

イヌの薬物治療において薬物動態学的相互作用を  
もたらず因子に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程 動物疾病制御学 生体疾病制御学 獣医薬理学

DV0805 福永 航也

## 目次

動物倫理 . . . . . 4

略語一覧 . . . . . 5

緒言 . . . . . 6

### 第1章 薬物－薬物相互作用：フェノバルビタールが抗てんかん薬ゾニサミドの 薬物動態におよぼす影響とその持続期間

第1節 はじめに . . . . . 8

第2節 材料と方法 . . . . . 9

第3節 結果 . . . . . 13

第4節 考察 . . . . . 14

第5節 小括 . . . . . 17

第6節 図と表 . . . . . 18

### 第2章 薬物－食餌相互作用：尿 pH コントロール食が抗てんかん薬フェノバル ビタールの薬物動態におよぼす影響

第1節 はじめに . . . . . 24

第2節 材料と方法 . . . . . 26

第3節 結果 . . . . . 30

第4節 考察 . . . . . 31

第5節 小括 . . . . . 33

第6節 図と表 . . . . . 34

第3章 薬物－病態相互作用：僧帽弁閉鎖不全（MR）が新規心不全薬ニコラン  
ジルの薬物動態におよぼす影響

第1節 はじめに・・・・・・・・・・41

第2節 材料と方法・・・・・・・・・・43

第3節 結果・・・・・・・・・・45

第4節 考察・・・・・・・・・・46

第5節 小括・・・・・・・・・・49

第6節 図と表・・・・・・・・・・50

第4章 薬物－経口投与補助剤相互作用：経口投与補助剤（ペースト、カプセル  
およびオブラート）がゾニサミドの薬物動態におよぼす影響

第1節 はじめに・・・・・・・・・・53

第2節 材料と方法・・・・・・・・・・55

第3節 結果・・・・・・・・・・68

第4節 考察・・・・・・・・・・59

第5節 小括・・・・・・・・・・61

第6節 図と表・・・・・・・・・・63

第5章 薬物－サプリメント相互作用：セントジョーンズワートが免疫抑制剤シ  
クロスポリンの薬物動態におよぼす影響

第1節 はじめに・・・・・・・・・・71

第2節 材料と方法・・・・・・・・・・73

第3節 結果・・・・・・・・・・77

第4節 考察・・・・・・・・・・78

第5節 小括・・・・・・・・・・80

第6節 図と表・・・・・・・・・・82

総合考察・・・・・・・・・・88

総括・・・・・・・・・・90

参考文献・・・・・・・・・・93

謝辞・・・・・・・・・・104

## 動物倫理

動物の取り扱いはすべて麻布大学実験動物ガイドライン、April 2000.を順守して行った。また血液採取はすべてのイヌにおいて欧州連邦製薬工業協会の定める推奨最大採血量（64 ml/体重 10 kg/24 時間を 1 週間隔）を下回っている。

## 略語一覧

$A_e$  : 累積尿排泄率

AUC : 濃度時間曲線下面積

AUMC : 一次モーメント曲線下面積

$Cl_{int}$  : 固有クリアランス

$C_{max}$  : 最大血中濃度

$CL_R$  : 腎クリアランス

$CL_{tot}$  : 全身クリアランス

$CL_{tot}/F$  : みかけのクリアランス

CYP : チトクローム P450

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

ISACHC (International Small Animal Cardiac Counsel) : 国際小動物心臓学会議

$k_a$  : 吸収速度定数

$k_e$  : 排泄速度定数

$K_m$  : ミカエリス定数

MR : 僧帽弁閉鎖不全

MRT : 平均滞留時間

NADPH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸

$t_{max}$  : 最大血中濃度到達時間

$t_{1/2a}$  : 吸収相半減期

$t_{1/2e}$  : 排泄相半減期

$V_d/F$  : みかけの分布容積

$V_{dss}$  : 定常状態時の分布容積

$V_{max}$  : 最大反応速度

## 緒言

薬物治療中は他の薬物や食物の相互作用について考慮する必要がある。ヒトでは、併用薬[1]、食餌[2]、病態[3]、経口投与補助剤[4]、サプリメント[5]など様々な因子によって薬物動態が変化することが報告され、これらの情報をもとに適正な薬物治療が行われている。しかし、獣医療では、薬物相互作用を引き起こす因子に関する知見が非常に少ない。薬物相互作用により血中濃度が予測より増加あるいは減少することで、薬物の効果を過小評価したり、副作用を過大評価したりしてしまうケースがある。例えば、ゾニサミドはイヌのてんかん発作に対し有効性が高いことが前臨床試験において判明していたが、実際の獣医療ではてんかん発作を抑制しないというのが獣医師の見解であった。この矛盾は、獣医療でのてんかん発作に対する第一選択薬であるフェノバルビタールが薬物代謝酵素を誘導し、ゾニサミドがその誘導した酵素で分解されるという薬物相互作用が原因であることを本論文の第 1 章で明らかにした。すなわち、フェノバルビタールの薬物代謝酵素の誘導により、ゾニサミドの血中濃度が減少し、てんかん発作抑制効果が減弱してしまう可能性を突き止めた。本事例のように薬物本来の有効性ではなく、それ以外の因子によって、薬物の効果の有無が評価されてしまうケースがある。

薬物相互作用を引き起こす因子は獣医療特有のものも多く、ヒトの情報が転用できない場合が非常に多い。ヒトのてんかんに対し広く用いられているバルプロ酸やカルバマゼピンは、イヌでは代謝が著しく速いため、1日に4-5回投与しなければ有効血中濃度を維持できない[6]。そのため、イヌのてんかんにはフェノバルビタールが第一選択として用いられ[7]、前述のような事例がイヌ特有に起こることになった。また、イヌはヒトとは異なり、毎日同じドッグフードを摂取する。ドッグフードの成分が薬物と相互作用を引き起こす場合、そ

の作用は継続するため、イヌ特有の薬物－食餌相互作用が惹起される可能性が非常に高い。すなわち、ヒトで起こり得ない薬物代謝酵素への影響がイヌでは生じ、薬物治療中であればイヌ特有の薬物－食餌相互作用が惹起される可能性が非常に高い。

本論文では相互作用を引き起こす可能性のある 5 つの因子と獣医療においてそれらに関連の深い薬物との関係を明らかにした。第 1 章では薬物－薬物相互作用としてフェノバルビタールが抗てんかん薬ゾニサミドの薬物動態におよぼす影響とその持続期間、第 2 章では薬物－食餌相互作用として尿 pH コントロール食が抗てんかん薬フェノバルビタールの薬物動態におよぼす影響、第 3 章では薬物－病態相互作用として僧帽弁閉鎖不全 (MR) が新規心不全薬ニコランジルの薬物動態におよぼす影響、第 4 章では薬物－経口投与補助剤相互作用として経口投与補助剤 (ペースト、カプセルおよびオブラート) がゾニサミドの薬物動態におよぼす影響、第 5 章では薬物－サプリメント相互作用としてセントジョーンズワートが免疫抑制剤シクロスポリンの薬物動態におよぼす影響を追究した。これらの研究により、本論文では、獣医臨床上イヌで薬物相互作用を惹起する因子を薬物動態学的観点から明らかにすることで、イヌ特有の適正な薬物使用の礎を構築した。



# 第1章 薬物－薬物相互作用：フェノバルビタールが抗てんかん薬ゾニサミドの薬物動態におよぼす影響とその持続期間

## 第1節 はじめに

イヌの抗てんかん薬の第一選択はフェノバルビタールである。しかし、フェノバルビタールによって、てんかん発作が抑制できない場合の代替薬もしくは併用薬として近年、ゾニサミドが用いられ始めている[8]。そのためゾニサミドとフェノバルビタールは併用されるもしくはフェノバルビタール使用後にゾニサミドに変更される可能性が高い薬物である。

フェノバルビタールはチトクローム P450 (CYP)の分子種である CYP2B、CYP2C および CYP3A など様々な酵素を誘導し、その薬物代謝酵素の増加によって、併用薬の血中濃度を減少させることがイヌにおいて報告されている[9, 10]。また、ゾニサミドはヒトにおいて CYP3A で代謝されると報告されている[11]。そのためフェノバルビタールとゾニサミドを併用した時、フェノバルビタールによって CYP3A 活性が上昇し、ゾニサミドの血中濃度を減少させる可能性が考えられる。しかし、イヌにおいてフェノバルビタールがゾニサミドの薬物動態に影響を与えるという報告はいまだない。

本章ではイヌにフェノバルビタールを反復投与した時のゾニサミドの薬物動態を検討した。またフェノバルビタールがゾニサミドの薬物動態に影響を与えた時、その影響がどの程度持続するののかも検討した。さらにその薬物相互作用に CYP が関わっているかどうかを様々な CYP で代謝される CYP 活性の *in vivo* マーカー薬物アンチピリン[12, 13]を用いて検討した。

## 第2節 材料と方法

### 1) 使用動物

健常雌ビーグル犬5頭を用い(4-6歳、10-12kg)、麻布大学獣医臨床センター6階小動物飼育施設で飼育した。すべてのビーグルはそれぞれの実験の前に、一般身体検査、血液検査および血清生化学検査を行い、腎臓や肝臓に疾患が示唆される臨床徴候はみられなかった。食餌は1日2回k/d(Hill's Prescription Diet k/d®、日本ヒルズ・コルゲート株式会社、東京)を8:00 AMと6:00 PMに与え、水は自由給水とした。成犬の1日栄養要求量63 kcal/kg/dを基準に食餌を与えた。

### 2) 使用薬物および化学物質

フェノバルビタール、塩酸、ジクロロメタン、リン酸、フェナセチン、アンチピリンおよびアセトニトリルは和光純薬工業(大阪)から購入した。ゾニサミドの原末は大日本住友製薬株式会社(大阪)から供与された。内部標準物質の5-(4-Methylphenyl)-5-phenylhydantoinはSIGMA ALDRICH(マサチューセッツ、米国)から購入した。ゾニサミドとフェノバルビタールは経口投与のためにカプセル(カプセル・ジャパン株式会社、神奈川)に封入して与えられた。

#### 3-1)ゾニサミドの投与計画および採血

フェノバルビタール投与4日前、フェノバルビタール(5 mg/kg, PO, BID)反復投与35日目およびフェノバルビタール断薬から56(8)、70(10)、84日(12週)後にゾニサミド(5 mg/kg, PO)を1回投与し、その後、1, 2, 3, 4, 6, 9, 12および24時間後に頸静脈を直接穿刺し、1測定点あたり5 ml採血した(Fig.1)。そ

それぞれの実験の間の休薬期間は基礎検討によって算出されたゾニサミドの半減期から 14 日間以上とした[14]。全血を遠心(980 g, 10 min)し、得られた血清を測定まで-20°Cで冷凍保存した。

### 3-2) アンチピリンの投与計画および採血

フェノバルビタール投与 5 日前、フェノバルビタール(5 mg/kg, PO, BID)反復投与 34 日目およびフェノバルビタール断薬から 14 (2), 28 (4), 42 (6)および 55 日(8 週)後にアンチピリン (5 mg/kg, IV) を 1 回投与しその後、0.5, 1, 2, 3 および 4 時間後に頸静脈を直接穿刺し、1 測定点あたり 5 ml 採血した(Fig.11)。アンチピリン投与後イヌの頸静脈を直接穿刺し、1 測定点あたり 5 ml 採血した。それぞれの実験の間の休薬期間は基礎検討によって算出されたアンチピリンの半減期から 7 日間以上とした[15]。全血を EDTA2Na で抗凝固処理をした後、遠心(1150 g, 15 min)し、得られた血清を測定まで-20°Cで冷凍保存した。

### 4) 血清中ゾニサミドおよびアンチピリン濃度の測定

血清中ゾニサミドおよびアンチピリン濃度は HPLC (SCL-10A シリーズ、島津製作所株式会社、京都) にて測定した[16, 17]。サンプル分離は ODS C18 カラム(ODSpak F-411、4.6 mm i.d. × 150 mm、particle size 5 μm、昭和電工株式会社、東京)で行った。カラムオーブンは 31°C、流速は 1.8 mL/min。血清中ゾニサミドおよびアンチピリン濃度測定の移動相はそれぞれアセトニトリル : 8 mM リン酸を 3:7 (v/v)およびアセトニトリル : 8 mM リン酸を 15:85 (v/v) で、波長は 215 nm で測定した。

血清中ゾニサミドおよびアンチピリン濃度の測定は以下の方法を用いた[18]。血清 200 μl に内部標準物質(5-4-Methylphenyl-5-phenylhydantoin, 100

μg/ml)を 20 μl を加え、0.2 M 塩酸を 40 μl 、ジクロロメタンを 2 ml 加え、3 分間ミキサーで混和した後、遠心(980 g, 15 min)した。有機層のみとりだし、真空遠心器 (CC-105、株式会社トミー精工、東京) によって乾燥固化した。残渣を移動相 200 μl に溶解し、25 μl を HPLC に注入し、測定した。ゾニサミドおよびアンチピリン濃度が 0.1, 1 および 5 μg/ml となるように添加した血清を各 5 本ずつとなるよう調製し、各濃度におけるばらつきを精度によって算出した (精度 = 標準偏差/平均値 × 100)。また同時に作成した検量線から真の濃度を求め、各濃度における正確度を算出した (正確度 = 真の濃度/推定される濃度 (今回は 0.1, 1 および 5 μg/ml) × 100)。同時再現性の試験を 1 日のうちに 5 回行うことを日内変動における再現性とし、異なる日に 5 日間行うことを日間変動における再現性として評価した。ゾニサミドの測定限界は 0.05 μg/ml で回収率は 86-96%であった。精度と正確度の算出には 0.1, 1 および 5 μg/ml の既知のゾニサミド血漿を作成し行った。精度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 2.6-5.7%および 5.6-8.5%であった。正確度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 91-101%および 100-104%であった。アンチピリンの測定限界は 0.05 μg/ml で回収率は 91-94%であった。精度と正確度の算出には 0.1, 1 および 5 μg/ml の既知のアンチピリン血清を作成し行った。精度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 2.3-7.5%および 4.6-5.8%であった。正確度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 0.4-3.3%および 0.1-3.2%であった。

##### 5) 薬物動態パラメーター解析

薬物動態解析にはノンコンパートメント解析を用いた。経口投与後の  $C_{max}$  と  $t_{max}$  は実測値を用いた。血中濃度時間曲線下面積は台形法によって算出した。排

排泄速度定数は7つ以上の測定点を基に算出した。排泄相半減期は  $t_{1/2e} = \ln 2/k_e$  の公式を用いて算出した。みかけのクリアランスは  $CL_{tot}/F = \text{投与量}/AUC_{0-\infty}$  の公式を用いて算出した。静脈注射時の  $MRT_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot}$  および  $V_{dss}$  は  $MRT_{0-\infty} = AUC_{0-\infty}/AUMC_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot} = \text{投与量}/AUC_{0-\infty}$  および  $V_{dss} = CL_{tot} \times MRT_{0-\infty}$  の公式を用いて算出した。それ以外の  $t_{1/2e}$  および  $AUC_{0-\infty}$  は経口投与時のものと同様に算出した。

## 6) 統計学的処理

データはすべて平均値  $\pm$  標準偏差(SD)で示した。フェノバルビタール投与前および投与中のゾニサミドの薬物動態パラメーターの差は Mann-Whitney の U 検定を用いた。フェノバルビタール投与中と断薬後のゾニサミドの薬物動態パラメーターの差は Kruskal-Wallis 検定を行った後 Shirley-Williams 検定を用いた。フェノバルビタール投与前、投与中および断薬後のアンチピリンの薬物動態パラメーターの差は Dunnett の多重比較を用いた。すべての値は  $P < 0.05$  で有意差があると評価した。

### 第3節 結果

フェノバルビタール投与前と反復投与中のゾニサミドの薬物動態を Fig.2 に示した。血清中ゾニサミド濃度—時間曲線はフェノバルビタールの反復投与により下方に移動した。フェノバルビタール反復投与中のゾニサミドの  $C_{max}$  および  $AUC_{0-24}$  はフェノバルビタール反復投与前より減少し、 $t_{1/2e}$  は短縮した(Fig.3)。フェノバルビタールの反復投与により下方に移動した血清中ゾニサミド濃度—時間曲線はフェノバルビタール断薬から 10 週後までは下方にあったが、12 週後には元のレベルに戻った(Fig.4)。フェノバルビタール反復投与中と比べて、フェノバルビタール断薬から 8 週後と 10 週後のゾニサミドの  $C_{max}$  および  $AUC_{0-24}$  に有意な差は認められなかったが、断薬から 12 週後には  $C_{max}$  および  $AUC_{0-24}$  が増加し、 $t_{1/2e}$  が延長した。フェノバルビタール断薬から 12 週後の  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-24}$  および  $t_{1/2e}$  はフェノバルビタール投与前の値とほぼ同等の値を示した(Fig.5)。

フェノバルビタール投与前に比べ、フェノバルビタール反復投与中から断薬から 4 週後までアンチピリンの  $AUC_{0-\infty}$  は減少し、 $CL_{tot}$  および  $V_{dss}$  は上昇した(Table 1)。しかし、フェノバルビタール断薬から 6 および 8 週後のアンチピリンの  $AUC_{0-\infty}$ 、 $CL_{tot}$  および  $V_{dss}$  はフェノバルビタール投与前の値と同等であった(Table 1)。

#### 第4節 考察

本章の目的はフェノバルビタール反復投与によりゾニサミドの薬物動態に影響を与えるか、また影響を与えた場合その影響がどの程度持続するかを明らかにすることだった。フェノバルビタール反復投与は血清中ゾニサミド濃度を減少させ、その作用はフェノバルビタール断薬から 10 週後まで持続したが、12 週後には元のレベルにまで戻っていた。この薬物相互作用において CYP 活性の上昇が関与しているかに着目し、アンチピリンを用いて CYP 活性の上昇の持続を調査したところフェノバルビタール断薬から 4 週後までは CYP 活性の上昇が持続していた。しかし、断薬から 6 週後以降の CYP 活性は元のレベルにまで戻っていた。

フェノバルビタールの反復投与はイヌの CYP2B、CYP2C および CYP3A を誘導することが報告されている[9]。本章では、イヌのフェノバルビタールの反復投与中に CYP 活性が上昇していることをアンチピリン試験によって間接的に明らかにした。しかし、アンチピリンによってどの CYP 分子種活性が上昇したのかを特定することはできない。そのため、本章では血清中ゾニサミド濃度に影響を与えた CYP 分子種は特定できなかった。またゾニサミドが代謝するイヌの CYP 分子種も明らかではないため、本章ではフェノバルビタール反復投与がイヌのどの CYP 分子種に影響を与えたかについては明らかにすることができなかった。ゾニサミドがイヌのどの CYP 分子種で代謝されるかを明らかにすれば、その CYP で代謝される薬物にも本章と同様の薬物相互作用が引き起こされることを推察できるため、獣医療により多くの情報が提供できる。この問題は今後の検討課題である。

フェノバルビタールが血清中ゾニサミド濃度を減少させるのはフェノバルビタール断薬から 10 週後までであるのに対し、CYP 活性の上昇は断薬後から 4

週後までしか持続しなかった。そのため血清中ゾニサミド濃度の減少はフェノバルビタールの CYP 活性の上昇によってだけではないことを示しているかもしれない。ゾニサミドはヒトにおいて CYP だけでなく、第二相反応酵素であるグルクロン酸転移酵素によっても代謝される[19]。また、フェノバルビタールはイヌにおいて CYP だけでなくグルクロン酸転移酵素も誘導する[20]。さらに第二相反応酵素は一度上昇すると第一相反応酵素である CYP 活性の上昇よりも長く持続する[21]。そのため本章のフェノバルビタールの反復投与による血清中ゾニサミド濃度の減少は断薬から 4 週後まで CYP 活性の上昇とグルクロン酸転移酵素の上昇が関与し、断薬 4 週後から 10 週後まではグルクロン酸転移酵素の上昇のみが関与していたのかもしれない。今後は第二相反応酵素についても詳細に明らかにしなければならない。

本章からフェノバルビタールの反復投与が血清中ゾニサミド濃度を減少させることを明らかにした。しかし、これはイヌのてんかん発作の治療にフェノバルビタールとゾニサミドの併用を妨げる結果ではない。フェノバルビタールは、主たる作用として、抑制神経系の GABA<sub>A</sub> 受容体に結合し、Cl<sup>-</sup>チャネルを開く時間を延長する[22]。これにより Cl<sup>-</sup>流入が促進することで神経興奮を抑制し、てんかん発作を抑制する。またゾニサミドは電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルや Na<sup>+</sup>チャネルを阻害することにより、神経興奮を抑制することで発作を抑制する[23]。つまりフェノバルビタールとゾニサミドのてんかん発作抑制の機序は異なる。そのためこの 2 剤の併用はてんかん発作の抑制に協力作用を示す可能性がある。よって本章の結果はフェノバルビタールとゾニサミドを併用する際、血清中ゾニサミド濃度が減少するため、ゾニサミドは単独で用いるよりも投薬量を多くしなければ同等の発作抑制効果を得られない可能性が高い。これらは実際のてんかん症例において検討する必要がある。



結論としてフェノバルビタール反復投与は血清中ゾニサミド濃度を減少させ、その作用はフェノバルビタール断薬から少なくとも10週後まで持続した。その作用はフェノバルビタール断薬から少なくとも4週後まではCYP活性の上昇が関与している可能性を明らかにした。以上のことから本章はイヌのゾニサミドのてんかん治療においてフェノバルビタールを併用またはフェノバルビタールから変更する時の治療の適正化の一端を担った。

## 第5節 小括

本章ではイヌにフェノバルビタールを反復投与した時および断薬後のゾニサミドの薬物動態を追究し、その薬物相互作用の有無および持続期間を明らかにした。また、その薬物相互作用に CYP 活性の上昇が関わっていることを追究した。

- 1) フェノバルビタール反復投与が血清中ゾニサミド濃度を減少させた。
- 2) フェノバルビタール反復投与の血清中ゾニサミド濃度に対する影響は断薬から少なくとも 10 週後まで持続し、12 週後には元のレベルに戻っていた。
- 3) フェノバルビタール反復投与による CYP 活性の上昇は少なくとも断薬から少なくとも 4 週後まで持続し、6 週後には元のレベルに戻った。

以上の結果からフェノバルビタールの反復投与は断薬から少なくとも 10 週後まで血清中ゾニサミド濃度を減少させた。また、この作用に断薬から 4 週後までは CYP 活性の上昇が関わっている可能性を示唆したが、その後の血清中ゾニサミド濃度が減少する作用を示唆する知見を得ることはできなかった。

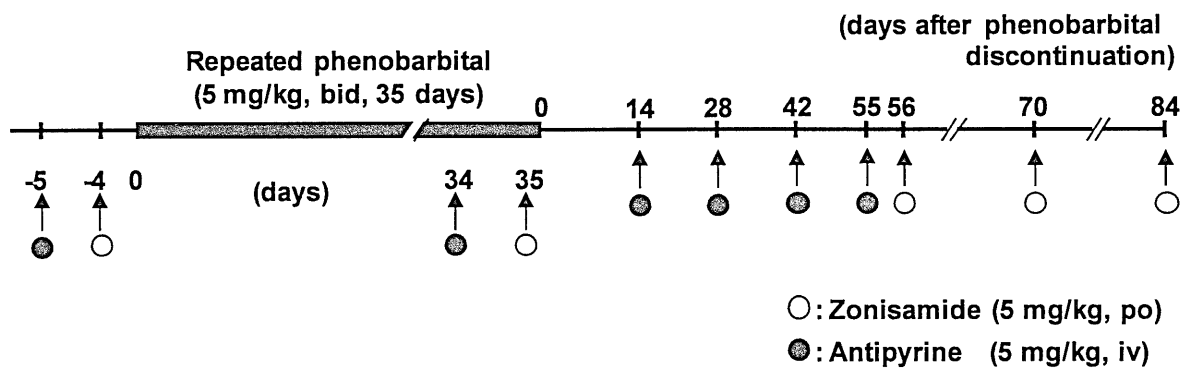


Fig.1. Time course of pharmacokinetic studies.

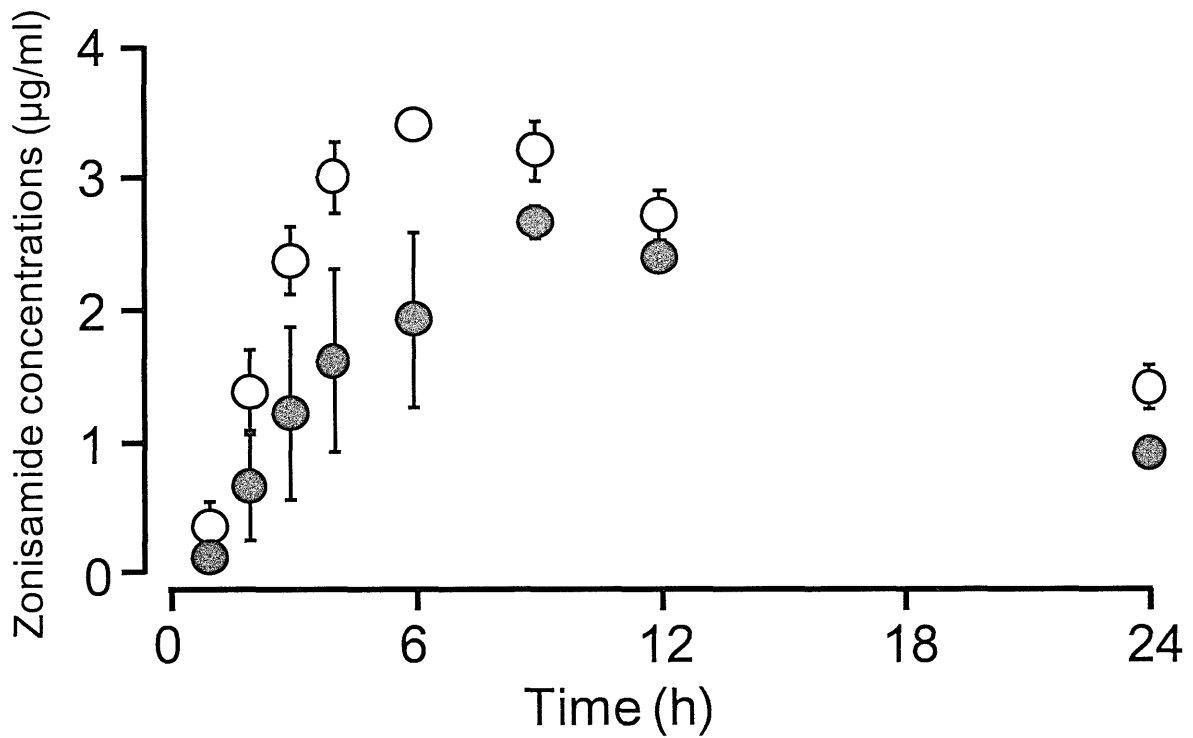


Fig.2. Serum concentrations following a single oral dose of zonisamide at a dose of 5 mg/kg before (open circles) and on the 30th day of (closed circles) repeated administration of phenobarbital (5 mg/kg, PO, BID). Values represent the mean  $\pm$  SD of 5 dogs.

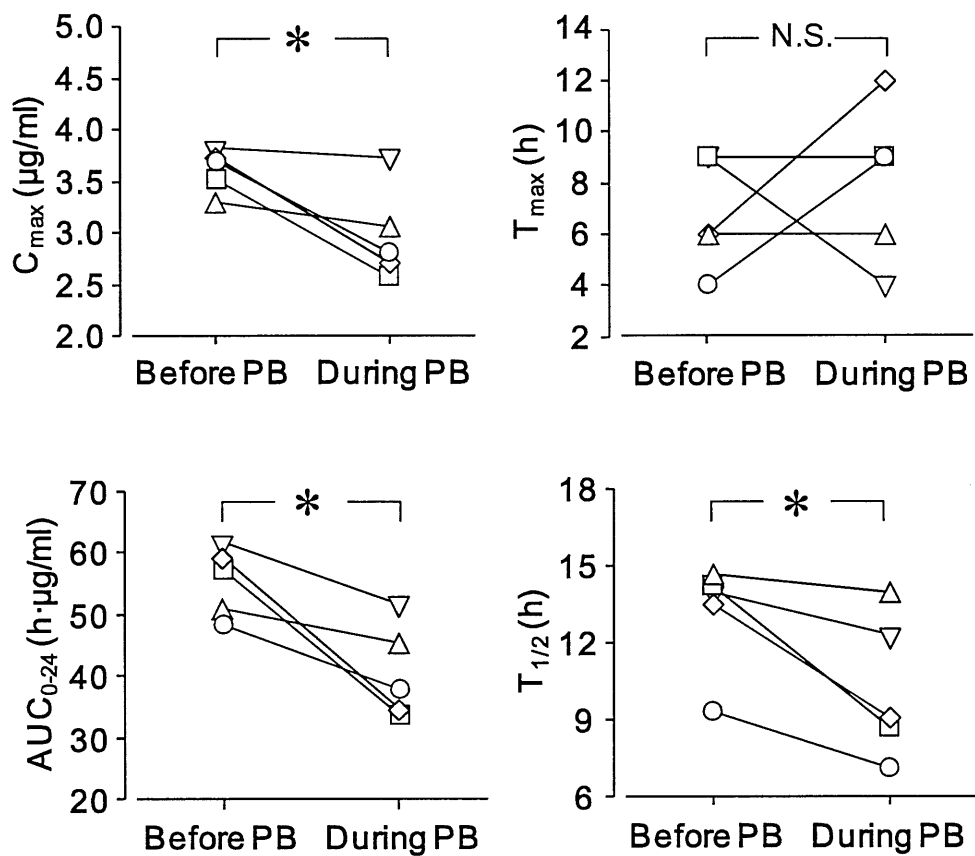


Fig.3. The pharmacokinetic parameters of zonisamide after a single oral administration in dogs before and during repeated administration of phenobarbital (PB, 5 mg/kg, PO, BID) \* P < 0.05 vs. before PB with Mann-Whitney's U test, N.S. not significant.

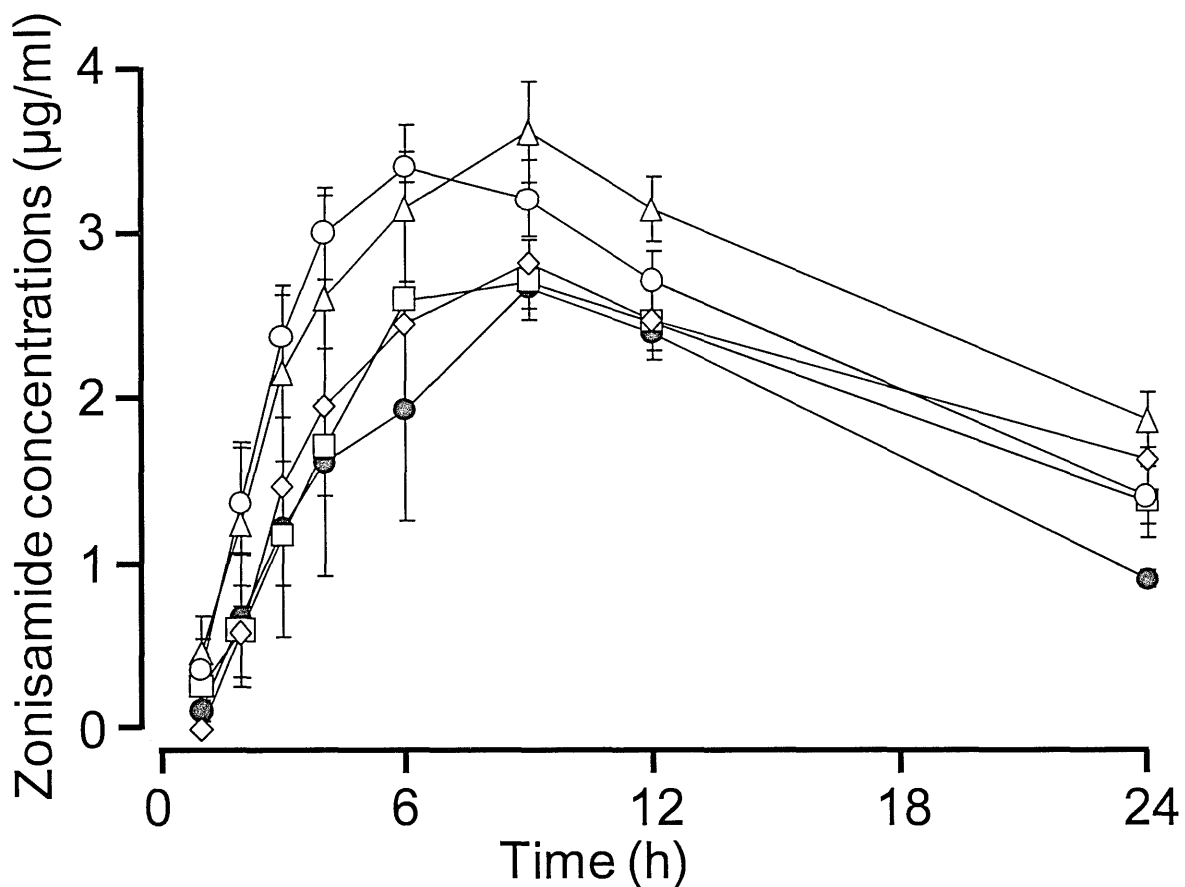


Fig.4. Serum concentrations following a single oral dose of zonisamide at a dose of 5 mg/kg before (open circles) and during repeated administration of phenobarbital (closed circles), and 8 weeks (open squares), 10 weeks (open rhombuses) and 12 weeks (open triangles) after discontinuation of repeated administration of phenobarbital. Values represent the mean  $\pm$  SD of 5 dogs.

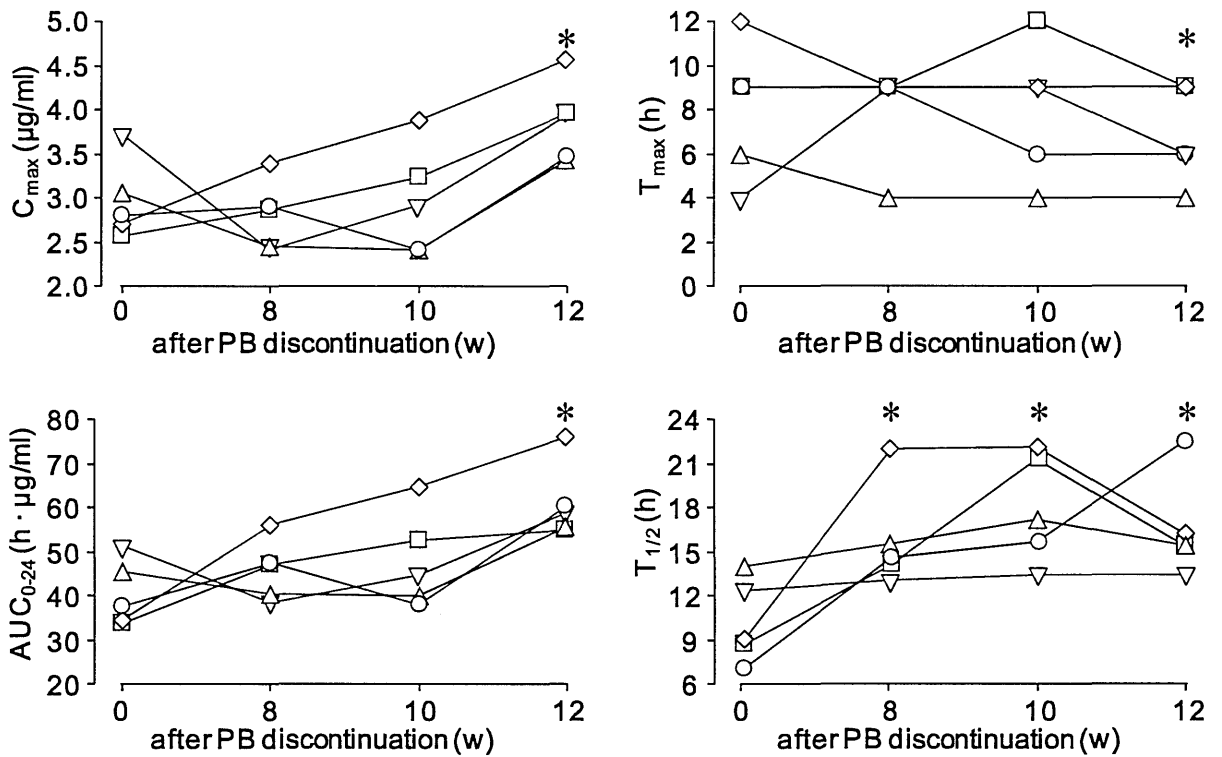


Fig.5. The pharmacokinetic parameters of zonisamide after a single intravenous administration at a dose of 5 mg/kg in individual dog during and 8, 10 and 12 weeks after discontinuation of phenobarbital (PB, 5 mg/kg, PO, BID) \*  $P < 0.05$  vs. during PB with Kruskal-Wallis test followed by Shirley-Williams test.

Table 1. The pharmacokinetic parameters of intravenous antipyrine (5 mg/kg, IV) in 5 dogs before and during repeated administration of phenobarbital (PB, 5 mg/kg, PO, BID) and at different time intervals after PB discontinuation

Parameters	Before PB	During PB	Weeks after PB discontinuation			
			2	4	6	8
$t_{1/2e}$ (h)	0.84 ± 0.11	0.75 ± 0.11	0.71 ± 0.09	0.73 ± 0.11	0.78 ± 0.15	0.74 ± 0.17
AUC <sub>0-∞</sub> (µg·h/ml)	6.57 ± 0.97	2.96 ± 0.16*	3.80 ± 0.43*	3.85 ± 0.44*	5.04 ± 1.53	6.25 ± 1.99
MRT <sub>0-∞</sub> (h)	1.32 ± 0.15	1.37 ± 0.14	1.09 ± 0.10	1.22 ± 0.09	1.17 ± 0.17	1.10 ± 0.22
CL <sub>tot</sub> (l/h/kg)	0.77 ± 0.12	1.69 ± 0.09*	1.33 ± 0.15*	1.31 ± 0.15*	1.05 ± 0.24	0.86 ± 0.22
V <sub>dss</sub> (l/kg)	1.05 ± 0.23	2.31 ± 0.40*	1.48 ± 0.19*	1.24 ± 0.25*	1.07 ± 0.50	0.95 ± 0.43

Values represent the mean ± SD of 5 dogs. \* P < 0.05 vs before PB with one-way analysis of variance for repeated measures and a post testing with Bonferroni's multiple comparison test.



## 第 2 章 薬物－食餌相互作用：尿 pH コントロール食が 抗てんかん薬フェノバルビタールの薬物動態におよぼす 影響

### 第 1 節 はじめに

フェノバルビタールなどの抗てんかん薬は副作用として尿石症を引き起こす可能性があるとしてヒトで指摘されている[24]。イヌにおいても確実なエビデンスは存在しないが、抗てんかん薬が尿石症を誘発するかもしれないという報告がある[25]。イヌの場合、尿石症を引き起こした際の治療もしくは尿石の防止の第一選択になるのが食餌療法である[25]。ストラバイト尿石症などの尿中に増加した場合は食餌を変更することで尿を酸性にし、またシュウ酸カルシウム尿石などができることを予防するためには尿をアルカリ性にし尿石を溶解もしくは予防する。そのため、フェノバルビタール治療中に尿石症を患いもしくはその素因が認められその治療または予防のために、尿 pH コントロール食と併用する可能性は非常に高い。

フェノバルビタールは弱酸性で  $pK_a$  が 7.2 であるため尿 pH が 7.2 以下（以下、酸性）では非イオン型のフェノバルビタールが増加し、尿 pH が 7.2 以上（以下、アルカリ性）ではイオン型のフェノバルビタールが増加する[26]。これが腎臓の近位尿細管では、尿が酸性になれば分子型のフェノバルビタールが増加し再吸収が促進し、尿がアルカリ性になればイオン型のフェノバルビタールが増加し排泄が促進することが理論上予測できる。そのためフェノバルビタールは尿を酸性にすると排泄が抑制され血中濃度が増加し、尿をアルカリ性にすると血中濃度が減少する可能性がある。

しかし尿 pH コントロール食がイヌのフェノバルビタールの薬物動態に影響を与えるかについては報告されていない。もし、フェノバルビタールの薬物動態が尿 pH コントロール食によって変化するのであれば、それを考慮にいった薬物治療の適正化が必要である。そこで本章では健常ビーグルにおいて尿 pH コントロール食がフェノバルビタールの薬物動態に与える影響について検討した。また、その相互作用が理論通り、尿 pH の変化によって影響があるかを明らかにするためフェノバルビタールの尿中排泄も調査した。

## 第 2 節 材料と方法

### 1) 使用動物

健常雌ビーグル犬 5 頭を用い(2-7 歳、7.7 -8.7 kg)、麻布大学獣医臨床センター6 階小動物飼育施設で飼育した。すべてのビーグルはそれぞれの実験の前に、一般身体検査、血液検査や尿路感染検査を行い、腎臓や肝臓に疾患が示唆される臨床徴候はみられなかった。食餌は 1 日 2 回 k/d を 8:00 AM と 6:00 PM に与え、水は自由給水とした。成犬の 1 日栄養要求量 63 kcal/kg/d を基準に食餌を与えた。

### 2) 使用薬物および化学物質

塩化アンモニウム、クエン酸カリウムおよび硫酸アンモニウムは和光純薬工業（大阪）から購入した。それ以外の薬物はすべて前章と同じものを用いた。

### 3) 投与計画および採血と採尿

すべての処置は同じビーグル犬でクロスオーバーで行われた。投与 1 週間前から実験終了まで、k/d のみを与えた時を中性、k/d と尿を酸性にするために塩化アンモニウム(0.1 g, BID)を投与した場合を酸性、k/d と尿をアルカリ性にするためにクエン酸カリウム(0.3 g, BID)を与えた場合をアルカリ性とした。なお塩化アンモニウムとクエン酸カリウムは尿 pH を変化させるために一般的な尿 pH コントロール食にも含まれている試薬である。それぞれの食餌を 7 日間摂取させた後、フェノバルビタール(3 mg/kg, PO)を 1 回投与し、その後、0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144,

168, 192 および 216 時間後に頸静脈を直接穿刺し、1 測定点あたり 2 ml 採血した。またフェノバルビタール投与後 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-10, 10-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, 144-168, 168-192 および 192-216 時間の尿をすべて採取し、尿量と尿 pH を直ちに測定した。採血および採尿中も同様の食餌を 10 日間与え続けた。それぞれの実験の間の休薬期間は以前報告されたフェノバルビタールの半減期から 14 日間以上とした[27]。全血を遠心(980 g, 10 min)し、得られた血清を測定まで -20°C で冷凍保存した。

フェノバルビタール投与後の採尿は独自の方法を開発したため以下に特記する。それぞれのイヌのケージの下に尿と糞を分離できる採尿器を設置し(Fig.6)、そこで採取した尿およびその時間での膀胱尿をカテーテルで採尿し、併せたものを 24 時間後の尿サンプルとして採取した。予備検討の結果少なくとも 24 時間常温で放置しておいても膀胱からカテーテルで採尿した直後の尿 pH と変わらないことを確認した。ただし、採尿器を入念に洗浄しなかった場合、尿がアルカリ性になったため、採尿後、毎日、採尿器は入念に洗浄し、乾燥してから用いた。採尿器はすべてで 10 個作成し、乾燥のため各日ごとに取り換えた。

#### 4) 尿 pH、血清および尿中フェノバルビタール濃度測定

尿 pH は pH メーターにて測定した(SEVEN EASY®、Mettler Toledo、オハイオ、米国)。血清中および尿中フェノバルビタール濃度は第 1 章と同様の HPLC 条件を用いた。

血清中フェノバルビタール濃度の測定は以下の方法を用いた[18]。血清

200  $\mu\text{l}$  に内部標準物質 (5-4-Methylphenyl-5-phenylhydantoin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 20  $\mu\text{l}$  を加え、0.2 M 塩酸を 40  $\mu\text{l}$ 、ジクロロメタンを 2 ml 加え、3 分間ミキサーで混和した後、遠心(980 g, 15 min)した。有機層のみとりだし、真空遠心器 (CC-105、株式会社トミー精工、東京) によって乾燥固化した。残渣を移動相 200  $\mu\text{l}$  に溶解し、25  $\mu\text{l}$  を HPLC に注入し、測定した。

尿中フェノバルビタール濃度の測定は以下の方法を用いて行った[16]。尿 200  $\mu\text{l}$  に内部標準物質 (5-4-Methylphenyl-5-phenylhydantoin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 20  $\mu\text{l}$  を加え、飽和硫酸アンモニウムを 1.0 ml、ジクロロメタンを 2.0 ml を加え、3 分間ミキサーで混和した後、遠心(980 g, 15 min)した。有機層のみ抽出し、真空遠心器によって乾燥固化した。残渣を移動相 200  $\mu\text{l}$  に溶解し、25  $\mu\text{l}$  を HPLC に注入し、測定した。測定限界は血清中および尿中フェノバルビタール濃度ともに 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で回収率は 96-107%であった。精度における日内変動( $n=5$ )および日間変動( $n=5$ )は血清中および尿中フェノバルビタール濃度ともに 10%以下であった。正確度における日内変動( $n=5$ )および日間変動( $n=5$ )は血清中および尿中フェノバルビタール濃度ともに 10%以下であった。

## 6) 薬物動態パラメーター解析

薬物動態解析はノンコンパートメント解析を用い、 $C_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{max}}$ ,  $t_{1/2e}$ ,  $\text{AUC}_{0-24}$ ,  $\text{AUC}_{0-\infty}$  および  $\text{CL}_{\text{tot}}/F$  は第 1 章と同様に算出した。累積尿排泄量はフェノバルビタール投与 216 時間後まで求めた。腎クリアランスは  $\text{CL}_{\text{R}} = A_e/\text{AUC}_{0-216}$  の公式を用いて算出した。

## 7) 統計学的処理

データはすべて平均値  $\pm$  標準偏差(SD)で示した。血清中と尿中の薬物動態パラメーターの差は対応のある一元配置分散分析の後 Bonfferoni の多重比較法を用いた。腎クリアランスと尿 pH の間の関係性は単回帰分析を用いた。尿 pH と時間の関係、尿中排泄率と時間の差はすべて二元配置分散分析（繰り返し有り）を用いた。すべての値は  $P < 0.05$  で有意差があると評価した。

### 第3節 結果

実験を開始する以前にすべてのビーグル犬に k/d のみを 7 日間与え、食餌による様々な因子の順化を行ったところ、尿 pH は  $6.9 \pm 0.5$  であった。

食餌によって尿を酸性、中性およびアルカリ性にするための処置をした後の 24 時間尿 pH はそれぞれ  $6.92 \cdot 7.34$ 、 $6.73 \cdot 5.89$  および  $7.61 \cdot 8.16$  であり、それぞれ目標の尿 pH にコントロールすることができた(Fig.7)。各処置間の尿量に有意な差は認められなかった(Table 2)。

それぞれの尿処置時のフェノバルビタールの血中濃度推移および薬物動態パラメーターは Fig. 8 および Table 3 に示した。フェノバルビタールは投薬後 6 時間以内に  $C_{max}$  に到達し、その後、血清中フェノバルビタール濃度は 10 日間かけてゆっくり減少していった。フェノバルビタールの  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $AUC_{0-216}$ ,  $CL_{tot}/F$  および  $A_{e0-216}$  は 3 つの処置の間では有意な差は認められなかった。尿を酸性に処置をした場合の  $t_{1/2e}$  および  $CL_R$  はアルカリ性の処置をした場合に比べてそれぞれ有意に短縮および増加した。

尿を中性に処置をした場合、フェノバルビタール投与から 216 時間後までの尿中に排泄された未変化体フェノバルビタール量は  $A_{e0-216}$  から投与量の 24.7% であった。尿をアルカリ性および酸性に処置した場合では投与からフェノバルビタールの  $A_{e0-216}$  は中性の時に比べてそれぞれ 29.5% と有意に上昇および 18.9% と有意に減少した(Fig. 9)。尿 pH と投与から 216 時間までの  $CL_R$  の間には正の相関が認められ、尿 pH が上昇すればするほどフェノバルビタールの尿中への排泄が増加した(Fig. 10)。

#### 第 4 節 考察

本章の目的は食餌による尿 pH の変化が臨床用量のフェノバルビタール (3 mg/kg) の薬物動態に与える影響を精査することであった。本章から食餌による尿 pH の変化はフェノバルビタールの尿中排泄を変化させることによって薬物動態に影響を与えることを明らかにした。

ビーグル犬における腎臓からのフェノバルビタールの  $A_e$  は報告されていなかった。本章および以前のウマの研究から尿 pH が中性の時、フェノバルビタール投与 72 時間後のイヌおよびウマの累積尿排泄率はそれぞれ 15% および 11% であった [28]。またフェノバルビタール投与 120 時間後のイヌおよびヒトの累積尿排泄率はそれぞれ 21% および 25% であった [29]。そのためイヌのフェノバルビタールの尿中からの排泄はウマおよびヒトとほぼ同等の値を示すことを明らかにした。

本章から尿 pH とフェノバルビタールの  $CL_R$  の間には正の相関が認められ、尿 pH が上昇すればするほどフェノバルビタールの排泄は促進されることが明らかになった。しかし、尿 pH を変化させることで薬物動態に影響を与えるサリチル酸やスルファメトキサゾールの場合、尿 pH と各薬物の  $CL_R$  の間には本章の結果より強い正の相関が認められた [30, 31]。これらの違いは両研究の間の尿 pH の変化が持続する時間によるのかもしれない。以前の研究では持続点滴によって実験期間中、常に尿 pH は一定にされていたが、本章では 1 日 2 回の食餌の投与で尿 pH を変化させたため、尿 pH は 1 日中常に一定ではないかもしれない。そのためフェノバルビタールの尿中排泄が 1 日のうちで尿 pH に依存的に変動し、尿 pH とフェノバルビタールの  $CL_R$  の間に強い正の相関が認められなかったのかもしれない。



ない。

本章の結果は犬種によって異なる可能性がある。例えば本章においてビーグルの尿 pH は 6.9 ~ 7.1 の範囲にコントロールされた。しかし本章と同様にミニチュアシュナウザーに k/d を投与した時、尿 pH は 6.3 ~ 6.7 の範囲にコントロールされ、ラブラドルレトリバーは 5.8 ~ 6.5 の範囲にコントロールされたと報告されている [32-35]。このように同じ食餌でも犬種によって、尿 pH の値は異なるため、フェノバルビタールの尿排泄の影響は犬種によって異なるのかもしれない。そのため尿 pH を変化させる食餌がフェノバルビタールの薬物動態に与える影響は犬種によって異なる可能性があり、今後さらなる研究が必要である。

フェノバルビタールは臨床現場において反復投与される薬物である。一方、イヌにおいて、フェノバルビタールの反復投与は CYP を誘導するため、フェノバルビタール自身の血中濃度を減少させる [27]。フェノバルビタールの単回投与から反復投与時の血中濃度をシュミレーションした時の血中濃度は、実際の反復投与時の血中濃度よりも低いとも報告されている [27]。本章ではフェノバルビタールの単回投与のみで検討しているため臨床現場で想定される反復投与の結果に適用できない可能性がある。今後、フェノバルビタールを反復投与している時に尿 pH を変化させる食餌を毎日摂取させた時の影響についても検討する必要がある。

尿 pH を変化させる食餌はフェノバルビタールの尿中ならびに血中の薬物動態に影響を与えることを明らかにした。

## 第 5 節 小括

本章ではイヌに尿 pH を変化させる 1 日 2 回の食餌を 7 日間与えた後のフェノバルビタールの薬物動態について追究した。また、その際の尿中のフェノバルビタールの排泄に関しても追究した。

- 1) 尿 pH を変化させる 1 日 2 回の食餌を与え、尿をアルカリ性にした時のフェノバルビタールの  $t_{1/2e}$  は尿をアルカリ性にした時より短縮した。
- 2) 尿 pH を変化させる 1 日 2 回の食餌を与えた時のフェノバルビタールの尿中排泄は尿をアルカリ性にした時が一番速く、中性、酸性の順に遅くなった。
- 3) 尿 pH が上昇すればするほどフェノバルビタールの尿中への排泄が増加した。

以上の結果から尿 pH を変化させる食餌はイヌのフェノバルビタールの薬物動態に影響を与えることを明らかにした。また、その相互作用は尿の pH の上昇に伴うフェノバルビタールの尿中排泄の増加であることをフェノバルビタールの示唆した。



Fig.6. Urine collecting device made hands by us for dogs.

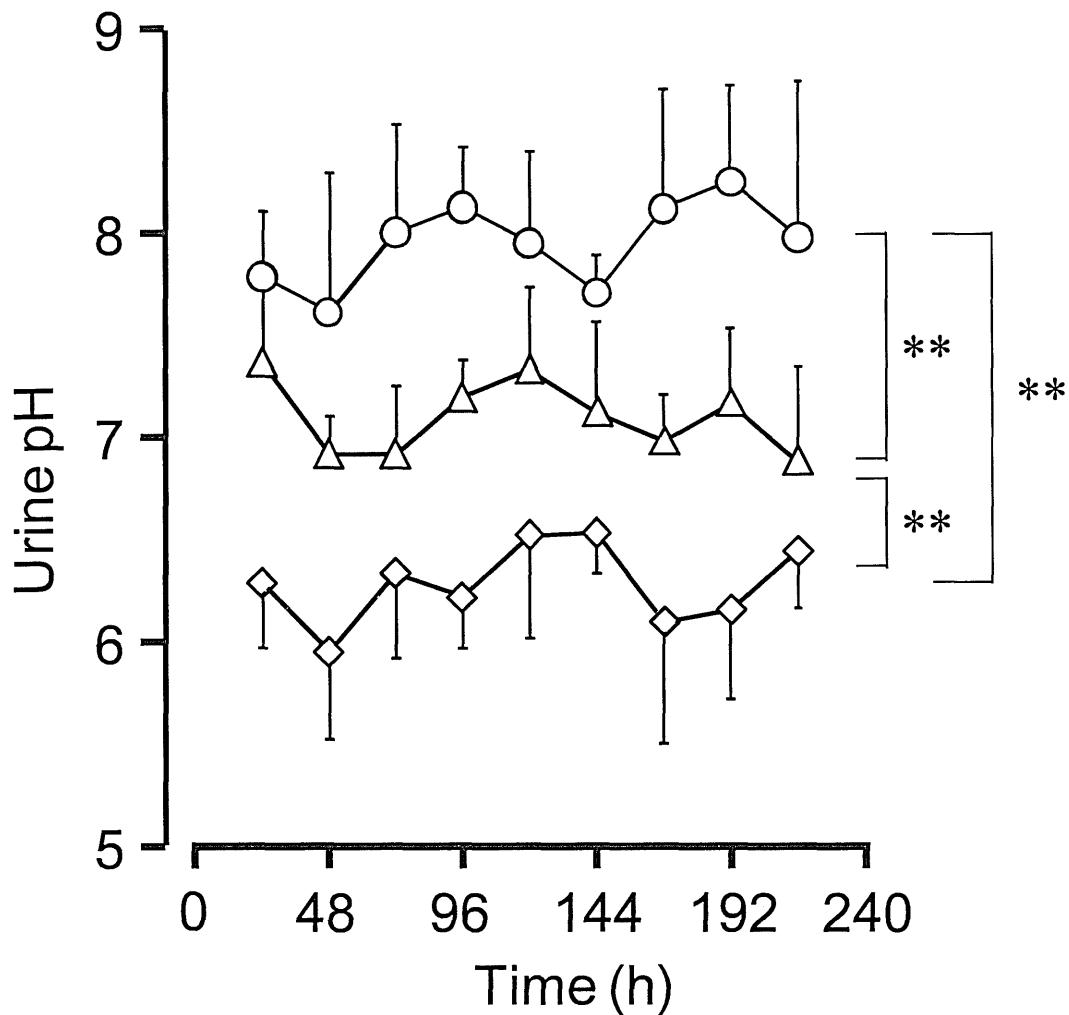


Fig.7. Changes in urine pH after single phenobarbital (3 mg/kg, PO) in dogs treated with alkalization (circle), neutral (triangle) or acidification (square). Values represent the mean + or - SD of 5 dogs. \*\* P < 0.01 vs. 3 treatments with two-way ANOVA with repeated measurements.

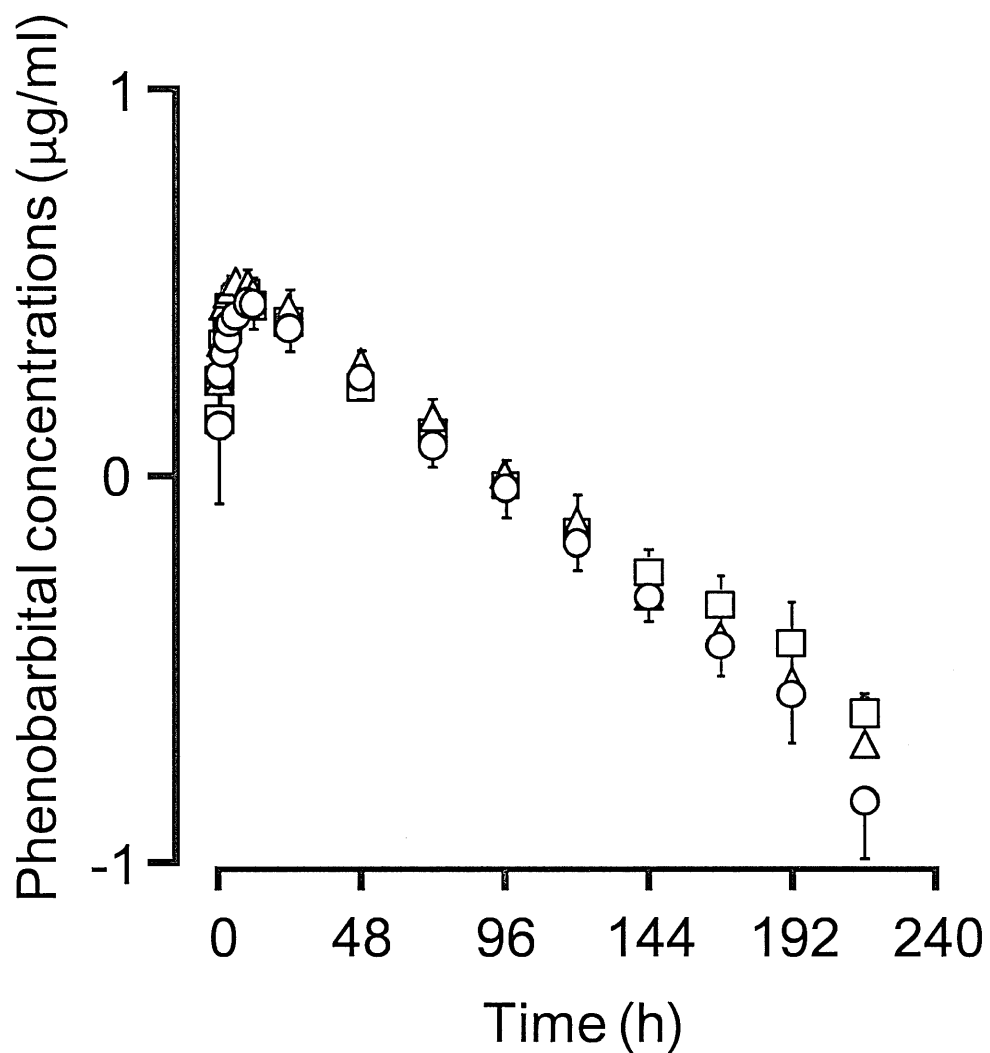


Fig.8. Serum concentrations of phenobarbital (3 mg/kg, PO) in dogs treated with acidification (square), neutral (triangle) or alkalization (circle). Values represent the mean + or - SD of 5 dogs.

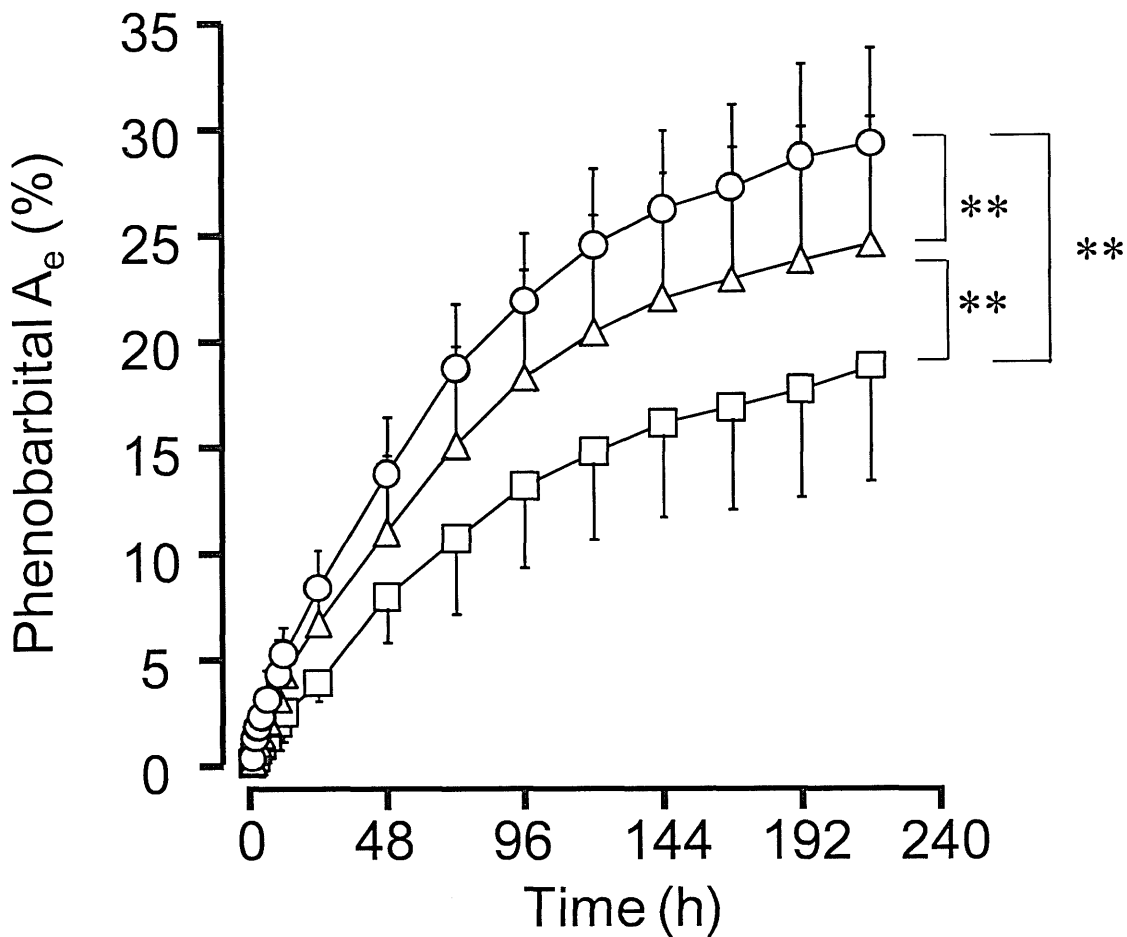


Fig.9. Cumulative excretion rate of phenobarbital in urine after single phenobarbital (3 mg/kg, PO) in dogs treated with alkalization (circle), neutral (triangle) or acidification (square). Values represent the mean + or - SD of 5 dogs. \*\* P < 0.01 vs. 3 treatments with two-way ANOVA with repeated measurements.

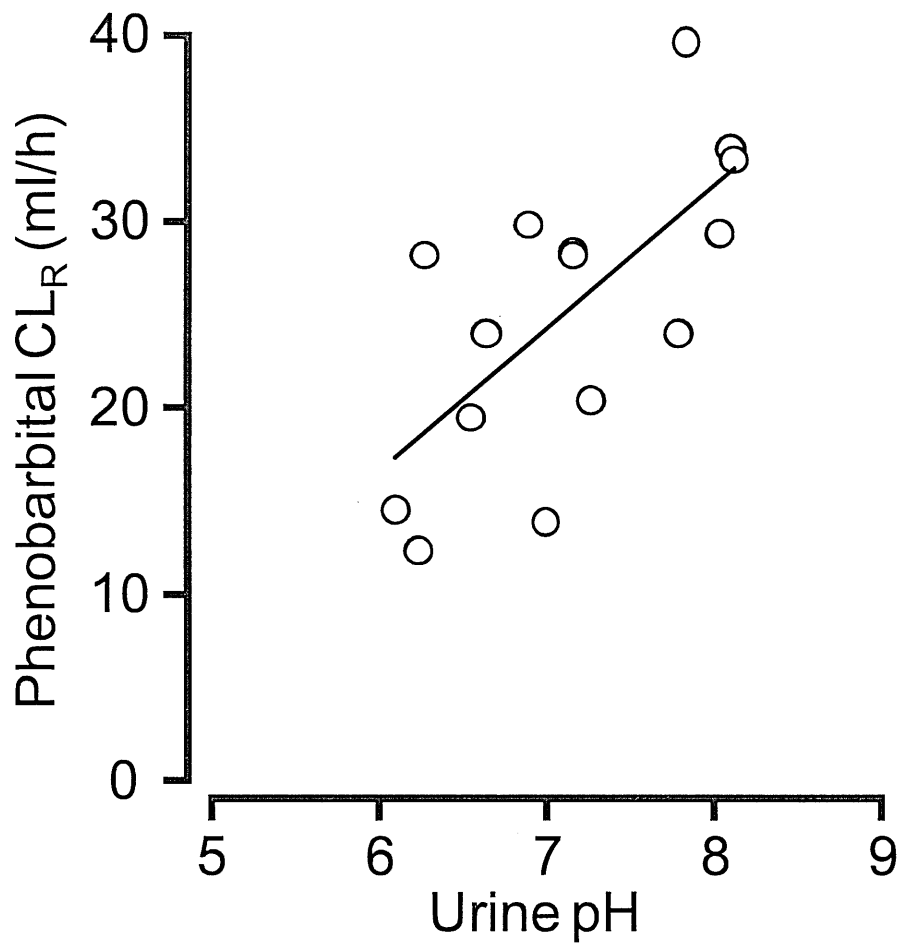


Fig.10. Linear regression of phenobarbital renal clearance versus urine pH.  $y = 7.69x - 29.6$  ( $R^2 = 0.46$ ;  $n = 15$ ;  $p < 0.05$ )

Table 2. Urine volumes after single phenobarbital (3 mg/kg, PO) in dogs treated with alkalization, neutral or acidification.

<i>Treatments</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>72 h</i>	<i>96 h</i>	<i>120 h</i>	<i>144 h</i>	<i>168 h</i>	<i>192 h</i>	<i>216 h</i>
Alkalization	287 ± 139	336 ± 193	358 ± 185	304 ± 142	258 ± 101	259 ± 113	240 ± 136	242 ± 72	288 ± 213
Neutral	233 ± 52	262 ± 79	350 ± 299	244 ± 122	280 ± 138	224 ± 97	208 ± 102	219 ± 96	233 ± 109
Acidification	179 ± 67	236 ± 118	203 ± 97	231 ± 92	201 ± 84	186 ± 65	206 ± 67	191 ± 87	264 ± 162

Values represent the mean ± SD of 5 dogs. One-way ANOVA with repeated measurements followed by the post hoc Bonferroni's

test.



Table 3. Pharmacokinetics parameters after single phenobarbital (3 mg/kg, PO) in dogs treated with alkalization, neutral or acidification.

Treatments	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2e</sub> (h)	AUC <sub>0-216</sub> (µg·h/ml)	CL <sub>rot</sub> /F (L/h)	A <sub>e0-216</sub> (mg)	CL <sub>R</sub> (L/h)
Alkalization	2.97 ± 0.28	9.6 ± 3.3	51.1 ± 4.0	230 ± 20	12.4 ± 1.1	7.38 ± 1.40	32.0 ± 5.8
Neutral	3.25 ± 0.19	8.4 ± 2.2	52.3 ± 4.4 *	256 ± 20	11.1 ± 1.0	6.20 ± 1.73	24.2 ± 6.8 *
Acidification	2.96 ± 0.21	9.2 ± 1.8	59.6 ± 4.4	241 ± 12	11.4 ± 0.7	4.76 ± 1.56	19.7 ± 6.6

Values represent the mean ± SD of 5 dogs. \* P < 0.05 vs. 3 treatments with one-way ANOVA with repeated measurements followed by the post hoc Bonfferoni's test.

### 第3章 薬物－病態相互作用：僧帽弁閉鎖不全（MR）が新規心不全薬ニコランジルの薬物動態におよぼす影響

#### 第1節 はじめに

イヌで最も多い心疾患の一つである MR の治療には、僧帽弁置換術に代表される外科手術が行われているが、医療費が高額である。そのため、QOL 改善ならびに延命効果を目的とした薬物治療を行うことが多い。イヌの MR に対し徴候改善作用を有する薬物としてジゴキシン、アンギオテンシン変換酵素阻害薬およびフロセミドが用いられている [36]。しかし、これら 3 剤併用により徴候改善効果の認められない症例も少なくないため、より多角的な心不全治療のために新たな治療薬の獣医領域への導入が必要である。

ニコランジルは、血管に存在する ATP 感受性  $K^+$ チャネルを開口させる [37]。これにより、血管平滑筋細胞は過分極を引き起こし、結果的に血管を拡張させる [38, 39]。これに加え、一酸化窒素（NO）作用により静脈系をも拡張させることで心臓の前負荷や後負荷の軽減を導く。またニコランジルは、 $K^+$ チャネル開口を通じ心筋保護作用も有すると報告されている [40, 41]。実際に、ニコランジルは心保護作用を有することがヒト臨床でも明らかになっている [42]。これらのエビデンスよりニコランジルは、イヌの MR の徴候改善作用を有する可能性が高い。一方で血管拡張薬は、血中濃度が高くなりすぎると低血圧を惹起したり、虚血部位の灌流圧が低下したりするため、循環徴候を悪化させてしまう可能性がある。そのため適用量範囲を明らかにしておくことが必要である。ニコランジルの薬物動態

は、健常なビーグルでは明らかにされている。一方で MR により肝臓の CYP 活性が低下し、薬物動態を変化させる可能性が報告されている[43, 44]。このことから、正常犬と異なり MR 犬のニコランジルの血中濃度が高く推移し、循環徴候を悪化させてしまう可能性が考えられる。従って、獣医領域にニコランジルを導入する際には、MR 犬におけるニコランジルの薬物動態から適用量範囲を明らかにする必要がある。そこで、本章では MR のビーグルを作出し、ニコランジルの薬物動態を詳細に解析した。

## 第2節 材料と方法

### 1) 使用動物

健康雌ビーグル犬 6頭および MR 雌ビーグル犬 6頭を用い(4-8歳、8-12 kg)、麻布大学獣医臨床センター6階小動物飼育施設で飼育した。健康犬には偽手術を施し、Control 群とした。MR 犬にはイソフルラン麻酔下で直接僧帽弁の腱索を断裂させることで MR 群とした。本章で用いた MR 犬は劇的な臨床徴候はみられず、心雑音が聴取されるのみの軽度な MR である(5頭は ISACHC 1b、1頭は ISACHC 1a)。すべてのイヌはそれぞれの実験の前に、一般身体検査、血液検査および血清生化学検査を行い、腎臓や肝臓に疾患が示唆される臨床徴候はみられなかった。食餌は1日2回 k/d を 8:00 AM と 6:00 PM に与え、水は自由給水とした。成犬の1日栄養要求量 63 kcal/kg/d を基準に食餌を与えた。

### 2) 使用薬物および化学物質

ニコランジルおよび内部標準物質の SG-89 の原末は中外製薬株式会社(東京)から供与された。ほう酸および水酸化ナトリウムは和光純薬工業(大阪)から購入した。それら以外の薬物は前章と同様のものを用いた。

### 3) ニコランジルの投与計画および採血

ニコランジルは水に溶解し、それぞれのイヌに 0.2 ml/kg に調整した。3用量のニコランジル(0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg, PO)をそれぞれ1回投与し、その後、5, 15, 20, 30, 45, 60 および 90分 2, 3 および 4時間後に頸静脈を直接穿刺し、1測定点あたり 5 ml 採血した。実験はクロスオーバー

デザインで行った。それぞれの実験の間の休薬期間は基礎検討によって算出されたニコランジルの半減期から7日間以上とした。全血をEDTA2Naで抗凝固処理をした後、遠心(980 g, 15 min)し、得られた血漿を測定まで-20°Cで冷凍保存した。

#### 4) 血漿中ニコランジル濃度の測定

血漿中ニコランジル濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC、SCL-10A シリーズ、島津製作所株式会社、京都) にて測定した[45]。サンプル分離は ODS C18 カラム(ODSpak F-411、4.6 mm i.d. × 150 mm, particle size, 5 μm、昭和電工株式会社、東京)で行った。カラムオーブンは 25°C、流速は 1.8 mL/min. 移動相はアセトニトリル : 0.1 M ほう酸 (pH8.0) : 水を 15:15:70 (v/v) を用い測定波長は 220 nm で行った。

血漿 500 μl に内部標準物質(SG-89, 2.5 μg/ml)を 50 μl を加え、0.1 M 水酸化ナトリウムを 90 μl 、ジクロロメタンを 4.0 ml 加え、3 分間ミキサーで混和した後、遠心(800 g, 15 min)した。有機層のみとりだし、真空遠心器によって乾燥固化した。残渣を移動相 100 μl に溶解し、45 μl を HPLC に注入し、測定した。ニコランジルの測定限界は 5 ng/ml で回収率は 97.4-104.2%であった。精度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 9.7-15.7%および 2.5-12.5%であった。正確度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 91.1-101.3%および 93.5-106.4%であった。

#### 6) 薬物動態パラメーター解析

薬物動態解析はノンコンパートメント解析を用い、 $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2e}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $AUMC_{0-\infty}$ ,  $MRT_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot}/F$  および  $V_d/F$  は前章と同様に算出した。

#### 7) 統計学的処理

データはすべて平均値  $\pm$  標準偏差(SD)で示した。Control 犬および MR 犬の薬物動態パラメーターの差は対応のない t-検定を用いた。投与量と  $C_{max}$  および投与量と  $AUC_{0-\infty}$ との間で単回帰分析を用いた。すべての値は  $P < 0.05$  で有意差があると評価した。

### 第 3 節 結果

ニコランジルを各投与量(0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg, PO)で投与後、血漿中ニコランジル濃度は 1 時間以内に  $C_{max}$  に到達し、その後、4 時間以内に急速に減少していった。Control 犬および MR 犬の間の血漿中濃度一時間曲線は各投与量ともに同等の値をしめした(Fig.11A-C)。また、Control 犬および MR 犬の  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2e}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $AUMC_{0-\infty}$ ,  $MRT_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot}/F$  および  $V_d/F$  もすべて同等の値を示した(Table 4)。ニコランジルの各投与量(0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg)と  $C_{max}$  または  $AUC_{0-\infty}$  との関係は直線的な正の相関を示した(Fig.12A, B)。この直線においても Control 犬と MR 犬の間では同等の値を示した。

#### 第 4 節 考察

血漿中ニコランジル濃度は、投与後急速に上昇し、投与後 4 時間には測定限界以下まで血漿中濃度が減少した。この薬物動態プロファイルは以前にイヌで報告されたものと異なっていた[45, 46]。以前の報告では同じ投与量のニコランジル投与 2 時間後の血漿中濃度は  $110 \pm 40$  ng/ml であったのに対し、本章の投与後 2 時間の血漿中濃度は Control 犬  $47 \pm 23$  ng/ml および MR 犬  $40 \pm 15$  ng/ml であった[47]。これは以前の研究では絶食後にニコランジルを投与し、本章では食餌後に投与したことに起因するかもしれない。本章におけるもっとも有用な知見は Control 犬と MR 犬の間の薬物動態プロファイルが同等であったということである。またイヌにおいてもヒトと同じようにニコランジルの投与量と  $C_{\max}$  および  $AUC_{0-\infty}$  の間に直線的な正の用量依存性があったということも新規の知見であった[48, 49]。

本章においてはヒトとは異なり、各用量におけるニコランジルの薬物動態は Control と MR の間で全く同じ値を示した。一方、急性心不全のヒトでは健常のヒトと比較して排泄相半減期が劇的に延長することが報告されている[50]。またヒトではニコランジルの主要代謝経路は腎排泄であるため、低クリアランスや初回通過効果がニコランジルの排泄に影響を与えているのかもしれない[38]。そのため今回作出した軽度の MR のイヌでは腎臓の排泄速度に影響を与えるほど腎臓に障害がなかったため、ニコランジルの薬物動態プロファイルに影響を与えなかったのかもしれない。今後は重度の MR 犬においてもニコランジルの薬物動態を明らかにする必要がある。



アンギオテンシン変換酵素阻害薬およびピモベンダン<sup>®</sup>は MR 犬の生存率を延長することが報告されている [51, 52]。アンギオテンシン変換酵素阻害薬は血管収縮や心肥大を引き起こすアンギオテンシン II の産生を減少させる。ピモベンダンは心不全犬の心臓の収縮を増加させる。MR は左室負荷を引き起こし心筋の虚血状態を引き起こされる [53]。ニコランジルはイヌの末梢血管を拡張させることにより血流を改善する [54]。またニコランジルはイヌの高血圧を用量依存的に減少させ、後負荷の減少を導く [47, 55]。このようにニコランジルはアンギオテンシン変換酵素阻害薬やピモベンダンとは異なるメカニズムで心機能を改善するため、MR によって引き起こされる心不全の治療の主要なもしくは補助的な薬物として効果的であるかもしれない。本章のニコランジルの薬物動態はビーグル犬の軽度な MR にのみ限定した研究であるため、今後は重度の MR や他の心疾患、または犬種は性別などについても検討する必要がある。

## 第5節 小活

本章では MR 犬にニコランジルを投与し、MR がニコランジルの薬物動態に影響を与えるかを Control 犬と比較することで追究した。また、ニコランジルの投与量と血漿中濃度の間に相関があることを追究し、それにおいても MR が与える影響も明らかにした。

1) MR 犬のニコランジル(0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg, PO)の薬物動態は Control 犬と同等の値を示した。

2) ニコランジルの各投与量(0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg)と  $C_{\max}$  または  $AUC_{0-\infty}$ の間には直線性の正の相関が認められた。

3) ニコランジルの各投与量と  $C_{\max}$  または  $AUC_{0-\infty}$ の間の直線においても健常と MR では同等の傾きを示した。

以上の結果からニコランジルの薬物動態は MR によって影響を受けないことが明らかになった。また、ニコランジル投与時に必要な基礎的な情報を臨床へ提供した。

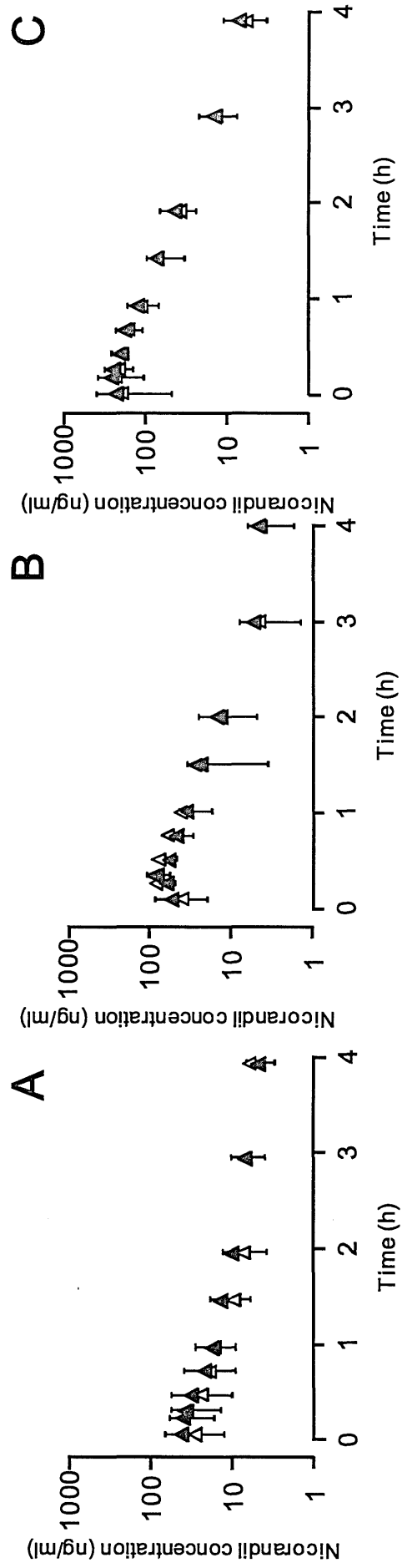


Fig.11A, B and C. Plasma concentrations of nicorandil following a single oral administration of nicorandil at doses of 0.1 (A), 0.3 (B) and 1.0 (C) mg/kg, in control dogs (open triangle) and dogs with mitral regurgitation (closed triangle). Values represent the mean  $\pm$  SD of 6 dogs.

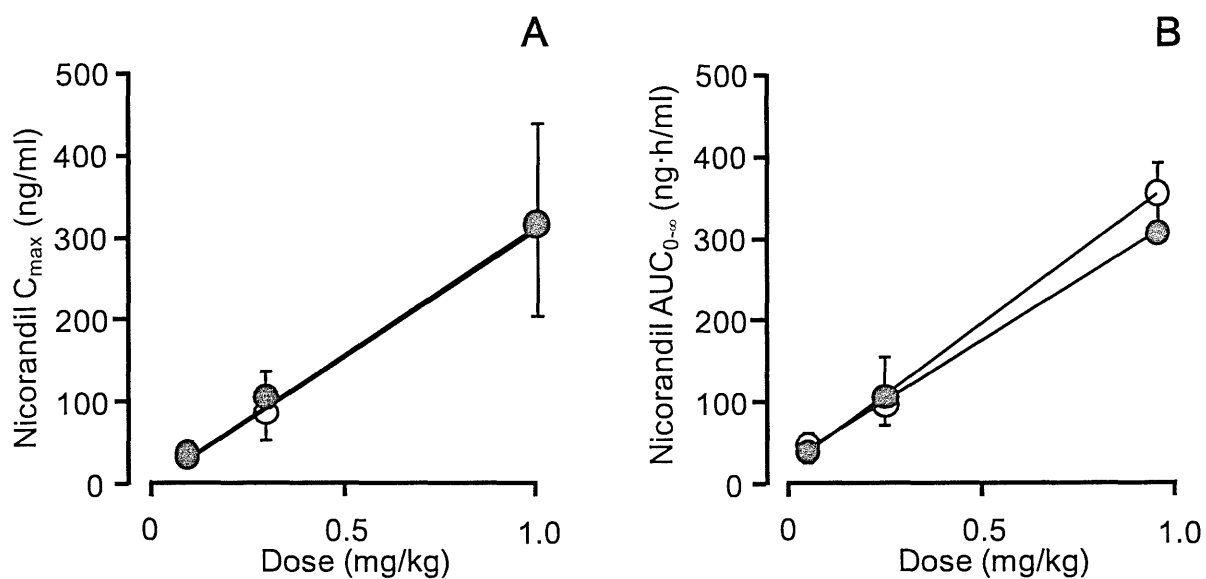


Fig.12A and B. Linear relation between maximum plasma concentrations ( $C_{max}$ ) and oral ascending doses of nicorandil (A) and that between area under the plasma concentration-time curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) and oral ascending doses of nicorandil (B) in control dogs (open circle) and dogs with mitral regurgitation (closed circle). Values represent the mean  $\pm$  SD of 6 dogs. [Control:  $C_{max} = 0.4 + 312.0$  (dose),  $R^2 = 0.998$ ,  $P = 0.03$  and MR:  $C_{max} = 7.3 + 310.5$  (dose),  $R^2 = 0.999$ ,  $P = 0.02$ ] [Control:  $AUC_{0-\infty} = 34.3 + 347.3$  (dose),  $R^2 = 0.999$ ,  $P = 0.04$  and MR:  $AUC_{0-\infty} = 43.3 + 293.5$  (dose),  $R^2 = 0.999$ ,  $P = 0.02$ ]

Table 4. The pharmacokinetic parameters of nicorandil in control dogs and dogs with mild mitral regurgitation (MR) after a single oral administration of nicorandil (0.1, 0.3, and 1.0 mg/kg, PO)

Parameters	0.1 mg/kg		0.3 mg/kg		1.0 mg/kg	
	Cont	MR	Cont	MR	Cont	MR
$C_{max}$ (ng/ml)	37.74 ± 18.68	33.76 ± 14.93	86.20 ± 31.22	106.29 ± 31.13	314.2 ± 123.0	316.5 ± 108.2
$t_{1/2e}$ (h)	0.62 ± 0.17	0.71 ± 0.25	0.66 ± 0.19	0.67 ± 0.46	0.63 ± 0.16	0.76 ± 0.26
$t_{max}$ (h)	0.21 ± 0.16	0.22 ± 0.11	0.29 ± 0.10	0.32 ± 0.10	0.33 ± 0.22	0.28 ± 0.19
$AUC_{0-\infty}$ (ng h/ml)	46.79 ± 18.09	42.89 ± 15.19	97.67 ± 20.44	107.04 ± 40.06	340.09 ± 81.07	310.82 ± 90.10
$MRT_{0-\infty}$ (h)	1.62 ± 0.34	1.81 ± 0.55	1.29 ± 0.32	1.12 ± 0.14	1.07 ± 0.27	1.09 ± 0.18
$CL_{tot}/F$ (l/h/kg)	2.47 ± 1.15	2.54 ± 0.74	3.22 ± 0.88	3.26 ± 1.32	3.15 ± 1.09	3.42 ± 0.85
$V_d/F$ (l/kg)	1.47 ± 0.77	1.64 ± 0.60	1.60 ± 1.13	1.29 ± 0.74	1.31 ± 1.26	1.37 ± 1.12

Values represent the mean ± SD of 6 dogs. \*  $P < 0.05$  vs. Cont with unpaired t-test.

## 第 4 章 薬物—経口投与補助剤相互作用：経口投与補助剤（ペースト、カプセルおよびオブラート）がゾニサミドの薬物動態におよぼす影響

### 第 1 節 はじめに

イヌはヒトとは異なり、薬物を動物の意思に任せ摂取させることは困難である。そのため様々な専門的技術で投薬は行われる。例えば投薬量を調節するために錠剤を破砕したものや散剤であればカプセルおよびオブラートなどの経口投与補助剤に包んだりして投薬する方法がある。このようにカプセルやオブラートで包んだとしてもイヌに投与することが困難な状況もあり、その際には専門的な技術を用いて投薬する。例えば、直接投薬する場合イヌの鼻先を上に向け、逆手で唇を口の中に入れるように持ちイヌに負担なく口を開け、咽喉に向かい薬物を投与する。しかし、このような投薬方法は専門的な技術をもたない飼主にとっては非常に難しく、イヌに咬まれる可能性があるため非常に危険である。そこで飼主が行う簡便な投薬方法としてイヌの嗜好性が高いペースト状の食餌（以下ペースト）の中に直接薬物を混入したりカプセルやオブラートに包んだ薬物をさらに食餌で包んだりして投薬するという方法が行われる。

新規の薬物は薬理作用が確認された後、その薬物が実際の標的器官に到達するために様々な剤型が考案されている。例えば免疫抑制剤であるシクロスポリンはその薬物を散剤で経口投与しても薬物の吸収が個体ごとに一定ではなく、血中濃度を一定に保つことができない[56]。吸収を一定にするためマイクロエマルジョンという剤型を用いて投薬するのが現在の

主流になっている。商品化されているヒト用のネオーラル®や動物用のアトピカ®はマイクロエマルジョン型のシクロスポリンであり、それぞれの個体ごとに散剤よりも一定の血中濃度になることが薬物動態学的研究から証明されている。このようにヒトでは剤型が血中濃度に影響を与えることを薬物動態学的観点から様々検討されているにもかかわらず、イヌではペースト、カプセルおよびオブラートに薬物を包んだ時の薬物動態に与える影響またはそれらをさらに食餌に包んだ時の薬物動態に与える影響に関する薬物動態学的な研究は皆無である。

ゾニサミドはイヌでは新規の抗てんかん薬である[57]。そのため単回投与以外の詳細な薬物動態が明らかになっておらず、その投薬方法が確立されていない薬物である。さらに抗てんかん薬は生涯投薬されることが一般的で、飼主の毎日の投薬の負担を最小限にするために食餌に包むことが多い薬物である。そこで本章ではイヌを用い、ゾニサミドをそれぞれペースト、カプセルおよびオブラートに包み、その時のゾニサミドの単回投与時の薬物動態を検討した。またカプセルやオブラートをさらにペーストに包んだ時のゾニサミドの薬物動態も検討した。またゾニサミドの薬物動態プロファイルも非常に少ないため、ペーストに包んだゾニサミドを反復投与した時の薬物動態も検討し、その用量依存性も検討した。

## 第2節 材料と方法

### 1) 使用動物

健康雌ビーグル犬6頭もしくは8頭を用い(5-9歳、8.8-11.4 kg)、麻布大学獣医臨床センター6階小動物飼育施設で飼育した。すべてのビーグルはそれぞれの実験の前に、一般身体検査、血液検査および血清生化学検査を行い、腎臓や肝臓に疾患が示唆される臨床徴候はみられなかった。食餌は1日2回k/dを8:00 AMと6:00 PMに与え、水は自由給水とした。成犬の1日栄養要求量63 kcal/kg/dを基準に食餌を与えた。

### 2) 使用薬物および化学物質

ゾニサミドを包むためにペースト状の肉(サイエンスダイエット・アダルト®、日本ヒルズ・コルゲート株式会社、東京)を購入した。カプセルはカプセル・ジャパン株式会社(神奈川)から、オブラートは白十字株式会社(東京)から購入した。それら以外の薬物は前章と同様のものを用いた。

#### 3)-1 ペースト、カプセルおよびオブラートを使用した時のゾニサミドの単回投与時の投与計画および採血

ゾニサミドの原末を市販されている嗜好性の高い肉(約5 g)で包んだものをペースト、カプセルに包んだものをカプセル、オブラートに包んだものをオブラート、カプセルに包んだものをさらに肉に包んだものをカプセル+ペーストおよびオブラートに包んだものをさらに肉に包んだものオブラート+ペーストとした。それぞれの形態のゾニサミド(5 mg/kg, PO)



を6頭のビーグル犬に1回投与し、その後、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 および 72 時間後に頸静脈を直接穿刺し、1測定点あたり5 ml 採血した。実験はクロスオーバーデザインで行った。それぞれの実験の間の休薬期間は基礎検討によって算出されたゾニサミドの半減期から14日間以上とした[14]。全血をEDTA2Naで抗凝固処理をした後、遠心(980 g, 15 min)し、得られた血漿を測定まで-20℃で冷凍保存した。

### 3)-2 ペーストを使用した時のゾニサミドの反復投与時の投与計画および採血

ペーストで包んだゾニサミド(5 mg/kg, PO, BID)を8頭のビーグル犬に反復投与し、それぞれの日の最初の投与の直前(=血漿中トラフ濃度)に頸静脈を直接穿刺し、1測定点あたり5 ml 採血した。それぞれの用量で反復投与中の5日間のゾニサミドの血漿中トラフ濃度の間のばらつきが8%以内の時に定常状態であると定義した。5 mg/kgのゾニサミド(PO, BID)の反復投与で定常状態に達した後、休薬期間を設けず、連続して10 mg/kgの反復投与に変更し、血漿中トラフ濃度を測定した。その後、定常状態に達するごとに15および30 mg/kgの反復投与を行った。全血をEDTA2Naで抗凝固処理をした後、遠心(980 g, 15 min)し、得られた血漿を測定まで-20℃で冷凍保存した。

### 4) 血漿中ゾニサミド濃度の測定

血漿中ゾニサミド濃度のHPLCによる測定条件は第1章で用いた条件と同じ条件下および同様の前処理で行った。

## 6) 薬物動態パラメーター解析

薬物動態解析はノンコンパートメント解析を用いて行った。吸収速度定数と  $k_e$  は 8 つ以上の測定点を基に残差法を用い算出した。吸収相半減期は  $t_{1/2abs} = \ln 2/k_a$  の公式を用いて算出した。その他のパラメーター  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $AUMC_{0-\infty}$ ,  $MRT_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot}/F$  および  $V_d/F$  は前章と同様に算出した。

## 7) 統計学的処理

データはすべて平均値  $\pm$  標準偏差(SD)で示した。各投薬方法の薬物動態パラメーター差は対応のある一元配置分散分析の後 Bonfferoni の多重比較法を用いた。カプセルとカプセル + ペーストの間およびオブラートとオブラート + ペーストの間の薬物動態パラメーターの差は対応のある  $t$ -検定を用いた。投与量とゾニサミドの血漿中トラフ濃度の間の関係性は単回帰分析を用いた。すべての値は  $P < 0.05$  で有意差があると評価した。

### 第 3 節 結果

ゾニサミドの血中濃度一時間曲線はペーストにくらべ、カプセルおよびオブラートの方が右方に移動した(Fig.13)。ペーストに比べ、オブラートの  $t_{1/2abs}$  および  $MRT_{0-\infty}$  が有意に延長した(Table 5)。一方、各処置間の  $t_{1/2e}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $AUMC_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot}/F$  および  $V_d/F$  に有意な差は認められなかった。ゾニサミドの血中濃度一時間曲線はカプセルよりもカプセル+ペーストの方が右方に移動した(Fig.14)。カプセル+ペーストの  $t_{1/2abs}$ ,  $t_{1/2e}$ ,  $t_{max}$  および  $MRT_{0-\infty}$  はカプセルの値よりも有意に延長した(Table 6)。ゾニサミドの血中濃度一時間曲線はオブラートよりもオブラート+ペーストの方が右方に移動した(Fig.15)。オブラート+ペーストの  $t_{1/2abs}$  および  $t_{max}$  はオブラートの値よりも有意に延長した(Table 7)。

ゾニサミド(5 mg/kg, PO, BID)をペーストで包んで反復投与した時、その血漿中トラフ濃度は4日以降すべて同じ濃度になり、定常状態になった。以降、投与量を段階的に(5→10 mg/kg, 10→15 mg/kg および 15→30 mg/kg)増加し、反復投与した時、それぞれゾニサミドの血漿中トラフ濃度は4, 3 および 4 日で定常状態になった(Fig.16)。それぞれの用量の時のゾニサミドの血漿中トラフ濃度は直線性の正の相関が認められた(Fig.17)。

#### 第 4 節 考察

本章の目的は投与形態の違いがゾニサミドの薬物動態に影響を与えるか否かを明らかにすることであった。またイヌでのゾニサミドの薬物動態プロファイルが明らかにされていなかったため、適切な投与形態での反復経口投与時のゾニサミドの薬物動態を明らかにすることであった。投与形態はゾニサミドの薬物動態の代謝や排泄に影響を与えなかったが、吸収に影響を与えた。ペーストで包むことでゾニサミドの吸収が最も速く、カプセル、オブラートの順に吸収速度は遅くなっていった。またカプセルやオブラートをペーストで包むことは単独で投与するよりも吸収速度を遅らせることも明らかになった。ペーストでゾニサミドを反復経口投与した時、定常状態は 4 日以内に到達することが明らかになった。またゾニサミドの血漿中トラフ濃度と投与量の間には直線的な正の相関があることも明らかにした。

ペースト、カプセル、オブラートの順に吸収速度が異なった理由はゾニサミドが腸内に暴露される形態の違いが関与しているのかもしれない。ペーストは肉で、カプセルはゼラチンで、オブラートはでんぷんで主に構成されているため、ゾニサミドが暴露されるにはそれぞれ胃および腸内の蠕動運動による物理的破砕、水分による溶解およびアミラーゼによる溶解が関与している可能性がある[58]。つまり胃および腸内に到達したものには蠕動運動による物理的刺激の影響が一番大きく、ついで水分、アミラーゼの影響があることを示唆しているかもしれない。さらにカプセルやオブラートをペーストで包むことはゾニサミドが胃および腸内に暴露されるまでに 2 重の層構造から溶出してこななければならない。そのためカプセルや

オブラート単独で溶出してくる速度よりも遅くなるのかもしれない。本章ではペースト、カプセルやオブラート単独でゾニサミドを投与した時の  $t_{\max}$  はそれぞれ 3.0、4.8 および 5.5 時間であった。さらにペーストで包むことによってカプセルおよびオブラートは二重構造になるため  $t_{\max}$  もそれぞれ単純計算で  $4.8 + 3.0 = 7.8$  および  $5.5 + 3.0 = 8.5$  時間である。カプセルとオブラートをペーストで包んだ時の  $t_{\max}$  の実測値はそれぞれ 7.3 および 9.0 時間であったため、計算値とほぼ同等の値を示し、理論通りであった。

臨床現場において、てんかん発作の抑制は 1 日でも早く行うことが必要である。しかし、抗てんかん薬はその薬物の半減期が長いため、発作抑制効果のある血中濃度(=定常状態)に達するまで長い時間を要する[6]。そのため定常状態に達する日数が短いことが重要である。そこで本章では吸収速度が最も早いペーストを用いてゾニサミドの血漿中トラフ濃度が安定する定常状態までの日数を調査し、各投与量において 4 日以内に定常状態に達することを明らかにした。これは獣医療で用いられている他の抗てんかん薬フェノバルビタール(定常状態までの日数 7 日)や臭化カリウム(定常状態までの日数 28 日)に比べ格段に早かった[59, 60]。これは獣医療においてゾニサミドがある程度、緊急を要する発作を抑制する際の第一選択薬になるかもしれない。

以上のことから本章ではゾニサミドの薬物動態には投与形態が影響することを明らかにし、その反復投与時の定常状態にかかる日数が 4 日以内であるということを明らかにした。このように本章の結果はゾニサミドを臨床現場で使用する際、適正な薬物治療を施す重要な情報源となった。

## 第5節 小括

本章ではゾニサミドをペースト、カプセルおよびオブラートに包んだ時のそれぞれのイヌの薬物動態について追究した。カプセルやオブラートをペーストにさらに包んだ時のイヌのゾニサミドの薬物動態についても追究した。また、ペーストに包んだゾニサミド反復投与時の血漿中トラフ濃度が定常状態になるまでの日数と各用量における用量依存性についても追究した。

- 1) ペーストよりカプセルおよびオブラートにゾニサミドを包む方が順に吸収を遅延させることが明らかになった。
- 2) カプセルやオブラートにゾニサミドを包んだものをさらにペーストに包むことで、さらに吸収が遅延することが明らかになった。
- 3) ペーストに包んだゾニサミドを反復投与した時(5 mg/kg, PO, BID)または用量を増加した時(5→10 mg/kg, 10→15 mg/kg および 15→30 mg/kg)の血漿中トラフ濃度が定常状態になるまでの日数は多くとも4日以内であった。
- 4) 定常状態に達したゾニサミドの血漿中トラフ濃度と投与量の間には直線性の正の相関が認められた。

以上の結果からゾニサミドを投与する経口投与補助剤の違いはゾニサ

ミドの吸収に差を生じることを明らかにした。また、ゾニサミド反復投与時に必要な基礎的な情報を臨床へ提供した。

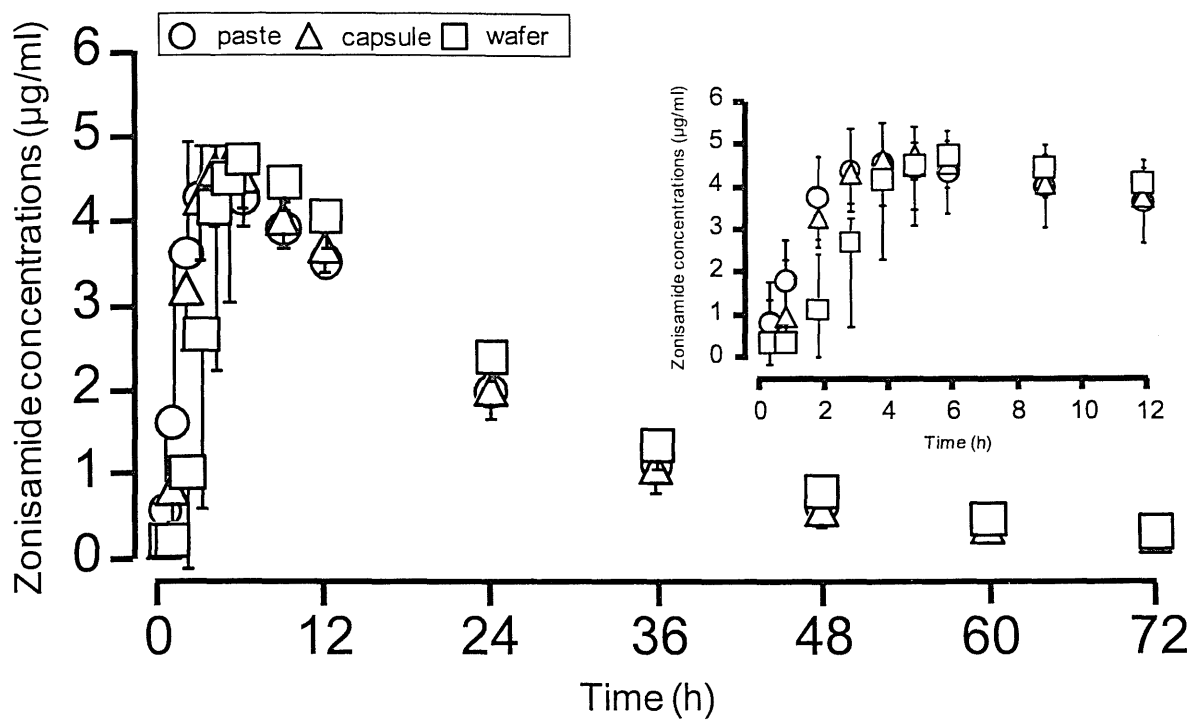


Fig.13. Plasma concentrations following a single oral dose of zonisamide (5 mg/kg) wrapped the paste and filled in the capsule or wafer in dogs. Values represent the mean + or - SD of 6 dogs.



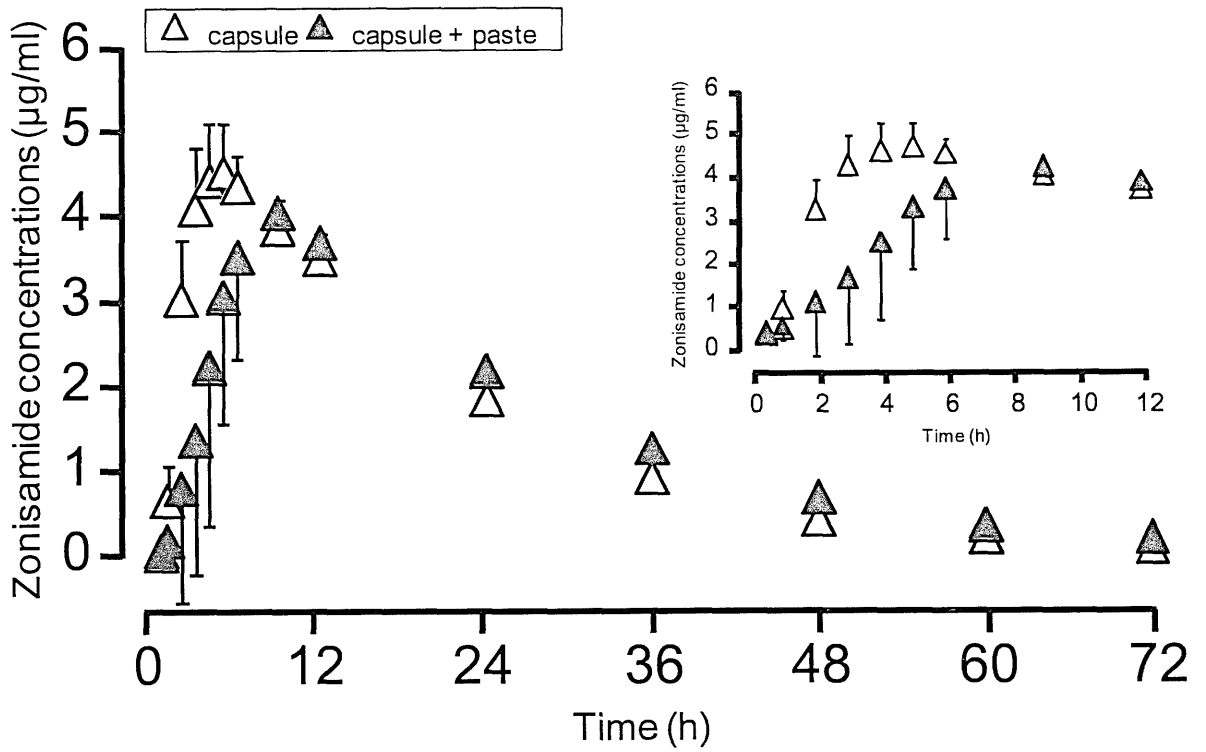


Fig.14. Plasma concentrations following a single oral dose of zonisamide (5 mg/kg) filled in the capsule or filled in the capsule plus wrapped the paste in dogs. Values represent the mean + or - SD of 6 dogs.

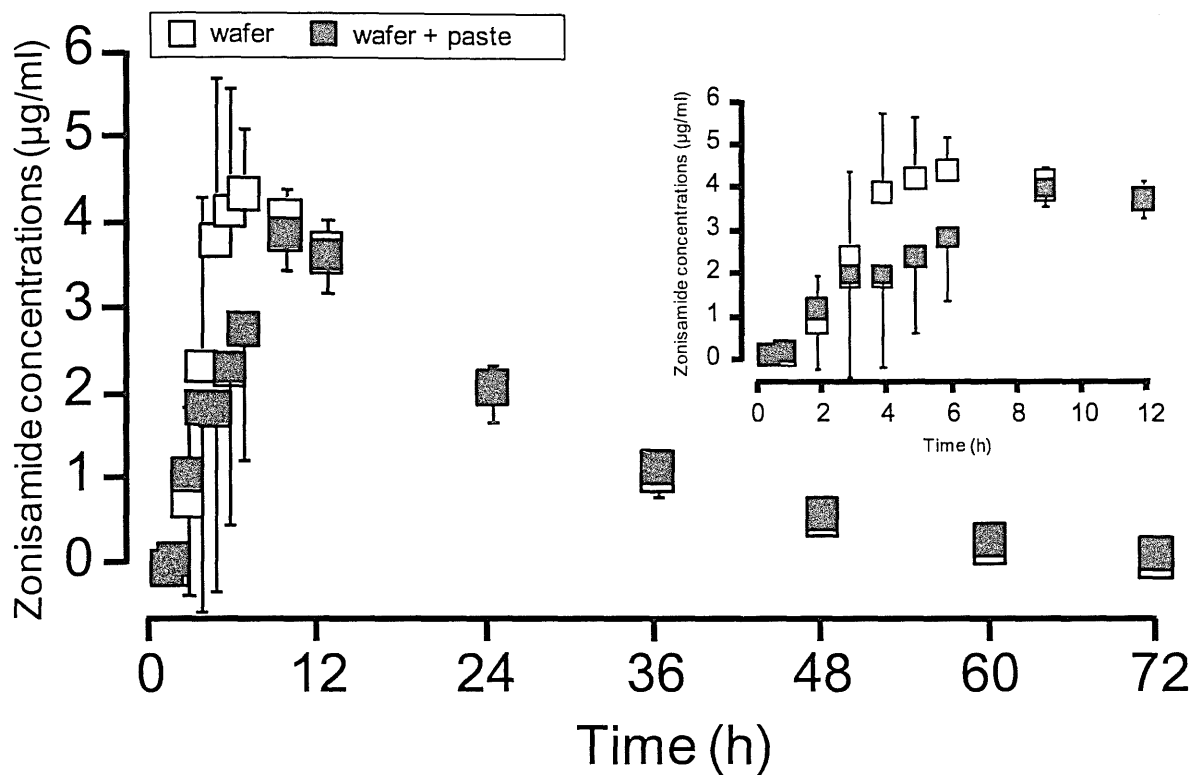


Fig.15. Plasma concentrations following a single oral dose of zonisamide (5 mg/kg) filled in the wafer or filled in the wafer plus wrapped the paste in dogs. Values represent the mean + or - SD of 6 dogs.

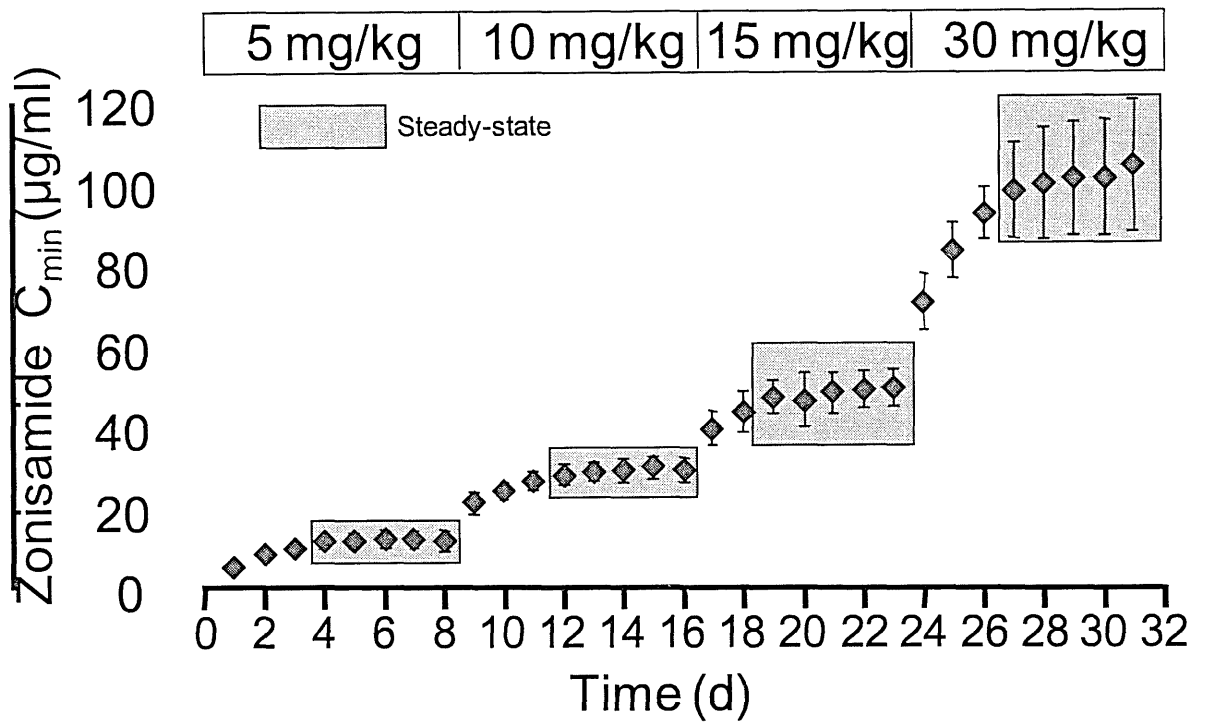


Fig.16. Trough plasma concentrations ( $C_{min}$ ) of zonisamide after multiple doses (5, 10, 15, and 30 mg/kg, PO, BID). Values represent the mean  $\pm$  SD of 8 dogs.

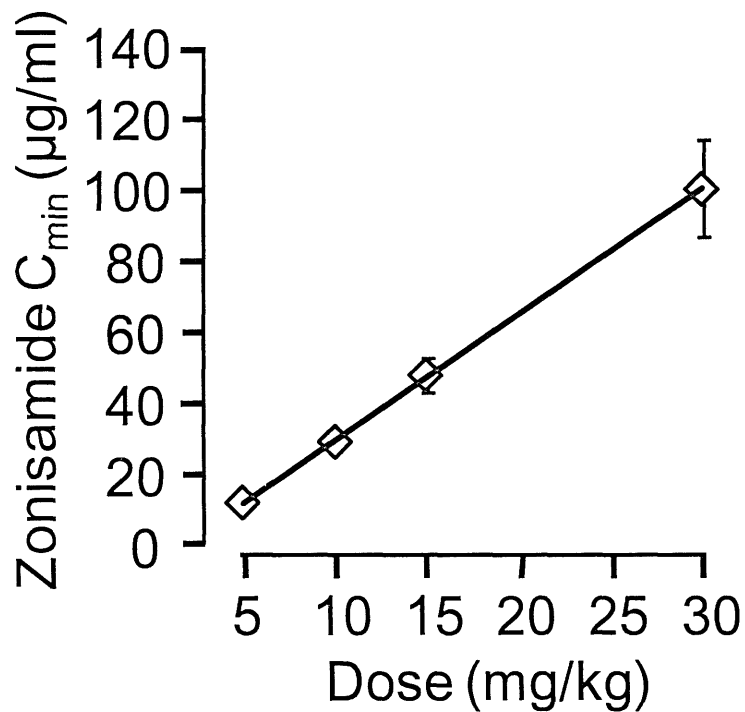


Fig.17. The association between the dose and  $C_{min}$  at a steady state in plasma (circle) after multiple doses (5, 10, 15, and 30 mg/kg, PO, BID) [plasma  $C_{min} = -6.31 + 3.57(\text{dose})$ ,  $R^2 = 1.00$ ,  $P < 0.01$ ]. Values represent the mean  $\pm$  SD of 8 dogs.

Table 5. Pharmacokinetic parameters of zonisamide in dogs after a single oral administration of zonisamide wrapped in the paste, filled in the capsule or wafer.

Parameters	paste	capsule	wafer
$t_{1/2a}$ (h)	0.87 ± 0.42	1.23 ± 0.22	1.75 ± 0.44*
$t_{1/2e}$ (h)	13.8 ± 2.3	12.1 ± 1.3	12.6 ± 1.5
$t_{max}$ (h)	3.00 ± 1.1	4.83 ± 0.98	5.50 ± 1.87*
$C_{max}$ (ng/ml)	4.59 ± 0.59	4.61 ± 0.58	4.81 ± 0.62
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	112 ± 15	105 ± 17	112 ± 19
$MRT_{0-\infty}$ (h)	21.5 ± 3.5	18.7 ± 2.1	22.1 ± 1.8
$CL_{tot}/F$ (ml/h/kg)	45.1 ± 6.8	48.4 ± 7.6	46.0 ± 9.0
$V_d/F$ (l/kg)	0.88 ± 0.09	0.84 ± 0.08	0.83 ± 0.10

Values represent the mean ± SD of 6 dogs. \* P < 0.05 vs. paste with one-way analysis of variance for repeated measures and a posteriori testing with Bonferroni's multiple comparison test.

Table 6. Pharmacokinetic parameters of zonisamide in dogs after a single oral administration of zonisamide (5 mg/kg) filled in the capsule or filled in the capsule plus wrapped the paste in dogs.

Parameters	capsule	capsule + paste
$t_{1/2a}$ (h)	1.23 ± 0.22	3.24 ± 1.84*
$t_{1/2e}$ (h)	12.1 ± 1.3	14.2 ± 1.5*
$t_{max}$ (h)	4.83 ± 0.98	7.33 ± 1.90*
$C_{max}$ (ng/ml)	4.61 ± 0.58	4.42 ± 0.24
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	105 ± 17	113 ± 15
$MRT_{0-\infty}$ (h)	18.7 ± 2.1	24.5 ± 2.2*
$CL_{tot}/F$ (ml/h/kg)	48.4 ± 7.6	45.0 ± 7.1
$V_d/F$ (l/kg)	0.84 ± 0.08	0.91 ± 0.06

Values represent the mean ± SD of 6 dogs. \*  $P < 0.05$  vs. capsule with paired  $t$ -test.

Table 7. Pharmacokinetic parameters of zonisamide in dogs after a single oral administration of zonisamide (5 mg/kg) filled in the wafer or filled in the wafer plus wrapped the paste in dogs.

Parameters	wafer	wafer + paste
$t_{1/2a}$ (h)	1.75 ± 0.44*	3.30 ± 1.19*
$t_{1/2e}$ (h)	12.6 ± 1.5	13.9 ± 2.1
$t_{max}$ (h)	5.50 ± 1.87	9.00 ± 1.90*
$C_{max}$ (ng/ml)	4.81 ± 0.62	4.45 ± 0.54
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	112 ± 19	112 ± 17
$MRT_{0-\infty}$ (h)	22.1 ± 1.8	24.9 ± 2.9
$CL_{tot}/F$ (ml/h/kg)	46.0 ± 9.0	45.5 ± 7.1
$V_d/F$ (ml/kg)	0.83 ± 0.10	0.90 ± 0.07

Values represent the mean ± SD of 6 dogs. \* P < 0.05 vs. wafer with paired *t*-test.

## 第 5 章 薬物－サプリメント相互作用：セントジョーンズワートが免疫抑制剤シクロスポリンの薬物動態におよぼす影響

### 第 1 節 はじめに

セントジョーンズワートは、ヒトの中度のうつ症状の治療に医師の処方なしに手に入れることのできるハーブの一種である。作用メカニズムは明らかにされていないが、セロトニンやノルエピネフリンの取り込みを阻害することがセントジョーンズワートの抗うつ作用のメカニズムだと報告されている [61]。獣医療においてもセロトニンやノルエピネフリン阻害薬であるクロミプラミンがイヌの問題行動を抑制するとの報告がある [62]。セントジョーンズワートとクロミプラミンは同じ作用機序であるため、セントジョーンズワートもイヌの問題行動の治療に効果があるかもしれない。また獣医療においてセントジョーンズワートは、無駄吠えを抑制するなどの目的で近年発売もされており今後、使用頻度が増加する可能性もある。

セントジョーンズワートは数多くの薬物と相互作用を引き起こすものとして医療分野では広く認識されている。その相互作用のメカニズムはセントジョーンズワートが CYP2C, CYP3A および CYP2E を誘導することによって、それら CYP で代謝される併用薬の血中濃度を減少させると報告されている [63, 64]。セントジョーンズワートが薬物相互作用を引き起こした最初の事例は免疫抑制剤であるシクロスポリンとの相互作用である [65, 66]。臓器移植の患者が移植終了後の精神不安を改善するために医



師に相談なく、セントジョーンズワートを使用していた。そのため、血中シクロスポリン濃度が減少し、拒絶反応が強く現れた。イヌにおいて臓器移植時にシクロスポリンを使用される事例は少ないかもしれない。しかし、シクロスポリンはアトピー性皮膚炎などで用いられ、服用中に飼主が獣医師に相談なく、セントジョーンズワートを服用させる可能性がある。しかし、イヌにおいてセントジョーンズワートがシクロスポリンやその他の併用薬に影響をあたえる可能性についての報告はない。そこで本章ではセントジョーンズワートの反復投与がシクロスポリンの薬物動態に与える影響を検討し、その他の併用薬の影響を予測するためにセントジョーンズワートが薬物相互作用を引き起こす主要因である小腸や肝臓の CYP の mRNA 量に与える影響もあわせて検討した。

## 第 2 節 材料と方法

### 1) 使用動物

健常雌ビーグル犬 8 頭を用い(1-2 歳、9-10 kg)、麻布大学獣医臨床センター6 階小動物飼育施設で飼育した。すべてのビーグルはそれぞれの実験の前に、一般身体検査、血液検査および血清生化学検査を行い、腎臓や肝臓に疾患が示唆される臨床徴候はみられなかった。食餌は 1 日 2 回 k/d を 8:00 AM と 6:00 PM に与え、水は自由給水とした。成犬の 1 日栄養要求量 63 kcal/kg/d を基準に食餌を与えた。

### 2) 使用薬物および化学物質

セントジョーンズワート(Kira<sup>®</sup>)は Lichtwer Healthcare GmbH 株式会社(ベルリン、ドイツ) およびシクロスポリンとしてネオーラル<sup>®</sup>内用液 10% (マイクロエマルジョン製剤) をノバルティスファーマ株式会社(東京) から購入した。内部標準物質のシクロスポリン D は LKT Laboratories (ミネソタ、米国) から購入した。酢酸エチル、 $\alpha$ -ナフトフラボン(NF)、クロラムフェニコール(CP)、スルファフェナゾール(SP)、キニジン(QD)、ケトコナゾール(KT)は和光純薬株式会社(大阪) から購入した。イヌ CYP 抗体は塩野義製薬株式会社(大阪) からそれら以外の薬物は前章と同様のものを用いた。

### 3) シクロスポリンの投与計画および採血

セントジョーンズワートを投与するビーグル犬 4 頭(SJW 群)、投与しないビーグル犬 4 頭(Cont 群)を準備した。セントジョーンズワート(300

mg/day, PO, SID)反復投与 0, 7(1), 14(2)および 28 日(4 週)後にシクロスポリン(5 mg/kg, PO)を 1 回投与し、その後、0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10 および 12 時間後に頸静脈を直接穿刺し、1 測定点あたり 2 ml 採血した (Fig.18)。それぞれの実験の間の休薬期間は以前に報告されたシクロスポリンの半減期から 7 日間以上とした[67]。得られた全血は測定まで-20℃で冷凍保存した。セントジョーンズワート投与 29 日目にペントバルビタール(100 mg/kg)で麻酔したのちに安楽死させ、その後、小腸と肝臓を採取し、分析するまで-80℃で保存した。

#### 4) 全血中シクロスポリン濃度の測定

全血中シクロスポリン濃度は HPLC (EPC-500 型、株式会社 エイコム 京都)にて測定した。サンプル分離は ODS C18 カラム(ODSpak F-411、4.6 mm i.d. × 150 mm, particle size, 5 μm、昭和電工株式会社、東京)で行った。カラムオーブンは 70℃、流速は 3.0 ml/min で行った。全血中のシクロスポリン測定の移動相はアセトニトリル：水を 7 : 3 (v/v) とし、波長は 210 nm で測定を行った。

マイクロテストチューブに採取した全血 500 μl に内部標準物質 (シクロスポリン D、10 ng/ml) を 15 μl とアセトニトリル 800 μl を加え、3 分間ミキサーで混和し、完全に溶血させた後、遠心(10800 g, 10 min)した。有機層のみを抽出し、真空遠心機によって乾燥固化した。残渣に 0.025 M の塩酸 500 μl、メタノール 1 ml、ヘキサン 2.8 ml を加え、3 分間ミキサーで混和した後、遠心(980 g, 5 min)した。その後、下層のみを抽出し、0.025 M の水酸化ナトリウム水溶液 1 ml と酢酸エチル 2.8ml 加え、3 分

間ミキサーで混和した後、遠心(980 g, 5 min)した。その後、有機層のみを抽出し、真空遠心機によって乾燥固化した。残渣を移動相 100  $\mu$ l に溶解し、65  $\mu$ l を HPLC に注入し、測定した。シクロスポリンの測定限界は 50 ng/ml で回収率は 90-99%であった。精度と正確度の算出には 0.1, 1 および 5  $\mu$ g/ml の既知のシクロスポリン全血を作成し行った。精度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 3.2-10.2%および 4.2-9.8%であった。正確度における日内変動(n=5)および日間変動(n=5)はそれぞれ 10.0-13.3%および 8.8-13.6%であった。

#### 5) イヌ肝ミクロソームにおけるシクロスポリンの代謝

小腸および肝臓のミクロソーム分画を Cont 群と SJW 群の犬から定法に従って、遠心(10500 g, 60 min)し、採取した。シクロスポリン(0.5, 1, 2.5, 5, 10 および 20  $\mu$ M)の反応溶液は 50 mM のリン酸緩衝液(pH 7.4)、肝臓および小腸のミクロソーム(250 mg)および NADPH の再構築系を含み、全量を 250  $\mu$ l とした。反応液はインキュベーション(37°C, 30 min)の後、500  $\mu$ l のアセトニトリルで反応を停止した。遠心(10000 g, 10 min)後、有機層のみ抽出し、真空遠心機によって乾燥固化した。残渣を移動相 100  $\mu$ l に溶解し、65  $\mu$ l を HPLC に注入し、測定した。

#### 6) シクロスポリンの代謝に関与する CYP 分子種の同定

シクロスポリンの代謝に関与する CYP 分子種を同定するために chemical inhibition および immuno inhibition を行った。分析方法は in vitro でのシクロスポリンの代謝と同様の方法を用い、シクロスポリンの

濃度は 10  $\mu$ M に設定した。chemical inhibition で用いた阻害剤は CYP1A 阻害剤として 10  $\mu$ M NF, CYP2B 阻害剤として 100  $\mu$ M CP, CYP2C 阻害剤として 10  $\mu$ M SP, CYP2D 阻害剤として 10  $\mu$ M QD および CYP3A 阻害剤として 5  $\mu$ M KT を用いた。immuno inhibition で用いた阻害剤はイヌのポリクローナル抗体として CYP1A1/2, CYP2B11, CYP2C21 および CYP3A12 を用いた。

#### 7) 定量リアルタイム RT-PCR

小腸および肝臓から定法にしたがい、RNA を抽出し(SV Total RNA isolation system, プロメガ株式会社、東京)、cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、東京)にした後、定量リアルタイム RT-PCR (SYBR<sup>®</sup> GREEN RT-PCR kit, アプライドバイオシステム、東京)をサーマルサイクラー (LightCycler<sup>®</sup> 1.5 (ST300)、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、東京)で行った。

#### 8) 薬物動態パラメーター解析

薬物動態解析はノンコンパートメント解析を用い、 $C_{max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $CL_{tot}/F$  および  $V_d/F$  は第 1 章と同様に算出した。

#### 9) 統計学的処理

データはすべて平均値  $\pm$  標準偏差(SD)で示した。Cont 群および SJW 群の間の薬物動態パラメーターおよび CYP mRNA 発現量の差は対応のない t-検定を用いた。すべての値は  $P < 0.05$  で有意差があると評価した。

### 第3節 結果

セントジョーンズワートの反復投与 1, 2 および 4 週間後の全血中シクロスポリン濃度一時間曲線は Cont 群に比べて下方に移動した(Fig. 19)。セントジョーンズワート反復投与中のシクロスポリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{0-\infty}$  は Cont 群に比べて有意に減少していた。セントジョーンズワート投与中のシクロスポリンの  $CL_{tot}/F$  および  $V_d/F$  は Cont 群に比べて有意に増加していた(Table 8)。

セントジョーンズワート投与中の小腸および肝臓のミクロソームにおけるシクロスポリンの代謝の  $V_{max}$  は Cont 群に比べ促進していた(Table 20)。

シクロスポリンのイヌの肝臓のミクロソームによる *in vitro* の代謝は NF, CP, SP, QD, CYP1A1/2, 2B11 および 2C21 抗体では阻害されなかったが、KT と CYP3A12 抗体では阻害された(Fig.21 A, B)。

セントジョーンズワート投与犬の小腸の CYP2B11 および 3A12 の mRNA 量は Cont 群に比べ有意に上昇した。セントジョーンズワート投与犬の肝臓の 2C21 および 3A12 の mRNA 量も Cont 群に比べ有意に上昇した。

#### 第 4 節 考察

本章ではセントジョーンズワートがイヌのシクロスポリンの薬物動態に与える影響について検討した。セントジョーンズワートの反復投与は少なくとも 1 週間でシクロスポリンの血中濃度を減少させ、その後血中濃度の減少は 4 週まで持続した。セントジョーンズワートがシクロスポリンの薬物動態に与えた影響には、少なくとも小腸と肝臓の CYP3A12 発現の上昇が関与していることを明らかにした。またセントジョーンズワートは CYP2B11 や CYP2C21 によって代謝される薬物の血中濃度に影響を与えることも示唆した。

セントジョーンズワートの反復投与によりシクロスポリンの  $C_{max}$  および  $AUC_{0-\infty}$  を約半分にまで減少した。シクロスポリンの免疫抑制効果は血中濃度に依存していると報告されているため、イヌのシクロスポリンの効果も半分に減少しているかもしれない[68]。

小腸と肝臓は CYP が多量に含まれる臓器である[69]。そのため今回のようにシクロスポリンの血中濃度に影響を与えた臓器として着目するのは一般的である。しかし、小腸や肝臓以外にも腎臓や心臓などの臓器にも CYP は含まれている。シクロスポリンは臓器移植で用いられる可能性のある薬物であるため、移植の可能性が多いその他の臓器に局限した薬物動態についても検討する必要がある。

同じ CYP 分子種であるにもかかわらず、イヌの CYP3A はヒトの CYP3A で代謝される薬物を代謝しないという報告がある[70]。例えばヒトではその薬物動態が CYP3A 活性を評価するために適切であるとされているミダゾラムはイヌにおいては CYP2B11 および CYP2C21 で代謝されることが報

告されている。そのため、ヒトで CYP3A4 および CYP3A5 で代謝されるシクロスポリンもイヌでは異なるサブファミリーの CYP で代謝される可能性があった[71]。しかし、本章ではヒトと同じ CYP サブファミリーであるイヌの CYP3A12 でシクロスポリンは代謝されることが明らかになった。今後、CYP が代謝する併用薬についてもイヌとヒトの違いを明らかにすることが、イヌの薬物治療の適正化のために必要である。

ヒトにおいてセントジョーンズワートは *in vivo* 試験で CYP2B、CYP2C および CYP3A を誘導することが報告されている[64]が、*in vitro* 試験では CYP2C、CYP2D および CYP3A を阻害するということが報告されている[72]。セントジョーンズワートは投与 1 日後に併用薬の血中濃度を増加することも報告されているため、CYP を阻害するという *in vitro* 試験は有用である[73]。しかし、*in vitro* 試験のみではセントジョーンズワートが様々な CYP 分子種を誘導し、その併用薬の血中濃度を減少させるということは明らかにできない。そのため本章で行ったように *in vivo* 試験においてシクロスポリンの血中濃度が減少することを明らかにするとともに、小腸と肝臓の CYP の mRNA 発現を明らかにすることは、セントジョーンズワートの今後の薬物治療の適正化を行う上での非常に重要な情報源となる。

本章ではセントジョーンズワート反復投与が CYP3A12 を誘導することによって、イヌのシクロスポリンの薬物動態に影響を与え、イヌの CYP2B および CYP2C で代謝される薬物と相互作用を引き起こす可能性も明らかにした。本章ではイヌのセントジョーンズワートの薬物治療時における留意すべき点を明らかにしたため、セントジョーンズワートによる薬物治療の適正化の一端を担った。



## 第 5 節 小活

本章ではセントジョーンズワート反復投与がシクロスポリンの薬物動態に与える影響を追究した。また、その相互作用のメカニズムを明らかにするためにイヌのシクロスポリンの代謝経路も追究した。さらにセントジョーンズワート反復投与した後の小腸や肝臓のシクロスポリン活性も追究し、それぞれの CYP 分子種の mRNA 量に与える影響も追究した。

1) セントジョーンズワート反復投与から少なくとも 1 週間後にはシクロスポリンの全血中濃度は減少し、4 週後も同等の全血中濃度の減少が続いていた。

2) シクロスポリンはイヌの CYP1A1/2, CYP2B11 および CYP2C21 では代謝されなかったが、CYP3A12 で代謝された。

3) セントジョーンズワート反復投与によって小腸と肝臓によるシクロスポリンの代謝活性が上昇した。

4) セントジョーンズワート反復投与によって小腸の CYP2B11 および CYP3A12 の mRNA 量と肝臓の CYP2C21 および CYP3A12 の mRNA 量が増加した。

以上の結果からシクロスポリンの薬物動態はセントジョーンズワートによって影響を受けることが明らかになった。また、小腸や肝臓において

もシクロスポリンの代謝はセントジョーンズワートによって亢進することが明らかになった。シクロスポリンはイヌの CYP3A12 で代謝され、セントジョーンズワートが小腸および肝臓による CYP3A12 の mRNA 量を増加させたことから、この薬物相互作用はセントジョーンズワートによる小腸および肝臓の CYP3A12 量の増加によるものであることが明らかになった。

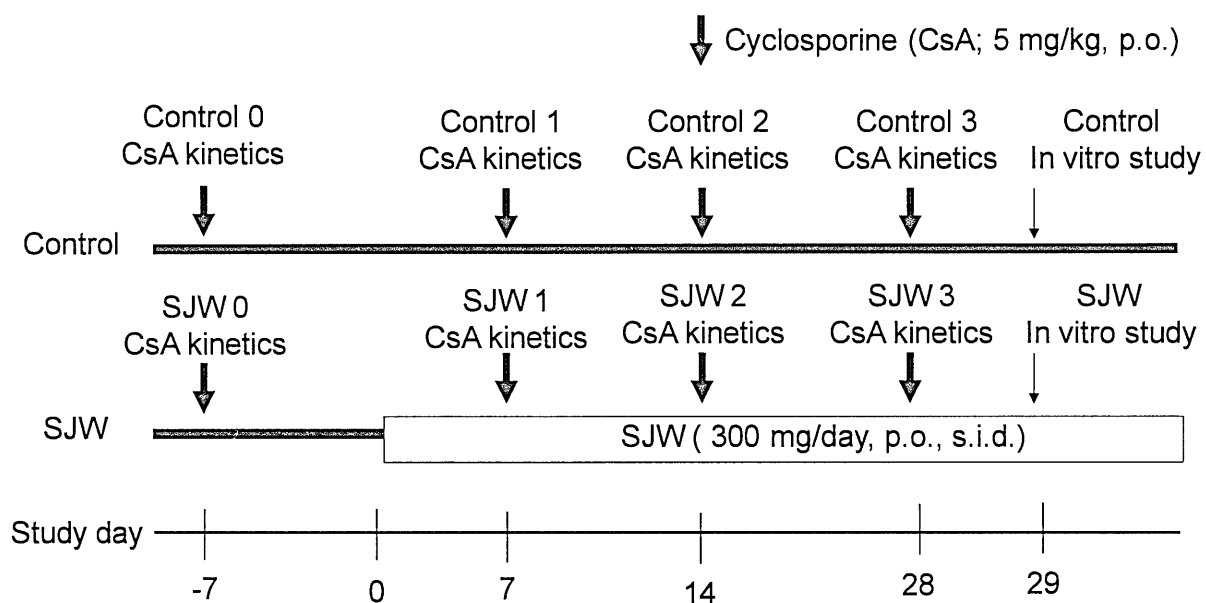


Fig.18. Time course of pharmacokinetic studies.

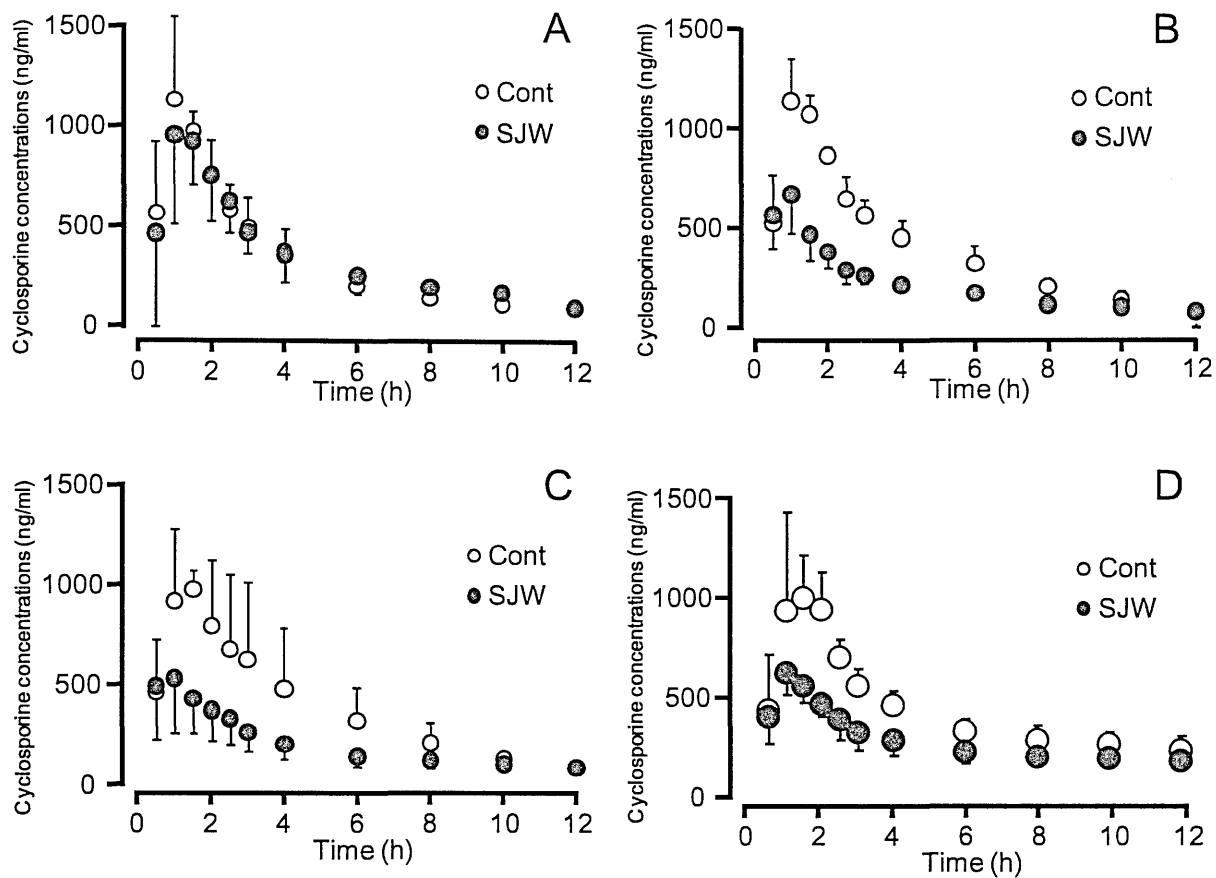


Fig.19. Blood concentrations following a single oral dose of cyclosporine at a dose of 5 mg/kg without St John's wort (open circles) and after 0, 1, 2 and 4 weeks of repeated administration of St John's wort (300 mg/day, po, sid) (closed circles). Values represent the mean  $\pm$  SD of 4 dogs.

Table 8. Pharmacokinetic parameters of cyclosporine without St John's wort (open circles) and after 0, 1, 2 and 4 weeks of repeated administration of St John's wort.

Parameters	0 week		1 week		2 weeks		4 weeks	
	Cont	SJW	Cont	SJW	Cont	SJW	Cont	SJW
$C_{\max}$ (ng/ml)	1188 ± 349	1044 ± 379	1184 ± 155	673 ± 194*	1137 ± 111	601 ± 137*	1253 ± 336	725 ± 129*
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	3829 ± 642	4108 ± 729	4370 ± 321	2764 ± 344*	4211 ± 861	2599 ± 532*	5566 ± 1379	2931 ± 1063*
$CL_{10t}/F$ (l/h/kg)	1.33 ± 0.23	1.25 ± 0.23	1.15 ± 0.08	1.83 ± 0.24*	1.22 ± 0.21	1.99 ± 0.45*	0.92 ± 0.16	1.59 ± 0.31*
$V_d/F$ (l/kg)	5.99 ± 0.96	6.26 ± 1.36	4.82 ± 0.65	11.49 ± 3.56*	5.48 ± 2.06	12.66 ± 3.88*	5.66 ± 1.90	11.09 ± 1.89*

Values represent the mean ± SD of 4 dogs. \*  $P < 0.05$  vs. Cont with unpaired t-test.

Table 9. In vitro kinetic parameters for cyclosporine metabolism in control and SJW dog intestine and liver microsomes

parameter	intestine		liver	
	Cont	SJW	Cont	SJW
$V_{\max}$ (nmol/min/mg protein)	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.04*	0.15 ± 0.05	0.43 ± 0.16*
$K_m$ (μM)	20.5 ± 8.6	19.5 ± 8.2	15.9 ± 5.6	19.4 ± 6.8
$CL_{\text{int}}$ (μl/min/mg protein)	7.6 ± 1.8	12.7 ± 3.6*	9.3 ± 10.0	23.2 ± 7.6*

Values represent the mean ± SD of 4 dog intestine and liver microsomes. \*  $P < 0.05$  vs. Cont with unpaired t-test

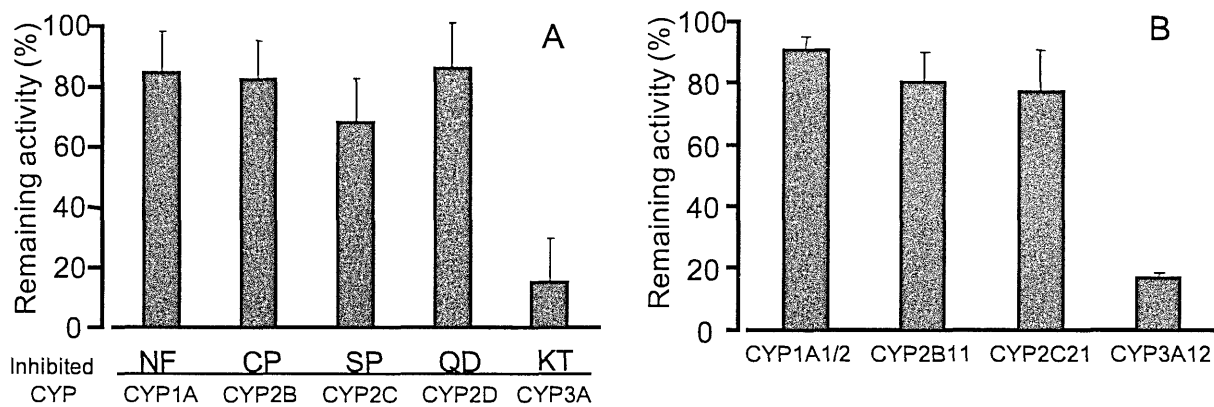


Fig.20. Effects of chemical inhibitors (A) and anti-P450 antibodies (B) on cyclosporine metabolism in dog liver microsomes. Values represent the mean  $\pm$  SD of 3 canine microsomes.

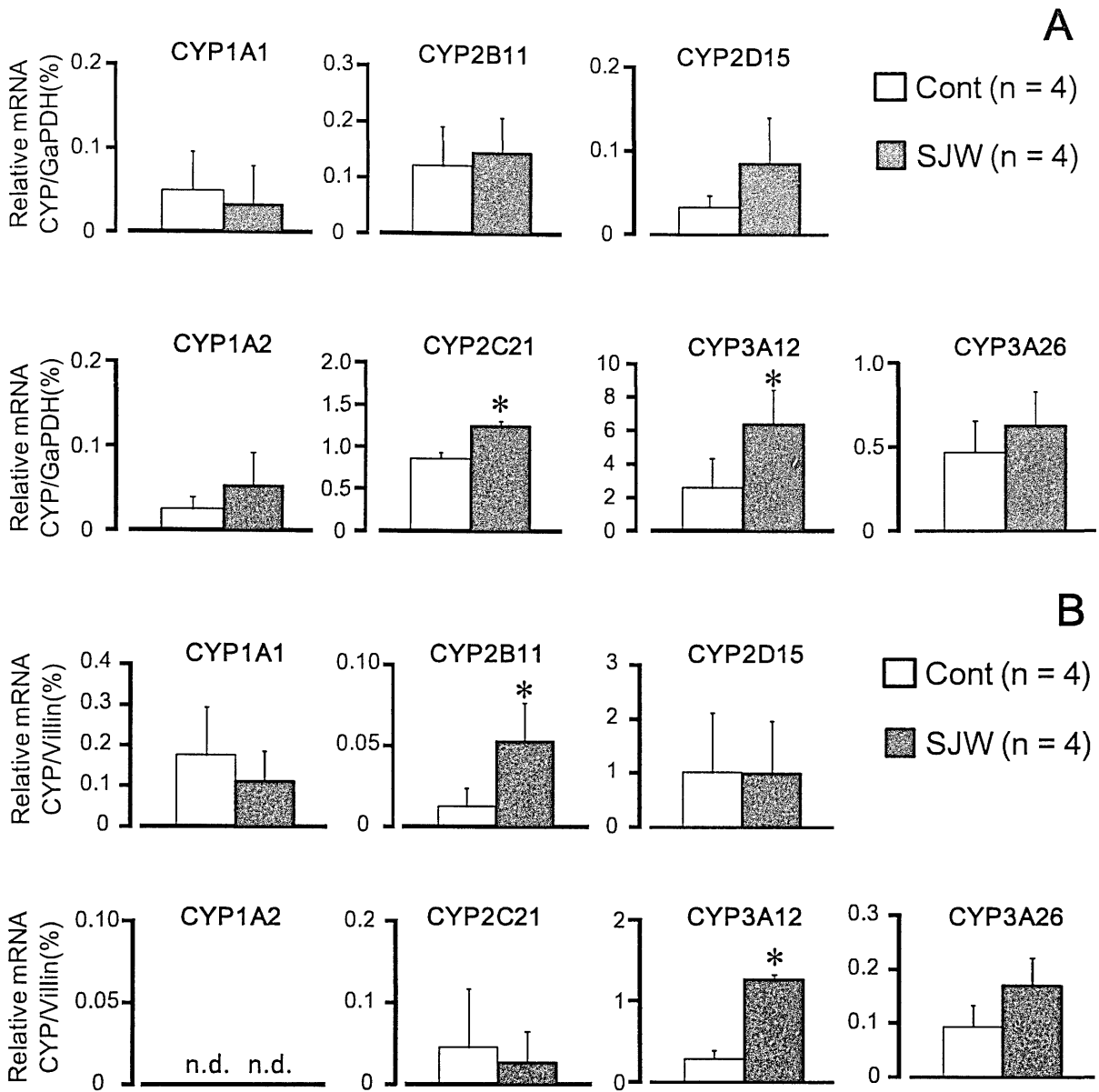


Fig.21. Effects of St John's Wort on CYP mRNA expression of intestine (A) and liver (B). Values represent the mean  $\pm$  SD of 4 canine intestine and liver. \*  $P < 0.05$  vs. Cont with unpaired t-test.



## 総合考察

イヌの薬物治療の適正化のために食餌、投与形態、併用薬、病態およびサプリメントがフェノバルビタール、ゾニサミド、ニコランジルおよびシクロスポリンという獣医療においても薬物動態が重要とされている薬物への影響を検討した。また、イヌは毎日同じドッグフードを摂取する食餌形態であり、ヒトとは異なるなどイヌの臨床現場で必要とされる項目を明らかにした。本論文において病態によってイヌの薬物動態は変化しなかったが食餌、投与形態、併用薬およびサプリメントはイヌの薬物動態に影響を与えることを明らかにした。本論文において病態は軽度の MR という最も一般的な慢性の病態を取り上げたが、軽度であったため、イヌの薬物動態に影響を与えなかったのかもしれない。今後、重度の MR など様々な病態に薬物動態に与える影響を検討しなければならないかもしれない。

食餌と投与形態はイヌにおいて非常に密接な関係にある。イヌが薬物を投与する場合、第 2 章で示したように、ペースト状の食餌で投与することがある。一方、第 1 章で示したように食餌はフェノバルビタールの薬物動態に影響を与える。つまりフェノバルビタールをペースト状の食餌に包んで、投薬した場合、吸収が変化するだけでなく、その包んだ食餌の種類によって吸収以外の代謝や排泄にも影響を与え、食餌—投与形態—薬物相互作用が起こる可能性がある。そのため、今後はこれら因子が同時に起こる場合についても考慮しなければならないかもしれない。

セントジョーンズワートはその効果にもかかわらず、一般的に薬物としての認識が低いものである。そのため、様々な薬物で治療されている時に同時に投与される可能性がある。本論文であげた食餌、投与形態および併

用薬と同時にセントジョーンズワートが投与された場合、どの因子がその薬物に影響を与えたかを見極めなければ誤った治療に繋がるかもしれない。今後はこれら因子を獣医師 1 人 1 人が理解し、総合的な薬物治療をしなければならない。

## 総括

以上、イヌを対象として行った薬物動態試験により、以下の結論を得た。

### 第 1 章 薬物－薬物相互作用：フェノバルビタールが抗てんかん薬ゾニサミドの薬物動態におよぼす影響とその持続期間

フェノバルビタールを反復投与することにより経口投与後のゾニサミド血中濃度は減少した。このゾニサミドの血中濃度の減少は、フェノバルビタール断薬後 10 週間持続した。この相互作用のメカニズムとしてチトクローム P450 (CYP) 活性の上昇が少なくとも断薬後 4 週までは関与していることを示唆した。本章より、フェノバルビタール反復投与時および断薬後 10 週間はゾニサミドの代謝が促進され、ゾニサミド単独投与時よりも血中濃度が減少することを明らかにした。

### 第 2 章 薬物－食餌相互作用：尿 pH コントロール食が抗てんかん薬フェノバルビタールの薬物動態におよぼす影響

尿をアルカリ化または酸性化する食餌を与え、フェノバルビタールを単回経口投与すると、フェノバルビタールの血中濃度は、尿をアルカリ化する食餌で低くなり、酸性化する食餌で高くなった。この相互作用はフェノバルビタールの尿中排泄率が尿のアルカリ化により上昇し、酸性化で低下することが原因であることを明らかにした。本章より、尿 pH コントロール食がフェノバルビタールの薬物動態に影響をおよぼすことを明らかにした。

### 第 3 章 薬物－病態相互作用：僧帽弁閉鎖不全（MR）が新規心不全薬ニコランジルの薬物動態におよぼす影響

MR 犬を作出し、偽手術をおこなった犬を対象としてニコランジルを投与した（0.1, 0.3 および 1.0 mg/kg）ところ、ニコランジルの血中濃度は投与量依存的に増加し、また MR はニコランジルの薬物動態に影響を与えないことを明らかにした。本章より、MR がニコランジルの薬物動態には影響を与えないことが示唆された。

### 第 4 章 薬物－経口投与補助剤相互作用：経口投与補助剤（ペースト、カプセルおよびオブラート）がゾニサミドの薬物動態におよぼす影響

ペースト、カプセルおよびオブラートで包んだゾニサミドを単回投与したところ、ペーストで包むともっとも速く吸収され、カプセル、オブラートの順に遅くなっていくことを明らかにした。また、カプセルやオブラートをさらにペーストで包むとさらに吸収が遅れることも明らかにした。ペーストで包んだ時のゾニサミドの血漿中トラフ濃度は定常状態になるまで少なくとも 4 日かかり、投与量依存的(5, 10, 15 および 30 mg/kg)に増加することも明らかにした。したがって、ゾニサミドをペースト、カプセルおよびオブラートで包むことは吸収を遅らせることを明らかにした。本章より、ペースト、カプセルおよびオブラートで包むことはゾニサミドの吸収を遅らせることを明らかにした。

### 第 5 章 薬物－サプリメント相互作用：セントジョーンズワートが免疫抑制剤シクロスポリンの薬物動態におよぼす影響

セントジョーンズワート反復投与から少なくとも1週後にはシクロスポリンの血中濃度は減少し、4週後も同等の血中濃度の減少が続くことを明らかにした。この相互作用のメカニズムとしてセントジョーンズワートによる小腸の CYP2B11/3A12、肝臓の CYP2C21/3A12 mRNA 量増加が関与していることを明らかにした。本章より、セントジョーンズワートが CYP3A12 量を増加することによってシクロスポリンの薬物動態に影響をおよぼすことを明らかにした。

以上のようにイヌの薬物治療において、薬物動態を変化させる様々な因子について追究した結果、フェノバルビタール反復投与がゾニサミドの血清中濃度を減少すること、尿 pH を変化させる1日2回の食餌がフェノバルビタールの薬物動態を変化すること、ゾニサミドをペースト、カプセルおよびオブラートで包むことは吸収を遅らせること、セントジョーンズワート反復投与がシクロスポリンの全血中濃度を減少することが明らかになった。本研究はイヌの薬物動態におよぼす影響要因を臨床で起こり得る事例を中心に、薬物動態学的に検討したものであり、今後の薬物動態研究の重要性を示唆するとともに、薬物治療の適正化・安全管理を提唱するうえで有用な基礎情報になるものと考えられる。

## 参考文献

1. Armstrong SC, Wynn GH, Sandson NB: Pharmacokinetic drug interactions of synthetic opiate analgesics. *Psychosomatics* 2009, 50(2):169-176.
2. Li Z, Vachharajani NN, Krishna R: On the assessment of effects of food on the pharmacokinetics of drugs in early development. *Biopharm Drug Dispos* 2002, 23(4):165-171.
3. Cacabelos R: Pharmacogenomics and therapeutic prospects in dementia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 2008, 258 Suppl 1:28-47.
4. Izquierdo I, Borja J, Rovira S, Pelagio P, Torres F, Cebrecos J, Garcia-Rafanell J: Comparative bioavailability study of triflusal oral solution vs. triflusal capsules in healthy subjects. A single, randomized, two-way cross-over, open-label phase I study. *Arzneimittel-Forschung*, 60(1):36-41.
5. Ulbricht C, Basch E, Weissner W, Hackman D: An evidence-based systematic review of herb and supplement interactions by the Natural Standard Research Collaboration. *Expert Opin Drug Saf* 2006, 5(5):719-728.
6. Frey HH, Loscher W: Pharmacokinetics of anti-epileptic drugs in the dog: a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 1985, 8(3):219-233.
7. Podell M: Antiepileptic drug therapy. *Clinical techniques in small animal practice* 1998, 13(3):185-192.
8. Booth DM, Perkins, J. & Dewey, C. : Clinical pharmacokinetics and safety of

- the anticonvulsant zonisamide in healthy dogs following single and multiple dosing. . In: *Proceedings of the 23rd ACVIM forum: June 1 to 4, 2005*; 2005.
9. Hojo T, Ohno R, Shimoda M, Kokue E: Enzyme and plasma protein induction by multiple oral administrations of phenobarbital at a therapeutic dosage regimen in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2002, 25(2):121-127.
  10. Bai SA, Abramson FP: Interactions of phenobarbital with propranolol in the dog. 1. Plasma protein binding. *J Pharmacol Exp Ther* 1982, 222(3):589-594.
  11. Matsumoto K, Miyazaki H, Fujii T, Kagemoto A, Maeda T, Hashimoto M: Absorption, distribution and excretion of 3-(sulfamoyl[14C]methyl)-1,2-benzisoxazole (AD-810) in Rats, Dogs and Monkeys and of AD-810 in Men. *Arzneimittel-Forschung* 1983, 33(7):961-968.
  12. Abramson FP, Lutz MP: The kinetics of induction by rifampin of alpha 1-acid glycoprotein and antipyrine clearance in the dog. *Drug Metab Dispos* 1986, 14(1):46-51.
  13. Engel G, Hofmann U, Heidemann H, Cosme J, Eichelbaum M: Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin Pharmacol Ther* 1996, 59(6):613-623.
  14. Orito K, Saito M, Fukunaga K, Matsuo E, Takikawa S, Muto M, Mishima K, Egashira N, Fujiwara M: Pharmacokinetics of zonisamide and drug interaction with phenobarbital in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2008, 31(3):259-264.

15. Boothe DM, Cullen JM, Calvin JA, Jenkins WL, Brown SA, Green RA, Corrier DE: Antipyrine and caffeine dispositions in clinically normal dogs and dogs with progressive liver disease. *American journal of veterinary research* 1994, 55(2):254-261.
16. Bhargava VO, Soine WH, Garrettson LK: High-performance liquid chromatographic analysis of 1-(beta-D-glucopyranosyl)phenobarbital in urine. *Journal of chromatography* 1985, 343(1):219-223.
17. Thacker DL, Abernethy DR, Raines A, Flockhart DA: Method for the determination of 5,5-diphenylbarbituric acid and its separation from 1,3-dimethoxymethyl-5,5-diphenylbarbituric acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 1998, 710(1-2):149-155.
18. Tanaka E, Nakamura T, Terada M, Shinozuka T, Hashimoto C, Kurihara K, Honda K: Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 854(1-2):116-120.
19. Besag FM, Berry D: Interactions between antiepileptic and antipsychotic drugs. *Drug Saf* 2006, 29(2):95-118.
20. Oguri K, Kurogi A, Yamabe K, Tanaka M, Yoshisue K, Ishii Y, Yoshimura H: Purification of a phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferase isoform from dog liver which catalyzes morphine and testosterone glucuronidation. *Arch Biochem Biophys* 1996, 325(2):159-166.
21. Sugiyama T, Kubota Y, Shinozuka K, Yamada S, Yamada K, Umegaki K:



- Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with Ginkgo biloba extract. *Food Chem Toxicol* 2004, 42(6):953-957.
22. Ushijima I, Kobayashi T, Suetsugi M, Watanabe K, Yamada M, Yamaguchi K: Cocaine: evidence for NMDA-, beta-carboline- and dopaminergic-mediated seizures in mice. *Brain Res* 1998, 797(2):347-350.
  23. Matar N, Jin W, Wrubel H, Hescheler J, Schneider T, Weiergraber M: Zonisamide block of cloned human T-type voltage-gated calcium channels. *Epilepsy Res* 2009, 83(2-3):224-234.
  24. Osborne CA, Lulich JP, Polzin DJ, Allen TA, Kruger JM, Bartges JW, Koehler LA, Ulrich LK, Bird KA, Swanson LL: Medical dissolution and prevention of canine struvite urolithiasis. Twenty years of experience. *The Veterinary clinics of North America* 1999, 29(1):73-111, xi.
  25. Osborne CA, Lulich JP, Forrester D, Albanan H: Paradigm changes in the role of nutrition for the management of canine and feline urolithiasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2009, 39(1):127-141.
  26. Frenia ML, Schauben JL, Wears RL, Karlix JL, Tucker CA, Kunisaki TA: Multiple-dose activated charcoal compared to urinary alkalization for the enhancement of phenobarbital elimination. *Journal of toxicology* 1996, 34(2):169-175.
  27. Ravis WR, Pedersoli WM, Wike JS: Pharmacokinetics of phenobarbital in dogs given multiple doses. *American journal of veterinary research* 1989, 50(8):1343-1347.
  28. Nicholson JD: The urinary excretion of phenobarbitone and pentobarbitone

in the horse. *Biochemical pharmacology* 1968, 17(1):1-8.

29. Alvin J, McHorse T, Hoyumpa A, Bush MT, Schenker S: The effect of liver disease in man on the disposition of phenobarbital. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1975, 192(1):224-235.
30. Proudfoot AT, Krenzelok EP, Brent J, Vale JA: Does urine alkalinization increase salicylate elimination? If so, why? *Toxicological reviews* 2003, 22(3):129-136.
31. Vree TB, Hekster YA, Baars AM, Damsma JE, van der Kleijn E: Pharmacokinetics of sulphamethoxazole in man: effects of urinary pH and urine flow on metabolism and renal excretion of sulphamethoxazole and its metabolite N4-acetylsulphamethoxazole. *Clin Pharmacokinetics* 1978, 3(4):319-329.
32. Lulich JP, Osborne CA, Unger LK, Sanna J, Clinton CW, Davenport MP: Prevalence of calcium oxalate uroliths in miniature schnauzers. *American journal of veterinary research* 1991, 52(10):1579-1582.
33. Stevenson AE, Hynds WK, Markwell PJ: Effect of dietary moisture and sodium content on urine composition and calcium oxalate relative supersaturation in healthy miniature schnauzers and labrador retrievers. *Research in veterinary science* 2003, 74(2):145-151.
34. Stevenson AE, Markwell PJ: Comparison of urine composition of healthy Labrador retrievers and miniature schnauzers. *American journal of veterinary research* 2001, 62(11):1782-1786.
35. Stevenson AE, Smith BH, Markwell PJ: A system to monitor urinary tract

- health in dogs. *J Nutr* 1998, 128(12 Suppl):2761S-2762S.
36. Uehara Y, Takahashi M: Hemodynamic changes during administration of drugs for mitral regurgitation in dogs. *J Vet Med Sci* 1998, 60(2):213-218.
37. Taira N: Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *Am J Cardiol* 1989, 63(21):18J-24J.
38. Tice FD, Binkley PF, Cody RJ, Moeschberger ML, Mohrland JS, Wolf DL, Leier CV: Hemodynamic effects of oral nicorandil in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1990, 65(20):1361-1367.
39. Galié N, Varani E, Maiello L, Boriani G, Boschi S, Binetti G, Magnani B: Usefulness of nicorandil in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1990, 65(5):343-348.
40. Izawa H, Iwase M, Takeichi Y, Somura F, Nagata K, Nishizawa T, Noda A, Murohara T, Yokota M: Effect of nicorandil on left ventricular end-diastolic pressure during exercise in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European heart journal* 2003, 24(14):1340-1348.
41. Suwa M, Kusukawa J, Hirota Y, Otake Y, Ito T, Kawamura K: Effects of nicorandil on left ventricular systolic and diastolic function in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Japanese circulation journal* 1995, 59(3):146-153.
42. Gupta DK, Kapoor A, Garg N, Tewari S, Sinha N: Beneficial effects of nicorandil versus enalapril in chronic rheumatic severe mitral regurgitation: six months follow up echocardiographic study. *J Heart Valve Dis* 2001, 10(2):158-165.

43. Huang A, Kaley G: Gender-specific regulation of cardiovascular function: estrogen as key player. *Microcirculation* 2004, 11(1):9-38.
44. Ng CY, Ghabrial H, Morgan DJ, Ching MS, Smallwood RA, Angus PW: Impaired elimination of propranolol due to right heart failure: drug clearance in the isolated liver and its relationship to intrinsic metabolic capacity. *Drug Metab Dispos* 2000, 28(10):1217-1221.
45. Schwende FJ, Lewis RC: Determination of nicorandil in plasma using high-performance liquid chromatography with photoconductivity and ultraviolet detection. Application to pre-clinical pharmacokinetics in beagle dogs. *Journal of chromatography* 1990, 525(1):151-160.
46. Ishizaki T, Chiba K, Suganuma T, Sasaki T, Kamiyama H, Nakano H: Pharmacokinetics of nicorandil, a new coronary vasodilator, in dogs. *Journal of pharmaceutical sciences* 1984, 73(4):494-498.
47. Humphrey SJ: Cardiovascular and pharmacokinetic interactions between nicorandil and adjunctive propranolol, atenolol or diltiazem in conscious dogs. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 1998, 20(9):779-791.
48. Frydman A: Pharmacokinetic profile of nicorandil in humans: an overview. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1992, 20 Suppl 3:S34-44.
49. Ojha A, Pargal A: Determination of nicorandil concentrations in human plasma using liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 1999, 21(1):175-178.
50. Frydman AM, Chapelle P, Diekmann H, Bruno R, Thebault JJ, Bouthier J,

- Caplain H, Ungethuem W, Gaillard C, Le Liboux A *et al*: Pharmacokinetics of nicorandil. *Am J Cardiol* 1989, 63(21):25J-33J.
51. Haggstrom J, Duelund Pedersen H, Kwart C: New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *The Veterinary clinics of North America* 2004, 34(5):1209-1226, vii-viii.
52. Lefebvre HP, Brown SA, Chetboul V, King JN, Pouchelon JL, Toutain PL: Angiotensin-converting enzyme inhibitors in veterinary medicine. *Current pharmaceutical design* 2007, 13(13):1347-1361.
53. Ohte N, Cheng CP, Suzuki M, Little WC: The cardiac effects of pimobendan (but not amrinone) are preserved at rest and during exercise in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 282(1):23-31.
54. Opie SR, Dib N: Local endovascular delivery, gene therapy, and cell transplantation for peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther* 2004, 11 Suppl 2:II151-162.
55. Satoh K, Orito K, Yoneyama F, Taira N: A further study of the vasodilator and negative inotropic mechanisms of action of nicorandil and its congeners in the canine heart. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 1994, 8(2):227-234.
56. Robson D: Review of the pharmacokinetics, interactions and adverse reactions of cyclosporine in people, dogs and cats. *Vet Rec* 2003, 152(24):739-748.

57. Dewey CW, Guiliano R, Boothe DM, Berg JM, Kortz GD, Joseph RJ, Budsberg SC: Zonisamide therapy for refractory idiopathic epilepsy in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004, 40(4):285-291.
58. Harmoinen J, Saari S, Rininen M, Westermarck E: Evaluation of pancreatic forceps biopsy by laparoscopy in healthy beagles. *Vet Ther* 2002, 3(1):31-36.
59. Dowling PM: Update on therapy of canine epilepsy. *Can Vet J* 1999, 40(8):595-598.
60. Abramson FP: Dose-response behavior of the induction of alpha 1-acid glycoprotein by phenobarbital in the dog. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 1988, 16(4):546-550.
61. Neary JT, Bu Y: Hypericum LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res* 1999, 816(2):358-363.
62. Subhan F, Deslandes PN, Pache DM, Sewell RD: Do antidepressants affect motivation in conditioned place preference? *Eur J Pharmacol* 2000, 408(3):257-263.
63. Komoroski BJ, Zhang S, Cai H, Hutzler JM, Frye R, Tracy TS, Strom SC, Lehmann T, Ang CY, Cui YY *et al*: Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2004, 32(5):512-518.
64. Bray BJ, Perry NB, Menkes DB, Rosengren RJ: St. John's wort extract induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster mouse. *Toxicol Sci* 2002, 66(1):27-33.

65. Mai I, Bauer S, Perloff ES, Johne A, Uehleke B, Frank B, Budde K, Roots I: Hyperforin content determines the magnitude of the St John's wort-cyclosporine drug interaction. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2004, 76(4):330-340.
66. Bauer S, Stormer E, Johne A, Kruger H, Budde K, Neumayer HH, Roots I, Mai I: Alterations in cyclosporin A pharmacokinetics and metabolism during treatment with St John's wort in renal transplant patients. *British journal of clinical pharmacology* 2003, 55(2):203-211.
67. Katayama M, Igarashi H, Tani K, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Hara Y, Aoki S, Tagawa M: Effect of multiple oral dosing of fluconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy beagles. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2008, 70(1):85-88.
68. Steffan J, Strehlau G, Maurer M, Rohlf A: Cyclosporin A pharmacokinetics and efficacy in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2004, 27(4):231-238.
69. Marks WH, Harding MW, Handschumacher R, Marks C, Lorber MI: The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues. *Transplantation* 1991, 52(2):340-345.
70. Locuson CW, Ethell BT, Voice M, Lee D, Feenstra KL: Evaluation of Escherichia coli membrane preparations of canine CYP1A1, 2B11, 2C21, 2C41, 2D15, 3A12, and 3A26 with coexpressed canine cytochrome P450 reductase. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*

71. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Pascual M, Eap CB: CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008, 30(6):689-699.
72. Hellum BH, Nilsen OG: In vitro inhibition of CYP3A4 metabolism and P-glycoprotein-mediated transport by trade herbal products. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008, 102(5):466-475.
73. Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD: The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2001, 70(4):317-326



## 謝辞

本論文を終えるにあたり、本研究を行うに際し、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました麻布大学獣医学部薬理学研究室 浅井史敏教授、同学部生理学第二研究室 折戸謙介准教授ならびに同学部内化学第二研究室 土屋亮教授に深甚なる謝意を表します。また有益な御助言と御指導を賜りました同学部外科学第二研究室 齋藤弥代子講師ならび同学部基礎教育研究室・生物学 佐原弘益教授に深謝致します。最後に、ご協力いただいた同学部生理学第二研究室の皆様方にも心よりお礼を申し上げます。