塩酸ジラゼプの血球、血小板に対する結合性の動物種差

小島順司,* 吉村三夫

興和株式会社東京研究所

Species Difference on Binding Property of Dilazep to Erythrocytes and Platelets

Junji KOJIMA* and Mitsuo YOSHIMURA

Tokyo Research Laboratories, Kowa Co. Ltd., 2-17-43,

Noguchicho, Higashimurayama, Tokyo 189, Japan

(Received March 27, 1995)

The whole blood of human, rabbit and dog spiked with dilazep was fractionated by discontinuous density gradients of Ficoll-Paque, and the species difference of distribution to blood components was elucidated. In order to quantitatively evaluate its blood distribution, the binding property of dilazep to the isolated erythrocytes and platelets was also studied. Dilazep undergoes saturable binding to the erythrocytes. Therefore, the fitting of the data sets to binding models was carried out using the nonlinear least-square method, and binding parameters were calculated. This technique could be also applied to analyze directly the binding parameters for several whole blood components. In human and rabbit, dilazep was bound to the erythrocytes with a high affinity (human, $K_{ERY}=0.466$ nM; rabbit, $K_{ERY}=0.0417$ nM), however, the affinity to the erythrocytes in dog was very low. On the other hand, the binding affinity to the platelets decreased in the order of rabbit > dog > human.

Key words—dilazep; erythrocyte binding; GC-MS; platelet binding; protein binding; discontinuous density gradient

はじめに

塩酸ジラゼプは血流量増加作用、微小循環改善作用等の薬理作用を有することから虚血性心疾患、脳血管障害及び腎炎治療剤として用いられている。¹⁾

塩酸ジラゼプのヒトにおける薬物動態は血液濃度推移をもってなされているが(未発表), 血漿中濃度は非常に低く推移するため十分解明がなされているとは言えない. このように血漿中の塩酸ジラゼプ濃度が低い理由としては, 塩酸ジラゼプが血液中で血漿以外の成分に高親和性を示すためと考えられている. 著者らはヒト及び各種動物の血液成分に対する結合特性の違いを明らかにするために, 密度勾配遠心法 (Ficoll-Paque) を利用した視覚的な解析と, 結合モデル式への当てはめによる定量的な解析を行った.

実験の部

1. 薬物及び試薬 塩酸ジラゼプはアスタ社(西独)で合成されたものを使用した. 重水素

標識塩酸ジラセプ（内標準）は没食子酸をジメチル硫酸- d_6 （標識率 99% 以上，メルク）で重水素メチル化してトリメトキシ安息香酸 (TMB)- d_9 とした後，1,4-bis (3-hydroxy-propyl)-perhydro-1,4-diazepine と反応させて合成した。²⁾ 塩酸ジラセプ及び重水素標識塩酸ジラセプは 0.01 N 硫酸に溶解した後，適宜生理食塩液で 5—80 μ M に希釈して用いた。その他の試薬は市販特級品を用いた。

Fig. 1. Structure of Dilazep

2. 測定機器及び装置 GC-MS による測定は，JEOL 製 MS-GCG05 型ガスクロマトグラフを JEOL 製 DX300 型質量分析装置に接続して用いた。OV-1 bonded フューズドシリカキャピラリーカラム (25 m $\times$ 0.25 mm i.d.; 膜厚 0.3 μ m, GL サイエンス製) は入口側をソルベントレス注入部 (SL05 型) に接続し，出口側をイオン化室内に取り付けた。キャリアガスにはヘリウムを 1 ml/min 流した。カラム，試料注入口，セパレーター及びイオン化室の温度はそれぞれ 230, 260, 260 及び 250 $^{\circ}$ C とした。検出は電子衝撃イオン化法により正イオンとし， m/z 268 (TMB ブチルエステルの M^{+}) 及び 277 (内標準， d_9 -TMB ブチルエステルの M^{+}) にて行った。なお，データ処理は JMA-3500 システムによった。

全血あるいは浮遊液中の血球数 (NEC)，血小板数 (NPC) 及び平均血小板容積 (MPV) は F-800 型自動血球計数装置 (東亜医用電子製) にて計測した。また，血球容積比 (ヘマトクリット値) は KH-120A 型ヘマトクリット測定用遠心分離機 (久保田工業製) にて計測した。血小板の容積比 (H_{PLT}) は血小板数 (NPC) と平均セル容積 (MPV) の積 ($H_{PLT}=NPC\times MPV$) より，血球の平均セル容積 (MEV) はヘマトクリット値 (H_{ERY}) と血球数 (NEC) の比 ($MEV=H_{ERY}/NEC$) より求めた。

3. 実験動物及び血液の採取 イヌのヘパリン処理血液は体重約 10 kg の雄性ビーグル犬 (日本医科学動物資材研究所より購入) 8 頭より，一夜絶食後に前肢静脈から 1 頭当たり約 20 ml を採取した。試験には 2 頭分を合わせて用いた。ウサギのヘパリン処理血液は体重約 3 kg の JW 系雄ウサギ (クリーン実験動物センターより購入) 4 匹より，2 日間ネックレスリング (夏目製) を用いて絶食した後，耳静脈から 1 頭当たり約 20 ml を採取した。ヒトのヘパリン処理血液は年齢 20—24 歳，体重 54—75 kg の健康な成人男性 4 名より絶食時に前腕静脈から 1 人当たり 45 ml を採取した。

4. 塩酸ジラセプの結合性試験 (in Vitro) 4-1. 密度勾配遠心法による血液成分の分離——ヒト及び動物の血液 2 ml に 1% (v/v) を越えない塩酸ジラセプ溶液 (最終濃度 100—150 nM) を添加し，37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションを行った。3 ml の Ficoll-Paque ($d=1.077$, ファルマシア製) を静かに容器の底に積層し，900 $\times g$ で 10 分間，冷却遠心分離 (H-103RS 型，国産科学製) を行った。試料の上層より 0.5 ml ずつ分離して血漿，血小板 (リンパ球を含む) 及び血球に分画し，各画分に含まれる塩酸ジラセプ濃度を測定した。

4-2. 血球及び血小板浮遊液の調製——ヒト及び動物の血液 4.5 ml をポリエチレン製試験管に取り，0.5 ml の 3.8% (w/v) クエン酸ナトリウム溶液 (山口製薬 (株)) を加えて混和した。250 $\times g$ (イヌでは 200 $\times g$) で 7 分間 (室温) 遠心分離した後，血小板を含む血漿を別のポリエチレン製試験管に移した。残りの血球層に 2 ml のトリス・塩酸緩衝液³⁾ (pH 7.4) を加えて混和し，同様に遠心分離して上清を先の容器に移した。血小板を含む溶液の底に 0.2 ml の Ficoll-Paque を静かに積層し，900 $\times g$ で 5 分間冷却遠心分離した。上清を捨てた後，血小板層をピ

ペットで吸引して集め、これに少量のトリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えた。ピペットによる吸排を繰り返して血小板を均一に浮遊させた後、トリス・塩酸緩衝液を加えて約 9 ml とし、 $900 \times g$ で 5 分間冷却遠心分離を行った。上清を除き、同様の操作を繰り返して血小板を洗浄した。分離血小板を 9 ml のトリス・塩酸緩衝液に分散して浮遊液とし、*in vitro* 試験に供した。

残った血球層 (白血球を含む) は同量のトリス・塩酸緩衝液にて 2 回洗浄した。分離血球を 10 ml のトリス・塩酸緩衝液に分散し、*in vitro* 試験に供した。

4-3. 塩酸ジラゼブの血球及び血小板への結合性試験 (*in Vitro*)——1/100 容積を越えない塩酸ジラゼブ溶液を血球浮遊液 2 ml (最終塩酸ジラゼブ濃度 50—170 nmol/l)、血小板浮遊液 1—1.5 ml (最終塩酸ジラゼブ濃度 50—800 nmol/l) あるいは血液 2 ml (最終塩酸ジラゼブ濃度 30—300 nmol/l) に添加し、37°C で 10 分間インキュベートした。インキュベーション混液及び冷却分離 (4°C, $1400 \times g$ で 5 分間) して得た上清中の塩酸ジラゼブ濃度を測定した。なお、*in vitro* 試験は塩酸ジラゼブの器具への吸着を防止するため、ポリエチレン製試験管を使用した。

5. 塩酸ジラゼブの測定法 試料 0.5—1 ml を遠心管に取り、塩酸ジラゼブ標準液あるいは精製水 0.2 ml、内標準液 0.2 ml 及び 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6) 0.3 ml を加え、5 ml のベンゼンで抽出した。ベンゼン層を別の遠心管に移し、0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6) 1 ml を加えて振り混ぜ、ベンゼン層を別の遠心管に移し、0.05 N 硫酸 1 ml を加えて逆抽出した。有機層を除き、氷冷した硫酸層に 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6) 1 ml を加えて中和後、6 ml のベンゼンを加えて再抽出した。溶媒を別の遠心管に移し、窒素ガスを吹き込んで留去し、残留物に *n*-ヘキサン 3 ml を加えて溶解した。0.2 M カリウム *tert*-ブトキシド・*n*-ブタノール溶液 0.4 ml を加え、室温 30 分間放置してエステル交換反応を行った。ついで、0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6) 1 ml を加えて反応を停止し、振り混ぜて残存する試薬類を除いた。溶媒を別の容器に移し、窒素ガスを吹き込んで留去後、残留物に *n*-ヘキサン 50 μ l を加えて溶解し、その一部を GC-MS 法にて測定した。

6. 結合パラメータの解析法 血球に結合した塩酸ジラゼブの濃度 (B_{ERY}) は濃度に依存する高親和性結合部位と依存しない結合部位を 2 箇所考慮した Eq. 1 により表した。血小板あるいは血漿蛋白に結合した塩酸ジラゼブの濃度 (B_{PLT} 及び B_{PLASMA}) は濃度に依存しない結合部位 1 箇所を考慮した Eq. 2 及び Eq. 3 により表した。⁴⁾

$$B_{ERY} = N_{ERY} \cdot C_U / (K_{ERY} + C_U) + V_{ERY} \cdot C_U \quad (1)$$

$$B_{PLT} = V_{PLT} \cdot C_U \quad (2)$$

$$B_{PLASMA} = V_{PLASMA} \cdot C_U \quad (3)$$

ところで、 N_{ERY} 及び K_{ERY} は血球の高親和性結合部位に対する最大結合量 (nmol/l) 及び解離定数 (nM) である。この高親和性結合部位の結合定数は N_{ERY}/K_{ERY} として表され、 $K_{ERY} > C_U$ の条件で Eq. 1 より誘導される。 V_{ERY} 、 V_{PLT} 及び V_{PLASMA} は血球、血小板及び血漿の結合定数、 C_U は非結合型薬物濃度 (nM) である。

分離血球及び分離血小板浮遊液の濃度 (C_{ERY} 及び C_{PLT}) は Eq. 4 及び 5 として表した。また、ヒト及びウサギの血液濃度 (C_{BLOOD}) は血球、血小板及び血漿蛋白に結合した薬物濃度の和 (Eq. 6) で表した。⁵⁾ 血液へ拡張する際には血小板と血球の低親和性線形結合部分を合わせてハイブリッド型結合定数 $V_{MIX} (= V_{PLT} + V_{ERY} \cdot H_{ERY}/H_{PLT})$ として表した。なお、これらパラメータの解析は非線形最小二乗法の解析プログラム MULTI を用いた結合モデル式への当てはめ ($w=1$) により行った。⁶⁾ その際、非結合型薬物濃度 (C_U) 及び血漿中濃度 (C_{PLASMA}) は観測値として扱ったのでそれぞれを C_U あるいは C_{PLASMA} の関数に変形して用いた。血液について変形した

例を Eq. 7 に示した.

$$C_{ERY} = (B_{ERY} + C_U)H_{ERY} + C_U(1 - H_{ERY}) \quad (4)$$

$$C_{PLT} = (B_{PLT} + C_U)H_{PLT} + C_U(1 - H_{PLT}) \quad (5)$$

$$\begin{aligned} C_{BLOOD} &= (B_{ERY} + C_U)H_{ERY} + (B_{PLT} + C_U)H_{PLT} + C_{PLASMA}(1 - H_{ERY} - H_{PLT}) \\ &= \{N_{ERY} \cdot C_U / (K_{ERY} + C_U) + C_U\} H_{ERY} + (V_{MIX} \cdot C_U + C_U) H_{PLT} \\ &\quad + C_{PLASMA}(1 - H_{ERY} - H_{PLT}) \end{aligned} \quad (6)$$

$$C_{PLASMA} = (-B + \sqrt{B^2 - 4 \cdot A \cdot C}) / 2A \quad (7)$$

$$A = (H_{ERY} + V_{MIX} \cdot H_{PLT} + H_{PLT})f_u^2 + (1 - H_{ERY} - H_{PLT})f_u$$

$$\begin{aligned} B &= (N_{ERY} \cdot H_{ERY} + K_{ERY} \cdot H_{ERY} + V_{MIX} \cdot K_{ERY} \cdot H_{PLT} + K_{ERY} \cdot H_{PLT} - C_{BLOOD})f_u \\ &\quad + (1 - H_{ERY} - H_{PLT})K_{ERY} \end{aligned}$$

$$C = -C_{BLOOD} \cdot K_{ERY}$$

ところで, H_{ERY} 及び H_{PLT} はそれぞれ血球及び血小板の容積比, f_u は血漿の非結合率 ($f_u = C_U / C_{PLASMA}$, $f_u = 1 / (1 + V_{PLASMA})$) である.

結 果

1. 測定法

エステル交換反応による塩酸ジラゼプから TMB ブチルエステルへの変換はほぼ定量的 (90% 以上) であった. 本反応は遊離の TMB からエステルは全く生成しないため, 特異性に優れた方法であり, 生体試料による妨害も見られなかった. 本法の測定限界は 0.3 nmol/l (0.2 ng/ml 相当) であり, 3, 14 及び 72 nmol/l 添加時の変動係数はそれぞれ 3.7, 3.6 及び 3.2% であった.

2. 密度勾配遠心法 (Ficoll-Paque) による分離

塩酸ジラゼプを各動物種の血液に添加し, 密度勾配遠心法 (Ficoll-Paque) により分画した際の薬物の分布像を Fig. 2 に示した. イヌでは血漿及び血小板に多く分布し, 血球への分布はわずかであった. ウサギの分布像はイヌと異なり, 血球に大部分が分布し, 血小板と血漿にはわずかししか分布しなかった. ヒトの分布像はイヌ及びウサギとも異なり, 血球と血漿に多く分布し, 血小板への分布は少なかった.

3. 各種動物の分離血球及び血小板に対する塩酸ジラゼプの結合パラメータ

イヌ, ウサギ及びヒトの血液より分離した血

Fig. 2. Fractionation of Dog (A), Rabbit (B) and Human (C) Blood Spiked with Dilazep by Discontinuous Density Gradients of Ficoll-Paque

The percentages of total drug mass in each fraction were given.

Fig. 3. Direct and Scatchard Analysis of Dilazep Binding to Erythrocyte Prepared from Dog, Rabbit and Human Blood

Fig. 4. Dilazep Binding to Platelet Prepared from Dog, Rabbit and Human Blood

Table 1. Mean Binding Parameters of Dilazep for Isolated Erythrocyte and Platelet

	Species		
	Dog	Rabbit	Human
Experimental condition			
NEC (10^9 cells/ml)	5.51 (0.28)	2.84 (0.10)	1.89 (0.04)
MEV (fl)	69.5 (2.5)	63.6 (1.6)	110.0 (2.2)
H_{ERY}	0.381 (0.005)	0.180 (0.004)	0.208 (0.001)
NPC (10^8 cells/ml)	0.99 (0.02)	1.09 (0.02)	1.79 (0.29)
MPV (fl)	11.5 (0.2)	7.1 (0.3)	9.9 (0.3)
H_{PLT} (10^{-3})	1.14 (0.03)	0.774 (0.029)	1.76 (0.26)
Binding parameter			
N_{ERY} (nmol/l)	—	592.1 (9.8)	265.5 (12.0)
K_{ERY} (nM)	—	0.0417 (0.0098)	0.466 (0.203)
N_{ERY}/K_{ERY}	—	17395 (4656)	1194 (490)
V_{ERY}	2.76 (0.07)	6.70 (0.69)	4.96 (0.36)
V_{PLT}	646 (82)	749 (76)	134 (54)

Parenthesis represents the S.E. of 3—4 experiments.

球及び血小板に対する結合特性を結合モデルへの当てはめ（カーブフィッティング）により評価し（Fig. 3 及び 4），それぞれの結合パラメータを算出（Table 1）した。

塩酸ジラゼプに対するイヌ分離血球の V_{ERY} は 2.76，イヌ分離血小板の V_{PLT} は 646 であり，分離血小板は分離血球に比べて高い結合性を示した。

ウサギ分離血球への結合には濃度に依存した高親和性の結合部位と低親和性の結合部位が確認され，前者の N_{ERY} は 592.1 nmol/l， K_{ERY} は 0.0417 nM であり， N_{ERY}/K_{ERY} 比は 17395 と極めて高値を示した。後者の V_{ERY} は 6.70 であり，イヌ分離血球の V_{ERY} と大きな差はなかった。また，ウサギの分離血小板の V_{PLT} は 749 であり，高い結合性を示したが，血球の高親和性結合部位と比較した場合には 1/17 と小さく，選択性もほとんど無いものと考えられる。

ヒト分離血球に対する塩酸ジラゼプの結合はウサギと同様に高親和性の結合部位 ($N_{ERY} = 265.5$ nmol/l, $K_{ERY} = 0.466$ nM, $N_{ERY}/K_{ERY} = 1194$) と低親和性の結合部位 ($V_{ERY} = 4.96$) を認めた。ヒト分離血小板の結合部位はイヌ及びウサギと異なって低い親和性を示し， V_{PLT} (134) はイヌ及びウサギに比べて約 1/5 であった。

4. ウサギ及びヒト血液での結合性の直接評価

分離血球及び分離血小板の結合の解析に用いた結合モデルへの当てはめを，非線形性を示すウサギ及びヒトの血液の直接解析に拡張した（Table 2, Fig. 5）。

ウサギ血液で直接求めた K_{ERY} は 0.0214 nM， N_{ERY} は 564.0 nmol/l ($N_{ERY}/K_{ERY} = 35124$) であり血球への高親和性を裏付け，いずれも分離血球の成績に近似していた。一方，血小板と血球の低親和性結合部位を合わせたハイブリッド型結合定数 (V_{MIX} , 999) は分離血球の V_{ERY} 及び分離血小板の V_{PLT} を用いた予想 (V_{MIX} , 2307) の約 1/2 であった。なお，これらのパラメータを算出する過程で同時に求められた血漿蛋白との結合率は 61.5% ($f_u = 38.5\%$) であった。

ヒト血液において高親和性を示す血球結合部位の K_{ERY} は 0.258 nM， N_{ERY} は 292.1 nmol/l (N_{ERY}/K_{ERY} , 1864) であり，いずれも分離血球で求めた値に近似していた。しかしながら，血小板と血球の低親和性結合部位を合わせた V_{MIX} は 0.268 であり，分離血小板と分離血球の成績か

Table 2. Mean Binding Parameters of Dilazep for Whole Blood Components

	Species	
	Rabbit	Human
Experimental condition		
NEC (10^9 cells/ml)	6.43 (0.21)	4.55 (0.28)
MEV (f1)	67.4 (0.7)	94.4 (3.3)
H_{ERY}	0.433 (0.016)	0.431 (0.042)
NPC (10^8 cells/ml)	3.86 (0.19)	2.35 (0.36)
MPV (f1)	7.7 (0.1)	9.9 (0.5)
H_{PLT} (10^{-3})	2.98 (0.10)	2.30 (0.28)
Binding parameter		
N_{ERY} (nmol/l)	546.0 (19.3)	292.1 (21.8)
K_{ERY} (nM)	0.0214 (0.0069)	0.258 (0.092)
N_{ERY}/K_{ERY}	35124 (13983)	1864 (1027)
V_{MIX}	999 (128)	0.268 (0.134)
V_{PLASMA}	1.60 (0.06)	4.88 (2.57)
f_u	0.385 (0.010)	0.233 (0.073)

Parenthesis represents the S.E. of 3—4 experiments.

ら予想される結合定数 (V_{MIX} , 720) に比べて著しく低値を示した。なお、ヒト血漿の蛋白結合率は 76.7% ($f_u=23.3\%$) であった。

考 察

塩酸ジラゼプの測定は高速液体クロマトグラフを用いた Sambhi ら⁷⁾の方法が知られているものの、本研究には感度の点で採用できなかった。著者らは塩酸ジラゼプの測定に GC-MS 法を採用したが、塩酸ジラゼプそのままではカラム内で分解を受けるため困難であり、塩酸ジラゼプの構成成分である TMB をブチルエステルに誘導化することにより測定した。しかし、TMB は塩酸ジラゼプの代謝的加水分解によっても生成し得ることから、エステル交換反応を利用して直接塩酸ジラゼプから TMB ブチルエステルに変換することにより、TMB からのエステル体生成を防止した。

血液成分への塩酸ジラゼプの結合を視覚的に明らかにする目的で、血漿、血小板（リンパ球混在）及び血球の比重の違いに着目して密度勾配遠心法 (Ficoll-Paque) により塩酸ジラゼプを添加した血液の分画を試みた。Ficoll-Paque は血小板の分離・精製に汎用されており、血液成分との相互作用は比較的少ない媒体と考えられる。密度勾配遠心法により、イヌでは主に血漿及び血小板画分に、ウサギでは血球画分に、ヒトでは血球と血漿画分に塩酸ジラゼプの分布する像が得られた。このように、塩酸ジラゼプの血液成分への分布には大きな動物種差が認められ、それぞれについて結合様式を解明することは重要な課題であることを示唆した。

非線形の結合を示す血液成分の解析には、結合モデル式へのカーブフィッティングが有効な手段となる。多成分から構成される血液の解析に同法を拡張するには、非線形の結合を示す因子が 1 つであるか、複数の場合でも解離定数が大きく離れていることが必要と考えられる。塩酸ジラゼプの場合には血球に対して非線形の結合を示し、血小板及び血漿蛋白に対して線形の結合を示すため、同解析法による直接評価が可能と考えられる。なお、同解析法は分離操作していない状態のこれら血液成分の結合を明らかにできると共に、副次的に血漿蛋白結合率も算出できる利点を有している。

ヒト及びウサギ分離血球の低親和性結合部位に対する塩酸ジラゼプの結合定数 V_{ERY} はヒトで 4.96, ウサギで 6.70 と算出された。これらの値はこれまで報告されているプロプラノロール (6.4) 及びフェニトイン (5.5) と近似しており、脂溶性に基づく非特異的な分配によるものと考えられる。⁴⁾ 一方、分離血球の高親和性結合部位に対する塩酸ジラゼプの解離定数 K_{ERY} はウサギで 0.0417 nM, ヒトで 0.466 nM の低い濃度を示し、極めて高い親和性を有することが示唆された。これまで、血球膜上に存在する carbonic anhydrase に対して特異的に結合することが明らかにされている sulfonamide 類⁸⁾の K_{ERY} は 2.6—36 μM と報告されている他、血球膜上の特定蛋白に結合することで知られているシクロスポリン A⁵⁾の K_{ERY} (59 nM) と比較しても、塩酸ジ

Fig. 5. Relationship between Dilazep Concentration in Whole Blood and Plasma of Rabbit and Human

ラゼプがウサギとヒトの血球に対して極めて高い親和性を有する薬物であることは興味深い。このように、塩酸ジラゼプの血球に対する高親和性は血球膜上のレセプターあるいはチャンネルに結合している可能性を示唆するものであるが、血球膜上の結合蛋白について具体的な知見は現在まで得られていない。しかしながら、Mahony ら⁹⁾は塩酸ジラゼプがヒト血球でヌクレオシド・トランスポートを阻害することを明らかにしており、本研究における血球の高親和性結合部位と何らかの関連があることを示唆するものである。また、本研究で算出された血球への最大結合量 (N_{ERY}) から、1個の血球に結合できる塩酸ジラゼプの最大分子数 ($N_{ERY} \times MEV \times \text{アボガドロ数}$) をヒトとウサギについて求めると 2×10^4 前後であった。

前述したように、塩酸ジラゼプと各血液成分との結合には著しい動物種差が観察され、ヒトでは血球に、イヌは血小板に、ウサギは血球と血小板に特異的に結合することが示されたが、塩酸ジラゼプが全血の各成分に分布する割合（占有率, S_i ）は全血中に占める各成分の容積比 (H_i) と各成分中の薬物濃度 (B_i) とに依存していることが Eq. 8 で表せる。

$$\begin{aligned} C_{BLOOD} &= \Sigma(B_i + C_u)H_i + (1 - \Sigma H_i)C_{PLASMA} \\ S_i &= (B_i + C_u)H_i / C_{BLOOD} \end{aligned} \quad (8)$$

事実、Ficoll-Paque 法によって得られたイヌの成績では血球に対する親和性が低いために、大きな結合定数を有している血小板 ($V_{PLT} > V_{ERY}$) に比較的多く分布する像が得られた。一方、ウサギでは血小板にイヌと同程度の結合定数が認められるものの、数の上で圧倒的に多く存在する血球（数は約 10 倍、容積は 20 倍）にも非常に大きな結合定数 ($N_{ERY}/K_{ERY} > V_{PLT}$ あるいは V_{MIX}) が認められるため、血小板の占有率は著しく低くなった。また、ヒトでは血小板の結合定数が小さいことから、多くの塩酸ジラゼプが血球に占有されていることを明らかにした。しかし、ヒトとウサギ血球の高親和性結合部位は結合量に飽和があるために、血液中では薬物濃度の上昇に伴い急激に血漿側に分布の比重が移行するものと推察される。

ヒトとウサギの血液で求めた塩酸ジラゼプの血球に対する高親和性結合部位のパラメータは、いずれも分離血球を用いた成績に近似しており、両動物種とも血液中の血球に極めて高い親和性を有することが明らかにされた。なお、ウサギにおいて血小板及び血球の低親和性結合部位を合わせたハイブリッド型結合定数 (V_{MIX} , 999) は分離血小板と分離血球の結合定数から推定した値の約 1/2 であった。また、ヒト血液においても V_{MIX} が 0.268 と低値であり、分離血小板と分離血球から得た推定値と大きな差を示した。この理由としては、ヒトの血球及び血小板の非特異的な結合部位（低親和性）では血液からの分離操作で膜の特性が変化し、塩酸ジラゼプに対する結合性が増加したためと考えられる。したがって、本研究で示した塩酸ジラゼプとの結合を血液中の多成分に対して直接解析した方法は極めて有用性の高いものと考えられる。

引用文献

- 1) 中井紘二, 高橋秀平, 松本 駿, 猪尾 力, 友松達弥, 基礎と臨床, **8**, 2841 (1974); 相沢豊三, 木村 武, 祖父江逸郎, 勝沼英宇, 沓沢尚之ら, *ibid.*, **14**, 3839 (1980); 東條静夫, 成田光陽, 宮原 正, 酒井 紀, 加藤暎一ら, *ibid.*, **19**, 275 (1985).
- 2) a) Asta-Werke, Br. Patent 1107470 (1968) [*Chem. Abstr.*, **69**, 59297e]; b) Asta-Werke, Japan, Patent 23334 (1969).
- 3) Phillips D. R., *Biochemistry*, **11**, 4582 (1972).

- 4) a) Legg B., Powland M., *Therapeutic Drug Monitoring*, **10**, 19 (1988); b) Urien S., Riant P., Renouard A., Coulomb B., Rocher I., Tillement J. P., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2963 (1988).
- 5) Shibata N., Minouchi T., Ono T., Shimakawa H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 20 (1990).
- 6) Yamaoka K., Tanigawara Y., Nakagawa T., Uno T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 7) Sambhi M. P., Kannan R., Thananopavarn C., Ookhtens M., Gudenzi M., *J. Pharm. Sci.*, **78**, 281 (1989).
- 8) a) Matsumoto K., Miyazaki H., Fujii T., Hashimoto M., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1913 (1989); b) Matsumoto K., Miyazaki H., Fujii T., Amejima H., Furukawa H., Hashimoto M., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2810 (1989).
- 9) Mahony W. B., Domin B. A., Zimmerman T. P., *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 263 (1991).