	10 \pm 3
T _{1/2} (h)	1.44 \pm 0.28	1.22 \pm 0.21	1.09 \pm 0.22
MRT (h)	2.14 \pm 0.41	1.82 \pm 0.30	1.64 \pm 0.31
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	308 \pm 41	103 \pm 17	15 \pm 4
V _{ss} (L/kg)	0.30 \pm 0.03	-	-
CL (L/h·kg)	0.14 \pm 0.02	-	-

Values represent the mean \pm S.D., n=5.

得られた VPA 濃度は、全て 1 コンパートメントモデルによる消失パターンを示した。本知見は、Bourin ら⁹⁷⁾ が家兎へ VPA を静脈内投与することによって得た血中からの VPA の消失パターンとよく符合している。

限外ろ液中遊離 VPA 濃度と透析液中 VPA 濃度を薬物速度論的パラメーターから比較してみると、消失半減期 (T_{1/2}) ならびに平均滞留時間 (MRT) は、ほぼ一致する値を示した。一方、初期 VPA 濃度 (Co) と VPA 濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、両者間で大きく異なり、透析液中 VPA 濃度の Co ならびに AUC の値は、限外ろ液中遊離 VPA 濃度のそれらの値と比較した場合、Co については 16%、AUC については 15% にそれぞれ相当した。これらの値は、マイクロダイアリシス法による VPA の *in vivo* での回収率を表わすものであるが、これらの値が、前節の 2-1 で述べた、温度 37 °C、攪拌回数 700 rpm の実験条件下に於て家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率 (15.8%) と一致したことは非常に興味深い結果である。

第 4 節 *In vivo* 血漿蛋白結合

4-1 *In vitro* 回収率を用いての血漿中遊離 VPA 濃度の補正算出

前節に於てマイクロダイアリシス法により得た透析液中 VPA 濃度のデータから血漿中遊離 VPA 濃度を求めるため、第 2 節の 2-1 で述べた、温度 37 °C、攪拌回数 700 rpm の実験条件下に於て各種溶媒から求めた VPA の *in vitro* 回収率に基づき、家兎の血漿中遊離 VPA 濃度の補正算出を行った。

リンゲル液、5% 家兎血清アルブミン溶液ならびに家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率に基づき、透析液中 VPA 濃度から補正算出した血漿中遊離 VPA 濃度の経時変化を、Fig. 23 で示した限外ろ液中遊離 VPA 濃度の経時変化

と併せて Fig. 24 に示す。グラフには得られた VPA 濃度の平均値 ± 標準偏差を示している。

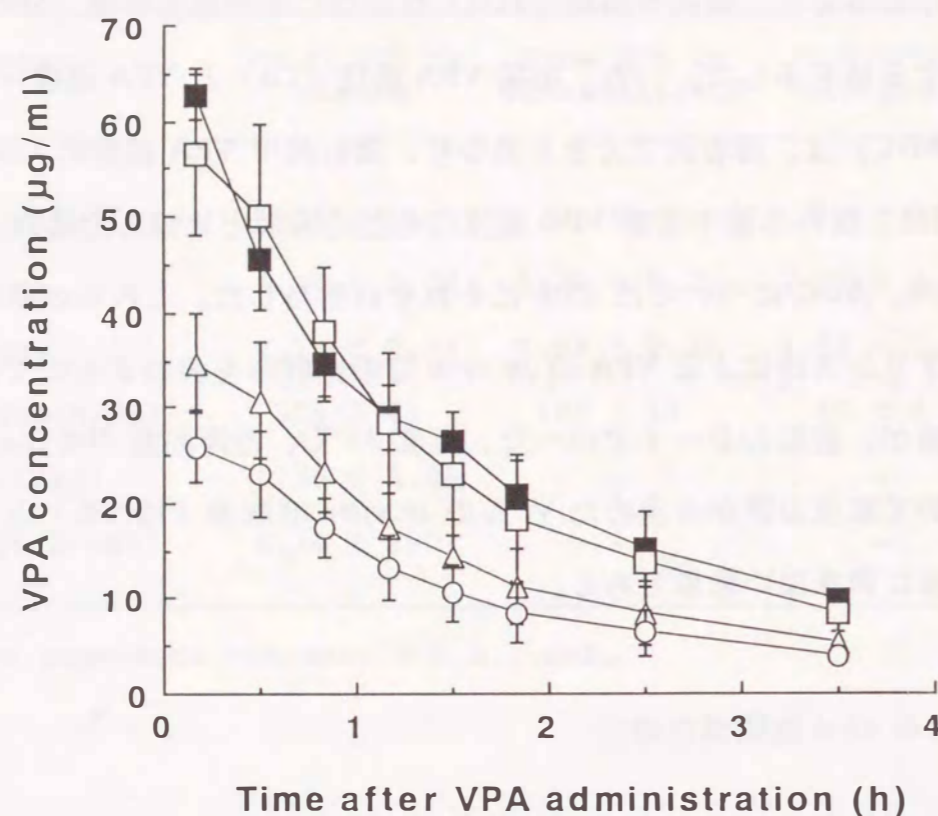


Fig. 24. Concentration-Time Curves for VPA in Ultrafiltrate and Calculated VPA in Dialysate Adjusted by Each *In Vitro* Relative Recovery after I.V. Administration of VPA (43 mg/kg) to Rabbits
Points represent the mean ± S.D., n=5.
■:VPA in ultrafiltrate, □:VPA calculated by *in vitro* relative recovery from plasma sample (15.8 ± 1.2 %),
△:VPA calculated by *in vitro* relative recovery from 5% albumin solution (25.7 ± 4.6 %), ○:VPA calculated by *in vitro* relative recovery from Ringer's solution (34.3 ± 2.6 %).

家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率 (15.8%) を用いて補正した血漿中遊離 VPA 濃度推移は、限外ろ過法によって得られた血漿中遊離 VPA 濃度推移と極めてよい一致を示した。一方、リンゲル液または 5% 家兎血清アルブミン溶液から求めた VPA の *in vitro* 回収率を用いて、血漿中遊離 VPA 濃度の補正算出を行った場合は、それらの推移は限外ろ過法によって得られた血漿中遊離 VPA 濃度推移とは一致せず、いずれも低くなる傾向が示された。

4-2 VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率

4-1 の Fig. 24 に示す血漿中遊離 VPA 濃度推移から求めた AUC の値に基づき、家兎に於ける VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率を、限外ろ過法ならびにマイクロダイアリシス法によってそれぞれ算出し比較した。

限外ろ過法によって得られた家兎に於ける VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は $66.6 \pm 2.7\%$ であった。一方、マイクロダイアリシス法によって得られた家兎に於ける VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は、家兎血漿から求めた VPA の *in vitro* 回収率 (15.8%) を用いて血漿中遊離 VPA 濃度を補正算出した場合には $69.2 \pm 6.9\%$ と計算され、限外ろ過法によって得られた結果とほぼ同値を示した。しかし、リンゲル液から求めた VPA の *in vitro* 回収率 (34.3%) ならびに 5% 家兎血清アルブミン溶液から求めた VPA の *in vitro* 回収率 (25.7%) を用いて、血漿中遊離 VPA 濃度の補正算出を行った場合には、VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は、それぞれ $85.7 \pm 3.2\%$ ならびに $81.2 \pm 4.2\%$ と計算され、限外ろ過法によって得られた値と比較した場合、顕著に高くなる傾向が認められた。

以上の結果より、マイクロダイアリシス法を家兎の血漿中遊離 VPA 濃度の *in vivo* 定量法として用いる目的で、被験 VPA の *in vitro* 回収率を測定する場合には、回収率算出時の *in vitro* 実験条件が極めて重要な意義をもち、家兎血漿を試料として、温度 37 °C、攪拌回数 700 rpm の実験条件下で求めた VPA の

in vitro 回収率が最適であることがわかった。更に、同 *in vitro* 回収率を基に、マイクロダイアリス法により求めた家兎に於ける VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は、限外ろ過法から求めた結果とほぼ一致することを実証した。

第5節 小括

薬物-血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法としてのマイクロダイアリス法の有用性を確立することを目的に、家兎に於ける VPA の血漿蛋白結合をモデルとして、家兎の血漿中遊離 VPA 濃度を *in vivo* 定量する際の最適な透析プローブからの VPA の *in vitro* 回収率の算出条件について検討した。更に、VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率に関して、マイクロダイアリス法から得られた結果を限外ろ過法から得られた結果と比較した。

その結果、家兎血漿を試料として、温度 37 °C、攪拌回数 700 rpm の実験条件下で算出した VPA の *in vitro* 回収率が、*in vivo* に於ける VPA 回収率とほぼ一致することがわかった。更に、同 *in vitro* 回収率を用いて算出した家兎に於ける VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は 69.2% で、限外ろ過法によって得られた VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率、66.6% と極めて近いことを認めた。

本論文では、マイクロダイアリス法を血漿中遊離薬物濃度の *in vivo* 定量法として用いる目的で、被験薬物の *in vitro* 回収率を測定する際には、回収率算出時の *in vitro* 実験条件が極めて重要な意義をもち、その場合は、実験に用いる動物の血漿を試料として、温度 37 °C、よく攪拌した状態（例えば 700 rpm）の実験条件下に於て、被験薬物の *in vitro* 回収率を測定することが重要であることを立証した。更に、マイクロダイアリス法を血漿中遊離薬物濃度を *in vivo* 定量する実験法として用いる場合には、絶対量を検討する実験法としても十分適用可能であることがわかり、本マイクロダイアリス法が、薬物-血漿蛋白結合研究に於ける *in vivo* 実験法として有用であることを証明できた。

第6節 実験の部

1 試料ならびに試薬

VPA に関しては前述（第2章の第4節、1）と同様に協和発酵工業より供与された VPA ナトリウム塩を用いた。家兎血清アルブミンの Fraction V は Sigma より購入した。アルブミン自動分析装置用試薬は和光純薬より購入したのものを用いた。ヘパリンに関しては小玉より購入したヘパリンナトリウム注射液を用いた。リン酸一ナトリウム（無水）、リン酸二ナトリウム（無水）及び VPA の FPIA 用試薬セットは前述（第2章の第4節、1）と同様なものを使用した。また、ウレタン、リンゲル液及び水は前述（第1章の第6節、1）と同様なものを使用した。

2 実験動物

雄性日本白色種家兎（体重 3.0~3.2 kg）を用いた。

3 マイクロダイアリス装置

前述（第2章の第4節、3）と同様なマイクロダイアリス装置を用いた。ただし、灌流液の流速は、1次消失モデル実験装置による回収率測定の場合には 1.0 μ l/min、その他の場合には 4.0 μ l/min とした。

4 VPA の定量

前述（第2章の第4節、4）と同様な方法で定量した。

5 限外ろ過法

家兎血漿及び家兎血清アルブミン溶液中の遊離 VPA 濃度の測定は限外ろ過法を用いて行った。VPA を含む血漿またはアルブミン溶液 300 μ l をウルトラフリ

— C3 (LGC 型：分画分子量 10,000) に充填し、3,500 rpm で 30 分間遠心分離した後、得られた限外ろ液中の VPA 濃度を前述の FPIA 法にて測定した。

6 家兎血漿中アルブミン濃度の測定

ブロムクレゾールグリーン法に基づいた自動分析装置 (クリナライザー RX-40、日本電気製) により測定した。なお測定は長崎大学医学部附属病院検査部で実施した。

7 *In vitro* 実験

7.1 1次消失モデル実験装置による VPA の回収率測定

後藤ら^{9,8)}の報告を参考に、枝付きビーカー (500 ml) 及びペリスタポンプ (RP-NE1、古江サイエンス製) を用いて *in vitro* 1次消失モデル実験装置を組み立てた。装置の概略を Fig. 25 に図示する。

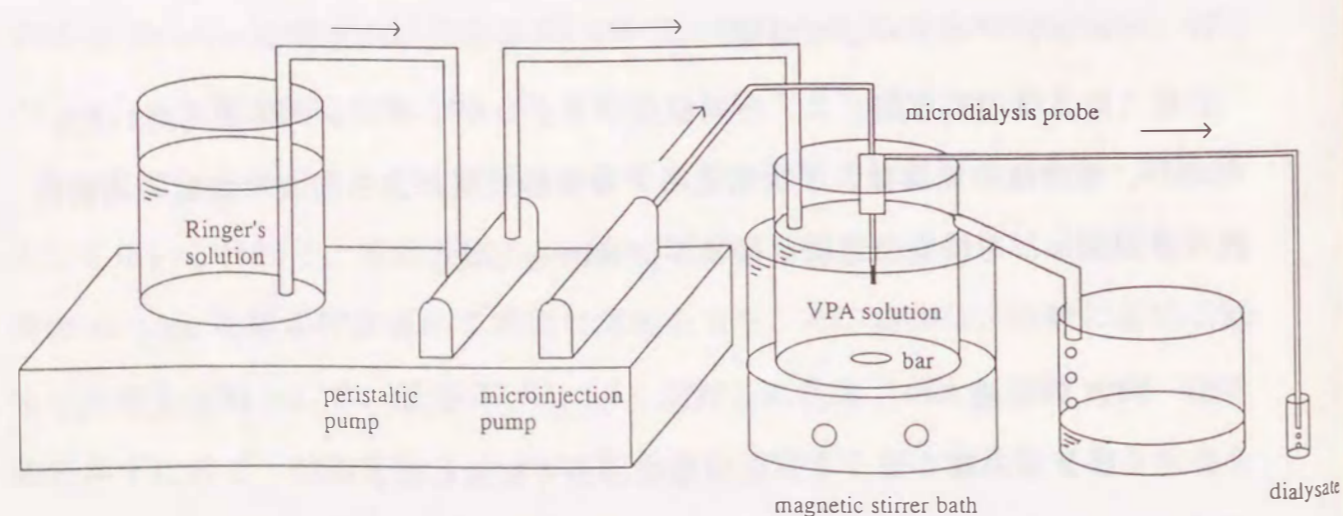


Fig. 25. Scheme of the Apparatus Used for the *In Vitro* Experimental First-Order Elimination System

既知濃度に調製した VPA のリンゲル溶液 (0.6 mM) を枝付きビーカーに満たし、流速 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流中の透析プローブをその中に挿入した。挿入 1 時間後、別のビーカーよりリンゲル液をペリスタポンプを用いて 2.5 ml/min の一定流速で枝付きビーカー中に注入した。注入後、30 分毎に 3 時間に亘って透析液をサンプル管に補集すると同時に、透析液サンプリング時間の中間点に於て、枝付きビーカーより 30 μl の試料を採取し、得られた試料を 2 倍に希釈した後 VPA 濃度を測定した。本実験中は枝付きビーカー中 VPA 溶液の温度は 37 $^{\circ}\text{C}$ に保ち、スターラーを用い攪拌した。

7.2 家兎血漿、家兎血清アルブミン溶液ならびにリンゲル液からの VPA 回収率測定実験

ウォーターバスをホットスターラー (HM-15G 型、小池製) に組み合わせた自製の装置に円筒形の小型のビーカー (15 ml 容量) を固定し、小型の星状マグネチックスターラーを用いてビーカー中溶液の攪拌回数と温度を任意に設定した。家兎血漿は、ヘパリン処理した注射筒を用い採血した血液サンプルを採血後直ちに 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し分取したものを用いた。家兎血清アルブミン溶液は、家兎血清アルブミンの Fraction V を 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、それぞれ 1%、3%、4% ならびに 5% 濃度になるように調製した。リンゲル液は pH を 7.4 に調整して用いた。VPA 濃度は、家兎血漿ならびにリンゲル液の場合それぞれ 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製し、家兎血清アルブミン溶液の場合 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製した。温度は 37 $^{\circ}\text{C}$ を基本条件とし、別途温度による影響を 25 $^{\circ}\text{C}$ と 50 $^{\circ}\text{C}$ で検討した。攪拌回数はよく攪拌された状態であった 700 rpm を基本条件とし、別途 300 rpm と 0 rpm でも検討した。

既知濃度の VPA 溶液 15 ml を上述の小型のビーカーに満たし、それぞれに設定した温度ならびに攪拌条件下、流速 4.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流中の透析プローブを挿入した。挿入 1 時間後から透析液を 20 分間隔で 3 サンプル採集すると同時に、透

析液サンプリング時間の中間点に於て、ビーカーより家兎血漿ならびに家兎血清アルブミン溶液の場合は 400 μ l、リンゲル液の場合は 80 μ l の試料を採取した。家兎血漿及び家兎血清アルブミン溶液から採取した試料は更に 2 つに分け、1 つは前述の方法で限外ろ過した。得られた試料からリンゲル液中 VPA 濃度、家兎血漿中 VPA 濃度、家兎血清アルブミン溶液中 VPA 濃度、限外ろ液中 VPA 濃度ならびに透析液中 VPA 濃度をそれぞれ測定した。

VPA の free fraction 値はリンゲル液の場合 1.00 であったが、家兎血漿及び家兎血清アルブミン溶液の場合は下記の式から算出した。

$$\text{Free fraction 値} = \frac{\text{限外ろ液中 VPA 濃度}}{\text{血漿またはアルブミン溶液中 VPA 濃度}}$$

VPA の *in vitro* 回収率は下記の式から算出した。

リンゲル液の場合は、

$$\text{In vitro 回収率 (\%)} = \frac{\text{透析液中 VPA 濃度}}{\text{リンゲル液中 VPA 濃度}} \times 100$$

家兎血漿及び家兎血清アルブミン溶液の場合は、

$$\text{In vitro 回収率 (\%)} = \frac{\text{透析液中 VPA 濃度}}{\text{限外ろ液中 VPA 濃度}} \times 100$$

8 *In vivo* マイクロダイアリシス実験

8.1 投与薬液

VPA ナトリウム塩を生理食塩液に溶解し VPA として 43 mg(0.3 mmol)/ml になるように調製した。

8.2 血中マイクロダイアリシス実験

家兎をウレタン 1.5 g/kg の腹腔内投与による麻醉下、大腿部を切開して大腿静脈を暴露した。IV ガイド (Carnegie Medicin 製) を大腿筋に通しながら大腿静脈に挿入し、その IV ガイドを通して流速 4.0 μ l/min で灌流中の透析プローブを挿入した。透析プローブ挿入 1 時間後、薬液を 43 mg(0.3 mmol)/kg の投与量で耳介静脈より投与した。薬液投与後 240 分まで透析液を経時的 (0~20 分、20~40 分、40~60 分、60~80 分、80~100 分、100~120 分、120~180 分及び 180~240 分) に血中から回収すると同時に、透析液サンプリングの中間点に於て、投与した耳と反対の耳介静脈からヘパリン処理した注射筒を用い採血を行った。得られた血液サンプルは採血後直ちに遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) し、血漿を分取した後 2 つに分け、1 つは前述の方法で限外ろ過した。得られた試料から血漿中総 VPA 濃度、限外ろ液中遊離 VPA 濃度ならびに透析液中 VPA 濃度をそれぞれ測定した。

9 薬物速度論的解析

VPA 濃度は 1 コンパートモデルにより解析し、各パラメーターの算出には MULTI^{6,9)} を用いた。

血液採取実験により得られた VPA 濃度-時間曲線下面積 (AUC) は下記の式から算出した。

$$\text{AUC} = \int_0^n C_t dt + \frac{C_n}{K_e}$$

ここで、*t* は時間、*n* は最終サンプリング時間、*C_t* は時間 *t* での VPA 濃度、*C_n* は時間 *n* での VPA 濃度、*K_e* は消失速度定数を示す。

一方、マイクロダイアリス法により得られた薬物濃度は透析液を回収した一定時間内の平均濃度を示すので、この場合 AUC は下記の式から算出した。

$$AUC = \sum_{t=1}^n C_t \Delta t + \frac{C_n}{K_e}$$

総クリアランス (CL) は、 $CL = \text{dose} / AUC_T$ 式から算出した。ここで、 AUC_T は総 VPA 濃度の AUC を示す。

平均滞留時間 (MRT) と平衡分布容積 (V_{ss}) はモーメント解析により下記の式から算出した。

$$MRT = AUMC / AUC$$

$$V_{ss} = \text{dose} \cdot MRT / AUC$$

ここで、AUMC は VPA 濃度・時間-時間曲線下面積 (area under the moment curve) を示す。

VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は下記の式から算出した。

$$\text{in vivo 血漿蛋白結合率 (\%)} = \frac{AUC_T - AUC_F}{AUC_T} \times 100$$

ここで、 AUC_F は遊離 VPA 濃度の AUC を示す。

10 統計処理

得られた実験値の有意差の検定は Student の *t* 検定を使用した。

結論

著者は、マイクロダイアリス法を薬物動態の *in vivo* 実験法として評価すべく、L-dopa の脳内移行動態に対する AADC 阻害薬併用の影響、VPA ならびに MTX の経皮吸収動態に対する経皮吸収促進剤 HPE-101 の併用効果及び VPA の血漿蛋白結合を本法により種々検討した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

1) AADC 阻害薬である carbidopa ならびに benserazide を併用した際のラットに於ける L-dopa の血中及び線条体内での動態ならびに代謝をマイクロダイアリス法により *in vivo* で測定し、薬物速度論的に比較検討した。その結果、AADC 阻害薬併用時には、いずれも血中 L-dopa 量の増加に符合した線条体内 L-dopa 量の有意な増加が認められたが、benserazide は、臨床用量比の併用に於てはじめて carbidopa 併用時と同等の線条体内 L-dopa 量の上昇効果を示すこと。及び、carbidopa と benserazide は、同じ AADC 阻害薬でありながら、L-dopa の脳内移行性、血中及び線条体細胞外液中に於ける DA 動態には異なる作用を及ぼすことが認められた。以上、マイクロダイアリス法は、L-dopa 及び関連代謝物の脳内出現量を立ち上がりから消失まで、一匹の実験動物に於て *in vivo* で観察することを可能とし、中枢作用薬の脳内移行動態に関する相対的変化の比較検討を行える優れた特質を有することを実証した (第 1 章)。

2) マイクロダイアリス法による *in vivo* 経皮吸収実験法を新たに考案し、ラットに於ける VPA の経皮吸収動態を検討するとともに、吸収促進剤 HPE-101 の併用効果を *in vivo* で検討した。その結果、VPA の経皮吸収速度は 3% HPE-101 の併用により約 80 倍増大することを実証した (第 2 章)。

3) ラットに於ける MTX の経皮吸収動態に対する吸収促進剤 HPE-101 の併用効果を、経皮及び血中マイクロダイアリス法を用いて、皮膚内 MTX 濃

度と全身血中 MTX 濃度の変化から併せて検討した。その結果、MTX 単独で経皮適用した場合は、MTX の皮膚内及び血中濃度は極めて低値であったが、3% HPE-101 を併用した MTX の経皮適用の際には、MTX の皮膚内への吸収量が著しく増大し、血中 MTX 濃度は治療域レベルにまで上昇可能であること。及び、経皮吸収促進剤としての HPE-101 の効果は、脂溶性の高い VPA より脂溶性の低い MTX の経皮吸収に対して顕著であることを確認した（第3章）。

4) 薬物-血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法としてのマイクロダイアリシス法の有用性の確立を目的に、家兎に於ける VPA の血漿蛋白結合をモデルとして、家兎の血漿中遊離 VPA 濃度を *in vivo* 定量する場合の最適な透析プローブからの VPA の *in vitro* 回収率の算出条件について検討した。更に、VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率に関して、マイクロダイアリシス法と限外ろ過法から得られた結果を比較した。その結果、VPA の *in vitro* 回収率算出時の実験条件は極めて重要な意義をもち、家兎血漿を試料として、温度 37 °C、攪拌回数 700 rpm（よく攪拌した状態）の実験条件下で算出した VPA の *in vitro* 回収率が、*in vivo* に於ける回収率とほぼ一致すること。及び、同 *in vitro* 回収率を用いて算出した VPA の *in vivo* 血漿蛋白結合率は、限外ろ過法によって得られた結果と極めて近いことを認めた。以上、薬物-血漿蛋白結合の *in vivo* 実験法としてマイクロダイアリシス法を適用する場合には、被験薬物の正確な血漿中遊離濃度の定量が可能なことを立証し、絶対量の検討も十分可能であることを実証した（第4章）。

現在、病院薬剤師は、医療チームの一員としての位置付けが明確となり、直接患者と接し服薬指導を行い、薬物療法上の責任もより重くなっている状況にある。また、毎年、薬物療法の改善を目的とした新規医薬品が数多く臨床の場に供され、既存の医薬品との薬効比較や相互作用などを詳細に検討することがより重要となってきている。従って、医療現場に於ける薬剤師が、生体内に於ける医薬品間の薬効比較ならびに薬物相互作用を薬学的手法を用い実験的に検討することは非常に重要なことである。

マイクロダイアリシス法は、薬物の組織移行に及ぼす併用薬の影響または薬物相互作用などを検討する上で極めて有用な *in vivo* 実験法であり、医療薬学上の問題点を解明する手段としてこれからの応用が期待できる。

参考文献

- 1) 瀬崎仁編：ドラッグデリバリーシステム；新しい投与剤形を中心とした製剤学、南江堂、東京、1986
- 2) 瀬崎仁編：医薬品の開発、第13巻；薬物送達法、広川書店、東京、1989
- 3) 山岡清、谷川原祐介：マイコンによる薬物速度論入門、南江堂、東京、1983
- 4) 山岡清：マイコンによる薬物体内動態解析法、南江堂、東京、1984
- 5) K. Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 6, 547-558, 1978
- 6) D. J. Cutler : *J. Pharm. Pharmacol.*, 30, 476-478, 1978
- 7) W. A. Colburn : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 9, 367-368, 1981
- 8) W. F. Ebling, W. J. Jusko : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 14, 558-599, 1986
- 9) K. Yamaoka, M. Kanbe, Y. Toyoda, Y. Yano, T. Nakagawa : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 18, 545-559, 1990
- 10) Y. Yano, K. Yamaoka, H. Yasui, T. Nakagawa : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 19, 71-85, 1991
- 11) 粟津莊司、小泉保編：最新生物薬剤学、南江堂、東京、1991
- 12) K. B. Bischoff, R. L. Dedrick : *J. Pharm. Sci.*, 57, 1346-1351, 1968
- 13) G. R. Wilkinson, D. G. Shand : *Clin. Pharmacol. Ther.*, 18, 377-390, 1975
- 14) M. Rowland, L. Z. Benet, G. G. Graham : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 1, 123-136, 1973

- 15) K. S. Pang, M. Rowland : *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 5, 625-653, 1977
- 16) 杉山雄一：薬学雑誌, 109, 199-231, 1989
- 17) 花野学、梅村甲子郎、伊賀立二編：医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法、ソフトサイエンス社、東京、1985
- 18) 杉山雄一編：ファーマコキネティクス研究の方法と技術；前臨床から臨床第1相へ、日本薬物動態学会、東京、1993
- 19) J. M. R. Delgado, F. V. DeFeudis, R. H. Roth, D. K. Ryugo, B. M. Mitruka : *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 198, 9-21, 1972
- 20) U. Ungerstedt, C. Pycock : *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.*, 1278, 1-13, 1974
- 21) T. Zetterstrom, T. Sharp, C. A. Marsden, U. Ungerstedt : *J. Neurochem.*, 41, 1769-1773, 1983
- 22) J. Korf, C. Klein, K. Venema, F. Postema : *J. Neurochem.*, 50, 1087-1096, 1988
- 23) S. Consolo, C. F. Wu, F. Fiorentini, H. Ladinsky, A. Vezzani : *J. Neurochem.*, 48, 1459-1465, 1987
- 24) G. Damsma, B. H. C. Westerink, J. B. DeVries, C. J. VanDenBerg, A. S. Horn : *J. Neurochem.*, 48, 1523-1528, 1987
- 25) D. O. Scott, L. R. Sorenson, K. L. Steele, D. L. Puckett, C. E. Lunte : *Pharm. Res.*, 8, 389-392, 1991
- 26) Y. Saisho, T. Umeda : *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 808-810, 1991
- 27) M. Telting-Diaz, D. O. Scott, C. E. Lunte : *Anal. Chem.*, 64, 806-810, 1992
- 28) C. E. Lunte, D. O. Scott, P. T. Kissinger : *Anal. Chem.*, 63, 773A-780A, 1992

- 29) Y. Deguchi, T. Terasaki, H. Yamada, A. Tsuji : *J. Pharmacobio-Dyn.*, 15, 79-89, 1992
- 30) R. A. Yokel, D. D. Allen, D. E. Burgio, P. J. McNamara : *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 27, 135-142, 1992
- 31) T. Yano, N. Higo, K. Furukawa, M. Tsuji, K. Noda, M. Otagiri : *J. Pharmacobio-Dyn.*, 15, 527-533, 1992
- 32) M. Nakashima, M. Nakano, K. Matsuyama, M. Ichikawa : *Int. J. Pharm.*, 72, R5-R8, 1991
- 33) M. Nakashima, M. N. Nakashima, M. Matsumura, K. Matsuyama, M. Ichikawa : submitted in *J. Pharm. Pharmacol.*
- 34) W. H. Oldendorf : *Brain Res.*, 24, 372-376, 1970
- 35) S. I. Rapoport, W. A. Klee, K. D. Pettigrew, K. Ohno : *Science*, 207, 84-86, 1980
- 36) B. V. Zlokovic, D. J. Begley, B. M. Djuricic, D. M. Mitrovic : *J. Neurochem.*, 46, 1444-1451, 1986
- 37) B. V. Zlokovic, M. N. Lipovac, D. J. Begley, H. Davson, L. Radic : *J. Neurochem.*, 49, 310-315, 1987
- 38) B. V. Zlokovic, M. N. Lipovac, D. J. Begley, H. Davson, L. Radic : *J. Neurochem.*, 51, 252-257, 1988
- 39) B. V. Zlokovic, V. T. Susic, H. Davson, D. J. Begley, R. M. Jankov, D. M. Mitrovic, M. N. Lipovac : *Peptides*, 10, 249-254, 1989
- 40) B. V. Zlokovic, J. B. Mackic, B. M. Djuricic, H. Davson : *J. Neurochem.*, 53, 1333-1340, 1989
- 41) 永津俊治、永津郁子 : パーキンソン病 ; 病理化学の進歩、共立出版、東京、1981
- 42) 三須良実 : モダンメディシン, 16 (10), 34-39, 1987

- 43) 安藤一也 : 老年精神医学, 5, 365-370, 1988
- 44) 久野貞子 : 治療学, 22, 275-278, 1989
- 45) G. C. Cotzias, P. S. Papavasiliou, R. Gellene : *New Engl. J. Med.*, 280, 337-345, 1969
- 46) J. M. Cedarbaum, L. S. Schleifer : 「Drugs for Parkinson's disease, spasticity, and acute muscle spasms」, *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed.*, A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies, P. Taylor (eds), pp463-484, Pergamon Press, New York, 1990
- 47) J. J. Korten, A. Keyser, E. M. G. Joosten, F. J. M. Gabreels : *Eur. Neurol.*, 13, 65-71, 1975
- 48) H. Pakkenberg, E. Birket-Smith, E. Duponet, E. Hansen, B. Mikkelsen, J. Presthus, I. Rautakorpi, E. Riman, U. K. Rinne : *Acta Neurol. Scand.*, 53, 376-385, 1976
- 49) J. K. Greenacre, A. Coxon, A. Petric, J. L. Reid : *Lancet*, 2, 381-384, 1976
- 50) A. Lieberman, E. Estey, G. Gopinathan, T. Ohashi, A. Sauter, M. Goldstein : *Neurology*, 28, 964-968, 1978
- 51) U. K. Rinne, P. Molsa : *Neurology*, 29, 1584-1589, 1979
- 52) J. G. Nutt, J. H. Fellman : *Clin. Neuropharmacol.*, 7, 35-49, 1984
- 53) 久野貞子、藤竹純子、西谷裕 : 医療, 41, 445-450, 1987
- 54) P. T. Mannisto, S. Kaakkola : *Pharmacol. Toxicol.*, 66, 317-323, 1990
- 55) 印東利勝 : 神経内科, 22, 346-352, 1985
- 56) J. H. Wolf, L. Veenma-van Der Duin, J. Korf : *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 101-106, 1990

- 57) H. Benveniste : *J. Neurochem.*, 52, 1667-1679, 1989
- 58) H. Benveniste, A. J. Hansen, N. S. Ottosen : *J. Neurochem.*, 52, 1741-1750, 1989
- 59) P. M. Bungay, P. F. Morrison, R. L. Dedrick : *Life Sci.*, 46, 105-119, 1990
- 60) P. F. Morrison, P. M. Bungay, J. K. Hsiao, B. A. Ball, I. N. Mefford, R. L. Dedrick : *J. Neurochem.*, 57, 103-119, 1991
- 61) K. H. Dykstra, J. K. Hsiao, P. F. Morrison, P. M. Bungay, I. N. Mefford, M. M. Scully, R. L. Dedrick : *J. Neurochem.*, 58, 931-940, 1992
- 62) E. Acquas, E. Carboni, R. H. A. DeRec, M. Da Prada, G. Di Chiara : *J. Neurochem.*, 59, 326-330, 1992
- 63) S. Kaakkola, R. J. Wurtman : *J. Neurochem.*, 60, 137-144, 1993
- 64) S. Kaakkola, P. Tuomainen, R. J. Wurtman, P. T. Mannisto : *J. Neural Transm. (P-D Sect.)*, 4, 143-154, 1992
- 65) N. S. Sharpless, M. D. Muentner, G. M. Tyce, C. A. Owen : *Clin. Chem. Acta*, 37, 359, 1972
- 66) S. Rose, P. Jenner, C. D. Marsden : *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 325-330, 1991
- 67) G. Paxinos, C. Watson : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed., Fig.15, Academic Press, San Diego, 1986
- 68) マイクロダイアリシスの紹介、ビー・イー・エス出版、東京
- 69) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno : *J. Pharmacobio-Dyn.*, 4, 879-885, 1981
- 70) K. Matsuyama, M. Nakashima, M. Ichikawa, T. Yano, S. Satoh, S. Goto : *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1395-1398, 1994

- 71) 後藤茂編：生物薬剤学実験マニュアル、清至書院、東京、1985
- 72) R. S. Hinz, C. D. Hodson, C. R. S. Lorence, R. H. Guy : *J. Invest. Derm.*, 93, 87-91, 1989
- 73) K. B. Sloan, H. D. Beall, W. R. Weimar, R. Villanueva : *Int. J. Pharm.*, 73, 97-104, 1991
- 74) 町田良治 : *DDS*, 6, 5-11, 1991
- 75) 遠藤武男 : 日本薬剤師会雑誌, 46, 803-809, 1994
- 76) J. M. Ault, C. E. Lunte, N. M. Meltzer, C. M. Riley : *Pharm. Res.*, 9, 1256-1261, 1992
- 77) 中原大一郎、尾崎紀夫、永津俊治 : 薬物・精神・行動, 11, 1-16, 1991
- 78) T. Ogiso, Y. Ito, M. Iwaki, Y. Yamamoto, T. Yamahata : *J. Pharmacobio-Dyn.*, 10, 537-542, 1987
- 79) S. T. Wang, F. Peter : *Clin. Chem.*, 31, 493-494, 1985
- 80) K. Matsuyama, M. Nakashima, Y. Nakaboh, M. Ichikawa, T. Yano, S. Satoh : *Pharm. Res.*, 11, 684-686, 1994
- 81) 渡辺孝宏、土田哲也 : 日本病院薬剤師会雑誌, 29, 673-677, 1993
- 82) E. J. VanScott, R. P. Reinertson : *J. Invest. Derm.*, 33, 357-369, 1959
- 83) O. Chukwumerije, R. A. Nash, J. R. Matias, N. Orentreich : *J. Invest. Derm.*, 93, 349-352, 1989
- 84) M. Dohi, F. Kaiho, A. Suzuki, N. Sekiguchi, N. Nakajima, H. Nomura, Y. Kato : *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 2877-2879, 1990
- 85) M. Hori, S. Satoh, H. I. Maibach, R. H. Guy : *J. Pharm. Sci.*, 80, 32-35, 1991
- 86) K. Tojo, C. C. Chiang, Y. W. Chien : *J. Pharm. Sci.*, 76, 123-126, 1987

- 87) L. Fry, R. M. H. McMinn : *Arch. Derm.*, 96, 483-488, 1967
- 88) L. Slordal, P. S. Prytz, I. Pettersen, J. Aarbakke : *Ther. Drug Monit.*, 8, 368-372, 1986
- 89) M. Nakashima, N. Takeuchi, M. Hamada, K. Matsuyama, M. Ichikawa, S. Goto : *Biol. Pharm. Bull.*, in press
- 90) V. P. Shah, S. M. Wallace, S. Riegelman : *J. Pharm. Sci.*, 63, 1364-1367, 1974
- 91) J. Kurz, J. Trunk, B. Weitz : *Drug Res.*, 27, 1373-1380, 1977
- 92) J. Sophianopoulos, I. Jerkunica, C. N. Lee, D. Sgoutas : *Clin. Chem.*, 26, 159-162, 1980
- 93) J. B. Whitlam, K. F. Brown : *J. Pharm. Sci.*, 70, 146-150, 1981
- 94) F. Albani, R. Riva, G. Procaccianti, A. Baruzzi, E. Perucca : *Epilepsia*, 24, 65-73, 1983
- 95) F. Albani, R. Riva, M. Contin, A. Baruzzi : *Ther. Drug Monit.*, 6, 31-33, 1984
- 96) J. Barre, J. M. Chamouard, G. Houin, J. P. Tillement : *Clin. Chem.*, 31, 60-64, 1985
- 97) M. Bourin, J. Guenzet, P. Thomare, M. F. Kergueris, A. Ortega, C. Larousse : *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 5, 331-339, 1991
- 98) 後藤茂、岡利栄子、大賀良美 : *薬剂学*, 40, 226-232, 1980

付記

本研究は、次の論文をまとめたものである。

- 1) Mikiro Nakashima, Mihoko Nakano, Kenji Matsuyama, Masataka Ichikawa :
An Application of the Microdialysis System to the Pharmacokinetic Study
on Striatal Distribution of L-Dopa with or without Carbidopa in Rats,
Int. J. Pharm., 72, R5-R8, 1991. (第1章)
- 2) Mikiro Nakashima, Mihoko N. Nakashima, Mihoko Matsumura, Kenji
Matsuyama, Masataka Ichikawa : *In Vivo* Microdialysis for Pharmacokinetic
Investigations of L-Dopa in Blood and Striatum : Effect of Carbidopa or
Benserazide on L-Dopa Metabolism in Rats,
submitted in *J. Pharm. Pharmacol.* (第1章)
- 3) Kenji Matsuyama, Mikiro Nakashima, Masataka Ichikawa, Tadanori Yano,
Shuji Satoh, Shigeru Goto : *In Vivo* Microdialysis for the Transdermal
Absorption of Valproate in Rats,
Biol. Pharm. Bull., 17, 1395-1398, 1994. (第2章、第4章)
- 4) Kenji Matsuyama, Mikiro Nakashima, Yukiko Nakaboh, Masataka Ichikawa,
Tadanori Yano, Shuji Satoh : Application of *in Vivo* Microdialysis to
Transdermal Absorption of Methotrexate in Rats,
Pharm. Res., 11, 684-686, 1994. (第3章)
- 5) Mikiro Nakashima, Naoko Takeuchi, Motoko Hamada, Kenji Matsuyama,
Masataka Ichikawa, Shigeru Goto : *In Vivo* Microdialysis for
Pharmacokinetic Investigations : A Plasma Protein Binding Study of
Valproate in Rabbits,
Biol. Pharm. Bull., in press. (第4章)

謝辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御鞭撻、御校閲を賜りました九州大学薬学部 後藤 茂 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究は、長崎大学医学部附属病院薬剤部で行ったもので、本研究の機会を賜り、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました長崎大学医学部附属病院薬剤部長 市川正孝 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始直接の御指導、御鞭撻を賜りました長崎大学医学部附属病院薬剤部 松山賢治 助教授に心より深謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲を賜りました九州大学薬学部 野田敦子 助教授、九州大学薬学部 山本経之 助教授ならびに九州大学薬学部 湯川栄二 助教授に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたって、終始暖かい励ましと協力を頂いた長崎大学薬学部 中嶋弥穂子 教務職員に心より感謝致します。また、本研究遂行に際して、御協力頂いた中坊由起子、松村美穂子、竹内直子、濱田元子の諸氏に感謝致します。

HPE-101 を御提供頂きました久光製薬(株) 筑波研究所 矢野忠則 博士に御礼申し上げます。

最後に、本研究を実施するにあたり、励ましと御鞭撻を頂きました長崎大学医学部附属病院薬剤部 小笠原正良 副部長はじめ職員の皆様に心より感謝の意を表します。

