

生体リズムを基盤にした新規時間治療法の開発に関する基礎的研究

大戸 茂弘

Development of New Chronopharmacotherapies Based on Biological Rhythm

Shigehiro OHDO

Clinical Pharmacokinetics, Division of Clinical Pharmacy, Department of Medico-Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received August 12, 2002)

The mammalian circadian pacemaker resides in the paired suprachiasmatic nuclei (SCN). Clock genes are the genes that control the circadian rhythms of physiology and behavior. The effectiveness and toxicity of many drugs vary depending on dosing time associated with 24-h rhythms of biochemical, physiological, and behavioral processes under the control of the circadian clock. However, many drugs are still administered without regard to the time of day. Identification of a rhythmic marker for selecting dosing time will lead to improved progress and diffusion of chronopharmacotherapy. The monitoring of rhythmic markers may be useful in choosing the most appropriate time of day for administration of drugs and may increase their therapeutic effects and/or reduce their side effects. On the other hand, several drugs can cause alterations in 24-h rhythms, leading to illness and altered homeostatic regulation. Here, we show the disruptive effect of interferon on the rhythm of locomotor activity, body temperature, and clock gene mRNA expression in the periphery and SCN. The alteration of the clock function, a new concept of adverse effects, can be overcome by devising a dosing schedule that minimizes adverse drug effects on clock function. Furthermore, to produce new rhythmicity by manipulating the conditions of living organs using rhythmic administration of altered feeding schedules or several drugs appears to lead to the new concept of chronopharmacotherapy. One approach to increasing the efficiency of pharmacotherapy is administering drugs at times during which they are best effective and/or tolerated.

Key words—circadian rhythm; clock genes; chronopharmacology; chronopharmacokinetics; chronopharmacotherapy

はじめに

近年、医薬品適正使用の向上を目指し、薬物治療の個別化を指向した研究が活発に行われている。これまで薬物動態の個体差に関する研究は、薬物濃度に着目した研究が中心であった。しかしながら、分子生物学的手法の急速な発展により個体間の変動に着目した遺伝子診断や薬物代謝酵素の多型性に関する研究が活発に行われ、薬物動態の個体差に着目した投薬設計は確立されつつある。また二十一世紀は薬物治療のテーラーメイドの時代に突入するものと思われる。したがって、医薬品適正使用のさらなる

充実を図るには、個体間変動のみならず個体内変動に着目した研究の充実は必至である。こうした状況の中で、投薬時刻により薬の効き方が大きく異なることが分かってきた（時間薬理学：Chronopharmacology）。¹⁻³⁾ また薬の効き方を決定する薬の体内での動き方や薬に対する生体の感じ方も生体リズムの影響を受ける。最近では、医薬品の添付文書などに服薬時刻が明示されるようになってきた。

現在、疾患症状や生体機能に日周リズムが存在するため添付文書などに至適投薬時刻が記載されている代表的医薬品として降圧薬、高脂血症治療薬、気管支喘息治療薬、副腎皮質ホルモン、利尿薬、消化性潰瘍治療薬、睡眠薬などがある。しかしながら、抗腫瘍薬を含むその他の薬物に関しては治療に応用されるに至っていない。その理由として薬効や薬物動態の日周リズムの制御機構が明らかにされていない

九州大学大学院薬学研究院医療薬科学専攻臨床薬学講座薬物動態学分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）
e-mail: ohdo@phar.kyushu-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

果, PER 蛋白質量が減少し CLOCK/BMAL1 による Per 遺伝子の転写が再び活性化される。

遺伝子産物の活性が概日リズムを示す遺伝子, いわゆる時計調節遺伝子 (clock-controlled gene, CCG) とその産物はフィードバックループの外にあるため, 時計振動機構には影響しない。^{14,15)} SCN のバソプレッシン遺伝子は Per 同様に明期にピークを示す。この遺伝子の転写は CLOCK/BMAL1 によって活性化され, PER1-3/TIM によって抑制される。すなわち出力系の遺伝子のいくつかは直接時計遺伝子の支配下にある。時計遺伝子は SCN 以外の他の臓器でも発現しており, SCN に比べ位相が遅れている。このことは SCN が中心時計として働き, 他の部位に発現している時計遺伝子はローカル時計として働き, SCN から何らかの情報 (ホルモン, 神経機能) が他の臓器の機能をコントロールしていると考えられる。¹⁷⁻¹⁹⁾

マウスを恒暗条件下に飼育すると概日リズムを示す状態になる。²⁰⁾ その後, 主観的暗期 (恒暗条件にする前の明暗条件下の暗期に相当) の始まりに光照射を行うと体内時計の位相は後退し, 主観的暗期の終わりに照射すると前進する。一方, 主観的明期に

光照射しても位相の変化はみられない。ヒトの場合, 体内時計の発振周期は 24 時間より長く, 夜明け前の光照射が体内時計の位相を前進させ, 我々は 24 時間周期に同調して生活できる。光は網膜から SCN へ至る視神経の神経伝達物質を介して Per1 及び Per2 遺伝子上流配列に存在する光応答配列に働き, それらの転写を促進する。光による Per1 遺伝子発現の誘導量は, 行動の位相変化量の光強度依存性と関連がある。

2. 時間薬理学

2-1. 生体リズムと疾患

起床時に副腎皮質ホルモン (コルチゾール) の急激な上昇により, 我々は眠りからさめて行動できるように身体の体制が準備される。引き続き交感神経の活動が活発になり, 眠りに付く頃には副交感神経の活動が活発になる。またホルモン分泌や神経活動の日周リズムと関連して様々な疾患に日周リズムが認められる (Figs. 2, 3)。²¹⁾ 例えば, 高血圧症患者では, 一日の中で血圧が最高に達する夕方頃に高血圧症状を示す。血圧の日周リズムとも関連して, クモ膜下出血や脳梗塞の発症頻度は, 時間により大きく変化する。コレステロールの生合成は夜間に高まる。喘息発作による呼

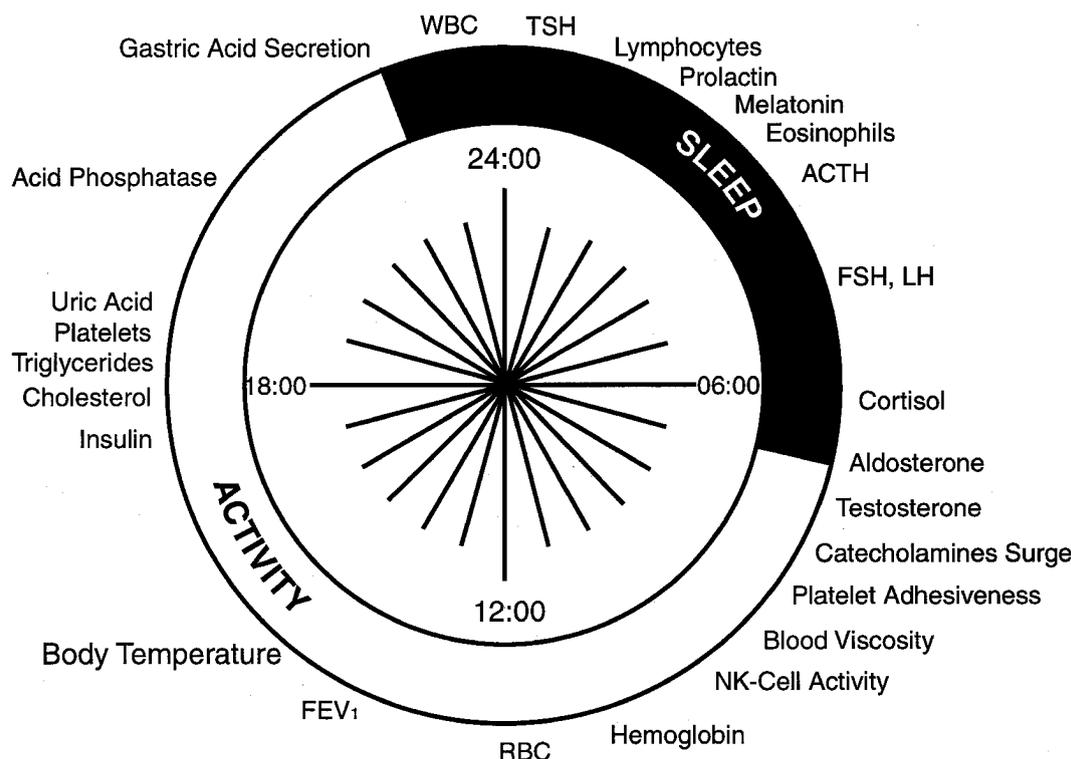


Fig. 2. Display in the Form of a 24-hr Clock Diagram of the Approximate Time, in Human Following the Diurnal Activity/Nocturnal Sleep, when Physiological or Biochemical Function Shows a Peak^{1,21)}

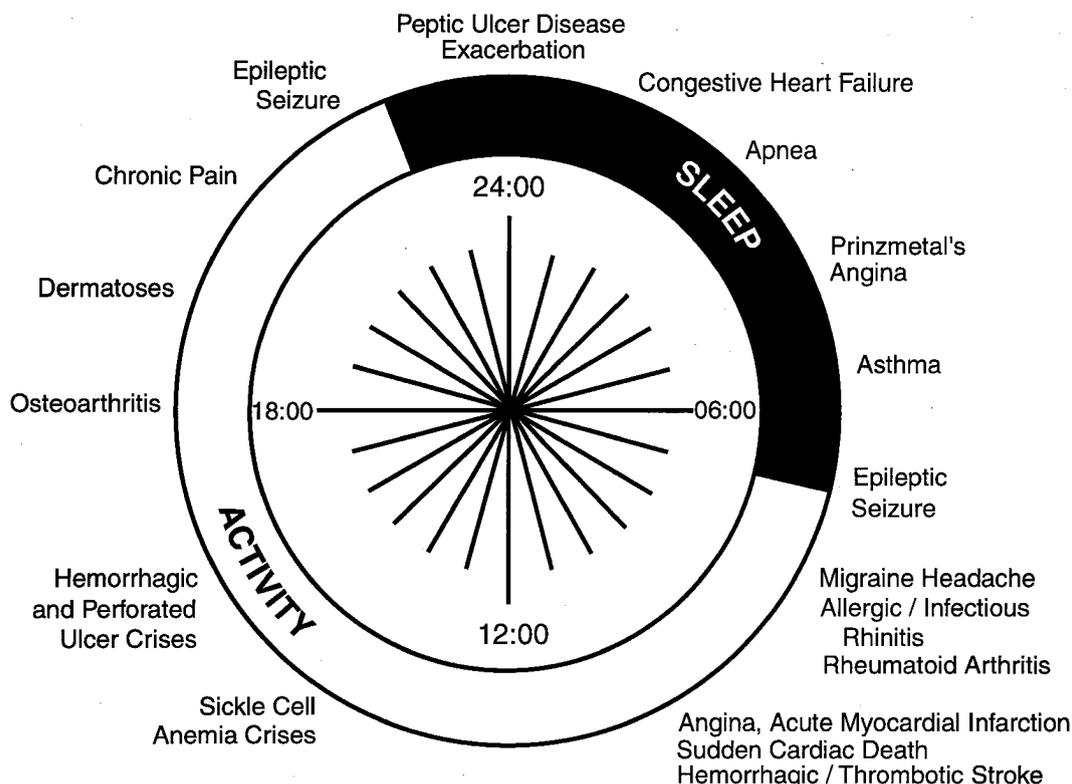


Fig. 3. Display in the Form of a 24-hr Clock Diagram of the Approximate Time, in Human Following the Diurnal Activity/Nocturnal Sleep Routine, when Symptoms or Events of Diseases are Worst or Most Frequent^{1,21)}

吸困難の増加及び最大気流量の低下は深夜に起こる。消化性潰瘍時の胃酸分泌増加は夜間に起こる。歯などの痛みは夜間から早朝に発現する。以上のように喘息、高血圧、高脂血症、内分泌疾患などでは、症状が悪化する時間帯が決まっており、投薬タイミングを設定することが比較的容易である。一方、病型が多岐にわたり一律に疾患症状の日周リズムを規定できない場合もある。しかしながら、睡眠・覚醒のサイクル、自律神経機能、ホルモン分泌機能、免疫機能など多くの生体機能に日周リズムが認められる。この点を考慮すると、現時点で時間治療の必要性が注目されていない疾患に関しても日周リズムの所見を病型ごとに整理し体系化することにより、時間治療の対象となり得る可能性がある。また、睡眠障害などのいわゆる生体リズム障害は、生体リズムが変容していることが問題となる。

2-2. 生体リズムと薬効 疾患症状や生体機能に日周リズムが存在するため添付文書などに至適投薬時刻が記載されている代表的医薬品として気管支喘息治療薬、降圧薬、高脂血症治療薬、副腎皮質ホルモン、利尿薬、消化性潰瘍治療薬、睡眠薬などが

ある。一方で、疾患症状の日周リズムの存在の有無にかかわらず多くの薬物の効果、副作用及び薬物動態が、投薬時刻により異なることが知られている。その機序としてレセプター機能、神経伝達物質などの生体の感受性や吸収、分布、代謝、排泄などの薬物動態の日周リズムが関与している。

Figure 4は、喘息患者を対象にテオフィリンの最大気流量上昇作用及び薬物動態に及ぼす投薬時刻の影響を示す。²²⁾ 08:00時投与では夜間に血中濃度が下降し、夜間における気流量の低下に対し効果が認められない。一方、20:00時投与では夜間の血中濃度を高く維持することができ、夜間における気流量の上昇が可能となる。夜間に気流量の低下や喘息発作による呼吸困難の頻度が高まる機序として、夜間に交感神経機能の低下、コーチゾール濃度の低下、ヒスタミン濃度の上昇などがあげられる。

プロプラノロールの心拍数減少作用及び薬物濃度ともに投薬時刻による有意な差異が認められる。²³⁾ プロプラノロールの血中濃度は、08:00投与時に最高値を示し、薬効の時間的変化と対応している。高脂血症治療薬のHMG-CoA還元酵素阻害剤(プ

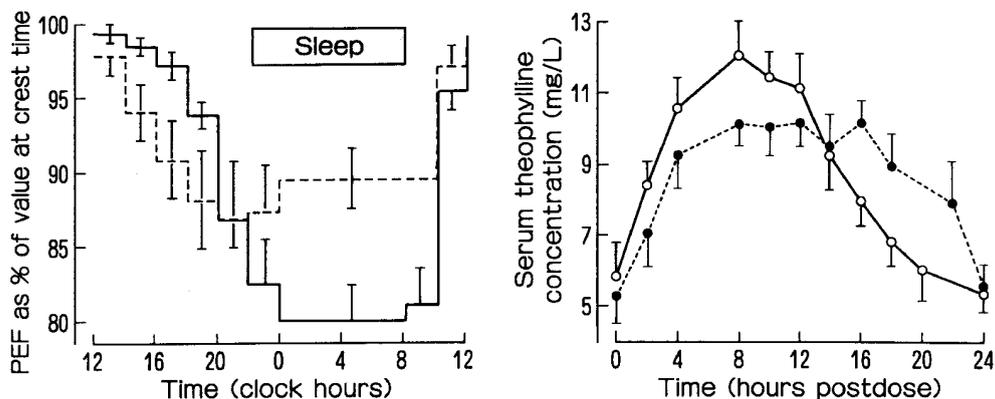


Fig. 4. Administration-Time Dependent Aspects of Theophylline Disposition in Asthmatic Patients Treated with the Drug (top)²²⁾
 Solid line: dosing at 08 : 00. Broken line: dosing at 20 : 00. Each value is the mean with SE of 8 subjects. 24-hr change in peak expiratory flow (PEF) of the 8 asthmatics treated with theophylline (bottom). Solid line: dosing at 08 : 00. Broken line: dosing at 20 : 00. Each value is the mean with SE of 8 subjects. Dosing in the evening results in a moderation in the nocturnal decline in PEF in comparison to treatment of the same patients with the same dose of drug administered at 08 : 00.

ラバスタチン, シンバスタチン) は, コレステロール生合成の律速段階を司る酵素を阻害して, 血清総コレステロール濃度を低下させる. また, 肝における低比重リポ蛋白質 (LDL) レセプター活性亢進を誘導させ, LDL-コレステロール代謝を促進させる. コレステロールは夜間に合成が高まる. それと関連して夕方投与する方が血清コレステロール低下作用が強い.²⁴⁾

以上の薬物の他に副腎皮質ホルモン, 向精神薬, 解熱鎮痛薬, 免疫抑制薬, 局所麻酔薬, 抗潰瘍薬及び抗腫瘍薬など多くの薬物で時間薬理的所見が報告されている.

2-3. 生体リズムと薬物動態 薬物動態の日周リズムは, 吸収, 分布, 代謝, 排泄の時間的変化により生じる. 各過程は, Fig. 5 に示すように生理機能の日周リズムにより制御されている.²⁵⁾

経口投与時の薬物吸収過程は, 薬の物理化学的性質, 生体膜の面積と構造, 胃内通過時間及び消化管の pH, 運動及び血流量などの要因により支配されている. これらの要因には日周リズムが認められ, 薬物吸収リズムの機序であると考えられる. 薬物は血中蛋白 (アルブミンやグロブリン) と結合するため, 血中蛋白濃度や薬物蛋白結合率に影響を及ぼす血中遊離脂肪酸などの生体内物質の日周リズムにより遊離型の薬物濃度が変動し, その結果薬物の組織への移行性が変化することが考えられる. 薬物の肝代謝は, 一般に肝酵素活性及び肝血流量により制御されている. 両者ともに日周リズムを示し, 薬物代

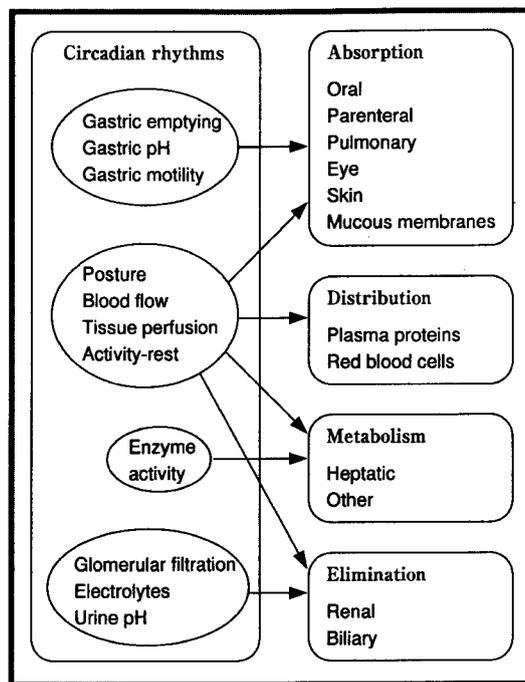


Fig. 5. 24-hr Rhythm of Physiological Variables Involved in Chronopharmacokinetic Mechanisms, i.e. Absorption, Distribution, Metabolism and Elimination²⁵⁾

謝の日周リズムの機序として考えられる. 酵素活性の日周リズムに関して, 肝臓, 腎臓, 脳などで報告されている. 最近, 遺伝子型と薬物代謝の表現型との関連が活発に研究されている. 薬物代謝の表現型から評価して, 代謝が亢進している群と低下している群の2群間で, デブリソキンの代謝能が昼間低下することが明らかにされている.²⁶⁾ このように, 遺伝子型毎に薬物代謝能の日周リズムを比較検討する

ことにより、個体間変動を減少させ、個体内変動をより正確に評価できるものと考えられる。多くの薬物が腎臓を介して排泄される。糸球体ろ過、腎血流量、尿の pH 及び尿細管の再吸収は、活動期に高まる有意な日周リズムを示す。これが主として腎から未変化体として排泄される親水性薬物の排泄の日周リズムの機序と考えられる。

3. 薬物活性日周リズムの機序解明と生体リズムマーカーの探索

多くの薬物の薬効や薬物動態に日周リズムが存在する。しかし、これまで薬物治療において投薬タイミングに関する明確な指針は確立されていない。その理由として、何を指標に投薬タイミングを設定すべきかが明確にされていない点があげられる。生体リズムマーカーをモニタリングすることにより、個々の生体リズムの中で投薬タイミングに関する情報を体系化していくことが重要となる。これにより個々の生体リズムにマッチした投薬設計が構築でき、治療の個別化が可能となる。

3-1. 抗腫瘍薬 一般に抗腫瘍薬の効果は、薬物動態、薬力学及び癌細胞の感受性により規定される。また感受性は、癌細胞の増殖状態、細胞周期によって異なることが知られている。一方、抗腫瘍薬の薬物治療において、癌細胞に対し抗腫瘍効果を最

大にする点と正常細胞に対し毒性を最小にする点が重要である。抗腫瘍薬の共通した副作用として骨髄抑制があり、その他頻度の高い副作用として消化管障害がある。すなわち、活発に増殖を繰り返している骨髄細胞や消化管細胞は抗腫瘍薬による副作用の標的臓器となりうる。健康人の骨髄細胞の DNA 合成能には、活動期に高値を、休息期に低値を示す有意な日周リズムが認められる。²⁷⁻²⁹⁾ 同様の所見は、直腸粘膜細胞でも認められる。一方、癌細胞の DNA 合成能にも日周リズムが認められる。すなわち、生体内では抗腫瘍薬に対する細胞の感受性が時間と共に変化していることが推察される。生体の感受性の側面から細胞動態（細胞周期や標的酵素の動き）の日周リズムが、正常細胞と癌細胞との間で同じか異なるか（リズムの位相が同じか異なるか）が重要である（Fig. 6）。位相が異なる場合は正常細胞の感受性が低く、癌細胞の感受性が高い時刻に投薬することが望ましい。位相が同じ場合は、薬物を用い細胞動態を制御することにより細胞種間に位相の差異を見出すことも可能である。一般に mRNA の発現は S 期の直前あるいは前半に高まり、その後 DNA 合成と共にタンパク合成能が高まる。期特異性薬剤の作用機序としては、DNA、RNA 及びタンパク合成阻害や紡錘系形成阻害など

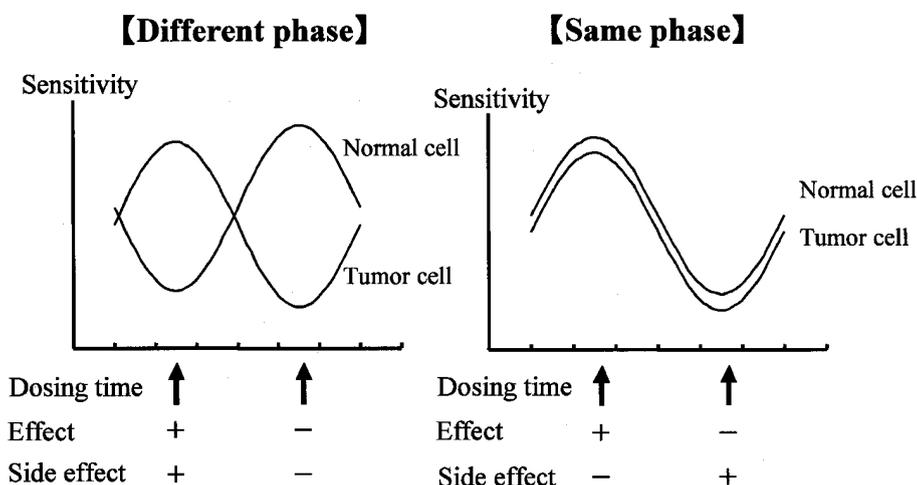


Fig. 6. Strategy of Cancer Chemotherapy Following Dosing Time Associated with Rhythmic Pattern of Drug Sensitivity to Tumor Cells or Normal Cells

The maximization of the antitumor effect to tumor cells and the minimization of the toxicity to normal cells are important in cancer chemotherapy because antitumor drugs can kill normal cells as well as tumor cells. One approach for increasing the efficiency is administration of highly toxic drugs when they are best effective and/or tolerated. The use of a chronopharmacological strategy can improve tumor response to treatment and overall survival rates and reduce drug toxicities. The mechanisms underlying the 24-hr rhythm of antitumor effect and cytotoxicity induced by antitumor drugs have been investigated. One of them is considered to be circadian stage-dependent change in cell cycle distribution. For cell cycle phase-specific antitumor drugs, there is suitable timing for drug administration depending on cell kinetics. When a phase of cell cycle is different between tumor cells and normal cells, the dosing time is determined easily (left side). When a phase of cell cycle is not different between tumor cells and normal cells, the dosing time showing the highest effectiveness means that showing the highest toxicity (right side).

が知られており、細胞分裂の中で特定の期（S期、M期）に有効である。実際ヒト白血病細胞（HL-60）を対象に、細胞培養系でS期特異性薬剤であるメトトレキサート（MTX）の抗腫瘍効果は、S期の細胞の割合が増加する時間帯に増強し、減少する時間帯に減弱する。^{30,31} その機序として薬力学的側面より、標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の活性及びその mRNA の時間的变化が関与している。

塩酸イリノテカン（CPT-11）はI型トポイソメラーゼの選択的阻害を作用機序とする抗腫瘍薬である。しかし、強力な抗癌作用の一方で、骨髄抑制や消化器障害といった強い副作用のため、治療の中断や投与量の制限など本来の抗腫瘍効果を発揮できない状況を招く。そこで、CPT-11の抗腫瘍効果増強及び副作用軽減を目的として、CPT-11の薬効に及ぼす投薬タイミングの影響について検討した。³²

実験動物として自由摂食摂水・明暗周期〔明期（休息期）：07：00-19：00〕条件下で飼育しているマウスを使用した。09：00, 13：00, 17：00, 21：00, 01：00, 05：00の6時点のいずれかに、CPT-11（100 mg/kg, ip）を投薬後の体重減少及び白血球減少に及ぼす投薬時刻の影響について検討した。07：00, 19：00のいずれかに骨髄を採取後、I型トポイソメラーゼ活性を測定し、細胞採取時刻間で比較検討した。I型トポイソメラーゼ活性は、pUC19 supercoiled DNA を基質として超らせん型 DNA の弛緩型 DNA への変換率を測定した。また footpad に結腸癌細胞（colon26）を移植したマウスにおいて、07：00, 19：00のいずれかにCPT-11を投薬した。CPT-11の腫瘍増殖抑制効果を投薬時刻間で比較検討した。上記6時点のいずれかに、正常骨髄細胞及び腫瘍細胞を採取後、細胞動態（DNA合成能）を測定し、細胞採取時刻間で比較検討した。07：00, 19：00のいずれかにCPT-11を投薬後、経時的に採血し、CPT-11濃度及び主活性代謝物であるSN-38濃度をHPLC法で測定した。薬物動態値はモーメント解析法で算出し、投薬時刻間で比較検討した。上記6時点のいずれかに採血後、血中エステラーゼ活性を測定し、採血時刻間で比較検討した。血中エステラーゼ活性は、p-nitrophenyl acetate の脱エステル化を指標として、生成された p-nitrophenol の吸光度を測定した。CPT-11投薬後の

体重減少は、活動期後半から休息期前半の投薬で最大となり、休息期後半の投薬で最小を示す投薬時刻による有意な差異が認められた（Fig. 7）。CPT-11投薬後の白血球減少は、休息期投薬で最大となり、活動期前半投薬で最小を示す投薬時刻による有意な差異が認められた（Fig. 8）。この機序としてCPT-11の標的酵素であるI型トポイソメラーゼ活性の時間的变化が一部関与していることが示唆された。一方、footpadにcolon26を移植したマウスにおいて、CPT-11の抗腫瘍効果は、毒性が減弱する時間帯（19：00）の投薬で増強し、毒性が増強する時間帯（07：00）の投薬で減弱した。DNA合成能の日周リズムには、正常骨髄細胞と移植した腫瘍細胞との間で約12時間の位相の差（最高値を示す時刻の差）が認められた（Fig. 9）。これが効果と毒性のリズムの位相差に関与しているものと思われる。またCPT-11投薬後のCPT-11及び主活性代謝物であるSN-38の血中濃度にも投薬時刻による有意な差異が認められた。血中エステラーゼ活性には活動期に高値を示す日周リズムが認められ、これがCPT-11からSN-38への代謝の時間的变化に関与しているものと思われる。以上の結果からCPT-11の

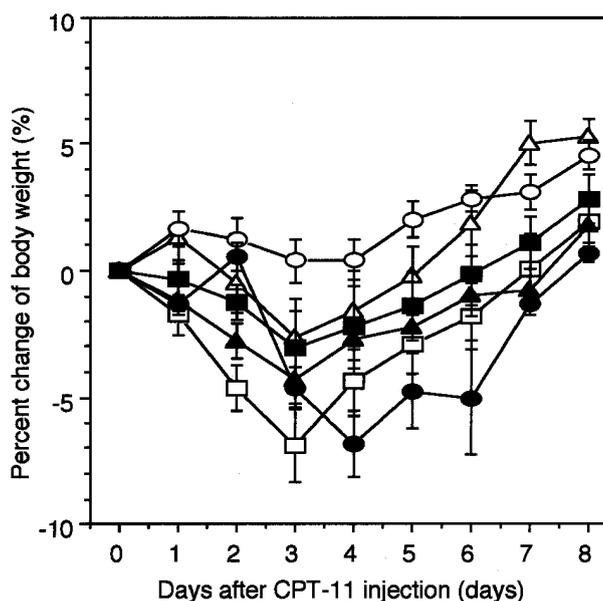


Fig. 7. Dosing Time-Dependent Change of Body Weight Change after CPT-11 (100 mg/kg, i.p.) Injection at 09：00 (□), 13：00 (△), 17：00 (○), 21：00 (■), 01：00 (▲) or 05：00 (●)³²

Body weight change was calculated as the percentage change for each mouse from the initial treatment day (day 0). Each value is the mean with SE of 10 mice. The body weight change after CPT-11 injection showed a significant dosing time-dependent difference ($p < 0.01$).

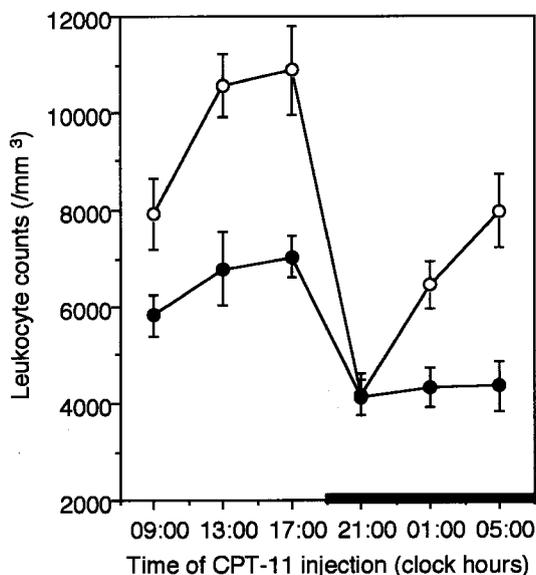


Fig. 8. 24-hr Rhythm of Leukocyte Counts in Control Mice (○) with Saline or Mice (●) on Day 3 after CPT-11 (100 mg/kg, *i.p.*) Injection at 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 or 05:00³²⁾

Each value is the mean with SE of 10 mice. A significant 24-hr rhythm dependence was demonstrated for leukocyte counts in both mice with saline and mice with CPT-11 ($p < 0.01$, respectively).

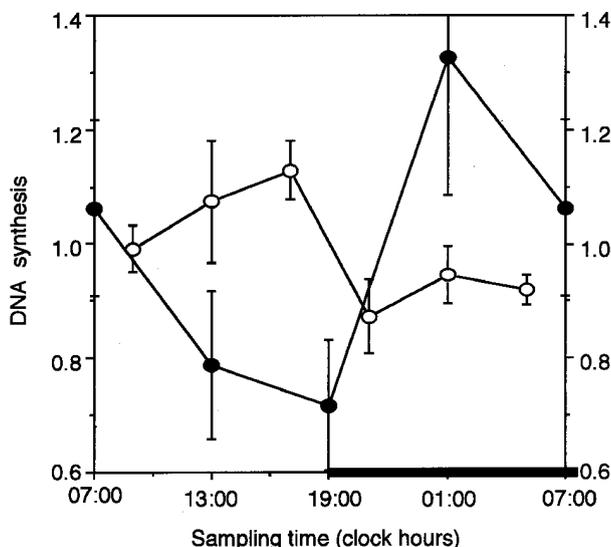


Fig. 9. 24-hr Rhythm of DNA Synthesis in Tumor Cells (●: Colon-26) and Normal Cells (○: Bone Marrow)

Each value is the mean with SE of 6 mice. A significant 24-hr rhythm dependence was demonstrated for DNA synthesis activity in both cells ($p < 0.05$, respectively). A phase of cell cycle is different between tumor cells and normal cells.

薬効の日周リズムの機序として、生体の感受性の側面より細胞動態、標的酵素の時間的变化、また薬物動態学的側面よりエステラーゼ活性の日周リズムの関与が考えられる。

同様の所見は、メトトレキサート (MTX) でも認められ、MTX 毒性の日周リズムの機序として、細胞周期と関連した生体の感受性の変化及び細胞内への薬物の取り込みと排出などの薬物動態の投薬時刻による変化の関与が考えられる。^{30,31)}

3-2. サイトカイン 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、癌化学療法時の好中球の回復促進、感染防止及び抗癌剤の大量投与を可能にする画期的な薬剤である。しかし、抗腫瘍薬との併用に際しての最適投薬タイミングなど適正使用に関しての詳細な検討はなされていない。そこで、抗腫瘍薬と幅広く併用されている G-CSF の効果増強を目的として、G-CSF の白血球増加作用に及ぼす投薬タイミングの影響について検討した。^{33,34)}

実験動物として自由摂食摂水・明暗周期 [明期 (休息期): 07:00-19:00] 条件下で飼育しているマウスを使用した。09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00 の 6 時点のいずれかに、G-CSF (250 µg/kg, *sc*) あるいは saline を投薬後、白血球増加作用に及ぼす投薬時刻の影響について検討した。上記 6 時点のいずれかに、骨髓細胞を採取後フローサイトメーターで細胞動態を測定し、細胞採取時刻間で比較検討した。07:00, 19:00 のいずれかに、G-CSF (250 µg/kg, *i.v.*) を投薬後経時的に白血球数を測定し、投薬時刻間で比較検討した。07:00, 19:00 のいずれかに骨髓細胞を採取し、lactoperoxidase 法で標識した [¹²⁵I]-G-CSF と 4°C で 2 時間反応させレセプター特異的結合量を測定した。Scatchard 解析で解離定数とレセプター数を算出し、細胞採取時刻間で比較検討した。07:00, 19:00 のいずれかに G-CSF を投薬後経時的に採血を行い、ELISA 法で血中 G-CSF 濃度を測定した。薬物動態値はモーメント解析法で算出し、投薬時刻間で比較検討した。G-CSF 投薬後の白血球増加作用は、活動期後半から休息期投薬で最大となり、活動期前半投薬で最小を示す投薬時刻による有意な差異が認められた。また G-CSF の白血球増加作用は、白血球が増加し始める時間帯 (07:00) の投薬で、白血球が下降し始める時間帯 (19:00) の投薬と比較して有意に増強した (Fig. 10)。薬物未処置マウスの白血球数及び骨髓細胞の DNA 合成にも効果と対応した有意な日周リズムが認められた。骨髓細胞を対象とした G-CSF のコロニー形成刺激作用は、

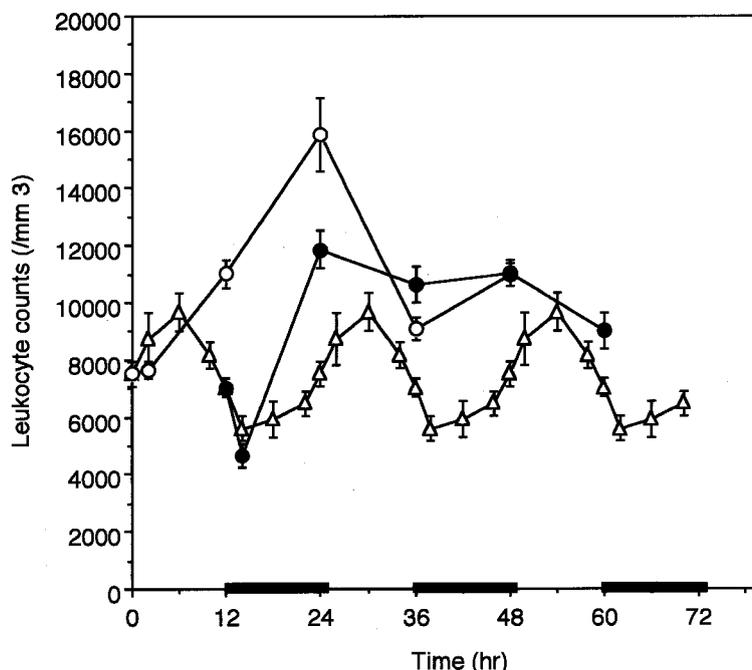


Fig. 10. Influence of Dosing Time on the Time Course of Leukocyte Counts after G-CSF (250 µg/kg, *i.v.*) or Saline Injection^{33,34)}
Each value is the mean with SE of 10 mice. The leukocyte counts at 24 hr after G-CSF injection was significantly higher in mice injected with the drug at 07 : 00 than at 19 : 00 ($p < 0.01$).

活動期前半 (19 : 00) と比較して休息期前半 (07 : 00) に採取した細胞で有意に増強した。骨髓細胞の G-CSF レセプター数は、活動期前半と比較して休息期前半に採取した細胞で有意に増加した [07 : 00 : 953 ± 35 , 19 : 00 : 807 ± 28 sites/cell, $p < 0.01$ ($n = 6$, mean \pm SE)]. 血中 G-CSF 濃度には休息期前半投薬で高値を、活動期前半投薬で低値を示す投薬時刻による有意な差異が認められた。G-CSF 濃度の投薬時刻による差異は効果のリズムと対応しており、効果の高い時間帯に高値を示し、効果の低い時間帯に低値を示した。以上の結果から G-CSF の白血球数増加作用の日周リズムの機序として、白血球数、骨髓細胞動態、レセプター機能の日周リズムと関連した細胞の感受性の変化及び薬物動態の投薬時刻による変化の関与が考えられる。

インターフェロン (IFN) は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用など多彩な生理活性を有するサイトカインであり、B 型、C 型肝炎、慢性骨髄性白血病などに広く臨床応用されている。しかし、その副作用発現率は非常に高く、発熱、全身倦怠感、白血球数減少など発症頻度の高いものから、抑うつ、間質性肺炎などの頻度は低い重篤なものまで知られている。そこで、IFN- α の抗ウイルス効果増強及び副作用

軽減を目的として、IFN- α の薬効に及ぼす投薬タイミングの影響について検討した。³⁵⁻⁴⁰⁾

実験動物として自由摂食摂水・明暗周期 [明期 (休息期) : 07 : 00-19 : 00] 条件下で飼育しているマウスを使用した。09 : 00, 13 : 00, 17 : 00, 21 : 00, 01 : 00, 05 : 00 の 6 時点のいずれかに、IFN- α (10 MIU/kg, *iv*) を投薬後、発熱に及ぼす投薬時刻の影響について検討した。血中及び視床内 Prostaglandin E2 (PGE2) 濃度は、09 : 00, 21 : 00 のいずれかに、IFN- α を投薬後 30 分目に採血、脳摘出を行い、酵素免疫測定法で測定し、投薬時刻間で比較検討した。血中 2'-5' oligoadenylate synthetase (2'-5' OAS) 活性は、09 : 00, 21 : 00 のいずれかに IFN- α を投薬後 24 時間目に採血、肝摘出を行い、radioimmunoassay 法で測定し、投薬時刻間で比較検討した。09 : 00, 21 : 00 のいずれかにリンパ球を採取し、lactoperoxidase 法で標識した [¹²⁵I]-IFN- α と 4°C で 2 時間反応させレセプター特異的結合量を測定した。Scatchard 解析で解離定数とレセプター数を算出し、細胞採取時刻間で比較検討した。09 : 00, 21 : 00 のいずれかに IFN- α を投薬後経時的に採血を行い、ELISA 法で血中 IFN- α 濃度を測定した。薬物動態値はモーメント解析法で算出

し、投薬時刻間で比較検討した。09:00, 21:00のいずれかに腎薄切片を作製し、IFN- α (1000 IU/ml) を含む 0.1% BSA-Krebs-Ringel 溶液中でインキュベートし、溶液中の IFN- α 活性を ELISA 法で測定し、投薬時刻間で比較検討した。IFN- α 投薬後の発熱は休息期の投薬で増強し、活動期の投薬で軽減する投薬時刻による有意な差異が認められた。発熱作用に投薬時刻による差異が生じた機序を PGE2 を指標として生体の感受性の側面から検討した結果、IFN- α 投薬後の視床内 PGE2 濃度には投薬時刻による有意な差異が認められ、発熱が増強される投薬時刻において視床内 PGE2 濃度は高値を示した。また IFN- α による発熱は、cyclooxygenase を阻害することにより PGE2 産生を抑制するインドメタシンの前処置により完全に抑制された。このことから IFN- α による発熱の投薬時刻による差異の機序として、IFN- α による PGE2 産生の時間的変化が一部関与しているものと思われる。2'-5'OAS 活性を指標とした IFN- α 投薬後の抗ウイルス作用は、活動期前半 (21:00) と比較して休息期前半 (09:00) の投薬で有意に増強した (Fig. 11)。リンパ球の IFN- α レセプター数は、活動期前半と比較して休息期前半に採取した細胞で有意に増加した [09:00: 321 ± 31 , 21:00: 213 ± 18 sites/cell, $p < 0.05$ ($n =$

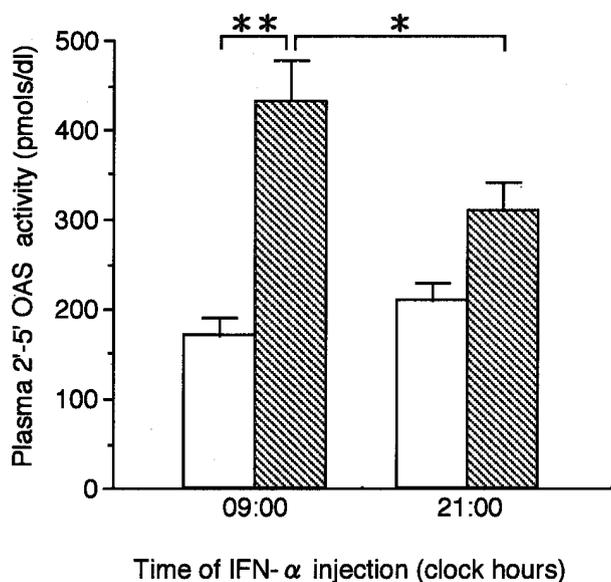


Fig. 11. Influence of Dosing Time on the Plasma 2'-5'OAS Activities after IFN- α (10.0 MIU/kg, *i.v.*) Injection at 09:00 or 21:00³⁷⁾

Each value represents the mean with SE of 8-10 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared with saline group or between the two dosing times. Open column: saline, Hatched column: IFN- α .

6, mean \pm SE)]. このことから IFN- α による 2'-5'OAS 活性の投薬時刻による差異の機序として、リンパ球の IFN- α レセプター数の時間的変化が一部関与しているものと思われる。IFN- α 投薬後の血中 IFN- α 濃度は活動期前半と比較して休息期前半の投薬で有意に高値を示した。IFN- α 投薬後の IFN- α クリアランスは休息期前半と比較して活動期前半の投薬で有意に高値を示した。腎臓のスライスを用いた IFN- α の代謝能は休息期前半と比較して活動期前半に採取した細胞で有意に亢進していた。このことから血中 IFN- α 濃度の投薬時刻による差異の機序として、IFN- α 腎代謝の時間的変化が一部関与しているものと思われる。IFN- α 濃度の投薬時刻による差異は薬効のリズムと対応しており、薬効の高い時間帯に高値を示し、薬効の低い時間帯に低値を示した。以上の結果から IFN- α の薬効の日周リズムの機序として、生体の感受性の側面よりレセプター機能、PGE2 産生の時間的変化が、また薬物動態学的側面より腎代謝能の時間的変化の関与が考えられる。

以上の結果から、抗腫瘍薬及びサイトカインの効果や副作用が投薬時刻により有意に異なること、その機序として標的細胞の DNA 合成能・標的酵素・レセプター機能及び薬物動態 (薬物の細胞内への取り込み及び細胞外への放出) の日周リズムが関与していることが明らかとなった。これにより単に時間によって薬物活性が変化するという従来の時間治療の漠然としたイメージを払拭し、細胞レベルの周期性と関連した投薬設計が可能となる。

3-3. 緑内障治療薬 緑内障は眼内圧が亢進して視神経の機能障害、器質変化を起こす疾患であり、薬物治療が中心となる。緑内障の治療には β -ブロッカー製剤が最も汎用されているが、心拍数減少及び血圧低下といった全身性の副作用を発現し得ることが知られている。このような背景から、 β -ブロッカー点眼薬は眼内への移行を高め、全身への移行を抑えることが極めて重要である。一方、点眼剤の眼内薬物動態に関する研究は、技術的に困難であるためヒトに関して全く検討されていない。そこで、家兔を対象としてチモロールの眼内への移行及び全身への移行に及ぼす投薬時刻の影響について検討した。⁴¹⁻⁴³⁾

家兔を対象に、0.65%のマレイン酸チモロールを

06:00, 12:00, 18:00, 24:00 の4時点のいずれかに点眼した。投薬後、経時的に眼組織内薬物濃度及び血中薬物濃度を測定し、投薬時刻による差異を比較検討した。チモロールの薬効と密接に関連する毛様体薬物濃度と房水中薬物濃度を測定したところ、両者の薬物濃度は12:00投与時に最大となり、06:00投与時に最小を示した。一方、血中薬物濃度は眼内濃度が最高値を示す12:00投与時に最低値を示した。AUCも薬物濃度にほぼ類似する結果が得られた。薬物動態学的側面より薬物の治療効率(全身移行性に対する眼内移行性)を評価するため、血中薬物濃度から算出したAUCに対する眼内薬物濃度から算出したAUCの比を算出した(Table 1)。その結果、12:00投与時に最も治療効率が高まることが明らかとなった。これらの機序を薬物の角膜透過性及び眼球表面からの消失について検討した。その結果、眼内薬物濃度が最低値を示す06:00投与時に、チモロールの角膜透過性が最も低下することが明らかとなった。一方、点眼後の溶液の眼表面滞留時間を検討したところ、眼内薬物濃度が最高値、血中薬物濃度が最低値を示す12:00投与時に眼球表面からの消失が最も低下することが明らかとなった。以上の結果から、眼内薬物移行性の時間的変化の機序として角膜透過性及び眼球表面からの消失の時間的変化が関与しているものと考えられる。これらの結果は、点眼のタイミングを考慮することにより、薬物動態学的側面より治療効率を高める可能性を示唆する所見である。

3-4. Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

薬物治療の有効性と安全性を高めるためには薬物の効果を最大限に高め、その有害反応を最小限に抑える工夫が望まれる。とりわけ薬物療法の個別化は治

療医学の重要な課題の1つである。この1つの回答として登場したのがTDMであり、臨床薬物動態学の理論に基づき投与量・投与間隔を科学的に調節することが可能になってきた。現行行われている薬物投与計画法は、その基礎となる個々の患者の薬物動態値並びに薬物に対する反応性が、日中、夜間など時間帯によって変動しないという前提の上に成り立っている。しかしながら、生体リズムや時間薬理学に関する研究の発展により、至適な投与時刻設定の必要性、そして投薬時刻についての科学的根拠が解明されつつある。これらの薬物投与計画においては、投与量・投与間隔のみならず、投与時刻も正確に調節することが望まれる。TDMにおいては、ベイズ推定法による患者の薬物動態パラメータ推定、血中濃度予測などが頻繁に行われている。⁴⁴⁻⁴⁷⁾これに用いられる薬物動態値は、一般に朝ないし昼間に行われた試験から得られたものである。しかし、TDM対象薬物のテオフィリン、バルプロ酸(VPA)、アミノグリコシド系抗生剤などの薬物動態値は有意な日周リズムを示す。⁴⁸⁻⁵¹⁾そこで、VPAを対象に日中と夜間それぞれの母集団薬物動態値を考慮したベイズ推定法による投与設計を試みた。⁵²⁻⁵⁴⁾

8名の健常男子大学生を対象に、VPA 400 mgを1日2回朝08:30と夜20:30に9日間経口投与した。8日目の朝と夜の内服直前と内服後0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12時間目に採血を行った。また翌日9日目の朝及び夜内服後1, 2時間目(最高血中濃度附近)、12時間目(最低血中濃度附近)に採血を行った。8日目のデータを用い1-コンパートメントモデルに従い求めた朝及び夜服薬後の投薬時刻別薬物動態値を使用して9日目の朝及び夜服薬後の血中VPA濃度を予測した。その際予測の正確度に及ぼす予測に使用した投薬時刻別薬物動態値の影響を検討した。その結果、朝服薬後の1, 2時間目の濃度の予測は、前日の朝服薬後の薬物動態値を使用した際良好であったが、夜服薬後の薬物動態値を使用した際正確度は低下しunderestimationを示した。一方、夜服薬後の1, 2時間目の濃度の予測は、前日の夜服薬後の薬物動態値を使用した際良好であったが、朝服薬後の薬物動態値を使用した際正確度は低下しoverestimationを示した。服薬後12時間目の血中濃度の予測は両者で差異は認められなかった。以上

Table 1. The Ratio of Ocular: Systemic Absorption in the Pigmented Rabbit Following the Topical Instillation of 25 μ l of 0.65% Timolol Maleate Solutions at 06:00, 12:00, 18:00 or 24:00 hr⁽⁴¹⁾

	Dosing time (clock hours)			
	06:00	12:00	18:00	24:00
Humor/plasma	1.00	4.17	2.00	1.67
Iris-ciliary body/plasma	1.00	3.11	1.50	1.57

The ratio of area under the concentration-time curves (AUC) of timolol in the plasma to those in the aqueous humor or the iris-ciliary body was calculated in the pigmented rabbit following the topical instillation of 25 μ l of 0.65% timolol maleate solutions at 06:00, 12:00, 18:00 or 24:00 hr. Each data represents the mean of 4-8 mice.

の結果から連投時の血中 VPA 濃度の予測に際し、薬物動態の個体内変動としての投薬時刻の影響を情報として取り入れることによりその正確度が高められることが判明した。同様の所見は、少数の測定値からでも種々のパラメータを算出可能なベイズ理論に基づく母集団薬物動態解析での検討においても認められた。

以上、血中薬物動態に日周リズムの認められる TDM 対象薬物では、ルーチンの血中濃度を“読む”作業や、薬物動態パラメータ推定や血中濃度予測などの予測作業において注意が必要となろう。今後これまでの用量-濃度-反応関係の理論式にコサイナー法や最大エントロピー法などのリズム解析法を適用していくことが望まれる。理論式の誘導に関して検討が進められているが、実際面では解析に多数のサンプル数を必要とするなどの問題点も数多く存在する。TDM の領域の用量-濃度-反応関係の解析では少数の測定値からでも種々のパラメータを算出可能なベイズ理論に基づく母集団薬物動態解析が使用されており、リズム解析法に基づく時間投薬設計でも検討されていくことが望まれる。

3-5. Drug Delivery System (DDS) これまでの放出制御型 DDS 開発の目的は、体液中薬物濃度を一定に維持するための 0 次の放出パターンをもつ放出制御の工夫であった。しかしながら、多くの薬物の薬物動態に日周リズムが存在し、例えば一定速度で投与しても一定の血中濃度は期待できない。^{2,55)} また一定の薬物濃度の維持がレセプターなどのダウンレギュレーションを誘発し、必ずしも最適の薬物治療となり得ない。さらに疾患や薬効に日周リズムが認められる。このような背景から時間薬理学的所見に基づいた放出制御型 DDS の開発が望まれる。²⁾ 現在、臨床で使用されている時間の要因を考慮した DDS として、時間により注入速度を変えることの可能なクロノポンプが抗腫瘍薬の時間治療に使用されている。経口剤としてはテオフィリン徐放錠ユニフィルが喘息治療に使用されている。この製剤は、親水性セルロース及び疎水性高級脂肪アルコールから成る均質なマトリックス構造の錠剤である。消化管内の液が浸透することにより錠剤が膨潤し、マトリックスの隙間からテオフィリンが徐々に放出される。1日1回夕食後投与により睡眠中の肺機能が最も低下し、喘息発作が好発する時間帯に高い血中テ

オフィリン濃度を維持して気管支喘息などの予防効果を期待する。また狭心症・早朝血圧上昇予防には、就寝前に投与して早朝の効果を期待する投与設計が合理的と考えられる。ベラパミルを含む遅延・持続放出錠 Covera-HS は半透性膜の内側に遅延用被いを加えて、通常の浸透ポンプに放出遅延機構を付与している。1日1回就寝前投与により約10時間後にピーク濃度を示す。親水性高分子としてヒドロキシエチルセルロースを用いて、カルシウム拮抗剤ジルチアゼムの遅延放出錠が開発されている。粘度を高めることにより、10数時間程度 T_{max} (血中ジルチアゼム濃度がピークに達する時間) を延長させることに成功している。その他、硝酸イソソルビドを薬物保存層に分散させ、透過促進剤ミリスチン酸イソプロピルを粘着層に含む経皮治療システム及び薬物の皮膚吸収制御に電場を利用して、薬効成分の血中移行量を電場の on-off で時間制御できるイオントフォoresisなどの開発が進められている。

4. 新規副作用 (生体の恒常性の破綻) とそれを回避するための投与方法の開発

生体リズムは健康を保持・増進させる上でも重要な役割を果たしている。生体リズムの破綻が不眠や胃腸障害などを引き起こし、持続的に続くと精神疾患などの慢性の疾患を生じることにも少なくない。一方、薬物治療中に睡眠・覚醒のサイクル、コーチゾール、体温などの生体リズムが変容することが注目され始めているが、その原因の中核となる時計遺伝子への影響は全く検討されていない。

インターフェロン (IFN) は腫瘍及び慢性肝炎治療などに幅広く使用されているが、重要な副作用としてリズム障害と関連の深いうつ状態、不眠、自殺などが報告されている。⁵⁶⁻⁵⁸⁾ IFN 非投与時には、ヒトにおいてリンパ球数は 08:00 時頃に最低となり、22:00 時頃に最高となるが、コーチゾール濃度は 08:00 時頃に最高となり、22:00 時頃に最低となる。これらのリズムは IFN を 08:00 時頃に連日投与するとリンパ球数は低値を維持し、コーチゾール濃度は高値を維持する。すなわち正常なリンパ球数とコーチゾール濃度の逆相関関係は崩れリズムは消失する。一方、IFN を 22:00 時頃に隔日投与すると正常に維持される。以上の結果は、IFN を夜間に投与し、かつ隔日に投与することが生体リズムを崩さない理想的な投与方法であることを示し

ている。しかしながら、IFNの生体リズム障害の機序については明らかにされていない。そこで、実験動物を対象に、体内時計の本体である視交叉上核の時計遺伝子の日周リズムが薬物投与中にいかに変容するかを明らかにすること、及び時計遺伝子の日周リズム障害を克服するための至適投薬設計を構築することを目的に以下の検討を行った。⁵⁸⁾

自由摂食飲水・明暗周期 (ZT=zeitgeber time, ZT0=light on, ZT12=light off) 条件下で2週間飼育した7週齢ICR雄性マウスを使用した。行動、体温、時計遺伝子 (mPer1, mPer2, mPer3, mClock, mBmal1) の mRNA 発現量に及ぼす IFN- α 投薬タイミングの影響を検討する目的で、IFN- α (2 MIU/kg) あるいは生理食塩水を、ZT0あるいはZT12のいずれかに6日間連日皮下投与した。各パラメータは、投薬開始後6日目のZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18, ZT22の6時点に測定した。時計遺伝子の mRNA 発現量は RT-PCR 法で測定した。マウス行動量の測定は、自動運動解析装置を用いて行った。体温測定はサーモセンサー付きのデジタル温度計を使用した。SCN の mPer1 mRNA 発現量に及ぼす IFN- γ 投薬タイミングの影響を検討する目的で、IFN- γ (0.1 MIU/kg) あるいは生理食塩水を、ZT0あるいはZT12のいずれかに6日間連日皮下投与後ZT2に、mPer1 mRNA 発現量を測定した。また光によるSCNのmPer1 mRNA 転写促進効果に及ぼす IFN- α 投薬タイミングの影響を検討する目的で、IFN- α (2 MIU/kg) あるいは生理食塩水を、ZT0あるいはZT12のいずれかに6日間連日皮下投与した。投薬終了翌日のZT16に光 (600 lux) を30分間照射後、mPer1 mRNA 発現量を生理食塩水投薬群及び光照射未実施群と比較検討した。SCNにおける Interferon stimulated gene factor (ISGF) 発現量に及ぼす IFN- α 投薬の影響を検討する目的で、IFN- α (14 kIU/hr) あるいは生理食塩水を浸透圧ミニポンプを用い6日間持続皮下投与した。ISGF 発現量は、投薬開始後6日目のZT12にウエスタンブロット法で測定した。SCN の mPer1 mRNA 発現量のリズムに及ぼす行動リズムの影響を検討する目的で、corticosterone (30 μ g/hr) あるいは生理食塩水を、浸透圧ミニポンプを用い6日間持続皮下投与した。各パラメータは投薬開始後6日目の上記6時点に測定した。

SCNにおける各 mPer 及び mBmal1 の mRNA 発現量は、コントロール群において有意な日周リズムが認められた [Fig. 12(a)-(d)]。mPer1, mPer2, mPer3 及び mBmal1 mRNA 発現量の最高値を示す時刻はそれぞれ ZT2, ZT10, ZT6, ZT22 であった。一方、最低値は ZT18, ZT18, ZT22, ZT10 で認められた。SCNにおける mClock mRNA 発現量には、有意な日周リズムは認められなかった [(Fig. 12(e))]. IFN- α の ZT0 投薬群ではコントロール群との間に有意差が認められなかった。一方、IFN- α の ZT12 投薬群では有意な日周リズムが認められたものの、コントロール群と比較して有意に低下していた。mPer1 mRNA 発現量は、IFN- γ の ZT0 投薬群ではコントロール群と比較して有意差は認められなかった [Fig. 12(f)]. 一方、IFN- γ の ZT12 投薬群ではコントロール群と比較して有意に低値を示した。本研究において、IFNによる生体リズムの障害が末梢のみならずSCNでも認められることを明らかにした。薬物非投与時には、SCNのmPer1, mPer2, mPer3 mRNA 発現量はそれぞれ明期 (休息期) 前半、後半、中間に最高値を示す有意な日周リズムを示す。一方、IFNの連日投与によりそれらの日周リズムの振幅は低下しリズムの形状が顕著に変容した。mPer 遺伝子の転写促進因子である mClock 及び mBmal1 の mRNA 発現量は、IFNの連日投与により有意に抑制された。また光刺激による mPer1 遺伝子の誘導は IFNの連日投与により有意に障害された。これらの点と関連して、IFNには細胞増殖抑制作用や網膜に対する作用があることから、IFNが時計機能を障害する機序の一部として考えられる。薬物非投与時には、肝臓や腎臓における mPer1 mRNA 発現量は、SCNと比べ数時間遅延した時点で最高値を示す有意な日周リズムを示した。これはSCNから末梢に至る時計機能の階層構造を反映した所見であると思われる。一方、IFNの連日投与によりリズムの振幅が低下した。また行動や体温の日周リズムは暗期 (活動期) に高値を示したが、IFNの連日投与によりその振幅は顕著に低下した。IFNは末梢でリンパ球を活性化させたり抗腫瘍効果を示すとともに、中枢性の副作用を示すため中枢と末梢の両方に作用すると考えられる。SCNを電氣的に破壊することにより末梢の日周リズムは障害されるが、生体内環境を操作することに

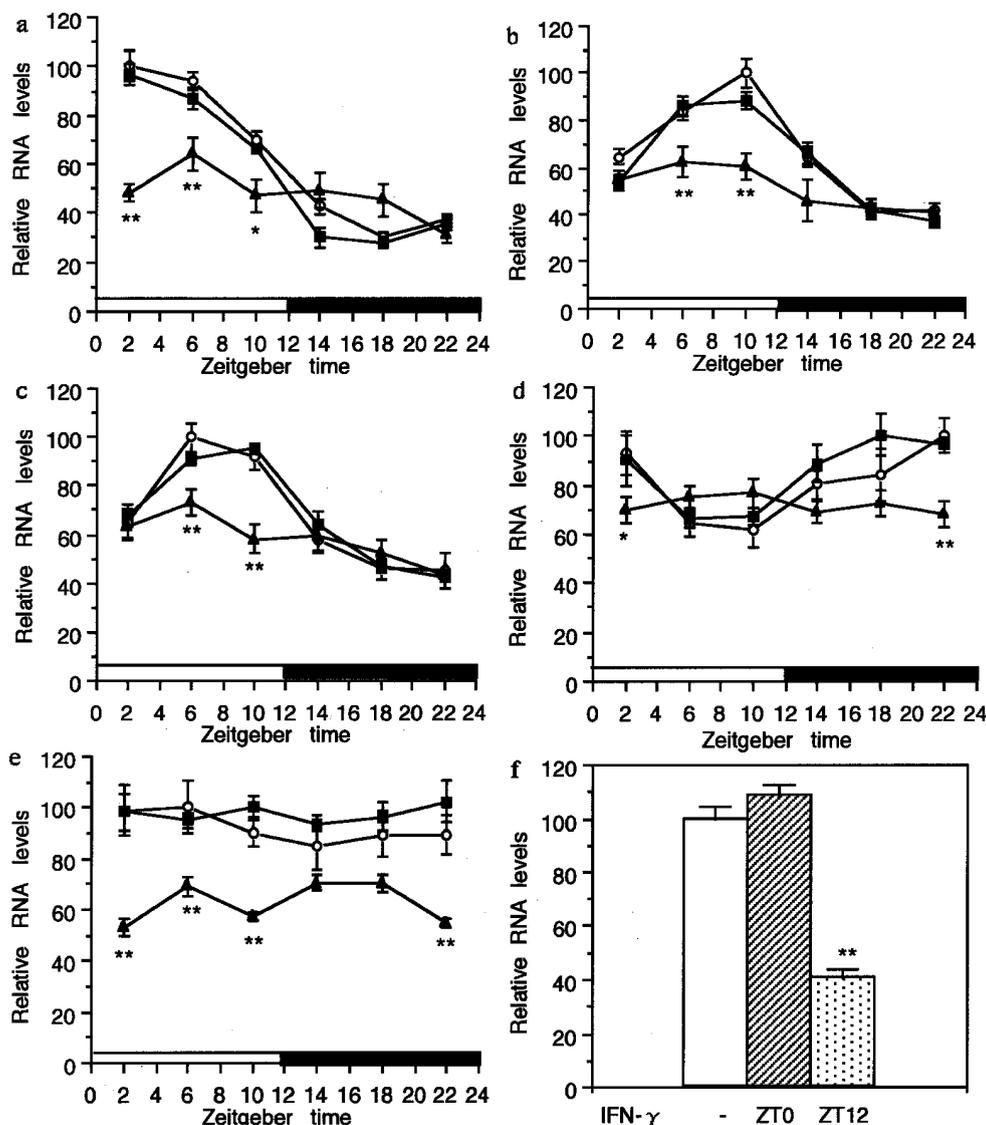


Fig. 12. Influence of IFN- α or IFN- γ Dosing Schedule on mRNA Expression of Clock Genes in the SCN⁵⁸⁾

In panels a-e, RNA levels for the mPer1 (a), mPer2 (b), mPer3 (c), mBmal1 (d) or mClock (e) in the SCN in mice after a single dose of IFN- α (2 MIU/kg, s.c.) at ZT0 (closed square) or ZT12 (closed triangle), or saline (open circle) daily for 6 days. In panel f, RNA levels for mPer1 in SCN in mice at ZT2 on day 7 after a single dose of IFN- γ (0.1 MIU/kg, s.c.) at ZT0 (hatched column) or ZT12 (dotted column), or saline (open column) daily for 6 days. Each value represents the mean with SE of 6 observations. All groups except for mClock in all groups and mBmal1 in groups injected with IFN- α at ZT12 show significant 24-hr rhythms (mPer1 and mPer2 in groups injected with IFN- α at ZT12; $p < 0.05$, respectively, others; $p < 0.01$, respectively). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared with the value of controls at corresponding ZTs. White bars indicate the light period, and grey bars indicate the dark period.

より行動リズムを変容させた場合 SCN のリズムは変化しなかった。そのため IFN の末梢での作用が SCN の機能障害の機序であるとは考えがたい。また IFN がそのレセプターを介して誘導する ISGF は SCN でも強く発現しており、IFN の SCN への直接作用を示唆する所見である。IFN により誘導される時計機能障害は、投薬時刻を考慮することで回避することが可能となった。すなわち、明期（休息期）前半の投薬では障害されないが、暗期（活動期）前半の投薬では顕著に障害された。この結果は

ヒトでの所見と類似している。また SCN における IFN レセプターには暗期に最高値を示す有意な日周リズムが存在するため、時計機能障害による投薬時刻の差の機序として考えられる。⁵⁹⁾ このような現象は他の抗腫瘍薬や抗精神薬でも認められるため、IFN 以外の薬物に関しても生体のホメオスタシス機構を維持しながら治療していくことが、副作用、合併症の防止という点で極めて重要であろう。臨床で、多くの薬物が不眠や不定愁訴など生体リズム障害と深く関連した副作用を呈することが知られてい

る。しかしながら、これら副作用と生体リズム障害という生体のホメオスタシス機構の破綻を関連付けて考える意識は非常に低い。

本研究結果は、薬が体内時計の時計遺伝子に異常を引き起こす可能性があること、そして、このような有害反応は投薬スケジュールを最適化することで避けることができ、またそうすべきであることを示している。これは1日2回あるいは3回均等分割する従来の投与方法にインパクトを与え、投薬タイミングを加味した新しい治療法の開発につながるものである。また臨床上的の問題点を基礎実験でその根拠を明確にし、基礎から臨床への橋渡しを試みている点と、本研究で作製された生体リズム障害動物モデルを新規リズム調整薬の開発に応用できる点で今後の発展が期待される。

5. 生体リズム（生体内環境）を操作することによる新規時間治療法の開発

生体リズムは、生活パターン、治療状況、疾患の症状など様々な要因により影響される。^{60,61} そのためリズムの位相（ピークを示す時間）が前進したり後退する。また振幅が小さくなり消失することもある。生体リズムは個体内変動であるが、個体差が認められる。したがって、時間治療において個体差を調整することが重要である。そのためには摂食条件の操作や細胞同調剤により薬物活性リズムを制御する必要がある。

5-1. 摂食条件 近年、時間薬理学的研究の発展に伴い多くの薬物の活性が投薬時刻により変化することが明らかとされている。一方、これら薬物活性リズムの成因である生体リズムは明暗周期、摂食、ストレスなど外部環境からの影響を受け変化する。特に、摂食時間帯（食事を摂る時間帯）による影響は薬物活性の日周リズムにも多大な影響を与え、その重要性が指摘されている。栄養液（デキストリン、アミノ酸などの混液）の投与方法によりコーチゾールの日周リズムは大きく異なる。⁶¹ 通常の食事リズムにあわせて栄養液を昼間投与した場合、コーチゾールは朝最高値、夜最低値を示す有意な日周リズムを示す。一方、栄養液を夜間投与あるいは一日中連続投与した場合には、コーチゾールの日周リズムは変容する。しかし薬物活性の日周リズムに及ぼす食事の時間帯の影響は明らかではない。そこで、マウスを対象にインターフェロン- α

(IFN- α) の薬物活性の日周リズムに及ぼす摂食時間帯の影響について検討した。⁶²

明暗周期 [明期 (休息期) : 07:00–19:00], 自由摂食又は時間制限摂食 (摂食時間帯 : 09:00–17:00) 条件下で飼育した ICR 雄性マウスを使用した。19:00 又は 07:00 に IFN- α (10 MIU/kg) を静脈内投与し、投薬後 24 時間目に採血及び肝臓摘出を行い、2'-5'オリゴアデニル合成酵素 (2'-5'OAS) 活性をラジオイムノアッセイ法で測定した。09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00 のいずれかに IFN- α を静脈内投与し、投薬後経時的に採血を行い、ELISA 法で血中 IFN- α 濃度を測定した。薬物動態値はモーメント解析法で算出した。IFN- α / β レセプター (IFNAR) mRNA 発現量は、上記 6 時点に肝臓を摘出し、RT-PCR 法で測定した。自由摂食群における体温には明期に低値を、暗期に高値を示す有意な日周リズムが認められ、IFN- α による発熱作用は暗期投薬において軽減された (Fig. 13)。また、IFN- α の抗ウイルス作用の指標である 2'-5'OAS 活性は発熱が軽減される 07:00 投薬時に有意に増大した。一方、IFN- α による発熱及び抗ウイルス作用ともに摂食時間帯を繰り返して操作することにより、自由摂食群におけるリズム

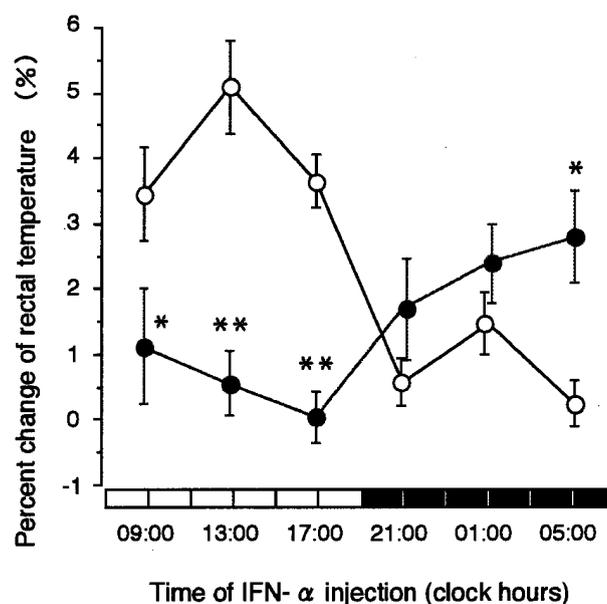


Fig. 13. Influence of Feeding Schedule on 24-hr Rhythm of the Percent Change of Rectal Temperature at 0.5 hr after IFN- α (10.0 MIU/kg, *i.v.*) Injection⁶²

Each value represents the mean with SE of 8–10 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared with the ad lib feeding group at corresponding time. ○: ad lib feeding group, ●: Shift feeding group.

と位相が逆転していた。これら薬物活性リズムの変化の機序を薬物動態学的側面から検討した結果、IFN- α 投薬後 2.5 時間目の血中濃度は、自由摂食群においては暗期後半から明期前半に高値を、明期後半から暗期前半に低値を示す有意な日周リズムが認められた。また、IFN- α 薬物動態値は、CL 及び AUC について投薬時刻間で有意な差異が認められ、CL は血中濃度が低値を示す暗期前半投薬において有意に高値を示した。一方、血中 IFN- α 濃度及び IFN- α 薬物動態値ともに摂食時間帯を繰り返し操作することにより自由摂食群におけるリズムと位相が逆転していた。次に薬力学的側面から検討した結果、自由摂食群においては肝臓における IFNAR mRNA 発現量は暗期後半から明期前半に高値を、明期後半から暗期前半に低値を示す有意な日周リズムが認められた。一方、摂食時間帯を繰り返し操作することにより、自由摂食群におけるリズムと位相が変化していた。これらの結果より、摂食時間帯を繰り返し操作することにより IFN- α の薬物活性の日周リズムが変化する機序として、IFN- α 薬物動態及び IFNAR 発現量の日周リズムの変化が一部関与していることが明らかとなった。

同様の所見は、テオフィリン、ゲンタマイシン、メトトレキサート、モルヒネ、漢方薬など多くの薬物で認められる。⁶³⁻⁶⁶⁾ そのため、至適投薬タイミングの設定において、単に「時刻」を指標とするのではなく、「摂食時間帯」の違いによる生体リズム及び薬物活性の日周リズムの個人差までを考慮することの重要性が示唆される。また、摂食時間帯を繰り返し操作することにより薬物活性の日周リズムを制御できることが明らかとなった。

5-2. 細胞同調剤 ハイドロキシウレア (HU) はその細胞周期同調作用により、併用した抗腫瘍薬の抗腫瘍効果を増大させることが知られている。しかしながら HU 投薬後における腫瘍細胞の細胞動態までを考慮に入れた抗腫瘍薬との併用効果については明らかではない。そこで、塩酸イリノテカン (CPT-11) の効果増強と副作用軽減を目的として HU 併用時における CPT-11 の至適投薬タイミングについて検討した。^{67,68)}

自由摂食摂水、明暗周期 [明期 (休息期) : 07 : 00-19 : 00] 条件下で 2 週間飼育した 6 週齢 ICR 雄性マウスを使用した。肉腫細胞 (sarcoma 180;

S-180) を右後足 footpad に移植後 1 週間目に HU (300 mg/kg, *i.p.*) を投薬し、投薬後 0, 5, 10, 15, 20, 25 時間目のいずれかに CPT-11 (100 mg/kg, *i.p.*) を投薬した。その後経日的に腫瘍径及び体重を測定し、効果及び副作用に及ぼす CPT-11 併用タイミングの影響を検討した。HU 投薬後、正常骨髄細胞及び腫瘍細胞を摘出し、³H] チミジン取り込み量を指標に DNA 合成能を測定した。CPT-11 及びその活性代謝物である SN-38 の血中濃度は、HU と CPT-11 の併用後経時的に採血を行い HPLC 法で測定した。薬物動態値はモーメント解析法で算出した。HU 投薬後、経時的に採血を行い、*p*-nitrophenol acetate の脱エステル化を指標として、生成された *p*-nitrophenol の吸光度を測定した。

HU と CPT-11 を併用した際の抗腫瘍効果は CPT-11 を単独で投薬した場合と比較して有意に増大した。また HU 投薬後の CPT-11 併用のタイミングにより CPT-11 の作用が有意に異なった。抗腫瘍効果は 20 時間目併用群が最大となり単独投与と比較して有意に増強された。体重減少作用は 0 時間目併用群 (同時併用群) が最小であったが単独投与との間に有意な差は見られなかった。薬物未処置時には、腫瘍及び骨髄の細胞動態は類似し DNA 合成能はともに休息期に高値を活動期に低値を示す有意な日周リズムが認められた (Fig. 14)。HU 投薬により骨髄細胞の DNA 合成は抑制され、その作用は 20 時間以上持続した。しかし腫瘍細胞の DNA 合成は HU 投薬後一時的に抑制されたがすぐに回復した。さらに薬物未処置時において低値を示した活動期後半の DNA 合成能は HU によって高値を示すなど、そのリズムは変容した。CPT-11 は S 期特異的な抗腫瘍薬であるため、その殺細胞効果と標的細胞の細胞動態との間に関連性がみられる。今回の検討において、腫瘍細胞の DNA 合成能が高いとき、あるいは高まり始めたときに CPT-11 を併用した場合に抗腫瘍効果が増強した。特に HU 投薬後 20 時間目に CPT-11 を併用した場合は、併用時以降長時間にわたり DNA 合成能が高い値を維持しており、他の併用タイミングと比較して CPT-11 が S 期の細胞に長時間作用したと思われる。CPT-11 投薬 2 時間後の血中 CPT-11 濃度に併用タイミングによる差異は認められなかった。一方血中 SN-38 濃度は 0 時間目併用群、10 時間目併用群と比較して 20

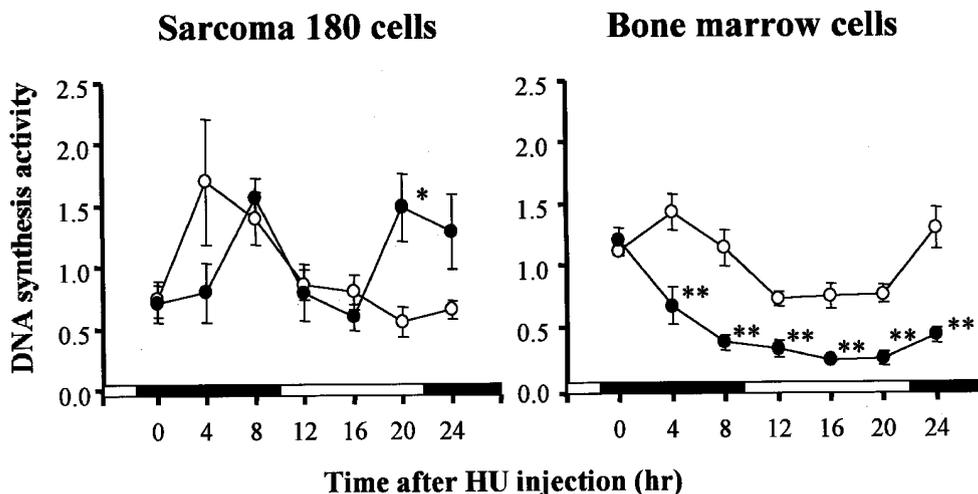


Fig. 14. Time Course of DNA Synthesis Activity in S-180 Sarcoma Cells (left side) or Bone Marrow Cells (right side) after Hydroxyurea (HU: 300 mg/kg, *i.p.*) (●) or Saline (○) Injection at 09:00^{67,68)}

Each value was calculated as the ratio to the average of the 6 points (0, 4, 8, 12, 16 and 20 hr after saline injection). Each value represents the mean with SE of 6 mice * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from control. When a phase of cell cycle is not different between tumor cells and normal cells, the dosing time showing the highest effectiveness means that showing the highest toxicity. Thus synchronizing drug such as hydroxyurea is useful to make a different phase of cell cycle between tumor cells and normal cells.

時間目併用群において有意に高値を示した。また、HU投薬により血中エステラーゼ活性は有意に上昇し、HU投薬後4及び20時間目に高値を示した。CPT-11は投薬後、血中、肝臓、腸管などのcarboxylesteraseにより脱エステル化され強い殺細胞作用を有するSN-38へと変換される。HU投薬後0時間目と20時間目の比較において、血中エステラーゼ活性は20時間目に有意に高値を示し、それと関連してCPT-11からSN-38への代謝が促進していた。以上の結果からCPT-11との併用において、HUは細胞周期同調剤として働き、CPT-11の抗腫瘍効果を増大させることが明らかとなった。さらにHUとCPT-11の併用時において、HU投薬後のCPT-11の併用タイミングを考慮することの有用性が示唆された。

5-3. 生体リズム調整薬 種々の薬物が体内時計に作用し、生体リズムの位相を変化させることが明らかにされつつある。メラトニンは松果体から分泌されるホルモンであり、その分泌は日周リズムを示し臨床的に睡眠を誘発するため時差ぼけ治療薬として用いられている。⁶⁹⁻⁷¹⁾ 例えば日本から米国西海岸に移動しメラトニンを現地時間の夜の始まり(日本時間ではまだ昼間)に服用すると、睡眠誘発と位相前進作用が起こることがヒトや動物で確認されている。また睡眠障害などの生体リズム障害に対

し有効性が確認されている。その他、動物を対象とした基礎的検討ではあるが、種々の薬物が体内時計機構に作用し、生体リズムの位相をシフトさせることが明らかとなっており、今後臨床で使用されることが期待される。⁷²⁻⁷⁴⁾

以上の実験から、摂食条件の繰り返し操作及び細胞同調剤の投与により、種々の薬物の薬物活性日周リズムの位相(ピークを示す時間)を制御することに成功した。これにより、生体リズムをモニターし至適投薬タイミングを設定する受動的な従来の時間治療に対し、生体リズム(生体内環境)を操作することにより至適投薬タイミングを設定する能動的な時間治療が可能となる。

6. 時間治療の今後の展開

時間治療の歴史は浅いが、この10数年の間にくつつかの薬物の添付文書に投薬時刻が明示されるに至っている。また時間薬理学的所見を考慮したDDSの開発も進み現在治療応用されるに至っている。しかしながら、時間治療をさらに展開させる上で、生体リズムに個体差が存在する点が大きな支障となっている。そのため、これまで蓄積された時間薬理学的所見を整理して体系化していくことが必要となる。すなわち、何を生体リズムの指標(生体リズムマーカー)とすべきか、生体リズムの中でいつ投薬すべきかを決定することが重要となる。一方、

Science, Cell, Nature などの科学誌は、最近急速に発展した分野として体内時計の分子機構をあげている。そして、今後の重要な課題は臨床応用でありこの分野の研究の発展が大いに期待される。このような背景から、時計遺伝子に関する最新の情報に基づき時間治療の今後の展開について紹介する。

睡眠障害の機序として時計遺伝子の変容が一部関与していると考えられるが、家族性睡眠相前進症候群 (familial advanced sleep phase syndrome: FASPS) における hPer2 リン酸化部位の突然変異が知られている。⁷⁵⁾ FASPS は常染色体優性の生体リズム異常であり、睡眠、体温、メラトニンの各周期が正常より 4 時間進んでいる「早起き」型を示す。FASPS 患者では、hPer2 の CKIε 結合領域内でセリンがグリシンに置換した突然変異が見られる。このため CKIε による hPer2 のリン酸化低下が生じている。したがって、FASPS 患者に睡眠行動の異常が発現するのは、生体リズムに影響を及ぼす時計遺伝子 hPer2 のミスセンス突然変異によると考えられる。このようにある種の時計遺伝子の変異により生体リズムが障害されることが明らかにされている。今後種々の時計遺伝子に着目した遺伝的多型解析を実施することにより、日周リズムの変容の有無を遺伝子診断から推定することも可能となるであろう。心筋梗塞の発症は朝にピークを示す日周リズムが認められる。心筋梗塞の発症に関与する線溶系の調節因子、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター I (PAI-1) 遺伝子発現が E-box を介して時計遺伝子により調節されている。⁷⁶⁾ *In vitro* の系において PAI-1 は、CLOCK と BMAL2 のヘテロダイマーの E-box への結合により転写活性化されるが、この活性化は PER2 及び CRY1 によって抑制される。このように疾患の日周リズムと密接に関連した遺伝子の日周リズムも時計遺伝子の制御下にある。また SCN や肝臓でリズムに発現している Dbp は出力系の遺伝子であり、時計遺伝子により制御されている。⁷⁷⁾ 肝臓におけるアルブミン遺伝子や数種の P450 分子の転写はこの転写因子の制御下にあり、転写活性が概日リズムを示す。⁷⁸⁾ したがって、Dbp の概日リズムが薬物動態の日周リズムの成因の一部であると考えられている。今後種々の薬物代謝酵素、レセプター機能などの日周リズムの成因を解明することにより、これらの制御因子から

生体リズムマーカーを抽出することも可能となろう。これらの手法を用い生体リズムの診断法を確立することにより、生体リズム障害の診断や至適投薬タイミングの設定が可能となるであろう。また生体リズムは血液サンプルなどから簡単に診断できれば極めて実践的となる。

IFN は癌や肝炎の治療に幅広く使用されているが、中枢性の副作用、うつ病や自殺を引き起こすことから厚生省より警告がなされていた。しかしながら、今日までそのメカニズムは全く解明されていなかった。IFN による生体リズム障害が末梢のみならず SCN でも認められることをマウスを対象とした実験で明らかにした。⁵⁸⁾ SCN の Per mRNA は明期にピークを示す日周リズムを示すが、IFN の連続投与によりリズムの振幅は低下し顕著に変容する。一方、IFN により誘導される時計機能障害は投薬時刻を考慮することで回避することが可能である。すなわち、明期 (マウスの休息期) 前半の投薬では障害されないが、暗期 (活動期) 前半の投薬では顕著に障害される。以上の結果は、薬物が時計機能の異常を引き起こす可能性があること、そしてこのような有害反応は投薬スケジュールを最適化することで避けることができ、またそうすべきであることを示している。従来の投薬設計では、薬物濃度を持続的に維持するために薬を 1 日 2 回あるいは 3 回均等分割することが主流であった。しかしながら、今回の結果から投薬時刻をも考慮した投薬設計を構築することで、生体の恒常性を破綻させることなく治療できることが明らかとなった。これらの所見は臨床所見と類似しており、また IFN 以外の薬物でもこのような現象が認められる。したがって、副作用、合併症の防止という点からも生体の恒常性を維持しながら治療していくことが望まれる。薬物治療中に誘発される新規副作用 (生体の恒常性の破綻) を克服するための投薬設計の構築も今後の重要な課題であろう。

生体リズムは、生活パターン、治療状況、疾患の症状など様々な要因により影響される。また種々の薬物が体内時計に作用し、生体リズムの位相を変化させることが明らかにされつつある。光刺激は主観的暗期に特異的に体内時計の位相を変化させるが、多くの非光刺激は明期に作用して体内時計をリセットする。このような非光同調因子としては、制限給

餌、薬物などが知られている。例えば、セロトニン受容体 (5HT_{1A}/5HT₇) のアゴニストである 8-OH-DPAT は行動リズムの位相を時刻依存的に変化させる。⁷⁴⁾ しかし、その位相反応曲線は光同調刺激によるものと 180 度位相が異なる。すなわち、8-OH-DPAT は主観的明期に投与したときのみ行動リズムの位相前進を誘導する。8-OH-DPAT 投与 2 時間後の SCN の Per1 や Per2 の発現パターンはコントロール群に比べ有意に減少する。この結果は非光同調時にも Per1 発現と行動リズムの位相変化に関連があることを示している。また摂食条件を繰り返し操作することにより、末梢での時計遺伝子の日周リズムが摂食時間帯に応じて変化することが知られている。⁷⁹⁾ 逆に薬物や摂食条件を操作することにより、生体リズムを調整したり、意図的に変化させることも可能である。すなわち、先に記載した生体リズム診断に基づき生体リズムに応じて至適投薬タイミングを設定する従来の時間治療に対し、生体リズムを積極的に操作することにより至適投薬タイミングを容易に設定可能な新規時間治療法の開発につながるものと思われる。今後、摂食条件の繰り返し操作や薬物による生体内環境を操作することによる積極的な時間治療の新展開が期待される。

以上のように、薬物治療の個別化には遺伝子の質のみならず量を評価していくことも重要であろう。

おわりに

生体は体内時計の階層構造をうまく利用し、生体のホメオスタシス機構を維持している。生理的ホメオスタシスや薬効に日周リズムが存在することが、時間薬理学の基盤になっている。実際の治療において、これまで蓄積された時間薬理学的所見を整理して体系化していくことが必要となる。すなわち、何を生体リズムの指標 (生体リズムマーカー) とすべきか、生体リズムの中でいつ投薬すべきかを決定することが重要となる。そのためにも薬物活性の日周リズムを生理機能の日周リズムと関連づけて、時計遺伝子によりいかに制御されているかを明らかにしていく必要がある。以上の点を考慮して、現在我々は時計遺伝子を基盤にした薬物代謝酵素、レセプター機能などの日周リズムの成因解明、新規副作用 (生体の恒常性の破綻) を克服するための投薬設計の構築、至適投薬タイミングの設計を容易にする生体リズム操作方法の開発などを目的とした研究を行

っている。身近なところで、これまで経験的に行われている 1 日 2 回あるいは 3 回均等分割する投薬設計を、生体リズムを考慮して治療効果が望まれる時間帯に高用量、不必要な時間帯には投与量を減量するといった試みだけでも医薬品適正使用の向上につながるのではないだろうか。多くの生体機能や疾患に日周リズムが認められるため、個々の生体リズムにマッチした投薬タイミング、投与方法、製剤の工夫が望まれる。薬物療法の最終ゴールが治療の個別化であるとすれば、個々の生体リズムにマッチした至適投薬設計を構築することが必要不可欠と言えよう。21 世紀を迎え、社会の少子化及び高齢化が進む中で、集団の医療から個の医療へとその重点が移りつつある。現在、個体間変動要因の代表例である遺伝子多型に関する研究及びその治療への応用は確立されつつあるが、遺伝子診断のみでは説明できない要因もある。個体間変動要因の整理・体系化が進むことによりクローズアップされるのは個体内変動である。このような状況の中で個体内変動要因の代表例である生体リズムの研究及びその治療への応用は今後益々注目されるであろう。

謝辞 最後になりましたが、本研究を激励、支援下さいました諸先生方に厚く御礼申し上げます。また協力頂きました共同研究者及び学生諸氏に感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Ohdo S., *The Pharmaceutical Monthly*, **44**, 752-764 (2002).
- 2) Ohdo S., "Chronopharmacology," ed. by Ogawa N., Asakurashoten, Tokyo, 2001, pp. 51-64.
- 3) Ohdo S., *Mol. Med.*, **36**, 1184-1189 (1999).
- 4) Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *Jpn. J. Pharmacol.*, **47**, 11-19 (1988).
- 5) Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *Chronobiol. Int.*, **6**, 229-235 (1989).
- 6) Ohdo S., Watanabe H., Ogawa N., Yoshiyama Y., Sugiyama T., *Eur. J. Pharmacol.*, **293**, 281-285 (1995).
- 7) Ohdo S., Watanabe H., Ogawa N., Yoshiyama Y., Sugiyama T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **70**, 253-258 (1996).
- 8) Watanabe H., Ohdo S., Ishikawa M., Ogawa

- N., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 1036–1045 (1992).
- 9) Viyoch J., Ohdo S., Yukawa E., Higuchi S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 964–969 (2001).
- 10) Yoshiyama Y., Nishikawa S., Sugiyama T., Kobayashi T., Shimada H., Tomonaga F., Ohdo S., Ogawa N., Nakano S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2042–2043 (1993).
- 11) Ohdo S., Ogawa N., Song J. G., *Eur. J. Pharmacol.*, **293**, 151–157 (1995).
- 12) Ogawa N., Ohdo S., Song J. G., Higuchi S., *Life Sci.*, **60**, 2091–2098 (1997).
- 13) Ohdo S., Ogawa N., Song J. G., Higuchi S., *Life Sci.*, **62**, 2057–2064 (1998).
- 14) Jin X., Shearman L. P., Weaver D.R., Zylka M.J., De Vries G.J., Reppert S.M., *Cell*, **96**, 57–68 (1999).
- 15) Chang D. C., Reppert S. M., *Neuron*, **29**, 555–558 (2001).
- 16) Moore R.Y., Eichler V. B., *Brain Res.*, **42**, 201–206 (1972).
- 17) Sakamoto K., Nagase T., Fukui H., Horikawa K., Okada T., Tanaka H., Sato K., Miyake Y., Ohara O., Kako K., Ishida N., *J. Biol. Chem.*, **273**, 27039–27042 (1998).
- 18) Silver R., LeSauter J., Tresco P. A., Lehman M. N., *Nature*, **382**, 810–813 (1996).
- 19) Ueyama T., Krout K. E., Nguyen X. V., Karpitskiy V., Kollert A., Mettenleiter T. C., Loewy A. D., *Nature Neurosci.*, **2**, 1051–1053 (1999).
- 20) Shigeyoshi Y., Taguchi K., Yamamoto S., Takekida S., Yan L., Tei H., Moriya T., Shibata S., Loros J. J., Dunlap J. C., Okamura H., *Cell*, **91**, 1043–1053 (1997).
- 21) Smolensky M.H., Labrecque G., *Pharmaceutical News*, **4**, 10–16 (1997).
- 22) Reinberg A., Pauchett F., Ruff F., Gervais A., Smolensky M. H., Levi F., Gervais P., Chaouat D., Abella M. L., Zidani R., *Chronobiol. Int.*, **4**, 409–419 (1987).
- 23) Langner B., Lemmer B., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **33**, 619–624 (1988).
- 24) Nakaya N., Kita T., Matsuzawa Y., Saito Y., Nakai T., Yamamoto A., Goto Y., *J. Clin. Ther. Med.*, **6**, 1803–1828 (1990).
- 25) Bruguerolle B., *Clin. Pharmacokinet.*, **35**, 83–94 (1998).
- 26) Shaw G. L., Falk R. T., Caporaso N. E., Issaq H. J., Kase R. G., Fox S. D., Tucker M. A., *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1573–1575 (1990).
- 27) Bjarnason G. A., Hrushesky W. J. M., “Circadian Cancer Therapy,” ed. by Hrushesky W. J. M., CRC Press Inc, Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo, 1994, pp. 241–263.
- 28) Levi F., Zidani R., Misset J. L., *Lancet*, **350**, 681–686 (1997).
- 29) Hrushesky W. J. M., von Roemeling R., Sothorn R. B., “Chronopharmacology: Cellular and Biochemical Interactions,” ed. by Lemmer B., Marcel Dekker Inc, New York and Basel, 1989, pp. 439–473.
- 30) Yamauchi A., Ohdo S., Aramaki H., Hayashida Y., Yukawa E., Higuchi S., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **27**, 289–290 (1996).
- 31) Ohdo S., Inoue K., Yukawa E., Higuchi S., Nakano S., Ogawa N., *Jpn. J. Pharmacol.*, **75**, 283–290 (1997).
- 32) Ohdo S., Makinosumi T., Ishizaki T., Yukawa E., Higuchi S., Nakano S., Ogawa N., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1383–1388 (1997).
- 33) Ohdo S., Furukubo T., Arata N., Yukawa E., Higuchi S., Nakano S., Ogawa N., *Life Sci.*, **62**, PL163–168 (1998).
- 34) Ohdo S., Arata N., Furukubo T., Yukawa E., Higuchi S., Nakano S., Ogawa N., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 242–246 (1998).
- 35) Ohdo S., Koyanagi S., Yukawa E., Higuchi S., *Life Sci.* **61**, PL95–100 (1997).
- 36) Koyanagi S., Ohdo S., Yukawa E., Higuchi S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 259–264 (1997).
- 37) Ohdo S., Wang D. S., Koyanagi S., Takane H., Inoue K., Aramaki H., Yukawa E., Higuchi S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 488–493 (2000).
- 38) Takane H., Ohdo S., Yamada T., Yukawa E., Higuchi S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 746–752 (2000).
- 39) Wang D. S., Ohdo S., Koyanagi S., Takane H., Aramaki H., Yukawa E., Higuchi S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 176–180 (2001).
- 40) Takane H., Ohdo S., Yamada T., Koyanagi S., Yukawa E., Higuchi S., *Life Sci.*, **68**, 1449

- 1455 (2001).
- 41) Ohdo S., Grass G. M., Lee V. H. L., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**, 2790–2798 (1991).
- 42) Ohdo S., Zhu J., Lee V. H. L., *Life Sci.*, **51**, 2025–2031 (1992).
- 43) Lee V. H. L., Yamahara H., Gurny R., Sintzel M. B., Martenet M., Gex-Fabry M., Balant L., Ohdo S., Podder S. K., *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, **12**, 103–113 (1996).
- 44) Yukawa E., Hokazono T., Funakoshi A., Yukawa M., Ohdo S., Higuchi S., Ichimaru R., Maki T., Matsunaga K., Anai M., Goto Y., *J. Clin. Psychopharmacol.*, **20**, 685–690 (2000).
- 45) Yukawa E., Suematsu F., Yukawa M., Minemoto M., Ohdo S., Higuchi S., Goto Y., Aoyama T., *Clin. Pharmacokinet.*, **40**, 773–781 (2001).
- 46) Yukawa E., Nonaka T., Yukawa M., Ohdo S., Higuchi S., Kuroda T., Goto Y., *J. Clin. Psychopharmacol.*, **21**, 588–593 (2001).
- 47) Yukawa E., Hokazono T., Yukawa M., Ichimaru R., Maki T., Matsunaga K., Ohdo S., Anai M., Higuchi S., Goto Y., *Clin. Pharmacokinet.*, **41**, 153–159 (2002).
- 48) Chrystyn H., Ellis J. W., Mulley B. A., Peake M. D., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 215–221 (1989).
- 49) Nakano S., Watanabe H., Ohdo S., Ogawa N., *Ann. Rev. Chronopharmacol.*, **3**, 421–424 (1986).
- 50) Watanabe H., Nakano S., Ohdo S., Takaoka N., Ogawa N., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **21**, 579–584 (1990).
- 51) Yoshiyama Y., Kobayashi T., Ohdo S., Ogawa N., Bergeron M. G., Labrecque G., Beauchamp D., Nakano S., *J. Infect. Chemother.*, **2**, 106–109 (1996).
- 52) Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **21**, 747–754 (1990).
- 53) Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *Clin. Pharmacol.*, **6**, 108–112 (1990).
- 54) Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 822–826 (1992).
- 55) Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *Chronobiol. Int.*, **8**, 35–43 (1991).
- 56) Abrams P.G., McClamrock E., Foon K.A., *New Engl. J. Med.*, **312**, 443–444 (1985).
- 57) Bocci V., *Cancer Drug Deliv.*, **2**, 313–316 (1985).
- 58) Ohdo S., Koyanagi S., Suyama H., Higuchi S., Aramaki H., *Nature Med.*, **7**, 356–360 (2001).
- 59) Lundkvist G. B., Robertson B., Mhlanga J. D. M., Rottenberg M. E., Kristensson K., *NeuroReport*, **9**, 1059–1063 (1998).
- 60) Duncan W.C., *Pharmacol. Ther.*, **71**, 253–312 (1996).
- 61) Nishimura K., Kato H., Saito M., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 117–125 (1992).
- 62) Suyama H., Ohdo S., Yukawa E., Higuchi S., Koyanagi S., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 297S–298S (2001).
- 63) Ohdo S., Ogawa N., Nakano S., Higuchi S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 74–81 (1996).
- 64) Nakano S., Ohdo S., Ogawa N., *Ann. Rev. Chronopharmacol.*, **5**, 317–320 (1988).
- 65) Song J. G., Nakano S., Ohdo S., Ogawa N., *Jpn. J. Pharmacol.*, **62**, 373–378 (1993).
- 66) Song J.G., Ohdo S., Nakano S., Ogawa N., *Chronobiol. Int.*, **10**, 338–348 (1993).
- 67) Akagi T., Ohdo S., Ushinohama K., Yukawa E., Higuchi S., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **31**, 437–438 (2000).
- 68) Akagi T., Ohdo S., Ushinohama K., Ishizaki T., Makinosumi T., Yamauchi A., Inoue K., Yukawa E., Higuchi S., *Life Sci.*, (in press) (2002).
- 69) Arendt J., Aldhous M., Marks V., *Br. Med. J.*, **292**, 1170, (1986).
- 70) Dahlitz M., Alvarez B., Vignau J., English J., Arendt J., Parkes J. D., *Lancet*, **337**, 1121–1124 (1991).
- 71) Lewy A. J., Ahmed S., Latham Jackson J. M., Sack R. L., *Chronobiol. Int.*, **9**, 380–392 (1992).
- 72) Shibata S., *The Pharmaceutical Monthly*, **41**, 1109–1113 (1999).
- 73) Akiyama M., Kirihara T., Takahashi S., Minami Y., Yoshinobu Y., Moriya T., Shibata S., *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1616–1622 (1999).
- 74) Horikawa K., Yokota S., Fuji K., Akiyama M., Moriya T., Okamura H., Shibata S., *J. Neurosci.*, **20**, 5867–5873 (2000).
- 75) Toh K. L., Jones C. R., He Y., Eide E. J., Hinz W. A., Virshup D. M., Ptacek L. J., Fu Y. H., *Science*, **291**, 1040–1043 (2001).
- 76) Maemura K., de la Monte S. M., Chin M. T., Layne M. D., Hsieh C. M., Yet S. F., Perrella

- M. A., Lee M. E., *J. Biol. Chem.*, **275**, 36847–36851 (2000).
- 77) Ripperger J. A., Shearman L. P., Reppert S. M., Schibler U., *Genes Dev.*, **14**, 679–689 (2000).
- 78) Lavery D.J., Lopez–Molina L., Margueron R., Fleury–Olela F., Conquet F., Schibler U., Bonfils C., *Mol. Cell Biol.*, **19**, 6488–6499 (1999).
- 79) Damiola F., Minh N.L., Preitner N., Kornmann B., Fleury–Olela F., Schibler U., *Genes Dev.*, **14**, 2950–2961 (2000).