薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (11) 853-857 (1989)

新規 Thromboxane 合成酵素阻害剤 Sodium 4-[α -Hydroxy-5-(1-imidazolyl)-2-methylbenzyl]-3,5-dimethylbenzoate (Y-20811) の体内動態 (第2報¹⁾)

イヌにおける未変化体及び主代謝物の Pharmacokinetics

岩田稔夫,* 三ヶ島浩, 磯部正雄, 高松陸男, 横部哲朗

吉富製薬株式会社中央研究所

Pharmacokinetics of Sodium 4-[α -Hydroxy-5-(1-imidazolyl)-2-methylbenzyl]-3,5-dimethylbenzoate (Y-20811), a New Thromboxane Synthetase Inhibitor. II.¹⁾ Pharmacokinetics of Intact Drug and Main Metabolite in Dog

Toshio IWATA,* Hiroshi MIKASHIMA, Masao ISOBE,
Rikuo TAKAMATSU, and Tetsuo YOKOBE

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd.,
Koiwai Yoshitomi-cho, Chikujo-gun, Fukuoka 871, Japan

(Received March 20, 1989)

The pharmacokinetics of sodium 4-[α -hydroxy-5-(1-imidazolyl)-2-methylbenzyl]-3,5-dimethylbenzoate (I-Na) in the beagle dog was investigated after *p.o.* and *i.v.* administration. After the administration of I-Na at 3 mg/kg (*p.o.*), 70.9% of the dose was absorbed, and the maximum plasma concentration of free acid (I) was observed at 0.33 h. After *p.o.* administration, the area under the plasma concentration-time curve of I increased almost linearly in proportion to the dose.

The metabolite, 4-[α -hydroxy-2-hydroxymethyl-5-(1-imidazolyl)benzyl]-3,5-dimethylbenzoic acid (II) was also detected in the plasma, but the concentration of II was lower than that of I. After the administration at 3 mg/kg (*p.o.*), 27.7% and 3.8% of the dose were recovered as I and II, respectively, in the urine, and 32.2% and 30.1% recovered as I and II in the feces. Therefore, 93.8% of the dose was totally recovered within five days.

The inhibitory effect of II on the aggregation of rabbit platelets was studied *in vitro*. This metabolite showed only one sixth activity of I-Na. Thus, the inhibitory effect on the platelet aggregation of II is considered to be almost negligible in the beagle dog administered with I-Na.

Keywords—thromboxane synthetase inhibitor; imidazole derivative; pharmacokinetics; dog; HPLC; metabolite; platelet aggregation

新規な imidazole 誘導体 4-[α -hydroxy-5-(1-imidazolyl)-2-methylbenzyl]-3,5-dimethylbenzoic acid (I)²⁾ は、強力かつ持続性の thromboxane 合成酵素阻害作用を有する。³⁾ I のナトリウム塩⁴⁾ (I-Na) については、Y-20811 のコード名で、虚血性循環障害などの症例に対する治療薬として、現在、臨床試験が進められている。

すでに、著者らは、ビーグル犬に I-Na を経口投与した際の尿中代謝産物を検索し、主代謝物として 4-[α -hydroxy-2-hydroxymethyl-5-(1-imidazolyl)benzyl]-3,5-dimethylbenzoic acid (II) を単離して、化学構造を解明した。¹⁾

今回、I-Na をビーグル犬に静脈内あるいは経口投与した際の体内動態について検討し、更に、II の家兎血小板に対する凝集阻害作用についても検討し、I-Na を生体に投与した際の薬理作用に対する II の寄与について考察したので報告する。

実 験 の 部

1. 被験化合物及び試薬 I, I-Na, II 及び測定の際の内部標準物質として用いた 2-chloro-5-(1-imidazolyl)-

α -(2,4,6-trimethylphenyl)benzenemethanol (III) は、吉富製薬中央研究所で合成したものを使用した。ペントバルビタール・ナトリウム (PET-Na) は Abbott 社製を、ヘパリン・ナトリウムは清水製薬製を使用した。ジアゾメタンは、*N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミドより調製し、エチルエーテル溶液として用いた。⁶⁾ その他の各種試薬は、すべて市販特級品を使用した。

2. 実験動物 I-Na の体内動態の検討には、雄性ビーグル犬 (体重約 11 kg) を、また、II の血小板凝集阻害作用の検討には雄性日本白色種家兎 (体重約 3 kg) を用いた。

3. 薬物投与及び試料の採取 未変化体 (I) の体内動態を検討する目的で、3 匹のビーグル犬を用い、 3×3 ラテン方格に割り付けて I-Na を静脈内あるいは経口投与した。静脈内投与量は 3 mg/kg、経口投与量は 3 又は 30 mg/kg とした。静脈内には I-Na 3 mg/ml 生理食塩水溶解液を投与し、経口投与では 0.5% メチルセルロース溶液に I-Na 6 mg/ml を溶解あるいは 60 mg/ml を懸濁した液を、水 40 ml とともに投与した。なお、投与 24 h 前から 24 h 後までは、摂食を禁じたが、この間を通して水は自由に与えた。各投与は 7 日間の間隔をおいて行った。投与 15 及び 30 min 並びに 1, 2, 4, 7, 11, 24 及び 30 h 後に血液それぞれ約 3 ml を採取した。更に、静脈内投与の際には、投与 5 及び 10 min 後にも採血した。また、すべての投与例について、投与 48 h 後までの尿試料を採取した。

I 及び II の体内動態を同時に検討する目的で、別のビーグル犬 3 匹に、上述と同様にして、I-Na を 3 mg/kg 経口投与し、経時的に血液試料を採取するとともに、投与 120 h 後まで尿及び糞試料を採取した。

また、胆管カニューレを施したビーグル犬を用い、I 及び II の胆汁中排泄を検討した。PET-Na (50 mg/ml) を、25 mg/kg 静脈内に投与し麻酔したビーグル犬を手術台に固定して、大腿静脈にポリエチレンチューブによるカニューレを施し、更に実験終了時まで麻酔維持のため PET-Na を 4 mg/(kg·h) の速度で持続注入した。開腹して胆のうを結紮した後、胆管にポリエチレンチューブによるカニューレを施した。手術後表皮を縫合し、I-Na を 3 mg/kg 静脈内に投与し、胆汁試料を 1 h ごとに、投与 7 h 後まで採取した。

採取した血液試料に、1/40 量のヘパリン・ナトリウム溶液 (1000 単位/ml) を添加した後、直ちに遠心分離 (1500 g, 20 min) して血漿を分取した。尿試料は、あらかじめ pH 4 緩衝液 (McIlvaine 緩衝液: 0.2 M リン酸水素二ナトリウム/0.1 M クエン酸) 200 ml を入れた容器に 24 h ごとに採取し、尿量を測定した後その一部を試料として保存した。糞試料は、24 h ごとに採取し、pH 4 緩衝液を加え 1000 ml とし、ミキサーを用い均一に混和した後その一部を試料として保存した。すべての試料は薬物濃度測定時まで、 -20°C で保存した。

4. 薬物濃度の測定方法 あらかじめ設定した測定レンジ内の濃度 (5–2000 ng/ml) になるように水で希釈した血漿、尿、糞及び胆汁試料 1 ml に、pH 4 緩衝液 (McIlvaine 緩衝液) 1 ml を加え、酢酸エチル 4 ml で抽出した。有機層 3 ml を分取し、ジアゾメタンのエチルエーテル溶液 1 ml を加え、30 min 室温で放置後、0.1 N 塩酸 2 ml で振とう抽出した。水層 1.8 ml を分取し pH 6.8 緩衝液 (0.5 M リン酸水素二ナトリウム/0.5 M リン酸二水素カリウム) 1 ml を加え、内部標準物質として III を 20 μg 添加し、トルエン 2 ml で抽出した。トルエン層 1.8 ml を分取し、溶媒を留去後、ジクロロメタン 150 μl にて溶解した液 100 μl を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に導入した。

HPLC 装置は島津製作所製 LC-6A ポンプ及び Rheodyne 社製 model 7125 インジェクターを用いた。検出器は島津製作所製 RF-530 ケイ光検出器 (励起波長 298 nm, ケイ光波長 325 nm)、データ処理装置はクロマトパック C-R3A を用いた。固定相には順相のカラム Nucleosil 50-5 (20 cm $\times$ 4.6 mm i.d.; Macherey-Nagel 社製) を用いた。移動相には、メタノール-28% アンモニア水-ジクロロメタン (2.85:0.15:97, v/v) の混液を用い、流速は 2 ml/min とし室温で溶出した。I, II 及び III は、それぞれ約 3.4, 6.5 及び 3.0 min に溶出し、3 者は良好な分離を示した。なお、血漿試料中の I 及び II の検出限界は、それぞれ 5 及び 20 ng/ml であった。

また、抱合体を検索するために、各試料に 10 分の 1 量の 28% アンモニア水を添加し、 60°C で 15 min インキュベーションして抱合体を加水分解し、1 N 塩酸を加え pH を中性とした後、上述の方法と同様にして I 及び II の測定を行った。

5. 解析方法 最高血漿中濃度 ($C_{\max}$) は実測値の最大値を、最高血漿中濃度到達時間 ($t_{\max}$) は最大実測値を示す試料の採血時間を用いた。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は投与 30 h 後までは台形法により、30 h 以降については外挿して算出した。体循環到達率 (F) は経口投与時と静脈内投与時の AUC を投与量で補正した上で、両者の比 (AUC_{po}/AUC_{iv}) から算出した。累積尿中排泄率 (U) は、投与量 (D) に対する累積排泄量 (X_u) の比 (X_u/D) で表示した。

腎クリアランス (Cl_r) は尿中排泄量と AUC の比 (X_u/AUC) から算出した。

また、各時間の血漿中 I 濃度を 2-compartment open model に従った理論式に Levenberg-Marquardt 最小 2

乗法により回帰させて、 α , β 値を算出し、 α 相及び β 相の消失半減期 ($t_{1/2}$) を求めた。なお、有意差検定は、分散分析により行った。

6. 血小板凝集阻害作用の評価 あらかじめシリコン処理を施した注射筒に、採血量の 1/10 量の 3.8% クエン酸ナトリウムを加え、家兎から血液を採取した。採取した血液を 200 g で 10 min 遠心した上清を血小板多血漿 (PRP) とした。残りの血液を更に 1400 g で 10 min 遠心分離し上清を乏血小板血漿 (PPP) とした。血小板凝集能は、血小板凝集メーター (NKK PAT-6A) を用いて測定した。すなわち、1000 rpm で攪拌しながら PRP に I-Na あるいは II を各種濃度 (1—300 μ M) で添加し、2 分間 37°C でインキュベート後、アラキドン酸を添加して凝集を惹起した際の透光度の変化を経時的に測定した。Calibration は PRP (0%) と PPP (100%) を用いて行った。凝集の抑制は、最大透光度から算出した。

結果及び考察

I-Na を 3 mg/kg 静脈内投与、あるいは 3 又は 30 mg/kg 経口投与した際の血漿中の未変化体 (I) の濃度推移を Fig. 1 に示した。静脈内及び経口投与後の濃度は、いずれも 2 相性の消失を示した。3 mg/kg 経口あるいは静脈内投与 1 h 以後の血漿中の I の濃度推移は、よく一致した。また、30 mg/kg 経口投与後の濃度は、3 mg/kg 経口投与した際のそれらより約 10 倍高い値を示した。

これらの結果に基づき、薬動学的パラメーターを算出し、Table I に示した。3 mg/kg 経口投与した際の血漿中 I 濃度は、速やかに最高濃度に達し ($t_{\max}=0.33$ h), 更に AUC_{iv} との比較から求めた F は 71.3% であり、

TABLE I. Pharmacokinetic Parameters of I in Beagle Dogs

Parameters	3 mg/kg i.v.	3 mg/kg p.o.	30 mg/kg p.o.
$C_{\max}$ (μ g/ml)	—	2.96 $\pm$ 2.14	13.9 $\pm$ 4.2
$t_{\max}$ (h)	—	0.33 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.0
$AUC_{0-\infty}$ (μ g·h/ml)	5.71 $\pm$ 0.22	4.08 $\pm$ 0.92	32.7 $\pm$ 14.5
F (%)	—	71.3 $\pm$ 15.3	57.7 $\pm$ 26.5
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.40 $\pm$ 0.11	0.60 $\pm$ 0.20	0.57 $\pm$ 0.15
$t_{1/2\beta}$ (h)	9.5 $\pm$ 3.4	8.8 $\pm$ 2.2	10.5 $\pm$ 6.1
U (%)	32.2 $\pm$ 3.0	21.6 $\pm$ 11.2	16.5 $\pm$ 9.6
Cl_r (ml/h·kg)	146 $\pm$ 19	132 $\pm$ 43	126 $\pm$ 23

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 3 dogs.

Fig. 1. Plasma Levels of I in Beagle Dogs after Intravenous Administration of 3 mg/kg Dose (▲) and Oral Administration of 3 (●) and 30 (■) mg/kg Dose of I-Na

Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 3 dogs.

Fig. 2. Plasma Levels of I (●) and (II) (■) in Beagle Dogs after Oral Administration of 3 mg/kg Dose of I-Na

Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 3 dogs.

TABLE II. Cumulative Excretion of I and II in Urine and Feces after Oral Administration of 3 mg/kg Dose of I-Na in Beagle Dogs

	% of dose (0—120 h)		
	I	II	Total
Urine	27.7±6.1	3.8± 1.9	31.5±7.4
Feces	32.2±9.2	30.1± 9.4	62.3±1.1
Total	59.9±5.5	33.9±11.1	93.8±8.0

Each value represents the mean±S.D. of 3 dogs.

Fig. 3. Effects of I-Na (●) and II (■) on Arachidonic Acid-Induced Aggregation of Rabbit Platelets

I-Na の良好な生物学的利用性が示唆された。Table I に示すように、経口投与時の α 相及び β 相の $t_{1/2}$ 及び腎クリアランス Cl_r は、同用量を静脈内に投与した際の値と、いずれの場合においても有意差はなかった。投与 48 h 後までの I の尿中排泄率 U は、静脈内投与で 32.2%，経口投与で 21.6% であり、I-Na の吸収が良好であることが示唆された。

3 及び 30 mg/kg 経口投与した際の各パラメータを比較すると、両者の t_{max} , α 相及び β 相の消失半減期並びに Cl_r に有意差はなく、ほぼ一致した。F 及び尿中排泄率は、高投与量時の方が低い値を示したものの、両者間に統計学的に有意な差は認められなかった。また、AUC はほぼ用量に比例して増加したことより、I は、30 mg/kg 以下の用量ではほぼ線形の体内動態を示すものと考えられる。

別途、I-Na を 3 mg/kg 経口投与し、血漿、尿及び糞試料中の I 及び II を測定した。血漿中 II 濃度は、I 濃度に比べて低く、投与 1—4 h 後では I の約 1/10 の濃度であり、7 h 以降 II は検出されなかった (Fig. 2)。なお、血漿中には I 及び II の抱合体は検出されなかった。

投与 5 日後までの尿中に、I は投与量の平均 27.7% が、II は 3.8% が排泄され、両者の和は 31.5% であった。また、糞中には I が 32.2%、II が 30.1% 排泄され、両者の和は 62.3% であった (Table II)。なお、I 及び II の抱合体は尿、糞中ともに検出されなかった。

麻酔下胆管カニューレを施したビーグル犬を用い胆汁を採取したところ、投与 7 h 後までに胆汁中に投与量の約 10% の未変化体 I が排泄されたが、胆汁をアルカリ加水分解後測定した際には投与量の約 30% の I が回収された。この結果は、I の一部は抱合体として胆汁中に排泄されることを示している。また、代謝物 II についても加水分解を行うことでその濃度が約 3 倍に増加したことより、体内で抱合化を受けるものと推察された。しかし、糞試料中からは抱合体が検出されなかったことより、胆汁中に排泄されたこれら抱合体は、消化管内でほぼ完全に加水分解されるものと推定される。

Table II に示すように、尿中排泄率 31.5% と糞中排泄率 62.3% を合わせた全回収率は 93.8% であり、投与量の大部分が I 又は II として回収できた。これらの結果から、I の一部は II へ代謝され、更に I 及び II は一部抱合反応を受けるが、これら以外には、主要な代謝経路は存在しないものと推察された。

血小板凝集阻害作用の検討には、感受性の高い家兎を用いた。家兎の PRP に、各種濃度の I-Na あるいは II を添加した後、アラキドン酸を加え、凝集阻害率を測定した。血小板凝集に対する 50% 阻害濃度は、I で約 30 μ M、II では 200 μ M であり、I は II に比べて強い活性を示した (Fig. 3)。

II は I に比べて血漿中での濃度が低く、しかも、薬理活性も弱いことから、I-Na を投与した際の血小板凝集阻害作用は、主として I に由来するものと考えられる。

引用文献及び注

- 1) 岩田稔夫, 鶴田峯生, 出水賢一, 磯部正雄, 高松陸男, 横部哲朗, 薬誌, 109, 636 (1989)
- 2) 鶴田峯生, 三ヶ島浩, 大江孝範, 川崎和幸, 瀬戸口信郎, 中 洋一, 田原哲治, 薬誌, 109, 33 (1989).

-
- 3) H. Mikashima, H. Ochi, Y. Muramoto, H. Yasuda, M. Tsuruda, Y. Maruyama, *Thrombosis Research*, **43**, 455 (1986).
 - 4) 鶴田峯生, 塩月宜子, 松本 隆, 大江孝範, 薬誌, **109**, 26 (1989).
 - 5) 野村祐次郎, 務台 潔, “新実験化学講座 14 卷, 有機化合物の合成と反応 [III],” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1978, pp. 1550—1551.