

## 第四章 Y, Z-蛋白の機能

### 1. 有機アニオンの胆汁排泄とX, Y, Z-成分への結合

既に第一章で述べた様にY, Z-蛋白がBSP等の有機アニオンの肝へのNet uptakeに重要な役割を果たす事が推論されている。又、一方では、肝内移行、及び胆汁排泄にも影響があるという推論もみられる(64, 96)。しかし、Net uptakeとY, Z-蛋白の関係については、種々の根拠があるのに反して、肝内移行、胆汁排泄との関連についてはあまり確かな根拠がない。そこで当教室伊賀ら(8)により、シグママイスタアロトす導で区別された胆汁排泄における二つのtype\* (High dose type と, Low dose type)の違いを決める要因に、X, Y, Z-成分が成り得るかどうかについて考察する。Fig. 44の上図は、非

\* P. 25 参照

代謝性 Xanthene 系色素で、かつ、典型的な High dose type 及び Low dose type の排泄を示す代表として、Phloxine B (PB),

Rose bengal (RB) を選んで、その血中消失、及び、胆汁排泄を示したものである(8)。両色素ともに、dose の 80% 以上が bile 中に、回収される事、及び投与後、20 min では、dose の 90% 以上が血中から消失しているのに、胆汁中にはほとんどあらわれていない事より、Fig. 44 中のシグママイナスプロットは、色素が血中から肝にとり込まれた以後、即ち、胆内移行、胆汁排泄の速度過程を示す plot と考えよう。従って、横軸に肝中の色素量、縦軸に胆汁排泄速度をとってプロットしなおすと、それぞれ、Fig. 44 の下図に示すようなプロットになるはずである。さて、胆汁排泄速度  $v$  は、次の式で表わされるであろう。

$$v = k \cdot A_{\text{effective}} = k \cdot F \cdot A_{\text{liver}} \quad \text{Eq. 1}$$

ここで、 $k$  は、色素が bile canaliculi 膜を通過する時の intrinsic permeability constant

である。この透過の過程は、既に一章で述べたように、carrier の関与する系であるので、 $\bar{c}$  の大きさは、色素と膜 carrier の affinity 及び carrier の膜中移動速度に depend する。又、 $F = A_{\text{effective}} / A_{\text{liver}}$  と定義する。

$A_{\text{liver}}$  は、肝中の薬物濃度である。

$A_{\text{effective}}$  は、肝中有効薬物濃度、即ち、bile canaliculi 膜の通過に、有効な型で存在する肝中薬物濃度であるが、これが具体的に何を示すかは、わからない。

RB のように、Low dose type を示すものは、ひと、 $A_{\text{liver}}$  の plot が原点を通る直線になるはずなので、 $\bar{c} \cdot F$  が  $A_{\text{liver}}$  によらないで一定値を示すという事である。一方、PB のように、High dose type を示すものは、ひと  $A_{\text{liver}}$  が比例せず、 $A_{\text{liver}}$  が大きくなると、 $\bar{c} \cdot F$  も大きくなると考えられる。そこで、この High dose type における  $\bar{c} \cdot F$  の  $A_{\text{liver}}$  による変化が、 $\bar{c}$  の変化によるものか、 $F$  の変化によるものかを検討してみる。まず、 $F$  の方を定める要因を

考える意には、Aeffective の内容を知る必要があるが、これを、肝中遊離型薬物、X-蛋白と結合した薬物、Y-蛋白と結合した薬物、Z-蛋白と結合した薬物と考えてみる。RB、PBの違いを説明できるかどうかを調べてみる。又、右の方の内容については、現在の所考えられる手段として、肝細胞形質膜のうちbile canaliculi 側のrickenな膜を分離し、PB、RBとの結合をみとめる事にした。

### (1). 方法-----上清中への色素の分配

25%の肝homogenate 15mlに、PB、RBを0.25〜4.0  $\mu$ mole 加え、4°Cで2hr incubateする。

100,000gで2.5hr 遠心後、上清中の色素の濃度を日立356型分光光度計で定量した。PBの場合  $\lambda_1=650\text{nm}$ ,  $\lambda_2=550\text{nm}$ ; RBの場合は、

$\lambda_1=650\text{nm}$ ,  $\lambda_2=560\text{nm}$  を使用した。

X, Y, Z-分画への色素の結合。X, Y, Z-分画の調整、平衡透折法による色素との結合は、既にP30〜P34に述べた方法による。

RBの場合は、Disking膜との結合は無視で

きなかつたので、膜の両側を定量して計算した。蛋白側のRBの定量は、各蛋白と結合したRBと、フリーのRBの吸収スペクトルの等吸収点をを用いて定量した。即ち、X-分画存在下では、 $\lambda_1 = 650 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 554 \text{ nm}$ , Y-分画存在下では、 $\lambda_1 = 650 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 555 \text{ nm}$ , Z-分画存在下では、 $\lambda_1 = 650 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 556 \text{ nm}$ を用いた。又、平衡透析の条件は、蛋白濃度、(X) =  $810 \mu\text{g/ml}$ , (Y) =  $458 \mu\text{g/ml}$ , (Z) =  $135 \mu\text{g/ml}$ を用い、色素濃度は、 $1 \sim 30 \mu\text{M}$ まで13点変化させた。

Bile canaliculi側 rich な膜の調整, 基本的には Song らの方法に従った(97)。即ち、

- ① 肝をはさみで small pieces に切った後、肝湿重量の2倍量の  $1 \text{ mM NaHCO}_3$  (pH 7.5) を加え、Dounce homogenizer (Diameter clearance  $0.35 \text{ mm}$ ) で20 stroke、ホモジナイズする。
- ② homogenate を8倍量の  $\text{NaHCO}_3$  buffer で希釈した後、4枚重ぬのがーゼで2度通過する。
- ③ 口液を、 $1500 \text{ g}$  で10min 間遠心分離する。得られたペレットを、最初の肝湿重量に相当する

$\text{NaHCO}_3$  buffer に suspend する。

- ④. この suspension に 5.5 倍量の密度  $d=1.26$  の sucrose 水溶液を加え、静かに混ぜ合わせる。  $d=1.22$  に合わせる。
- ⑤. この suspension 16ml の上に,  $d=1.18$  の sucrose 液を 8ml,  $d=1.16$  の sucrose 液を 6ml 積層する。アングロターで 66000g, 1hr 超遠心する。  $d=1.18$  と  $1.16$  との間に集まった白色の膜をパスツールピペットで集める。
- ⑥. 得られた膜 suspension を,  $\text{pH} 7.4$  50mM の Tris-HCl buffer で約 5 倍に希釈して, 1500g で 10min 遠心する。これを 10min の buffer に再 suspension して最終標品とする。この膜のメルクマールとして, 5'-nucleotidase 活動を調べた。10mM AMP, 10mM  $\text{MgCl}_2$  in  $\text{pH} 7.4$ , 50mM Tris-HCl buffer 2ml に, 膜の suspension を 1ml 加える。この時, 最終の膜蛋白濃度として約  $20\mu\text{g/ml}$  にする。15min,  $37^\circ\text{C}$  で incubate しに後。35% TCA を 0.5ml 加えて反応をとめる。

生じた無機リン酸を, Fiske - Subbarrow 法で定量する(98)。

(2) 結果-----上清への分布の比較, Fig. 45 は, 実際の肝中 level に相当する量の色素が homogenate に存在する時に, どの程度, 上清分画(cytosol)に分布しているかを, RB, PB について調べたものである。両色素ともに, 16倍の濃度の範囲において, 上清への分配率が一定である事がわかる。即ち, High dose type を示す PB の原因として, Eq. (1) における  $F$  の非線型性に, 上清分画への分配率の非線型性を挙げる事は出来ない。

#### X, Y, Z - 分画への結合の比較

そこで, 今度は, X, Y, Z - 分画への結合した型のもの, 或いは, 非結合型のものが, Eq. (1) における  $F$  の非線型性を生じる原因になるかどうかを検討する為に, X, Y, Z - 分画への結合を調べた。Table VII には, 平衡透析法のデータを, 電子計算機を用いる最小二乗法で解析して得た Binding parameter ( $n, K$ )

を示してある。いずれも相関係数 0.985 以上で  
 示した。<sup>\*</sup> 更に、table VII の右表に示す様  
 な値を用い、<sup>\*\*</sup> Eq. (2) を使って、肝中の色素の  
 量の関数として、各-蛋白分画への結合量及  
 び非結合型薬物の量を、simulation して  
 みた。その結果を、Fig. 46 に示す。PB, RB  
 各蛋白への結合の pattern 及び、free の色素  
 の pattern で比較してみても、Fig. 44 の下図で  
 考察した様な pattern の違いを示すもの  
 はない。これは、Eq. (1) における A effectine の  
 内容として、X-分画への結合体、Y-分画への  
 結合体、Z-分画への結合体、或いは、未結  
 合型のもの、いずれを採択してみても、High  
 dose, Low dose type を説明できるものが  
 ない事を示す。従って、High dose type の生

<sup>\*</sup> Y-分画への PB の結合 data のみ、収束値が得られ  
 ず、 $n_1, n_2$  の値を、RB の場合と同じ値に固定をし、最小  
 二乗解を求めた。この場合相関係数は 0.952 であった。

<sup>\*\*</sup> X, Y, Z-分画の蛋白濃度については、P. 36 の脚  
 注の方法により求めた。



じる原因として、Eq. (1)におけるFの値の肝中の色素量の変化に対する非線型性は、考えにくいという事である。

Bile canaliculi 側の rich な細胞膜への結合, Fig. 47には、得られた細胞膜の、5'-nucleotidase 活性を homogenate のそれと比較したものを示す。約16倍に比活性が上昇している。又、右には、電顕写真を示してあり、確かに bile canaliculi 側の膜の存在する事がわかる。そこで、各有機アニオンの膜への結合を間接的に調べる為に、まず、ANSと膜の結合をみた。一定濃度のANS (3.3  $\mu\text{M}$ ) を膜で titration し、補外により得られたりの量子収率を用いて、逆に、膜を、ANSで titrate した data より、既にP. 41で述べた方法により、計算し、Scatchard plot したものが、Fig. 48に示してある。free のANS 濃度範囲が0.75  $\mu\text{M}$  ~ 15  $\mu\text{M}$  と、約20倍変化しても、Scatchard plot がほぼ直線を示す事より、一種類の結合部位を持つ事がわかり、結合定数として、

$1 \times 10^5 M^{-1}$ , 結合部位の数として  $n = 290 \mu\text{mole/g}$ .  
Protein が得られた。

次に、ANS と膜の結合が、H 及び L-type の有機アニオンが存在すると、どの様に変化するかを調べてみた。H-type を示すものとして、PB の他に、やはり非代謝性の色素 BPB (96) を選び、L-type を示すものとして、RB の他に、非代謝性の色素 ICG (99) を選んだ。これら色素の存在下での ANS と膜の Binding を、逆数 plot (P. 43 参照) で示した。

Fig. 49 の左図に示す様に、H-type を示す PB, BPB の様な有機アニオンが存在すると、逆数 plot の Y-切片が一致し、いわゆる、

Competitive Inhibition が、かかる事、又、それに反し、L-type を示す RB, ICG が存在する場合は、切片が一致しない事がわかった。L-type の RB の場合、更に、RB の濃度を变化させて、inhibition をみた所、右図の如く、各逆数 plot は、第一象限で交わった。これは、酵素反応速度論の理論 (100) に従って解釈

すると、“RBとANSは膜上の結合部位を共有しないが、RBが膜に結合すると、ANSの膜への結合定数は小さくなり、かつ、膜-ANS Complexの出すけい光強度より、RB-膜-ANSの ternary Complexの出すけい光強度の方が小さい”という事を示すものである。この実験により得られた事は、ANSは、膜上の結合部位を、H-typeの、PB、BPBとは共有するが、L-typeのRB、ICGとは共有しないという事を示している。この結合部位の違いが、Eq. (1)における  $\phi$  の非線型性を支配する要因になるのかもしれない。

しかし、この事を更に明確に証明する為には、① ANSと膜との結合を調べたが、この結合は、本当に、transport に関する特異的な結合をみているのか？

② もし、そうだとすると、結合部位の違いが、H-type における  $\phi$  の非線型性を生じる mechanism は何であるのか？等の事を明らかにする必要がある。②については、carrier

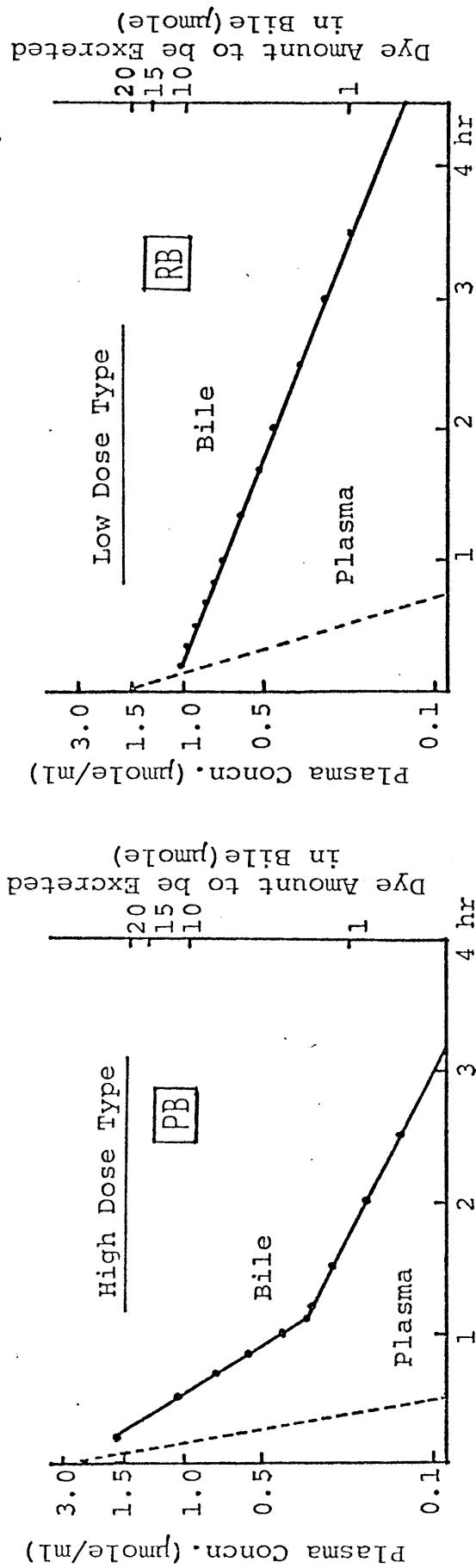
と、H-typeの基質の結合において、いわゆる“Positive Cooperativity”が生じる為には、高濃度において transport 速度が速くなるという speculation 等が可能であるが、今の所、実証が得られない。以上の事を調べる為には、Bindingのみではなく、更に bile canaliculi への transport を *in vitro* で測定する実験系を確立する事が必要とされる。今の所、得られた膜は完全に vesicle 化されているかわからない。従って、遊離細胞を使って、排泄をみる等の実験系が必要であろう。

(3). 考察及びまとめ ----- 伊賀ら(8)によればよく胆汁に排泄させる色素が、初期に速い排泄のみられる H-type と、dose によらない速度をもつ L-type に分類される事がみつけられ、この原因として、肝内結合の飽和性が考えられた。今回、私は、*Eq. (1)* に示される様に、H-type の非線型性を生じる原因として、肝内での存在様式の dose dependency, 及び、排泄をつかさどる bile canaliculi 膜の透過

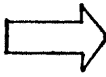
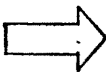
の dose dependency の二つにわけて考えた。  
前者については、排泄に直接有効な存在状態  
は、mobile な状態である細胞質中での存在であ  
ると考え、細胞質全体への分配、各結合蛋白  
分画への結合の dose dependency を調べたが、  
説明ができなかった。又、後者については、ANS  
を用いる方法により、L-type と H-type と  
では、bile canaliculi 膜への結合部位が異  
なる事がわかり、type の違いを生じる1つの  
可能性として、考えられた。

Fig. 44

Plasma Disappearance Curves and Sigma-Minus Plots of Dyes



1) about 80% of dose is recovered in bile



2) about 20 minutes later, over 90% of dose disappeared from plasma

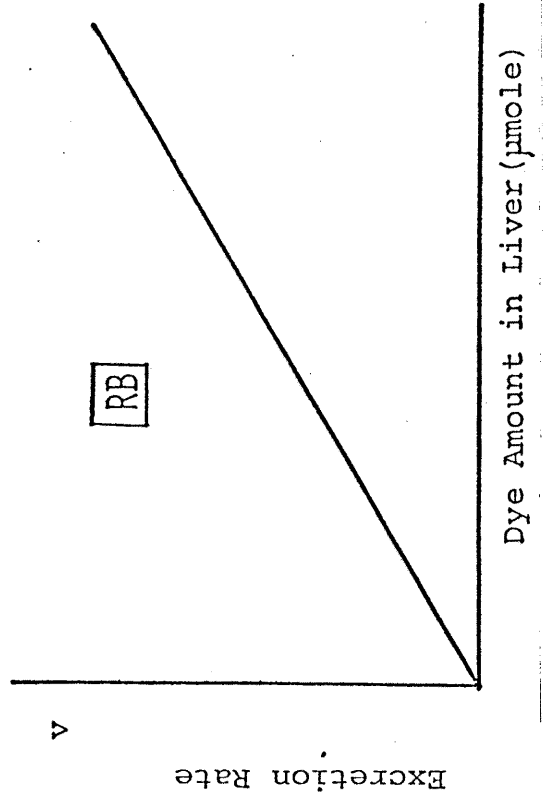
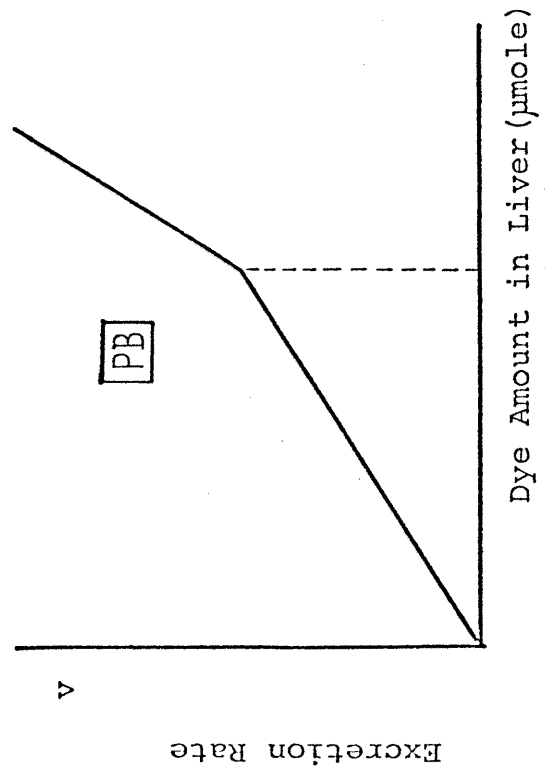


Fig. 45  
PARTITION OF DYES BETWEEN CYTOSOL AND PARTICLE COMPONENTS

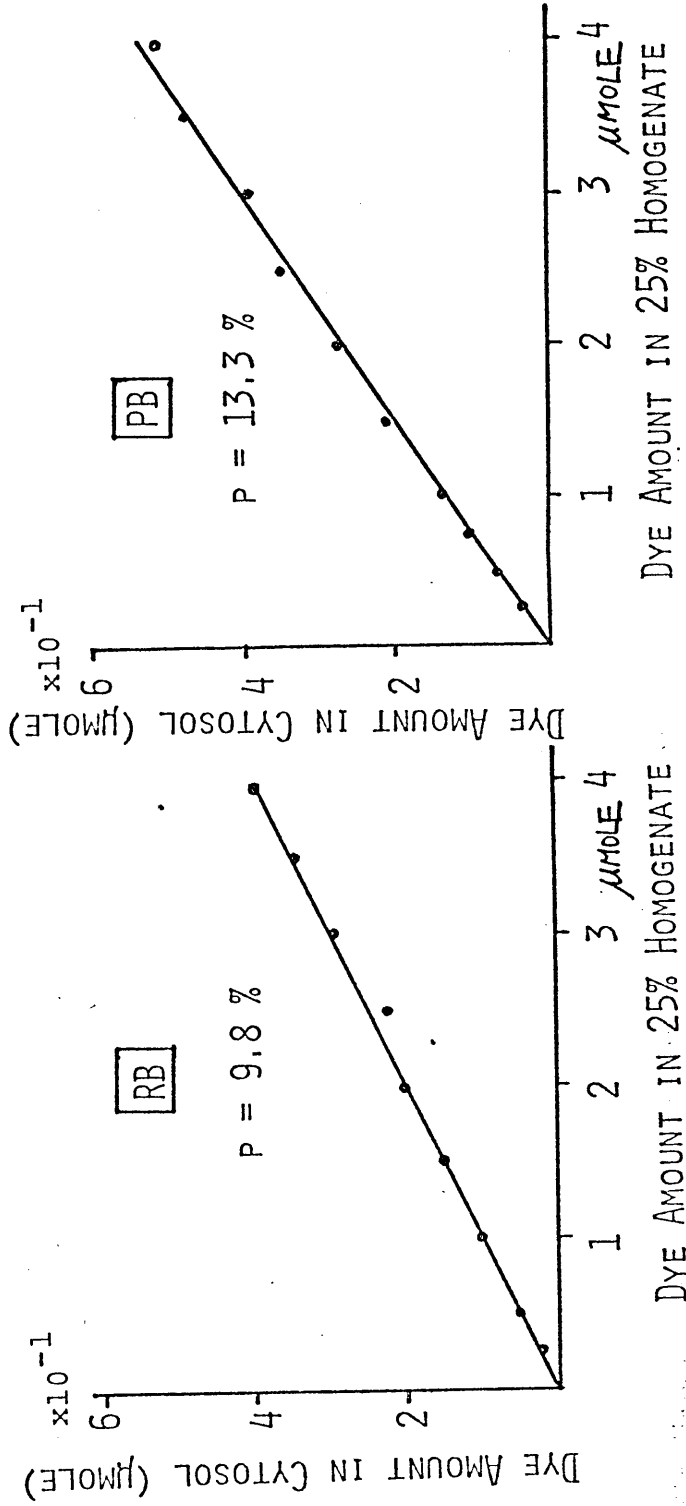


Table VII

BINDING PARAMETERS

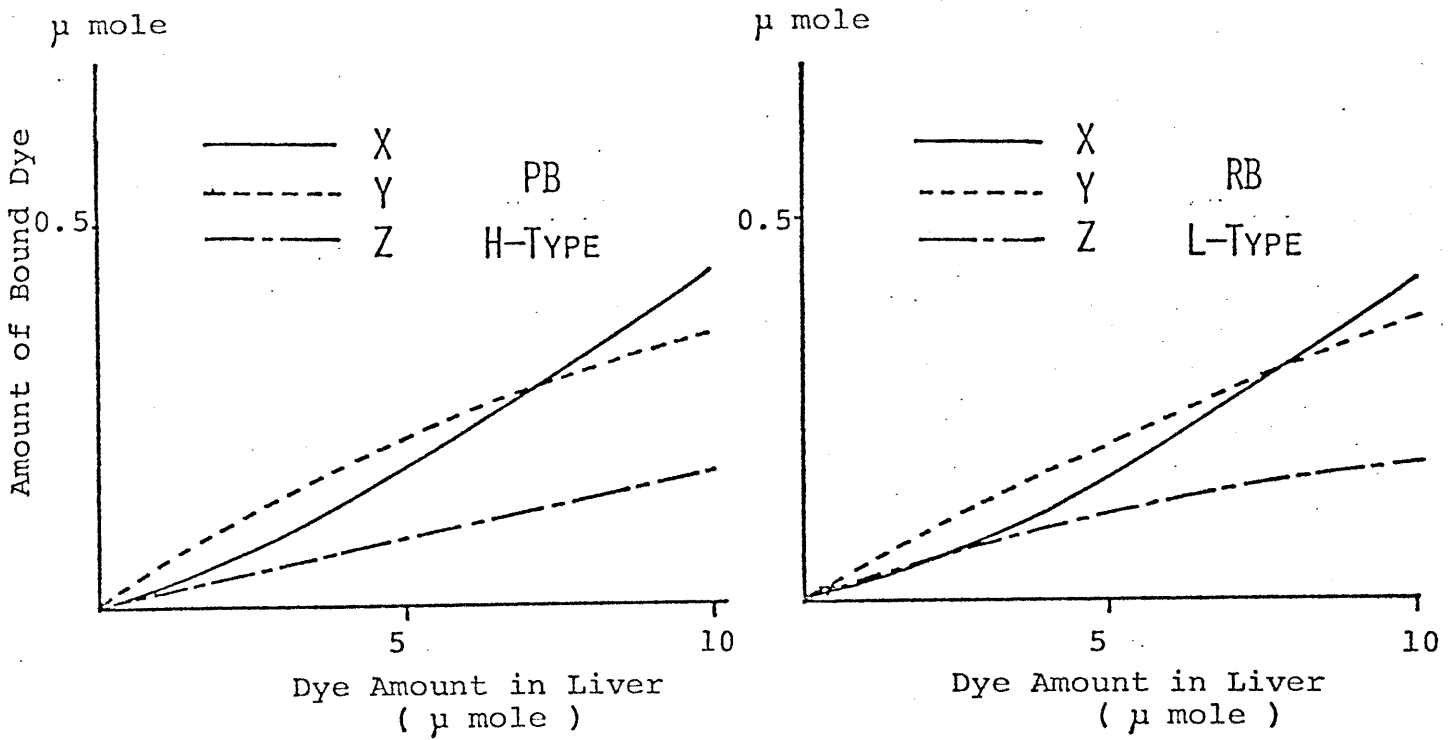
	PB			RB		
	X	Y	Z	X	Y	Z
$k_1$ ( $10^6 M^{-1}$ )	0.525	38.5	1.81	0.862	38.7	37.0
$k_2$ ( $10^6 M^{-1}$ )	—	0.276	0.0333	—	0.990	0.286
$n_1$ ( $\mu\text{mole/g}$ )	34	3	37	60	3	17
$n_2$ ( $\mu\text{mole/g}$ )	—	61	32	—	61	84

LIVER WEIGHT	10 g
100% HOMOGENATE SUPERNATANT	5 ML/HEAD
PARTITION TO CYTOSOL	10 %
PROTEIN CONCENT- RATION	
X	17.0 g/L
Y	9.1 g/L
Z	2.3 g/L



Fig. 46

SIMULATION OF DYE AMOUNT BOUND TO EACH BINDING PROTEIN FRACTIONS



SIMULATION OF DYE AMOUNT IN UNBOUND FORM

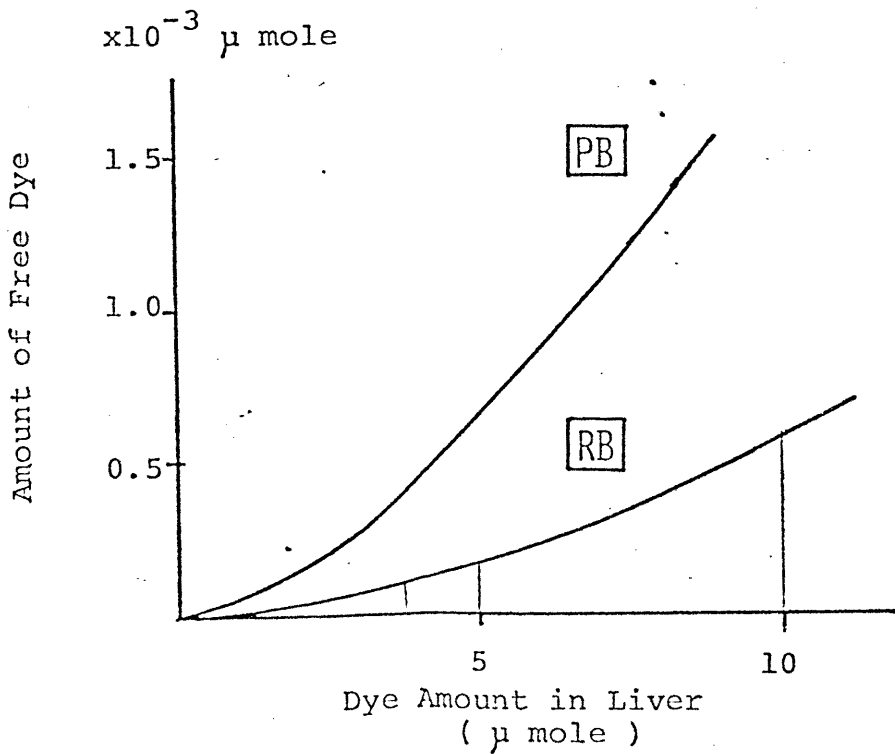


Fig. 47 5' - NUCLEOTIDASE ACTIVITY

	TOTAL PROTEIN (mg/g Liver)	SPECIFIC ACTIVITY ( $\mu$ mole Pi/ mg prot./ hr)	TOTAL ACTIVITY ( $\mu$ mole Pi/ g Liver/ hr)	YIELD (%)
HOMOGENATE	$321.2 \pm 46.4$	$1.5 \pm 0.28$	$417.0 \pm 47.1$	100
BILE CANALICULI MEMBRANE	0.21	24.5	5.15	1.24

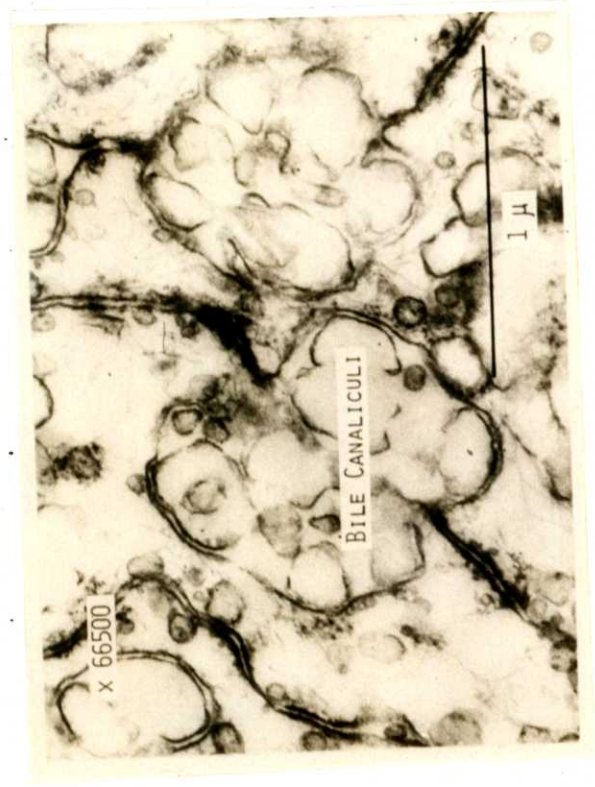
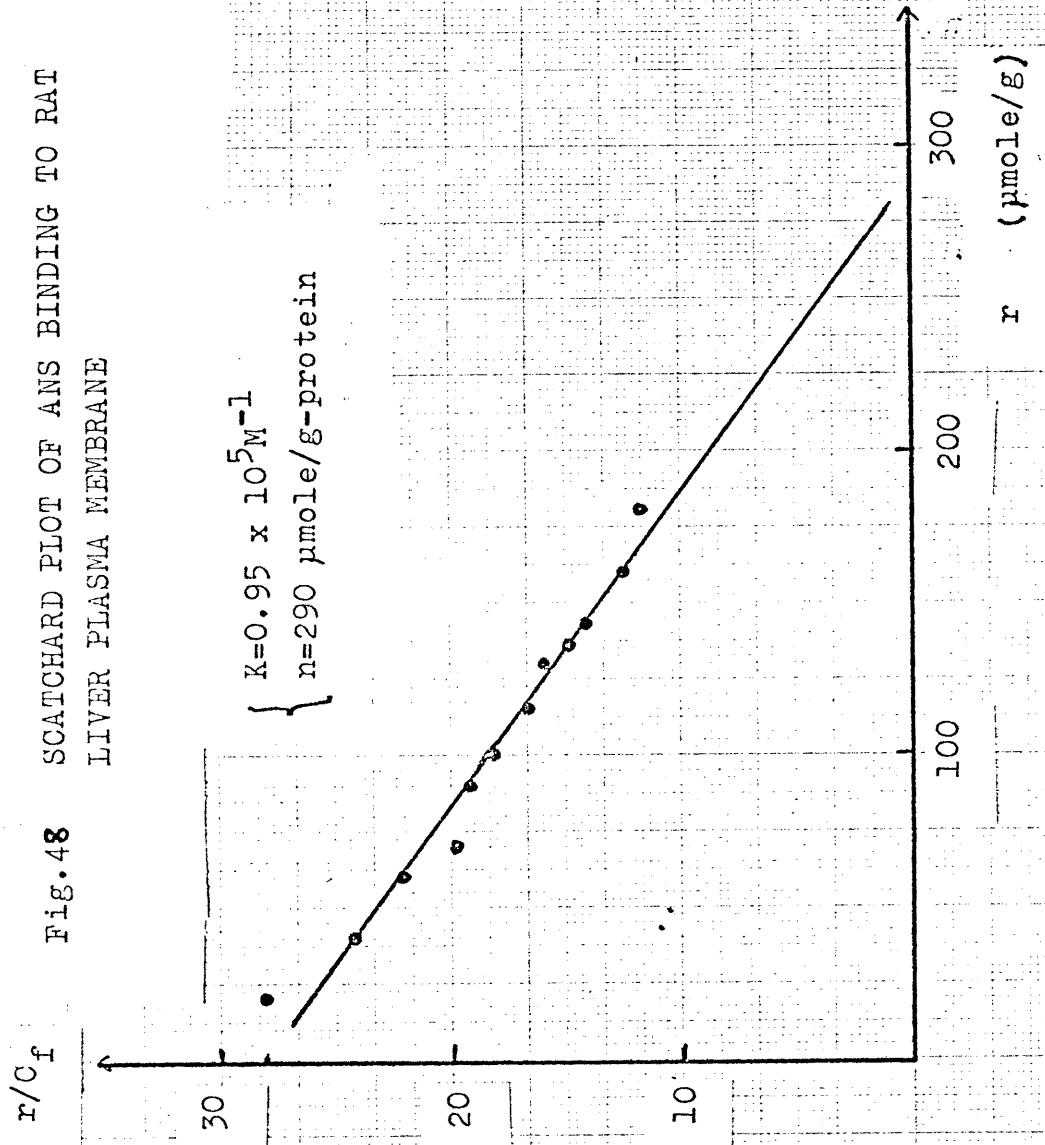
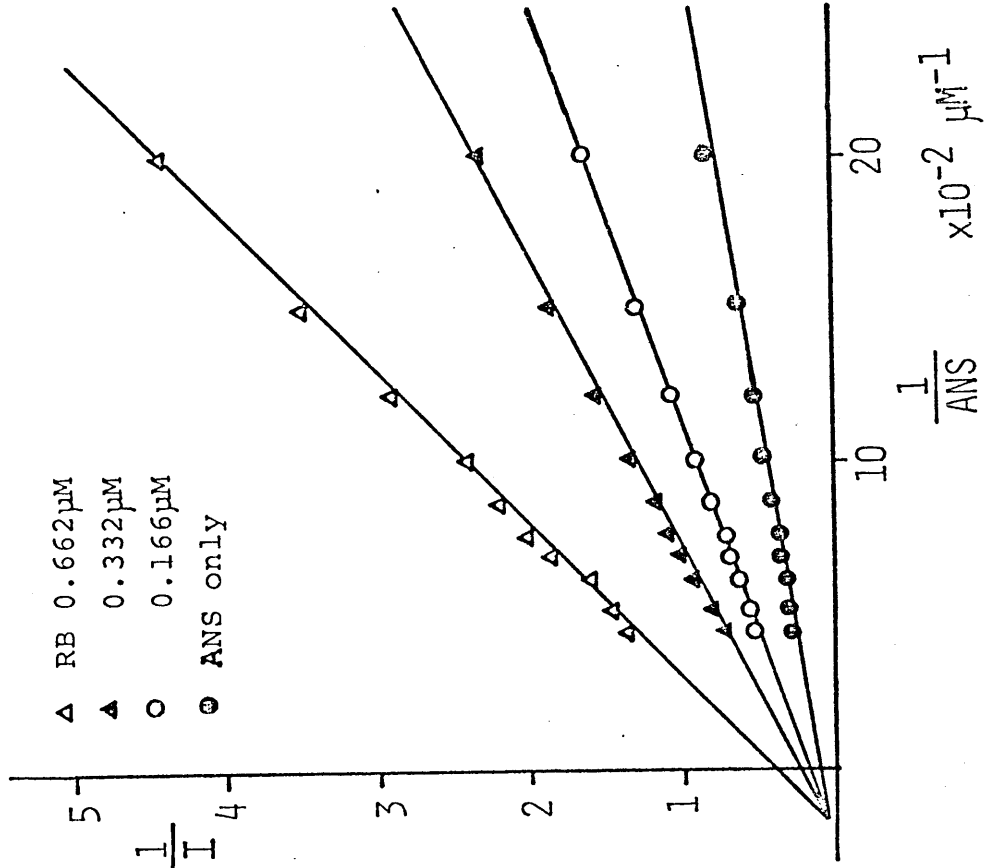


Fig. 48 SCATCHARD PLOT OF ANS BINDING TO RAT LIVER PLASMA MEMBRANE



F-60

EFFECT OF RB ON ANS BINDING TO BILE CANALICULI MEMBRANES



EFFECT OF VARIOUS DYES ON ANS BINDING TO BILE CANALICULI MEMBRANES

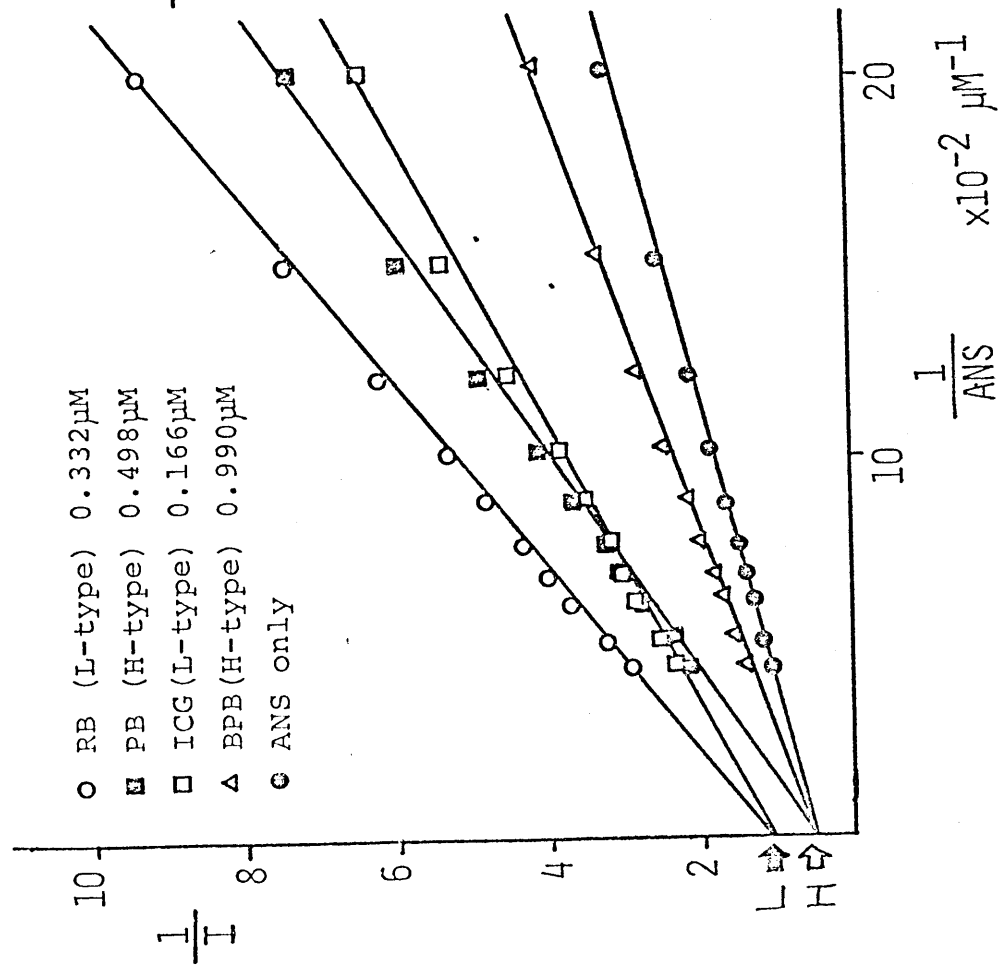


Fig. 49

## 2. BSPの肝への Net uptake と、 Y.γ-分画への結合—— $\text{CCl}_4$ による慢性 肝硬変ラットを使ったの研究

従来、Y.γ-蛋白の機能については、第一章で述べた様に、“有機アニオンの血中から肝への Net uptake に役立つ”と云われていた。これは、各種 Competitor や Phenobarbital 等により上下させた蛋白の BSP 結合能と BSP の肝とり込み速度との相関をみたり、或いは個体発生及び系統発生に伴う変化を調べる事に基づいている。又、この場合、肝とり込み速度は、BSP 投与後 2~7 min における血中消失速度より判定している。今回は、この事をより明確にする為に、 $\text{CCl}_4$ による慢性肝硬変をおこした rat を用いて、Y.γ-蛋白の変化と BSP の肝へのとり込み速度との関係を、定量的に調べた。

(1). 方法、 $\text{CCl}_4$ 慢性肝硬変ラットの作成(101)。雄の Donryu 系 rat (120~140g) を用い、基本的には、鶴藤、大内らの方法(102)に従って作成

した。即ち、 $\text{CCl}_4$  in olive oil (3:4%)<sup>137</sup> を、100g 体重当り、0.1ml を、ラットの背中の皮下に、一週間に二度ずつ、8~9週間注射した。Control としては、olive oil のみを注射した。

(2) 結果.  $\text{CCl}_4$  による慢性肝硬変の rat での patho-physiological な変化.

Table VIII に示す様に、この方法による intoxication rat では、体重、アルブミン濃度の減少、又、GOT, GPT, 活性の増加がみられた。胆汁流量の有意な減少はみられなかったが、肝血流量は有意に減少した。(101)

Pharmacokinetics of BSP. 既に、横田雅行君の修士論文(99)に発表されているが、Fig. 50 に再び掲載する。上図には、BSP 血中消失挙動が Intoxication によってどの様に変化するかを、又、下図は BSP の胆汁排泄挙動の変化を示した。いずれも、病気により大きく遅れる事がわかる。Pharmacokinetic parameter の比較も既に発表済みであるが、(後)。

の discussion の為に Table XII に掲げた。

Intoxication による、8-分画での BSP 結合の比較

Fig. 51 には、Control と、Intoxication

らよりとった肝上清を、一定量(3 $\mu$ mole)の BSP存在下でセファテックスG-75ゲル口過をした結果の代表例を示している。280nmで示される $\gamma$ , $\delta$ -分画の蛋白濃度そのもの、減少の他に、 $\gamma$ , $\delta$ -分画へのBSPの結合低下が明らかである。このゲル口過パターン中のピークごとの各吸光度をまとめたものを、Table IX に示してある。 $\delta$ -分画は蛋白濃度が非常に低い為、誤差を伴う可能性が大きく280nmでの比較は行なわれなかった。こゝでわかる事は、 $\gamma$ -分画の蛋白濃度そのものが約半に減少している他に、 $\gamma$ , $\delta$ -分画に結合しているBSP濃度も減少している。更に、一種の結合活性を示すものと考えられる580nmと280nmでの吸光度の比の低下も明らかである。そこで、これらBSP結合の低下が蛋白濃度の低下のみで把握されるか否かについて検討する為に、 $\gamma$ , $\delta$ -分画を用い、BSPとの結合を平衡透析法で調べた。Fig. 52 に scatchard plot で結果を示したように、病気により、 $\gamma$ , $\delta$ -分画ともに明らかに結合活性の低下がみられ

る。Table X にその結果をまとめたが、Y-分画では結合定数が約4割に、又、Z-分画では2割に低下している事が認められる。又、Z-分画の大きな特徴である“ANSと結合して、非常に大きな量子収率でけい光を出す”という性質を調べた所、Fig. 8に示してある様に、病態ラットよりとったZ-分画では、けい光量子収率に相当する最大けい光強度がControlラットの約1/2に低下しており、有機アニオン結合部位の疎水性の低下が考えられる。既に述べた様に、有機アニオンとZ-分画の結合のmain force が疎水力である事を考えると、結合部位の病変による疎水性の減少が、結合力の低下につながったものと考えるのが妥当であろう。

以上、 $\text{CCl}_4$  慢性肝硬変ラットを用いた今回の実験結果よりも、細胞質蛋白Y、Zが何らかの形でBSPの血中から肝へのNet uptakeを支配している事が確認された。



Table VIII From Reference 107

Patho-physiological changes after chronic CCl<sub>4</sub> intoxication\*

	Control rats (n = 11)	Intoxicated rats (n = 24)
Body wt (g)	341 ± 13	278 ± 6†
Liver wet wt (g)	13.1 ± 0.7	14.8 ± 0.5
Liver wet wt/body wt (g)	3.6 ± 0.01	5.0 ± 0.14†
Plasma transaminase activity (Karman's unit)		
GOT	87 ± 10	478 ± 120†
GPT	52 ± 9	220 ± 20†
Plasma albumin concn (g/dl)	3.51 ± 0.14‡	2.55 ± 0.13†§
Bile flow rate (10 <sup>-3</sup> ml/min)	9.0 ± 1.1	8.5 ± 1.0*
Hepatic blood flow** (ml/min/g liver)	0.97 ± 0.03††	0.64 ± 0.08†,††

\* Results are given as the mean ± S. E. Chronic CCl<sub>4</sub>-intoxication was produced by repeated injections of CCl<sub>4</sub> in olive oil (3:4, v/v), 0.1 ml/100 g of body weight, s.c. into the back twice a week for 8-9 weeks. Controls were produced by repeated injections of olive oil by the method described above.

† Significantly different (P < 0.05) from the control.

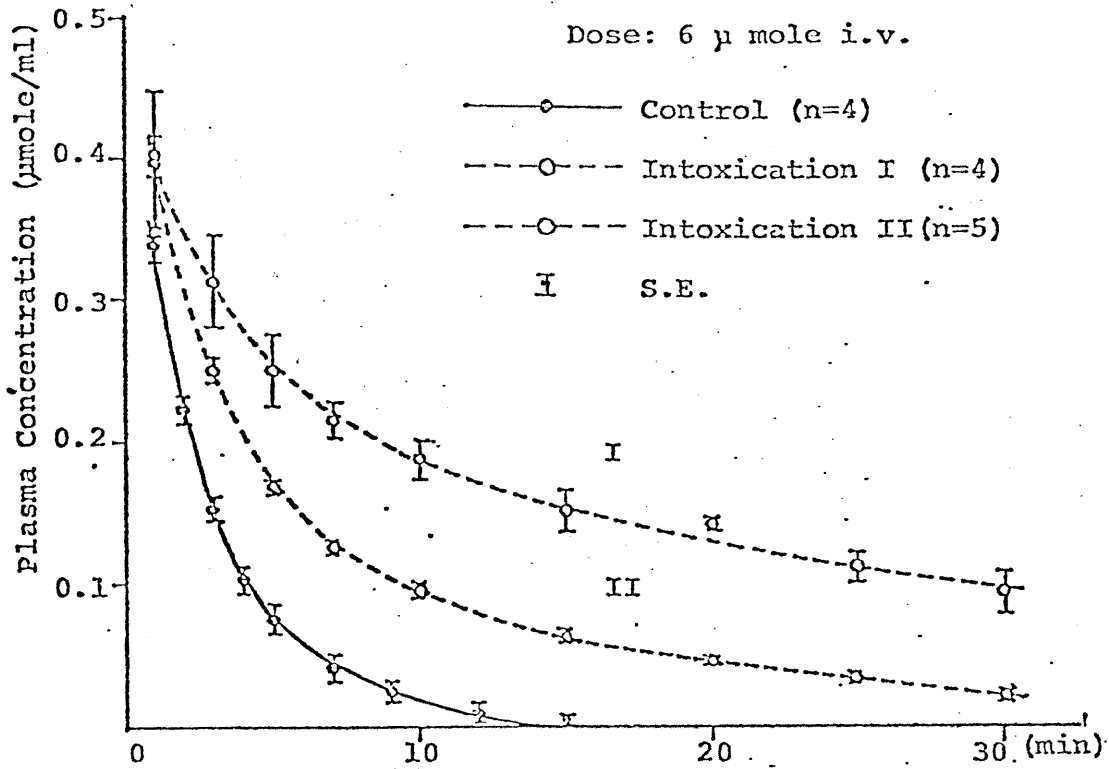
‡ n = 8. § n = 15. || n = 9. ¶ n = 11.

\*\* Data from the previous paper

†† n = 3.

Fig. 50

Plasma Disappearance Curves for BSP



Cumulative Biliary Excretion Curves for BSP

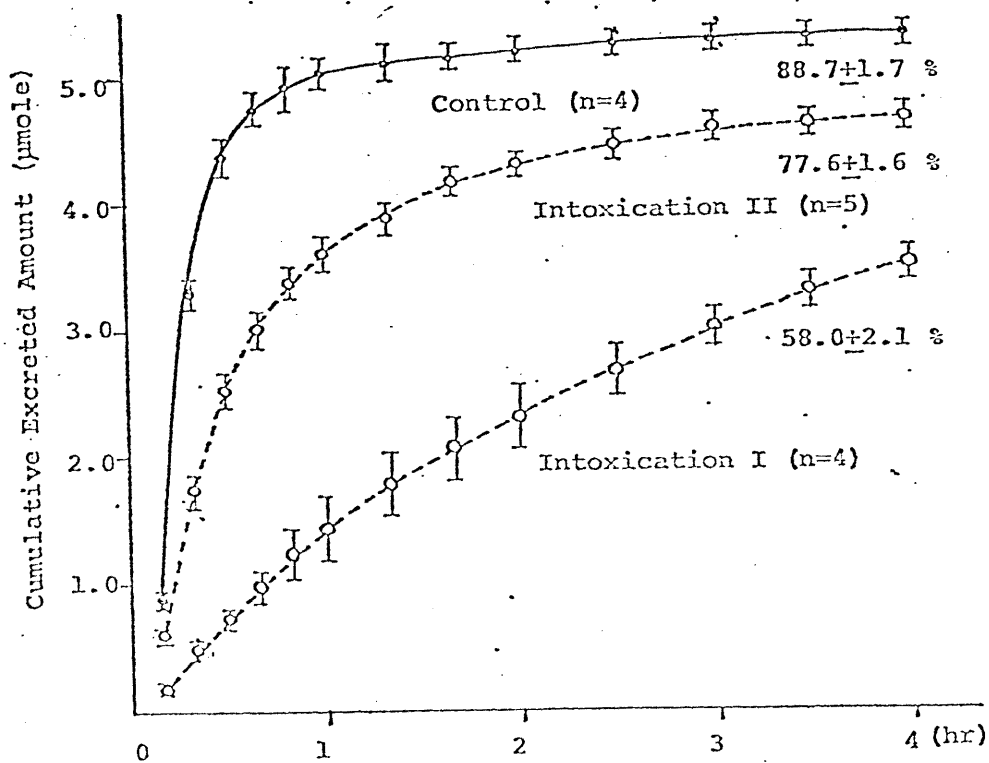


Fig. 51

COMPARISON OF THE ELUTION PATTERN(25% sup 3ml + 3µmole BSP)

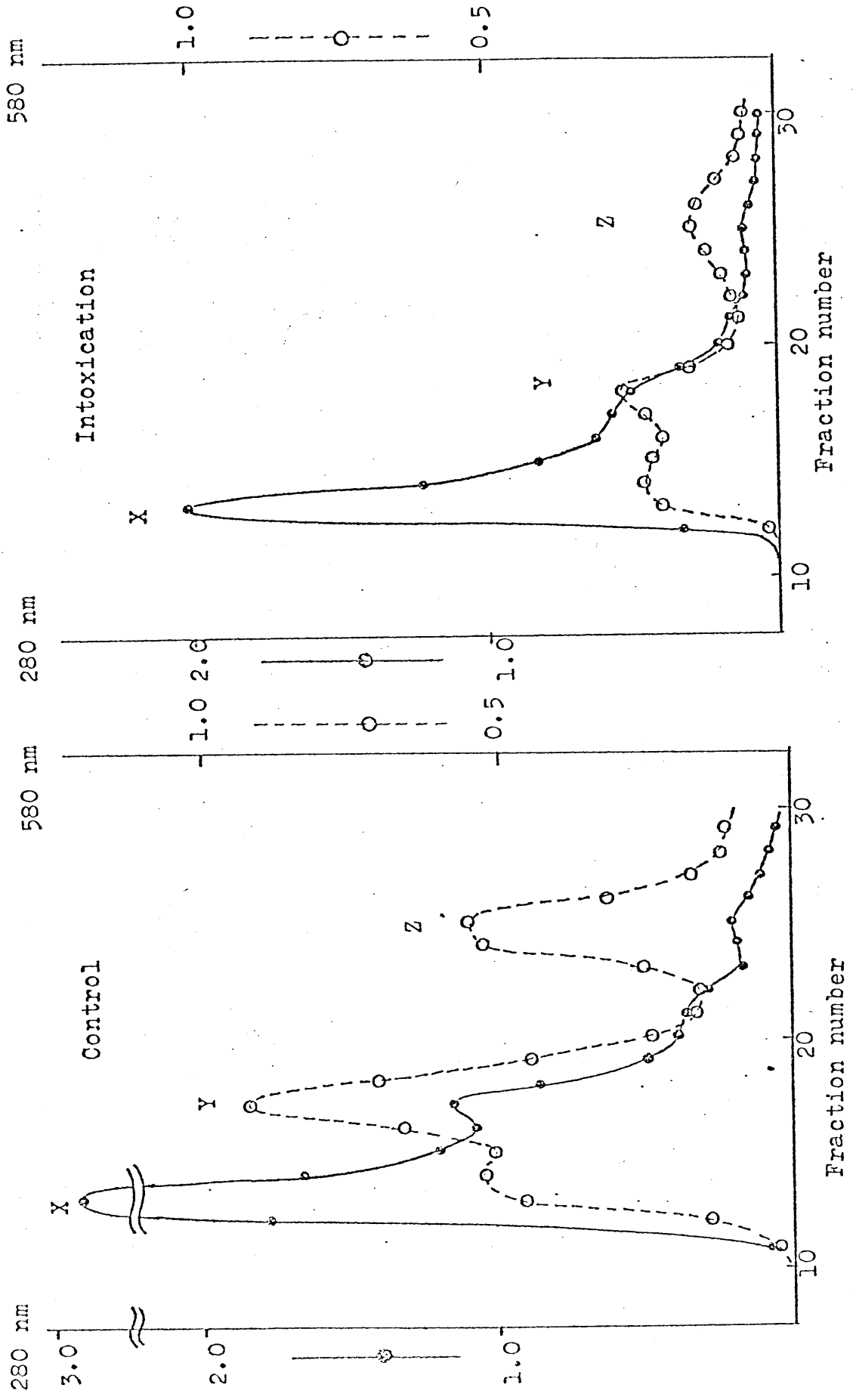


Fig.52

COMPARISON OF THE SCATCHARD PLOT

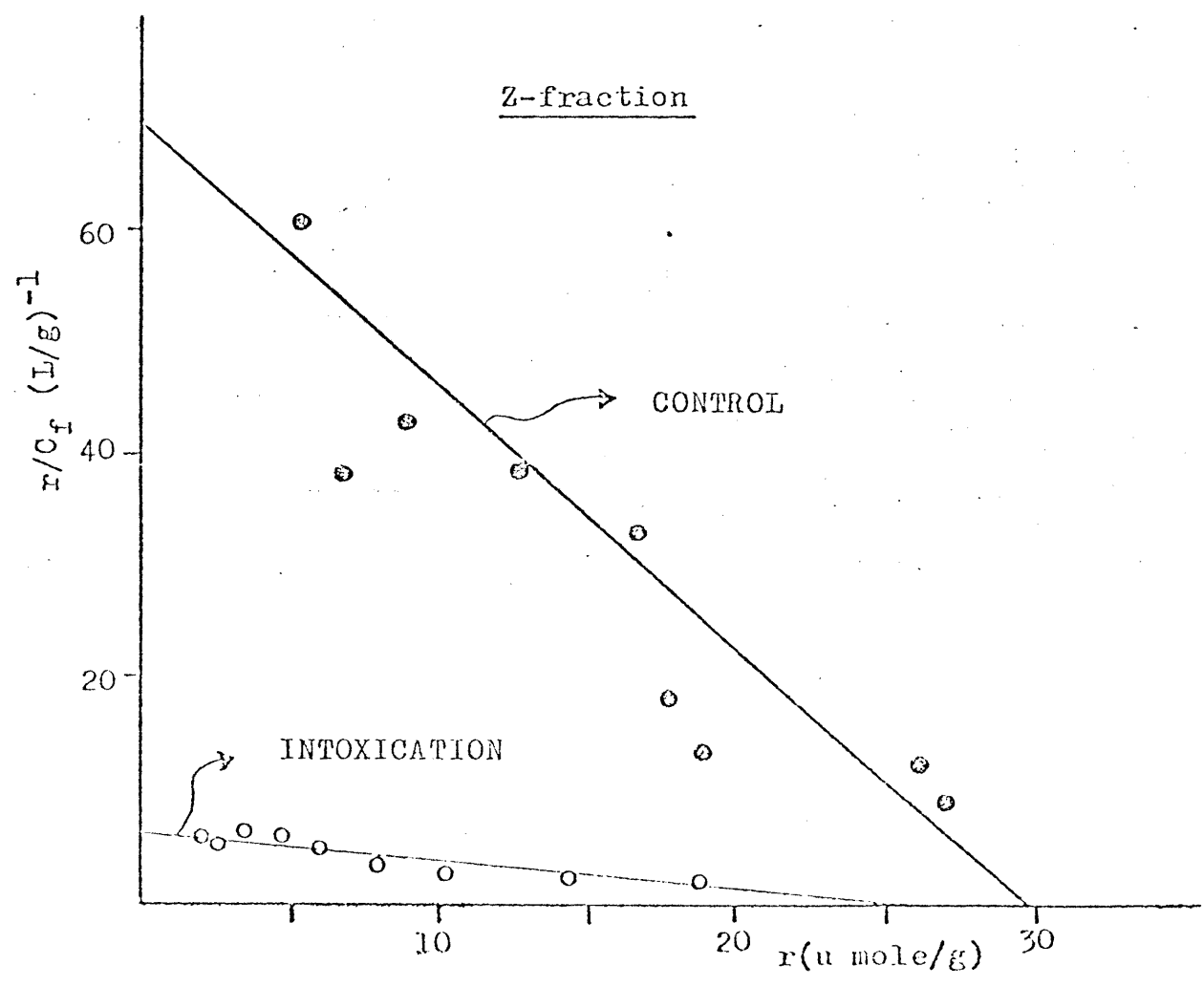
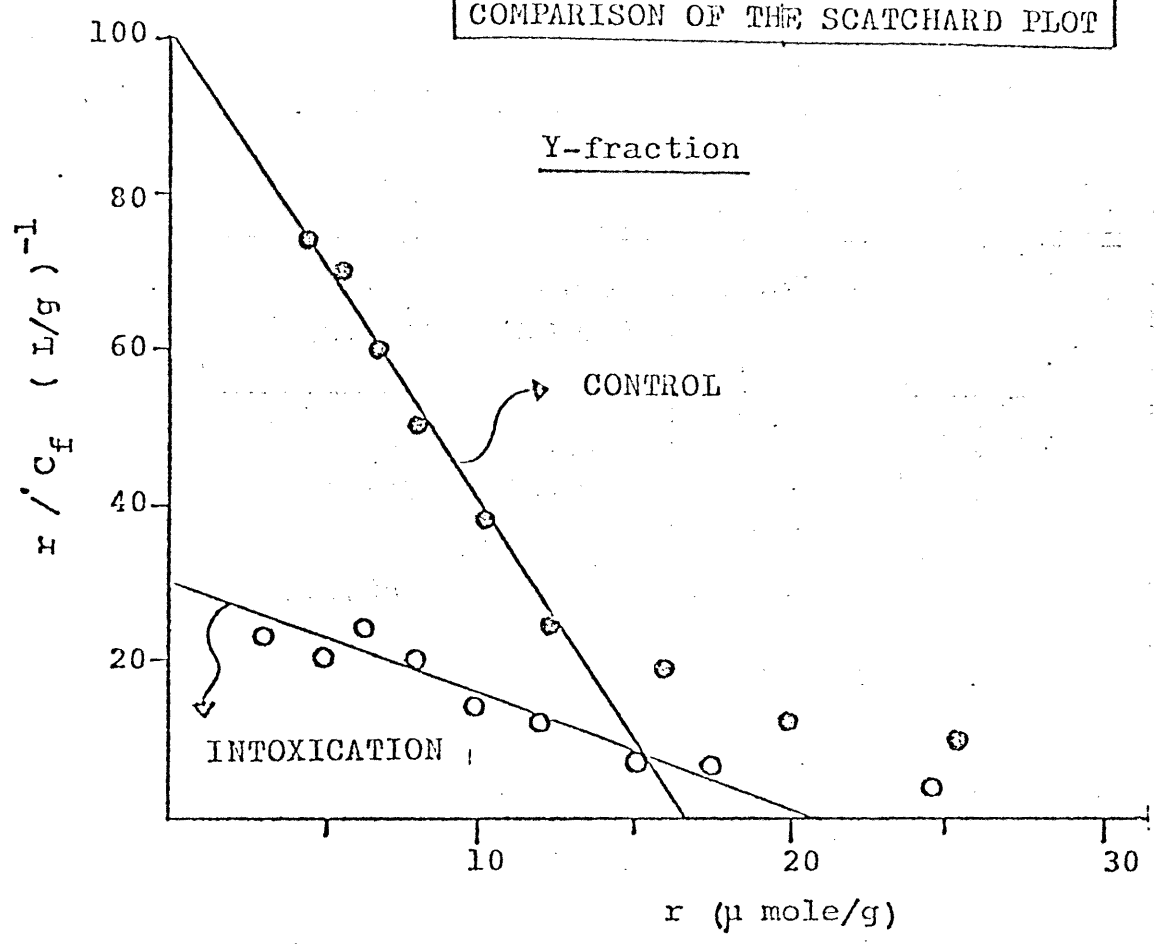


Table IX

COMPARISON OF THE ELUTION PROFILE (MEAN  $\pm$  S.E.)

	Y (280 nm)	Y (580 nm)	Y $\left(\frac{580 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}\right)$	Z (580 nm)
CONTROL (n=2)	1.12 ( $\pm 0.02$ )	0.93 ( $\pm 0.01$ )	0.83 ( $\pm 0.01$ )	0.45 ( $\pm 0.1$ )
INTOX. (n=3)	0.65 ( $\pm 0.10$ )	0.35 ( $\pm 0.07$ )	0.53 ( $\pm 0.04$ )	0.18 ( $\pm 0.06$ )
	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.1

Table X From Reference 101

Table 4. Binding parameters of BSP to Y- and Z-fractions by an equilibrium dialysis method\*

Binding parameters	Y-fraction		Z-fraction	
	Controls rats (n = 4)	Intoxicated rats (n = 3)	Control rats (n = 4)	Intoxicated rats (n = 3)
$K_1 (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	7.8 $\pm$ 0.5	4.3 $\pm$ 1.8†	2.5 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.1†
$n_1 (\mu\text{moles/g})$	14.9 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 1.2	27.2 $\pm$ 1.2	25.0 $\pm$ 3.5

\* Parameters were calculated by visual approximation. Results are given as the mean  $\pm$  S.E.

† Significantly different (P < 0.01) from the control.

### (3) Physiological Model による解析

従来より薬物の生体内挙動を記述する為に、いわゆる compartment theory (103) が広く用いられて来た。この方法論は、薬物の移行過程に一次速度式を仮定する事により、数学的統一理論が完成されており、吸収量の算出とか、投与計画の設定などの分野にその有効性が示されてきた。特に、各コンパートメントの内部に関する情報がなくても、全体を black box として扱う事により算出が可能という大きな特色を持っている。しかしながら、コンパートメントの内容が不明確な為に、この Model 解析より算出されるパラメータ (分布容積  $V$ , 速度定数を) の実体的意味があいまいであるという欠点を持っている (104)。従って、例えば今回の BSP Kinetics が示されるように病態によるパラメータの変化が生体内のどの部分の変化によるものかを決定しようとすると、多くの問題点に遭遇する。この様な点を改善できるものとして、近年、Physiological

pharmacokinetics と呼ばれる方法が発展してきた(104)。この方法は、各コンパートメントにより実質的な意味を与え(実際の tissue と対応する)。これら tissue 間には、血流によってつながっていると考える Model である(Fig. 53)。この為に Perfusion Model と呼ばれる事もある。そして血流と tissue の間には分配率で定義される濃度比が瞬時的に平衡が成立していると考えられる。この比を支配する要因としては Plasma, tissue との結合の程度、及び各 tissue 細胞の形質膜の透過の速さが考えられる。このような方法により、各種薬物の血中、臓器中濃度の推移の予測、更には、小動物より大動物へのいわゆるアニマルスケールアップなどの面で成功をおさめている(105, 106, 107, 108, 109)。そこで、この Physiological Model を使って Y, Z-分画と BSP の結合が、BSP の血中消失速度にどの程度の影響を及ぼしうるのかを考察してみたいと思う。

F-67

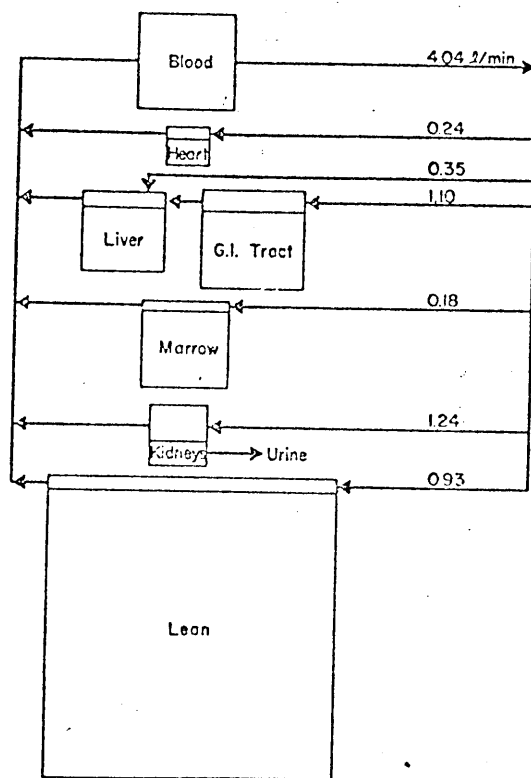


Fig.53 Compartmental model for Ara-C pharmacokinetics

From Reference 106



(i). Rowland らの Perfusion-limited model による考察-----Rowland ら(110) は Fig. 54 に示す様に、Perfusion model と従来の compartment model を対応させ、それぞれのパラメータの間に、table XI に示す対応がある事を示した。この Model において Eliminating organ を肝臓と考え、Reservoir を Plasma とみなす。そこで、BSP の血中消失 data を 2-compartment model により解析をし得られたパラメータ値 (table XII) を、この Perfusion model における各パラメータになおしたものを Table XIII に示す。病気により、plasma volume ( $V_R$ ) には変化がみられず、分配率 ( $K_p$ ) は、約 1/4 に減少する事がわかった。その他、肝血流 ( $\dot{V}_B$ ) の減少、排泄速度定数 ( $k_m$ ) の減少が計算上みられた。この Model の仮定の正しさを判断する方法として、計算上得られた肝血流値 ( $\dot{V}_B$ ) を実測値と比較する事が考えられる。table VIII にあるように、実測値は 6.7 ml/min per body (Control), 5.0 ml/min. per body

という値が得られた。Control の方は、計算値とかなり近い値が得られたが、Intox の方では、計算値の約5.5倍であった。こうした大きい違いは、Model の不当性によると考えるのが妥当であるが、考えられる事としては、肝以外にも分布臓器が存在する事、及び、Perfusion-limited の仮定が正しくない事がある。次にこの二つの事柄について検討してみる。

(ii) Model のくみだりをなす為の考察。

肝以外の臓器への分布 C. D. Klaassen らによって、我々とほぼ同じ dose\* の時の BSP の臓器分布が調べられている(111)。投与後、10 min 後の各臓器中濃度を測定し、臓器中の血液量を、 $^{125}\text{I}$ -serum albumin で測定し、補正してある。その結果、Liver, plasma, bile 以外にも、Kidney, Spleen, Heart, Lung, Brain, Muscle, Duodenum に分布している事が示されている。10min 後の plasma,

\* 我々、 $6 \mu\text{mole}/300\text{g}\cdot\text{body weight}$  .

C. D. Klaassen,  $6.7 \mu\text{mole}/300\text{g}\cdot\text{body weight}$

Liver, spleen 以外への BSP 分布は投与量の 35% に及んでいる。この様に、Liver 以外への組織の分布を考える事が BSP の場合、必要である。

### Perfusion-limited の仮定について。

“臓器と毛細血管の間に、瞬間的な平衡が成立する。”という仮定が、perfusion-limited の仮定である。Perfusion-limited であるかどうかの判断は、L. Dedrick と B. Bischoff によって考察されている (Fig. 55)。彼らは、この図にある Model による解析から、perfusion-limited の criteria として、Eq. B7 を導き出した。BSP の場合、この K 値は、Montandon ら (112) の constant infusion の data より、7.6 を用い、又、 $\sqrt{V_1/V_2}$  の値は、Dedrick ら (106) の 0.06 を用いると、 $(1 + \frac{V_1}{KV_2})^2 = 1.02$  となる。即ち、Eq. B7 は、より簡単な Eq. B8\* で表現できる。この式により、plasma flow ( $Q_1$ ) と、とり込みのクリアランス ( $Cl$ ) とを比較すれば良い事がわかる。plasma flow は、実測

<p>* <math>\frac{Q_1}{Cl} \ll 1</math>      Eq. B8</p>
--

により、約、7 ml (Control), 5 ml (Intox) である事がわかっている。これについては、最近、肝浮遊細胞を用いてのいくつかの報告がみられる(113, 114, 115)。Table XIVに、その報告値より、ラット実質細胞を  $10^9 \text{ cell/rat}$  (114) と考え、ラット一匹あたりのとり込みクリアランス (L) を計算したものをかかげてある。気をつけなければならぬものは、Cg. B8の右辺のLは、plasma 存在下での値を考えなければならぬという事である。Stegelら(113)の結果より、5% アルブミン存在下でのLは、 $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \text{ per rat}$  となるのに比べ、Bezooijenら(114)の結果では、同じく5% アルブミン存在下で、 $0.2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \text{ per rat}$  という大きな違いを生じている。これには、BSPのMedium中の濃度の違いも関係しているであろうが、それだけでは説明し難く、とり込み量の測定法、浮遊細胞濃度の違い、浮遊細胞の質の違い等によるものと考えられる。又、最近、Schwenkら(115)により、厳密な方法で生死

をチェックされた浮遊細胞を用い、centrifugal filtration 法により肝実質細胞への BSP の initial uptake をみるというおぐれた報告が発表された。彼らは、Medium 中 BSP 濃度を  $0.3 \mu\text{M}$  から  $26 \mu\text{M}$  まで変化させ、initial uptake を測定した。この結果より、同様に、 $K_d$  に計算しなおすと、 $150 \sim 1000 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  が得られた。しかしながら、plasma 存在下でのデータがなく、plasma の存在により、この値がどの程度に下るかを推定する事は難しい。<sup>\*</sup> 以上の様に、現在の所、文献的な情報からは、Eq. B8 における  $K_d$  をみつける事は困難な為、perfusion-limited の判定をする事が不可能である。従って、今回は、Rowland Model による

<sup>\*</sup> plasma 中の結合を考え、free の BSP のみかとり込みに関係すると考えると、一応計算は可能であるが、最近、Ammer ら (116) によって胆汁酸のとり込みと Albumin の関係が調べられ、Albumin により、non-competitive inhibition をうける場合もある事より、必ずしも上の考えが正しいとは言えない事が報告されている。

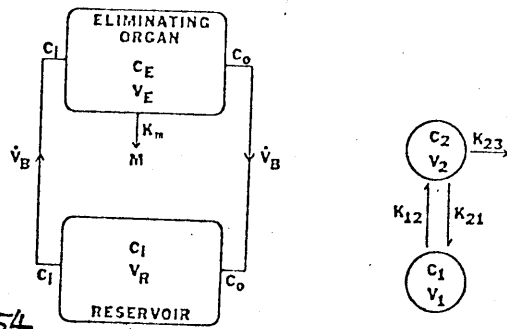


Fig.54

Diagrammatic representations of the model of an isolated perfused organ system containing a reservoir and an eliminating organ and of the two-compartment model with elimination from the peripheral compartment. The constants are described in the text.

From Reference 110

Table XI

A Comparison of the Perfusion Model and the Analogous Compartment Model Within the Parameters Associated with Each Model

	Perfusion model	Compartment model
Dose	$C_1 = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$	$C_1 = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$
A	$V_R C_1^0$	$V_1 C_1^0$
B	$C_1^0 (\dot{V}_D / K_p V_E + k_m - \alpha) / (\beta - \alpha)$	$C_1^0 (k_{21} + k_{23} - \alpha) / (\beta - \alpha)$
$\alpha + \beta$	$C_1^0 (\dot{V}_D / K_p V_E + k_m - \beta) / (\alpha - \beta)$	$C_1^0 (k_{21} + k_{23} - \beta) / (\alpha - \beta)$
$\alpha\beta$	$\dot{V}_D / V_R + \dot{V}_D / K_p V_E + k_m$	$k_{21} + k_{23} + k_{12}$
Mean (steady-state) clearance ( $\dot{V}_{Cl}$ )	$\dot{V}_B k_m / V_R$	$k_{12} k_{23}$
	$\dot{V}_D \times k_m / (\dot{V}_D / K_p V_E + k_m)$	$V_1 k_{12} k_{23} / (k_{23} + k_{21})$
	$\dot{V}_D / V_R$	$k_{12}$
	$\dot{V}_D / K_p V_E$	$k_{21}$
	$k_m$	$k_{23}$
	$V_R$	$V_1$
	$V_E K_p$	$V_2$
	$K_p V_E$	$V_1 (k_{12} / k_{21})$
	$\dot{V}_D / (\dot{V}_D / K_p V_E + k_m)$	$V_1 [k_{12} / (k_{21} + k_{23})]$

Table XII  
From Reference 101

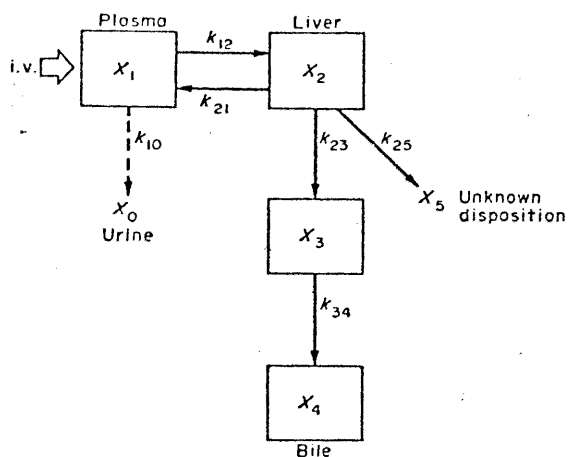


Fig. 3. Schematic illustration of a four-compartment open model. The data of BSP kinetics were fitted in the plasma compartment ( $X_1$ ) and in the bile compartment ( $X_4$ ).

Pharmacokinetic parameters calculated with a four-compartment model\*

Pharmacokinetic parameters	Control rats (n = 4)	Intoxicated rats (n = 4)
$k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.4612 \pm 0.0219$	$0.1455 \pm 0.0372\ddagger$
$k_{21}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.0635 \pm 0.0216$	$0.0862 \pm 0.0220$
$k_{23}\ddagger$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.3270 \pm 0.0405$	$0.0257 \pm 0.0041\ddagger$ $(0.0206 \pm 0.0020)\ddagger$
$k_{25}\ddagger$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.0363 \pm 0.0045$	$0.0036 \pm 0.0021\ddagger$ $(0.0137 \pm 0.0006)\ddagger$
$k_{34}\ddagger$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.0560 \pm 0.0032$	$0.0104 \pm 0.0008\ddagger$ $(0.0243 \pm 0.0026)\S$
$V_1$ (ml)	$11.35 \pm 0.22$	$13.30 \pm 1.50$
$V_2$ (ml)	$82.40 \pm 28.30$	$22.45 \pm 8.50$

\* Results are given as the mean  $\pm$  S. E. Parameters were calculated by a non-linear iterative least squares method, using a digital computer.

$\ddagger$  Significantly different ( $P < 0.01$ ) from the control.

$\S$  Calculations were carried out under conditions such that the ratios ( $R$ ) of the total recovery of BSP in the bile to the administered dose were fixed at 0.90 in the control and 0.75 in the intoxicated rats respectively. The values in parentheses were calculated from  $R = 0.60$  (see text).

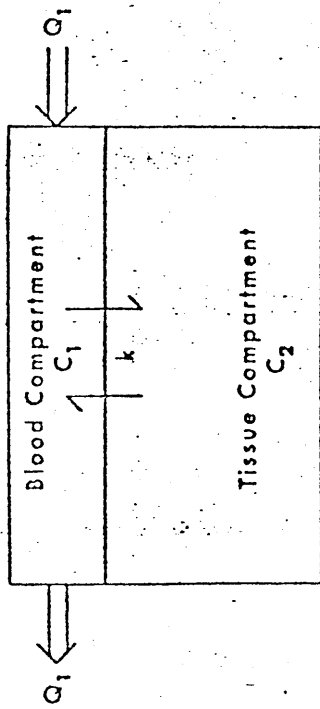
$\S$  Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control.

Table XIII COMPARISON OF THE PARAMETERS CALCULATED BASED ON THE PERFUSION MODEL DEPICTED IN Fig. 54

	Control	Intox
$V_R = V_1$ (ml)	11.35	13.30
$V_E^*$ (ml)	13.1	14.8
$K_p = V_2 / V_E$	6.29	1.52
$V_B = k_{12} V_1$ (ml/min)	5.23	1.94
$k_m = k_{23}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.327	0.026

\* wet weight of liver

Fig. 55 from L. Dedrick and B. Bischoff (195)



Symbols:



Flow



Mass Transfer

Body region containing blood compartment and tissue compartment.

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = Q_1(C_0 - C_1) + k \left( \frac{C_2}{K} - C_1 \right) \quad (B1)$$

$$V_2 \frac{dC_2}{dt} = k \left( C_1 - \frac{C_2}{K} \right) \quad (B2)$$

Complications such as binding will be ignored for the moment, but the overall distribution coefficient,  $K$ , could approximately take some of these effects into account. For the case of flow limiting conditions,  $k \rightarrow \infty$ , Equations (B1) and (B2) become

$$(V_1 + KV_2) \frac{dC_1}{dt} = Q_1(C_0 - C_1) \quad (B3)$$

The solution of this equation for a pulse injection of  $M$  units is

$$(C_1)_\infty = \frac{M}{Q_1} \left( \frac{Q_1}{V_1 + KV_2} \right) e^{-\left( \frac{Q_1}{V_1 + KV_2} \right) t} \quad (B4)$$

which will be compared with the general solution of Equations (B1) and (B2). For the same initial condition, this is

$$C_1 = \frac{M}{Q_1} \frac{Q_1}{V_1} \frac{\left( r_2 + \frac{k}{KV_2} \right) e^{r_2 t} - \left( r_1 + \frac{k}{KV_2} \right) e^{r_1 t}}{2R} \quad (B5a)$$

where

$$r_{(1)} = -\frac{1}{2} \left[ \frac{Q_1}{V_1} + \frac{k}{V_1} \left( 1 + \frac{V_1}{KV_2} \right) \right] \mp R \quad (B5b)$$

$$R = \sqrt{\frac{1}{4} \left[ \frac{Q_1}{V_1} + \frac{k}{V_1} \left( 1 + \frac{V_1}{KV_2} \right) \right]^2 - \frac{Q_1 k}{V_1 KV_2}} \quad (B5c)$$

Now, in the limit as  $k \rightarrow \infty$ , the root  $r_1$  becomes very large and negative, and Equation (B5a) reduces to Equation (B4).

To derive a mathematical criterion of flow limiting conditions, a formal expansion of Equations (B5) in terms of  $(Q_1/k)$  can be made, with the result

$$C_1 = \frac{M}{Q_1} \left( \frac{Q_1}{V_1 + KV_2} \right) \left[ 1 - \left( \frac{Q_1}{k} \right) \left( 1 + \frac{V_1}{KV_2} \right) \right] \times \exp \left\{ - \left( \frac{Q_1}{V_1 + KV_2} \right) \left[ 1 - \left( \frac{Q_1}{k} \right) \left( 1 + \frac{V_1}{KV_2} \right) \right] t \right\} + \text{higher order terms in } \left( \frac{Q_1}{k} \right) \quad (B6)$$

It is seen that Equation (B6) can be reduced to the flow limiting case, Equation (B4), if the following criterion is satisfied:

$$\frac{Q_1}{k} \ll \left( 1 + \left( \frac{V_1}{KV_2} \right) \right)^2 \quad (B7)$$



Table XIV BSP UPTAKE BY ISOLATED LIVER CELL FROM VARIOUS LITERATURES

Reference	Cell conc. (cells/ml)	Medium conc. ( $\mu\text{M}$ )	Uptake rate ( $\text{nmol}/10^6 \text{ cell}$ per min)	Rate constant* per body ( $\text{min}^{-1}$ per rat)	Time** (min)	Method
T. E. Stege (113)		1.2	0.95	600(buffer)	X 5	Centrifugation
		1.2	0.09	60(5% BSA)	O 15	Centrifugation
van Bezooijen (114)	$3 \times 10^5$	30.0	0.18	6(buffer)	X 15	Centri.+Wash
	$3 \times 10^5$	30.0	0.006	0.2(5% BSA)	O 15	Centri.+Wash
M. Schwenk (115)	$4 \times 10^5$	0.3	0.3	1000	O 1	Centri.filtration
	$4 \times 10^5$	1.2	0.9	750 (buffer)	O 1	(silicon oil)
	$4 \times 10^5$	6.0	2.0	330	O 1	
	$4 \times 10^5$	26.0	3.8	150	O 1	

\* フット-匹(108肝)の持, 2.1の肝細胞数を  $1 \times 10^9 \text{ cell}$  (114) と考え, かつそのずべてが, BSPトリニオに有効であり, トリニオ速度が細胞数に比例するといふ仮定のもとに計算した。

\*\* トリニオの初速度を測定して, トリニオと認められるものに O を, そうでないものに X をつけてある。

147

考察より、少なくとも、Control rat においては、  
ほぼ Perfusion - limited に近いものと考えて、  
以下の考察を加えてゆく、将来、遊離肝細胞  
を用いる、plasma 存在下の正しい値をみつめる  
事ができ細胞への influx、細胞からの  
outflux に関する速度パラメータが得られれば  
より精密な Model 解析ができるであろう。

### (iii) Physiological Model の構築

a) パラメータの設定 . Fig. 56に主なる  
分布組織を考えて、この解析に用いた Model  
を示した。この中で必要なパラメータは、臓器  
Mass, 血流という生理学的パラメータと、分配係  
数(臓器と臓器静脈との間の BSP の濃度比)  
plasma, 肝の蛋白質との結合及び肝、腎クリ  
アランスという生化学的パラメータにわけられる。  
以下にこれらパラメータのきめ方を示す。

臓器 Mass ----- 当教室リンガ、Wistar 系 rat  
(約 250g) で実測した値(117)を体重当りに  
換算した。

臓器血流 ----- 肝血流量は、当教室横田が測定した値を用い、他の臓器<sup>2</sup>の値は、

Sasakiら(118)のラット麻酔下での値(% of cardiac output で示されている)を用い、肝<sup>2</sup>の横田の値を基にして比例配分した。

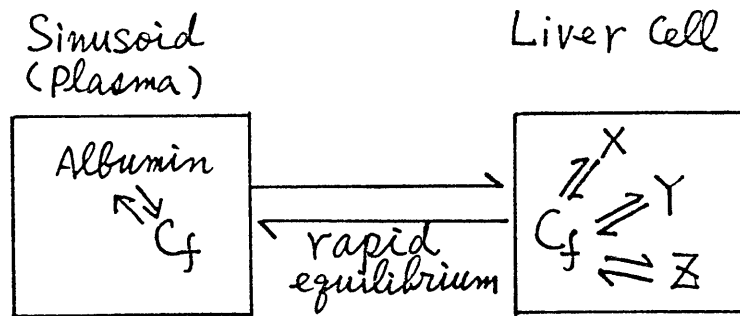
Muscleのみは、Sasakiのデータ中にはない為、Dedrickの値<sup>\*</sup>を引用した(107)。

分配係数 Fig. 57で述べる様に分配係数( $R$ )のきめ方には、constant infusionによる方法、Pulse injectionでの方法が考えられるが、こゝでは、後者の方法、即ち、KlaassenのBSP静注10 min後の tissue/plasma ratioをもとにしてきめた。

肝における分配係数 肝細胞内の結合蛋白の役割として最も考えられる事は、分配係数( $R$ )を支配する働きである。分配係数をきめる要因としては、plasma結合、細胞質蛋白結合、肝形質膜透過性が考えられる。今、最も simpleな Modelとして次図のような平衡が成

<sup>\*</sup> この場合も、横田の肝血流量値を基にして、比例配分した。

立していると考える。



こゝで Table XV にあける plasma 結合に関する結合パラメーター及び、肝上清蛋白に関する結合パラメーターより計算した plasma 及び Liver cell 中金濃度の関係を Fig. 58 に示す。この図でわかるように、平衡時においては、plasma 中濃度が、Liver cell 中濃度よりも高くなるという結果が得られる (plasma/Liver. = 2 ~ 4)。

これは、Montandon ら (112) により低 dose の BSP を constant infusion, steady state で測定した Liver/plasma ratio に胆汁排泄クリアランスを考慮して計算された  $K_p$  値 7.6 と比較するとはるかに小さい値である。この違いを説明する意には plasma 中と Liver cell 中とで free の濃度が等しくない、即ち、Liver cell 中の

の方が高い free 濃度が平衡に達していると考えなければならぬ。この事は、BSPの肝とり込みに carrier mediated transport が関与するという数々の報告(10, 11, 15, )、更に KCN や DNP 等の代謝阻害剤によって肝浮遊細胞へのとり込みが阻害を受ける事\*(114)により、この transport 系が active transport によっていると考えると説明がつく。そこで、何倍の free 濃度の差が生じているのかを計算してみよう。Montandonら(112)の constant infusion の data より、steady state 2 の血中濃度は  $9.1 \mu\text{mole/l}$  が得られている。血中 free 濃度 ( $C_f$ ) と total 濃度 ( $C_t$ ) には、次の関係がある。

$$C_t = \frac{n_1 K_1 \cdot C_f}{1 + K_1 \cdot C_f} + \frac{n_2 K_2 \cdot C_f}{1 + K_2 \cdot C_f} + C_f$$

ここで、 $n_i, K_i$  のパラメーターは、Table XV に示す実測値である。この式より、 $C_t = 9.1 \mu\text{M}$  の時

\* 一斉、Schneufelら(115)によつて、Antimycin A, rotenone 等の影響を受けないという報告もある。

の  $C_f$  値を求めると、 $C_f = 0.87 \times 10^{-3} \mu M$  が得られる。一方、肝中の全濃度  $C_t = 9.1 \times 7.6 = 69 \mu M$  の時の、肝中 free 濃度を求めると、table XV のパラメータを用い、同様の方法で  $C_f = 0.033 \mu M$  が得られる。即ち、free の濃度としては、

Liver/plasma = 39 の比で、濃度分布があると考えなければ説明できない。この free の濃度比を形成する原因が、形質膜中の carrier の膜の内外での BSP に対する affinity の差にある(119) と考えると、この比そのものも当然、濃度 dependent な値であると考えなければならぬ。

しかし現在の所、これに関する定量的情報が得られないので、まずは、この値を constant と考えて考察をすすめる。従って、以後は free の濃度の分配比 39 を用い、肝における  $K_p$  値を定めるものは、plasma 及び肝上清蛋白との結合であると考え。従って  $K_p$  値は、濃度 dependent な値となり、通常の physiological model と異なり、一定値ではない。この  $K_p$  値は、本計算の中では、関数副プログラム FUNCTION

RSQ(CTI)\* を用いて肝中濃度に応じて計算する。

速度パラメーター

胆汁排泄に関する QK<sub>3</sub> ----- Montandonら

(112) の BSP を constant infusion をし、steady state 時の胆汁排泄速度を体重当りに換算をして用いた。即ち、

$$v = \text{steady state 時の胆汁排泄速度} \\ = QK_3 \cdot V_2 \cdot C_2(\text{steady state}) \quad \text{----- eq. 1}$$

eq. 1 に おいて  $v = 64 \text{ nmol/min}$ ,

$V_2 = 14.5 \text{ ml}$ ,  $C_2(\text{steady state}) = 25 \text{ nmol/ml}$  を用い、

$$QK_3 = \frac{v}{V_2 \cdot C_2} = 0.18 \text{ min}^{-1} \text{ を計算した。}$$

胆汁流速 QK<sub>4</sub> ----- 実測値  $0.009 \text{ ml/min}$  を用いた。

Intox. においては、 $0.0085 \text{ ml/min}$  を用いた

(Table XV-1)

unknown disposition QK<sub>2</sub> ----- 胆汁中への総回

$$\text{収率} = \frac{QK_2}{QK_2 + QK_3} \text{ より計算した。}$$

\* Appendix 参照

腎クリアランス  $QK_5$  -----  $QK_3$  と同様に考え、

Montandonらの data より計算した。但し、  
クリアランスで表現した。  $QK_5 = \frac{\text{腎排泄速度}}{C_7(\text{steady state})}$

## ② Computer Analysis

Fig. 56 に示す Model において、各コンパートメントについて Mass balance に基づいて、Fig. 59 に示す連立微分方程式が書ける。この連立微分方程式を Runge - Kutta - Gill 法を用いて解く。この数値計算は、日立のライブラリープログラム DRKGN1 を用いた。

## ③ 計算結果

血中消失カーブの simulation Fig. 61-1  
に Control rat での BSP 血中消失 simulation curve と実測値を示した。すべてのパラメータは Table XV に示した Control rat での値を用いた。いわゆる pharmacokinetics のように、最小ス



乗法を用いて、誤差平方和の最も小さくなるようにパラメータを定めるという方法ではないので、完全に実験 data とあう事は難しいが、ほとんどのパラメータを *in vitro* の data より求めた事を考えるとかなりよくあっている。次に Intoxication により確実に変化する事の確かめられたパラメータ、(plasma binding, hepatic cytoplasmic binding, hepatic plasma flow) を使って simulate したものを、Fig. 61-2 に示した。実際の data と大きくおれる事がわかり、Intox による大きな血中消失のおくれは、この3つのパラメータの変化のみでは説明できない事が示された。このおくれを説明する為には、Rowland model で推察したように、 $QK_3$  の変化、或いは、肝へのとり込みが遅くなる事により、膜透過 process が律速になるという事を考えなければ、説明ができない。

パラメータ変化に対する sensitivity この血中濃度 simulation の結果が、パラメータの変化にどの程度 sensitive であるかを調べてみた。まず、plasma Volume (V1) を 11ml から 5ml まで

変化させたが、simulationの結果は程んど同じであった。次に、最も臓器Volumeの大きいMuscleにおいては、 $K$ 値の変動による血中消失curveの変化が大きいと考え、その大きさを変えてsimulateしてみた。その結果をFig. 62に示す。

### $CCl_4$ , Phenobarbital 処理に伴う Initial plasma disappearance rate の変化

既に第1章で述べた様に、 $\gamma$ -G-蛋白のBSP肝とり込みに対する役割について述べたAriasらの至なる判定基準は、各種蛋白誘導剤による蛋白の増加度と、BSP投与2~7min後の血中消失速度定数増加度の対応にあった。更に、今回の結果でも $CCl_4$ による病態動物での $\gamma$ -G-蛋白の変化と、BSPの血中消失速度定数の低下のあいだにも、定性的対応があった。

ここでは、Ariasらが、BSPの肝とり込みの基準としてみているBSP投与後2~7min後のInitial plasma disappearance rateが、これら処理によりどの程度変化するかをsimulateしてみた。

この際、この両処理ともに、蛋白の変化のみならず、肝血流量にも変化を与える事がしられているので、この点も加味して simulate した。

Fig. 63 にその結果を示した。Arias らは、phenobarbital 処理により Initial plasma disappearance rate constant が 25% 増加する事を述べているが、この simulation 結果でも、蛋白の変化 ( $\gamma$ -蛋白量の 2 倍の増加<sup>\*</sup>) と肝血流の変化<sup>\*\*</sup> を考えると、この変化が説明できる。しかしながら、この simulation の結果によると、 $\gamma$ -蛋白の誘導による効果と、肝血流の増加による効果とがほぼ同じ割合で効いていることがわかる。同様に  $\text{CCl}_4$  による影響をこの時間内 (2~8 min) で考えると Initial plasma disappearance rate constant が減少する (Control の 65% になる) 事が計算できるが、強い

<sup>\*</sup> Arias (33) の報告によると、BSP binding method (p 8 参照) により、2 倍に増加する事がしられている。

<sup>\*\*</sup> 条件により、大きなばらつきがあるが、30% ~ 130% の増加がみられている (120)。

Intox.がかかった時のように、Controlの30%にも減少する事は説明できない。

細胞質蛋白結合, 肝血流の影響

このように、Simulation curveの結果より3~8 minの所では、ほぼ直線とみなす事が出来る。この範囲での速度定数を、Initial plasma disappearance rate constant ( $K_1$ )と定義すると、 $K_1$ は、hepatic cytoplasm binding, 及び hepatic plasma flow の両 factor によって影響される事がわかった。この両 factor の寄与率を、Simulation によって見たものを Fig. 64 に示す。

Cytoplasm binding の影響をみる時には、hepatic plasma flow を Control での値  $6.7 \text{ ml/min}$  に保ち、結合定数  $K$  或いは、蛋白量と結合部位の数の積  $n$  を変化させた。又、hepatic plasma flow の影響をみる時には、cytoplasmic binding parameter を Control での値 (Table XV 参照) に保ち、hepatic plasma flow を変化させた。Fig. 64 に示されるように、cytoplasmic binding は、 $K_1$  にかなりの影響を与える事が

わかるがとくにその効果は、蛋白結合が減少  
 する事により顕著にあらわれる。しかし実際に  
 観察されているように、せいぜい2倍(或いは1/2)  
 程度の変化では、 $K_1$ は1/1倍(或いは0.7)の変化  
 が計算された。又、hepatic plasma flow の  
 影響についての Simulation も、flow が低下  
 する方が、 $K_1$ に対する効果が顕著である事  
 を示している。

肝における分配率の Intoxication による変化。

既に“パラメーターの設定”の項で述べたように、  
 細胞質結合蛋白の役割として、肝での分配  
 係数を支配すると考えている。そしてこの分  
 配係数の大小によって、血中消失の速さが  
 影響をうける事を、Fig. 64 の Simulation に  
 よって述べてきた。そこで次に、Intoxication にあ  
 って、この分配係数(RSQ)がどの程度の影響  
 をうけるかを計算したものを、Fig. 65 に示  
 した。RSQ 値は、時間によって変化し、\* Control

\* RSQ 値は、肝中の BSP 濃度により変化するので、  
 当然時間によって変化するわけである。

では、5.5~7.5 であり、Intoxication では、3~4 の値であった。Intoxication により、主に Y.8- 分画との結合が低くなり、その結果、肝での分配係数が約 1/2 に低下する事及び、その結果として、Fig. 65 中の血中消失 Simulation curve で示されるように、BSP の血中消失におくれを生じるわけである。

細胞質蛋白結合によって、BSP の血中消失における dose dependency は説明できるか？

第1章で述べたように、BSP の肝とり込みが、carrier-mediated transport である事のうらづけとして、従来、言われてきた事に、とり込みの飽和 (dose dependency) がある。そこで、この飽和現象が、細胞質の蛋白結合でどの程度、説明ができるものかを知る目的で、BSP の血中消失 curve を dose を変えて simulate し、Klaassen らの生 data と比較した。Fig. 66 の Klaassen の data で示される様に、dose をあげる事により、血中消失の大きな遅れを生じている。しかしながら、Simulation の結果をみ

ると、半減期はあまり変化せず、高 dose における消失のおくれを、細胞質内の蛋白結合で説明する事は、できなかった。

この遅れを説明するには、 $QK_3$  (胆汁排泄速度定数) の dose dependency, 或いは、肝細胞膜透過の速度定数が dose がふえるに従い低下する事より膜透過 process が律速になる (血流にくらべ) 事などを考えなければならぬ。この様に、今回の Model においても、肝とり込み、或いは胆汁排泄過程の飽和現象が示唆されたわけである。

### 胆汁排泄の Simulation

次に、BSP の胆汁排泄の Simulation を行ったものを Fig. 67 に示す。Control の条件を入れて Simulate したものを、curve 1 に示してある。実際の data と非常に良く fit している。しかし、Intoxication の条件 (plasma 結合、肝細胞質蛋白の結合、肝血流、胆汁流量の減少、及び unknown disposition の割合の上昇) を考慮して Simulate したものが curve 2 である。実際に、Intox. による生じる胆汁排泄の大き

な遅れを説明する事はできない。この遅れを説明する意には、既に血中消失の simulation の項でも述べたように、胆汁排泄の速度定数 ( $QK_3$ ) の減少を考慮する必要があると思われる。そこで、 $QK_3$  の値を control の条件 ( $0.18 \text{ min}^{-1}$ ) から、 $0.09 \text{ min}^{-1}$ 、 $0.015 \text{ min}^{-1}$  に下げて、simulate したものを、それぞれ curve 3、curve 4 に示す。確かに、 $QK_3$  を低下すると、実際の胆汁排泄 pattern にかなり近い curve を書く事ができた。

BSP は周知のように、主に、グルタチオン体となって、胆汁排泄される。このように、胆汁排泄のまえに、もうひとつの代謝 process があるにもかかわらず、わらが control においては、この Model で非常に良く simulate できた。これは、おそらく、Montandonら(112)も指摘するように、BSP と BSP 抱合体の、胆汁排泄速度に大きな差がない為とも考えられるが、詳細な事はわからない。Intoxicated rats においては、ラット1個体の持つ、BSP抱合が大きく



低下する事(121)及び、BSPとBSP抱合体で胆汁排泄のcapacityが異なるという報告(122)を併せ考えると、Intoxicationにおける排泄の大きな遅れは、 $QK_3$ の低下のみではなく、代謝の遅れの為に、胆汁排泄capacityの大きいBSP抱合体の割合が少なくなったという原因も考えられる。この事を明らかにする意には、BSPの代謝に関するin vitroのdata集積及び、BSP、BSP抱合体それぞれの胆汁排泄速度パラメータを分別して求める事により、私のKinetic modelの中に、代謝過程をくみこんだmodelを發展させてゆく必要があるだろう。

Fig.56 SCHEMATIC DIAGRAM OF A MODEL FOR BSP DISPOSITION

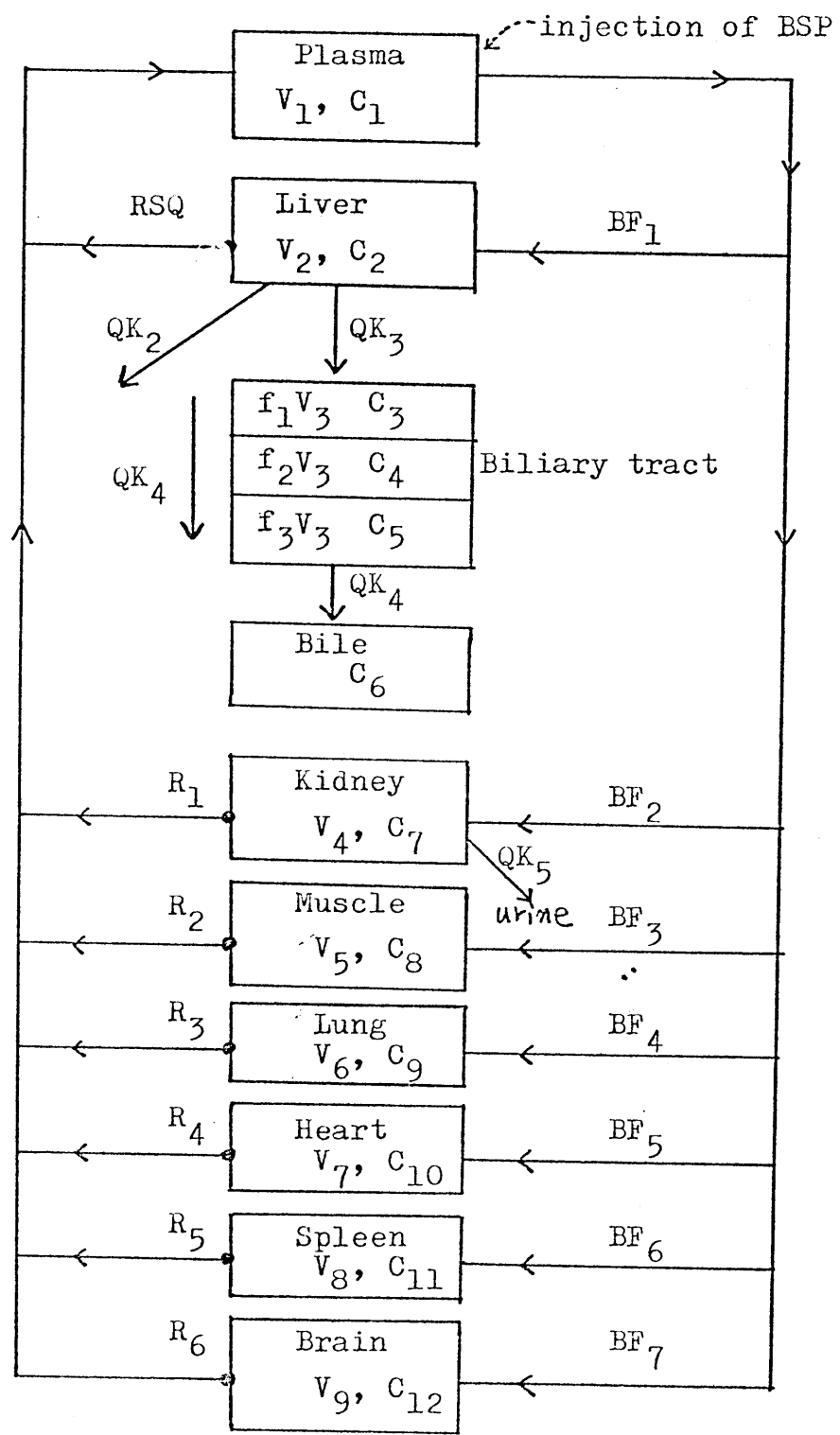
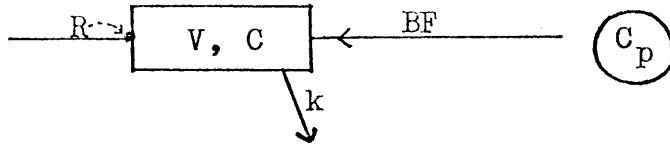


Fig.57 HOW TO DETERMINE THE "ACTUAL " TISSUE-TO-VEINOUS PLASMA CONCENTRATION(R) FROM in vivo DATA

1) Constant infusion

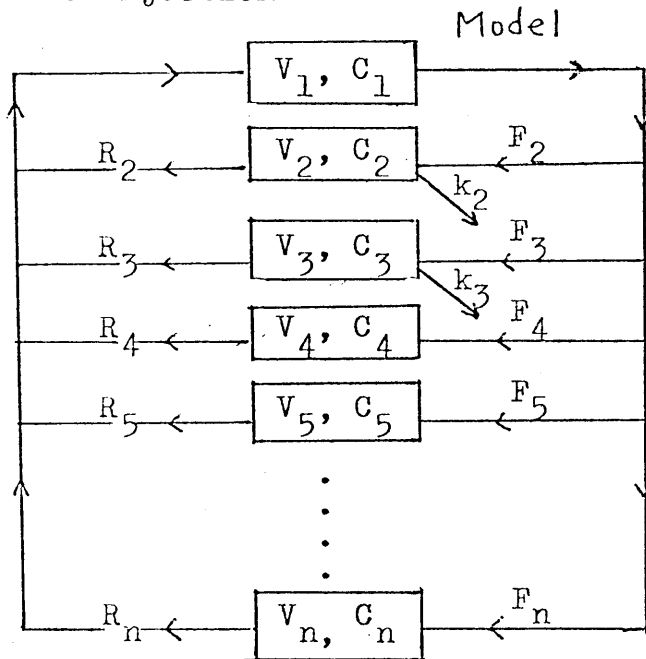


$$V(dC/dt) = BF(C_p - C/R) - kVC$$

at steady state ,  $V(dC/dt) = 0$       $R = BF C / (BF C_p - kVC)$  eq.1

When  $kVC \ll BF C_p$ , eq.1 reduces to  $R = C/C_p$ . Thus, when there is no excretion from the tissue, the "actual" tissue-to-plasma ratio(R) can be the same as the tissue-to-peripheral plasma ratio, "peripheral plasma" meaning the well-mixed plasma peripheral to the tissue(in the large veins, heart and arteries).

2) Pulse injection



- C; concentration
- V; volume
- F; plasma flow
- R; " actual " tissue-to-plasma ratio
- k; rate constant

Compartment 1 is plasma pool  
 と考え、他の compartment は  
 他の tissue と考えよ。k12  
 Compartment 2, 3 の clearing  
 Capacity を表すとすよ

Compartment 理論 (線型) に従うと、

$$C_1 = C_{plasma} = A_1 e^{-\lambda_1 t} + A_2 e^{-\lambda_2 t} + A_3 e^{-\lambda_3 t} + \dots + A_n e^{-\lambda_n t}$$

$$C_{tissue} = A_{t11} e^{-\lambda_1 t} + A_{t12} e^{-\lambda_2 t} + A_{t13} e^{-\lambda_3 t} + \dots + A_{t1n} e^{-\lambda_n t}$$

で示すれよ 但し  $\lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3 < \dots < \lambda_n$  とすよ

従って十分に時間がたつた時の plasma と tissue の濃度比  $R_{app}(=C_{tissue}/C_{plasma})$  は、次式で示される。

$$R_{app} = A_{t11}/A_1 \quad \text{eq.2}$$

Model 図において各コンパートメントについて、Mass balance に基づく連立微分方程式をつくり、Laplace 変換を利用して解く(103)。

$$\Delta = \begin{vmatrix} s + \frac{F_2 + F_3 + \dots + F_n}{V_1} & -\frac{F_2}{R_2 V_1} & -\frac{F_3}{R_3 V_1} & \dots & -\frac{F_n}{R_n V_1} \\ \frac{F_2}{V_2} & -(s + \frac{F_2}{R_2 V_2} + k_2) & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \frac{F_3}{V_3} & 0 & -(s + \frac{F_3}{R_3 V_3} + k_3) & 0 & \dots & 0 \\ \frac{F_4}{V_4} & 0 & 0 & -(s + \frac{F_4}{R_4 V_4}) & 0 & \dots & 0 \\ \cdot & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \frac{F_n}{V_n} & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & -(s + \frac{F_n}{R_n V_n}) \end{vmatrix}$$

$\Delta=0$  の根を、 $-d_1, -d_2, -d_3, \dots, -d_n$  とす (  $d_1 < d_2 < d_3 < \dots < d_n$  )

< つづき >

F-75

$$\begin{aligned}\Delta_{1,1} &= (s + \frac{F_2}{R_2 V_2} + k_2)(s + \frac{F_3}{R_3 V_3} + k_3)(s + \frac{F_4}{R_4 V_4}) \dots (s + \frac{F_n}{R_n V_n}) \\ \Delta_{1,2} &= \frac{F_2}{V_2} (s + \frac{F_3}{R_3 V_3} + k_3)(s + \frac{F_4}{R_4 V_4}) \dots (s + \frac{F_n}{R_n V_n}) \\ \Delta_{1,3} &= \frac{F_3}{V_3} (s + \frac{F_2}{R_2 V_2} + k_2)(s + \frac{F_4}{R_4 V_4}) \dots (s + \frac{F_n}{R_n V_n}) \\ \Delta_{1,n} &= \frac{F_n}{V_n} (s + \frac{F_2}{R_2 V_2} + k_2)(s + \frac{F_3}{R_3 V_3} + k_3)(s + \frac{F_5}{R_5 V_5}) \dots (s + \frac{F_{n-1}}{R_{n-1} V_{n-1}})\end{aligned}$$

例えば、plasma (C<sub>1</sub>) と tissue 2 (C<sub>2</sub>) の間の濃度比を考えると

$$\begin{aligned}R_{app} = A_{t11}/A_1 &= \frac{\Delta_{1,2} \text{ 中の } s \text{ を } -\alpha_1 \text{ におきかえる}}{\Delta_{1,1} \text{ 中の } s \text{ を } -\alpha_1 \text{ におきかえる}} \\ &= \frac{F_2}{(k_2 - \alpha_1)V_2 + F_2/R_2} \quad \text{eq. 3}\end{aligned}$$

従って、一般的に、十分な時間を経たあとの、  
R<sub>app</sub> は、次頁の ように 整理 できる。

1) Clearing Capacityのない tissue においては.

$$R = \frac{F \cdot R_{app}}{F + \alpha_1 \cdot R_{app} \cdot V} \quad \text{eq.4}$$

if  $F \gg \alpha_1 \cdot R_{app} \cdot V$  ならば

$$R = R_{app}$$

一般的に、 $R_{app}, V$  の大きな tissue では、上の仮定は成立せず、この時は、 $R < R_{app}$  となる

2) Clearing Capacityのある tissue においては.

$$R = \frac{F \cdot R_{app}}{F - R_{app} \cdot (k - \alpha_1) \cdot V} \quad \text{eq.5}$$

if  $F \gg R_{app} \cdot (\alpha_1 - k) \cdot V$  ならば

$$R = R_{app}$$

1), 2) の場合ともに、血中消失 curve の  $\beta$ -phase より、 $\alpha_1$  を求めれば、 $R_{app}, F, V, k$  の値より、 $R$  の計算が可能である

Table XV-1 MODEL PARAMETERS FOR 300 g RAT

Tissue	Volume(V) (ml)	Plasma flow(BF) (ml/min)	Partition Ratio(R)	Rate Const. or Clearance (QK)
Plasma	11			
Liver	14.5	6.7(5.0)*	5.5~7.6** (3.0~4.0)	QK <sub>2</sub> =0.03 (min <sup>-1</sup> ) QK <sub>3</sub> =0.18 (min <sup>-1</sup> )
Biliary tract	0.08 f <sub>1</sub> =f <sub>2</sub> =f <sub>3</sub> =0.33			QK <sub>4</sub> =0.009 (0.0085) (ml.min <sup>-1</sup> )
Kidney	2.6	5.0	2.5	QK <sub>5</sub> =0.0024 (ml.min <sup>-1</sup> )
Muscle	165.0	3.1	0.054	
Lung	1.6	0.9	0.22	
Heart	1.3	1.9	0.17	
Spleen	1.1	0.67	0.15	
Brain	1.6	0.5	0.015	

\* Number in parenthesis is that in the intoxicated rats.

\*\* See details in the text.

Table XV-2 BINDING PARAMETERS FOR SIMULATION OF BSP TRANSPORT

	Plasma		X-fraction		Y-fraction		Z-fraction	
	Control	Intox	Control	Intox	Control	Intox	Control	Intox
$K_1$ (mL/ $\mu$ mole)	36000	38000			7800	4300	2500	400
$K_2$ (mL/ $\mu$ mole)	820	200			800	320	400	100
$n_1$ ( $\mu$ mole/ml)	0.28	0.20			0.20	0.15	0.1	0.08
$n_2$ ( $\mu$ mole/ml)	0.85	1.17			0.32	0.25	0.1	0.06
$q$ (linear binding parameter)			100	75				

\* BSPのX-fraction. 1の結合は. non-specific と考えらるゝので、ゲル内での結果 (Fig. )より、X-fraction, Y-fraction, 1の結合比が、おりに、 $q$ も定めた。

\*\* BSP conc. bound to plasma ( $C_{bp}$ ) =  $\sum_{i=1}^2 (n_{pi} \cdot K_{pi} \cdot C_f) / (1 + K_{pi} \cdot C_f)$

BSP conc. bound to X-fraction, =  $q \cdot C_f \cdot \sum_{i=1}^2 (C_{bx})$

BSP conc. bound to Y-fraction, =  $\sum_{i=1}^2 (n_{yi} \cdot K_{yi} \cdot C_f) / (1 + K_{yi} \cdot C_f)$

BSP conc. bound to Z-fraction, =  $\sum_{i=1}^2 (n_{zi} \cdot K_{zi} \cdot C_f) / (1 + K_{zi} \cdot C_f)$

Plasma conc. of BSP ( $C_p$ ) =  $C_f + C_{bp}$  , Cytosol conc. of BSP ( $C_{cyt}$ ) =  $(q+1)C_f + C_y + C_z$



Fig.58 SIMULATION OF BSP BINDING TO PLASMA AND HEPATIC CYTOSOL BASED ON THE BINDING PARAMETERS DEPICTED IN Table XV.

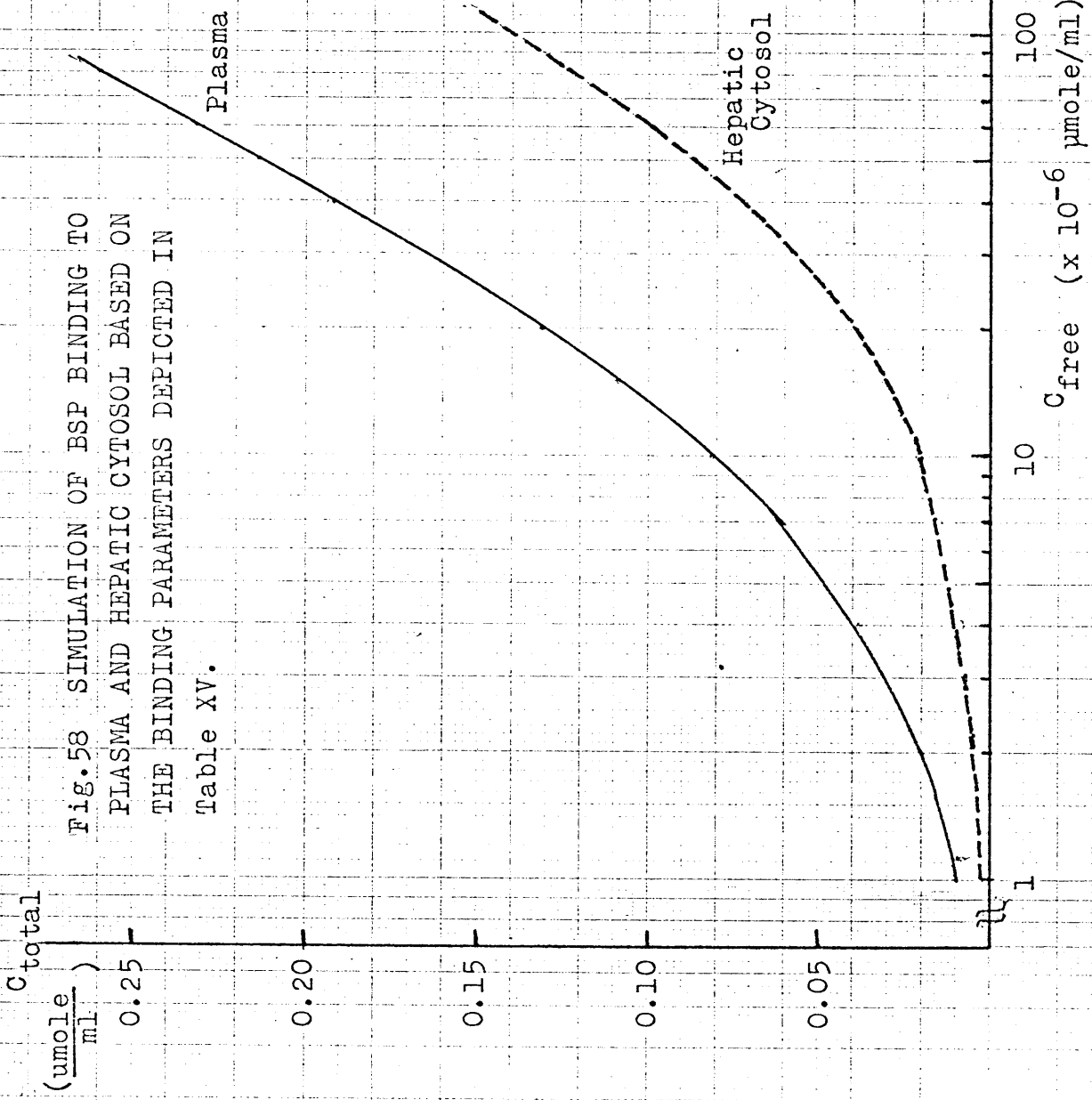


Fig.59 MASS DIFFERENTIAL EQUATIONS

The notation used in the model(Fig.56) is as follows.

- V: Volume
- f: Volume of bile in the bile duct as a fraction of the total bile volume,  $V_3$ .
- C: Concentration or amount of BSP( Amount,  $C_6$  only)
- BF: Plasma flow
- QK: Rate constant or clearance( Clearance,  $QK_5$ ,  $QK_4$ (bile flow))
- R: Tissue to venous plasma concentration ratio of BSP
- RSQ : Hepatic tissue to hepatic venous plasma concentration ratio of BSP

The complete set of mass balance equations for the various anatomical body regions can be written as follows.

Plasma:

$$V_1(dC_1/dt) = -(BF_1+BF_2+BF_3+BF_4+BF_5+BF_6+BF_7) \cdot C_1 + \\ BF_1 C_2/RSQ + BF_2 C_7/R_1 + BF_3 C_8/R_2 + BF_4 C_9/R_3 + \\ BF_5 C_{10}/R_4 + BF_6 C_{11}/R_5 + BF_7 C_{12}/R_6 + Dose \cdot g(t)$$

The last term represents an injection into the vascular system.  $g(t)$  is a normalized injection function as described by Dedrick and Bischoff(195).

$$g(t) = 30\lambda(\lambda t)^2(1-\lambda t)^2$$

, where  $\lambda$  ( $2 \text{ min}^{-1}$ ) is the reciprocal of injection duration.

Liver:

$$V_2(dC_2/dt) = BF_1(C_1 - C_2/RSQ) - (QK_2 + QK_3) \cdot V_2 C_2$$

<つづき>

F-81

Biliary tract:

$$f_1 V_3 (dC_3/dt) = QK_3 V_2 C_2 - QK_4 C_3$$

$$f_2 V_3 (dC_4/dt) = QK_4 (C_3 - C_4)$$

$$f_3 V_3 (dC_5/dt) = QK_4 (C_4 - C_5)$$

Bile:

$$dC_6/dt = QK_4 C_5$$

Kidney:

$$V_4 (dC_7/dt) = BF_2 (C_1 - C_7/R_1) - QK_5 C_7$$

Muscle:

$$V_5 (dC_8/dt) = BF_3 (C_1 - C_8/R_2)$$

Lung:

$$V_6 (dC_9/dt) = BF_4 (C_1 - C_9/R_3)$$

Heart:

$$V_7 (dC_{10}/dt) = BF_5 (C_1 - C_{10}/R_4)$$

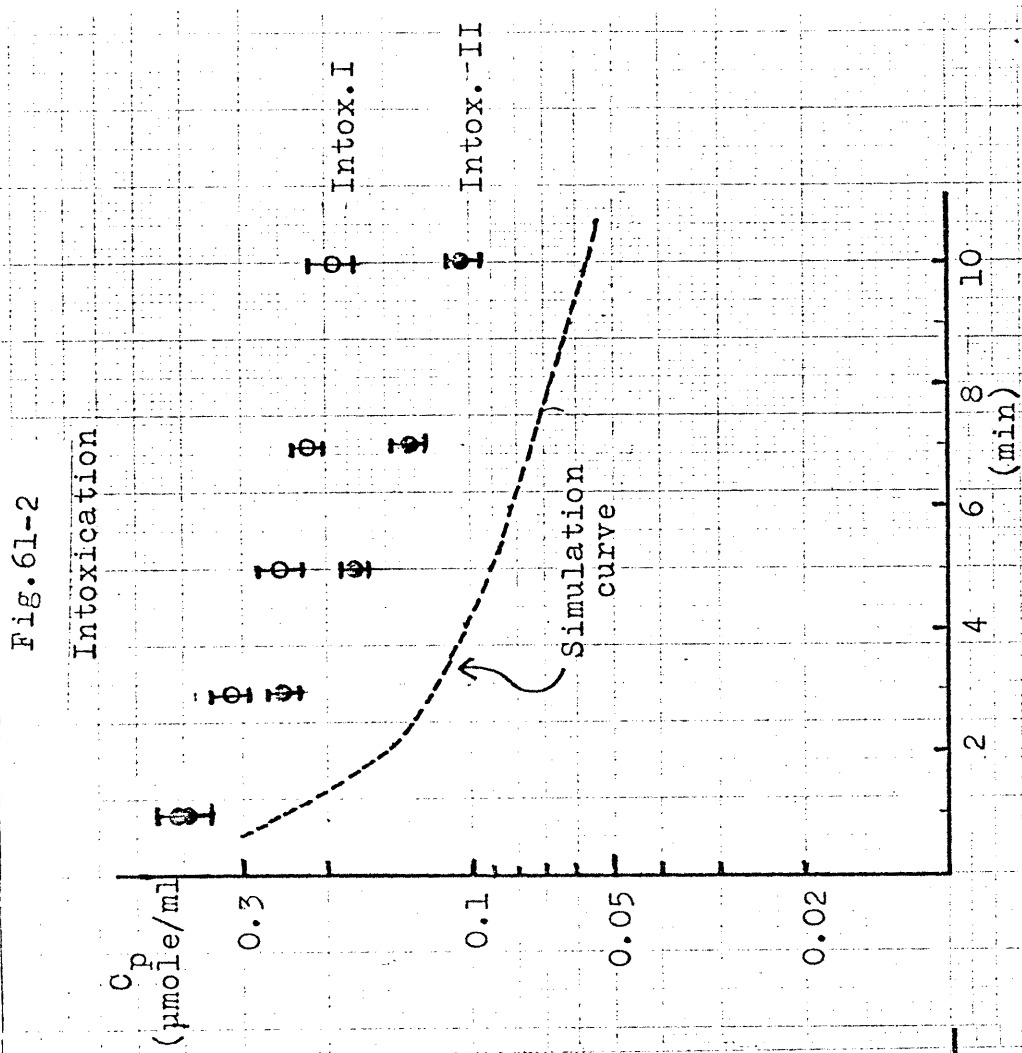
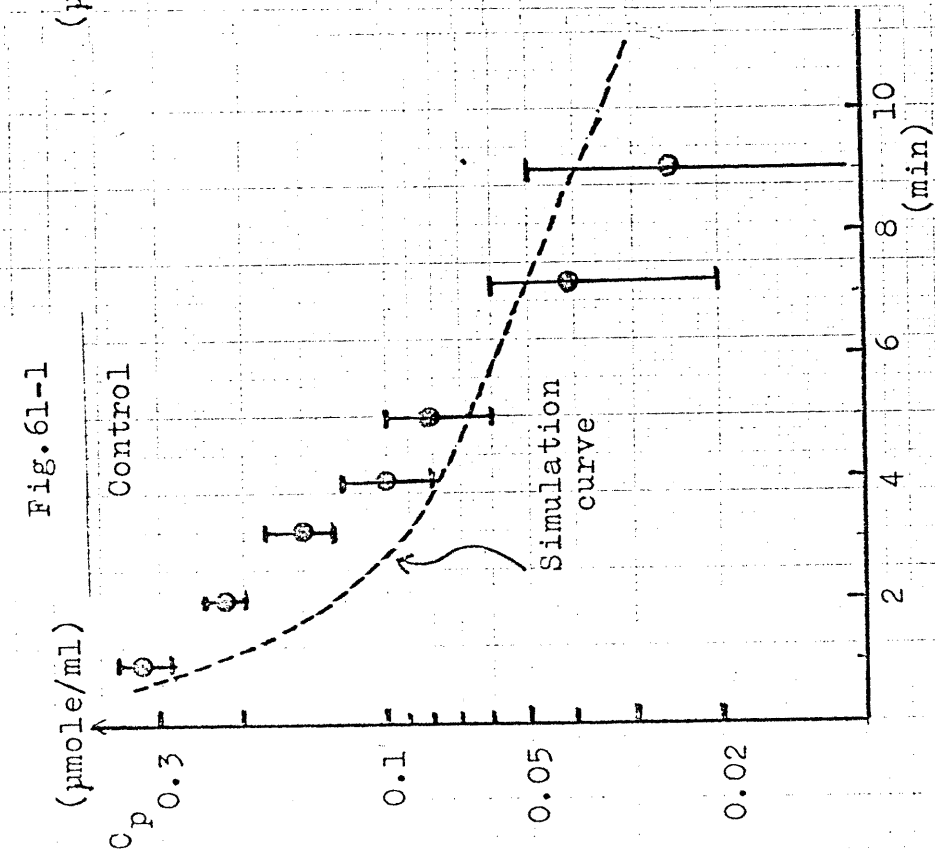
Spleen:

$$V_8 (dC_{11}/dt) = BF_6 (C_1 - C_{11}/R_5)$$

Brain:

$$V_9 (dC_{12}/dt) = BF_7 (C_1 - C_{12}/R_6)$$

Fig. 61 SIMULATION OF PLASMA DISAPPEARANCE CURVE OF BSP  
(Dose=6  $\mu$ mole)



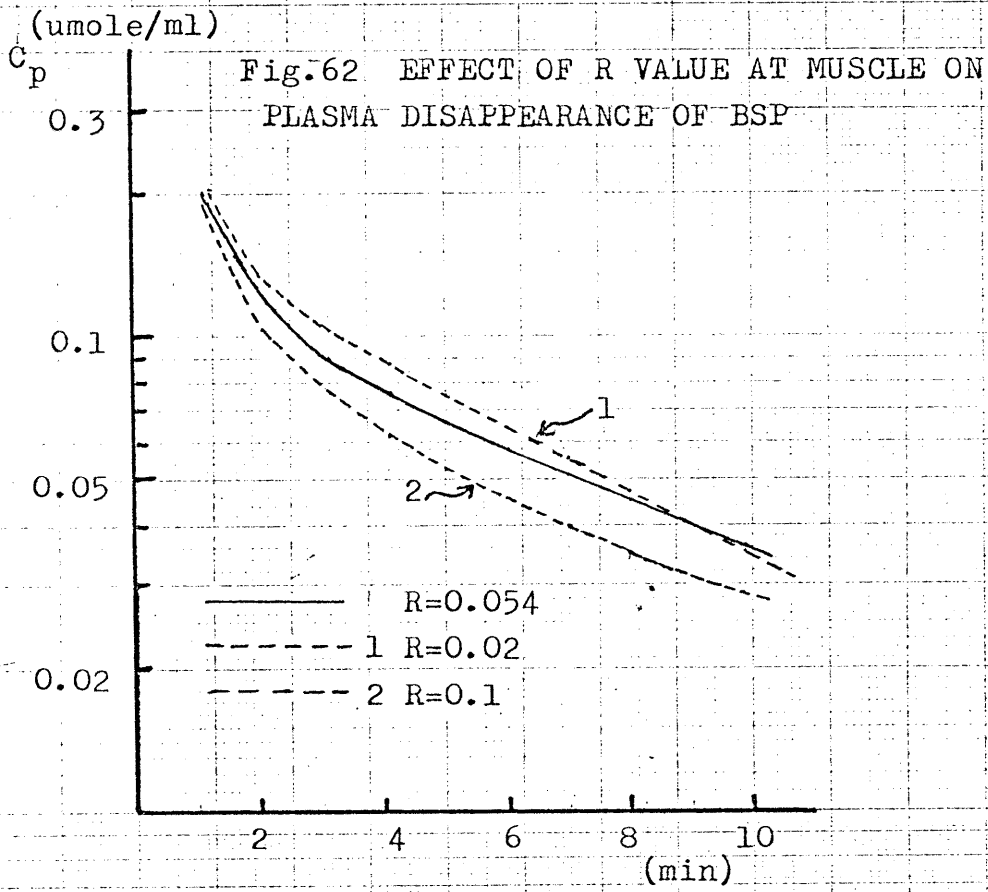
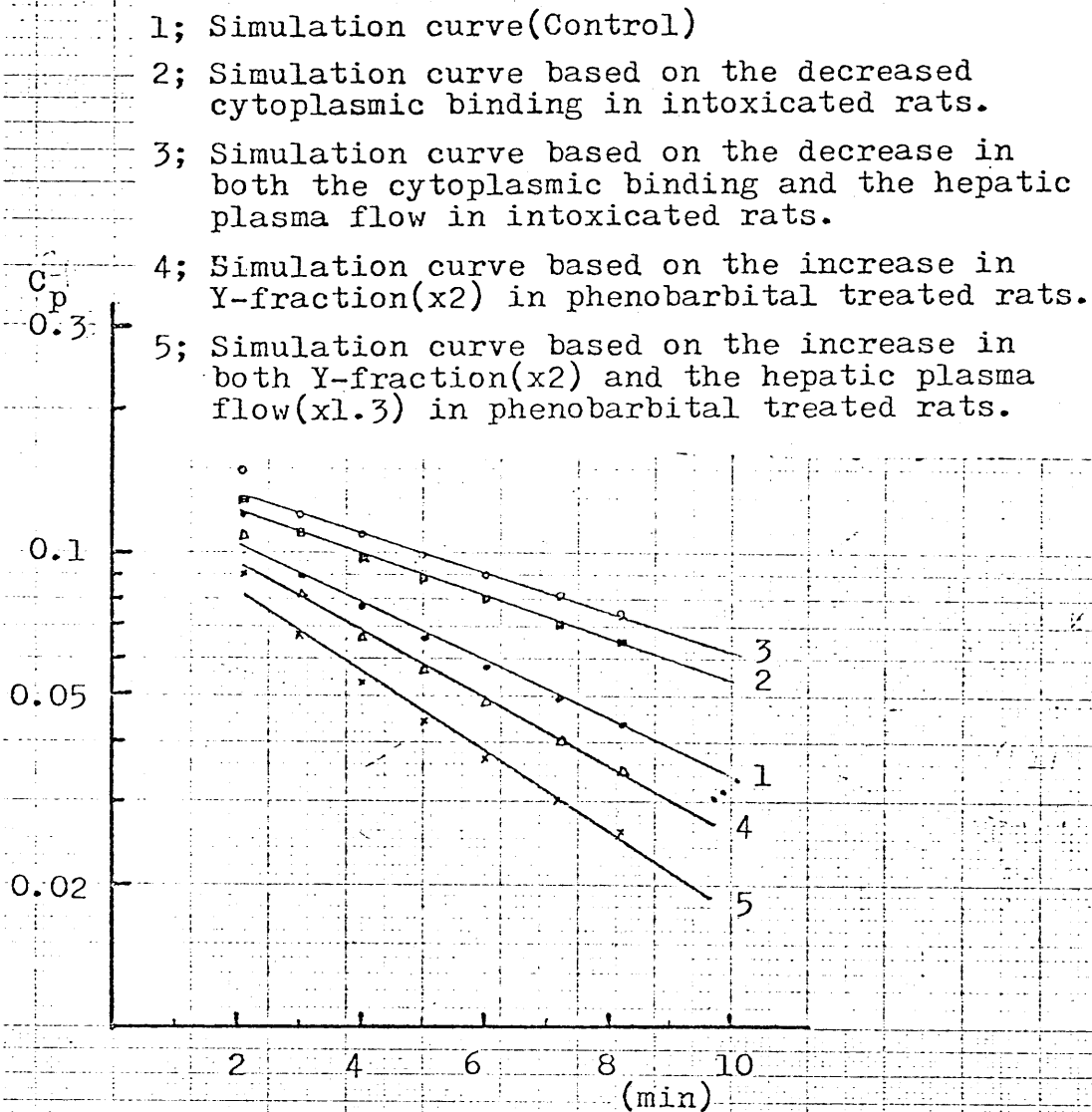


Fig.63 EFFECT OF TREATMENT BY  $\text{CCl}_4$  AND PHENOBARBITAL ON PLASMA DISAPPEARANCE CURVE OF BSP



F-85

Fig.64 EFFECT OF CYTOPLASMIC BINDING AND HEPATIC PLASMA FLOW ON THE PLASMA DISAPPEARANCE CURVE OF BSP

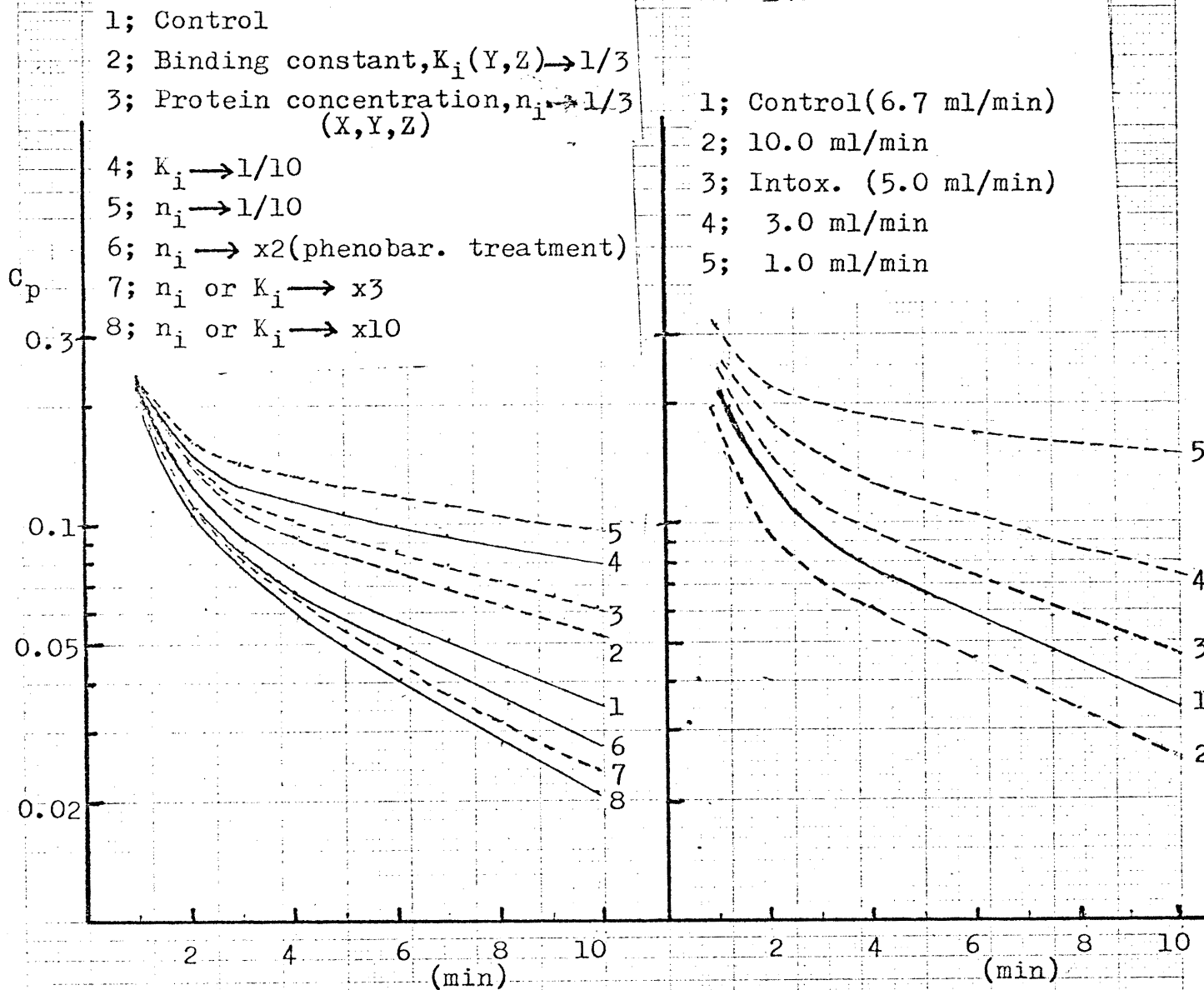


Fig.65 NON-LINEARITY OF RSQ VALUE

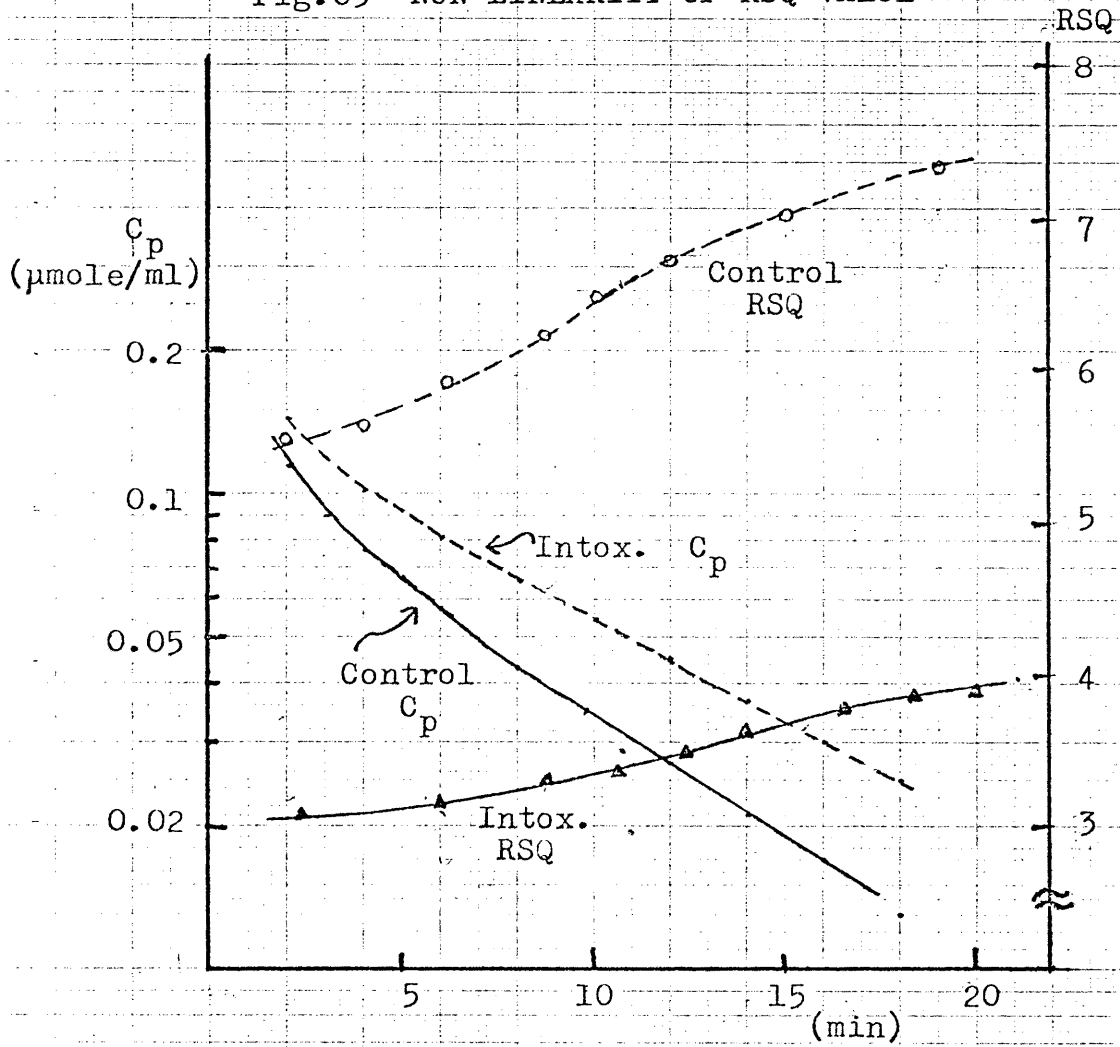




Fig.66 SIMULATION OF DOSE DEPENDENCY OF PLASMA  
DISAPPEARANCE CURVE OF BSP

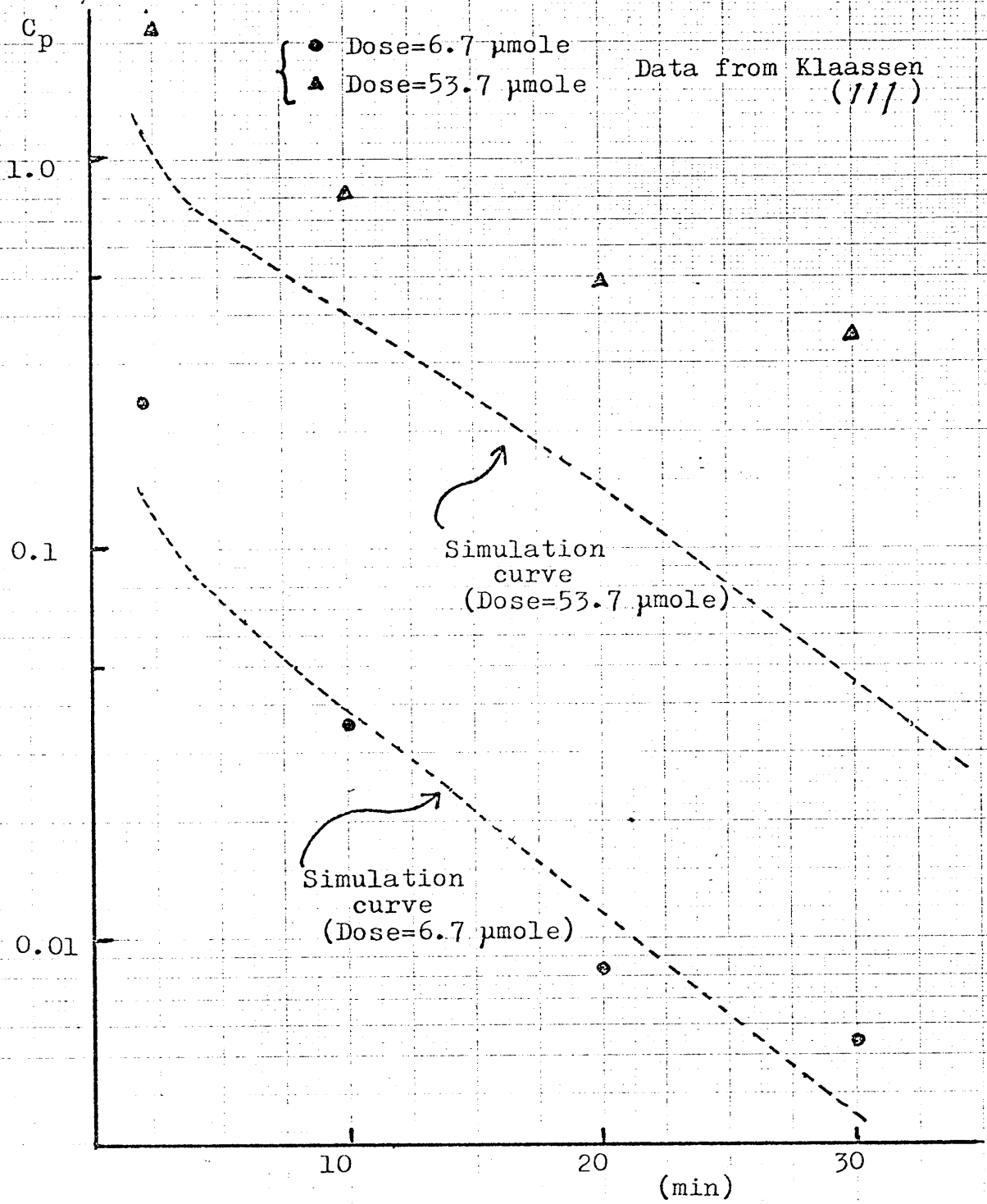
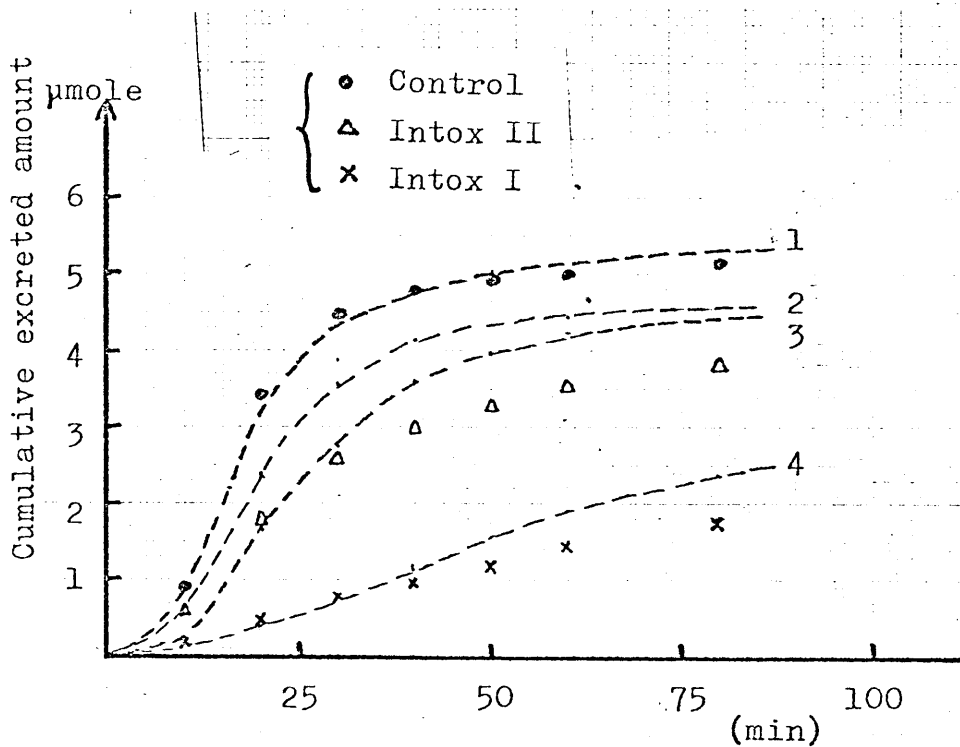


Fig.67 SIMULATION OF BILIARY EXCRETION OF BSP

- 1; Simulation curve(Control)
- 2; Simulation curve based on the decrease in plasma, cytoplasmic binding, hepatic plasma flow and bile flow rate, and the increase in the unknown disposition ratio,  $(QK_2/(QK_2+QK_3))$ .
- 3; Simulation curve(Condition 2, + decreased rate constant,  $QK_3(=0.09 \text{ min}^{-1})$  )
- 4; Simulation curve(Condition 2, + decreased rate constant,  $QK_3(=0.015 \text{ min}^{-1})$  )



## REFERENCES

- 1) Jablonski, P. and Owen, J.A. The clinical chemistry of BSP and other cholephilic dyes. in Advances in Clinical Chemistry, Vol.12 (Ed. Bodansky, O. and Stewart, C.P.). Academic Press, New York and London (1969) pp.309-386
- 2) Grodsky, G.M., Carbone, J.V., and Fanska, R., Biosynthesis of bromsulphophthalein mercaptide with glutathione. Proc.Soc. Exptl.Biol.Med. 106,526(1961)
- 3) Combes, B., and Stakelum, G.S., Conjugation of bromsulphophthalein with glutathione in thioether linkage in the rat. J.Clin. Invest. 39,1214(1960)
- 4) Schoenfield, L.J., Foulk, W.T., and Butt, H.R., Studies of sulfobromophthalein sodium metabolism in Man. I. In normal subjects and patients with hepatic diseases. J.Clin.Invest. 43,1409(1964)
- 5) Whelan, G., Hoch, J. and Combes, B., A direct assessment of the importance of conjugation for biliary transport of sulfobromophthalein sodium. J.Lab.Clin.Med. 75,542(1970)
- 6) Whelan, G. and Combes, B., Competition by unconjugated and conjugated sulfobromophthalein sodium (BSP) for transport into bile, evidence for a single excretory system. J.Lab. Clin.Med. 78,230(1971)
- 7) Yam, J., Reeves, M. and Roberts, R.J., Comparison of sulfobromophthalein and sulfobromophthalein glutathione disposition under conditions of altered liver function and in the isolated perfused rat liver. J.Lab.Clin.Med. 87,373(1976)
- 8) 伊賀立二, 胆汁排泄の速度論的研究, 博士論文(1972), 東京大学薬学部
- 9) Goresky, C.A., The hepatic uptake and excretion of sulfobromophthalein and bilirubin. Can.Med.Assoc.J. 92,851(1965)

- 10) Goresky, C.A. Initial distribution and rate of uptake of sulfobromophthalein in the liver. *Am.J.Physiol.* 207, 13 (1964)
- 11) Hunton, D.B., Bollman, J.L. and Hoffman, H.N. The plasma removal of indocyanine green and sulfobromophthalein: effect of dosage and blocking agents. *J.Clin.Invest.* 40, 1648 (1961)
- 12) Paumgartner, G., Probst, P., Kraines, R. and Leevy, C.M. Kinetics of indocyanine green removal from the blood. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 170, 134 (1970)
- 13) Leevy, C.M., Smith, F., Longueville, J., Paumgartner, G. and Howard, M.M. Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry. *J.Am. Med.Assoc.* 200, 236 (1967)
- 14) Goresky, C.A. The hepatic uptake process: its implications for bilirubin transport. In *Jaundice*. Goresky, C.A. and Fisher, M.M., editors. Proceedings of the Second International Symposium of the Canadian Hepatic Foundation. Plenum Press, New York.
- 15) Scharschmidt, B.F., Waggoner, J.G. and Berk, P.D. Hepatic Organic Anion Uptake in the Rat. *J.Clin.Invest.* 56, 1280 (1975)
- 16) Schanker, L.S., in *Handbook of Physiology, Alimentary Canal*, Section 6, Vol. 5., American Physiological Society, Washington, D.C., p2433 (1968)
- 17) Preisig, R., in *Liver and Drugs* (Eds; Orlandi, F. and Jezequel, A.M.), Academic Press, London and New York, p107 (1972)
- 18) 大屋文彦, 大屋敬彦. 肝細胞のICG色素の取り込み, *肝臓*. 17, 885 (1976)
- 19) Berthelot, P. and Billing, B., Effect of bunamiodyl on hepatic uptake of sulfobromophthalein in the rat. *Amer.J.Physiol.* 211, 395 (1966)

- 20) Hammaker, I. and Schmidt, R. Interference with bile pigment uptake in the liver by flavaspidic acid. *Gastroenterology*, 53, 31 (1967)
- 21) Hanzon, V. Liver cell secretion under normal and pathologic conditions studied by fluorescence microscopy on living rats. *Acta. Physiol. Scand.* 28, suppl. 101, 1-268 (1952)
- 22) Mendeloff, A. Fluorescence of intravenously administered rose bengal appears only in hepatic polygonal cells. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 70, 556 (1949)
- 23) Andrews, W.H.H. and Rio Lozano, I.D. Some factors affecting the passage of sulfobromophthalein into and out of hepatic parenchymal cells. *Quart. J. Exptl. Physiol.* 46, 238 (1961)
- 24) Brauer, R.W., Pessotti, R.L. and Krebs, J.S. The distribution and excretion of S<sup>35</sup>-labeled sulfobromophthalein-sodium administered to dogs by continuous infusion. *J. Clin. Invest.* 34, 35 (1955)
- 25) Takada, K., Ueda, M., Ohno, M. and Muranishi, S. Biopharmaceutical study of the hepato-biliary transport of drugs. II. Roles of the liver cytoplasmic Y and Z binding proteins and T binder on the hepato-biliary transport of organic anion compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 22, 1477 (1974)
- 26) Levi, A.J., Gatmaitan, Z., and Arias, I.M. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. Clin. Invest.* 48, 2156 (1969)
- 27) Arias, I.M. Transfer of bilirubin from blood to bile. *Seminars in hematology.* 9, 55 (1972)
- 28) Fleischner, G., Robbins, J. and Arias, I.M. Immunological studies of Y-protein. *J. Clin. Invest.* 51, 677 (1972)

- 29) Ockner, R.K. and Manning, J.A. Fatty acid-binding protein in small intestine: Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J.Clin. Invest.* 54,326(1974)
- 30) Kamisaka, K., Listowsky, I., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Interaction of bilirubin and other ligands with ligandin. *Biochemistry*, 14,2175(1975)
- 31) Kamisaka, K., Listowsky, I., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Circular dichroism analysis of the secondary structure of Z-protein and its complexes with bilirubin and other organic anions. *Biochim.Biophys.Acta.* 393,24(1975)
- 32) Reyes, H., Levi, A.J., Gatmaitan, Z., and Arias, I.M. Organic anion-binding protein in rat liver: Drug induction and its physiologic consequence. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 64,168(1969)
- 33) Reyes, H., Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Studies of Y and Z, two hepatic anion binding proteins: Effect of drugs, chemicals, hormones and cholestasis. *J.Clin.Invest.* 50, 2242(1971)
- 34) Arias, I.M. *The liver and its Diseases*(ed. Schaffner, S., Leevy, C.) New York International Medical Book Corp.(1974)
- 35) Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Deficiency of hepatic organic anion-binding protein as a possible cause of non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemia in the newborn. *Lancet*, 2,139(1969)
- 36) Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Deficiency of hepatic organic anion-binding protein, impaired organic anion uptake by liver and "physiologic" jaundice in newborn monkeys. *New.Eng.J.Med.* 283,1136(1970)
- 37) Levine, R.I., Reyes, H., Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Phylogenetic study of organic anion transfer from plasma into the liver. *Nature(London)*, 231,277(1971)

- 38) 神坂和明. ビリルビンのアルブミン, リガニンとの結合とグルタキオントランスフェラーゼ. 蛋白質・核酸・酵素, 22, 292 (1977)
- 39) Cornelius, C.E. and Gronwall, R.R. A mutation in Southdown sheep affecting the hepatic uptake of BSP, indocyanine green rose bengal, sodium cholate and phyllorythrin from blood. Fed.Proc. 24, 144 (1965)
- 40) Whelan, G., Hoch, J., Schenker, S., and Combes, B. Impaired hepatic disposition of BSP in neonatal guinea pigs: Nature of the defect. J.Lab.Clin.Med. 76, 775 (1970)
- 41) Boyer, J.L., Schwartz, J. and Smith, N. Selective hepatic uptake and biliary excretion of S<sup>35</sup>-sulfobromophthalein in marine elasmobranchs: Gastroenterology 70, 254 (1976)
- 42) Boyer, J.L., Schwartz, J. and Smith, N. Biliary excretion in elasmobranchs II. Hepatic uptake and biliary excretion of organic anions. Amer.J.Physiol. 230, 974 (1976)
- 43) Kirsch, R., Fleischner, G., Kamisaka, K. and Arias, I.M. Structural and functional studies of Ligandin, a major renal organic anion-binding protein. J.Clin.Invest. 55, 1009 (1975)
- 44) Ketterer, B. and Whitehead, J.K. FEBS Abstracts, 57 (1965)
- 45) Ketterer, B., Ross-Mansell, P., and Whitehead, J.K. The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethyl-aminoazobenzene. Biochem.J., 103, 316 (1967)
- 46) Baldwin, R.W., Barker, C.R. and Moore, M. Distribution of a basic azo-dye binding protein in normal rat tissues and carcinogen-induced hepatomata. Brit.J.Cancer. 22, 776 (1968)
- 47) Morey, K.S. and Litwack, G. Isolation and properties of cortisol metabolite binding proteins of rat liver cytosol. Biochemistry, 8, 4813 (1969)

- 48) Litwack G., Morey, K.S. and Ketterer, B. Corticosteroid binding proteins of liver cytosol and interactions with carcinogens. In "Effects of drugs on cellular Control Mechanisms" (Rabin, B.R. and Freedman, R.B. Eds.), p105-130. The Macmillan Press Ltd., London and Basingstoke, 1971
- 49) Litwack, G., Filler, R., Rosenfield, S.A., Lichtash, N., Wishman, C.A. and Singer, S. Liver cytosol corticosteroid Binder II, a hormone receptor. J.Biol.Chem. 248,7481(1973)
- 50) Litwack, G., Ketterer, B. and Arias, I.M. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. Nature, 234,466(1971)
- 51) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J.Biol.Chem. 249,7130(1974)
- 52) Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M. and Jakoby, W.B. The identity of glutathione S-transferase B with Ligandin, a major binding protein of liver. Proc.Nat. Acad.Sci, U.S.A. 71,3879(1974)
- 53) Reyes, H., Levi, A.J., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Organic anion-binding protein in rat liver: Drug induction and its physiologic consequence. Proc.Nat.Acad.Sci, U.S.A. 64, 168(1969)
- 54) Kamisaka, K., Listowsky, I., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Circular dichroism analysis of the secondary structure of Z-protein and its complexes with bilirubin and other organic anions. Biochimica.Biophysica.Acta. 393,24(1975)
- 55) Warner, M. and Neims, A.H. Studies on Z-fraction I. Isolation and partial characterization of low molecular weight ligand-binding protein from rat hepatic cytosol. Can.J.Physiol. Pharmacol. 53,493(1975)



- 56) Ketterer, B., Tipping, E. and Hackney, J.F. A low-molecular-weight protein from rat liver that resembles ligandin in its binding properties. *Biochem.J.* 155, 511(1976)
- 57) Ockner, R.K. and Manning, J.A. Fatty acid-binding protein in small intestine: Identification, isolation and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J.Clin. Invest.* 54, 326(1974)
- 58) Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. and Ho, W.K.L. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, 177, 56(1972)
- 59) Ockner, R.K. and Manning, J.A. Fatty acid binding protein: Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. *J.Clin. Invest.* 58, 632(1976)
- 60) Mishkin, S., Stein, L., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: Binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 997(1972)
- 61) Mishkin, S. and Turcotte, R. The binding of long chain fatty acid CoA to Z, a cytoplasmic protein present in rat liver and other tissues of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 918(1974)
- 62) Mishkin, S. and Turcotte, R. Stimulation of monoacetylglycerophosphate formation by Z-protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 376(1974)
- 63) Litwack, G., Morey, K.S. and Ketterer, B. In *Effects of drugs on cellular mechanisms*. Edited by Rabin, B.R. and Freedman, R.B. University Park Press, Baltimore, Md. p105-130(1972)

- 64) 岡 富子, 肝の色素移行に関する研究 ①. 肝排泄能の促進をもたらす薬剤のYおよびZ蛋白に及ぼす影響. 肝臓, 18, 239 (1977)
- 65) Mishkin, S., Stein, L., Fleischner, G., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M. Z protein in hepatic uptake and esterification of long-chain fatty acids. Am. J. Physiol. 228, 1634 (1975)
- 66) Sokoloff, J., Berk, R.N., Lang, J.H. and Lasser, E.C. The role of the Y and Z hepatic proteins in the excretion of radiographic contrast materials. Diagnostic. Radiol. 106, 519 (1973)
- 67) Turner, D.C. and Brandt, L. Quantitative estimation of protein binding site polarity. Fluorescence of N-aryl-aminonaphthalene-sulfonates. Biochemistry. 7, 3381 (1968)
- 68) Stryer, L. Fluorescence spectroscopy of proteins. Science, 162, 526 (1968)
- 69) 関根隆光, 高木俊夫 他, 蛍光測定の実験と生体系への応用, 蛋白質・核酸・酵素 別冊, 共立出版 (1974) pp. 120-149
- 70) Postner, J.F., in the Plasma Proteins, Vol. 1 (Putnam, F.W., Ed.) New York, N.Y., Academic Press (1960), p. 179
- 71) Putnam, F.W. Structure and function of the plasma proteins. in the Proteins Vol. 3 (Neurath, H., Ed.), chapter 14 (1965), pp. 154-267
- 72) Jonas, A. and Weber, G. Presence of arginine residues at the strong hydrophobic anion binding sites of bovine serum albumin. Biochemistry, 10, 1335 (1971)
- 73) Swaney, L.B. and Klotz, I.M. Amino acid sequence adjoining the lone tryptophan of human serum albumin. A binding site of the protein. Biochemistry, 9, 2570 (1970)

- 74) 國分 洩, "蛍光スペクトル, 励起スペクトル, 量子収率の測定".  
'蛍光測定の原理と生体系への応用, 蛋白質・核酸・酵素 別冊  
(共立出版) (1974) pp.43~56
- 75) Chignell, C.F., in *Methods in Pharmacology*, Vol.2 (Chignell, C.F., Ed), Appleton-Century-Crofts, New York, N.Y., (1972), p.33
- 76) Rubalcava, B., Martinez de Munoz, D. and Giltler, C.  
Interaction of fluorescent probes with membranes I. Effect of ions on erythrocyte membranes. *Biochemistry.*, 8, 2742 (1969)
- 77) Klungsoyr, L. Interaction of ANS with Holo- and Apophosphorylase b. Ligand effects, resolution, and reconstitution with pyridoxal 5-phosphate. *Biochemistry*, 13, 1751 (1974)
- 78) Weber, G. and Young, L.B. Fragmentation of Bovine serum albumin by pepsin. I. The origin of the acid expansion of the albumin molecule. *J.Biol.Chem.*, 239, 1415 (1964)
- 79) Wang, J.L. and Edelman, G.M. Fluorescent probes for conformational states of proteins. *J.Biol.Chem.*, 246, 1185 (1971)
- 80) Daniel, E. and Weber, G. Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of ANS. Fluorimetric Titrations. *Biochemistry*, 5, 1893 (1966)
- 81) Par-Lin, Hsu., Joseph, K.H.Ma., Jun, H.W. and Luzzi, L.A.  
Stricture relationship for binding of sulfonamides and penicillins to bovine serum albumin by fluorescence probe technique. *J.Pharm.Sci.*, 63, 27 (1974)
- 82) Jonas, A. and Weber, G. Limited digestion of citraconylated bovine serum albumin with -chymotrypsin. *Biochemistry*, 9, 5092 (1970)
- 83) Baker, K.J. and Bradley, S.E., Binding of sulfobromophthalein sodium by plasma albumin. Its role in hepatic BSP extraction. *J.Clin.Invest.*, 45, 281 (1966)

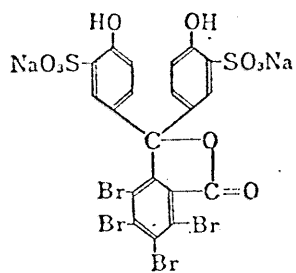
- 84) Davis, B.J., Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci. 121,404(1964)
- 85) Weber, K. and Osborn, M. The reliability of Molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244,4406(1969)
- 86) Halfman, C.J. and Nishida, T. Method for measuring the binding of small molecules to proteins from binding-induced alteration of physical-chemical properties. Biochemistry, 11,3493(1972)
- 87) Ketley, J.N., Habig, W.H. and Jakoby, W.B. Binding of non-substrate ligands to the glutathione S-transferases. J.Biol.Chem. 250,8670(1975)
- 88) 太田 隆久, タニパク質の自然蛍光と高次構造(1974)  
蛋白質・核酸・酵素 別冊, 蛍光測定の原理と生体系への応用, pp150~163
- 89) Levitzki, A., Stallcup, W.B. and Koshland, D.E. Half-of-the-sites reactivity and the conformational states of cytidine triphosphate synthetase. Biochemistry, 10,3371(1971)
- 90) Kamisaka, K., Listowsky, K. and Arias, I.M. Circular dichroism studies of Y-protein(ligandin), a major organic anion binding protein in liver, kidney and small intestine. Ann.N.Y.Acad.Sci., 226,148(1973)
- 91) Lane, s.e. et al., Fed.Proc., Fed.Amer.Soc.Exp.Biol., 30,1074(1974)
- 92) Kamisaka, K., Habig, W.H., Ketley, J.N., Arias, I.M. and Jakoby, W.B. Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. Europ.J.Biochem. 60,153(1975)
- 93) Listowski, I., Kamisaka, K., Ishitani, K. and Arias, I.M. Structure and properties of ligandin. In "Glutathione: Metabolism and Function"(Arias, I.M. and Jakoby, W.B. ed), Raven Press(1976), pp233-242
- 94) Ketterer, B., Tipping, E., Beale, D. and Meuwissen, J.A.T.P. Ligandin, Glutathione transferase, and carcinogen binding. In "Glutathione: Metabolism and Function"(Arias, I.M. and Jakoby, W.B. ed.), Raven Press(1976), pp243-257

- 95) Sugiyama, Y., Iga, T., Awazu, S. and Hanano, M. Studies on ligand binding properties of Z-fraction from rat liver cytosol using 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Chem.Pharm.Bull. 26, in press, (1978)
- 96) Takada, K., Muranishi, S and Sezaki, H. Pharmacokinetics of the hepatobiliary transport of bromphenol blue as a model of organic anion compounds. J.Pharmacokin.Biopharm.2,495(1974)
- 97) Song, C.S., Rubin, W., Rifkind, A.B. and Kappas, A. Plasma membranes of the rat liver. Isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculis. J.Cell.Biol., 41,124(1969)
- 98) Fiske, C.H. and Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorous. J.Biol.Chem., 66,375(1925)
- 99) 横田 雅之, BSP, ICGの肝移行動態, 修士論文(1977)  
東京大学 薬学部
- 100) 橋本 隆, 酵素反応速度論, 共立出版(1971)
- 101) Iga, T., Sugiyama, Y., Yokota, M., Tomono, Y., Awazu, S. and Hanano, M. Pharmacokinetic aspects of BSP transport in chronically carbon tetrachloride-intoxicated rats. Biochem.Pharmacol., 26,1867(1977)
- 102) 大内 和雄, 肝線維症におけるcollagenの動態と肝細胞の関与. 東京大学 薬学部 博士論文
- 103) 花野 学, 栗津 荘司, 薬物体内消長の速度論, 製剤設計法(1), pp356~495, 地人書館(1971)
- 104) 花野 学, 栗津 荘司, 最近のファルマコキネティクスの展開, 医学のあゆみ, 96, 105(1976)
- 105) Dedrick, R.L. and Bischoff, K.B. Pharmacokinetics in applications of the artificial kidney. Chem.Eng.Prog.Symp.Ser., No.84, 64,32(1968)

- 106) Dedrick,R.L., Forrester,D.D. and Ho,D.H.W. In vitro-In vivo correlation of drug metabolism-Deamination of 1- $\beta$ -D-arabino-furanosyl-cytosine. *Biochem.Pharmacol.* 21,1(1972)
- 107) Dedrick,R.L., Zaharko,D.S. and Lutz,R.J. Transport and Binding of Methotrexate in vivo. *J.Pharm.Sci.*,62,882(1973)
- 108) Dedrick,R.L., Animal scale-up. *J.Pharmacokin.Biopharm.* 1,435(1973)
- 109) Benowitz,N., Forsyth,R.P., Melmon,K.L. and Rowland,M. Lidocaine disposition kinetics in monkey and man I. Prediction by a perfusion model. *Clin.Pharmacol.Therap.*,16,87(1974)
- 110) Rowland,M., Benet,L.Z. and Graham,G.G. Clearance concepts in pharmacokinetics. *J.Pharmacokin.Biopharm.*,1,123(1973)
- 111) Klaassen,C.D. Extrahepatic distribution of BSP. *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, 53,120(1975)
- 112) Montandon,B., Roberts,R.J. and Fischer,L.J. Computer simulation of BSP kinetics in the rat using flow-limited models with extrapolation to man. *J.Pharmacokin.Biopharm.*, 3,277(1975)
- 113) Stege,T.E., Loose,L.D. and Luzio,N.R.Di., Comparative uptake of BSP by isolated Kupffer and parenchymal cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 149,455(1975)
- 114) van Bezooijen,C.F.A , Grell,T. and Knook,D.L. BSP uptake by isolated liver parenchymal cells. *BBRC.*,69,354(1976)
- 115) Schwenk,M., Burr,R., Schwartz,L. and Pfaff,E. Uptake of BSP by isolated liver cells. *Europ.J.Biochem.* 64,189(1976)
- 116) Anwer,M.S., Kroker,R. and Hegner,D. Effect of albumin on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Is there a common bile acid carrier?. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 73,63(1976)
- 117) 林 俊輝, エトキニテニズアミドの体内分布, 代謝及び排泄に関する pharmacokinetics. 修士論文, 東京大学薬学部(1976)
- 118) Sasaki,Y., and Wagner,H.N. Measurement of the distribution of cardiac output in unanesthetized rats. *J.Applied.Physiol.*, 30,879(1971)

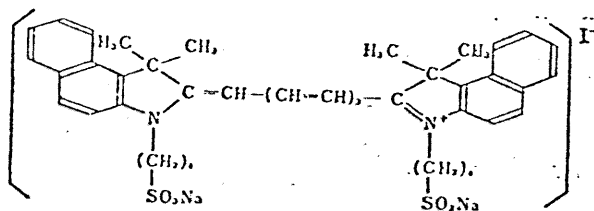
- 119) Stein,W.D. The movement of molecules across cell membranes. Academic Press,Inc., New York. pp126-176(1967)
- 120) Ohnhaus,E.E., Thorgeirsson,S.S., Davies,D.S. and Breckenridge. Changes in liver blood flow during enzyme induction. Biochem.Pharmacol., 20,2561(1971)
- 121) Suyama,A., Sugiyama,Y., Iga,T., Awazu,S. and Hanano,M. Decrease in BSP-conjugation in CCl<sub>4</sub> chronically intoxicated rats. in preparation
- 122) Yam,J., Reeves,M. and Roberts,J. Comparison of BSP and BSP-GSH disposition under conditions of altered liver function and in the isolated perfused rat liver. J.Lab.Clin.Med. 87,373(1976)
- 123) Scatchard,G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann.N.Y.Acad.Sci., 51,660(1949)
- 124) Fletcher,J.E., Ashbrook,D. and Spector,A.A. Computer analysis of drug-protein binding data. Ann.New.York.Acad.Sci., 226,69(1973)
- 125) Fletcher,J.E., Spector,A.A. and Ashbrook,D. Analysis of macromolecule-ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants. Biochemistry. 9,4580(1970)

# Chemical Structure

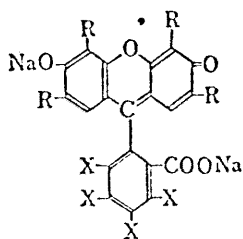


Sulfophthalein dye

Bromsulphthalein (BSP)

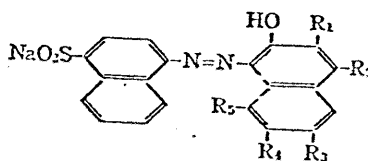


Indocyanine Green  
(ICG)

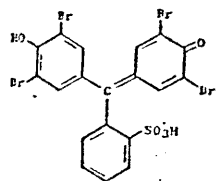


Xanthene dyes

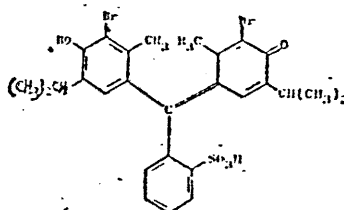
	R	X
Phloxine B (PB)	Br	Cl
Rose Bengal (RB)	I	Cl



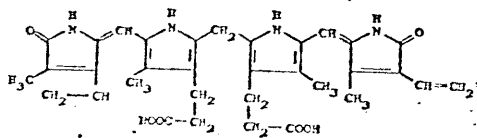
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Amaranth (AM)	SO <sub>3</sub> Na	H	SO <sub>3</sub> Na	H	H
New Coccine (NC)	H	H	SO <sub>3</sub> Na	H	SO <sub>3</sub> Na



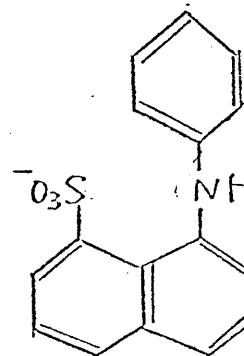
Bromphenol blue (BPB)



Bromthymol blue (BTB)



Bilirubin



ANS



## < Appendix >

### (1) 蛋白結合の解析 program

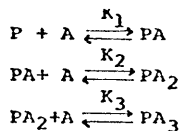
蛋白と Ligand の結合解析をする方法として、Scatchard plot が旧くから用いられている。これは、preexisting independent binding site を仮定した model に立脚して誘導される (123, 124)。一方、必ずしも、preexisting site を仮定する必要のない、しかも種々の cooperative effects の存在する時でも成立する stepwise 結合 model について最近、Fletcher ら (124, 125) が述べている。Fig. 68 は、Scatchard model における intrinsic binding constant ( $k_i$ ) と stepwise model における stepwise binding constant ( $K_i$ ) の関係を簡単に示したものである。わかりやすくする為に、Scatchard model において、 $N_1 = 1$ ,  $N_2 = 2$  の場合 をとりあげ stepwise model と対比した。より一般的な場合の関係、

係は□の中を示してある。本programのフローチャートをFig. 69に示す。まずScatchard modelを仮定し、 $n_i, K_i$ に初期値を与え、非線型最小二乗法により、収束値を求める。 $n_i$ を整数化、最も誤差平方和の小さくなるように、パラメータを定める。こうして得られたScatchard parameter ( $n_i, K_i$ )より、Fig. 68の関係式を用い、stepwise binding constant ( $K_i$ )の初期値を求める。次に、この値を、初期値として、非線型最小二乗法を用い、 $K_i$ の収束値を得る。この流れにそった計算例(BSPとC<sub>10</sub>蛋白質の結合)をTable IIIに示してある。

次頁以降にフォートランで書かれたプログラムの内容をあげた。

Fig. 68

Relationship Of The Stepwise Equilibrium Constants To The Scatchard Binding Constants



(1) Stepwise Model

$$r = \frac{K_1A + 2K_1K_2A^2 + 3K_1K_2K_3A^3}{1 + K_1A + K_1K_2A^2 + K_1K_2K_3A^3}$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n \left[ i \prod_{j=1}^{j=i} K_j A \right]}{1 + \sum_{i=1}^n \left[ \prod_{j=1}^{j=i} K_j A \right]}$$

(2) Scatchard Model ( $N_1=1, N_2=2$ )

$$r = \frac{k_1A}{1+k_1A} + \frac{2k_2A}{1+k_2A}$$

$$\begin{aligned}
 r &= \sum_{i=1}^m N_i \frac{k_i A}{1+k_i A} = \sum_{i=1}^n \frac{Q_i A}{1+Q_i A} \\
 n &= \sum_{i=1}^m N_i
 \end{aligned}$$

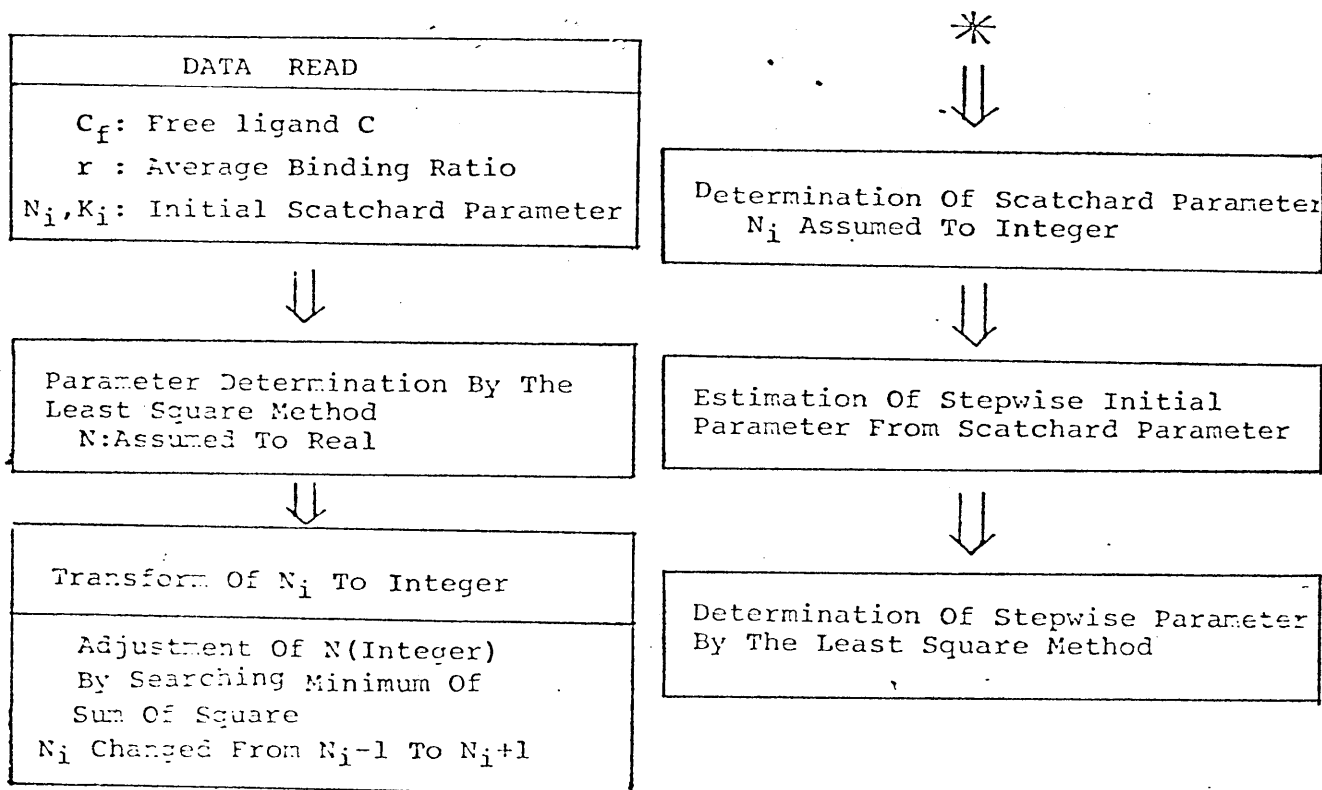
(3)

$$\begin{aligned}
 K_1 &= k_1 + 2k_2 \\
 K_1 K_2 &= k_2 (2k_1 + k_2) \\
 K_1 K_2 K_3 &= k_1 k_2^2 \\
 K_1 &= \frac{k_1 + 2k_2}{k_2} \\
 K_2 &= \frac{k_2 (2k_1 + k_2)}{k_1 + 2k_2} \\
 K_3 &= \frac{k_1 k_2}{2k_1 + k_2}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 C_p &\equiv \prod_{i=1}^p K_i = \sum_{i_1=1}^{n-p+1} \dots \sum_{i_p=i_{p-1}+1}^n Q_{i_1} \cdot Q_{i_2} \dots Q_{i_p} \\
 \therefore K_{p+1} &= \frac{C_{p+1}}{C_p}
 \end{aligned}$$

Fig. 69

Analysis Of Binding Data By Computer



\*

```

ISN          SOURCE STATEMENT
00001      C      ANALYSIS OF PROTEIN BINDING EQUILIBRIUM PROGRAM
00002      LOGICAL LNP(50)
00003      INTEGER TITLE(20),FRM(20)
00004      INTEGER*8 IFCTR
00005      REAL*8 XU,XMIU,P,CX,PM,PMM,EP,DS
00006      DIMENSION XNJ(10),XKJ(10),XU(120),XB(120),XMIU(120),P(50),CX(120)
00007      DIMENSION PM(50),NI(50),IDATE(2),EP(50),PMM(50)
00008      PRINT OF COVER
00009      CALL DATE(IDATE)
00010      WRITE(6,100) IDATE(1),IDATE(2)
00011      FORMAT(1H1/1H ,117X,2A4)
00012      WRITE(6,101)
00013      FORMAT(15(/),1H0,38X,'** ANALYSIS OF PROTEIN BINDING EQUILIBRIUM
00014      1 **',//////////)
00015      READ(5,99)
00016      FORMAT(1X,51H
00017      WRITE(6,99)
00018      SMALL=0.000001; IND=1 ; JOB='*END' ; RC=0.0 ; SFM=0.0 ; MRR=4HR
00019      10000 READ(5,200) TITLE
00020      FORMAT(20A4)
00021      IF(TITLE(1).EQ. JOB) STOP
00022      READ(5,201) MJ,NR,NK,IFCTR,MSP
00023      FORMAT(A1,I4,3I5)
00024      READ(5,200)FRM
00025      READ(5,FRM) (XKJ(I),XNJ(I),I=1,NK)
00026      READ(5,FRM)XNK
00027      DS=DFLOAT(10*IFCTR)
00028      IF(XNK .LT.0.1E-10)GO TO 80
00029      XNK=XNK/DS
00030      IF(NR.EQ.0)GO TO 500
00031      READ(5,204) ND
00032      FORMAT(15)
00033      READ(5,200) FRM
00034      READ(5,FRM) (XU(I),XMIU(I),I=1,ND)
00035
00036

```

```

00037 C          PRINT OF DATA
00038 500      WRITE(6,102) TITLE
00039 102      FORMAT(1H1,/,10X,20A4)
00040 103      WRITE(6,103)NR
00041 103      FORMAT(1H0,10X,'RUN NUMBER *****',I5)
00042 104      WRITE(6,104)NK
00043 104      FORMAT(1H0,10X,'NUMBER OF KINDS OF BINDING SITE **',I5)
00044 105      WRITE(6,105)MJ
00045 105      FORMAT(1H0,10X,'BINDING SITE NUMBER RESTRICTED TO **',A1)
00046 J=-IFCTR
00047 WRITE(6,140) J,IFCTR, J
00048 140      FORMAT(1H0,10X,'BINDING CONSTANTS ARE EXPRESSED IN 10.0**',I3,
00049 1' TIMES',1H,10X,'UNBOUND LIGAND CONCENTRATIONS ARE EXPRESSED IN
00050 210.0**',I3,' TIMES',1H,10X,'BINDING RATIOS ARE EXPRESSED IN 10.0
00051 3**',I3,' TIMES')
00052 IF(NR.EQ.0) GO TO 501
00053 WRITE(6,106)
00054 106      FORMAT(1H0,10X,'TABLE OF ORIGINAL DATA')
00055 WRITE(6,107)
00056 107      FORMAT(1H0,10X,'UNBOUND LIGAND CONCENTRATION (U)',3X,'MIU VALUE (M
00057 11U)',5X,'BINDING RATIO (MIU/U)')
00058 DO 7 I=1,ND
00059 XU(I)=XU(I)*DS
00060 XB(I)=XMIU(I)/XU(I)
00061 WRITE(6,108) I,XU(I),XMIU(I),XB(I)
00062 108      FORMAT(1H,18,7X,1PE15.8,15X,E15.8,5X,E15.8)
00063 CONTINUE
00064 501      WRITE(6,109) XNK
00065 109      FORMAT(1H0,10X,'COMBINED BINDING PARAMETER *****',1PE15.8)
00066 WRITE(6,110)
00067 110      FORMAT(1H0,10X,'TABLE OF INITIAL SCATURD PARAMETERS')
00068 WRITE(6,111)
00069 111      FORMAT(1H0,10X,'KINDS OF BINDING SITE',9X,'NUMBER OF BINDING SITE',
00070 1,8X,'BINDING CONSTANT')
00071 DO 8 I=1,NK
00072 XKJ(I)=XKJ(I)/DS
00073 WRITE(6,112) I,XNJ(I),XKJ(I)
00074 112      FORMAT(1H,120,25X,1PE15.8,10X,E15.8)
00075 CONTINUE

```

```

00070 C ADJUSTMENT OF SCATURD PARAMETER, NUMBER OF SITE IS REAL.
00071 IF(XNK.GT.0.1E-10)JP=1
00072 DO 9 I=1,NK
00073 P(I)=XKJ(I)
00074 P(I+NK+JP)=XNJ(I)
00075 MP=2*XNK+JP
00076 IF(JP.EQ.1)P(NK+1)=XNK
00077 MJN=1
00078 NTYPE=1
00079 WRITE(6,114)
00080 FORMAT(1H1, '//1H0,10X, 'ADJUSTMENT OF SCATURD PARAMETER, NUMBER OF
114 1 SITE IS REAL')
00081 DO 11 I=1,MP
00082 PM(I)=P(I)
00083 LNP(I)=I.
00084 CALL ERRSET(202,260,-1,1,1,205)
00085 MJN=0
00086 MAXI=50
00087 CALL BPAFLS(XMIU,XU,CX,P,EP,SMALL,SFM,RC,LNP,ND,MP,NTYPE,MAXI,IND)
00088 WRITE(6,115)
00089 FORMAT(1H0,5X, 'PARAMETER NO.',2X, 'INITIAL PARAMETER',3X, 'ADJUSTED',
115 1,2X, 'ADJUSTED PARAMETER',2X, 'SQUARE ROOT OF STANDARD ERROR')
00090 DO 14 I=1,NK
00091 WRITE(6,1161) I,PM(I),LNP(I),P(I),EP(I)
00092 CONTINUE
00093 IF(JP.LE.0)GO TO 4007
00094 I=NK+JP
00095 WRITE(6,1162) I,PM(I),LNP(I),P(I),EP(I)
00096 DO 4008 I=1,NK
00097 J=NK+JP+I
00098 WRITE(6,1163) I,PM(J),LNP(J),P(J),EP(J)
00099 CONTINUE
00100 FORMAT(1H ,9X,'K',12,8X,1PE15.8,9X,L1,5X,E15.8,5X,'+ ',E15.8)
00101 FORMAT(1H ,8X,'NK',12,8X,1PE15.8,9X,L1,5X,E15.8,5X,'+ ',E15.8)
00102 FORMAT(1H ,9X,'N',12,8X,1PE15.8,9X,L1,5X,E15.8,5X,'+ ',E15.8)
00103 WRITE(6,117)
00104 FORMAT(1H0,10X, 'TABLE OF CALCULATED DATA')
00105 WRITE(6,118)
00106 FORMAT(1H0,10X, 'UNBOUND LIGAND CONCENTRATION',7X, 'OBSERVED MIU VAL

```

```

10116 1UE',2X,'CALCULATED MIU VALUE')
10117 DO 15 I=1,ND
10118 WRITE(6,119)I,XU(I),XMIU(I),CX(I)
10119 119 FORMAT(1H,18,7X,1PE15.8,17X,E15.8,5X,E15.8)
10120 15 CONTINUE
10121 WRITE(6,120)MAXI,SFM,RC
10122 120 FORMAT(1H0,10X,'ITERATION=',I3/1H,10X,'SUM OF SQUARE OF DEVIATION
10123 1 BETWEEN CALCULATED AND OBSERVED=',1PE15.8/1H,10X,'MULTIPLE CORRE
10124 2LATION COEFFICIENT=',E15.8)
10125 IF(IND.LE.2)GO TO 16
10126 WRITE(6,121)
10127 121 FORMAT(//////////1H0,30X,'***** UNSUCCESSFUL CALCULATION ****
10128 1*****')
10129 SFM=1.0E38
10130 16 IF(MJN.GT.1) GO TO 4001
10131 C ADJUSTMENT OF SCATURD PARAMETER, NUMBER OF SITE IS INTEGER
10132 DO 181 I=1,MP
10133 181 PM(I)=P(I)
10134 CONTINUE
10135 DO 79 I=1,MP
10136 79 IF(LNP(I)) GO TO 79
10137 GO TO 791
10138 CONTINUE
10139 GO TO 3001
10140 MJNN=MJNN+1
10141 DO 792 I=1,MP
10142 792 LNP(I)=.T.
10143 IF(MJNN.LE.1) GO TO 4000
10144 3001 J1=NK+JP+1
10145 IF(MJ.EQ.MRR) GO TO 10000
10146 J2=2*NK+JP
10147 DO 17 I=J1,J2
10148 P(I)=FLOAT(IFIX(P(I)+0.5))
10149 17 PM(I)=P(I)
10150 LNP(I)=.F.
10151 IF(P(J1).LT.1.0)P(J1)=1.0
10152 JJ=NK+JP
10153 DO 18 I=1,JJ
10154 18 LNP(I)=.T.
10155 SFMM=0.1E38
10156 K=0
10157 P(J2)=P(J2)-2.0

```

```

00142 MJUN=2
00143 II=1
00144 P(J2)=P(J2)+1.0
00145 IF(P(J2).LT.1.0)P(J2)=1.0
00146 IF(NK.LE.1) GO TO 20
00147 P(J2-1)=PM(J2-1)-2.0
00148 K=1
00149 P(J2-1)=P(J2-1)+1.0
00150 IF(P(J2-1).LT.1.0) P(J2-1)=1.0
00151 GO TO 20
00152 K=K+1
00153 IF(K.LE.3) GO TO 21
00154 II=II+1
00155 IF(II.LE.3)GO TO 19
00156 GO TO 23
00157 WRITE(6,122)II,K
00158 FORMAT(1H1//1H0,10X,'ADJUSTMENT OF SCATURED PARAMETER, NUMBER OF
00159 SITE IS INTEGER, NO.',2X,2I1)
00160 DO 22 M=1,JJ
00161 LNP(M)=1.
00162 GO TO 4000
00163 IF(SFMM.LT.SFN) GO TO 4002
00164 SFMM=SFN.
00165 JS=II*10+K
00166 DO 24 M=1,MP
00167 PMM(M)=P(M)
00168 DO 4006 N=1,JJ
00169 P(M)=P(M)
00170 IF(NK.LE.1) GO TO 3003
00171 GO TO 3002
00172 WRITE(6,125)
00173 FORMAT(1H1,//1H0,10X,'DETERMINED SCATURED PARAMETER, NUMBER OF SI
00174 TE IS INTEGER')
00175 IF(SFMM.GE.0.1E38) GO TO 25
00176 WRITE(6,126)JS
00177 FORMAT(1H0,10X,'SET OF PARAMETER IS NO.',I4)
00178 WRITE(6,127)
00179 FORMAT(1H0,5X,'PARAMETER NO.',2X,'ADJUSTED PARAMETER')
00180 DO 26 I=1,MP
00181 WRITE(6,128) I,PMM(I)
00182 FORMAT(1H ,I12,8X,1PE15.8)
CONTINUE

```



```

00183 WRITE(6,129) SFMM
00184 FORMAT(1H0,10X,'SUM OF SQUARE OF DEVIATION=',1PE15.8)
00185 GO TO 27
00186 WRITE(6,121)
00187 GO TO 96
00188
00189 INITIAL ESTIMATION OF STEPWISE BINDING CONSTANT
00190 DO 29 I=1,MP
00191 P(I)=PMN(I)
00192 IF(JP.LE.0) GO TO 28
00193 DO 30 I=1,ND
00194 XMIU(I)=XMIU(I)-P(NK+1)*XU(I)
00195 WRITE(6,130)
00196 FORMAT(1H1,////,1H0,10X,'TABLE OF CORRECTED DATA')
00197 WRITE(6,131)
00198 FORMAT(1H0,10X,'UNBOUND LIGAND CONCENTRATION',7X,'CORRECTED MIU VA
1LUE')
00199 DO 31 I=1,ND
00200 WRITE(6,132) I,XU(I),XMIU(I)
00201 FORMAT(1H ,I8,7X,1PE15.8,20X,E15.8)
00202 CONTINUE
00203 MP=0
00204 DO 32 I=J1,J2
00205 J=I-J1+1
00206 NI(J)=FIX(P(I)+0.5)
00207 DO 33 I=1,NSP
00208 L=0
00209 J=0
00210 J=J+1
00211 IF(J.GT.NK) GO TO 71
00212 L=L+NI(J)
00213 IF(L.LT.I) GO TO 70
00214 P(I)=PMN(J)
00215 CONTINUE
00216 MP=NSP
00217 GO TO 72
00218 MP=I-1
00219 IF(MP.LT.1)MP=1
00220 IF(MP.EQ.1) GO TO 41
00221 K=1
00222 SS=0.0
00223 DO 34 I=1,K
00224 NI(I)=I

```

```

00223 3006 KK=K
00224 S=1.0
00225 DO 35 I=1,K
00226 J=NI(I)
00227 S=S*P(J)
00228 SS=SS+S
00229 DO 36 I=1,K
00230 IF(I-KK) 36,37,38
00231 NI(I)=NI(I-1)+1
00232 GO TO 36
00233 NI(I)=NI(I)+1
00234 IF(NI(I).GT.MP-K+KK) GO TO 39
00235 CONTINUE
00236 GO TO 3006
00237 KK=KK-1
00238 IF(KK.GT.0) GO TO 3007
00239 PM(K)=SS
00240 K=K+1
00241 IF(K.LE.MP) GO TO 3005
00242 DO 40 I=1,MP-1
00243 J=MP-I+1
00244 P(J)=PM(J)/PM(J-1)
00245 P(1)=PM(1)
00246 IF(MP.LE.ND-1)GO TO 41
00247 DO 42 I=ND,MP
00248 LNP(I)=F
00249 DO 43 I=1,MP
00250 LNP(I)=T
00251 C PRINT OF INITIAL PARAMETER OF STEPWISE BINDING MODEL
00252 WRITE(6,133)
00253 FORMAT(1H1////1H0,10X,'TABLE OF INITIAL PARAMETER OF STEPWISE BIN
00254 DING MODEL')
00255 WRITE(6,134)
00256 FORMAT(1H0,10X,'PARAMETER NUMBER',4X,'INITIAL BINDING CONSTANT',
00257 16X,'ADJUST')
00258 DO 44 I=1,MP
00259 WRITE(6,135) I,P(I),LNP(I)
00260 FORMAT(1H ,120,15X,1PE15.8,12X,L1)
00261 CONTINUE
00262 NTYPE=2
00263 MAXI=200
00264 DO 45 I=1,MP

```

```

00262 PM(I)=P(I)
00263 WRITE(6,136)
00264 FORMAT(1H1//1H0,10X,'ADJUSTMENT OF STEPWISE BINDING PARAMETER')
00265 CALL BPAFLS(XMIU,XU,CX,P,EP,SMALL,SFM,RC,LNP,ND,MP,NTYPE,MAXI,IND)
00266 IF(IND.GT.1) GO TO 46
00267 WRITE(6,115)
00268 DO 47 I=1,MP
00269 WRITE(6,116) I,PM(I),LNP(I),P(I),EP(I)
00270 CONTINUE
00271 WRITE(6,117)
00272 WRITE(6,118)
00273 DO 48 I=1,ND
00274 WRITE(6,119) I,XU(I),XMIU(I),CX(I)
00275 CONTINUE
00276 WRITE(6,120) MAXI,SFM,RC
00277 IF(IND.LE.1) GO TO 10000
00278 WRITE(6,121)
00279 GO TO 10000
00280 END

```

```

00282 SUBROUTINE BPAFLS(Y,X,CY,P,EP,SMALL,SFM,RC,LNP,ND,MP,NTYPE,MAXI,
1IND)
00283 REAL*8 Y,X,CY,P,EP,S,W,T
00284 DIMENSION Y(120),X(120),CY(120),P(50),EP(50),DP(50),IP(50)
00285 LOGICAL LNP(50)
00286 REAL*8 FP(50,51),AP(50),CP(50),DS,DSS,SMSQR
00287 ITRT=0;NTYPE=NTYPE;M1=50; N1=51;MP=MP
00292 MPP=MP+1
00293 IND=IND
00294 DO 16 I=1,MP
00295 DP(I)=P(I)
00296 DO 1 I=1,MP
00297 DO 2 J=1,MPP
00298 FP(I,J)=0.0D0
00299 CONTINUE
00300 ITRT=ITRT+1
00301 DSS=0.0D0
00302 DO 1000 I=1,ND
00303 T=X(I)
00304 S=FUNC(T,P,NTYPE,MP)
00305 CY(MPP)=XFUNC(T,P,NTYPE,MP,S)
00306 W=(CY(MPP)**2)*(T**2)+Y(I)**2
00307 CY(MPP+1)=Y(I)-S
00308 L=0
00309 DO 3,J=1,MP
00310 IF(.NOT.LNP(J)) GO TO 3
00311 L=L+1
00312 CY(J)=PFUNC(T,P,NTYPE,MP,J,S)
00313 CONTINUE
00314 DO 4 J=1,L
00315 DO 5 K=J,L
00316 FP(J,K)=FP(J,K)+CY(J)*CY(K)/W
00317 FP(J,L+1)=FP(J,L+1)+CY(J)*CY(MPP+1)/W
00318 DSS=DSS+CY(MPP+1)*CY(MPP+1)/W
00319 CONTINUE
00320 M=L+1
00321 DO 17 I=1,L
00322 AP(I)=FP(I,M)
00323 DO 18 J=I,L
00324 FP(J,I)=FP(I,J)
00325 CONTINUE
00326 DS=0.0D0

```

```

16
5000
2
1
3
5
4
1000
18
17

```

```

00327 CALL DINVL(FP,L,1,M1,N1,IP,CP,DS,IND)
00328 IF(IND.GT.2)GO TO 3000
00329 SMSQR=DSS
00330 DO 6 I=1,L
00331 SMSQR=SMSQR-AP(I)*FP(I,M)
00332 SFN=SMSQR
00333 ESP=P(I)-FP(I,M)
00334 IF(ESP.GT.1.0E-20) GO TO 30
00335 FP(I,M)=FP(I,M)/P(I)
00336 IF(FP(I,M).GT.100.0)FP(I,M)=100.0
00337 P(I)=P(I)/EXP(FP(I,M))
00338 GO TO 31
00339 P(I)=P(I)-FP(I,M)
00340 EP(I)=FP(I,I)
30
31
6 CONTINUE
IF(SMSQR.LE.0.000) GO TO 8
DS=(DSS-SMSQR)/DSS
IF(DS.LT.0.000)GO TO 8
IF(DS.GT.SMALL) GO TO 8
GO TO 9
8 IF(ITRT.GE.MAXI) GO TO 9
GO TO 5000
9 MAXI=ITRT
DO 10 I=1,ND
T=X(I)
CY(I)=FUNC(T,P,NTYPE,MP)
CONTINUE
10 DSS=0.0
DO 11 I=1,ND
DSS=DSS+Y(I)*CY(I)
S1=0.0
S2=0.0
S=0.0
SS=0.0
DO 12 I=1,ND
S1=S1+Y(I)*Y(I)
S2=S2+CY(I)*CY(I)
S=S+Y(I)
SS=SS+CY(I)
CONTINUE
12

```

```

00367 S1=S1-SXS/ND
00368 S2=S2-SSXSS/ND
00369 DSS=DSS-SXSS/ND
00370 RC=DSS/SQRT(S1*S2)
00371 SMSQR=SMSQR/(ND-L)
00372 DO 13 I=1,MP
00373 IF(.NOT.LNP(I)) GO TO 15
00374 EP(I)=EP(I)*SMSQR
00375 IF(EP(I).LT.0.0) GO TO 15
00376 EP(I)=SQRT(EP(I))
00377 GO TO 13
00378 EP(I)=0.0
00379 CONTINUE
00380 RETURN
00381 LNP(L)=.F.
00382 IF(L.LE.1) GO TO 4000
00383 DO 19 I=1,MP
00384 P(I)=DP(I)
00385 ITRT=0
00386 GO TO 5000
00387 DO 20 I=1,MP
00388 P(I)=DP(I)
00389 GO TO 9
00390 END

```

```

15
13
3000
19
4000
20

```

00392	REAL FUNCTION PFUNC*8 (X,P,KK,MP,N,S)	
00393	REAL*8 P(50),S,X,SS,DS,FP,G,DSS	
00394	GO TO(10,20),KK	
00395	M=MP/2	10
00396	JP=NOD(MP,2)	
00397	IF(N.LE.M)GO TO 1	
00398	IF(JP.LT.1)GO TO 2	
00399	IF(N.GT.M+1)GO TO 2	
00400	PFUNC=-X	
00401	RETURN	
00402	PFUNC=-P(N+M+JP)*X/((1.0+P(N)*X)**2)	1
00403	RETURN	
00404	PFUNC=-P(N-M-JP)*X/(1.0+P(N-M-JP)*X)	2
00405	RETURN	
00406	DS=1.0	20
00407	DO 3 I=1,MP	
00408	SS=1.0	
00409	DO 4 K=1,I	4
00410	SS=SS*P(K)*X	
00411	DS=DS+SS	3
00412	FP=DS	
00413	G=P(N)	
00414	P(N)=1.0	
00415	DS=0.0	
00416	DSS=0.0	
00417	DO 5 I=N,MP	
00418	SS=1.0	
00419	DO 6 K=1,I	6
00420	SS=SS*P(K)*X	
00421	DS=DS+SS	
00422	DSS=DSS+FLOAT(I)*SS	5
00423	PFUNC=(DS*S-DSS)/FP	
00424	P(N)=G	
00425	RETURN	
00426	END	

```

REAL FUNCTION XFUNC*8 (X,P,K,MP,DS)
REAL*8 P(50),DS,X,S,SS,F
GO TO (10,20),K
M=MP/2
JP=MOD(NP,2)
S=0.0
DO 1 I=1,M
J=M+1+JP
S=S+P(I)*P(J)/(1.0+P(I)*X)**2
IF(JP.EQ.1)S=S+P(M+1)
XFUNC=-S
RETURN
S=0.0 ; F=1.0
DO 2 I=1,MP
SS=1.0
DO 3 J=1,I
SS=SS*P(J)*X
S=S+FLOAT(I*I)/X*SS
F=F+SS
XFUNC=DS*DS/X~S/F
RETURN
END

```

```

00428
00429
00430
00431
00432
00433
00434
00435
00436
00437
00438
00439
00440
00442
00443
00444
00445
00446
00447
00448
00449
00450

```

10

1

20

3

2



```

00452 REAL FUNCTION FUNC*8 (X,P,K,MP)
00453 REAL*8 P(50),S,X,SS,DS
00454 GO TO (10,20),K
00455 M=MP/2
00456 JP=MOD(MP,2)
00457 S=0.0
00458 DO 1 I=1,M
00459 J=M+I+JP
00460 S=S+X*P(I)*P(J)/(1.0+P(I)*X)
00461 IF(JP.EQ.1)S=S+P(M+1)*X
00462 FUNC=S
00463 RETURN
00464 DS=0.0
00465 S=1.0
00466 DO 2 J=1,MP
00467 SS=1.0
00468 DO 3 J=1,I
00469 SS=SS*P(J)*X
00470 DS=DS+SS*FLOAT(I)
00471 S=S+SS
00472 FUNC=DS/S
00473 RETURN
00474 END

```

10

1

20

3

2

[2] Physiological model の解析 program  
連立微分方程式は日立の Library program  
DRKGV1 を使い、Runge-Kutta-Gill 法により  
解いた。この際、微分方程式は、関数副プログラ  
ム、FUNCTION FUNC\*8(K,X1,Y1) で定義した。  
又、この微分方程式の中に出てくる RSQ 値は、  
X1 の関数であるので、この計算は関数副プログラム、  
FUNCTION RSQ(CT1) で行った。  
次に、このプログラムの内容を示す。

```

00001 C MAIN PROGRAM
00002 REAL*8 FUNC, X0,Y0,H1,H2,F,Y4
00003 COMMON BF(7),R(6),V(9),GK(5),RM,Q,SN(4),SK(4),SNP(2),SKP(2),EPS,
00004 6 INUM,DOSE,FBIL(3)
00005 DIMENSION Y0(12),F(12,13),Y4(12,4000)
00006 EXTERNAL FUNC
00007 NR=12
00008 PARAMETER NO YOMIKOMI
00009 READ(5,100) N,NX1,NX2,H1,H2,EPS,X0
00010 100 FORMAT(3I10,4F10.3)
00011 READ(5,105) DOSE,RM
00012 105 FORMAT(2F10.3)
00013 READ(5,101) (Y0(I),I=1,N)
00014 READ(5,101) (SN(I),I=1,4),(SK(I),I=1,4)
00015 101 FORMAT(8F10.3)
00016 READ(5,102) Q
00017 102 FORMAT(F10.3)
00018 READ(5,107) (SNP(I),I=1,2),(SKP(I),I=1,2)
00019 107 FORMAT(4F10.3)
00020 READ(5,101) (BF(I),I=1,7)
00021 READ(5,101) (R(I),I=1,6)
00022 READ(5,101) (V(I),I=1,9)
00023 READ(5,101) (GK(I),I=1,5)
00024 READ(5,101) (FBIL(I),I=1,3)
00025 PARAMETER NO KAKIDASHI
00026 WRITE(6,200) N,NX1,NX2,H1,H2,EPS,X0
00027 200 FORMAT(1H1,5HINPUT/7X,2HN=12,3X,'NX1=',I4,3X,'NX2=',I4,2X,'H1=',
00028 1F6.3,3X,'H2=',F6.3,5X,'EPS=',F7.4,3X,'X0=',F6.3,///)
00029 WRITE(6,213) DOSE,RM
00030 213 FORMAT(1H,12X,'DOSE=',F10.4,5X,'RAMDA',F6.3,///)
00031 WRITE(6,204) (I,Y0(I),I=1,N)
00032 204 FORMAT(1H,4X,12(1X,3HY0(11,2H)=F4.1))
00033 WRITE(6,201) (BF(I),I=1,7),(R(I),I=1,6)
00034 201 FORMAT(1H0,'INPUT PARAMETER'//5X,'FLOW',5X,7F10.4/5X,'PARTITION',
00035 25X,6F10.4////)
00036 WRITE(6,202) (V(I),I=1,9)
00037 202 FORMAT(1H0,5X,'VOLUME',5X,9F10.4///)
00038 WRITE(6,280) (FBIL(I),I=1,3)
00039 280 FORMAT(1H0,5X,'BILE VOLUME FRACTION',3X,3F6.2///)

```

```

00034 WRITE(6,203) (GK(I),I=1,5)
00035 FORMAT(1H0,5X,'RATE CONSTANT',5X,5F15.7//)
00036 WRITE(6,208) Q,(SN(I),I=1,4),(SK(I),I=1,4)
00037 FORMAT(1H0,/,5X,'BINDING PARAMETER'//,10X,'Q=',F15.5,/,10X,
1'N VALUE=',4F15.6,/,10X,'K VALUE=',4F15.6//)
00038 WRITE(6,209) (SNP(I),I=1,2),(SKP(I),I=1,2)
00039 FORMAT(1H0,/,5X,'PLASMA BINDING PARAMETER'//,10X,'N-VALUE',
42F15.6,/,10X,'K-VALUE',2F15.6//)
00040 INUM=0
00041 WRITE(6,260)
00042 FORMAT(1H1,5X,'LIVER TOTAL',3X,'LIVER FREE',4X,'SINUS FREE',2X,
1'SINUS TOTAL',3X,'LIVER SINUS PARTITION'//)
C RUNGE-KUTTA GILL KEISAN(SHORT TIME, KIZAMI=H1)
C CALL DRKGN1(FUNC,X0,Y0,N,H1,F,Y4,NX1,NR)
C KEKKA NO KAKIDASHI(SHORT TIME)
00043 WRITE(6,210)
00044 FORMAT(1H0,6HOUTPUT/8X,2HX4,18X,'Y4(1)',20X,'Y4(2)',20X,'Y4(3)',
120X,'Y4(4)'//)
00045 X4=0.0
00046 NY=FIX(0.25/H1+0.1)
00047 DO 20 J=1,NX1,NY
00048 WRITE(6,220) X4,Y4(1,J),Y4(2,J),Y4(3,J),Y4(4,J)
00049 FORMAT(1H,4X,F7.3,4E25.8)
00050 20 X4=X4+H1*FLOAT(NY)
00051 WRITE(6,230)
00052 FORMAT(1H,/,5X,'LIVER TOTAL',3X,'LIVER FREE',4X,'SINUS FREE',2X,
3'Y4(8)'//)
00053 X4=0.0
00054 DO 30 J=1,NX1,NY
00055 WRITE(6,240) X4,Y4(5,J),Y4(6,J),Y4(7,J),Y4(8,J)
00056 FORMAT(1H,4X,F7.3,4E25.8)
00057 30 X4=X4+H1*FLOAT(NY)
00058 WRITE(6,290)
00059 FORMAT(1H,/,5X,'PLASMA BINDING PARAMETER'//,10X,'N-VALUE',
1'Y4(12)'//)
00060 X4=0.0
00061 DO 40 J=1,NX1,NY
00062 WRITE(6,240) X4,Y4(9,J),Y4(10,J),Y4(11,J),Y4(12,J)
00063 40 X4=X4+H1*FLOAT(NY)
00064

```

```

00065 C NEW INITIAL VALUE NO SETTEI
00066 X3=H1*FLOAT(NX1-1)
00067 WRITE(6,250) X3,(Y4(I,NX1),I=1,N)
250 FORMAT(1H0,///,5X,'NEW INITIAL VALUE',/10X,'X4=',F10,4,/10X,'Y4',
14E25.8,/12X,4E25.8,/12X,4E25.8///)
00068 RM=0.01
00069 X0=X3
00070 DO 50 I=1,N
00071 Y0(I)=Y4(I,NX1)
00072 WRITE(6,260)
C RUNGE-KUTTA-GILL KEISAN(LONG TIME, KIZAMI=H2)
CALL DRKGN1(FUNC,X0,Y0,N,H2,F,Y4,NX2,NR)
C KEKKA NO KAKIDASHI (LONG TIME)
WRITE(6,210)
X4=X3
NY=FIX(2.0/H2+0.1)
DO 21 J=1,NX2,NY
21 WRITE(6,220) X4,Y4(1,J),Y4(2,J),Y4(3,J),Y4(4,J)
X4=X4+2.0
WRITE(6,230)
X4=X3
DO 31 J=1,NX2,NY
31 WRITE(6,240) X4,Y4(5,J),Y4(6,J),Y4(7,J),Y4(8,J)
X4=X4+2.0
WRITE(6,290)
X4=X3
DO 32 J=1,NX2,NY
32 WRITE(6,240) X4,Y4(9,J),Y4(10,J),Y4(11,J),Y4(12,J)
X4=X4+2.0
STOP
END
00091

```

```

00093 C      FUNCTION SUBPROGRAM(BIBUN HOTEISHIKI O KAKU)
00094     REAL FUNCTION  FUNC*8(K,X1,Y1)
00095     REAL*8 X1,Y1
00096     DIMENSION Y1(12)
00097     COMMON BF(7),R(6),V(9),GK(5),RH,Q,SN(4),SK(4),SNP(2),SKP(2),EPS,
00098     6INUM,DOSE,FBIL(3)
00099     TR=1.0/RM
00100     IF(TR.GT.10.0) GO TO 30
00101     IF(X1.LE.TR) GO TO 50
00102 C      INPUT FUNCTION O KANGAENAI CASE(TIME>1/RAMDA)
00103     30 GO TO (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12),K
00104     1  FUNC=- (BF(1)+BF(2)+BF(3)+EF(4)+BF(5)+BF(6)+BF(7))*Y1(1)/V(1)
00105     2  R(2)/V(1)+BF(4)*Y1(9)/R(5)/V(1)+BF(2)*Y1(7)/R(1)/V(1)+BF(3)*Y1(8)/
00106     3  Y1(11)/R(5)/V(1)+BF(7)*Y1(12)/R(6)/V(1)-QK(1)*Y1(1)
00107     GO TO 90
00108     2  FUNC=+BF(1)*Y1(1)/V(2)-BF(1)*Y1(2)/RSQ(Y1(2))/V(2)-(QK(2)+QK(3))
00109     3*Y1(2)
00110     GO TO 90
00111     3  FUNC=GK(3)*V(2)*Y1(2)/FBIL(1)/V(3)-QK(4)*Y1(3)/FBIL(1)/V(3)
00112     GO TO 90
00113     4  FUNC=GK(4)*Y1(3)/FBIL(2)/V(3)-QK(4)*Y1(4)/FBIL(2)/V(3)
00114     GO TO 90
00115     5  FUNC=GK(4)*Y1(4)/FBIL(3)/V(3)-QK(4)*Y1(5)/FBIL(3)/V(3)
00116     GO TO 90
00117     6  FUNC=GK(4)*Y1(5)
00118     GO TO 90
00119     7  FUNC=BF(2)*Y1(1)/V(4)-BF(2)*Y1(7)/R(1)/V(4)-QK(5)*Y1(7)/V(4)
00120     GO TO 90
00121     8  FUNC=BF(3)*Y1(1)/V(5)-BF(3)*Y1(8)/R(2)/V(5)
00122     GO TO 90
00123     9  FUNC=BF(4)*Y1(1)/V(6)-BF(4)*Y1(9)/R(3)/V(6)
00124     GO TO 90
00125     10 FUNC=BF(5)*Y1(1)/V(7)-BF(5)*Y1(10)/R(4)/V(7)
00126     GO TO 90
00127     11 FUNC=BF(6)*Y1(1)/V(8)-BF(6)*Y1(11)/R(5)/V(8)
00128     GO TO 90
00129     12 FUNC=BF(7)*Y1(1)/V(9)-BF(7)*Y1(12)/R(6)/V(9)
00130     90 RETURN

```

```

C INPUT FUNCTION O KANGAERU CASE(TIME<1/RAMDA)
50 GO TO (61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72),K
61 FUNC=- (BF(1)+BF(2)+BF(3)+BF(4)+BF(5)+BF(6)+BF(7))*Y1(1)/V(1)
1+BF(1)*Y1(2)/RSQ(Y1(2))/V(1)+BF(2)*Y1(7)/R(1)/V(1)+BF(3)*Y1(8)/
2R(2)/V(1)+BF(4)*Y1(9)/R(3)/V(1)+BF(5)*Y1(10)/R(4)/V(1)+BF(6)*
3Y1(11)/R(5)/V(1)+BF(7)*Y1(12)/R(6)/V(1)-QK(1)*Y1(1)
3+30.0*DOSE*RM**3*X1**2*(1.0-RH*X1)**2/V(1)
GO TO 20
00127
00128
62 FUNC=+BF(1)*Y1(1)/V(2)-EF(1)*Y1(2)/RSQ(Y1(2))/V(2)-(QK(2)+QK(3))
3*Y1(2)
GO TO 20
00129
00130
63 FUNC=QK(3)*V(2)*Y1(2)/FRIL(1)/V(3)-QK(4)*Y1(3)/FBIL(1)/V(3)
GO TO 20
00131
00132
64 FUNC=QK(4)*Y1(3)/FBIL(2)/V(3)-QK(4)*Y1(4)/FBIL(2)/V(3)
GO TO 20
00133
00134
65 FUNC=QK(4)*Y1(4)/FBIL(3)/V(3)-QK(4)*Y1(5)/FBIL(3)/V(3)
GO TO 20
00135
00136
66 FUNC=QK(4)*Y1(5)
GO TO 20
00137
00138
67 FUNC=BE(2)*Y1(1)/V(4)-BF(2)*Y1(7)/R(1)/V(4)-QK(5)*Y1(7)/V(4)
GO TO 20
00139
00140
68 FUNC=BF(3)*Y1(1)/V(5)-BF(3)*Y1(8)/R(2)/V(5)
GO TO 20
00141
00142
69 FUNC=BF(4)*Y1(1)/V(6)-BF(4)*Y1(9)/R(3)/V(6)
GO TO 20
00143
00144
70 FUNC=BF(5)*Y1(1)/V(7)-BF(5)*Y1(10)/R(4)/V(7)
GO TO 20
00145
00146
71 FUNC=BF(6)*Y1(1)/V(8)-BF(6)*Y1(11)/R(5)/V(8)
GO TO 20
00147
00148
72 FUNC=BF(7)*Y1(1)/V(9)-BF(7)*Y1(12)/R(6)/V(9)
20 RETURN
END
00149
00150

```

```

00152 C FUNCTION SUBPROGRAM(LIVER NO RSQ VALUE NO KEISAN)
00153 FUNCTION RSG(CT1)
00154 COMMON BF(7),R(6),V(9),GK(5),RM,Q,SN(4),SK(4),SNP(2),SKP(2),EPS,
00155 6 INUM,DOSE,FBIL(3)
00156 BND(KN,WK,CF)=HN*WK*CF/(1.0+WK*CF)
00157 IF(CT1.EQ.0.0) GO TO 6
00158 LIVER TOTAL CONC. YORI RIVER FREE CONC. NO KEISAN
00159 FCF=0.0
00160 GCF=0.0
00161 CF=CT1
00162 1 CT=(Q+1.0)*CF+BND(SN(1),SK(1),CF)+BND(SN(2),SK(2),CF)
00163 1+BND(SN(3),SK(3),CF)+BND(SN(4),SK(4),CF)
00164 A=(CT-CT1)/CT1
00165 IF(ABS(A).LE.EPS) GO TO 5
00166 IF(A.GT.0.0) GO TO 2
00167 FCF=CF
00168 CF=(GCF+CF)/2.0
00169 GO TO 1
00170 2 GCF=CF
00171 CF=(FCF+CF)/2.0
00172 GO TO 1
00173 5 GZAN=CF
00174 LIVER FREE CONC. YORI SINUSOID TOTAL CONC. NO KEISAN
00175 FRSN=0.026*GZAN
00176 CSIN=FRSN+BND(SNP(1),SKP(1),FRSN)+BND(SNP(2),SKP(2),FRSN)
00177 RSQ VALUE NO KEISAN OYOBI KAKIDASHI
00178 RSQ=CT1/CSIN
00179 INUM=INUM+1
00180 K=MOD(INUM,500)
00181 IF(K.EQ.0) GO TO 7
00182 RETURN
00183 7 WRITE(6,290) CT1,GZAN,FRSN,CSIN,RSQ
00184 290 FORMAT(1H0,5X,4E15.7,3X,F15.5//)
00185 RETURN
00186 6 RSG=7.88
00187 RETURN
00188 END

```