

中枢刺激薬メチルフェニデート光学異性体の  
体内動態と薬効発現に関する基礎ならびに臨床研究

青山 隆夫

平成5年10月28日

正誤表

	誤	正
11頁Table 2	Patient C のCmax 2.9 Patient D のCmax 2.7	6.5 8.4
11頁5行目	MPDのTmaxは1~2hr t <sub>1/2</sub> は2.3~3.0hr	1~3hr 2.6~3.0hr
11頁10行目	3週間連続投与、	3週間連続投与して
32頁10行目	r=0.843	r=0.850

1

中枢刺激薬メチルフェニデート光学異性体の  
体内動態と薬効発現に関する基礎ならびに臨床研究

青山隆夫

# 目 次

頁

## 序 論

1

## 第 1 章 メチルフェニデート (MPD) 光学異性 体の体内動態

5

### 1. 健常人における MPD の立体特異的体内 動態

5

#### 1-1 ラセミ体投与

#### 1-2 異性体投与

### 2. ナルコレプシー患者における MPD 光学 異性体の体内動態

10

#### 2-1 初回投与

#### 2-2 連続投与

### 3. ナルコレプシー患者および健常人に おける (+)-MPD の非線形体内動態

13

#### 3-1 患者における非線形体内動態

#### 3-2 健常人における非線形体内動態

#### 3-3 尿中回収率

#### 3-4 血漿蛋白結合率

4. ラットにおける非線形体内動態	18
-------------------	----

#### 4-1 静脈内投与

#### 4-2 経口投与

#### 4-3 門脈内投与

5. 小括	27
-------	----

## 第2章 ナルコレプシー患者におけるMPDの

最適投与設計	28
--------	----

### 1. 血漿中MPD光学異性体濃度と臨床効果

の関係	28
-----	----

#### 1-1 Stanford sleepiness scale (SSS) に

よる効果の主観的判定

#### 1-2 入眠潜時による脳波学的な効果の判

定

### 2. 患者におけるMPDの最適投与計画の設

定	32
---	----

#### 2-1 血漿中(+) -MPD濃度と入眠潜時と関

係

#### 2-2 最適投与計画の設定

3. 小括	36
-------	----



### 第3章 ラットにおけるMPD光学異性体の脳

#### 内動態と薬効発現

37

#### 1. ラット脳線条体におけるMPDの立体特

##### 異的挙動

37

##### 1-1 ラセミ体投与

##### 1-2 異性体投与

##### 1-3 モノアミン再取り込み阻害剤の併用

#### 2. マイクロダイアリシス法による脳線条

##### 体細胞間隙液中MPD光学異性体と内因

##### 性ドパミンの関係

47

##### 2-1 MPDの静脈内投与後の血漿中と線条

##### 体透析液中MPD濃度推移

##### 2-2 MPDの静脈内投与後の線条体細胞間

##### 隙液中DAおよびDOPAC、HVAレベルの

##### 推移

##### 2-3 血漿中および線条体透析液中MPD濃

##### 度とDAレベルの関係

#### 3. 脳線条体細胞間隙液中DAレベルと

##### locomotor activityの関係

59

##### 3-1 MPDラセミ体の静脈内投与後の線条

体細胞間隙液中DAレベルの変化	
3-2 MPDの静脈内投与後のlocomotor activityの変化	
3-3 細胞間隙液中DAレベルとlocomotor activityとの関係	
4. 小括	65
結 語	67
実験法	69
1. 実験材料	69
1-1 薬品、標品および試薬	
1-2 実験動物	
2. 生体試料中MPD光学異性体と代謝物の定量法	71
2-1 生体試料からの抽出操作	
2-2 使用機器と測定条件	
3. 患者および健常人における経口投与試験	74
3-1 被験者	

3-2 投与試験	
3-3 効果の判定法	
<u>4. ラットにおける投与実験</u>	78
4-1 静脈内投与	
4-2 経口投与	
4-3 門脈内投与	
<u>5. 血漿蛋白結合率の測定</u>	79
<u>6. マイクロダイアリシス実験</u>	80
6-1 手術式	
6-2 投与実験	
6-3 in vitro 回収率	
6-4 透析液中モノアミン(DA、DOPAC、 HVA)濃度測定	
<u>7. locomotor activity測定実験</u>	84
<u>8. 薬物速度論的解析方法</u>	85
8-1 薬物速度論パラメータ	
8-2 Influx clearance	
<u>文 献</u>	88
<u>謝 辞</u>	94



## 序 論

中枢刺激薬であるメチルフェニデート、ペモリン、モダフィニール、アンフェタミンおよびメタンフェタミンなどは、覚醒および活動性の増大作用を有し、傾眠傾向、睡眠発作、睡眠麻痺および情動脱力発作を主症状とするナルコレプシー患者の日常生活を維持するために用いられる[1,2]。この中で、メチルフェニデート [MPD; threo-(+)/(-)-methyl- $\alpha$ -phenyl- $\alpha$ -(2-piperidyl) acetate] は、アンフェタミン、メタンフェタミンに比べて、長期連用により生ずる耐性の増大、身体的依存性、服薬中止による禁断症状の発現がほとんど認められないため、日本ではペモリンとともに繁用される薬物である[3-7]。

MPDの作用機序は、主として脳のドパミン(DA)作動性神経終末部におけるDAの再取り込みを阻害して神経細胞間隙液中のDA濃度を増加させることにより、興奮性の作用を発現させることが報告されている[8-11]。しかし、

臨床における効果の発現には個人差が大きく、食欲不振、頭痛、病的高揚感、まれに幻覚妄想などの重篤な副作用の発現も報告されているにもかかわらず、投与量の設定は経験的に行なわれているのが現状である〔6, 7〕。しかも、その臨床上の至適投与量は10～60mgの広範囲に渡っている(Fig. 1)。これらの理由から、MPDの体内動態に基づく綿密な投与計画の設定が望まれている。

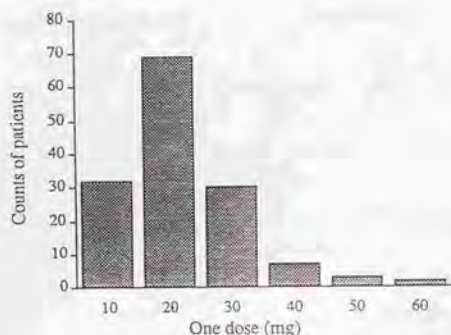


Fig.1 One dose of racemic *threo*-methylphenidate (MPD) HCl in 143 narcoleptic patients

一方、MPDは光学異性薬物で、临床上では threo 型のラセミ混合物が用いられている (Fig. 2)。しかしながら、各異性体 5mg/kg をラットに腹腔内投与した後の locomotor activity の増加率は (+) 体が (-) 体に比べて約 20 倍高いことが報告されているにもかかわらず [12]、MPD 各異性体の実験動物およびヒトにおける体内動態、さらに効果との定量的な関係についてはほとんど説明されていない。

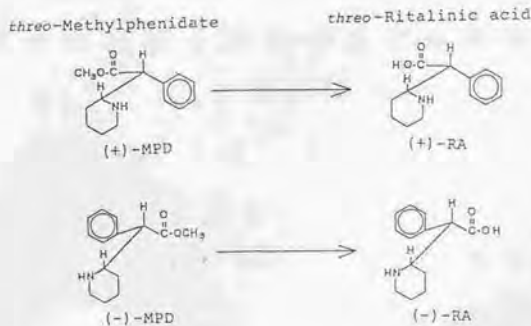


Fig.2 Absolute stereochemistry and main metabolic pathway of *threo*-methylphenidate (MPD) enantiomers

そこで、本研究は次の3つの項目を目的として検討を行なった。

- 1) MPD光学異性体のヒトとラットにおける体内動態を明らかにする。
- 2) ナルコレプシー患者におけるMPD光学異性体の体内動態と効果発現の関係を解析し、MPDの最適投与設計法を確立する。
- 3) ラットにおけるMPD光学異性体の脳内分布、線条体細胞間隙液中のMPDと内因性ドパミン(DA)レベルの変化、およびlocomotor activityとの関係を解析し、MPD光学異性体の体内動態と薬効発現との関係を明らかにする。

## 第 1 章    メチルフェニデート (MPD) 光学異性           体の体内動態

### 1. 健常人における MPD の立体特異的体内動態

ヒトにおける MPD 光学異性体の体内動態は、ラセミ体を経口投与した場合、大きく初回通過効果を受けること [13, 14]、血漿中濃度は (+) 体の方が (-) 体より著しく高いこと [15, 16] が報告されている。しかし、各異性体の投与後の体内動態、MPD の主代謝物であるリタリン酸 (ritalinic acid; RA, Fig. 2) の光学異性体の体内動態は明らかにされていないことから [13-20]、健常人において MPD 経口投与後の MPD と RA の光学異性体の体内動態について検討した。投与薬剤は、MPD の市販錠剤 2 錠 (ラセミ体の塩酸塩 20 mg)、MPD ラセミ体の塩酸塩の結晶 20 mg、各異性体の塩酸塩の結晶 10 mg とした。各投与は同一健常人で行なった。

MPD および RA 光学異性体の定量はガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC-MS) により行なった。



# 1-1 ラセミ体投与

Fig. 3 にラセミ体の市販錠剤2錠(20mg; 臨床上の投与頻度が最も高い投与量、Fig. 1)を健康人2名に経口投与した後のMPDとRAの光学異性体の血漿中濃度推移と累積尿中回収率を示す。Table 1には、体内動態パラメータを示す。

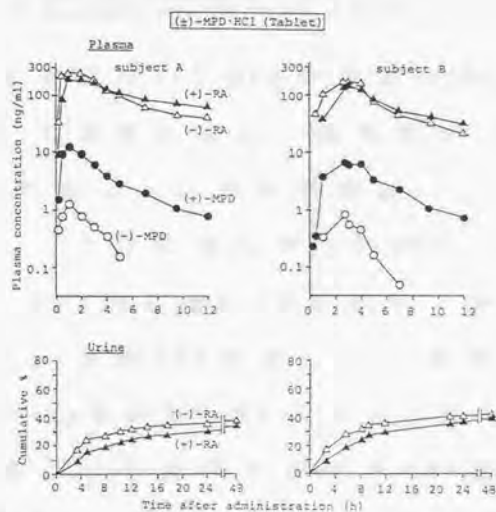


Fig. 3 Plasma concentration and urinary excretion of MPD and the metabolite (ritalinic acid; RA) enantiomers after single oral dose of 20 mg racemic MPD · HCl in tablet form to two healthy subjects



Table 1 Pharmacokinetic parameters of MPD enantiomers after oral dose of MPD · HCl to two healthy subjects

Subject	Dose <sup>a)</sup> (mg)	$t_{1/2}$ <sup>b)</sup> (h)		AUC <sup>c)</sup> (ng·h/ml)		CL <sup>d)</sup> (L/h·kg)	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
A	(±)-MPD (T) <sup>a)</sup> 17.2	3.2	1.2	48.2	3.14	3.33	51.0
	(±)-MPD (C) 17.2	2.9	1.4	32.8	3.48	4.89	46.0
	(+)-MPD (C) 8.6	2.3	-	31.6	-	5.08	-
	(-)-MPD (C) 8.6	-	1.0	-	0.62	-	258.3
B	(±)-MPD (T) 17.2	3.0	1.2	39.1	2.50	3.31	51.7
	(±)-MPD (C) 17.2	3.1	1.3	33.1	1.89	3.94	68.3
	(+)-MPD (C) 8.6	2.5	-	34.3	-	3.76	-
	(-)-MPD (C) 8.6	-	0.9	-	1.30	-	99.3

a) MPD was administered as hydrochloride salts.

b) The plasma half-life of MPD in the terminal phase.

c) The area under the plasma concentration curve of MPD from time zero to infinity.

d) Clearance was calculated by dividing dose of MPD by AUC.

e) T; commercially available tablets. C; crystal.

錠剤投与後の(+)-MPDの血漿中濃度は1~3 hr(T<sub>max</sub>)で最高に達し、最高濃度(C<sub>max</sub>)は約10 ng/mlであった。消失半減期( $t_{1/2}$ )は約3 hrであった。これに対して(-)-MPDのC<sub>max</sub>は約1 ng/mlで(+)体の約1/10であり、その消失半減期( $t_{1/2}$ )は約1 hrであった。全身クリアランス(CL<sub>tot</sub>)は(-)体が(+)体より著しく高かった。一方、RAの血漿中濃度はMPD濃度に比べて著しく高く、投与後3 hrまでは(-)体が高かった。(+)と(-)-RAのC<sub>max</sub>は被験者Aが各々219と283 ng/ml、被験者Bが165と188 ng/mlであっ

た。さらに48hrまでのRAの尿中回収率は共に投与量の約40%であったが、約4hrまでは(-)体が(+)体の2倍多く回収された。(+)および(-)-MPDの尿中回収率は各々2%と0.1%以下であった。このことから、MPDの主たる消失経路はRAへの代謝であることが確認された。

#### 1-2 異性体投与

Fig. 4に(+)-MPDおよび(-)-MPDの結晶(各々10mg)を経口投与した場合の結果を示す。各異性体投与におけるMPDとRAの血漿中濃度と尿中排泄の様相は、ラセミ体の結晶投与後の各異性体の推移(Figに示さず)とほぼ同様で、血漿および尿中に投与薬物の対掌体はほとんど検出されなかった。また、(+)-および(-)-RAの尿中回収率は投与量の70%と80%であった。

以上のことから、MPDはヒトに経口投与した場合、立体特異的体内動態を示すことが明らかとなった。さらに、体内での異性化および異性体間の相互作用はほとんどないことが示された。

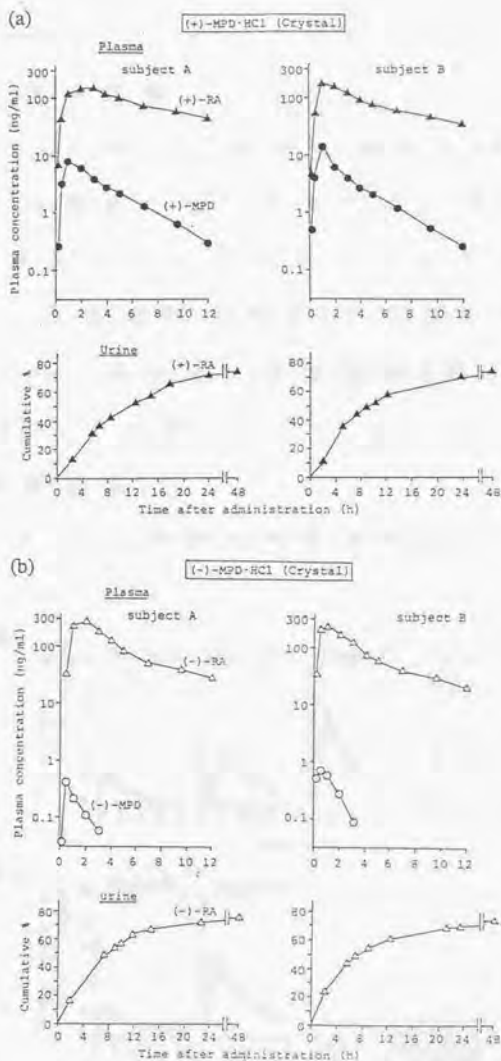


Fig. 4 Plasma concentration and urinary excretion of MPD and RA enantiomers after single oral dose of 10 mg (+)-MPD · HCl (a) and (-)-MPD · HCl (b) in crystal to two healthy subjects

## 2. ナルコレプシー患者におけるMPD光学異性

### 体の体内動態

ナルコレプシー患者におけるMPD光学異性体の体内動態を検討するため、休薬中またはMPDを服用したことの無いナルコレプシー患者3名と真性傾眠症患者1名に経口投与試験を行なった。投与量は市販錠剤2錠(ラセミ体塩酸塩20mg)とした。

### 2-1 初回投与

Fig. 5(a)に初回投与におけるMPD光学異性

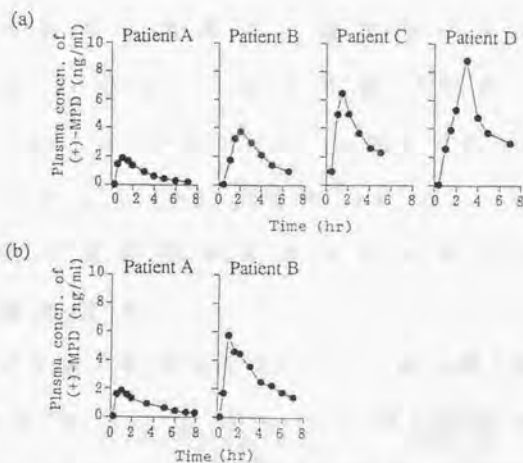


Fig.5 Plasma concentrations of MPD enantiomers after single (a) and repeated (b) oral doses of 20 mg racemic MPD · HCl to hypersomniac patients. Patients A, B and C were narcoleptics, and patient D essential hypersomniac.

Table 2 Pharmacokinetic parameters of (+)-MPD after oral dose of 20 mg racemic MPD · HCl to hypersomniac patients

Patients	Sex	Age (year)	Weight (kg)	Dose (mg/kg)	T <sub>max</sub> (hr)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	t <sub>1/2</sub> (hr)	AUC (ng · hr/ml)	CL <sub>tot</sub> (L/hr/kg)
A	M	65	72	0.24 <sup>1)</sup>	1	1.7	2.6	5.9	20.35
				0.24 <sup>2)</sup>	1	1.9	3.3	7.2	16.62
B	M	40	58	0.30 <sup>1)</sup>	2	3.7	3.0	17.1	8.72
				0.30 <sup>2)</sup>	1	5.3	2.8	24.0	6.21
C	M	18	70	0.25 <sup>1)</sup>	1.5	2.9	2.9	27.3	4.52
D	F	23	45	0.38 <sup>1)</sup>	3	2.7	2.7	37	5.25

1) single administration 2) repeated administration

patients A, B and C were narcoleptics, and patient D essential hypersomniac.

体の血漿中濃度の時間推移を、Table 2に(+)-MPDの体内動態パラメータを示す。MPD各異性体の血漿中濃度は、各患者ともに、薬理活性型の(+)体が(-)体より約10倍高く、(+)-MPDのT<sub>max</sub>は1~2hr、t<sub>1/2</sub>は2.3~3.0hrであった。しかし、(+)-MPDのC<sub>max</sub>は1.7~8.4ng/mlの範囲で患者間で大きな差が認められた。

## 2-2 連続投与

患者2名(患者AとB)に、1日2回(朝と昼)、1回2錠の投与スケジュールで3週間連続投与、その最終投与後のMPD異性体の体内動態を検



討した (Fig. 5(b)、Table 2)。その結果、最終投与直前の血漿中にはMPDは検出されなかった。また、投与後の血漿中濃度は初回投与時 (Fig. 5(a))と同様な推移を示したことから、連続投与による血漿中への蓄積と体内動態への影響はほとんどないことが明らかとなった。



### 3. ナルコレプシー患者および健常人における

#### (+)-MPDの非線形体内動態

##### 3-1 患者における非線形体内動態

患者Aでは、他の2名に比べて血漿中濃度が低く、十分な効果が得られなかったため、その後、投与量を2倍の40mgに増加した。その結果、Fig. 6に示すように(+)-MPDの $C_{max}$ は20mgの約6倍に、血漿中濃度下面積(AUC)は約7倍に非線形的に増大した。

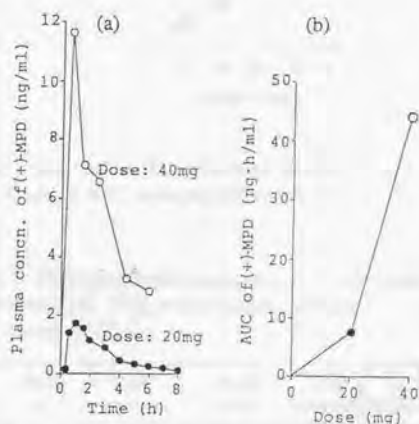


Fig. 6 Plasma concentration of (+)-MPD after single oral dose of 20 mg and 40 mg racemic MPD · HCl to patient A (a), and correlation between dose and AUC of (+)-MPD (b)

### 3-2 健康人における非線形体内動態

ナルコレプシー患者で見られた(+)-MPDの非線形動態をより明確にするために、健康人4名を対象にMPDラセミ体の投与量を種々変えて投与試験を行なった。

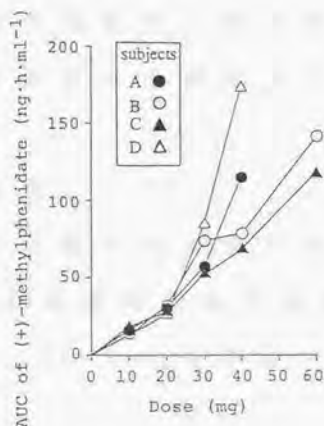


Fig.7 Correlations between doses of racemic MPD·HCl and AUC of (+)-MPD in four healthy subjects

Table 3 Pharmacokinetic parameters of (+)-MPD after oral dose of racemic MPD·HCl to four healthy subjects (n=2-4, mean±SD)

Dose (mg)	Tmax (hr)	Cmax (ng/ml)	t <sub>1/2</sub> (hr)	AUC (ng·hr/ml)	CL <sub>tot</sub> (L/hr/kg)
10	0.9±0.1	5.0±0.9	2.5±0.4	17.2±0.9	4.08±0.92
20	1.4±0.5	8.1±1.5	2.5±0.2	28.9±2.3	5.18±1.16
30	1.2±0.4	17.1±4.3	2.5±0.3	66.9±14.9	3.40±0.68
40	1.2±0.7	26.0±10.1	3.3±1.3	117.9±51.9	2.82±0.72
60	2.0, 3.0	25.7, 23.6	2.9, 3.0	116.6, 141.1	2.70, 2.85

Fig. 7 に、各健常人における各投与量と (+)-MPD の AUC との関係を示す。Table 3 に各投与量における体内動態パラメータを示す。

(+)-MPD の  $T_{max}$  と  $t_{1/2}$  は投与量間で大きな変化はなかったが、 $C_{max}$  と AUC は投与量が 20 mg を超えると非線形的な増加が認められ、また被験者間で大きな差があることが認められた。

### 3-3. 尿中回収率

健常人での各投与量における投与後 48 hr までの MPD と RA の各異性体の平均尿中回収率を Fig. 8 に示す。MPD と RA を併せた値は、いずれ

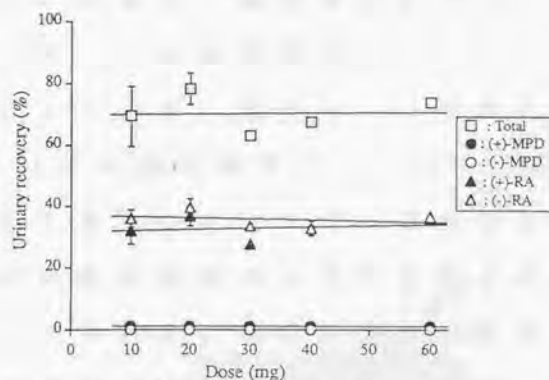


Fig. 8 Urinary recovery of MPD and RA enantiomers by 48 hr after single oral dose of racemic MPD·HCl to healthy subjects (mean  $\pm$  SD, n=2-3)

の投与量においても70%前後であり、投与量間ではほとんど変化しなかった。このことは、MPDはヒトに経口投与した場合、MPDの吸収率は投与量によって変動しないことを示唆している。

#### 3-4. ヒト血漿蛋白結合率

健常人のブランク血漿にMPDラセミ体を40 ng/mlの濃度に添加して、限外濾過法により各異性体の血漿蛋白結合率を求めた。その結果、(+)-MPDが $36.5 \pm 1.6\%$ 、(-)-MPDが $50.4 \pm 3.1\%$ であった。このことから、健常人での投与量増大に伴う(+)-MPDの血漿中濃度増加の非線形性の原因は、血漿蛋白結合率の変化の寄与は小さいことが示唆された。

以上のことから、患者および健常人におけるMPD経口投与後の血漿中(+)-MPD濃度は個人間で大きく変動し、投与量の増大によりに非線形的に血漿中濃度が上昇することが示唆された。この原因は、吸収率および血漿蛋白結合率の変動によるものでなく、MPDの経口投

与後の初回通過効果の飽和とその個人間変動  
によるものと推察された。



#### 4. ラットにおけるMPDの非線形体内動態

ヒトにおける経口投与後のMPDの体内動態に非線形性が存在することが推察されたことから、その体内動態についてラットを用いてより詳細に検討した。ラット(Wistar系雄性、280~320g)にMPDのラセミ体0.5、2、3.5、5 mg/kgを静脈内、経口、門脈内投与した後、経時的に血液と尿を採取した。

##### 4-1. 静脈内投与

静脈内投与後の各MPD異性体の血漿中濃度は、各投与量ともに2相性を示して低下したが、その消失は(-)-MPDの方が速かった(Fig. 9)。2-コンパートメントモデルで近似して求めた各投与量における両異性体の体内動態パラメータをTable 4に示す。異性体間では、各投与量ともに、消失速度( $\beta$ )は(-)-MPDの方が早く、CL<sub>tot</sub>も大きかった。分布容積(V<sub>dss</sub>)はほぼ同じであった。しかし、両異性体ともに投与量間で有意な差は認められず、Fig. 10に示すようにAUCは、各異性体とも投



与量の増加に伴って比例的に増大した。

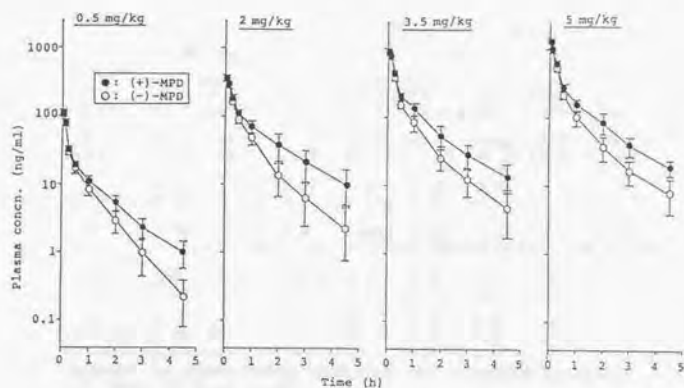


Fig.9 Plasma concentration of MPD enantiomers after intravenous dose of racemic MPD to rats (mean  $\pm$  SD, n=3-4)

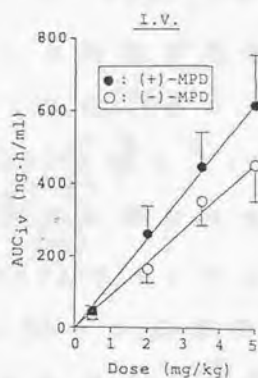


Fig.10 Correlations between dose of racemic MPD and AUC<sub>i.v.</sub> of MPD enantiomers in rats

Table 4 Pharmacokinetic parameters of MPD enantiomers after intravenous dose of racemic MPD to rats

Parameter	Dose (mg/kg)							
	0.5		2		3.5		5	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
A (ng/ml)	86.0 (23.7)	101.4 (32.7)	319.3 (19.2)	352.9 (21.2)	770.0 (110.6)	859.5 (170.4)	1089.3 (46.8)	1153.9 (288.6)
B (ng/ml)	24.5 (5.7)	26.1 (9.6)	113.7 (22.6)	92.0 (9.6)	199.5 (45.8)	191.8 (29.9)	269.2 (118.0)	203.5 (85.5)
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	5.97 (0.52)	7.74 (3.20)	5.26 (0.21)	5.75 (1.27)	5.68 (0.65)	5.68 (0.17)	5.87 (1.16)	5.57 (1.11)
$\beta$ (h <sup>-1</sup> )	0.784 (0.164)	1.175 (0.178)	0.600 (0.148)	0.953 (0.276)	0.642 (0.080)	0.855 (0.325)	0.624 (0.080)	0.797 (0.107)
V <sub>ss</sub> (l/kg)	5.9 (0.3)	5.2 (1.0)	5.9 (0.4)	5.6 (0.4)	5.2 (0.5)	4.5 (0.4)	5.3 (0.5)	5.1 (1.0)
CL (l/h/kg)	5.6 (0.7)	7.1 (1.1)	4.1 (1.3)	6.3 (1.6)	4.0 (0.7)	5.2 (1.0)	4.3 (1.2)	5.7 (1.6)

Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three to four rats.

#### 4-2. 経口投与

ラセミ体を0.5～5 mg/kgの投与量範囲で経口投与した後の各異性体の吸収は、いずれの投与量においても速やかで、血漿中濃度は投与後15 minでC<sub>max</sub>に達した(Fig. 11)。前述の静脈内投与と同様に消失速度およびCL<sub>tot</sub>は(-)-MPDの方が(+)-MPDよりも有意に大きい値を示し(Table 5)、 $\beta$ は両異性体ともに静脈内投与とほぼ同じであったが、CL<sub>tot</sub>は著しい投与量依存性を示し、低投与量ほど増大し

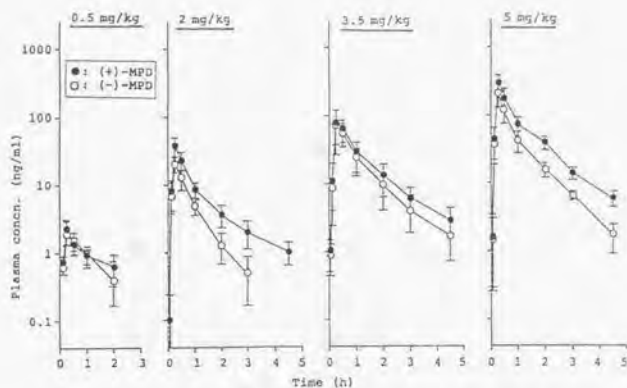


Fig.11 Plasma concentration of MPD enantiomers after oral dose of racemic MPD to rats (mean  $\pm$  SD, n=3-4)

Table 5 Pharmacokinetic parameters of MPD enantiomers after oral dose of racemic MPD to rats

Parameter	Dose (mg/kg)							
	0.5		2		3.5		5	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Tmax (min)	15	15	15	15	15	15	15	15
Cmax (ng/ml)	2.1 (0.7)	1.8 (0.6)	35.7 (10.6)	19.8 (3.3)	62.5 (29.1)	58.2 (34.4)	258.8 (81.9)	172.4 (64.9)
k <sub>s</sub> (h <sup>-1</sup> )	0.561 (0.430)	1.018 (0.430)	0.583 (0.210)	1.317 (0.569)	0.656 (0.055)	0.737 (0.088)	0.477 (0.222)	0.993 (0.383)
CL (l/h/kg)	85.9 (36.4)	132.6 (47.7)	42.0 (23.9)	79.5 (32.8)	26.5 (9.7)	34.9 (16.2)	11.7 (2.6)	23.2 (10.4)

Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three to four rats.

た。さらに Fig. 12 に示すように、各異性体の AUC は投与量の増大に伴い、非線形的に増加した。経口投与時の AUC を静脈内投与時の AUC で除して求めた bioavailability は、投与量

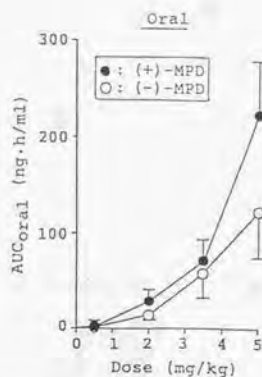


Fig.12 Correlations between dose of racemic MPD and AUC<sub>Oral</sub> of MPD enantiomers in rats

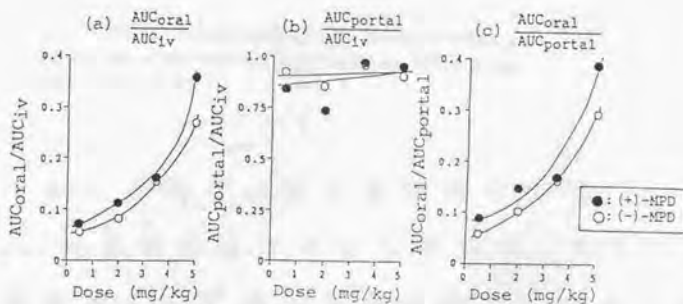


Fig.13 Correlations between dose of racemic MPD and AUC<sub>Oral</sub>/AUC<sub>iv</sub> of MPD enantiomers (a), AUC<sub>portal</sub>/AUC<sub>iv</sub> (b), and AUC<sub>Oral</sub>/AUC<sub>portal</sub> (c) in rats

の増大に伴い (+)-MPD は 0.07 から 0.36 へ、(-)-MPD は 0.06 から 0.27 へ増大した (Fig. 13(a))。また経口投与後 48 hr までの尿中回収率 (MPD + RA) は、投与量間でほぼ一定であった (Fig. 14)。

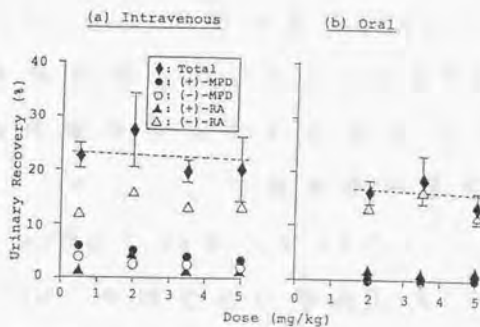


Fig. 14 Urinary recovery of MPD and RA enantiomers after intravenous (a) and oral (b) doses of racemic MPD to rats (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )

以上のことから、投与量増加に伴う  $AUC_{0-48h}$  の非線形増大の主な原因は、MPDの初回通過効果における投与量依存性によるものであることが示唆された。



#### 4-3. 門脈内投与

MPDの初回通過効果の肝および消化管での寄与を調べるために門脈内投与を行ない静注と経口投与時のAUCと比較した。門脈内投与後の血漿中濃度推移から求めた各異性体のAUC<sub>portal</sub>の値には投与量依存性は認められず(Table 6)、各投与量のAUC<sub>portal</sub>/AUC<sub>iv</sub>の値は各異性体ともに0.7~0.9で1に近く、ほぼ一定の値を示したのに対し(Fig. 13(b))、AUC<sub>oral</sub>/AUC<sub>portal</sub>の値は投与量の増加に伴って(+)-MPDが0.09から0.40へ、(-)-MPDが0.06から0.30へ非線形的に増加した(Fig. 13(c))。これらのことから、MPDの初回通過効果にお

Table 6 Pharmacokinetic parameters of MPD enantiomers after intraportal dose of racemic MPD to rats

Parameter	Dose (mg/kg)							
	0.5		2		3.5		5	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
C <sub>max</sub> (ng/ml)	44.5 (21.3)	42.2 (16.9)	116.5 (68.2)	189.7 (52.7)	567.5 (232.1)	515.7 (180.5)	806.5 (281.5)	722.7 (228.3)
B <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	0.461 (0.093)	0.549 (0.124)	0.412 (0.037)	0.503 (0.057)	0.493 (0.103)	0.599 (0.220)	0.444 (0.030)	0.554 (0.089)
CL (l/h/kg)	7.8 (4.2)	8.2 (3.2)	5.5 (1.6)	7.7 (2.9)	4.5 (1.7)	5.0 (1.5)	4.6 (1.8)	6.5 (2.0)

Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three rats.



ける肝臓の寄与は小さく、MPDの投与量依存性は消化管での初回通過効果の非線形性によるものと推察された。

さらに、ラットブランク血漿にMPDラセミ体および各異性体を添加して、5～1000 ng/mlの濃度範囲で得られた(+)-MPDと(-)体の蛋白結合率は各々25～33%と28～36%であり、異性体間の差は認められなかった(Fig. 15)。

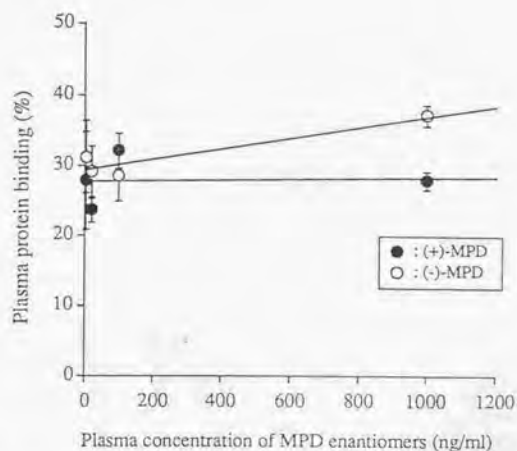


Fig.15 In vitro plasma protein binding of MPD enantiomers in rats

ラットにMPDラセミ体を静脈内投与後に採血した血液のヘマトクリット値、全血および血漿中MPD異性体濃度から求めた各異性体の赤血球移行率(血球中濃度/血漿中濃度)は、各異性体とも血漿中濃度が80~1000 ng/mlの範囲で約1.2で異性体間で大きな差は認められなかった。以上のことから、異性体間の体内動態の差は血漿蛋白結合率および赤血球移行率の異性体間の差によるものでないことがわかった。

## 5. 小 括

ヒトにMPDラセミ体を経口投与後の血漿中MPD濃度は(+)体が(-)体より著しく高く、投与量の増大により(+) - MPD濃度は非線形的に増大することが明らかになった。また生体内での異性化は認められなかった。異性体間の体内動態の差には蛋白結合率と赤血球移行率の関与していないことが示唆された。

患者における血漿中(+) - MPD濃度は患者間で大きく変動することが示唆され、この血漿中濃度の変動は、ラットを用いた実験により、消化管での初回通過効果の飽和に起因する非線形現象における個人間変動によることが示唆された。

## 第2章 ナルコレプシー患者におけるMPDの

### 最適投与の設計

#### 1. 血漿中MPD光学異性体濃度と臨床効果の関 係

ナルコレプシー患者におけるMPDの効果発現とMPD光学異性体の体内動態との関係を検討した。効果の判定はStanford Sleepiness Scale (SSS)[21]に基づいた眠気の主観的評価 (Fig. 39) と Multiple Sleep Latency Test (MSLT)[22]による入眠潜時 (Sleep Latency: 安静閉眼時に $\alpha$ 波が消失するまでの時間) を測定する脳波学的方法を用いて経時的に行なった。

#### 1-1. Stanford Sleepiness Scale (SSS) による効果の主観的判定

ナルコレプシー患者3名と真性傾眠症患者1名にMPD(ラセミ体の塩酸塩20mg)を経口投与後の血漿中(+)-MPD濃度とSSSによる眠気の程度の時間推移をFig. 16に示す。

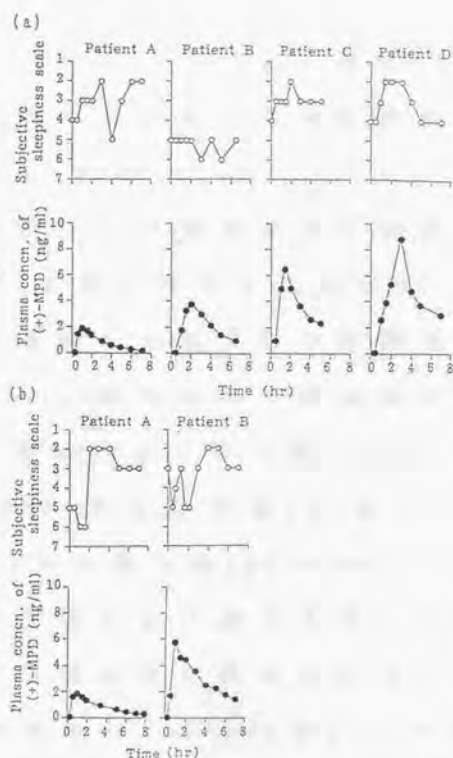


Fig.16 Subjective sleepiness and plasma concentration of (+)-MPD after single (a) and repeated (b) oral doses of 20 mg racemic MPD · HCl to hypersomniac patients  
Patients A, B and C were narcoleptics, and patient D essential hypersomniac.

初回投与では患者Dにおいて血漿中(+)-MPD濃度の推移にほぼ対応したSSSのスコアーの変化を示した。しかし、他の3名のナルコレプシー患者では、明確な対応関係は認められ



なかった (Fig. 16(a))。2名の患者の連続投与後の試験においても明確な対応関係は認められなかった (Fig. 16(b))。

## 2-2. 入眠潜時による脳波学的な効果の判定

患者にMPDを経口投与した後のMPD光学異性体の血漿中濃度と入眠潜時の時間推移を Fig. 17に示す。投与後の入眠潜時は、患者Aでは投与前の3minから投与後1.5hrの8minへ、患者Bでは3minから投与後2hrの14minへ、患者Cでは2minから投与後1hrの20minへ延長し、効果の発現が明らかに認められ、また、その程度に大きな個人差が認められた。その最大効果の発現時間は(+)-MPDの $T_{max}$ とほぼ一致し、効果は(+)-MPDの血漿中濃度と同様に推移した (Fig. 17(a))。また、連続投与後においても血漿中濃度と入眠潜時は単回投与と同様に推移した。

以上のことから、ナルコレプシー患者におけるMPD投与後の臨床効果としての入眠潜時変化は、血漿中(+)-MPD濃度と同様に推移す

ることが示唆され、SSSを用いた方法よりも効果を明確に判定できることが明らかとなった。またMPDラセミ体投与後の効果発現の個人差は、その体内動態の個人間変動による可能性が示唆された。

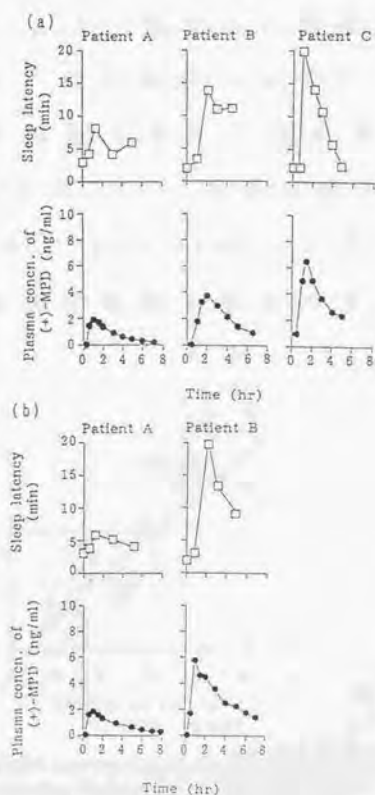


Fig.17 Sleep latency and plasma concentration of (+)-MPD after single (a) and repeated (b) oral doses of 20 mg racemic MPD · HCl to three narcoleptic patients

## 2. 患者におけるMPDの最適投与計画の設定

以上のナルコレプシー患者におけるMPD投与後の体内動態と効果(入眠潜時)の検討結果に基づいて、MPDの最適投与計画の設定法を検討した。

### 2-1. 血漿中(+) -MPD濃度と入眠潜時との関係

3名の患者での単回投与試験における(+) -MPDの血漿中濃度に対して入眠潜時をプロットした結果(Fig.18)、両者の間に良好な直線関係が示された( $r=0.843$ )。このことは(+) -MPD濃度が効果の指標となりうることが示唆

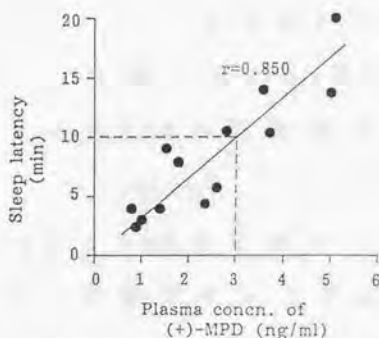


Fig.18 Correlation between plasma concentration of (+)-MPD and sleep latency after single oral dose of 20 mg racemic MPD · HCl to three narcoleptic patient

している。日常生活を維持するための入眠潜時は10min以上あれば良いとされている。したがって、患者における臨床効果を入眠潜時間で判断する場合、この10minに対応する(+)-MPD濃度の約3ng/mlを目安として投与量設定を行なう必要があると推察された。

## 2-2 最適投与計画の設定

MPDの投与は朝と昼の1日2回行なわれるケースが大部分である。そこで、この1日2回の投与を考慮して、夜間にその効果が残存しないよう投与方法を考える必要がある。そこで、(+)-MPDの日中での最低血漿中濃度を3ng/ml以上に保ち、しかもその $t_{1/2}$ の値を考慮して投与後1~2時間での $C_{max}$ が5~7ng/mlの範囲に入るようにMPDの投与量を設定すべきである。

Fig. 19に、MPDの最適投与量を決定する手順を示す。左に示すように、患者個人毎にまず20mgを経口投与した後の1~2hrの血漿中(+)-MPD濃度を測定する。この濃度が斜で示

す至適範囲からはずれた場合、投与量を増減して2回目の投与を行ない、Fig.19の左下に示す投与量と最高濃度のノモグラムを作成し、最終的にその5~7ng/mlに対応する値、最適投与量を求めることができると考えられる。

患者AとCにおいてはこの方法により2回目の投与を行なって、投与量の設定を行なって

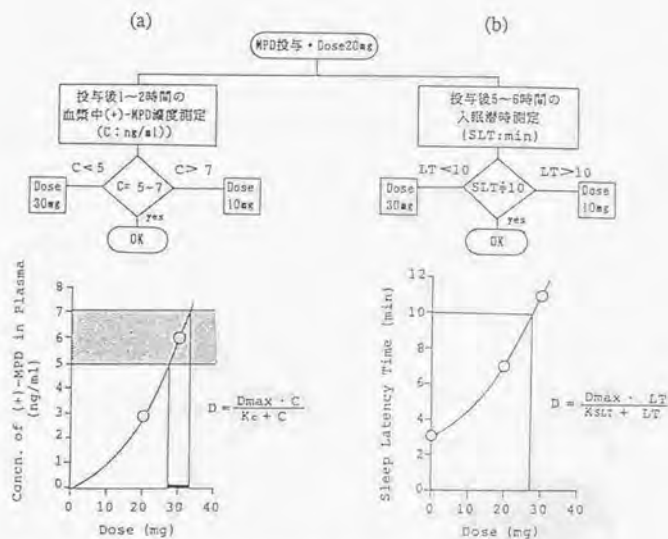


Fig.19 Determination procedures for dose resimen of racemic MPD·HCl as indicated plasma concentration of (+)-MPD (C) (a), and latency time (LT) in narcoleptic patients (b)



おり、病状がコントロールされたことから、この投与量設定法の有用性を確認している。

同様のことはFig.19の右に示す脳波による入眠潜時の測定でも可能であるが、脳波測定の煩雑さと患者の負担を考慮すると、血漿中濃度による投与量設定がより有用であると考えられる。

### 3. 小 括

ナルコレプシー患者におけるMPDの経口投与後の臨床効果としての入眠潜時と血漿中(+) - MPD濃度との間に良好な直線関係が見出された。この関係から、血漿中(+) - MPD濃度を少なくとも $3\text{ ng/ml}$ 以上に維持するように投与量を設定することにより、有効治療効果が得られることが可能となった。

### 第3章 ラットにおけるMPD光学異性体の

#### 脳内動態と薬効発現

##### 1. ラット脳線条体における立体特異的挙動

MPDの作用部位である脳におけるMPDの結合部位に関しては、 $[^3\text{H}]$ MPDはドパミン(DA)の神経終末が局在する線条体に結合すること[23]、また、ラットの前脳部(尾状核、側座核、結節)に高度に特異的な結合をすること[24]が*in vitro*実験により報告されている。また、*in vivo*実験において、 $[^{14}\text{C}]$ MPDをラットに静脈内投与した後の脳内各部位の放射活性の推移に、部位間の差はないこと[25]が報告されている。しかしながら、これらの報告はラセミ体での検討であり、MPD光学異性体の脳内各部位との結合性および脳内挙動については明らかにされていない。

そこで、この異性体間の薬理活性の差の要因を調べるために、ラットにMPDのラセミ体および各異性体を静脈内投与した後の各異性体の脳内挙動を検討した。さらに、DAとノル

エピネフリン(NE)取り込み阻害剤のマジンドール(MZD)とNE取り込み阻害剤のデシプラミン(DMI)を併用して[26-28]、MPDの特異的結合部位を特定した。

### 1-1 ラセミ体投与

MPDラセミ体(2mg/kg)を静脈内投与した後、1~240minの所定時間に採血した。採血後、直ちに断頭して、小脳、線条体、中脳、脳幹部および皮質の5部位を摘出し[28]、MPD光学異性体濃度を測定した。Fig.20は投与後の血

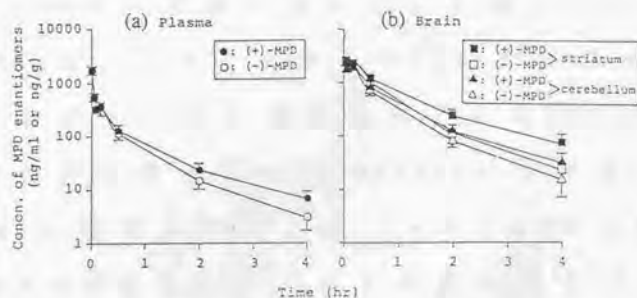


Fig.20 Concentration time courses of MPD enantiomers in plasma (a), and striatum and cerebellum (b) after intravenous dose of 2 mg/kg racemic MPD to rats (mean  $\pm$  SD, n=3-6)

漿中 (panel a)、小脳と線条体中 (panel b) の各異性体濃度推移を示している。小脳と線条体中の各異性体濃度はいずれも投与後 1min で血漿中濃度の平均 1.8 ~ 2.3 倍、5min で 5.1 ~ 7.4 倍に達した後、血漿中濃度とほぼ平行に低下した。他の脳部位についても同様に推移した。

Fig. 21 には投与後 240min までの各時間における血漿中濃度に対する脳内各部位の濃度比 ( $K_{\text{papp}}$ ) を示す。投与後、各部位における各異性体の  $K_{\text{papp}}$  値は急速に上昇してほぼ 10min で 5 ~ 10 の一定値に達した。しかし、ドパミン (DA) とノルエピネフリン (NE) の再取り込み部位が存在すると報告されている [26-28] 線条体では、投与後 120 と 240min における (+) 体の  $K_{\text{papp}}$  値はそれぞれ  $10.1 \pm 0.9$  と  $10.3 \pm 2.0$  で他の 4 部位に比べてより有意に高く ( $P < 0.01$ )、また、(-) 体の線条体の  $7.5 \pm 0.6$  ( $P < 0.01$ ) と  $7.0 \pm 3.0$  ( $P < 0.05$ ) に比べていずれも有意に高かった。このことから、線条体にお



けるMPDの(+)体の特異的な結合が示唆された。

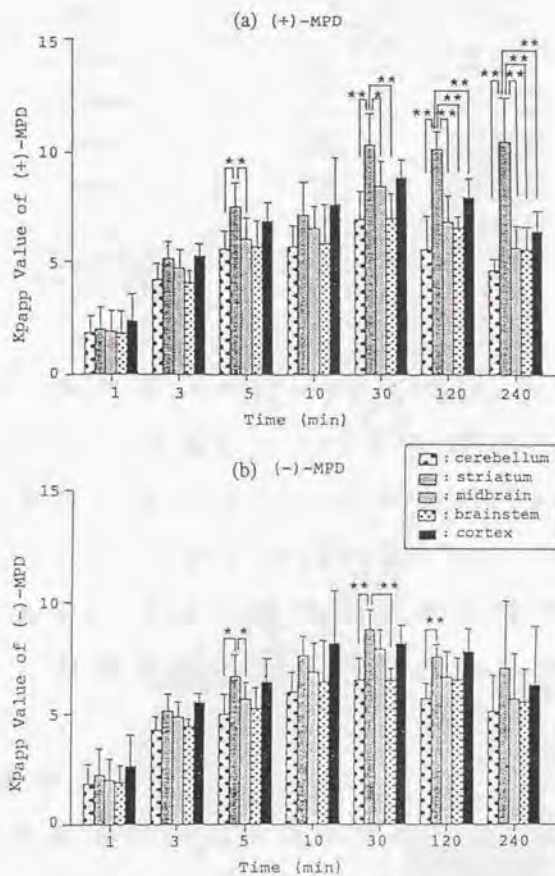


Fig.21 Kpapp values of (+)-MPD (a) and (-)-MPD (b) in regional brains after intravenous dose of 2 mg/kg racemic MPD to rats (mean  $\pm$  SD, n=3-6)  
\*P<0.05, \*\*P<0.01 when compared the Kpapp value in striatum with other brain regions.

Table 7 Influx clearance of MPD enantiomers in various brain regions after intravenous dose of racemic MPD (2 mg/kg) and isomers (1 mg/kg) to rats

Regional brain	Isomer	Influx clearance (ml/min/g)	
		Racemate <sup>1)</sup>	Isomers <sup>2)</sup>
Striatum	(+)	0.570 ± 0.062 <sup>3)</sup>	0.794 ± 0.222 <sup>1)</sup>
	(-)	0.506 ± 0.171	0.463 ± 0.040
Cerebellum	(+)	0.401 ± 0.090	0.309 ± 0.082
	(-)	0.379 ± 0.190	0.421 ± 0.083
Midbrain	(+)	0.446 ± 0.111	0.559 ± 0.217
	(-)	0.471 ± 0.230	0.529 ± 0.120
Brainstem	(+)	0.414 ± 0.055	0.413 ± 0.235
	(-)	0.396 ± 0.183	0.583 ± 0.214
Cortex	(+)	0.481 ± 0.125	0.501 ± 0.182
	(-)	0.430 ± 0.222	0.526 ± 0.061

1) Racemic MPD was administered. 2) Each isomer was administered.

3) Mean ± SD, n=3-6.

投与後初期(1~10min)の $K_{app}$ 値から Patlakらの方法[19,30]により各異性体の血液脳関門における取り込み速度(Influx clearance)を求めた(Table 7)。その結果、各異性体の血液脳関門の透過は速やかで、部位差、異性体間の差は比較的小さいことが示された。

#### 1-2 異性体投与

異性体間の相互作用の有無を調べる目的で、MPD各異性体1mg/kgの投与量で、ラセミ体投与と同様の実験を行なった。その結果、異性

化は認められず、血漿中濃度推移はラセミ体投与の各異性体の推移とはほぼ同様であった。Influx clearanceの値はラセミ体投与と有意な差はなかった (Table 7)。

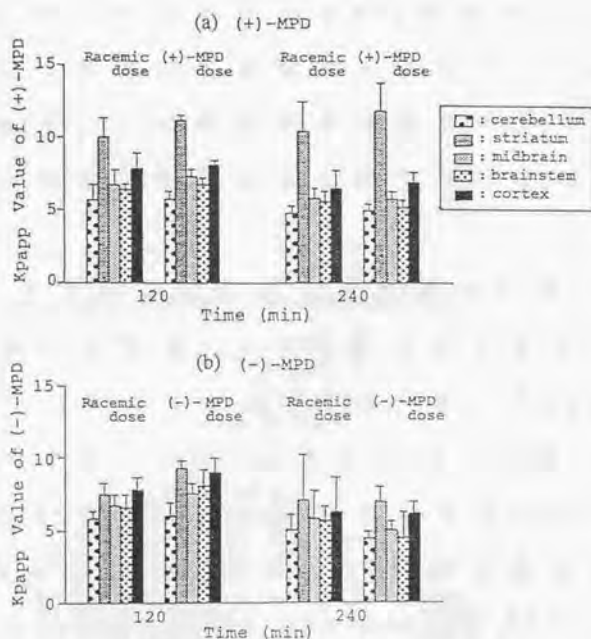


Fig.22 Comparative  $K_{papp}$  values of (+)-MPD in regional barins at 120 and 240 min after intravenous dose of (+)-MPD (1 mg/kg) or racemic MPD (2 mg/kg) to rats (a), and comparative  $K_{papp}$  values of (-)-MPD after intravenous dose of (-)-MPD (1 mg/kg) or racemic MPD (2 mg/kg) (b). (mean  $\pm$  SD, n=4-6)

Fig. 22(a)に示す(+)-MPD投与後120と240 minの線条体における $K_{Dapp}$ 値は、それぞれ  $11.2 \pm 0.3$ と $11.9 \pm 2.0$ で他の4部位比べて有意に大きく、Fig. 24(b)に示す(-)-MPDの $K_{Dapp}$ 値より有意に大きかった。ラセミ体投与と異性体投与における各MPD異性体の $K_{Dapp}$ 値の間にも有意な差は認められなかった。このことから、この異性体間の結合の差は、異性体間の相互作用によるものでないことが示された。

### 1-3 モノアミン再取り込み阻害剤の併用

線条体における(+)-MPDの立体特異的結合部位を特定するために、MPDラセミ体2mg/kgを静脈内投与して90minまたは210min後に、DAおよびNE再取り込み阻害剤であるmazindol (MZD; 8mg/kg [30])またはNE再取り込み阻害剤であるdesipramine(DMI; 8mg/kg [30, 31])を静脈内投与し、その30min後に断頭して各脳組織を摘出した。Fig. 23には、(+)-MPDの線条体(Panel a)と主にNE再取り込み部位の



存在すると報告されている小脳 (Panel b) [26]での各投与における  $K_{papp}$  値、(-)-MPDの線条体 (Panel c) と小脳 (Panel d) での  $K_{papp}$  値を示す。線条体における (+)-MPDの  $K_{papp}$  値は、MZD併用の場合120minで  $7.8 \pm 0.8$  ( $P < 0.01$ )、240minで  $7.0 \pm 0.5$  ( $P < 0.05$ )を示し、

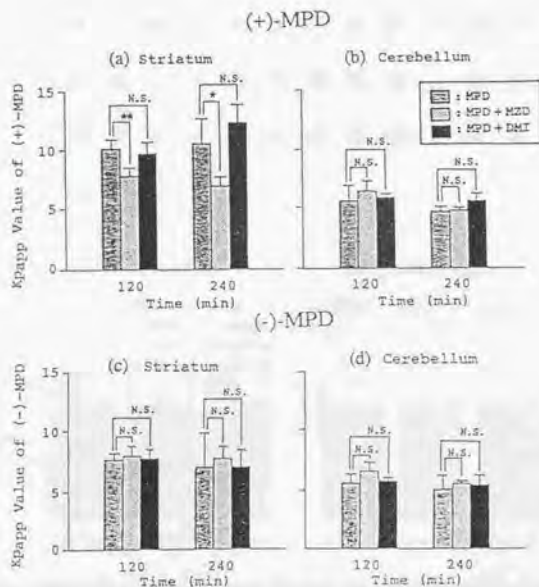


Fig.23 Effect of mazindol (MZD, 8 mg/kg) and desipramine (DMI, 8 mg/kg) on  $K_{papp}$  values of (+)-MPD in striatum (a) and cerebellum (b), and (-)-MPD in striatum (c) and cerebellum (d) after intravenous dose of racemic MPD (2 mg/kg) to rats (mean  $\pm$  SD,  $n=3-6$ ) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , N.S.:not significant.



併用しない時の値に比べて有意に低下したが、DMI併用では各々 $9.8 \pm 0.9$ と $12.3 \pm 1.5$ で有意な変化は認められなかった(Panel a)。一方、小脳における(+)-MPDの $K_{DAPP}$ 値(Panel b)、線条体、小脳における(-)-MPDの値(Panel c、d)には、各阻害剤の併用による影響は認められなかった。

Fig.24は、以上の阻害実験の結果を模式的に示している。ここで縦軸は、結合部位における結合ポテンシーの任意値を表わし、各投

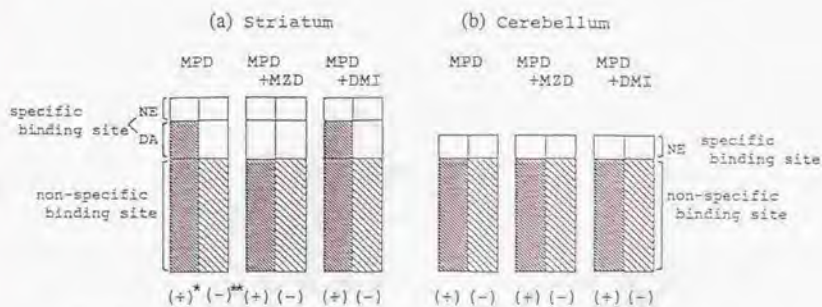


Fig.24 Schematic representation of binding site of MPD enantiomers in striatum (a) and cerebellum (b) after intravenous dose of racemic MPD, racemic MPD + mazindol (MZD) and racemic MPD + desipramine (DMI). Each bar represents the arbitrary number of binding potency in the binding site. NE: norepinephrine reuptake site, DA: dopamine reuptake site. (+)-MPD, (-)-MPD.

与における線条体と小脳における各異性体の結合部位を示した。

以上のことから、(+)-MPDは線条体のDA再取り込み部位に特異的に結合することが示唆され、この結合における異性体間の差が薬理活性の差の主たる原因であることが推察された。

## 2. マイクロダイアリシス法による脳線条体細胞間隙液中MPD光学異性体と内因性ドパミンの関係

MPDは主に脳のドパミン(DA)作動性神経終末におけるDAの再取り込みを阻害して、神経細胞間隙中DA濃度を増加させることにより薬理効果を発現すると報告されており[8-11]、前項でこの薬理効果の異性体間の差は、DA再取り込み部位への結合性の違いによるものであることが示唆された。そこで、マイクロダイアリシス法を用いて、ラット脳線条体に挿入した微小プローブより細胞間隙液の透析を行ない、MPD投与後の透析液中MPD光学異性体および内因性DA濃度を測定して、MPDの体内動態とDAレベルの変化との関係を検討した。

ラットに無麻酔の状態でMPDラセミ体の5mg/kgまたは各異性体の2.5mg/kgを静脈内投与した後、脳線条体に挿入した微小プローブを用いて透析を行なった。経時的に採取した透析液中のMPD異性体濃度および、DAとDAの逐

次的代謝物[33]である3,4-di-hydroxyphenyl-acetic acid(DOPAC)とhomovanillic acid(HVA)の濃度を測定した。DA、DOPAC、HVA濃度はHPLC-ECDにより測定した。

## 2-1.MPDの静脈内投与後の血漿中と線条体透析液中MPD濃度推移

脳内透析液中MPD濃度と血漿中MPD濃度を比較するため、透析実験とは別に、ラットにMPDを静脈内投与した後(ラセミ体5mg/kgまたは各異性体2.5mg/kg)の各異性体の血漿中濃度を測定した。

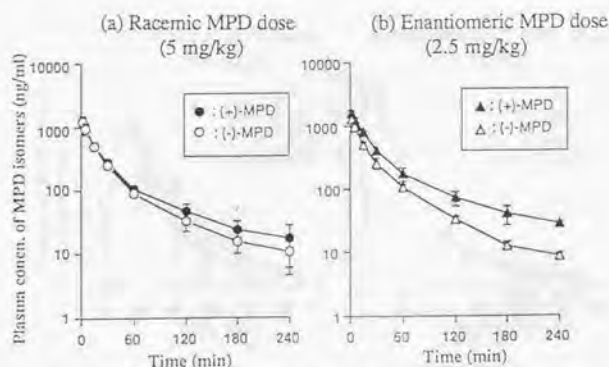


Fig.25 Plasma concentrations of MPD enantiomers after intravenous dose of racemic MPD (5 mg/kg) (a), and enantiomeric MPD (2.5 mg/kg) (b) to rats (mean  $\pm$  SD, n=3)

Table 8 Pharmacokinetic parameters of MPD enantiomers after intravenous dose of racemic and enantiomeric MPD to rats

Parameters	Isomers	Racemic MPD (5 mg/kg)	(+)-MPD (2.5 mg/kg)	(-)-MPD (2.5 mg/kg)
A (ng/ml)	(+)	1085 ± 261 <sup>1)</sup>	1385 ± 160 <sup>1)</sup>	
	(-)	1089 ± 259		1178 ± 115 <sup>1)</sup>
B (ng/ml)	(+)	337 ± 32	361 ± 128	
	(-)	332 ± 28		202 ± 34
$\alpha$ (hr <sup>-1</sup> )	(+)	6.27 ± 1.44	4.38 ± 0.81	
	(-)	6.26 ± 1.79		4.77 ± 0.40
$\beta$ (hr <sup>-1</sup> )	(+)	0.93 ± 0.14	0.71 ± 0.16	
	(-)	1.08 ± 0.14		0.83 ± 0.04
V <sub>dss</sub> (L/kg)	(+)	5.01 ± 0.07	4.43 ± 1.15	
	(-)	4.78 ± 0.19		6.14 ± 0.94
CL <sub>tot</sub> (L/hr/kg)	(+)	4.66 ± 0.66	3.02 ± 0.24	
	(-)	5.17 ± 0.58		5.09 ± 0.58
AUC (ng · hr/ml)	(+)	544 ± 81	832 ± 68	
	(-)	488 ± 56		495 ± 58

1) Mean ± SD, n=3.

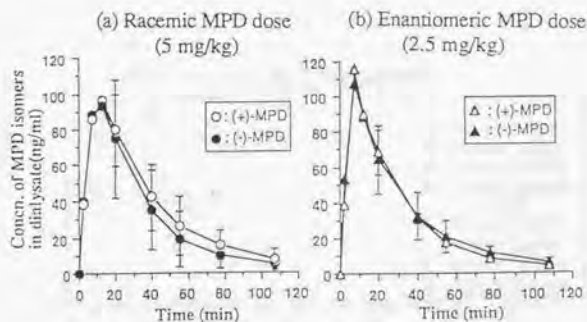


Fig.26 Extracellular MPD enantiomers levels in striatum after intravenous dose of racemic MPD (5 mg/kg) (a), and enantiomeric MPD (2.5 mg/kg) (b) to rats (mean ± SD, n=3)



ラセミ体投与後の透析液中MPD濃度は、各異性体ともに投与後5～15minで最高に達し、その後血漿中濃度とほぼ平行に減衰した(Fig. 26(a))。βは(+)体が平均 $0.8\text{h}^{-1}$ で(-)体が $1.0\text{h}^{-1}$ であった(Table 8)。Fig. 26(b)に示す異性体投与における透析液中MPD濃度は、ラセミ体投与の濃度推移とほぼ同じであり、静注後の脳組織中濃度推移(Fig. 20(b))とほぼ一致した。

Fig. 27に示す各MPD静脈内投与後60minにお

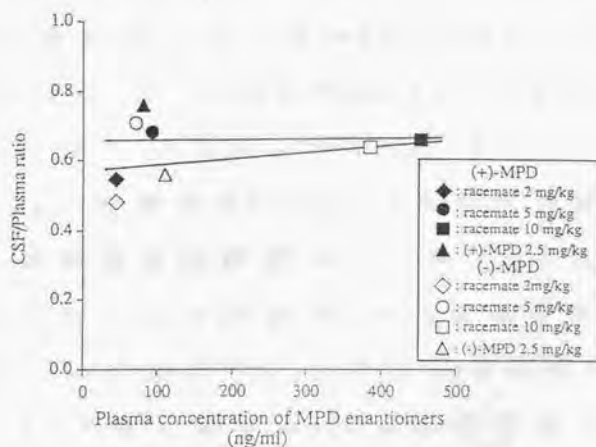


Fig. 27 Ratios of cerebrospinal fluid (CSF) concentration to plasma of MPD enantiomers at 60 min after intravenous doses of MPD to rats

ける各異性体の血漿中濃度に対する脳脊髄液中濃度の比(CSF/Plasma)は、血漿中MPD異性体濃度が40~450ng/mlの範囲でほぼ一定で、(+)体が $0.664 \pm 0.085$  (n=4)、(-)体が $0.598 \pm 0.098$  (n=4)であった。これらの値はMPDの血漿中蛋白非結合率(Fig.15)とほぼ同じであった。このことから、MPDの血液から脳脊髄液中への移行過程に担体を介する能動的な輸送機構がないことが推察される。

#### 2-2. MPDの静脈内投与後の線条体細胞間隙液中DAおよびDOPAC、HVAレベルの推移

MPD投与前の透析液中DA、DOPAC、HVA濃度は各々 $38 \pm 21$ 、 $690 \pm 265$ 、 $367 \pm 139$  pg/10  $\mu$ l (各n=12)であった。Fig.28はMPDラセミ体5mg/kg、各異性体2.5mg/kgを静脈内投与した後の透析液中DA濃度の変化率(%)の推移を示している。この変化率はMPD投与前の濃度を基準として求めた。生理食塩液投与(コントロール)では、投与後4hrまで投与前の値に比べて変化がほとんど認められなかったが、ラ

セミ体投与後のDAレベルは急激に上昇して5~10minで最高に達し、投与前の $4.7 \pm 0.5$ 倍に増加した。その後は、速やかに低下して、60minではほぼ投与前の値に戻った。

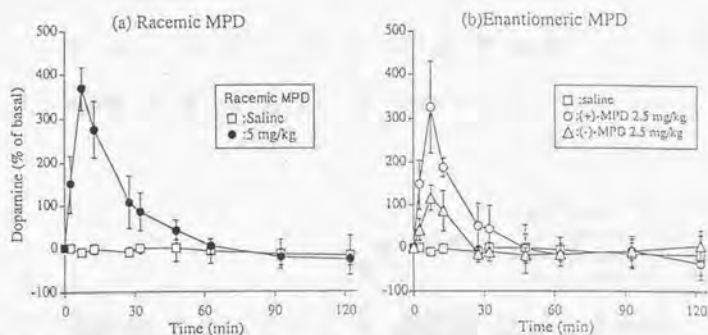


Fig.28 Extracellular dopamine levels in striatum after intravenous doses of racemic MPD (5 mg/kg) (a), and enantiomeric MPD (2.5 mg/kg) (b) to rats (mean  $\pm$  SD, n=3)

異性体投与では、 $T_{max}$ は各異性体ともにラセミ体投与とほぼ同じであったが、その値は(+)体が投与前の $4.3 \pm 1.1$ 倍、(-)体が $2.2 \pm 0.3$ 倍であり、(+)体の方が変化率が大きかった。

細胞間隙液中のDOPACレベルはラセミ体と(+)体投与により徐々に減少し、投与後30minで投与前の60~80%に達した(Fig. 29(a))。一方、(-)体投与ではほとんど変化は認められなかった。HVAの変化は、ラセミ体および(+)体投与で、DOPACの変化の推移とほぼ同様の変化を示したが、その減少率はDOPACより小さい傾向にあった(Fig. 29(b))。

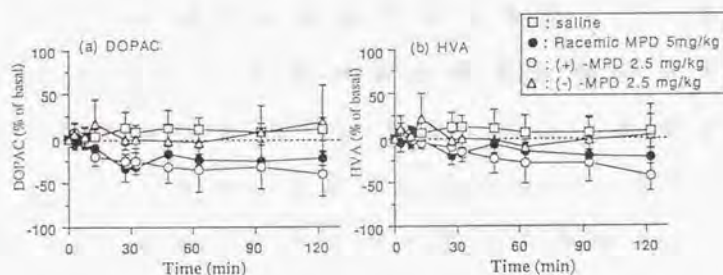


Fig.29 Extracellular DOPAC (a) and HVA (b) levels in striatum after intravenous dose of racemic MPD (5 mg/kg) (a), and enantiomeric MPD (2.5 mg/kg) (b) to rats (mean  $\pm$  SD, n=3)

MPDの作用機序としてDA再取り込み阻害作用が報告されている[8-11, 23]。本研究にお



いて、MPDラセミ体および(+)体投与後の透析液中DA濃度が透析液中MPD濃度の上昇に伴って急激に増加したことは、DAの再取り込みが阻害されたことによると示唆される。この急激な増加は、Hurdら[8]やButcherら[9]のラットに麻酔下でMPDを皮下または腹腔内投与した後に透析液中DA濃度が緩徐に増加した報告と異なる結果であった。彼等はMPDがDA再取り込み部位に結合したことにより、細胞間隙液中にDAが徐々に蓄積すると考察している。Kushimaら[34]は麻酔薬が灌流実験における脳内神経伝達物質の放出量に大きな影響を与えることを報告している。これらのことから、このDAの増加のパターンの違いの原因として、我々の静脈内投与実験と投与経路が異なること、さらに麻酔による影響が考えらる。

一方、(-)体投与後のDA濃度は(+)体ほど大きな変化が認められなかった。これは(+)体が主たる薬理活性型であるという報告[12]を支持するものである。



細胞間隙液中のDOPACおよびHVAレベルはDAに比べて変化率が小さく、減少傾向にあった。この知見は、Hurdら[8]とButcherら[9]の報告と同様な結果であり、この原因としてHurdらは、これらの代謝物の生成が細胞間隙液中ではなく、神経細胞内でおこるため、細胞間隙液中DAレベルの変化によって、DOPACとHVAレベルは影響されないとしている。

### 2-3. 血漿中および線条体透析液中MPD濃度と

#### DAレベルの関係

MPDラセミ体 (Fig. 30(a)) および各異性体

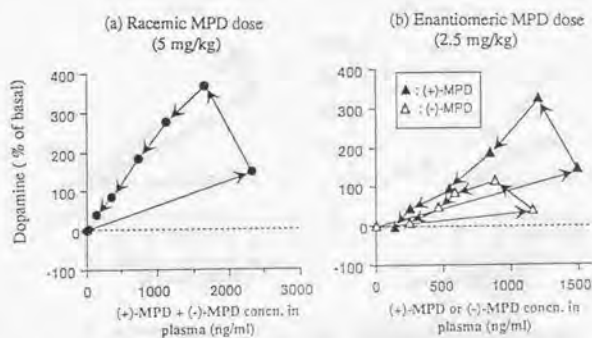


Fig. 30 Correlation between plasma concentrations of MPD and extracellular DA levels in striatum after intravenous dose of racemic MPD (5 mg/kg) (a), and enantiomeric MPD (2.5 mg/kg) (b) to rats (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )

(Fig. 30(b))を静脈内投与した後の血漿中および透析液中MPD濃度に対する細胞間隙液中DAレベルの変化率の関係を検討した。ラセミ体および各異性体投与ともに、血漿中MPD濃度とDAレベルの間には反時計回りのヒステリシス現象が認められた。また、透析液中MPD濃度とDAレベルの変化率の間には、ラセミ体(Fig. 31(a))および各異性体投与(Fig. 31(b))ともに時計回りの弱いヒステリシス現象が認められた。

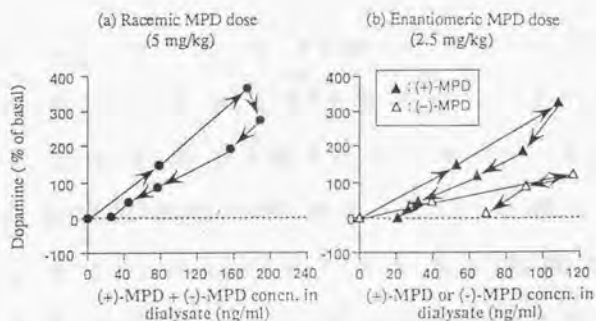


Fig.31 Correlation between Extracellular MPD and DA levels in striatum after intravenous dose of racemic MPD (5 mg/kg) (a), and enantiomeric MPD (2.5 mg/kg) (b) to rats (mean  $\pm$  SD, n=3)

血漿中MPD濃度に対する細胞間隙液中DAレベルの時間推移において、反時計回りのヒステリシ現象が認められたのは、DAレベルが静注後5~10minで最大値に達するためである。一方、透析液中MPD濃度に対するDAレベルの推移は、血漿中濃度との関係よりも良好な比例関係が認められた。これは透析液中MPD濃度のTmaxが、DAレベルと同様に遅れるためである。弱いながら時計回りのヒステリシ現象が認められたのは、透析液中MPD濃度の消失に比べてDAレベルの消失が速いためと考えられる。

Fig.32に示したin vitroマイクロダイアリシス実験から求めたMPD異性体とDAの回収率は、ほとんど同じ(約20%)であり、また平衡に達する時間も透析開始後7.5minと同じであった。このことは、DAとMPDの透析膜透過性には差がないことを示している。従って、上記の透析液中のMPDとDA間の時計回りのヒステリシス現象の原因として、MPDの静脈内投与

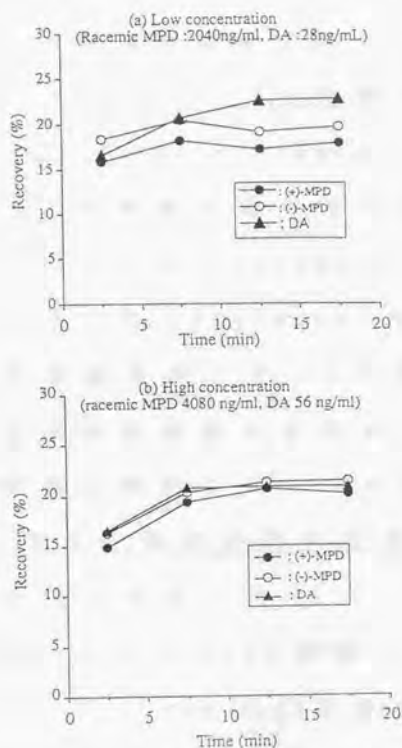


Fig.32 In vitro recovery of MPD enantiomers and DA through microdialysis probe  
(Infusin carrier :Ringer HEPES buffer, Flow rate :2  $\mu$ l/min)

後の高いMPD濃度にDA再取り込み部位が曝されたことによる脱感作、DAの細胞間隙液中からの消失の亢進または間隙液中への放出の低下などの可能性が推察される。しかし、現時点では原因は明らかではない。

### 3. 脳線条体細胞間隙液中DAレベルと

#### locomotor activityとの関係

MPDラセミ体(2、5、10mg/kg)と各異性体(2.5mg/kg)を静脈内投与後の脳線条体細胞間隙液中のDAレベルとlocomotor activityとの関係を検討した。locomotor activityは動物行動解析装置を用いて、5分毎の移所行動距離、立ち上がり回数の変化をマイクロダイアリシス実験とは別のラットで測定した。

#### 3-1. MPDラセミ体の静脈内投与後の細胞間隙

##### 液中DAレベルの変化

locomotor activity実験に先立ち、MPDラセミ体(2、5、10mg/kg)を静脈内投与後の細胞間隙液中DAレベルの変化を検討した(Fig. 33)。

各投与後の細胞間隙液中DAレベルは、投与後、急激に上昇して5~10minで最高に達し、2mg/kgで投与前の $3.0 \pm 1.0$ 倍、5mg/kgで $4.7 \pm 0.5$ 倍(2-2のデータ)、10mg/kgで $8.5 \pm 2.8$ 倍で、投与量の増加にほぼ比例して増加した。



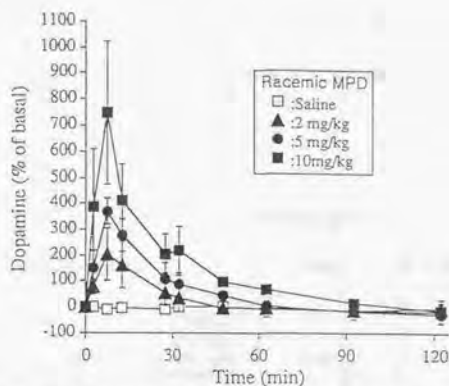


Fig.33 Extracellular dopamine levels in striatum after intravenous doses of 2, 5 and 10 mg/kg racemic MPD to rats (mean  $\pm$  SD, n=3)

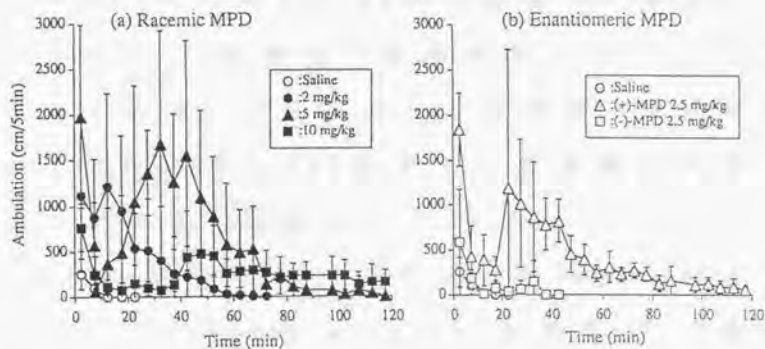
### 3-2. MPD 静 脈 内 投 与 後 の locomotor activity の 変 化

5 分 毎 の ラ ッ ト の 移 動 距 離 と 立 ち 上 が り 回 数 の 経 時 的 変 化 を Fig. 34 に 示 す。

MPD ラ セ ミ 体 2 mg/kg を 静 注 し た 後、移 動 距 離 は 急 激 に 増 加 し て 12.5 min で 最 高 に 達 し た 後 ( $1213 \pm 1022$  cm)、速 や か に 低 下 し て 約 60 min で ラ ッ ト の 動 き は ほ ぼ 停 止 し た (panel a)。こ の 推 移 は 透 析 液 中 MPD 濃 度 (Fig に 示 さ ず) お よ び DA レ ベ ル (Fig. 33) の 推 移 と 一 致 し た。ラ セ ミ 体 5 mg/kg 投 与 で は 2.5 min と 32.5 min に 2 つ

のピークが認められ、その値はそれぞれ  $1985 \pm 1002 \text{ cm}$ 、 $1672 \pm 1254 \text{ cm}$ であった。ラセミ体

### Ambulation



### Rearing

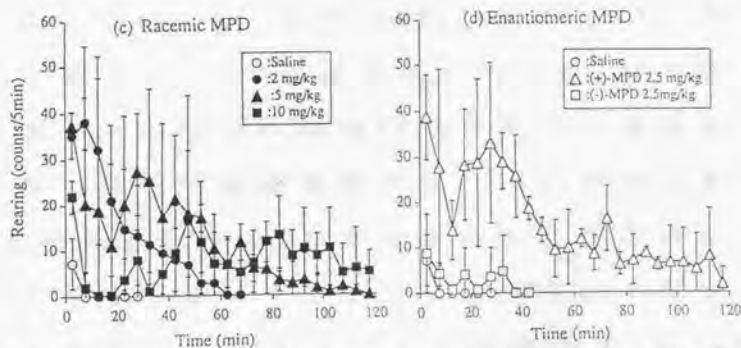


Fig.34 Locomotor activity per 5 min after intravenous doses of MPD to rats (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )  
Distance of ambulation at doses of racemic MPD (a) and enantiomeric MPD (b)  
Rearing counts at doses of racemic MPD (c) and enantiomeric MPD (d)

10mg/kg投与では、5mg/kg投与と同様に2峰性を示したが、locomotor activityは他の投与量に比べて著しく低かった。

異性体2.5mg/kg投与(panel b)では、(+)体はほぼラセミ体5mg/kg投与と同様の推移を示したが、(-)体投与では投与後12.5minで動きは停止して、コントロールと同様の推移を示したことより、(+)体が主に薬理活性を持つことが確認された。

MPDの高投与量で、ラセミ体2mg/kg投与に比べてlocomotor activityが低下し、2峰性が認められたことは、メタンフェタミンにおけるSharpら[35]とHirabayashiら[36]の報告と一致する。MPDラセミ体10mg/kgを投与後、急激にlocomotor activityが低下した時間帯では、装置内の床の格子をbitingする行動(常同行動の一つ)が認められた。この現象はアンフェタミンやメタンフェタミンの高投与量で常同行動が発現するという報告[37,38]と同じであり、常同行動の増加により

locomotor activityが低下したものと考えられる。

MPDラセミ体投与後の5分毎の立ち上がり回数(panel c)は、2mg/kgを静脈内投与した後、急激に上昇して7.5分で最高に到達し(38.0 ± 5.6回)、その後速やかに低下して、移動距離とほぼ同様の推移を示した。5mg/kgおよび10mg/kg投与においても、移動距離の推移と同様に2峰性を示し、そのレベルは10mg/kg投与の方が5mg/kgより低かった。

MPDの各異性体2.5mg/kg投与においても、移動距離の推移と同様であった(panel d)。

### 3-3. 細胞間隙液中DAレベルとlocomotor

#### activityの関係

Fig. 35は各投与量における線条体細胞間隙液中DAレベルと移動距離の関係を示している。DAレベルが投与前の2.5倍までは移動距離と直線関係が認められたが、それ以上のDAレベルでは逆に低下し、ベル型を呈した。

Sharpら[35]は、メタンフェタミンのラッ

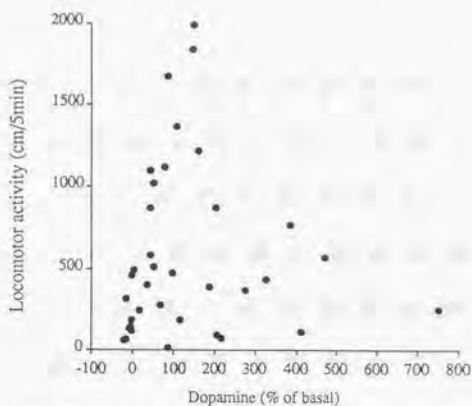


Fig. 35 Correlation between extracellular dopamine (DA) level and locomotor activity (distance of ambulation) after doses of MPD to rats

ト脳線条体と側坐核のDAレベルの変化と locomotor activityとの関係において、low doseで相関があると報告している。MPDにおいては脳線条体細胞間隙液中DAレベルの増加が、投与前の約2.5倍まではlocomotor activityとほぼ原点を通る相関関係にあると言える。しかし、それ以上のDAレベルになると、逆にlocomotor activityは低下し、いわゆるベル型を呈することが明らかとなった。



#### 4. 小 括

MPDラセミ体の静脈内投与後の脳内各部位の各異性体濃度推移より、線条体における(+)体の立体特異的な結合が示された。さらにDA再取り込み阻害剤の併用実験により、(+)体は、DA再取り込み部位に特異的に結合し、この結合における異性体間の差が薬理活性の主たる要因であることが示唆された。

マイクロダイアリシス実験における、MPD異性体を静脈内投与後の脳線条体細胞間隙液中DAレベルの増加率は、(+)体投与の方が(-)体より約3倍大きいことが示され、(+)体が主たる薬理活性型であることが確認された。またDAレベルの増大は投与量の増加にほぼ比例した変化を示した。しかしながら、細胞間隙液中DAレベルの増加率とMPD濃度との間に弱い時計回りのヒステリシス現象が認められたが、この原因は現在明らかではない。

ラットの移動距離と立ち上がり回数で表わしたlocomotor activityと、細胞間隙液中DA

レベルとの間にはベル型が示され、DAレベルが2.5倍以下の低レベル領域ではlocomotor activityはDAレベルと比例的に増加することが明らかとなった。

## 結 語

(1)本研究において、ナルコレプシー患者におけるMPDの体内動態とその変動機序、および血漿中濃度と薬効との関連性について明らかにした。そして、これらの結果に基づいて、(+)-MPDの血漿中濃度を少なくとも $3\text{ ng/ml}$ 以上に維持するように、投与計画を設定する方法を確立した。この方法の確立によって、従来経験的に投与量が決められていたこの薬物において、副作用発現を防止して最大の効果をあげるきめ細かい投与量設定を可能とした。このことは、ナルコレプシー患者のQOLをより向上させるものであり、臨床上の貢献が大であると考ええる。

(2)MPDの脳内動態と効果の関係についてラットを用いて検討し、DAの再取り込み部位のある脳線条体にMPDの(+)体の特異的に結合することを明らかにした。この結合における異性体間の差が、薬理効果発現の主たる要因であることが示唆された。さらに脳線条体細胞間

隙液中のDAレベルの増加率の異性体間の差は、線条体におけるMPDの立体特異的な結合を反映していることを示唆した。

脳細胞間隙液中DAレベルは、MPDの消失相における血漿中濃度推移と平行な変化を示し、また細胞間隙液中のMPDレベルの推移ともほぼ平行な変化(弱いながらヒステリシスが見られるが)を示した。さらに、脳細胞間隙液中DAの低レベル領域での locomotor activity は、DAレベルと比例的に増加することが明らかとなった。本研究におけるこれらの結果は、ナルコレプシー患者の臨床効果と血漿中濃度の間の良好な相関関係を支持するものである。

## 実験法

### 1. 実験材料

#### 1-1 薬品、標品および試薬

Threo型MPD・HClのラセミ体はCiba-Geigy (宝塚、日本)から提供された。MPDの各異性体はPatrickらの方法を用いてMPDのラセミ体を晶析法で分割した[12]。得られた各異性体の旋光度は(+)体の0.8%メタノール溶液で $[+88^{\circ}]$ (文献値 $[+89^{\circ}]$ )、(-)体の0.8%メタノール溶液で $[89^{\circ}]$ (文献値 $[81^{\circ}]$ )であった[39]。

生体試料中のMPD光学異性体の定量における内標準物質(I.S.)として用いたthreo型ethylphenidate・HClのラセミ体は合成によって得た[40,41]。MPDおよびI.S.のキラル誘導体化試薬のn-heptafluoro-butyryl-L-prolyl-chloride(HFBPC)はLimらの方法に従って合成した[42]。

ヒトにおける経口投与試験に用いた錠剤(リタリン®錠:1錠中にthreo型MPD・HClのラ



セミ体10mgを含有)は、Ciba-Geigy(宝塚、日本)から購入した。

ラットにおけるMPDのDA再取り込み阻害実験に用いたMazindol(MZD)はCiba-Geigy(宝塚、日本)から、desipramine・HCl(DMI)は東京大学薬学部製剤学教室から提供された。

マイクロダイアリシス実験における透析液中モノアミンの定量に用いたDopamine(DA)・HCl、3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid (DOPAC)およびhomovanillic acid(HVA)は和光純薬(大阪、日本)から購入した。I.S.の塩酸イソプロテレノール液はBAS社(東京、日本)から購入した。ハロタンはヘキストジャパン(東京、日本)から購入した。他の試薬は全て特級品を用いた。

## 1-2 実験動物

すべての動物実験においてWistar系雄性ラット(270~330g:日本医科動物)を用いた。少なくとも3週間、自由に餌と水を摂取させた状態で飼育してから使用した。なお、経口投

与実験の場合、実験前日から絶食させた。

## 2. 生体試料中のMPD光学異性体と代謝物の定量法 [43, 44]

### 2-1 生体試料からの抽出操作

ヒトの血漿、尿、ラットの血漿、全血、尿、脳組織、脳脊髄液、マイクロダイアリス実験における透析液、および蛋白結合率測定実験における限外ろ過液中のMPDあるいはRAの光学異性体はGC-MS法により定量した。尿は希釈して、脳組織は3倍量の生理食塩液を添加してホモジネートした液を試料とした。他の試料はそのまま用いた。

氷冷下で生体試料にI.S.のメタノール溶液(50~500 ng/ml)の0.1 mlと、Sodium tetraborateの飽和溶液(pH 9.2~9.5)の1 mlを加えた後、4 mlのcyclohexaneでMPDとI.S.を抽出した。この有機相を塩酸酸性下で蒸発乾固した後、その残渣に氷冷下で1 mlの0.3 M carbonate buffer(pH 9)とキラル誘導体化試

葉の0.02M HFBPCのdichloromethane溶液を20  $\mu$ l加えて、MPDとI.S.を誘導体化した。なお、水相に残存するRAを定量する場合は、水相1 mlを別に採取した。ついで、この誘導体をcyclohexaneで抽出した後、有機相を蒸発乾固した残渣をメタノール30  $\mu$ lで溶解して、その1~4  $\mu$ lをカラムに注入した(Fig.36)。

水相のRAは、2-propanolで抽出し、蒸発乾固した後、 $H_2SO_4$ -methanol混液を加え、85  $^{\circ}C$

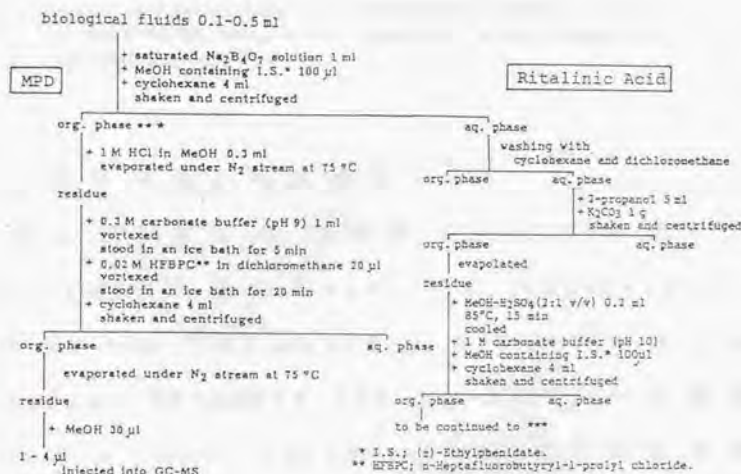


Fig.36 Extraction procedures of determination of MPD enantiomers and its metabolite, ritalinic acid (RA), enantiomers in biological fluids

でメチル化してMPDの形にした後、上記と同様にHFBP誘導体化して測定した (Fig. 37)。

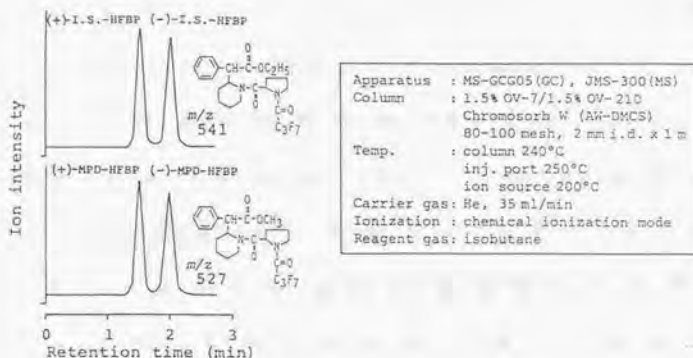


Fig.37 Selected ion monitoring chromatograms of heptafluorobutryl-(-)-prorol (HFBP) derivatives of racemic MPD and ethylphenidate (IS), and condition of GC-MS

## 2-2 使用機器と測定条件

測定に用いたGC-MS装置はmultiple ion detectorを装備したmass spectrometer(model JMX DX-300, JEOL, JAPAN), ガスクロマトグラフ(model MS-GCG05, JEOL)およびデータ処理システム(model JNA2000, JEOL)から構成された。カラムはシラン処理したガラス管(1m x

2.6mm, id) に 1.5% OV-7/1.5% OV-210、Chromosorb W AW DMCS (80-100 mesh、ガスクロ工業、東京、日本) を充填したものを用いた。キャリアガスとして 37 ml/min のヘリウムを用いた。oven, injection port, separator, ion source の温度はそれぞれ 240、250、285、200 °C で行なった。mass spectrometer は反応ガスとして isobutane を用いた CI モードで操作し、MPD および I.S. の HFBP 誘導体はそれぞれ  $m/z$  527 と 541 の偽イオン分子  $[M+1]^+$  をモニターした。Fig. 37 には、この条件で測定した MPD 光学異性体と I.S. のクロマトグラムを示す。

### 3. 患者および健常人における経口投与試験

#### 3-1 被験者

被験者は 4 名の傾眠疾患患者 (男性 3 名と女性 1 名、年齢  $37 \pm 22$  才、体重  $61 \pm 12$  kg : Table 3) と健常人 4 名 (男性 3 名と女性 1 名、年齢  $34 \pm 6$  才、体重  $61 \pm 11$  kg) とした。



患者の内訳は、情動脱力発作が現在または既往に見られ、HLA-DR2が陽性でありナルコレプシーと診断された3名(患者A、B、C)と情動脱力発作はないが傾眠傾向が認められ、真性傾眠症(EHS)と診断された1名(患者D)であった[45-48]。患者Aは休薬中で約6ヶ月間MPDを服薬しておらず、残りの患者3名および健常人4名はいままでこの薬物を服薬しなかった。また、患者Aは、1回投与試験の前日まで、ペモリン50mg/day[48]とクロミプラミン100mg/day[49]を服用していた。全ての患者と健常人の肝機能、腎機能は、臨床試験の結果、正常であった。

また、試験に先立ち、被験者に試験の主旨を説明して承諾を得た。

### 3-2 投与試験

被験者に午前10時半～11時の間に約200mlの水と一緒に各MPDを服用させ、投与前と投与後8～12hrまで経時的に0.5～1hr間隔で血液を採取し、さらに健常人では全尿を48hrま

で採取した。患者においては、採血時に効果の判定を行なった。採取した血液を遠心分離して得た血漿と尿は $-80^{\circ}\text{C}$ で測定まで保存した。

患者AとBでは、初回投与から3週間連続投与した後、同様の投与試験を行なった。健常人については、各々3~4レベルの投与量で投与試験をおこなった。なお投与間隔は4週間、投与順序はランダム化した。

### 3-3 効果の判定法

患者全員に、7段階のStanford Sleepiness Scale(SSS)(Table 9)[21]に基づく眠気の主観的評価法を、患者A、B、CにMultiple Sleep Latency Testによる入眠潜時(Latency Time:LT)を測定する脳波学的な方法を実施して効果を判定した。LTの判定にはAmerican Sleep Disorders Association(ASDS)の基準[22]を用い、入眠と判定した直後に患者を覚醒させた。20min経過しても入眠に至らなかった場合にはその時点でその回の測定を中断し

た。入眠は安静閉眼時に出現する脳波の $\alpha$ 波が消失した時点とし、専門医が判定した (Fig. 38)。

Table 9 Stanford Sleepiness Scale (SSS)

Scale	Statement of subjects
1	Feeling active and vital; alert; wide awake.
2	Functioning at a high level, but not a peak, able to concentrate.
3	Relaxed; awake; not at full alertness; responsive.
4	A little foggy; not at peak; let down.
5	Fogginess; beginning to lose interest in remaining awake; slowed down.
6	Sleepiness; prefer to be lying down; fighting sleep; woozy.
7	Almost in reverie; sleep onset soon; lost struggle to remain awake.

E. Hooddes, et al., Psychophysiol., 9,150 (1972)

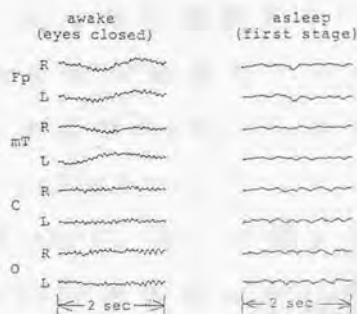


Fig.38 Electroencephalogram change in human

試験当日はコーヒーやお茶などの覚醒レベルに影響を及ぼす飲食物やMPDを含めた薬物の摂取を禁じた。朝食は投与2hr以上前に摂取し、昼食は投与後2hr以降の午後1時に摂取した。また、患者に睡眠調査表(OSA質問紙)[50]において前夜の睡眠が普段と変わらないことを確認し、試験当日は起床から試験終了までMSLT施行時を除いて居眠りを禁じ、試験中は眠っていないことを確認した。

#### 4. ラットにおける投与実験

##### 4-1 静脈内投与

ラットに軽いエーテル麻酔下で大腿静脈と動脈に各々投与用と採血用のPE製カニューレを施し、麻酔から覚醒した後に各MPDの生理食塩液溶液を約40secかけて静脈内投与した。投与液量は1ml/kgとした。投与後、経時的に採血し(約0.3ml)、遠心分離して血漿を得た。また、尿は24hr間採取した。

脳内分布実験では、静脈内投与後の所定時

間に採血した後、直ちに断頭して小脳、線条体、基底部、脳幹部および大脳皮質の5部位を摘出し[28]、各重量を測定した。血漿、尿および各脳組織は測定まで-80℃で保存した。

#### 4-2 経口投与実験

大腿動脈に採血用のカニューレを施した後、各MPD水溶液(1ml)を経口用ゾンデを用いて経口投与し、4hrまで経時的に採血した。なお、消化管内容物によるMPDの体内動態への影響を避けるため、実験前日から絶食したラットを用いた。

#### 4-3 門脈内投与実験

大腿動脈に採血用と、門脈に投与用のカニューレを各々施した。各MPD投与量の生理食塩液溶液を0.08ml/minの速度で20min間、定速注入した。注入開始後5、10および20minと、注入終了後4hrまで経時的に採血した。

#### 5. 血漿蛋白結合率の測定

ヒトおよびラットのブランク血漿にMPDラ



セミ体または各異性体の既知量を添加し、限外濾過法によりMPD各異性体の血漿蛋白結合率を測定した。限外濾過装置にはアミコン(MPS-1、グレースジャパン社)を用いた。アミコンのリザーバーに試料約1mlを入れ、37℃、2000gで10分間遠心した後、リザーバーの残存液とろ液の0.1mlを採取し、測定まで-80℃で保存した。また、MPDのラセミ体の生理食塩溶液を用いて、同様の処理を行ない限外ろ過膜へのMPDの吸着の程度を検討した。

## 6. マイクロダイアリシス実験

### 6-1 手術式

ハロタン麻酔下で、ラット下肢大腿静脈にMPDの静脈内投与用のPE製カニュラを施し、皮下を通して、頸部の背中側に固定した。続いて、ステンレス製のダミーを装着したガイドカニュラを脳の左線条体(頭蓋骨のプレグマから前方に1.4mm、左に3mmのポイントにドリルで穴を開け、脳膜から3mm下方)に挿入

してデンタルセメントで固定した。速やかに麻酔から回復させて、餌と水を自由に与えて1昼夜放置した。翌日、再びハロタン麻酔下でガイドカニューラのダミーを抜き、透析用のプローブ(CMC/10, BAS社)を挿入して固定した。このプローブの膜はポリカーボネート製(20,000 dalton以上の分子量の物質をカット)で、膜の外径は0.5mm、膜長は3mmのものを用いた。

#### 6-2 投与実験

プローブを挿入したラットをフリームービング用のアクリルケージ(BAS社)に入れ、プローブのinletのラインを送液シリンジに接続し、透析液を10  $\mu$ l/minの流速で2時間、その後2  $\mu$ l/minで送液した。送液ポンプはマイクロインジェクションポンプ(CMA/100, BAS社)を用いた。透析液はRinger-Hepes buffer (NaCl 147mM, KCl 4mM, CaCl<sub>2</sub> 3mM, HEPES 10mM, pH7.4)を用いた。麻酔からは速やかに覚醒させた。2  $\mu$ l/minの速度で1時間灌流した後

outletからの透析液を5分間(10  $\mu$ l)毎に、200pgのI.S.(塩酸イソプロテレノール)/0.02M酢酸水溶液10  $\mu$ lを入れたPEチューブに氷冷下で採取し、直ちに各モノアミン濃度を測定して、その濃度が安定したことを確認してから、各薬液を静脈内投与した。MPDの生理食塩液溶液、またはコントロールとしての生理食塩液を、静脈内投与用のカニューレから約40秒かけて注入した。投与量はMPDのラセミ体の2、5、10mg/kgまたは各異性体の2.5mg/kgとした。

投与後4hrまで経時的にモノアミン用透析液試料(5分間、10  $\mu$ l)とMPD用透析液試料(5~25分間、10~50  $\mu$ l)を交互に氷冷下で採取した。モノアミン用試料は、I.S.200pg/0.02M酢酸溶液を予め入れたPEチューブに採取後、その10  $\mu$ lを速やかにHPLCに注入した。MPD用試料は測定まで-80℃で保存した。

### 6-3 *in vitro* 回収率

MPDラセミ体およびDAを溶解したRinger-

Hepes buffer (MPD:2040 および 1020 ng/ml、DA:56 および 28 ng/ml) に、in vivo 実験と同じ型のプローブを浸し、37℃、2  $\mu$ l/min の流速で透析を行なった。5 min 間毎に 4 回透析液 (10  $\mu$ l) を採取するとともに、各 5 min の中間点でリザーバーの 10  $\mu$ l 採取した。各試料は測定まで -80℃ で保存した。

#### 6-4 透析液中モノアミン (DA、DOPAC、HVA) の測定

透析液中モノアミン類 (DA、DOPAC、HVA) の測定は HPLC-ECD 法により行なった。透析実験で得た透析液に I.S を添加した溶液を直接 HPLC カラムに注入して分析した。解析はピーク高さ比を用いた。

HPLC 装置は、検出器としてアンペロメトリックディテクター (ECD) を装備したセップステータシステム (BAS 社) を用いた。カラムは Bio-Phase ODS IV 型 ( $\phi$  1 x 100 mm) (BAS 社) を用いた。移動相は 0.1M 酒石酸 / 0.1M 酢酸 Na (5/4) Buffer (pH 3.2): アセトニトリル = 97:3、0.5

mM EDTA·Na、0.2%テトラヒドロフラン、650  
μMオクタンスルホン酸Naの組成を用い、流  
速は30 μl/min、温度は25℃に設定した。ECD  
はglassy carbon electrodeを用いて、700mV  
vs. Ag/AgClの電圧にセットした。

#### 7. Locomotor activity測定実験

Locomotor activityの測定は室町科学(東京、日本)製の動物行動軌跡解析装置(BTA-1)を用いて行なった。マイクロダイアリシス実験と同様にラット下肢大腿静脈にMPDの静脈内投与用カニューレを施し、頸部の背中側に固定した。1昼夜放置した後、ラットを装置内に入れ、30min間以上かけて環境に慣らした後、カニューレより各MPDの生理食塩液溶液およびコントロールとしての生理食塩液を約40secで注入した。投与後5min毎のラットの移動距離および立ち上がり回数を120minまで経時的に測定した。



## 8. 薬物速度論的解析方法

### 8-1 薬物速度論パラメータ

ラットにMPDを静脈内投与した後の各異性体の血漿中濃度を、非線形最小二乗法により、時間 $t$ における血漿中濃度 $C_p(t)$ の(1)式にあ

$$C_p(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1)$$

てはめて各パラメータを求めた。AとBは縦軸切片、 $\alpha$ と $\beta$ は1次速度定数を表わす。血漿中濃度時間曲線下面積(AUC)は台形法を用いて求めた値と最後の血漿中濃度を $\beta$ で除した値を加えることにより求めた。各パラメータ用いて定常状態における分布容積( $V_{ss} = \text{Dose} / \beta / (A / \alpha + B / \beta)$ )と総クリアランス( $CL_{tot} = \text{Dose} / \text{AUC}$ )を求めた[51]。

ヒトに経口投与した場合、およびラットに経口または門脈内投与した後の血漿中の各異性体の消失速度( $\beta$ )および半減期( $t_{1/2}$ )は、血漿中濃度の対数値を時間に対してプロット

して得られた終末の直線部分の傾きから算出した。AUC、 $V_{ss}$ および $CL_{tot}$ は静脈内投与実験と同様に求めた[51]。

### 9-2 Influx clearance

見かけ血液組織間分率( $K_{app}$ )は、各脳組織中濃度 $C_b(t)$ をその時の血漿中濃度 $C_p(t)$ で除して求めた。血液脳関門における取り込み速度(Influx clearance :  $K$ )はPatlakら[29, 30]の(2)式に静脈内投与後の1~10minにおける $C_p(t)$ と $C_b(t)/C_p(t)$  ( $=K_{app}(t)$ )の値をあてはめて、最適値を得た。

$$C_b(t)/C_p(t) = K \cdot \int_0^T \exp[-k_b \cdot (T-t)] \cdot C_p(t) dt / C_p(T) + (f \cdot V_e + V_B) \quad (2)$$

ここで $k_b$ は組織から血液への消失速度を表わし、 $(f \cdot V_e + V_B)$ は可逆的結合部分の分布容積で、 $f$ は血液に戻る可逆的コンパートメン

ト内の薬物分率、 $V_e$ は可逆的コンパートメント内における定常状態の分布容積、 $V_B$ は毛細血管容積を表わす。

# 文 献

1. 高橋康郎: 中枢神経刺激剤, 現代精神医学体系, 精神薬理学 II 第22巻B, 122-138, 中山書店(1980)
2. Mitler, MM., Hajdukovic, R.: Relative efficacy of drugs for the treatment of sleepness in narcolepsy. *Sleep* 14:218-220(1991)
3. Daly, DD., Yoss, RE.: The treatment of narcolepsy with methylphenyl-piperidylacetate: a preliminary report. Staff Meeting of the Mayo Clinic 31:620-626(1956)
4. Yoss, RE., Daly, D.: Treatment of narcolepsy with Ritalin. *Neurology* 9:171-173(1956)
5. Honda, Y., Hishikawa, Y., Takahashi, Y.: Long-term treatment of narcolepsy with methylphenidate (Ritalin). *Curr. Ther. Res.* 25:288-298 (1979)
6. 本多 裕: ナルコレプシーに対するリタリンの長期使用経験. 薬理と治療 6:2149-2165(1978)
7. 高橋康郎: ナルコレプシーに対するRitaline長期投与の臨床経験. 薬理と治療 6:2179-2200(1978)
8. Hurd, YL., Ungerstedt, U.: In vivo neurochemical profile of dopamine uptake inhibitor and releaser in rat caudate-putamen. *Euro. J. Pharmacol.* 166:251-260(1989)
9. Butcher, SP., Liptrot, J., Aburthnott, GW.: Characterisation of methylphenidate and nomifensine induced dopamine release in rat striatum using in vivo brain microdialysis. *Neurosci. Lett.* 122:245-248(1991)
10. Nielsen, JA., Chapin, DS., Moore, KE.: Differential effects of d-amphetamine,  $\beta$ -phenylethylamine, cocaine and methylphenidate on the rate of dopamine synthesis in terminals of nigrostriatal and mesolimbic neurons and on the efflux of dopamine metabolites into cerebroventricular perfusates of rats. *Life Sci.* 33:1899-1907(1983)
11. Zetterstrom, T., Sharp, T., Collin, AK., Ungerstedt, U.: In vivo measurement of extra cellular dopamine and DOPAC in rat striatum after

- various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Euro. J. Pharmacol.* 148:327-334(1988)
12. Patrick, K.S., Kilts, C.D., Breese, G.R. :Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:152-158(1987)
  13. Chan, Y.M., Soldin, S.J., Swanson, J.M., Deber, C.M., Thiessen, J.J., Macleod, S. :Gas chromatographic mass spectrometric analysis of methylphenidate (Ritalin) in serum. *Clin. Biochem.* 13:266-272(1980)
  14. Wargin, W., Patrick, K., Kilts, C., Gualtieri, C.T., Ellington, K., Mueller, R.A., Kraemer, G., Breese, G.R. :Pharmacokinetics of methylphenidate in man, rat and monkey. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226:382-386(1983)
  15. Srinivas, N.R., Quinn, D., Hubbard, J.W., Midha, K.K. :Stereoselective disposition of methylphenidate in children with attention-deficit disorder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:300-306(1987)
  16. Hubbard, J.W., Srinivas, N.R., Quinn, D., Midha, K.K. :Enantioselective aspects of the disposition of dl-threo-methylphenidate after the administration of a sustained-release formulation to children with attention deficit-hyperactivity disorder. *J. Pharm. Sci.* 78:944-947(1989)
  17. Faraj, B.A., Israilli, Z.H., Perel, J.M., Jenkins, M.L., Holtzman, S.G., Cucinell, S.A., Dayton, P.G. :Metabolism and disposition of methylphenidate-<sup>14</sup>C :Studies in man and animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 191:535-547(1974)
  18. Redalieu, E., Bartlett, M.F., Waldes, L.M., Darrow, W.R., Egger, H., Wagner, W.E. :A study of methylphenidate in man with respect to its major metabolite. *Drug Metab. Disp.* 10:708-709(1982)
  19. Gualtieri, C.T., Hicks, R.E., Patrick, K., Schroeder, S.R., Breese, G.R., :Clinical correlates of methylphenidate blood levels. *Ther. Drug Monit.* 6:379-392(1984)
  20. Hungund, B.L., Perel, J.M., Hurwic, M.J., Sverd, J., Winsberg, B.G. :Pharmacokinetics of methylphenidate in hyperkinetic children. *J. Clin.*



- Pharmacol., 8:571-576(1979)
21. Hoddes, E., Zarcone, V., Smythe, H., Phillips R., Dement, W. :The Development and use of the Stanford Sleepiness Scale (SSS).  
Psychophysiology 9:150(1972)
  22. Carskadan, MA. :Guideline for multiple sleep latency test (MSLT);  
A standard measure of sleepiness. Sleep, 9:519-524(1986)
  23. Janowsky, A., Scherri, MM., Berger, P., Long, R., Skolnick, P.,  
Paul, SM. :The effects of surgical and chemical lesion on striatal  
[<sup>3</sup>H]threo-(±)-methylphenidate binding :correlation with [<sup>3</sup>H]dopamine  
uptake. Euro. J. Pharmacol. 108:487-491(1985)
  24. Units, AS., Dawson, TM., Gehlert, DR., Wamsley, JK. :Autoradiographic  
localization of [<sup>3</sup>H]Methylphenidate binding sites in rat brain. Euro. J.  
Pharmacol. 113:146-155(1976)
  25. Segal, JL., Cunningham, RF., Dayton, PG., Iaraili, ZH. :  
[<sup>14</sup>C]Methylphenidate hydrochloride, studies on disposition in rat brain.  
Drug Metab. Disp. 4:140-146(1976)
  26. Javitch, JA., Steittmatter, SM., Snyder, SH. :Differential visualization  
of dopamine and norepinephrine uptake site in rat brain using  
[<sup>3</sup>H]mazindol autoradiography. J. Neurosci. 5:1513-1517(1985)
  27. Aquilonius, SM., Bergstrom, K., Eckernas, SA., Hartvig, P., Leeders,  
KL., Lundquist, H., Antoni, G., Gee, A., Rimland, A., Uhlin, L.,  
Langstrom, B. :In vivo evaluation of striatal dopamine reuptake sites  
using <sup>11</sup>C-nomifensine and positron emission tomography. Acta Neurol.  
Scand. 76:283-287(1987)
  28. Glowinski, J., Iversen, LC. :Regional studies of catecholamines in the  
rat brain-I, The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H]dopamine and  
[<sup>3</sup>H]dopa in various regions of the brain. J. Neurochem. 13:655-669(1966)
  29. Patlak, CS., Blasberg, RG., Fenstermacher, JD., :Graphical evaluation of  
blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data.  
J. Cerebral. Blood Flow and Metab. 3:1-7(1983)

30. Patlak, CS., Blasberg, RG. :Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. Generalization. *J. Cerebral. Blood Flow and Metab.* 5:584-590(1985)
31. Takahashi, N., Sawada, Y., Sugiyama, Y., Suzuki, H., Iga, T., Hanano, M. :Kinetic analysis of in vivo dopamine reuptake function in mouse brain striatum by [<sup>3</sup>H]-mazindol. *Xenob. metab. Disp.* 4:314-315(1989)
32. Riva, E., Hrdina, PD., Morsili, PL. :Measurement of desipramine in brain tissue by a radioisotope derivative technique. *J. Pharm. Pharmac.* 27:797-799(1975)
33. 栗山欣弥、松田友宏: 脳と神経の薬理、改訂2版、1章 総論、神経薬理学の神経化学的観点、18-20、金芳堂(1989)
34. Kushima, Y., Takeda, K., Oh-hashi, Y., Nakagawa, T., Kato, T. :The effects of anesrhetics on the concentrations of cholecystokinin octapeptide sulfate-like immunoreactivity in rat brain regions. *Neuropeptides* 14:225-330(1989)
35. Sharp, T., Zetterstrom, T., Ljungberg, T., Ungerstedt, T. :A direct comparison of amphetamine-induced behaviour and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res.* 401:322-330(1987)
36. Hirabayashi, M., Alam, MR. :Enhancing effect of methylphenidate on ambulatory activity produced by repeated administration in mice. *Pharmac. Biochem. Behav.* 15:925-932(1981)
37. Anden, NE., Rubenson, A., Fuxe, K., Hokfelt, T. :Evidence for dopamine receptor stimulation by apomorphine. *J. Pharm. Pharmacol.* 19:627-629(1967)
38. Ernst, AM. :Model of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacologia* 10:316-323(1967)
39. Rometsch, R. U.S.Pat. 2,838,519(1958)
40. Gal, J., Hodson, BJ., Pintauro, G., Flamm, BL., Cho, AK. *J. Pharm. Sci.*, 66:866- (1977)

41. Nakajima, K., Kotaki, H., Saitoh, Y., Nakagawa, F. :Determination of methylphenidate and its metabolite in plasma by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* 34:1701-1708 (1986)
42. Lim, HK., Hubbard, JW., Midha, KK. :Development of enantioselective gas chromatographic quantitation assay for dl-threo-methylphenidate in biological fluids. *J. Chromatogr.* 378:109-123(1986)
43. Aoyama, T., Kotaki, H., Saitoh, Y., :Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of threo-methylphenidate enantiomers in plasma. *J. Chromatogr.* 494:420-423(1989)
44. Aoyama, T., Kotaki, H., Honda, Y., Nakagawa, F. :Kinetic analysis of enantiomers of threo-methylphenidate and its metabolite in two healthy subjects after oral administration as determined by a gas chromatographic-mass spectrometric method. *J. Pharm. Sci.* 79:465-469(1990)
45. Honda, Y., Juji, T., Matsuki, K., Naohara, T., Satake, M., Inoko, H., Someya, T., Harada, S., Doi, Y. :HLA-DR2 and Dw2 in narcolepsy and in other disorders of excessive somnolence without cataplexy. *Sleep* 9:133-142(1986)
46. Honda, Y., Juji, T. eds. *HLA in narcolepsy*. Heidelberg: Springer-Verlag, (1988)
47. Diagnostic Classification Steering Committee; Thorpy MJ, chairman : International classification of sleep disorders: Diagnostic classification of sleep disorders: Diagnostic and coding manual. American Sleep Disorders Association, Rochester, 38-43(1990)
48. Kotaki, H., Aoyama, T., Nakazato, F., Saitoh, Y., Nakagawa, F. : Interaction in tissue distribution between methylphenidate and pemoline. II. Effects of methylphenidate or its metabolite on plasma and tissue concentration of pemoline in the rat. *Chem. Pharm. Bull.* 36:4560-4566 (1988)
49. Wharton, RN., Perel, JM., Dayton, PG., Malitz, S. :A potential clinical

use for methylphenidate with tricyclic antidepressants. *Ame. J. Psychiatry.* 127:1619-1625(1971)

50. 小栗 貢、白川修一郎、阿住一雄. OSA睡眠調査表の開発—睡眠感評定のための統計的尺度構成と標準化—. *精神医学* 27:791-799(1985)
51. Gibaldi, M., Perrier, D. : "Drug and The Pharmaceutical Science, Vol.15. Pharmacokinetics" 2nd ed., Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc., New York, 1982, pp.45-111, 199-219



## 謝 辞

本研究に際し、御指導を賜わりました東京大学医学部伊賀立二教授に謹んで感謝の意を表わします。

本研究中、有益な御助言と御協力を戴きました医学部澤田康文助教授、医学部附属病院薬剤部小滝一博士ならびに薬剤部の諸先生方に深く感謝いたします。また、数々の御教示を戴きました前東京大学医学部中川富士雄教授、日本大学医学部板橋病院齋藤侑也薬剤部長に厚く感謝いたします。

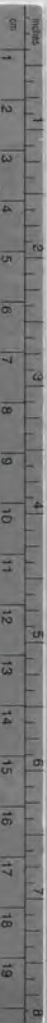
臨床面で、終始御協力戴きました神経研究所附属晴和病院本多裕博士、帝京大学医学部佐々木司氏ならびに東京大学医学部須藤康彦氏に深甚の意を表します。また、行動薬理実験において御助言を戴きました東京大学薬学部小野秀樹助教授に厚く感謝いたします。

平成 5 年 1 0 月 8 日

青山 隆 夫







# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Blue      Cyan      Green      Yellow      Red      Magenta      White      3/Color      Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A    1    2    3    4    5    6    M    8    9    10    11    12    13    14    15    B    17    18    19

