クレンチアゼム静脈内投与時のラットにおける体内動態： 組織内分布および血漿，脳ならびに肝臓中代謝物

福島 健，仲村 進，伊藤 豊*，高市 雄之

田辺製薬株式会社 薬物代謝研究所，薬理研究所* 〒335 埼玉県戸田市川岸2-2-50

Key words : Clentiazem, Intravenous administration, Rat, Tissue distribution, Metabolite

Metabolic fate of clentiazem in rats after intravenous administration : Tissue distribution and metabolites in plasma, brain and liver

Takeshi FUKUSHIMA, Susumu NAKAMURA, Yutaka Ito* and Osasi TAKAITI

Research Laboratory of Drug Metabolism, Pharmacological Research Laboratory*,
Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
2-2-50, Kawagishi, Toda, Saitama, 335, Japan

Summary

The organ and tissue distribution of radioactivity, the concentration of acidic and basic metabolites in plasma, brain and liver were studied after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3mg/kg to male and female rats. The plasma levels of radioactivity was higher in male rats than in female rats at any time examined. On the other hand, the radioactivity in the organs and tissues became higher in female rats than that in male rats with the lapse of time. The acidic metabolites which might be formed through oxidative deamination of clentiazem and the basic metabolites were higher in the plasma of male rats. The metabolites in the brain were mainly of basic character and the levels were higher in female rats. Few acidic metabolites were found in the brain of both male and female rats. One may expect that basic metabolites were easily transferred to the organs and tissues, while acidic metabolites were hardly transferred, due to their pK_a values if the pH -partition theory is considered. Accordingly, it would be considered that plasma levels of radioactivity were higher in male rats while the organ and tissue levels of radioactivity were higher in female rats.

序

クレンチアゼムは、ジルチアゼムのベンゾチアゼピン骨格の8位に塩素原子を導入した新規カルシウム拮抗剤である¹⁾。クレンチアゼム経口投与時の吸収、臓器・組織内分布および排泄については、すでに報告されている²⁾。また、雄および雌ラットにおけるクレンチアゼム経口投与時の血漿中放射能濃度、尿、糞および胆汁中放射能排泄率ならびに代謝物の組成割合には明らかな性差が認められている。性差は、主として脱アミノ化反応を経て生成すると考えられる酸性代謝物の量が雌雄ラットで異なることに起因していると考えられた。静脈内投与時においては、肝臓での初回通過代謝を受けないが、臓器・組織内放射能濃度および臓器・組織内の代謝物組成が雌雄ラットで異なると推測される。本報では、¹⁴C-クレンチアゼム静脈内投与時の雌雄ラットにおける臓器・組織内放射能濃度および血漿、脳および肝臓中代謝物の組成割合について検討した。

実験材料および実験方法

1. 試 薬

¹⁴C-クレンチアゼム (Fig. 1) は、既報²⁾ に示した方法によりアマーシャムインターナショナル (Buckinghamshire, U.K.) にて合成された。比放射能は1.84MBq/mg、放射化学的純度は TLC で検討した結果98%であった。標識化合物は実験に応じて使用前、非標識クレンチアゼムで希釈した。

Fig. 1 Chemical structure of ¹⁴C-clentiazem
*: labelled position

2. 動 物

実験には日本チャールスリバー (神奈川, 日本) より購入した Sprague-Dawley 系雄性 (7 週齢, 210~250 g) および雌性 (7 週齢, 160~

200 g) ラットを用いた。

3. 投与液の調製法と投与方法

¹⁴C-クレンチアゼムを生理食塩水に溶解し, 3 mg/ml/kg を雌雄ラットの尾静脈内に投与した。

4. 臓器・組織内放射能濃度

¹⁴C-クレンチアゼムを雄あるいは雌ラットに静脈内投与後 5, 30分, 1, 3, 6, 24, 72時間の各時点においてエーテル麻酔下, 腹部大動脈よりヘパリン添加のシリンジにより採血し, 脱血致死させた。次いで, 臓器・組織を速やかに切除し, 摘出した。血液の一部は, 血漿を得るために4000 rpm で5分間遠心分離した。血漿および秤量した臓器・組織は Soluene 350 (組織溶解剤, Packard Downers Grove, U.S.A) を1 ml 加え, 加温溶解した。血液は Soluene 350-イソプロピルアルコール(1:1, v/v) 混液の1 ml を加え, 加温溶解後, 10% H₂O₂ 0.2 ml を加えて脱色した。これらの試料に Hionic fluor (Packard) を加えて, 放射能を液体シンチレーションカウンター (Packard, Tri-Carb 460CD) で測定した。

5. 血漿, 脳および肝臓中代謝物測定用試料の調製法

血漿は0.1N HCl で pH 2 に調製後, 2 倍量の tert-butyl methyl ether (t-BME) を加えて酸中性代謝物画分を t-BME に抽出した。脳および肝臓は秤量後, 約10倍量のアセトンを加え, 氷冷下, 脳はポッター型ホモジナイザーで, 肝臓はポリトロン (Kinematika, Switzerland) でホモジナイズした。

ホモジネートを4℃, 3000rpm で10分間遠心分離し, 上清を分取後, 沈澱に等量のアセトンを加えて, 同じ操作を2回繰り返した。得られた上清を合わせて, 溶媒を減圧下, 濃縮乾固し得られた残渣を t-BME に溶解し, 0.1N HCl 10 ml を加えて抽出操作を行い, 酸中性代謝物画分を t-BME 層に分画した。血漿および肝臓の酸中性代謝物を含む t-BME 層は, 0.1N Na₂HPO₄ 水溶液を加えて振盪し, 遠心分離後, t-BME 層を分取し, 中性代謝物画分とした。残水層は1N HCl

Fig. 2 Chemical structures of acidic metabolites (MA1-MA4) and basic metabolites (MB1-MB7)

を加えて pH 2 に調整後、2 倍量の t-BME で抽出し、酸性画分とした、先に得た血漿、脳および肝臓の酸中性代謝物画分抽出後の残水層は 1N NH_4OH で pH 8 に調整後、2 倍量の t-BME で抽出し、塩基性代謝物画分とした。アセトン抽出画分および各抽出画分の一部の放射能を測定することにより各画分の割合を求めた。定量した酸性代謝物 (MA1-MA4) および塩基性代謝物 (MB1-MB7) の構造を Fig. 2 に示した。

6. 代謝物の定量

溶媒抽出法で分離した脂溶性の酸性 (脳は酸中性画分) および塩基性代謝物画分は、HPLC-ラジオアナライザーにより分離、定量した。酸性代謝物画分には合成標品 (MA1-MA4)、塩基性代謝物画分にはクレンチアゼムおよび合成標品 (MB1-MB7) を加え、合成標品の UV ピークと同一の保持時間を示す放射性ピークをその代謝物に由来するピークと判断した。各代謝物の濃度はクロマトグラム上の放射性ピークの存在比を計算し、投与したクレンチアゼムの比放射能、臓器・組織内放射能濃度および抽出率から求めた。なお、HPLC の測定条件は下記の通りである。

装置：日立 L-6200 型液体クロマトグラフ装置

：日立 D-2500 型データ処理装置

：日立 655A 型 UV 検出器

カラム：Nova Pak C-18 (Waters, U.S.A)

ラジオアナライザー：Raytest 5-LS Ramona

溶媒系 (酸性代謝物)：

(A) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}$ (7 : 3, v/v)

(B) 0.1M Phosphate buffer (pH 2.2)

(塩基性代謝物)：

(A) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}$ (7 : 3, v/v)

(B) 0.1M Phosphate buffer (pH 7.9)

グラジェントの条件：試料注入後 0, 1, 25, 30 分で (A) : (B) の比 (v/v) が 25 : 75, 25 : 75, 50 : 50 および 50 : 50 に変化。

結 果

1. 臓器・組織内放射能濃度

^{14}C -クレンチアゼムの 3 mg/kg を静脈内投与したときの雄ラットにおける臓器・組織内放射能濃度を Table I に示した。

血漿、血液および各臓器・組織内放射能濃度のピークは、投与後 5 分から 1 時間に見られた。ピーク時点での濃度は肺が最も高く、次いで副腎、ハーダー腺、肝臓、下垂体、腎、甲状腺、脾臓、心筋の順に高かった。また、膵臓、唾液腺、小腸壁および骨髄は中程度であり、大脳、胸腺、脳幹、小脳、骨格筋、血管壁、胃壁、脂肪、精巣、皮膚、

Table I Organ and tissue concentrations of radioactivity after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male rats

Tissue	Concentration ($\mu\text{g eq. clentiazem/g or ml}$)						
	5 min	30 min	1 hour	3 hour	6 hour	24 hour	72 hour
blood	1.07 $\pm$ 0.17	1.06 $\pm$ 0.11	1.29 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.11	0.56 $\pm$ 0.12	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
plasma	1.09 $\pm$ 0.18	1.36 $\pm$ 0.20	1.76 $\pm$ 0.16	1.32 $\pm$ 0.19	0.80 $\pm$ 0.22	0.12 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.00
blood vessel	3.59 $\pm$ 0.74	1.63 $\pm$ 0.55	1.10 $\pm$ 0.23	0.87 $\pm$ 0.37	0.52 $\pm$ 0.24	0.03 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.03
cerebrum	5.86 $\pm$ 2.32	1.91 $\pm$ 0.28	1.48 $\pm$ 0.17	0.43 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.02	N.D.	N.D.
cerebellum	3.99 $\pm$ 1.29	1.54 $\pm$ 0.25	1.30 $\pm$ 0.31	0.38 $\pm$ 0.09	0.14 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	N.D.
brain stem	4.42 $\pm$ 1.56	1.72 $\pm$ 0.19	1.44 $\pm$ 0.19	0.40 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.03	N.D.	N.D.
pineal body ^{a)}	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	N.D.	N.D.	N.D.
eye ball	1.58 $\pm$ 0.48	0.97 $\pm$ 0.14	0.85 $\pm$ 0.19	0.55 $\pm$ 0.15	0.29 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.00
pituitary gland	7.29 $\pm$ 2.86	11.25 $\pm$ 7.05	4.71 $\pm$ 2.29	4.58 $\pm$ 3.09	4.36 $\pm$ 0.75	0.48 $\pm$ 0.37	N.D.
salivary gland	6.95 $\pm$ 1.07	6.89 $\pm$ 0.67	7.03 $\pm$ 3.38	2.89 $\pm$ 0.35	1.47 $\pm$ 0.16	0.14 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.01
Harders gland	7.14 $\pm$ 2.70	12.23 $\pm$ 2.19	18.12 $\pm$ 1.44	16.13 $\pm$ 1.68	10.78 $\pm$ 1.30	2.65 $\pm$ 1.32	0.16 $\pm$ 0.05
thyroid gland	10.24 $\pm$ 4.26	4.86 $\pm$ 1.90	4.20 $\pm$ 2.11	1.93 $\pm$ 0.48	1.18 $\pm$ 0.28	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
adrenal gland	20.29 $\pm$ 8.36	16.32 $\pm$ 2.57	10.96 $\pm$ 1.68	4.82 $\pm$ 0.81	2.36 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.06
thymus	3.65 $\pm$ 1.19	5.35 $\pm$ 0.46	4.76 $\pm$ 0.93	1.67 $\pm$ 0.21	0.93 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.40	0.07 $\pm$ 0.01
spleen	2.63 $\pm$ 1.38	10.09 $\pm$ 0.98	8.78 $\pm$ 2.09	3.84 $\pm$ 0.59	2.02 $\pm$ 0.18	0.28 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.02
bone marrow	2.48 $\pm$ 0.86	6.30 $\pm$ 1.22	6.11 $\pm$ 2.94	2.76 $\pm$ 0.30	1.50 $\pm$ 0.15	0.24 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.04
liver	5.59 $\pm$ 2.04	12.71 $\pm$ 2.09	17.81 $\pm$ 6.80	10.43 $\pm$ 1.07	6.38 $\pm$ 0.60	1.37 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.09
kidney	11.14 $\pm$ 1.60	10.28 $\pm$ 1.65	9.42 $\pm$ 1.10	5.26 $\pm$ 0.74	3.01 $\pm$ 0.23	0.37 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.02
lung	46.59 $\pm$ 14.89	25.91 $\pm$ 4.72	24.11 $\pm$ 3.14	11.46 $\pm$ 1.97	5.43 $\pm$ 0.42	0.38 $\pm$ 0.17	0.09 $\pm$ 0.02
heart	9.57 $\pm$ 2.73	4.78 $\pm$ 0.65	3.82 $\pm$ 0.50	1.90 $\pm$ 0.30	0.90 $\pm$ 0.08	0.09 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01
pancreas	8.64 $\pm$ 2.65	6.73 $\pm$ 0.56	5.94 $\pm$ 0.44	3.27 $\pm$ 0.31	2.04 $\pm$ 0.15	0.18 $\pm$ 0.08	0.06 $\pm$ 0.01
gastric wall	3.33 $\pm$ 1.71	3.05 $\pm$ 0.83	2.45 $\pm$ 0.70	1.76 $\pm$ 0.15	1.17 $\pm$ 0.28	0.16 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01
intestine wall	3.01 $\pm$ 0.63	7.05 $\pm$ 1.34	7.16 $\pm$ 1.33	4.87 $\pm$ 0.61	2.91 $\pm$ 1.26	0.33 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.01
adipose tissue	0.70 $\pm$ 0.20	2.10 $\pm$ 0.19	3.12 $\pm$ 0.73	1.95 $\pm$ 0.09	0.87 $\pm$ 0.15	0.05 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.02
skin	1.15 $\pm$ 0.26	1.69 $\pm$ 0.23	2.72 $\pm$ 0.53	1.30 $\pm$ 0.20	0.59 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00
skeletal muscle	3.94 $\pm$ 0.91	2.25 $\pm$ 0.28	1.93 $\pm$ 0.55	0.88 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
testis	0.93 $\pm$ 0.10	2.12 $\pm$ 0.29	3.07 $\pm$ 0.35	2.09 $\pm$ 0.13	0.97 $\pm$ 0.12	0.19 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01

mean $\pm$ S.D. (n=4) ; a) : values per whole body ; N.D. : not detected (<60 dpm/sample)

Table II Organ and tissue concentrations of radioactivity after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to female rats

Tissue	Concentration ($\mu\text{g eq. clentiazem/g or ml}$)						
	5 min	30 min	1 hour	3 hour	6 hour	24 hour	72 hour
blood	0.73 $\pm$ 0.44	0.86 $\pm$ 0.44	0.57 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00
plasma	0.82 $\pm$ 0.57	1.00 $\pm$ 0.48	0.57 $\pm$ 0.10	0.64 $\pm$ 0.14	0.49 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00
blood vessel	1.93 $\pm$ 0.82	1.27 $\pm$ 0.22	1.44 $\pm$ 0.65	1.83 $\pm$ 0.94	0.84 $\pm$ 0.27	0.15 $\pm$ 0.03	N.D.
cerebrum	1.88 $\pm$ 1.04	2.97 $\pm$ 0.34	2.32 $\pm$ 0.46	1.69 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.20	0.06 $\pm$ 0.02	N.D.
cerebellum	1.72 $\pm$ 0.97	2.48 $\pm$ 0.35	1.93 $\pm$ 0.35	1.46 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.14	0.05 $\pm$ 0.01	N.D.
brain stem	1.74 $\pm$ 0.95	2.90 $\pm$ 0.32	2.10 $\pm$ 0.42	1.64 $\pm$ 0.21	0.96 $\pm$ 0.14	0.05 $\pm$ 0.01	N.D.
pineal body ^{a)}	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.25	0.01 $\pm$ 0.00	N.D.	N.D.
eye ball	0.71 $\pm$ 0.32	1.18 $\pm$ 0.17	0.83 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.05	N.D.
pituitary gland	2.72 $\pm$ 2.01	11.12 $\pm$ 1.66	8.84 $\pm$ 3.02	6.07 $\pm$ 4.13	6.34 $\pm$ 0.49	1.23 $\pm$ 1.86	0.22 $\pm$ 0.10
salivary gland	3.46 $\pm$ 1.75	7.72 $\pm$ 0.63	5.91 $\pm$ 1.52	5.33 $\pm$ 0.74	4.70 $\pm$ 0.33	0.63 $\pm$ 0.18	0.04 $\pm$ 0.01
Harders gland	2.63 $\pm$ 0.92	15.03 $\pm$ 1.56	17.52 $\pm$ 4.57	28.76 $\pm$ 2.17	30.43 $\pm$ 2.63	9.00 $\pm$ 2.69	0.56 $\pm$ 0.15
thyroid gland	5.05 $\pm$ 3.20	5.04 $\pm$ 1.58	3.77 $\pm$ 1.21	5.15 $\pm$ 4.04	2.66 $\pm$ 0.54	0.33 $\pm$ 0.23	N.D.
adrenal gland	7.80 $\pm$ 2.65	15.37 $\pm$ 1.30	10.96 $\pm$ 2.19	9.62 $\pm$ 1.69	9.41 $\pm$ 1.89	1.29 $\pm$ 0.51	0.09 $\pm$ 0.02
thymus	1.62 $\pm$ 0.74	5.34 $\pm$ 0.28	4.34 $\pm$ 1.07	3.78 $\pm$ 0.24	2.86 $\pm$ 0.28	0.60 $\pm$ 0.11	0.04 $\pm$ 0.00
spleen	0.57 $\pm$ 0.28	11.68 $\pm$ 1.19	9.50 $\pm$ 2.79	8.24 $\pm$ 0.44	6.88 $\pm$ 0.56	1.29 $\pm$ 0.40	0.11 $\pm$ 0.02
bone marrow	0.80 $\pm$ 0.17	7.34 $\pm$ 1.16	6.61 $\pm$ 1.76	5.47 $\pm$ 0.70	4.73 $\pm$ 0.22	0.71 $\pm$ 0.21	N.D.
liver	0.73 $\pm$ 0.44	11.39 $\pm$ 1.50	11.97 $\pm$ 3.77	10.80 $\pm$ 1.29	10.69 $\pm$ 1.16	1.85 $\pm$ 0.25	0.36 $\pm$ 0.06
kidney	3.40 $\pm$ 1.45	10.52 $\pm$ 1.30	8.56 $\pm$ 2.09	8.13 $\pm$ 0.83	9.19 $\pm$ 0.78	1.49 $\pm$ 0.39	0.12 $\pm$ 0.01
lung	30.24 $\pm$ 19.66	32.76 $\pm$ 1.97	30.00 $\pm$ 7.19	23.67 $\pm$ 3.82	24.87 $\pm$ 5.19	2.59 $\pm$ 1.03	0.09 $\pm$ 0.02
heart	6.47 $\pm$ 5.14	5.17 $\pm$ 0.43	4.17 $\pm$ 0.94	3.90 $\pm$ 0.19	3.04 $\pm$ 0.19	0.36 $\pm$ 0.11	0.03 $\pm$ 0.01
pancreas	3.58 $\pm$ 1.42	7.13 $\pm$ 0.59	5.84 $\pm$ 1.63	5.32 $\pm$ 0.56	5.25 $\pm$ 0.46	0.68 $\pm$ 0.18	0.05 $\pm$ 0.01
gastric wall	1.58 $\pm$ 0.46	4.67 $\pm$ 1.04	4.55 $\pm$ 2.12	4.79 $\pm$ 1.49	3.54 $\pm$ 0.29	0.41 $\pm$ 0.13	0.03 $\pm$ 0.00
intestine wall	1.50 $\pm$ 0.42	7.38 $\pm$ 1.17	6.47 $\pm$ 2.08	6.14 $\pm$ 1.18	5.79 $\pm$ 0.89	1.51 $\pm$ 0.48	0.08 $\pm$ 0.03
adipose tissue	0.25 $\pm$ 0.09	1.97 $\pm$ 0.44	3.68 $\pm$ 2.19	3.48 $\pm$ 0.29	2.53 $\pm$ 0.33	0.13 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.00
skin	0.35 $\pm$ 0.12	2.09 $\pm$ 0.58	2.24 $\pm$ 0.79	2.03 $\pm$ 0.17	1.57 $\pm$ 0.13	0.24 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.01
skeletal muscle	1.54 $\pm$ 0.46	2.40 $\pm$ 0.21	1.86 $\pm$ 0.59	1.70 $\pm$ 0.11	1.35 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.04	N.D.
ovary	3.32 $\pm$ 1.46	9.57 $\pm$ 1.92	6.93 $\pm$ 2.05	5.79 $\pm$ 0.82	4.82 $\pm$ 1.16	0.62 $\pm$ 0.18	0.05 $\pm$ 0.00
uterus	0.76 $\pm$ 0.12	4.26 $\pm$ 0.90	3.25 $\pm$ 1.01	3.74 $\pm$ 1.26	3.02 $\pm$ 0.93	0.67 $\pm$ 0.13	0.06 $\pm$ 0.02

mean $\pm$ S.D. (n=4); a) : values per whole body; N.D. : not detected (<60 dpm/sample)

血漿, 眼球, 血液および松果体の濃度は低かった。血漿中放射能濃度は, 投与後5分で $1.09\mu\text{g eq. クレンチアゼム/ml}$, 1時間で最高濃度の $1.76\mu\text{g eq. クレンチアゼム/ml}$ に達した後, 徐々に減少し, 投与後3時間では $1.32\mu\text{g eq. クレンチアゼム/ml}$, 6時間では $0.80\mu\text{g eq. クレンチアゼム/ml}$, 72時間では最高濃度の約1/30の $0.05\mu\text{g eq. クレンチアゼム/ml}$ になった。肺の放射能濃度は, 投与後5分で血漿中濃度の約40倍の $46.59\mu\text{g eq. クレンチアゼム/g}$ であり, その後比較的速度やかに減少し, 投与後24時間では $0.38\mu\text{g eq. クレンチアゼム/g}$ となり, 血漿中濃度と同程度になった。肝臓では投与後5分で $5.59\mu\text{g eq. クレンチアゼム/g}$, 1時間では最高濃度の $17.81\mu\text{g eq. クレンチアゼム/g}$ になり, その後徐々に減少し, 投与後24時間では最高濃度の約1/13, 72時間では約1/30になった。

大脳, 小脳, 脳幹および松果体の放射能濃度は, 投与後5分で最高濃度を示した後, 経時的に減少し, 投与後24時間以降では検出限界以下となった。唾液腺, 甲状腺, 腎臓, 心筋, 骨格筋, 脾臓, 副腎および眼球は, 投与直後に高い濃度を示し, 精巣, 皮膚, 脂肪組織, 腸壁, ハーダー腺, 脾臓および下垂体は投与後30分あるいは1時間に最高濃度に達した。

^{14}C -クレンチアゼムの 3 mg/kg を, 静脈内投与時の雌ラットにおける臓器・組織内放射能濃度を Table II に示した。

雌ラットにおいても雄ラットの場合と同様, ピーク時点では肺の放射能濃度が最も高く, 次いでハーダー腺, 副腎, 肝臓, 脾臓, 脳下垂体, 腎臓, 卵巣の順に高かった。また, 唾液腺, 腸壁, 脾臓, 骨髄, 心筋, 胸腺, 胃壁, 子宮, 甲状腺は中程度であり, 大脳, 小脳, 脳幹, 骨格筋, 脂肪組織, 皮膚, 眼球, 血漿, 血液, 松果体の濃度は低かった。

雌ラットにおける血漿中放射能濃度は, 投与後30分でピーク($1.00\mu\text{g eq. クレンチアゼム/ml}$)に達し, 以後経時的に減少し, 投与後24時間では最高濃度の約1/12, 72時間では最高濃度の約1/50まで減少した。

肺においては, 投与後5分から1時間まで同程度の濃度で推移し($30.00\sim 32.76\mu\text{g eq. クレン$

チアゼム/g), 以後6時間まで緩やかに減少する推移を示し, 6時間以降比較的速度やかに減少した。投与後24時間での濃度は最高濃度の約1/13, 72時間では約1/360にまで減少した。

肝臓の投与後5分での濃度は低かったが, 投与後30分から6時間まで比較的高い濃度を維持し($10.69\sim 11.97\mu\text{g eq. クレンチアゼム/g}$), 投与後24時間では最高濃度の約1/6にまで減少した。

大脳, 小脳, 脳幹では, いずれも投与後30分で最高濃度に達した後, 経時的に減少し, 投与後72時間では検出限界以下になった。血管壁および心筋においては, 投与後5分で最高濃度に達した後, 6時間まで同程度の濃度を持続し, 以後減少した。

2. 血漿中代謝物

^{14}C -クレンチアゼム静脈内投与後5, 30分, 1, 3時間の雄および雌ラットにおける血漿中の酸性, 中性, 塩基性および水溶性代謝物画分の放射能濃度の経時変化を Fig. 3 に示した。各代謝物画分の放射能を合した総放射能濃度は, 投与後5分では雌雄間に差が認められなかったが, その後, 雄ラットでは濃度が経時的に上昇したのに対し, 雌ラットでは投与後30分で減少した後, はほぼ同じ濃度で推移した。投与後3時間では, 雄ラットの濃度は雌ラットのその約2倍になった。

投与後5分での各代謝物画分の放射能濃度については, 雄および雌ラットとも酸性代謝物画分の濃度は低く, 塩基性および水溶性代謝物画分の濃度が高かった。投与後30分以降になると, 雄ラットの酸性代謝物画分が雌ラットのそれと比べて著しく高くなり, 雌ラットのその約2.5~3.5倍になった。一方, 塩基性代謝物画分の濃度は, 投与後30分までは雄および雌ラットとも同程度であったが, 投与後1および3時間では, 雄ラットでの塩基性代謝物画分の放射能濃度の減少が雌ラットに比べて速やかであり, 雌ラットでの塩基性代謝物画分の濃度が雄ラットの1.5~3倍高くなった。なお, 水溶性代謝物画分の放射能濃度は, 雌雄ラットとも投与後5分で全体の約40%を占めていたが, 経時的に減少する傾向が見られ, 3時間以降では全体の約15%まで減少した。

雄および雌ラットにおける血漿中酸性代謝物(MA1-MA4)濃度の推移を Fig. 4 に示した。

Fig. 3 Plasma levels of acidic, neutral, basic and aqueous fraction after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats ($n=3\sim4$)

Fig. 4 Plasma levels of acidic metabolites after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats ($n=3\sim4$)

雄ラットでは投与後30分以降, MA2および MA4の濃度が投与後3時間まで比較的速やかに上昇し, 酸性代謝物画分中の放射能の大部分は MA2および MA4であった. 一方, MA1および MA3は投与後30分と1時間で僅かに検出されたにすぎなかった. 雌ラットにおける MA2および MA

4の濃度は投与後1時間まで上昇し, 以後減少する推移を示した. また, いずれの時点においても MA2の濃度が最も高く, 次いで MA4であり, MA1と MA3は検出されなかった.

血漿中塩基性代謝物の推移を Fig. 5 に示した. 雄ラットにおいては, クレンチアゼム (未変化

Fig. 5 Plasma levels of basic metabolites after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats ($n=3\sim4$)

Fig. 6 The concentrations of acidic, neutral, basic and aqueous metabolite fraction extracted by acetone from brain after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats.

体)の濃度は投与後30分まではほぼ同じ濃度で推移し、以後比較的速やかに減少し、投与後1時間では検出限界以下となった。また、MB1の濃度は投与後1時間まで上昇したが、その濃度は未変化体の約1/3であり、投与後1時間では未変化体と同様検出限界以下となった。一方、雌ラットにお

いては各時点とも MB1の濃度が未変化体濃度より高く、MB1および未変化体ともその減少は雄ラットに比べて緩やかであった。MB2-MB7は各測定時点とも検出限界以下であった。

3. 脳内代謝物

雄および雌ラットでの脳内放射能のアセトンによる抽出率は約90%であり、ほぼ定量的にアセトンへ抽出された。アセトンにより抽出された代謝物の酸中性、塩基性および水溶性代謝物画分の組成を Fig. 6 に示した。

脳内放射能濃度は、各時点とも雌ラットの方が雄ラットに比べて高く、しかもその差は経時的に大きくなった。脳内放射能の大部分は、雌雄ラットとも塩基性代謝物画分であり、酸中性代謝物画分の割合は極めて少なかった。

雄および雌ラットにおける脳内の塩基性代謝物濃度の推移を Fig. 7 に示した。

雄ラットにおける投与後5分の脳内には未変化体の濃度が最も高く、次いで MB1であった。未変化体は投与後5分から比較的速やかに減少し、1時間では投与後5分の約1/3になった。一方、MB1は投与後1時間まで徐々に上昇し、以後比較的速やかに減少した。

雌ラットにおいては、投与後30分までは未変化体が最も高かったが、投与後1時間以降では M

Fig. 7 The concentration of each basic metabolite extracted by acetone from brain after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats.

Fig. 8 The concentration of acidic, neutral, basic and aqueous fraction extracted by acetone from liver after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats.

B1の濃度が高くなった。未変化体濃度の減少程度は、雄ラットの場合と同様に比較的速やかであったが、MB1濃度は投与後1時間まで徐々に高くなり、その後の減少も比較的緩やかであった。

投与後1時間では、若干量の MB3および MB5、3時間では MB3、MB4および MB5が検出された。

なお、雌雄ラットとも、酸性代謝物は酸中代謝物画分中の放射能濃度が極めて低いことから定量するに至らなかった。

4. 肝臓中代謝物

肝臓のホモジネートからのアセトンへの抽出率は、雄ラットでは投与後5、30分、1、3時間の各時点でそれぞれ55.0%、59.4%、51.7%および50.5%であった。一方、雌ラットではそれぞれ99.8%、81.9%、69.7%および80.3%であり、各時点とも雄ラットの値より高かった。

^{14}C -クレンチアゼムを静脈内投与したときの雌雄ラットにおけるアセトン抽出画分中の肝臓中代謝物画分の組成を Fig. 8 に示した。

アセトン抽出画分の総放射能濃度のピークは、雄ラットにおいては投与後1時間、雌ラットにおいては投与後30分に見られ、その濃度は雌雄ラットともほぼ同じであった。雄ラットでの酸性代謝物画分の濃度は投与後30分以降、雌ラットのそれより3～6倍高かった。しかしながら、酸性代謝物画分の占める割合は、雄ラットでは総放射能濃度の6～8%、雌ラットでは1～2%と少なかった。

Fig. 9 The concentration of each acidic metabolite extracted by acetone from liver after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats.

Fig. 10 The concentration of each basic metabolite extracted by acetone from liver after intravenous administration of ^{14}C -clentiazem at a dose of 3 mg/kg to male and female rats.

た。また、投与後30分以降、中性および水溶性代謝物画分も雄ラットの方が約2倍高かった。肝臓中の主要代謝物画分である塩基性代謝物画分の濃度は、各時点を通じて雌ラットの方が高く、雄ラットの1.3~1.8倍であった。

アセトン抽出画分中の各酸性代謝物の濃度をFig. 9に示した。雄ラットにおいて投与後1時間ではMA3の濃度が最も高く、次いでMA4、MA2およびMA1であり、投与後3時間ではMA4が高く、次いで、MA2、MA3、MA1であった。投与後1時間では、MA1およびMA2は僅かに減少したが、MA3ならびにMA4は増加した。MA3の濃度は投与後1時間まで徐々に上昇

し、以後減少したのに対し、MA4の濃度は投与後3時間まで上昇した。MA1濃度は投与後30分でピークに達した後、比較的緩やかに減少したが、MA4濃度は投与後30分以降、3時間まではほぼ同じ濃度で推移した。一方、雌ラットにおける酸性代謝物の濃度は極めて少なく、投与後30分から1時間でMA1-MA4が僅かに認められたにすぎなかった。投与後1時間でのMA2およびMA4の濃度は高くなったが、投与後3時間になると、両者とも減少した。雌ラットにおける各酸性代謝物の濃度は雄ラットに比較して低かった。

アセトン抽出画分中の各塩基性代謝物の濃度をFig. 10に示した。雄ラットにおいて、MB2、M

B4濃度は MB1と同様、投与後30分でピークに達し、以後減少した。また、MB3, MB5, MB6は投与後1時間でピークに達した後減少した。投与後5分では未変化体の濃度が高く、以後比較的速やかに減少した。最も高濃度であった MB1は、投与後30分でピークに達した後、比較的速やかに減少した。

一方、雌ラットにおける各塩基性代謝物の濃度は、投与後5分において MB1が最も高く、MB4, 未変化体, MB3, MB2, MB5および MB6の濃度は低かった。MB1は投与後30分でピークに達し、以後比較的速やかに減少した。投与後1時間では MB3および MB6の濃度は増加した。投与後3時間になると MB6のみ増加したが、他の塩基性代謝物は減少した。

考 察

^{14}C -クレンチアゼム静脈内投与時の臓器・組織内の放射能濃度は、雄および雌ラットで異なっていた。また、雄ラットの血漿中放射能濃度は、測定した全時点で雌ラットより高く、雄ラットでの最高血漿中濃度が $1.76\mu\text{g eq.}$ クレンチアゼム/ ml (投与後1時間) であるのに対して、雌ラットでは $1.00\mu\text{g eq.}$ クレンチアゼム/ ml (投与後30分) と約1/2であった。臓器・組織内放射能濃度の性差の原因を解明するため、雌雄ラットにおける血漿および脳、肝臓中代謝物濃度およびその推移を検討した。雄および雌ラットにおける血漿中の各代謝物の割合は投与後30分以降、両者で大きく異なっていた。酸性代謝物濃度は雄ラットの方が1.5~3.5倍高く、塩基性代謝物濃度は、投与後初期においては雌雄ラットで同程度であったが、雄ラットにおける塩基性代謝物濃度の減少程度は、雌ラットと比較して著しく、投与後1および3時間では雌ラットの方が高くなった。

一般的に、血漿中で解離型として存在する薬物は細胞膜を通過しにくく、また、細胞内に一旦取り込まれると細胞外に出にくい性質を有する。酸性代謝物はカルボキシル基を持っていることから、 pKa 値は低く約5、未変化体ならびに塩基性代謝物の pKa 値は約7~8と推定される。これらの pKa 値から、生理的な pH 条件 (pH 7~7.4) においては、酸性代謝物は解離型として、

また、塩基性代謝物は非解離型として存在するため、塩基性代謝物の方が細胞膜を通過しやすいと思われる。また、細胞内外の pH 差を考慮し、Henderson-Hasselbalch の式に従って計算すると、酸性代謝物は細胞外に、未変化体および塩基性代謝物は細胞内に多く分布する。これらのことから、血漿中の塩基性代謝物の濃度が、主として臓器・組織内の代謝物濃度に影響すると思われる。本実験において、クレンチアゼムをラットに静脈内投与後の脳内の主要代謝物は塩基性代謝物であり、その濃度は経時的に減少した (Fig. 6)。また、投与後1時間以降の血漿中では、酸性代謝物画分が50%以上に増加していた (Fig. 3)。したがって、クレンチアゼム (未変化体) は静脈内投与後、速やかに組織へ移行し、経時的に組織移行性の低い酸性代謝物へ代謝され、その結果、投与後30分から1時間における血漿中放射能濃度が投与後5分の値よりも高くなったと推測される。

血漿中酸性代謝物の濃度は経時的に増加し、特に雄ラットにおいて著しかった。これは雄ラットの酸化的脱アミノ化活性が雌ラットに比べて高いことを示唆している。ジルチアゼムの酸性代謝物は、肝ミクロゾームのチトクローム P-450による代謝を経て生成すると考えられている³⁾。クレンチアゼムの化学構造は、ジルチアゼムと極めて類似していることから、クレンチアゼムの酸性代謝物も同様の機構により生成すると推察される。クレンチアゼムの酸性代謝物生成量の性差も、肝のチトクローム P-450による酸化的脱アミノ化活性の性差に基づくと思われる。

雄ラットでの血漿中の塩基性代謝物画分中には未変化体が多く、また、MB1の消失は速やかであった。また、脳内の塩基性代謝物画分の未変化体濃度は高く、MB1の濃度は低かった。一方、雌ラットでの血漿中塩基性代謝物画分の未変化体の消失は雄ラットより緩やかであり、MB1濃度は未変化体濃度より高く、さらにその消失は比較的緩やかであった。また、脳内の塩基性代謝物画分中の未変化体の消失は、雄ラットのそれとほぼ類似していたが、MB1濃度は投与後1時間で未変化体濃度を上回り最高濃度となった後、比較的緩やかに消失した。これらの結果は、雌ラットにおけるクレンチアゼムの脱アセチル化に携わるエ

エステラーゼ活性が雄ラットより高いことを示唆している。ジルチアゼムの脱アセチル化活性は、遊離肝細胞あるいは肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験により、雌ラットの方が高いことが報告されており⁴⁾、構造の類似性からクレンチアゼムも同様に、雌ラットにおける脱アセチル化活性は雄ラットより高いと思われる。

脳内には酸性代謝物がほとんど検出されず、クレンチアゼムおよび塩基性代謝物がほとんどであり、脳内の放射能濃度はいずれの時点においても雌ラットの方が高かった。雌ラットの脳内塩基性代謝物画分の組成は、静注後5分では未変化体が大部分を占めたが、1時間以降になると脱アセチル代謝物である MB1 が未変化体よりも多くなり、3時間になるとほとんどが MB1 になった。雄ラットにおける脳内での未変化体濃度の減少速度は雌ラットとほぼ同じであったが、MB1 のそれはほぼ一定で変化しなかった。脳組織内の塩基性代謝物濃度は血漿中濃度よりも高いが、雌雄ラットにおける未変化体と MB1 の脳内組成比の経時的推移は、血漿中のそれらの経時的推移に良く対応しており、この現象は、先に述べた pH 分配理論による塩基性代謝物の臓器・組織分布を強く

支持するものと考えられる。しかし、投与初期(5分)では未変化体の割合は血漿中より脳内の方が高かった。これは未変化体が MB1 よりも脂溶性が高く、脳内へ移行しやすいことによると思われる。また、ジルチアゼムは脳内で脱アセチル化される報告があり⁵⁾、このことから、脳内に取り込まれた未変化体が脱アセチル化されて MB1 になる可能性も考えられる。

アセトンに抽出された肝臓中放射能濃度は、雄および雌ラットで差がなかったが、抽出率はいずれの時点においても雄の方が低く、雄ラット肝臓中の成分とクレンチアゼムおよびその代謝物との親和性が高い可能性が考えられる。また、抽出された各代謝物画分中の塩基性代謝物を定量したところ、エステラーゼ活性が高い雌ラットにおける主要塩基性代謝物は MB1 であり、その濃度は雌ラットの MB1 濃度に比べて著しく高く、約2倍であった。一方、酸性代謝物は塩基性代謝物に比べ低濃度であるが、雄ラットにおける酸性代謝物濃度は雌ラットのそれより高く、肝臓における酸性代謝物への酸化的脱アミノ化代謝の性差を反映しているものと思われる。

文 献

- 1) Inoue, H., Konda, M., Hashiyama, T., Ohtsuka, H., Takahashi, K., Gai no, M., Date, T., Aoe, K., Takeda, M., Murata, S., Narita, H. and Nagao, H.: Synthesis of halogen-substituted 1,5-benzothiazepine derivatives and their vasodilating and hypotensive activities. *J. Med. Chem.*, **34**: 675-687 (1991).
- 2) Nakamura, S., Ohashi, M., Suzuki, T., Sugawara, Y., Usuki, S. and Takaiti, O.: Metabolic fate of the new Ca^{++} -channel blocking agent (+)-(2S, 3S)-3-acetoxy-8-chloro-5-[2-(dimethylamino) ethyl]-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4-(5H)-one maleate. *Arzneim.-Forsch.* *Drug Res.*, **39**: 1100-1108 (1989).
- 3) Nakamura, S., Ito, Y., Fukushima, T., Sugawara, Y. and Ohashi, M.: Metabolism of Diltiazem, III. Oxidative deamination of diltiazem in rat liver microsomes. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**: 612-621 (1990).
- 4) Theno, J.P., Durand, A. and Gillet, G.: Sex differences in the biotransformation of diltiazem: *in vitro* study with rat hepatocytes. IInd international ISSX meeting. ISSX-88 "Xenobiotic metabolism and disposition" in Kobe (1988).
- 5) LeBoeuf, E. and Grech-Belanger, O.: Deacetylation of diltiazem by rat liver. *Drug Metab. Dispos.*, **15**: 122-126 (1987).