急性心不全治療薬 NKH477 の体内動態 (第3報): ラットにおける単回静脈内投与時の胎盤通過性および乳汁移行性

入江 毅, 松本 真一, 合田 里佳, 浴 敏子, 山下 幸和

Metabolic Fate of NKH477 (3): Feto-Placental Transfer and Excretion into Milk in Rats after a Single Intravenous Administration

Tsuyoshi IRIE, Shin-ichi MATSUMOTO, Rika GODA, Toshiko EKI and Kouwa YAMASHITA

Research & Development Division, Pharmaceuticals Group, Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo

Summary: Feto-placental transfer and excretion into milk of ^{14}C -NKH477 were investigated in pregnant and lactating rats after a single intravenous administration.

1. From the results of whole body autoradiography in pregnant rats performed on the 17th of gestation, the levels of radioactivities in placenta and amnion were similar as that in the maternal blood within 6 hours after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477, and the radioactivities in these tissues decreased to tracer levels at 24 hours after administration. There were no radioactivities present in fetus and amniotic fluid to 24 hours after administration.

2. The radioactivity levels in amniotic fluid, fetus and fetal liver were lower than those of amnion and placenta after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 to rats on the 14th or 18th day of pregnancy. The levels of radioactivity in fetus at 5 min and 1 hour after administration were 1/3~1/9 of the concentrations in maternal blood. The amounts of the radioactivity transferred to fetus were low both on the 14th and 18th day of pregnancy, and the radioactivity slightly distributed in fetus was eliminated rapidly.

3. After a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 to lactating rats on the 11th day after delivery, the radioactivity was detected in the milk, and the ratio of milk to plasma within 24 hours after administration was 1.0~2.2.

Key words: NKH477, Feto-placental transfer, Excretion into milk, Rat

緒 言

NKH477 ((+)-(3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-5-acetoxy-6-(3-dimethylaminopropionyloxy)-dodecahydro-10,10b-dihydroxy-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-3-vinyl-1H naphtho[2,1-b]pyran-1-one monohydrochloride) は、フォルスコリンの水溶性誘導体で、 β 受容体を介さずにアデニル酸シクラーゼを活性化することにより陽性変力作用¹⁾および血管平滑筋弛緩作用²⁾の発現が確認され、各種心不全モデルで心機能の改善効果が認められている³⁾。前報において ^{14}C -NKH477を用いたラットおよびイヌにおける血中濃度、分布、排泄について報告した^{4,5)}。本報では、 ^{14}C -NKH477を妊娠ラットまたは授乳期の雌ラットに静脈内投与したときの胎盤通過性および乳汁移行性を検討した。

材料および方法

1. 標識化合物および試薬

^{14}C -NKH477 はヘキスト AG で合成されたものを用いた。比放射能は 3916.0, 3174.0, 3244.0, 3916.0 MBq/g, 放射化学的純度は96.8%以上であった。なお、放射化学的純度は HPLC で測定した。

他の試薬および溶媒は市販の特級品を使用した。

2. 動物

全身オートラジオグラフィ (ARG) には妊娠 Wistar ラット (体重 280~360 g, 妊娠17日目; 日本チャールス・リバー株) を、組織内濃度には妊娠 Wistar ラット (体重 225~320 g, 妊娠14および18日目, ヘキスト AG) を、乳汁移行性には雌 Wistar ラット (体重

360~380 g, 分娩後11日目, 日本チャールス・リバー(株)を用いた。動物数はARGでは1群1匹, その他は1群3匹とした。

3. 投与液の調製および投与

^{14}C -NKH477は生理食塩液に溶解し, ラットに0.3または0.036 mg/kgで尾静脈または頸静脈内投与した。

4. 全身オートラジオグラフィ

妊娠ラットに ^{14}C -NKH477を0.3 mg/kg尾静脈内投与し, 投与後5分, 6および24時間の全身オートラジオグラムを前報⁴⁾に準じて作製した。

5. 組織内濃度の測定

妊娠ラットに ^{14}C -NKH477を0.036 mg/kg尾静脈内投与し, 投与後5分, 1, 6, 24および72時間に脱血し, 血液, 肝臓, 腎臓, 卵巣, 子宮, 胎盤, 羊膜, 羊水, 胎仔および胎仔肝臓を摘出した。

試料中放射能は前報の燃焼法または溶解法⁴⁾で放射能を測定した。

6. 乳汁移行性

分娩後のラットに ^{14}C -NKH477を0.3 mg/kg頸静脈内投与した後, 5分, 30分, 1, 2, 5, 8, 24, 48および72時間に胸部および腹部の乳腺から乳汁を採取した。同時に尾静脈からヘパリン処理した微量採血管(テルモ(株))を用いて血液を採取し, 遠心分離して血漿を得た。なお, 乳汁分泌を促すため採乳時刻1時間前にオキシトシン(Sigma, USA) 0.6 U/匹を腹腔内投与した。採取した血漿および乳汁に液体シンチレーター Clear-sol Iを加えて放射能を測定した。

7. 放射能の測定

放射能の測定は液体シンチレーションカウンター(BF5000; Berthold, Germany または LSC-3500; 株アロカ)で計測し, 計数効率の補正は外部標準線源によるチャンネル比法にて行った。

8. 試験成績の表示と処理

試験成績は3例の平均値と標準偏差で表示した。定量限界値は放射能のバックグラウンド値の2倍とし, それ以下を定量限界以下(N.D.)で表した。薬物動態パラメータは各個体の濃度曲線から求め, 平均値±標準偏差で表した。なお, 濃度・時間曲線下面積(AUC)および半減期($t_{1/2}$)はそれぞれ台形法および残差法で算出した。

実験結果

1. 全身オートラジオグラム

妊娠ラットに ^{14}C -NKH477を静脈内投与したときの全身オートラジオグラムをFig. 1A~Cに示した。胎盤通過に関係する部位では投与後5分に羊膜および胎盤に母獣血液とほぼ同程度の放射能が認められ, 投与後6時間にもこれらの部位にわずかな放射能が認められた。投与後24時間では羊膜にわずかな放射能が認められたが, 胎盤の放射能はバックグラウンドレベルまで減衰した。胎仔および羊水では, いずれの時点においても放射能はバックグラウンドレベルであった。そのほかの母獣の主要臓器における放射能の分布は雄ラットでの分布特性⁴⁾とほぼ同様であった。

2. 組織内放射能濃度

1) 妊娠14日目の分布

妊娠14日目のラットに ^{14}C -NKH477を静脈内投与したときの母獣および胎仔組織における組織内濃度をTable Iに示した。

摘出組織のほとんどは投与後5分で最高放射能濃度を示し, その濃度は母獣肝臓, 腎臓, 卵巣, 羊膜, 血液, 胎盤, 子宮, 胎仔および羊水の順であった。羊水は投与後1時間で最高放射能濃度を示した。

投与後5分の卵巣, 羊膜, 胎盤および子宮の放射能濃度はそれぞれ母獣血液中放射能濃度(31.2 ng eq./g)の1.4倍, 1.1倍, 0.9倍および0.8倍で母獣血液とほぼ同程度であったが, 羊水および胎仔中放射能濃度は母獣血液の1/18および1/8で低かった。

投与後1時間では羊水の放射能濃度は最高値となったが, 胎盤, 羊膜, 子宮, 卵巣, 血液および胎仔の放射能濃度は投与後5分に比べ減少した。胎盤, 羊膜, 子宮および卵巣の放射能濃度は母獣血液中放射能濃度(7.0 ng eq./g)の2~3倍を示した。羊水および胎仔の放射能濃度は母獣血液の1/2および1/3で低かった。

投与後6時間では全ての摘出組織で放射能濃度が低下し, 卵巣, 胎仔および羊水の放射能濃度は定量限界以下となった。羊膜, 胎盤および子宮の放射能濃度は母獣血液中放射能濃度(5.1 ng eq./g)とほぼ同程度を示した。

投与後24時間では羊膜の放射能は母獣血液中放射能濃度(4.7 ng eq./g)とほぼ同程度であったが, 胎盤および子宮はそれ以下に減少した。

投与後72時間では羊膜には母獣血液中放射能濃度(3.5 ng eq./g)と同程度の放射能が観測されたが, 子宮および胎盤の放射能濃度は定量限界以下となった。また, この時点では胎仔の肝臓を摘出することができたが, 放射能濃度は定量限界以下であった。

Fig. 1 A : Whole body autoradiograms at 5 min after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.3 mg/kg) to rats on the 17th day of pregnancy

1. Gastric contents 2. Liver 3. Thymus 4. Bone marrow 5. Amnion 7. Heart 8. Kidney
 9. Pancreas 10. Spinal cord 11. Placenta 12. Mandibular 14. Brain 15. Lung 16. Harderian gland
 17. Spleen 18. Adrenal gland 21. Hypophysis 22. Brown fat 23. Blood 24. Thyroid gland 25. Skin
 26. Fetus

母獣の血液、胎盤および羊膜中の放射能は羊水および胎仔よりも高く推移した。また、妊娠ラットにおいて高い放射能濃度を示した組織は雄性ラットと同様であった⁴⁾。

2) 妊娠18日目の分布

妊娠18日目のラットに ^{14}C -NKH477 を静脈内投与したときの母獣および胎仔における組織内濃度を **Table II** に示した。

Fig. 1 B: Whole body autoradiograms at 6 hr after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.3 mg/kg) to rats on the 17th day of pregnancy

1. Gastric contents 2. Liver 5. Amnion 6. Small intestinal contents 8. Kidney 11. Placenta
18. Adrenal gland 19. Large intestinal contents 20. Caecum contents

ほとんどの組織内放射能濃度は投与後5分で最高放射能濃度を示したが、羊膜と羊水は投与後1時間で最高濃度となった。

投与後5分の卵巣、羊膜、胎盤および子宮の放射能濃度はそれぞれ母獣血液中放射能濃度 (27.1 ng eq./g) の1.4倍、1.3倍、1.0倍および0.7倍で母獣血液とはほぼ同程度であったが、羊水、胎仔および胎仔肝臓中放射能濃

度は母獣血液の1/5, 1/9 および1/5 で低かった。

投与後1時間では羊膜および羊水を除き胎盤、羊膜、子宮、卵巣、血液、胎仔および胎仔肝臓の放射能濃度は投与後5分に比べ減少した。胎盤、子宮および卵巣の放射能濃度は母獣血液中放射能濃度 (8.1 ng eq./g) の約2倍であったが、羊膜の放射能濃度は母獣血液の7倍と高かった。胎仔および胎仔肝臓の放射能濃度は最高

Fig. 1 C: Whole body autoradiograms at 24 hr after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.3 mg/kg) to rats on the 17th day of pregnancy

2. Liver 5. Amnion 8. Kidney 18. Adrenal gland 19. Large intestinal contents

濃度の半分以下に減少し、投与後5分と同様に母獣血液の約1/5で低かったが、羊水中放射能は母獣血液の1.7倍であった。

投与後6時間では摘出した全ての組織で放射能濃度が低下し、卵巣、胎仔および胎仔肝臓の放射能濃度は定量限界以下となり、羊水中放射能濃度は母獣血液中放射能濃度以下となった。胎盤および子宮の放射能濃度は母

獣血液中放射能濃度 (4.7 ng eq./g) とほぼ同程度を示したが、羊膜の放射能濃度は母獣血液の6倍と高かった。

投与後24時間では羊水中放射能濃度が定量限界以下となった。羊膜は母獣血液中放射能濃度 (4.4 ng eq./g) の4倍と高かった。

投与後72時間では組織中放射能濃度はさらに減少し、

Table I Tissue concentrations of radioactivity after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.036 mg/kg) to rats on the 14th day of pregnancy

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq./g)				
	5 min	1 hr	6 hr	24 hr	72 hr
Maternal					
Blood	31.2 $\pm$ 1.5	7.0 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.2
Liver	166.3 $\pm$ 3.6	138.7 $\pm$ 12.5	108.1 $\pm$ 18.4	75.7 $\pm$ 6.2	54.9 $\pm$ 9.8
Kidney	100.8 $\pm$ 8.0	23.9 $\pm$ 7.8	8.2 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.5
Ovary	43.6 $\pm$ 7.6	11.3 $\pm$ 4.3	N.D.	N.D.	N.D.
Uterus	25.3 $\pm$ 3.8	14.2 $\pm$ 2.1	3.7 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.3	N.D.
Placenta	27.7 $\pm$ 1.0	21.4 $\pm$ 7.3	7.8 $\pm$ 1.4	2.9 $\pm$ 0.7	N.D.
Amnion	33.7 $\pm$ 5.9	19.2 $\pm$ 4.8	8.3 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 2.4	3.0 $\pm$ 0.5
Amniotic fluid	1.7 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 2.7	N.D.	N.D.	N.D.
Fetal					
Whole body	4.0 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 0.3	N.D.	N.D.	N.D.
Liver	—	—	—	—	N.D.

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

N.D. : Not detected.

— : No sample.

Table II Tissue concentrations of radioactivity after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.036 mg/kg) to rats on the 18th day of pregnancy

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq./g)				
	5 min	1 hr	6 hr	24 hr	72 hr
Maternal					
Blood	27.1 $\pm$ 5.6	8.1 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 0.7	4.4 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.4
Liver	145.5 $\pm$ 28.1	143.1 $\pm$ 19.3	104.5 $\pm$ 16.7	88.7 $\pm$ 8.4	67.7 $\pm$ 1.2
Kidney	124.3 $\pm$ 17.3	30.5 $\pm$ 6.4	10.3 $\pm$ 1.7	7.4 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 0.9
Ovary	38.9 $\pm$ 9.1	13.1 $\pm$ 3.1	N.D.	N.D.	N.D.
Uterus	19.3 $\pm$ 2.5	16.8 $\pm$ 1.9	3.5 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 5.8
Placenta	26.4 $\pm$ 2.1	19.3 $\pm$ 2.8	5.6 $\pm$ 1.1	3.2 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 0.2
Amnion	34.3 $\pm$ 3.8	53.7 $\pm$ 7.4	27.0 $\pm$ 7.0	16.4 $\pm$ 2.3	9.1 $\pm$ 0.4
Amniotic fluid	5.3 $\pm$ 0.1	13.5 $\pm$ 7.3	2.8 $\pm$ 1.0	N.D.	N.D.
Fetal					
Whole body	3.1 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4	N.D.	N.D.	N.D.
Liver	5.6 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 1.7	N.D.	N.D.	N.D.

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

N.D. : Not detected.

子宮および胎盤に微量の放射能が観測されたが、羊膜は依然として母獣血液中放射能濃度 (3.1 ng eq./g) の3倍と高かった。

母獣の血液中放射能濃度は、投与後1時間の羊水を除き胎仔および胎仔肝臓よりも高く推移した。妊娠18日目では妊娠14日目に比べ羊膜および羊水の放射能濃度が高く観測されたが、組織からの放射能の消失は妊娠14日目の結果と同様であった。また羊水、胎仔および胎仔肝臓中の放射能は羊膜および胎盤中の放射能より低値であった。

3. 乳汁移行性

分娩後11日目の授乳期の雌ラットに ^{14}C -NKH477 を静脈内投与したときの乳汁および血漿中放射能濃度推移を **Fig. 2** に示した。またそのときの薬物動態パラメータを **Table III** に示した。乳汁中放射能は投与後5分で既に最高濃度 333.5 ng eq./ml に達し、その後、半減期 0.37時間 (α 相), 27.90時間 (β 相) で減衰し、投与後24時間では最高濃度の約3%になった。同時に測定した血漿中放射能濃度は投与後5分で 154.2 ng eq./ml を示した後、半減期 0.46時間 (α 相), 16.75時間 (β 相) で減少した。また、乳汁および血漿中放射能濃度の AUC_{0-24} の値はそれぞれ 509.4 および 370.2 ng eq.·hr/

Fig. 2 Concentrations of radioactivity in milk and plasma after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.3 mg/kg) to lactating rats
Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three rats

Table III Pharmacokinetic parameters of radioactivity in milk and plasma after a single intravenous administration of ^{14}C -NKH477 (0.3 mg/kg) to lactating rats

	AUC ₀₋₂₄ (ng eq.·hr/ml)	$t_{1/2\alpha}$ (hr)	$t_{1/2\beta}$ (hr)
Milk	509.4 $\pm$ 70.4	0.37 $\pm$ 0.07	27.90 $\pm$ 6.46
Plasma	370.2 $\pm$ 67.3	0.46 $\pm$ 0.11	16.75 $\pm$ 7.91

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

mlであり、乳汁中濃度のAUCは血漿中濃度のAUCの1.4倍であった。投与後24時間までの各時点における放射能の乳汁中濃度/血漿中濃度比(M/P比)は1.0~2.2であった。

考 察

妊娠14日目および18日目のラットに ^{14}C -NKH477を0.036 mg/kg 静脈内投与したとき、放射能は投与後5分で母獣全身に速やかに分布し、母獣の血液、肝臓および腎臓中の放射能濃度は雄ラットと同様に推移することが確認された⁴⁾。羊水、胎仔および胎仔肝臓中放射能濃度は妊娠14日目および妊娠18日目の全時点で羊膜および胎盤よりも低く推移した。また、投与後5分および1時間で、胎仔の放射能濃度は母獣血液の1/3~1/9であり、羊水中放射能濃度もほとんどの時点で母獣血液よりも低値であった。妊娠17日目のラットに ^{14}C -NKH477を0.3 mg/kg 静脈内投与したときの全身オートラジオグラムでも投与後5分から24時間の胎仔および羊水にはほとんど放射能が認められなかった。これらのことから、NKH477は胎盤通過性の低い薬物であることが確認された。投与された放射能は血液胎盤関門により胎仔への移行が抑えられているものと考えられた。

妊娠14日目および妊娠18日目のラットにおいて胎仔

の放射能濃度は同様に推移し、NKH477の胎盤通過性は妊娠期(中期~後期)によって変化しないことが認められた。また、妊娠17日目のラットにおける全身オートラジオグラムは組織内放射能濃度の推移とよく一致した。さらに胎仔および胎仔肝臓中の放射能濃度は投与後6時間以降定量限界以下となった。また、投与後24時間では羊水においても放射能濃度は定量限界以下となったことから、胎仔組織に分布した放射能は速やかに消失することが示された。

乳汁移行性を検討したとき乳汁中放射能濃度は投与後5分で既に最高濃度を示し、同時に測定した血漿中放射能濃度の2.2倍であったことから速やかな乳汁移行性が示された。一般に塩基性薬物は乳汁(pH 6.8)中に移行しやすく、乳汁中でイオン化した薬物が血漿(pH 7.4)中へは戻り難いため、M/P比が1を超えることが知られている⁶⁾。NKH477も塩基性薬物であることから、同様の理由によって乳汁中に速やかに移行しM/P比が1を超えたものと考えられた。NKH477は速やかな乳汁移行性を示したが、NKH477投与後の授乳に起因したと思われる毒性的変化は認められなかった(未発表資料)。

要 約

妊娠ラットおよび授乳中ラットに ^{14}C -NKH477を単回静脈内投与したときの胎盤通過性および乳汁中移行性について検討した。

1. 妊娠17日目のラットに ^{14}C -NKH477を単回静脈内投与したときの全身オートラジオグラムより、投与後6時間まで胎盤および羊膜に母獣血液とはほぼ同程度の放射能が認められたが、24時間後には痕跡程度まで減衰した。胎仔および羊水には放射能は認められなかった。

2. 妊娠14日目および18日目のラットに ^{14}C -NKH477を単回静脈内投与したとき、羊水、胎仔および胎仔肝臓中の放射能濃度は羊膜および胎盤中の放射能濃度よりも低値であった。また、投与後5分および1時間の胎仔の放射能は母獣血液の1/3~1/9であった。妊娠14日目および18日目とともに胎盤を通過する放射能はわずかであり、同様であった。胎仔に分布したわずかな放射能は速やかに消失した。

3. 分娩後11日目の授乳中ラットに ^{14}C -NKH477を単回静脈内投与したときの乳汁中には放射能が認められ、乳汁/血漿中放射能濃度比は投与後24時間まで1.0~2.2であった。

文 献

- 1) Hosono, M., Takahira, T., Fujita, A., Fujihara, R., Ishizuka, O., Tatee, T., Nakamura, K.: Cardiovascular and adeny-

- late cyclase stimulant properties of NKH477, a novel water-soluble forskolin derivative. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **19**: 625-634 (1992).
- 2) Ishizuka, O., Hosono, M. and Nakamura, K.: Profile of cardiovascular effects of NKH477, a novel forskolin derivative, assessed in isolated, blood-perfused dog heart preparations: Comparison with isoproterenol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**: 261-267 (1992).
- 3) Fujita, A., Takahira, T., Hosono, M., and Nakamura, K.: Improvement of drug-induced cardiac failure by NKH477, a novel forskolin derivative, in the dog heart-lung preparation. *Japan. J. Pharmacol.*, **58**: 375-381 (1992).
- 4) 松本真一, 入江 毅, 浴 敏子, 山下幸和: 急性心不全治療薬 NKH477 の体内動態 (第1報), 薬物動態, **13**(3): 207-220 (1998).
- 5) 松本真一, 入江 毅, 浴 敏子, 山下幸和, 関 英昌, 二宮真一, 高尾厚志, 大坪美和, 高市松夫, 江角凱夫: 急性心不全治療薬 NKH477 の体内動態 (第2報), 薬物動態, **13**(3): 221-228 (1998).
- 6) 菅原和信, 豊口偵子: 薬剤の母乳への移行, 南山堂, (1991).