薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (7) 474-479 (1989)

抗アレルギー薬 1-(2-Ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-
1H-benzimidazole Difumarate (KG-2413) のラジオレセプターアッセイ
における活性代謝物の交差性¹⁾

浜田 司,* 川島恒男, 栗田則男
鐘紡株式会社 薬品研究所

Cross-Reactivities of Active Metabolites in the Radioreceptor Assay of an
Antiallergic Agent, 1-(2-Ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-
diazepin-1-yl)-1H-benzimidazole Difumarate (KG-2413)¹⁾

Tsukasa HAMADA,* Tsuneo KAWASHIMA and Norio AWATA
Pharmaceuticals Research Center, Kanebo, Ltd., 5-90, Tomobuchi-cho
1-chome, Miyakojima-ku, Osaka 534, Japan

(Received January 6, 1989)

A new antiallergic agent, 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-1H-benzimidazole difumarate (KG-2413), was orally administered to guinea pigs at a dose of 2 mg/kg.

The drug levels in the plasma measured by the radioreceptor assay (RRA) method were significantly higher by 7% than those by the gas chromatographic (GC) method which was selective for the intact drug.

Among the metabolites of KG-2413, 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-1H-1,4-diazepin-1-yl)-1H-benzimidazole (desmethyl metabolite) and 1-(2-ethoxyethyl)-5-hydroxy-2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-1H-benzimidazole (5-hydroxy metabolite) had relatively high cross-reactivities of 29% and 21%, respectively, on the RRA method. However, the 5-hydroxy metabolite was not extracted with benzene under strongly basic conditions on the extraction procedure carried out prior to the receptor assay. Therefore, it was suggested that the desmethyl metabolite might affect the RRA method. In order to determine the amount of the desmethyl metabolite in the plasma, a high-performance liquid chromatographic method was established to determine the dansyl derivative of the desmethyl metabolite. By using this method, it was found that the desmethyl metabolite corresponding to 21-32% of the intact drug was present in the plasma after oral administration of KG-2413 at a dose of 2 mg/kg. Taking account of the cross-reactivity (29%) and extraction ratio (83%) of the desmethyl metabolite, this active metabolite affects the RRA method to give 5.1-7.7% overestimation of the intact drug concentration. Therefore, it became clear that the presence of the active desmethyl metabolite resulted in the difference between the GC and RRA method.

Keywords—antiallergic agent; 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-1H-benzimidazole difumarate (KG-2413); radioreceptor assay; active metabolite; HPLC; histamine H₁ receptor

緒 言

ラジオレセプターアッセイ (RRA) 法は薬理活性のスクリーニングやホルモン濃度の測定等に利用されてきたが, 1977 年 Creese, Snyder²⁾ が血清中のハロペリドール等の向精神薬の濃度測定に応用して以来, 生体試料中の薬物濃度測定法として注目されるようになった. しかしながら, RRA 法はそれ自身の持つ特性から, 活性体の総量を測定できるという有用性がある反面, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やガスクロマトグラフィー (GC) 等の機器分析に比較すると, 未変化体の測定法としては活性代謝物が共存する場合選択性に欠けるという点に注意しなければならない.

著者らは、新規抗アレルギー薬、1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-1*H*-benzimidazole difumarate (KG-2413) の薬物速度論的研究を行うために、RRA 法による血漿中薬物の微量定量法を確立した。⁸⁾ 更に KG-2413 を 2 mg/kg 経口投与したモルモットの血漿中濃度を RRA 法により測定すると同時に GC 法により KG-2413 遊離塩基 (未変化体) の濃度を測定し、両者を比較したところ RRA 法の方がわずかに高い値を示すことを報告した。⁸⁾ 両値の差が RRA 法における活性代謝物の交差性に起因している可能性が予想されるので、活性代謝物 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-1*H*-benzimidazole (脱メチル体) の HPLC 法による微量定量法を確立し、モルモットにおける活性代謝物の挙動と RRA 法における交差性に関し詳細に検討した。

実験の部

材料 KG-2413 は前報⁸⁾ と同一のものを使用した。1-(2-Ethoxyethyl)-2-(hexahydro-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-1*H*-benzimidazole (脱メチル体)、2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-1-(2-hydroxyethyl)-1*H*-benzimidazole (脱エチル体)、1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-1*H*-benzimidazole *N*-oxide (*N*-オキシド体)、1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-5-oxo-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-1*H*-benzimidazole (5'-オキソ体)、1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-4-hydroxy-1*H*-benzimidazole (4 位水酸化体)、1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-5-hydroxy-1*H*-benzimidazole (5 位水酸化体)、1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-6-hydroxy-1*H*-benzimidazole (6 位水酸化体) 及び 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1*H*-1,4-diazepin-1-yl)-7-hydroxy-1*H*-benzimidazole (7 位水酸化体) は当研究所にて合成した。ダンシルクロライドは生化学用を、ベンゼンは残留農薬試験用を、その他の試薬は試薬特級を和光純薬工業(株)より購入した。

動物実験 Hartley 系雄性モルモット (体重 240—320 g) は Keali Co., Ltd. より購入し、1 週間の予備飼育の後、実験に供した。投与に先立ち一夜絶食したモルモットに KG-2413 の水溶液 (0.6 mg/ml) を 2 mg/kg の投与量で、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に投与した。投与後 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 及び 4 時間に腹下大静脈よりヘパリンを添加したプラスチックシリンジにて血液 5—6 ml を採取し、採血後直ちに動物を頸椎脱臼死させた。血液は直ちに遠心分離して、血漿を分離した。得られた血漿は分析に供するまで -20°C にて保存した。

RRA 法 放射性リガンドとして [³H]メピラミン (比放射能 26Ci(962 MBq)/mmol, アマ-ジャム・ジャパン(株))を用い、またレセプターはモルモットの小脳を 50 mM Na/K リン酸塩緩衝液 (pH 7.5) にて懸濁することにより調製し、前報⁸⁾ に従って行った。

GC 法 前報⁴⁾ に従って行った。なお測定試料は次のように調整した。血漿 1 ml に 0.2 N NaOH 1 ml を加えて強塩基性となし、ベンゼン 6 ml にて抽出した。有機層 5 ml を分取し、1 N HCl 2 ml を加えて逆抽出後、有機層を除去した。水層に 5 N NaOH 0.5 ml を加えて強塩基性となし、ベンゼン 6 ml にて抽出した。有機層 5 ml を分取し、濃縮後 GC に供した。

血漿中脱メチル体の定量 血漿 1 ml に 0.2 N NaOH 1 ml を加えて強塩基性となし、ベンゼン 6 ml にて抽出した。有機層 5 ml を分取し、窒素気流下、約 40°C で乾固した。残渣にダンシルクロライドのアセトン溶液 (100 µg/ml) 100 µl 及び 0.2 M Na/K リン酸塩溶液 (pH 9.0) 50 µl を加えた後、40°C にて 20 分間反応させた。反応後、0.2 M Na/K リン酸塩溶液 (pH 9.0) 1 ml を加え、ベンゼン 6 ml にて抽出した。有機層 5 ml を分取し、窒素気流下、約 40°C で乾固した。残渣を HPLC 溶出液 0.1—1 ml に溶解し、その 10 µl を HPLC に供した。

HPLC は Waters 6000A 型ポンプ、U6K 型インジェクター及び島津 RF-530 型蛍光検出器を用いた。蛍光検出器の励起波長は 340 nm、蛍光波長は 489 nm とした。カラムは µPorasil® (5 µm, 30 cm×5 mm i.d., Waters Assoc.) を用い、溶出液は酢酸エチル-*n*-ヘキサン-1-プロパノール-トリエチルアミン (45:55:1:0.02, v/v), 溶出速度は 1.0 ml/min とした。

結 果

1. GC 法と RRA 法の比較

モルモット血漿中薬物濃度を GC 法及び RRA 法により測定し比較した (Fig. 1)。

ブランク血漿に既知量の KG-2413 を添加した試料では両法で良く一致した値が得られ、GC 法に対する RRA 法による測定値の比 (RRA/GC) は 0.993 ± 0.0596 (平均±標準偏差, $n=12$) であり、対応のある *t* 検定により有意差は認められなかった。一方、2 mg/kg の KG-2413 を経口投与したモルモット血漿中濃度を測定したところ、

Fig. 1. Comparison of the Radioreceptor Assay and Gas Chromatographic Method for the Determination of KG-2413 in Plasma

○, guinea pig plasma samples spiked with KG-2413;
●, plasma samples obtained from guinea pigs after oral administration of KG-2413 at a dose of 2 mg/kg.

投与後のいずれの測定時点においても RRA 法による方がわずかに高く、RRA/GC は 1.063 ± 0.106 (平均±標準偏差, $n=21$) であり、対応のある t 検定により有意差 ($p < 0.01$) が認められた。添加試料と投与試料の RRA/GC を Student's t 検定により統計処理したところ、危険率 5% 以下で有意な差が認められた。

2. KG-2413 及び代謝物のヒスタミン H_1 レセプターへの親和性

KG-2413 と主要代謝物及び類縁化合物のヒスタミン H_1 レセプターへの交差率を測定した (Table I)。代謝物中脱メチル体及び 5 位水酸化体の結合交差率が最も高くそれぞれ 29 及び 21% であった。脱エチル体、N-オキシド体及び 6 位水酸化体の親和性は低く、交差率は 2% 以下であった。なお 5'-オキシド体のヒスタミン H_1 レセプターへの親和性は極めて低く交差率は 0.01% 以下であった。

3. RRA 法における KG-2413 及び代謝物の抽出率

KG-2413 及び代謝物の pH による抽出率の変化を Fig. 2 に示す。未変化体、脱メチル体及び脱エチル体の抽出率は pH の上昇に伴い高くなり、pH 13 においてそれぞれ 99%、83% 及び 22% であった。一方、5 位及び 6 位水酸化体は酸性あるいは強塩基性では抽出されず、pH 10 付近で最も高い抽出率を示し、それぞれ 26% 及び 18% であった。N-オキシド体はいずれの pH においても抽出されなかった。

4. 血漿中脱メチル体の定量法

血漿中脱メチル体はベンゼンにより抽出後、ダンシル誘導体とし、蛍光検出器を接続した HPLC にて分離定量した。

モルモットのブランク血漿に脱メチル体を添加し、実験の部に示した測定法に従い操作した結果、脱メチル体

TABLE I. Cross-Reactivities of KG-2413 Metabolites and Related Compounds

Metabolites	Cross-reactivities (%)
KG-2413 base	100
Desmethyl metabolite	28
Desethyl metabolite	0.8
N-Oxide metabolite	0.6
5-Hydroxy metabolite	21
6-Hydroxy metabolite	1.7
4-Hydroxy compound ^{a)}	1.9
7-Hydroxy compound ^{a)}	2.9
5'-Oxo compound ^{b)}	≤ 0.01

a) Both hydroxy compounds were not detected as a metabolite in rats and guinea pigs.^{5,6)} b) The 5'-oxo compound was not detected as a metabolite but the desmethyl-5'-oxo, desethyl-5'-oxo, 5-hydroxy-5'-oxo and 6-hydroxy-5'-oxo metabolites were identified in rats and guinea pigs.^{5,6)}

Fig. 2. Extraction Ratios of KG-2413 and Its Metabolites with Benzene under Various pH

1, KG-2413 base; 2, desmethyl metabolite; 3, desethyl metabolite; 4, 5-hydroxy metabolite; 5, 6-hydroxy metabolite.

The N-oxide metabolite was not extracted at any pH.

Fig. 3. HPLC Obtained from (a) Guinea Pig Blank Plasma and (b) Guinea Pig Plasma Spiked with the Desmethyl Metabolite (2 ng/ml)

A, peak of the dansyl derivative of the desmethyl metabolite

Fig. 5. Effect of Temperature on the Reaction of the Desmethyl Metabolite with Dansyl Chloride

■, 0°C; ▲, 25°C; ●, 40°C.

Fig. 4. Effect of pH on the Reaction of the Desmethyl Metabolite with Dansyl Chloride

Fig. 6. Calibration Curve for the Determination of the Desmethyl Metabolite in Guinea Pig Plasma

TABLE II. Accuracy and Reproducibility of the Assay

Desmethyl metabolite (ng/ml) Added	Desmethyl metabolite (ng/ml) Found (mean±S.D., n=5)	Coefficients of variation (%)	Accuracy (%) (mean±S.D., n=5)
1.0	1.07±0.019	1.8	7.0±2.4
2.0	1.88±0.076	4.0	-6.0±4.3
10.0	10.29±0.143	1.4	2.9±1.4
25.0	24.91±0.273	1.1	0.3±1.1
50.0	50.49±1.304	2.6	1.0±2.6

のダンシル誘導体は保持時間約 12 分で溶出された。一方、ブランク血漿中ではその保持時間にピークは認められなかった (Fig. 3)。

脱メチル体のダンシル誘導体生成反応につき反応時の pH と温度条件について検討した。Fig. 4 に示すように、40°C、20 分の反応で pH 6 以下では 30% 以下の反応率であった。pH の上昇に伴い誘導体生成量は上昇し、pH 7 以上でプラトーに達した。しかしながら、pH 11 では生成量の低下が認められた。

温度による影響を調べたところ、Fig. 5 に示すように、0°C では pH 9、60 分においても反応は不十分であった。しかし、25 及び 40°C ではそれぞれ 30 及び 10 分で反応生成量はプラトーに達した。以上のことから、ダン

シル化反応条件を pH 9, 40°C, 20 分に設定した。

モルモットのブランク血漿に脱メチル体 0.5—50 ng/ml を添加し、検量線を作成したところ濃度とピーク高さにほぼ原点を通る良好な直線関係 ($r = 0.9999$, $n = 7$) が認められた (Fig. 6)。この検量線を用いて定量の正確度と再現性を調べたところ、Table II に示すように良好な正確度 (添加量に対する測定値の偏差 (%) の平均 -6.0 — 7.0%) と再現性 (変動係数 4.0% 以下) を示した。検出限界は S/N 比 3 で 0.4 ng/ml であった。

5. モルモットにおける未変化体及び脱メチル体の血漿中濃度

モルモットに 2 mg/kg の KG-2413 を経口投与し血漿中脱メチル体を測定すると同時に、GC 法及び RRA 法による薬物濃度の測定を行った。Fig. 7 に示すように、RRA 法により得られた薬物濃度はいずれの時点においても未変化体濃度より高く、ほぼ並行した推移を示した。一方、脱メチル体は投与後 30 分に最高血漿中濃度 18.7 ± 5.4 ng/ml (平均 $\pm$ 標準偏差, $n = 3$) に到達し、以後未変化体とほぼ並行して漸時減少し、4 時間後には検出限界以下となった。

Fig. 7. Plasma Levels of KG-2413 Base Measured by the Gas Chromatographic Method (●), KG-2413 Base Plus Its Some Active Metabolites Measured by the Radioreceptor Assay (▲) and the Desmethyl Metabolite Measured by the HPLC Method (○) after Oral Administration of KG-2413 at a Dose of 2 mg/kg to Guinea Pigs

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

考 察

KG-2413 を 2 mg/kg 経口投与したモルモットの血漿及びブランク血漿に KG-2413 を添加した試料中の薬物濃度を GC 法及び RRA 法により測定した (Fig. 1)。添加試料では両法の測定値はよく一致しその比は約 1 であったのに対し、投与試料では RRA 法による測定値がいずれも有意に高かった。投与試料の RRA/GC 比 (1.063) を添加試料での比 (0.993) で補正すると RRA 法は GC 法に比較して血漿中薬物濃度を約 7% 過剰評価していることがわかった。

RRA 法は薬物のレセプターへの親和性を利用した測定法であるため、活性代謝物の交差が予想される。KG-2413 のラット及びモルモットにおける主要代謝物は同定、定量され、主な代謝様式が明らかにされている。^{5,6)} これら代謝物のうち脱メチル体及び 5 位水酸化体が KG-2413 に次いで比較的高い結合親和性を示した (Table I)。

互いに位置異性体である 4 位、5 位、6 位及び 7 位水酸化体のうち、5 位及び 6 位水酸化体のみが代謝物として認められており 4 位及び 7 位水酸化体は検出されていない。^{5,6)} またヒスタミン H_1 レセプターへの親和性についても、5 位水酸化体は比較的高い交差率を示したが、4 位、6 位及び 7 位水酸化体は 2% 以下であり位置選択性が認められた。クロルプロマジンにおいてもフェノチアジン環の水酸化位置によってドーパミンレセプターへの結合親和性が異なり、3 位水酸化体では親和性が高くなるのに対して 8 位水酸化体では著しい低下が認められることが報告されている。⁷⁾

KG-2413 投与後血漿中薬物濃度を RRA 法で定量する場合、血漿中内因性物質と放射性リガンドとの結合を出来る限り少なくし、定量の感度をより高めるため試料の前処理として強塩基性 (約 pH 13) 下でベンゼン抽出を行っている。⁸⁾ 代謝物のうち強塩基性下で高い抽出率を示したのは脱メチル体のみであり、脱エチル体は抽出されるもののその率は低く、しかもヒスタミン H_1 レセプターへの結合親和性も低い。したがって、脱メチル体のみが高い抽出率 (Fig. 2) 及び結合親和性 (Table I) を示し、RRA 法に影響を及ぼすことが示唆された。なお 5 位水酸化体は RRA 法の前に行うベンゼン抽出により RRA 法に影響を及ぼすことはないが、モルモットにおいて代謝物としても少ないことがすでに報告されている。⁶⁾

そこで血漿中脱メチル体の微量定量法を検討した。脱メチル体をダンシル誘導体とした後、蛍光検出すると 50 ng/ml の濃度まで良好な直線を示す検量線が得られ (Fig. 6), 高感度定量が可能となった。

KG-2413 を 2 mg/kg 経口投与後のモルモット血漿中脱メチル体濃度は (Fig. 7), 未変化体と同様、投与後 0.5 時間に最高濃度に到達し、その濃度は未変化体の $28 \pm 3.1\%$ (平均 $\pm$ 標準偏差, $n=3$) であった。また脱メチル体濃度は投与後 0.25—3 時間で未変化体とほぼ並行した推移を示し、未変化体の平均 21—32% に相当した。RRA 法における脱メチル体の前処理での抽出率 (83%) 及びヒスタミン H_1 レセプターへの結合親和性 (交差率 29%) を考慮すると RRA 法は GC 法により測定したモルモット血漿中未変化体濃度よりも 5.1—7.7% 過剰評価することがわかる。GC 法と RRA 法の測定値を比較した場合、後者の方が 7% 程度高く、その差が活性代謝物である脱メチル体に起因することが示された。

KG-2413 の臨床用量は 1 回 2 mg 前後と極めて少なく、血漿中未変化体濃度の機器分析⁴⁾ は感度の面で問題があり、また代謝物も低濃度と予想されることから、機器分析による定量はいずれも困難と考えられる。RRA 法は高感度な定量が可能であるが、本検討結果から一部の活性代謝物が交差することが確認された。ヒトにおける薬物速度論的解析を行うためには血漿中未変化体濃度を分離定量することが必要であり、RRA 法を臨床試験に応用する場合、得られた定量値が未変化体のみの値であるか否か明らかにすることが重要である。RRA 法がヒト血漿中濃度の測定にも有用であり、また活性代謝物はほとんど存在しないことを一部報告したが、¹⁾ 詳細については別途報告する予定である。

引用文献及び注

- 1) 日本薬学会第 106 年会で一部を発表、千葉、1986 年 4 月。
- 2) I. Creese, S. H. Snyder, *Nature* (London), **270**, 180 (1977).
- 3) T. Hamada, M. Kadowaki, N. Awata, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3329 (1987).
- 4) T. Hamada, M. Kadowaki, Y. Nakamura, N. Awata, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1168 (1986).
- 5) 栗田則男, 高橋秀之, 能海和宣, 酒井孝範, 浜田 司, 薬誌, **109**, 318 (1989).
- 6) 和田幸雄, 高橋秀之, 浜田 司, 酒井孝範, 川島恒男, 栗田則男, 薬物動態, 受理。
- 7) I. Creese, A. A. Manian, T. D. Prosser, S. H. Snyder, *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 291 (1978).