新規抗アレルギー薬 KW-4679 の体内動態 (第 6 報): 各種実験動物における血漿中動態

桑原 隆・大石 孝義・池永 哲二*・西家 弘佳・佐藤 隆・小林 弘幸・小林 智

Disposition of KW-4679 (6): Pharmacokinetics in Experimental Animals

Takashi KUWABARA, Takayoshi OHISHI, Tetsuji IKENAGA, Hiroyoshi NISHIIE,
Takashi SATOH, Hiroyuki KOBAYASHI, Satoshi KOBAYASHI

Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Shizuoka;

**Toxicological Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Yamaguchi*

Summary

The disposition of new antiallergic (Z)-11-[(3-Dimethylamino) propylidene]-6,11-dihydro-dibenz[b,e]oxepin-2-acetic acid hydrochloride (KW-4679) was studied in rats, guinea pigs, dogs and monkeys using highly sensitive RIA method.

1) Cross-reactivities of mono-demethyl-KW-4679 (M1) and di-demethyl-KW-4679 (M2), both of which were metabolites of KW-4679 in rat and dog plasma, were 27 and 4 %, respectively. Plasma concentrations measured by RIA method were well correlated with the those by HPLC-RIA method. This RIA method provided good reproducibility ranging from 0.1 to 2 ng/ml with lower limit of quantification of 0.1 ng/ml.

2) KW-4679 disappeared from plasma after intravenous administration triphasically. Total clearance of KW-4679 in rats was comparable to that in guinea pigs with 1.31 to 1.45 l/hr/kg, which was greater than those in dogs (0.32 l/hr/kg) and monkeys (0.73 l/hr/kg). The urinary excretion of KW-4679 was 43.1, 62.1 and 50.1% in rats, dogs and monkeys, respectively. Not only glomerular filtration but also tubular secretion were likely to be involved in urinary excretion of KW-4679 in rats and monkeys.

3) After oral administration to rats, guinea pigs and dogs, KW-4679 was rapidly absorbed. Bioavailabilities were between 60.8 and 83.3%. The elimination half-life was generally constant with 5.8 to 10.6 hr in these animal species. The disposition of KW-4679 was linear in the dose range studied. Absorption of KW-4679 in monkeys was slightly slower than other animals, but bioavailability was almost 100%.

4) The unbound fractions of KW-4679 in animal sera ranged 37 to 50% *in vitro*. Also, this was dose-independent in the range from 0.1 to 1000 ng/ml.

5) Total and renal clearances of KW-4679 were in good allometric relation with body weight of respective animal species.

Key words : Antiallergic, KW-4679, Rat, Guinea pig, Dog, Monkey, Species difference, Animal scale-up, Urinary excretion, Radioimmunoassay

緒 言

(Z)-11-[(3-Dimethylamino)propylidene]-6,11-dihydro-dibenz[b,e]oxepin-2-acetic acid hydrochloride (KW-4679, **Fig. 1**) は、選択的ヒスタミン H_1 拮抗作用¹⁾および種々のケミカルメディエーターの遊離作用を併せ持ち、種々の動物実験モデルにおいて強い抗アレルギー作用、抗喘息作用を示し、新規抗アレルギー剤として開発中の薬物である²⁾。ラットおよびモルモットにおける有効用量は 3 mg/kg 以下²⁾と低用量であることから、薬効量投与後の薬物動態を検討するためには、高感度な定量法が必要であった。今回、高感度血漿中 KW-4679 濃度測定法としてラジオイムノアッセイ (RIA) 法を確立し、その特異性について検討した。また本法を用いてラット、モルモット、イヌおよびサルにおける体内動態について検討した。

実験材料および方法

1. 実験材料

KW-4679 および関連化合物 (**Fig. 1**) は、当社において合成された。Bovine serum albumin

Compound	R1	R2	R3	
KW-4679	$N(CH_3)_2$	CH_2COOH	H	•HCl
³ H-KW-4679 base	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ N-C-CH_3 \\ \\ H \end{array}$	CH_2COOH	H	
M1	$NHCH_3$	CH_2COOH	H	
M2	NH_2	CH_2COOH	H	
M3	O	CH_2COOH	H	
	$\uparrow$			
M5	$N(CH_3)_2$	CH_2COOH	OH	
I.S.	$N(CH_3)_2$	CH_2CH_2COOH	H	

Fig. 1 Chemical structures of KW-4679 and its metabolites

(BSA, Fraction V) は生化学工業, 1-ethyl-3-(3-diaminopropyl) carbodiimide (EDCI) は Pierce, Freund's complete adjuvant (FCA) および gelatin はナカライテスク, Dextran T-70 はファルマシア, アセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用を, クロロホルムは分光分析用を関東化学より購入した。その他の試薬は試薬特級の市販品を用いた。

2. 実験動物

HPLC-RIA と RIA の相関を検討する実験には雄性 Wistar 系ラット (7 週齢, 体重 190-210 g, 日本ラット) を 1 群 3 匹で用いた。

KW-4679 の血漿中濃度推移および尿中排泄には以下の動物を用いた。雄性 Wistar 系ラット (7 週齢, 体重 190-230 g, 日本チャールス・リバー), 雄性 Hartley 系モルモット (7 週齢, 体重 400-460 g, 日本チャールス・リバー), 雄性ビーグル犬 (6-8 ヶ月齢, 体重: 8-10 kg, 日本農産工業) および雄性カニクイザル (推定 3 年齢以上, 体重 4-5 kg, 日本エスエルシー) を使用した。いずれの動物も 1 週間以上の予備飼育の後, 実験 16-19 時間前より絶食し, 投与後 6 時間より餌を与えた。水は実験前および実験期間中自由に摂取させた。実験例数はラット, モルモットは 1 群 4-5 匹, イヌ, サルは 1 群 3 頭とした。

3. 投与薬液の調製および投与方法

静脈内投与試験では, KW-4679 を生理食塩液 (大塚製薬) に溶解し, ラット, モルモットでは体重 1 kg あたり 1 ml, イヌ, サルでは 0.5 ml を投与した。投与量は 1 mg/kg とした。経口投与試験では, KW-4679 を注射用蒸留水 (大塚製薬) に溶解し体重 1 kg あたりラット, モルモットでは 5 ml, イヌ, サルでは 1 ml を経口ゾンデまたはカテーテルを用いて胃内に強制投与した。投与量はラット, イヌでは 0.3, 1, 3 mg/kg, モルモットでは 1, 3 および 10 mg/kg, サルでは 1 mg/kg とした。

4. 血漿および尿試料の採取

1) RIA 法と HPLC-RIA 法の相関: ラットに KW-4679 を 1 mg/kg 経口投与後, 0.083,

0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 および24時間に断頭採血を行った。血液はヘパリンを加えたポリプロピレンチューブに集め、遠心分離後 (1500 x g, 10分, 4°C) 血漿を得た。得られた血漿中 KW-4679 を RIA 法および HPLC-RIA 法により測定した。

2) 静脈内投与：ラットにおいては大腿部静脈内に KW-4679 を投与後, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 および48時間に尾静脈よりヘパリン処理したキャピラリーチューブで血液を 0.1-0.25 ml 採取した。モルモットは右耳静脈内に投与し, 左耳静脈より投与後 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 および54時間にラットと同様に血液 0.1-0.4 ml を採取した。イスは前腕橈側皮静脈内に投与し, 投与後 0.017, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 および48時間に, 反対側の前腕橈側皮静脈より少量のヘパリンを入れた注射筒で血液 4 ml を採取した。サルは前肢静脈内投与し, 投与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 24, 34 および48時間にヘパリン処理した注射筒で血液 2 ml を採取した。血液は直ちに 4°C 下, 遠心分離 (1000-2000 x g, 10 分) し, 得られた血漿を KW-4679 の RIA の測定に供した。ラット, イスおよびサルにおいては静脈内投与後48時間まで代謝ケージ内で飼育し, 自然排泄された尿を集め, HPLC 法による測定に供した。血漿および尿は, 測定まで -20°C で保存した。また KW-4679 を投与していない各動物よりコントロール血漿および尿を採取した。

3) 経口投与：各動物に KW-4679 を経口投与後, 静脈内投与と同様の方法で採血した。採血時点はラットでは 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 および48時間とし, モルモットは静脈内投与と同じ時点, イスは 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 および48時間とし, サルは 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 および48時間とした。ラット, イスおよびサルについては静脈内投与実験時と同様に採尿した。

5. 抗血清および ligand の作成

1) KW-4679-BSA conjugate の合成および免疫：KW-4679 52 mg を dimethylformamide

(DMF) 1.5 ml に溶解し, 蒸留水 0.5 ml を加えた後, EDCI DMF 溶液 (100 mg/ml) を 0.3 ml 加えた。攪拌後, 蒸留水をさらに 5 ml 加えた後に BSA 100 mg/ml 水溶液を 1 ml 添加した。室温で1時間反応させた後, 5 l の蒸留水に透析し, 凍結乾燥した。BSA, KW-4679 および KW-4679-BSA conjugate の紫外外部吸収より結合比は BSA 1 分子あたり, KW-4679 3.7 分子であった。KW-4679-BSA conjugate を生理食塩水に溶解し (1 mg/ml), FCA と等量混合し, 完全に乳化したものを投与液とした。これを3羽のウサギ日本白色在来種 (体重 2.5-3.0 kg, 市川屋) の背部皮下に数カ所に分けて投与した。免疫量は初めの4回は1週間毎に 0.2 mg/rabbit ずつ行い, それ以降は2週間毎に 1 mg/rabbit を6回行った。最終免疫後8日目に総頸動脈より全血を採取した。血液は4°C で1晩放置した後, 遠心分離 (1500 x g, 10分, 4°C) を行い, 血清を採取した。

2) ³H-KW-4679 の合成：KW-4679 のモノ脱メチル体 DMF 溶液 (0.5 mg/ml) に NaOCH₃ DMF 溶液 (1 mg/ml) 20 μl および ³H-CH₃I 370 MBq (比放射能 3.11 TBq/mmol) を加え 37°C 中で1晩攪拌した。これを窒素気流下濃縮乾固した後, HPLC により ³H-KW-4679 を分離精製した。得られた ³H-KW-4679 の比放射能は 2.70-3.20 TBq/mmol, 放射化学的純度97%以上であった。

6. ラジオイムノアッセイ (RIA) 法

適宜希釈した KW-4679, 関連化合物溶液または血漿サンプル 0.1 ml に, 0.2% gelatin/磷酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.4, PBS) で4000-16000 倍に希釈した抗血清, PBS, 0.2% gelatin/PBS, および ³H-KW-4679 (約15000 dpm) をそれぞれ 0.1 ml ずつ加え, 室温で3.5時間振盪し, 反応させた。これに DCC 溶液 (2% DextranT-70, 4% Charcol) を 0.2 ml 加え, 4°C で5分放置後, 遠心分離 (1500 x g, 15 分, 4°C) した。この上清 0.5 ml をとり, 乳化型シンチレーター (Scintisol EX-H, 和光純薬工業) を加え, 液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 300C, 4530C ま

たは2200CA, Packard) で放射能を測定した。各サンプルの特異的抗体結合放射能を次式に従って計算した。

$$\text{Binding \%} = \frac{S-B}{B_0-B} \times 100$$

ここでBは非特異的結合、B₀はKW-4679を添加していないサンプル、Sはサンプルの放射能を示す。交差反応性の実験ではKW-4679および関連化合物をPBSに溶解し、B₀の50%の結合を示す濃度をIC₅₀とし、交差反応性をその比により計算した。血漿中濃度の測定においては各動物のコントロール血漿にKW-4679を10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01 ng/mlとなるように添加し、標準曲線を作成して血漿中濃度を算出した。

またコントロール血漿にKW-4679を0.1, 0.5および2.0 ng/mlとなるように添加し、日内変動を検討した。

7. HPLC-RIA 法

ラット血漿 0.5 ml に氷冷したメタノール 0.05 ml およびアセトニトリル 0.5 ml を加え、氷冷下 5 分静置後、遠心分離 (1500 x g, 10 分, 4°C) して上清を得た。上清は窒素気流下濃縮乾固した後、下記 HPLC の移動相 A 0.1 ml に溶解し、このうち 0.05 ml を HPLC に注入した。HPLC は、ポンプが 655-11 (日立製作所)、カラムが Nucleosil 5C₁₈ 4×250 mm (ジーエルサイエンス) から構成され、移動相 A は 0.02 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルを 9:1 に混合したもの、移動相 B をアセトニトリルとし、流量 1 ml/min で A と B を 79:21 から、16 分間で 72:28 になるよう直線的に変化させた。溶出液のうち保持時間 10.8-13.1 分の溶出液を KW-4679 画分として集め、試験管濃縮機 (RD-31, ヤマト科学) により乾固した。残渣を PBS (pH 7.4) 0.1 ml に溶解後、RIA の検体とした。RIA は上記と同様に行った。

8. 尿中排泄率の測定

尿中 KW-4679 は HPLC 法により測定した。ラット、イヌおよびサル尿 0.25 ml に 0.01 M

磷酸 0.5 ml を加え、内部標準物質 (I.S., Fig. 1) を 5 μg 添加後、0.1 ml の 0.1 M オクタンスルホン酸ナトリウム、2 M 塩酸を添加した。これにクロロホルム 6 ml を添加、攪拌後、遠心分離 (1500 x g, 10 分, 4°C) してクロロホルム層を得、窒素気流下濃縮乾固した後、下記 HPLC の移動相 0.5 ml に溶解し、このうち 0.025 ml を HPLC に注入した。HPLC の装置は、ポンプが LC-6A (島津製作所) または L-6000 (日立製作所)、検出器が SPD-10A (島津製作所)、検出波長 301 nm、カラムが YMC AM-304 (4×300 mm, ワイエムシィ)、ガードカラムが μBondapak C₁₈ (日本ミリポアリミテッド) から構成され、移動相はラットでは 0.02 M 磷酸緩衝液 (pH 2.5) とアセトニトリルを 66:34 に混合したものに 0.01 M となるようにオクタンスルホン酸ナトリウムを添加したものとし、流量は 0.8 ml/min とした。イヌにおいては移動相は 0.02 M 磷酸緩衝液 (pH 2.5) とアセトニトリルとメタノールを 66:34:20 に混合したものに 0.01 M となるようにオクタンスルホン酸ナトリウムを添加したものとした。サルにおいては生体成分と分離するために、カラム、ガードカラム、移動相組成を変更した。カラムは Inertsil ODS-80A (4.6×150 mm, ジーエルサイエンス)、ガードカラムは Inertsil ODS-80A Cartridge Guard Column E (ジーエルサイエンス) を用いた。移動相は、0.01 M オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 0.1% トリフルオロ酢酸とアセトニトリルの混液とし、アセトニトリルの比率を 32% から 20 分間で 61% まで直線的に変化させた。それぞれのコントロール尿に KW-4679 を 0.2-20 μg/ml となるように添加し標準曲線を得た。

9. 蛋白結合率の測定

ラット、モルモット、イヌおよびサルより、血液を採取し、ベノジェクト II オートセップ (テルモ) を用いて血清を採取した。³H-KW-4679 および KW-4679 を血清に添加し、最終の血清中 KW-4679 濃度を 0.1, 10, 1000 ng/ml とした。これらを 37°C の水浴中で 5 分間プレインキューベ

ションし、予め37°Cに加熱したアミコン MPS-3 (W.R.Grace) に加え、37°Cにインキュベートしたローター (RPF20, 日立工機) に入れ、650xg にて遠心分離 (18PR-3, 日立工機) した。遠心前の血清中および遠心後のろ液中放射能の測定は、試料の一部を採取しシンチレーター (Ultima gold, Packard) 3 ml を加えて十分に攪拌し、液体シンチレーションカウンタ (LS6500, Beckman あるいは Tri-Carb 4530C, Packard) を用いて行った。遠心前の血清中放射能濃度と遠心後のろ液中放射能濃度の比より非結合型分率を算出した。

10. 薬物速度論的解析

各動物の薬物速度論的パラメーターは個体毎に算出した。血漿中濃度を対数変換して時間に対してプロットし、消失相の直線部分の傾き (k) を線形最小二乗法により算出し、消失相の半減期は $0.693/k$ として算出した。静脈内投与後の血漿中濃度から残差法により初期濃度を算出した。最高血漿中濃度 (C_{max}) および最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は実測値、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は最終実測値までは台形公式により求め、最終実測値以降は消失速度定数を用いて外挿して $AUC_{0-\infty}$ を求めた。全身クリアランス (Cl, Cl/F) は $Dose/AUC_{0-\infty}$ により計算した。平均滞留時間 (MRT) および見かけの分布容積 (V_{dss}) は次式により算出した。

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} t C_p dt}{\int_0^{\infty} C_p dt} \quad V_{dss} = Cl \times MRT$$

ここで、t は時間、 C_p は時間tにおける血漿中濃度を示す。平均吸収時間 (MAT) は経口投与時の各個体の MRT と同一投与量の静脈内投与時の MRT の平均値の差より算出した。また、経口投与時の生物学的利用率は各個体の $AUC_{0-\infty}$ を静脈内投与時の $AUC_{0-\infty}$ の平均値で除して算出した。

11. 統計学的解析

投与量間の薬物速度論的パラメーター、蛋白結

合率の有意差検定は Bartlett の検定で分散に一樣性が認められた場合は ANOVA で、分散に一樣性が認められない場合は Kruskal Wallis 検定により行った。なお、 $AUC_{0-\infty}$ については投与量で正規化した後に行った。有意水準は両側 5 % とした。

結 果

1. ラジオイムノアッセイ法の確立およびその特異性

KW-4679-BSA conjugate を家兎に免疫することにより抗 KW-4679 抗血清を得た。この抗血清の特異性について検討するため、KW-4679 の各代謝物の交差反応性を調べた。KW-4679 の IC_{50} が 0.68 ng/ml であったのに対し、N-モノ脱メチル体 (M1)、N-ジ脱メチル体 (M2) の IC_{50} はそれぞれ、2.55, 18.62 ng/ml であり、交差反応性は 27 および 4 % であった (Table I)。N-オキシド体 (M3) および水酸化体 (M5) については、 IC_{50} が 50 ng/ml 以上と高く、交差反応性は 1 % 以下であった。

ラット血漿に KW-4679 を添加したときの標準曲線を Fig. 2 に示した。 IC_{50} は 0.5 ng/ml であり、良好な濃度依存的な抗体への ligand の結

Fig. 2 Dose-response curve of KW-4679 in rat plasma determined by the radioimmunoassay

Table I Cross-reactivities of KW-4679 and its metabolites to anti-KW-4679 antiserum

Compounds	IC ₅₀ (ng/ml)	Cross-reactivity (%)
KW-4679	0.68	100
Mono-demethyl KW-4679 (M1)	2.55	27
Di-demethyl KW-4679 (M2)	18.62	4
KW-4679 N-oxide (M3)	>50	<1
Hydroxylated KW-4679 (M5)	>50	<1

Table II Intra-assay variation and accuracy of RIA and HPLC-RIA for determining KW-4679 in rat, dog and monkey plasma

Species	Method	Concentration (ng/ml)		CV (%)	Accuracy (%)
		Added	Measured		
Rat	RIA	0.1	0.10±0.01	9.5	0.0
		0.5	0.46±0.05	10.3	-9.2
		2.0	2.21±0.29	13.2	10.1
	HPLC-RIA	0.5	0.57±0.14	23.5	14.8
		2.0	2.39±0.11	4.6	19.5
		10.0	12.5 ±0.50	4.0	25.0
Dog	RIA	0.1	0.10±0.02	20.0	0.0
		0.5	0.52±0.02	3.9	4.0
		2.0	2.02±0.07	3.5	1.0
Monkey	RIA	0.1	0.08±0.01	12.5	-20.0
		0.5	0.48±0.03	6.3	-4.0
		2.0	1.93±0.08	4.2	-3.5

n=5

合阻害が認められた。そこで各動物の血漿について添加回収試験を行い、0.1-2 ng/ml の濃度範囲で良好な accuracy および CV が得られた (**Table II**)。この結果より本 RIA 法の定量限界は 0.1 ng/ml とした。

ラットおよびイヌ血漿中代謝物であるモノ脱メチル体 (M1)³⁾ と本抗血清の交差反応性が 27% であったことから、KW-4679 投与後の血漿中未変化体濃度が正確に定量できない可能性が考えられた。そこでラットに KW-4679 を 1 mg/kg 経口投与したサンプルを用いて、RIA 法と HPLC-RIA 法で測定することにより、その特異性について検討した。HPLC-RIA 法の添加回収試験の結果を **Table II** に示したが、定量限界は 0.5 ng/

Fig. 3 Correlation of the plasma concentrations of KW-4679 determined by RIA and HPLC-RIA

The plasma samples were obtained from the rats, which were orally given KW-4679 at 1 mg/kg. The line represents a regression line by the weighted linear least-squared methods (weight = 1/(x))

ml であった。本 HPLC 条件で未変化体と脱メチル体は良好に分離された。経口投与後 0.083-24 時間までの計 27 サンプルをそれぞれの方法で測定した。RIA 法における最高値は、377 ng/ml、最低値は 0.24 ng/ml であったのに対し、HPLC-RIA ではそれぞれ 304 ng/ml および定量限界未満であった。両測定法による血漿中濃度測定値の相関を **Fig. 3** に示した。両測定値は傾きがほぼ 1 の相関を示し、RIA 法が実際の測定において未変化体のみを測定していると考えられた。従って以下の血漿中濃度の測定には RIA 法を用いた。

2. 静脈内投与後の血漿中濃度推移

ラット、モルモット、イヌおよびサルに KW-4679 を 1 mg/kg 静脈内投与後の血漿中濃度推移を **Fig. 4** に示した。ラットにおいて KW-4679 は投与後 3 分に 827.83 ± 201.61 ng/ml を示した後、三相性に消失し、36 時間以降定量限界未満 (<0.1 ng/ml) であった。消失相の半減期は 4.55 ± 0.71 時間、 $AUC_{0-\infty}$ は 708 ± 127 ng · hr/

Fig. 4 Plasma concentration-time profiles for KW-4679 after intravenous administration to rats(□), guinea pigs(○), dogs(△) and monkeys(◇) at 1 mg/kg. Each point with a bar represents the mean+s.d. of 3-5 animals

Table III Pharmacokinetic parameters of KW-4679 after intravenous administration to fasting rats, guinea pigs, dogs and monkeys (Dose: 1 mg/kg)

		$AUC_{0-\infty}$ (ng · hr/ ml)	$t_{1/2}$ (hr)	Cl (l/hr/ kg)	Vdss (l/kg)	MRT (hr)
Rat	Mean	708	4.55	1.45	1.90	1.31
	S.D.	127	0.71	0.27	0.34	0.12
Guinea pig	Mean	776	7.37	1.31	1.75	1.32
	S.D.	112	1.99	0.19	0.57	0.35
Dog	Mean	3181	7.60	0.32	0.96	3.02
	S.D.	434	2.75	0.04	0.12	0.30
Monkey	Mean	1366	9.66	0.73	2.28	3.11
	S.D.	51	0.64	0.03	0.13	0.24

n=3-5 animals

ml, Cl, Vdss, MRTはそれぞれ, 1.45 ± 0.27 l/hr/kg, 1.90 ± 0.34 l/kg, 1.31 ± 0.12 時間であった (Table III). モルモットにおいて KW-4679 は投与後三相性に消失したが, その血漿中濃度推移は24時間までラットとほぼ同様であったが, 消失相の半減期は 7.37 ± 1.99 時間とやや長かった. Cl, Vdss, MRTはそれぞれ, 1.31 ± 0.19 l/hr/kg,

1.75 ± 0.57 l/kg, 1.32 ± 0.35 時間 (Table III) であり, ラットとほぼ同一値を示した. イヌ, サルにおいては KW-4679 の血漿中濃度推移はラット, モルモットに比較し高く推移した. 消失相の半減期はイヌ, サルでそれぞれ, 7.60 ± 2.75 , 9.66 ± 0.64 時間とラット, モルモットに比較し顕著な相違は認められなかったものの, Clは小さく, それぞれ 0.32 ± 0.04 , 0.73 ± 0.03 l/hr/kg であった. Vdssはサルでは 2.28 ± 0.13 l/kg とラット, モルモットとほぼ同様であったが, イヌにおいてはやや小さく, 0.96 ± 0.12 l/kg であった.

3. 経口投与後の血漿中濃度推移

ラット, モルモット, イヌおよびサルに KW-4679 を経口投与後の血漿中濃度推移を Fig. 5 に, その時の薬物速度論的パラメーターを Table IV に示した.

ラットに0.3, 1 および 3 mg/kg を経口投与後, KW-4679 は速やかに吸収され, 0.35-0.5時間に C_{max} を示し, その後二相性の消失を示した. 各投与量における C_{max} はそれぞれ, 67.93 ± 30.81 , 183.43 ± 74.91 , 574.57 ± 46.09 ng/ml であり, 投与量の増量にはほぼ比例して上昇した. また消失相の半減期は5.50-7.45時間であり, 投与量の増量に伴う変化は認められなかった. $AUC_{0-\infty}$ は0.3, 1, 3 mg/kg でそれぞれ, 158 ± 42 , 431 ± 65 , 1404 ± 100 ng · hr/ml と投与量の増量に伴い増加した. 各投与量における Cl/F は2.02-2.36 l/hr/kg, MRT は2.97-4.20時間と共に投与量の増量に伴う変化は認められなかった. 1 mg/kg 経口投与後の $AUC_{0-\infty}$ および MRT を静脈内投与時のそれらと比較することにより算出した生物学的利用率, MAT はそれぞれ $60.8 \pm 9.2\%$, 2.31 ± 0.95 時間であった.

モルモットに1, 3 および 10 mg/kg を経口投与後においても, KW-4679 は速やかに吸収され, 0.50-0.72時間に C_{max} を示し, その後二相性の消失を示した. C_{max} は1 mg/kg の 399.87 ± 276.97 ng/ml から, 10 mg/kg の 2054.38 ± 638.49 ng/ml まで, 投与量の増量にはほぼ比例して増加した. また消失相の半減期は6.75-10.64時間であり, 投

Fig. 5 Plasma concentration-time profiles for KW-4679 after oral administration to rats (A) guinea pigs (B) dogs (C) and monkeys (D) at doses of 0.3–10 mg/kg
Each point with a bar represents the mean $\pm$ s.d. of 3–5 animals

与量の増量に伴う変化は認められなかった。AUC_{0-∞}は1, 3, 10 mg/kgでそれぞれ, 576 $\pm$ 181, 1663 $\pm$ 186, 4511 $\pm$ 824 ng $\cdot$ hr/mlと投与量の増量に伴い増加した。各投与量におけるCl/Fは1.82–2.28 l/hr/kgであり, MRTは3.19–4.27時間と共に投与量の増量に伴う変化は認められなかった。Cl/FおよびMRTはラットとはほぼ同様な値を示した。またモルモットに1

mg/kg経口投与後の生物学的利用率, MATはそれぞれ74.2 $\pm$ 23.4%, 2.04 $\pm$ 0.71時間であり, これもラットとおおむね同様であった。

イヌに0.3, 1, 3 mg/kgを経口投与後, KW-4679は速やかに吸収され, 0.75–1.17時間にC_{max}を示し, その後二相性の消失を示した。C_{max}は0.3 mg/kgの291.41 $\pm$ 14.96 ng/mlから, 3 mg/kgの2212.07 $\pm$ 281.76 ng/mlまで, 投与量の増

Table IV Pharmacokinetic parameters of KW-4679 after oral administration to fasting rats, guinea pigs, dogs and monkeys

Species	Dose (mg/kg)		$T_{\max}$ (hr)	$C_{\max}$ (ng/ml)	$t_{1/2}$ (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/ml)	Cl/F (l/hr/kg)	MRT (hr)	MAT (hr)	B.A. (%)
Rat	0.3	Mean	0.50	67.93	7.45	158	2.02	4.20		
		S.D.	0.31	30.81	4.11	42	0.56	0.86		
	1	Mean	0.45	183.43	6.40	431	2.36	3.62	2.31	60.8
		S.D.	0.11	74.91	1.14	65	0.32	0.95	0.95	9.2
	3	Mean	0.35	574.57	5.50	1404	2.14	2.97		
		S.D.	0.14	46.09	0.30	100	0.16	0.14		
Guinea pig	1	Mean	0.67	399.87	10.64	576	1.91	3.36	2.04	74.2
		S.D.	0.45	276.97	4.61	181	0.68	0.71	0.71	23.4
	3	Mean	0.50	1151.62	8.48	1663	1.82	3.19		
		S.D.	0.31	648.52	1.87	186	0.21	1.04		
	10	Mean	0.72	2054.38	6.75	4511	2.28	4.27		
		S.D.	0.41	638.49	0.87	824	0.42	1.02		
Dog	0.3	Mean	0.75	291.41	7.93	806	0.37	3.48		
		S.D.	0.43	14.96	1.12	32	0.01	0.07		
	1	Mean	1.17	808.55	5.78	2642	0.39	3.55	0.53	83.3
		S.D.	0.76	80.82	0.69	570	0.08	0.43	0.15	14.7
	3	Mean	0.83	2212.07	6.19	8276	0.37	3.79		
		S.D.	0.29	281.76	1.63	1431	0.07	0.28		
Monkey	1	Mean	1.67	457.32	12.38	1398	0.72	8.09	4.98	102
		S.D.	0.58	103.04	0.73	146	0.07	1.30	1.30	11

n=3-5 animals

量に伴い上昇した。消失相の半減期は5.78-7.93時間であり、投与量による差は認められなかった。 $AUC_{0-\infty}$ は 0.3, 1, 3 mg/kg でそれぞれ、 806 ± 32 , 2642 ± 570 , 8276 ± 1431 ng·hr/ml と投与量の増量にはほぼ比例して増加した。各投与量における Cl/F は 0.37-0.39 l/hr/kg であり、各投与量でおおむね一定であった。イヌの Cl/F は静脈内投与後の Cl と同様、ラット、モルモットと比較して約 1/5 であった。また MRT は 3.48-3.79 時間と各投与量でおおむね一定であった。イヌに 1 mg/kg 経口投与後の生物学的利用率、MAT はそれぞれ $83.3 \pm 14.7\%$, 0.53 ± 0.15 時間であった。

サルに KW-4679 を経口投与後の吸収は他の動物種に比較してやや遅く、投与後 1.67 ± 0.58 時間に $C_{\max}$ 457.32 ± 103.04 ng/ml を示した。消失相の半減期は 12.38 ± 0.73 時間と他の動物種に比

較して長く、Cl/F は 0.72 ± 0.07 l/hr/kg と静脈内投与後の Cl 同様ラットとイヌの中間値であった。生物学的利用率は約 100% と高く、MAT は 4.98 ± 1.30 時間と他の動物種に比較して 2 倍以上長いものであった。

4. 尿中排泄率

ラット尿中 KW-4679 定量法を HPLC で確立した。Fig. 6 に典型的なクロマトグラムを示した。測定を妨害する生体成分由来のピークは認められなかった。同様にイヌ、サル尿中 KW-4679 定量法を確立した。定量限界はいずれの動物種においても $0.2 \mu\text{g/ml}$ であった。

ラット、イヌおよびサルに KW-4679 を静脈内あるいは経口投与後の尿中への KW-4679 の排泄率を Fig. 7 に示した。ラットに 1 mg/kg 静脈内投与後 48 時間までに $43.1 \pm 5.0\%$ が排泄された。経口投与後の 48 時間までの排泄率は、0.3, 1,

Fig. 6 Typical HPLC chromatograms of KW-4679 extracted from rat urine

Rat blank urine (A). Rat blank urine spiked with $5 \mu\text{g/ml}$ (B). Rat urine collected from 0 to 24 hr after oral administration of KW-4679 at 3 mg/kg (C)

Fig. 7 Cumulative urinary excretion of KW-4679 for 48 hr after intravenous or oral administration of KW-4679 to rats, dogs and monkeys. Each column with a bar represents the mean $\pm$ s.d. of 3 animals

3 mg/kg でそれぞれ 30.7 ± 6.3 , 31.7 ± 2.5 および $29.7 \pm 3.6\%$ であり、静脈内投与後に比べ低い値を示した。投与量による排泄率の差は認められなかった。一方、イヌにおいては静脈内投与後の排泄率が $62.1 \pm 7.3\%$ とラットに比較して高いものであった。また経口投与後においても排泄率は 0.3 , 1 , 3 mg/kg で 61.5 ± 6.2 , 58.4 ± 6.7 , $67.6 \pm 6.8\%$ とラットに比較して高いものであった。ラット同様、 0.3 – 3 mg/kg の投与量範囲で排泄率はおおむね等しかった。サルにおいては投与後 48 時間までの尿中への未変化体の排泄率は、静脈内および経口投与後でそれぞれ、 50.1 ± 2.7 および $39.6 \pm 2.7\%$ であった。

5. 血清蛋白結合率の測定

KW-4679 の *in vitro* 血清蛋白結合率を限外濾過法により測定した (Fig. 8)。各種動物血清に KW-4679 を 0.1 , 10 および 1000 ng/ml 添加した

Fig. 8 Unbound fraction of KW-4679 in rat, guinea pig, dog and monkey serum
Each column with a bar represents the mean $\pm$ s.d. of triplicates

ときの KW-4679 の非結合型分率はラットでそれぞれ 37.4 ± 0.8 , 38.0 ± 1.1 および $37.5 \pm 1.5\%$ であった。モルモットにおいては非結合型分率はそれぞれ 33.8 ± 3.8 , 33.3 ± 0.4 , $33.4 \pm 1.4\%$, イヌではそれぞれ 45.5 ± 0.7 , 43.5 ± 5.5 , $42.4 \pm 4.3\%$, サルではそれぞれ 49.5 ± 1.3 , 51.9 ± 1.9 , $52.7 \pm 4.4\%$ であった。いずれの動物種においても 3 濃度の非結合型分率に有意差は認められず、各種動物血清中において KW-4679 は 0.1–1000 ng/ml の濃度範囲で一定の非結合型分率を示した。各動物種間で比較すると、非結合型分率はサルで約 50% と最も高く、モルモットで約 33% と最も低い値を示した。

考 察

今回我々は KW-4679 に対する抗血清を作成し、血漿中濃度測定法として RIA 法を確立した。この抗血清は、KW-4679 の代謝物として報告されている³⁾モノ脱メチル体 (M1), ジ脱メチル体 (M2) に対してそれぞれ、27, 4 % の交差反応性を示した (Table I)。M1 は ^{14}C -KW-4679 を経口投与後 0.5–4 時間のラットおよびイヌ血漿にお

いて総放射能のそれぞれ 7.2–7.7%, 2.1–4.7% を占めることが報告されている³⁾。また M2 は 0.8–0.9, 0.5–1.1% と報告されている³⁾。血漿中 KW-4679 の測定にこれらの代謝物あるいは未知の代謝物が影響を及ぼすことが考えられた。またイヌに経口投与後 0.5–2 時間の血漿においては M3 が 10–11% と比較的高い割合で存在するが³⁾、M3 の交差反応性は低く KW-4679 の測定には影響を与えないものと考えられた。HPLC により血漿中 KW-4679 を単離した後 RIA 法により測定 (HPLC-RIA 法) し、RIA 法の実際の測定における未変化体に対する特異性について検討した。ラットに KW-4679 を 1 mg/kg 経口投与後の血漿について、HPLC-RIA 法および RIA 法での測定値は傾きはほぼ 1 の良好な相関関係を示し、M1 の比率がイヌよりも高いラット血漿においても、RIA 法による測定値は未変化体濃度をよく表していると考えられた。また Table II に示したように各種動物血漿中において、本 RIA 法は 0.1–2 ng/ml の濃度範囲で良好な再現性を示し、定量限界は 0.1 ng/ml であった。以上のことから本 RIA 法は KW-4679 の体内動態研究に有用であると考えられた。

KW-4679 を静脈内投与後のラット、イヌおよびサルでの Cl および尿中未変化体排泄率より、これらの動物における尿中排泄クリアランスは 0.625, 0.199, 0.373 l/hr/kg と算出される。またこの時の血漿中濃度範囲において KW-4679 の蛋白結合率に濃度依存性が認められていない (Fig. 8)。腎糸球体濾過速度はラット、イヌおよびサルで 1.31, 61.3 および 10.4 ml/min と報告されている⁴⁾。これに KW-4679 の血清中の非結合型分率を乗じて得られた糸球体濾過クリアランスは 0.137, 0.172, 0.066 l/hr/kg と推定された。ラットおよびサルにおける KW-4679 の尿中排泄クリアランスは糸球体濾過クリアランスの推定値の 4.5–5.6 倍高く、KW-4679 の尿中への排泄には糸球体濾過のみならず、尿細管分泌も関与しているものと考えられた。尿細管分泌機構としては、p-aminohippuric acid, probenecid などに代表さ

れる有機アニオン輸送機構と cimetidine で代表される有機カチオン輸送機構が知られている⁵⁾。KW-4679 は生理的条件下で両性化合物であり、両方の輸送機構で分泌される可能性を有し、この点については今後の検討課題である。しかしながらラットにおける尿中排泄率は投与量に依存せずほぼ一定値を示したことから、いずれの輸送機構で分泌されるにせよ、今回検討した投与量範囲では、輸送機構の飽和がないことが示された。一方イスにおいては同様に計算した KW-4679 の糸球体濾過クリアランスの推定値は尿中排泄クリアランスとほぼ等しく、KW-4679 の尿中排泄は大部分が糸球体濾過によるものと考えられた。イスにおいてラットと比較し、Cl が低い理由の一つとして尿細管での分泌の寄与が低いことが推測された。またイスにおける腎外クリアランスは 0.121 l/hr/kg とラットの腎外クリアランス 0.825 l/hr/kg の約 1/7 と小さく、胆汁への排泄あるいは代謝を受けにくいことも、イスで Cl の小さい一因と考えられた。

KW-4679 を経口投与後の T_{max} は、ラット、モルモットおよびイスではほぼ 1 時間以内と KW-4679 は速やかに吸収されていた。これらの動物種では消失相の半減期も 5.50–10.64 時間とほぼ一定値を示し (Table III), また静脈内投与後の消失相での半減期とおおむね同一値であった。一方、サルに経口投与後の半減期は 12.38 時間と他の動物種に比較して長いものであったが、静脈内投与後の消失相の半減期は他の動物種とおおむね同様であった。サルにおいて MAT が他の動物種に比べて長く、吸収の遅延のため経口投与後では見かけ上長い半減期を示したのと考えられた。

KW-4679 の経口投与後の体内動態の投与量依存性についてラット、モルモットおよびイスで検討した。今回検討した投与量範囲では、いずれの動物種においても、Cl, 半減期, MRT などの薬物速度論的パラメーターに投与量依存性は認められず、その体内動態は線形であった。このことは、今回の投与量範囲で KW-4679 の消化管か

Fig. 9 Allometric relationships between KW-4679 clearances (Cl(A), Cl/F(B) and Cle, Clsec (C)) and body weight

らの吸収および体内から消失 (代謝, 排泄) に飽和がないことを示している。

これまで多くの薬物について実験動物のデータ

からヒトの体内動態の予測が行われている^{6,7)}。これらの予測は、薬物速度論的パラメーターと体重の allometric な関係に基づいて行われている。KW-4679についても今回得られた実験動物のクリアランスから、ヒトでのクリアランスの予測を試みた。タンパク結合率に大きな種差が認められなかったため、クリアランスは、血漿クリアランスをそのまま用い、Fig. 9 に体重との両対数プロットを示した。静脈内投与後の Cl は良好な直線関係を示し、その回帰式は $Cl = 0.92 \cdot (\text{体重})^{0.65}$ (Fig. 9,A) であり、ヒトの体重を 60 kg とするとヒトでの Cl は 13.2 l/hr と計算される。一方、経口投与後の Cl/F についても良好な直線関係が得られ (Fig. 9,B), その回帰式は $Cl/F = 1.19 \cdot (\text{体重})^{0.55}$ であり、ヒトでの Cl/F は 11.3 l/hr と推定された。実際に KW-4679 を健康成人に 10 mg 経口投与したときの Cl/F は 16.27 l/hr であり⁸⁾、予測値とほぼ一致した。さらに経口投与後の KW-4679 の尿中排泄クリアランス (Cle) およびこれから糸球体濾過クリアランスを差し引いた分泌クリアランス (Clsec) について同様にプロットした (Fig. 9,C)。ヒトについては 10 mg 経口投与後の尿中排泄率の報告値 71.8%⁸⁾ を計算に用いた。Cle はヒトを含め、良好な直線的な allometric な関係を示した。一方、Clsec についてはイヌ以外の動物種は良好な allometric な関係を示した。排泄機構がイヌでは異なり、イヌにおいては尿細管分泌の寄与が少なくと考えられた。しかし、Cle は、イヌにおいても良好な allometric な関係を示していることから、他の動物種への外挿に関してはこの影響は少なく、上記のように Cl/F は良好な直線関係を示したと思われた。

KW-4679 は、各動物種において線形な体内動態を示し、比較的尿中への未変化体の排泄率が高く、そのクリアランスが体重と良好な allometric な関係を示すことから、比較的体内動態の予測性の高い薬剤であると考えられた。

要 約

新規抗アレルギー薬 (Z)-11-[(3-Dimethylamino) propylidene]-6, 11-dihydro-dibenz[b, e]oxepin-2-acetic acid hydrochloride (KW-4679) の体内動態を検討するために高感度定量法である RIA 法を確立し、これを用い、ラット、モルモット、イヌおよびサルにおける KW-4679 の体内動態を比較した。

1. 家兎より得られた KW-4679 の抗血清は、ラットおよびイヌにおける血漿中代謝物であるモノ脱メチル体 (M1) およびジ脱メチル体 (M2) とそれぞれ、27 および 4 % の交差反応性を示した。しかしながら、RIA 法での測定値は HPLC 法で単離後測定した未変化体の血漿中濃度と良く相関していた。各種動物血漿中において本 RIA 法は 0.1-2 ng/ml の濃度範囲で良好な再現性を示し、定量限界は 0.1 ng/ml であった。
2. KW-4679 を静脈内投与後、血漿中 KW-4679 はいずれの動物種においても三相性に消失した。全身クリアランス (Cl) はラットおよびモルモットでは 1.31-1.45 l/hr/kg とほぼ同様であったが、イヌおよびサルでは、それぞれ 0.32 および 0.73 l/hr/kg と低値を示した。この時のラット、イヌおよびサルにおける KW-4679 の尿中排泄率は 43.1, 62.1 および 50.1 % であった。ラット、サルにおいては尿中への排泄に糸球体濾過のみならず、尿細管分泌の関与が考えられた。
3. KW-4679 をラット (0.3-3 mg/kg)、モルモット (1-10 mg/kg) およびイヌ (0.3-3 mg/kg) に経口投与すると KW-4679 は速やかに吸収された。最高値を示した後二相性に消失した。生物学的利用率は 60.8-83.3 % であった。これらの動物種では消失相の半減期も 5.8-10.6 時間とほぼ一定値を示した。今回検討した投与量範囲では、いずれの動物種においても、その体内動態は線形であった。サル (1 mg/kg) では他の動物種に比較し、やや吸収が遅かったが、生物学的利用率は約 100 % であった。
4. 各動物種における *in vitro* 血清中非結合型分

率は33.3-52.7%であり, 0.1-1000 ng/mlにおいて一定であった。

5. KW-4679の全身クリアランスおよび尿中排泄クリアランスは各動物種の体重と良好な allometric な関係を示した。

謝 辞: 本研究遂行にあたり, 御協力頂いた協和発酵工業株式会社医薬研究所 長谷川陽子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Ohsima, E., Otaki, S., Sato, H., Kumazawa, T., Obase, H., Ishii, A., Ishii, H., Ohmori, K. and Hirayama, N.: Synthesis and antiallergic activity of 11-(aminoalkylidene)-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin derivatives. *J. Med. Chem.*, **35**: 2074-2084 (1992).
- 2) Ohmori, K., Ishii, H., Ikemura, T., Shirakura, R. and Kitamura, S.: Inhibitory effect of KW-4679 on antigen-induced late asthmatic responses and airway inflammation in guinea pigs. *Eur. Resp. J.*, **6**(Suppl.): 17, 318S (1993).
- 3) 大石孝義, 真柄 弘, 安澤 亨, 小林弘幸, 山口和夫, 小林 智: 新規抗アレルギー薬 KW-4679 の体内動態 (第4報) KW-4679 のラットおよびイヌにおける代謝. *薬物動態* **10**(5): 689-706 (1995).
- 4) Davis, B. and Morris T.: Physiological parameters in laboratory animal and humans. *Pharm. Res.*, **10**: 1093-1095 (1993).
- 5) Aiba, T., Sakurai, Y. Tsukada, S. and Koizumi, T.: Effects of probenecid and cimetidine on the renal excretion of 3'-azido-3'-deoxythymidine in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **272**: 94-99 (1995).
- 6) Boxenbaum, H.: Interspecies pharmacokinetic scaling and the evolutionary-comparative paradigm. *Drug Metab. Rev.*, **15**: 1071-1121 (1984).
- 7) Sawada, Y., Hanano, M., Sugiyama, Y. and Iga, T.: Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **13**: 477-492 (1985).
- 8) 角尾道夫, 百村伸一, 舩尾生俊, 飯塚秀樹, 大石孝義, 小林弘幸, 小林 智: 抗アレルギー薬 KW-4679 の臨床第 I 相試験, 健常者における単回および反復投与試験時の安全性および体内動態. 基礎と臨床 **29**(16), in press, (1995).