新規抗血小板薬 Ethyl 2-[4,5-bis(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]pyrrol-1-ylacetate (KBT-3022) のマウスにおける胎児移行性およびラットにおける乳汁移行性について

中田雄一郎・粟田 則男・畔取 政行*・荒川 勝雅*
市毛 一美**・堀 勝行**

Transfer a New Antiplatelet Drug, Ethyl 2-[4,5-bis(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl]pyrrol-1-ylacetate (KBT-3022), to Fetus in Mice and Milk in Rats

Yuichiro NAKADA, Norio AWATA, Masayuki KUROTORI*, 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

Transfer to fetus in mice and milk in rats were investigated after oral administration of an antiplatelet drug, ^{14}C -KBT-3022 at a dose of 2 mg/kg.

1. The level of radioactivity in the fetus as revealed by whole body autoradiography, was lower than in the maternal blood and decreased to a trace levels at 24 hr after administration to fasting mice on the 13th day of gestation.

2. The radioactivity level in the fetus was less than 36% of that in the maternal plasma up to 8 hr after administration to fasting mice on the 18th day of gestation. And the radioactivity level at 24 hr decreased to 55% of that found at 8 hr. Fetal intestine showed a high level of radioactivity but the other fetal tissues showed low levels as shown by whole body autoradiograms.

3. The radioactivity levels in the milk reached a maximum of 105 ng/ml at 8 hr after administration to non-fasting lactating rats and were below the detection limit at 48 hr. Compared with the radioactivity levels in the plasma, the radioactivity levels in the milk were 2 and 3 times higher at 8 and 24 hr after administration, respectively.

Key words : KBT-3022, Mouse, Rat, Feto-placental transfer, Transfer to milk

鐘紡株式会社 薬品開発研究所 〒534 大阪府大阪市都島区友渕町 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

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²⁾および連続投与時³⁾の吸収、分布および排泄については既に報告した。

今回、¹⁴C で標識した KBT-3022 を用いて、妊娠マウスに単回経口投与し胎児移行性について検討した。また、哺育中ラットに ¹⁴C-KBT-3022 を単回経口投与し、乳汁中への移行性を検討した。

実験材料および方法

1. 使用薬物

¹⁴C-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

実験動物として妊娠 13 または 18 日目 ddY 系 SPF マウス (日本エスエルシー, 未経産, 生後 9 週齢交配, 体重約 40 g または 50 g) および哺育中 Wistar 系 SPF ラット (日本エスエルシー, 分娩後 12 日目, 体重約 230 g) を用いた。

購入後のマウスおよびラットは、水および固型

飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) 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 1 群 3 匹とした。

3. 投与量および投与方法

¹⁴C-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、2 mg/5 ml/kg で経ロゾンデ針を用いて、マウスおよびラットに経口投与した。投与放射能は約 1.85 MBq/kg とした。投与に際して、動物は投与前夜より絶食し (水は自由に与えた)、投与後 4 時間より給餌を行った。ただし、乳汁中放射能濃度の測定試験については絶食処置を施さなかった。

4. 胎児移行に関する試験

1) 全身オートラジオグラフィ

¹⁴C-KBT-3022 を妊娠マウスに 2 mg/kg で経口投与したのち、妊娠 13 日目マウスでは投与後 2 時間および 24 時間、妊娠 18 日目マウスでは投与後 30 分、2, 8 時間および 24 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 (PMV 450 MP, 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 ($4 \mu\text{m}$, ダイアホイル) 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。

2) 組織内放射能濃度の測定

¹⁴C-KBT-3022 を妊娠 18 日目マウスに 2 mg/kg で経口投与したのち、投与後 30 分、2, 8 時間および 24 時間にエーテル麻酔下、腹大動脈より

Fig. 1 Structure of KBT-3022
* labelled position with ¹⁴C.

採血致死させ、血漿、血液、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、子宮、卵巣、胎盤、羊水、胎児を採取した。血漿、血液を除く各組織はそれぞれ湿重量を測定し、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。

5. 乳汁移行に関する試験

^{14}C -KBT-3022を分娩後12日目の哺育中ラットに2 mg/kgで経口投与したのち、哺育ケージ(TR-PC-200A, トキワ科学器械)に収め、投与後15, 30分, 2, 4, 8, 24時間および48時間にエーテルで軽度麻酔し、乳汁および血液を採取した。乳汁は母獣の胸部および腹部の乳頭から搾乳し、血液は尾静脈より採血した。乳児は搾乳約1時間前に母獣から離し、搾乳後再び同居させた。なお、乳汁採取約30分前にオキシトシン(帝国機器製薬)を0.5 U/kg腹腔内投与した。

6. 放射能の測定

血漿、血液、乳汁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に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。

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。

7. 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ものの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。

実験結果

1. 胎児への移行

1) 全身オートラジオグラム(WARG)

妊娠13日目絶食マウスに ^{14}C -KBT-3022を2 mg/kg経口投与した際のWARGをFig. 2に示した。

投与後2時間では卵巣、胎膜、胎盤および子宮には母体血液と同程度の放射能が認められた。胎児には母体血液より低い放射能が認められた。

投与後24時間では胎膜に母体血液より高い放射能が認められた。卵巣、子宮、胎盤および胎児の放射能は母体血液同様、痕跡程度であった。

妊娠18日目絶食マウスに ^{14}C -KBT-3022を2 mg/kg経口投与した際のWARGをFig. 3に示した。

投与後30分では卵巣に最も高い放射能が認められた。胎盤および胎膜は母体血液と同程度の放射能であった。子宮は母体血液より低い放射能であった。胎児においては肝臓に放射能が認められたが、胎盤より低い放射能であった。他の胎児組織の放射能は痕跡程度であった。

投与後2時間では母体の生殖組織は30分と同様の分布パターンが認められた。胎児においては消化管内容物に胎盤より高い放射能が認められた。胎児の肝臓、肺および脳の放射能は胎盤より低かった。

投与後8時間では胎児の消化管内容物が投与後2時間より高い放射能を示したが、分布パターンは投与後2時間と同様であった。

投与後24時間では全体の放射能は低下したものの、胎膜には母体血液より高い放射能が認められた。卵巣および胎盤は母体血液と同程度の放射能であった。胎児においては消化管内容物に高い放射能が認められた。他の胎児組織は胎盤と同程度か、それより低い放射能であった。

2) 組織内放射能濃度

妊娠18日目絶食マウスに ^{14}C -KBT-3022を2

Table 1 Radioactivity levels in tissue after single oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to fasting mice on 18th day of gestation (dose: 2 mg/kg)

Tissue	Radioactivity level (ng equiv. of KBT-3022/g or ml)			
	30 min	2 h	8 h	24 h
Plasma	540 $\pm$ 34	391 $\pm$ 66	332 $\pm$ 108	58 $\pm$ 19
Blood	427 $\pm$ 21	275 $\pm$ 50	251 $\pm$ 77	44 $\pm$ 13
Brain	51 $\pm$ 4	50 $\pm$ 6	28 $\pm$ 7	9 $\pm$ 1
Heart	661 $\pm$ 61	411 $\pm$ 21	268 $\pm$ 82	60 $\pm$ 7
Lung	626 $\pm$ 67	402 $\pm$ 34	257 $\pm$ 65	114 $\pm$ 12
Liver	5045 $\pm$ 509	2694 $\pm$ 192	1822 $\pm$ 363	592 $\pm$ 144
Kidney	858 $\pm$ 43	584 $\pm$ 51	343 $\pm$ 73	133 $\pm$ 18
Uterus	162 $\pm$ 11	248 $\pm$ 9	197 $\pm$ 35	94 $\pm$ 15
Ovary	438 $\pm$ 58	361 $\pm$ 15	186 $\pm$ 36	76 $\pm$ 14
Placenta	135 $\pm$ 1	155 $\pm$ 14	163 $\pm$ 29	72 $\pm$ 9
Amniotic fluid	N.D.	24 $\pm$ 1	48 $\pm$ 6	35 $\pm$ 9
Fetus	29 $\pm$ 1	79 $\pm$ 15	121 $\pm$ 26	67 $\pm$ 9
Fetus content (% of dose)	0.03 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.02

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

N.D.: Not detected.

mg/kg 経口投与した際の組織内放射能濃度を **Table 1** に示した。

卵巣は最初の測定時間である投与後30分に、子宮は投与後2時間に、胎盤、羊水および胎児は投与後8時間に最高濃度を示した。投与後30分では卵巣は母体血漿中放射能濃度540 ng/ml とほぼ同濃度であり、子宮および胎盤は母体血漿中放射能濃度の30%および25%であった。胎児は母体血漿中放射能濃度の5%であった。羊水は検出限界以下であった。

投与後2時間では30分とほぼ同様の分布傾向を示した。

投与後8時間では子宮および卵巣は母体血漿中放射能濃度332 ng/ml のそれぞれ59%および56%、胎盤および胎児は母体血漿中放射能濃度のそれぞれ49%および36%であった。羊水は母体血漿中放射能濃度の14%であった。

投与後24時間では羊水に最高濃度の73%の濃度が認められたが、胎児、胎盤および子宮は最高濃度の38~55%に減少した。卵巣は投与後30分の濃度の17%に減少した。

胎児1匹当たりの分布率は、いずれの時点に

おいても投与量の0.15%以下であった。

2. 乳汁中への移行

分娩後12日目の哺育中非絶食ラットに ^{14}C -KBT-3022を2 mg/kg 経口投与した際の乳汁および血漿中放射能濃度を **Fig. 4** に示した。

乳汁中放射能濃度は投与後8時間に最高濃度105 ng/ml を示した。投与後24時間には8時間の23%に減少し、投与後48時間には検出限界以下となった。

乳汁中放射能濃度は同時に測定した血漿中放射能濃度と比較すると、投与後2時間までは血漿と同濃度かそれより低い濃度であったが、投与後8時間および24時間ではそれぞれ血漿中放射能濃度の2倍および3倍であった。

考 察

妊娠マウスに ^{14}C -KBT-3022を2 mg/kg で経口投与し、胎児移行性について検討したところ、妊娠13日目の胎児の放射能は全身オートラジオグラムにおいて母体血液および胎盤より低く、投与後24時間においては痕跡程度であったことよ

2 hr

Fig. 2-1

24 hr

Fig. 2-2 Whole body autoradiograms after single oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to fasting mice on 13th day of gestation (dose: 2 mg/kg)

1. Blood	2. Fetal Membrane	3. Fetus
4. Ovary	5. Placenta	6. Uterus

30 min

9

1

8

7

4

6

Fig. 3-1

2 hr

Fig. 3-2

8 hr

Fig. 3-3

24 hr

8

1

3

7

6

Fig. 3-4 Whole body autoradiograms after single oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to fasting mice on 18th day of gestation (does: 2 mg/kg)

1. Blood	2. Fetal Brain	3. Fetal intestinal contents
4. Fetal liver	5. Fetal lung	6. Fetal membrane
7. Ovary	8. Placenta	9. Uterus

Fig. 4 Radioactivity levels in milk and plasma after single oral administration of ^{14}C -KBT-3022 to non-fasting lactating rats (dose: 2 mg/kg)
Data are expressed as the mean values $\pm$ S.E. of three animals.

り、器官形成期での胎児への移行性は低いものと考えられた。妊娠18日目の胎児は投与後8時間まで母体血漿中放射能濃度の36%以下であり、投与後24時間には投与後8時間の濃度の55%に減少した。全身オートラジオグラムからは胎児の消化管内容物に主として放射能が認められ、胎児組織の放射能は低かった。これらの結果から、妊娠18日目では妊娠13日目に比較して胎児への移行性は高いものの、胎児へ移行した放射能は胎盤あるいは胎児胆汁を経由して体外へ排泄されるものと推察された。雄性マウスに単回投与した時の組織中濃度²⁾に比べ、妊娠18日目の組織中濃度は高い結果となった。しかし、マウスにおけるKBT-3022経口単回投与時の性差は認められておらず²⁾、妊娠18日目の組織中濃度が高いのは、妊娠による影響と考えられる。

哺育中ラットに ^{14}C -KBT-3022を2 mg/kgで経口投与した際、乳汁中への移行は緩慢であり、投与後8時間に最高濃度を示し、同時に測定した血漿中放射能濃度の2倍程度であった。また、乳汁からの放射能の消失は血漿のそれと同様であることから、乳汁中に残留する傾向は小さいもの

と考えられた。

要 約

1) 妊娠13日目絶食マウスに2 mg/kg 経口投与した際の全身オートラジオグラムより、胎児の放射能は母体血液より低く、投与後24時間では痕跡程度となった。

2) 妊娠18日目絶食マウスに2 mg/kg 経口投与した際、胎児濃度は投与後8時間まで母体血漿中放射能濃度の36%以下であった。投与後24時間には投与後8時間の濃度の55%に減少した。また、全身オートラジオグラムでは、胎児の消化管に高い放射能が認められたが、胎児組織の放射能は低かった。

3) 哺育中非絶食ラットに2 mg/kg 経口投与した際、乳汁中放射能濃度は投与後8時間に最高濃度105 ng/mlを示し、投与後48時間には検出限界以下となった。同時に測定した血漿中放射能濃度と比較すると、投与後8時間および24時間では血漿中放射能濃度のそれぞれ2倍および3倍であった。

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.: Antiplatelet activity of KB-3022. *Jpn. J. Pharmacol.*, **46** (Suppl.): 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**: 208-220 (1994).
- 3) 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: 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, 排泄及び薬物代謝酵素系への影響. 薬物動態, **9**: 221-238 (1994).