NZ-105 のラットとイヌにおける Pharmacokinetics

織田 寿久・首藤 典正*・中別府 仁*・篠崎 豊**

Pharmacokinetic Studies of NZ-105 in Beagle Dogs and Rats

Toshihisa ODA, Norimasa SHUDO*, Hitoshi NAKABEPPU*, Yutaka SHINOZAKI**

Central Research Institute, Nissan Chemical Industries, Ltd., Chiba;

**Shiraoka Research Station of Biological Science, Nissan Chemical Industries, Ltd., Saitama;*

***Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama*

Summary

Plasma levels of NZ-105 were determined after an intravenous and a single oral administration to rats and dogs.

1. When NZ-105 was administrated to rats and dogs intravenously at the doses of 1.0 and 0.3 mg/kg respectively, the plasma levels of NZ-105 declined bi-exponentially with the half-lives of 1.35 and 1.03 hr at the terminal elimination phase, respectively.

2. After oral administration of NZ-105 to rats at the doses of 5, 10 and 20 mg/kg, bioavailability of each dose was 19.5, 25.0, 23.9%, respectively.

3. When NZ-105 was administrated to unfasted rats orally at the dose of 10 mg/kg, the bioavailability was 10.0%. The absorption of NZ-105 was affected by food consumption.

4. After oral administration of NZ-105 to dogs at the doses of 2, 5 and 10 mg/kg, bioavailability of each dose was 5.1, 5.6, 4.9%, respectively.

Key words : NZ-105, Rat, Dog, Pharmacokinetics, Bioavailability

緒 言

NZ-105 (塩酸エホニジピン), (±)-2-[Benzyl (phenyl)amino]ethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-(5,5-dimethyl-2-oxo-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl)-4-(3-nitrophenyl)-3-pyridine-carboxylate hydrochloride ethanol は, 日産化学工業(株)で合成された1,4-ジヒドロピリジン骨格を有する新規 Ca 拮抗薬であり, 既存の Ca 拮抗剤と比較して作用発現は緩徐で, しかも作用時間が長いという特徴を有する化合物である^{1,2)}. 我々は,

NZ-105 をラットおよびビーグル犬に投与し, その血漿中濃度推移にもとづいて本化合物の速度論的検討を行ったので報告する.

実験材料および方法

1. 被験物質および試薬

NZ-105 は Lot No. 110P-8701, 測定時の内部標準物質である P-851743((±)-2-[Benzyl (phenyl)amino]ethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-5-(4,4,6,6-tetramethyl-2-oxo-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl)-3-pyridine-

日産化学工業株式会社 中央研究所 〒274 千葉県船橋市坪井町 722-1

* 日産化学工業株式会社 生物科学研究所 〒349-02 埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡 1470

** ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所 〒360-01 埼玉県大里郡江南町大字押切 2512-1

Fig. 1 Chemical structures of NZ-105 and P-851743 (internal standard)

carboxylate hydrochloride) は Lot No. KN-1157 を用い、化学構造式を Fig. 1 に示した。これらは日産化学工業(株)中央研究所で合成されたものである。n-hexane は残留農薬試験用を用い、他の定量試薬は液体クロマトグラフ用または試薬特級を用いた。また、メチルセルロースは SM-400 (信越化学工業) を用いた。

2. 実験動物

ラットは、6 週齢 SD 系雄性ラットを日本チャールスリバー(株)より購入し、定時照明 (6:00-18:00) の飼育室にて一定の飼育条件下 (温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$) で約 1 週間予備飼育し実験に供した。

イヌは雄性ビーグル犬 (Hazleton Research Animals, BW 8-10 kg) を埼玉実験動物(株)より購入し、定時照明 (6:00-18:00) の飼育室にて一定の飼育条件下 (温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$) で約 1 ヶ月間予備飼育し実験に供した。

3. 投与液の調製と投与および採血法

1) ラットの静脈内投与および経口投与

静脈内投与時は、NZ-105 を界面活性剤である Cremophor EL (BASF) の 5 % を含有させた生理食塩水に溶解させ、1 mg/ml の溶液を調製した。背位固定したラットの左頸静脈に 1 ml/kg の容量で静注し、その後、右頸静脈よりヘパリン処理した注射筒を用いて、3, 6, 10, 30 分および 1, 2, 3, 4, 6 時間後に 0.25 ml を採血した。

経口投与時は、NZ-105 を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁し、5, 10, 20 mg/3 ml/kg の割合でゾンデを用いて経口投与した。絶食する場合は投与前 14~16 時間絶食した。実験期間中水は自由に摂取させ、給餌は投与 4 時間後から行った。薬物投与後、0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 および 24 時間目に背位固定し、頸静脈より 0.25 ml を採血した。

得られた血液は直ちに室温下で遠心分離し、得られた血漿は測定するまで冷凍保存した。

2) ビーグル犬における静脈内投与および経口投与

静脈内投与時は、NZ-105 を PEG400 : ethanol : $\text{H}_2\text{O} = 2 : 3 : 5$ の混合溶媒に溶解させ 3 mg/ml の溶液を調製した。ビーグル犬の左橈側皮静脈より 0.1 ml/kg の容量で静注し、その後、右橈側皮静脈よりヘパリン処理した注射筒を用いて、3, 6, 10, 30 分および 1, 2, 3, 4, 6, 8 時間後に 1.2 ml を採血した。

経口投与時は、NZ-105 を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁し、2, 5, 10 mg/ml/kg の割合でゾンデを用いて経口投与した。投与前 24 時間絶食し、実験期間中水は自由に摂取させ、投与後は次の投与まで 1 週間を休薬期間とした。薬物投与後、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24 時間目に橈側皮静脈より 1.2 ml を採血した。

得られた血液は直ちに室温下で遠心分離し、得られた血漿は測定するまで冷凍保存した。

4. 血漿中濃度測定法

1) ラットにおける NZ-105 の測定

ラット血漿 0.1 ml に内部標準物質 (P-851743) を 50 ng 添加し, H₂O 1 ml, 5N NaOH 0.5 ml, n-hexane 5 ml, イソプロピルアルコール (IPA) 2 ml を順次加え, 振盪したのち遠心分離し, 得られた有機層に 4N HCl 1 ml を加えたのち, さらに振盪, 遠心分離した. 次に有機層を除去したのち, 水層に 5N NaOH 1 ml, n-hexane 5 ml を加え振盪, 遠心分離した. 有機層を減圧乾固したのち, n-hexane : ethanol = 3 : 1 の混合溶媒を 0.12 ml 加え再溶解させたのち, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に 35 μ l を注入し, 内部標準物質とのピーク高さ比により測定した. 定量限界は, 20 ng/ml であった. なお, HPLC は以下の条件で行った.

ポンプ	: LC-6A (島津製作所)
カラムホルダ	: CTO-6A (島津製作所)
UV 検出器	: SPD-6A (島津製作所)
データ処理装置	: C-R3A (島津製作所)
分析カラム	: Nucleosil 50-5 4.6 ϕ × 250 mm (GL サイエンス)
ガードカラム	: Lichrosorb Si-60 4 ϕ × 4 mm (メルク)
移動相	: n-hexane/EtOH/CH ₃ Cl = 100/15/10 (V/V)
流速, 温度	: 1 ml/min, 40°C
測定波長	: UV 254 nm (0.002 AUFS)

2) ビーグル犬における NZ-105 の測定

Bond Elut C2 (100 mg/ml, Analytichem International) を用いた固相抽出を行った. Methanol : 0.2 M Na₂CO₃ = 1 : 1 の混液を 0.3 ml, 血漿を 0.5 ml 加え減圧下で Bond Elut に通したのち, H₂O および 50% methanol 溶液 1 ml で洗浄し, 95% methanol 溶液 0.35 ml で溶出させ, 内部標準物質 (P-851743) を 50 ng 添加して減圧乾固させた. n-hexane : ethanol = 3 : 1 の混合溶媒を 0.1 ml 加え再溶解させたのち, 35 μ l を HPLC に

注入し, 内部標準物質とのピーク高さ比により測定した. 定量限界は, 4 ng/ml であった. なお, HPLC は以下の条件で行った.

ポンプ	: LC-6A (島津製作所)
カラムホルダ	: CTO-6A (島津製作所)
UV 検出器	: SPD-6A (島津製作所)
データ処理装置	: C-R3A (島津製作所)
分析カラム	: Nucleosil 50-5 4.6 ϕ × 250 mm (GL サイエンス)
ガードカラム	: Lichrosorb Si-60 4 ϕ × 4 mm (メルク)
移動相	: n-hexane/MeOH/CH ₃ Cl/IPA = 240/30/5/5 (V/V)
流速, 温度	: 1 ml/min, 40°C
測定波長	: UV 254 nm (0.002 AUFS)

5. 体内動態の解析法

1) モデルによる解析

ラットおよびイスにおける静脈内投与時の血漿中濃度の実測値を 2-Compartment Model にあてはめ非線形最小二乗法 MULTI³⁾ を用いてパラメーターを算出した. 重みは 1/(測定値) とした. さらに, 得られたパラメーターを用いて, $t_{1/2}$ を $(\ln 2)/\beta$ で求め, $AUC_{0-\infty}$ を $(A/\alpha + B/\beta)$ で算出した. また, Total plasma clearance (CL_p) を $Dose/AUC_{0-\infty}$ で, Vd_{β} を $Dose/(\beta \cdot AUC_{0-\infty})$ で算出した.

2) モデルによらない解析

ラットおよびイスにおける静脈内投与時の実測値から最終測定時点までの AUC, MRT を台形公式で求め, それ以降の無限大時間までの $AUC_{0-\infty}$, $MRT_{0-\infty}$ は, 血漿中濃度を対数変換し消失相での傾き (kel) から外挿法により算出した. さらに, CL_p を $Dose/AUC_{0-\infty}$, Vd_{ss} を $CL_p \cdot MRT_{0-\infty}$ により算出した.

経口投与時の血漿中濃度の実測値から最高濃度を C_{max} , その到達時間を T_{max} とし, 0-24 時間までの AUC_{0-24} , MRT_{0-24} を台形公式で算出し

た. また, 血漿中濃度を対数変換し, 消失相での傾きから半減期 ($t_{1/2}$) を算出した. 経口投与時の absolute bioavailability (F) は, (用量 iv) * (AUCpo) / (用量 po) * (AUCiv) で算出した.

実験結果

1. ラットおよびイヌにおける静脈内投与

NZ-105 をラットに 1 mg/kg, イヌに 0.3 mg/kg の用量で静脈内投与した場合の血漿中濃度-時間推移を **Fig. 2** に示した. また, 2-Compartment Model にあてはめた際の各推定パラメーターを **Table 1** に示し, モーメント解析により得られたパラメーターを **Table 2** に示した.

静脈内投与後, NZ-105 は, 速やかに血中から消失し, ラットにおいては投与 4 時間以降, イヌにおいては投与 6 時間以降には定量限界以下となった. ラットおよびイヌにおいてともに明ら

Fig. 2 Plasma levels of NZ-105 in rats (●, 1 mg/kg) and dogs (■, 0.3 mg/kg) after intravenous administration. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 4 animals. The solid lines are the fitted curves by the 2-compartment open model.

かな二相性が認められ, 2-Compartment Model のあてはめにより, β 相での半減期は, ラットとイヌにおいて, それぞれ 1.35, 1.03 時間であった. また, モーメント解析により実測値から得られたパラメーター値 (AUC, CLp, $t_{1/2}$) と, モデル解析により得られたパラメーター値 (AUC, CLp, $t_{1/2\beta}$) がほぼ類似した値を示した.

2. ラットおよびイヌにおける経口投与

NZ-105 をラットに 5, 10, 20 mg/kg, イヌに 2, 5, 10 mg/kg の用量で経口投与した際の血漿中濃度-時間推移を **Fig. 3** および **Fig. 4** に示し, ラットにおける 10 mg/kg 投与時の摂食時と絶食

Table 1 Pharmacokinetic parameters of NZ-105 after intravenous administration in rats and dogs

Parameters	Rat	Dog
Dose (mg/kg)	1.0	0.3
A (ng/ml)	1374.7 $\pm$ 273.3	1006.1 $\pm$ 278.2
B (ng/ml)	469.0 $\pm$ 69.6	89.4 $\pm$ 12.9
α (1/hr)	11.13 $\pm$ 3.14	27.72 $\pm$ 3.99
β (1/hr)	0.551 $\pm$ 0.081	0.676 $\pm$ 0.027
AUC _{0-∞} (ng/ml*hr)	995.3 $\pm$ 79.4	166.3 $\pm$ 11.1
CLp (ml/min/kg)	17.1 $\pm$ 1.5	30.4 $\pm$ 1.9
$t_{1/2\alpha}$ (hr)	0.081 $\pm$ 0.023	0.026 $\pm$ 0.004
$t_{1/2\beta}$ (hr)	1.35 $\pm$ 0.20	1.03 $\pm$ 0.04
Vd _{β} (ml/kg)	1959.7 $\pm$ 264.3	2724.5 $\pm$ 230.5

Parameters were calculated using the 2-compartment open model.

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 animals.

Table 2 Pharmacokinetic parameters of NZ-105 after intravenous administration in rats and dogs

Parameters	Rat	Dog
Dose (mg/kg)	1.0	0.3
AUC _{0-∞} (ng/ml*hr)	990.3 $\pm$ 84.0	158.8 $\pm$ 13.7
MRT _{0-∞} (hr)	1.71 $\pm$ 0.18	1.73 $\pm$ 0.15
CLp (ml/min/kg)	17.3 $\pm$ 1.7	32.2 $\pm$ 2.7
kel (1/hr)	0.52 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.05
$t_{1/2}$ (hr)	1.39 $\pm$ 0.14	1.71 $\pm$ 0.20
Vd _{ss} (ml/kg)	1750.5 $\pm$ 173.3	3376.9 $\pm$ 541.8

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 animals.

Fig. 3 Plasma levels of NZ-105 in rats after single oral administration of 5 (□), 10 (○) and 20 (△) mg/kg of NZ-105. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 6 animals.

Fig. 5 Plasma levels of NZ-105 in rats after single oral (○: fasted, ●: unfasted) administration (Dose: 10 mg/kg). Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 5-6 animals.

Fig. 4 Plasma levels of NZ-105 in dogs after single oral administration of 2 (□), 5 (○) and 10 (△) mg/kg of NZ-105. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 3-4 animals.

時の血漿中濃度の比較を **Fig. 5** に示した。また、各経口投与時の血漿中濃度から得られたパラメーターを **Table 3** および **Table 4** に示した。

NZ-105 をラットに経口投与した場合、投与後 2.3~4.3 時間に C_{max} に達し、 T_{max} は以降速やかに血中より消失し投与 24 時間後には血漿中には検出されなかった。AUC は用量依存的に増加したが、 T_{max} は用量の増加に伴い遅延する傾向が認められた。また、絶食時の F (absolute bioavailability) は 19.5-25.0% であったが、摂食時には 10.0% で、約 60% 低下することが認められ、食餌の影響により、吸収率の低下する可能性が示唆された。

イスに経口投与した場合は、投与後速やかに吸収され、投与 1~2 時間後には C_{max} に達し、 T_{max} は以降速やかに血中より消失し投与 24 時間後には血漿中には検出されなかった。 C_{max} 、AUC とともに用量依存的に増加し、F は 4.9~5.6% とラットの約 25% であった。

Table 3 Pharmacokinetic parameters of NZ-105 after single oral administration in rats

Dose (mg/kg)	N	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC ₀₋₂₄ (ng/m/*hr)	t _{1/2} (hr)	MRT ₀₋₂₄ (hr)	F (%)
5 (fasted)	6	235.3±22.8	2.3±0.3	966.7±75.9	1.93±0.07	3.40±0.30	19.5±1.5
10 (fasted)	6	441.5±56.5	4.2±0.6	2486.3±363.2	1.71±0.28	4.27±0.19	25.0±3.6
10 (unfasted)	5	181.2±27.2	1.1±0.2	997.2±140.7	2.87±0.30	3.93±0.13	10.0±1.4
20 (fasted)	6	639.8±43.8	4.3±0.6	4750.2±347.5	2.23±0.80	5.67±0.25	23.9±1.7

Each value represents the mean±S.E.

Table 4 Pharmacokinetic parameters of NZ-105 after single oral administration in dogs

Dose (mg/kg)	N	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC ₀₋₂₄ (ng/m/*hr)	t _{1/2} (hr)	MRT ₀₋₂₄ (hr)	F (%)
2 (fasted)	3	13.7±3.8	2.0±0.0	56.0±36.5	—a)	3.39±1.31	5.1±3.3
5 (fasted)	4	26.5±6.3	2.0±0.0	156.0±72.6	1.80±0.64	3.84±1.06	5.6±2.6
10 (fasted)	4	48.3±13.4	1.1±0.3	271.5±142.4	2.86±1.14	3.66±1.19	4.9±2.6

Each value represents the mean±S.E.

a) Can not calculated.

考 察

NZ-105 は、尿中には未変化体でほとんど排泄されず、大部分が代謝されて胆汁中に排泄されることが既に報告されている⁴⁾。したがって、静脈内投与後の Total clearance の大部分が Hepatic clearance と考えられる。ラットにおける静脈内投与時の CL_p (Total plasma clearance) を、他のジヒドロピリジン系化合物と比較してみると、nicardipine では、115–197 ml/min/kg⁵⁾、nilvadipine では、94 ml/min/kg⁶⁾であったのに対し、NZ-105 では、17 ml/min/kg と小さいことから、他のジヒドロピリジン系化合物に比べて First-pass effect を受けにくい可能性が示唆された。¹⁴C-NZ-105 をラットに 10 mg/kg の用量で経口投与した際の吸収率は約62%⁴⁾であり、F (absolute bioavailability) が25%であったことから、吸収された量に対して、First pass effect を受ける割合は約60%であると考えられた。この値は、ラットに ¹⁴C-NZ-105 を経口投与後の血漿中総放射能に対する未変化体の割合 (投与後、0.5~4 時間で38–48%⁴⁾) と矛盾しなかった。また、ラットにおける経口投与後の T_{max} は、2.3~4.3時

間で、nicardipine⁵⁾や nilvadipine⁶⁾と比較して長く、吸収初期の急激な血中濃度の上昇は認められず、緩徐に消化管から吸収されていると考えられた。このことは、NZ-105 の緩徐な作用発現^{1,2)}と関連していると推察された。さらに、ラットに ¹⁴C-NZ-105 を経口投与した場合の血漿中放射能濃度において、飽食時の C_{max} や AUC が絶食時の約1/2になる⁴⁾ことから、緩徐な吸収のために、消化管の運動などによって食餌の影響を受けやすいことが考えられた。

一方、イヌにおける CL_p はラットの約2倍であり、ラットより大きな First pass effect を受ける可能性が考えられた。このことは、¹⁴C-NZ-105 をイヌに 10 mg/kg の用量で経口投与した際の血漿中総放射能に対する ¹⁴C-NZ-105 の割合が、投与後、0.5–4 時間で21–29%⁷⁾とラットに比べて低いことから推察された。

要 旨

NZ-105 をラットおよびイヌに静脈内投与と単回経口投与を行い、投与後の血漿中濃度推移を検討した。

1. ラットおよびイヌにそれぞれ、1.0, 0.3

mg/kg の用量で静脈内投与を行った結果、NZ-105 は二相性に消失し、消失相の半減期はそれぞれ1.35, 1.03 hr であった。

2. ラットに 5, 10, 20 mg/kg で経口投与を行った結果、生物学的利用率は、それぞれ19.5, 25.0, 23.9%であった。

3. ラットに摂食条件下で 10 mg/kg の経口投与を行った場合、生物学的利用率は10%で、食餌の影響を受ける可能性が示唆された。

4. イスに 2, 5, 10 mg/kg で経口投与を行った結果、生物学的利用率は、それぞれ5.1, 5.6, 4.9%であった。

文 献

- 1) Masuda, Y. Takeguchi, M. Arakawa, C. Sakai, T. Hibi, M. Tanaka, S. Shigenobu, K. and Kasuya, Y.: Antihypertensive and diuretic effects of NZ-105, a novel dihydropyridine derivative. *Arch. int. Pharmacodyn.* **304**, 247-264 (1990).
- 2) Tamura, T. Saigusa, A. and Kokubun, S.: Mechanisms underlying the slow onset of action of a new dihydropyridine, NZ-105, on a cultured smooth muscle cell line. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **343**, 405-410 (1991).
- 3) 山岡 清: マイコンによる薬物体内動態解析法, 南江堂 (1984).
- 4) 篠崎 豊, 檜森裕美子, 佐野 廣, 中別府 仁, 織田寿久, 江角凱夫, 関 英昌: NZ-105の生体内動態 (第1報) ラットにおける吸収, 分布, 代謝および排泄. *薬物動態*, **6**: 919-932 (1991).
- 5) Higuchi, S. Shiobara, Y.: Comparative pharmacokinetics of nicardipine hydrochloride, a new vasodilator, in various species. *Xenobiotica* **10**: 6, 447-454 (1980).
- 6) Tokuma, Y. Sekiguchi, M. Niwa, T. and Noguchi, H.: Pharmacokinetics of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in mice, rats, rabbits and dogs. *Xenobiotica* **18**: 1, 21-28 (1988).
- 7) 篠崎 豊, 檜森裕美子, 佐野 廣, 中別府 仁, 織田寿久, 江角凱夫, 関 英昌: NZ-105の生体内動態 (第3報) イスにおける吸収, 代謝, 排泄および蛋白結合. *薬物動態*, **6**: 945-953 (1991).