

薬物性肝障害モデルにおける  
弱塩基性薬物の体内動態変動の機序

— 血漿  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein の影響を中心として —

杉 原 成 美

# 薬物性肝障害モデルにおける 弱塩基性薬物の体内動態変動の機序

— 血漿  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein の影響を中心として —

## 目次

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 序論                                                 | 1  |
| 本論                                                 |    |
| 第1章 四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの体内動態                  | 3  |
| 第1節 単回静注投与後の血漿中挙動                                  | 3  |
| 第2節 定常状態における組織分布                                   | 5  |
| 第3節 全身クリアランス減少と肝機能低下の関連                            | 10 |
| 第4節 小括                                             | 12 |
| 第2章 四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの組織分布変動の機序             | 14 |
| 第1節 組織分布の理論的解析                                     | 14 |
| 第2節 組織結合                                           | 15 |
| 第3節 血漿pHの測定                                        | 16 |
| 第4節 血漿蛋白質結合                                        | 17 |
| 第5節 小括                                             | 18 |
| 第3章 四塩化炭素肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率増大の要因            | 19 |
| 第1節 In vitro 血漿蛋白質結合                               | 19 |
| 第2節 血漿蛋白質結合に及ぼすTris(butoxyethyl)-phosphateの影響      | 20 |
| 第3節 血漿蛋白質濃度の測定                                     | 22 |
| 第4節 血漿蛋白質結合率と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の相関 | 23 |
| 第5節 小括                                             | 24 |
| 第4章 種々の薬物性肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合                 | 25 |
| 第1節 血漿蛋白質濃度の測定                                     | 25 |
| 第2節 肝障害度と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の       |    |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 関係                                                                         | 28 |
| 第3節 血漿蛋白質結合率と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein<br>濃度との相関                    | 30 |
| 第4節 小括                                                                     | 32 |
| 第5章 高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデル（テレピン<br>油投与ラット）におけるquinidineの体内動態 | 33 |
| 第1節 生理学的パラメーター                                                             | 33 |
| 第2節 単回静注投与後の血漿中挙動                                                          | 35 |
| 第3節 肝抽出率の測定                                                                | 38 |
| 第4節 組織分布と血漿蛋白質結合率との相関                                                      | 40 |
| 第5節 小括                                                                     | 42 |
| 第6章 結論                                                                     | 44 |
| 謝辞                                                                         | 46 |
| 論文目録                                                                       | 47 |
| 実験の部                                                                       | 48 |
| 引用文献                                                                       | 61 |

## 序論

臨床における薬物療法は、薬物を如何に有効にかつ安全に標的臓器に送達するかにあるが、疾患時の薬物動態は正常時に比べ大幅に異なると予想されるにも関わらず、多くの薬物動態の研究は正常実験動物においてなされており、種々の疾患時における薬物動態に関する情報は未だ十分とはいえない。この様な現状から、疾患時における薬物動態を、疾患に関する生理的パラメーターに基づき理解し、予測し得ることは薬物療法の分野においても有用な情報を与えるものと考えられる。

肝臓は、薬物の代謝・排泄をつかさどり、さらに、血漿蛋白質合成の場となっているなど、薬物の体内動態に関する最も重要な臓器となっている。従って、肝疾患時には、肝血流速度の低下や薬物代謝能の低下に加え、血漿蛋白質組成や含量等が変動し、薬物の体内動態が大幅に変化することが考えられる。

肝障害時における薬物動態に関して、酸性薬物では比較的多くの報告がある<sup>1-6)</sup>。その大きな特徴として、肝代謝機能の低下によるクリアランスの減少、及び血漿蛋白質結合率の減少による分布容積の増大等があげられる。特に、分布容積の増大に関しては、ガラクトサミン肝障害ラットにおけるphenytoin<sup>7)</sup>についてなど、詳細な報告がなされている。

一方、弱塩基性薬物に関しては、肝疾患患者の血漿蛋白質結合率に関する臨床報告はあるものの、一定の見解は得られておらず、結合率の増加または低下といった相反する結果が報告されているのが現状である<sup>8-12)</sup>。また、肝障害動物モデルにおいても、弱塩基性薬物の体内動態を詳細に検討した報告は、我々が知るところでは未だなされていない。一般に弱塩基性薬物は、血中において中性や酸性薬物の結合蛋白質であるalbuminやlipoproteinに結合する他、

特に  $\alpha_1$ -acid glycoprotein と高い親和性をもって結合していることが知られている<sup>13,14)</sup>。また、弱塩基性薬物は、中性や酸性薬物に比べ、その組織移行性が高く、その組織分布率は臓器間で著しい差を示すことが知られている<sup>15-17)</sup>。この様に、弱塩基性薬物の体内動態は、中性、酸性薬物のそれらとは大きく異なっており、肝疾患時における弱塩基性薬物の体内動態の変化について検討することは、臨床上からも有用な知見を与えるものと考えられる。

本研究は、実験的肝障害惹起化合物として広く用いられている四塩化炭素を用いて薬物性肝障害モデルを作成し、弱塩基性薬物である quinidine の体内動態を検討した。更に、その体内動態の変化の要因として肝機能及び血漿蛋白質結合率を中心に詳細な解析を試みた。

## 本論

### 第1章 四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの体内動態

肝疾患時における弱塩基性薬物の体内動態について検討するため、四塩化炭素肝障害モデルを作成した。四塩化炭素は肝障害を惹起する代表的化合物として知られており、その作用機序、肝組織の形態学的変化、生化学的変化等に関する報告は数多くなされている<sup>18-20)</sup>。その肝障害発現の機構としては、肝細胞の滑面小胞体で四塩化炭素が代謝され、 $\text{CCl}_3\cdot$ とClに分解し、発生したフリーラジカルが、膜の脂質過酸化をひきおこすためであるといわれている。また、四塩化炭素は、肝障害惹起の再現性がよいことから、今日、実験的肝障害の研究に最も広く用いられている物質の一つである。

弱塩基性薬物のモデルとして、quinidineを用いた。Quinidineは、その代謝・消失がほとんど肝臓に限られていることから<sup>21)</sup>、肝障害時の体内動態の研究に適していること、体内動態及び体内分布に関する参考の報告があること<sup>22-25)</sup>、さらに定量が比較的簡単であること、などの理由で選択した。

#### 第1節 単回静注投与後の血漿中挙動

四塩化炭素をオリーブ油に混合し、20%溶液としたものを、5 ml/kgの投与量でラットの腹腔内に投与した。肝障害の指標としては、投与24時間後、血漿中GPT活性(Karmen unit)を測定した。

Table I. GPT Activity 24 h following Administration of  $\text{CCl}_4$

|                   | Control          | $\text{CCl}_4$     |
|-------------------|------------------|--------------------|
| GPT (Karmen unit) | $18.57 \pm 0.69$ | $1291.7 \pm 124.0$ |

Table I に示したように、四塩化炭素投与により血漿GPTの著しい上昇が認められ、肝障害が惹起されたことが確認された。これらのラットに、quinidine 12.5 mg/kgを股静脈より単回急速投与し、血漿中濃度を経時的に測定した。Quinidineの血漿からの消失はcontrol及び四塩化炭素肝障害群ともbiexponential curveで示されることから(Fig.1)、two compartment modelを用い種々の薬物速度論的パラメーターを求めた(Table II)。Control群においては、quinidineの分布は静注後30分以内に平衡に達し、平衡到達後の $\beta$ 相における半減期は0.93時間、消失速度定数( $k_{e1}$ )は $0.027 \text{ min}^{-1}$ 、分布容積( $V_{dss}$ )は7.6 l/kg、全身クリアランス( $CL_{tot}$ )は $102 \text{ ml/min/kg}$ であった。これらの値は、Nishiuraら<sup>24)</sup>やWatariら<sup>25)</sup>によって報告されている値とほぼ一致した。一方、四塩化炭素肝障害群

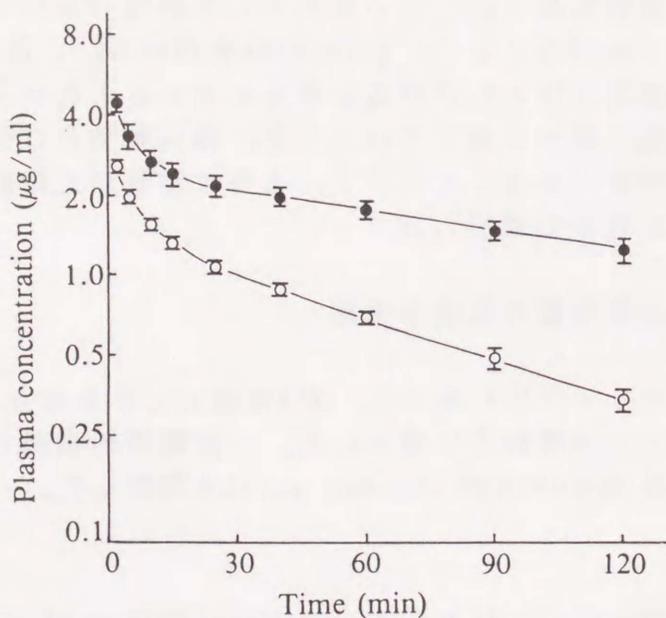


Fig.1. Disappearance of Quinidine from Plasma after Intravenous Administration

Quinidine sulfate was injected at a dose of 12.5 mg/kg as quinidine base. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 6 animals.  $\circ$ , control;  $\bullet$ , CCl<sub>4</sub>-intoxicated.

Table II. Pharmacokinetic Parameters of Quinidine after Intravenous Administration

|                                           | Control             | CCl <sub>4</sub>                  |
|-------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| A ( $\mu\text{g/ml}$ )                    | 1.90 $\pm$ 0.11     | 3.50 $\pm$ 0.43 <sup>a)</sup>     |
| B ( $\mu\text{g/ml}$ )                    | 1.44 $\pm$ 0.07     | 2.52 $\pm$ 0.28 <sup>a)</sup>     |
| $\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )            | 0.225 $\pm$ 0.026   | 0.268 $\pm$ 0.056                 |
| $\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )             | 0.0124 $\pm$ 0.0008 | 0.0058 $\pm$ 0.0012 <sup>b)</sup> |
| $k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )            | 0.104 $\pm$ 0.013   | 0.152 $\pm$ 0.045                 |
| $k_{21}$ ( $\text{min}^{-1}$ )            | 0.107 $\pm$ 0.015   | 0.108 $\pm$ 0.012                 |
| $k_{e1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )            | 0.0269 $\pm$ 0.0017 | 0.0133 $\pm$ 0.0020 <sup>b)</sup> |
| $V_c$ (l/kg)                              | 3.79 $\pm$ 0.11     | 2.10 $\pm$ 0.13 <sup>b)</sup>     |
| $V_{dss}$ (l/kg)                          | 7.60 $\pm$ 0.33     | 4.89 $\pm$ 0.64 <sup>a)</sup>     |
| AUC ( $\mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$ ) | 131.4 $\pm$ 9.4     | 481.2 $\pm$ 75 <sup>b)</sup>      |
| CL <sub>tot</sub> (ml/min/kg)             | 101.7 $\pm$ 7.2     | 27.5 $\pm$ 3.3 <sup>b)</sup>      |

The drug concentrations in plasma from an individual animal were fitted to the equation  $C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$  by non-linear least squares regression. Values are the means  $\pm$  S.E. of 6 animals. a)  $p < 0.01$ , b)  $p < 0.001$ .

においては、血中からの薬物の消失は著しく遅延した。すなわち、 $\beta$ 相における半減期はcontrol値に比べて102%、AUCは266%増加し、CL<sub>tot</sub>、 $k_{e1}$ 、及び $V_{dss}$ は、それぞれ、73、51及び36%減少した。

## 第2節 定常状態における組織分布

四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの $V_{dss}$ 減少を、組織分布の観点から解析するため、組織と血漿間における薬物の分配係数である $K_p$ 値を求めた。検討した組織は、quinidineの作用部位である心臓、高い移行性が知られている肺臓、消失臓器と考えられる肝臓、腎臓、及び脾臓を加えた主要な5種の組織である。各組織中薬物濃度( $C_t$ )と体循環血漿中薬物濃度( $C_p$ )の比、 $C_t/C_p$ 値から $K_p$ 値を求める方法を以下に示す<sup>26)</sup>。

まず、1つの組織における薬物の動きを見ると、Fig.2に示すように、薬物は組織血流速度( $Q$ )、薬物濃度  $C_a$ で動脈から毛細血管に流れ込み、濃度  $C_v$ で静脈側に流れ出す。その間に薬物は毛細血管と組織間で濃度平衡に達するとともに、組織内で代謝、排泄等により消失する。そのため $C_a$ と $C_v$ の間に濃度差が生じる。組織分布

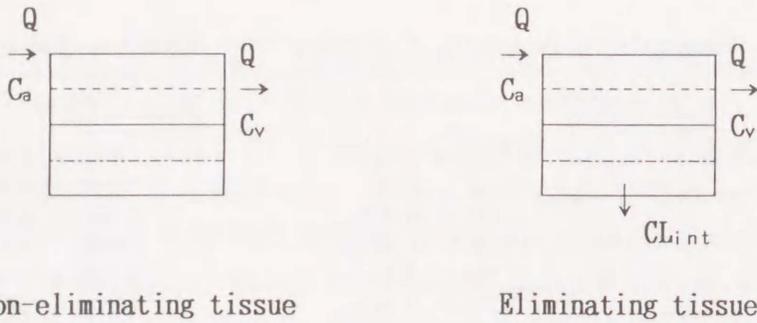


Fig.2. Schematic Diagram of Well-Stirred Model  
 Q: blood flow rate, C<sub>a</sub>: drug concentration in arterial plasma, C<sub>v</sub>: drug concentration in venous plasma, CL<sub>int</sub>: intrinsic clearance,  
 ----- : drug concentration in capillary,  
 ----- : drug concentration in tissue.

を解析する主なモデルとして、毛細血管中の薬物濃度を場所の関数と考えるparallel tube modelと、毛細血管中や組織中はよく攪拌され、瞬時に平衡が成立すると考えるwell-stirred modelの二つがある。Parallel tube modelは実際の薬物の動きを反映するものと考えられるが、数学的な処理が複雑なため、通常はwell-stirred modelで代用されることが多い。Well-stirred modelにおいては、毛細血管中薬物濃度は場所に依らず末端の組織静脈血中濃度 C<sub>v</sub>と等しいと考える。

K<sub>p</sub>値は、前述したように、組織と毛細血管の血漿間の薬物の分配係数であるので、well-stirred modelにおいては、次式で示すことができる。

$$K_p = C_t / C_v \quad \text{-----} \quad (1)$$

( A ) 非消失組織におけるK<sub>p</sub>値の求め方

代謝や排泄による消失を受けない非消失組織では、組織中の物質収支式は

$$dX / dt = Q \cdot C_a - Q \cdot C_v \quad \text{-----} \quad (2)$$

で表される。ここで、Xは組織中の薬物量、Qは組織血流速度を示

す。 血漿中濃度が一定に保たれる定常状態では、組織中の薬物量は変化しないため、(2)式の左辺は0であり、 $C_a$ と $C_v$ は等しくなり、更に体循環血漿中の薬物濃度、 $C_p$ とも等しいことから、(3)式が得られる。

$$K_p = C_t / C_v = C_t / C_p \quad \text{-----} \quad (3)$$

( B ) 消失組織における $K_p$ 値の求め方

代謝や排泄による消失を受ける消失組織では、物質収支式は次式で示される。

$$dX/dt = Q \cdot C_a - Q \cdot C_v - CL_{int} \cdot C_f^t \quad \text{-----} \quad (4)$$

ここで、 $C_f^t$ は組織中の非結合型薬物濃度を表し、また、固有クリアランス  $CL_{int}$ は、組織が単位時間当りに組織内液から薬物を代謝、排泄によりクリアする真の能力を表す。血液中と組織中の非結合型薬物濃度は等しいと考えられるため、

$$C_f^t = C_v \cdot f^B \quad \text{-----} \quad (5)$$

となる。ここで、 $f^B$ は血液中薬物の非結合型分率を表す。また、定常状態では(4)式の左辺は0となるため、次式が得られる。

$$C_v = A \cdot C_a \quad \text{-----} \quad (6)$$

ただし、

$$A = Q / ( Q + CL_{int} \cdot f^B ) \quad \text{-----} \quad (7)$$

定常状態においては  $C_p = C_a$  となる。この $C_p$ より、control群においては $Q$ 及びquinidineの $CL_{int}$ 、 $f^B$ 値に関する文献値<sup>27)</sup>を用いて、(6)及び(7)式に従って $C_v$ を算出することができる。しかし、四塩化炭素肝障害群の $Q$ や、 $CL_{int}$ 及び $f^B$ の値に関しては、いまだ報告がなされていない。そこで、本研究では消失組織における $K_p$ 値は、control群、四塩化炭素肝障害群とも消失組織の $C_v$ を実測することにより求めた。

ラットにおいてquinidineは、未変化体として尿中に排泄される割合は2.6%にすぎず、また、腎クリアランスの寄与は無視することが可能であり、全身クリアランスは肝クリアランスによりほぼ説明で

きることが知られている<sup>21)</sup>。以上のことから、本研究では、肝臓のみを消失臓器として扱い、肝臓における $K_p$ 値は肝静脈血漿中薬物濃度( $C_v^h$ )を実測し、他の組織では $C_p$ 値を用いて(1)式より求めた。

Quinidineの組織分布は、血漿中薬物濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ の定常状態において測定した。定常状態を設定するためのquinidineの infusion rate 及びbolus injection doseは、Table IIで示した急速静注後のパラメーターよりそれぞれ算出した。Quinidineの注入開始60分後には、血漿中濃度は一定となり、定常状態が成立した。定常状態での実測血漿中濃度は、パラメーターから求めた理論値と差がなく、このことはパラメーターの妥当性を示すものである。完全な定常状態を確保するため、持続注入開始後90分に、肺臓、脾臓、心臓、腎臓及び肝臓の各組織中薬物濃度( $C_t$ )、頸静脈血漿中薬物濃度( $C_p$ )及び肝静脈血漿中薬物濃度( $C_v^h$ )を測定した。また、全血の薬物濃度( $C_b$ )も測定し、次式より血液-血漿間分配比、 $R_b$ 値を求めた。

$$R_b = C_b / C_p \text{ ----- (8)}$$

Table IIIにcontrol及び四塩化炭素肝障害ラットにおける種々の組織のquinidineの $K_p$ 値と $R_b$ 値を示した。Control群の肺臓、脾臓、心

Table III. Tissue to Plasma Partition Coefficients( $K_{p, vivo}$ ) of Quinidine in Various Tissues

|          | Control         | $\text{CCl}_4$     | Change(%) <sup>d)</sup> |
|----------|-----------------|--------------------|-------------------------|
| Lung     | $73.1 \pm 3.2$  | $49.5 \pm 4.0^b)$  | 32                      |
| Spleen   | $26.0 \pm 1.3$  | $17.4 \pm 0.8^b)$  | 33                      |
| Heart    | $11.1 \pm 1.1$  | $7.4 \pm 0.3^a)$   | 34                      |
| Kidney   | $28.9 \pm 1.5$  | $15.2 \pm 0.9^b)$  | 39                      |
| Liver    | $26.4 \pm 2.3$  | $15.2 \pm 0.8^b)$  | 42                      |
| $R_b^c)$ | $1.55 \pm 0.02$ | $1.25 \pm 0.05^b)$ | 20                      |

The plasma concentration of quinidine at the steady state condition was  $1.08 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$  in control and  $1.05 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$  in  $\text{CCl}_4$ -treated rats. Values are the means  $\pm$  S.E. of 4 to 8 animals. a)  $p < 0.01$ , b)  $p < 0.001$ .

c) Blood-to-plasma concentration ratio. d)  $\% = \{(\text{control} - \text{CCl}_4) / \text{control}\} \times 100$

臓、腎臓、肝の $K_p$ 値及び $R_b$ 値は、それぞれ、73.1、26.0、11.1、28.9、26.4、及び1.55であった。今回測定した組織の中で、肺臓における $K_p$ 値が最も高く、心臓における $K_p$ 値が最も低かった。これらの結果は、Shibasakiら<sup>23)</sup>やNishiuraら<sup>17, 24)</sup>の報告とほぼ同様であった。四塩化炭素肝障害群の $K_p$ 値は、control群に比べ、肺臓、脾臓、心臓、腎臓及び肝臓の各組織においてそれぞれ、32、33、34、39及び42%減少した。また、四塩化炭素肝障害群の $R_b$ 値はcontrol群の値に比べ20%減少した。以上の結果から、肝障害群におけるquinidine単回静注投与後の $V_{dss}$ の減少は、組織における $K_p$ 値と $R_b$ 値の減少によることが推察された。

今回得られた $K_p$ 値を次式に代入して定常状態での分布容積( $V_{dss, Kp}$ )を、求めた。

$$V_{dss, Kp} = R_b \cdot V_b + \sum k_{p,i} \cdot V_{t,i} \text{ ----- (9)}$$

ここで、 $V_b$ は全血液の容量、 $V_t$ は各組織の容量を示し、 $V_t$ は各組織の比重を1と考え、各組織の湿重量から得た。ここで用いた $V_t$ の値をTable IVに記載した。 $V_b$ は、Bischoffら<sup>28)</sup>の式(10)によって求めた。

$$V_b = V_p / (1 - \text{Hematocrit}) \text{ ----- (10)}$$

$$V_p = 44 \cdot (\text{body weight, kg})$$

$$\text{Hematocrit} = 0.42$$

Table IV. Tissue Volumes of Rats (Body Weight: 250g)

| Tissue       | Volume (ml) |                  |
|--------------|-------------|------------------|
|              | Control     | CCl <sub>4</sub> |
| Lung         | 1.38        | 1.21             |
| Spleen       | 0.90        | 0.81             |
| Heart        | 0.95        | 0.91             |
| Kidney       | 2.20        | 2.24             |
| Liver        | 9.40        | 10.5             |
| Blood artery | 6.8         | 6.8              |
| vein         | 13.6        | 13.6             |

Control群と肝障害群の $V_{d_{ss}, k_p}$ 値はそれぞれ、1.91と1.21 l/kgであり、control群及び肝障害群の $V_{d_{ss}, k_p}$ 値はともに、quinidineの静注後の血中消失曲線から得られた $V_{d_{ss}}$ 値のおよそ25%を示した。測定した臓器の全体重に対する割合が約14%であったことから、ほぼ妥当な数値と考えられる。肝障害群の $V_{d_{ss}, k_p}$ 値は、control群の値に比べ約37%減少し、この値は、肝障害群の $V_{d_{ss}}$ の減少率(36%)とほぼ一致していた。以上の結果から、肝障害群における $V_{d_{ss}}$ の減少は、組織における $K_p$ 値と $R_b$ 値の減少に起因することが示された。

### 第3節 全身クリアランス減少と肝機能低下の関連

Table II に示したように、四塩化炭素肝障害時にquinidineの血中からの消失速度( $k_{el}$ )は著しく減少した。ラットにおけるquinidineの全身クリアランスは、腎クリアランスがわずかであること<sup>21)</sup>からほとんど肝クリアランスで説明できる。Well-stirred modelでは、薬物の肝クリアランスは次式で表される<sup>26)</sup>。

$$CL_h = Q_h \cdot E \text{ ----- (11)}$$

ここで、 $Q_h$ は肝血流速度、 $E$ は肝抽出率(hepatic extraction ratio)である。従って、四塩化炭素肝障害による $k_{el}$ の減少は、肝血流量や肝抽出率を主とする肝機能の低下によるものと考えられる。そこで、肝血流量及び肝抽出率を求め、肝障害時の全身クリアランス減少をこれらの値から解析した。

肝の血流速度( $Q_h$ )は水素ガスクリアランス法<sup>29)</sup>により測定した。本法で求めた肝血流速度( $Q_h$ )は、Table V に示したように、control群では1.11 ml/min/gであり、この値はICG法で測定された文献値<sup>30, 31)</sup>とほぼ一致した。四塩化炭素肝障害群の肝血流速度( $Q_h$ )は、control群の値に比べ、47%減少した。

一方、肝抽出率( $E$ )は、次式で求められる。

$$E = (C_a - C_v) / C_a \text{ ----- (12)}$$

Caは頸静脈中薬物濃度( $C_p$ )、 $C_v$ は肝静脈中薬物濃度( $C_v^h$ )を代入して求めた。Table Vに示したように肝抽出率は、control群で0.527、肝障害群で0.228であり、四塩化炭素肝障害群の肝抽出率はcontrol群の値に比べ57%減少した。

また肝抽出率は、次式によっても表される。

$$E = (f_p / R_b) \cdot CL_{int} / \{Q_h + (f_p / R_b) \cdot CL_{int}\} \quad -- (13)$$

肝固有クリアランス( $CL_{int}$ )は、組織により単位時間当りに薬物が体液から代謝、排泄により除去される真の能力を示すものであり、四塩化炭素肝障害群におけるquinidineの肝抽出率の減少は、薬物の代謝酵素活性の低下によることが考えられる。そこで、(13)式より肝固有クリアランス( $CL_{int}$ )を求めた。Control群と肝障害群の $CL_{int}$ は、それぞれ229と44 ml/min/kgであり、肝障害群値はcontrol群値に比べ、81%低下していた。また、肝におけるquinidineの代謝能を、肝homogenateの9,000 g上清を用いて測定した結果、肝障害群の薬物代謝能は、control群に比べ84%低下しており、肝固有クリアランスの低下率と近似していた。以上の結果から、四塩化炭素肝障害群におけるquinidineの肝抽出率の減少には、肝のquinidine代謝活性の低下が大きく関与していることが判明した。

今回の実験によって得られたcontrol群と四塩化炭素肝障害群の肝血流速度( $Q_h$ )と肝抽出率( $E$ )の値を、(11)式に代入して得られたquinidineの肝クリアランスは、control群で22.0、四塩化炭素肝障害群で5.7 ml/min/kgであり、四塩化炭素肝障害群の肝クリアランスは、control群に比べて74%減少していた。一方、quinidine静注後の血中消失曲線から得られた血漿クリアランス( $CL_{tot}$ )は、control群で102、四塩化炭素肝障害群で27.5 ml/min/kgであった(Table II)。これらの値を $R_b$ 値で割ることにより求めた全血クリアランスは、control群で65.8、四塩化炭素肝障害群で、22.0 ml/min/kgであり、四塩化炭素肝障害群の全血クリアランスは、control群に比べて67%減少した。この減少率は、四塩化炭素肝障害群における肝クリアランスの減少率(74%)に近い値であった。

Table V. Hepatic Blood Flow(HBF), Hepatic Extraction Ratio(HER) and Metabolic Activity in the Liver(MA)

|                   | Control       | CCl <sub>4</sub>            | Change(%) <sup>e)</sup> |
|-------------------|---------------|-----------------------------|-------------------------|
| HBF <sup>a)</sup> | 1.11 ± 0.07   | 0.59 ± 0.08 <sup>d)</sup>   | 47                      |
| HER <sup>b)</sup> | 0.527 ± 0.011 | 0.228 ± 0.035 <sup>d)</sup> | 57                      |
| MA <sup>c)</sup>  | 13.6 ± 0.2    | 2.21 ± 0.17 <sup>d)</sup>   | 84                      |

a) Hepatic blood flow(ml/min/g) was determined by using hydrogen monitor.

b) Hepatic extraction ratios were calculated from the equation:

HER =  $(C_{in} - C_{out})/C_{in}$  where  $C_{in}$ : quinidine concentration in jugular

vein;  $C_{out}$ : quinidine concentration in hepatic vein. c) Metabolic

activity for quinidine was measured by using 9,000 x g supernatant of

liver homogenates. The activity(ng/mg protein) was expressed as the

amount of quinidine metabolized per mg protein for 10 min of incubation.

Values are the means ± S.E. of 4 to 5 animals. d)  $p < 0.001$ .

e) % =  $\{(control - CCl_4)/control\} \times 100$ .

## 第5節 小括

四塩化炭素肝障害ラットに弱塩基性薬物であるquinidineを静注したところ、薬物の血中からの消失はcontrol群に比べ著しく遅延した。四塩化炭素肝障害群におけるquinidineの全身クリアランス、消失速度定数及び分布容積はcontrol群の値に比べてそれぞれ、73、51及び36%減少し、その結果AUCは、266%増加した。

肝障害時におけるquinidineの組織分布を検討するため、血漿中薬物濃度1  $\mu$ g/mlの定常状態で、各組織の $K_p$ 値及び $R_b$ 値を求めた。

肝障害群では、肺臓、脾臓、心臓、腎臓及び肝臓の $K_p$ 値が、control群値に比べそれぞれ、32、33、34、39及び42%減少した。また、肝障害群の $R_b$ 値は20%減少した。従って、肝障害群における $V_{dss}$ の低下は組織における $K_p$ 値と $R_b$ 値の低下によることが明らかとなった。

肝血流量及び、定常状態におけるquinidineの肝抽出率は、四塩化炭素肝障害群においては、control群の値に比べそれぞれ、47及び

57%減少した。肝固有クリアランス( $CL_{int}$ )を算出したところ、control群と四塩化炭素肝障害群の $CL_{int}$ は、それぞれ229と44 ml/min/kgであり、肝障害群の $CL_{int}$ はcontrol群値に比べ、81%低下した。肝homogenateを用いて、肝の薬物代謝能を測定したところ、肝障害群のquinidine代謝能は、control群に比べ84%低下した。以上の結果から、四塩化炭素肝障害群におけるquinidineの全身クリアランスの低下は、肝血流量及び肝代謝能等の肝機能の低下によることが明らかとなった。

## 第2章 四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの組織分布変動の機序

第1章において、四塩化炭素肝障害モデルでは、弱塩基性薬物であるquinidineの分布容積( $V_{dss}$ )が著しく減少することを見いだした。すなわち、酸性薬物の分布容積が肝障害時には一般に増大するという知見<sup>1-5)</sup>とは対照的な結果である。本章では、四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの分布容積の減少の要因について検討をおこなった。

### 第1節 組織分布の理論的解析

血漿中や組織中の薬物濃度を、それぞれ結合型薬物濃度と非結合型薬物濃度の和と考えると、組織-血漿間分配係数( $K_p$  値)は、次式に書き換えることができる<sup>32)</sup>。

$$K_p = C_t / C_v \\ = (Cf^t + Cb^t) / (Cf^v + Cb^v) \quad \text{----- (14)}$$

ここで $C_t$ は組織中薬物濃度、 $C_v$ は血漿中薬物濃度、 $Cf^t$ は組織中非結合型薬物濃度、 $Cb^t$ は組織中結合型薬物濃度、 $Cf^v$ は血漿中非結合型薬物濃度、 $Cb^v$ は血漿中結合型薬物濃度を表す。(14)式は次式のように変形することができる。

$K_p = (Cf^t/Cf^v) \cdot \{Cf^v/(Cf^v + Cb^v)\} \cdot (1 + Cb^t/Cf^t) \quad \text{---- (15)}$   
( $Cf^t/Cf^v$ )は、組織及び血漿間のpHの差による薬物分配を示すものであり、塩基性薬物の場合次式のように表すことができる。

$$Cf^t/Cf^v = (1 + 10^{pK_a - pH_i}) / (1 + 10^{pK_a - pH_v}) \quad \text{----- (16)}$$

ここで、 $pK_a$ は薬物の解離定数、 $pH_i$ は組織内pH、 $pH_v$ は血漿pHを表す。

$Cf^v/(Cf^v + Cb^v)$ は血漿中における薬物の非結合型分率を示す。

( $1 + Cb^t/Cf^t$ )は、組織における薬物の結合を示すもので、

Langmuirの式により次式のように表すことができる。

$$1 + Cb^t/Cf^t = 1 + nKP / (1 + K \cdot Cf^t) \quad \text{----- (17)}$$

ここで、 $n$ は結合部位の数、 $K$ は結合定数、 $P$ は蛋白質または phospholipidなどの組織結合因子の濃度を表している。薬物濃度が低く、また結合が線形領域では $K \cdot Cf^t \ll 1$ となるので(17)式は次式に変形される。

$$1 + Cb^t/Cf^t = 1 + nKP \text{ ----- (18)}$$

以上のことから、弱塩基性薬物の $K_p$ 値は次式で表される。

$$K_p = (1 + nKP) \cdot \left\{ \frac{(1 + 10^{pK_a - pH_i})}{(1 + 10^{pK_a - pH_v})} \right\} \cdot \left\{ \frac{Cf^v}{(Cf^v + Cb^v)} \right\} \text{ ----- (19)}$$

つまり、薬物と組織成分との結合、組織及び血漿中間のpH差による薬物分布、ならびに血漿中における薬物の非結合率の関数として示すことができる。

## 第2節 組織結合

Hananoらは、酸性や中性薬物である barbiturates<sup>33)</sup>、ethoxybenzamide<sup>34)</sup> や adriamycin<sup>35)</sup> の *in vivo*組織分布、及び弱塩基性薬物である quinidine<sup>36)</sup> の一部組織分布が、組織homogenateへの薬物結合実験から予測できることを報告している。そこで、四塩化炭素肝障害モデルにおける $K_p$ 値減少の要因を検討するため、組織homogenateを使ったquinidineの*in vitro*結合実験を行った。四塩化炭素投与24時間後に組織を摘出し、control群と同様に、直ちに4倍量のpH 7.0の等張bufferで組織homogenate溶液を作成した。Quinidineの組織homogenate結合実験は、平衡透析法でおこなった。Table VIに示したように、肺homogenateへのquinidineの結合が最も高く、その他の組織homogenateへのquinidineの結合はほぼ同じ値であった。これらの値は、Hananoらの報告<sup>36)</sup>と類似していた。四塩化炭素肝障害群の組織homogenateへのquinidineの結合はcontrol群値との間で有意な差を示さなかった。以上の結果から、四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの $K_p$ 値の減少は、薬物の組織への結合が低下したためではないことが判明した。

Table VI. Binding Ratios( $k_{p, f, vitro}$ ) of Quinidine in Vitro in Various Tissue Homogenates

|        | Control    | CCl <sub>4</sub> |
|--------|------------|------------------|
| Lung   | 34.7 ± 1.0 | 34.8 ± 4.6       |
| Spleen | 18.3 ± 0.5 | 17.8 ± 0.6       |
| Heart  | 14.3 ± 0.7 | 16.4 ± 0.8       |
| Kidney | 17.4 ± 0.4 | 18.7 ± 0.9       |
| Liver  | 19.2 ± 1.3 | 19.8 ± 0.6       |

The binding of quinidine in tissue homogenates was determined by the method of equilibrium dialysis. Values are the means ± S.E. of 4 to 8 animals.

### 第3節 血漿pHの測定

四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの $K_p$ 値の減少は、血液のacidosisに起因することも考えられる。すなわち、quinidineの $pK_a$ を8.6、組織細胞内pHは7.0で疾病による変化はないと仮定すると、四塩化炭素肝障害群における32から42%の $K_p$ 値の減少は、(16)式から、肝障害群の血漿pHが0.18から0.25低下することで説明される。そこで、quinidineの $K_p$ 値の減少が血漿のacidosisに起因するもの

Table VII. Plasma pH

|    | Control     | CCl <sub>4</sub> |
|----|-------------|------------------|
| pH | 7.39 ± 0.02 | 7.36 ± 0.03      |

Plasma pH from jugular vein was measured by a pH meter with a syringe type-electrode. Values are the means ± S.E. of 4 to 5 animals.

かどうか肝障害群の血液pHの変化を調べた。測定には、注射筒型のpH電極を用いた。Table VIIに示したように、四塩化炭素肝障害群の血漿pHは7.36で、control群7.39と有意な差は認められなかった。この結果より、肝障害群における $K_p$ 値の減少は、血漿のpHの変化によるものではないことが判明した。

#### 第4節 血漿蛋白質結合

$K_p$ 値を支配する第三番目の要因である薬物の血漿蛋白質結合率の変化について検討をおこなった。ラット血漿中quinidine濃度が、 $1 \mu\text{g/ml}$ の定常状態を作成し、下大静脈より血液を採集した。弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率は、pHの影響を大きく受けることから、採血後のpH変動を抑えるため、phosphate bufferで血漿のpHを7.4に調整し、限外濾過法により測定した。Table VIIIに示したように、control群においてquinidineの血漿中非結合型分率( $f_p$ )は0.315で、Shibasakiらの報告<sup>23)</sup>と近似していた。一方、四塩化炭素肝障害群において、quinidineの $f_p$ は、control群値に比べて34%減少した。肝障害群の各組織の $K_p$ 値の減少率は、32から42%であり、またquinidineを静注した際の分布容積( $V_{dss}$ )の減少は36%であった。以上の結果から、四塩化炭素肝障害群におけるquinidineの $K_p$ 値及び $V_{dss}$ の減少は、薬物の血漿蛋白質結合率の上昇に起因することが明らかとなった。

Table VIII Plasma Free Fraction( $f_p$ ) of Quinidine

|       | Control           | CCl <sub>4</sub>     | Change(%) <sup>b)</sup> |
|-------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| $f_p$ | $0.315 \pm 0.016$ | $0.207 \pm 0.011^a)$ | 34                      |

The plasma protein binding of quinidine was measured by the method of ultrafiltration. Values are the means  $\pm$  S.E. of 5 animals. a)  $p < 0.01$ . b) Calculated by the equation:  $\% = \{(\text{control} - \text{CCl}_4)/\text{control}\} \times 100$ .

## 第5節 小括

四塩化炭素肝障害モデルにおける $K_p$ 値減少の要因について、1)薬物の組織結合、2)血漿pH、3)薬物の血漿蛋白質結合率、の三点から検討した。組織homogenateに対するquinidineの結合は、四塩化炭素肝障害群とcontrol群の間に有意な差は認められなかった。また四塩化炭素肝障害群における血漿pHの変化も認められなかった。一方、quinidineの $f_p$ は、肝障害群において、control群の値に比べ34%減少した。肝障害群の各組織の $K_p$ 値の減少は、32から42%、またquinidine静注後の分布容積( $V_{dss}$ )の減少は36%であり、これらの値は、quinidineの $f_p$ の減少率と近似した。以上の結果から、四塩化炭素肝障害群におけるquinidineの $K_p$ 値、ならびに $V_{dss}$ 減少の要因は、薬物の血漿蛋白質結合率の上昇によるものであることが明らかとなった。

### 第3章 四塩化炭素肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率増大の要因

第2章において、四塩化炭素肝障害モデルでのquinidineの分布容積( $V_{dss}$ )の減少は、薬物の血漿蛋白質結合率の上昇によるものであることが明かとなった。これは、酸性薬物の血漿蛋白質結合率が肝障害時に減少するとされている<sup>1-5)</sup>ことと対照的な結果である。弱塩基性薬物は、albuminや、lipoproteinに結合するほか、 $\alpha_1$ -acidglycoprotein(AGP)に高い親和性をもって結合することが知られている<sup>37, 38)</sup>。 $\alpha_1$ -Acid glycoproteinは、炎症性病変に応答して、肝臓で合成される急性期炎症蛋白質群の一種である<sup>39, 40)</sup>。肝障害時においては、血漿中のalbuminやlipoprotein濃度が減少するのに対し<sup>4, 41)</sup>、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は増加する可能性が考えられる。本章では、四塩化炭素肝障害モデルにおけるquinidineの血漿蛋白質結合率上昇の原因を明らかにするため、弱塩基性薬物のin vitro血漿蛋白質結合率と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度との関係について検討した。

#### 第1節 In vitro 血漿蛋白質結合

四塩化炭素肝障害ラットにおけるquinidineの血漿蛋白質結合率をin vitroにおいて検討した。四塩化炭素投与24時間後のラット血液を採集し、この血漿をphosphate bufferでpH 7.4に調整した後、quinidine及びpropranololを、また比較として酸性薬物であるsalicylic acidを、薬物濃度が各々 $1 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した。Fig. 3にcontrol群及び肝障害群の各薬物の血漿中非結合型分率( $f_p$ )を示した。Salicylic acidの $f_p$ は四塩化炭素肝障害群では、control群のそれに比べて71%増加した。この結果は同じく酸性薬物であるphenytoinの血漿蛋白質結合率が、ガラクトサミン肝障害ラットにおいて減少したというIthoらの報告<sup>7)</sup>と一致する。肝障

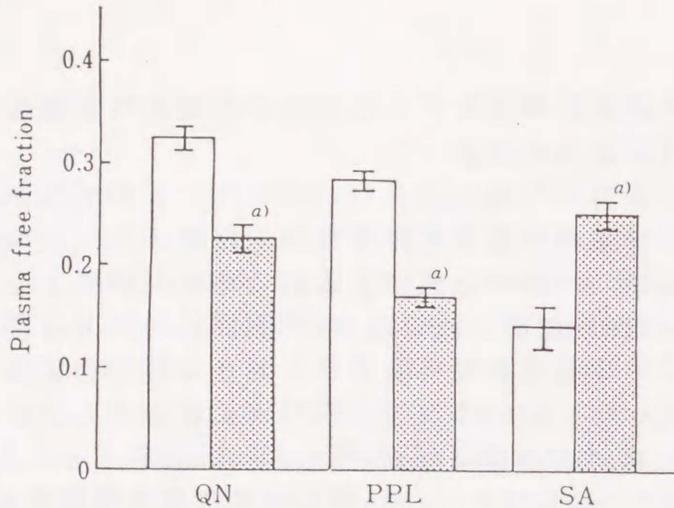


Fig. 3. Binding of Various Drugs to the Plasma Proteins from the Control and CCl<sub>4</sub>-Intoxicated Rats

Animals were sacrificed 24 h after the injection. Plasma samples containing each drug at a concentration of 1  $\mu$ g/ml were ultrafiltrated. Plasma free fractions of the drug were expressed as ratios of the amount of drug in the filtrate to the total amount of drug. Values are the means  $\pm$  S.E. of 6 to 9 animals. Significantly different from control; a)  $p < 0.01$ . QN, quinidine; PPL, propranolol; SA, salicylic acid.  $\square$ , control;  $\text{▨}$ , CCl<sub>4</sub>.

害時の酸性薬物の蛋白質結合率減少の原因としては、albuminや lipoproteinなどの血漿蛋白質濃度の減少に加え、bilirubinやfree fatty acidsなど内因性競合物質の血漿中濃度増加のためと説明されている<sup>4, 41-43</sup>)。酸性薬物とは対照的に、弱塩基性薬物である quinidineやpropranololの $f_p$ は、四塩化炭素肝障害群ではcontrol群のそれに比べそれぞれ30及び41%減少した。Quinidineのin vitroでの $f_p$ は、in vivoにおける $f_p$ 値と同程度のものであった(Table VIII)。

## 第2節 血漿蛋白質結合に及ぼすTris(butoxyethyl)phosphateの影響

四塩化炭素肝障害群における弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率の増加が、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加によるものかどうかを確認する目的で、 $\alpha_1$ -acid glycoproteinへの競合的結合阻害剤である Tris(Butoxyethyl)phosphate (TBEP)を用いて検討した<sup>44, 45</sup>)。

Fig. 4は、TBEP存在下(200  $\mu$ g/ml)におけるcontrolと肝障害群血漿

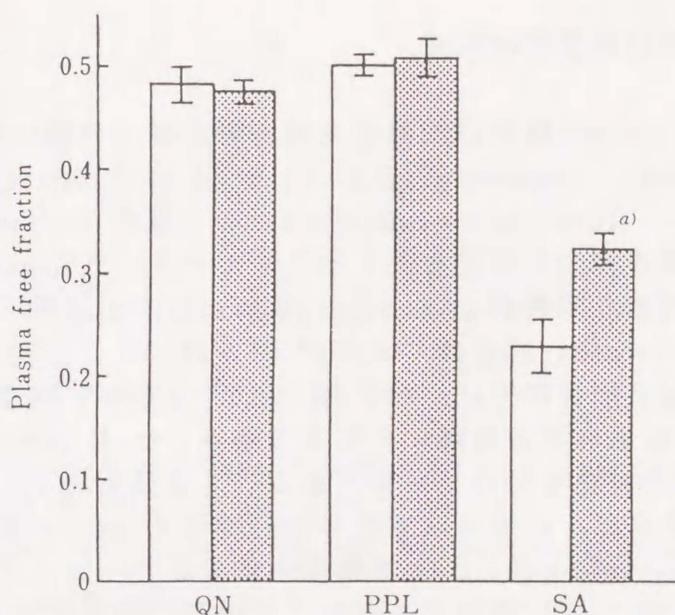


Fig.4. Inhibitory Effect of TBEP on the Binding of Various Drugs to the Plasma Proteins from the Control and CCl<sub>4</sub>-Intoxicated Rats

The same plasma samples as those used in Fig.3 were subjected to the experiments. Plasma samples containing each drug and TBEP(200 μg/ml) were ultrafiltered. Other experimental conditions were the same as those in Fig.3. Values are the means ± S.E. of 6 to 9 animals. Significantly different from control; a) p<0.05. QN, quinidine; PPL, propranolol; SA, salicylic acid. □, control; ▨, CCl<sub>4</sub>.

へのquinidine、propranolol及びsalicylic acidの結合を $f_p$ で示したものである。血漿へのTBEPの添加により、quinidine、propranololの $f_p$ がcontrol、四塩化炭素肝障害群とも0.5まで増加し、またTBEP非存在下にcontrol群と肝障害群の間に認められた薬物の血漿蛋白質結合の有意な差は、両塩基性薬物とも消失した。一方、酸性薬物であるsalicylic acidの血漿蛋白質結合は、TBEP添加によってもcontrol群と四塩化炭素肝障害群との間の有意な差は消失しなかった。これらの結果は、四塩化炭素肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率の増加は、血漿 $\alpha_1$ -acid glyco-protein濃度の増加によるものであることを示すものである。

### 第3節 血漿蛋白質濃度の測定

Table IXは、control群及び四塩化炭素肝障害群の血漿total protein、albumin、lipoprotein及び $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の測定値である。Total protein並びにalbumin濃度は、control群と四塩化炭素肝障害群間で有意な差を示さなかった。Lipoprotein濃度は、四塩化炭素肝障害群ではcontrol群値の約半分に減少した。 $\alpha_1$ -Acid glycoprotein濃度は、control群では168  $\mu\text{g/ml}$ であったが、四塩化炭素肝障害群では、約2.7倍の460  $\mu\text{g/ml}$ に増加した。

Fig. 5は、四塩化炭素投与群における血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度とGPTの経時変化を示したものである。血漿中の $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は、四塩化炭素投与24時間後でcontrol値の2.7倍、48時間後では4.8倍に上昇し、その後漸次減少した。一方、GPTレベルは、投与24時間後に最高値を示し、以後48時間までに急速に減少した。

Table IX. The Plasma Concentrations of Total Proteins, Albumin, Lipoproteins and  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein (AGP) in Control and  $\text{CCl}_4$ -Intoxicated Rats

| Constituent    | Concentration (mg/ml plasma) |                      |
|----------------|------------------------------|----------------------|
|                | Control                      | $\text{CCl}_4$       |
| Total proteins | $73.2 \pm 1.34$              | $70.2 \pm 1.13$      |
| Albumin        | $41.7 \pm 0.7$               | $40.6 \pm 0.7$       |
| Lipoproteins   | $1.21 \pm 0.073$             | $0.62 \pm 0.042^a)$  |
| AGP            | $0.168 \pm 0.012$            | $0.460 \pm 0.025^a)$ |

Animals were sacrificed 24 h after the injection. Values are the means  $\pm$  S.E. of 6 to 9 animals. Significantly different from control; a)  $p < 0.001$ .

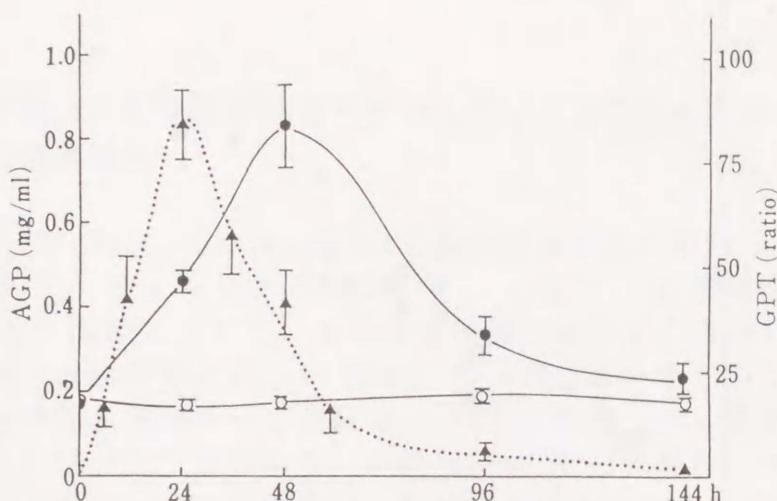


Fig.5 Changes in the Plasma Concentrations of  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein(AGP) and GPT in the Rat after the  $\text{CCl}_4$ -Intoxication

Animals were sacrificed at definite times after the injection. Values are the means  $\pm$  S.E. of 6 to 8 animals. The AGP level; ○, control group; ●,  $\text{CCl}_4$  group. The GPT levels(▲) were expressed as ratios of the plasma concentrations in the  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats to those in normal rats.

#### 第4節 血漿蛋白質結合率と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の相関

四塩化炭素肝障害群において、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の変動が弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率に及ぼす影響を調べるため、四塩化炭素投与後、経時的に血漿を採集し、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度と propranololの血漿蛋白質結合率を測定した。

Fig.6 は、propranololの血漿蛋白質結合性を bound/free で表したものを縦軸に、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度を横軸にとりplotしたものである。これらのplotは、相関係数 $r = 0.978$ の直線性を示し、propranololの血漿蛋白質結合と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は、高い相関性を有することが示された。以上の結果から、四塩化炭素肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率増加の主な要因は、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加であると考えられる。また、ヒトにおいて、肝疾患は様々な原因で引き起こされるが、四塩化炭素肝障害のような重篤な肝障害時においても、肝臓組織における $\alpha_1$ -acid glycoproteinの生合成が増大していることは興味深いものと考えられる。

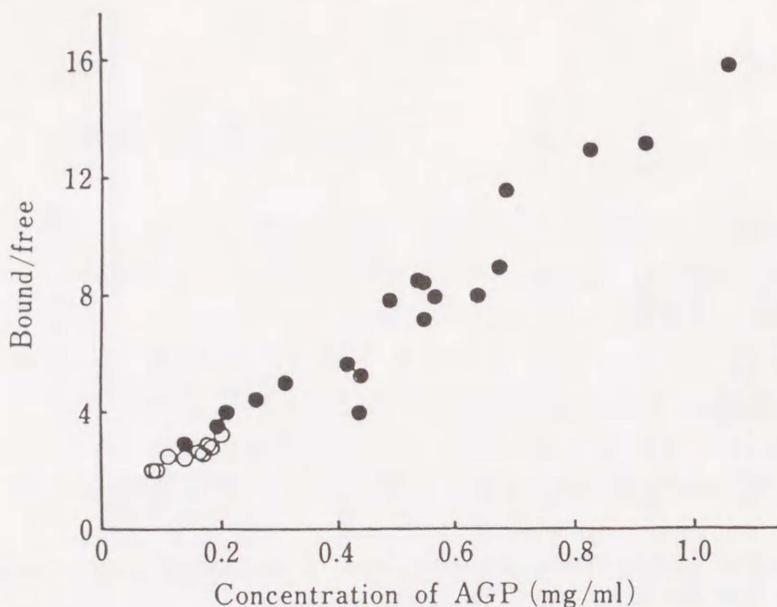


Fig.6. Relationship between the Ratios of Bound to Free Fraction of Propranolol and the Concentration of  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein(AGP) in the Plasma from Rats

Animals were sacrificed at various intervals after the injection. ○, control group; ●, CCl<sub>4</sub> group. Regression line  $y = 13.95x + 0.415$ ;  $r = 0.978$ ;  $p < 0.001$ .

## 第5節 小括

四塩化炭素肝障害群において、血漿のtotal protein、およびalbumin濃度は変化がなく、lipoprotein濃度はcontrol値の約半分に低下し、また $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は2.7倍に増加した。四塩化炭素肝障害時において、弱塩基性薬物であるpropranololとquinidineの血漿蛋白質結合率はcontrol群に比べて有意に増加した。弱塩基性薬物の $\alpha_1$ -acid glycoproteinへの結合の競合的阻害剤であるTBEPを血漿へ添加すると、control群と四塩化炭素肝障害群間における薬物の血漿蛋白質結合率の有意な差はpropranolol、quinidine共に消失した。また、control群及び四塩化炭素投与群において、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度とpropranololの血漿蛋白質結合の間には、相関係数 $r = 0.978$ の非常に高い相関性が示された。以上の結果から、四塩化炭素肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率の増加は、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加によるものであると結論づけられた。

## 第4章 種々の薬物性肝障害モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合

$\alpha_1$ -Acid glycoprotein (AGP)は、急性期炎症蛋白質群の一種であり、外傷<sup>46)</sup>、リウマチ性関節炎<sup>47)</sup>、火傷<sup>48)</sup>、心筋梗塞<sup>49)</sup>及び癌<sup>50)</sup>などの疾患において、その血漿中濃度は著しく増加する。肝障害の際、本臓器が $\alpha_1$ -acid glycoprotein合成の場であることから、その病理学的状態によって血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は複雑に変動する。<sup>13, 51)</sup> すなわち、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は、慢性の肝疾患あるいは肝硬変患者では減少するとされている<sup>52, 53)</sup>。一方、急性ウイルス性肝疾患患者では上昇する報告がある<sup>54, 55)</sup>。また、動物実験においても、ガラクトサミン肝障害モデルでは、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は低下すると報告<sup>56, 57)</sup>されているが、第3章に示した様に、四塩化炭素肝障害モデルでは、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度が増加することが判明した。この様に、肝疾患時における血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の変動に関する報告は少なく、また、一致した見解が得られていない。

本章においては、様々の薬物性肝障害モデルを作成し、その血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度及びalbumin濃度の変動を調べると共に、弱塩基性薬物であるPropranololの血漿蛋白質結合率と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度との関係について検討した。

### 第1節 血漿蛋白質濃度の測定

肝障害惹起薬物として、四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>, 1 ml/kg)の他に、galactosamin(GalN, 500 mg/kg)、ethionine(EN, 800 mg/kg)、N-nitrosodimethylamine(NDA, 50 mg/kg)、allyl alcohol(AOH, 50 mg/kg)、acetaminophen(AA, 900 mg/kg)、あるいはbromobenzene(BB, 1 ml/kg)をラット腹腔内に投与し、24時間後に、下大静脈より血液を採集した。N-Nitrosodimethylamine、acetaminophen及

Table X. The Plasma level of GPT in Control and Several Different Models of Chemically-Induced Liver Injury

|                            |                         |                  |                          |
|----------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| Control                    | 23 ± 3 <sup>a)</sup>    | Allyl alcohol    | 657 ± 187 <sup>c)</sup>  |
| Galactosamine              | 900 ± 186 <sup>d)</sup> | CCl <sub>4</sub> | 1126 ± 142 <sup>d)</sup> |
| Ethionine                  | 83 ± 18 <sup>c)</sup>   | Acetaminophen    | 64 ± 14 <sup>b)</sup>    |
| N-Nitroso<br>dimethylamine | 115 ± 21 <sup>d)</sup>  | Bromobenzene     | 86 ± 24 <sup>b)</sup>    |

Animals were sacrificed 24 h after the injection of galactosamine (500 mg/kg), ethionine(800 mg/kg), N-nitrosodimethylamine(50 mg/kg), allyl alcohol(50 mg/kg), CCl<sub>4</sub>(1 ml/kg), acetaminophen(900 mg/kg) or bromobenzene(1 ml/kg). a)GPT values(Karmen unit). Values are the means ± S.E. of 4 to 10 animals. Significantly different from the control; b) p<0.05, c) p<0.01, d) p<0.001.

びbromobenzeneは致死量に近い量を投与し、ethionineは肝障害を最も強く引き起こすと報告されている投与量を用いた<sup>58)</sup>。Table Xに示した様に、薬物投与群の血漿GPT値は、いずれもcontrol群値に比べて有意に増加しており、肝障害が惹起されたが、各々の肝障害モデル間においてGPT値に大きな差が認められた。

Control群の血漿中total protein、albumin、及びα<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度は、それぞれ76.9±1.3、37.2±0.7、及び0.137±0.039 mg/mlであった。Fig.7は、それぞれの肝障害群の血漿蛋白質濃度を、control群値からの変化%で示している。

Galactosamine投与群の血漿α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度はcontrol群値に比べ45%減少した。この結果は、Monnetら<sup>57)</sup>の報告と一致している。対照的に、四塩化炭素、acetaminophen、N-nitroso-dimethylamine、allyl alcohol及びbromobenzeneの投与群では、血漿α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度はcontrol群値に比べて明らかに増加しており、その増加率は、それぞれ、244、188、166、122 及び 92%であった。一方、ethionine投与群の血漿α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度には有意な変化が認められなかった。

血漿albumin濃度は、allyl alcohol、galactosamine、及び

N-nitrosodimethylamine投与群において、control値に比べそれぞれ、23、20及び11%減少した。また、血漿total protein濃度も、allyl alcohol、galactosamine及びN-nitrosodimethylamine投与群においては、albumin濃度の減少に対応して、それぞれ、23、17及び8%減少した。四塩化炭素、acetaminophen及びbromobenzene投与群の血漿中total protein及びalbumin濃度にはほとんど変化が認められなかった。今回作成した種々の薬物性肝障害モデルは、その血

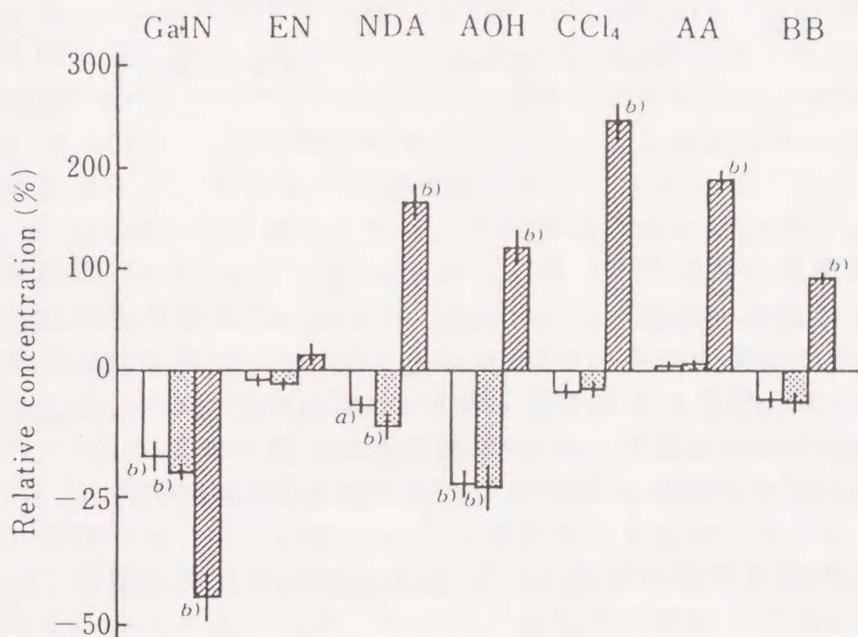


Fig. 7. Relative Plasma Concentrations of Total Protein, Albumin and  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein(AGP) in Several Models of Chemically-Induced Liver Injury

The relative concentration(%) were calculated from the equation:  
 $\% = \{(P_i - P_c) / P_c\} \times 100$  where  $P_i$  is the plasma protein concentration in the rats with chemically-induced hepatic injury and  $P_c$  is the plasma protein concentration in the control rats. Values are the means  $\pm$  S.E. of 4 to 10 animals. Significantly different from control; a)  $p < 0.05$ , b)  $p < 0.01$ . GalN, galactosamine; EN, ethionine; NDA, N-nitrosodimethylamine; AOH, allyl alcohol; AA, acetaminophen; BB, bromobenzene.  $\square$ , total protein;  $\square$  (dotted), albumin;  $\square$  (hatched), AGP.

Table XI. Classification of Several Different Models of Chemically-Induced Liver Injury

|            |                  |                                                |
|------------|------------------|------------------------------------------------|
| Category 1 | AGP ↑, Albumin → | CCl <sub>4</sub> , Acetaminophen, Bromobenzene |
| Category 2 | AGP ↑, Albumin ↓ | N-Nitrosodimethylamine, Allyl alcohol          |
| Category 3 | AGP →, Albumin → | Ethionine                                      |
| Category 4 | AGP ↓, Albumin ↓ | Galactosamine                                  |

漿蛋白質濃度の変動の違いから、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度のみ増加するもの(category I)、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度が増加し、albumin濃度が減少するもの(category II)、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度、albumin濃度ともに変化しないもの(category III)、及び $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度、albumin濃度ともに減少するもの(category IV)の四種に分類することができた(Table X I)。

## 第2節 肝障害度と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の関係

薬物性肝障害モデルにおける血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加の原因として、肝細胞障害にひき続いて起きる炎症性反応が考えられる。そこで、種々の肝障害モデルにおいて血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加と、肝細胞壊死の指標となる血漿中GPT増加との相関性を調べた。四種類の肝障害モデルのcategoryの中から肝障害惹起薬物として、それぞれ、四塩化炭素、allyl alcohol、galactosamine及びethionineを選択し、これらの薬物の様々な量をラットに投与し、24時間後の血中 $\alpha_1$ -acid glycoproteinとGPT濃度を調べた。Fig. 8に、横軸の投与量に対して血漿中の $\alpha_1$ -acid

glycoprotein濃度とGPT活性を縦軸にplotした。四塩化炭素群の血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は、投与量の増加とともに、GPT活性の上昇とほぼ平行して増加した。しかしながら、allyl alcohol投与群においては、GPTレベルが上昇する以前から、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加が認められた。また、四塩化炭素、allyl alcohol投与群とも、重篤な肝障害の状態では、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は逆に低下した。一方、galactosamine投与群では血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は、いかなる投与量においても増加することなく、肝障害の重篤度と共に漸次減少した。また、ethionine投与群においては、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の有意な変化は認められなかった。以上の結果から、肝障害惹起薬物投与モデルにおいて、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の上昇は、肝障害の程度とは相関しないことが示された。

今回の実験で血漿の $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度を上昇させた薬物、すなわち四塩化炭素<sup>59)</sup>、acetaminohen<sup>60)</sup>、N-nitroso-dimethylamine<sup>61)</sup>、allyl alcohol<sup>62)</sup>及びbromobenzene<sup>63)</sup>の肝障害発現のメカニズムは、薬物あるいは代謝物によって生じた活性酸素が、膜の脂質過酸化を引き起こすためであると報告されている。一方、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度を上昇させなかったgalactosamine<sup>65)</sup>及びethionine<sup>66, 67)</sup>の肝障害発現には、活性酸素の関与はないとされている。また、四塩化炭素投与動物においては、膜のリン脂質の過酸化が引き起こされた結果、炎症反応のmediatorであるleukotrienが生じるという報告<sup>68, 69)</sup>もある。これらのことから肝障害惹起薬物による血漿 $\alpha_1$ -acid glycoproteinの上昇に、肝臓における脂質過酸化のなんらかの関与があるように思われる。

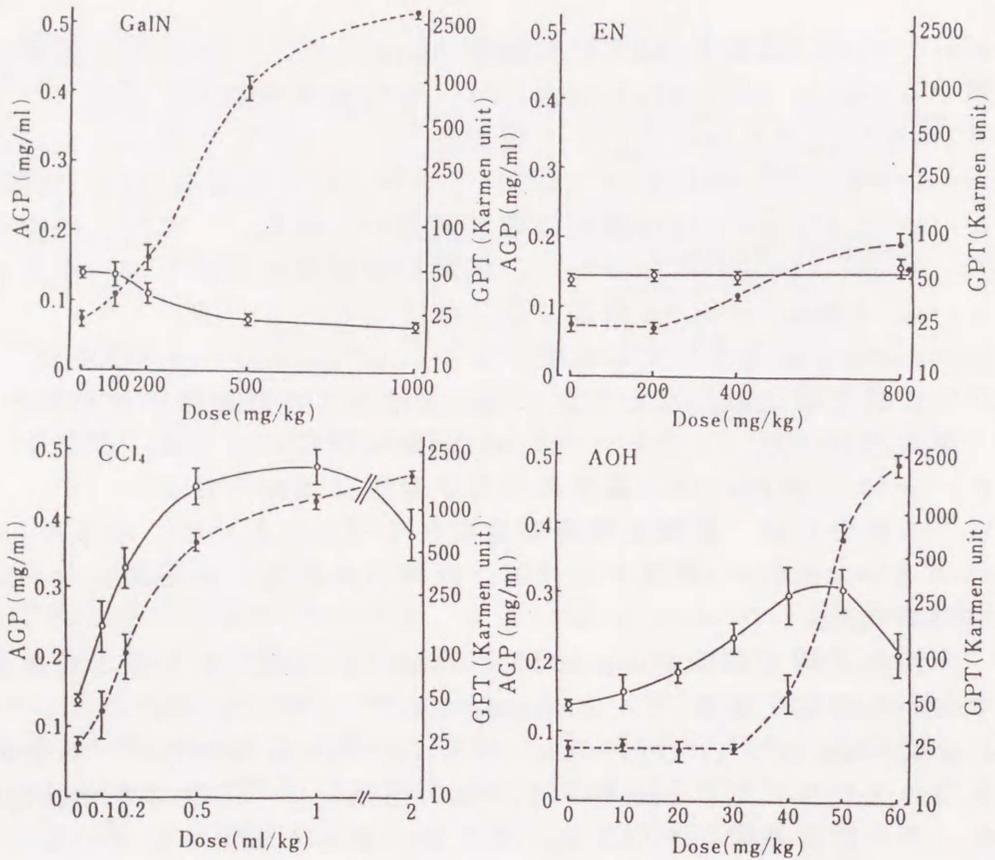


Fig.8 The Plasma Concentrations of  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein(AGP) and GPT in the Rats Treated with Various Doses of CCl<sub>4</sub>, Allyl alcohol, Galactosamine or Ethionine

Animals were sacrificed 24 h after the injection of hepatotoxin. Various are the means  $\pm$  S.E. of 7 to 8 animals.  $\circ$ , AGP level;  $\bullet$ , GPT level. GalN, galactosamine; EN, ethionine; AOH, allyl alcohol.

### 第3節 血漿蛋白質結合率と血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度との相関

血漿albuminと $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の変動が弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率に及ぼす影響を評価するため、血漿蛋白質濃度とpropranolol血漿蛋白質結合を同時に、種々の薬物性肝障害モデル

間で測定した。蛋白質結合率の測定は、propranolol 1  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で限外濾過法で行った。Fig.9は、propranololの血漿蛋白質結合性をbound/freeで表したものを縦軸に、albuminあるいは $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度を横軸にとりplotしたものである。Propranololの血漿蛋白質結合は、albumin濃度との間には相関性を示さず、一方、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度との間には相関係数 $r=0.940$ で高い相関性を示した。以上の結果から、種々の薬物性肝障害モデルにおいて、propranololの血漿蛋白質結合率は、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の変動に大きく影響を受け、一方albumin濃度の変動にはほとんど影響を受けないことが判明した。

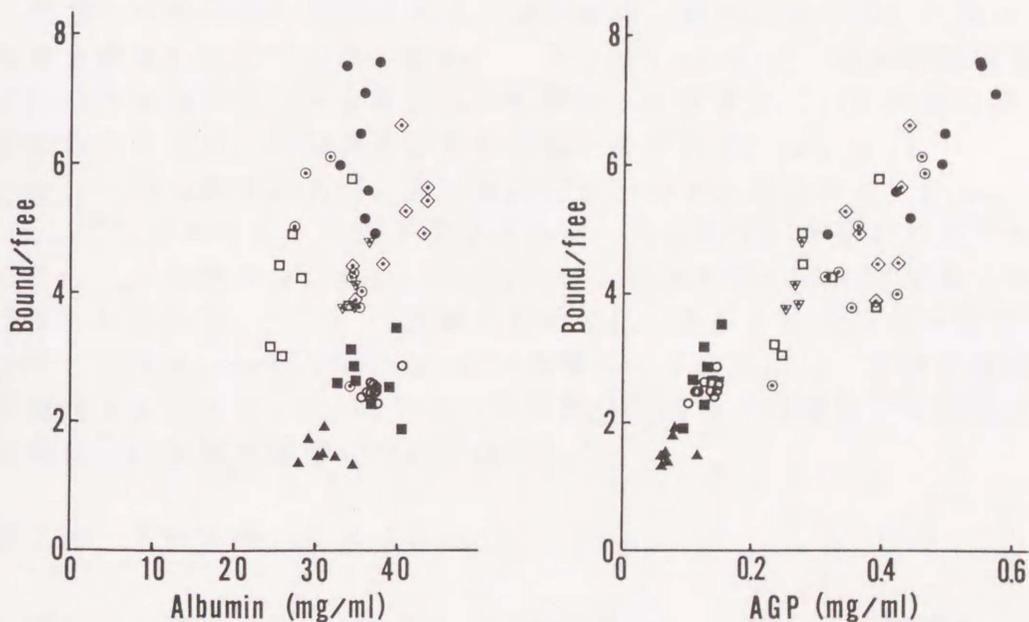


Fig.9 Relationships between the Ratios of Bound to Free Fraction of Propranolol and the Concentrations of  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein(AGP) or Albumin in the Plasma from Control and Several Different Models of Chemically-Induced Liver Injury

The same plasma samples as those shown in Fig.7 were subjected to the experiments.  $\circ$ , control;  $\blacktriangle$ , galactosamine;  $\blacksquare$ , ethionine;  $\odot$ , N-nitrosodimethylamine;  $\square$ , allyl alcohol;  $\bullet$ ,  $\text{CCl}_4$ ;  $\diamond$ , acetaminophen;  $\nabla$ , bromobenzene. Regression line for  $\alpha_1$ -acid glycoprotein  $y = 11.90 x + 0.714$ ;  $r = 0.940$ ;  $p < 0.001$ .

#### 第4節 小括

7種の肝障害惹起薬物をラットに投与し、種々の薬物性肝障害モデルを作成した。肝障害モデルは、血漿中蛋白質濃度の変動の相違から4種類のcategoryに分類された。種々の肝障害モデルにおいて、propranololの血漿蛋白質結合性は、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度との間に相関係数 $r=0.940$ の高い相関性を示したが、albumin濃度との間には相関性を示さなかった。従って、種々の薬物性肝障害モデルにおいては、弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率は、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の変化から予測されることが判明した。

## 第5章 高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデル（テレピン油投与ラット）におけるquinidineの体内動態

第3章において、四塩化炭素肝障害モデルでは、血漿中の $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP)濃度が上昇することにより、quinidine等の弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率が増加することが判明した。また第1章で示したように蛋白質結合率の増加は、四塩化炭素肝障害モデルにおいて、quinidineの分布容積( $V_{dss}$ )を減少し、更にplasma total body clearance ( $CL_{tot}$ )や消失速度定数( $K_{e1}$ )の減少にも影響を及ぼしていると考えられた。しかしながら、四塩化炭素肝障害モデルにおいては、quinidineの体内動態変化の要因として、血漿蛋白質結合率の増加の他に、肝代謝能、肝血流量の著しい減少も充分考慮しなくてはならない。従って、quinidineの血漿蛋白質結合率の増加が及ぼす本薬物の体内動態への影響について詳細に検討するためには、肝障害及び肝血流低下を伴わず、 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度のみが上昇する動物モデルが必要と考えられる。

テレピン油をラットに皮下投与すると、投与部位に肉芽を形成するとともに、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度が著しく上昇することが知られている<sup>70, 71)</sup>。本章においては、ラットにテレピン油を投与して高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデルを作成し、その肝機能を検討すると共に、quinidineの血漿蛋白質結合率の増加が本薬物の体内動態に及ぼす影響について検討した。

### 第1節 生理学的パラメーター

テレピン油 5 ml/kg をラットに皮下投与し、16、48 時間後に（以後16h-テレピン群、48h-テレピン群と表す）血漿中albuminや $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度、quinidineの血漿中非結合型薬物分率( $f_p$ )及び血液-血漿間分配比( $R_b$ )、さらに肝機能を示すものとして血漿GPTと肝血流量を測定した(Table X II)。テレピン油投与群の

Table X II. Physiological Parameters in Turpentine Oil-Treated Rats

|                              | Control       | Turpentine <sup>a)</sup>    |                             |
|------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                              |               | 16 h                        | 48 h                        |
| GPT(Karmen unit)             | 19.5 ± 1.0    | 20.6 ± 1.01                 | 18.6 ± 1.3                  |
| Albumin(mg/ml)               | 37.2 ± 1.2    | 38.6 ± 0.7                  | 39.4 ± 0.5                  |
| AGP(mg/ml)                   | 0.142 ± 0.011 | 0.466 ± 0.045 <sup>f)</sup> | 2.18 ± 0.13 <sup>f)</sup>   |
| HBF(ml/min/g) <sup>b)</sup>  | 1.11 ± 0.07   | —                           | 1.13 ± 0.10                 |
| f <sub>p</sub> <sup>c)</sup> | 0.332 ± 0.009 | 0.234 ± 0.020 <sup>e)</sup> | 0.079 ± 0.006 <sup>f)</sup> |
| R <sub>b</sub> <sup>d)</sup> | 1.50 ± 0.02   | 1.19 ± 0.03 <sup>f)</sup>   | 0.704 ± 0.020 <sup>f)</sup> |

a) Determined at 16 h and 48 h after the injection of turpentine oil at a dose of 0.5 ml per 100g body weight. b) Hepatic blood flow was measured hydrogen gas clearance method. c) Free fraction of quinidine in the plasma. The concentration of quinidine in plasma was 1 μg/ml. d) Blood-to-plasma concentration ratio. Significantly different from the control group, e) p<0.01, f) p<0.001. Values are the means ± S.E. of 4 to 6 animals.

肝血流量及びGPT値は、control群値と比べて有意な変化が認められなかった。従って、テレピン油投与によってラットに肝障害は惹起されていないことが推察される。一方、血漿α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度は、16h-及び48h-テレピン群で、それぞれcontrol群値の約3倍及び約15倍に増加した。しかし、血漿中albumin濃度はcontrol群値と比べて有意に変化しなかった。16h-及び48h-テレピン群から、血漿中quinidine濃度が1 μg/mlの定常状態で採集した血漿におけるquinidineのf<sub>p</sub>は、それぞれ0.234と0.079であり、control群値と比べて30%及び76%減少した。Fig.10は、quinidineの血漿蛋白質結合性をbound/freeで表したものを縦軸に、血漿α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度を横軸にとりplotしたものである。これらのplotから、相関係数r=0.987が得られ、quinidineの血漿蛋白質結合と血漿α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度の間には、非常に高い相関性があることが示された。この図において、quinidineのbound/freeの比と血漿中α<sub>1</sub>-acid glycoprotein濃度のplotが原点を通らず、その

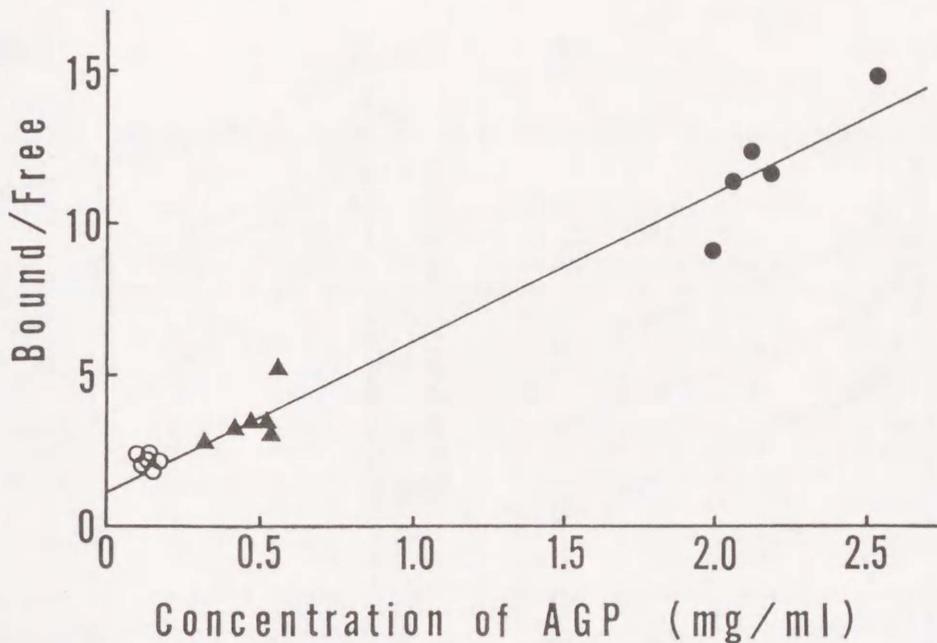


Fig.10 Relationship between the Ratio of the Bound to Free Fraction of Quinidine and the Plasma  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein(AGP) Concentration in Rats

Control(○), 16 h- (▲) and 48 h- (●) turpentine oil-treated rats. The line represents regression line ( $r = 0.987$ ,  $p < 0.001$ ).

切片が1.18であることは、quinidineの一部は $\alpha_1$ -acid glycoprotein以外の血漿成分とも結合していることを示唆している。この事は、quinidineの血漿濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ で、control群における本薬物の血漿蛋白質結合率68%のうち52%が、albuminなどの他の血漿成分と結合していることが示された結果と一致している。

## 第2節 単回静注投与後の血漿中挙動

Quinidine 3.0、7.0あるいは12.5 mg/kgを、control及びテレピン群に静注し、quinidineの血漿中濃度を経時的に測定した(Fig.11)。テレピン群においては、quinidineの血漿中濃度はいずれの投与量においてもcontrol値に比べて高く、また、血漿からのquinidineの消失の遅延が認められた。Control、テレピン群ともに、quinidine

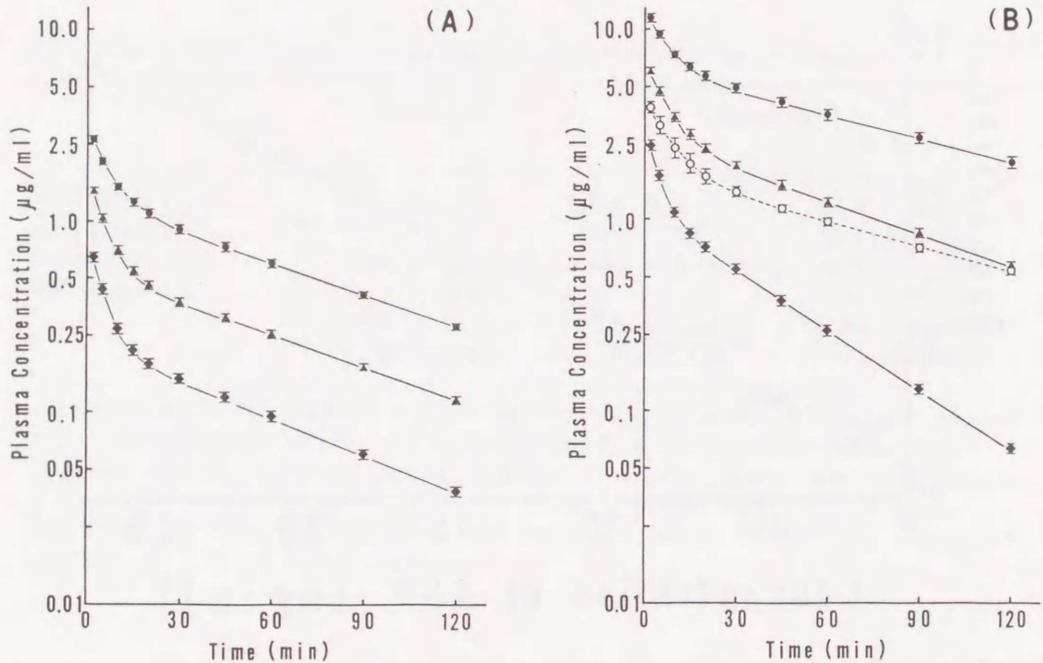


Fig.11 Disappearance of Quinidine from Plasma after Intravenous Injection in Control(A) and Turpentine Oil-Treated(B) Rats

Quinidine sulfate was injected at a dose of 3.0(◆), 7.0(▲) or 12.5(● or ○) mg/kg as quinidine base. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4 to 6 animals. (◆▲●): 48 h-turpentine oil-treated rats, (○): 16 h-turpentine oil-treated rats.

の血漿からの消失はbiexponential curveで示され、two compartment modelに従って解析したpharmacokinetics parameterをTableX IIIに示した。Control群及びテレピン群の $R_b$ 値はすべてのquinidine濃度において一定であり、 $CL_p$ と $R_b$ 値から算出した全身血液クリアランス( $CL_b$ )は、投与量の増加とともに漸次減少していった。この様なquinidineの血漿中挙動のdose-dependencyは、分布容積( $V_c$ )にdose-dependencyが認められないことより、肝におけるquinidineの薬物代謝の飽和、即ち $K_{e1}$ の減少によるものと考えられる。 $CL_b$ は、テレピン群ではcontrol群に比べ、より著しいdose-dependencyを示した。48h-テレピン群における $CL_b$ は、投与量

Table XIII. Pharmacokinetic Parameters of Quinidine after Intravenous Administration

| *                                       | control                |                                      |                                      | 48 h-turpentine                      |                                        |                                          | 16 h-turpentine                      |
|-----------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|
|                                         | 3.0mg/kg               | 7.0mg/kg                             | 12.5mg/kg                            | 3.0mg/kg                             | 7.0mg/kg                               | 12.5mg/kg                                | 12.5 mg/kg                           |
| A ( $\mu\text{g/ml}$ )                  | 1.09<br>$\pm 0.21$     | 1.26<br>$\pm 0.05$                   | 2.03 <sup>a)</sup><br>$\pm 0.19$     | 2.41 <sup>e)</sup><br>$\pm 0.10$     | 4.59 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 0.20$     | 7.05 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 0.67$       | 2.86 <sup>d)</sup><br>$\pm 0.16$     |
| B ( $\mu\text{g/ml}$ )                  | 0.232<br>$\pm 0.013$   | 0.560 <sup>c)</sup><br>$\pm 0.015$   | 1.29 <sup>c)</sup><br>$\pm 0.11$     | 1.14 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.04$     | 2.77 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 0.20$     | 6.45 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 0.45$       | 1.79 <sup>e)</sup><br>$\pm 0.03$     |
| d ( $\text{min}^{-1}$ )                 | 0.223<br>$\pm 0.016$   | 0.178<br>$\pm 0.011$                 | 0.186<br>$\pm 0.027$                 | 0.253<br>$\pm 0.016$                 | 0.158 <sup>a)</sup><br>$\pm 0.022$     | 0.163 <sup>a)</sup><br>$\pm 0.028$       | 0.144<br>$\pm 0.036$                 |
| $\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )           | 0.0148<br>$\pm 0.0007$ | 0.0131<br>$\pm 0.0003$               | 0.0126<br>$\pm 0.0006$               | 0.0244 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.0006$ | 0.0131 <sup>c)</sup><br>$\pm 0.0006$   | 0.00978 <sup>c,e)</sup><br>$\pm 0.00044$ | 0.0101 <sup>e)</sup><br>$\pm 0.0002$ |
| $k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )          | 0.121<br>$\pm 0.010$   | 0.0908<br>$\pm 0.0079$               | 0.0856<br>$\pm 0.0116$               | 0.117<br>$\pm 0.010$                 | 0.0722 <sup>a)</sup><br>$\pm 0.0112$   | 0.0696 <sup>a)</sup><br>$\pm 0.0144$     | 0.0685<br>$\pm 0.0212$               |
| $k_{21}$ ( $\text{min}^{-1}$ )          | 0.0698<br>$\pm 0.0076$ | 0.0640<br>$\pm 0.0043$               | 0.0837<br>$\pm 0.0189$               | 0.0982<br>$\pm 0.0082$               | 0.0687<br>$\pm 0.0112$                 | 0.0839<br>$\pm 0.0147$                   | 0.0621<br>$\pm 0.0147$               |
| $k_{el}$ ( $\text{min}^{-1}$ )          | 0.0476<br>$\pm 0.0012$ | 0.0363 <sup>c)</sup><br>$\pm 0.0009$ | 0.0291 <sup>c)</sup><br>$\pm 0.0011$ | 0.0629 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.0022$ | 0.0304 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 0.0004$ | 0.0191 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 0.0006$   | 0.0232 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.0002$ |
| $V_c$ (l/kg)                            | 3.41<br>$\pm 0.18$     | 3.86<br>$\pm 0.11$                   | 3.80<br>$\pm 0.16$                   | 0.845 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.021$   | 0.957 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.042$     | 0.943 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.063$       | 2.70 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.11$     |
| $V_{dss}$ (l/kg)                        | 9.32<br>$\pm 0.32$     | 9.32<br>$\pm 0.29$                   | 7.97 <sup>a)</sup><br>$\pm 0.36$     | 1.84 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.06$     | 1.98 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.12$       | 1.65 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.06$         | 5.59 <sup>e)</sup><br>$\pm 0.36$     |
| AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$ ) | 18.7<br>$\pm 0.7$      | 50.2 <sup>c)</sup><br>$\pm 1.3$      | 114 <sup>c)</sup><br>$\pm 3$         | 56.7 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.7$      | 241 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 9$         | 709 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 43$          | 201 <sup>f)</sup><br>$\pm 9$         |
| $CL_p$ (ml/min/kg)                      | 162<br>$\pm 6$         | 140 <sup>a)</sup><br>$\pm 4$         | 110 <sup>c)</sup><br>$\pm 4$         | 53.0 <sup>f)</sup><br>$\pm 0.7$      | 29.1 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 1.1$      | 17.9 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 1.1$        | 62.6 <sup>f)</sup><br>$\pm 2.9$      |
| $CL_b$ (ml/min/kg)                      | 108<br>$\pm 4$         | 93.2 <sup>a)</sup><br>$\pm 3.6$      | 73.4 <sup>c)</sup><br>$\pm 3.6$      | 75.3 <sup>f)</sup><br>$\pm 1.0$      | 41.3 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 1.5$      | 25.4 <sup>c,f)</sup><br>$\pm 1.5$        | 52.6 <sup>e)</sup><br>$\pm 2.4$      |

The values except  $CL_b$  were estimated from plasma concentration. The value of  $CL_b$  was calculated by the equation:  $CL_b = CL_p / R_b$ . Values are the means  $\pm$  S.E. of 4 to 6 animals. Significantly different from a dose of 3.0 mg/kg. a)  $p < 0.05$ , b)  $p < 0.01$ , c)  $p < 0.001$ . Significantly different from the control of corresponding dose. d)  $p < 0.05$ , e)  $p < 0.01$ , f)  $p < 0.001$ .

3.0、7.5、12.5 mg/kgにおいて、control群値と比べてそれぞれ30、56、65%減少した。テレピン油投与群における分布容積は、各投与量間で一定の値を示したものの、control群に比べて大幅に低下したことから、テレピン群における $CL_b$ の減少は、分布容積( $V_c$ )と消失速度定数( $k_{e1}$ )の両パラメーターの減少によることが判明した。また、投与量12.5mg/kgのquinidineの分布容積( $V_{dss}$ )は、16h-及び48hテレピン群において、control群値と比べてそれぞれ30と79%減少した。この $V_{dss}$ の減少は、四塩化炭素肝障害モデルにおける結果と同様、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加による $f_p$ の減少によるものと考えられる。

### 第3節 肝抽出率の測定

ラットにおいて、quinidineはほとんど肝臓で代謝除去される<sup>21)</sup>ことから、単回静注後のquinidineの $CL_b$ の減少は、肝クリアランスの減少によるものと考えられる。肝クリアランスは、well-stirred modelに従うと、(11)式で示したように肝血流と薬物の肝抽出率の積として表される。

$$CL_h = Q_h \cdot E \text{ ----- (11)}$$

Table X IIに示したように、肝血流量は、テレピン油処理によりほとんど影響を受けなかった。そこで、quinidineの肝クリアランス減少のもう一方の要因である肝抽出率をcontrol及び48h-テレピン群間で比較した。肝抽出率は、quinidineの血中濃度が0.5から2.3  $\mu\text{g/ml}$ までの定常状態で測定した。Fig.12に示したように、control及びテレピン両群とも、quinidineの肝抽出率は血中濃度の増加に従い漸次減少した。これらの結果は、単回静注時に認められたdose-dependencyの結果と一致するものである。テレピン群の肝抽出率は、いずれのquinidine血中濃度においてもcontrol群値に比べて低く、その低下率はquinidine血中濃度の上昇と共に、約15から40%に増大した。実測した肝抽出率から(13)式に従って肝臓における

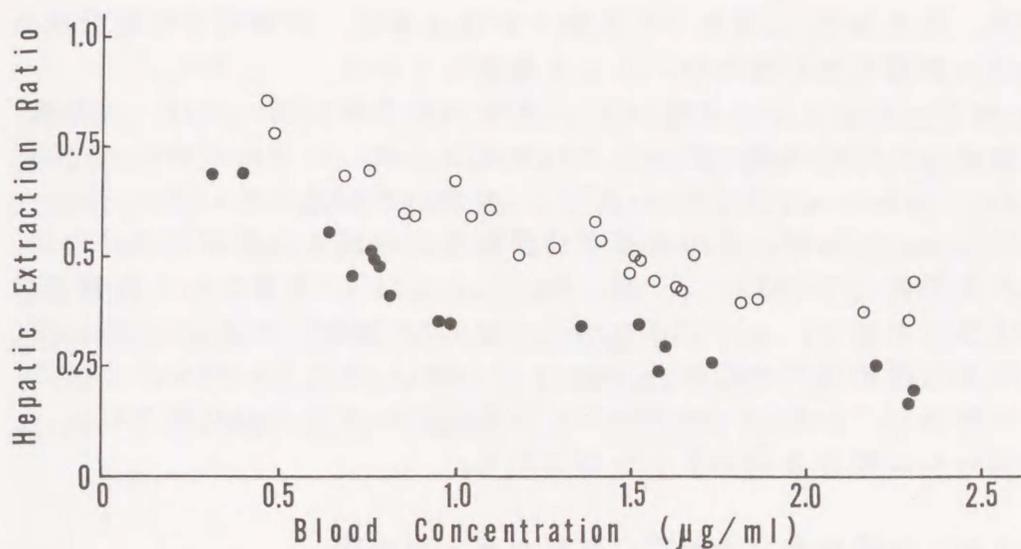


Fig.12 Hepatic Extraction Ratio as a Function of Blood Concentration of Quinidine in Control and 48 h-Turpentine Oil-Treated Rats

The hepatic extraction ratio was determined in control(○) and 48 h-turpentine oil-treated(●) rats under the steady state blood concentration of quinidine ranging from 0.5 to 2.3  $\mu\text{g/ml}$ .

quinidineの代謝能を示す $CL_{int}$ を求めたところ、control及びテレピン両群の間に有意な差は認められなかった。

$$E = (f_p / R_b) \cdot CL_{int} / \{Q_h + (f_p / R_b) \cdot CL_{int}\} \quad \text{--- (13)}$$

従って、テレピン群においては、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加に基づくquinidineの血漿蛋白質結合率の増加が、肝抽出率の低下を引き起こし、更には $CL_b$ の減少を招くものと考えられた。

これまで肝臓で主として代謝される薬物の血漿蛋白質結合率の変動が及ぼす $CL_b$ への影響について、肝抽出率の観点から多くの研究がなされている<sup>72-75)</sup>。WilkinsonやShandra<sup>76)</sup>は、肝固有クリアランス( $CL_{int}$ )の小さい薬物の肝抽出率は、血漿蛋白質結合率に依存す

るが、大きな $CL_{int}$ をもった薬物の肝抽出率は、血漿蛋白質結合率の変動の影響を殆ど受けないことを報告している。しかし、quinidineのような中程度の $CL_{int}$ をもった薬物に関しては、血漿蛋白質結合と肝抽出率の関係について未だ一致した見解が得られていない。Guentert及びDieらは<sup>77)</sup>、虚血した家兎において、quinidineの $CL_p$ が、その血漿蛋白質結合率の減少の影響を受けないことを報告している。一方、Mansorらは<sup>78)</sup>、単離ラット肝臓の灌流実験において、 $\alpha_1$ -acid glycoproteinの添加によるquinidineの血漿蛋白質結合率の増加が、quinidineの $CL_h$ を有意に減少させることを報告している。今回テレピン群において得られた結果は、Mansorらの報告を指示するものである。

#### 第4節 組織分布と血漿蛋白質結合率との相関

第2節において述べたように、16h-及び48h-テレピン群では、quinidine 12.5 mg/kg静注後の分布容積( $V_{dss}$ )は、control値に比べそれぞれ30及び79%減少した。そこで、control群とテレピン群において肺、腎臓、脾臓、肝臓、心臓におけるquinidineの $K_p$ 値を測定した(Table X IV)。各組織の $K_p$ 値はcontrol群値に比べ、16h-テレピン群では28-39%、48h-テレピン群では76-81%減少し、これらの値は $V_{dss}$ の減少率に近似した。従って、テレピン群における $V_{dss}$ の減少は、組織分布の減少に起因するものと考えられる。<sup>79-81)</sup> 薬物の $f_p$ の変動が分布容積( $V_{dss}$ )に大きな影響を与えること、更には $f_p$ と組織分布( $K_p$ )との関係を論じた報告はあるが、実際に、薬物の組織分布と $f_p$ との相関性について実測した報告はない。そこで、controlと16h-、48h-テレピン群における個々のラットの $K_p$ 値と $f_p$ 値をplotして両者の相関性を検討した。Fig. 13に示すように、検討したすべての組織において、 $K_p$ 値と $f_p$ の間には、原点を通る高い相関性が認められた。第2章において、 $K_p$ 値は血漿蛋白質結合率の他に、薬物と組織との結合、組織及び血漿中のpHによっても左右

されることを述べた。今回、 $K_p$ 値と $f_p$ の間に原点を通る相関性が認められたことは、テレピン油投与による各組織の $K_p$ 値の減少が、 $f_p$ の減少によってのみ引き起こされたものであることを示唆している。すでにFig.10で示したように、control及びテレピン群間における血漿中の $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度とquinidineの $f_p$ の間には、相関係数 $r=0.987$ と非常に高い相関性が認められた。従って、テレピン群における $V_{dss}$ あるいは $K_p$ 値の減少は、血漿中 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の上昇に起因するものと結論された。

Table XIV. Tissue to Plasma Partition Coefficients( $K_{p,vivo}$ ) of Quinidine in Various Tissues in Control and Turpentine Oil-Treated Rats

|        | Control     | 16 h-Turpentine<br>(change%) <sup>a)</sup> | 48 h-Turpentine<br>(change%) <sup>a)</sup> |
|--------|-------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Lung   | 73.5 ± 4.6  | 49.2 ± 5.7( 33 ) <sup>b)</sup>             | 14.8 ± 2.4( 80 ) <sup>c)</sup>             |
| Kidney | 29.5 ± 1.6  | 20.2 ± 2.0( 32 ) <sup>b)</sup>             | 5.63 ± 0.22( 81 ) <sup>c)</sup>            |
| Spleen | 24.7 ± 0.5  | 17.8 ± 1.2( 28 ) <sup>c)</sup>             | 5.92 ± 0.66( 76 ) <sup>c)</sup>            |
| Liver  | 24.5 ± 1.3  | 14.9 ± 1.2( 39 ) <sup>c)</sup>             | 5.59 ± 0.44( 77 ) <sup>c)</sup>            |
| Heart  | 9.88 ± 0.43 | 7.02 ± 0.72( 29 ) <sup>b)</sup>            | 1.98 ± 0.29( 80 ) <sup>c)</sup>            |

Values are the means ± S.E. of 5 to 6 animals. a) Calculated by the equation: % =  $\{(K_p \text{ in control} - K_p \text{ in turpentine})/K_p \text{ in control}\} \times 100$ .  
b)  $p < 0.01$ , c)  $p < 0.001$ .

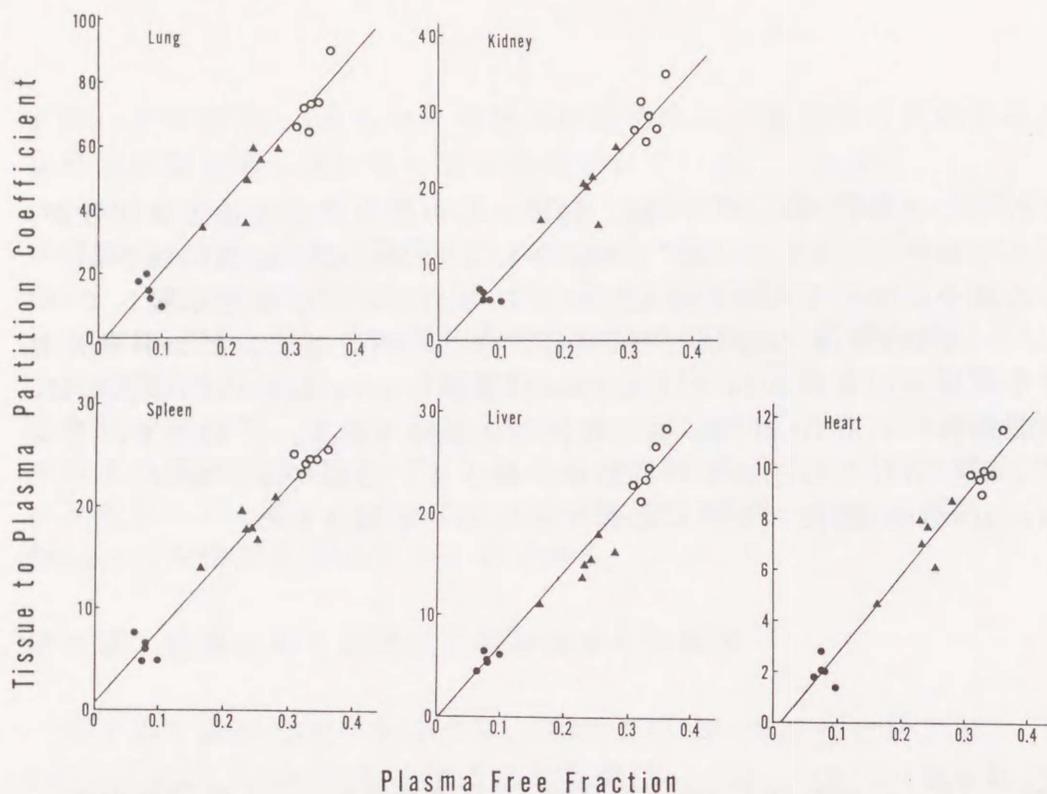


Fig.13 Relationship between the Tissue to Plasma Partition Coefficient( $K_p$ ) and the Plasma Free Fraction of Quinidine

Control(○), 16 h- (▲) and 48 h- (●) turpentine oil-treated rats. Each line represents the regression line ( $r = 0.970 - 0.982$ ,  $p < 0.001$ ).

## 第5章 小括

テレピン油の投与は、肝障害を伴わず、その血漿  $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度のみを著しく上昇した。Control及びテレピン油投与ラットの間において、血漿  $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度と quinidineの血漿蛋白質結合は、相関係数 $r=0.987$ という非常に高い相関性を示した。従って、テレピン油投与ラットは、quinidineの血漿蛋白質結合率増加による本薬物の体内動態の変化を説明する上で、有用な高  $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデルであることが示された。

高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデルにおいて、quinidineの血漿消失を調べたところ、quinidineの $CL_b$ が、dose-dependentにcontrol群の $CL_b$ に比べ著しく減少した。このことは、高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデルにおけるquinidineの肝抽出率がcontrol群のそれに比べて明らかに減少することからも実証された。

高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血漿モデルでは、quinidineのplasma free fraction( $f_p$ )の減少に伴い、 $K_p$ 値も減少し、またcontrolラット及び同モデル間におけるquinidineの $f_p$ と $K_p$ 値の間には、高い相関性が認められた。以上の結果から、四塩化炭素肝障害モデルにおいては、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の増加に基づくquinidineの血漿蛋白質結合率増加が、quinidineの $V_{dss}$ の減少のみならず $CL_b$ や $K_{e1}$ の減少にも寄与していることが証明された。

## 結論

今回、弱塩基性薬物のモデル薬物としてquinidineを選び、薬物性肝障害時におけるその体内動態の変化と要因について検討し以下の結論を得た。

- (1) 四塩化炭素肝障害モデルにおいては、quinidineの血漿蛋白質結合率の増加のため分布容積や組織分布率が減少していること、また、肝抽出率(HER)と肝血流量(HBF)の低下により全身クリアランス( $CL_{tot}$ )が減少していることを明らかにした。
- (2) 同モデルにおける弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率の増加は、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein(AGP)濃度の上昇によることを明らかにした。
- (3) 血漿の $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度は、四塩化炭素肝障害( $CCl_4$ )の他、N-nitrosodimethylamine(NDA)、allyl alcohol(AOH)、acetaminophen(AA)、及びbromobenzene(BB)肝障害モデルにおいて増加し、ethionine(EN)肝障害モデルでは変化せず、galactosamine(GalN)肝障害モデルで減少した。またこれらの薬物性肝障害モデル間において、弱塩基性薬物の血漿蛋白質結合率は、血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein(AGP)濃度に大きく影響を受け、血漿albumin濃度の変動にはほとんど影響されないことを明らかにした。
- (4) 肝障害を伴わない高 $\alpha_1$ -acid glycoprotein(AGP)血漿モデルを用いて、quinidineの血漿蛋白質結合率増加が、 $V_{dss}$ や $K_p$ 値を減少させるだけでなく、肝抽出率(HER)を低下させ、その結果 $CL_{tot}$ を減少させることを明らかにした。

本研究は、肝障害動物モデルにおける弱塩基性薬物の体内動態を生理学的速度論に基づき解析したものである。弱塩基性薬物としてquinidineを用いて検討した結果、四塩化炭素肝障害時の体内動態

変動を各生理学的パラメーターの変動として表現し理解することが可能となった。なかでも肝障害時の血漿 $\alpha_1$ -acid glycoprotein濃度の上昇が、quinidineの体内挙動変動の重要な因子となることを、全身クリアランス、肝抽出率及び組織分布の面から明らかにすることができた。これらの知見は、臨床における弱塩基性薬物のより安全で有効な投与計画確立に有用な情報を与えるものと考えられる。

## 謝辞

本論文の作成に際し、御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました広島大学医学部 矢田 登教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当り、終始御指導と御鞭撻を賜りました広島大学医学部 村上照夫助教授に深く感謝致します。更に、御世話になりました東 豊助教授をはじめとして、広島大学医学部医療薬剤学教室の皆様は厚く御礼申し上げます。

本研究は福山大学薬学部で行ったものであり、その間終始懇切な御指導と有益な御援助を賜りました福山大学薬学部 古野浩二教授に心からの感謝の意を表します。

また、 $\alpha_1$ -acid glycoproteinの精製に御協力と御助言を頂きました福山大学薬学部 辻 宏教授、赤崎健司講師、並びに肝血流量の測定に御協力頂きました湧永製薬株式会社 天々瀬晴信博士に深く感謝致します。さらに、本研究に御協力と御援助を頂きました福山大学薬学部 喜多典子助手に深く感謝致します。

最後に、本研究の機会を与えて下さり、終始御理解と御激励を賜りました福山大学薬学部長 井口定男教授に心からの感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

## 論文目録

1. Narumi SUGIHARA, Koji FURUNO, Noriko KITA,  
Teruo MURAKAMI, Noboru YATA:  
“Distribution of Quinidine in Rats with Carbon  
Tetrachloride-Intoxicated Hepatic Disease.”  
J. Pharmacobio-Dyn., 15, 167-174 (1992).
2. Narumi SUGIHARA, Koji FURUNO, Noriko KITA,  
Teruo MURAKAMI, Noboru YATA:  
“Increase in the Plasma Protein Binding of Weakly Basic  
Drugs in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats.”  
Chem. Pharm. Bull., 39, 2671-2673 (1991).
3. Narumi SUGIHARA, Koji FURUNO, Noriko KITA,  
Teruo MURAKAMI, Noboru YATA:  
“Plasma  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Concentration in Rats with  
Chemical Liver Injury.”  
Chem. Pharm. Bull., 40, 2516-2519 (1992).
4. Narumi SUGIHARA, Koji FURUNO, Noriko KITA,  
Teruo MURAKAMI, Noboru YATA:  
“The Influence of Increased Plasma Protein Binding on  
the Disposition of Quinidine in Turpentine-Treated Rats.”  
Biol. Pharm. Bull., 16, No.1 (1993).

## 実験の部

### 第1章の実験

#### (1) 試薬

Quinidine sulfateはWako Pure Chemicals Co., Ltd. から購入し、他の試薬は市販特級品を使用した。

#### (2) 動物

Wistar系雄性ラット（体重250g）を使用した。四塩化炭素肝障害モデルは、オリーブ油に溶解した20%四塩化炭素溶液を、5ml/kgの投与量でラット腹腔内に投与して作成した。Controlラットには、同量のオリーブ油のみを投与した。実験は、オリーブ油または四塩化炭素投与24時間後におこなった。Control及び四塩化炭素肝障害ラットの血漿中のglutamate pyruvate transaminase活性(GPT, Karmen unit)の平均値は、それぞれ、18.6と1290であった。

#### (3) 急速単回静注投与

Sodium pentobarbital麻酔下、体温が正常を維持するよう、37°Cの保温板上にラットを固定し、実験をおこなった。生理食塩水に溶解したquinidine sulfate 2.5 mg/2 ml/kg (quinidine baseとして)は股静脈から急速静注した。静注後、経時的に頸静脈からヘパリン処理したシリンジを用いて血液を採取した。採取した血液を10,000 rpmで遠心分離し、血漿をsampleとして得た。速度論的解析は、plasma concentration-time curveから、two compartment modelに従って行った。

#### (4) 血漿quinidine濃度の定常状態の設定

麻酔下に、ラットの股静脈にpolyethylene tubing(PE-50, Clay

Adams, U.S.A.)を挿入した。股静脈からquinidineのbolus投与をした後、直ちに股静脈カニューレを介してconstant infusionをおこない、quinidineの血漿中濃度を $1\mu\text{g/ml}$ の定常状態に保った。Controlと四塩化炭素肝障害群のquinidineのbolus投与量は、それぞれ $3.79\text{ mg/kg}$ と $2.1\text{ mg/kg}$ 、infusion rateは、 $101.7\mu\text{g/min/kg}$ と $27.5\mu\text{g/min/kg}$ で行った。このbolus injection投与量とinfusion rateは静注投与後のpharmacokinetic parameterから求めた。血漿中quinidine濃度の定常状態は、infusion開始、約60分後に得られた。定常状態をより確実にを行うため90分間infusionした後、頸静脈、肝静脈及び下大静脈から採血した。直ちに門脈から氷冷したsalineを注入し脱血した後、肺、脾臓、心臓、腎臓及び肝臓の各組織をすばやく摘出した。各組織は、4倍量の $0.05\text{M}$  Tris-HCl buffer(pH 7.4)で、teflon homogenizerを使って、氷冷下でhomogenizeした。

#### (5) 定常状態におけるquinidineの $K_p$ 値と $R_b$ 値の算出

各組織の $K_p$ 値は、次式に従って求めた。

$$\begin{aligned}K_p &= C_t / C_p \\ &= 5 \cdot C_{t, dil} / C_p\end{aligned}$$

ここで、 $C_t$ は、組織中の薬物濃度を、 $C_{t, dil}$ は20%組織homogenate中の薬物濃度を表す。 $C_p$ は、頸静脈血から得られた血漿中薬物濃度を表す。肝臓の場合、 $C_p$ は、肝静脈血から得られた値を用いた。

$R_b$ 値は、全血の薬物濃度( $C_b$ )を測定し、次式より求めた。

$$R_b = C_b / C_p$$

#### (6) Quinidineの定量<sup>17)</sup>

血液、血漿及び組織homogenate中のquinidineは、Nishiuraらの方法に従って抽出した後、HPLCにて定量した。すなわち、血液、血漿sample( $100\mu\text{l}$ )を、 $0.1\text{N}$  NaOH  $1\text{ml}$ でアルカリ性とした後、benzene  $3\text{ml}$ で抽出し、そのbenzene層 $2\text{ml}$ を採取して、減圧乾固した。

組織homogenate sample(0.5ml)は、1N HCl 0.5mlで酸性とした後、dichlormethane-isopropanol(4:1 v/v)混合液3mlで抽出し、有機層を除去し、水層を採取した。この水層に3 N NaOH 0.9 mlを加え、dichlormethane-isopropanol(4:1 v/v)混合液3mlで抽出し、その有機層2mlを減圧乾固した。減圧乾固後の残査を、methanol 100  $\mu$ lで溶解し、その20  $\mu$ lをHPLC columnに注入した。使用したHPLCの機種及び定量条件を以下に示す。

Instrument : Jasco Twinkle (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)  
Detector : Fluorometric detector FP-210 (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)  
Column packing : TSK Gel ODS-80T<sub>M</sub> (Tosoh)  
Mobile phase : Acetonitrile : Methanol : 0.01M Phosphate buffer (pH 3.0) = 2 : 2 : 6  
Detection : Ex. 310nm Em. 380nm  
Flow rate : 1.0 ml/min  
Internal Standard : Propranolol

#### (7) 肝抽出率の測定

血漿中quinidine濃度 1  $\mu$ g/mlの定常状態において採取した頸静脈( $C_p$ )、肝静脈血中( $C_v^h$ )のquinidine濃度から、次式に従って、肝抽出率(E)を算出した。

$$E = (C_p - C_v^h) / C_p$$

#### (8) 肝血流量の測定<sup>29)</sup>

Sodium pentobarbital麻醉下、ラットを37°Cの保温板上に固定し、正中線にそって開腹した。Hydrogen Monitor(PHG-300, Tokai Irika Co., Ltd.)の電極を、肝左葉上に固定し、ラットに、50% hydrogen gasを1分間吸入させた。血中のhydrogen濃度を、

Hydrogen Monitorで経時的に測定し、次式に従って、肝血流量(HBF)を算出した。

$$\text{HBF} = 0.693 / T_{1/2} \text{ ml / min / g}$$

ここで、 $T_{1/2}$ は、肝血中hydrogenの半減期を表す。

#### (9) 肝homogenateにおける代謝

肝臓を、0.25M sucrose-0.05M Tris-HCl buffer(pH7.2)でhomogenizeし、25%homogenateを作成した。このhomogenateを1,000gで5分、続いて9,000gで20分遠心分離し、その上清を用いた。この上清(蛋白質濃度 10 mg/ml)に、還元型nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)0.1mMとMgCl<sub>2</sub>15mM及びquinidine 0.5μg/mlを添加し、37°Cでincubationした。10分後、1 NのHCl 1mlで反応を停止させ、残存しているquinidineを定量した。

#### (10) 血漿GPT活性

Shino Test Kit(Shino Test Co., Ltd.)で定量した。

#### (11) 蛋白質濃度の定量

Lowryらの方法<sup>82)</sup>に従っておこなった。

#### (12) 統計学的解析

Controlと四塩化炭素肝障害群間の有意差検定は、危険率を5%として、Student's t-testにより検定した。

### 第2章の実験

#### (1) Quinidineの組織homogenate結合

氷冷したsalineを門脈から注入すると同時に、下腹部の大静脈、大動脈をまとめて切断して各組織を脱血した。直ちに各組織を摘出し、4倍量の0.15M KCl-0.01 M phosphate buffer(pH7.0)で

homogenizeした。組織homogenateへの結合実験は、平衡透析法で行った。実験には、semimicro dialysis cells(Sanko Plastic Co., Ltd.)とsemipermeable membranes(Sanko Plastic Co., Ltd.)を用いた。Semipermeable membraneをはさんで一方のchamberには0.15M KCl-0.01 M phosphate buffer(pH7.0)を、もう一方のchamberには、quinidine  $1\mu\text{g/ml}$ を含有した組織homogenate溶液をそれぞれ1ml注入し、 $37^{\circ}\text{C}$ で16時間incubationした。ただし、肝臓homogenateのincubationは、 $4^{\circ}\text{C}$ でおこなった。 $K_{p,f,vitro}$ は、次式に従って算出した<sup>36)</sup>。

$$\begin{aligned} K_{p,f,vitro} &= C_t / C_f \\ &= (C_b + C_f) / C_f \\ &= 1 + d \cdot C_{d,dil} / C_f \end{aligned}$$

ここで、 $C_t$ 、 $C_f$ 、 $C_b$ は、それぞれquinidineの組織中total濃度、非結合型濃度、及び結合型濃度を表す。 $d$ は、希釈係数(ここでは、 $d = 5$ )を、 $C_{d,dil}$ は、希釈組織homogenate中の結合型quinidine濃度を表す。

## (2) 血漿pHの測定

血液のpHは、シリンジ型pHメーター(MCE702, Tokyo Chemical Laboratories, Co., Ltd.)を用いて測定した。

## (3) 血漿蛋白質結合率の測定

Quinidineの血漿中濃度を、 $1\mu\text{g/ml}$ の定常状態に設定したのち、下大静脈から採取した血漿をsampleとして用いた。1M Phosphate buffer(pH7.4) 0.1mlを血漿0.9mlに添加し、血漿のpHを7.4に調整した。このsample 1mlを、Molcut II LGC(Millipore-Japan)を用いて限外濾過にかけ、濾液  $50\mu\text{l}$ を得た。Plasma free fraction ( $f_p$ )は、次式に従って求めた。

$$f_p = C_f / C_p$$

ここで $C_f$ は、濾液中のquinidine濃度を、 $C_p$ は血漿中のquinidine濃

度を表す。

### 第3章の実験

#### (1) 試薬

dl- $[^3\text{H}]$  Propranolol(27Ci/mmol)及び $[^{14}\text{C}]$  salicylic acid (56mCi/mmol)はDupon/NEN Research Productsから購入した。dl-Propranolol、quinidine及びsalicylic acidはWako Pure Chemicals Co., Ltd.のもの、他の試薬は市販特級品を使用した。

#### (2) 動物

Wistar系雄性ラット(体重250g)を使用した。四塩化炭素肝障害モデルは、第1章と同様の方法で作成した。

#### (3) 薬物の血漿蛋白質結合率

Control及び四塩化炭素肝障害ラットの下大静脈から、heparin処理したシリンジで血液を採取し、この血液を10,000rpm.で遠心分離し、血漿を得た。薬物濃度が $1\mu\text{g/ml}$ となるように、血漿に薬物を添加した。薬物の血漿蛋白質結合率は、第2章と同様の限外濾過法により求めた。

Tris(butoxyethyl)phosphate (TBEP)による競合的薬物結合阻害実験は、TBEPの最終濃度が $200\mu\text{g/ml}$ となるよう、ethanolに溶解したTBEP  $5\mu\text{l}$ を血漿sample  $1\text{ml}$ 中に添加しておこなった。

#### (4) 薬物の血漿蛋白質結合と蛋白質濃度の相関

血漿中の薬物は次式によって表される。

$$C_p = C_f + C_b^{\alpha\text{GP}} + C_b^{\text{alb}} + C_b^{\text{lip}} \text{----- (a)}$$

ここで、 $C_f$ は血漿中の遊離薬物濃度、 $C_b^{\alpha\text{GP}}$ 、 $C_b^{\text{alb}}$ 及び $C_b^{\text{lip}}$ はそれぞれ $\alpha_1$ -acid glycoprotein、albuminもしくはlipoproteinへの結合型薬物濃度を表す。Langmuirの式に従うと、薬物の血漿蛋白質への

結合は、線形領域において次式によって表される。

$$C^i = \sum n_i K_i P_i C_f$$

ここで、 $n_i$ 、 $K_i$ 及び $P_i$ は血漿蛋白質 $i$ の結合部位の数、結合定数及び蛋白質濃度を表す。従って(a)式を変形すると、

$$C_p / C_f = 1 + \sum n_i K_i P_i$$

$$(C_p - C_f) / C_f = \text{Bound} / \text{Free} = \sum n_i K_i P_i$$

従って、薬物の血漿蛋白質結合と血漿蛋白質濃度との相関は、縦軸にBound/Free、横軸に蛋白質濃度をとって検討した。

### (5) 薬物の定量

#### a) Quinidine

血漿(20  $\mu$ l)、濾液(50  $\mu$ l)を、0.1N NaOH 1mlでアルカリ性とした後、benzene 3mlで抽出し、そのbenzene層2mlを別のtest tubeに採取した。これに、0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え、再抽出し、水層の蛍光活性を測定した。

Instrument : Hitachi 650-10S Fluorescence Spectrophotometer

Detection : Ex. 350nm Em. 450nm

#### b) Propranolol及びsalicylic acid

血漿(50  $\mu$ l)及び濾液(50  $\mu$ l)のradioactivityをliquid scintillation counter(Aloka Co., Ltd.)で測定した。

### (6) 血漿蛋白質濃度の定量

#### a) Total protein

Lowry法<sup>82)</sup>で測定した。

#### b) Albumin

Albumin B-Test kit(Wako Pure Chemicals Co., Ltd.)で定量した。

c) Lipoprotein<sup>83)</sup>

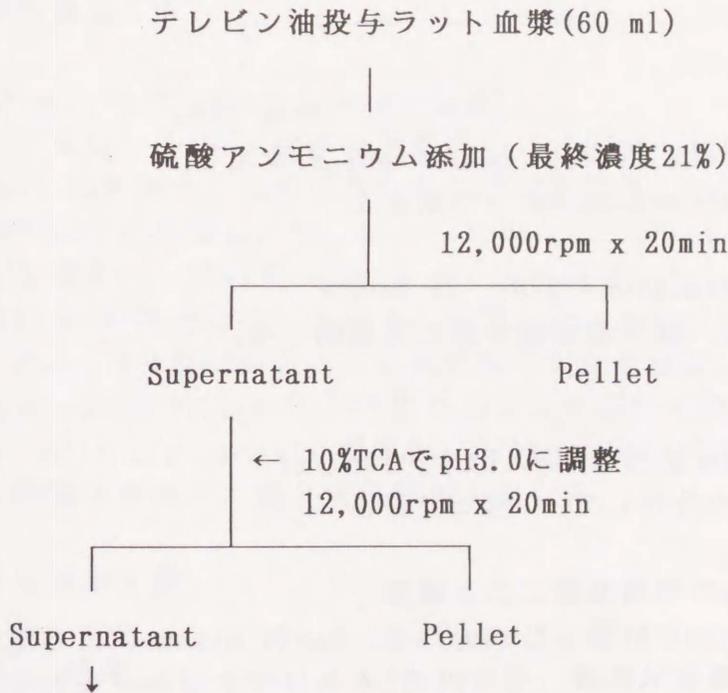
血漿にKBrを添加した後、105,000gで48時間遠心を行い、血漿 lipoproteinをその上清中に分離した。採取した lipoproteinは、Lowry法<sup>82)</sup>で定量した。

d)  $\alpha_1$ -Acid glycoprotein

1)  $\alpha_1$ -Acid glycoproteinの精製<sup>84)</sup>

体重250-350gのラットに turpentine oil 5ml/kgを皮下投与し、48時間後に血液を採取した。この血液を、3,000rpmで遠心分離し血漿を得た。血漿中の  $\alpha_1$ -acid glycoproteinは、下記の schemeに従って精製した。

① 硫酸処理による精製

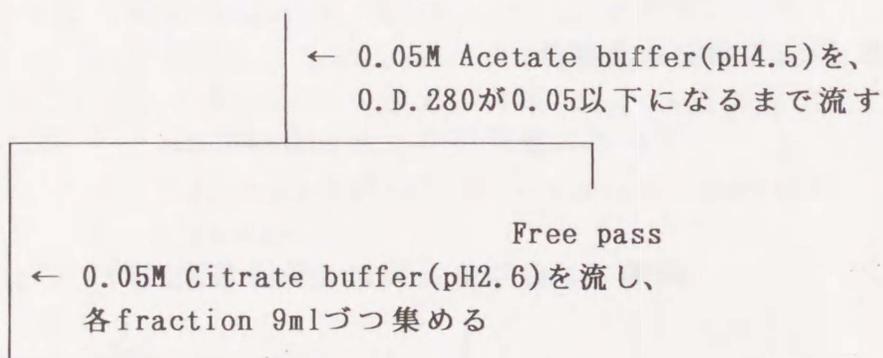


↓  
0.05M Acetate buffer  
(pH4.5)で透析

② DEAE-Sepharoseによる精製

次に、0.05M acetate buffer(pH4.5)で透析したsampleを、DEAE-sepharose CL-6B(Pharmacia Fain Chemical Co.,Ltd.)を用いてさらに精製した。DEAE-Sepharoseは、0.05M acetate bufferで一晩洗浄(流速 1滴/秒)したものを用いた。

Sample  
(0.05M Acetate buffer(pH4.5)で透析したもの)



O. D. 値が高いfractionを集め、1N NaOHでpH4.5に調整し、限外濾過器で蛋白を濃縮する。

20mM Phosphate buffer(pH7.0)で約10mg/mlになるように小分けして、-30°Cで保存

③ Davis systemの電気泳動による精製

DEAE-Sepharoseで精製したsampleを、Davis systemによる電気泳動にかけた。電気泳動後、その内の1本をコマシブルー染色し、

$\alpha_1$ -acid glycoproteinの位置を確認した。他のゲルの $\alpha_1$ -acid glycoproteinの位置を測って切り取り、回収した。回収したゲルを50mM Tris-HCl(pH7.4)-0.2M NaCl buffer中で、homogenateし、15,000rpm x 25min で遠心分離し、上清を得た。この上清を、透析後、濃縮した。

## 2) $\alpha_1$ -Acid glycoprotein抗血清の作成

上記の方法により作成した $\alpha_1$ -acid glycoproteinとFreund's complete adjuvantを等量混合し、homogenizerを用いて乳化させた。乳化液を家兎に、蛋白量で500 $\mu$ g相当を10日間隔で3回、皮下投与した。途中、Ouchterlony testをおこない、ラット $\alpha_1$ -acid glycoprotein抗体が家兎血清中に生成されたことを確認した。最終皮下投与した10日後、salineに溶解した $\alpha_1$ -acid glycoprotein溶液200 $\mu$ g/0.5mlを家兎の耳静脈内に投与した。一週間後、血液を耳から採取した。

## 3) $\alpha_1$ -Acid glycoproteinの定量<sup>85)</sup>

アガロースLGT(低ゲル化温度)に、50mM phosphate buffer(pH7.4)を加え、加熱溶解して1%溶液を調整した。この溶液が、40°C以下に冷却した後、抗 $\alpha_1$ -acid glycoprotein血清を、5%となるよう混合し、15mlずつ90mmシャーレに展開した。ゲル化した後、直径2mmの穴をあけ、その中に血漿sampleを7 $\mu$ l注入し、3日間放置した。3日後に形成された沈降輪の直径を測定した。単離精製した $\alpha_1$ -acid glycoproteinを標準品として用いて検量線を作成した。 $\alpha_1$ -Acid glycoprotein濃度は、500ng-5 $\mu$ g/holeの範囲において、沈降輪の直径の二乗と直線関係を示した。

## 第4章の実験

### (1) 試薬

dl- [<sup>3</sup>H] -Propranolol(27Ci/mmol)は、Dupon/NEN Research Productsから購入した。 dl-Propranolol-HCl、 carbon tetra-chloride及びgalactosamine-HClは、Wako Pure Chemical Co., Ltd. から購入した。 Ethionine、 N-nitrosodimethylamine、 allyl alcohol、 acetaminophen及びbromobenzeneは、Nacalai Tesque. Inc. より購入した。 他の試薬は市販特級品を使用した。

## (2) 動物

Wistar系雄性ラット（体重250g）を、24時間絶食させて使用した。種々の薬物性肝障害モデルは、下記の薬物量を腹腔内に投与することによって作成した。四塩化炭素(1ml/kg)、bromobenzene(1ml/kg)は、オリーブ油に溶解させ、それぞれ20%、50%溶液としたものを投与した。Galactosamine(500mg/kg)、ethionine(800mg/kg)、N-nitrosodimethylamine(50mg/kg)及びallyl alcohol(50mg/kg)は、生理食塩水に溶解させて投与した。Acetaminophen(900mg/kg)は、20%glycerol懸濁液として投与した。薬物投与24時間後に、下大静脈より血液を採取し、3,000rpmで遠心することにより血漿sampleを得た。

## 第5章の実験

### (1) 試薬

Turpentine oilは、Nacalai Tesque, Inc. のもの、他の試薬は市販特級品を使用した。

### (2) 動物

Wistar系雄性ラット（体重250g）の背部に、turpentine oil(5ml/kg)を皮下投与した。投与16時間または48時間後に実験に使用した（16h-テレピン群、48h-テレピン群と表す）。

### (3) 急速単回静注投与

Sodium pentobarbital麻酔下、体温が正常を維持するよう、37°C保温板上にラットを固定し、実験をおこなった。Quinidine sulfate 3.0、7.0あるいは12.5mg/2ml/kgを股静脈から急速静注した。静注後、経時的に頸静脈からヘパリン処理したシリンジを用いて血液を採取した。採取した血液を10,000rpmで遠心分離し、その0.1mlをquinidineの定量に使用した。速度論的解析は、第1章と同様に、plasma concentration-time curveから、two compartment modelに従って行った。CL<sub>b</sub>は、次式から計算した。

$$CL_b = CL_p / R_b$$

### (4) 定常状態における組織分布

麻酔下でラットの股静脈にpolyethylene tubing(PE-50; Clay Adams, U.S.A.)を挿入した。股静脈から、quinidineをbolus投与した後、直ちに股静脈カニューレを介して、constant infusionをおこない、quinidineの血漿中濃度を1μg/mlの定常状態に保った。Controlと16h-及び48h-テレピン群のquinidineのbolus投与量は、それぞれ3.8、2.7及び1mg/kg、infusion rateは、110、63及び29μg/min/kgとした。このbolus injection投与量とinfusion rateは、静脈投与後のpharmacokinetic parameterから求めた。血漿中quinidine濃度の定常状態は、infusion開始後、約60分で得られた。90分間infusionした後、血液を頸静脈、肝静脈及び下大静脈から採取した。直ちに門脈から氷冷したsalineを注入し脱血した後、肺臓、脾臓、心臓、腎臓及び肝臓の各組織をすばやく摘出した。各組織は、4倍量の0.05M Tris-HCl buffer (pH7.4)で、teflon homogenizerを用い氷冷下でhomogenizeした。

各組織のK<sub>p</sub>値は、次式に従って求めた。

$$\begin{aligned} K_p &= C_t / C_p \\ &= 5 \cdot C_{t, dil} / C_p \end{aligned}$$

ここで、 $C_t$ は、組織中の薬物濃度を、 $C_{t,dil}$ は組織homogenate中の薬物濃度を表す。 $C_p$ は、頸静脈血から得られた血漿中薬物濃度を表す。肝臓の場合、 $C_p$ は、肝静脈血から得られた値を用いた。

(5) 肝抽出率の測定

血液中quinidine濃度が、0.5から2.3  $\mu\text{g/ml}$ の範囲の定常状態に設定した後、頸静脈、肝静脈血を採取した。肝抽出率(E)は、次式に従って算出した。

$$E = (C_b - C_b^h) / C_b$$

ここで、 $C_b$ 及び $C_b^h$ は、それぞれ頸静脈及び肝静脈血中のquinidine濃度を表す。

## 引用文献

- 1) W.D.Hooper, F.Bochner, M.J.Eadie and J.H.Tyrer: Plasma protein binding of diphenylhydantoin, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 15, 276-282 (1973).
- 2) T.F.Blaschke, P.J.Meffin, K.L.Melmon and M.Rowland: Influence of acute viral hepatitis on phenytoin kinetics and protein binding, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 17, 685-690 (1975).
- 3) U.Klotz: Pathophysiological and disease-induced changes in drug distribution volume: Pharmacokinetic Implications, *Clin. Pharmacokinet.*, 1, 204-218 (1976).
- 4) T.F.Blaschke: Protein binding and kinetics of drugs in liver diseases, *Clin. Pharmacokinet.*, 2, 32-44 (1977).
- 5) M.Perez-Mateo and S.Erill: Protein binding of salicylate and quinidine in plasma from patients with renal failure, chronic liver disease and chronic respiratory insufficiency, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 11, 225-231 (1977).
- 6) C.Li, S.Nakayama, Y.Kurosaki, T.Nakayama and T.Kimura: Pharmacokinetics of cefpiramide in rats acutely intoxicated with carbon tetrachloride, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 13, 186-194 (1990).
- 7) T.Itoh, Y.Sawada, T.H.Lin, T.Iga and M.Hanano: Kinetic analysis of phenytoin disposition in rats with experimental renal and hepatic disease, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 11, 289-308 (1988).
- 8) M.Affrime and M.M.Reidenberg: The protein binding of some drugs in plasma from patients with alcoholic liver

- disease, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 8, 267-269 (1975).
- 9) R.A.Branch, J.James and A.E.Read: A study of factors influencing drug disposition in chronic liver disease using the model drug(+)-propranolol, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 3, 243-249 (1976).
  - 10) J.P.Tillement, F.Lhoste and J.F.Giudicelli: Diseases and drug protein binding, *Clin. Pharmacokinet.*, 3, 144-154 (1978).
  - 11) K.M.Kessler, W.C.Humphries, M.Black, J.F.Spann: Quinidine pharmacokinetics in patients with cirrhosis or receiving propranolol, *Am. Heart J.* 96, 627-635 (1978).
  - 12) C.Aguirre, R.Caloo and J.M.Rodriguez Sasiain: Serum protein binding of penbutolol in patients with hepatic cirrhosis, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 26, 566-569 (1988).
  - 13) K.M.Piafsky: Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs, *Clin. Pharmacokinet.*, 5, 246-262 (1980).
  - 14) S.A.Bai, F.P.Abramson: Interactions of phenobarbital with propranolol in the dog, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 222, 589-594 (1982).
  - 15) A.Hayes and R.G.Cooper: Studies on the absorption, distribution and excretion of propranolol in rat, dog and monkey, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 176, 302-311 (1971).
  - 16) H.R.Ochs, D.J.Greenblatt and E.Woo: Clinical pharmacokinetics of quinidine, *Clin. Pharmacokinet.*, 5, 150-168 (1980).
  - 17) A.Nishiura, J.Higashi, T.Murakami, Y.Higashi and N.Yata: A possible contribution of phospholipids in tissue

- distribution of quinidine in rats, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 9, 819-828 (1986).
- 18) E. A. Smuckler, E. Arrhenius and T. Hultin: Alterations in microsomal electron transport, oxidative n-demethylation and azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine-induced liver injury, *Biochem. J.*, 103, 55-64 (1967).
  - 19) T. Kanaghinis, A. F. Avgerinos, P. Scliros, N. Kalantzis, J. Hatzioannou, P. Nikolopoulou, D. Anagnostou, A. Katsas, J. Demopoulos, G. Rekoumis and D. Stathakos: Plasma lipoprotein pattern in relation to liver histology after toxic hepatitis and experimental biliary obstruction in rabbits, *Am. J. Gastroenterology*, 77, 512-522 (1982).
  - 20) T. F. Slater: Free-radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.* 222, 1-15 (1984).
  - 21) D. Fremstad, S. Jacobsen and P. K. M. Lunde: Influence of serum protein binding on the pharmacokinetics of quinidine in normal and anuric rats, *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 41, 161-176 (1977).
  - 22) H. Harashima, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano: Analysis of nonlinear tissue distribution of quinidine in rats by physiologically based pharmacokinetics, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 13, 425-440 (1985).
  - 23) S. Shibasaki, K. Komoriya, S. Gon, Y. Matsuura, R. Nishigaki and K. Umemura: Effects of cimetidine on quinidine distribution in rats, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 10, 719-726 (1987).
  - 24) 西浦昭雄: 学位論文(1988)
  - 25) N. Watari, A. Wakamastu and N. Kaneniwa: Comparison of disposition parameters of quinidine and quinine in the

- rat, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12, 608-615 (1989).
- 26) K.S.Pang and M.Rowland: Hepatic of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 5, 625-653 (1977).
- 27) H.G.Chen and J.F.Gross: Estimation of tissue-to-plasma partition coefficients used in physiological pharmacokinetic models, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 7, 117-125 (1979).
- 28) K.B.Bischoff, R.L.Dedrick, D.S.Zaharko and J.A.Longstreth: Methotrexate pharmacokinetics, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1128-1133 (1971).
- 29) K.Aukaland, B.F.Bower and R.W.Berliner: Measurement of local blood flow with hydrogen gas, *Circulation Res.*, 14, 164-187 (1964).
- 30) M.Yokota, T.Iga, S.Awazu and M.Hanano: Simple method of hepatic venous blood sampling in the rats, *J. Appl. Physiol.*, 41, 439-441 (1976).
- 31) H.Katayama, J.Fujiwara, M.Yasuhara, K.Okumura and R.Hori: Increased availability of propranolol in rats with uranyl nitrate-induced acute renal failure, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 7, 536-544 (1984).
- 32) 花野学、梅村甲子郎、伊賀立二: 医薬品のためのファーマコキネティクス実験法、p.383 ソフトサイエンス社
- 33) Y.Igari, Y.Sugiyama, S.Awazu and M.Hanano: Comparative physiologically based pharmacokinetics of hexobarbital, phenobarbital, and thiopental in the rats, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 10, 53-75 (1982).

- 34) J.H.Lin, Y.Sugiyama, S.Awazu and M.Hanano: Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained in vitro as well as on physiological data, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 10, 649-661 (1982).
- 35) T.Terasaki, T.Iga, Y.Sugiyama and M.Hanano: Experimental evidence of characteristic tissue distribution of adriamycin, tissue DNA concentration as a determinant, *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 597-600 (1982).
- 36) H.Harashima, Y.Sugiyama, Y.Sawada, T.Iga and M.Hanano: Comparison between in-vivo and in-vitro tissue-to-plasma unbound concentration ratios( $K_{p,r}$ ) of quinidine in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, 340-342 (1984).
- 37) O.G.Nilsen, P.Leren, I.Aakesson and S.Lacobsen: Binding of quinidine in sera with different levels of triglycerides, cholesterol, and orosomucoid protein, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 871-876 (1977).
- 38) S.Glasson, R.Zini, P.D'Athis, J.P.Tillement and J.R. Boissier: The distribution of bound propranolol between the different human serum proteins, *Mol. Pharmacol.*, 17, 187-191 (1980).
- 39) G.Schreiber, G.Howlett, M.Nagashima, A.Millership, H. Martin, J.Urban and L.Kotler: The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation, *J. Biol. Chem.*, 257, 10271-10277 (1982).
- 40) P.C.Heinrich, J.V.Castell and T.Andus: Interleukin-6 and the acute phase response, *Biochem. J.*, 265, 621-636 (1990).
- 41) J.J.Thiessen, E.M.Sellers, P.Denbeigh and L.Dolman: Plasma protein binding of diazepam and tolbutamide in chronic alcoholics, *J. Clin. Pharmacol.*, 16, 345-351

(1976).

- 42) R. Gugler, D.W. Shoeman and D.L. Azarnoff: Effect of in vivo elevation of free fatty acids on protein binding of drugs, *Pharmacology*, 12, 160-165 (1974).
- 43) K.M. Kessler, R.C. Leech and J.F. Spann: Blood collection techniques, heparin and quinidine protein binding, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 25, 204-210 (1979).
- 44) O. Borga, K.M. Piafsky and O.G. Nilsen: Plasma protein binding of basic drugs I. Selective displacement from  $\alpha_1$ -acid glycoprotein by tris(2-butoxyethyl)phosphate, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22, 539-544 (1977).
- 45) N. Terao and D.O. Shen: Alterations in serum protein binding and pharmacokinetics of propranolol in the rats elicited by the presence of an indwelling venous catheter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227, 369-375 (1983).
- 46) D.J. Edwards, D. Lalka, R.L. Slaughter:  $\alpha_1$ -acid glycoprotein concentration and protein binding in trauma, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 31, 62-67 (1982).
- 47) A. Baruzzi, M. Contin, E. Perucca, F. Albani and R. Riva: Altered serum protein binding of carbamazepine in disease states associated with an increased  $\alpha_1$ -acid glycoprotein concentration, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 31, 85-89 (1986).
- 48) L. Sevaljevic, M. Petrovic, D. Bogojevic, J. Savic and D. Pantelic: Acute-phase response to scalding: Changes in serum properties and acute-phase protein concentration, *Circulatory Shock*, 28, 293-307 (1989).
- 49) D. Garfinkel, R.D. Mamelok and T.F. Blaschke: Altered therapeutic range for quinidine after myocardial infarction and cardiac surgery, *Ann. Int. Med.*, 107,

48-50 (1987).

- 50) P.R.Jackson, G.T.Tucker, H.F.Woods: Altered plasma drug binding in cancer: Role of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein and albumin, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 32, 295-302 (1982).
- 51) K.M.Piatsky, O.Borga, I.Odar-Cederlof, C.Johansson and F.Sjoqvist: Increased plasma protein binding of propranolol and chlorpromazine mediated by disease-induced elevations of plasma acid glycoprotein, *N. Engl. J. Med.*, 299, 1435-1439 (1978).
- 52) H.Echizen, S.Saima, N.Umeda and T.Ishizaki: Protein binding of disopyramide in liver cirrhosis and in nephrotic syndrome, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40, 274-280 (1983).
- 53) R.Meliconi, O.Parracino, A.Facchini, A.M.Morselli-labate, F.Bortolotti, F.Tremolada, M.Martuzzi, F.Miglio and G.Gasbarrini: Acute phase proteins in chronic and malignant liver disease, *Liver*, 8, 65-74 (1988).
- 54) J.V.Gool: Profiles of acute-phase reactants and clinical significance of  $\alpha_2$  macroglobulin in acute hepatitis, *Inflammation*, 7, 277-289 (1983).
- 55) R.Meliconi, O.Parracino and A.Facchini: Serum protease-inhibitors in acute viral hepatitis, *Ric. Clin. Lab.*, 17, 53-59 (1987).
- 56) A.Koj and A.Dubin: Inhibition of the liver and plasma protein acute-phase response in mice by d-galactosamine, *Br. J. Exp. Path.*, 57, 733-741 (1976).
- 57) D.Monnet, D.Durand, D.Biou, J.Feger and G.Durand: D-galactosamine-induced liver injury: A rat model to study the heterogeneity of the oligosaccharide chains of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*,

- 23, 249-253 (1985).
- 58) B.Flaks, A.O.Conner and P.N.Wilks: Modification of toxic liver injury in the rat. III. Fine structure of hepatocytes during cycloheximide protection and autoprotection in acute ethionine intoxication, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35, 423-436 (1976).
- 59) L.Marzella, K.Muhvich and R.A.M.Myers: Effect of hyperoxia on liver necrosis induced by hepatotoxins, *Virchows Arch., (Cell Pathol.)* 51, 497-507 (1986).
- 60) A.W.Harman and L.J.Fischer: Hamster hepatocytes in culture as a model for acetaminophen toxicity: Studies with inhibitors of drug metabolism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71, 330-641 (1983).
- 61) X.L.Ma, E.Baraona, J.M.Lasker and C.S.Lieber: Effects of ethanol consumption on bioactivation and hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine in rats, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 585-591 (1991).
- 62) Y.Ohno, K.Ormstad, D.Ross and S.Orrenius: Mechanism of allyl alcohol toxicity and protective effects of low-molecular-weight thiols studied with isolated rat hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78, 169-179 (1985).
- 63) D.J.Jollow, J.R.Mitchell, N.Zampaglione, J.R.Gillette: Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence of 3,4-bromobenzen oxide as the hepatotoxic metabolite, *Pharmacol.*, 11, 151-169 (1974).
- 64) D.Keppler, J.Pausch and K.Decker: Selective uridine triphosphate deficiency induced by d-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors, Effect on ribonucleic acid synthesis, *J. Biol. Chem.*,

- 249, 211-216 (1974).
- 65) C.H.Bauer, R.Buchsel, H.P.Morris and W.G.Reutter: Alterations of d-galactose metabolism in morris hepatomas, *Cancer Res.*, 40, 2026-2032 (1980).
- 66) C.M.Baglio and E.Farber: Reversal by adenine of the ethionine-induced lipid accumulation in the endoplasmic reticulum of the rat liver, *J. Cell. Biol.*, 27, 591-601 (1965).
- 67) H.Shinozuka, P.J.Goldblatt and E.Farber: The disorganization of hepatic cell nucleoli induced by ethionine and its reversal by adenine, *J. Cell Biol.*, 36, 313-328 (1968).
- 68) H.Nagai, T.Shimazawa, I.Yakuo, M.Aoki, A.Koda and M.Kasahara: Role of peptide-leukotrienes in liver injury in mice, *Inflammation*, 13, 673-680 (1989).
- 69) N.Kawada, Y.Mizoguchi, K.Kobayashi, S.Yamamoto and S.Morisawa: Arachidonic acid metabolites in carbon tetrachloride-induced liver injury, *Gastroenterol. Jpn.*, 25, 363-368 (1990).
- 70) J.C.Jamieson, F.E.Ashton, A.D.Friesen and B.Chou: Studies on acute phase proteins of rat serum. II. Determination of the contents of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein,  $\alpha_2$ -macroglobulin, and albumin in serum from rats suffering from induced inflammation, *Can. J. Biochem.*, 50, 871-880 (1972).
- 71) D.A.Darcy: Granuloma weight and the  $\alpha_1$ -acute phase protein response in rats injected with turpentine, *Br. J. Exp. Path.*, 51, 59-72 (1970).
- 72) A.Yacobi, J.A.Udall and G.Levy: Serum protein binding as a determinant of warfarin body clearance and

- anticoagulant effect, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19, 552-558 (1976).
- 73) R. Gucler, D.W. Shoeman, D.H. Huffman, J.B. Cohlma and D.L. Azarnoff: Pharmacokinetics of drugs in patients with the nephrotic syndrome, *J. Clin. Invest.*, 55, 1182-1189 (1975).
- 74) C.D. Klaassen and G.L. Plaa: Plasma disappearance and biliary excretion of indocyanine green in rat, rabbits and dogs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 15, 374-384 (1969).
- 75) G.H. Evans and D.G. Shand: Disposition of propranolol IV. Independent variation in steady-state circulating drug concentrations and half-life as a result of plasma drug binding in man, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 14, 494-500 (1973).
- 76) G.R. Wilkinson and D.G. Shand: A physiological approach to hepatic drug clearance, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 18, 377-390 (1975).
- 77) T.W. Guentert and S. Øie: Effect of plasma protein binding on quinidine kinetics in the rabbit, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215, 165-171 (1980).
- 78) S.M. Mansor, S.A. Ward, G. Edwards, P.E. Hoaksey and A.M. Breckenridge: The influence of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein on quinine and quinidine disposition in the rats isolated perfused liver preparation, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 650-654 (1991).
- 79) A. Jacobi and G. Levy: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XX I: Effect of plasma protein binding on distribution kinetics of warfarin in rats, *J. Pharm. Sci.*, 66, 567-572 (1977).
- 80) M. Gibaldi and P.J. McNamara: Apparent volumes of

- distribution and drug binding to plasma proteins and tissues, *Clin. Pharmacol.*, 13, 373-378 (1978).
- 81) S. Qie and T. Tozer: Effect of altered plasma protein binding on apparent volume of distribution, *J. Pharm. Sci.*, 68, 1203-1205 (1979).
- 82) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 262-275 (1951).
- 83) E. Pike, B. Skuterud, P. Kierulf and P. K. M. Lunde: Significance of lipoproteins in serum binding variations of amitriptyline, nortriptyline, and quinidine, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 32, 599-606 (1982).
- 84) J. Urban, C. Danny and S. Gerhard: A rat serum glycoprotein whose synthesis rate increase greatly during inflammation, *J. Biol. Chem.*, 254, 10565-10568 (1979).
- 85) G. Mancini, A. O. Carbonara and J. F. Heremans: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion, *Immunochemistry*, 2, 235-254 (1965).