

齧歯類における(*R*)-ketamine の
抗うつ作用に関する研究

2023

土岐 英統

目次

緒言	1
第 1 章 (R)-Ketamine の抗うつ作用本体の特定	6
第 1 節 マウス血漿、脳及び脳脊髄液中における(R,S)-ketamine、(R,S)-norketamine 及び (2R,6R;2S,6S)-HNK の立体選択的濃度測定法の開発	6
1. 序.....	6
2. 結果.....	7
2.1. 光学分割条件の設定.....	7
2.1.1. (R,S)-Ketamine 及び(R,S)-norketamine (分離条件 1)	7
2.1.2. (2R,6R;2S,6S)-HNK (分離条件 2)	9
2.2. 測定用生体試料の前処理.....	10
2.3. アッセイバリデーション.....	17
3. 考察.....	25
第 2 節 (R)-Ketamine の抗うつ作用に対する代謝物の寄与	28
1. 序.....	28
2. 結果.....	29
2.1. LPS 誘発うつ病モデルマウスにおける(R)-ketamine、(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK の抗うつ作用.....	29
2.2. LPS 誘発うつ病モデルマウスにおける(R)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝酵素阻 害剤の影響.....	33
2.3. ナイーブマウスにおける(R)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝酵素阻害剤の影響.....	36
3. 考察.....	39
第 2 章 (S)-Ketamine の抗うつ作用に対する(R)-ketamine の優位性の検証.....	44
1. 序.....	44
2. 結果.....	45
2.1. マウス強制水泳試験における(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の抗うつ作用	45
2.2. マウス尾懸垂試験における(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の抗うつ作用	45
2.3. コルチコステロン誘発うつ病ラット強制水泳試験における(R)-ketamine 及び(S)- ketamine の抗うつ作用	46
2.4. マウス及びラットの自発運動量に対する(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の影響	48
2.5. マウス及びラットにおける(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の血漿、脳及び脳脊髄液中 濃度.....	49
3. 考察.....	51
総括	55
実験の部	58
第 1 章第 1 節付属実験.....	58

試薬.....	58
動物実験.....	58
生体試料の採取.....	58
測定用生体試料の調製.....	58
検量線及び QC 用試料の調製.....	59
測定用生体試料の前処理.....	60
装置及び測定条件.....	60
検量線の作成.....	62
アッセイバリデーション.....	63
第 1 章第 2 節付属実験.....	63
動物実験.....	63
試薬.....	64
薬液の調製.....	64
LPS 誘発うつ病モデルマウスの強制水泳及び PK 試験.....	64
薬液の投与.....	64
強制水泳試験.....	65
自発運動量の測定.....	65
PK 試験.....	65
ナীব mouse の尾懸垂及び PK 試験.....	66
薬液の投与.....	66
尾懸垂試験.....	66
PK 試験.....	67
データ解析.....	67
第 2 章付属実験.....	67
動物実験.....	67
試薬.....	68
薬液の調製.....	68
強制水泳試験.....	68
尾懸垂試験.....	69
ラットコルチコステロン慢性投与モデル.....	69
自発運動量測定.....	69
PK 試験.....	70
データ解析.....	70
参考文献.....	71
論文目録.....	78
謝辞.....	79

略号一覧

AGP: α 1-acid glycoprotein

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AS: auto-sampler

AUC_{0-3h}: area under the concentration-time curve from time 0 to 3 h

AUC_{0-∞}: area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinite time

BLQ: below the lower limit of quantification

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CE: collision energy

C_{max}: maximum concentration

CROT: corticosterone

CV: coefficient of variation

CXP: collision exit potential

CYP: cytochrome P450

CYPI: CYP inhibitors

DHNK: dehydronorketamine

DP: declustering potential

EDTA-2K: ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid potassium salt dehydrate

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FDA: Food and Drug Administration

FT: freeze/thaw

GC: gas chromatography

HK: hydroxyketamine

HNK: hydroxynorketamine

HPLC: high performance liquid chromatography

HQC: high quality control

IS: internal standard

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LLOQ: lower limit of quantification

LPS: lipopolysaccharide

LQC: low quality control

LT: long term

MQC: middle quality control

mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1

NBQX: 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide

NC: not calculated

NMDA: *N*-methyl-D-aspartic acid

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

PD: pharmacodynamics

PK: pharmacokinetics

PK/PD: pharmacokinetics/pharmacodynamics

QC: quality control

REMS: Risk Evaluation and Mitigation Strategy

RT: room temperature

SEM: standard error of the mean

SRM: selected reaction monitoring

TGF: transforming growth factor

t_{\max} : time to maximum plasma concentration

T/P: tissue/plasma concentration ratio

1-ABT: 1-aminobenzotriazole

$^2\text{H}_4$ -norketamine: 3, 4, 5, 6-tetradeuterophenyl-norketamine

緒言

うつ病は、抑うつ気分、意欲・興味の低下、強い焦燥感、食欲の減退・増加、睡眠障害などの症状を特徴とした精神障害である。世界保健機関の報告によると、世界中で 2.8 億人がうつ病を患っており、2030 年には、健康な生活に影響を及ぼす疾病の第 1 位になると予測されている。日本国内においても、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）の調査によると、うつ状態の人口の割合は、2013 年の調査では 7.9%であったのに対し、2020 年には 17.3%と倍増している。うつ病は、高頻度に自殺を引き起こす疾患であり、自殺者の 90%以上が直前にうつ病などの精神疾患があったという調査報告もあることから、うつ病患者の急増は、社会的にも深刻な問題となっている。うつ病の原因は、症状に多様性があることから特定されていないが、モノアミン類であるセロトニンやノルアドレナリン等の神経伝達物質の低下を原因とするモノアミン仮説が提唱されている。そのため、薬物によるうつ病治療は、これらのモノアミン類に作用する選択的セロトニン再取り込み阻害薬やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬を第一選択として行われている。しかし、これらの抗うつ薬は、効果が得られるまでに長期投与が必要であること、患者の約 30%に対しては効果を示さないこと、眠気、めまい、ふらつき、消化器症状、性機能不全といった副作用が治療効果より先に認められ、治療継続が妨害されること等の課題を抱えている [1-3]。したがって、これらの課題を解決した抗うつ薬、すなわち、即効性を有し、既存薬が奏功しない治療抵抗性うつ病患者にも効果を示す新規抗うつ薬の創出が望まれる。

解離性麻酔薬である(*R,S*)-ketamine は、2000 年に、麻酔薬としての用量よりも低い用量で、大うつ病患者に対し、抗うつ作用を示すことが報告された [4]。その後、治療抵抗性うつ病患者において、単回静脈内投与約 2 時間後に抗うつ作用を示し、その効果は 1 週間持続することが報告された [5]。さらに、自殺願望及び希死念慮の顕著な低下、既存の抗うつ薬が効果を示さない双極性障害のうつ症状に対しても効果を示すなど、うつ病治療のアンメッ

トニーズに最も期待される薬剤として注目を集めている [6-9]。しかし、(R,S)-ketamine は、投与初期から精神症状及び解離性症状が観察され、長期使用による依存形成及び神経毒性などの副作用の懸念に加え、静脈内投与などの投与方法が問題となっており、抗うつ薬として承認されていない [10, 11]。

(R,S)-Ketamine は、不斉炭素を有した 2 つの光学異性体からなるラセミ体である (Figure 1)。N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid: NMDA) 受容体に対する親和性は、R 体に比べて S 体の方が 3~4 倍程度高く、麻酔作用も強い [12, 13]。このことから、(R,S)-ketamine の抗うつ作用本体は、S 体の(S)-ketamine であると長年考えられてきた。実際、米国 Food and Drug Administration (FDA) は 2019 年に(S)-ketamine を治療抵抗性うつ病に対する点鼻薬として承認している。しかし、これまで複数の企業が NMDA 受容体拮抗薬として新規抗うつ薬の創出を試みたが、第Ⅲ相臨床試験において、(R,S)-ketamine のような強力な抗うつ作用を示すことなく、開発を断念している [14]。また、(S)-ketamine は、(R,S)-ketamine と同様に、抗うつ作用を示す用量で、精神症状などの重大な副作用を引き起こす。そのため、医療機関においてのみ使用が許されており、自宅に持ち帰っての服薬は禁止されるなど、その使用は厳しく制限されている。一方、もう一つのエナンチオマーである (R)-ketamine は、齧歯類において、(S)-ketamine よりも強力かつ持続的な抗うつ作用を示すだけでなく、(R,S)-ketamine や(S)-ketamine で見られる精神症状などの副作用を発現しないことが報告されている [15, 16]。2020 年には、Perception Neuroscience 社による治療抵抗性うつ病患者を対象としたオープンラベルの臨床試験において、(R)-ketamine は 0.5 mg/kg の単回静脈内投与後 60 分に抗うつ作用を示し、その効果は 7 日後まで持続した [17]。さらに、58 人の健康成人を対象とした安全性評価においても、(R)-ketamine は 150 mg まで重大な有害事象を示さなかったと報告されている。2023 年には、(R)-ketamine はプラセボ対照二重盲検試験において、プラセボ群との間に統計学的に有意な差は認められなかったものの、2 週間の試験期間中の全ての時点において、有効性のシグナルを示すとともに、良好な安全

性プロファイルを示した。引き続き、臨床での抗うつ作用の評価が必要であるが、*(R)*-ketamine は、安全かつ効果的な新規抗うつ薬としての可能性を秘めている。

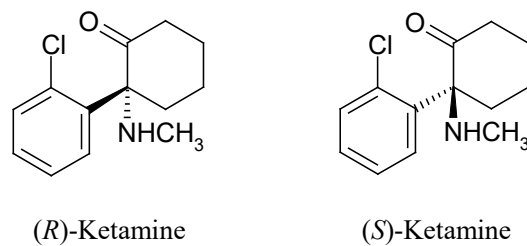


Figure 1 Chemical structures of *(R)*-ketamine and *(S)*-ketamine

(R,S)-Ketamine は、Figure 2 に示すように、生体内で cytochrome P450 (CYP) によって広範に代謝される。主に *N*-脱メチル化を受け *(R,S)*-norketamine となり、さらにシクロヘキサノン環の 4、5 又は 6-位が水酸化された 5 つのジアステレオマーである hydroxynorketamines (HNKs) あるいは 5、6-位が脱水素された *(R,S)*-dehydronorketamine (DHNK) に代謝される [18]。これらの代謝物のうち、*(S)*-norketamine 及び *(2R,6R)*-HNK は、齧歯類において抗うつ作用を示し、*(R)*-ketamine 同様、*(R,S)*-ketamine や *(S)*-ketamine で観察されている精神症状などの有害作用を示さないことが報告されている [19, 20]。さらに、Zanos らによって、*(R,S)*-ketamine の抗うつ作用の発現には、*(2R,6R)*-HNK の生成が不可欠であることが Nature 誌に報告され大きな話題となった [19]。しかし、ヒトや齧歯類において、*(S)*-ketamine も抗うつ作用を示すこと、また、同用量での *(R)*-ketamine、*(S)*-ketamine 及び *(2R,6R)*-HNK の抗うつ作用のポテンシーをマウスで直接比較した結果、最も効果が強かったのは *(R)*-ketamine であり、*(2R,6R)*-HNK は無効であったと報告されているなど、Zanos らの主張には矛盾があり、抗うつ作用本体についての統一見解は得られていない [21]。さらに、*(R)*-ketamine は齧歯類にて、*(S)*-ketamine よりも強力かつ持続的な抗うつ作用を示し、その作用に形質転換増殖因子 (transforming growth factor: TGF) - β が関与していることが報告されているものの [22]、治療抵抗性うつ病モデルに対する有効性は不明であり、*(R)*-ketamine の *(S)*-ketamine に対する

優位性については検証の余地がある。

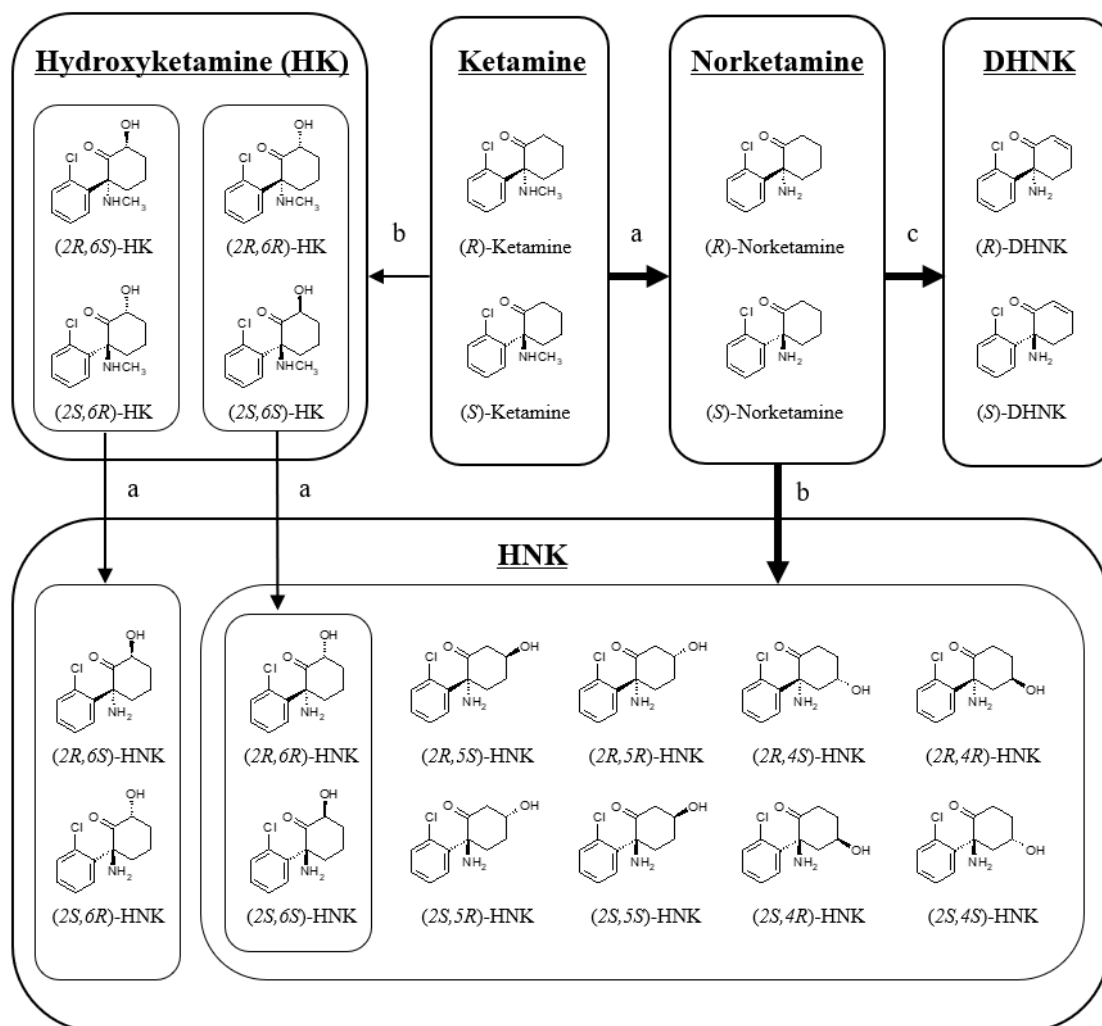


Figure 2 Proposed metabolic pathways of (R,S)-ketamine enantiomers. a: N-demethylation, b: hydroxylation, c: dehydrogenation.

そこで本研究では、(R,S)-ketamine 並びにその主要代謝物である(R,S)-norketamine 及び (2R,6R;2S,6S)-HNK の立体選択的な濃度測定法を構築し、pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) のアプローチにより、これまで不明であったげっ歯類における (R)-ketamine の抗うつ作用本体を特定するとともに、(R)-ketamine の抗うつ作用の特性を(S)-ketamine と比較評価することにした。

第 1 章第 1 節では、本章での研究遂行に不可欠なマウス血漿、脳及び脳脊髄液中の(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 及び (*2R,6R;2S,6S*)-HNK の立体選択的な濃度測定法を構築した。第 2 節では、前節で構築した測定法を用い、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝物の寄与の有無を検討し、マウスにおける(*R*)-ketamine の抗うつ作用本体を特定した。第 2 章では、治療抵抗性うつ病モデルを含む、種々のモデル動物における(*R*)-ketamine の抗うつ作用を (*S*)-ketamine と比較し、(*S*)-ketamine に対する (*R*)-ketamine の優位性について検証した。

第 1 章 (R)-Ketamine の抗うつ作用本体の特定

第 1 節 マウス血漿、脳及び脳脊髄液中における(R,S)-ketamine、(R,S)-norketamine 及び(2R,6R;2S,6S)-HNK の立体選択的濃度測定法の開発

1. 序

生体内に入った薬物は、循環血液を通じて、組織中の作用部位に運ばれて効果を発揮する。そのため、血液及び標的組織中の薬物濃度が薬効発現の指標となる。本章の研究目的である(R)-ketamine の抗うつ作用本体を特定するためには、(R)-ketamine と抗うつ作用への寄与が疑われる代謝物、すなわち主要代謝物である(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK の体内動態 (pharmacokinetics: PK) を加味して、薬効 (pharmacodynamics: PD) を評価する必要がある。そのためには、うつ病のモデル動物として汎用されているマウスの血漿、脳及び脳脊髄液中の(R)-ketamine、(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK の適切な濃度測定法が不可欠であり、測定法に必要な条件は次の 3 条件である。第一に、マウス血漿、脳及び脳脊髄液中の(R,S)-ketamine、(R,S)-norketamine 及び(2R,6R;2S,6S)-HNK を立体選択的に定量分析できることである。なぜなら、これらの測定対象物質は、マウスの体内にてキラリインバージョンするか否かが不明なためである。第二に、マウス 1 匹からの経時的な連続採血で得られる血漿や脳脊髄液といった極微量の生体試料で、1 ng/mL (ng/g) 前後の定量感度が得られることである。そして第三に、多数の測定検体を可能な限り簡便かつ迅速に処理、測定できることである。しかし、既存の測定法は、このような条件を満たすものではなく、著者の研究にそのまま適用することができなかった。そこで、本節では、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) を用いて、本研究目的に合致した濃度測定法を構築し、その性能を評価した。

2. 結果

2.1. 光学分割条件の設定

測定対象物質の物理化学的性質を勘案することにより、一つの生体試料を前処理して得られた測定試料を二つのクロマトグラフィー条件、すなわち、(R,S)-ketamine 及び(R,S)-norketamine 用の条件（分離条件 1）並びに(2R,6R;2S,6S)-HNK 用の条件（分離条件 2）で光学分割することとし、以下の検討を進めた。

2.1.1. (R,S)-Ketamine 及び(R,S)-norketamine（分離条件 1）

LC-MS/MS 測定に汎用されている逆相系の移動相を用いた LC による(R,S)-ketamine 及び(R,S)-norketamine の光学分割条件は多数報告されている [23-26]。これらの報告では、キラルセクターに α 1-acid glycoprotein (AGP) を使用したカラムと中性の移動相を採用しているが、光学分割に必要な時間は 20~25 分であった。著者は、塩基性のラセミ化合物の迅速光学分割には、多糖誘導体系のキラルカラムと炭酸水素アンモニウム水溶液のような弱塩基性の移動相の組み合わせが効果的であるとする報告 [27] を基に、カラムに amylose tris-[(S)- α -methylbenzylcarbamate] をキラルセクターとした CHIRALPAK AS-3R を、移動相には炭酸水素アンモニウム水溶液とアセトニトリルの混液を用い、(R,S)-ketamine 及び(R,S)-norketamine の光学分割に必要な時間の短縮を試みた。

まず、10 mmol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液の液性を弱酸性から弱アルカリ性 (pH5、7.8 及び 9) に調整し、光学分割能に対する移動相液性の影響を検討した。その結果、pH7.8 及び 9 において、(R,S)-ketamine 及び(R,S)-norketamine の良好な光学分割が認められ、(Figure 3B 及び C)、アセトニトリルの比率を 46%とした場合、5 分以内にベースライン分割できることを見出した。一方、酸性の移動相では十分に分割されなかった (Figure 3A)。これらの結果から、移動相の pH は、アンモニア水の添加による pH 調整が不要な pH7.8 を選択することにした。

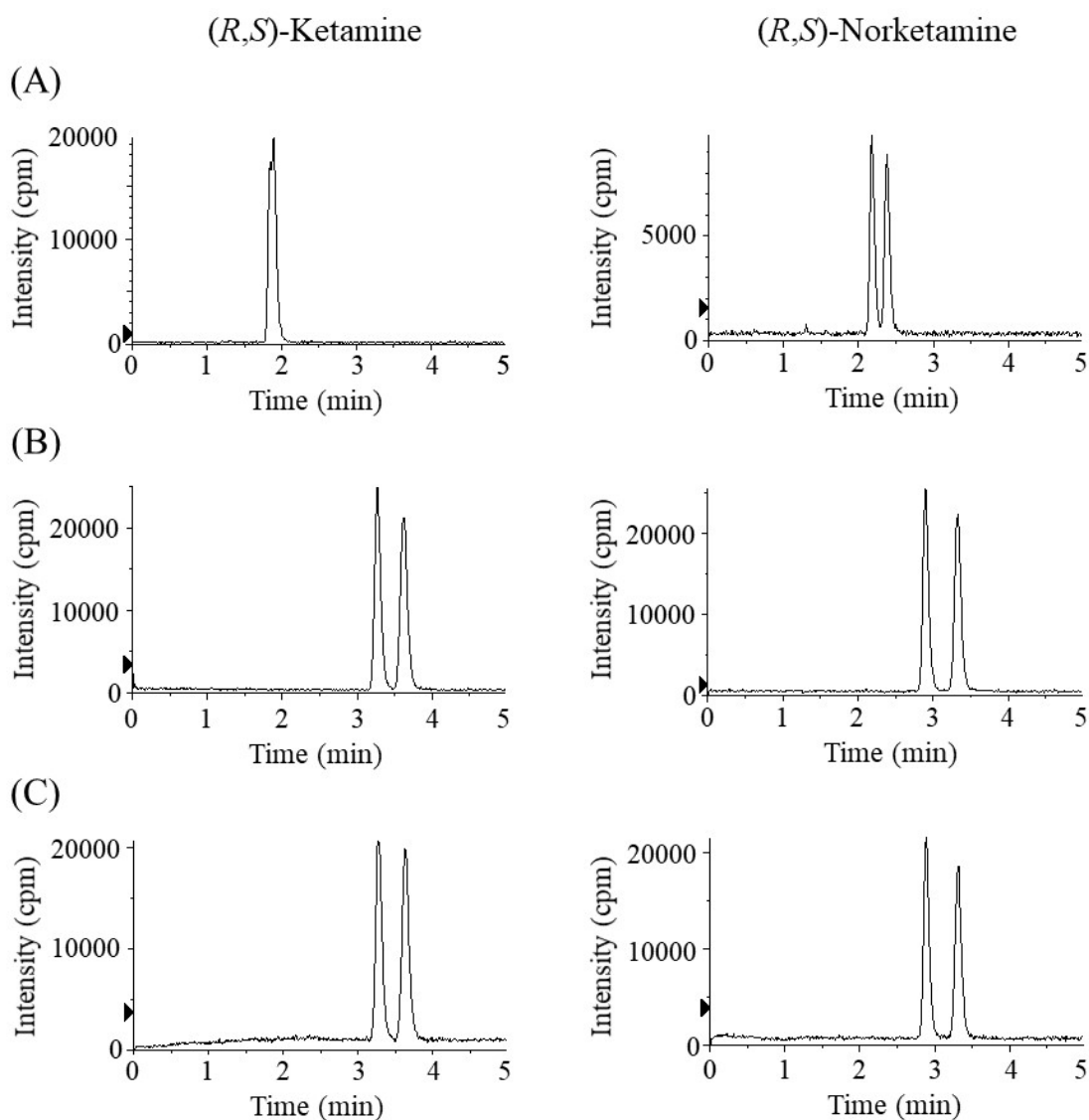


Figure 3 Influence of pH on mobile phase aqueous component (pH5 (A), pH7.8 (B), and pH9 (C)) during chiral separation for *(R,S)*-ketamine (left panel) and *(R,S)*-norketamine (right panel).

一般に、LCにおいて、移動相の塩濃度を高く設定することは、良好なピーク形状の形成に有利である。その一方で、LC-MS (MS) 分析においては、測定対象物質のイオン化の妨害やイオン源の汚染に起因する感度低下の原因になりうることから、移動相の塩濃度は可能な限り低く設定した方が高感度測定に有利とされる。そこで、光学分割能と検出感度に対する移動相の塩濃度 (0.1、1 及び 10 mmol/L) の影響を検討した。その結果、0.1 mmol/L では良好な光学分割を達成できなかったが、1 mmol/L 以上の濃度では (R,S) -

ketamine 及び(*R,S*)-norketamine いずれも良好に光学分割し、10 mmol/L に比べて 1 mmol/L の塩濃度の方が、より高感度であった。

以上、カラムには amylose tris-[(*S*)- α -methylbenzylcarbamate] をキラルセクターとした CHIRALPAK AS-3R を、移動相には 1 mmol/L 炭酸水素アンモニウム (pH7.8) /アセトニトリル (54:46, v/v) を用い、アイソクラティックモードで溶出することで、従来法の測定時間の 1/4~1/5 の時間で(*R,S*)-ketamine 及び(*R,S*)-norketamine の光学分割が可能になった (Figure 4)。

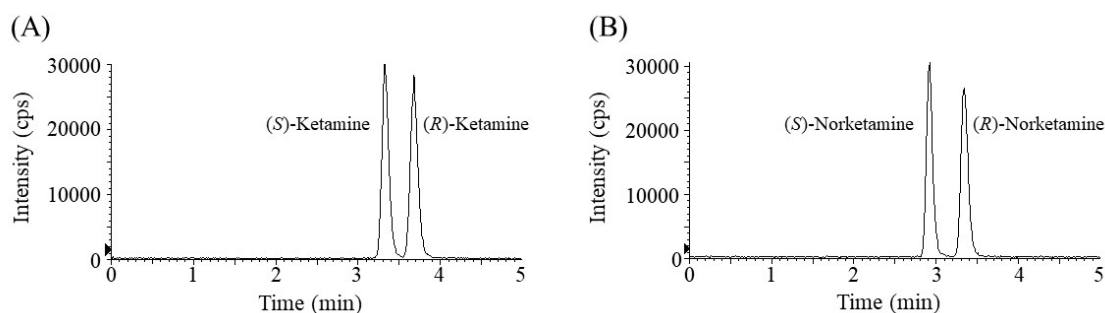


Figure 4 Representative chiral selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of (*R,S*)-ketamine (A) and (*R,S*)-norketamine (B). The chiral separation was performed using a CHIRALPAK AS-3R column (4.6 mm i.d. \times 100 mm, 3 μ m particles) using a mobile phase containing 1 mmol/L ammonium bicarbonate aqueous solution/acetonitrile (54:46, v/v).

2.1.2. (*2R,6R;2S,6S*)-HNK (分離条件 2)

逆相 LC による(*2R,6R;2S,6S*)-HNK の光学分割条件は、Hasan らにより唯一報告されている [26]。この方法は、カラムに amylose tris (5-chloro-2-methylphenylcarbamate) をキラルセクターとした CHIRALPAK AY-RH を、移動相に酢酸アンモニウム (pH 9) /有機溶媒 (イソプロパノール/アセトニトリル (4:1, v/v)) を用い、10 分程度と比較的短時間で光学分割できる。しかし、この分離条件は(*2R,6R;2S,6S*)-HNK 以外の 5 つのジアステレオマーについても検出できるよう条件設定されているため、1 分析あたりの測定時間が 60 分と長い。そこで著者は、グラジエント溶出条件に工夫を加え、(*2R,6R;2S,6S*)-HNK の光学分割能を損な

うことなく、1分析あたりの測定時間をオリジナルの条件の半分の時間（30分）に短縮した条件を“分離条件2”として設定することにした（Figure 5）。

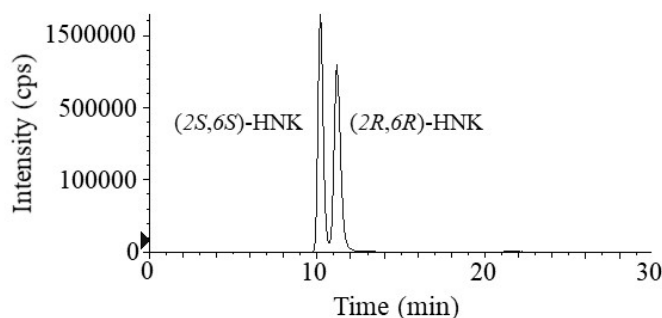


Figure 5 A representative chiral SRM chromatogram of (2R,6R;2S,6S)-HNK. The chiral separation was performed using a CHIRALPAK AY-RH column (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm particles) using a mobile phase containing solvent A (5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (pH 9)) and solvent B (isopropanol/acetonitrile (4:1, v/v)). The gradient program was as follows: 0-5 minutes (30% solvent B), 5-15 minutes (30%→32.5% solvent B), 15.01-25 minutes (80% solvent B), 25.01-30 minutes (30% solvent B).

2.2. 測定用生体試料の前処理

被験物質投与後の個々の動物から経時的に連続採血し、個体毎のPKプロファイルを解明できれば、研究に必要な実験動物を大幅に削減できる。本研究では、マウスの生理機能に影響しないとされている推奨最大採血量（血液量の15%：約300 μL）を基に[28]、各サンプリング時点の採血量を30~35 μL（7~8時点）とした。得られた血漿は、ロスなく適切にサンプリングできるよう、採取直後に蒸留水で10倍希釈した。脳脊髄液についても、採取量が数マイクロリットルと微量なため、採取直後に生理食塩水で20倍希釈し、かつ3例をプールした。脳については、脳重量に対し4倍量の蒸留水でホモジネートを調製した。これらの希釈又はホモジネート試料を測定用生体試料とし、その50 μLをクリーンアップ操作（前処理）に供することにした。

前処理法は、最も簡便でスループット性の高い除タンパク法を採用し、LC-MS/MSの分析には、内標準物質（internal standard: IS）として(R,S)-²H₄-norketamineを含むアセトニトリ

ル/メタノール溶液 (9:1、v/v) による除タンパク後の遠心上清を供することにした。

Figures 6、7、8 及び 9 は、(R,S)-ketamine 及び(R,S)-norketamine の各エナンチオマー濃度が 1 ng/mL (血漿)、0.5 ng/g (脳) 及び 2 ng/mL (脳脊髄液)、(2R,6R;2S,6S)-HNK については 3 ng/mL (血漿)、1.5 ng/g (脳) 及び 6 ng/mL (脳脊髄液) となるように調製した添加試料を前処理し、分析したクロマトグラムを示す。測定対象物質それぞれの溶出位置に妨害ピークは認められず、十分なシグナル/ノイズ比で各測定対象物質を検出できた。次に測定対象物質のピークレスポンスに対する生体試料由来の夾雑成分の影響 (マトリックス効果) の有無を確認するために、マウス 6 個体から採取したブランク血漿及び脳試料並びにマウス 3 個体のブランク脳脊髄液をプールした 6 ロットを用い、上述の濃度となるように調製した添加試料を LC-MS/MS 測定に供した。その結果、真度及び精度は、それぞれ 88.8~108.0%及び 9.5%以下と良好であったことから、測定結果に影響を及ぼし得るマトリックス効果を回避できていると判断された (Table 1)。

以上、各測定対象物質を十分な感度で検出できること、また、測定上問題となるマトリックス効果も認められなかったことから、今回採用した除タンパク法により、十分なクリーンアップ効果が得られたと考えられた。

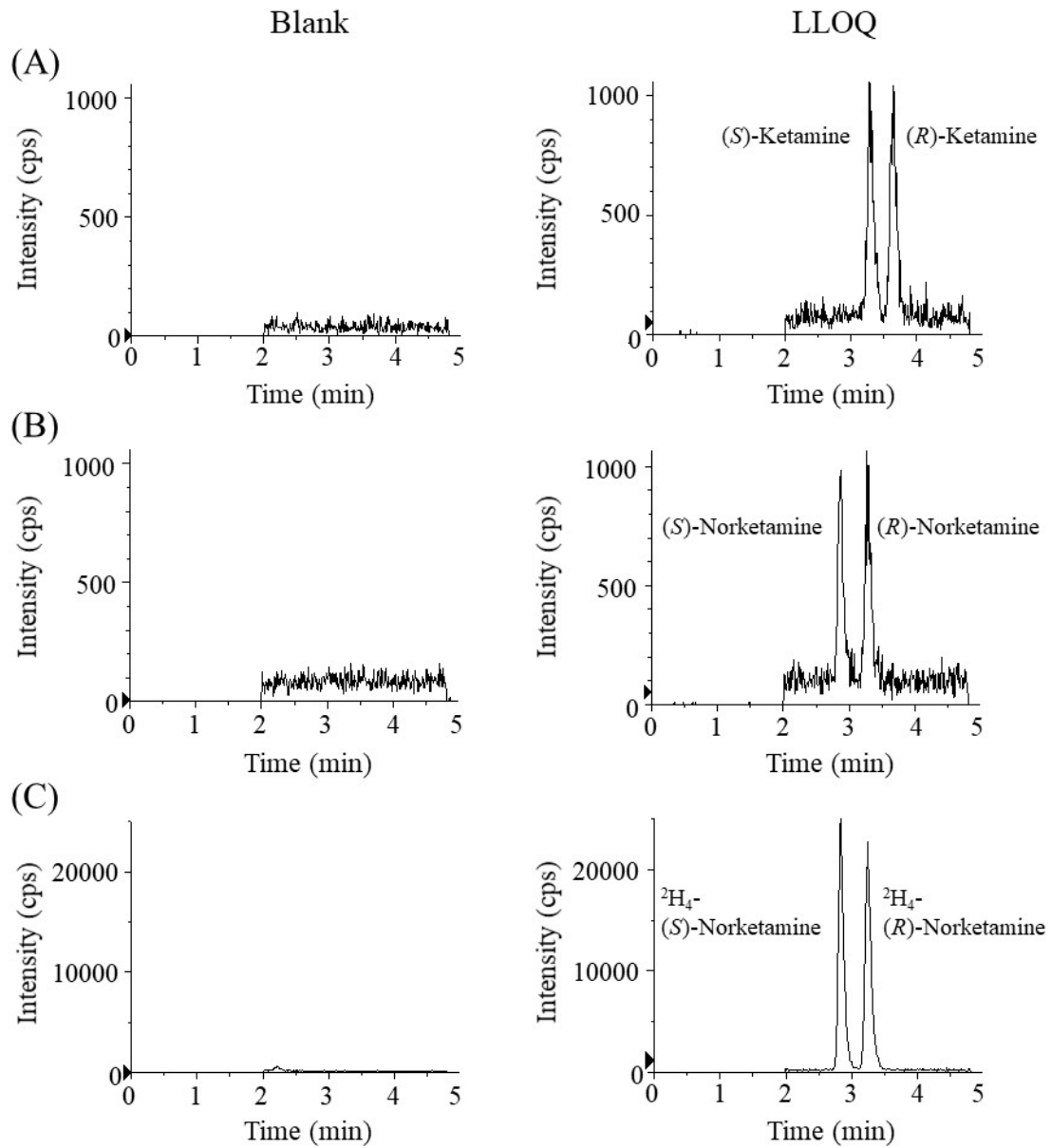


Figure 6 Representative chiral SRM chromatograms of (*R,S*)-ketamine (A), (*R,S*)-norketamine (B), and $^2\text{H}_4$ -(*R,S*)-norketamine (IS, C) in a mouse double blank plasma sample (left panel) and a lower limit of quantification (LLOQ) plasma sample (right panel).

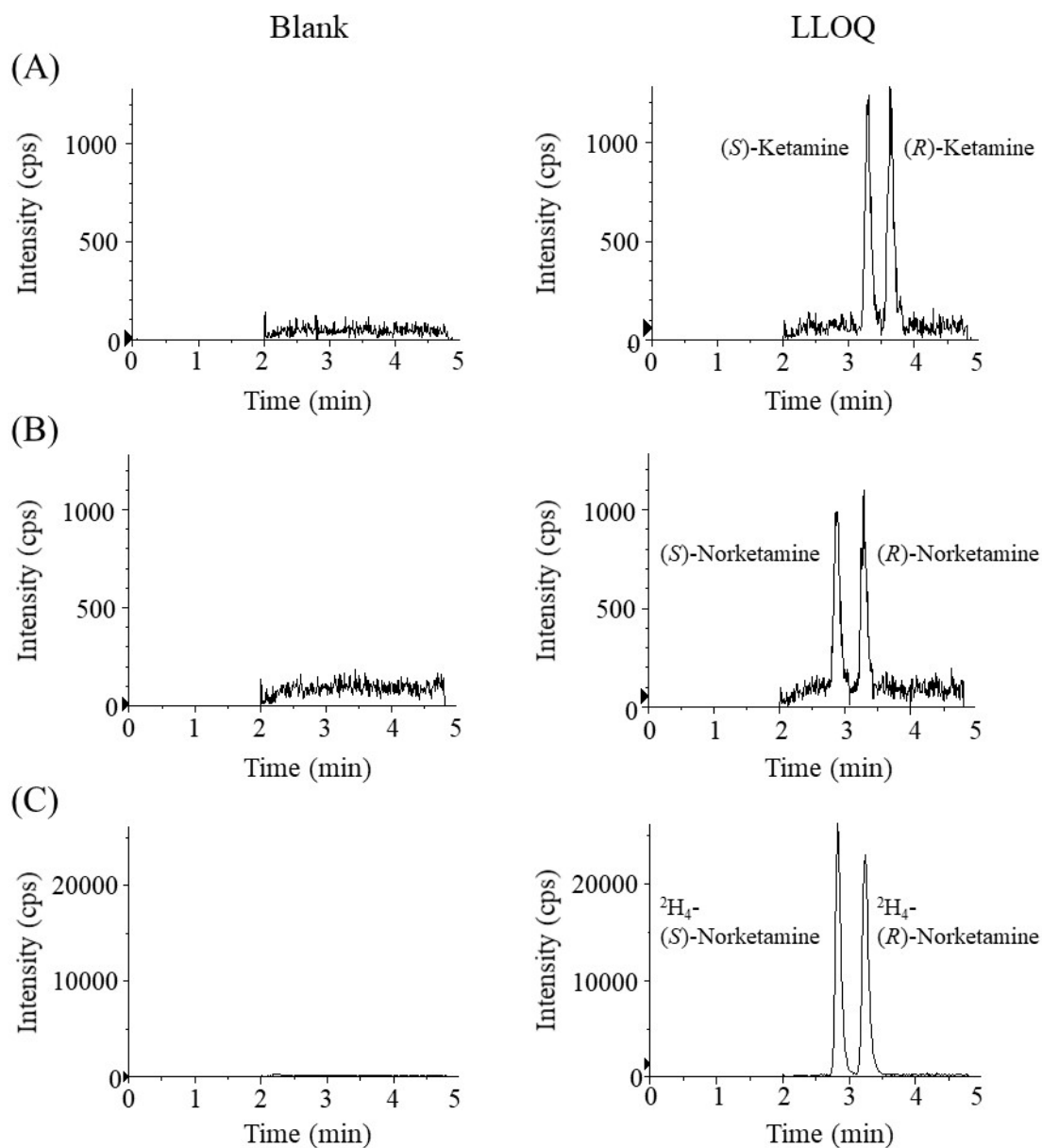


Figure 7 Representative chiral SRM chromatograms of (*R,S*)-ketamine (A), (*R,S*)-norketamine (B), and $^2\text{H}_4$ -(*R,S*)-norketamine (IS, C) in a mouse double blank brain sample (left panel) and an LLOQ brain sample (right panel).

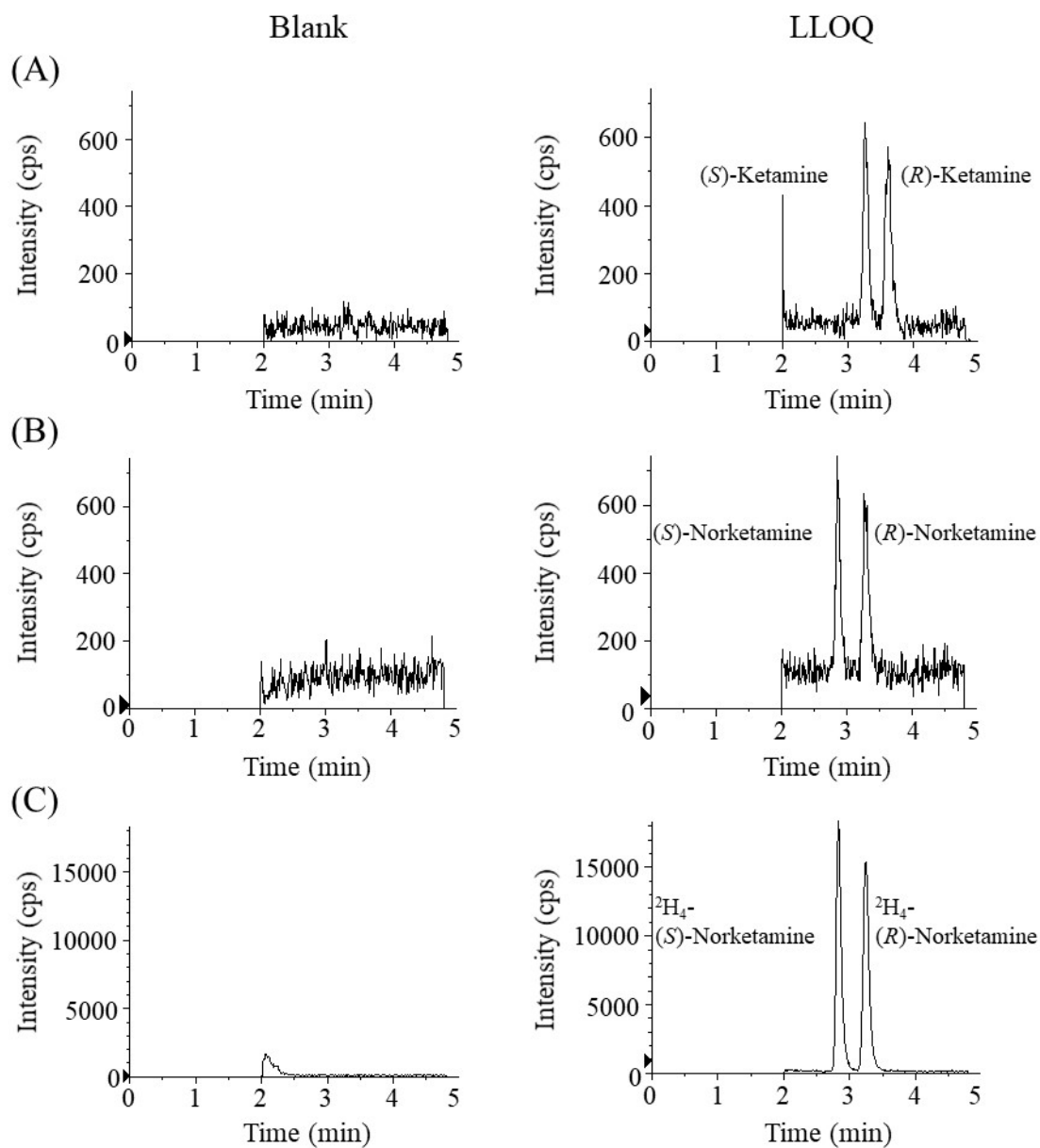


Figure 8 Representative chiral SRM chromatograms of (*R,S*)-ketamine (A), (*R,S*)-norketamine (B), and $^2\text{H}_4$ -(*R,S*)-norketamine (IS, C) in a mouse double blank saline (left panel) and an LLOQ saline for cerebrospinal fluid sample (right panel).

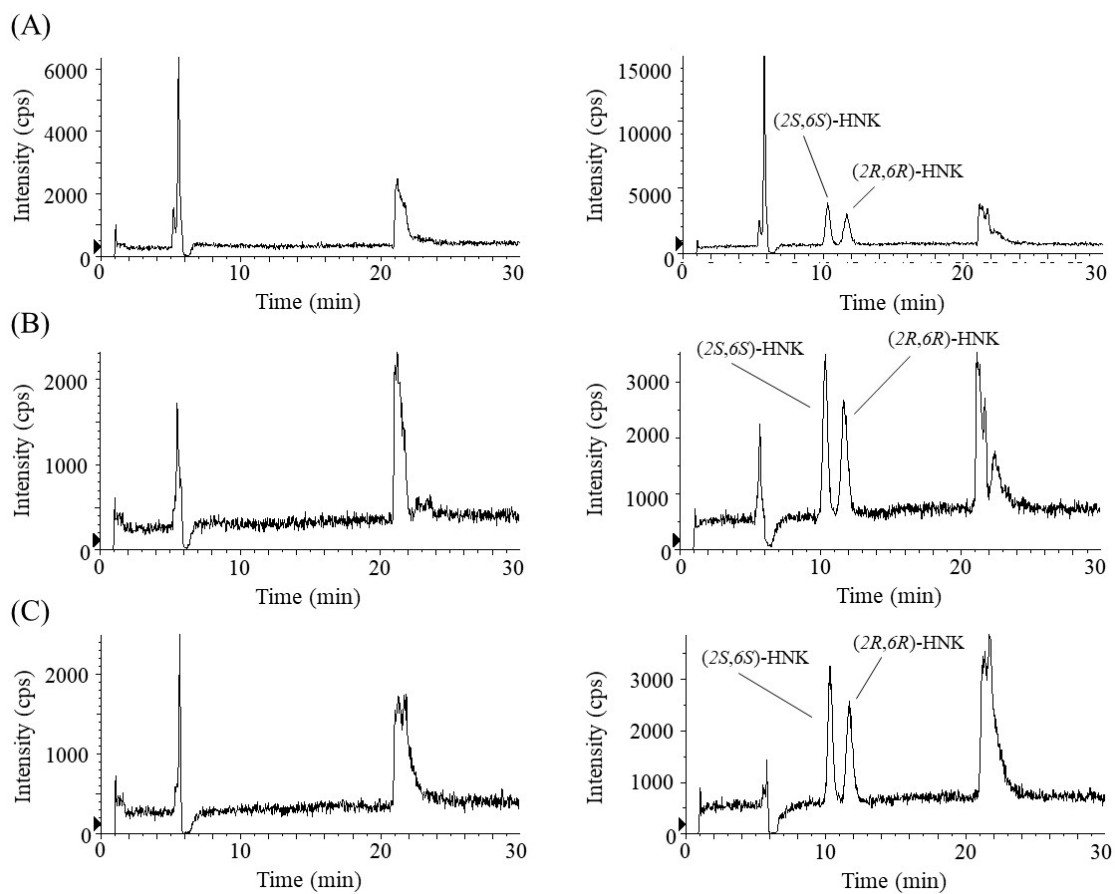


Figure 9 Representative chiral SRM chromatograms of $(2R,6R;2S,6S)$ -HNK in mouse double blank samples (left panel) and LLOQ samples (right panel). A: plasma sample, B: brain sample, and C: saline for cerebrospinal fluid sample.

Table 1 Matrix effect for the determination of (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in mouse plasma, brain, and cerebrospinal fluid.

Matrix	Analyte	Nominal concentration (ng/mL or ng/g)	Mean concentration (ng/mL or ng/g)	Accuracy (%)	CV (%)
Plasma	(<i>R</i>)-Ketamine	1	0.974	97.3	5.4
	(<i>S</i>)-Ketamine	1	0.925	92.5	2.9
	(<i>R</i>)-Norketamine	1	1.08	108.0	4.0
	(<i>S</i>)-Norketamine	1	0.950	95.1	6.7
	(<i>2R,6R</i>)-HNK	3	2.95	98.3	5.1
	(<i>2S,6S</i>)-HNK	3	2.85	95.0	6.4
Brain	(<i>R</i>)-Ketamine	0.5	0.510	102.0	6.1
	(<i>S</i>)-Ketamine	0.5	0.514	103.0	5.3
	(<i>R</i>)-Norketamine	0.5	0.470	94.1	6.8
	(<i>S</i>)-Norketamine	0.5	0.516	103.0	9.5
	(<i>2R,6R</i>)-HNK	1.5	1.43	95.3	4.6
	(<i>2S,6S</i>)-HNK	1.5	1.44	96.0	2.0
Cerebrospinal fluid	(<i>R</i>)-Ketamine	2	1.77	88.8	8.1
	(<i>S</i>)-Ketamine	2	1.84	91.8	6.1
	(<i>R</i>)-Norketamine	2	1.97	98.6	8.8
	(<i>S</i>)-Norketamine	2	1.93	96.7	8.0
	(<i>2R,6R</i>)-HNK	6	6.33	105.5	3.6
	(<i>2S,6S</i>)-HNK	6	6.24	104.0	3.1

Data are represented as the mean of six samples.

LLOQ samples of plasma and brain were prepared with six lots of an individual mouse blank matrix.

LLOQ samples of cerebrospinal fluid were prepared with six lots of a pooled sample collected from three mice.

CV: coefficient of variation

2.3. アッセイバリデーション

前項で確立した(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 及び (*2R,6R;2S,6S*)-HNK のマウス血漿、脳及び脳脊髄液中濃度測定法の信頼性を検証するために、選択性、検量線、再現性及び安定性を評価した。

まず初めに、選択性を確認するために、マウス 6 個体のブランク血漿及び脳並びにマウス 3 個体のブランク脳脊髄液をプールした 6 ロットを測定した。その結果、全例において、測定上妨害となるピークは認められず、本測定法は、高い選択性を有する方法と考えられた (Figures 6、7、8 及び 9)。

次に、検量線の直線性について検討した。(*R,S*)-ketamine 及び(*R,S*)-norketamine は、各エナンチオマーの濃度が 1-1000 ng/mL (血漿)、0.5-500 ng/mL (脳) 及び 2-2000 ng/mL (サロゲート脳脊髄液: 生理食塩水)、(*2R,6R;2S,6S*)-HNK については、3-1000 ng/mL (血漿)、1.5-500 ng/mL (脳) 及び 6-2000 ng/mL (サロゲート脳脊髄液: 生理食塩水) の濃度範囲において、3 回検量線を作成した結果、相関係数は 0.9982 以上、検量線各濃度の真度は 89.6~110.9% であり、良好な直線性が確認された (Table 2、3 及び 4)。さらに、分析単位内再現性における真度及び精度は、それぞれ 89.9~108.0% 及び 6.6% 以下、分析単位間再現性における真度及び精度は、それぞれ 90.0~105.3% 及び 7.9% 以下であることから、本測定は、極めて堅牢性の高い方法であることが実証された (Table 5、6 及び 7)。

最後に、測定用生体試料中における(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 及び(*2R,6R;2S,6S*)-HNK の安定性を検討した。その結果、各マトリックスにおける 3 回凍結融解後の 6 種のエナンチオマーの残存率は、86.2~104.4% (血漿)、91.0~103.5% (脳) 及び 88.5~101.3% (脳脊髄液) であった (Table 8)。室温で約 4 時間放置後のエナンチオマーの残存率は、86.9~106.6% (血漿)、91.9~106.2% (脳) 及び 91.6~107.0% (脳脊髄液) であり、冷凍 (-30°C) で少なくとも 16 週間 ((*R,S*)-ketamine 及び(*R,S*)-norketamine) 又は 4 週間 ((*2R,6R;2S,6S*)-HNK) 保存後では、86.6~96.3% (血漿)、86.6~100.7% (脳) 及び 96.9~

110.1% (脳脊髄液) であった (Table 8)。オートサンプラー中 (設定値 : 15°C) で約 96 時間保存後の測定試料中のエナンチオマーの残存率は、90.1~109.7% (血漿)、89.5~108.7% (脳) 及び 97.2~107.2% (脳脊髄液) であった (Table 8)。

Table 2 Calibration curves for (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in mouse plasma

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Back-calculated concentration (ng/mL)			Accuracy (%)		
		1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
<i>(R)</i> -Ketamine	1.00	1.00	0.987	1.00	100.1	98.7	99.8
	3.00	2.99	3.10	3.01	99.5	103.2	100.4
	10.0	9.85	10.1	9.86	98.5	100.8	98.6
	30.0	31.2	31.6	31.3	104.0	105.3	104.5
	100	105	97.1	102	104.9	97.1	102.1
	300	292	308	305	97.4	102.7	101.6
	1000	955	922	929	95.5	92.2	92.9
	correlation coefficient	0.9993	0.9988	0.9992			
<i>(S)</i> -Ketamine	1.00	0.976	0.988	0.996	97.6	98.8	99.6
	3.00	3.18	3.06	3.07	106.0	102.1	102.2
	10.0	10.4	10.3	9.50	103.6	102.5	95.0
	30.0	29.9	32.2	31.7	99.7	107.3	105.7
	100	104	98.0	100	103.7	98.0	100.4
	300	286	305	309	95.5	101.7	103.1
	1000	939	896	940	93.9	89.6	94.0
	correlation coefficient	0.9988	0.9982	0.9989			
<i>(R)</i> -Norketamine	1.00	0.984	0.968	0.966	98.4	96.8	96.6
	3.00	3.14	3.29	3.30	104.6	109.7	110.2
	10.0	10.0	9.88	9.98	100.0	98.8	99.8
	30.0	30.5	30.8	30.4	101.6	102.5	101.4
	100	105	96.5	100	104.9	96.5	100.2
	300	292	307	300	97.3	102.4	99.9
	1000	932	932	919	93.2	93.2	91.9
	correlation coefficient	0.9990	0.9983	0.9982			
<i>(S)</i> -Norketamine	1.00	0.987	0.990	1.01	98.7	99.0	101.3
	3.00	3.11	3.10	2.87	103.6	103.4	95.8
	10.0	10.0	9.72	9.90	100.2	97.2	99.0
	30.0	30.1	31.2	31.6	100.2	104.1	105.3
	100	106	99.8	100	105.8	99.8	100.5
	300	291	310	310	97.1	103.4	103.3
	1000	944	931	948	94.4	93.1	94.8
	correlation coefficient	0.9991	0.9990	0.9991			
<i>(2R,6R)</i> -HNK	3.00	3.00	3.01	3.03	100.0	100.3	101.1
	10.0	9.89	9.80	9.61	98.9	98.0	96.1
	30.0	31.0	31.0	30.2	103.3	103.3	100.7
	100	98.4	98.2	99.1	98.4	98.2	99.1
	300	303	306	311	100.9	102.0	103.7
	1000	984	982	994	98.4	98.2	99.4
correlation coefficient	0.9998	0.9997	0.9996				
<i>(2S,6S)</i> -HNK	3.00	2.99	3.02	3.03	99.7	100.6	100.9
	10.0	9.98	9.72	9.61	99.8	97.2	96.1
	30.0	31.0	30.7	30.6	103.5	102.3	101.9
	100	98.6	98.9	100	98.6	98.9	100.3
	300	302	308	307	100.7	102.8	102.4
	1000	977	982	984	97.7	98.2	98.4
correlation coefficient	0.9998	0.9997	0.9997				

Table 3 Calibration curves for (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in mouse brain

Analyte	Nominal concentration (ng/g)	Back-calculated concentration (ng/g)			Accuracy (%)		
		1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
<i>(R)</i> -Ketamine	0.500	0.485	0.499	0.505	97.0	99.7	100.9
	1.50	1.62	1.52	1.45	108.0	101.1	96.5
	5.00	5.15	4.86	5.07	103.1	97.3	101.4
	15.0	15.2	15.8	15.3	101.3	105.2	102.2
	50.0	48.8	50.0	51.5	97.6	100.0	102.9
	150	151	154	154	100.5	102.7	102.9
	500	462	470	465	92.5	94.0	93.1
	correlation coefficient	0.9985	0.9992	0.9992			
<i>(S)</i> -Ketamine	0.500	0.489	0.494	0.488	97.7	98.8	97.6
	1.50	1.60	1.54	1.60	106.7	102.9	106.8
	5.00	4.98	5.05	5.00	99.6	101.1	99.9
	15.0	15.3	15.5	15.4	101.8	103.5	102.6
	50.0	49.8	50.7	51.2	99.7	101.3	102.3
	150	153	151	148	101.7	100.8	98.6
	500	464	458	460	92.8	91.6	92.0
	correlation coefficient	0.9989	0.9990	0.9987			
<i>(R)</i> -Norketamine	0.500	0.491	0.497	0.501	98.3	99.4	100.2
	1.50	1.57	1.53	1.49	104.4	101.8	99.4
	5.00	5.11	4.95	4.98	102.2	98.9	99.6
	15.0	15.4	15.6	15.2	102.6	104.0	101.3
	50.0	49.0	50.1	50.7	98.0	100.2	101.3
	150	150	154	156	100.2	102.9	103.7
	500	472	464	472	94.4	92.8	94.4
	correlation coefficient	0.9993	0.9992	0.9995			
<i>(S)</i> -Norketamine	0.500	0.489	0.495	0.482	97.9	99.1	96.4
	1.50	1.60	1.53	1.66	106.6	102.1	110.9
	5.00	4.95	5.05	5.00	98.9	100.9	99.9
	15.0	15.2	15.6	14.9	101.5	103.8	99.5
	50.0	49.2	50.3	50.9	98.5	100.5	101.8
	150	150	150	146	99.9	100.2	97.3
	500	484	467	471	96.8	93.4	94.3
	correlation coefficient	0.9994	0.9994	0.9983			
<i>(2R,6R)</i> -HNK	1.50	1.50	1.49	1.51	99.9	99.2	100.9
	5.00	4.99	5.12	4.82	99.8	102.5	96.5
	15.0	15.2	15.0	15.1	101.2	100.2	101.0
	50.0	50.4	50.0	50.4	100.8	100.0	100.7
	150	150	149	151	100.0	99.4	100.6
	500	491	494	501	98.3	98.7	100.3
	correlation coefficient	0.9999	0.9999	0.9998			
<i>(2S,6S)</i> -HNK	1.50	1.49	1.49	1.51	99.3	99.6	100.5
	5.00	5.11	5.05	4.90	102.2	101.0	98.0
	15.0	15.0	15.1	15.1	100.2	101.0	100.9
	50.0	50.2	50.3	50.2	100.5	100.5	100.5
	150	149	150	151	99.6	100.1	100.3
	500	491	489	499	98.2	97.8	99.8
	correlation coefficient	0.9999	0.9999	0.9999			

Table 4 Calibration curves for (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in saline for mouse cerebrospinal fluid

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Back-calculated concentration (ng/mL)			Accuracy (%)		
		1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
<i>(R)</i> -Ketamine	2.00	2.00	1.94	1.98	99.8	97.2	99.2
	6.00	6.01	6.49	6.03	100.1	108.1	100.4
	20.0	20.1	20.0	21.1	100.3	99.9	105.7
	60.0	62.4	62.4	61.6	104.0	104.0	102.6
	200	204	201	208	102.1	100.5	103.8
	600	608	578	578	101.3	96.3	96.3
	2000	1850	1880	1840	92.4	93.9	92.0
	correlation coefficient	0.9992	0.9986	0.9987			
<i>(S)</i> -Ketamine	2.00	2.01	1.99	1.99	100.3	99.3	99.5
	6.00	5.87	6.02	5.97	97.8	100.4	99.6
	20.0	20.6	20.6	20.9	102.8	103.1	104.7
	60.0	63.2	64.5	62.5	105.3	107.5	104.2
	200	206	200	201	103.1	100.0	100.4
	600	593	594	582	98.8	99.1	97.0
	2000	1840	1810	1890	92.0	90.6	94.6
	correlation coefficient	0.9989	0.9985	0.9992			
<i>(R)</i> -Norketamine	2.00	2.00	2.01	1.95	100.1	100.5	97.6
	6.00	5.96	5.87	6.28	99.3	97.8	104.7
	20.0	20.1	20.3	21.5	100.6	101.3	107.4
	60.0	61.8	61.2	61.0	103.0	101.9	101.6
	200	208	205	203	103.8	102.5	101.5
	600	594	598	579	99.0	99.7	96.5
	2000	1890	1920	1810	94.3	96.2	90.6
	correlation coefficient	0.9994	0.9997	0.9982			
<i>(S)</i> -Norketamine	2.00	2.01	1.95	1.95	100.5	97.4	97.3
	6.00	5.81	6.40	6.38	96.8	106.7	106.4
	20.0	21.0	20.5	20.9	105.0	102.6	104.7
	60.0	61.2	62.4	61.6	102.0	103.9	102.7
	200	201	199	202	100.5	99.3	101.0
	600	597	590	580	99.5	98.3	96.7
	2000	1910	1830	1820	95.7	91.7	91.1
	correlation coefficient	0.9994	0.9986	0.9983			
<i>(2R,6R)</i> -HNK	6.00	6.01	6.00	6.01	100.2	100.0	100.2
	20.0	20.0	20.0	19.8	99.9	100.1	99.2
	60.0	58.9	59.7	60.0	98.2	99.6	100.0
	200	201	200	198	100.5	100.0	98.9
	600	605	616	611	100.8	102.7	101.9
	2000	2010	1950	1990	100.4	97.6	99.7
	correlation coefficient	0.9999	0.9998	0.9999			
<i>(2S,6S)</i> -HNK	6.00	6.01	5.99	6.02	100.2	99.8	100.4
	20.0	19.8	20.0	19.7	99.2	99.9	98.5
	60.0	60.0	61.4	60.0	99.9	102.4	100.0
	200	202	199	202	101.0	99.3	100.8
	600	599	615	607	99.9	102.5	101.1
	2000	1990	1920	1980	99.7	96.0	99.2
	correlation coefficient	1.0000	0.9997	0.9999			

Table 5 Accuracy and precision for the determination of (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in mouse plasma

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)		
		Mean (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)	Mean (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)
<i>(R)</i> -Ketamine	3	2.94	98.0	5.2	2.96	98.7	7.9
	30	30.5	101.7	1.4	30.5	101.7	1.9
	800	789	98.6	1.9	778	97.3	3.0
<i>(S)</i> -Ketamine	3	3.18	106.0	4.1	3.10	103.3	3.9
	30	31.0	103.3	1.8	30.7	102.3	1.9
	800	763	95.4	1.3	752	94.0	2.4
<i>(R)</i> -Norketamine	3	2.90	96.7	5.6	3.05	101.7	5.6
	30	30.8	102.7	1.7	30.6	102.0	1.8
	800	789	98.6	1.6	774	96.8	2.3
<i>(S)</i> -Norketamine	3	3.02	100.7	5.5	2.99	99.7	5.5
	30	31.1	103.7	1.1	30.5	101.7	2.2
	800	781	97.6	1.2	767	95.9	1.6
<i>(2R,6R)</i> -HNK	9	8.23	91.4	1.3	8.10	90.0	2.7
	80	75.8	94.8	0.6	75.6	94.5	1.1
	800	798	99.8	1.1	786	98.3	1.4
<i>(2S,6S)</i> -HNK	9	8.09	89.9	1.6	8.12	90.2	1.8
	80	76.1	95.1	0.9	75.6	94.5	1.0
	800	790	98.8	1.1	778	97.3	1.3

Table 6 Accuracy and precision for the determination of (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in mouse brain

Analyte	Nominal concentration (ng/g)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)		
		Mean (ng/g)	Accuracy (%)	CV (%)	Mean (ng/g)	Accuracy (%)	CV (%)
<i>(R)</i> -Ketamine	1.5	1.62	108.0	3.3	1.55	103.3	4.3
	15	15.5	103.3	0.9	15.7	104.7	2.0
	400	388	97.0	2.1	397	99.3	2.6
<i>(S)</i> -Ketamine	1.5	1.55	103.3	2.2	1.56	104.0	4.6
	15	15.7	104.7	2.0	15.8	105.3	2.0
	400	384	96.0	1.8	387	96.8	2.3
<i>(R)</i> -Norketamine	1.5	1.48	98.7	6.6	1.51	100.7	5.6
	15	15.5	103.3	1.1	15.7	104.7	1.9
	400	393	98.3	1.6	396	99.0	1.8
<i>(S)</i> -Norketamine	1.5	1.49	99.3	2.4	1.54	102.7	4.7
	15	15.3	102.0	2.3	15.6	104.0	2.2
	400	388	97.0	2.3	391	97.8	2.2
<i>(2R,6R)</i> -HNK	4.5	4.23	94.0	1.3	4.36	96.9	2.9
	40	39.1	97.8	1.0	39.5	98.8	1.5
	400	394	98.5	0.5	390	97.5	1.8
<i>(2S,6S)</i> -HNK	4.5	4.35	96.7	1.1	4.39	97.6	1.3
	40	39.1	97.8	0.5	39.5	98.8	1.3
	400	390	97.5	0.3	387	96.8	1.3

Table 7 Accuracy and precision for the determination of (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in saline for mouse cerebrospinal fluid

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)		
		Mean (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)	Mean (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)
<i>(R)</i> -Ketamine	6	5.72	95.3	5.5	5.89	98.2	4.7
	60	58.2	97.0	2.1	59.2	98.7	1.9
	1600	1450	90.6	0.5	1460	91.3	1.0
<i>(S)</i> -Ketamine	6	5.77	96.2	3.9	5.95	99.2	4.2
	60	60.2	100.3	3.0	60.2	100.3	2.1
	1600	1460	91.3	1.9	1450	90.6	1.4
<i>(R)</i> -Norketamine	6	6.11	101.8	4.7	5.95	99.2	4.9
	60	59.4	99.0	1.6	59.9	99.8	1.8
	1600	1490	93.1	1.4	1490	93.1	2.1
<i>(S)</i> -Norketamine	6	5.70	95.0	2.8	5.92	98.7	4.9
	60	60.2	100.3	2.1	60.0	100.0	1.4
	1600	1500	93.8	0.8	1470	91.9	2.1
<i>(2R,6R)</i> -HNK	18	18.4	102.2	1.1	18.4	102.2	6.4
	160	166	103.8	1.7	163	101.9	2.0
	1600	1650	103	0.9	1630	101.9	3.0
<i>(2S,6S)</i> -HNK	18	18.3	101.7	0.9	18.2	101.1	6.5
	160	165	103.1	1.3	163	101.9	1.6
	1600	1630	101.9	0.5	1620	101.3	2.4

Table 8 Stability of (*R,S*)-ketamine, (*R,S*)-norketamine, and (*2R,6R;2S,6S*)-HNK enantiomers in mouse plasma, brain, and cerebrospinal fluid

Matrix	Analyte	Nominal concentration (ng/mL or ng/g)	Remaining (%)			
			RT	FT	LT	AS
Plasma	<i>(R)</i> -Ketamine	3	106.6	104.4	95.7	109.7
		800	90.0	89.1	89.2	96.6
	<i>(S)</i> -Ketamine	3	102.2	103.2	94.1	107.0
		800	89.3	88.7	88.7	97.0
	<i>(R)</i> -Norketamine	3	105.4	99.8	93.0	103.7
		800	87.5	88.2	89.6	92.0
	<i>(S)</i> -Norketamine	3	104.1	102.6	94.1	106.7
		800	86.9	86.2	86.6	91.4
	<i>(2R,6R)</i> -HNK	9	91.1	92.2	96.0	91.4
		800	100.0	99.4	95.2	95.3
	<i>(2S,6S)</i> -HNK	9	94.4	93.3	90.4	90.1
		800	99.7	98.8	96.3	95.3
Brain	<i>(R)</i> -Ketamine	1.5	98.2	94.5	89.1	102.7
		400	92.4	93.5	94.3	92.3
	<i>(S)</i> -Ketamine	1.5	104.0	102.5	100.7	108.7
		400	92.3	91.0	94.6	90.0
	<i>(R)</i> -Norketamine	1.5	106.2	102.2	92.7	104.0
		400	92.0	92.3	86.6	92.8
	<i>(S)</i> -Norketamine	1.5	106.0	103.5	91.5	108.7
		400	91.9	91.9	87.9	89.5
	<i>(2R,6R)</i> -HNK	4.5	97.8	95.6	95.3	100.4
		400	97.3	98.1	98.6	99.0
	<i>(2S,6S)</i> -HNK	4.5	95.6	97.8	96.2	98.0
		400	97.5	98.2	97.6	97.5
Cerebrospinal fluid	<i>(R)</i> -Ketamine	6	107.0	92.9	105.6	104.0
	<i>(S)</i> -Ketamine	6	97.3	98.2	110.1	107.2
	<i>(R)</i> -Norketamine	6	91.6	88.5	100.1	97.8
	<i>(S)</i> -Norketamine	6	96.5	88.8	105.5	99.5
	<i>(2R,6R)</i> -HNK	18	99.4	101.3	96.9	97.2
	<i>(2S,6S)</i> -HNK	18	97.8	100.4	98.0	98.9

Data are represented as the mean of three samples.

RT: room temperature (4 hours). FT: freeze/thaw (3 cycles). LT: long term (-30°C, at least 16 weeks for (*R,S*)-ketamine and (*R,S*)-norketamine, and -30°C, 4 weeks for (*2R,6R;2S,6S*)-HNK), AS: auto-sampler (at 15°C, 96 hours)

3. 考察

これまでに生体試料中の(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 又は(*2R,6R;2S,6S*)-HNK の立体選択的な測定法として、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography: GC)、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) 及びキャピラリー電気泳動などが報告されている [23, 29-32]。しかし、これらの方法には測定に供する前に煩雑な誘導体化が必要、選択性、スループット性、あるいは汎用性などの問題がある。

LC-MS/MS は、その測定原理上、不揮発性で極性の高い化合物をも直接測定可能であり、卓越した感度に加え、選択性が高いことから、生体試料中微量物質の高感度定量、すなわち、バイオアナリシスに汎用されている。実際、LC-MS/MS による(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 又は(*2R,6R;2S,6S*)-HNK の立体選択的濃度測定法がいくつか報告されている [25, 26]。しかし、いずれの方法も、本節の序項で記述した通り著者の研究にそのまま適用できるものではなかった。そこで、新たにマウス血漿、脳及び脳脊髄液中の(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 及び(*2R,6R;2S,6S*)-HNK の立体選択的 LC-MS/MS アッセイ法を構築することにした。本節にて構築した方法は、IS として(*R,S*)-²H₄-norketamine を含むアセトニトリル/メタノール (9:1、v/v) を用いて極微量の生体試料 (血漿 5 µL、脳 10 mg、脳脊髄液 2.5 µL 相当) を除タンパクし、得られた遠心上清を LC-MS/MS システムに直接注入後、分離条件 1 で(*R,S*)-ketamine 及び(*R,S*)-norketamine を、分離条件 2 で(*2R,6R;2S,6S*)-HNK を光学分割し、エレクトロスプレーイオン化-選択反応モニタリングで検出する方法である。*(R,S)*-Ketamine 及び(*R,S*)-norketamine の各エナンチオマーの定量下限は 1 ng/mL (血漿)、0.5 ng/g (脳) 及び 2 ng/mL (脳脊髄液)、(*2R,6R;2S,6S*)-HNK については 3 ng/mL (血漿)、1.5 ng/g (脳) 及び 6 ng/mL (脳脊髄液) であり、検量線範囲は 1000 又は 333 倍の範囲で良好な直線性が得られた。*(R,S)*-Ketamine 及び(*R,S*)-norketamine の測定時間は 5 分、(*2R,6R;2S,6S*)-HNK は 30 分であり、従来法に比べ大幅に測定時間を短縮できた (1 分析あたり 80 分必要であったものを 35 分に短縮)。さらに本法の測定感度は極めて高く、測定に

必要な生体試料は極微量である。そのため、マウス個体毎の PK プロファイルが解明可能となり、動物愛護、すなわち、世界的な動物実験の基本理念である 3R (Replacement: 代替法の活用、Reduction: 使用動物数の削減、Refinement: 動物の苦痛の軽減) の観点からも有用といえる。

LC-MS/MS 測定において、マトリックス効果による検出感度や堅牢性への影響が大きな問題となる。そのため、高感度かつ高選択性を誇る LC-MS/MS システムを用いたとしても、微量な測定対象物質を感度良く適切に測定するためには、マトリックス効果の回避、すなわち、適切な試料前処理が不可欠である。今回著者は、スループット性を重視し、最も簡便な有機溶媒による除タンパク法を前処理法として採用したにもかかわらず、目標感度を達成することができた。その主な理由は、クロマトグラフィー条件の最適化により、①移動相由来の電解質に起因する測定対象物質の感度低下を抑えるとともに、測定対象物質をカラムからシャープなピークとして溶出させることで、十分な S/N 比が得られたこと、②測定対象物と生体試料中の夾雑物の分離が適切に行われ、マトリックス効果を十分に回避できたこと、などが挙げられる。

LC-MS/MS 測定において、信頼性の高い分析結果を得るためには、マトリックス効果や抽出効率、クロマトグラフィー挙動などの分析パラメータのばらつきを補正可能な安定同位体標識化合物を IS として使用することが推奨されている。このため、本来ならば (*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 及び (*2R,6R;2S,6S*)-HNK の定量には、それぞれの安定同位体標識化合物を IS として使用すべきである。しかし、安定同位体標識された (*R,S*)-ketamine は、(*R,S*)-ketamine 同様、厳重な管理が必要な麻薬として取り扱わなければならないため、本研究では管理上の制約を受けない (*R,S*)-²H₄-norketamine のみを IS として使用し、(*R,S*)-ketamine 及び (*R,S*)-norketamine の定量を行うことにした。一方、(*2R,6R;2S,6S*)-HNK については、その安定同位体標識化合物を入手できなかったことに加え、(*R,S*)-²H₄-norketamine とのクロマトグラフィー挙動があまりにも異なるため、検量線の作成には IS

を使用しない絶対検量線法を採用した。このように本測定法では、ISの使用についてイレギュラーな対応を取ったが、この測定戦略が可能となったのは、効果的なクリーンアップの達成と本法の高い堅牢性によるものであり、一連のバリデーション試験の結果からも本測定法の高い信頼性が実証された。

以上、本節にて構築した簡便迅速かつ高感度な(*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine、(*2R,6R;2S,6S*)-HNKの立体選択的LC-MS/MSアッセイ法は、冒頭で掲げた3つの条件をクリアするものであり、(*R*)-ketamineの抗うつ作用本体の特定を目的とするPK/PD解析に合致した濃度測定法と判断された。

第2節 (R)-Ketamine の抗うつ作用に対する代謝物の寄与

1. 序

2014年に世界で初めて、齧歯類において、(R)-ketamine が(S)-ketamine より強力かつ持続的な抗うつ作用を示すことが報告された [15]。その2年後、Nature 誌に本知見を裏付けるデータが掲載されたのを境に、多くの研究者が(R)-ketamine の抗うつ作用に注目するようになった [19]。その一方で、Zanosらは、(R)-ketamine の主要代謝物の一つである(2R,6R)-HNK もまた、即効かつ持続的な抗うつ作用を示すことを見出し、(R,S)-ketamine の抗うつ作用には、(2R,6R;2S,6S)-HNK への代謝反応、すなわち、(2R,6R)-HNK の生成が不可欠であると主張した [19]。これに対し、橋本らのグループは、(R)-ketamine が抗うつ作用を示した3種類のうつ病モデルにおいて、(2R,6R)-HNK が作用しなかったことを報告した [21]。さらに、極微量の(R)-ketamine (4 µg) を脳内に直接投与することで、抗うつ作用が認められることも報告しており [33]、(2R,6R)-HNK が(R,S)-ketamine の抗うつ作用の本体であるという主張には疑問が残る。(R)-ketamine のもう一つの主要代謝物である(R)-norketamine についても、マウスで抗うつ作用を示すことが報告されているが、その作用は弱い [20]。これらの報告は、齧歯類における(R)-ketamine の抗うつ作用の本体は、(R)-ketamine そのものであり、主要代謝物である(R)-norketamine や(2R,6R)-HNK ではないことを示唆している。しかし、これらの知見は、いずれも投与量での比較によるものであり、本来、加味されるべき曝露量の観点から(R)-ketamine の抗うつ作用における代謝物の寄与については、論じられていない。

そこで本節では、第1節で構築したLC-MS/MSアッセイ法を用いてPKとPDとの関連性を検討し、(R)-ketamine の抗うつ作用に対する主要代謝物、すなわち、(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK の寄与を検討することで、これまで不明であった(R)-ketamine の抗うつ作用本体の特定を試みた。

2. 結果

2.1. LPS誘発うつ病モデルマウスにおける(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine及び(*2R,6R*)-HNKの抗うつ作用

Lipopolysaccharide (LPS) 誘発うつ病モデルマウスに(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 又は(*2R,6R*)-HNK (いずれも 10 mg/kg) を、それぞれ単回腹腔内投与後3時間における抗うつ作用を評価した。強制水泳試験において、LPS 処理したマウスの無動時間は有意に延長され、うつ様行動が認められた (Figure 10A)。これに対し、(*R*)-ketamine は無動時間の延長を抑制し、うつ様行動を改善した (Figure 10A)。一方、(*R*)-norketamine 及び(*2R,6R*)-HNK は、無動時間の延長を抑制しなかった (Figure 10A)。なお、全ての群において、自発運動量に差がなかったことから、LPS 又は被験物質投与によって、運動機能は障害されていないと考えられた (Figure 10B)。

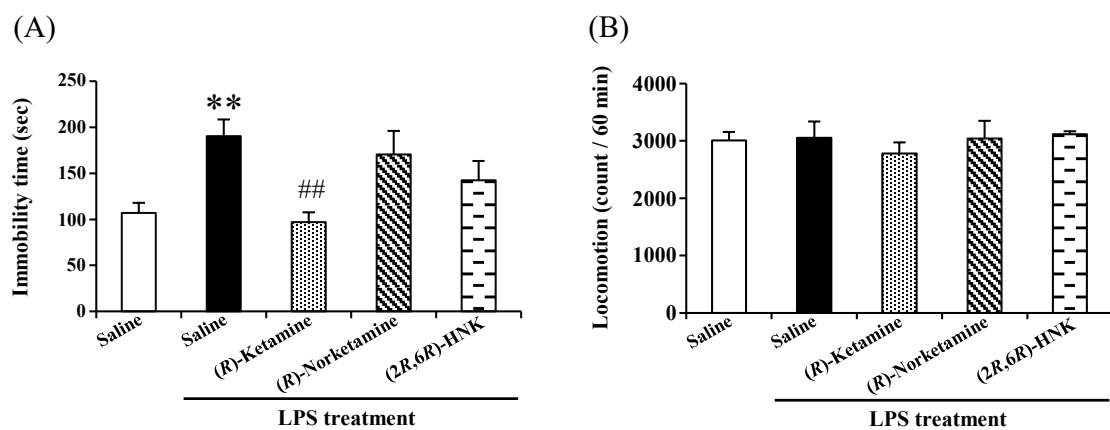


Figure 10 Effects of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK in the LPS-induced inflammation model. Each compound (10 mg/kg) was administered intraperitoneally at 3 hours prior to the forced swimming test. (A) Effects of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK on the LPS-induced increase in the immobility time during the forced swimming test (one-way analysis of variance, $F_{4,35} = 5.553$, $P = 0.001$). (B) Effects of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK in the locomotion test ($F_{4,35} = 0.356$, $P = 0.838$). Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 8$). ** $P < 0.01$ compared with saline, ## $P < 0.01$ compared with saline-LPS treatment.

次に、抗うつ作用の評価と同条件で投与後のマウス血漿、脳及び脳脊髄液中(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK 濃度を測定した。(*R*)-Ketamine は投与後、速やかに吸収され、(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の血漿中濃度は、それぞれ 5、15 及び 15 分に最高血漿中濃度 (maximum concentration: C_{max}) に到達した。その後、いずれも速やかに消失し、投与後 3 時間には C_{max} の 6%以下に減少した (Figure 11 及び Table 9)。(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の投与後 3 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve from time 0 to 3 h: AUC_{0-3h}) は、それぞれ 249、658 及び 326 h·ng/mL であった (Table 9)。また、最高血漿中濃度到達時間 (time to maximum plasma concentration: t_{max}) における(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の脳並びに脳脊髄液中濃度は、それぞれ 6520、4910 及び 483 ng/g 並びに 1230、895 及び 229 ng/mL であった (Figure 12 及び Table 10)。

(*R*)-Ketamine と同様に、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK は、いずれも投与後、速やかに吸収された。(*R*)-Norketamine 投与後の(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の血漿 t_{max} における血漿、脳及び脳脊髄液中濃度は、いずれも(*R*)-ketamine 投与後の(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の濃度よりも高かった。(2*R*,6*R*)-HNK 投与後の(2*R*,6*R*)-HNK の血漿 t_{max} においても、血漿、脳及び脳脊髄液中濃度は、(*R*)-ketamine 投与後の(2*R*,6*R*)-HNK 濃度よりも高く、 AUC_{0-3h} についても、(*R*)-ketamine 投与後に比べて、(2*R*,6*R*)-HNK 投与後の方が高かった (Figure 12 並びに Table 9 及び 10)。なお、血漿、脳及び脳脊髄液のいずれの時点においても、(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK のキラルインバージョンは認められなかった。

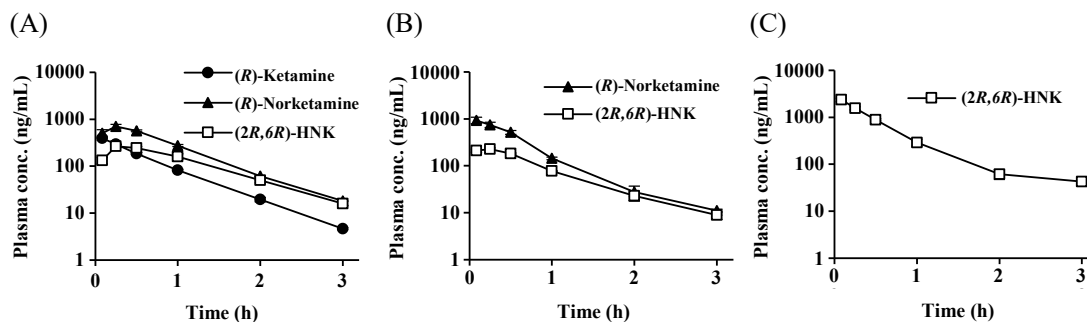


Figure 11 Plasma concentration-time profiles after a single intraperitoneal administration of (*R*)-ketamine (A), (*R*)-norketamine (B), or (*2R,6R*)-HNK (C) at 10 mg/kg. The plasma levels are represented as the mean \pm SEM ($n = 3$).

Table 9 Pharmacokinetic parameters of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK after a single intraperitoneal administration of each compound (10 mg/kg).

Administered compound	Analyte	C_{\max} (ng/mL)	t_{\max} (min)	AUC_{0-3h} (h·ng/mL)
(<i>R</i>)-Ketamine	(<i>R</i>)-Ketamine	394 ± 39.0	5	249 ± 10.0
	(<i>R</i>)-Norketamine	701 ± 73.9	15	658 ± 40.2
	(<i>2R,6R</i>)-HNK	264 ± 18.5	15	326 ± 28.6
(<i>R</i>)-Norketamine	(<i>R</i>)-Norketamine	931 ± 148	5	566 ± 38.6
	(<i>2R,6R</i>)-HNK	228 ± 13.6	15	217 ± 1.45
(<i>2R,6R</i>)-HNK	(<i>2R,6R</i>)-HNK	2360 ± 205	5	1180 ± 56.9

Data except t_{\max} are represented as the mean \pm SEM ($n = 3$). The t_{\max} is represented as the mean of three mice.

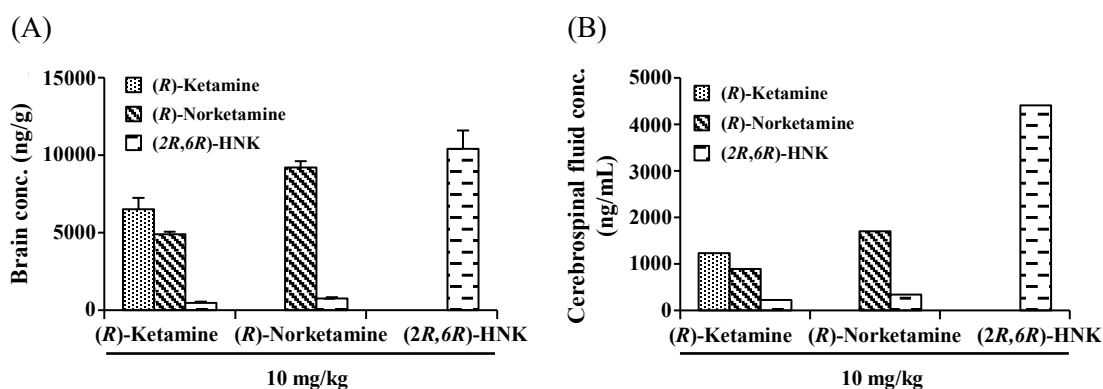


Figure 12 Brain (A) and cerebrospinal fluid (B) concentrations of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK at the time points (5 or 15 minutes) corresponding to their plasma t_{max} after a single intraperitoneal administration of each compound (10 mg/kg). Brain concentrations are represented as the mean \pm SEM (n=3). Each cerebrospinal fluid concentration represents a value derived from a pooled cerebrospinal fluid specimen collected from three mice.

Table 10 Plasma, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK at 5 and 15 minutes after a single intraperitoneal administration of each compound (10 mg/kg).

Administered compound	Matrix	Time (min)	(<i>R</i>)-Ketamine		(<i>R</i>)-Norketamine		(<i>2R,6R</i>)-HNK	
			(ng/mL or ng/g)	T/P	(ng/mL or ng/g)	T/P	(ng/mL or ng/g)	T/P
(<i>R</i>)-Ketamine	Plasma	5	2130 \pm 343	-	1560 \pm 405	-	134 \pm 36.8	-
		15	1470 \pm 287	-	2170 \pm 37.9	-	383 \pm 42.1	-
	Brain	5	6520 \pm 722	3.1	2990 \pm 860	1.9	121 \pm 46.2	0.9
		15	5530 \pm 797	3.8	4910 \pm 162	2.3	483 \pm 79.7	1.3
	Cerebrospinal fluid	5	1230	0.6	602	0.4	66.4	0.5
		15	785	0.5	895	0.4	229	0.6
(<i>R</i>)-Norketamine	Plasma	5	-	-	3530 \pm 282	-	278 \pm 83.1	-
		15	-	-	1800 \pm 125	-	580 \pm 34.8	-
	Brain	5	-	-	9210 \pm 400	2.6	240 \pm 126	0.9
		15	-	-	3340 \pm 439	1.9	762 \pm 81.4	1.3
	Cerebrospinal fluid	5	-	-	1700	0.5	154	0.6
		15	-	-	556	0.3	343	0.6
(<i>2R,6R</i>)-HNK	Plasma	5	-	-	-	-	8360 \pm 1730	-
		15	-	-	-	-	3180 \pm 217	-
	Brain	5	-	-	-	-	10400 \pm 1190	1.2
		15	-	-	-	-	4300 \pm 260	1.4
	Cerebrospinal fluid	5	-	-	-	-	4410	0.5
		15	-	-	-	-	2230	0.7

T/P: tissue/plasma concentration ratio. Plasma and brain concentrations are represented as the mean \pm SEM (n=3). Each cerebrospinal fluid concentration represents a value derived from a pooled cerebrospinal fluid specimen collected from three mice.

-: not applicable.

2.2. LPS 誘発うつ病モデルマウスにおける(*R*)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝酵素阻害剤の影響

初めに、LPS 誘発うつ病モデルマウスを用いて、代謝酵素 (CYP) 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (1-ABT) 及びチクロピジン処理による(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(*2R,6R*)-HNK の血漿、脳及び脳脊髄液中濃度への影響を検討した。

LPS 誘発うつ病モデルマウスに(*R*)-ketamine (3 又は 10 mg/kg) を単回腹腔内投与後の血漿中(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(*2R,6R*)-HNK 濃度は、いずれも用量に応じて増加し、それぞれ 5、15 及び 15 分に C_{max} に到達した (Figure 13A 及び C 並びに Table 11)。代謝酵素阻害剤で処理したマウスに(*R*)-ketamine (3 mg/kg) を単回腹腔内投与後の(*R*)-ketamine の C_{max} 及び AUC_{0-3h} は、いずれも増加し、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) のみを投与したときに比べて C_{max} は同等、 AUC_{0-3h} は 2.6 倍高かった。一方、(*2R,6R*)-HNK の血漿中濃度は、阻害剤処理によって、全ての時点において定量下限未満 (< 3 ng/mL) に低下し、(*2R,6R*)-HNK の生成が完全に阻害された (Figure 13B、D 及び E 並びに Table 11)。(*R*)-Norketamine については、阻害剤処理によって、 C_{max} は変動せず、 AUC_{0-3h} は増加した (Figure 13D 及び E 並びに Table 11)。また、阻害剤処理の有無によって、(*R*)-ketamine 及び(*R*)-norketamine の脳/血漿中濃度比及び脳脊髄液/血漿中濃度比が変動しなかったことから、阻害剤は(*R*)-ketamine 及び(*R*)-norketamine の脳及び脳脊髄液への移行性に影響しないと考えられた (Table 12)。

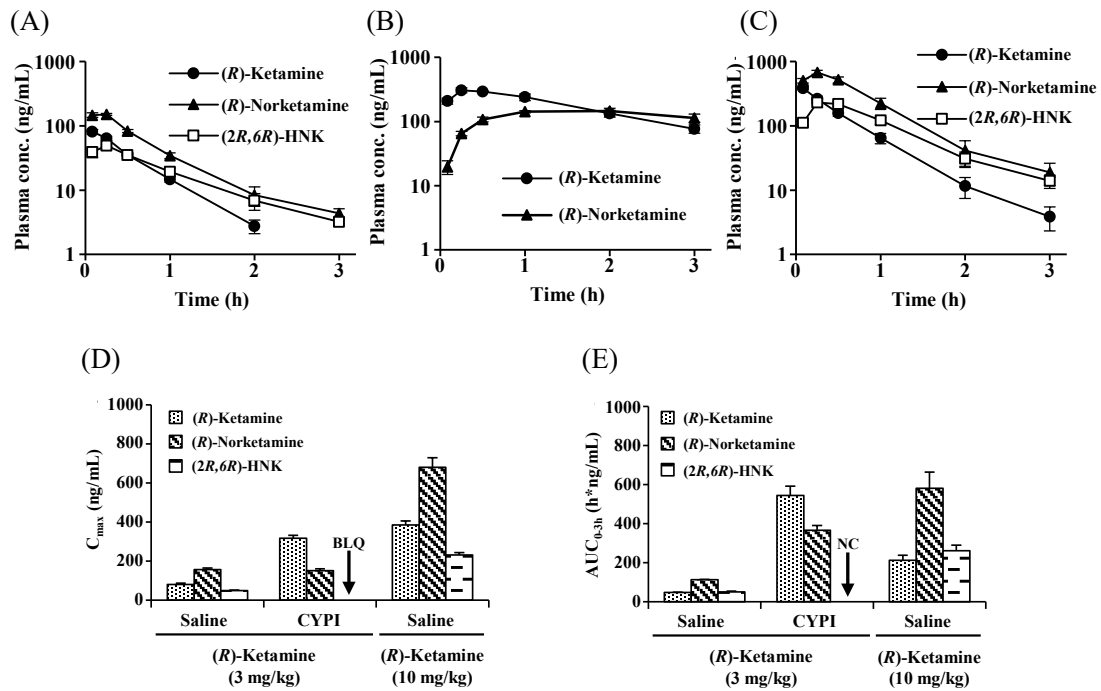


Figure 13 Effects of CYP inhibitors (CYPI) on the pharmacokinetic profiles of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK in LPS-treated mice. Plasma concentration-time profiles of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK after a single intraperitoneal administration of (*R*)-ketamine (3 mg/kg) without (A) and with CYPI pretreatment (B), and (*R*)-ketamine (10 mg/kg) without CYPI pretreatment (C). Effect of CYPI pretreatment on the plasma C_{max} (D) and AUC_{0-3h} (E) of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK. Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 3$).

BLQ: below the lower limit of quantification, NC: not calculated.

Table 11 Effect of CYPI on pharmacokinetic parameters of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK after a single intraperitoneal administration of (*R*)-ketamine in LPS-treated mice.

Data are represented as the mean \pm SEM (n = 3).

Dose (mg/kg)	CYPI	Analyte	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-3h} (h·ng/mL)
3	-	(<i>R</i>)-Ketamine	81.1 \pm 6.99	47.1 \pm 1.44
		(<i>R</i>)-Norketamine	157 \pm 8.37	112 \pm 2.33
		(<i>2R,6R</i>)-HNK	49.7 \pm 2.61	49.4 \pm 4.66
3	+	(<i>R</i>)-Ketamine	317 \pm 16.0	543 \pm 48.3
		(<i>R</i>)-Norketamine	152 \pm 9.24	366 \pm 23.7
		(<i>2R,6R</i>)-HNK	BLQ	NC
10	-	(<i>R</i>)-Ketamine	385 \pm 21.5	211 \pm 26.2
		(<i>R</i>)-Norketamine	681 \pm 47.9	580 \pm 83.7
		(<i>2R,6R</i>)-HNK	232 \pm 11.5	260 \pm 29.2

Table 12 Plasma, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK at 30 minutes after a single intraperitoneal administration of (*R*)-ketamine (3 mg/kg) without or with CYPI pretreatment, and (*R*)-ketamine (10 mg/kg) without CYPI pretreatment in LPS-treated mice.

Dose (mg/kg)	CYPI	Matrix	(<i>R</i>)-Ketamine		(<i>R</i>)-Norketamine		(<i>2R,6R</i>)-HNK	
			(ng/mL or ng/g)	T/P	(ng/mL or ng/g)	T/P	(ng/mL or ng/g)	T/P
3	-	Plasma	41.0 \pm 3.94	-	113 \pm 6.52	-	56.6 \pm 4.87	-
		Brain	146 \pm 12.9	3.6	237 \pm 13.7	2.1	80.5 \pm 8.31	1.4
		Cerebrospinal fluid	23.1	0.6	51.1	0.5	49.0	0.9
3	+	Plasma	485 \pm 14.7	-	176 \pm 7.10	-	BLQ	-
		Brain	1840 \pm 115	3.8	318 \pm 11.1	1.8	1.86 \pm 0.0484	NC
		Cerebrospinal fluid	304	0.6	63.2	0.4	BLQ	NC
10	-	Plasma	224 \pm 11.0	-	722 \pm 27.4	-	396 \pm 29.7	-
		Brain	739 \pm 23.4	3.3	1390 \pm 37.9	1.9	518 \pm 37.8	1.3
		Cerebrospinal fluid	101	0.5	240	0.3	226	0.6

Plasma and brain concentrations are represented as the mean \pm SEM (n=3). Each cerebrospinal fluid concentration represents a value derived from a pooled cerebrospinal fluid specimen collected from three mice.

次に、LPS 誘発うつ病モデルマウスに(*R*)-ketamine を単回腹腔内投与後 3 時間の抗うつ作用に対する代謝酵素阻害剤の影響を検討した。その結果、強制水泳試験において、(*R*)-ketamine (3 mg/kg) は、無動時間の延長を抑制しなかったが、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) は

有意に抑制した (Figure 14A)。一方、(R)-ketamine (3 mg/kg) は、代謝酵素阻害剤処理によって、無動時間の延長を有意に抑制し、抗うつ作用と血漿中(R)-ketamine 濃度との間に相関が認められた (Figure 13 及び 14 並びに Table 11)。なお、全ての群において、自発運動量に差がなかったことから、LPS、代謝酵素阻害剤又は被験物質投与によって、運動機能は障害されていないと考えられた (Figure 14B)。

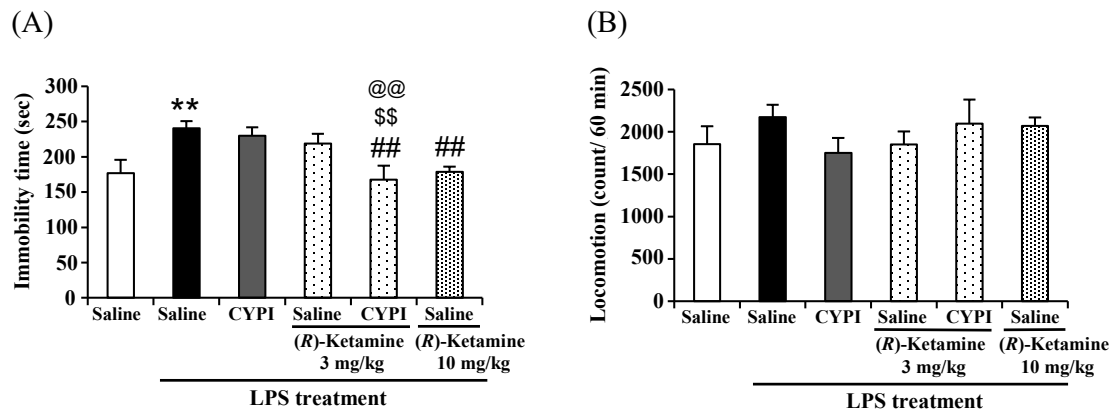


Figure 14 Effects of CYPI on the antidepressant effects of (R)-ketamine in the LPS-induced inflammation model. (A) Effects of (R)-ketamine on the LPS-increased immobility in the forced swimming test in the presence or absence of CYPI (one-way analysis of variance, $F_{5,42} = 4.707$, $P = 0.002$). (B) Effects of (R)-ketamine on the locomotion test in the presence or absence of CYPI ($F_{5,42} = 0.804$, $P = 0.553$). Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 8$). ** $P < 0.01$ compared with saline, ## $P < 0.01$ compared with saline-LPS treatment, @@ $P < 0.01$ compared with CYPI-LPS treatment, \$\$ $P < 0.01$ compared with saline/(R)-ketamine (3 mg/kg)-LPS treatment.

2.3. ナイーブマウスにおける(R)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝酵素阻害剤の影響

薬物等の処理が施されていない ICR マウス (ナイーブマウス) を用いて、代謝酵素阻害剤処理による(R)-ketamine、(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK の血漿中濃度への影響を検討した。

ナイーブマウスに(R)-ketamine (10 又は 30 mg/kg) をそれぞれ単回腹腔内投与後の血漿中(R)-ketamine、(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK 濃度は、5、15 及び 15 分に C_{max} に到達後、速やかに消失し、24 時間後には定量下限未満 (< 1 又は 3 ng/mL) に減少した (Figure 15A

及び C)。未変化体及び代謝物の血漿中濃度は、いずれも用量に応じて増加した。代謝酵素阻害剤処理したナীবマウスに(*R*)-ketamine を 10 mg/kg 単回腹腔内投与後の血漿中(*R*)-ketamine 及び(*R*)-norketamine 濃度は、いずれも増加し、(*R*)-ketamine (30 mg/kg) のみを投与したときに比べて、(*R*)-ketamine の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ は同等及び 2.2 倍高く、(*R*)-norketamine の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ は、0.4 倍及び同程度であった。一方、(2*R,6R*)-HNK の血漿中濃度は、著しく低下し、LLOQ レベルであった (Figure 15B、D 及び E 並びに Table 13)。

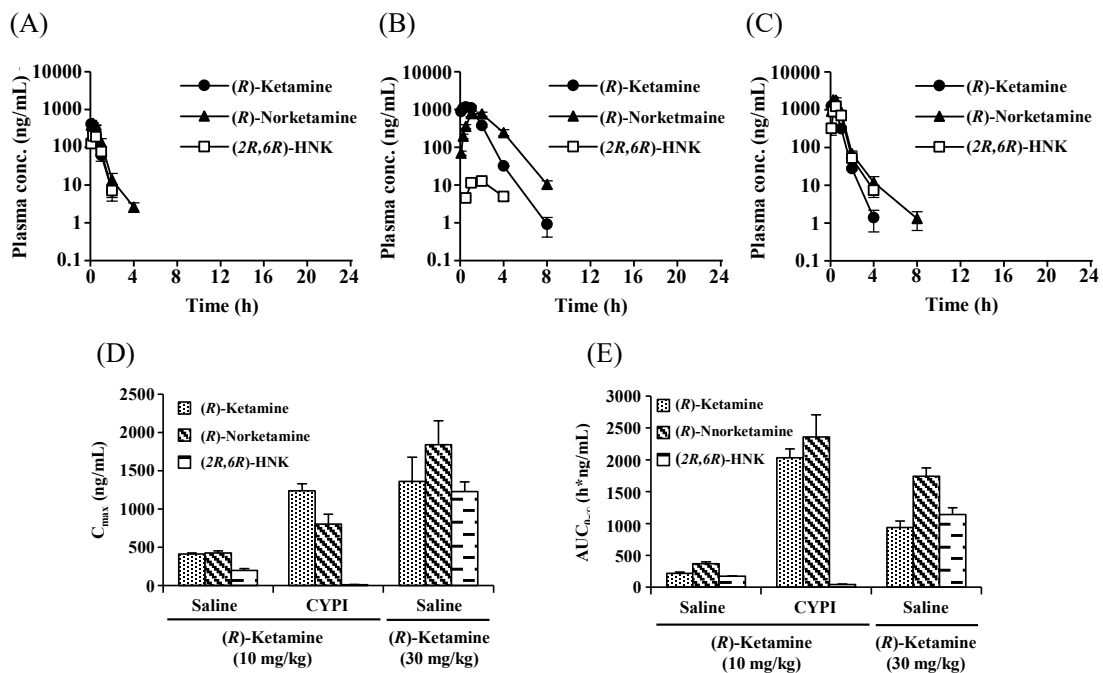


Figure 15 Effects of CYPI on the pharmacokinetic profiles of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (2*R,6R*)-HNK in naive mice. Plasma concentration-time profiles of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (2*R,6R*)-HNK after a single intraperitoneal administration of (*R*)-ketamine (10 mg/kg) without (A) and with CYPI pretreatment (B), and (*R*)-ketamine (30 mg/kg) without CYPI pretreatment (C). Effect of CYPI pretreatment on the plasma C_{max} (D) and $AUC_{0-\infty}$ (E) of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (2*R,6R*)-HNK. Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 3$).

Table 13 Effect of CYP1 on pharmacokinetic parameters of (*R*)-ketamine, (*R*)-norketamine, and (*2R,6R*)-HNK after a single intraperitoneal administration of (*R*)-ketamine in naive mice.

Dose (mg/kg)	CYP1	Analyte	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-∞} (h·ng/mL)
10	-	(<i>R</i>)-Ketamine	414 ± 12.8	216 ± 22.5
		(<i>R</i>)-Norketamine	427 ± 26.6	369 ± 27.2
		(<i>2R,6R</i>)-HNK	199 ± 24.4	174 ± 4.66
10	+	(<i>R</i>)-Ketamine	1240 ± 90.1	2030 ± 139
		(<i>R</i>)-Norketamine	802 ± 130	2360 ± 346
		(<i>2R,6R</i>)-HNK	12.6 ± 2.57	43.5 ± 8.49
30	-	(<i>R</i>)-Ketamine	1360 ± 318	938 ± 99.3
		(<i>R</i>)-Norketamine	1840 ± 314	1740 ± 132
		(<i>2R,6R</i>)-HNK	1230 ± 124	1140 ± 107

Data are represented as the mean ± SEM (n = 3).

次に、抗うつ作用の持続性を評価するために、ナীবマウスの尾懸垂試験にて、(*R*)-ketamine を単回腹腔内投与後 24 時間における抗うつ作用を評価した。その結果、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) は無動時間に影響を与えなかったが、(*R*)-ketamine (30 mg/kg) は無動時間を有意に短縮した (Figure 16)。一方、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) は、代謝酵素阻害剤処理によって無動時間を有意に短縮し、抗うつ作用と血漿中(*R*)-ketamine 濃度との間に相関が認められた (Figure 15 及び 16 並びに Table 13)。なお、阻害剤は無動時間に影響を与えなかった (Figure 16)。

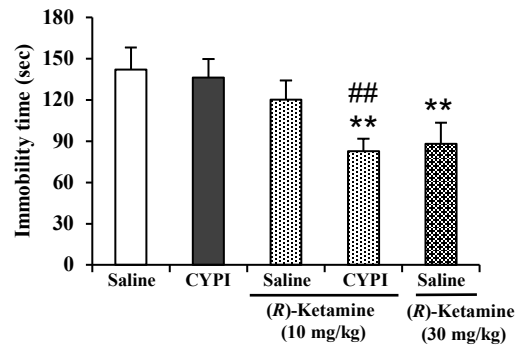


Figure 16 Effects of CYPI on the antidepressant effects of (*R*)-ketamine in naive mice. Effects of (*R*)-ketamine on the immobility in the tail suspension test in the presence or absence of CYPI (one-way analysis of variance, $F_{4,75} = 3.89$, $P = 0.006$). Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 16$). $**P < 0.01$ compared with CYPI, $##P < 0.01$ compared with saline/(*R*)-ketamine (10 mg/kg) treatment.

3. 考察

本節では、(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の PK と PD との関連性の検討並びに代謝酵素阻害剤を用いて、(2*R*,6*R*)-HNK の生成を阻害することによって、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に対する(2*R*,6*R*)-HNK の寄与を検証するとともに、(*R*)-norketamine の役割についても検討した。

LPS 誘発うつ病モデルマウスの強制水泳試験において、(*R*)-ketamine は抗うつ作用を示した。一方、(*R*)-ketamine と同じ用量で(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK は、抗うつ作用を示さなかった。この結果は、(*R*)-ketamine や(*S*)-ketamine (いずれも 10 mg/kg) が抗うつ作用を示した社会的敗北ストレスモデルマウスにおいて、(2*R*,6*R*)-HNK (10 mg/kg) は作用を示さなかった過去の結果と一致する [21]。さらに、学習性無力ラットにおいて、(*R*)-norketamine (20 mg/kg) 及び(2*R*,6*R*)-HNK (20 及び 40 mg/kg) は、抗うつ作用を示さなかったのに対し、(*R*)-ketamine (20 mg/kg) は抗うつ作用を示した結果によっても支持される [34]。

本研究で得られた(*R*)-norketamine 又は(2*R*,6*R*)-HNK (いずれも 10 mg/kg) 投与後の血漿、脳及び脳脊髄液中(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK 濃度は、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) 投与後の代謝物濃度に比べて十分高く、少なくとも LPS 誘発うつ病モデルマウスにおける(*R*)-

ketamine 投与後 3 時間の抗うつ作用、すなわち、即効性の抗うつ作用に(*R*)-norketamine 及び (*2R,6R*)-HNK は寄与していないと考えられる。一方、生体内で(*R,S*)-ketamine は速やかに消失することから、(*R,S*)-ketamine の持続的な抗うつ作用には、(*2R,6R*)-HNK による NMDA 受容体の拮抗作用が関与していると報告されている [35]。しかし、本研究において、(*2R,6R*)-HNK の血漿中濃度は(*R*)-ketamine と同様に速やかに消失しており、PK の観点からは、(*R*)-ketamine の持続的な抗うつ作用への(*2R,6R*)-HNK の寄与を説明できないと考えられる。なお、血漿、脳及び脳脊髄液のいずれの時点においても、(*R*)-ketamine のキラルインバージョンは認められなかった。この結果は、過去に報告されているヒトやウマの血漿中でキラルインバージョンが認められなかったという結果とも一致している [36, 37]。また、本研究結果より、代謝物である(*R*)-norketamine 及び(*2R,6R*)-HNK もまた、マウスの生体内でキラルインバージョンしないことが明らかになった。

次に、(*R*)-ketamine から(*2R,6R*)-HNK への代謝を阻害することによって、(*R*)-ketamine の抗うつ作用における(*2R,6R*)-HNK の寄与を検証した。ヒトにおいて、(*R,S*)-ketamine の代謝には複数の CYP 分子種が関与しており、主に CYP2B6、それ以外に CYP2A6、CYP2C19 及び CYP3A4/5 によって(*R,S*)-norketamine に代謝された後に、CYP2A6、CYP2B6 及び CYP3A5 により、(*2R,6R;2S,6S*)-HNK に代謝される [18]。この情報を基に、1-ABT とチクロピジンの合剤を用いて、(*R*)-ketamine から(*2R,6R*)-HNK への代謝を完全に阻害することを試みた。1-ABT は複数の CYP に対して阻害能を有すが、CYP2B6 への阻害能は弱いため、その選択的阻害剤であるチクロピジンも用いた。その結果、阻害剤処理した LPS 誘発うつ病モデルマウスにおいて、(*R*)-ketamine 投与後の血漿中に(*2R,6R*)-HNK は検出されず、ナイーブマウスにおいても、わずかに検出できるレベルであった。これに対し、阻害剤処理によって無効用量の(*R*)-ketamine (LPS 誘発うつ病モデルマウスは 3 mg/kg、ナイーブマウスは 10 mg/kg) 投与後の(*R*)-ketamine 濃度は、有効用量の(*R*)-ketamine (LPS 誘発うつ病モデルマウスは 10 mg/kg、ナイーブマウスは 30 mg/kg) 投与後と同程度まで増加した。なお、本試験で得られ

た脳又は脳脊髄液/血漿中濃度比は、いずれの時点においても同程度であり、阻害剤による影響も認められなかったことから、血漿中濃度は標的組織である脳及び脳脊髄液中濃度を反映していると考えられる。それゆえに、無効用量の(*R*)-ketamine が、阻害剤処理によって抗うつ作用を示した場合、その作用は(*R*)-ketamine そのものに起因し、作用を示さなかった場合は、(2*R*,6*R*)-HNK に起因することを示す。結果として、LPS 誘発うつ病モデルマウスの強制水泳試験において、無効用量の(*R*)-ketamine (3 mg/kg) は、阻害剤処理によって投与後 3 時間に抗うつ作用を示した。同様に、ナイーブマウスの尾懸垂試験においても、無効用量の(*R*)-ketamine (10 mg/kg) は、阻害剤処理によって投与後 24 時間に抗うつ作用を示した。これらの結果は、少なくとも 2 つの異なるうつ病モデルにおいて、(*R*)-ketamine の抗うつ作用が(2*R*,6*R*)-HNK ではなく、(*R*)-ketamine の血漿中濃度と相関することを示しており、(*R*)-ketamine の即効かつ持続的な抗うつ作用に(2*R*,6*R*)-HNK が必要ではないことが示された。一方、もう一つの主要代謝物である(*R*)-norketamine についても、これまでの報告にある通り [20, 33]、抗うつ作用を示しておらず、PK と PD を比較した結果からも、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に寄与していないことが示唆される。しかし、それを結論付けるためには、(*R*)-norketamine の生成を十分に抑制した条件下にて、抗うつ作用を評価することが必要である。

さて、本研究で得た知見は Zanos らの報告と矛盾する。彼らは、重水素標識した(*R,S*)-ketamine を用いて、24 時間における抗うつ作用が(*R,S*)-ketamine に比べて弱いこと、(2*R*,6*R*;2*S*,6*S*)-HNK の脳中濃度が低下したことから、(*R,S*)-ketamine の抗うつ作用には、(2*R*,6*R*;2*S*,6*S*)-HNK への代謝反応が不可欠であり、特に(2*R*,6*R*)-HNK が重要な役割を果たしていると主張した [19]。しかし、重水素標識によって、(*R,S*)-ketamine 及び(*R,S*)-norketamine の濃度は変動しておらず、(2*R*,6*R*;2*S*,6*S*)-HNK の生成抑制も部分的であり、完全ではない。これに対し、本研究では、(2*R*,6*R*)-HNK の生成を完全に阻害し、その結果として、(*R*)-ketamine の濃度が最も増加する条件を設定できた。これにより、(*R*)-ketamine の抗うつ作用

の本体は、(R)-ketamine そのものであることが示唆され、(2R,6R)-HNK の生成は必要ないことを明確にすることができた。一方で、本結果は、(2R,6R)-HNK の抗うつ作用のポテンシャルを否定するものではない。実際、Zanos らとは別の研究グループからも、(2R,6R)-HNK が即効かつ持続的な抗うつ作用を示すことが報告されており、(2R,6R)-HNK は、(R,S)-ketamine の抗うつ作用の機序の一つと考えられている内側前頭前野のセロトニン放出、側坐核の α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体機能、腹側被蓋野のドーパミンニューロンに作用を示すことも報告されている [38, 39]。本研究の LPS 誘発うつ病モデルマウスにおいても、(2R,6R)-HNK が無動時間延長を抑制する傾向が認められていることから (Figure 10A)、(R)-ketamine の有効用量で検出される(2R,6R)-HNK 濃度よりも高い濃度で、(2R,6R)-HNK が抗うつ作用を示す可能性を否定できない。また、一部の動物モデルにおいて、(R,S)-ketamine やそのエナンチオマーが抗うつ作用を示すのに対し、(2R,6R)-HNK は作用を示さない、あるいは弱いなどのケースが存在しており [21, 34]、これらの知見は、(2R,6R)-HNK の抗うつ作用のプロファイルが、(R,S)-ketamine やそのエナンチオマーとは実質的に異なることを示している可能性がある。そのため、(R)-ketamine の抗うつ作用において、(2R,6R)-HNK の寄与は低いと考えられるが、(2R,6R)-HNK そのものの薬効及び安全性プロファイルを明らかにすることは新規抗うつ薬の創出において意義があると考えられる。

本節では、LPS 誘発うつ病モデルマウスにおいて、(R)-ketamine (10 mg/kg) は、抗うつ作用を示す一方で、(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK (いずれも 10 mg/kg) は無効であることを再現するとともに、(R)-ketamine 投与後の(R)-norketamine 及び(2R,6R)-HNK の血漿、脳及び脳脊髄液中濃度は、(R)-norketamine 又は(2R,6R)-HNK 投与後の濃度に比べて低いことを初めて明らかにした。さらに、CYP 阻害剤を用いて、(R)-ketamine 投与後の(2R,6R)-HNK の生成を完全に阻害した条件下で抗うつ作用を評価し、(2R,6R)-HNK ではなく、(R)-ketamine の曝露と抗うつ作用に相関があるという新規知見を得た。これらの結果から、これまで不

明であった(*R*)-ketamine 投与後の即効かつ持続的な抗うつ作用の本体は、(*R*)-norketamine や (*2R,6R*)-HNK などの代謝物ではなく、(*R*)-ketamine そのものであることが示唆された。

第2章 (S)-Ketamine の抗うつ作用に対する(R)-ketamine の優位性の検証

1. 序

(S)-Ketamine は、2019年に治療抵抗性うつ病に対する点鼻薬として、米国FDAによって承認された。しかし、精神症状といった副作用及び依存形成が懸念されたことから、リスク評価軽減戦略（Risk Evaluation and Mitigation Strategy: REMS）のもとで使用することが義務付けられた。そのため、REMSの認証を受けた医療施設においてのみ、投与が可能で、投与後2時間は患者をモニターするなど、その使用は厳しく制限されている。

(R)-Ketamine は、齧歯類において、(S)-ketamine で認められている精神病症状の惹起、神経毒性及び依存形成といった副作用を示さない [16]。サルにおいても、(S)-ketamine と異なり、ヒトでの精神病惹起及び解離症状に関連すると考えられるドーパミン放出を引き起こさない [40, 41]。さらに、最近報告された臨床試験の結果では、(R)-ketamine による重大な有害事象は報告されておらず、ヒトにおいても、(S)-ketamine よりも良好な安全性プロファイルを示すことが確認されている。一方、抗うつ作用については、齧歯類にて、(S)-ketamine よりも、(R)-ketamine の方が強力かつ持続的な抗うつ作用を示すことが報告されている [15, 19]。これらの知見は、(R)-ketamine が臨床において、副作用を示すことなく、(S)-ketamine と同様の抗うつ作用を示す、すなわち、(S)-ketamine よりも安全性及び薬効が優れた抗うつ薬としてのポテンシャルを有することを示している。しかし、(R)-ketamine の抗うつ作用には、治療抵抗性うつ病モデルに対する有効性が不明である、抗うつ作用のメカニズムが未解明であるといった課題が残されており、抗うつ作用における(S)-ketamine に対する優位性については検証の余地がある。

そこで本章では、治療抵抗性うつ病モデルを含む、種々のモデル動物における(R)-ketamine の抗うつ作用を(S)-ketamine と比較し、(S)-ketamine に対する (R)-ketamine の優位性について検証した。

2. 結果

2.1. マウス強制水泳試験における(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の抗うつ作用

マウスに(R)-ketamine 又は(S)-ketamine (いずれも 10 又は 30 mg/kg) を、単回腹腔内投与後 30 分及び 24 時間における抗うつ作用を評価した。(R)-Ketamine 及び(S)-ketamine は、いずれも投与後 30 分において無動時間を有意に短縮し、うつ様行動を改善したが、(S)-ketamine の方がより低い用量で改善した (Figure 17A)。24 時間後においても、(R)-ketamine 及び(S)-ketamine は、無動時間を有意に短縮したが、その強度は同程度であった (Figure 17B)。

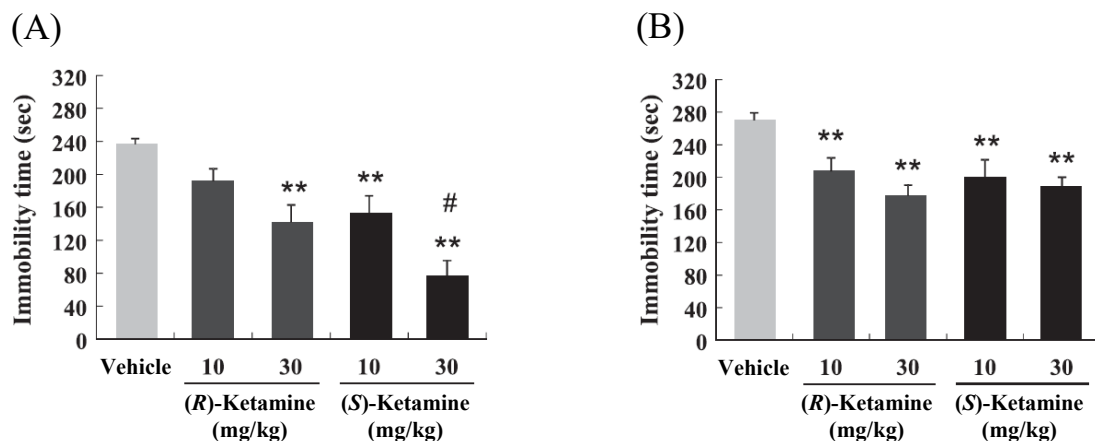


Figure 17 Effect of (R)-ketamine or (S)-ketamine in mouse forced swimming test. (R)-Ketamine or (S)-ketamine was administered intraperitoneally at 30 minutes (A) or 24 hours (B) prior to the forced swimming test. Data are represented as the mean \pm SEM (n = 8). ** $P < 0.01$ compared with each vehicle (Dunnett's test); # $P < 0.05$ compared with (R)-ketamine (30 mg/kg) (Student's t test).

2.2. マウス尾懸垂試験における(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の抗うつ作用

マウスに(R)-ketamine 又は(S)-ketamine (いずれも 10 又は 30 mg/kg) を、単回腹腔内投与後 30 分並びに 24 及び 48 時間における抗うつ作用を評価した。(R)-Ketamine 及び(S)-ketamine は、いずれも投与後 30 分において無動時間を有意に短縮し、うつ様行動を改善したが、(S)-ketamine の方がより低い用量で改善した (Figure 18A)。24 時間後においても、(R)-ketamine 及び(S)-ketamine は、無動時間を有意に短縮し、その強度は、いずれも(R,S)-

ketamine と同程度であった (Figure 18B)。一方、48 時間後において、(R)-ketamine は(R,S)-ketamine 同様、無動時間を有意に短縮したのに対し、(S)-ketamine は短縮せず、(S)-ketamine に比べて(R)-ketamine の方が、より持続的にうつ様行動を改善した (Figure 18C)。既存の抗うつ薬であるデシプラミンは、単回腹腔内投与後 30 分において、用量依存的に無動時間を有意に短縮した (Figure 18D)。

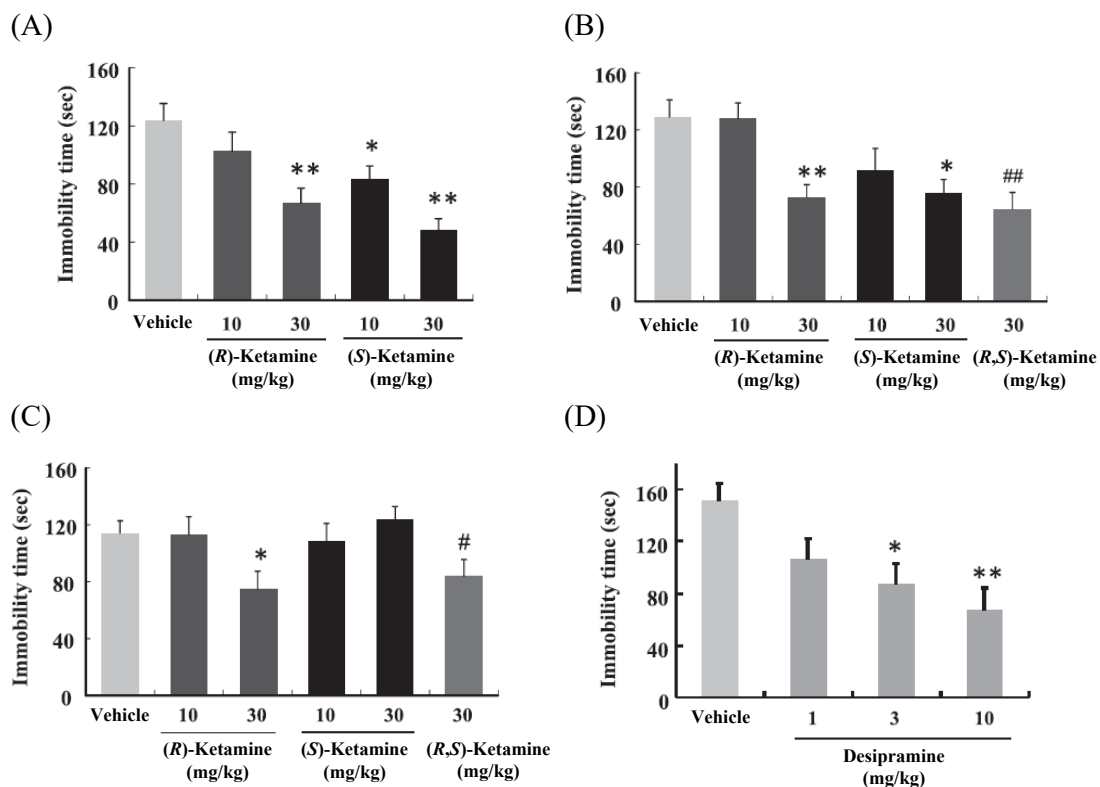


Figure 18 Effect of (R)-ketamine, (S)-ketamine, or (R,S)-ketamine in mouse tail suspension test. (R)-Ketamine, (S)-ketamine, or (R,S)-ketamine was administered intraperitoneally at 30 minutes (A), 24 (B), or 48 hours (C) prior to the tail suspension test. (D) Desipramine was administered intraperitoneally at 30 minutes prior to the tail suspension test. Data are represented as the mean \pm SEM [n = 16 (A), n = 12-14 (B), n = 13-14 (C), and n = 15 (D)]. * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with each vehicle (Dunnett's test); # P < 0.05, ## P < 0.01 compared with each vehicle (Student's t test).

2.3. コルチコステロン誘発うつ病ラット強制水泳試験における(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の抗うつ作用

コルチコステロン (20 mg/kg) を 1 日 1 回、21 日間反復皮下投与したラットの無動時間

は、生理食塩水を反復皮下投与したラットに比べて延長した。(R)-Ketamine、(S)-ketamine 及び(R,S)-ketamine (いずれも 10 mg/kg) は、試験開始の 24 時間及び 30 分前の計 2 回投与によって、無動時間の延長を抑制した (Figure 19A)。一方、(R)-ketamine 及び(R,S)-ketamine (いずれも 10 mg/kg) は、試験開始の 24 時間前投与によって、無動時間の延長を有意に抑制したが、(S)-ketamine (3 及び 10 mg/kg) は抑制しなかった (Figure 19B)。また、(R)-ketamine のうつ様行動の改善は、AMPA 受容体拮抗薬である 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX、10 mg/kg) によって有意に抑制された (Figure 20A)。なお、NBQX は、コルチコステロン誘発うつ病ラットの無動時間に影響しなかった (Figure 20B)。

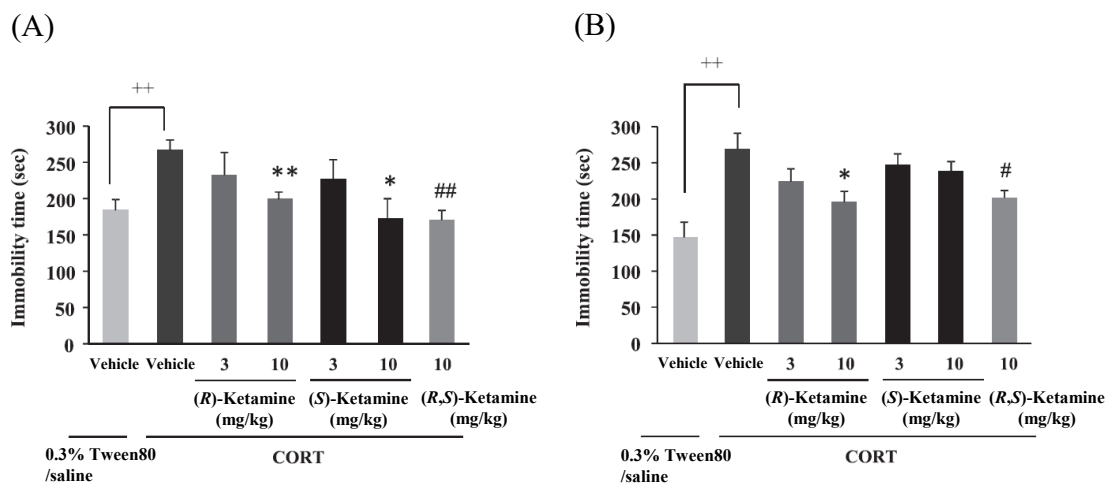


Figure 19 Effect of (R)-ketamine, (S)-ketamine, and (R,S)-ketamine on repeated corticosterone (CORT) injection-induced immobility time during the forced swimming test. (R)-Ketamine, (S)-ketamine, or (R,S)-ketamine was administered intraperitoneally twice at 24 hours and 30 minutes prior to the test (A) or once at 24 hours prior to the test (B). Data are represented as the mean \pm SEM [$n = 7-8$ (A), and $n = 8$ (B)]. ++ $P < 0.01$ compared with the 0.3% Tween 80/saline-treated vehicle (Student's t test); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the CORT-treated vehicle (Dunnett's test); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the CORT-treated vehicle (Student's t test).

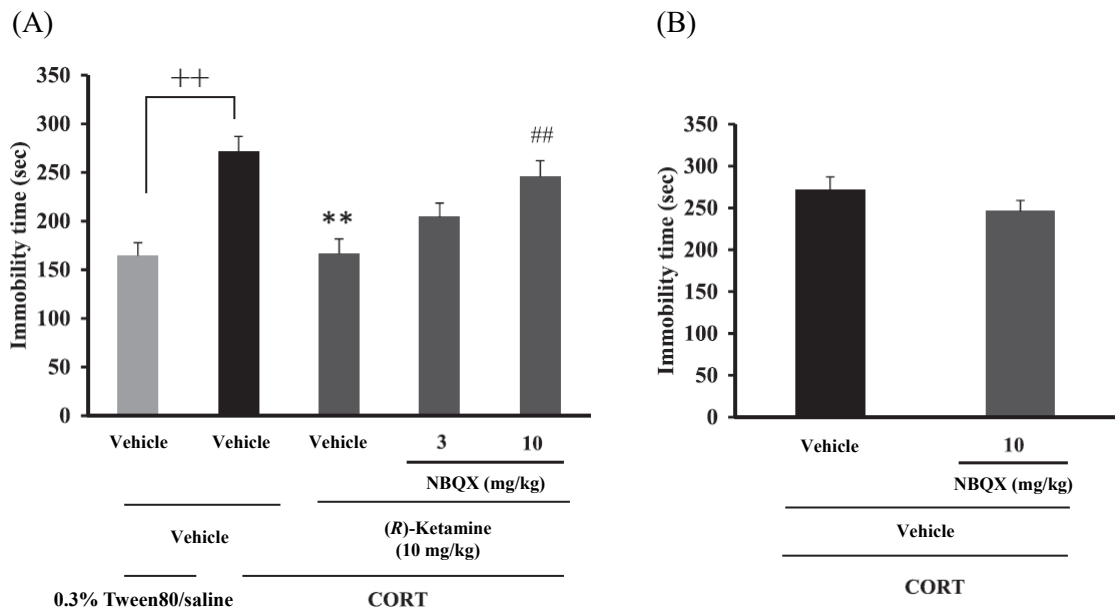


Figure 20 Effect of an AMPA receptor antagonist on antidepressant effects of (*R*)-ketamine in a repeated CORT injection-induced model. The effect of NBQX pretreatment on the effect of (*R*)-ketamine (A) and the effect of NBQX itself on immobility time (B) were investigated. (*R*)-ketamine was administered intraperitoneally at 24 hours prior to the test, and NBQX was administered subcutaneously at 5 minutes prior to the administration of (*R*)-ketamine. Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 8$). $^{++}P < 0.01$ compared with the 0.3% Tween 80/saline-treated vehicle (Student's *t* test); $^{**}P < 0.01$ compared with the CORT-treated vehicle (Student's *t* test); $^{##}P < 0.01$ compared with the CORT-treated vehicle / (*R*)-ketamine (Dunnett's test).

2.4. マウス及びラットの自発運動量に対する(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine の影響

(*R*)-Ketamine 及び(*S*)-ketamine (いずれも 10 及び 30 mg/kg) は、マウスの自発運動量を有意に増加させた。一方、ラットについては、(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine (いずれも 30 mg/kg) は、自発運動量を有意に増加させたが、(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine (いずれも 10 mg/kg) は影響しなかった (Table 14)。

Table 14 Effect of (*R*)-ketamine and (*S*)-ketamine on locomotor activity in mice and rats

Compound	Dose (mg/kg)	Mice	Rats
Vehicle	-	2217.5 ± 139.7	1025.9 ± 294.9
<i>(R)</i> -Ketamine	10	5029.5 ± 782.1*	1869.9 ± 289.5
	30	16654.5 ± 1106.5**	4458.3 ± 807.5**
<i>(S)</i> -Ketamine	10	6018 ± 804.9*	1826.6 ± 278.0
	30	12368.5 ± 1106.5**	9547.1 ± 1572.5**

Data are represented as the mean ± SEM (n = 8). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus vehicle (Dunnett's test).

2.5. マウス及びラットにおける(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine の血漿、脳及び脳脊髄液中濃度

マウス又はラットに(*R*)-ketamine 又は(*S*)-ketamine (マウス: 10 又は 30 mg/kg、ラット: 3 又は 10 mg/kg) を単回腹腔内投与後の血漿、脳及び脳脊髄液中未変化体濃度を測定した。*(R)*-Ketamine 及び(*S*)-ketamine は、いずれも投与後 15 分に C_{max} に到達後、同様の推移で速やかに消失し、マウスは 4 時間後以降、ラットは 8 時間後以降に定量下限未満の濃度になった (Figure 21)。投与後 30 分の脳及び脳脊髄液においても、血漿同様、(*R*)-ketamine と(*S*)-ketamine の濃度に違いはなく、脳/血漿中濃度比は、マウスが 1.3~2.6、ラットが 1.7~2.2、脳脊髄液/血漿中濃度比は、マウスが 0.2~0.5、ラットが 0.3~0.4 であった。投与後 24 時間における脳及び脳脊髄液中濃度は、マウス脳 (30 mg/kg) を除いて、定量下限未満であった (Table 15)。両化合物ともに、血漿、脳及び脳脊髄液の全ての時点において、キラリイソマーは認められなかった。

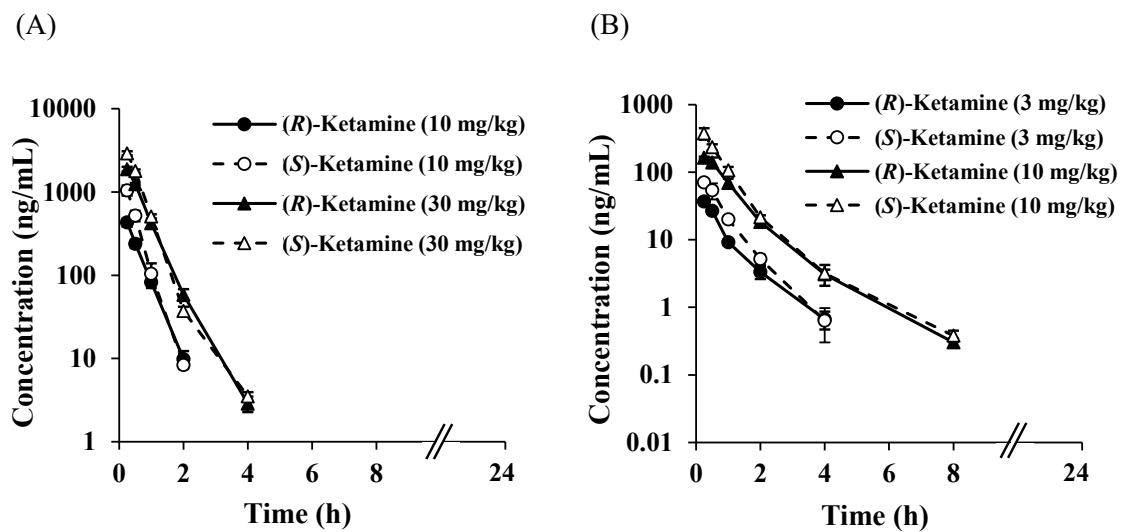


Figure 21 Plasma concentration-time profiles of (*R*)-ketamine and (*S*)-ketamine after a single intraperitoneal administration to mice (A) and rats (B). Data are represented as the mean \pm SEM of three animals. The LLOQ was 1 ng/mL for mice and 0.1 ng/mL for rats.

Table 15 Plasma, brain, and cerebrospinal fluid concentrations of (*R*)-ketamine and (*S*)-ketamine following a single intraperitoneal administration to mice and rats

Species	Compound	Dose (mg/kg)	Time (h)	Concentration (ng/mL or ng/g)		
				Plasma	Brain	Cerebrospinal fluid
Mouse	<i>(R)</i> -Ketamine	10	0.5	210 ± 48.3	513 ± 105	57.3
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
		30	0.5	958 ± 89.5	2460 ± 222	452
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	<i>(S)</i> -Ketamine	10	0.5	376 ± 19.9	527 ± 48.6	127
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
		30	0.5	1770 ± 117	2310 ± 233	330
			24	<LLOQ	0.823 ± 0.457	<LLOQ
Rat	<i>(R)</i> -Ketamine	3	0.5	57.9 ± 2.83	118 ± 17.6	20.9 ± 3.04
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
		10	0.5	289 ± 22.0	633 ± 62.4	86.4 ± 8.03
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	<i>(S)</i> -Ketamine	3	0.5	105 ± 11.1	235 ± 31.2	33.8 ± 4.31
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
		10	0.5	303 ± 42.5	507 ± 44.1	90.1 ± 2.57
			24	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

Data are presented as the mean ± SEM of three animals.

Each mouse cerebrospinal fluid concentration represents a value derived from a pooled cerebrospinal fluid specimen collected from three mice.

The LLOQ in plasma was 1 ng/mL (mice) or 0.1 ng/mL (rats); the LLOQ in brain was 0.5 ng/g for both species; the LLOQ in cerebrospinal fluid was 2 ng/mL (mice) or 0.2 ng/mL (rats).

3. 考察

本章では、治療抵抗性を含む複数のうつ病モデル動物における(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine の抗うつ作用を比較した。さらに、両化合物の抗うつ作用の違いが、薬物動態に起因したものであるかを明らかにするために、血漿、脳及び脳脊髄液中未変化体濃度を測定した。

2 つのうつ病モデル、強制水泳試験及び尾懸垂試験において、(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine は、いずれも投与後 30 分に抗うつ作用を示したが、(*S*)-ketamine の方が、より低用量である 10 mg/kg の腹腔内投与で作用を示した。しかし、(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine (いずれも 10 mg/kg) は、マウスの自発運動を一時的に増加させており、この増加が抗う

つ作用の一部に影響している可能性が考えられた。そのため、これらのモデルにおいて、(S)-ketamine が(R)-ketamine よりも強力な抗うつ作用を有すると結論づけることはできなかった。なお、(R)-ketamine は他の動物モデルにおいて、(S)-ketamine よりも低用量で即効性の抗うつ作用を示すことが報告されていることから [19]、作用の強さは試験条件に依存する可能性が考えられた。また、脳及び脳脊髄液中における(R)-ketamine 及び(S)-ketamine の曝露量は同程度であったことから、仮に、両化合物の作用の違いがあったとしても、薬物動態プロファイルの違いに起因するものではないと考えられた。

これらの即効性の抗うつ作用に加えて、(R)-ketamine 及び(S)-ketamine は、いずれも持続的な抗うつ作用（投与後 24 時間）を示した。投与後 24 時間の脳及び脳脊髄液中に両化合物いずれも検出されなかったことから、持続的な抗うつ作用には、化合物の直接的な作用ではなく、シナプス可塑性に起因した作用の可能性が考えられた。さらに、尾懸垂試験において、(R)-ketamine は(R,S)-ketamine と同様、投与後 48 時間に抗うつ作用を示したが、(S)-ketamine は示さなかった。この結果は、(R)-ketamine が、(S)-ketamine よりも抗うつ作用が長く持続する可能性を示しており、過去の報告とも一致する [15, 16, 19]。また、(R)-ketamine は(S)-ketamine よりも NMDA 受容体に対する親和性が低いことから [12, 13]、(R)-ketamine の持続的な抗うつ作用には、NMDA 受容体遮断以外のメカニズムが関与している可能性が考えられた。

コルチコステロンを反復投与したラットは、強制水泳試験において、無動時間の延長などのうつ様行動を誘発する。しかし、このうつ様行動は、通常の抗うつ薬によって改善されない。そのため、このモデルは治療抵抗性うつ病のモデルと考えられている [42]。実際、(R,S)-ketamine は、このモデルでうつ様行動を改善しており、(R,S)-ketamine が治療抵抗性うつ病患者に有効であるという臨床所見を反映している [43]。本研究では、(R)-ketamine 又は(S)-ketamine を強制水泳試験開始の 24 時間前及び 30 分前の 2 回投与することによって、両化合物いずれも(R,S)-ketamine と同様、無動時間の延長を有意に抑制した。また、試験を実施

した用量において、自発運動量に影響を与えなかったため、このモデルで観察された即効性の抗うつ作用は、運動量の変化によるものではないと考えられる。一方、強制水泳試験の24時間前に1回投与した場合、(R)-ketamineは、(R,S)-ketamine同様、うつ様行動を有意に改善したが、(S)-ketamineは改善しなかった。これらの結果から、(R)-ketamineは、治療抵抗性モデルラットにおいても即効かつ持続的な抗うつ作用を示すが、(S)-ketamineは、即効性の抗うつ作用しか示さないことが初めて明らかになった。このことは、治療抵抗性うつ病患者における(R,S)-ketamineの持続的な抗うつ作用は、(R)-ketamineが担っている可能性を示している。PKについては、(R)-ketamine及び(S)-ketamineのラット血漿中濃度推移並びに脳及び脳髄液中濃度に違いはなく、投与後24時間の脳及び脳髄液中には、両化合物とも存在しなかった。したがって、(R)-ketamine及び(S)-ketamineの抗うつ作用の持続性の違いは、両化合物の薬物動態プロファイルの違いによるものではないと考えられ、(R)-ketamineが引き起こす直接的な作用ではなく、シナプス可塑性に起因した作用による可能性が考えられた。さらに、(R)-ketamineの持続的な抗うつ作用は、AMPA受容体拮抗薬であるNBQXによって減弱された。このことから、(R)-ketamineの持続的な抗うつ作用にはAMPA受容体刺激が関与していると考えられる。(R,S)-ketamineによって誘導されるシナプスタンパク質合成の増加は、AMPA受容体刺激を介して行われ[44-46]、抗うつ作用の発現に重要な役割を担っていると報告されている[47]。したがって、(R)-ketamineの持続的な抗うつ作用は、AMPA受容体を介したシナプス可塑性の変化によるものと解釈できる。さらに、シナプス可塑性の低下が報告されているコルチコステロン誘発うつ病モデルにおいて[48]、(R)-ketamineのみが持続的な抗うつ作用を示したことからも、シナプス可塑性への作用の違いが、抗うつ作用の持続性の違いに関与している可能性がある。この仮説は、(R)-ketamineが単回投与8日後に社会的敗北ストレスによる樹状突起スパインの形成及び脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) レベルの低下を(S)-ketamineよりも強固に回復させたという報告によっても支持される[16]。また、(S)-ketamineのシナプス

形成は、mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナルを介すが、(R)-ketamine は、mTORC1 ではなく、extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナルを介すことが報告されており[49-50]、これらのメカニズムが(R)-ketamine と(S)-ketamine の抗うつ作用特性の差異に関与する可能性が考えられている (Figure 22)。

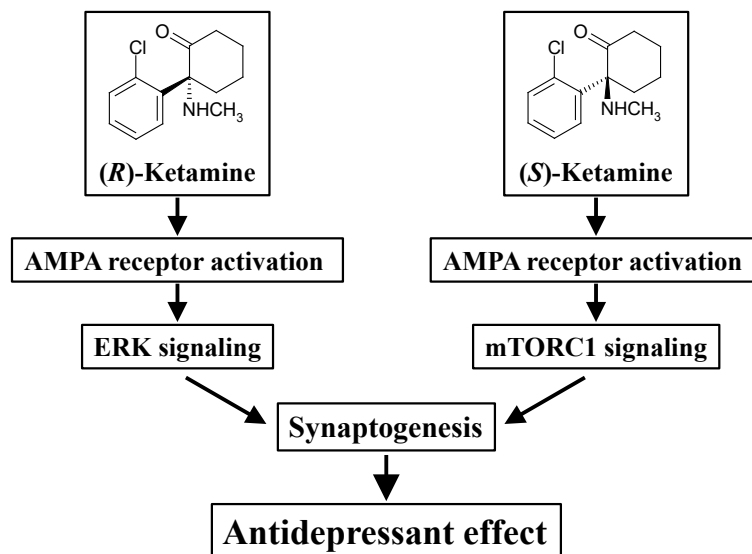


Figure 22 Proposed mechanism of antidepressant effects of (R)-ketamine and (S)-ketamine

本章では、齧歯類のうつ病モデルにおいて、(R)-ketamine が(S)-ketamine よりも持続的な抗うつ作用を示すことを確認した。さらに、治療抵抗性モデルにおいて、(S)-ketamine は、持続的な抗うつ作用を示さなかったのに対し、(R)-ketamine は即効かつ持続的な抗うつ作用を示し、その作用は AMPA 受容体刺激を介している可能性を初めて明らかにした。また、その作用の差異は、薬物動態プロファイルに起因しないことを明らかにした。本研究で得られた知見は、(R)-ketamine が、治療抵抗性を含むうつ病患者において、(S)-ketamine と同様の抗うつ作用を示し、その効果はより持続的であることを期待させるものである。

総括

(*R,S*)-Ketamine 及び(*S*)-ketamine は、即効かつ持続的な抗うつ作用を有し、既存薬が奏功しない治療抵抗性うつ病患者に対しても有効性を示す。しかし、これらの薬物は精神障害等の副作用を引き起こすため、臨床現場では厳しい使用制限が設けられている。これに対し、(*R,S*)-ketamine のエナンチオマーの 1 つである (*R*)-ketamine は、齧歯類のうつ病モデルにおいて抗うつ作用を示す一方で、(*R,S*)-ketamine や (*S*)-ketamine で認められている有害作用を惹起しないことが報告されており、有用な抗うつ薬候補として大きな期待が寄せられている。しかし、(*R*)-ketamine の抗うつ作用の本体は明らかにされておらず、体内動態を加味した抗うつ作用の解釈も不十分であった。これに加えて、治療抵抗性うつに対する有効性や抗うつ作用の根底にある神経メカニズムなど、(*R*)-ketamine の抗うつ作用には、未解決の課題が残されたままであった。そこで著者は、齧歯類のうつ病モデルを用い、これまで不明であった(*R*)-ketamine の抗うつ作用本体の特定を試みた。さらに、得られた知見を加味し、種々のモデルで(*R*)-ketamine の抗うつ作用を検討し、(*S*)-ketamine に対する (*R*)-ketamine の優位性及び抗うつ薬として可能性について検討を加えた。

第 1 章では、マウスにおける(*R*)-ketamine の抗うつ作用の本体特定を試みた。まず第 1 節にて、本研究の遂行に不可欠なマウス血漿、脳及び脳脊髄液中の (*R,S*)-ketamine、(*R,S*)-norketamine 及び (*2R,6R;2S,6S*)-HNK の立体選択的 LC-MS/MS アッセイ法を構築し、その性能を評価した。その結果、開発した測定法は、マウス各個体から経時的に採取した血漿や脳脊髄液のような微量の検体で薬物動態評価が可能となる高い感度、簡便性及び多検体の連続測定にも耐えうる堅牢性を備えており、我々の研究目的に合致した測定法であることが実証された。

第 2 節では、PK/PD のアプローチを用い、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝物の寄与の有無について検討した。抗うつ作用は、LPS 誘発うつ病モデルにおける強制水泳試験及びナイーブマウスにおける尾懸垂試験により評価した。血漿、脳及び脳脊髄液中の

(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の濃度は、前節で構築した立体選択的 LC-MS/MS アッセイ法により測定した。(*R*)-Norketamine (10 mg/kg) 又は(2*R*,6*R*)-HNK (10 mg/kg) を単回腹腔内投与後のマウス血漿、脳及び脳脊髄液中(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK 濃度は、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) を腹腔内投与後の(*R*)-norketamine 及び(2*R*,6*R*)-HNK の濃度よりも高曝露を示した。その一方で、(*R*)-ketamine (10 mg/kg) のみが抗うつ作用を示し、(*R*)-norketamine (10 mg/kg) 及び(2*R*,6*R*)-HNK (10 mg/kg) は無効であった。この結果から、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に対する代謝物の寄与は低い可能性が考えられた。これまでに、(*R,S*)-ketamine の抗うつ作用には、(*R*)-ketamine の代謝物である (2*R*,6*R*)-HNK への代謝が不可欠であると報告されている。しかし、これに反する報告もあり、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に対する(2*R*,6*R*)-HNK の寄与の有無は、議論的になっていた。そこで、(2*R*,6*R*)-HNK が生成しない条件下、すなわち、代謝酵素阻害剤で処理したマウスを用いて、(*R*)-ketamine の抗うつ作用を検討した。その結果、阻害剤処理したマウスに(*R*)-ketamine を投与後の(*R*)-ketamine の曝露は増加した。一方、(2*R*,6*R*)-HNK は、定量下限未満あるいはその付近まで曝露が低下した。抗うつ作用については、阻害剤処理によって、より低用量の(*R*)-ketamine 投与で有効性を示し、その作用の強さは、(2*R*,6*R*)-HNK ではなく、(*R*)-ketamine の曝露と一致した。この結果から、(*R*)-ketamine の抗うつ作用に(2*R*,6*R*)-HNK の生成は不要であることが明らかとなった。以上の結果から、マウスで認められる(*R*)-ketamine の抗うつ作用は、代謝物ではなく、未変化の(*R*)-ketamine によることが示唆された。

第 2 章では、(*S*)-ketamine の抗うつ作用に対する (*R*)-ketamine の優位性について検証するために、治療抵抗性うつ病モデルを含む、種々のモデル動物に対する(*R*)-ketamine の抗うつ作用を(*S*)-ketamine と比較した。(*R*)-Ketamine と(*S*)-ketamine は、マウスの強制水泳及び尾懸垂試験において、投与後 30 分及び 24 時間で抗うつ作用を示した。しかし、尾懸垂試験の投与後 48 時間において、抗うつ作用を示したのは(*R*)-ketamine のみであり、(*S*)-ketamine は

示さなかった。さらに、(R)-ketamine は、ラット強制水泳試験の開始 24 時間前に単回腹腔内投与することで、コルチコステロンの反復投与により誘発されたうつ様行動を有意に改善したが、(S)-ketamine は改善しなかった。この作用は、AMPA 受容体拮抗薬によって減弱されたことから、AMPA 受容体刺激の関与を示唆している。また、(R)-ketamine の抗うつ作用本体と推定される未変化体の血漿、脳及び脳脊髄液中の曝露は、本質的に(S)-ketamine と同等であり、両化合物ともに血漿から急速に消失した (4~8 時間で定量下限未満)。したがって、薬効の持続性におけるエナンチオマー間差は、薬物動態の立体選択性に起因するのではなく、薬理学的特性の差異によるものと考えられた。これらの結果は、うつ病モデル動物において、(R)-ketamine が(S)-ketamine よりも持続的な抗うつ作用を示すという以前の知見を再現したことに加え、(R)-ketamine が治療抵抗性モデルにおいて、(S)-ketamine よりも持続的な抗うつ作用を示すこと、さらに、その作用の差異は薬物動態プロファイルに起因しないことを明らかにしたものである。

以上、本研究は、(R)-ketamine が各種うつ病モデルだけでなく、治療抵抗性モデル動物においても抗うつ作用を示すこと、そして、その作用は(S)-ketamine よりも持続的であることを初めて明らかにし、(R)-ketamine が、より有望な抗うつ薬としての可能性を有することを示した。さらに、これまで結論が出ていなかった(R)-ketamine の抗うつ作用本体は、未変化の(R)-ketamine であることを示唆した。うつ病は誰でも罹患し得る国民病の一つであるが、未だ満足できる治療薬はなく、アンメットメディカルニーズは高い。(R)-Ketamine は、臨床において(S)-ketamine よりも優れた安全性プロファイルを有することが明らかになっている一方で、有効性については海外の臨床試験にて検証中である。本研究は、これまで不明であった(R)-ketamine の抗うつ薬としての優れた特性の一端を非臨床レベルで解明したものであるが、ここで得られた知見が、臨床における(R)-ketamine の抗うつ作用の解釈に示唆を与え、画期的な新規うつ病治療薬創製の一助となることが期待される。

実験の部

第1章第1節付属実験

試薬

Ketamine hydrochloride エタノール溶液（ラセミ体のフリー体として 50 mg/mL）は、フジタ製薬から購入した。Norketamine hydrochloride、(2*R*,6*R*)-HNK hydrochloride 及び(2*S*,6*S*)-HNK hydrochloride は、フナコシ株式会社から購入した。IS として使用した 3, 4, 5, 6-tetradeuterophenyl-norketamine (²H₄-norketamine) hydrochloride メタノール溶液（ラセミ体のフリー体として 100 µg/mL）は、Sigma-Aldrich 社から購入した。その他の試薬及び溶媒は、市販品を使用した。

動物実験

雄性 C57BL（8 週齢）は、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入した。全ての動物飼育及び実験は、大正製薬株式会社の動物実験に関する規定及び動物実験のガイドライン（The Japanese Experimental Animal Research association standards）に従って実施した。

生体試料の採取

血漿は、イソフルラン麻酔を施したマウスの後大静脈から採取した血液を ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid potassium salt dehydrate（EDTA-2K）入りチューブに入れた後、直ちに遠心分離して得た。脳及び脳脊髄液は、マウスを放血致死によって安楽死させた後に採取した。

測定用生体試料の調製

本研究では、血漿を蒸留水で 10 倍希釈して測定用血漿試料を調製した。また、脳脊髄液は、生理食塩水で 20 倍希釈して、測定用脳脊髄液試料とした。脳については、脳重量に対

し 4 倍量の蒸留水 (1:4, w/v) を加え、冷蔵下にてマルチビーズショッカーを用いてホモジナイズし、測定用脳試料を調製した。調製した測定用生体試料は、 -30°C の冷凍庫に保存した。

検量線及び QC 用試料の調製

Ketamine hydrochloride エタノール溶液 (ラセミ体のフリー体として 50 mg/mL) を蒸留水で 50 倍希釈し、標準原液を調製した。*(R,S)*-Norketamine の標準原液は、norketamine hydrochloride を正確に秤量し、ラセミ体のフリー体として 1 mg/mL となるように、蒸留水に溶解して調製した。これらの標準原液を測定用ブランク血漿試料、測定用ブランク脳試料又はサロゲート脳脊髄液 (生理食塩水) で希釈混合し、各エナンチオマーの生体試料中濃度がそれぞれ $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $25\text{ }\mu\text{g/g}$ 又は $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ となるように混合標準試料を調製した。この混合標準試料を対応する測定用ブランク試料又はサロゲート脳脊髄液にて順次希釈し、検量線用及び quality control (QC) 用試料を調製した。検量線用試料の各エナンチオマー濃度は、血漿が 1、3、10、30、100、300、1000 ng/mL、脳が 0.5、1.5、5、15、50、150、500 ng/g、脳脊髄液が 2、6、20、60、200、600、2000 ng/mL となるように調製した。また、QC 用試料は、血漿が 3、30、800 ng/mL、脳が 1.5、15、400 ng/g、脳脊髄液が 6、60、1600 ng/mL となるように調製した。

(2R,6R)-HNK 及び *(2S,6S)*-HNK の標準原液は、*(2R,6R)*-hydroxynorketamine hydrochloride 及び *(2S,6S)*-hydroxynorketamine hydrochloride を正確に秤量し、フリー体として $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ となるように、それぞれ蒸留水に溶解して調製した。以降の操作は、*(R,S)*-ketamine 及び *(R,S)*-norketamine と同様に行い、検量線用及び QC 用試料を調製した。検量線用試料の各エナンチオマー濃度は、血漿が 3、10、30、100、300、1000 ng/mL、脳が 1.5、5、15、50、150、500 ng/g、脳脊髄液が 6、20、60、200、600、2000 ng/mL となるように調製した。また、QC 用試料は、血漿が 9、80、800 ng/mL、脳が 4.5、40、400 ng/g、脳脊髄液が 18、160、1600

ng/mL となるように調製した。

IS 溶液は、²H₄-norketamine hydrochloride メタノール溶液（ラセミ体のフリー体として 100 μg/mL）をアセトニトリル/メタノール（9/1、v/v）で希釈し、エナンチオマーとして 1.5 ng/mL となるように調製した。

測定用生体試料の前処理

各試料（測定用生体試料並びに検量線用試料及び QC 試料）50 μL と IS 溶液 100 μL を混合し、ボルテックスミキサーで攪拌後、遠心分離（設定値: 3639 × g、10 分）した。得られた遠心上清を LC-MS/MS 測定に供する注入試料とした。測定用ブランク試料は、IS 溶液のかわりに、アセトニトリル/メタノール（9/1、v/v）を添加し、同様の処理を行った。

装置及び測定条件

1. (R,S)-Ketamine 及び(R,S)-norketamine（測定条件 1）

質量分析には、エレクトロスプレーインターフェイスを装着した AB Sciex 社製 Triple Quad™5500 四重極タンデム質量分析計を使用した。ヒーターガス温度は 650°C、スプレー電圧は 4500V、ネブライザーガス（GS1）、ターボガス（GS2）及びカーテンガスは、それぞれ 50、80 及び 26 psi に設定した。コリジョンガスは、設定値を 8（arbitrary units）とした。MS/MS 条件は、下記表の通りに設定した。移動相は、島津製作所社製の液体クロマトグラフ装置（LC-30AD シリーズ）を使用して、2 台の送液ポンプ（LC-30AD）で移動相 A（1 mmol/L 炭酸水素アンモニウム）と移動相 B（アセトニトリル）を 54 : 46（v/v）の比率で混合し、流速 1.0 mL/minute でガードカラム（ダイセル社製 CHIRALPAK AS-3R、4.0 mm i.d. × 10 mm、粒子径 3 μm）を装着した分析カラム（ダイセル社製 CHIRALPAK AS-3R、4.6 mm i.d. × 100 mm、粒子径 3 μm）に送液した。カラム温度は 25°C、試料の注入量は 1 μL とし、1 分析あたりの測定時間は 5 分とした。

・ MS/MS 条件

Analyte	SRM transition	Polarity	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
(<i>R,S</i>)-Ketamine	<i>m/z</i> 238 → <i>m/z</i> 125	Positive	51	39	22
(<i>R,S</i>)-Norketamine	<i>m/z</i> 224 → <i>m/z</i> 125	Positive	51	35	22
² H ₄ -(<i>R,S</i>)-Norketamine	<i>m/z</i> 228 → <i>m/z</i> 129	Positive	51	35	22

DP: declustering potential、CE: collision energy、CXP: collision exit potential

2. (*2R,6R;2S,6S*)-HNK (測定条件 2)

質量分析には、エレクトロスプレーインターフェイスを装着した AB Sciex 社製 Triple Quad™5500 四重極タンデム質量分析計を使用した。ヒーターガス温度は 500°C、スプレー電圧は 4500V、ネブライザーガス (GS1)、ターボガス (GS2) 及びカーテンガスは、それぞれ、60、90 及び 20 psi に設定した。コリジョンガスは、設定値を 8 (arbitrary units) とした。MS/MS 条件は、下記表の通りに設定した。移動相は、島津製作所社製の液体クロマトグラフ装置 (LC-30AD シリーズ) を使用して、2 台の送液ポンプ (LC-30AD) で移動相 A (5 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH9.0)) と移動相 B (イソプロパノール:アセトニトリル = 4:1 (v/v)) を下記の移動相送液プログラムにて混合し、流速 0.35 mL/minute でガードカラム (ダイセル社製 CHIRALPAK AY-RH、4.0 mm i.d. × 10 mm、粒子径 5 μm) を装着した分析カラム (ダイセル社製 CHIRALPAK AY-RH、4.6 mm i.d. × 150 mm、粒子径 5 μm) に送液した。カラム温度は 40°C に設定し、試料の注入量は 5 μL とした。

・ MS/MS 条件

Analyte	SRM transition	Polarity	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
(2R,6R;2S,6S)-HNK	m/z 240 → m/z 125	Positive	36	31	18

・ 移動相送液プログラム

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0.00	70	30
5.00	70	30
15.00	67.5	32.5
15.01	20	80
25.00	20	80
25.01	70	30
30.00	70	30

検量線の作成

(R,S)-Ketamine 及び(R,S)-norketamine の各エナンチオマーの検量線式は、検量線検体中の濃度を x、IS に対する各エナンチオマーのピーク面積比を y として、最小二乗法（重みファクター $1/x^2$ ）の直線回帰により求めた。なお、(R)-ketamine 及び(R)-norketamine の IS は、 $^2\text{H}_4$ -(R)-norketamine とし、(S)-ketamine 及び(S)-norketamine の IS は、 $^2\text{H}_4$ -(S)-norketamine とした。(2R,6R)-HNK 及び(2S,6S)-HNK の検量線式は、検量線検体中の濃度を x、各エナンチオマーのピーク面積を y として、最小二乗法（重みファクター $1/x^2$ ）の直線回帰により求めた。

アッセイバリデーション

以下の項目について、評価した。

項目	評価方法
選択性	下記試料において、測定対象物質の保持時間に妨害ピークが検出されないことを確認 血漿及び脳 マウス 6 個体のブランク試料 脳脊髄液 マウス 3 個体のブランク試料をプールした 6 ロット
検量線	以下の濃度範囲で 3 分析の真度 (<i>R,S</i>)-Ketamine 及び(<i>R,S</i>)-norketamine 血漿 (1-1000 ng/mL)、脳 (0.5-500 ng/g)、サロゲート脳脊髄液 (2-2000 ng/mL) (<i>2R,6R;2S,6S</i>)-HNK 血漿 (3-1000 ng/mL)、脳 (1.5-500 ng/g)、サロゲート脳脊髄液 (6-2000 ng/mL)
分析単位内再現性	血漿、脳及びサロゲート脳脊髄液、各マトリックスにつき、LQC、MQC 及び HQC をそれぞれ n=5 の真度及び精度
分析単位間再現性	血漿、脳及びサロゲート脳脊髄液、各マトリックスにつき、LQC、MQC 及び HQC をそれぞれ n=5、3 分析の真度及び精度
マトリックス効果	下記のブランク試料に LLOQ 濃度となるように添加した試料の真度及び精度 マウス 6 個体の血漿又は脳 マウス 3 個体の脳脊髄液をプールした 6 ロット
安定性	下記条件で保存後の残存率を算出 室温 4 時間 冷凍 (設定温度-30°C) 16 週間 ((<i>R,S</i>)-ketamine 及び(<i>R,S</i>)-norketamine) 4 週間 ((<i>2R,6R;2S,6S</i>)-HNK) 凍結 (-30°C) 融解 (室温) 3 回 オートサンプラー中安定性 (設定温度 15°C、96 時間)

LQC: low QC、MQC: middle QC、HQC: high QC

第 1 章第 2 節付属実験

動物実験

雄性 C57BL マウス (8 週齢) は、日本エスエルシー株式会社から、雄性 ICR マウス (5 週齢) は、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入した。LPS 誘発うつ病モデルマウスを用いた薬効評価試験は、千葉大学の動物実験委員会によって、それ以外の

実験については、大正製薬株式会社の動物実験委員会によって承認を得て実施した。

試薬

(*R*)-Ketamine は、既存の報告に従い、共創未来ファーマ株式会社又は第一三共株式会社から購入した(*R,S*)-ketamine (動物用ケタラール 50 又はケタラール) と D-(-)-酒石酸の再結晶によって得た [15]。(*R*)-Norketamine hydrochloride 及び(2*R,6R*)-HNK hydrochloride は、過去の報告に従って得た [19]。代謝阻害剤として使用した 1-ABT 及びチクロピジン塩酸塩並びにモデル動物の作成に使用した LPS (L-4130、serotype 0111:B4) は、Sigma-Aldrich 社から購入した。測定用の標準物質として、(2*R,6R*)-HNK hydrochloride は、上記で得たものを使用した。測定以外の第 1 章第 1 節に準じた。その他の試薬及び溶媒は、市販品を使用した。

薬液の調製

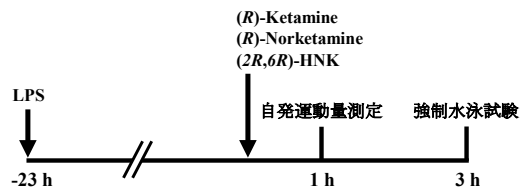
(*R*)-Ketamine、(*R*)-norketamine、(2*R,6R*)-HNK 及び LPS は、生理食塩水にそれぞれ溶解した。1-ABT 及びチクロピジンは、カクテル溶液として、生理食塩水に溶解した。

LPS 誘発うつ病モデルマウスの強制水泳及び PK 試験

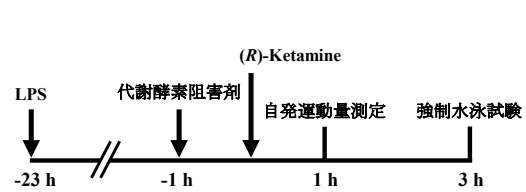
薬液の投与

下記図 A に従い、薬液を投与した。C57BL マウスに生理食塩水又は LPS 溶液 (0.5 mg/kg) を単回腹腔内投与した。その 23 時間後、LPS 処理したマウスに生理食塩水、(*R*)-ketamine、(*R*)-norketamine 又は(2*R,6R*)-HNK (いずれも 10 mg/kg) を単回腹腔内投与した。強制水泳試験及び自発運動量の測定は、それぞれ投与後 3 時間及び 1 時間に行った。代謝酵素阻害剤を用いた実験については、下記図 B に従い、LPS 処理後 22 時間に、マウスに代謝酵素阻害剤 (1-ABT : 50 mg/kg 及びチクロピジン : 20 mg/kg のカクテル溶液) を単回腹腔内投与した。その 1 時間後、生理食塩水又は(*R*)-ketamine (3 又は 10 mg/kg) を単回腹腔内投与した。

(A)



(B)



強制水泳試験

水温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、水深 15 cm となるように水を入れたシリンダー（直径 23 cm、高さ 31 cm）にマウスを入れ、行動解析装置（SCANET MV-40、有限会社メルクエスト、富山、日本）を用いて、マウスの無動時間を 6 分間測定した。

自発運動量の測定

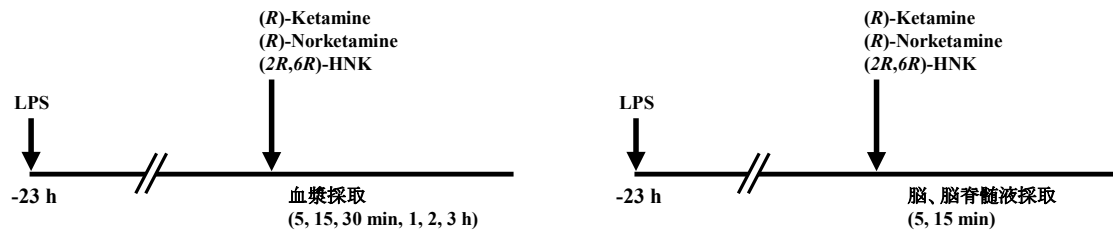
実験ケージ（奥行き 56 cm、幅 56 cm、高さ 33 cm）にマウスを入れ、行動解析装置（SCANET MV-40、有限会社メルクエスト、富山、日本）を用いて、マウスの自発運動量を 60 分間測定した。

PK 試験

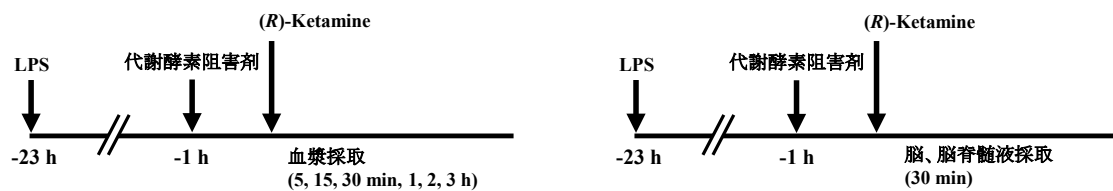
下記図 A に従い、薬液投与及び試料採取を行った。C57BL マウスに LPS 溶液（0.5 mg/kg）を単回腹腔内投与後 23 時間に、(R)-ketamine、(R)-norketamine 又は(2R,6R)-HNK（いずれも 10 mg/kg）を単回腹腔内投与した。血漿は、投与後 5、15 及び 30 分並びに 1、2 及び 3 時間に経時採血し、血液を EDTA-2K 入りチューブに入れた後、直ちに遠心分離（設定値、5600 ×g、6 分）して得た。脳及び脳脊髄液は、投与後 5 及び 15 分に採血し、放血致死によって安楽死させた後に採取した。血漿は、経時採血した血液と同様の方法にて得た。代謝酵素阻害剤を用いた実験については、下記図 B の実験スケジュールに従って、上記と同様の方法にて、血漿、脳及び脳脊髄液を採取した。血漿、脳及び脳脊髄液は、第 1 章第 1 節付属実験の測定用生体試料の調製に記載した方法にて、測定用血漿、脳及び脳脊髄液試料とし、

-30°Cで保存した。これらの生体試料中濃度の測定は、第1章第1節に準じて行った。

(A)

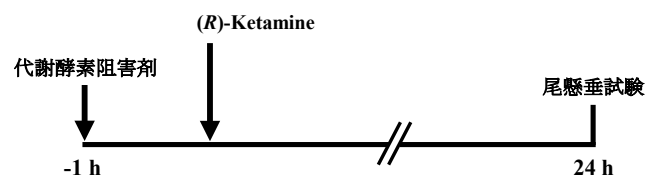


(B)



ナীবマウスの尾懸垂及び PK 試験 薬液の投与

下記図の投与スケジュールに従い、薬液を投与した。ICR マウスに代謝酵素阻害剤 (1-ABT : 50 mg/kg 及びチクロピジン : 20 mg/kg のカクテル溶液) を単回腹腔内投与後 1 時間に、生理食塩水又は(R)-ketamine (10 又は 30 mg/kg) を単回腹腔内投与した。

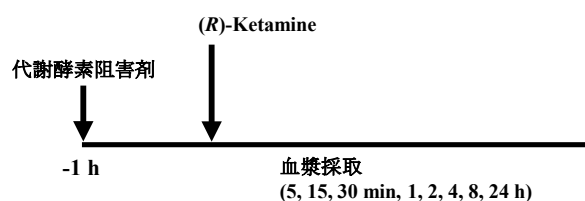


尾懸垂試験

金属性パイプを実験台表面から 47 cm の高さに固定し、マウスの尻尾を持ち上げ粘着性テープを用いて金属パイプに吊した。その後 6 分間、マウスの無動時間を測定した。なお、マウスが全く動かずに吊り下がっている時間を無動時間とし、うつ様行動の指標とした。

PK 試験

下記図の投与スケジュールに従い、薬液投与及び試料採取を行った。ICR マウスに代謝酵素阻害剤（1-ABT : 50 mg/kg 及びチクロピジン : 20 mg/kg のカクテル溶液）を単回腹腔内投与後 1 時間に、(R)-ketamine（10 又は 30 mg/kg）を単回腹腔内投与した。血漿は、投与後 5、15 及び 30 分並びに 1、2、4、8 及び 24 時間に経時採血し、血液を EDTA-2K 入りチューブに入れた後、直ちに遠心分離（設定値、5600×g、6 分）して得た。血漿は、第 1 章第 1 節付属実験の測定用生体試料の調製に記載した方法にて、測定用血漿試料とし、-30°C で保存した。これらの血漿中濃度の測定は、第 1 章第 1 節に準じて行った。



データ解析

全てのデータは、平均値±標準誤差で表示した。LPS 誘発うつ病モデルマウスの試験は、PASW Statistics 20（日本 IBM 株式会社）、ナীবマウスの試験は、SAS system Ver. 9.2（SAS Institute Japan 株式会社）にて、統計処理を行った。有意差の検定は、一元配置分散分析（one-way analysis of variance : one-way ANOVA）を行い、次いで Fisher's LSD test を行った。PK パラメータは、WinNonlin 7.0 software（Certara, Princeton, NJ）にて、ノンコンパートメント解析により算出した。

第 2 章付属実験

動物実験

雄性 C57BL マウス（8 又は 9 週齢）、雄性 ICR マウス（5 週齢）及び雄性 SD ラット（4 又は 7 週齢）は、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入した。全ての動物飼育及び実験は、大正製薬株式会社の動物実験に関する規定及び動物実験に関するガイド

ライン (The Japanese Experimental Animal Research association standards) に従い行った。

試薬

(*R,S*)-ketamine (動物用ケタラール 50) は、共創未来ファーマ株式会社から購入した。
(*R*)-Ketamine 及び(*S*)-ketamine は、既存の報告に従い、共創未来ファーマ株式会社から購入した(*R,S*)-ketamine と D-(-)-酒石酸の再結晶によって得た [15]。デシプラミンは、富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。NBQX 及びコルチコステロンは、それぞれ Tocris Cookson 社及び Sigma-Aldrich 社から購入した。測定用の標準物質として、上記の(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine を使用した。IS は、第 1 章第 1 節に準じた。その他の試薬及び溶媒は、市販品を使用した。

薬液の調製

(*R*)-Ketamine 及び(*S*)-ketamine は、生理食塩水に溶解し、(*R,S*)-ketamine は、生理食塩水で希釈した。デシプラミン及びコルチコステロンは、0.3%モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 80) 含有生理食塩水に、それぞれ溶解及び懸濁した。

強制水泳試験

動物は、雄性 C57BL マウスを使用した。試験前日に、水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、水深 13 cm となるように水を入れたシリンダー (直径 17 cm、高さ 24 cm) にマウスを入れ、6 分間強制的に水泳させた (プレ試験)。翌日、マウスを再び 6 分間強制的に水泳させ、無動時間を測定した (試験)。試験時には、シリンダーの前方からマウスの行動をビデオカメラで撮影した。マウスが水中で全く動かないか、あるいは水に沈むのを防ぐために後肢を動かすのみの行動を無動化とし、その時間を、うつ様行動の指標として測定した。(*R*)-Ketamine 又は(*S*)-ketamine (いずれも 10 又は 30 mg/kg) は、試験開始の 30 分又は 24 時間前に単回腹腔内投与した。

尾懸垂試験

動物は、ICRマウスを使用した。金属性パイプを実験台表面から45 cmの高さに固定し、マウスの尻尾を持ち上げ粘着性テープを用いて素早く金属パイプに吊した。その後6分間、マウスの無動時間を測定した。なお、マウスが全く動かずに吊り下がっている時間を無動時間とし、うつ様行動の指標とした。(R)-ketamine 又は(S)-ketamine (いずれも10又は30 mg/kg) は、試験開始の30分並びに24又は48時間前に、(R,S)-ketamine (30 mg/kg) は、試験開始の24又は48時間前に単回腹腔内投与した。ポジティブコントロールとして使用したデシプラミンは、試験開始の30分前に単回腹腔内投与した。

ラットコルチコステロン慢性投与モデル

動物は、雄性SDラットを使用した。生理食塩水又はコルチコステロン (20 mg/kg) をラットに1日1回、21日間反復皮下投与した。強制水泳試験は、反復投与後48時間に行った。水温25°C、水深30 cmとなるように水を入れたシリンダーにラットを入れ、10分間強制的に水泳させた。試験時には、シリンダーの前方からラットの行動をビデオカメラで撮影した。ラットが水中で全く動かないか、あるいは水に沈むのを防ぐために後肢を動かすのみの行動を無動化とし、その時間をうつ様行動の指標として測定した。(R)-Ketamine、(S)-ketamine (いずれも3又は10 mg/kg) 又は(R,S)-ketamine (10 mg/kg) は、試験開始の24時間及び30分前の2回、あるいは24時間前に単回腹腔内投与した。NBQX (10 mg/kg) は、(R)-ketamine 投与 (10 mg/kg、24時間前1回) の5分前に単回皮下投与した。

自発運動量測定

アクリル製のケージ (47×28.5×29.5 cm) にラットを、アクリル製ケージ (内径30 cm、高さ30 cm) にマウスを入れ、60分間馴化後、(R)-ketamine 又は(S)-ketamine を投与した。投与後60分間、防音箱の中でSCANET (ニューロサイエンス株式会社、東京、日本) を用いて運動量を測定した。

PK 試験

雄性 C57BL マウス又は雄性 SD ラットに(*R*)-ketamine 又は(*S*)-ketamine (マウス: 10 又は 30 mg/kg、ラット: 3 又は 10 mg/kg) を単回腹腔内投与した。血漿は、投与後 15 及び 30 分並びに 1、2、4、8 及び 24 時間に経時採血し、EDTA-2K 入りチューブに入れた後、直ちに遠心分離 (設定値、11200×g、3 分又は 5600×g、6 分) して得た。脳及び脳脊髄液は、投与後 30 分及び 24 時間に採血し、放血致死によって安楽死させた後に採取した。血漿は経時採血した血液と同様に、遠心分離 (設定値、11200×g、3 分) して得た。マウス血漿、脳及び脳脊髄液並びにラット脳は、第 1 章第 1 節付属実験の測定用生体試料の調製に準じて、測定用血漿、脳及び脳脊髄液試料を調製し、-30℃で保存した。ラット脳脊髄液は、生理食塩水で 2 倍希釈して、測定用脳脊髄液試料とし、血漿は採取したものを測定用血漿試料とした。これらのラットの試料は、-30℃で保存した。生体試料中濃度の測定は、第 1 章第 1 節に準じて行った。なお、本測定は測定対象が(*R*)-ketamine 及び(*S*)-ketamine であったため、検量線及び QC の調製は、(*R*)-ketamine、(*S*)-ketamine についてのみ行い、代謝物については調製しなかった。

データ解析

全てのデータは、平均値±標準誤差で表示した。統計処理には、SAS system Ver. 9.2 (SAS Institute Japan 株式会社) を使用した。有意差の検定は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance : one-way ANOVA) を行い、次いで Student's t-test 又は Dunnett's test を行った。PK パラメータは、WinNonlin 7.0 software (Certara, Princeton, NJ) にて、ノンコンパートメント解析により算出した。

参考文献

- [1] Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry*. 2006;163:1905-1917.
- [2] Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M. STAR*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006;163:28-40.
- [3] Goodman WK, Murphy TK, Storch EA. Risk of adverse behavioral effects with pediatric use of antidepressants. *Psychopharmacology*. 2007;191:87-96
- [4] Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47:351-354.
- [5] Zarate Jr CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an *N*-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63:856–864.
- [6] DiazGranados N, Ibrahim L, Brutsche N, Ameli R, Henter ID, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Zarate Jr CA. Rapid resolution of suicidal Ideation after a single infusion of an NMDA antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2010;71:1605-1611.
- [7] Newport DJ, Carpenter LL, McDonald WM, Potash JB, Tohen M, Nemeroff CB, APA Council of Research Task Force on Novel Biomarkers and Treatments. Ketamine and other NMDA antagonists: early clinical trials and possible mechanisms in depression. *Am J Psychiatry*. 2015;172:950–966.
- [8] Kishimoto T, Chawla JM, Hagi K, Zarate Jr CA, Kane JM, Bauer M, Correll CU. Single-dose infusion ketamine and non-ketamine *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists for unipolar and

bipolar depression: a meta-analysis of efficacy, safety and time trajectories. *Psychol Med.* 2016;46:1459-1472.

[9] Wilkinson ST, Ballard ED, Bloch MH, Mathew SJ, Murrough JW, Feder A, Sos P, Wang G, Zarate Jr CA, Gerard Sanacora. The effect of a single dose of intravenous ketamine on suicidal ideation: a systematic review and individual participant data meta-analysis. *Am J Psychiatry.* 2018;175:150-158.

[10] Freedman R. Further investigation of ketamine. *Am J Psychiatry.* 2016;173:761-762.

[11] Newport DJ, Schatzberg AF, Nemeroff CB. Whether ketamine as an antidepressant: panacea or toxin? *Depress Anxiety.* 2016;33:685-688.

[12] Kohrs R and Durieux ME. Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg.* 1998;87:1186-1193.

[13] Domino EF. Taming the ketamine tiger. 1965. *Anesthesiology.* 2010;113:678-684.

[14] Hashimoto K. R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without risk of brain toxicity. *Psychol Med.* 2016;46:2449-2451.

[15] Zhang JC, Li SX, Hashimoto K. R (-)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+)-ketamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;116:137-141.

[16] Yang C, Shirayama Y, Zhang JC, Ren Q, Yao W, Ma M, Dong C, Hashimoto K. R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. *Transl Psychiatry.* 2015;5:e632.

[17] Leal GC, Bandeira ID, Correia-Melo FS, Telles M, Mello RP, Vieira F, Lima CS, Jesus-Nunes AP, Guerreiro-Costa LNF, Marback RF, Caliman-Fontes AT, Marques BLS, Bezerra MLO, Dias-Neto AL, Silva SS, Sampaio AS, Sanacora G, Turecki G, Loo C, Lacerda ALT, Quarantini LC. Intravenous arketamine for treatment-resistant depression: open-label pilot study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2021;271:577-582.

[18] Desta Z, Moaddel R, Ogburn ET, Xu C, Ramamoorthy A, Venkata SL, Sanghvi M, Goldberg ME,

Torjman MC, Wainer IW. Stereoselective and regiospecific hydroxylation of ketamine and norketamine. *Xenobiotica*. 2012;42:1076-1087.

[19] Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate Jr CA, Gould TD. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*. 2016;533:481-486.

[20] Yang C, Kobayashi S, Nakao K, Dong C, Han M, Qu Y, Ren Q, Zhang J, Ma M, Toki H, Yamaguchi J, Chaki S, Shirayama Y, Nakazawa K, Manabe T, Hashimoto K. AMPA receptor activation-independent antidepressant actions of ketamine metabolite (*S*)-norketamine. *Biol Psychiatry*. 2018;84:591-600.

[21] Yang C, Qu Y, Abe M, Nozawa D, Chaki S, Hashimoto K. (*R*)-Ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than its metabolite (*2R,6R*)-hydroxynorketamine. *Biol Psychiatry*. 2017;82:e43-e44.

[22] Zhang K, Yang C, Chang L, Sakamoto A, Suzuki T, Fujita Y, Qu Y, Wang S, Pu Y, Tan Y, Wang X, Ishima T, Shirayama Y, Hatano M, Tanaka KF, Hashimoto K. Essential role of microglial transforming growth factor- β 1 in antidepressant actions of (*R*)-ketamine and the novel antidepressant TGF- β 1. *Transl Psychiatry*. 2020;10:1-12.

[23] Svensson JO, Gustafsson LL. Determination of ketamine and norketamine enantiomers in plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;678:373-376.

[24] Rosas MER, Patel S, Wainer IW. Determination of the enantiomers of ketamine and norketamine in human plasma by enantioselective liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;794:99-108.

[25] Moaddel R, Venkata SL, Tanga MJ, Bupp JE, Green CE, Iyer L, Furimsky A, Goldberg ME,

Torjman MC, Wainer IW. A parallel chiral-achiral liquid chromatographic method for the determination of the stereoisomers of ketamine and ketamine metabolites in the plasma and urine of patients with complex regional pain syndrome. *Talanta*. 2010;82:1892-1904.

[26] Hasan M, Hofstetter R, Fassauer GM, Link A, Siegmund W, Oswald S. Quantitative chiral and achiral determination of ketamine and its metabolites by LC-MS/MS in human serum, urine and fecal samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;139:87-97.

[27] Peng L, Jayapalan S, Chankvetadze B, Farkas T. Reversed-phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris (chloromaethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases. *J Chromatogr A*. 2010;1217:6942-6955.

[28] Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol*. 2001;21:15-23.

[29] Davisson JN. Rapid gas chromatographic analysis of plasma levels of ketamine and major metabolites employing either nitrogen selective or mass spectroscopic detection. *J Chromatogr*. 1978;146:344-349.

[30] Yanagihara Y, Ohtani M, Kariya S, Uchino K, Aoyama T, Yamamura Y, Iga T. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketamine and its active metabolite, norketamine, in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000;746:227-231.

[31] Porpiglia N, Musile G, Bortolotti F, Palo EFD, Tagliaro F. Chiral separation and determination of ketamine and norketamine in hair by capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int*. 2016;266:304-310.

[32] Sandbaumhüter FA, Thormann W. Enantioselective capillary electrophoresis provides insight into the phase II metabolism of ketamine and its metabolites in vivo and in vitro. *Electrophoresis*. 2018;39:1478-1481.

[33] Shirayama Y, Hashimoto K. Effects of a single bilateral infusion of R-ketamine in the rat brain

regions of a learned helplessness model of depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2017;267:177-182.

[34] Shirayama Y, Hashimoto K. Lack of antidepressant effects of (2R,6R)-hydroxynorketamine in a rat learned helplessness model: comparison with (R)-ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018;21:84-8.

[35] Suzuki K, Nosyreva E, Hunt KW, Kavalali ET, Monteggia LM. Effects of a ketamine metabolite on synaptic NMDAR function. *Nature*. 2017;546:E1-E3.

[36] Peltoniemi MA, Hagelberg NM, Olkkola KT, Saari TI. Ketamine: A review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55:1059-1077.

[37] Larenza MP, Landoni MF, Levionnois OL, Knobloch M, Kronen PW, Theurillat R, Schatzmann U, Thormann W. Stereoselective pharmacokinetics of ketamine and norketamine after racemic ketamine or S-ketamine administration during isoflurane anaesthesia in shetland ponies. *Br J Anaesth*. 2007;98:204-212.

[38] Pham TH, Defaix C, Xu X, Deng SX, Fabresse N, Alvarez JC, Landry DW, Brachman RA, Denny CA, Gardier AM. Common neurotransmission recruited in (R,S)-ketamine and (2R,6R)-hydroxynorketamine-induced sustained antidepressant-like effects. *Biol Psychiatry*. 2018;84:e3-e6.

[39] Yao N, Skiteva O, Zhang X, Svenningsson P, Chergui K. Ketamine and its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine induce lasting alterations in glutamatergic synaptic plasticity in the mesolimbic circuit. *Mol Psychiatry*. 2018;23:2066-2077.

[40] Singh JB, Fedgchin M, Daly E, Xi L, Melman C, Bruecker GD, Tadic A, Sienaert P, Wiegand F, Manji H, Drevets WC, Nueten LV. Intravenous esketamine in adult treatment resistant depression: a double-blind, double-randomization, placebo-controlled study. *Biol Psychiatry*. 2016;80:424-431.

[41] Hashimoto K, Kakiuchi T, Ohba H, Nishiyama S, Tsukada H. Reduction of dopamine D2/3

receptor binding in the striatum after a single administration of esketamine, but not R-ketamine: a PET study in conscious monkeys. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2017;267:173-176.

[42] Iijima M, Ito A, Kurosu S, and Chaki S. Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats. *Brain Res.* 2010;1359:75-80.

[43] Koike H, Iijima M, and Chaki S. Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;107:20-23.

[44] Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science.* 2010;329:959-964.

[45] Koike H, Iijima M, Chaki S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behav Brain Res.* 2011;224:107-111.

[46] Koike H, Chaki S. Requirement of AMPA receptor stimulation for the sustained antidepressant activity of ketamine and LY341495 during the forced swim test in rats. *Behav Brain Res.* 2014;271:111-115.

[47] Alt A, Nisenbaum ES, Bleakman D, Witkin JM. A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:1273-1288.

[48] Pazini FL, Cunha MP, Rosa JM, Colla AR, Lieberknecht V, Oliveira Á, Rodrigues AL. Creatine, similar to ketamine, counteracts depressive-Like behavior induced by corticosterone via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Neurobiol.* 2016;53:6818-6834.

[49] Yang C, Ren Q, Qu Y, Zhang JC, Ma M, Dong C, Hashimoto K. Mechanistic target of rapamycin-independent antidepressant effects of (*R*)-Ketamine in a social defeat stress model. *Biol Psychiatry.* 2018;83:18-28.

[50] Hashimoto K. Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A

historical overview and future perspective. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2019;73:613-627.

論文目録

1. A rapid and sensitive chiral LC-MS/MS method for the determination of ketamine and norketamine in mouse plasma, brain and cerebrospinal fluid applicable to the stereoselective pharmacokinetic study of ketamine
Toki H, Ichikawa T, Mizuno-Yasuhira A, Yamaguchi J
J Pharm Biomed Anal. 2018;148:288-297.
2. (2*R*,6*R*)-Hydroxynorketamine is not essential for the antidepressant actions of (*R*)-ketamine in mice
Yamaguchi J, **Toki H**, Qu Y, Yang C, Koike H, Hashimoto K, Mizuno-Yasuhira A, Chaki S
Neuropsychopharmacology. 2018;43:1900-1907.
3. Antidepressant Potential of (*R*)-Ketamine in Rodent Models: Comparison with (*S*)-Ketamine
Fukumoto K, **Toki H**, Iijima M, Hashihayata T, Yamaguchi J, Hashimoto K, Chaki S
J Pharmacol Exp Ther. 2017;361:9-16.

謝辞

本論文の執筆に際し、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻及びご校閲を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野 教授 小暮健太郎博士に謹んで感謝の意を表します。また、本論文のご校閲及び適切なるご助言を頂きました徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 教授 石田竜弘博士、創薬理論化学分野 教授 立川正憲博士に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました千葉大学社会精神保健教育研究センター 病態解析研究部門 教授 橋本謙二博士、並びに関係諸氏に心から御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました大正製薬株式会社 常務執行役員 北谷脩氏、医薬研究本部 本部長 ロドニー・スティーブンス博士、同フェロー 茶木茂之博士、安全性・動態研究所 所長 山本浩二博士、長年に渡り論文執筆の後押しをして頂いたシニアスペシャリスト 山口順一博士、QA 推進室 室長 遠藤裕美博士、薬物動態研究室 安平明公博士に心から感謝申し上げます。また、本研究にご協力くださった住友ファーマ株式会社 福本健一博士、大塚製薬株式会社 小池宏幸博士、中外製薬株式会社 市川拓也氏、大正製薬株式会社 端早田隆博士、飯島通彦博士、同薬物動態研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。