

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860108

研究課題名(和文) 低体温療法時における薬物投与の最適化に向けた薬物組織移行性の変動要因の網羅的解析

研究課題名(英文) Evaluation for change in drug distribution under hypothermia for optimization of medication

研究代表者

宮元 敬天 (MIYAMOTO, Hirotaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：20619481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、低体温モデルラットを用い低体温療法時に汎用される鎮静薬であるミダゾラムの体内動態を評価した。低体温時においては肝臓での薬物代謝能が減少し、血漿中のミダゾラム濃度が上昇することが明らかとなった。しかしながら、臓器組織中のミダゾラム濃度は低体温時においても正常体温時と変わらず、低体温時においては薬物の臓器組織への移行性が変化することが示された。低体温時における薬物の臓器組織への移行性変化の要因として血漿中でのタンパク結合が変化しタンパク遊離型のミダゾラム濃度が低体温時で半減することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have evaluated the pharmacokinetics of midazolam in rats under hypothermia. The plasma concentration of midazolam was increased under hypothermia. However, brain and liver concentration of midazolam did not change under hypothermia. This result suggest the distribution of midazolam was inhibited under hypothermia. We evaluated the protein binding of midazolam in rat serum. The free fraction of midazolam was significantly decreased compared to normal condition.

研究分野：薬物動態

キーワード：低体温療法 CYP3A2 タンパク結合

1. 研究開始当初の背景

心停止蘇生後の患者や低酸素性虚血性脳症の患児においては、後遺症(特に脳障害)が生じやすい。低体温療法は脳障害を防ぐ有効な手段として高く評価されており、米国心臓協会が公表したガイドラインにおいて、院外心停止心室細動患者や低酸素性虚血性脳症の新生児に対し推奨されている治療法である。脳虚血時の低体温療法による脳神経保護作用の機構が解明され(Nat. Rev. Neurosci. 2012; **13**: 267-278)、国内外における大規模臨床試験より有効性が既に確認されている(N. Engl. J. Med. 2002; **346**: 549-556)。低体温療法の有効性の一方で、低体温という非生理的環境においてはシバリング(震え)などの合併症が生じるため、合併症を予防・治療するために鎮静薬や麻酔薬の投与が不可欠となる(Crit. Care Med. 2009; **37**: 1101-1120)。しかし、低体温療法中に汎用される鎮静薬であるミダゾラムの血漿中濃度は正常体温時での投与と比較して低体温時には高くなることが報告されており(Drug Metab. Dispos. 2010; **38**: 781-788)、標的臓器への薬物到達の問題および薬効の低下が懸念される。

これまでに我々は消失過程の異なる各種薬物を用い、温度低下時の肝臓における薬物の動態変化について明らかにし報告してきた。(Miyamoto H et al. J. Pharm. Pharmacol. 2012; **64**: 848-854, Miyamoto H et al. J. Pharm. Pharmacol. 2013; **65**: 1536-1540) これまでの検討では主に薬物の代謝・排泄過程に着目した解析を重点的に行ってきたが、治療時の薬効を決定づける最も重要なファクターは薬物の組織中濃度である、という点に立ち返ると、当該研究領域では、薬物投与後の臓器組織における薬物分布に関する知見は乏しい現状にある。

我々は低体温療法中に汎用されるミダゾラムの最大の薬効を發揮させるために、薬物の体内動態変動の要因の中で臓器組織中濃度へと影響を与える因子への温度低下の影響を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は低体温時における薬物の臓器組織移行性の変動要因を明らかにし、低体温療法中の薬物投与の最適化を行うための基盤を構築すること目的とした。

そこで、臓器組織への薬物移行の過程において血中タンパク結合、臓器血流量、細胞内取り込みの各過程への温度低下の影響を低体温モデルラットを用いた *in vivo* 実験及び *in vitro* 実験系により解析した。

3. 研究の方法

(1) 低体温モデルラットを用いたミダゾラム体内動態の解析

麻酔下、ラットの直腸温をヒートランプもしくは保冷剤を用いて 37、32、28 に維持した。ラットの頸静脈よりミダゾラム溶液を急

速投与し、投与後から経時的に血液を採取した。採取した血液より血漿を分離し定量に供した。また、薬物投与から一定時間後に脱血し、臓器組織を摘出した。臓器組織のホモジネートを作製し定量に供した。

ミダゾラムの定量は HPLC-UV 法にて行った。

(2) ラットヘパトサイトを用いた *in vitro* 代謝実験

正常ラットに対し、コラゲナーゼ灌流を行いラットヘパトサイトを採取した。ラットヘパトサイト懸濁液とミダゾラム溶液を混合し、37, 32, 28 で一定時間インキュベートした。インキュベート後に 10,000 x g で 5 分間遠心分離を行いヘパトサイトを沈殿させ、上清を採取した。上清中のミダゾラム濃度を算出し、消失速度 v を求めた。得られた v を用いてミカエリス-メンテンプロットを作製し、 K_m および V_{max} を算出した。

(3) ラット血清を用いた *in vitro* タンパク結合試験

正常ラットより採取した血清とミダゾラム溶液を混合しセルロース製透析膜内に封入し、リン酸緩衝液中へ浸漬した後に 37, 32, 28 で 18 時間インキュベートした。インキュベート後、透析膜内外の溶液を採取し、ミダゾラム濃度を定量した。

4. 研究成果

(1) 低体温モデルラットを用いたミダゾラム体内動態の解析

ミダゾラムの血漿中濃度は体温の低下に伴い上昇した(図1)。ミダゾラムの定常状態における分布容積である V_{ss} を算出したところ、37 で 2.96L/kg であったのに対し、32、28 ではそれぞれ 1.97、1.39L/kg と有意に低下した。

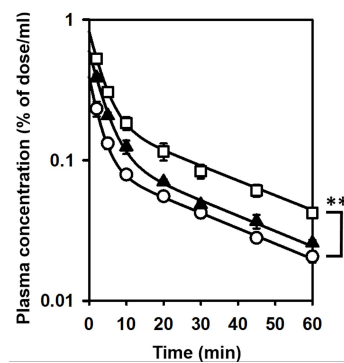


図1 Plasma concentration-time profiles of midazolam (5 mg/kg) after its intravenous administration to rats at different body temperatures. Each symbol is the mean \pm SE of four experiments; 37°C (○), 32°C (▲) and 28°C (□). ** $p < 0.01$, significantly different from value at 37°C

この結果より低体温時においてはミダゾラムの分布が変化することが考えられたため、作用部位である脳中濃度および代謝臓器

である肝臓中濃度を測定したところ、血漿中濃度と異なり脳および肝臓中濃度は体温低下の影響を受けず（図2）、臓器組織へのミダゾラム移行性が低下することが示唆された。

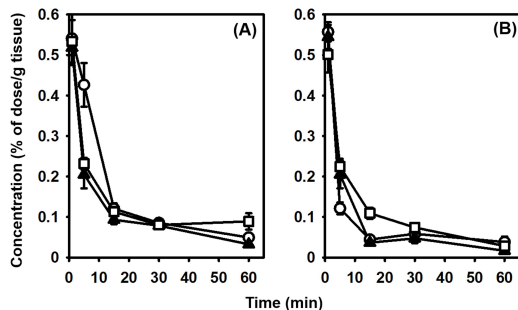


図2 (A) Brain and (B) Liver concentration-time profiles of midazolam (5 mg/kg) after its intravenous administration to rats at different body temperatures. Each symbol is the mean \pm SE of four experiments; 37°C (○), 32°C (▲) and 28°C (□). ** $p < 0.01$, significantly different from value at 37°C

さらに、薬物の組織移行性を示す指標として組織 血漿中ミダゾラム濃度比を算出したところ、低体温時においてはいずれの時間においても組織 血漿中ミダゾラム濃度比が減少しており、低体温時においてミダゾラムの脳及び肝臓への移行性が低下することが明らかとなった。

(2) ラットヘパトサイトを用いた in vitro 代謝実験

ラットヘパトサイトを用いた in vitro 代謝実験を行い、各温度における K_m および V_{max} をミカエリスメンテン式より算出したところ（図3） K_m は温度低下の影響を受けなかったが V_{max} は温度低下に従い顕著に減少した。ミダゾラムはラットの CYP3A2 により代謝される薬物であることから低温時には CYP3A2 活性が減少することが示唆された。

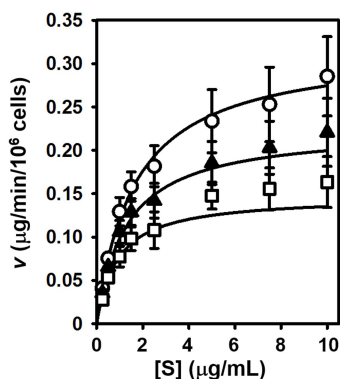


図3 Michaelis-Menten plot for the elimination rate of midazolam in rat hepatocytes at 37, 32, and 28 °C. Each symbol is the mean \pm SE of at least four experiments. Solid lines represent the result of the best fit by the least-square method; 37 °C (○), 32 °C (▲) and 28 °C (□)

(3) ラット血清を用いた in vitro タンパク結合試験

ラット血清を用いミダゾラムのタンパク結合率を平衡透析膜法により算出したところ、37 °C でミダゾラムのタンパク遊離型分率は 2.4%であったのに対し、32, 28 °C ではそれぞれ 1.2%、1.0%と有意に低下した。臓器組織へと移行可能な薬物は血中のタンパク質と結合していない遊離型のもののみであることから、低温時における遊離型分率の低下がミダゾラムの臓器組織移行性低下の一因であることが示唆された。

今後は低体温時における臓器組織中濃度の予測に基づく最適な薬物投与法を構築するために、生理学的薬物速度論を用いた臓器組織中濃度の予測を行う予定である。さらに、低体温療法のみならず、虚血再灌流障害時における薬物の体内動態変化についても解析を行い、病態時における薬物の組織移行性変化について解明する。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 3件)

Miyamoto H, Matsueda S, Moritsuka A, Shimokawa K, Hirata H, Nakashima M, Sasaki H, Fumoto S, Nishida Koyo: Evaluation of hypothermia on the in vitro metabolism and binding and in vivo disposition of midazolam in rats, Biopharm. Drug Dispos. 査読有 36: 481-489 (2015)

Hirata H, Miyamoto H, Shimokawa K, Nakashima M, Nakayama M, Fumoto S, Nishida K: Novel diagnostic method of peritoneal injury using dual macromolecular markers. Biol. Pharm. Bull. 査読有 37: 262-267 (2014)

Mine T, Miyamoto H, Yoshikawa N, Fumoto S, Sasaki H, Nakamura J, Nishida K: Effect of absorption enhancers on the absorption of FD-4 as a poorly absorbable marker macromolecule from the liver surface in rats. J. Drug. Del. Sci. Tech. 査読有 24: 386-389, (2014)

〔学会発表〕(計 7件)

宮元敬天、森塚暁裕、谷口麻里子、麓伸太郎、西田孝洋：生理学的薬物速度論による低体温時のラットにおけるミダゾラム体内動態の予測、第18回日本脳低温療法学会、2015年7月、アルファあなぶきホール（香川県高松市）

Mariko Taniguchi, Hiroataka Miyamoto, Haruna Hirata, Shintaro Fumoto and Koyo Nishida: Evaluation for change in

pharmacokinetics of Midazolam in acute hepatitis model rats, 日本薬物動態学会第30年会, 2015年11月、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Hirotaka Miyamoto, Takenori Tsukinuki, Mariko Taniguchi, Eriko Kinoshita, Shintaro Fumoto, and Koyo Nishida: Establishment of the method for estimation the absorbed rate constant from the pharmacokinetic parameters obtained by package insert, 日本薬物動態学会第30年会, 2015年11月、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

宮元敬天, 堀友理香, 麓伸太郎, 江頭かの子, 下川研太, 平田春奈, 西田孝洋: 低体温時におけるミダゾラムの肝クリアランス変化の予測に基づく定速注入時の投与速度最適化, 日本薬学会第134年会, 2014年3月、ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

宮元敬天, 松枝 慧, 森塚 暁裕, 堀 友理香, 麓 伸太郎, 西田 孝洋: 肝クリアランスの予測に基づく低体温時におけるミダゾラム定速注入時の投与速度最適化, 第17回日本脳低温療法学会, 2014年8月、プラザヴェルデ ふじのくに千本松フォーラム(静岡県沼津市)

Hirotaka Miyamoto, Mariko Taniguchi, Haruna Hirata, Shintaro Fumoto and Koyo Nishida: EVALUATION FOR CHANGE IN THE DISPOSITION OF MIDAZOLAM UNDER HYPOTHERMIA IN RATS BY IN VITRO METABOLISM AND PROTEIN BINDING STUDY, 29th JSSX Meeting and 19th North American ISSX Meeting, 2014年10月、San Francisco, California, USA

山田あかね, 平田春奈, 宮元敬天, 麓伸太郎, 西田孝洋: 2種類の高分子マーカー物質を併用した腹膜機能診断法の妥当性, 第31回日本薬学会九州支部大会, 2014年12月、第一薬科大学(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/dds/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮元 敬天 (MIYAMOTO, Hirotaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号: 20619481

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし