新規抗血小板薬 Ethyl 2-[4,5-bis(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]
pyrrol-1-ylacetate (KBT-3022) のマウスにおける
連続投与時の吸収, 分布, 排泄および薬物代謝酵素系への影響

中田雄一郎・藤川 真章・栗田 則男・畔取 政行*

荒川 勝雅*・市毛 一美**・堀 勝行**

***Absorption, Distribution, Excretion and Effects on Drug Metabolizing
Enzyme Activities of a New Antiplatelet Drug,
Ethyl 2-[4,5-bis(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]pyrrol-1-ylacetate
(KBT-3022), after Multiple Oral Administration in Mice***

Yuichiro NAKADA, Masaaki FUJIKAWA, Norio AWATA, Masayuki KURATORI*

Katsumasa ARAKAWA*, Kazumi ICHIGE**, Katsuyuki HORI**

Pharmaceuticals Research Center, Kanebo, Ltd., Osaka;

**Research Laboratories, Torii & Co., Ltd., Chiba;*

***Tokai Research Laboratories, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Ibaraki*

Summary

Absorption, distribution, excretion, enzyme induction and effect to platelet were investigated in male mice after oral administration of an antiplatelet drug, KBT-3022.

1. Radioactivity levels in the plasma 24 hr after daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 reached a steady state by the 4th dosing. The radioactivity levels after the 21st dosing showed a broad peak with about half of the $C_{\max}$ after single dosing but had a similar $\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$.

2. Radioactivity levels in tissues 24 hr after daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 increased with the number of doses and reached a steady state by the 21st dosing except the spleen. The radioactivity levels in the lung, heart and testis after the 21st dosing were 5-6 times higher than those after single dosing, but those in the other tissues were lower than 4 times. Elimination of radioactivity from tissues after the 21st dosing was slower than that after single dosing. At 72 hr after the 21st dosing, the radioactivity level in the aorta was 50% of the maximum and those in the skin, testis, lung, fat and spleen were 24-35% of the maximum. High level of radioactivity was noted in the deferent duct as revealed by whole body autoradiography.

3. No marked difference was observed in plasma concentration of 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ and serum concentration of TXB_2 between the single and repeated dosing groups, although the accumulation of radioactivity was noted in the aorta after

鐘紡株式会社 薬品開発研究所 〒534 大阪府大阪市都島区友通町 1-5-90

* 鳥居薬品株式会社 研究所 〒267 千葉県千葉市緑区大野台 1-2-1

** 第一化学薬品株式会社 東海研究所 〒319-11 茨城県那珂郡東海村村松 2117

multiple doses of ^{14}C -KBT-3022. From these results, metabolites in the aorta would not inhibit the production of PGI_2 .

4. Excretion of radioactivity in the urine and feces did not change with the number of doses and was 1.3 and 92.7% of the cumulative dose, respectively, within 120 hr after the 21st dosing.

5. No significant effect on hepatic drug-metabolizing enzyme system was observed after repeated dosing of KBT-3022.

Key words : KBT-3022, Mouse, Repeated administration, Absorption, Distribution, Excretion, Enzyme induction

緒 言

Ethyl 2-[4,5-bis(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]pyrrol-1-ylacetate (KBT-3022) は, シクロオキシゲナーゼ阻害作用を有する新規抗血小板薬である¹⁾. 本剤のマウスにおける単回投与時の吸収, 分布および排泄については既に報告した²⁾.

今回, ^{14}C で標識した KBT-3022 を用いて, 雄性マウスに反復経口投与し, その吸収, 分布, 排泄および薬物代謝酵素系への影響について検討を行った. また血小板凝集と関連の深い thromboxane A_2 (TX A_2) および prostaglandin I_2 (PGI_2) のそれぞれの安定代謝物 thromboxane

B_2 (TXB_2) および 6-keto-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) の血清または血漿中濃度を測定し, ^{14}C -KBT-3022 経口投与後の血小板および動脈中放射能濃度との関連性について検討した.

実験材料および方法

1. 使用薬物

^{14}C -KBT-3022 (Fig. 1) は第一化学薬品 (株) 東海研究所で合成したものをを使用した. 比放射能は 4.21 MBq/mg であり, 薄層クロマトグラフィ (TLC) により求めた放射化学的純度は 95% 以上であった.

非標識の KBT-3022 は鐘紡 (株) 薬品創薬研

Fig. 1 Synthetic route of ^{14}C -KBT-3022

究所にて合成されたものを使用した。

2. 実験動物

実験動物として雄性 ddY 系 SPF マウス (生後 5~8 週齢, 体重約 30 g, 日本エスエルシー) を用いた。

購入後のマウスは, 水および固型飼料 (MF, オリエンタル酵母工業または CE-2, 日本クレア (株)) を自由に摂取させ, 温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で 1 週間以上予備飼育をしたのち試験に供した。各試験に供する動物の例数は全身オートラジオグラフィ, TXB_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の測定試験および酵素誘導試験を除き 1 群 3 匹とした。全身オートラジオグラフィは 1 群 1 匹, 血清中 TXB_2 の測定は 1 群 3~8 匹, 血漿中 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の測定は 1 群 4~14 匹, 酵素誘導試験は 4 匹の肝臓を合したものを 1 例分とし, 1 群 4 例とした。

3. 投与量および投与方法

^{14}C -KBT-3022 に非標識 KBT-3022 を加え, クロロホルムに溶解したのち, 窒素ガスでクロロホルムを除去した。これにポリエチレングリコール 400 : エタノール : 蒸留水 (1 : 1 : 1) を加えて溶解し, 0.2 または 2 mg/5 ml/kg で経口ゾンデ針を用いて, マウスに 1 日 1 回最高 21 回経口投与した。投与放射能は約 1.85 MBq/kg とした。また非標識 KBT-3022 投与の場合は一定量を秤量し同様に投与液の調製, 投与を行った。

4. 試料の採取

1) 血液, 血漿中放射能濃度

^{14}C -KBT-3022 を雄性マウスに経口投与したのち, 飼育ケージ (KN-600, 夏目製作所) に収め, 所定の時間にそれぞれエーテル麻酔下, 腹大動脈より採血致死させた。得られた血液は遠心分離 ($1800 \times g$, 4°C , 15 min) し, 血漿を採取した。測定時間は 1, 4, 7, 10, 14, 17 回投与後 24 時間および 21 回投与後 5, 15, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8, 12 時間および 24 時間とした。

また, 各測定時点においてヘマトクリット値 (Ht) を測定し, 次式より血球移行率を算出した。

$$\text{血球移行率}(\%) = \left(1 - \frac{P}{B} \times \frac{100 - \text{Ht}}{100}\right) \times 100$$

P : 血漿中放射能濃度 (dpm/ml)

B : 血液中放射能濃度 (dpm/ml)

Ht : ヘマトクリット値 (%)

2) 全身オートラジオグラフィ

^{14}C -KBT-3022 を雄性マウスに 21 回経口投与後 2, 24 時間および 72 時間にそれぞれエーテル麻酔死させ, -70°C のドライアイス・アセトンにより凍結した。得られた凍結屍体を 5% カルボキシメチルセルロース (CMC) で包埋し, クライオミクロトーム (PMV450MP, LKB) を用いて約 $35 \mu\text{m}$ の凍結切片を接着テープ (No. 810, 住友スリーエム) に貼りつけて削り取った。得られた凍結切片は -25°C 前後で凍結乾燥し, 切片表面を保護膜 ($4 \mu\text{m}$, ダイヤホイル) で被い, X 線フィルム (MARG ^3H タイプ, コニカ) と密着させ, 4°C で 28 日間露出して全身オートラジオグラムを作製した。

3) 組織内放射能濃度

^{14}C -KBT-3022 を雄性マウスに経口投与したのち, 飼育ケージに収め, 所定の時間にそれぞれエーテル麻酔下, 腹大動脈より採血致死させ, 脳, 眼球, ハーダー腺, 顎下腺, 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 膵臓, 白色脂肪, 褐色脂肪, 骨格筋, 皮膚, 骨髄, 大動脈, 精巣, 前立腺, 胃, 小腸, 大腸, 膀胱の各組織を摘出した。

血液および血漿はそれぞれ実験材料および方法 4.1) に準じて採取し, 血漿, 血液を除く各組織はそれぞれの湿重量を測定し, 一部の組織については小片を切り取り, その湿重量も測定して試料とした。

測定時間は 1 回投与後 24 時間, 7 回投与後 24 時間, 14 回投与後 24 時間および 21 回投与後 30 分, 2, 8, 24, 72 時間とした。なお, 21 回投与後 72 時間を除き, 実験材料および方法 4.1) と同一動物で行った。

4) 尿, 糞中排泄率

^{14}C -KBT-3022を雄性マウスに経口投与したのち, ガラス製代謝ケージ (第一化学薬品型, 石井商店) に収め, 自然排泄された尿および糞を採取した. 測定時間は尿および糞とも毎回投与後24時間および21回投与後24時間毎に120時間までとした.

21回投与後120時間の尿および糞を採取後, マウスをエーテル麻酔死させ, 屍体中の放射能測定に供した.

5. 血清中 TXB_2 濃度の測定

経口投与後所定時間に腹大静脈より約400 μl 採血し, 37°C で1時間インキュベーションし, 遠心後血清を採取した. 得られた血清を適宜希釈し, ラジオイムノアッセイ (Thromboxane B_2 [^3H]-RIA キット, DU PONT NEN 社) で血清中 TXB_2 を測定した.

6. 血漿中 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度の測定

経口投与後所定時間に, 10 μM インドメタシンを含む77 mM EDTA 水溶液100 μl の入ったシリンジで, 900 μl の血液を腹大静脈より採血した. 遠心後 (12000 rpm, 3分), 得られた血漿を2四分プールして合計1 ml として久米らの方法³⁾を参考に前処理操作を実施した. 前処理後, ラジオイムノアッセイ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ [^{125}I] RIA キット, Amersham) により 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ を定量した. なお, 標品として用いた [^3H]-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (7.77 GBq/ μmol) は, DU PONT NEN 社より入手した. 逆相 TLC (HPTLC) による精製段階でロスが生じるため, 回収率による補正を実施した. 分離精製の全過程における回収率は44~58%であった.

7. 酵素誘導試験

1) 投与方法

雄性マウスに KBT-3022 を 2 mg/kg で 1 日 1 回, 7 回反復経口投与した. また, 陰性対照 (vehicle) として PEG-400 : エタノール : 蒸留水

(1 : 1 : 1) を 5 ml/kg で同様に反復経口投与した. 一方, 陽性対照群として phenobarbital sodium (和光純薬工業) を蒸留水に溶解し, 80 mg/5 ml/kg で 1 日 1 回, 7 回反復経口投与した.

2) 蛋白質, P-450含量および酵素活性の測定

KBT-3022あるいは vehicle および phenobarbital sodium を雄性マウスに投与したのち体重, 肝重量, 肝ミクロソーム蛋白量, チトクロム P-450含量および酵素活性を測定した. すなわち, 最終投与後に絶食処置を施し24時間後にマウスを断頭放血死させたのち, 直ちに肝臓を摘出し, Matsubara らの方法⁴⁾に従ってミクロソームを調製した. 肝ミクロソーム蛋白量の測定は Lowry 法⁵⁾により測定した. チトクロム P-450含有量は自記分光光度計 (UV-2100, 島津製作所) を用いて Omura らの方法⁶⁾に準じて測定した. Aminopyrine N-demethylase 活性は Matsubara らの方法⁷⁾に, aniline hydroxylase 活性は Imai らの方法⁸⁾に, p-nitroanisole O-demethylase 活性は Netter らの方法⁹⁾に準じて測定した. UDPG transferase 活性は p-nitrophenol を基質として Iselbacher らの方法¹⁰⁾に準じてそれぞれ測定した.

8. 放射能の測定

血漿, 血液および各組織の一部あるいは全部に組織溶解剤 SOLUENE-350 (PACKARD) を加えて溶解し, 必要に応じて過酸化ベンゾイル飽和のベンゼン溶液を加え, 一夜振盪して脱色したのちシンチレーター ECONOFLUOR (Du Pont NEN Research Products) を加えて測定試料とした. 尿は水を加えて希釈したのち, 糞は70%エタノールを加えて攪拌均質化したのち, それぞれシンチレーター ATOMLIGHT (Du Pont NEN Research Products) を加えて測定試料とした. 屍体は0.5M 水酸化ナトリウムおよびトルエンを加えて72時間還流して溶解後, 水を加えて攪拌均質化し, シンチレーター ATOMLIGHT を加えて測定試料とした.

各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 (LSC-903, ALOKA) で2分間計数することにより行った. なお, 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よった.

9. 試験成績の表示

試験成績は平均値と標準誤差 (S.E.) で表示した. また, 放射能の検出限界はバックグラウンド値 (dpm) の2倍とした. 動物例数の半数以上が検出限界以下の場合には N.D. (not detected) と表示し, 3例中1例が検出限界以下の場合には, 検出限界以下を示したのもバックグラウンド値との差の数値を用いて計算し, 3例の平均値および標準誤差 (S.E.) を算出した. さらに, 放射能濃度はいずれも KBT-3022 に換算して表示した. 有意差の検定には t 検定を用いた.

10. 速度論的パラメータの算出方法

パラメータの算出はすべて3例の平均値を用いて求めた. 半減期 ($t_{1/2}$) は実測値を用いて, 最小二乗法により求めたみかけの $t_{1/2}$ として表示した. 血液, 血漿中放射能濃度-時間曲線下面積 (AUC_b , AUC_p) は台形法により算出し, 最終測定時点以後における AUC の算出は消失相を直線

回帰して外挿することにより求めた.

実験結果

1. 反復投与試験

非絶食雄性マウスに ^{14}C -KBT-3022 を 2 mg/kg で 1 日 1 回, 最高21回経口投与した際の体内動態について検討した.

1) 血液, 血漿中放射能濃度

毎回投与後24時間における血液および血漿中放射能濃度を Fig. 2 に, 21回投与後の血液および血漿中放射能濃度を Fig. 3 に示した.

毎回投与後24時間における血液および血漿中放射能濃度はそれぞれ4回から21回投与まで 26~42 ng/ml, 28~65 ng/ml を示し, 4回投与以後, 投与回数に伴う上昇傾向は認められなかった.

21回投与後の血液中放射能濃度は投与後2時間に最高濃度319 ng/mlを示したのち, 4時間から24時間まで $t_{1/2}$ 5.8時間で消失した. 投与後24時間までの AUC_b は $3.44 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ であった. 血漿中放射能濃度は投与後2時間に最高濃度496 ng/mlを示したのち, 4時間から24時間まで $t_{1/2}$ 4.9時間で消失した. 投与後24時間までの AUC_p

Fig. 2 Radioactivity levels in blood and plasma 24 hr after daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting male mice (dose: 2 mg/kg/day) Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. of three animals.

Fig. 3 Radioactivity levels in blood and plasma after a 21 day period of daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting male mice (dose: 2 mg/kg/day)
Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. of three animals.

は $5.20 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ であった。

また, 血球への移行率は21回投与後5分から24時間まで6.1~34.2%であった。

2) 全身オートラジオグラム (WARG)

21回投与した際のWARGをFig. 4に示した。

21回投与後2時間では胃内容物, 腸内容物, 胆汁, 精管に高い放射能が認められ, 次いで肝臓が高かった。腎臓, 大動脈, 包皮腺, 副腎にも血液より高い放射能が認められた。心臓, 肺, 精巣上体, ハーダー腺, 褐色脂肪, 脾臓, 骨髄, 皮膚, 舌, 顎下腺, 下垂体は血液とほぼ同程度の放射能であった。骨格筋, 脾臓, 胸腺, 精巣は血液より低い放射能であった。白色脂肪, 脳, 眼球の放射能は最も低かった。

21回投与後24時間では全体の放射能は低下したが, 2時間と同様の分布パターンを示した。

21回投与後72時間では全体の放射能はさらに低下したが, 精管には高い放射能が認められ, 次いで大動脈, 肝臓, 腸内容物に高かった。肺, 副腎, 皮膚, 精巣上体, 腎臓, 心臓には血液より高い放射能が認められた。血液を含む他の組織にも痕跡程度の低い放射能が認められた。

3) 組織内放射能濃度

反復投与期間中の組織内放射能濃度をTable 1に, 21回投与後の組織内放射能濃度をTable 2に示した。

各回投与後24時間における組織内放射能濃度は大部分の組織が投与回数に伴い上昇し, 脾臓は21回投与以後も上昇する傾向が認められたが, 他の組織は21回投与までに定常状態に達する傾向が認められた。KBT-3022の作用部位である血小板の毎回投与後24時間における放射能濃度は, 検出限界以下であった。大動脈は肝臓とほぼ同程度の高い放射能濃度を示した。濃度上昇の大きな組織は肺, 心臓および精巣であり, 21回投与後では単回投与後の5~6倍を示した。他の組織は4倍以下であった。

21回投与後の組織内放射能濃度は, 胃および小腸では最初の測定時点である投与後30分に, 眼球, 肺, 白色脂肪, 前立腺, 大腸および膀胱では投与8時間に最高濃度を示した。他の組織はいずれも投与後2時間に最高濃度を示した。21回投与後30分では胃に最も高く, 血漿中放射能濃度422 ng/mlの12倍を示した。次いで肝臓お

2 hr

Fig. 4-1

24 hr

Fig. 4-2

72 hr

Fig. 4-3 Whole body autoradiograms after a 21 day period of daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting male mice (dose: 2 mg/kg/day)

1. Adrenal gland	2. Aorta	3. Bile in gall bladder
4. Blood	5. Bone marrow	6. Brain
7. Brown fat	8. Deferent duct	9. Epididymis
10. Eyeball	11. Fat	12. Gastric contents
13. Harderian gland	14. Heart	15. Hypophysis
16. Intestinal contents	17. Kidney	18. Liver
19. Lung	20. Mandibular gland	21. Pancreas
22. Skeletal muscle	23. Skin	24. Spleen
25. Testis	26. Thymus	27. Tongue

Table 1 Radioactivity levels in tissue 24 hr after daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting male mice (dose: 2 mg/kg/day)

Tissue	Radioactivity level (ng equiv. of KBT-3022/g or ml)			
	Single dose	7 doses	14 doses	21 doses
Plasma	16 $\pm$ 1	41 $\pm$ 15	57 $\pm$ 23	28 $\pm$ 3*
Blood	10 $\pm$ 3	28 $\pm$ 11	42 $\pm$ 15	26 $\pm$ 5
Platelet	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Brain	N.D.	5 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2
Eyeball	N.D.	N.D.	12 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2
Harderian gland	18 $\pm$ 3	33 $\pm$ 14	50 $\pm$ 5*	33 $\pm$ 2*
Mandibular gland	7 $\pm$ 1	20 $\pm$ 6	26 $\pm$ 4*	26 $\pm$ 3*
Thymus	14 $\pm$ 3	26 $\pm$ 7	27 $\pm$ 6	30 $\pm$ 6
Heart	12 $\pm$ 1	36 $\pm$ 9	59 $\pm$ 7*	63 $\pm$ 12*
Lung	32 $\pm$ 5	135 $\pm$ 14*	187 $\pm$ 19*	199 $\pm$ 24*
Liver	155 $\pm$ 22	551 $\pm$ 177	588 $\pm$ 26*	600 $\pm$ 73*
Kidney	39 $\pm$ 5	110 $\pm$ 37	116 $\pm$ 16*	113 $\pm$ 11*
Adrenal gland	N.D.	N.D.	N.D.	90 $\pm$ 5
Spleen	33 $\pm$ 3	68 $\pm$ 16	96 $\pm$ 19*	113 $\pm$ 23*
Pancreas	7 $\pm$ 2	15 $\pm$ 7	28 $\pm$ 8	22 $\pm$ 4*
Fat	20 $\pm$ 1	39 $\pm$ 4*	69 $\pm$ 15*	72 $\pm$ 6*
Brown fat	17 $\pm$ 1	45 $\pm$ 10*	63 $\pm$ 13*	64 $\pm$ 9*
Skeletal muscle	N.D.	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
Skin	14 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5	60 $\pm$ 9*	56 $\pm$ 7*
Bone marrow	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Aorta	N.D.	159 $\pm$ 52	517 $\pm$ 128	458 $\pm$ 50
Testis	4 $\pm$ 1	12 $\pm$ 3	18 $\pm$ 2*	20 $\pm$ 1*
Prostate gland	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Stomach	147 $\pm$ 47	138 $\pm$ 54	195 $\pm$ 77	233 $\pm$ 77
Small intestine	89 $\pm$ 10	150 $\pm$ 37	111 $\pm$ 20	143 $\pm$ 39
Large intestine	109 $\pm$ 34	126 $\pm$ 42	90 $\pm$ 10	137 $\pm$ 23
Urinary bladder	41 $\pm$ 10	58 $\pm$ 20	64 $\pm$ 2	70 $\pm$ 13

Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. of three animals.

*: Significant difference from values of a single dose. $p < 0.05$

N.D.: Not detected.

および小腸に高く, それぞれ血漿中放射能濃度の6倍および3倍を示した. 大動脈, 腎臓, 副腎および肺は血漿とほぼ同濃度であった. 血液, 心臓, 脾臓, ハーダー腺, 大腸, 褐色脂肪および膀胱は血漿中放射能濃度の40~64%, 顎下腺, 脾臓, 皮膚, 胸腺, 前立腺および白色脂肪は血漿中放射能濃度の14~30%であった. 骨髄は検出限界以下であった. 他の組織は血漿中放射能濃度の11%以下であった.

21回投与後2時間では胃および肝臓に高く,

それぞれ血漿中放射能濃度496 ng/mlの9倍および7倍を示した. 次いで大動脈, 腎臓および小腸に高く, とともに血漿中放射能濃度の2倍を示した. 副腎, 肺, 褐色脂肪, ハーダー腺および心臓は血漿とほぼ同濃度であった. 他の組織はいずれも血漿中放射能濃度より低かった.

21回投与後8時間では胃および肝臓に高く, それぞれ血漿中放射能濃度236 ng/mlの14倍および10倍を示し, その他の組織も2時間とほぼ同様の分布傾向を示した.

Table 2 Radioactivity levels in tissue after a 21 day period of daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting male mice (dose: 2 mg/kg/day)

Tissue	Radioactivity level (ng equiv. of KBT-3022/g or ml)				
	30 min	2 h	8 h	24 h	72 h
Plasma	422±162	496±104	236±44	28±3	9±1
Blood	270±102	319±65	153±25	26±5	10±3
Brain	25±7	38±10	26±3	8±2	6±0
Eyeball	24±5	34±4	41±3	15±2	N.D.
Harderian gland	233±107	369±130	269±45	33±2	21±2
Mandibular gland	126±43	197±52	110±16	26±3	20±2
Thymus	65±22	129±45	116±22	30±6	23±2
Heart	249±90	363±90	196±25	63±12	56±2
Lung	434±107	534±70	594±125	199±24	176±11
Liver	2633±847	3526±645	2439±245	600±73	476±26
Kidney	565±196	938±217	608±110	113±11	50±1
Adrenal gland	480±206	543±94	348±17	90±5	N.D.
Spleen	234±59	269±44	236±26	113±23	65±3
Pancreas	126±49	180±38	109±16	22±4	15±2
Fat	59±10	113±1	149±14	72±6	28±3
Brown fat	199±78	375±96	266±34	64±9	37±4
Skeletal muscle	46±18	64±17	50±4	12±1	10±1
Skin	75±13	139±22	133±18	56±7	48±1
Bone marrow	N.D.	245±70	N.D.	N.D.	N.D.
Aorta	594±76	939±80	501±131	458±50	472±60
Testis	32±8	63±11	62±4	20±1	20±1
Prostate gland	62±28	115±23	184±94	N.D.	N.D.
Stomach	5047±372	4240±1557	3206±1201	233±77	50±4
Small intestine	1220±623	919±266	352±43	143±39	96±21
Large intestine	225±50	270±63	641±90	137±23	44±5
Urinary bladder	170±74	202±38	246±55	70±13	27±4

Data are expressed as the mean values±S.E. of three animals.

N.D.: Not detected.

21回投与後24時間では大動脈、白色脂肪、脾臓および皮膚は最高濃度の40～49%に、眼球、肺、精巣、膀胱、胸腺、脳および大腸は21～37%に減少した。その他の組織は最高濃度の19%以下に減少した。

21回投与後72時間では大動脈は最高濃度の50%、皮膚、精巣および肺は30～35%に減少した。その他の組織は最高濃度の24%以下に減少した。

4) 尿、糞中への排泄

毎回投与後24時間および21回投与後の尿およ

び糞中への累積投与量に対する排泄率を **Table 3** に示した。

毎回投与後24時間における尿および糞中への累積投与量に対する排泄率は投与回数に伴う変化は認められず、尿中に1.0～1.3%が、糞中に89.8～96.7%が排泄された。

21回投与後120時間までの尿中には累積投与量の1.3%、糞中には92.7%が排泄され、尿、糞中総排泄率は94.0%であった。また、この時点の体内には累積投与量の0.2%が認められた。

Table 3 Cumulative excretion of radioactivity in urine and feces during and after a 21 day period of daily oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting male mice (dose: 2 mg/kg/day)

Dose number	Excretion of radioactivity (% of cumulative dose)		
	Urine	Feces	Total
1	1.0±0.1	91.1±0.5	92.1±0.4
2	1.1±0.1	89.8±4.4	90.9±4.5
3	1.1±0.1	96.7±1.5	97.8±1.4
4	1.0±0.0	90.7±2.0	91.8±2.0
5	1.0±0.0	92.7±0.8	93.8±0.9
6	1.1±0.0	94.4±0.7	95.5±0.7
7	1.1±0.0	95.6±1.0	96.7±1.0
8	1.1±0.0	95.2±1.1	96.4±1.1
9	1.2±0.0	94.8±1.1	96.0±1.1
10	1.2±0.0	93.8±0.9	95.0±0.9
11	1.2±0.0	92.8±0.9	94.0±0.9
12	1.2±0.0	92.2±1.0	93.5±0.9
13	1.2±0.0	92.6±0.9	93.8±0.9
14	1.3±0.0	92.8±0.9	94.1±0.9
15	1.3±0.0	93.0±0.7	94.2±0.7
16	1.3±0.0	92.1±0.6	93.4±0.6
17	1.3±0.0	92.4±0.7	93.7±0.7
18	1.3±0.0	92.9±0.7	94.1±0.7
19	1.3±0.0	92.4±0.7	93.7±0.6
20	1.3±0.0	92.4±0.6	93.7±0.6
21	24*	1.3±0.1	92.4±0.6
	48*	1.3±0.1	92.6±0.6
	72*	1.3±0.1	92.7±0.6
	96*	1.3±0.1	92.7±0.6
	120*	1.3±0.1	92.7±0.6

Residual radioactivity in carcass at 120 hr after the final dose: $0.2\pm0.0\%$ of cumulative dose

*: Hours after the final dose

All samples were collected for a 24 hr period after daily dosing and then every 24 hr after the final dose.

Data are expressed as the mean values±S.E. of three animals.

2. 血清中 TXB_2 濃度, 血漿中 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度

マウスに KBT-3022 を単回経口投与した時の血清中 TXB_2 濃度を Fig. 5 に, 血漿中 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度を Fig. 6 に示す.

TXB_2 濃度は 2 mg/kg 投与で, 投与後 0.5, 2,

4, 8 時間, 0.2 mg/kg 投与で 0.5 時間にそれぞれ有意な減少が認められた. 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度は, 2 mg/kg 投与で投与後 2, 4, 8 時間に有意な減少が認められたが, 0.2 mg/kg 投与時には有意な減少が認められなかった. 連続経口投与後 24 時間目の血清中 TXB_2 濃度を Fig. 7 に, 血漿中 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度を Fig. 8 に示す.

TXB_2 濃度は vehicle 投与群, KBT-3022 投与群ともほぼ同様の値を示し, 連投による抑制傾向は認められなかった. また, 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度も 0.2, 2 mg/kg の連続投与で vehicle 投与群とほぼ同様の値を示し, 連投による抑制傾向は認められなかった.

3. 酵素誘導試験

非絶食雄性マウスに KBT-3022 を 2 mg/kg で 1 日 1 回, 7 回経口投与した際の肝薬物代謝酵素活性を Table 4 に示した.

1) 体重および肝重量

KBT-3022 投与群では, 体重, 肝重量および体重に対する肝重量比において有意な変化は認められなかった. 一方, phenobarbital sodium 投与群では, 肝重量に有意な変化は認められなかったものの, 体重に約 10% の減少が認められた ($p<0.01$). また, 体重に対する肝重量比において約 20% の増加が認められた ($p<0.001$).

2) 肝ミクロソーム蛋白量

KBT-3022 投与群では, 肝ミクロソーム蛋白量に変化は認められなかった. 一方, phenobarbital sodium 投与群では, 肝臓 1 g 当たりおよび肝臓当たりの肝ミクロソーム蛋白量において増加傾向が認められた.

3) 肝薬物代謝酵素活性

KBT-3022 投与群では, aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, p-nitroanisole O-demethylase および UDPG transferase の各酵素活性に有意な変化は認められなかった. 一方, phenobarbital sodium 投与群では, UDPG transferase 活性および p-nitroanisole O-demethylase 活性の肝ミクロソーム蛋白 1 mg 当たりおよび肝

Fig. 5 Serum concentration of TXB₂ after oral administration of KBT-3022 to fasting male mice (dose: 0.2 mg/kg, 2 mg/kg). Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n=3$ or 4).
*; Significant difference from initial concentration by t test ($p<0.05$)

Fig. 6 Plasma concentration of 6-keto-PGF_{1α} after oral administration of KBT-3022 to fasting male mice (dose: 0.2 mg/kg, 2 mg/kg). Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n=2-4$).
*; Significant difference from initial concentration by t test ($p<0.05$)

Fig. 7 Serum concentration of TXB₂ 24 hr after daily oral administration of KBT-3022 to mice (dose: 0.2 mg/kg, 2 mg/kg, vehicle). Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n=3-8$).

Fig. 8 Plasma concentration of 6-keto-PGF_{1 α} 24 hr after daily oral administration of KBT-3022 to mice (dose: 0.2 mg/kg, 2 mg/kg, vehicle). Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n=2-7$).

Table 4 Effect of treatment with KBT-3022 or phenobarbital sodium for 7 days on hepatic drug-metabolizing enzymes of mice

Parameter	Vehicle (5 ml/kg/day)	KBT-3022 (2 mg/kg/day)	Phenobarbital sodium (80 mg/kg/day)
Body weight (g)	36.8±0.6 (1.00)	35.6±0.5 (0.97)	33.7±0.3 (0.92)*
Liver weight (g)	1.83±0.08 (1.00)	1.73±0.01 (0.95)	2.03±0.04 (1.11)
Liver weight/body weight (%)	4.97±0.13 (1.00)	4.86±0.06 (0.98)	6.02±0.09 (1.21)#
Microsomal protein content (mg/g liver)	38.60±0.48 (1.00)	39.39±1.34 (1.02)	43.74±5.04 (1.13)
(mg/liver)	70.45±2.44 (1.00)	68.04±2.32 (0.97)	89.00±10.98 (1.26)
Aminopyrine N-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	9.97±0.27 (1.00)	10.39±0.23 (1.04)	20.19±0.89 (2.03)#
(nmol/min/g liver)	385±8 (1.00)	409±14 (1.06)	870±65 (2.26)#
(μmol/min/liver)	0.703±0.032 (1.00)	0.706±0.022 (1.00)	1.768±0.147 (2.51)#
Aniline hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)	0.717±0.046 (1.00)	0.697±0.015 (0.97)	1.044±0.080 (1.46)†
(nmol/min/g liver)	27.7±2.0 (1.00)	27.5±1.3 (0.99)	44.6±2.7 (1.61)*
(nmol/min/liver)	50.2±1.5 (1.00)	47.5±2.2 (0.95)	90.6±6.2 (1.80)#
P-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	6.76±1.37 (1.00)	6.03±0.49 (0.89)	9.32±0.81 (1.38)
(nmol/min/g liver)	259±50 (1.00)	236±13 (0.91)	397±28 (1.53)
(nmol/min/liver)	485±108 (1.00)	407±24 (0.84)	805±51 (1.66)†
UDPG transferase activity (nmol/min/mg protein)	0.784±0.055 (1.00)	0.784±0.051 (1.00)	0.667±0.054 (0.85)
(nmol/min/g liver)	30.3±2.4 (1.00)	31.1±2.9 (1.03)	29.6±5.0 (0.98)
(nmol/min/liver)	54.8±2.1 (1.00)	53.7±5.0 (0.98)	60.0±10.2 (1.09)
Cytochrome P-450 content (nmol/mg protein)	0.523±0.078 (1.00)	0.524±0.070 (1.00)	0.869±0.099 (1.66)†
(nmol/g liver)	20.2±3.0 (1.00)	20.5±2.6 (1.01)	39.1±7.3 (1.94)
(nmol/liver)	36.5±4.7 (1.00)	35.4±4.5 (0.97)	79.3±14.9 (2.17)†

Data are expressed as the mean values±S.E. of four animals.

Values in parentheses are expressed as the ratio of drug treatment to Vehicle.

Significant difference from value of vehicle: †; $p<0.05$, *; $p<0.01$, #; $p<0.001$

臓 1 g 当たりの活性に有意な変化は認められなかったが、他の各酵素活性においては有意な増加が認められた。

4) チトクロム P-450 含量

KBT-3022投与群では、チトクロム P-450 含量に有意な変化は認められなかった。一方、phenobarbital sodium 投与群では、肝臓 1 g 当たりの含量に有意な変化は認められなかったものの、肝ミクロソーム蛋白 1 mg 当たりおよび肝臓当たりの含量が約70~120%増加した($p<0.05$)。

考 察

雄性マウスに ^{14}C -KBT-3022 を 2 mg/kg で 21 回反復経口投与した際の体内動態について検討した。Fig. 2 に示すように毎回投与後 24 時間における血漿中放射能濃度は 4 回投与でほぼ定常状態に達した。21 回投与後の血漿中放射能濃度は Fig. 3 に示すように単回投与群²⁾と比較して $C_{\max}$ が約 1/2 になり、ブロードなピークとなった。この原因として、吸収速度が単回投与と比較し低下したと考えられるが、詳細は不明である。なお、24 時間までの AUC_p には顕著な差は認められな

かった。また、血漿中からの消失半減期もほぼ同様の値を示した。ほとんどの組織中濃度は Table 1 に示すように21回投与までにほぼ定常状態に達する傾向を示したが、脾臓は21回投与後に単回投与群の3倍の放射能濃度を示し、さらに上昇する傾向が認められた。しかしながら、マウスにおける亜急性毒性試験の結果では2500 mg/kg の高投与量を投与した雄性マウスの脾臓にわずかな重量増加がみられた程度で、病理組織学的な変化も認められていない。KBT-3022の作用部位である血小板では毎回投与後24時間における放射能濃度は検出限界以下であった。また、肺、心臓および精巣の放射能濃度は21回投与後で単回投与群の5~6倍、他の組織は4倍以下であり、血漿中濃度が約2倍になることを考慮すると、組織への蓄積は大きくないものと考えられた。

21回投与後の各組織からの消失は Table 2 に示すように単回投与群に比較して遅く、21回投与後72時間では大動脈に最高濃度の50%、皮膚、精巣および肺に最高濃度の30~34%の放射能濃度が認められた。他の組織は最高濃度の25%以下に減少した。また、21回投与後72時間の全身オートラジオグラムより、精管にも高い放射能が認められた。単回投与に比べ連投後の各組織からの消失が遅くなる理由として、単回投与に比べ連投時の放射能濃度が相対的に高くなり、消失相での3相性が顕在化したのではないかと考えられる。

^{14}C -KBT-3022単回経口投与の場合、血小板中放射能濃度は血漿中濃度の2.4~15.7倍であるのに対して、大動脈中放射能濃度は最大で約50%であった²⁾。Fig. 5 に示すように、KBT-3022の0.2 mg/kg 単回経口投与時の血清中 TXB_2 濃度は投与前値に比べ有意な減少が認められた。しかし、Fig. 6 に示すように血漿中 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度は0.2 mg/kg 投与で有意な減少が認められず、血小板、大動脈中放射能濃度をほぼ反映した結果が得られた。

マウスに ^{14}C -KBT-3022を連投すると、他の

臓器に比べ大動脈に高い放射能濃度が認められた。KBT-3022は血小板中のシクロオキシゲナーゼを阻害することにより、血小板凝集抑制作用を示す TXA_2 の生成を抑制するが、シクロオキシゲナーゼは血管内皮細胞にも存在し、 TXA_2 とは逆に血小板凝集抑制作用を有する prostaglandin I_2 (PGI $_2$) の産生に深く関わっている¹¹⁾。血小板凝集抑制作用を有する PGI $_2$ の生成を抑制することは、血小板の凝集を促すことになる。よって ^{14}C -KBT-3022の連投で大動脈中に高い放射能濃度が認められることは、薬効の面から問題となると考えられた。そこで PGI $_2$ の安定代謝物 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の血漿中濃度を測定することにより、大動脈中シクロオキシゲナーゼ活性への影響を検討した。また、同時に TXA_2 の安定代謝物である TXB_2 の血清中濃度を測定し、作用部位である血小板中シクロオキシゲナーゼ活性への影響についても検討した。 ^{14}C -KBT-3022を 2 mg/kg 単回経口投与後8時間目の大動脈中放射能濃度は123 ng/g であり²⁾、6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度は有意な減少を示す。しかし、KBT-3022 2 mg/kg 21回連投24時間後の大動脈中放射能濃度は、Table 2 に示すように458 ng/g であるが、Fig. 8 に示すように 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 濃度はコントロール群と比較し、有意な減少を示さなかった。すなわち ^{14}C -KBT-3022の連投により大動脈中に高い放射能濃度は認められるが、直接 PGI $_2$ 産生に影響を及ぼさないことを示している。言い換えれば、大動脈中に検出される放射能は PGI $_2$ 生成に対して阻害活性のない代謝物として存在していることを示唆している。なお大動脈中代謝物の存在形態は放射能の絶対量が少なすぎるため明らかにすることは不可能であった。ただし、単回投与時の血漿中放射能のほとんどはエチルエステルのエチルが脱離した代謝物であることを確認している¹²⁾。また、毎投与24時間後の TXB_2 濃度は初回投与後24時間後の TXB_2 濃度と変化なく、連投によって薬効である血小板中シクロオキシゲナーゼ活性が増強されることもないことがわかった。

尿、糞中への排泄は Table 3 に示すように反復

投与期間中、投与回数に伴う変化は認められず、2 mg/kg の反復投与は排泄経路に変化を及ぼさないものと考えられた。

さらに、雄性マウスに KBT-3022 を 2 mg/kg で 7 日反復経口投与し、肝薬物代謝酵素系に対する影響を調べたところ、Table 4 に示すように測定した代謝酵素活性については vehicle 群と差が認められなかったことより、本薬物の肝薬物代謝酵素活性への影響は小さいものと考えられた。

要 約

1) 非絶食雄性マウスに 2 mg/kg 反復経口投与した際、毎回投与後 24 時間における血漿中放射能濃度は 4 回投与ではほぼ定常状態に達した。21 回投与後の血漿中放射能濃度は単回投与群と比較して C_{max} が約 1/2 になり、ブロードなピークとなったが、24 時間までの AUC_p には顕著な差は認められなかった。

2) 非絶食雄性マウスに 2 mg/kg 反復経口投与した際、各回投与後 24 時間の組織内放射能濃度は脾臓が 21 回投与後も上昇する傾向が認められたものの、他の組織は 21 回投与までに定常状態に達する傾向が認められた。肺、心臓および精巣は 21 回投与で単回投与の 5~6 倍を示したが、他の組織は 4 倍以下であった。21 回投与後の各組織からの消失は単回投与と比較して遅く、21 回投与後 72 時間では大動脈に最高濃度の 50% が、皮膚、精巣、肺、白色脂肪および脾臓に 24~35% が認められた。また、全身オートラジオグラムにおいて精管に高い放射能が認められた。

3) ^{14}C -KBT-3022 連投による大動脈への放射能蓄積の影響を 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の血漿濃度を測定することにより検討した。また、同時に TXB $_2$ の血清中濃度を測定し、作用部位である血小板への影響についても検討した。その結果、 ^{14}C -KBT-3022 の連投により大動脈中に高い放射能濃度が認められるが、直接 PGI $_2$ 産生に影響を及ぼさず、大動脈中の放射性物質は PGI $_2$ 生成阻害活性の低い代謝物として存在することが示唆された。また、毎投与 24 時間後の TXB $_2$ 濃度は初回

投与後 24 時間後の TXB $_2$ 濃度と変化なく、連投による薬効の変化（増強または減弱）はないと推察された。

4) 非絶食雄性マウスに 2 mg/kg 反復経口投与した際、尿、糞中への排泄は投与回数に伴う変化は認められず、21 回投与後 120 時間まで尿中には累積投与量の 1.3%、糞中には 92.7% が排泄された。

5) 非絶食雄性マウスに KBT-3022 を 2 mg/kg 反復経口投与し、各酵素活性を調べたところ、肝薬物代謝酵素活性は vehicle 群と比較して差は認められなかった。

文 献

- 1) 世古典彦, 吉野公一郎, 横田耕一, 山下 明, 伊藤敬三, 塚本悟郎: 血小板凝集阻害作用を有する新規ジフェニルアゾール誘導体の合成とその構造活性相関. 第 9 回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集, p. 131 (1988); Yokota, K., Yamamoto, N., Morimoto, Y., Yamashita, A. and Ito, K.: Anti-platelet activity of KB-3022. *Jpn. J. Pharmacol.*, **46** (Suppl.): p. 190 (1988).
- 2) 中田雄一郎, 三宅美穂, 嶋田 斎, 藤川真章, 栗田則男, 畔取政行, 荒川勝雅, 市毛一美, 堀 勝行: 新規抗血小板薬 Ethyl 2-[4,5-bis(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]pyrrol-1-ylacetate (KBT-3022) のマウスにおける単回経口投与時の吸収, 分布, 排泄. 薬物動態 **9**, 209-220 (1994).
- 3) 久米章司, 桜井兵一郎, 新村浩一, 高畑京也: プロスタサイクリンの測定. 臨床検査, **27**: 136-143 (1983).
- 4) Matsubara, T., Yoshihara, E., Iwata, T., Tochino, Y. and Hachino, Y.: Biotransformation of coumarin derivatives (I), 7-alkoxycoumarin O-dealkylase in liver microsomes. *Jpn. J. Pharmacol.*, **32**: 9-21 (1982).
- 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275 (1951).
- 6) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**: 2370-2378 (1964).
- 7) Matsubara, T., Touchi, A. and Tochino, Y.: Hepatic aminopyrine N-demethylase system: Further studies of assay procedure. *Jpn. J. Pharmacol.*, **17**: 127-136 (1977).
- 8) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R.: Evidence for biochemically different types of vesicles in the

- hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.*, **60**: 417-428 (1966).
- 9) Netter, K. J. and Seidel, G.: An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **146**: 61-65 (1964).
- 10) Isselbacher, K. J., Chrabas, M. F. and Quinn, R. C.: The solubilization and partial purification of a glucuronyl transferase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **237**: 3033-3036 (1962).
- 11) 鹿取 信: アラキドン酸代謝を中心とした血小板の脂質代謝. 医学のあゆみ, **114**: 577-584 (1980).
- 12) 中田雄一郎, 三宅美穂, 藤川真章, 谷沢利恵, 栗田則男, 畔取政行: 新規抗血小板薬 Ethyl 2-[4,5-bis (4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]pyrrol-1-ylacetate (KBT-3022) のマウス, ラット, イヌにおける薬物動態の種差及び性差. 薬剤学, **53**: 210-220 (1993).