

유전자 조작 알파 인터페론의 조직분포에 관한 연구

김제학·이혜선·김달현·조남진·곽규범

제일제당(주) 종합연구소

(1987년 11월 25일 접수)

Study on Tissue Distribution of Recombinant Human Alpha-Interferon

Je Hak Kim, Hye Sun Lee, Dal Hyun Kim, Nam Jin Cho and Kyu Bum Kwack

R & D Center, Cheil Sugar & Co.

(Received November 25, 1987)

The distribution features of recombinant human alpha-interferon (rHuIFN- α A) and ^{14}C -radiolabeled rHuIFN- α A (^{14}C -rHuIFN- α A) were investigated in ICR mice after i.v. injection. The level of rHuIFN- α A in the kidney was significantly higher than those in lung and liver at 10min after the injection. But the level was reduced significantly at 60min. The level of radioactivity in the kidney was also significantly higher than those in other organs after i.v. injection of ^{14}C -rHuIFN- α A, but it was reduced at much slower speed than was rHuIFN- α A. These results show that interferon is distributed rapidly and the kidney is the main site of distribution and metabolism of rHuIFM- α A.

인터페론은 1957년 Issacs와 Lindenmann¹⁾에 의해 항바이러스 효과가 있는 물질로 보고된 이래, 인체 백혈구를 이용한 알파 인터페론의 생산법²⁾의 보고되었으며 그후 세포배양법을 이용한 임파구 알파 인터페론의 생산법³⁻⁵⁾도 보고되어 있다.

인터페론이 생체 각 장기에 어떻게 분포하는가를 검토하는 것은 인터페론의 약물 동태학 및 약리학성질에 관한 지견을 얻는 데 중요한 의미가 있다. 또한 실험동물을 이용한 약물 동태학적 실험 결과는 그 약물을 인체에 투여함에 있어 이상적인 치료를 위한 투여용량, 투여간격 등의 최적의 투여계획을 설정하는 데 중요한 의미를 갖는다.

이러한 중요성에도 불구하고 인터페론의 생체내 동태에 관한 연구는 보고된 예가 극히 한정되어 있다. Bino 등⁶⁾은 HuIFN- α 의 조직분포와 대사에 신장이 중요한 역할을 하고 있음을, Bocci 등⁷⁾은 적출 또는 관류 상태하의 토끼 신장에서 IFN- α 의 역과를, Palleroni와 Bohoslawec⁸⁾은 방사성 동

위원소(I^{125})로 표지한 IFN- α 를 마우스에 정맥주사하였을 때의 조직분포를, Satoh 등⁹⁾은 IFN- α 를 토끼에게 정맥 및 근육주사하였을 때 그리고 Shim 등¹⁰⁾은 rIFN- α A의 rat에서의 체내 동태를 보고하고 있다.

그러나 이들 어느 논문도 ^{14}C 방사성동위원소로 표지된 유전자 조작 알파 인터페론(^{14}C rIFN- α A)을 이용한 생체내 조직분포에 관한 보고는 없었다.

저자 등은 유전자 조작 알파 인터페론(rIFN- α A) 및 방사선 동위원소(^{14}C)로 표지된 유전자 조작 알파 인터페론(^{14}C -rIFN- α A)을 마우스 체내에 투여하여 생체내 각 조직에 대한 분포를 검토하였다.

실험방법

재료

유전자 조작 알파 인터페론(rIFN- α A)-시험에

사용한 rIFN- α A (Lot No. JJI86001, JJI 86002, JJI86003, JJI86004)는 사람 백혈구 유래 인터페론 유전자를 대장균에 유전자 조작하여 생산한 인터페론을 동결 건조시킨 백색분말(역가 5.76×10^7 IU/g)을 사용하였다.

¹⁴C 표지 유전자 조작 알파 인터페론 (¹⁴C-rIFN- α A)-시험에 사용한 ¹⁴C-rIFN-mA는 사람 백혈구 유래 인터페론 유전자를 대장균에 유전자 조작하여 생산할 때, 대장균의 배지중에 ¹⁴C-glucose를 첨가하여 배양, 정제한 인터페론으로 방사능은 3.5×10^4 cpm/g이며, 역가는 5.76×10^7 IU/g이었다.

실험동물

20-23g되는 ICR계 자성 마우스(Charles River 주식회사)를 사용하였으며 물은 자유로이 먹게 하였다.

조직분포 시험

rIFN- α A 를 이용한 시험 -마우스 (각 군당 3~4마리)에 생리식염수에 녹인 인터페론(2×10^6 IU/ml)을 0.5 ml/ mouse의 용량으로 꼬리 정맥내에 투여하였다. 투여 10분 및 60분 후에 채혈을 하고 치사시킨 후 즉시 폐, 신장, 간장을 떼어 무게를 단 후 pH 7.2의 0.1M 인산염 완충액(폐, 신장: 조직 200 mg/ml, 간장: 조직 500

mg/ml)을 가하여 homogenizer(B. Braun Melsungen AG, Type 853202)를 사용하여 조직을 균질하게 분쇄하였다. $2,500 \times g$ 에서 20분간 1차 원심분리(Beckman model TJ-6 centrifuge)한 후, 한외 원심분리기(Beckman L8-70M ultracentrifuge)로 $160,000 \times g$ 에서 10분간 2차 원심분리해서 그 상청액을 조직 추출물로 하였다. 혈액은 원심분리기(Eppendorf centrifuge 5415)로 8,000 rpm에서 10분간 원심분리해서 혈청을 분리하였다.

¹⁴C-rIFN- α A를 이용한 시험-마우스 (각 군당 4마리)의 꼬리 정맥내에 인터페론(35,000 cpm/ml)을 0.25 ml/ mouse의 용량으로 투여하였다. 투여 10분 및 60분 후에 채혈을 하고 치사시킨 후 폐, 간장, 신장을 떼어 각 장기의 무게를 단 후 pH 7.2의 0.1M 인산염완충액(폐, 신장: 조직 300 mg/ml, 간장: 조직 500 mg/ml)을 가하여 homogenizer를 사용하여 조직을 균질하게 분쇄하였다. $2,500 \times g$ 에서 20분간 1차 원심분리한 후 $10,000$ rpm에서 20분간 2차 원심분리하여 그 상청액을 조직 추출물로 하였다. 혈액은 상기한 대로 행하여 혈청을 분리하였다.

인터페론의 역가분석

정 등¹¹⁾의 방법에 따라 WISH 세포(인체양막

Table I—Distribution of Interferon in Body Tissues of Mice after I.V. Injection of rHuIFN- α A (1×10^6 IU / mouse).

Time after i.v. injection	Mouse number	IFN titer of organ extract (IU/g) ^a			
		Lung	Liver	Kidney	Serum
10 min	A	40185	10952	504045	197605
	B	37035	10080	620055	136562
	C	40860	11600	572625	106691
	D	43325	8064	485415	133039
	Mean \pm S.D.	40351 \pm 2590	10174 \pm 1538	545535 \pm 62244	143474 \pm 38470
60 min	A	8325	968	63945	13939
	B	11520	1260	34785	18046
	C	6300	1125	33390	8257
	Mean \pm S.D.	8715 \pm 2632	869 \pm 297	44040 \pm 17252	13414 \pm 4916

^aExtracts were made by homogenizing the tissue in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) at 200 mg tissue/ml for lung and kidney and 500 mg tissue/ml for liver.

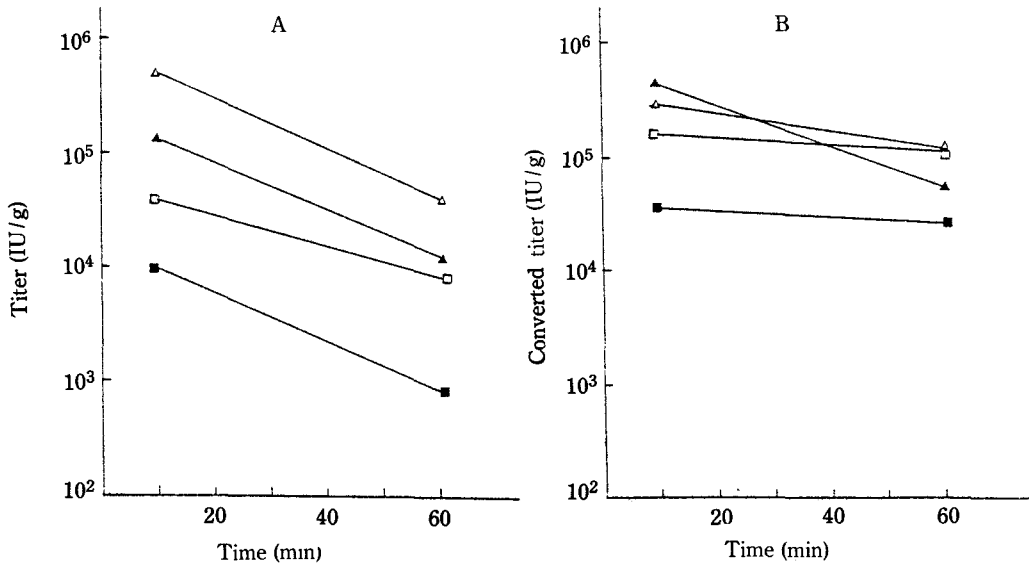


Figure 1—Tissue distribution of rHuIFN- α A (Left A) and ^{14}C -rHuIFN- α A in mice (expressed as mean of 3-4 experiments). A: 1×10^6 IU of rHuIFN- α A was i.v. injected per mouse (20-23g). B: 8750cpm of ^{14}C -rHuIFN- α A was i.v. injected per mouse (20-23g). Cpm was converted to corresponding titer. Key: Δ , kidneys; \blacktriangle , serum; \square , lung; \blacksquare , liver

세포)에 vesicular stomatitis virus(VSV)를 challenge 시키는 방법으로 혈청 및 조직 추출물 중의 rIFN- α A의 역가를 분석하였다.

인터페론의 방사능 측정

혈청 및 조직 추출물중의 ^{14}C -rIFN- α A의 총 방사능을 liquid scintillation counter(Packard Tri-Carb 4530)로 측정하였다.

실험결과 및 고찰

Table I은 rIFN- α A를 마우스의 꼬리 정맥내에 투여한 후 10분 및 60분에 혈청 및 각 장기의 조직 추출액중의 인터페론 역가를 나타낸 것이다. 투여 10분후에 이미 신장, 폐, 간장의 순으로 많은 양의 인터페론이 각 장기에 분포된 것을 알 수 있다. 또한 Fig. 1의 A에서 보는 바와 같이 신장과 간장에서의 소실속도는 혈청중의 소실속도와 같았다. 이는 혈류가 풍부한 이들 장기가 혈청과 체내 속도론적으로 동일한 compartment(즉 central compartment)에 속하고 있는 것을 알 수 있다.

Table II는 ^{14}C -rIFN- α A를 마우스의 꼬리 정맥내에 투여한 10분 및 60분후의 혈청 및 각 장기

의 균질 혼합액 중의 인터페론의 총 방사능 양을 나타낸 것이다. Table I의 경우처럼 신장에 많은 양이 분포되는 것을 알 수 있다. 투여 10분후의 인터페론 방사능의 분포는 rIFN- α A의 경우에서와 같이 신장, 폐, 간장의 순이었다. 그러나 Fig. 1의 B에서 보는 바와 같이 투여 10분 및 60분후의 소실속도는 Fig. 1 A의 경우와는 다르게 비교적 완만함을 알 수 있다. 이러한 사실은 투여 60분후의 인터페론은 상당량이 분해 또는 불활성화되어 역가는 낮아졌으나 그 분해산물은 인터페론 자체보다 체내에 비교적 오랫동안 남아 방사능을 띄고 있다는 것을 의미한다. 또한 인터페론은 투여 후 빠른 시간내에 분포 및 대사가 일어남을 알 수 있었다.

이러한 결과는 인터페론은 신체의 각 장기 중 신장에 가장 많이 분포되며 또한 신장이 인터페론 대사의 주요한 부위라는 보고^{6,8)}와 유사하다. Bino 등⁹⁾은 인터페론이 랫트 및 원숭이의 신장에 고농도가 분포되며, 신장에 분포되는 인터페론의 농도는 다른 기관의 분포 농도보다 7-10배나 됨을 보고하였다. 본 연구에서도 rIFN- α A는 투여 10분후에 인터페론의 신장분포 농도는 폐나 간보다 10배 이상 분포되었으며, 투여 60분후에도 인터페론의

Table II—Distribution of Interferon Radioactivity in Body Tissues of Mice after Intravenous Injection of ^{14}C -rHuIFN- αA (8750cpm / mouse).

Time after i.v. injection	Mouse number	IFN radioactivity of organ extract (cpm/g) ^a			
		Lung	Liver	Kidney	Serum
10 min	A	66.0	21.0	92.3	223.9
	B	118.3	13.0	211.3	210.7
	C	83.3	29.0	258.0	346.5
	D	123.3	22.8	161.3	293.3
	Mean \pm S.D.	97.7 \pm 27.6	21.5 \pm 6.6	180.7 \pm 71.0	268.6 \pm 63.3
60 min	A	55.0	15.0	58.7	32.5
	B	72.7	16.0	66.0	32.0
	C	73.3	17.6	62.0	26.4
	D	86.7	16.8	126.0	40.2
	Mean \pm S.D.	71.9 \pm 13.0	16.4 \pm 1.1	78.2 \pm 32.0	32.8 \pm 5.7

^aExtracts were made by homogenizing the tissue in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) at 300 mg tissue/ml for lung and kidney and 500 mg tissue/ml for liver.

신장분포 농도는 폐보다 5배 이상, 간장보다 20배 이상 분포됨을 알 수 있었다. 이러한 사실은 신장이 인터페론 대사에 중요한 역할을 할 가능성이 있음을 시사하는 것으로 생각된다.

그러나 ^{14}C -rIFN- αA 의 경우에 있어서는 투여 10분후의 인터페론의 신장분포 농도는 폐보다 약 2배, 간장보다 약 5배 정도 높게 분포되며, 60분후의 신장분포 농도는 폐와 비슷하며 간장보다 4배 높게 분포되었다.

이 연구에서는 조직중의 인터페론의 역가나 방사능을 측정할 때에 조직중에 혼입된 혈액을 제거하지 않은 상태에서 실험하였기 때문에 엄밀한 의미에서의 조직분포의 실체를 알 수는 없었으나, 혈액을 포함한 장기에의 인터페론의 분포에 대해서는 대체적인 경향을 분명히 알 수 있었다.

이로부터 HuIFN- α 의 조직분포가 rat와 원숭이에서 비슷한 양상을 보인 것¹⁾처럼 사람의 경우에도 유사한 조직분포 및 양상을 나타내는 것으로 생각되었다.

감사의 말씀

이 논문을 읽고 지도해 주신 서울대 약대 심창구 교수님께 감사드린다.

문헌

- 1) A. Issacs and J. Lindenmann, *Proc. Royal Soc. B.*, **147**, 258 (1957)
- 2) H. Strander and K. Cantell, *Am. Med. Exp. Biol. Fenn.*, **44**, 265 (1975)
- 3) H. Strander, K.E. Mogensen and K.K. Cantell, *J. Clin. Microbiol.*, **1**, 116 (1975)
- 4) P.J. Bridgen, C.B. Anfinson, L. Corley, S. Boss, K.C. Zoon and U.T. Ruegg, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6585 (1977)
- 5) T. Bino, H. Edery, A. Gertler and H. Rosenberg, *J. Gen. Virol.*, **59**, 39 (1982)
- 6) V. Bocci, A. Pacini, M. Muscettola, L. Paulesu, G.P. Pessina, M.K. Santiano and I. Viano, *J. Interferon Res.*, **1**, 347 (1981)
- 7) A.V. Palleroni and O. Bohoslawec, *J. Interferon Res.*, **4**, 493 (1984)
- 8) Y.I. Satoh, K. Kasama, A. Kajita, H. Shimizu and N. Ida, *J. Interferon Res.*, **4**, 411 (1984)
- 9) C.K. Shim, D.D. Kim, H.S. Kim, I.W. Jung and M.Y. Yoo, *Korean Biochem. J.*, **20**, 103 (1987)
- 10) I.W. Jung, U. Chang, H.S. Kim J.C. Bae and W.Y. Lee, *Kor. J. Appl. Bioeng.*, **13**, 27 (1985)

약물동태의 분자적 기구*

花野 学

東京大学 薬学部

Molecular Concepts in Pharmacokinetics

Manabu Hanano

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

오늘, 한국약제학회에서 강연할 수 있는 명예를 주신 것에 대해 먼저 깊은 감사를 드립니다.

오늘, 나의 이야기는, 「약물동태의 분자적기구」라는 제목하에 먼저 이 문제에 관한 연구의 방향을 얘기하고자 합니다.

10년 이상 우리는 소위 생리적 pharmacokinetics의 수법의 발전을 주제로 하여 연구를 진행시켜 왔습니다. Fig. 1에는 이 수법의 진행과정

동태의 분자적 기구(대사·배설·결합·분포·수송·투과) →조직에서의 물질수지식(조직내 분포모델)→전신에의 통합(순환혈류계)→연립미분방정식의 數値解→主組織의 농도추이→표적부위에서의 動態의 분자적 기구(물질수지식)→표적부위의 농도추이→작용의 분자적 기구(受容體 결합·작용의 추이)→약물작용의 추이

Figure 1

에 대해 보인 것입니다. 생체는 체내에서의 물질의 소실, 이동에 관한 다양하며 또한 고도로 발달된 분자적 기구를 갖고 있습니다. 이러한 기구는 생리적 물질 뿐만 아니라 약물, 異物의 체내동태를 지배하고 있습니다. 대사, 배설, 결합, 분포, 수송, 투과 등의 약물동태의 step의 분자적 기구는 생화학, 생물물리의 연구자에 의해 효소반응, 능동수송, 담체수송, 膜流動 등의 다양한 기구인 것이 해명되어져 온 것입니다. 생리적 속도론에서는 이러한 기구를, 그것이 작용하고 있는 부위에

서의 物質收支式, 즉 약물농도의 시간변화의 방정식으로써 나타내고 있습니다. 이 작용부위에 있어서의 물질수지식은 여러가지의 근사에 의해 순환혈중농도를 지배하는 것에 의해 전신의 조직농도에 영향을 주는 주요조직, 또는 장기, 또는 이들을 통합한 생리적 속도론에서의 콤파트먼트단위의 물질수지식으로 나타낼 수 있습니다. 이러한 몇개의 물질수지식이 전신순환계에 의해 연결된 연립미분방정식이 순환혈중의 약물농도를 나타내는 속도식입니다. 보통은 이것을 생리적 모델이라고 합니다. 이 모델로부터 동맥 및 정맥혈중농도 그리고 주요 조직에서의 약물농도의 시간推移가 계산됩니다. 이 혈중농도와 약물작용의 표적부위에서의 동태기구, 즉 분자적인 물질수지식으로 부터 그 부위에서의 약물활성체의 농도의 시간추이를 계산할 수 있습니다. 약물작용의 분자적 기구에 관해서도 최근 급속히 해명이 진전되고 있습니다. 현재 물질수지와 같은 의문이 없는 定式化는 확립되어 있지 않으나, 농도·작용관계 및 작용발현, 소실속도식을 사용하여 약물작용의 시간추이를 유도하는 것이 가능합니다. 곧 이러한 방향은 현상으로부터 본질 또는 기본법칙의 추출이라는 근대 과학사상과는 반대 방향이라는 비판이 있으리라고 생각합니다. 현상중에 포함되는 여러가지의 잡다한 修飾因子와 조건을 엄밀히 설정한 실험과 추상

* 한국약제학회 하계특별강연회(1987. 8. 25 대한약사회 강당)에서 발표되었음.

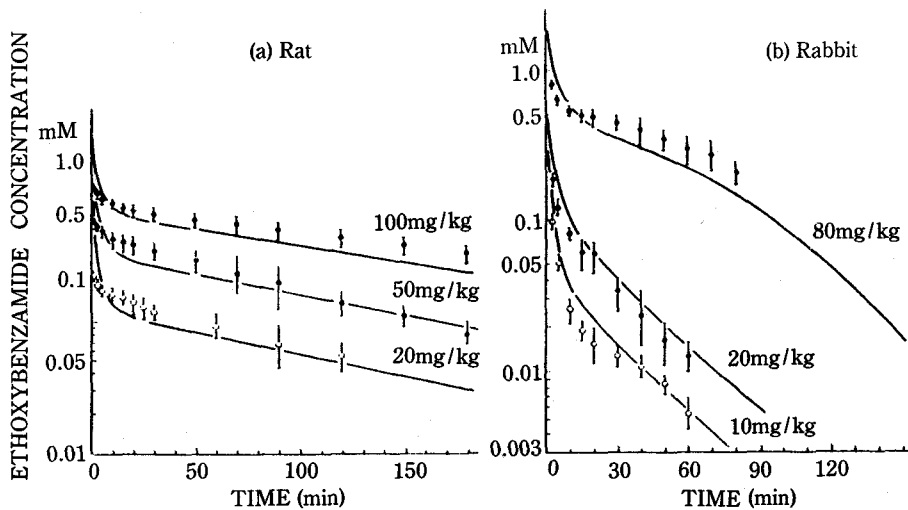


Figure 2—(a) Simulated curves and observed plasma EB concentrations after bolus i.v. administration of 20 mg/kg (○), 50 mg/kg (■), and 100 mg/kg (●) of EB in rats. (b) Simulated and observed plasma EB concentrations after i.v. administration of 10 mg/kg (○), 20 mg/kg (■), and 80 mg/kg (●) of EB in rabbits. Each point represents the mean \pm SD from 4-6 experiments.

화한 이론에 힘입어 선별, 판단함으로써 본질을 찾아내는 것이 과학의 방법론입니다. 이와같이 하여 학문은 개개의 현상의 속박을 벗겨 보편화하는 것입니다. 나 또한 이같은 근대과학의 충실한 학도이며, 가치판단에 따르고 있습니다. 그럼에도 불구하고 이같은 역방향을 지향하는 이유는 역시 환자 개인에의 학문성과의 응용을 목적으로 하기 때문입니다. 또한 보편적인 원리로부터 개별의 현상을 정량적으로 예측하기 위한 보편적인 수법을 만들기 때문이기도 합니다. 이와 같이 약간은 돈키호테적인 것을 생각한 것은, 인간이 만들어낸 도구가 인간의 능력을 비약적으로 증대시켜왔다는 평범한 사실로부터입니다. 달리는 속도와 거리는 자동차에 의해, 날으는 능력은 비행기와 로켓트에 의해 불가능이라고 생각되었던 것들을 가능하게 하였습니다. 사람의 두뇌는 사실의 본질을 이해하는 데에는 뛰어나지만 방대한 정보를 정해진 수법에 의해 처리하여 푸는 데에는 적합하지 못합니다. 이같은 것은 컴퓨터를 도구로 하는 것에 의해 능률적으로 해결될 수 있습니다. 진부한 얘기로 시간을 보냈습니다만 이후 東京大學의 제제학 교실의 연구를 서둘러 소개하고자 합니다.

Fig. 2는 해열진정제인 ethoxybenzamide의 쥐 및 토끼에의 정맥주사 후의 동맥중 혈중농도추이

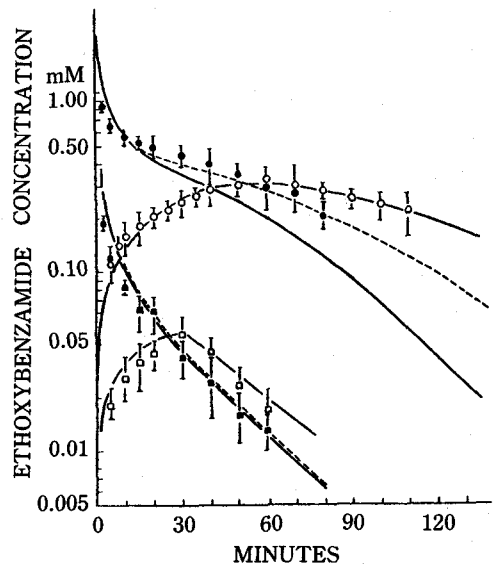


Figure 3—Time courses of ethoxybenzamide (●) and its metabolite, salicylamide (○) in plasma after the iv injection of ethoxybenzamide to rabbits.

를 microsome, 혈청 등을 사용한 *in vitro*의 실험에 의한 생화학적 측정치로부터 산출하는데 성공한 예입니다. 이 연구는 우리들의 생리학적 pharmacokinetic 연구의 거의 최초의 성과였습니다. microsome을 이용한 효소 kinetic의 측정치로부터, 肝 전체의 *in vivo*의 효소활성의 예측에

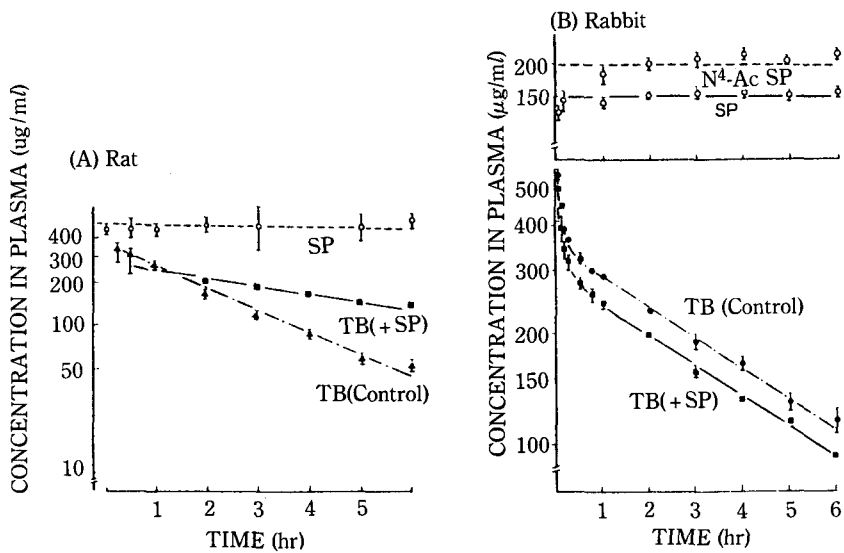


Figure 4—Plasma disappearance of TB after iv administration of 80 mg/kg in rats and rabbits with and without SA.

성공하고, 전신계를 구축하는 것이 가능하였습니다. 또한 Fig. 2에 보이는 동물중에 의한 동태의 相異를 효소활성의 差, 즉 K_m V_{max} 의 差에 귀착시키는 것에 성공했습니다. 또한 토끼의 80mg/kg 투여량에서 관찰되는 계산치와 실측치의 차이로부터, Fig. 3은 대사산물인 salicylamide의 대사저해, 즉 product inhibition의 존재를 발견하여 점선에서 보이듯이 완전한 동태산출에 성공한 것입니다²⁾.

경구혈당강하제인 tolbutamide의 효과가 sulfaphenazole의 병용에 의해 증강되는 약물간 상호작용이 알려져 있습니다. Fig. 4는 sulfaphenazole을 정맥내 infusion에 의해 일정농도로 유지시켰을 때의 tolbutamide의 쥐 및 토끼에 있어서의 동태와 그 분자적 기구를 연구한 결과를 보인 것입니다³⁾.

쥐에 있어서는 사람의 경우와 같이 sulfaphenazole의 병용은 tolbutamide의 반감기를 증대시키고 있습니다만, 토끼에서는 반감기의 변화는 없고 분포용적만이 증대하고 있습니다. 全身 clearance는 상호작용에 의해 쥐에서는 감소하고 토끼에서는 증대하고 있습니다⁴⁾.

Fig. 5는 상호작용의 분자적 기구를 *in vitro* 실험에 의해 조사한 결과입니다. 혈청단백결합의 치환에 의한 tolbutamide의 비결합율(f_B)은 兩種에

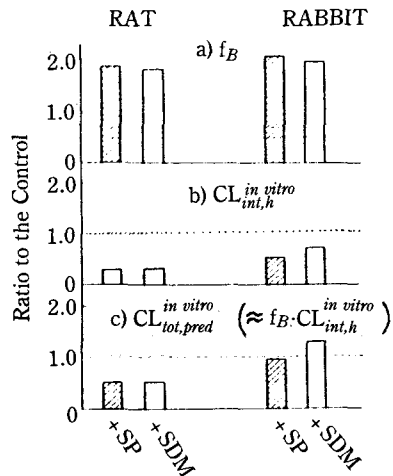


Figure 5—Ratios of f_B , $CL_{int, h}^{in vitro}$, and $CL_{tot, pred}^{in vitro}$ in the presence of SA to those in the absence of SA. These ratios were calculated based on the *in vitro* experiments. The dotted line in each panel shows the ratio of 1.0. panel a: f_B ; panel b: $CL_{int, h}^{in vitro}$, and panel c: $CL_{tot, pred}^{in vitro}$ ($\approx f_B \cdot CL_{int, h}^{in vitro}$) ($\approx f_B CL_{int, h}^{in vitro}$).

있어 같이 약 2배로 증가해 있습니다. 이것은 사람에게 있어서도 관찰되어, 상호작용의 분자적 기구로 생각되어져 왔었습니다. 肝 microsome 分画를 이용하여 조사해보면, sulfaphenazole과 tolbutamide의 대사를 저해하고 있습니다. 이 저해는 兩種에 공통하여 관찰되나 저해의 정도는 쥐의

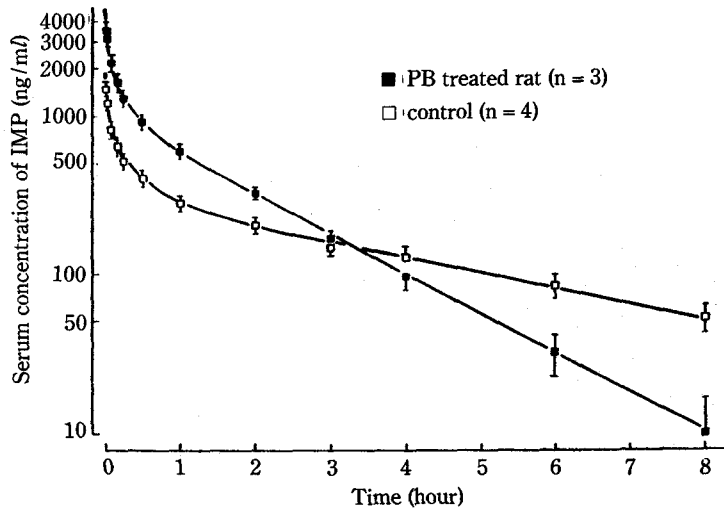


Figure 6—Serum disappearance curves of imipramine after i.v. administration of 8 mg/kg⁻¹ of imipramine. Each point and vertical bar represent the mean and s.e. of four control and three phenobarbitone-treated rats. Key: (○) and (●) phenobarbitone-treated rats.

편이 월등히 컸습니다. 비결합율의 증대는 대사를 증진시키며 또한 효소저해를 감소시킴으로써 質的으로는 同一기구의 상호작용이 일어남에도 불구하고 量的 動態의 변화에는 동물종에 의한 차이가 출현합니다. 혈중농도의 높이에 의한 상호작용의 변화 즉, 비선형적 상호작용의 문제를 포함하여 앞에서 보인 슬라이드의 실선과 같이 tolbutamide의 순환혈중농도의 구축의 완성이 가능했습니다⁴⁾.

알부민은 혈청중의 농도가 높고 많은 약물과의 결합능도 높으므로 약물結合의 주역을 담당하고 있습니다. 그러나 염기성의 약물에 관해서는 혈청중의 α₁-acid glycoprotein이 결합체의 대부분을 점하는 경우가 있습니다. 이 단백질은 염증 등의 病變에 의해 혈청중에 산출되기 때문에 염기성약물의 체내동태의 변동의 분자적 기구의 하나로서 주목되고 있습니다.

Fig. 6은 항정신약 imipramine의 쥐의 혈중동태가 phenobarbital 처리에 의해 소위 효소유도를 일으켰을 때의 변화의 양상을 보이고 있습니다. 유도에 의한 생물반감기의 단축은 단순히 대사의 촉진에 의한 것이라고 속단하기 쉬우나 잘 관찰하면 반감기의 단축은 clearance의 증대보다는 분포용적의 감소에 의해 야기되는 것임을 알 수 있습니다⁵⁾.

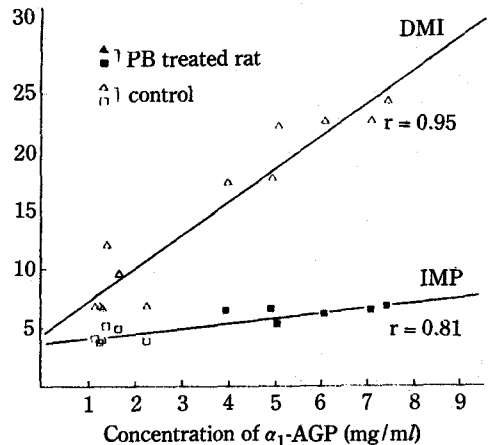


Figure 7—Plots of relation between 1/fp against concentration of α₁-AGP.

phenobarbital의 투여에 의해 Fig. 7에 보인 바와 같이 혈청중의 α₁-acid glycoprotein이 증가합니다. imipramine 및 그 대사물 DMI의 혈장중 비결합율의 역수는, α₁-acid glycoprotein의 농도에 따라 증가하며 좋은 상관관계를 보이고 있습니다. 그러나 현재 imipramine의 phenobarbital에 의한 유도의 체내동태의 정량적 구축은 아직 완성되어 있지 않습니다.

Fig. 8은 위암 및 담낭염환자 혈청중의 α₁-acid

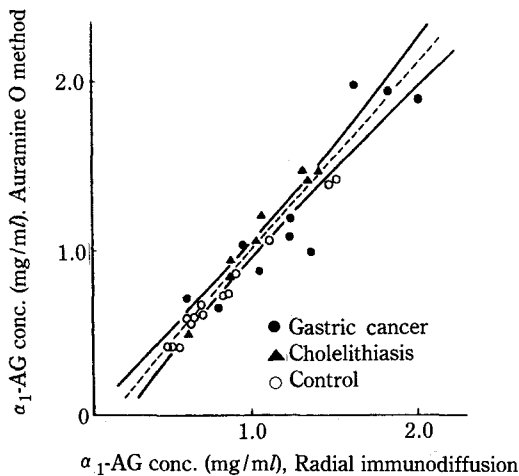


Figure 8—Relation between the α_1 -AG concentrations in human serum from 14 healthy subjects and 19 serum samples of 5 patients determined by the radial immunodiffusion method (abscissa) and by the AO method (ordinate). The regression line shown by a dotted line is $y = 1.08x - 0.106$ ($r = 0.976$, $p = 0.01$). The 95% confidence limits are shown by the solid lines.

glycoprotein 농도를 측정된 것입니다. 건강인에 비해 이들 염증성 환자에서는 α_1 -acid glycoprotein level의 상승경향이 관찰되고 있습니다.

혈청중의 약물단백결합에는 큰 種差가 있어, 혈청중 성분에 의한 결합치환의 상호작용과 前述의 단백질의 변화가 큰 것에 대해, 조직중의 결합에는 種差가 적은 것이 특징입니다. 이 특징을 살리는 것에 의해 약물분포의 각종 동물종간 예측, 소위 animal scale up의 가능한 것이 보고되었습니다⁷⁾. 그러나 adriamycin 등의 제암제의 경우에는

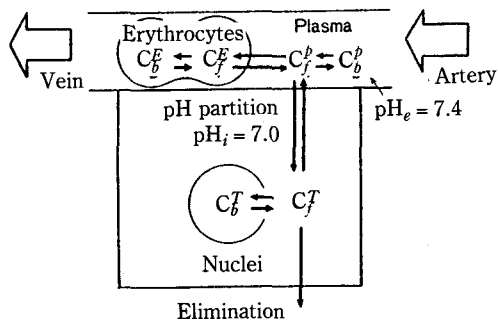


Figure 9—Diagrammatic representation of the organ model.

세포핵 또는 DNA에의 결합성이 높고, 조직결합의 항상성은 성립하지 않습니다. Fig. 9에는 adriamycin의 조직분포에 관해 제출된 분자적 기구를 보인 것입니다. adriamycin의 조직분포는 비해리형분자의 세포막투과에 의한 pH분배와 혈청중단백 및 세포핵에의 결합율에 의해 정해집니다.

Fig. 10은 adriamycin의 조직, 혈액간 분배율을 前述의 분자적 기구와 혈청 및 분리핵을 사용 *in vitro*에서의 결합실험에서 구축한 *in vitro* 분배율과 adriamycin 靜注後의 假定常狀態의 혈중 농도감소, 소위 β 相에서의 각 장기의 약물농도와 혈청중농도로부터 생리학적 약물속도론의 물질수지식에 근거하는 방법으로 산출한 *in vitro*의 분배율을 비교한 예입니다. 이와같은 相關은 제출한 모델의 적합성과 함께 핵과 adriamycin과의 결합이 조직에 의해 변하지 않음을 보이고 있습니다.

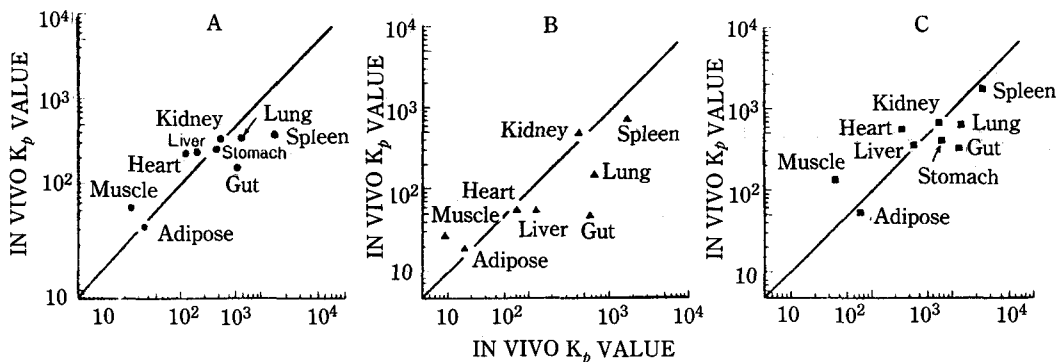


Figure 10—Comparison between *in vivo* and *in vitro* tissue-to-plasma partition coefficients (K_p values) in rats (A), rabbits (B), and guinea pigs (C).

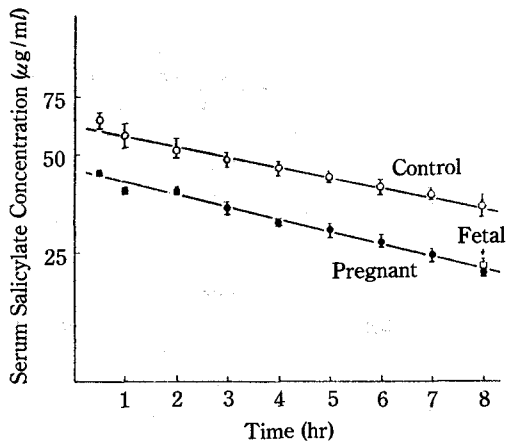


Figure 11—Serum disappearance of SA after iv administration of 10 mg/kg in control (○) and pregnant rats (●) and fetal rats (□). Each point and vertical bar represents the mean ± SE of three rats. Lines were calculated by fitting to mono-exponential equations using a least squares method.

이같은 상관관계는 쥐, 토끼, 모르못트에 있어서 공통으로 관찰되며 제암제의 조직분포와 함께 그 동물간 종차도 또한 조직중의 DNA함량에 의해 예측이 가능한 것을 알게된 것입니다. 더욱이, 이 관계는 adriamycin과 같이 DNA에 stocking하는 약물에 공통된 것을 알게 되었습니다.

이 연구논문은 작년의 최우수 논문으로써 미국 약학회의 에버트賞을 受賞하는 것으로 된 논문입니다⁹⁾.

약물의 체내동태는 생리적 상태의 변화에 의해 크게 변동하는 것이 있습니다. 이것이 동태예측을 곤란하게 하며, 약물치료의 현상으로부터의 동태학의 무력함의 근원으로 되고 있습니다. Fig. 11은 임신한 쥐의 salicylic acid 동태의 예측결과를 보인 것입니다⁹⁾. 임신 말기의 쥐에 있어서 salicylic acid의 동태는 크게 변동하고, 분포용적과 clearance의 급증이 관찰되고 있습니다. 임신에 의해 세포질간의 용적이 증대하는 것은 잘 알려진 사실이며, 이것이 임신시의 분포용적의 증대의 원인이라고 말해지고 있습니다. 그러나 間質容積의 증대로부터는 clearance의 증대를 설명하는 것이 불가능합니다.

혈청중의 salicylic acid의 비결합율을 비임신,

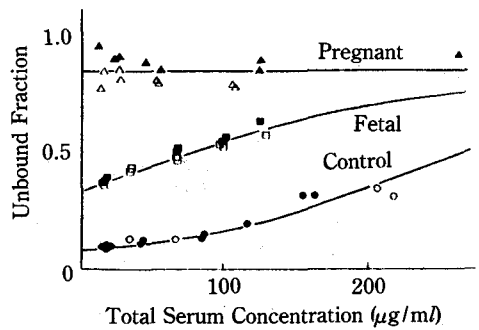


Figure 12—The points represent the experimental values as the unbound fraction of the total serum concentration. Sera obtained from two control rats (rat A, ●; rat B, ○), two pregnant rats (rat C, ▲; rat D, △), and 10 fetuses of the same pregnant rats C (■) and D (□) were separately used for the binding study. The lines were calculated by fitting to a Langmuir-type equation Serum protein binding of SA in control (○, ●), pregnant (△, ▲), and fetuses of the same pregnant rats (□, ■).

임신 및 태아에 관해 여러가지의 salicylic acid 농도에서 측정된 결과를 Fig. 12에 보였습니다. 임신시에는 명확히 혈청중의 비결합율이 증대하여 있습니다. 혈청을 사용한 *in vitro*에서의 결합실험에서 임신쥐의 혈청단백량은 거의 저하해 있지 않으므로, 명확히 해리정수의 증대가 생기는 것이 판명되었습니다. 태아에서는 낮은 단백질농도와 함께 큰 해리정수가 관측되었습니다. 해리정수의 증대의 원인으로서는 혈청중의 유리지방산의 증대가 생각되어 집니다. 단, salicylic acid와 지방산의 알부민 결합의 치환은 단순한 것이 아니고, 지방산에 대한 최강결합 site는 salicylic acid와의 경쟁이 없고 지방산의 일정농도의 상승을 경계로 하여 salicylic acid의 유리가 일어나는 것을 생각하지 않으면 안되는 것이 판명되었습니다¹⁰⁾.

Fig. 13은 제담제인 4-methylumbelliferone의 혈중농도곡선하면적의 투여량 및 투여경로의존성을 측정된 결과를 보인 것입니다. 이 약제는 간장에서 glucuronic acid conjugation 및 sulfate conjugation을 받아서 소실해 갑니다. 下肢정맥으로부터 투여한 때의 AUC 분의 dose, 즉, 전신 clearance는 거의 투여량에 무관계하게 일정합니다. 250g 체중의 쥐의 간혈류속도는 약 15ml/

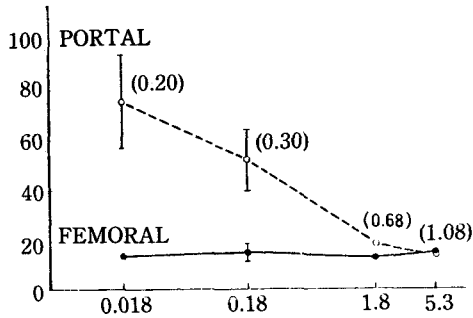


Figure 13—Dose dependency of hepatic availability from *in vivo* experiment.

min이므로, 전신 clearance는 거의 이것과 같은 값입니다. 한편 문맥으로부터 투여한 경우의 AUC 분의 dose는 肝에서의 물질수지식으로부터 간 고유 clearance와 비결합율의 積, 즉 肝혈류가 무한히 크다고 가정했을 때의 간 clearance로 됩니다. 이 값은 투여량에 의해 감소하여, 대사에 포화현상이 있음을 보이고 있습니다¹¹⁾.

Fig. 14는 multiple indicator dilution法이라고 불리는 실험방법을 보인 것입니다. 문맥으로부터 약물을 세포외액분포의 대조물질, 여기서는 요오드 125로 라벨한 알부민과 함께 瞬間투여 후, 肝 정맥에서 유출하는 관류액을 0.5초 간격으로 채취하여, 그 중의 대조물질과 약물의 농도비의 경시적 추이로부터, 모세혈관으로부터 간조직에의 약

물의 influx, 肝으로부터의 efflux, 그리고 간중에서의 약물의 감소 등의 과정을 분리측정할 수 있습니다. 이 방법의 결점은 측정시간이 짧기 때문에 낮은 속도과정, 예를들면 낮은 대사속도 등의 측정이 불가능한 것입니다. 이 때문에 간중에서의 약물 감소는 반드시 대사속도에 대응하지 않고, 간중의 확산 등의 이동과정을 보이는 것도 있습니다.

Fig. 15는 간기능진단약 rose bengal의 혈중동태를 선천적으로 알부민이 존재하지 않는 무알부민쥐를 사용하여 측정하여, 정상쥐와 비교한 결과입니다. rose bengal은 알부민관여의 간에의 uptake가 증명되어 있음에도 불구하고, 兩者에 차는 보이지 않습니다. rose bengal의 혈중소실이 간세포에의 uptake에 의한 것임은 증명되어 있으므로, 이 결과는 알부민의 유무에 관계없이 肝 uptake가 같음을 보이는 것입니다. 무알부민쥐의 혈중에서의 rose bengal은 거의가 결합형으로서 존재합니다. gel 여과에 의한 분리에 의해 rose bengal은 정상인 쥐에서는 albumin에, 무알부민 쥐에서는 globulin에 결합해 있음을 알게 되었습니다. warfarin의 경우와 같이, 간관류 MID법에 의해 이들 단백질의 간 uptake의 관여를 조사한 것이 Fig. 16입니다. 비결합형만이 uptake되는 것으로한 점선에 비교하여 명백히 정상쥐에서는 사람의 γ -globulin의 관여가 관찰됩니다. 또한, 무알

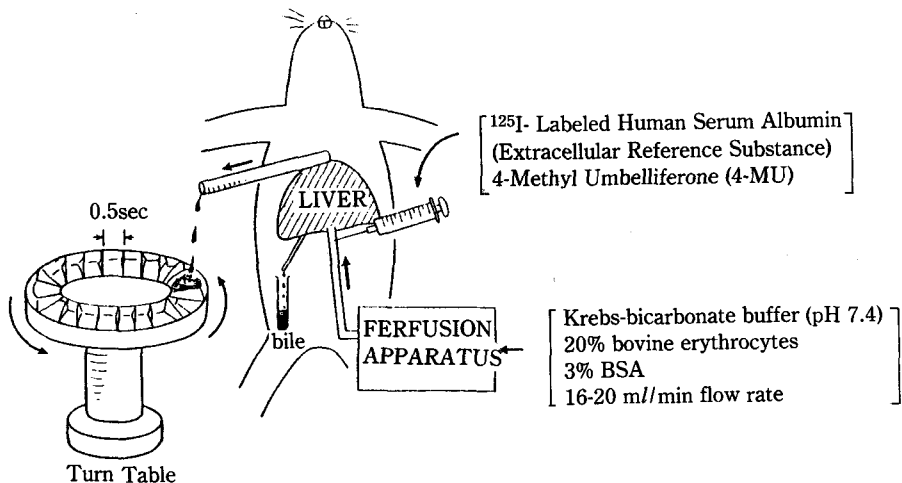


Figure 14—Multiple indicator dilution method.

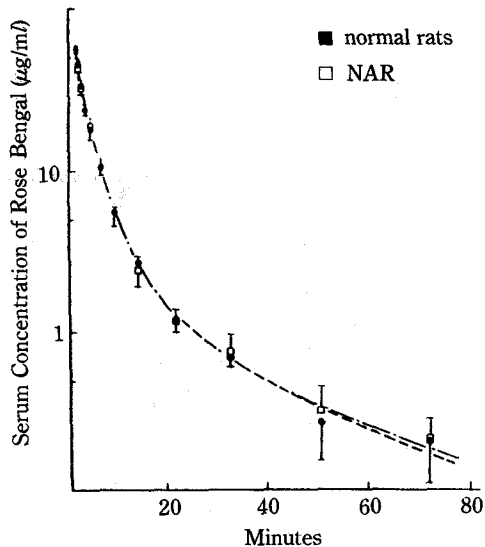


Figure 15—Serum disappearance curves of rose bengal after 2 mg/kg intravenous administration. mean \pm S.E. (n = 3)

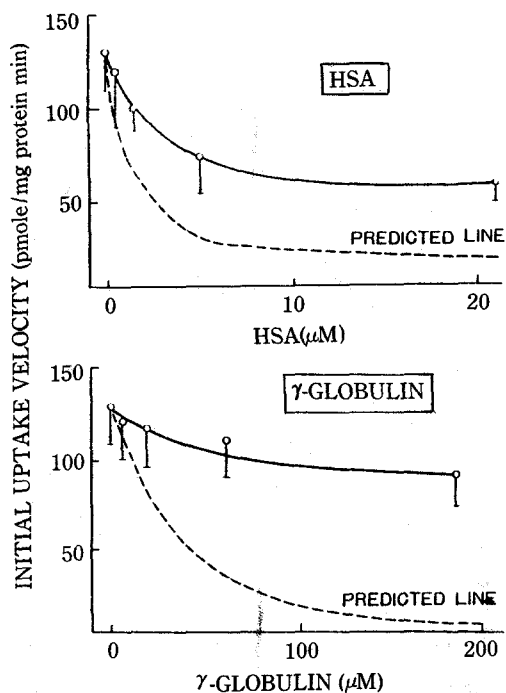


Figure 16—Effect of HSA and γ -globulin on the initial velocity of rose bengal uptake by isolated liver cells.

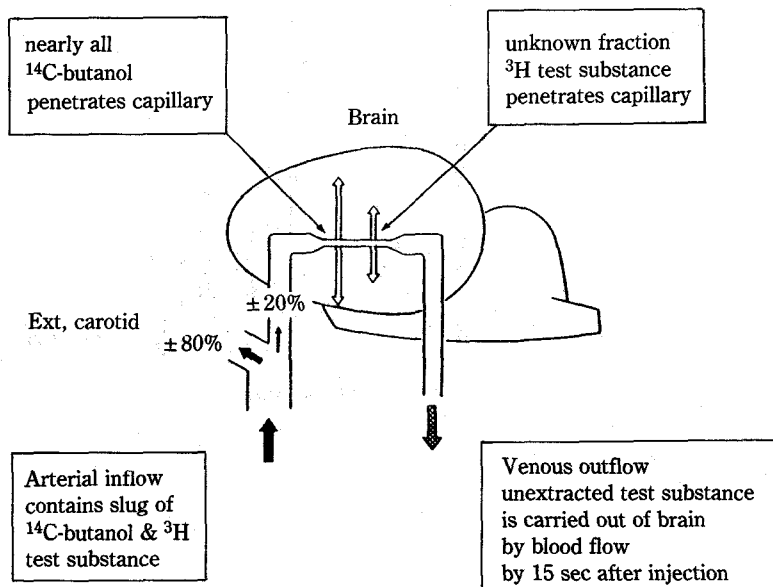


Figure 17—A diagrammatic representation of methodology employed. Mixture of a ^3H -labeled test substance and ^{14}C -butanol is injected rapidly into rat common carotid artery and animal decapitated 15 sec later. Test substance (^3H) remaining in brain is related to ^{14}C remaining. Some of both labeled substances washes out during 15 sec interval between injection and decapitation.

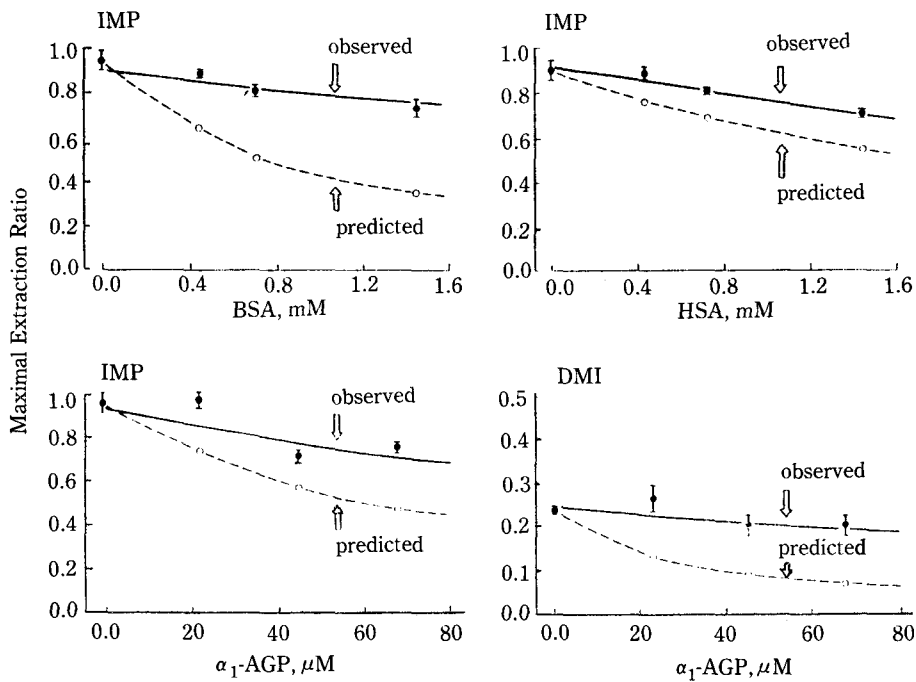


Figure 18—Plots of maximal extraction ratio (E_T) of ^3H imipramine (IMP) and ^3H desipramine (DMI) against concentrations of bovine serum albumin (BSA), Human serum albumin (HSA) and human α_1 -acid glycoprotein (α_1 AGP) in carotid injection solution.

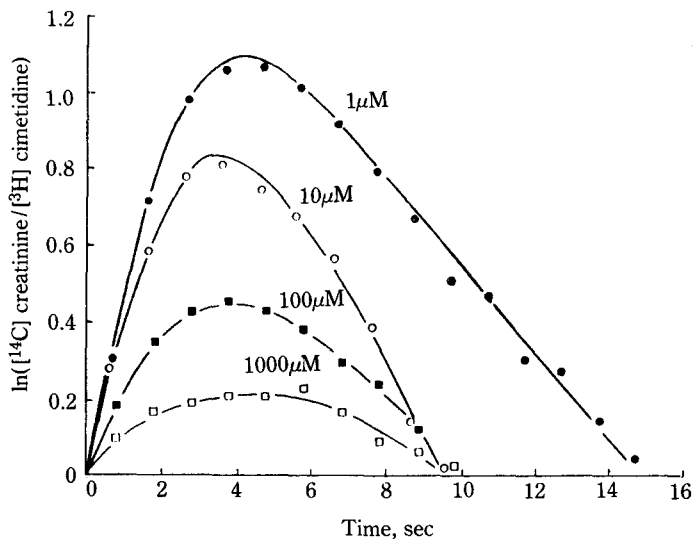


Figure 19—Plot of natural logarithm of ratio (creatinine outflow fraction per milliliter/cimetidine outflow fraction per milliliter) vs. time. Lines were calculated by MID-SALS method (25, 32) using a digital computer. Closed circles, 1 μ M cimetidine; open circles, 10 μ M; closed squares, 100 μ M; open squares, 1,000 μ M.

부민취에서의 알부민의 관여도 마찬가지로 증명 가능합니다. 이들의 결과는 알부민의 간 uptake에의 관여는 알부민에 특이적인 것이 아니며, 또한 지방산 등의 생리적 성분에 특이적인 기구이지도 않고, 결합율이 높은 약물에 비특이적으로 보이는 기구라고 생각됩니다.

혈청단백질 관여의 조직 uptake 현상은, 肝뿐만 아니라 뇌에서도 관찰되었습니다. Fig. 17은 뇌

에서 약물 uptake를 측정하기 위한 Oldendorf의 기법을 보인 것입니다.

Fig. 18은 向精神藥 imipramine 및 그 대사물 desipramine의 腦內移行에 대한 혈청단백의 관여를 증명한 연구를 보인 것입니다.

Fig. 19는 cimetidine의 腎에의 이행, 즉 분비 기구를 腎관류 MID법에 의해 연구한 결과를 보인 것입니다.

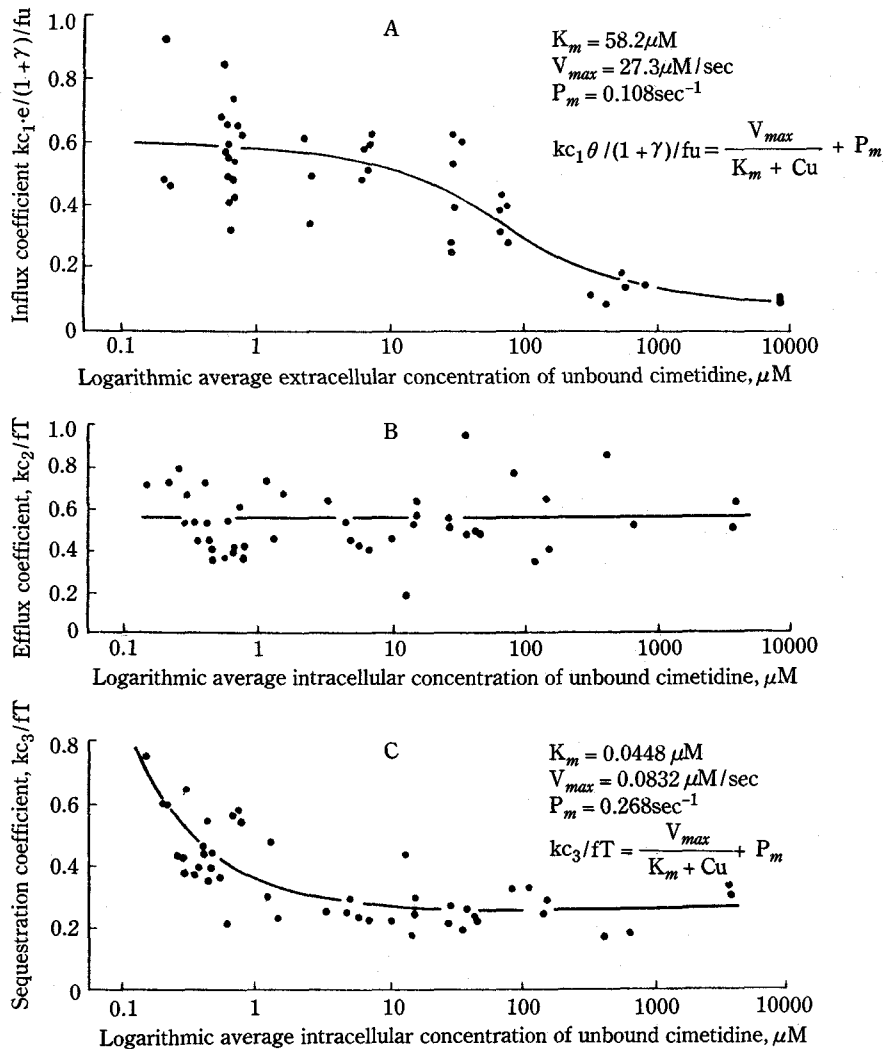


Figure 20—Relationship between rate constants for unbound cimetidine and average extracellular or intracellular concentration of unbound cimetidine. Equation in *inset* was used for fitting through points. K_m , V_{max} and P_m are Michaelis constant (μM), maximum velocity ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$), and permeability MULTI method using a microcomputer. A: influx rate constant; B: efflux rate constant; C: sequestration rate constant.

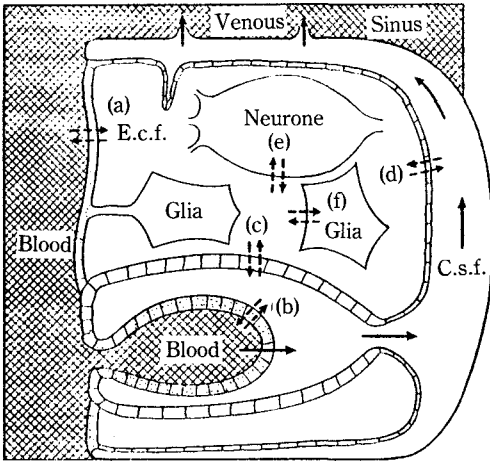


Figure 21—Diagram of fluid compartments of the blood-brain-cerebrospinal fluid system. H. Davson and M.W. Bradbury, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **19**, 349-364 (1965)

Fig. 20은 MID法에 의해 얻어진 cimetidine의 腎移行의 三過程, 즉 influx, efflux, sequestration의 투여량 의존성을 보인 것입니다.

Fig. 21은 뇌에 있어서 뇌척수액의 동태와 약물 동태의 관계의 개념도를 보인 것입니다. 뇌척수액과 혈액의 사이에는 혈액-뇌척수액관문을 형성하는 맥락충이라는 조직의 존재가 알려져 있습니다. 뇌혈액관문을 통과하여 腦內에 들어온 약물은 이 맥락충으로부터 혈액으로 배제됩니다.

이 과정에는 carrier 수송의 존재가 想定되어 있습니다.

Fig. 22는 맥락충에서의 능동적 배설이 없고 단지 流出만이 일어나는 ^{14}C inulin 및 능동적 배설이 想定되는 cimetidine을 腦室內에 투여한 후의 농도감소의 경시변화를 측정된 결과를 보인 것입니다.

Fig. 23은 cimetidine 맥락충배설의 경합관계를 조사한 결과입니다. cimetidine의 뇌척수액으로부터의 배설 clearance는 cation 수송 carrier로 이동한다고 생각되는 N-methylnicotinamide에 의해서는 감소하지 않고 음이온 수송계로 이동하는 benzyl penicillin에 의해 저해되었습니다. cimetidine 분자는 전체로서 양이온이지만, 이 결과는 음이온 수송계에서 운반되는 것을 시사하고 있습니다. 그러므로 쥐의 뇌에서 맥락충을 분리한 후 *in vitro*에서의 맥락충에의 uptake를 측정해 보았습니다. 이 uptake는 *in vitro*系에서는 배설 과정에 대응합니다.

Fig. 24는 음이온류가 cimetidine의 uptake를 저해하는 것을 보인 것입니다. 그림에서는 보이지 않으나 cimetidine의 uptake는 dipeptide에 의해서도 저해됩니다. 그외 많은 물질과의 경합관계를 조사한 결과, cimetidine의 맥락충 uptake, 따라서 뇌척수액에서의 배설과정은 유리 음이온 및 dipeptide의 수송에 있어서의 carrier

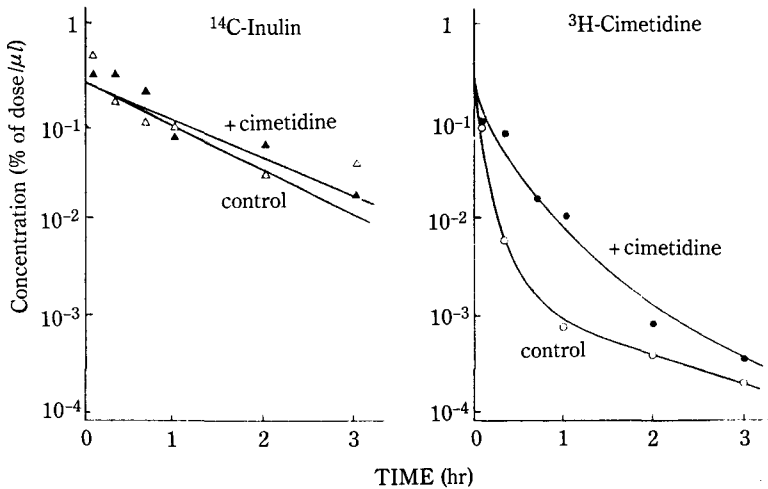


Figure 22—Concentration of substances in the cisternal CSF after intra cerebroventricular administration.

	Inulin clearance ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Cimetidine clearance ($\mu\text{l}/\text{min}$)
control	7.0 ± 1.0	72 ± 6
+ cimetidine	6.0 ± 0.7	36 ± 7
+ NMN	7.3 ± 0.6	71 ± 25
+ benzylpenicillin	6.4 ± 0.5	26 ± 1

Figure 23—Clearances of inulin and cimetidine from the CSF.

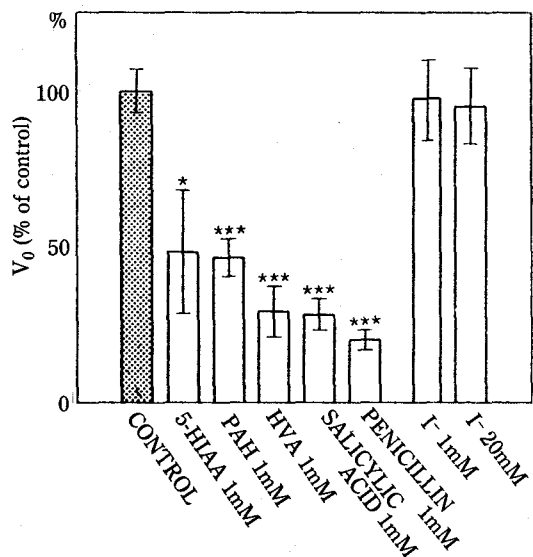


Figure 24—Effects of anionic compounds on the accumulation of cimetidine.

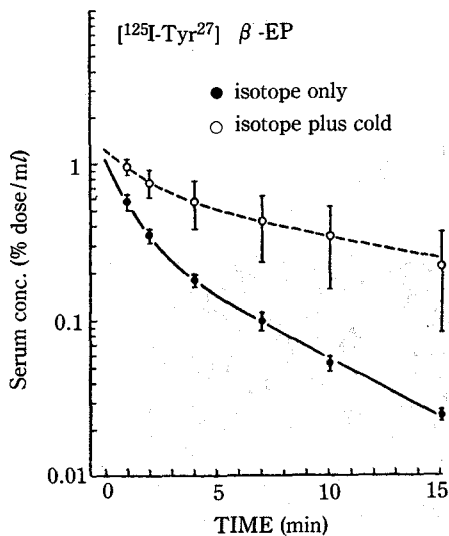


Figure 25—Plasma concentration of $[^{125}\text{I-Tyr}^{27}]\beta\text{-EP}$ after iv injection.

와 공통된 가능성이 시사되었습니다.

Fig. 25는 내인성 opioid peptide인 β -endorphine의 동태 data를 보인 것입니다. 125 요오드로 표식한 β -endorphine의 tracer level에서의 동태연구는 비표식의 β -endorphine을 첨가하는 것에 의해 현저한 생물학적 반감기의 증대와 혈중 농도의 상승을 나타내고 있습니다. Fig. 26은 2種의 요오드 표식체의 동태 및 이것에 非標識體를 도

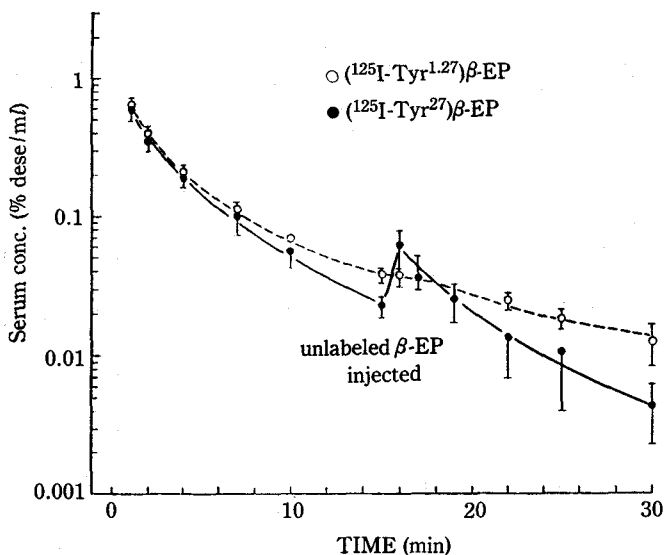


Figure 26—Effect of unlabeled $\beta\text{-EP}$ injection on plasma concentration profile of labeled EP.

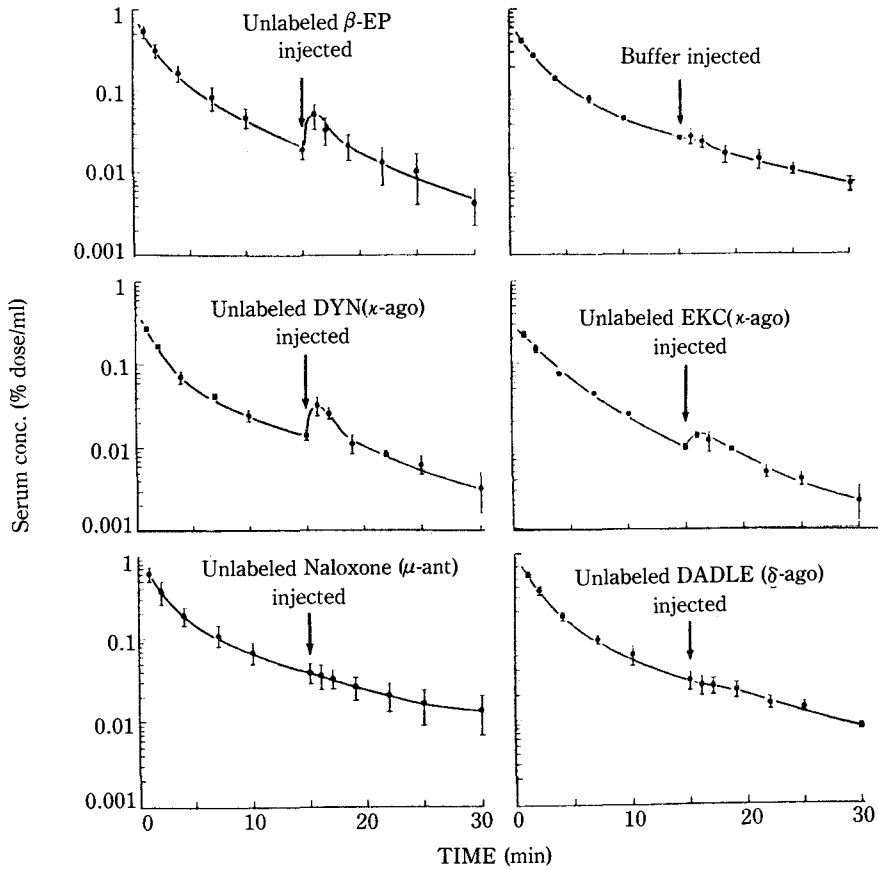


Figure 27—*In vivo* displacement of 27-labeled β -endorphine.

중에 첨가했을 경우의 변화를 보인 것입니다.

Fig. 27은 前出의 혈중농도상승을 여러가지의 agonist 및 antagonist로 조사한 것입니다.

Fig. 28은 上皮細胞成長 peptide, EGF의 간 clearance를 간 관류실험에 의해 조사한 실험결과를 보인 것입니다. EGF는 간표면의 receptor와 결합한 후, EGF-receptor 복합체로서 세포내에 uptake됩니다. Receptor mediated endocytosis의 기구에 의해 세포내에 uptake되는 것이 *in vitro*의 연구에서 보고되어 있습니다. Fig. 28로부터 알 수 있듯이 요오드 125로 라벨된 EGF의 간에의 uptake는 上段에 보였듯이 tracer level에서의 uptake가 없는 대조물질인 inulin에 비교하여 큰 uptake를 보이고 있으나 30 μ g의 非標識 EGF의 첨가에 의해 거의 완전히 억제되어 receptor mediated endocytosis의 특징을 보여

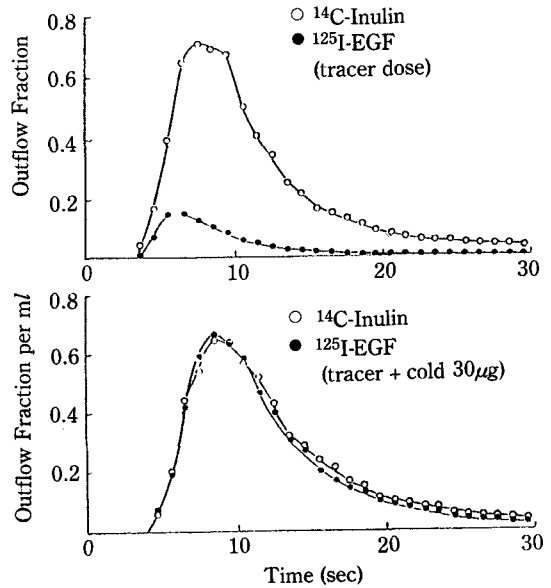


Figure 28

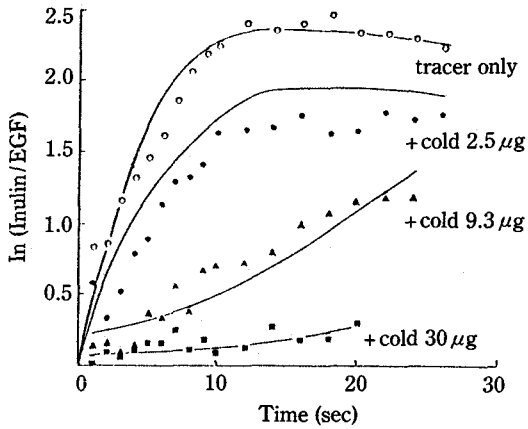


Figure 29—Ratio plot for the hepatic transport of human EGF (Analyzed by multiple indicator dilution method).

주고 있습니다.

Fig. 29은 여러가지 농도의 非標識 EGF의 공존 하에서의 간정맥에 流出하는 EGF에 관한 대조 inulin의 농도비의 시간추이 이른 바 ratio plot을 보인 것입니다.

약물동태연구의 목적은 약물작용을 예측하는 것이 있습니다. 종래부터 약물동태, 즉 약물혈중농도, 또는 조직내 농도추이와 약물 작용의 소실 또는 지속을 관련지은 연구는 다수 보고되어 있습니다. 이러한 연구에서는 작용부위의 약물활성체농도와 작용과의 관계를 용량-작용곡선에 따라서 제시하는 것입니다. 그러나 최근의 급속한 약물수용체의 연구의 발달에 의해 보다 분자적 기구의 명확

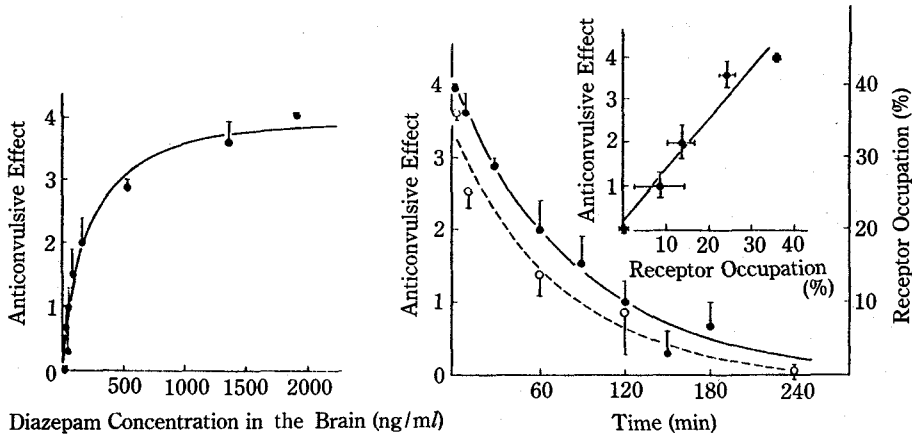


Figure 30—The relation between DPZ concentration in the brain and anticonvulsive effect. Time courses of anticonvulsive effect and receptor occupation by DZP.

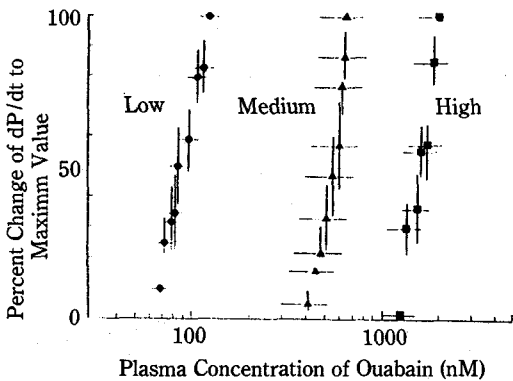


Figure 31—Infusion rate dependency on the relation between plasma concentration and PIA

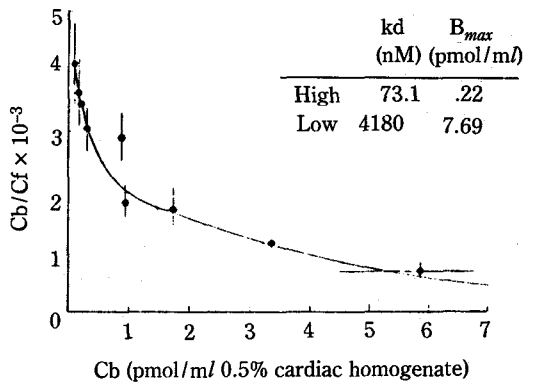


Figure 32—Scatchard plot of ouabain binding to Na, K-ATPase

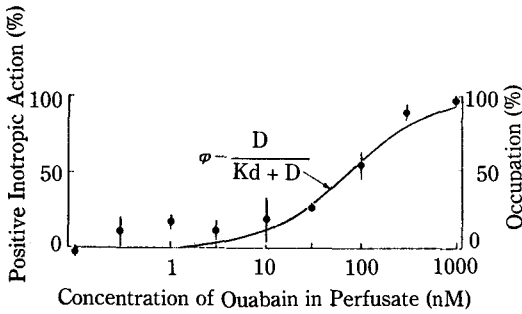


Figure 33—Concentration-effect relationship of ouabain in Langendorff heart preparation.

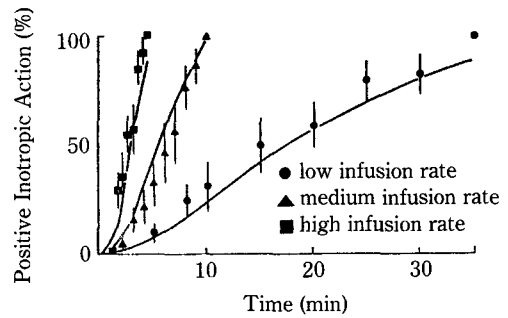


Figure 34—Simultaneous fitting of PIA in *in vivo* by the developed effect compartment model.

한 receptor 결합을 통해 약물동태와 작용을 연결하는 시도가 시작되고 있습니다. 본 강연의 마지막으로 우리들의 이러한 연구를 소개하고자 합니다.

Fig. 30은 diazepam의 동태와 항경련작용의 receptor 결합을 통해 관련지는 연구결과를 보인 것입니다¹⁷⁾. 左圖는 diazepam의 腦內 농도와 그 항경련작용의 관계를 보인 것으로서 이것이 종래부터의 용량-작용곡선에 상당하는 것입니다. 右圖는 항경련작용과 腦內 diazepam receptor 점유율의 경시적 추이가 거의 평행함을 보인 것입니다.

Fig. 31은 강심배당체 ouabain의 동태와 心筋수축력증가작용의 관계를 연구한 결과를 보인 것입니다. ouabain을 토끼에게 infusion속도를 변화시키면서 투여한 후 心臟수축압의 시간변화 dP/dt 를 측정합니다. 이같이 하여 얻은 혈장 ouabain 농도와 작용곡선은 여기에 보이듯이 현저한 infusion속도 의존성을 보이고 있습니다. 즉, 소용량씩을 주입하고, 시간을 들여 혈중농도를 상승시키면 낮은 농도에서 효과가 출현하며, 대용량의 주입으로 단시간에 혈중농도를 상승시키면 효과의 출현에는 높은 농도를 필요로 합니다. 이 사실은 작용의 출현에는 상당한 시간이 걸림을 나타내고 있습니다.

Fig. 32는 ouabain의 心筋 homogenate를 사용한 Na^+ , K^+ ATPase과 ouabain의 결합의 Scatchard plot을 보인 것입니다.

Fig. 33은 적출한 토끼의 심장관류시험, 즉, Langendorff의 심장을 이용하여 관류액 중의 ouabain 농도와 약물농도의 관계를 측정하는 것입니

다.

Fig. 34에는 모델에 의해 계산한 각 infusion속도에 있어서의 약물작용발현의 시간 추이의 계산치인 실선과 측정치를 보이고 있습니다.

이상 東京大学 제제학교실에서 진행중의 약물동태의 분자적 기구에 관한 연구중에서 전신계 또는 조직계에서의 약물동태를 취급한 것을 소개하였습니다. 또한 약물동태의 연구에는 각 연구자가 각 부분을 담당하여 전체로써 파라밋형의 협력에 의해 달성하는 것과도 다르고, 또한 개인의 독창력만에 의한 개인적인 연구와도 다른 협동연구체제가 필요합니다. 생화학, 약리학, 생리·해부학 및 동태학등의 넓은 지식으로부터의 동태의 이해를 각각 합쳐서, 실험수법을 습득하여, 컴퓨터를 충분히 이용하는 각인의 특기를 서로 이용하는 것이 중요합니다.

약물동태학의 연구는 물론 내가 여기에 소개드린 것이 전형은 물론 모범이라고 말할 수도 없습니다. 이 학문이 앞으로 어떻게 전개되어 나갈 것인가는 젊은 연구자의 어깨에 짊어지어져 있는 것임을 말씀드리는 것으로 강연을 끝맺고자 합니다.

문 헌

- 1) J.H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu and M. Hanano, Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained *in vitro* as well as physiological data, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**(6), 649-661 (1982)
- 2) J.H. Lin, Y. Sugiyama, M. Hanano and S.

- Awazu, Effect of product inhibition on elimination kinetics of ethoxybenzamide in rabbits. analysis by physiological pharmacokinetic model, *Drug Metab. Dispos.*, **12**(2), 253-256 (1984)
- 3) O. Sugita, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano, Prediction of drug-drug interaction from *in vitro* plasma protein binding and metabolism. A study of tolbutamide-sulfonamide interaction in rats, *Biochem. Pharmacol.*, **30**(24), 3347-3354 (1981)
 - 4) O. Sugita, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano, Kinetic analysis of tolbutamide-sulfonamide interaction in rabbits based on clearance concept. Prediction of species difference from *in vitro* plasma protein binding and metabolism, *Drug Metab. Dispos.*, **12**(1), 131-138 (1984)
 - 5) T.H. Lin, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano, Effect of phenobabitone on the distribution and elimination of imipramine in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 735-738 (1985)
 - 6) Y. Sugiyama, Y. Suzuki, Y. Sawada, S. Kawasaki, T. Beppu, T. Iga and M. Hanano, Auramin O as a fluorescent probe for the binding of basic drugs to human α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AG). The Development of a simple fluorometric method for the determination of α_1 -AG in human serum, *Biochem. Pharmacol.*, **34**(6), 821-829 (1985)
 - 7) Y. Sawada, M. Hanano, Y. Sugiyama and T. Iga, Prediction of the disposition of β -lactam antibiotics in humans from pharmacokinetics parameters in animals, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **12**(3), 241-261 (1984)
 - 8) T. Terasaki, T. Iga, Y. Sugiyama and M. Hanano, Pharmacokinetic study on the mechanism of tissue distribution of doxorubicin: Interorgan and interspecies variation of tissue-to-plasma partition coefficients in rats, rabbits, and guinea pigs, *J. Pharm. Sci.*, **73**(10), 1359-1363 (1984)
 - 9) T. Yoshikawa, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga and M. Hanano, Effect of pregnancy on tissue distribution of salicylate in rats, *Drug Metab. Dispos.*, **12**(4), 500-505 (1984)
 - 10) T. Yoshikawa, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga and M. Hanano, Hepatic extraction of endogenous inhibitors of drug binding to serum protein in the pregnant rat, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2733-2739 (1985)
 - 11) K. Morita, Y. Sugiyama and M. Hanano, Pharmacokinetic study of 4-methylumbelliferone in rats: Influence of dose on its first-pass hepatic elimination, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 117-124 (1986)
 - 12) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga, M. Hanano and K. Morita, Kinetics of hepatic transport of 4-methylumbelliferone in rats: Analysis by multiple indicator dilution method, *J. pharmacobio-Dyn.*, **8**, 0-128 (1985) [Proceeding].
 - 13) S.C. Tsao, Y. Sugiyama, Y. Sawada, S. Nagase, T. Iga and M. Hanano, Effect of albumin on hepatic uptake of warfarin in normal and analbuminemic mutant rats, Analysis by multiple indicator dilution method, *J. Pharmacokin. Biopharm.* (1986), in press.
 - 14) N. Itoh, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano, Kinetic analysis of rat renal tubular transport based on multiple-indicator dilution method, *Am. J. Physiol.* (1986), in press.
 - 15) H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano, Saturable transport of cimetidine from cerebrospinal fluid to blood in rats, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **88**, 73-76 (1985)
 - 16) H. Sato, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga and M. Hanano, Pharmacokinetic study of exogenously administered β -endorphine using a rapid radioreceptor assay in rats, *Life Sciences*, **35**, 1051-1059 (1984)
 - 17) Y. Igari, Y. Sugiyama, Y. Sawada, T. Iga and M. Hanano, Kinetics of receptor occupation and anticonvulsive effects of diazepam in rats, *Drug Metab. Disp.*, **13**, 102-106 (1985)