新規ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗剤 AE0047 の体内動態 (第2報): ラットにおけるリンパ吸収と分布

大久保雅啓, 平田 崇, 十亀 祥久, 田中 幹雄
岡野 周充, 津田 良夫

Metabolic Fate of a New Dihydropyridine Calcium Antagonist, AE0047 (II): Lymphatic Absorption and Distribution of AE0047 in Rats

Masahiro OHKUBO, Takashi HIRATA, Yoshihisa SOGAME, Mikio TANAKA, Kanemichi OKANO and Yoshio TSUDA

*Metabolic Research Center, Central Research Laboratories,
The Green Cross Corporation, Osaka*

Summary: The tissue distribution of ^{14}C -AE0047 in rats was studied after single or consecutive oral administrations by the whole body autoradioluminography and by the excised tissue-liquid scintillation method. The transfer of ^{14}C -AE0047 to lymphatic system during the absorption was also investigated.

1. The maximum levels in the lymph, liver and adrenals, which showed higher levels of radioactivity than other tissues, except gastro-intestinal tract, were found at 3 hr, and the levels of radioactivity in muscle, fat, brown fat, skin, bone marrow, testis and eyeball reached the maximum at 6 hr after an oral administration of ^{14}C -AE0047. The level of radioactivity in central nervous system was the lowest. The radioactivity in plasma decreased with a half-life of about 1.2 day, and those in each tissue did with half-lives of 2 to 4 days.

2. The tissue distribution pattern obtained after consecutive doses of ^{14}C -AE0047 for 14 days was similar to that after a single dose. Almost all tissues, except the adipose tissue, bone marrow and mesenteric artery, showed 3 to 6 times higher radioactivity levels than after a single dose, which were almost the same values as the predicted accumulation factor. No particular accumulation of radioactivity in main tissues was observed after the consecutive oral administration of ^{14}C -AE0047.

3. The radioactivity, 5.3% of the dose, transferred to lymph recovered from the thoracic duct within 48 hr after an oral dosing to rats.

Key words: AE0047, Ca antagonist, Distribution, Lymphatic absorption, Accumulation ratio, Accumulation factor, Single oral administration, Consecutive oral administration, Radioluminography, Rat

緒 言

新規ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗剤, (±)-2-[4-(α -Benzhydryl-1-piperazin-1-yl)phenyl]ethyl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-pyridine-3,5-dicarboxylate dihydrochloride (以降 AE0047 と略す) は, *in vitro* での Ca^{2+} 拮抗作用および高血圧モデル動物での緩徐で持続性を有する降圧作用を有している¹⁻³⁾. また, 高トリグリセリド (TG) 血症モデルである Zucker ラットで, 小腸でのカイロミクロン分泌の阻害作用および肝での超低密度リポ蛋白の取り込み促進を介して, 血漿中 TG 濃度を低下させることが報告されている⁴⁾.

前報において, ^{14}C 標識した AE0047 を用いラット, イヌにおける吸収と排泄, ラットでの用量相関性, 摂餌の影響および反復投与時の血中動態について検討した⁵⁾. その結果, ラットとイヌの吸収率と Bioavailability は約 20 から 30% とほぼ同じ程度であり高いものではなかったが, 血漿中放射能に占める未変化体濃度は他のジヒドロピリジン系カルシウム拮抗剤に比べて高く推移することがわかった. ラットでは経口投与で非線形性, 摂餌の影響が見られ, また排泄に性差はなかったことを報告した. 今回, ^{14}C 標識体をラットに単回経口投与, 単回静脈内投与および反復経口投与後の組織内分布およびリンパ移行性を検討したので報告する.

実験方法

1. 被験化合物および試薬

[6- ^{14}C]($\pm$)-2-[4-(-Benzhydryl-1-piperazin-1-yl)phenyl]ethyl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-pyridine-3,5-dicarboxylate dihydrochloride (以降 ^{14}C -AE0047 と略す) は, (株)ミドリ十字・中央研究所あるいはアマシャム (英国) で合成されたものを使用した. ^{14}C -AE0047 の比放射能は 2.63, 2.66 MBq/mg であり, 放射化学的純度は 98% 以上であった. 使用に際しては非標識の AE0047 (福寿製薬) で適宜希釈後, 使用した. AE0047 の構造式と標識位置を Fig. 1 に示した. その他の試薬はすべて市販の試薬特級あるいは液体クロマトグラフ用を使用した.

2. 実験動物

単回 (絶食下および非絶食下) 経口投与, 反復経口投与および単回静脈内投与後の分布実験では, 1 週間予備飼育した F344 系雄性ラット (7 週齢, 体重 125~171 g; チャールス・リバー) を使用した. リンパ移行実験では Wistar 系雄性ラット (10~12 週齢, 体重 340~463 g; ケアリー) を使用した. また, 細動脈内の放射能濃度の検討では高血圧自然発症ラット (SHR, 雄性, 16 週齢, 体重 258~300 g; 清水実験動物) を使用した.

3. 投与量および投与液の調製

経口投与では投与量を 3 mg/kg とし, 静脈内投与では 0.3 mg/kg とした. 投与液の調製は, ^{14}C -AE0047 をメノウ製乳鉢で Tween 80 原液とよく練り溶解後, 蒸留水あるいは生理食塩液を徐々に加えて希釈し, 経口投与液; 3 mg/2 ml, 10% Tween 80 水溶液/kg, 静脈内投与液; 0.3 mg/1 ml, 1% Tween 80 生理食塩液/kg を調製した.

4. 組織内分布

絶食下に単回経口投与後 1, 3, 6, 24, 72 および 168 時間, また非絶食下に反復経口投与した実験においては初回投与後 24 時間, 7 回投与後 24 時間, 14 回投与後 1, 3, 6, 24, 72, 168 (7 日) および 672 時間 (28 日) に血液, 血漿, 大脳, 眼球, ハーダ腺, 甲状腺, 胸腺, 肺, 心,

腎, 脾, 肝, 副腎, 脾, 膀胱, 精巣, 前立腺, 筋肉, 脂肪組織, 褐色脂肪, 皮膚, 骨髄, 腸間膜リンパ節, 大動脈, 腸間膜動脈, 胃, 小腸, 大腸の各組織を摘出した.

また, 摂餌の影響を比較した組織分布実験では絶食あるいは非絶食下に単回経口投与後 1, 3, 6 時間に主要な組織を摘出した.

5. 血球移行率

血液のヘマトクリット値を測定し, 次式より血球移行率を算出した.

$$\text{血球移行率 (\%)} = (1 - \text{Cp/Cb} \times (100 - \text{Ht}) / 100) \times 100$$

Cb: 血液中放射能濃度, Cp: 血漿中放射能濃度, Ht: ヘマトクリット値

6. 全身オートラジオミノグラフィー

^{14}C -AE0047 を絶食下に 3 mg/kg (7.89 MBq/kg) 単回経口投与後 1, 3, 6, 24 (1 日), 168 (7 日) および 672 時間 (28 日) に, あるいは非絶食下に 3 mg/kg (1.56 MBq/kg) 単回, 7 回, 14 回反復経口投与し, それぞれの 24 時間後および 14 回最終投与後 24, 168 (7 日), 672 時間 (28 日) に, あるいは ^{14}C -AE0047 を非絶食下に 0.3 mg/kg (0.78 MBq/kg) 静脈内投与後 2, 30 分, 3 および 24 時間に犠死後, 鼻腔および肛門を 5% カルボキシメチルセルロース (CMC) で塞ぎ, -70°C のドライアイス・アセトンで凍結し, さらに 5% CMC に包埋後, クライオミクロトーム (PMV 450 MP, LKB) を使用して -20°C で 40 μm の凍結切片を作製した. 切片を凍結乾燥後, 標本保護膜をかぶせイメージングプレート (以降 IP と略す, BAS-III; 富士写真フィルム) に密着させ, 2~21 日間露光後, バイオ・イメージングアナライザー (BAS2000 II; 富士写真フィルム) で IP を読み取り, BASstation あるいは Mac BAS (富士写真フィルム) を用いて画像解析し, 全身オートラジオミノグラム (RLG) を作製し, 主要な組織の Photo-stimulated luminescence value (PSL value, PSL (-BG)/ mm^2 ; 以降 PSL 値と略す) を測定した.

7. リンパ移行

山田らの方法⁶⁾に準じて絶食下にオリーブ油 2 ml を経口投与し, 2 時間後に開腹し, 腹部大動脈と胸管リンパを露出させ腹部胸管の最上部を結紮後, U 字形に湾曲させたチューブ (PE50; Clay Adams) を胸管に挿入した. 麻酔覚醒後, ^{14}C -AE0047 を投与し, 投与後 6 時間までは 1 時間ごとに, それ以降 24, 48 時間までリンパ液を採取した. 同時に投与後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 および 48 時間に尾静脈より血液を採取した.

8. 測定試料の調製と放射能の測定

血液, 血漿, リンパ液および組織細片については Soluene-350 (Packard) で溶解後, Hionic-Fluor (Packard) を加え, 液体シンチレーションカウンター (Wal-

* : ^{14}C -labeled position

Fig. 1 Chemical structure and labeled position of ^{14}C -AE0047

lac 1410 ; Pharmacia) で放射能を測定した。

9. 薬物動態パラメータ

血液、血漿および各組織中放射能濃度の最高濃度 ($C_{\max}$) ならびに最高濃度到達時間 ($T_{\max}$) は実測値より算出した。放射能濃度を対数変換後、時間軸に対してプロットし、直線部分から線形最小二乗法により勾配を算出し、消失速度定数 (K) を求めた。消失半減期 ($t_{1/2}$) は $0.693/K$ として算出した。血漿等の最終測定時点までの濃度-時間曲線下面積 (AUC) は台形公式で算出した。無限大時間までの AUC は K を用いた外挿法で求めた。各主要組織について単回経口投与後 24 時間以降の各組織濃度の平均値より K を求め、蓄積係数 $= (1/(1-e^{-K\tau}))$ を求めた⁷⁾ (τ は反復投与時の投与間隔)。また、7 回および 14 回反復経口投与後 24 時間の各組織内放射能濃度を初回投与後 24 時間の濃度と比較し、濃度上昇比 (蓄積率)⁷⁾ を求めた。

結 果

1. 単回投与後の組織内分布

1) 経口投与後の全身オートラジオミノグラフィー

投与後 1, 3, 6, 24, 168 および 672 時間の全身オートラジオミノグラムを **Fig. 2** に示した。1 時間では消化管内容物を除き胸管リンパ液、肝、副腎、血液の順に高い放射能が認められた。3~6 時間では全身の各組織が最高濃度に達した。胸管リンパ液は血液より高濃度であり、肝、副腎に高い分布が認められ、褐色脂肪も明確になった。24 時間では血液、各組織ともに減少したが、消化管内容物、肝、褐色脂肪、骨髄、副腎、腎および心に放射能が認められた。168 時間では肝にごく低い、腸間膜リンパ節と腎に痕跡程度の放射能が認められたが、672 時間では全組織から消失した。

特徴的な分布を示した組織の拡大図を **Fig. 3** に示した。投与後初期から分布の高かった副腎では皮質に局在していた。1 時間の大動脈近辺では大動脈内の血液、ついで血管周囲の結合組織 (脂肪組織)、血管壁の順に放射能が分布し、血管壁は低かった。3~6 時間になると血管周囲の結合組織、ついで大動脈内血液、血管壁の順に高くなった。

2) 静脈内投与後の全身オートラジオミノグラフィー

投与後 2, 30 分, 3 および 24 時間の全身オートラジオミノグラムを **Fig. 4** に、各組織の放射能の推移 (PSL 値) を **Fig. 5** に示した。2 分では血液がもっとも高く、以下、肝、副腎、腎、肺、心、骨髄、褐色脂肪の順に高かった。筋肉、脳にはごく低濃度分布していた。3 時間では小腸内容物がもっとも高く、ついで副腎、肝、心、腎、肺、脾、血液、胸管リンパ液、骨髄、褐色脂肪の順に高かった。24 時間では盲腸と大腸内容物が

もっとも高く、ついで肝、副腎、褐色脂肪、脾、骨髄、腎、肺、筋肉の順に認められ、血液はほとんど消失した。

3) 単回経口投与後の組織内放射能濃度

絶食下に投与後 1, 3, 6, 24, 72 および 168 時間の各組織内放射能濃度を **Table I** に示した。1 時間では肝、副腎および腸間膜リンパ節が高濃度で、3 時間では血漿と肝、腎などの主要な組織が $C_{\max}$ に達した。腸間膜リンパ節が 9005 ng eq./g ともっとも高濃度で、血漿の約 9.3 倍に相当した。血液より高いレベルでは、肝、副腎、骨髄、肺、心、脾、腎、腸間膜動脈の順であった。血液より低いレベルでは、甲状腺、褐色脂肪、脾、膀胱、脂肪、筋肉、前立腺、大動脈、ハーダー腺、胸腺、皮膚、精巣、眼球の順であり、脳等の中樞神経系は 20 ng/g 以下と低値であった。6 時間では筋肉、脂肪、褐色脂肪、皮膚、骨髄、眼球、ハーダー腺、胸腺、脾、大動脈等が、血漿の $T_{\max}$ より遅れて $C_{\max}$ に達した。

各組織の $t_{1/2}$ を **Table II** に示した。血漿は 3 時間に $C_{\max}$ (967 ng eq./ml) 到達後、24 時間では $C_{\max}$ の 1/25 に低下し、その後約 1.2 日の $t_{1/2}$ で消失した。 $C_{\max}$ の高かった肝、副腎 (3217, 2687 ng eq./g) は 24 時間には $C_{\max}$ の 1/7 に低下し、その後 2.3 日あるいは 2.7 日の $t_{1/2}$ で消失し、168 時間には 100 ng eq./g 以下になった。脂肪組織、骨髄あるいは腸間膜動脈からの消失は遅く、3.8~4.1 日の $t_{1/2}$ で消失した。

摂餌の影響をラット血漿濃度で見ると、非絶食下では絶食下に比べて $C_{\max}$, AUC は約 1/3 に減少し、 $T_{\max}$ が早くなったことをすでに報告した⁵⁾。非絶食あるいは絶食下に経口投与後 1, 3 および 6 時間の血漿、肝、肺、腎、心、副腎、腸間膜リンパ節濃度を比較した結果を **Fig. 6** に示した。非絶食下の各組織は血漿と同様に絶食下の 1/2 以下の低い濃度で推移していた。絶食下では各組織において 3 時間に $C_{\max}$ に達し、血漿とパラレルに推移した。一方、非絶食下の血漿は 1 時間に $C_{\max}$ に達したが、心、副腎、腎は血漿より遅れて 3 時間に $C_{\max}$ に達し、パラレルな推移ではなかった。絶食下の各組織濃度は非絶食下に比べると 2 倍以上高値で、絶食、非絶食下いずれにおいても腸間膜リンパ節の濃度がもっとも高く、特に腸間膜リンパ節/血漿の比は非絶食下投与では 3 倍程度であったが、絶食下では 13 倍と絶食と非絶食下で腸間膜リンパ節への移行率に大きな違いが見られた。

4) 細動脈の放射能濃度

SHR に ^{14}C -AE0047 を投与後、大動脈と腸間膜動脈の放射能濃度を測定した結果を **Fig. 7** に示した。血漿の $T_{\max}$ は 1 時間であったが腸間膜動脈では 6 時間に $C_{\max}$ に達し、6 時間以降は血漿よりも高く推移した。また、大動脈は腸間膜動脈に比べ低い濃度でパラレルに

Fig. 2 Autoradioluminograms showing the distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg) to fasting male rats

1: Adrenal gland 2: Aorta 3: Blood 4: Bone marrow 5: Brain 6: Brown fat 7: Cecum contents 8: Eyeball 9: Gastric contents 10: Heart 11: Kidney 12: Liver 13: Lung 14: Lymphaden 15: Mesenteric lymph node 16: Muscle 17: Nasal cavity 18: Skin 19: Small intestinal contents 20: Spinal cord 21: Spleen 22: Submaxillary gland 23: Testis 24: Thoracic duct lymph 25: Thymus 26: Thyroid 27: Urine of urinary bladder

1 hr

3 hr

6 hr

Fig. 3 Autoradioluminograms showing the distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg) to fasting male rats

1: Adrenal gland 2: Vessel of aorta 3: Blood of aorta 4: Kidney 5: Thoracic duct lymph

推移した。AE0047 を経口投与後の血管壁濃度の上昇は緩やかで、またその消失も緩やかであり、血漿中放射能推移とは相関していなかった。

2. 反復経口投与後の組織内分布

1) 全身オートラジオルミノグラフィー

初回、7 回、14 回投与後 24 時間および 14 回投与後 168、672 時間の全身オートラジオルミノグラムを **Fig. 8** に示した。初回投与後では消化管内容物を除くと肝に放射能が認められた。7 回および 14 回投与後では褐色脂

肪、肝に放射能が認められた。肝の放射能は初回から 7 回の上昇に比べて 7 回から 14 回の上昇幅は低かった。14 回反復投与後 168 時間では肝、褐色脂肪、脂肪に僅かに放射能が認められたが、672 時間では脂肪に痕跡程度の分布が認められた。

2) 組織内放射能濃度

反復投与での各組織の $t_{1/2}$ 、蓄積係数、および 7 回および 14 回反復投与後の蓄積率を **Table II** に示した。反復投与による蓄積係数は 2.3~6.4 倍と予測され、脂肪組

2 min

30 min

3 hr

24 hr

Fig. 4 Autoradioluminograms showing the distribution of radioactivity after intravenous administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg) to non-fasting male rats

1: Adrenal gland 2: Aorta 3: Blood 4: Blood in aorta 5: Blood in vena cava inferior 6: Bone marrow 7: Brain 8: Brown fat 9: Cecum contents 10: Eyeball 11: Gastric contents 12: Heart 13: Kidney 14: Large intestinal contents 15: Liver 16: Lung 17: Nasal cavity 18: Pituitary gland 19: Small intestinal contents 20: Spleen 21: Thoracic duct lymph 22: Thyroid gland 23: Urine of urinary bladder

Fig. 5 Tissue concentrations of radioactivity after intravenous administration of ^{14}C -AE0047 to fasting male rats

Fig. 6 Tissue concentrations of radioactivity after oral administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg) to fasting or non-fasting male rats

Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 3 animals.

組織への蓄積係数がもっとも高かった。実測の反復投与後の主要な組織内の放射能濃度は7回反復投与により1.8~9.2倍に、14回反復投与により2.7~12.9倍に増加した。蓄積率の高かった組織は脂肪および褐色脂肪の7.9, 9.2倍であり、標的組織である腸間膜動脈は12.9倍とさらに高値であった。各組織における蓄積率は、骨髄および腸間膜動脈を除くと予測した蓄積係数とほぼ一致した。

14回経口投与後672時間（28日）までの各測定時点の

放射能濃度を Table III に示した。放射能濃度の高かった肝、副腎を含め主要組織内の放射能濃度は672時間ではほぼ完全に消失した。また、蓄積係数のもっとも高かった脂肪あるいは褐色脂肪内の放射能濃度も672時間では約 $0.3 \mu\text{g eq./g}$ 以下にまで消失した。予想された蓄積係数以上の蓄積率であった骨髄あるいは腸間膜動脈は672時間には約 $0.01 \mu\text{g eq./g}$ に消失した。

3. リンパ移行

胸管カニューレ群と偽手術群のリンパ液、血漿中の放

Table I Tissue concentrations of radioactivity after an oral administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg) to fasting male rats

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq. of AE0047/g or ml)					
	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr	72 hr	168 hr
Blood	375±78	576±125	343±22	27±4	7±2	3±0
Plasma	667±92	967±219	582±53	39±6	7±1	1±0
Cerebrum	12±02	20±6	15±2	4±1	2±0	1±0
Eyeball	14±2	41±5	47±7	12±1	4±1	1±0
Harder's g.	42±8	129±22	167±21	127±19	30±7	6±1
Thyroid	151±65	530±125	390±63	146±30	71±10	17±10
Thymus	41±7	125±33	149±24	64±5	28±3	6±2
Lung	413±81	848±188	629±51	116±15	44±9	13±5
Heart	238±49	842±135	637±91	70±16	21±4	8±1
Kidney	223±24	725±153	599±56	102±19	41±7	19±2
Pancreas	294±71	402±47	415±104	155±33	39±12	19±7
Liver	1691±631	3217±767	2554±535	487±81	168±29	64±9
Adrenal	637±160	2687±308	2233±484	379±39	98±54	35±4
Spleen	359±96	749±236	398±38	81±11	29±7	12±1
Urinary b.	117±99	334±204	168±21	45±2	14±2	5±1
Testis	16±2	74±14	96±22	29±5	13±2	5±1
Prostate	49±15	142±29	114±26	69±12	23±9	6±4
Muscle	33±6	147±45	196±56	51±5	14±11	3±0
Fat	54±5	271±28	299±59	284±40	173±41	88±11
Brown fat	112±29	509±121	661±221	533±77	225±116	95±30
Skin	26±9	82±27	99±2	60±17	26±5	23±9
Bone m.	416±222	1038±604	1193±843	267±60	180±88	37±17
M. lymph	8485±1134	9005±2806	5738±2415	660±78	272±32	131±27
Aorta	114±56	113 ¹⁾	153±71	89±65	29±11	10±1
M. artery	491±79	694±216	417±62	278±150	195±137	44±4
Stomach	4043±1280	981±525	458±32	70±21	36±22	6±1
S. intestine	26329±13474	21401±25477	16400±14691	310±44	24±3	8±2
L. intestine	334±302	1505±1531	1671±2008	110±52	25±13	9±1

Each value represents the mean±S.D. of three animals.

¹⁾ : n=2, Harder's g.: Harder's gland, Urinary b.: Urinary bladder, Bone m.: Bone marrow, M. lymph: Mesenteric lymph node, M. artery: Mesenteric artery, S. intestine: Small intestine, L. intestine: Large intestine

Table II Accumulation ratio of radioactivity in non-fasting rats during once daily oral administration of ^{14}C -AE0047

Tissue	Half life (day)	Period (day)	Accumulation factor	Accumulation ratio	
				7 dose	14 dose
Plasma	1.2	1-7	2.3	1.8	2.7
Blood	2.0	1-7	3.4	2.8	3.8
Lung	2.0	1-7	3.4	3.5	4.8
Heart	2.9	3-7	4.7	3.4	4.2
Liver	2.3	1-7	3.8	4.1	4.4
Spleen	3.2	3-7	5.1	3.9	6.4
Kidney	3.6	3-7	5.7	4.0	5.8
Adrenal gland	2.7	3-7	4.4	4.9	6.3
Muscle	1.8	3-7	3.1	3.3	3.4
Brown fat	3.2	3-7	5.1	5.1	7.9
Fat	4.1	3-7	6.4	7.1	9.2
Bone marrow	3.8	1-3	6.0	7.3	11.9
Mesenteric artery	3.9	1-3	6.1	9.2	12.9

Accumulation factor = $1/(1 - e^{-k \cdot \tau})$

Accumulation ratio = C repeated, 24 hr / C single, 24 hr

射能濃度推移を **Fig. 9** に、薬物動態パラメータを **Table IV** に、リンパ液および尿中への放射能排泄率を **Table V** に示した。リンパ液中濃度は血漿中濃度の数十倍の高濃度で推移した。投与後48時間までに胸管リンパ中に投与量の5.3%が回収された。偽手術群の血漿放射能のAUCは $10.5 \mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$ で、胸管カニューレ群は $5.0 \mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$ であり、胸管リンパのカニューレションによりAUCは48%に低下した。尿中排泄率は3.9%が1.6%に低下した。なお、HPLC分析でリンパ液中放射能の90%以上は未変化体であった。

4. 血球移行率

絶食下に投与量 3 mg/kg で単回経口投与後の血球移行率を **Table VI** に示した。投与後24時間まで血球移行率は13.9~29.5%と移行は低かった。72時間以降徐々に増加し、血漿中からほとんど放射能が消失した168時間では80.3%であった。

Fig. 7 Concentration of radioactivity in plasma, aorta and mesenteric artery of non-fasting rats after oral administration of ^{14}C -AE0047
Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 3 animals.

Table III Tissue concentrations of radioactivity 1, 3, 6, 24, 72, 168 and 672 th after 14 th consecutive oral administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg/day) to non-fasting rats

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq. of AE0047/g or ml)						
	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr	72 hr	168 hr	672 hr
Blood	576 $\pm$ 76	418 $\pm$ 126	154 $\pm$ 18	43 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	16 $\pm$ 0	N.D.
Plasma	1054 $\pm$ 165	578 $\pm$ 59	234 $\pm$ 26	39 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2	N.D.	N.D.
Cerebrum	18 $\pm$ 3	21 $\pm$ 7	12 $\pm$ 0	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0	N.D.
Eyeball	42 $\pm$ 10	45 $\pm$ 8	37 $\pm$ 7	23 $\pm$ 6	9 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	N.D.
Harder's g.	221 $\pm$ 28	247 $\pm$ 15	238 $\pm$ 14	164 $\pm$ 18	63 $\pm$ 1	19 $\pm$ 4	N.D.
Thyroid	500 $\pm$ 263	738 $\pm$ 280	589 $\pm$ 124	362 $\pm$ 149	394 $\pm$ 170	106 $\pm$ 44	N.D.
Thymus	215 $\pm$ 50	291 $\pm$ 45	196 $\pm$ 34	182 $\pm$ 33	115 $\pm$ 34	66 $\pm$ 31	9 $\pm$ 10
Lung	862 $\pm$ 145	1006 $\pm$ 569	443 $\pm$ 35	196 $\pm$ 16	117 $\pm$ 18	66 $\pm$ 13	N.D.
Heart	439 $\pm$ 75	595 $\pm$ 72	347 $\pm$ 77	104 $\pm$ 1	60 $\pm$ 6	34 $\pm$ 6	N.D.
Kidney	564 $\pm$ 59	629 $\pm$ 84	478 $\pm$ 77	220 $\pm$ 20	170 $\pm$ 33	100 $\pm$ 16	N.D.
Pancreas	506 $\pm$ 284	493 $\pm$ 71	560 $\pm$ 185	286 $\pm$ 59	115 $\pm$ 18	143 $\pm$ 67	N.D.
Liver	2321 $\pm$ 366	2579 $\pm$ 495	1701 $\pm$ 108	764 $\pm$ 107	478 $\pm$ 28	203 $\pm$ 46	N.D.
Adrenal	2148 $\pm$ 640	2926 $\pm$ 714	1541 $\pm$ 110	498 $\pm$ 11	304 $\pm$ 110	197 $\pm$ 48	N.D.
Spleen	1074 $\pm$ 226	590 $\pm$ 89	325 $\pm$ 22	191 $\pm$ 9	118 $\pm$ 13	79 $\pm$ 11	4 $\pm$ 4
Urinary b.	646 $\pm$ 502	270 $\pm$ 81	262 $\pm$ 72	74 $\pm$ 64	67 $\pm$ 33	37 $\pm$ 26	N.D.
Testis	105 $\pm$ 14	129 $\pm$ 11	113 $\pm$ 3	62 $\pm$ 12	40 $\pm$ 5	18 $\pm$ 3	N.D.
Prostate	154 $\pm$ 27	146 $\pm$ 26	150 $\pm$ 23	86 $\pm$ 31	30 $\pm$ 10	62 $\pm$ 45	N.D.
Muscle	105 $\pm$ 27	154 $\pm$ 33	122 $\pm$ 6	65 $\pm$ 6	30 $\pm$ 3	20 $\pm$ 6	N.D.
Fat	1095 $\pm$ 117	1187 $\pm$ 78	1180 $\pm$ 49	940 $\pm$ 69	860 $\pm$ 21	634 $\pm$ 46	131 $\pm$ 8
Brown fat	2347 $\pm$ 237	2370 $\pm$ 469	2005 $\pm$ 563	2037 $\pm$ 403	1718 $\pm$ 171	855 $\pm$ 103	266 $\pm$ 33
Skin	317 $\pm$ 79	386 $\pm$ 35	283 $\pm$ 25	321 $\pm$ 149	241 $\pm$ 139	182 $\pm$ 63	N.D.
Bone m.	1195 $\pm$ 304	1398 $\pm$ 298	888 $\pm$ 91	862 $\pm$ 270	714 $\pm$ 99	285 $\pm$ 133	5 $\pm$ 9
M. lymph	3023 $\pm$ 1234	3279 $\pm$ 652	1346 $\pm$ 211	652 $\pm$ 184	416 $\pm$ 56	326 $\pm$ 18	120 $\pm$ 25
Aorta	238 $\pm$ 65	286 $\pm$ 189	143 $\pm$ 10	124 $\pm$ 52	133 $\pm$ 68	104 $\pm$ 35	N.D.
M. artery	801 $\pm$ 93	624 $\pm$ 219	669 $\pm$ 56	487 $\pm$ 163	503 $\pm$ 102	331 $\pm$ 74	11 $\pm$ 19
Stomach	2964 $\pm$ 598	849 $\pm$ 256	1518 $\pm$ 474	184 $\pm$ 76	57 $\pm$ 19	36 $\pm$ 19	N.D.
S. intestine	4340 $\pm$ 3723	9646 $\pm$ 2856	2216 $\pm$ 1027	315 $\pm$ 23	144 $\pm$ 66	119 $\pm$ 33	48 $\pm$ 35
L. intestine	525 $\pm$ 182	1057 $\pm$ 598	1964 $\pm$ 1211	317 $\pm$ 119	84 $\pm$ 25	50 $\pm$ 7	11 $\pm$ 14

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals. N.D.: Not detected.

Harder's g.: Harder's gland, Urinary b.: Urinary bladder, Bone m.: Bone marrow, M. lymph: Mesenteric lymph node, M. artery: Mesenteric artery, S. intestine: Small intestine, L. intestine: Large intestine

24 hr

7 day (14th)

24 hr (7th)

28 day (14th)

24 hr (14th)

Fig. 8 Autoradioluminograms showing the distribution of radioactivity after single, 7-day, 14-day consecutive oral administration of ^{14}C -AE0047 (3 mg/kg) to non-fasting male rats
1: Brown fat 2: Fat 3: Liver

Fig. 9 Concentration of radioactivity in plasma and thoracic-duct lymph in rats after an oral administration of ^{14}C -AE0047 (dose: 3 mg/kg)
Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 3 animals.

考 察

ラットに ^{14}C -AE0047 を 3 mg/kg 経口投与した時の組織放射能分布を全身オートラジオグラフィおよび組織摘出法により検討した。 ^{14}C -AE0047 投与後の分布では腸間膜リンパ節でもっとも高い放射能が認められ、血漿中放射能濃度の9.3~12.7倍であった。また胸管リンパ液を持続的に採取した実験より、胸管リンパ液の放射能は腸管吸収された AE0047 が未変化体のまま直接リンパ液に移行したものであることがわかった。投与後48時間までに胸管リンパより回収された放射能（リンパ移行率）は5.3%であった。経口投与後の吸収率⁵⁾を24.5%とすると、リンパ経由による循環血中への寄与率は門脈経由の21.6%程度と考えられる。一方、尿中排泄率の比較から吸収におけるリンパ経由の寄与率は59%程度に、また血漿放射能 AUC を比較すると約52~54%程度のリンパ移行の寄与が考えられた。リンパ移行性が高いことは AE0047 の log P が7.06であり、脂溶性が非常に高いというそのものの物理化学的性質によると考えられた。リンパ移行性が高く、血漿中未変化体の

Table IV Pharmacokinetic parameters of radioactivity in lymph and plasma after an oral administration of ^{14}C -AE0047 (dose: 3 mg/kg)

Parameters	Thoracic-duct cannulated rats		Control rat*
	Lymph	plasma	plasma
$C_{\max}$ ($\mu\text{g eq./ml}$)	12.0 ± 7.6	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0
AUC_{0-48} ($\mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$)	115.0 ± 51.0	4.5 ± 1.9	9.7 ± 0.1
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$)	121.7 ± 46.5	5.0 ± 2.2	10.5 ± 1.0

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals or
* the mean $\pm$ S.D. of four animals.

Table V Cumulative urinary excretion and amount of radioactivity transferred to lymph after an oral administration of ^{14}C -AE0047 (dose: 3 mg/kg)

Period (hr)	Thoracic-duct cannulated rats		Control rats
	Lymph (%)	Urine (%)	Urine (%)
0~6 hr	3.9 ± 2.9	$0.2^a)$	—
0~24 hr	5.0 ± 3.1	1.3 ± 0.3	3.7 ± 0.5
0~48 hr	5.3 ± 2.9	1.6 ± 0.5	3.9 ± 0.5

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals.

a) $n=2$.

Table VI Transfer rate of radioactivity to erythrocyte after an oral administration of ^{14}C -AE0047

Time after dosing (hr)	Transfer rate (%)
1	13.9 ± 2.9
3	22.9 ± 2.5
6	21.4 ± 4.4
24	29.5 ± 1.6
72	56.5 ± 1.5
168	80.3 ± 3.0

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals.

存在比率が高く⁵⁾、初回通過効果を受け難いことが AE0047 の薬物動態学的特徴であると考えられた。

リンパあるいは門脈経路で循環血中に移行した ^{14}C -AE0047 は比較的多くの組織に取り込まれた。もっとも移行量の多かった組織は腸間膜リンパ節を除くと肝、副腎であり、肺、心、腎、脾には血漿と同程度の放射能が検出された。また、脂溶性が高いためと思われるが、脂肪組織や骨髄にも放射能が緩やかに蓄積した。血漿および血液中の放射能濃度推移はほぼパラレルに推移し、血球移行率は低かったが投与後 1 日以降経時的に増加する傾向を示した。また、脳内にはほとんど放射能が認められず、血液脳関門の透過性は低かった。RLG から副腎では皮質に局在分布することが認められている。

単回経口投与後の血漿放射能の $t_{1/2}$ は 1.2 日と計算さ

れた。その他の組織からの消失は血漿よりも遅く、 $t_{1/2}$ は約 2~4 日と計算された。反復投与した時、各組織中放射能濃度は増加し、14 回投与後 24 時間の組織内濃度は血液を始め肝等の主要組織では初回に比べて約 4~6 倍に増加した。消失の遅かった脂肪、骨髄あるいは腸間膜動脈では約 10 倍に増加した。単回投与後の消失速度定数から予測される蓄積係数⁷⁾は約 3~6 倍であり、脂肪組織、骨髄、腸間膜動脈を除くと予測値から大きくはずれるものではなかった。ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬、Felodipine^{8,9)}、NB-818^{10,11)}においても脂肪組織への同様な蓄積が報告されている。骨髄あるいは腸間膜動脈の蓄積は単回投与後 168 時間では検出されなかったため、 $t_{1/2}$ を短く見積もった可能性があった。これら予測から外れた骨髄、腸間膜動脈でも最終投与後 28 日では約 $0.01 \mu\text{g eq./g}$ に低下していた。また、蓄積率の高い脂肪および褐色脂肪も最終投与後 28 日では約 $0.1, 0.3 \mu\text{g eq./g}$ に消失していた。反復投与毒性試験において骨髄等での毒性兆候は報告されておらず、問題となる蓄積性はないものと判断された。

各組織の $t_{1/2}$ は約 2~4 日と投与間隔の 2 倍以上であり、反復投与組織分布試験のガイダンス¹²⁾から組織分布試験を検討すべきと判断し 2 週間の反復投与試験を実施した。血中濃度や排泄動態⁵⁾から 10 回程度の反復投与で定常に達しているものと判断されたこと、7 回と 14 回投与後 24 時間の主要組織の放射能濃度の増加割合が少ないことから、14 回までに各組織はほぼ定常状態に達したものと考えている。

標的組織である細動脈の代表として腸間膜動脈への移行性を検討した。非絶食下に投与した場合、血漿中の $T_{\max}$ は 1 時間であったが、腸間膜動脈は 6 時間で最高濃度に達し、6 時間以降は血漿よりも高い放射能が検出された。標的組織である腸間膜動脈への移行および消失が遅いことは、緩やかで持続的な降圧作用^{1,2)}の一つの要因と考えられた。なお、脂溶性の高いカルシウム拮抗剤、lacidipine では緩徐な降圧作用の一因として、非特異的な細胞膜への取り込みと細胞膜内をレセプター部位に移動して結合するまでに時間がかかるため、作用発現に時間を要すると説明されている¹³⁾。AE0047 のレセプターへの結合・解離に関しては現在検討中であるが、非常に緩やかであることがわかってきており、緩徐な降圧作用の主たる理由と判断している。

以上のような AE0047 の体内分布の特徴、すなわちリンパ移行性による血中濃度のラグ・タイムの存在や未変化体の血中濃度が高いことは、本化合物の物性、脂溶性に起因しているものと考えられた。

要 約

雄ラットに ^{14}C -AE0047 を単回経口投与、単回静脈

内投与および反復経口投与後の組織内分布, およびリンパ移行性を検討した.

1) 単回経口投与後1時間では腸間膜リンパ節, 肝および副腎に高い放射能が認められた. 投与後3時間では放射能濃度の高い腸間膜リンパ節, 肝, 副腎, 肺, 心, 脾, 腎, 腸間膜動脈は $C_{\max}$ に達し, 血液濃度より高く分布した. 中枢神経系にはほとんど放射能は認められなかった. 筋肉, 脂肪, 褐色脂肪, 骨髄等では6時間に $C_{\max}$ に達した. 血漿濃度および各組織濃度は $C_{\max}$ 到達以降緩やかに消失し, 血漿では約1.2日の $t_{1/2}$ で, 各組織からは約2~4日の $t_{1/2}$ で消失した.

2) 14日間の反復経口投与では最終14回投与後24時間の各組織内濃度は初回投与の2.7~12.9倍に増加した. 蓄積率の高かった組織は脂肪, 褐色脂肪, 骨髄, 腸間膜動脈であった. 各組織の蓄積率は骨髄あるいは動脈壁を除き, 予想された蓄積係数とほぼ一致した.

最終14回投与後672時間までに肝, 副腎を含む各組織の放射能は完全に消失した. 蓄積率の高かった脂肪あるいは褐色脂肪の放射能濃度も約 $0.3 \mu\text{g eq./g}$ 以下にまで消失し, 骨髄あるいは腸間膜動脈は約 $0.01 \mu\text{g eq./g}$ にまで消失した.

3) 胸管にカニューレを施したラットを用いてリンパ移行を検討した. 胸管リンパ液は血漿より数十倍高濃度で推移し, 胸管リンパ中に投与量の5.3%が回収された. 偽手術群の血漿放射能のAUCは $10.5 \mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$ で, 胸管カニューレ群は $5.0 \mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$ であり, 胸管リンパのカニューレシオンによりAUCは48%に低下した. 尿中排泄率は3.9%が1.6%に低下した.

文 献

- Ohtaki, Y., Uchida, T., Ogura, Y., Nishikawa, M., Watanabe, M. and Yokoyama, K.: The antihypertensive effect of the novel Ca entry blocker AE0047 in rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **183**: 1325-1326 (1989).
- Hayashi, K., Uchida, T., Kido, H., Shinyama, H. and Watanabe, M.: Effects of AE0047 on renal haemodynamics and function in anaesthetized dogs. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **20**: 103-111 (1993).
- Yamanaga, K., Shinyama, H., Akira, T., Iwamoto, M., Uchida, T., Nakamura, N. and Kagitani, Y.: AE0047-mediated calcium channel blocking in vascular smooth muscles. *Gen. Pharmacol.*, (in press.)
- Hayashi, K., Gohoda, M., Matzno, S., Kubo, Y., Kido, H., Yamauchi, T. and Nakamura, N. Possible mechanism of action of AE0047, a novel calcium antagonist, on triglyceride metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (in press.)
- 大久保雅啓, 平田 崇, 十亀祥久, 田中幹雄, 岡野周充, 津田良夫: 新規ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗剤 AE0047 の体内動態 (第1報): ラットおよびイスにおける吸収と排泄, 薬物動態, **12**(3): 178-191 (1997).
- 山田 喬: ダイコクネズミ胸管より持続的多量リンパ球採取法, 医学のあゆみ, **56**: 234-238 (1966).
- 溝尻顯爾, 乗鞍 良, 反復投与試験における組織蓄積性の予測, 薬物動態, **11**: 147-159 (1996).
- Uno, K., Yamagami, S., Hayashi, S., Tabata, S., Esumi, Y., Takaichi, M., Jin, Y., Ishikawa, H. and Tsuji, S.: Studies on the metabolic fate of felodipine (I): Absorption, distribution, metabolism and excretion after a single administration to rats. *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, **6**: 717-747 (1991).
- Uno, K., Yamaguchi, S., Hayashi, S., Tabata, S., Esumi, Y., Takaichi, M., Jin, Y., Ishikawa, H. and Tsuji, S.: Studies on the metabolic fate of felodipine (II): Absorption, distribution, metabolism and excretion after a repeated oral administration to rats. *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, **6**: 749-767 (1991).
- 白鳥健二, 原 健一, 高山文夫, 斎藤 郁, 大多和昌克: 新規ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬 NB-818 の体内動態 (第1報): ラットにおける吸収・分布・代謝および排泄. 薬物動態, **6**: 309-330 (1991).
- 白鳥健二, 井ノ上志津子, 木村省子, 斎藤 郁, 石井康行, 大多和昌克: 新規ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬 NB-818 の体内動態 (第3報): ラットおよびイスにおける反復投与後の吸収・分布・代謝・排泄. 薬物動態, **6**: 343-352 (1991).
- 厚生省薬務局審査課長: 薬審第442号, 反復投与組織分布試験ガイダンスについて, 平成8年7月2日 (1996).
- Herbette, L. G., Gaviraghi, G., Tulenko, T. and Mason, R. P.: Molecular interaction between lacidipine and biological membranes. *J. Hypert.*, **11**: S13-S19 (1993).