ラットにおける Trimoprostil の体内動態に関する研究 (第3報): Trimoprostil 経口投与後の乳汁および胎仔への移行

深沢英雄, 斉藤広子, 市本範子, 富澤宏樹, 市原成泰, 立石 満
日本ロシュ研究所, 生化学部 〒247 神奈川県鎌倉市梶原200

藤野明治, 大谷勇作, 矢島多恵
野村生物科学研究所 〒247 神奈川県鎌倉市梶原4-7-1

Key words : Trimoprostil/Excretion into milk/Foeto-placental transfer (rat)

Pharmacokinetic Studies of Trimoprostil in Rats (III) : Excretion into Milk and Foeto-placental Transfer

Hideo FUKAZAWA, Hiroko SAITOH, Noriko ICHIMOTO, Hiroki TOMISAWA,
Shigeyasu ICHIHARA, and Mitsuru TATEISHI

Department of Biochemistry, Nippon Roche Research Center,
200 Kajiwara, Kamakura, Kanagawa 247, Japan

Akiharu FUJINO, Yusaku OHTANI and Tae YAJIMA

Nomura Research Industry Life Science, 4-7-1 Kajiwara,
Kamakura, Kanagawa 247, Japan

Summary

1. Excretion into the milk

^3H -Trimoprostil labeled at a C-11 methyl position was given to lactating rats at a single oral dose of $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ to examine excretion of total radioactivity into the milk.

Not only total radioactivity but also intact trimoprostil are unlikely to be subjected to an active transfer from the blood to the milk.

2. Foeto-placental transfer

On the 14th and 19th gestation day ^3H -trimoprostil was orally given to pregnant rats ($100\text{ }\mu\text{g/kg}$) to examine foeto-placental transfer.

Both the total radioactivity and the intact drug were effectively blocked by foeto-placental barrier on Day 14 and 19 of gestation.

緒言

trimoprostil は、PGE₂ 誘導体の1つであり、胃酸分泌抑制、胃粘膜保護作用等の薬理活性を有することから、臨床面において抗潰瘍剤として期待される化合物である。今回、著者らは、trimoprostil を妊娠ラットあるいは授乳ラットに経口投与し、その胎仔および乳汁への移行性について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 使用動物

(1) 胎仔移行実験、乳汁中移行実験

Sprague-Dawley 系妊娠ラット（交配時10週齢）を購入（日本チャールス・リバー株式会社）後、恒温恒湿（23±5℃，55±5%）の条件下で予備飼育し、体重増加の順調なラットを実験に供した。

胎仔移行実験では、妊娠14日目と19日目（ともに12週齢）の雌ラット（各6匹）を実験に供した。投薬時の体重は246～266 g（妊娠14日目）および280～316 g（妊娠19日目）であった。乳汁中移行実験では、正常分娩した雌ラット4匹を分娩9日目（13週齢）に実験に用いた。投薬時の体重は246～320 gであった。いずれの実験においても予備飼育期間および実験期間を通し、ラットには、固型飼料（NMF、オリエンタル酵母工業）および水道水を自由に摂取させた。

(2) 全身オートラジオグラフィーによる胎仔移行実験

Sprague-Dawley 系妊娠ラット（交配時10～11週齢）を購入（日本チャールス・リバー株式会社）後、恒温恒湿（24±2℃，55±10%）条件下で予備飼育し、妊娠14日目と19日目に異常のない個体を選び実験に供した。薬物投与時の体重は324 g（14日目）および354 g（19日目）であった。

2. 使用薬物

本実験に用いた trimoprostil [11R, 16, 16-trimethyl-15R-hydroxy-9-oxoprostanoic acid] は、F. Hoffmann-La Roche 社（スイス）にて、また、その11位のメチル基を³Hで標識した³H-trimoprostil および5位を¹⁴Cで標識した¹⁴C-trimoprostil は、Hoffmann-La

Fig. 1. Chemical structure of trimoprostil.

Roche 社（アメリカ）にて合成され供与を受けた。これらの化合物の化学構造は、Fig. 1 に示した。

³H-trimoprostil および ¹⁴C-trimoprostil の合成法と放射化学的純度（96.0%以上）の確認法については、前報（富澤ら，1986）に記載した。オキシトシンは、Sigma 社（アメリカ）より購入した。その他の試薬は、市販の最高純度の試薬を用いた。

3. 投与液の調製

³H-trimoprostil は投与前に非標識 trimoprostil を用いて希釈（800 μCi/mg）後、¹⁴C-trimoprostil（102.9 μCi/mg）は希釈せず40% PEG-400 水溶液に溶解し、最終濃度を20 μg/ml に調整して投与液とした。

4. 投薬および分析試料の採取

(1) 胎仔移行実験

薬物投与前16 hr 絶食させた妊娠ラット（妊娠14日目および19日目，1群3匹をそれぞれ2群）に³H-trimoprostil を100 μg/kg の用量で経口投与した。投与後，ラットを集団ケージに収容し，投与4 hr 後から給餌を再開させた。この間，水は自由に摂取させた。

投薬後45 min および24 hr に ether 麻酔下，腹大動脈採血により，ラットを脱血致死せしめ，羊水の一部を採取した後，母獣の肝臓，胎盤（5個）および胎仔（5匹，14日目は全部，19日目は頭部および胴部に分離）は生理食塩液にて洗浄後，正確に秤量し，3～7倍量の水を加えてホモジナイズした。

(2) 全身オートラジオグラフィーによる胎仔移行実験

薬物投与前16～18 hr 絶食した妊娠ラット（妊娠14日目および19日目，各1匹）に¹⁴C-trimoprostil を100 μg/kg の用量で経口投与した。投薬後45 min にラットをクロロホルム吸入死させた後，第1報（富澤ら，1986）に記載した方法に従ってオートラジオグラムを作成した。

(3) 乳汁中移行実験

薬物投与前 3 hr 絶食させ、かつ乳仔と隔離した母獣 4 匹に 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で ^3H -trimoprostil を経口投与した。投薬後、母獣を個別ケージに収容し、投与 4 hr 後から給餌を再開させた。この間水は自由に摂取させた。

投薬後所定の時点 (20, 40 min, 1, 2, 4, 7, 24 hr, そのうち未変化体測定時点は 40 min, 2, 4, 7, 24 hr) に無麻酔下で母獣を軽く保定し搾乳 (約 200 μl) を行った。搾乳 1 hr 前にオキシトシン (5 U/ml 生理食塩液) を 0.1 ml/kg の用量で腹腔内投与した。また、搾乳と同時に尾静脈末端よりヘパリン処理したマイクロピペットを用いて血液 (20~70 μl) を採取した。

5. 試料中放射能および未変化体の測定法

(1) 放射能の測定

血液 (20~100 μl)、羊水 (100~200 μl)、乳汁 (30~50 μl) および組織ホモジネート (200~300 μl) は自動試料燃焼装置 (ASC-113, Aloka) にて試料中の ^3H をトリチウム水として Aquasol-2 (New England Nuclear 社) シンチレーター中に回収した後、液体シンチレーションカウンタ (LSC-703, Aloka) を用いて放射能を測定した。

(2) 未変化体の測定

胎仔移行実験では、血漿 150 μl および組織 (肝臓、胎盤、胎仔) ホモジネート 200 μl に非標識 trimoprostil を担体として 2 μg 添加した。また、乳汁中移行実験では、血漿および乳汁をそれぞれ 4 匹分 (1 匹あたり 50 μl) 合わせて 200 μl (ただし、4 hr 目の乳汁は 3 匹分 150 μl , 7 hr では 1 匹のみ 100 μl) に非標識 trimoprostil (2 μg) を同様に担体として添加した。次いで 200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 1 ml を加え、有機溶媒抽出を行ったのち、逆相 HPLC による分析を第 1 報 (富澤ら, 1986) の方法に準じて行った。

実験結果

1. 胎仔移行

1-1 組織内濃度

妊娠 14 日目ならびに 19 日目のラットに ^3H -trimoprostil (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を経口投与し、投薬後 45 min および 24 hr における胎仔および母獣各組織中の放射能、および投薬後 45 min における未変化体を測定し Table I, II に示した。

(1) 妊娠 14 日目

投薬後 45 min における胎盤、胎仔中の放射能

Table I. Tissue concentration of ^3H -radioactivity in pregnant rats and foetuses after a single oral administration of ^3H -trimoprostil at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

	45 min		24 hr	
	ng eq./g tissue	% of dose	ng eq./g tissue	% of dose
[14 Gestation]				
*Blood	56.8 ± 10.6	4.37 ±0.81	1.14 ±0.09	0.09 ±0.01
*Liver	564 ±179	16.05 ±4.85	3.48 ±0.42	0.15 ±0.02
**Placenta	13.9 ± 2.8	0.008±0.002	0.53 ±0.09	0.0005±0.0000
*Amniotic fluid	1.01± 0.10		0.085±0.002	
**Foetus	3.45± 0.41	0.002±0.000	<D. L. (0.076)	
[19 Gestation]				
*Blood	72.7 ± 6.4	5.58 ±0.49	1.14 ±0.12	0.09 ±0.01
*Liver	548 ± 52	17.18 ±1.39	7.42 ±1.40	0.31 ±0.06
**Placenta	18.9 ± 1.9	0.03 ±0.00	1.26 ±0.11	0.002 ±0.000
*Amniotic fluid	2.07± 0.53		1.22 ±0.25	
**Foetus head	8.59± 0.82	0.02 ±0.00	0.511±0.080	0.001±0.000
body	12.0 ± 1.1	0.05 ±0.01	1.69 ±0.49	0.01 ±0.00

*: Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3 females and is expressed in ng trimoprostil equivalent per g (ml) tissue.

**: Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 15 foetuses obtained from 3 females.

<D.L.: Below the detection limit in the parentheses.

Table II. Tissue concentration of intact trimoprostil in rats on day 14 Dnd 19 of pregnancy 45 min after a single oral administration of ^3H -trimoprostil at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

	14 th gestation day		19 th gestation day	
	ng/g	% of total ^3H	ng/g	% of total ^3H
*Plasma	20.0 $\pm$ 3.3	25.3 $\pm$ 1.5	34.1 $\pm$ 3.5	30.3 $\pm$ 2.2
*Liver	126 $\pm$ 29	24.7 $\pm$ 3.9	177 $\pm$ 18	32.4 $\pm$ 0.7
**Placenta	4.68 $\pm$ 0.72	34.8 $\pm$ 3.3	5.08 $\pm$ 0.34	27.1 $\pm$ 1.0
**Foetus	1.15 $\pm$ 0.14	34.2 $\pm$ 6.1		
head			3.40 $\pm$ 0.59	39.4 $\pm$ 5.3
body			2.20 $\pm$ 0.21	18.3 $\pm$ 0.6

*: Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3 females and is expressed in ng trimoprostil equivalent per g (ml) tissue.

**: Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 15 fetuses obtained from 3 females.

はそれぞれ 14 ng eq./g および 3.5 ng eq./g であり、母獣血液中濃度 57 ng eq./ml の24%および6.1%と低値であった。この時点における胎仔1匹あたりの移行量は、投与量の0.002%あるいはそれ以下であった。

投薬後 45 min における母獣血漿、胎盤および胎仔中未変化体濃度は、放射能のそれぞれ25%、35%および34%であった。

投薬後 24 hr には、母獣血液中放射能 (1.1 ng eq./ml) は、45 min 値の2.0%に低下し、胎盤においてもその濃度 (0.5 ng eq./g) は、45 min の3.8%まで低下していた。胎仔中濃度は検出限界 (0.076 ng eq./g) 以下にまで減少していた。

(2) 妊娠19日目

投薬後 45 min における胎盤、胎仔中放射能はそれぞれ 19 ng eq./g および 9 ng eq./g (胎仔頭部)~12 ng eq./g (胎仔胴部)であった。これらの値はそれぞれ母獣血液中濃度 (73 ng eq./ml) の26%および12% (胎仔頭部)~17% (胎仔胴部)であり、妊娠14日目と比較し、胎仔中濃度の増加が観察された。胎仔1匹あたりの移行量は、投与量の0.07%であった。

投薬後 45 min における母獣血漿、胎盤、胎仔頭部および胎仔胴部中未変化体濃度は、各組織中放射能のそれぞれ30%、27%、39%および18%であった。

投薬後 24 hr では、母獣血液中放射能 (1.1 ng eq./ml) は、45 min 値の1.6%に低下していた。胎盤 (1.3 ng eq./g) および胎仔胴部 (1.7 ng eq./g) の濃度は、母獣血液中濃度とほぼ等しいものであったが、胎仔頭部の濃度 (0.5 ng eq./g)

は母獣血液の45%であった。胎仔1匹あたりの移行量は、0.01%であった。

1-2 組織内分布

妊娠14日目および19日目のラットに ^{14}C -trimoprostil (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を経口投与し、投薬後 45 min における全身オートラジオグラムを作成し、その組織内分布について検討した (Fig. 2, 3)。

(1) 妊娠14日目

胎盤および胎仔への放射能の分布はほとんど認められず、胎仔の特定の組織への放射能の局在はなかった。母獣では、胃および小腸内容物に高い放射能の分布が、次いで小腸、肝臓、腎臓に比較的高い放射能の分布が認められた。これら母獣での放射能の分布は、正常雌ラットでの全身オートラジオグラム (富澤ら, 1986) とほぼ同様の結果であった。

(2) 妊娠19日目

胎盤および胎仔あるいは胎仔の特定組織には、妊娠14日目のラットと同様、放射能の分布はほとんど認められなかった。母獣での放射能の分布は、妊娠14日目とほぼ同様であった。

2. 乳汁中移行

分娩後9日目の授乳ラットに ^3H -trimoprostil (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を経口投与した後の血液および乳汁中の放射能、未変化体濃度を経時的に測定した (Fig. 4)。

血液中放射能は、 ^3H -trimoprostil 投薬後 40 min (11 ng eq./ml) より 7 hr (8.9 ng eq./ml) まではほぼ一定の値を示した。投薬 24 hr 後の血液中濃度は 1.4 ng eq./ml までに低下した。

乳汁中放射能は、投薬後徐々に増加し、7 hr 後

Fig. 2. Autoradiograms showing the organ distribution of radioactivity 45 min after an oral administration of ^{14}C -trimoprostil ($100 \mu\text{g/kg}$) to a female rat on Day 14 of gestation.

Fig. 3. Autoradiograms showing the organ distribution of radioactivity 45 min after an oral administration of ^{14}C -trimoprostil ($100 \mu\text{g/kg}$) to a female rat on Day 19 of gestation.

に最高値 (7.7 ng eq./ml) に達した。その後 24 hr までほぼ血液中濃度と平行した減少が認められた。

血液中未変化体濃度 (未変化 trimoprostil の血球移行率は極めて小さいため、血漿中未変化体濃度からヘマトクリット値を用いて換算) は、投薬後 4 hr で最高値 (3.3 ng/ml) に達したが、この値は同時点の放射能の 33% であった。投薬後 7 hr の血液中未変化体濃度 (1.1 ng/ml) は、最高濃度 (4 hr 値) の 33% に低下していた。

乳汁中未変化体濃度は、同時点の血液中未変化体濃度の 29% (40 min 値) ~ 59% (7 hr 値) であったが、その経時変化は、血液中の濃度とほぼ平行しており、投薬後 4 hr に最高値 (1.1 ng/ml) に達した。この値は、同時点の乳汁中放射能の 17

% に相当した。投薬後 7 hr では乳汁中未変化体濃度は、最高値の 59% に、投薬後 24 hr では検出限界 (0.073 ng/ml) 以下に低下した。

考 察

1. 胎仔移行

一般に血液胎盤関門による生体外異物阻止能力は、妊娠後期において低下すると言われており (麻生, 1976)、今回の実験で trimoprostil についても同様の傾向が認められた。すなわち、妊娠 19 日目では、 ^3H -trimoprostil 投与後の胎仔中放射能濃度は 14 日目に比し高い値を示した。

しかし、妊娠 19 日目においても、 ^3H -trimoprostil 投与後 45 min における胎仔中放射能は、母獣血液中濃度の 16% 以下であり、本薬物の胎仔

Fig. 4. Concentration of ^3H -radioactivity and trimoprostil in the maternal blood and milk after a single oral administration of ^3H -trimoprostil ($100 \mu\text{g/kg}$) to lactating rats. Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n=3-4$). For determination of the intact drug, combined specimens of the milk and the plasma obtained from 3-4 rats were used.

への移行が、血液胎盤関門によりかなり強く阻止されていることは明らかである。このことは、 ^{14}C -trimoprostil 投与後の全身オートラジオグラフィで、胎児への放射能分布がほとんど認められないという結果からも支持される。

妊娠19日目の胎仔中放射能には、頭部と胴部で若干差が認められ、頭部の濃度は胴部よりも常に低い値を示した。一方、投薬後 45 min に測定した未変化体濃度は、逆に頭部で胴部よりも高い値を示した。これらの結果から、妊娠19日目においては、胎仔中の血液胎盤関門がある程度機能しており、代謝物に比べ、より脂溶性の高い未変化体が優先的に胎仔脳内に移行し、脂溶性の低い代謝物の移行がある程度阻止されている可能性が考えられる。

妊娠19日目の胎仔胴部における未変化体濃度と放射能濃度の比 (1:5) は、母獣血液のそれ (1:3) より小さいものであった。現時点では、本結果が何に由来しているかは明らかではないが、(1)胎仔中で trimoprostil の代謝変換が起っている、(2)母獣血液中のあるいは胎盤中で生成した代謝物の胎仔への移行量が増加している、の2つの

可能性が考えられよう。

2. 乳汁中移行

^3H -trimoprostil 投与後の血液中および乳汁中未変化体濃度は、ほぼ平行した経時変化を示し、未変化体は速やかに血液、乳汁間で平衡に達することが示唆された。一方、投薬後 7 hr までの放射能の経時変化は、血液と乳汁とで異なっていた。すなわち、血液中濃度は投薬後速やかに増加するのに対し、乳汁中濃度の増加は緩やかで、投薬後 7 hr で最高値に達していた。このことは、未変化体とは異なり、代謝物では血液-乳汁間で平衡に達するにはかなり長時間を要することを示している。投薬後 7 hr 以降の放射能は、血液と乳汁とではほぼ平行した経時変化を示し、7 hr 以後は血液、乳汁間に平衡が成立しているものと考えられる。

一般に、生体外異物の乳汁中移行は物質の脂溶性に依存していることが知られており(すなわち、脂溶性の高い物質の移行性が高い)(菅原ら, 1984), 本実験で認められた未変化体と代謝物との乳汁中移行に対する挙動の差は、未変化体と代謝物との脂溶性の差を反映しているものと考えら

れる。

要 約

1. 胎仔移行

^3H -trimoprostil を妊娠14日目 および 19日目のラットに単回経口投与 ($100\text{ }\mu\text{g/kg}$) し、投薬後 45 min および 24 hr における胎仔移行を検討した。

投薬後 45 min の胎仔中放射能は、妊娠14日目 および19日目でそれぞれ母獣血液中濃度の6% および15%であった。投薬後 24 hr の胎仔中放射能は、妊娠14日目では検出限界 (0.076 ng eq./g) 以下に、19日目では0.5 (頭部)~1.7 (胴部) ng eq./g と 45 min 値の6.2~14%に低下した。投薬後 45 min における胎仔中の未変化体濃度/放射能比は、妊娠19日目の胎仔胴部で0.18と若干低い値が認められた他は、ほぼ母獣血液中の値と等しい値が観察された。

さらに、上記実験に加え ^{14}C -trimoprostil ($100\text{ }\mu\text{g/kg}$) を上記両妊娠日のラットに単回経口投与し、投薬後 45 min に全身オートラジオグラフィを行い、本薬物の組織内分布を検討した。その

結果、両妊娠日において胎仔への放射能の分布は観察されなかった。

2. 乳汁中移行

^3H -trimoprostil を分娩後9日目の授乳ラットに単回経口投与 ($100\text{ }\mu\text{g/kg}$) し、投薬後の母獣血液および乳汁中の放射能、および未変化体濃度を測定し、本薬物の乳汁への移行について検討した。

乳汁中放射能は、投薬後徐々に増加し、7 hr で最高濃度 (7.7 ng eq./ml) に達した。一方、血液中放射能は、投薬後速やかに増加し、投薬後 40 min (11 ng eq./ml)~7 hr (8.9 ng eq./ml) までほぼ一定した値を示した。7 hr 以降は、乳汁中放射能は、血液中濃度とほぼ平行した減少を示した。

乳汁および血液中未変化体濃度は、平行した経時変化を示すとともに、投薬後 4 hr に最高濃度 (乳汁: 1.1 ng/ml , 血液: 3.3 ng/ml) に達した。これらの未変化体濃度は、それぞれ対応する放射能濃度の17% (乳汁) および33% (血液) に相当した。4 hr 以後、乳汁および血液中未変化体濃度は速やかに減少した。

文 献

- 1) 麻生芳郎 (1976): 薬物の胎盤通過性, 月刊薬事, 18 (11), 35-40
- 2) 富澤宏樹, 市本範子, 市原成泰, 深沢英雄, 立石 満, 藤野明治, 大谷勇作, 矢島多恵 (1986): ラットにおける trimoprostil の体内動態に関する研究 (第1報): trimoprostil 経口投与後の血中濃度, 体内分布および尿, 糞, 胆汁中排泄, 薬物動態, 1 (1): 43-53.
- 3) 菅原和信, 豊口禎子 (1984): 薬剤の母乳への移行, pp.14, 南山堂