Carvedilol の体内動態 (第6報)

サルにおける吸収, 排泄および分布

藤巻正慶, 新谷尚三, 伯水英夫

第一製薬株式会社中央研究所 〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13

Key words : Carvedilol (DQ-2466), Squirrel monkeys, Cynomolgus monkeys, Erythrocyte binding, Whole body autoradiography.

Studies on the Metabolic Fate of Carvedilol (V) Absorption, Excretion and Distribution in Monkeys

Masayoshi FUJIMAKI, Shouzou SHINTANI and Hideo HAKUSUI

Research Institute, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.,
1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan.

Summary

The absorption and excretion of ^{14}C -carvedilol were studied in cynomolgus monkeys after an oral administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 10 mg/kg. The distribution of radioactivity was also studied in squirrel monkeys by whole body autoradiography after an oral or intravenous administration of ^{14}C -carvedilol.

Blood level reached to the maximum of about $2.3\mu\text{g eq./ml}$ at 2h after an oral administration and decreased with the terminal half-life of 31.3h. The concentration of the radioactivity in plasma was higher than that in blood throughout experimental period. It was suggested that the erythrocyte binding in cynomolgus monkeys was clearly low as contrasted with that in rats. After an oral administration of ^{14}C -carvedilol to cynomolgus monkeys, approximately 65% and 16% of dose were excreted within 10 days into feces and urine, respectively.

In the whole body autoradiograms after an oral or intravenous administration to squirrel monkeys, high levels of radioactivity were observed in the gall bladder, liver, intestinal contents. It was suggested that biliary excretion was a major elimination route of carvedilol in monkeys. The distribution of radioactivity to tissues after an oral administration was remarkably low in comparison with that after an intravenous administration.

The accumulation of radioactivity in hair follicles and uveal tract containing melanin were observed in the autoradiograms at 24h after dosing.

緒言

Carvedilol (DQ-2466), (±)-1-(carbazol-4-yloxy)-3-[[2-(*o*-methoxy)ethyl]amino]-2-propanol は, Boehringer Mannheim 社より導入された末梢血管拡張作用をあわせもつ β -遮断薬である。本薬物の体内動態については, ヒトを含め種々の動物^{2,3)} で検討されており, 特に, ラットにおいて血球結合率が経時的に上昇する現象が存在することが明らかにされている^{3,4)}。すなわち, ^{14}C -carvedilol をラットに経口投与すると, 放射能の一部が血球に結合するため, 血液中放射能濃度は極めて緩慢な減衰を示す。サルにおける血球結合性, 吸収, 排泄を検討するために, カニクイザルに ^{14}C -carvedilol を経口投与し, その血液, 血漿および尿, 糞中放射能濃度を測定した。また, 組織内分布を検討するために, リスザルに ^{14}C -carvedilol を経口投与し, 全身オートラジオグラムを作製した。

試験方法

1. 標識化合物

^{14}C -Carvedilol は, BM社より譲渡された標識体を第一化学(株)東海研究所にて再精製した放射化学的純度98%, 比放射能58.2 μCi (2.15MBq)/mg の標識体を使用した (Fig. 1)。

Fig 1. Chemical structure of ^{14}C -carvedilol

2. 使用動物

吸収, 排泄試験においては, 静岡県実験動物農業共同組合 (以下, 静実動と略称) より購入した体重2.78~3.19kg の雌性カニクイザルを用いた。全身オートラジオグラフィ試験では, 加商株式会社より購入した体重500~750g の雄性リスザルを用いた。

実験に先立ち, サルを室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の環境下で飼育し, 前夜より絶食させ, 水は自由に摂取させた。実験に際しては, 上記の環境に準じた条件の実験室内で飼育し, 薬物投与4時

間後に固形飼料 (Purina Primate Chow #5048, 静実動), リンゴおよび水を与えた。

3. 投与液の調製および投与方法

吸収, 排泄試験に用いた投与液は, ^{14}C -carvedilol に非標識 carvedilol を加え, 10mg/2ml/kg となるように, 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し調製した。調製した投与液中の ^{14}C -carvedilol の比放射能は2.18 μCi (0.081MBq)/mg であり, TLC (展開溶媒 $\text{CHCl}_3 : \text{EtOH} : 28\% \text{NH}_3 / 100 : 10 : 1$) によって検討した放射化学的純度は94.0%であった。投与液を5ml のガラス製注射筒に取り, 小児用経鼻カテーテル (アトム栄養カテーテル5Fr, アトム社製) を用い経鼻的に胃内に投与した。その後, 5ml の水道水を与えることにより, カテーテル内を洗浄した。

全身オートラジオグラフィ試験における経口投与用の投与液は, ^{14}C -Carvedilol に非標識 carvedilol を加え, 10mg/10ml/kg となるように, 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し調製した。また, 静脈内投与時には, 1mg/2ml/kg となるように, 1mg の ^{14}C -carvedilol にジメチルホルムアミド200 μl , 10%酢酸20 μl , 5.25%グルコース100 μl を加え溶解後, 5.25%グルコースを加え, 全量を2ml に調製した。調製したこれらの投与液の比放射能は, それぞれ61.7 (2.28MBq) μCi /mg (経口投与1hr用), 21.1 μCi (0.78MBq)/mg (経口投与24hr用), および72.8 μCi (2.69MBq)/mg (静脈内投与1hr用) であった。これらの投与薬液を, 経口投与では10ml のガラス製注射筒にとり, 胃内に挿入したネラトンカテーテル (No. 6) より胃内に投与した。また, 静脈内投与では投与薬液を2ml のガラス製注射筒に取り, 下肢静脈内より投与した。

4. 吸収, 排泄試験

^{14}C -Carvedilol 10mg/kgを経口投与後, サルを代謝ケージに入れ, 所定の時間に股関節静脈より5ml の注射筒で, 以下のタイムコースで3~5ml の血液を採取した。投与後0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24および48時間に採取した血液を, あらかじめヘパリナイズしたスピッツに移し, その一部を用い直ちにヘマトク

リット値を測定した。さらに血液0.1mlを濾紙(東洋濾紙 No. 51)に塗布した。残りの血液は3,000r.p.m., 15minで遠心分離し血漿を得た。尿および糞は投与後240時間まで経時的にそれぞれ採取した。

5. 血球結合率

血球結合率は血液、血漿中放射能濃度およびヘマトクリット値より、以下に示す式⁵⁾に従って算出した。

$$\text{血球結合率} = \frac{100(B-P) + P \cdot H}{B}$$

B : 血液中放射能濃度

P : 血漿中放射能濃度

H : ヘマトクリット値

6. 放射能の測定

血液は濾紙に塗布し室温で乾燥後、自動燃焼装置(ASC-113型, アロカ株式会社)による燃焼処理(生成した¹⁴CO₂をエタノールアミンに捕集し, トルエン系シンチレーターを添加)後, その放射能を液体シンチレーションカウンタ(LSC-700およびLSC-900, アロカ株式会社)を用いて測定した。糞は凍結乾燥し, 全重量を測定後乳鉢にて細かく粉碎した。その一部を正確に秤量した後, 自動燃焼装置にて同様に処理し, 放射能の測定を行った。血漿および尿中放射能の測定は, これら試料の一部を正確にバイアルに取り, アク

アゾール2シンチレーター(NEN社製)約12mlを加えた後, 液体シンチレーションカウンタでその放射能を直接計測した。

放射能のクエンチングの補正は, 外部線源(¹³⁷Cs)チャンネル比法により行った。

7. 全身オートラジオグラフィ

全身オートラジオグラムの作製は松岡らの方法⁶⁾に準じて行った。経口および静脈内投与後1時間, および経口投与後24時間にリスザルをドライアイスで窒息死させた。サルの被毛を電気バリカンで刈った後, 直ちに約-70℃のアセトン-ドライアイス中で凍結し, クライオミクロトーム(PMV 450型, PMV社 Sweden)により厚さ30μmの全身凍結切片を作製した。切片を凍結乾燥後, カセット中でフィルム(³Hタイプマクロオートラジオグラフィ用, コニカ)と密着露出し, 全身オートラジオグラムを作製した。

試験成績

1. 血中放射能濃度

¹⁴C-Carvedilol 10mg/kgを経口投与後の血液および血漿中放射能濃度をTable IおよびFig. 2に示す。

血液中放射能濃度は, 投与後2~3時間で最高濃度(C_{max}) 2.27μg equiv./mlに達した。その後, 血液中放射能濃度は経時的に減衰し, 投与

Fig 2. Whole blood (●) and plasma (○) levels of radioactivity in the cynomolgus monkeys after a single oral administration of ¹⁴C-carvedilol at a dose of 10 mg/kg.

Table I Blood levels of radioactivity in the monkey after a single oral administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 10 mg/kg.

Sample	Animal No.	Time after dosing (h)												
		0.25	0.5	0.75	1	2	3	4	6	8	10	12	24	48
Whole blood	1	0.18	0.32	0.37	0.39	2.14	2.47	1.99	0.99	0.68	0.57	0.41	0.38	0.30
	2	0.26	0.68	1.35	1.95	2.19	1.15	1.12	0.60	0.45	0.38	0.35	0.23	0.18
	3	0.04	0.06	0.06	0.29	1.70	2.15	1.28	0.56	0.47	0.36	0.34	0.27	0.21
	Mean	0.16	0.35	0.60	0.88	2.01	1.92	1.46	0.72	0.53	0.44	0.37	0.30	0.23
	S.E.	0.06	0.18	0.39	0.54	0.16	0.40	0.27	0.14	0.07	0.07	0.02	0.04	0.03
Plasma	1	0.19	0.43	0.50	0.52	1.84	3.12	2.72	1.26	0.91	0.72	0.55	0.50	0.34
	2	0.32	0.89	1.91	2.67	2.79	1.66	1.49	0.79	0.64	0.50	0.50	0.31	0.22
	3	0.01	0.04	0.08	0.33	2.53	2.59	1.71	0.80	0.67	0.45	0.44	0.40	0.27
	Mean	0.17	0.45	0.83	1.18	2.39	2.46	1.97	0.95	0.74	0.56	0.49	0.40	0.27
	S.E.	0.09	0.25	0.55	0.75	0.28	0.43	0.38	0.16	0.08	0.08	0.03	0.06	0.03

Values were expressed as $\mu\text{g-equiv. to carvedilol/ml}$.Table II Red blood cell binding of radioactivity in the monkey after a single oral administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 10 mg/kg.

	Animal No.	Time after dosing (h)												
		0.25	0.5	0.75	1	2	3	4	6	8	10	12	24	48
	1	32.3	14.3	14.2	14.3	43.4	15.4	11.0	11.2	10.1	15.3	7.3	8.2	17.3
	2	26.4	18.5	14.0	14.5	20.8	16.3	18.0	20.8	13.7	15.9	10.4	15.1	16.2
	3	87.7	64.7	23.0	32.6	10.7	26.3	19.5	12.4	12.9	22.8	21.1	7.1	15.8
	Mean	48.8	32.5	17.1	20.5	25.0	19.3	16.2	14.8	12.3	18.0	12.9	10.1	16.4
	S.E.	19.5	16.1	3.0	6.1	9.6	3.5	2.6	3.0	1.1	2.4	4.2	2.5	0.5

Values were expressed as %.

Fig 3. Fecal and urinary excretion of radioactivity after a single oral administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 10 mg/kg to cynomolgus monkeys.

後48時間には $C_{\max}$ の約1/10 ($0.23\mu\text{g-equiv./ml}$) にまで低下した。血液中放射能濃度を片対数グラフにプロットし、その減衰の直線部分を最小二乗法にあてはめて算出した terminal half-life (6~48時間) は31.3時間であった。

血漿中放射能濃度は、血液中放射能濃度とほぼ平行に推移した。投与後2~3時間に $C_{\max}$, $2.83\mu\text{g-equiv./ml}$ に達し、投与後48時間には $0.27\mu\text{g-equiv./ml}$ に低下した。また、血液と同様に算出した terminal half-life (6~48時間) は28.6時間であった。

2. 血球結合率

^{14}C -Carvedilol 10mg/kg を経口投与後の血球結合率を Table II に示す。血球結合率は、投与直後の15および30分では、平均48.8%および32.5%の値を示したが、投与後1~48時間においては10~25%の値を示した。

3. 尿および糞中排泄

^{14}C -Carvedilol 経口投与後72時間までに尿中へ投与量の約14%が排泄されたが、糞中への排泄は約9%であった。糞中への放射能の排泄は以後経口的に上昇し、検討した最終日の投与後240時間には投与放射能の約65%に達した。投与後240時間までの累積尿中排泄率は投与量の15.7%であり、尿および糞を合わせた放射能の総累積排泄率は80.2%であった (Fig. 3)。

4. 全身オートラジオグラフィ

リスザルに ^{14}C -carvedilol 1 mg/kg 単回静脈

内投与後1時間の全身オートラジオグラムを Photo. 1 に示す。また、10mg/kg 単回経口投与後の1時間および24時間の全身オートラジオグラムを Photo. 2 および 3 に示す。

静脈内投与後1時間の放射能の黒化度は、胆嚢で最も高く、次いで小腸内容物、褐色脂肪、脾、肺、肝、唾液腺、心、肺、ブドウ膜、毛嚢、涙腺、骨格筋、脳、脊髄、血管壁、血液の順に低下した。静脈内投与においては、放射能が中枢神経系組織へも分布することが明らかであった。経口投与後1時間の全身オートラジオグラムにおいて、放射能の黒化度は胆嚢で最も高く、次いで小腸内容物、肝、腎、唾液腺、脾、睾丸、心筋、骨格筋、血液、肺、脳、脊髄の順であった。放射能の分布パターンは、静脈内投与時とほぼ同様な傾向を示していたが、胆嚢、肝および消化管を除き、放射能の全身への分布は静脈内投与と比較し著しく低濃度であった。投与後24時間の全身オートラジオグラムにおいて、放射能は全身の各組織から減衰していた。放射能の黒化度の順位は胆嚢で最も高く、次いで小腸内容物、肝、ブドウ膜、毛嚢、唾液腺、肝、脾、心筋、血管壁、褐色脂肪、骨格筋、血液、脳、脊髄の順であった。

考 察

^{14}C -Carvedilol 経口投与後のサルにおける血液中放射能濃度は、血漿中放射能濃度より検討したすべての時間において低値を示していた。この

Photo 1. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the squirrel monkey at 1 hour after a single intravenous administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 1 mg/kg.

1. Aortic wall	5. Gastric contents	9. Kidney	13. Muscle	17. Testis
2. Brain	6. Hair follicles	10. Lacrimal gland	14. Salivary gland	18. Uveal tract
3. Brown fat	7. Heart	11. Liver	15. Spinal cord	19. Whole blood
4. Gall bladder	8. Intestinal contents	12. Lung	16. Spleen	

ことは、サルにおける血球結合率が低いことを意味しており、実際の測定値（10～25%）は、ラットで得られた値（43～95%）に比べ低値を示していた。血液中放射能濃度の terminal half-life は、ラットで210時間（9～72時間）と報告¹⁾されているが、サルでは31.3時間（6～48時間）とラットの1/7程度であった。この terminal half-life の差は、血球への放射能の結合性に起因す

るものと考えられた。すなわち、ラットの血球結合率は経時的に上昇するのに対して、サルではほぼ一定の血球結合率を示していた。

ラットにおける ^{14}C -carvedilol 経口投与後の血液中放射能濃度の持続性および血球結合率の経時的な上昇は、ラットに特異的な現象であると推定された。ヒトに ^{14}C -carvedilol を静脈内投与し、その1.5時間後における血球中放射能濃度に

Photo 2. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the squirrel monkey at 1 hour after a single oral administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 10 mg/kg.

1. Aortic wall	5. Gastric contents	9. Kidney	13. Muscle	17. Testis
2. Brain	6. Hair follicles	10. Lacrimal gland	14. Salivary gland	18. Uveal tract
3. Brown fat	7. Heart	11. Liver	15. Spinal cord	19. Whole blood
4. Gall bladder	8. Intestinal contents	12. Lung	16. Spleen	20. Esophagus

対する血漿中放射能濃度の比 (P/RBC) は9.9と報告¹⁾されている。この値はサルで算出された $C_{\max}$ での P/RBC 濃度比 (2.26 ± 0.27) より高い値を示していた。サルにおいては、その血球に放射能が蓄積しなかったことを考え合わせると、ヒトにおいて carvedilol あるいはその代謝

物がラットで認められたように血球へ蓄積する可能性は少ないものと推測される。

サルでの主排泄経路は、ラット^{3,4)}、ウサギ⁴⁾およびヒト¹⁾と同様に糞中であった。リスザルの全身オートラジオグラムより胆嚢中の放射能の黒化が静脈内および経口の両投与経路においても著

Photo 3. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the squirrel monkey at 24 hours after a single oral administration of ^{14}C -carvedilol at a dose of 10 mg/kg.

1. Aortic wall	5. Gastric contents	9. Kidney	13. Muscle	17. Testis
2. Brain	6. Hair follicles	10. Lacrimal gland	14. Salivary gland	18. Uveal tract
3. Brown fat	7. Heart	11. Liver	15. Spinal cord	19. Whole blood
4. Gall bladder	8. Intestinal contents	12. Lung	16. Spleen	

しく、ラット⁷⁾と同様に、サルにおいても胆汁中排泄が主要排泄経路であることを示唆していた。サルにおける糞中への放射能の排泄は、胆汁経由であることが推定される。サルにおける糞中への放射能の排泄は、極めて緩慢であり、それは放射能の腸肝循環によるものと考えられた。

リスザルへの ^{14}C -carvedilol 経口投与後の放射能の全身への分布は、静脈内投与時に比べ低下していた。それは経口吸収性が低いためではなく、経口投与においても肝および胆嚢に著しく高濃度の放射能の分布が認められたことから、肝の初回通過効果に起因するものと推察された。すなわち、消化管より吸収された放射能は肝より直接胆汁中へ排泄されるため、循環血中に移行する放

射能の量は著しい低下をきたすと考えられる。経口投与においては、肝の初回通過効果による systemic availability の低下により静脈内投与後に認められたような中枢神経系への放射能の移行は著しく低下していた。

Carvedilol は分子内に窒素原子を含む側鎖とカルバゾール環を有しており、こうした分子内に塩基性の窒素原子を含む側鎖と芳香族多環構造を有する化合物は、メラニン組織に親和性を示すことが知られている^{8,9)}。経口投与後24時間の全身オートラジオグラムにおいて、ブドウ膜および毛嚢といったメラニン含有組織の放射能黒化度の順位が高くなっていたことから、carvedilol はメラニンに対して親和性を有していると考えられ

る。しかしながら、イヌにおける12カ月慢性毒性試験¹⁰⁾において眼障害性は報告されていない。

リスザルの経口投与時の放射能の組織内分布の成績を、すでに報告したラットの経口投与時の成績³⁾と比較すると、投与後1時間では、ほぼ類似した放射能の分布傾向が認められた。すなわち、両種において、腸管内容物、肝、腎、肺などの組織に高い放射能の分布が認められ、中枢神経系組織への放射能の分布は低下していた。投与後24時間の血液への放射能の分布には、両種間に差が認められ、ラットでは血球への親和性が高いため高濃度の分布を認めたが、サルでは血液から放射能はほとんど消失していた。その他の組織では、ラットおよびサルで類似した放射能の分布傾向が

認められた。

以上の結果をまとめると、carvedilol は脂溶性の高い化合物であり、静脈内投与すると中枢神経系組織を含め全身に広く分布するが、経口投与時には肝の初回通過効果によって全身への移行が低下するため、相対的に中枢神経系への放射能の移行も低下する。また、carvedilol はメラニンに対して親和性を有するため、投与後長時間において放射能はブドウ膜や毛嚢といったメラニン含有組織に貯留傾向を示したが、ラットにおいて認められたような血球への蓄積傾向は認められなかった。放射能の主排泄経路は、胆汁經由の糞中であり、糞中へは投与量の65%が、尿中へは投与量の16%がそれぞれ排泄された。

文 献

- 1) Neugebauer, G. Akpan, W. Mölendorff, E. Neubert, P. and Reiff, K. : Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10 (Suppl. 11) : S85-S88 (1987).
- 2) Koch, K. and Neubert, P. : Elimination kinetics and organ distribution of radioactivity in rats and rabbits. : Boehringer Mannheim Report (1984).
- 3) 伯水英夫, 藤巻正慶, 江角凱夫, 高市松夫, 斉藤尚子, 大月みゆき, 三宅隆行, 本多尚子 : Carvedilol の体内動態 (第1報) ラットにおける単回経口投与時の吸収, 分布, 排泄, 薬物動態. 4(6) : 637-649 (1989).
- 4) 伯水英夫, 藤巻正慶, 江角凱夫, 高市松夫, 横田喬枝, 斉藤尚子, 三宅隆行, 本多尚子 : Carvedilol の体内動態 (第2報) ラット反復経口投与における体内動態, 薬物動態. 4(6) : 651-665 (1989).
- 5) Hughes, I. Ilett, K. and Jellet, L. : The distribution of quinidine in human blood. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2 : 521-525 (1975).
- 6) 松岡理等 : 生体試料におけるオートラジオグラフィー(Ⅱ)マクロオートラジオグラフィー凍結全身オートグラフィーを中心に(Ⅰ), *Radioisotopes*, 18 : 75-84 (1969).
- 7) 藤巻正慶, 伯水英夫 : Carvedilol の体内動態 (第3報) ラットにおける胆汁中排泄と腸肝循環, 薬物動態. 4(6) : 667-671 (1989).
- 8) Potts, M. : The reaction of uveal pigment in vitro with polycyclic compounds. *Investigative Ophthalmology*, 3 (No. 4) : 405-416 (1984).
- 9) Ings, R. : The melanin binding of drugs and its implications. *Drug Metab. Reviews*, 15 : 1183-1212 (1984).
- 10) Bode, G. and Czerwek, H. : Chronic oral toxicity test of BM 14.190 12-month experiment in dogs. : Boehringer Mannheim Report (1986).