平成 24 年 4 月社名変更(平成 4 年 1 月作成)
テバ製薬株式会社
研究開発本部

クラウナート錠の薬理作用

緒言

スルフォニルウレア系の経口糖尿病治療薬であるグリクラジドの薬効薬理作用として血糖降下作用および血小板凝集抑制作用を他剤と比較検討し、また、単回投与毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

実験材料

1. 使用薬物

被検薬としてグリクラジドを、また、比較対照薬としてトルブタミドを用い、経口投与の場合いずれも 0.5%メチルセルロース（MC）溶液に懸濁し、静脈内投与の場合は、本薬物とほぼ等モルの KOH で溶解し、所要用量を調製して使用した。

血小板凝集反応には、本薬物を生理食塩液に溶解・希釈し、所要濃度を調製して使用した。

2. 使用動物

4 週齢の ICR 系雌雄性マウス、6 週齢の Wistar 系雌雄性ラット（日本エスエルシー㈱）および日本白色種雄性ウサギ（ケアリー中部）を購入後、室温 22±1℃、湿度 55±10%、照明時間 8：00～20：00 の飼育室で、約 1 週間以上予備飼育した後、実験に使用した。

実験方法

1. 血糖降下作用

グリクラジドの 3、10、30mg/kg、トルブタミドの 30、100、300mg/kg を 1 群 8 例のラットに経口投与し、投与前および投与 1、3、6 および 10 時間後に眼窩静脈叢より採血した。採取した血液を遠心分離し、得られた血清について自動生化分析装置（モノカード、アムコ㈱）により血糖を測定した。薬物投与前の血清値を 100 とし、投与後の血糖値の変化率として表した。

2. 血小板凝集抑制作用

体重 2～3kg のウサギ耳介静脈から 1/10 容の 3.2%クエン酸ナトリウム入り採血管に採血後、150g、10 分間、室温で遠心分離し、その上清を分取して多血小板血漿（PRP ： platelet rich plasma）を得た。さらに、1500g、10 分間、室温で遠心分離することにより、乏血小板血漿（PPP ： platelet poor plasma）を得た。

血小板凝集は、Born らの方法に準じ、PRP（＞1×10^9 個/mL）450 μL と薬物 50 μL を 37℃、1200rpm 撹拌下、2 分後に凝集剤である ADP（クロノ・ADP、バクスター㈱）5 μL（終濃度 5 M）またはコラーゲン（クロノ・コラーゲン、バクスター㈱）5 μL（終濃度 5 μL/mL）を添加し、アグリゴメーター（C-550、CHRONO-LOG 社）を用いて血小板凝集能を測定した。抑制率は、凝集曲線における最大凝集時の吸光度変化を対照群に比較して求め、さらに 50%抑制濃度（IC_{50}）値を算出した。

3.　単回投与毒性試験

投与経路は経口および静脈内投与の 2 経路とした。

グリクラジドの投与容積はマウスでは体重 10g 当り経口投与で 0.2mL、静脈内投与で 0.1mL、ラットでは体重 100g あたり経口投与で 1.0mL、静脈内投与で 0.5mL となるようにそれぞれ調製した。また、静脈内投与時では全量を約 1～1.5 分かけて投与した。

18 時間絶食した雌雄性マウス 10 匹およびラット 5 匹を 1 群とし、グリクラジド投与後 2 週間、毎日一般症状および死亡状況を観察した。死亡例はその都度可及的速やかに剖検し、生存例は観察期間の終了日にエーテル麻酔下で放血致死させた後剖検した。また、LD_{50} 値は実験終了時における各群の死亡率に基づいて Litchfield-Wilcoxon 法により算出した。

4.　統計学的処理

コントロール群と薬物投与群の各パラメーターについて、F 検定を $p<0.05$ で行い、両群が等分散の場合は Student の t 検定を用い、不等分散の場合は Cochran-Cox 検定を用いて有意差検定を行った。

実験結果

1.　血糖降下作用

グリクラジドおよびトルブタミドの正常ラットにおける血糖低下作用を表 1 および Fig.1 に示した。

グリクラジドは 3mg/kg 以上で用量に依存した著明な血糖降下作用を示し、その最大降下作用時間は投与 3 時間後であった。投与 3 時間後の血糖値は 3、10 および 30mg/kg でそれぞれ投与前血糖値の 63.3%、53.1%および 47.1%まで低下した。3 および 10mg/kg 投与群の血糖値は 10 時間後で投与前血糖値まで回復したが、30mg/kg 投与群では 10 時間後においても作用の持続が認められた。

一方、トルブタミドは、グリクラジドと同様に血糖効果作用を示し、その最大降下作用時間は投与 3 時間後であった。投与 3 時間後の血糖値は 30、100、300mg/kg でそれぞれ投与前血糖値の 78.5%、53.6%および 52.7%まで低下した。10 時間後にはいずれの濃度においても投与前血糖値まで回復した。

回帰直線より求めたグリクラジドおよびトルブタミドの ED_{30} 値はそれぞれ 1.1mg/kg および 44mg/kg であり、グリクラジドの効力はトルブタミドの約 40 倍であった。

表１　グリクラジドおよびトルブタミドのラットにおける血糖降下作用

薬物	用量 (mg/kg, p.o.)	例数	血糖値（投与前値に対する変化率%、平均±標準誤差） 投与時間 1	3	6	10
コントロール	—	8	95.9±1.8	101.5±1.9	104.6±3.0	99.8±1.4
グリクラシド	3	8	81.7±4.0**	63.3±3.1*** (37.6)	85.0±4.2**	104.8±3.6
	10	8	62.4±3.0***	53.1±2.6*** (47.7)	72.9±4.3***	99.0±4.7
	30	8	56.7±3.2***	47.1±1.6*** (53.6)	53.7±1.7***	63.9±4.0***
トルブタミド	30	8	84.5±2.5**	78.5±3.0*** (22.7)	81.0±2.4***	97.6±2.9
	100	8	79.9±1.9**	53.6±2.0*** (47.2)	70.7±2.9***	98.5±4.3
	300	8	76.0±3.0***	52.7±2.7*** (48.1)	66.6±3.1***	90.3±4.8

p＜0.01、*p＜0.001：対コントロール群

（　）内の数値は投与後３時間目のコントロール群に対する血糖低下率（%）

2.　血小板凝集抑制作用

ADP およびコラーゲンによる血小板凝集に対するグリクラジドの抑制作用を表２および Fig.2 に示した。

ADP 凝集に対してグリクラジドの 5×10^{-4}M から用量依存的な抑制を示し、IC_{50} 値は 2.3×10^{-3}M であった。

一方、コラーゲン凝集に対してはグリクラジドの 3×10^{-4}M から用量依存的な抑制を示し、IC_{50} 値は 7.5×10^{-4}M であった。

表２　グリクラジドのウサギ PRP における血小板凝集抑制作用

凝集惹起物質	グリクラジドの凝集抑制率（%） 3×10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-2}M	IC_{50} 値（M）
ADP（5μM）	—	5.6 ±2.7	16.2 ±2.6	66.1 ±5.5	84.5 ±8.5	90.6 ±6.7	2.3×10^{-3}
コラーゲン (5μg/mL)	11.6 ±2.1	25.4 ±3.2	74.3 ±8.4	92.1 ±4.5	—	—	7.5×10^{-4}

3.　単回投与毒性試験

1）　LD_{50} 値

マウスおよびラットの各実験における投与量、死亡推移および LD_{50} 値を表３に示した。

LD_{50} 値はマウスおよびラット経口投与で雌雄とも 5000mg/kg 以上、静脈内投与でマウスの場合雄 300（274～329）mg/kg、雌 317（269～372）mg/kg およびラットの場合雄 368（315～431）mg/kg、雌 398（301～527）mg/kg であった。

2)　一般症状観察

マウス経口投与の場合雌雄とも 5000mg/kg では一般症状に異常は認められなかった。

静脈内投与では死亡する例において、雌雄とも投与直後より伏臥姿勢を呈し、1～2 分後に強直性痙攣、眼球突出が見られ、5～10 分以内にほとんどの例が死亡した。生存例においては、投与直後より伏臥姿勢を示し、1～2 時間持続したが、以後徐々に回復した。

ラット経口投与の場合、雌雄とも 5000mg/kg で投与 1 日目よりほぼ全例に流涎、血涙、静穏、体重減少がみられ、死亡する例では投与後 2 日目に口腔および鼻腔より同様の泡沫液の排出が認められた。その他の例では投与 2～3 日目から徐々に回復を示した。
静脈内投与では雌雄ともマウスと同様の死亡経過および回復経過を示した。

3)　剖検所見

マウス経口投与において雌雄とも 5000mg/kg で異常は認められなかった。

静脈内投与において死亡例では雌雄とも肺のうっ血、血涙がほぼ全例にみられたが、生存例では異常は認められなかった。

ラット経口投与の場合、死亡例では肺うっ血、胃粘膜の出血がほぼ全例に認められたが、生存例では異常は認められなかった。

静脈内投与において死亡例では雌雄とも肺のうっ血が認められたが、生存例では特記すべき異常は認められなかった。

表３　グリクラジドのマウスおよびラットにおける単回投与毒性試験

動物種	投与経路	性	用量 (mg/kg)	例数	死亡推移（日）								死亡率 (%)	LD_{50}値 (mg/kg) [95% C.L.]
					0	1	2	3	4	5	6	7-14		
マウス	経口	雄	5000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	＞5000
		雌	5000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	＞5000
	静脈内	雄	200	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	300 [274～329]
			240	10	1	0	0	0	0	0	0	0	10	
			288	10	4	0	0	0	0	0	0	0	40	
			346	10	8	0	0	0	0	0	0	0	80	
			415	10	10	0	0	0	0	0	0	0	100	
		雌	200	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	317 [269～372]
			240	10	2	0	0	0	0	0	0	0	20	
			288	10	4	0	0	0	0	0	0	0	40	
			346	10	6	0	0	0	0	0	0	0	60	
			415	10	10	0	0	0	0	0	0	0	100	
ラット	経口	雄	5000	5	1	1	0	0	0	0	0	0	40	＞5000
		雌	5000	5	2	0	0	0	0	0	0	0	40	＞5000
	静脈内	雄	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	368 [315～431]
			300	5	1	0	0	0	0	0	0	0	20	
			360	5	2	0	0	0	0	0	0	0	40	
			432	5	4	0	0	0	0	0	0	0	80	
			518	5	5	0	0	0	0	0	0	0	100	
		雌	250	5	1	0	0	0	0	0	0	0	20	398 [301～527]
			300	5	1	0	0	0	0	0	0	0	20	
			360	5	2	0	0	0	0	0	0	0	40	
			432	5	3	0	0	0	0	0	0	0	60	
			518	5	5	0	0	0	0	0	0	0	100	

[95%　C.L.]：95%信頼限界

総括

スルフォニルウレア系の経口血糖値降下剤グリクラジドの薬理作用として血糖降下作用および血小板凝集抑制作用を、また単回投与毒性試験について検討した。

血糖降下作用では、グリクラジドおよび対照薬であるトルブタミドの ED_{30} 値はラットでそれぞれ 1.1mg/kg および 44mg/kg であり、グリクラジドの効力はトルブタミドの約 40 倍と強い作用が認められた。

また、グリクラジドは ADP およびコラーゲンによる血小板凝集反応に対して抑制効果を有することが認められたことから、糖尿病性血管障害の進行抑制が期待される薬物である。

単回投与毒性試験において、経口投与時の LD_{50} 値はマウスおよびラットの雌雄とも 5000mg/kg 以上、静脈内投与時ではマウス雄で 300mg/kg および雌で 317mg/kg、ラット雄で 368mg/kg および雌 398mg/kg を示し、種差および性差は特に認められなかった。また、本薬物の経口投与で 30%血糖降下作用を示す用量はラットで 1.1mg/kg であることから、本薬物の安全域は高いと思われた。中毒症状について経口投与でマウスに投与可能限界量の 5000mg/kg を投与しても何ら異常は認められなかったが、ラットでは雌雄とも 5 例中 2 例が死亡した。また、静脈内投与ではマウスおよびラットとも死亡例で強直性痙攣、眼球突出がみられ 10 分以内に死亡した。剖検所見ではラットの経口投与での死亡例で肺うっ血、胃粘膜の出血がみられたのみであり、その他特に異常は認められなかった。

以上より、グリクラジドは類薬のトルブタミドよりも強い血糖降下作用を有すると同時に、血小板凝集を抑制する作用を併せ持ち、かつ安全域が高い薬物であることが明らかとなった。

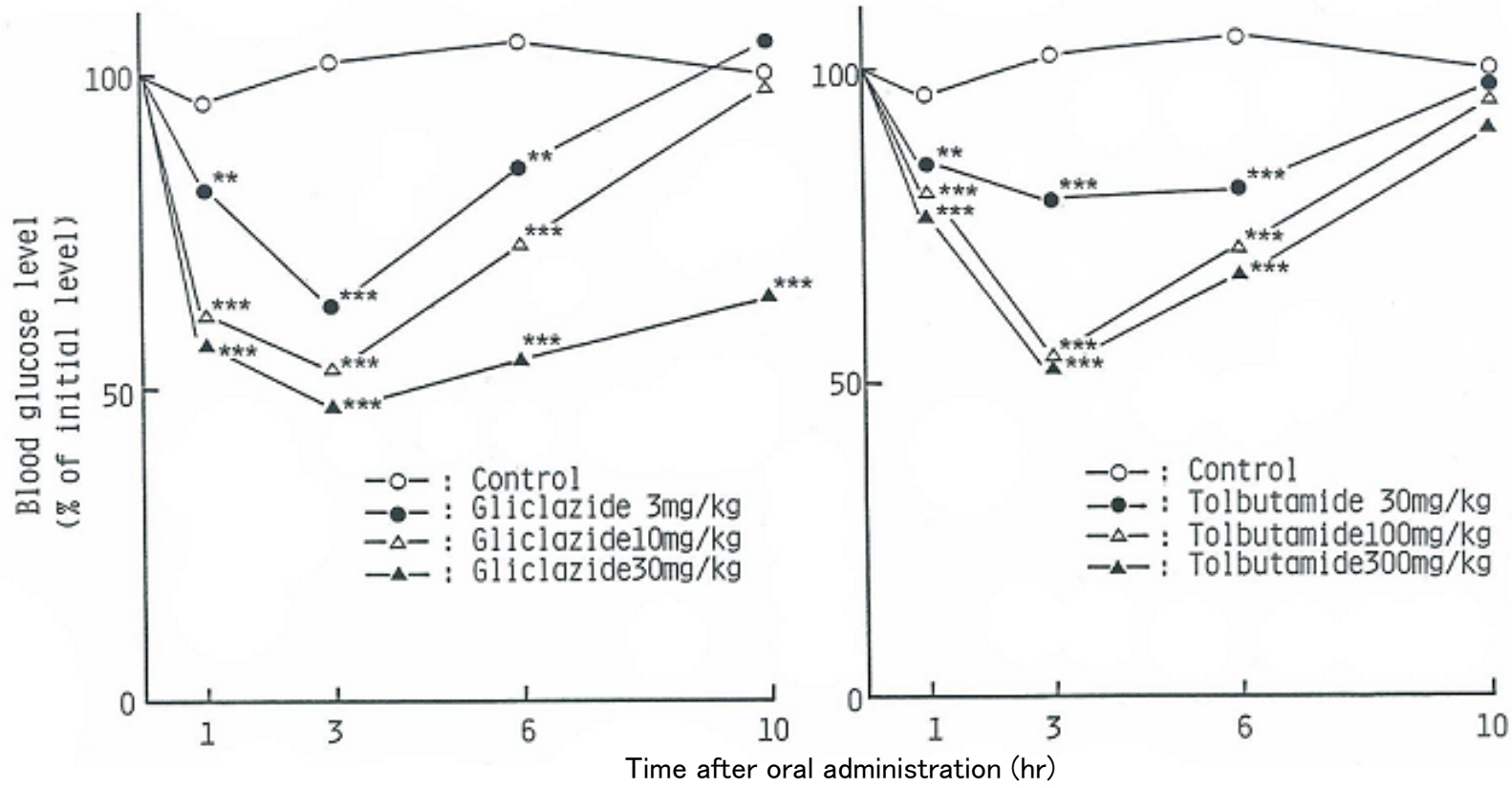

Fig.1　ラットにおけるグリクラジドおよびトルブタミドの血糖降下作用

各ポイントにつき１群８匹（雄）の平均値、**p＜0.01、***p＜0.001　対コントロール