塩酸ロプリノンの体内動態 (第1報):
ラットにおける単回静脈内投与時の血中濃度, 分布, 代謝および排泄

金子 和裕・但野 恭一・中島きよ美・佐野 善寿・杠 輝昭
泉二奈緒美*・河合 直士*・長谷川伸一*・重松 昭世*

***Studies on the Metabolic Fate of Loprinone Hydrochloride (1):
Blood Level, Distribution, Metabolism, Excretion after
a Single Intravenous Administration to Rats***

Kazuhiro KANEKO, Kyoichi TADANO, Kiyomi NAKAJIMA
Yoshihisa SANO, Teruaki YUZURIHA, Naomi MOTOJI
Naoshi KAWAI, Shinichi HASEGAWA, Akiyo SHIGEMATSU

Tsukuba Research Laboratories, Eisai, Co., Ltd., Ibaraki;

**Institute of Whole Body Metabolism, Chiba*

Summary

The pharmacokinetics of Loprinone hydrochloride, a new cardiotonic agent, was investigated after a single intravenous administration of ^{14}C -labelled compound to male rats.

1. After a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride to rats, the plasma level of radioactivity rapidly decreased biexponentially, with the corresponding half-lives of 9.7 min and 3.6 hr.

2. Radioactivity was distributed rapidly in all tissues. A high level of radioactivity was observed in the liver and kidney, followed by the duodenum. The tissue levels of radioactivity decreased with half-lives similar to that in blood. Similar distribution profiles were observed with whole body autoradiography, and at 96 hr after dosing, the level of radioactivity in all tissues was very low reaching the detection limit.

3. Loprinone hydrochloride was hardly metabolized. In the urine and feces, the unchanged form was mainly found, however, small amount of metabolites, amine form and enol-O glucuronide of unchanged form, were also detected.

4. Biliary excretion of radioactivity was 46.3% of dose within 24 hr after dosing.

5. Within 24 hr after dosing, the excretion of radioactivity was 43.0 and 47.2% of dose in urine and feces, respectively, and the total excretion of radioactivity was 97.2% of dose within 96 hr.

Key words : ^{14}C -Loprinone hydrochloride, Single intravenous administration, Rats, Imidazo[1, 2-*a*]pyrine derivative, Blood level, Distribution, Metabolism, Excretion, Phosphodiesterase III inhibitor

エーザイ株式会社 筑波研究所 〒300-26 茨城県つくば市東光台 5-1-3

* 株式会社 生体科学研究所 〒270-14 千葉県印旛郡白井町名内 340-2

緒 言

塩酸ロプリノン, 1,2-dihydro-5-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)-6-methyl-2-oxo-3-pyridine-carbonitrile hydrochloride monohydrate はエーザイ株式会社で合成された新規化合物¹⁾であり, ホスホジエステラーゼⅢ阻害を作用メカニズムとする急性心不全治療薬として現在開発中の薬剤である. 本化合物は種々の実験モデル^{2,3)}および臨床試験⁴⁾において心筋収縮力増強作用と血管拡張作用を示した. 今回, 塩酸ロプリノンの体内動態を明らかにするため, ¹⁴C-塩酸ロプリノンを用いてラットにおける単回静脈内投与時の血中濃度, 分布, 代謝, 排泄について検討したので報告する.

実験材料および方法

1. 標識化合物

標識化合物は塩酸ロプリノンのピリジン環3位の炭素を¹⁴Cで標識した¹⁴C-塩酸ロプリノンを用いた. 合成はエーザイ株式会社あるいはAmersham International plc (UK) で1ロットずつ行った. その化学構造と¹⁴C-ラベル位置をFig. 1に示した⁵⁾. 胆汁排泄および肝灌流の実験では前者のロットを用い比放射能は6.0 M Bq/mg (161 μCi/mg) であり, その他の実験では後者のロットを用い比放射能は6.7 MBq/mg (182 μCi/mg) であった. 放射化学的純度はクロロホルム: メタノール (9:1) およびアセトン: 水: 強アンモニア水 (90:10:1) を展開溶媒とした

薄層クロマトグラフィ (TLC plate: Kieselgel 60F₂₅₄, No. 5715, Merck) で2ロットともいずれの場合も98%以上であった.

2. 代謝物標品

代謝物 (アミン体, 5-(2-aminopyridin-5-yl)-1,2-dihydro-6-methyl-2-oxo-3-pyridinecarbonitrile) の標品はエーザイ株式会社で合成した. その構造式をFig. 1に示した. なお, アミン体については別報にて報告する⁶⁾.

3. 被験動物

SD 系雄性ラットを日本エスエルシー(株)より購入して約1週間予備飼育し, 健康状態の良好な動物を7週齢で使用した. 飼育は22±1°C, 湿度60±10%の条件下で行った. 水は新鮮水道水を, 飼料はオリエンタル酵母工業(株)製のMFを自由摂取させた. 投与日は朝から絶食とした.

なお, 全身オートラジオグラフィでは, SD 系雄性ラットを三共ラボサービス(株)より購入し, 6週齢で使用した. 飼料は日本クレア社製のCE-2を自由摂取させ, 摂食下で実験を行った.

実験に供した動物の例数は1群3匹とし, 全身オートラジオグラフィでは1群1匹とした.

4. 投与液の調整と投与

¹⁴C-塩酸ロプリノンを1 mg/ml となるように生理食塩水あるいは5%ブドウ糖注射液に溶解し投与液とした. なお, 全身オートラジオグラフィ

Fig. 1 Chemical structure of ¹⁴C-Loprinone hydrochloride and amine form

*: ¹⁴C labelled position

a): ¹⁴C-Loprinone hydrochloride, b): Amine form

においては非標識体で希釈した。

投与量は1 mg/1 ml/kgとし、投与方法は全身オートラジオグラフィでは尾静脈内投与、その他の実験では大腿静脈内投与とした。

投与放射能は胆汁排泄の実験では6.0 MBq/kg (161 μ Ci/kg)とし、全身オートラジオグラフィでは4.0 MBq/kg (107.0 μ Ci/kg)、血中濃度、分布、代謝(尿、糞および主要組織中存在形態)および排泄の実験では6.7 MBq/kg (182 μ Ci/kg)とした。

5. 血液中放射能濃度の測定

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを静脈内投与した後、所定の時間にエーテルで麻酔し、ヘパリン処理した注射筒で腹部大動脈より採血した。採取した血液は遠心分離(1500 $\times$ g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)し、血漿と血球に分画した。採取した血液、血漿および血球各50 μ lをSoluene-350 (Packard)/2-プロパノール (1:1) 0.75 mlを入れたミニバイアル内で可溶化し、さらに血液と血球は過酸化水素水を加えて脱色後、Instagel (Packard)/0.5 N 塩酸 (9:1) 6 mlを加えて一晩放置後放射能を測定した。

6. 全身オートラジオグラフィ

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを静脈内投与し、投与後5分、1、6および24時間にエーテル麻酔死させ、液体窒素で凍結シマイクローム (Leitz 1400型)を用いて薄切切片 (15 μ m厚)を作製した。切片を真空凍結乾燥後、X線フィルム (Konica SCRE)と密着させ、適正露出後、写真処理を行った。

7. 組織中放射能濃度の測定

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを投与した後、所定の時間にエーテルで麻酔し、腹部大動脈より採血後、放血死させ、大脳、脳下垂体、脊髄、眼球、ハーダー腺、顎下腺、リンパ節(頸部)、気管、甲状腺、胸腺、心臓(左心房、左心室、中隔)、肺、脂肪、脾臓、膵臓、副腎、腎(皮質、

髄質)、筋肉、座骨神経、骨髄、精巣、前立腺、膀胱、動脈(腹部)、静脈(腹部)、皮膚(背部)、肝臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、大腸、血液、血漿、血球を採取した。

採取した組織は約50 mgを精秤し、Soluene-350 1 mlを入れた標準バイアルにとって可溶化後、Instagel/0.5 N 塩酸 (9:1) 15 mlを加え、一晩放置後放射能を測定した。血液、血漿および血球は5.と同様に処理を行い放射能を測定した。

8. 血漿蛋白結合率の測定

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを静脈内投与後5、15、30分、1時間に血漿を採取し、その1 mlをセントリフリー (Amicon) に入れ2000 g $\times$ 5 minの遠心分離に付し、血漿蛋白結合画分と非結合画分(濾液)に分画した。血漿(総放射能濃度)および濾液各50 μ lの放射能濃度を測定し下記の式を用いて血漿蛋白結合率(%)を算出した。

血漿蛋白結合率(%)

$$= [1 - (F \times (1 + BG/100)/P)] \times 100$$

F: セントリフリー濾液中放射能濃度 (dpm/ml)

P: 血漿中放射能濃度 (dpm/ml)

BG: 物理的吸着率 (%)

なお、BG(%)については血漿の代わりに生理食塩水を用いて空試験を行い、10、100および1000 ng/mlにおけるセントリフリーに対する物理的吸着率(%)を算出した。

同様に、 ^{14}C -塩酸ロプリノンをラットの血漿1 mlに100および1000 ng/mlの濃度となるように添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした後、*in vitro*における血漿蛋白結合率を算出した。

9. 尿および糞中排泄率の測定

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを静脈内投与した後、ガラス製代謝ケージ(メタボリカ、杉山元医理器)に収容し、24時間ごとに尿および糞を分別採取した。

投与後24時間までの尿については、まず原尿をメスシリンダーに移して容量を測定後、その

50 μ l をとり ACS-II (Amersham) 6 ml を加えて放射能を測定した。次いで、代謝ケージの洗浄液に水を加えて40 ml にメスアップし、同様に50 μ l の放射能を測定した。この洗浄液の放射能量は尿中排泄量に加えた。また、投与後2日目以降の尿は初めから原尿と洗浄液を合わせて40 ml にメスアップし、その100 μ l の放射能を測定した。

糞は水を加えて40 ml とし、ヒスコトロン（日音医理器械）でホモジナイズした。その約100 mg を精秤し、Soluen-350 1 ml に溶解後、Instagel/0.5 N 塩酸（9：1）15 ml を加え、放射能を測定した。

これらの測定値と投与放射能の比から尿中および糞中排泄率を求めた。

10. 胆汁排泄に関する検討

胆管カニュレーションを施したラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを静脈内投与し、投与後24時間までに排泄された胆汁を経時的に採取した。ラットはボールマンケージに収め、投与後24時間までに排泄された胆汁を経時的に採取し、その20 μ l を Soluen-350 0.5 ml を入れたミニバイアル内で可溶性後、Instagel/0.5 N 塩酸（9：1）6 ml を加え、放射能を測定した。

一方、この時に得られた投与後6時間までの胆汁を別の胆管カニュレーションを施したラットに経口投与し、同様の方法で胆汁を経時的に採取し腸肝循環について検討した。

11. 代謝物の分析

1) 肝灌流での代謝物の検討

中瀬らの肝灌流実験法に基づき⁷⁾、ラットの肝臓を摘出し、肝灌流実験を行った。300 ml の灌流液（Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液，pH 7.4，流速30 ml/min）中に、 ^{14}C -塩酸ロプリノン0.86 mg（5.14 MBq）を10分間かけて持続注入した。3時間還流させ、灌流液、胆汁および肝臓中の放射能を測定した。放射能の存在形態の検討は、胆汁の場合は直接、灌流液の場合は酢酸エチ

ルで抽出した画分を各々 TLC に付した。肝臓の場合はヒスコトロンでホモジナイズし、酢酸エチルおよびメタノールで抽出した画分を TLC に付し、定量を行った。

胆汁中代謝物については分取用 TLC で精製し、0.2 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）中で β -グルクロニダーゼ（Type H-1, Sigma）と37°Cで一晩反応させた。次いで酢酸エチルで抽出し、TLC にて分析を行った。

TLC 条件：TLC Plate：Kieselgel 60F₂₅₄ 0.25 mm 厚（No. 5715, Merck）

展開溶媒：クロロホルム：メタノール（4：1）

2) 尿、糞および組織中放射能の存在形態

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを静脈内投与し、投与後5，15，30分，1および2時間に血漿、肝臓、腎臓、心臓を採取し分析試料とした。また尿、糞については投与後48時間までに排泄された尿および糞を用いた。

血漿および糞ホモジネートについては各1 ml を試験管にとり、メタノール10 ml で2回抽出した。肝臓、腎臓および心臓については、約1 g にメタノール9 ml を加えてヒスコトロンでホモジナイズし、振盪抽出後、再度メタノール10 ml で1回抽出した。それぞれの抽出液は溶媒を留去後、少量の抽出溶媒に再溶解して下記の条件の TLC に付した。なお、尿は抽出せずに直接 TLC に付した。TLC の標品としてはアミン体および1)で単離したグルクロン酸抱合体を用いた。

TLC 条件：TLC Plate：Kieselgel 60F₂₅₄ 0.25 mm 厚（No. 5715, Merck）

展開溶媒：アセトン：水：強アンモニア水（90：10：1）

展開した TLC plate は暗室にてフィルム（X線フィルム，Konica あるいは Ultrofilm，LKB）に密着させて2～4週間露出後、現像（Acedol，Konica），定着（Acefix，Konica）を行った。フィルム上のスポットと TLC plate の位置を対比させ、TLC plate から各標品に相当する画分をバイアルに描きとり、ACS-II（Amersham）15 ml

を加えて放射能を測定した。

12. 放射能の測定

試料中の放射能の測定は、液体シンチレーションカウンターを用いて行った。計数効率外部標準線源法により自動補正した。胆汁排泄の実験では Aloka LSC-903型を用いて計測時間1分で、その他の実験では Aloka LSC-3500型を用いて、計測時間2分で測定した。

なお、放射能の検出限界をバックグラウンドの平均値+3S.D. (30 dpm) と定め、計数値が30 dpm 未満の場合は検出限界以下として処理した。

13. 薬物速度論的解析

薬物動態学的パラメータは2コンパートメントモデルにあてはめて、非線形最小二乗法プログラム, MULTI を用いて算出した。また、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は最終実測値までを用いて台形公式により求めた。

14. データの表示および処理

3例のうち1例が検出限界以下の場合、その1例を0として平均、標準誤差を求め、3例のうち2例が検出限界以下の場合には平均および標準誤差をN. D. として表現した。

また、実験を行わなかった項目についてはN. T. として表現した。

結 果

1. 血液中放射能濃度

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与 (1 mg/kg) したときの血液中放射能濃度推移を Fig. 2 に示した。

血球中は投与後5分で398.4 ng eq./ml であり血漿中 (1841.4 ng eq./ml) の21.6%であることから、血球への移行性は低いと考えられた。また血球からの消失は速やかであり、投与後2時間で検出限界以下にまで減少した。

血液中放射能の大半が存在している血漿中放射能濃度は2相性を示して消失し、投与後24時間

Fig. 2 Blood, plasma and erythrocyte levels of radioactivity after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats. Each point represents the mean $\pm$ S. E. M. of three animals.

● : Blood, ○ : Plasma, ▲ : Erythrocyte

で検出限界付近まで減少した。生物学的消失半減期は $t_{1/2\lambda_1}$ が9.7分, $t_{1/2}$ が3.6時間であり、投与後24時間までの AUC は731 ng eq.·hr/ml であった。

2. 全身オートラジオグラフィ

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与 (1 mg/kg) した時の投与後5分, 1, 6, 24時間の全身オートラジオグラムを Fig. 3 に示した。

放射能は、投与後5分で既に腎臓の皮質部、肝臓および小腸内容物 (特に十二指腸付近) で高く、次いで肺、心臓、筋肉、脾臓、膵臓、脳下垂体でやや認められた。また、口腔内粘膜、皮膚 (主に毛根部) および皮下筋層に若干存在していたが、小腸を除く消化管には存在していなかった。精巣、脳脊髄等への分布は痕跡程度であった。

投与後1時間では小腸内容物で著しく高く、盲腸内容物に高く認められた。大腸内容物にも若干認められた。腎臓、肝臓の放射能濃度は投与後

Fig. 3 Whole-body autoradiograms after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats
 a): 5 min, b): 1 hr, c): 6 hr, d): 24 hr

5分に比べ低下していた。また、口腔内粘膜および皮膚(主に毛根部)にも認められた。上記以外の組織ではほとんど認められなかった。

投与後6時間まで盲腸および大腸内容物に高く存在しており、小腸内容物および口腔内粘膜にも認められた。これら以外の組織においては痕跡程度であった。

投与後24時間では大腸内容物および盲腸内容物に認めるだけであった。

3. 組織中放射能濃度

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与(1 mg/kg)した時の投与後5, 15分, 1, 2, 6, 24, 96時間の組織中放射能濃度をTable 1に示した。

放射能の組織への移行は速やかであり、回腸、盲腸、腎髄質、副腎、精巣を除くすべての組織で最初の観察時点である投与後5分に最も高い放射能濃度を示した。

投与後5分で血漿中濃度は1841.6 ng eq./mlであった。この時点では腎皮質(12902.6 ng eq./g)が最も高く、次いで十二指腸(4396.2 ng eq./g)、肝臓(4000.2 ng eq./g)、腎髄質(2142.9 ng eq./g)が血漿中濃度よりも高かった。心臓では心房、心室、中隔がそれぞれ928.6 ng eq./g, 693.1 ng eq./g, 578.1 ng eq./g、血管では動脈が1344.7 ng eq./g、静脈が574.8 ng eq./gであり、本化合物の奏効器官である心臓および血管においては血漿中濃度の73.0~31.2%の値を示した。この時点が最も高いことから、奏効器官への移行は速やかであった。

投与後15分で血漿は948.6 ng eq./mlと投与後5分値の約1/2となった。多くの組織でも投与後5分値の約1/2となり、血漿と同様の推移を示した。腎髄質(36813.7 ng eq./g)、膀胱(2367.5 ng eq./g)、前立腺(1788.6 ng eq./g)、副腎(744.4 ng eq./g)および精巣(145.2 ng eq./g)はこの時点で最も高かった。心臓および血管は他の組織と同様に投与後5分値の1/2以下となった。

投与後1時間では血漿中濃度は37.9 ng eq./mlと著しく減少した。多くの組織は投与後5分値の1/10以下となった。

投与後2時間では血漿中濃度は4.9 ng eq./mlとなった。多くの組織の放射能濃度も検出限界付近まで減少したが、回腸(1385.7 ng eq./g)はこの時点で最も高かった。

投与後6時間では血漿中濃度は1.9 ng eq./mlと検出限界付近まで減少した。また、大半の組織は検出限界以下に減少していたが、盲腸はこの時点で最も高かった。また、大腸でも再び高くなった。

投与後24時間および96時間ではほとんどの組織の放射能濃度は検出限界以下にまで減少した。

4. 血漿蛋白結合率

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与(1 mg/kg)した時の血漿中放射能の蛋白結合率をTable 2に示した。

投与後5, 15, 30分、および1時間における血漿中放射能の蛋白結合率は各々70.0, 72.6, 75.6および70.9%であり、経時的な変化は認められなかった。

ラットの血漿に ^{14}C -塩酸ロプリノンを100 ng/mlおよび1000 ng/mlの濃度になるように添加した時の*in vitro*における血漿蛋白結合率をTable 3に示した。 ^{14}C -塩酸ロプリノンの添加濃度が100 ng/mlでは82.4%, 1000 ng/mlでは82.8%であり、添加濃度の違いによる血漿蛋白結合率の変動は認められなかった。また、*in vivo*の結果とも大きく変わらなかった。

5. 尿、糞および胆汁中放射能排泄率

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与(1 mg/kg)した時の尿、糞中への放射能の排泄をFig. 4に示した。尿中には投与後24, 96時間までにそれぞれ投与量の43.0, 45.0%が排泄された。糞中には投与後24, 96時間までにそれぞれ投与量の47.2, 52.2%が排泄された。投与後96時間までの尿、糞中総排泄率は97.2%であった。

Table 1 Tissue concentration of radioactivity after a single intravenous administration of ^{14}C -Lopinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats

Tissue	Concentration (ng eq./ml or g)					
	5 min	15 min	1 hr	2 hr	6 hr	24 hr
Brain	51.3 $\pm$ 3.7	23.4 $\pm$ 2.6	1.6 $\pm$ 0.8	N.D.	N.D.	N.D.
Pituitary	364.3 $\pm$ 25.7	141.6 $\pm$ 20.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Spinal cord	44.0 $\pm$ 2.3	23.8 $\pm$ 7.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eyeball	169.2 $\pm$ 21.2	108.1 $\pm$ 10.6	14.1 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 1.3	0.7 $\pm$ 0.4	N.D.
Harderian gland	431.7 $\pm$ 31.8	308.1 $\pm$ 62.3	10.3 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 1.0	N.D.	N.D.
Submaxillary gland	681.8 $\pm$ 51.6	342.3 $\pm$ 16.7	22.4 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.5	N.D.	N.D.
Lymph node	665.6 $\pm$ 19.1	264.5 $\pm$ 17.5	17.2 $\pm$ 2.9	5.3 $\pm$ 2.9	N.D.	N.D.
Trachea	781.7 $\pm$ 75.0	417.3 $\pm$ 80.7	18.4 $\pm$ 1.2	2.9 $\pm$ 1.5	N.D.	N.D.
Thyroid	581.5 $\pm$ 93.1	200.3 $\pm$ 31.5	13.3 $\pm$ 2.1	N.D.	N.D.	N.D.
Thymus	551.0 $\pm$ 20.4	251.1 $\pm$ 11.4	9.4 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.3	N.D.	N.D.
Heart						
atrium	928.6 $\pm$ 84.8	491.4 $\pm$ 90.1	19.9 $\pm$ 2.5	N.D.	N.D.	N.D.
ventricle	693.1 $\pm$ 33.0	319.2 $\pm$ 31.0	15.2 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.4	N.D.	N.D.
septum	578.1 $\pm$ 23.6	296.8 $\pm$ 29.5	16.1 $\pm$ 2.2	N.D.	N.D.	N.D.
Lung	998.0 $\pm$ 58.4	496.2 $\pm$ 23.6	27.8 $\pm$ 1.5	4.9 $\pm$ 1.2	N.D.	N.D.
Adipose tissue	126.1 $\pm$ 20.6	46.0 $\pm$ 6.0	3.4 $\pm$ 1.8	N.D.	N.D.	N.D.
Spleen	839.3 $\pm$ 61.8	371.4 $\pm$ 16.7	16.6 $\pm$ 1.8	2.3 $\pm$ 0.3	N.D.	N.D.
Pancreas	1232.3 $\pm$ 169.6	572.4 $\pm$ 40.8	22.7 $\pm$ 2.1	2.5 $\pm$ 0.2	N.D.	N.D.
Adrenal	661.0 $\pm$ 69.3	744.4 $\pm$ 350.5	14.7 $\pm$ 1.5	1.7 $\pm$ 0.9	N.D.	N.D.
Kidney						
cortex	12902.6 $\pm$ 1651.0	18291.7 $\pm$ 586.5	339.3 $\pm$ 43.8	36.1 $\pm$ 2.2	17.8 $\pm$ 1.6	5.2 $\pm$ 0.3
medulla	2142.9 $\pm$ 267.6	36813.7 $\pm$ 4005.0	1093.3 $\pm$ 159.0	109.8 $\pm$ 50.3	27.9 $\pm$ 2.7	N.D.
Skeletal muscle	512.2 $\pm$ 38.6	327.1 $\pm$ 64.7	12.1 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.1	N.D.	N.D.
Sciatic nerve	131.4 $\pm$ 13.0	128.7 $\pm$ 33.1	24.3 $\pm$ 6.3	13.7 $\pm$ 2.3	3.5 $\pm$ 1.8	N.D.
Bone marrow	700.5 $\pm$ 64.2	314.1 $\pm$ 49.6	18.2 $\pm$ 0.7	N.D.	N.D.	N.D.
Testis	135.0 $\pm$ 8.1	145.2 $\pm$ 19.5	63.4 $\pm$ 8.1	18.2 $\pm$ 1.6	N.D.	N.D.
Prostate	378.0 $\pm$ 20.0	1788.6 $\pm$ 1705.9	323.2 $\pm$ 281.0	11.1 $\pm$ 3.2	6.7 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.6
Urinary bladder	628.5 $\pm$ 29.6	2367.5 $\pm$ 1477.9	857.6 $\pm$ 251.3	11.4 $\pm$ 3.9	7.2 $\pm$ 1.4	N.D.
Aorta	1344.7 $\pm$ 71.4	529.4 $\pm$ 75.0	61.1 $\pm$ 3.3	10.7 $\pm$ 2.2	6.1 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 2.7
Vein	574.8 $\pm$ 61.0	324.6 $\pm$ 95.1	27.9 $\pm$ 15.9	3.8 $\pm$ 2.0	N.D.	N.D.
Skin	901.3 $\pm$ 101.1	580.2 $\pm$ 59.8	66.1 $\pm$ 24.8	11.1 $\pm$ 2.5	14.5 $\pm$ 10.4	3.4 $\pm$ 1.7
Liver	4000.2 $\pm$ 140.9	2463.5 $\pm$ 316.8	117.9 $\pm$ 11.3	18.3 $\pm$ 1.3	12.1 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.8
Stomach	754.5 $\pm$ 40.6	393.1 $\pm$ 44.8	26.2 $\pm$ 3.1	23.4 $\pm$ 5.5	N.D.	N.D.
Duodenum	4396.2 $\pm$ 399.0	2289.4 $\pm$ 295.8	119.4 $\pm$ 22.2	35.3 $\pm$ 8.5	10.1 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 0.7
Jejunum	1804.7 $\pm$ 328.7	600.9 $\pm$ 99.6	146.9 $\pm$ 56.8	75.9 $\pm$ 31.7	10.2 $\pm$ 4.3	N.D.
Ileum	651.2 $\pm$ 10.5	366.7 $\pm$ 68.4	1031.6 $\pm$ 263.3	1385.7 $\pm$ 311.3	39.1 $\pm$ 6.2	15.5 $\pm$ 1.2
Caecum	488.6 $\pm$ 53.1	253.8 $\pm$ 36.4	193.8 $\pm$ 96.4	155.4 $\pm$ 43.5	798.4 $\pm$ 145.0	70.4 $\pm$ 15.9
Colon	981.4 $\pm$ 106.2	517.8 $\pm$ 147.2	76.6 $\pm$ 10.1	124.4 $\pm$ 15.9	771.7 $\pm$ 323.9	19.1 $\pm$ 7.8
Blood	1200.3 $\pm$ 3.8	614.0 $\pm$ 83.1	24.2 $\pm$ 1.9	3.4 $\pm$ 0.2	N.D.	N.D.
Plasma	1841.6 $\pm$ 41.6	948.6 $\pm$ 145.0	37.9 $\pm$ 3.7	4.9 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.1	N.D.
Erythrocyte	398.4 $\pm$ 40.5	143.9 $\pm$ 15.1	7.2 $\pm$ 0.3	N.D.	N.D.	N.D.

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

N.D. : Not detected.

Table 2 Plasma protein binding after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats

Time after dosing	Plasma protein binding (%)
5 min	70.0 ± 0.6
15 min	72.6 ± 1.3
30 min	75.6 ± 0.1
1 hr	70.9 ± 1.2

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

N.D. : Not detected.

Table 3 Binding of ^{14}C -Loprinone hydrochloride to rat plasma protein

Loprinone hydrochloride conc. (ng/ml)	Plasma protein binding (%)
100	82.4 ± 0.8
1000	82.8 ± 0.5

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

Fig. 4 Cumulative excretion of radioactivity in urine and feces after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats

Each point represents the mean $\pm$ S. E. M. of three animals.

● : Urine, ○ : Feces, ▲ : Total

Fig. 5 Cumulative excretion of radioactivity in bile after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to bile duct cannulated rats

Each point represents the mean $\pm$ S. E. M. of three animals.

胆管カニューレを施したラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与 (1 mg/kg) した時の放射能の胆汁中への排泄を **Fig. 5** に示した。胆汁中には投与後3時間までに投与放射能量の43.4%が、投与後24時間までには46.2%が排泄された。投与後24時間までに排泄された放射能の93.9%が投与後3時間までに胆汁中へ排泄されたことから、塩酸ロプリノンの胆汁への移行は速やかであると推察された。一方、投与後6時間までに排泄された胆汁をプールして胆管カニューレを施した別のラットに経口投与し、腸管からの再吸収率について検討した結果、投与後24時間までに投与量の8.2%が胆汁中へ排泄された。したがって本化合物は胆汁を介し一部が腸肝循環することが示唆され、その割合は胆汁を経口投与した時の胆汁排泄率より約18%と算出された。

6. 代謝物の分析

1) 肝灌流実験

3時間還流後の灌流液、胆汁および肝臓中に投与放射能量の各々63.6, 22.0, 14.4%の放射能が分布していた。各放射能の存在形態を検討した結果、灌流液中はすべて未変化体であり、代謝物は

認められなかった。また肝臓中放射能は96%以上が未変化体であった。一方、胆汁中放射能のTLC-ラジオクロマトグラムを **Fig. 6** に示した。胆汁中では放射能の45%は代謝物であった。この代謝物を分取用TLCで精製後、 β -グルクロニダーゼで処理し、TLC分画に付したところ、すべてが加水分解され、アグリコンは未変化体と一致した。このことから、胆汁中代謝物はイヌで構造決定された塩酸ロプリノンのエノール型O-グルクロン酸抱合体⁶⁾(以下グルクロン酸抱合体とする)と同一の化合物であると推察された。

2) 尿、糞および胆汁中代謝物

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与 (1 mg/kg) した時の投与後24時間までの尿および糞中放射能のTLC-オートラジオグラムを **Fig. 7** に、投与後48時間までの代謝物の存在比率についてTLCで検討した結果を **Table 4** に示した。投与後24時間および投与後48時間までの糞中の存在形態は未変化体がそれぞれ93.6, 94.4%, アミン体がそれぞれ0.8%および0.0%であった。また、尿中の存在形態は未変化体がそれぞれ94.4, 100.0%, アミン体が0.5, 0.0%, グルクロン酸抱合体が3.6, 0.0%であった。

Fig. 6 Thin-layer chromatogram of radioactivity in bile collected during 3 hr after injection of ^{14}C -Loprinone hydrochloride to perfused rat liver

Fig. 7 TLC-autoradiograms of radioactivity in 24 hr pooled urine and feces after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats
a): Urine, b): Feces

Table 4 Composition of Loprinone hydrochloride and its metabolites in urine and feces after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats

24 hr after dosing	Urine	Feces
Amine form	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.1
Unchanged form	94.4 ± 0.0	93.6 ± 0.3
Glucuronide	3.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Origin	0.5 ± 0.1	2.3 ± 0.2
Others	1.0 ± 0.0	3.3 ± 0.2
48 hr after dosing	Urine	Feces
Amine form	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Unchanged form	100.0 ± 0.0	94.4 ± 3.0
Glucuronide	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Origin	0.0 ± 0.0	2.2 ± 1.1
Others	0.0 ± 0.0	3.4 ± 1.9

% of radioactivity in sample.

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

N.D. : Not detected.

Origin : Polar metabolites.

Others : Unidentified metabolites.

投与後6時間までの胆汁中放射能の存在形態は未変化体が69.9%，グルクロン酸抱合体が28.3%であった。

3) 組織中代謝物

投与後5, 15, 30分, 1, 2時間での組織における代謝物の存在比率についてTLCで検討した結果をTable 5に示した。投与後5分の存在形態は各組織とも未変化体が主であった(肝臓96.4%, 腎臓94.5%, 心臓96.4%)。このほかにアミン体が0.3~0.6%, グルクロン酸抱合体が0.3~2.2%認められた。投与後15, 30分および1時間と経時的に未変化体の存在比率は減少していたが, 投与後2時間でも未変化体が主であり肝臓で77.0%, 腎臓で82.9%を占めていた。

血漿においては未変化体の存在比率が投与後5分において95.6%, 投与後1時間においても90.4%であった。

4) 代謝経路

1)~3)の結果より塩酸ロプリノンは代謝を受けにくく, 大部分が未変化体のまま排泄されることより, ハードタイプの化合物であると考えられた。

塩酸ロプリノンの代謝はグルクロン酸抱合およびイミダゾール環の酸化とそれに続く加水分解によるアミン体の生成が主代謝経路と考えられ, その推定代謝経路をFig. 8に示した。

Table 5 Composition of Loprinone hydrochloride and its metabolites in plasma, heart, liver and kidney after a single intravenous administration of ^{14}C -Loprinone hydrochloride (1 mg/kg) to rats

5 min after dosing	Plasma	Heart	Liver	Kidney
Amine form	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Unchanged form	95.6 ± 0.3	96.4 ± 0.3	96.4 ± 0.2	94.5 ± 0.1
Glucuronide	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.0	2.2 ± 0.1
Origin	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Others	2.7 ± 0.2	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1
15 min after dosing	Plasma	Heart	Liver	Kidney
Amine form	0.7 ± 0.0	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Unchanged form	93.2 ± 0.2	95.3 ± 0.3	95.5 ± 0.2	93.7 ± 0.4
Glucuronide	2.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.6 ± 0.0	3.4 ± 0.2
Origin	0.5 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0
Others	2.9 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.7 ± 0.2	1.7 ± 0.1
30 min after dosing	Plasma	Heart	Liver	Kidney
Amine form	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Unchanged form	90.9 ± 0.4	92.0 ± 0.1	93.0 ± 0.4	90.8 ± 0.6
Glucuronide	4.1 ± 0.1	3.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1	5.4 ± 0.4
Origin	0.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.1
Others	3.3 ± 0.4	4.1 ± 0.2	5.0 ± 0.5	2.3 ± 0.2
1 hr after dosing	Plasma	Heart	Liver	Kidney
Amine form	1.5 ± 1.5	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.8	1.4 ± 0.1
Unchanged form	90.4 ± 1.7	86.6 ± 2.5	90.2 ± 0.2	85.7 ± 1.1
Glucuronide	6.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.5	5.7 ± 0.5
Origin	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.1
Others	1.6 ± 1.5	13.4 ± 2.5	7.7 ± 0.1	5.6 ± 0.8
2 hr after dosing	Plasma	Heart	Liver	Kidney
Amine form	N.T.	N.T.	9.9 ± 9.9	0.0 ± 0.0
Unchanged form	N.T.	N.T.	77.0 ± 10.9	82.9 ± 0.1
Glucuronide	N.T.	N.T.	0.0 ± 0.0	10.7 ± 0.6
Origin	N.T.	N.T.	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Others	N.T.	N.T.	13.1 ± 1.7	6.4 ± 0.6

% of radioactivity in sample.

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

N.T. : Not tested.

Origin : Polar metabolites.

Others : Unidentified metabolites.

考 察

ラットに ^{14}C -塩酸ロプリノンを単回静脈内投与 (1 mg/kg) した時の血漿中放射能濃度推移は2相性を示した。投与後24時間で検出限界以下に

なることより、消失は速やかであった。

投与後5分の血球中放射能濃度は血漿中放射能濃度の21.6%であり、放射能の血球移行性は低かった。また、投与後2時間で検出限界以下になることより、本化合物の血球からの消失は速や

Fig. 8 Metabolic pathway of Loprinone hydrochloride

かであり、血球中での残留は認められなかった。

血漿中放射能に対する未変化体の占める割合は投与後5分で95.6%，投与後1時間で90.4%と経時的な変化は少なく、血漿中放射能のほとんどを未変化体が占めると考えられた。

分布の結果から本化合物は速やかに分布することが示された。その中でも排泄経路にあたる肝臓および腎臓での放射能濃度は投与後5分で既に高く、投与後2時間で急激に低下していたことにより、体外への排泄は速やかであると考えられた。

投与後24時間でほとんどの組織における放射能の濃度は検出限界付近まで低下しており、投与後96時間においては肝臓、腎皮質および盲腸にわずかな放射能が認められるにすぎないことから、組織からの放射能の消失は速やかであり、本化合物の残留性は極めて少ないと考えられた。これらのことは全身オートラジオグラフィの結果からも支持された。

奏効器官である心臓および血管における放射能濃度は血漿中放射能濃度の推移と同様に速やかに低下し、投与後24時間には検出限界付近まで低

下した。

投与後5分から1時間までの放射能の血漿蛋白結合率は、70.0～75.6%であり、経時的な変化は認められなかった。また、ラットの血漿に ^{14}C -塩酸ロプリノンを添加して未変化体の血漿蛋白結合率を測定したところ、濃度にかかわらず約80%であり、*in vivo*での血漿中放射能の蛋白結合率と大きな差は認められなかった。このことは血漿中放射能の主存在形態が未変化体であることから支持された。

投与後5分での組織中主存在形態は未変化体であり、すべての組織で未変化体の存在比率は90%以上であった。アミン体およびグルクロン酸抱合体はわずかに認められるにすぎなかった。

糞中にはグルクロン酸抱合体が認められないことから、本化合物は肝臓においてグルクロン酸抱合体を受けても腸管内で加水分解されると考えられた。

投与後24時間までに尿中に43.0%，糞中に47.2%，計90.2%の投与放射能が排泄され、この時点までの尿・糞中放射能の90%以上は未変化体であった。したがって、投与量の8割以上が

未変化体のまま排泄されると考えられ、本化合物は大部分が代謝を受けることなく速やかに排泄されると推察された。

投与後96時間までに尿中に45.0%、糞中に52.2%、計97.2%が排泄されることより放射能の残留性はほとんどないと考えられた。このことは組織分布および全身オートラジオグラフィの結果からも支持された。

データは示していないが、カニューレを施したラットにおいて腸肝循環の検討を行ったところ、約18%と算出された。また、経時採血による血中放射能濃度推移を検討したところ、投与後6時間付近で血中濃度の上昇が認められた。これらのことより腸肝循環の血中濃度推移に対する影響が大きいことが示された。

要 約

^{14}C -塩酸ロプリノンをラットに単回静脈内投与した際の血中濃度、分布、代謝および排泄について以下の結果を得た。

1) 全血、血漿および血球中放射能濃度は2相性を示し、投与後24時間で検出限界以下まで減少した。血球への移行性は約21.6%程度と低かった。また、血漿の消失半減期は λ_1 相が9.7分、 λ_2 相が3.6時間であり、投与後24時間までのAUCは731 ng eq.·hr/mlであった。

2) *In vivo*における血漿蛋白結合率は70.0~75.6%であり経時的な変動は少なかった。また*in vitro*においては濃度にかかわらず約70%程度であり、*in vivo* とほぼ同じ数値になった。

3) 組織への移行は速やかであり、投与後5分の値がほとんどの組織で最も高い濃度となった。標的組織である心臓、動脈および静脈を含めて組織からの消失は速やかであり、残留性はほとんど認められなかった。また、肝臓および腎臓は投与初期から高い放射能濃度を示しており、本化合物の排泄が速やかに始まっていることが明らかとなった。

4) 本化合物の代謝物としてはイミダゾピリジン環が開裂したアミン体と未変化体のO-エノ

ール型がグルクロン酸抱合された抱合体の2種が認められた。しかし、主要組織における主存在形態は未変化体であり、代謝を受けにくい化合物であることが示された。また、尿、糞中の主存在形態も未変化体であり、排泄された総放射能の90%以上は未変化体であった。

5) 胆汁、尿および糞中への放射能の排泄率は、投与後24時間までに投与放射能のそれぞれ46.3、43.0および47.2%であり排泄は速やかであった。また、投与後96時間までに97.2%が体外へ排泄されたことより本化合物の残留性がほとんどないことが示された。

文 献

- 1) Yamanaka, M., Miyake, K., Suda, S., Ohhara, H. and Ogawa, T.: Imidazo [1,2-*a*] pyridines. I. Synthesis and Inotropic Activity of New 5-Imidazo [1,2-*a*] pyridinyl-2 (1*H*)-pyridinone Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**: 1556-1567 (1991).
- 2) Ogawa, T., Ohhara, H., Tsunoda, H., Kuroki, J. and Shoji, T.: Cardiovascular Effects of the New Cardiotonic Agent 1, 2-Dihydro-6-methyl-2-oxo-5-(imidazo [1,2-*a*] pyridin-6-yl)-3-pyridine Carbonitrile Hydrochloride Monohydrate. 1st Communication: Studies on isolated guinea pig cardiac muscles. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **39**: 33-37 (1989).
- 3) Ohhara, H., Ogawa, T., Takeda, M., Katoh, H., Daiku, Y. and Igarashi, T.: Cardiovascular Effects of the New Cardiotonic Agent 1, 2-Dihydro-6-methyl-2-oxo-5-(imidazo [1, 2-*a*] pyridin-6-yl)-3-pyridine Carbonitrile Hydrochloride Monohydrate. 2nd Communication: Studies in Dogs. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **39**: 38-45 (1989).
- 4) 木全心一, 広沢弘七郎, 笠貫 宏, 高野照夫, 芹沢剛, 篠山重威, 久萬田俊明, 堀 正二, 平盛勝彦: 急性心不全に対するE-1020注射剤の臨床評価。臨床と研究, **69**: 2260-2274 (1992)
- 5) Yamanaka, Y., Suda, S. and Tadano, K.: Synthesis of the cardiotonic agent ^{14}C -loprinone. *J. Labelled Compounds & Radiopharm.*, **31**(2): 125-129 (1992).
- 6) 金子和裕, 但野恭一, 中島きよ美, 杠 輝昭, 泉二奈緒美, 河合直土, 長谷川伸一, 重松昭世: 塩酸ロプリノンの体内動態 (第3報) イヌにおける単回静脈内投与時の血中濃度、分布、代謝および排泄。薬物動態 (submitted)
- 7) 中瀬雄三, 萩原文二: 臓器機能の生理学 (分離臓器を用いて) 1) 臓器灌流報—肝灌流を中心に。代謝, **20**: 90-100 (1983).