Bufalin のラットにおける体内動態

東間章二,^a 平井康晴,^a 杉本智潮,^a 庄司政満,^a 小國泰弘,^a
森下信一,^{*,a} 伊藤千尋,^a 堀江正信^b
救心製薬(株) 総合研究所,^a 東京薬科大学^b

Metabolic Fate of Bufalin in Rats

Shouji TōMA,^a Yasuharu HIRAI,^a Chishio SUGIMOTO,^a Masamichi SHOJI,^a
Yasuhiro OGUNI,^a Shin-ichi MORISHITA,^{*,a} Chihiro ITO^a
and Masanobu HORIE^b

Research Laboratories of Kyushin Pharmaceutical Co., Ltd.,^a 1-31-7 Wada,
Suginami-ku, Tokyo 166, Japan and Tokyo College of Pharmacy,^b
1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03, Japan

(Received May 16, 1991)

In an attempt to evaluate the metabolic fate of "Kyushin", which is a traditional medicine containing Toad venom, a ³H-labeled compound of bufalin, which is one of the main active components, has been synthesized. The metabolic fate of the ³H-bufalin was studied after its single and repeated oral administration in rats.

After a single administration of the ³H-bufalin (20 μg/kg), the radioactivity in the blood reached a maximum level at 15 min. The radioactivity in the blood declined in a triphasic manner with half-life times of 18 min, 2.6 and 86 h.

Within 24 h after the single administration, the excretion of the radioactivity into the urine and feces amounted to 1.3% and 81% of the administered dose, respectively.

Tissue radioactivity was higher in the stomach, small intestine, liver, lung, kidney and pancreas, while the radioactivity in other tissues was lower than that in blood. Radioactivity disappeared rapidly from any tissues.

In case of repeated administration for 14 d, the disposition of radioactivity was almost same as the result after a single dosing, and radioactivity scarcely remained in any tissues after the last administration.

Keywords—bufalin; blood level; distribution; metabolism; excretion; rat

緒 言

「救心」はセンソ、ゴオウ、ニンジンなど8種類の生薬から成る強心剤である。その強心作用の主薬効成分がセンソと考えられること¹⁾から、著者らはセンソ中の bufadienolides に着目し、体内動態を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)²⁾ や enzyme immunoassay (EIA)³⁾ により検討してきた。しかし、通常1日に服用される「救心」量を bufadienolides 量に換算するとその量はおよそ 20 μg/kg となり、HPLC や EIA の感度では測定が困難であるため、通常の服用量より高い用量で検討しなければならなかった。今回 bufadienolides 中で薬理活性が高く、⁴⁾ またセンソ中の含量が比較的高い⁵⁾ bufalin (Fig. 1) の体内動態を検討するために、比放射能の極めて高い ³H 標識 bufalin (³H-bufalin) を合成した。

この標識体を用い、単回及び連続経口投与時の bufalin のラットにおける体内動態を検討した。

さらに、³H-bufalin が「救心」中の bufadienolides の 10% に相当するように、³H-bufalin に「救心」あるいはセンソを加え、「救心」中に共存する成分の血中濃度に及ぼす影響についても検討した。

実 験 の 部

1. 標識体 ³H-Bufalin は、著者らが提示した以下の合成経路 (Fig. 1) に従って Amersham 社で合成された。

Fig. 1. Synthetic Route of ^3H -Bufalin

bufalin: $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{H}$
 3α -bufalin: $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OH}$
 *, labelled position of ^3H .

3-Ketobufalin—Bufalin 200 mg と 4-methyl morpholine *N*-oxide 93 mg を dichloromethane 5 ml に溶解し, tetrapropylammonium perruthenate 12 mg を加え 1 時間攪拌した. 反応液を濃縮後, 薄層クロマトグラフィー (TLC, シリカゲル, 展開溶媒: chloroform-acetone-hexane (3:3:4, v/v) (展開溶媒 A)) により 3-ketobufalin (R_f 0.7) を単離した (収率 46%).

^3H -Bufalin—3-Ketobufalin 20 mg の dimethylformamide (300 μl) 溶液と $^3\text{H}_2\text{O}$ 15 μl (1.85 TBq) を 10% platinum charcoal 15 mg と共に 16 時間 80°C で振盪した. 溶媒及び遊離トリチウムを減圧留去し, 残渣を ethanol に溶解後触媒を濾過した. 濾液を減圧留去し, methanol 3 ml に再溶解し, sodium borohydride 4 mg を加え 30 分間攪拌した後, 反応混合物を上記の条件で TLC で分離し, ^3H -bufalin (R_f 0.6) と ^3H - 3α -bufalin (R_f 0.5) をそれぞれ単離した. ^3H -Bufalin はさらに HPLC (カラム: Zorbax octyl 25 cm $\times$ 1 cm, 移動相: methanol-water (50:50, v/v) から methanol ヘグラジエント) にて精製した.

^3H -Bufalin の比放射能は 2.57 TBq/mmol, 放射化学的純度はラジオ TLC 及びラジオ HPLC で 98% 以上であった.

2. 実験動物 雌雄 Wistar 系ラット (5週齢) を日本エスエルシーより購入し, 6—7 日間予備飼育した. 単回投与実験において, ラットは投与前約 18 時間絶食し, 投与後 5 時間より給餌を再開した.

3. 使用薬物 Bufalin は小松らの方法⁶⁾を参考にセンソより単離精製したものを使用した. 3α -Bufalin は Pettit と Kamano の方法⁷⁾を準用し, bufalin より合成した. HPLC で求めた純度は 99% 以上であった. また, 「救心」(KY-2¹⁾ 及び KY-R, 救心製薬) 及びセンソを使用した. KY-2 はその 90 mg 中にセンソ 5 mg, ゴオウ 3 mg, ニンジン 25 mg, レイヨウカク 6 mg, ジャコウ 1 mg, 動物胆 8 mg, シンジュ 7.5 mg, リュウノウ 2.7 mg を含有する. KY-R は KY-2 の処方のジャコウの代わりにロクジョウ 5 mg を加え, ニンジンを 25 mg, 動物胆を 6 mg に変えた処方である.

4. 投与液の調製及び投与方法 1) 経口投与— ^3H -Bufalin の ethanol 溶液 100 μl に 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) 水溶液を加えて 10 ml とし, 投与液とした. 投与液量は 10 ml/kg, 最終 ethanol 濃度は 1% 以下とした. 用量は 20 あるいは 200 $\mu\text{g/kg}$ の 2 用量, 投与放射能は全身オートラジオグラフィーでは 131 MBq/kg, その他の実験では 18.5 MBq/kg とした. Bufalin の代謝に及ぼす KY-2, KY-R あるいはセンソ中の成分の影響の検討では, ^3H -bufalin 13.1 MBq/2 $\mu\text{g/kg}$ に bufalin 18 $\mu\text{g/kg}$ 相当の KY-2, KY-R (1.62 mg/kg) あるいはセンソ (90 $\mu\text{g/kg}$) を加えて投与した.

2) 静脈内投与— ^3H -Bufalin の ethanol 溶液 200 μl に生理食塩水を加え 10 ml とし, 投与液とした. 投与液量は 5 ml/kg, 最終 ethanol 濃度は 2% とし, ^3H -bufalin 18.5 MBq/20 $\mu\text{g/kg}$ を尾静脈より投与した.

5. 放射能測定 放射能は液体シンチレーションカウンタ (LSC-900, Aloka) で測定した。血清、尿、胆汁は Aquasol-2 (NEN) に溶解し測定した。血液は採血用濾紙 (東洋濾紙) に吸着させ、24 時間以上風乾し 1 時間室温下で減圧乾燥した後、糞は同量の水と混ぜ合わせその一部を正確に濾紙カップ (Aloka) に秤量し室温下で 2 時間減圧乾燥した後、組織及び臓器は正確に濾紙カップに秤量し室温下で 3 時間減圧乾燥 (五酸化リン) した後、全自動試料燃焼装置 (ASC-113, Aloka) で燃焼した。

6. 血中濃度測定 雄と雌ラットを用い、 ^3H -bufalin を投与後所定の時間に尾静脈より血液 50 又は 100 μl を採取した。

7. 尿・糞中排泄 雄ラットに ^3H -bufalin を経口投与後、尿と糞を所定の時間に分別採取した。

8. 胆汁中排泄 Ether 麻醉下、雄ラットの胆管にポリエチレンチューブ (SP-35, 夏目製作所) を挿入し、覚醒後 ^3H -bufalin を経口投与し、投与後所定の時間に胆汁を採取した。

9. 組織内分布 雄と雌ラットを用い、 ^3H -bufalin を経口投与後、所定の時間にラットの頸動脈を切断し放血死させ、諸臓器及び組織の一部を摘出した。

10. 全身オートラジオグラフィ 雄ラットに ^3H -bufalin を経口投与後、所定の時間に ether 麻醉死させ、dry ice-acetone 中で凍結し、CMC で凍結包埋した。凍結切片 (約 20 μm) を接着テープに貼りつけ、凍結乾燥し、コニカマクロオートラジオグラフィフィルム (^3H タイプ, コニカ) と 60 日間露出した後、全身オートラジオグラム (ARG) を得た。

11. 遊離 $^3\text{H}_2\text{O}$ の測定 尿 0.2 ml, 胆汁 0.1 ml, 血清 0.1 ml を各々バイアルに採取し、尿には ethanol 0.2 ml を、胆汁及び血清には ethanol 0.2 ml と水 0.1 ml とを加えた後、放射能を測定した。他方、上記と同じ量の尿、胆汁、血清を各々バイアルに採取し、水を減圧留去した。各々の残渣に水 0.2 ml と ethanol 0.2 ml とを加えて溶解し、放射能を測定した。前者と後者との差を遊離 $^3\text{H}_2\text{O}$ と見なした。

12. 血清及び胆汁中の ^3H -Bufalin 代謝物の検索 1) 血清——雄ラットに ^3H -bufalin を経口投与後、所定の時間に全採血し、常法により血清を得た。血清 1 ml に ether-ethyl acetate (4:1, v/v) 混液 (抽出溶媒 A) 5 ml を加え 2 度抽出した。抽出液を減圧留去し、残渣を ethanol に溶解し、1.8—4.6 kBq を TLC (シリカゲル F₂₅₄, Merck) にスポットし、展開溶媒 A にて展開後ラジオクロマナイザー (JTC-600, Aloka) で放射能を測定した。

2) 胆汁——胆汁 0.5 ml に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え、抽出溶媒 A 5 ml で 3 度抽出した。別の胆汁 0.5 ml に Helicase 溶液 (Helicase (IBF) 原液を 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 10 倍に希釈した) 1 ml を加え 37°C で 24 時間インキュベートした。この反応液に抽出溶媒 A 5 ml を加え 3 度抽出した。抽出液を減圧留去した後、残渣を ethanol に溶解し、TLC に 0.3—1.6 kBq をスポットし、12.1 と同様に放射能を測定した。

13. 連続投与実験 体重 89—93 g の雄ラットを用い、 ^3H -bufalin を 24 時間毎に 14 日間連続経口投与した。

1) 血中濃度——投与 1, 7, 14 日目の投与後、所定の時間に採血した。絶食は投与 1, 7 及び 14 日目の投与前約 18 時間の間行い、投与 5 時間後より給餌を再開した。

2) 組織内分布——最終投与後 5, 72 時間にラットの頸動脈を切断し放血死させた。絶食と給餌の再開は投与 1 日目と 14 日目について 13.1 と同様に行った。

3) 尿・糞中排泄——投与開始より最終投与終了後 72 時間まで 24 時間毎の自然排泄した尿と糞を分別採取した。

結果及び考察

1. 標識体

Pt-C などの触媒の存在下、酸性又は塩基性条件で、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて bufalin の ^3H 標識化を試みたが、これらの反応条件下では bufalin の 17 位の α -pyron が開環し、標識体を合成することができなかった。そこで、ケトン、カルボニル基の α 位の水素が比較的緩やかな条件下で $^3\text{H}_2\text{O}$ と交換反応することに着目し、まず bufalin より 3-ketobufalin を合成し、3-keto 体を Pt-C 触媒下 $^3\text{H}_2\text{O}$ と交換反応を行ったところ、Fig. 1 で示す経路で bufalin を ^3H 標識することができた。

Amersham 社で測定した ^3H -bufalin と非標識 bufalin との電子衝撃イオン化法によるマスペクトルを比較したところ、 ^3H が 3 個結合したものが最も多く、次に 2, 4, 1 個の順であることが確認された。

TABLE I. Pharmacokinetic Parameters of Bufalin after Oral and Intravenous Administration in Rats

Drugs	Sex	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	T_{max} (min)	C_{max} (ng/ml as ^3H -bufalin)	$T_{1/2}$			AUC 0-4 d (ng·h/ml)
					1st (min)	2nd (h)	3rd (h)	
^3H -Bufalin	M	20 <i>p.o.</i>	15	11.6	17.7	2.6	85.9	59.9
	M	200 <i>p.o.</i>	15	127.5	23.2	1.8	98.2	550.5
	M	20 <i>i.v.</i>			13.4	2.7	83.9	74.0
	F	20 <i>p.o.</i>	15	12.0	21.3	2.0	86.3	65.0
KY-2 + ^3H -bufalin	M	$(1.62 \times 10^8$ +2) <i>p.o.</i>	15	1.18	19.0	2.3	98.2	5.66
KY-R + ^3H -bufalin	M	$(1.62 \times 10^8$ +2) <i>p.o.</i>	15	1.16	21.0	1.8	97.8	6.17
Toad venom + ^3H -bufalin	M	(90 +2) <i>p.o.</i>	15	1.03	19.2	1.8	95.6	5.44

The data are expressed as the mean of three animals. M, male; F, female.

2. 血中濃度

各投与群の最高血中濃度 (C_{max}), 最高血中濃度到達時間, 半減期, 血中濃度曲線下面積を Table I に示した.

1) 経口投与 雄ラットに ^3H -bufalin 20 $\mu\text{g/kg}$ を投与したところ, 速やかに吸収され, 15 分で C_{max} 11.6 ng/ml に達した. 消失パターンは 3 相を示した (Fig. 2A). 第 1 相 (半減期 17.7 分) は 2 コンパートメントモデルの分布相, 第 2 相 (半減期 2.6 時間) は排泄相に相当すると考えられた. 第 3 相の半減期 (85.9 時間) は $^3\text{H}_2\text{O}$ のそれに (98.4 時間)⁸⁾ ほぼ一致すること, 投与後 72 時間の全血清中放射能 (C_{max} の 3% に相当する) に対する遊離 $^3\text{H}_2\text{O}$ の割合が 91% であることから, bufalin 及びその代謝物は 72 時間の時点で血中からほぼ完全に消失していると考えられた. Digoxin をラットに経口投与した時の血中濃度は 1 時間で C_{max} に達し,

Fig. 2. Whole Blood Level Profiles of Radioactivity after Oral Administration of ^3H -Bufalin (○, 20 $\mu\text{g/kg}$; ●, 200 $\mu\text{g/kg}$) in Male (A) and Female (B) Rats

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three animals.

Fig. 3. Whole Blood Level Profiles of Radioactivity after Oral Administration of ^3H -Bufalin in Presence of KY-2, KY-R or Toad Venom in Male Rats

A) (KY-2 1.62 mg + ^3H -bufalin 2 μg)/kg; B) (KY-R 1.62 mg + ^3H -bufalin 2 μg)/kg; C) (Toad venom 90 μg + ^3H -bufalin 2 μg)/kg. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three animals.

その半減期が 3.6 時間と報告されている⁹⁾ことから, bufalin は digoxin より吸収が速やかで, 血中からの消失も速いことが明らかとなった。

^3H -Bufalin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したところ, 15 分で $C_{\max}$ に達し, $C_{\max}$ と 0—4 日間の血中濃度曲線下面積 (AUC) は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与時に比べほぼ 10 倍の値を示し, 各相の半減期は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与時と差がなかった (Fig. 2A).

雌ラットに ^3H -bufalin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したところ, 雄ラットに 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与した場合と差は認められなかった (Fig. 2B).

^3H -Bufalin 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に, bufalin 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に相当する KY-2, KY-R あるいはセンソを添加したものを投与したところ, いずれも 15 分で $C_{\max}$ に達し, 各相の半減期は ^3H -bufalin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単独投与時と大差なかった。 $C_{\max}$ と AUC は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単独投与時の約 1/10 を示し, 投与した標識 bufalin の量にはほぼ比例した。以上の事は共存成分が ^3H -bufalin の体内動態に顕著な影響を与えないことを示唆している (Fig. 3).

2) 静脈内投与 ^3H -Bufalin を静脈内投与した時の消失パターンは 3 相を示し, 各相の半減期は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与時と大差なかった (Fig. 4). 経口投与時と静脈内投与時の 0—4 日間の AUC 比 ($AUC_{p.o.}/AUC_{i.v.}$) は

Fig. 4. Whole Blood Level Profile of Radioactivity after Intravenous Administration of ^3H -Bufalin ($20 \mu\text{g/kg}$) in Male Rats

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three animals.

0.81 であった。これは bufalin が経口投与によって少なくとも投与量の 81% 吸収されたことを示しており、bufalin が吸収の良い薬物であることを示唆している。

3. 尿・糞及び胆汁中排泄

経口投与された ^3H -bufalin は、24 時間までに 81% が糞中へ、1.3% が尿中へ排泄された。排泄は 48 時間ではほぼ完了し、4 日間の累積排泄量は 89.9% (糞 88.3%, 尿 1.6%) であった (Fig. 5)。胆汁中には経口投与後 6 時間までに投与量の 61.9% が、24 時間までに 75.2% が排泄された (Fig. 6)。

ラットに digitoxin を静脈内投与した後、12 時間で 70.8% が胆汁中に排泄されること、¹⁰⁾ 尿より糞へ 2.3 倍多く排泄される¹¹⁾ ことから、ラットにおける強心ステロイドの排泄経路は糞中排泄が主と考えられており、bufalin も同様な排泄様式を示すことが判明した。

投与後 0—24 時間に採取した尿及び胆汁中の遊離 $^3\text{H}_2\text{O}$ はそれぞれ投与量の 0.2%, 0.81% とわずかであり、 ^3H 標識は生体内で安定であることが明らかとなった。

4. 組織内分布

雌雄ラットに ^3H -bufalin を経口投与した時の組織内濃度を Table II と III に示した。

投与後 15 分の放射能濃度は雌雄ともに、胃壁、肝臓、小腸壁で血液より高く、肺臓、腎臓、副腎で同程度、その他の臓器ではより低かった。5 時間の放射能濃度は肝臓、小腸壁、胃壁、肺臓、脾臓、腎臓で血液より高く、72 時間では肝臓、肺臓、脾臓、腎臓で血液より高かった。

^3H -Bufalin $20 \mu\text{g/kg}$ 経口投与時の血中濃度 (Fig. 2, Table I) と同様に組織内分布 (Table II, III) にも顕著な雌雄の差は認められなかった。臓器中の放射能濃度は血中濃度と平行して減少しているの、bufalin は臓器

Fig. 5. Urinary and Fecal Excretion of Radioactivity after Oral Administration of ^3H -Bufalin ($20 \mu\text{g/kg}$) in Male Rats

○, urine; ●, feces. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three animals.

Fig. 6. Excretion of Radioactivity in Bile after Oral Administration of ^3H -Bufalin ($20 \mu\text{g/kg}$) in Male Rats

Open circles show cumulative excretion in bile and the histogram shows radioactivities excreted during the indicated periods. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four animals.

(A)

(B)

Fig. 7. Autoradiograms Showing the Distribution of Radioactivity at (A) 15 min, (B) 5 h and (C) 24 h after Oral Administration of ^3H -Bufalin ($20 \mu\text{g/kg}$) in Male Rats

C, central section; L, left side section.

Fig. 8. Typical Radiochromatograms of Ether-Ethyl Acetate (4 : 1, v/v) Extract of Serum and Bile after Oral Administration of ^3H -Bufalin ($20 \mu\text{g/kg}$) in Male Rats

A) 2 h serum, B) 2-4 h bile (before helicase treatment). Peak 1, bufalin; 2, 3α -bufalin; 3 and 4, unknown polar metabolite. Developing agent, acetone-chloroform-hexane (3 : 3 : 4, v/v). Plate, silica gel F₂₅₄ (Merck).

に蓄積することはないと思われた。心臓中の放射能濃度は、いずれの時点でも血中の濃度より高くなり、*digoxin* などの強心配糖体が心筋に高濃度に集まらない¹²⁾という結果と一致した。

5. 全身オートラジオグラフィー

^3H -Bufalin を経口投与後 15 分、5、24 時間の ARG を Fig. 7 に示した。

投与後 15 分で胃内容物、肝臓に強い、その他の部位に中等度の放射能が認められ、吸収が速やかに進行しつ

TABLE II. Tissue Distribution of Radioactivity after Oral Administration of ^3H -Bufalin (20 $\mu\text{g/kg}$) in Male Rats

Tissue	Concentration (ng eq of ^3H -bufalin/g or ml)		
	15 min	5 h	72 h
Blood	11.72 $\pm$ 3.20	0.95 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.02
Eye ball	0.55 $\pm$ 0.09	0.14 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00
Cerebrum	4.34 $\pm$ 1.38	0.21 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.00
Cerebellum	4.06 $\pm$ 1.20	0.24 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00
Thyroid	2.91 $\pm$ 0.84	0.34 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.03
Submaxillary gland	5.23 $\pm$ 1.62	0.71 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.06
Thymus	3.62 $\pm$ 1.04	0.18 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.00
Heart	6.04 $\pm$ 1.58	0.56 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.02
Lung	10.99 $\pm$ 4.60	3.50 $\pm$ 0.10	1.67 $\pm$ 0.27
Pancreas	6.21 $\pm$ 1.81	3.41 $\pm$ 0.24	1.54 $\pm$ 0.11
Liver	87.26 $\pm$ 14.94	14.01 $\pm$ 0.81	2.77 $\pm$ 0.22
Spleen	4.07 $\pm$ 1.20	0.28 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01
Kidney	12.49 $\pm$ 2.91	3.37 $\pm$ 0.04	1.42 $\pm$ 0.07
Adrenal gland	11.91 $\pm$ 4.88	0.43 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01
Testis	2.94 $\pm$ 0.66	0.24 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01
Medulla spinalis	4.04 $\pm$ 1.20	0.22 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00
White fat	2.80 $\pm$ 0.70	0.33 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.04
Skeletal muscle	3.06 $\pm$ 0.66	0.30 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
Gastric wall	169.22 $\pm$ 36.46	7.46 $\pm$ 1.07	0.29 $\pm$ 0.02
Small int. wall	22.77 $\pm$ 5.09	9.46 $\pm$ 1.08	0.16 $\pm$ 0.02

The data are expressed as the mean $\pm$ S.E. of three animals.

つあることが示された。5 時間で食道、胃内容物、腸内容物に強い、肝臓に中等度の放射能が認められ、その他の部位には放射能がほとんど検出されなかった。24 時間では腸内容物に中等度、肝臓に弱い放射能が認められ、排泄が進行していることが示された。投与後 72 時間の ARG に放射能はほとんど認められなかった。以上の結果は組織内分布の結果と良く一致していた。

6. 血清及び胆汁中の ^3H -Bufalin 代謝物の検索

血清及び胆汁の抽出物をラジオ TLC で分析したところ、それぞれ 4 つの放射能ピークが認められた (Fig. 8)。ピーク 1 と 2 はそれぞれ bufalin 及び 3α -bufalin の R_f 値と一致した。 R_f 値の低いピーク 3 と 4 は抱合体あるいは極性の高い代謝物と考えられた。著者らは、bufalin をラットに経口投与した時の胆汁中に bufalin あるいは 3α -bufalin に水酸基が 2 つ導入された化合物を検出しており、¹³⁾ この化合物とピーク 3 の R_f 値がほぼ一致したことから、ピーク 3 は bufalin あるいは 3α -bufalin に水酸基が 2 つ導入された極性の高い代謝物と考えられた。また、胆汁を helicase 処理したところ、Fig. 8(B) と同様のクロマトグラムが得られ、ピーク 4 の割合が

TABLE III. Tissue Distribution of Radioactivity at 15 min after Oral Administration of ^3H -Bufalin (20 $\mu\text{g/kg}$) in Male Rats

Tissue	Concentration(ng eq of ^3H -bufalin/g or ml)
Blood	12.51 $\pm$ 0.36
Eye ball	0.42 $\pm$ 0.07
Cerebrum	4.18 $\pm$ 0.42
Cerebellum	3.50 $\pm$ 0.32
Thyroid	2.60 $\pm$ 1.23
Submaxillary gland	5.85 $\pm$ 0.50
Thymus	3.58 $\pm$ 0.39
Heart	6.21 $\pm$ 0.39
Lung	15.41 $\pm$ 5.41
Pancreas	8.85 $\pm$ 1.39
Liver	76.55 $\pm$ 7.53
Spleen	4.30 $\pm$ 0.24
Kidney	13.58 $\pm$ 1.20
Adrenal gland	13.17 $\pm$ 0.89
Ovary	5.54 $\pm$ 0.77
Uterus	4.15 $\pm$ 0.23
Medulla spinalis	3.70 $\pm$ 0.05
White fat	2.71 $\pm$ 0.29
Skeletal muscle	3.44 $\pm$ 0.50
Gastric wall	150.88 $\pm$ 16.30
Small int. wall	19.06 $\pm$ 4.02

The data are expressed as the mean $\pm$ S.E. of three animals.

減少しなかったことから、このピークが抱合体に由来する可能性は低いと思われた。血清中全放射能に対する bufalin, 3 α -bufalin の割合は、投与後 15 分でそれぞれ 1.3%, 69.5% であり、血清中放射能の大部分は 3 α -bufalin に由来することが示された。

胆汁中の bufalin と 3 α -bufalin は 0—6 時間でそれぞれ投与量の 0.04%, 0.35% とわずかであり、大部分がより極性の高い代謝物であった。ラットに digoxin を静脈内投与後 0—2 時間の胆汁中の未変化体の割合は 7.3%,¹⁴⁾ ラットに経口投与した時の血漿中のそれは投与後 1 時間の時点で 57.4%⁹⁾ と報告されている。血液や胆汁中で未変化体 bufalin の占める割合は digoxin の場合より低く、bufalin は digoxin に比べ代謝速度が速いことが示された。Digoxin などの配糖体からの糖の分解は緩慢に進行するが、ゲンインになると分解が速いことも知られており,¹²⁾ 糖をもたない bufalin が digoxin より代謝を受け易いことを支持している。

7. 連続投与

1) 血中濃度 ³H-Bufalin を 14 日間連続経口投与し、投与 1, 7, 14 日目の血中濃度推移を Fig. 9 に示した。

投与後 15 分の血中濃度は、投与開始 1, 7, 14 日目ともほぼ同一濃度 (10.0, 10.6, 9.5 ng/ml) を示した。投与後 5, 24 時間では投与回数が増すに従って増加した。血中濃度は最終投与後ゆるやかに減少した。

2) 組織内分布 最終投与後 5, 72 時間の組織内濃度を Table IV に示した。

TABLE IV. Tissue Distribution of Radioactivity after the Last Administration of Consecutive Oral Dose of ³H-Bufalin (20 μ g/kg) in Male Rats Once a Day for 14 d

Tissue	Concentration (ng eq of ³ H-bufalin/g or ml)	
	5 h	72 h
Blood	3.86 $\pm$ 0.15	2.25 $\pm$ 0.04
Eye ball	0.50 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.02
Cerebrum	0.66 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.02
Cerebellum	0.89 $\pm$ 0.11	0.56 $\pm$ 0.06
Thyroid	1.35 $\pm$ 0.20	0.70 $\pm$ 0.04
Submaxillary gland	3.36 $\pm$ 0.17	1.80 $\pm$ 0.16
Thymus	0.62 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.01
Heart	2.24 $\pm$ 0.05	1.27 $\pm$ 0.07
Lung	15.07 $\pm$ 0.64	8.98 $\pm$ 0.68
Pancreas	15.50 $\pm$ 1.22	9.41 $\pm$ 1.18
Liver	37.50 $\pm$ 1.78	10.77 $\pm$ 0.55
Spleen	1.06 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.04
Kidney	12.10 $\pm$ 0.35	5.71 $\pm$ 0.34
Adrenal gland	1.25 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.05
Testis	1.18 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.04
Medulla spinalis	0.86 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.03
White fat	1.78 $\pm$ 0.13	0.99 $\pm$ 0.04
Skeletal muscle	1.32 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.08
Gastric wall	11.05 $\pm$ 0.77	1.51 $\pm$ 0.10
Small int. wall	14.97 $\pm$ 1.71	0.83 $\pm$ 0.06

The data are expressed as the mean $\pm$ S.E. of three animals.

Fig. 9. Whole Blood Level Profiles of Radioactivity Determined on Day 1, 7, 14 (the Last Dose) during and after Consecutive Oral Administration of ³H-Bufalin (20 μ g/kg) Once a Day for 14 d in Male Rats

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four animals. $\circ$, day 1; $\bullet$, day 7; $\blacktriangle$, day 14.

Fig. 10. Cumulative Urinary and Fecal Excretion of Radioactivity during and after Consecutive Oral Administration of ³H-Bufalin (20 μ g/kg) Once a Day for 14 d in Male Rats

Samples were collected for 24 h after daily dosing and for 3 consecutive 24 h after the 14th dose.

$\circ$, urine; $\bullet$, feces. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of three animals.

最終投与後 5 時間の放射能濃度は肝臓、脾臓、肺臓、小腸壁、胃壁、腎臓で血液より高く、顎下線ではほぼ同程度、72 時間では肝臓、脾臓、肺臓、腎臓で血液より高かった。単回投与の 5 時間あるいは 72 時間で血液より高い放射能濃度を示した臓器は、連続投与の同時点でも血液より高かった。

3) 尿・糞中排泄 投与開始から最終投与後 72 時間まで尿・糞中に排泄された放射能を Fig. 10 に示した。最終投与後 72 時間までに投与放射能の 2.8% が尿中に、89.2% が糞中に排泄された。

7 日目及び 14 日目の投与後 5, 24 時間の血中濃度が 1 日目と比較して増加し、最終投与後 5, 24 時間の臓器中放射能が単回投与の場合と比較して増加したのは、既述したようにわずかに標識の脱離により生じた $^3\text{H}_2\text{O}$ が関与し、連続投与開始 3 日目ぐらいから $^3\text{H}_2\text{O}$ による影響が漸次現れているものと考えられた。

Bufalin の連続投与時の血中濃度が単回投与時と大きく変わらなかったこと、尿・糞中排泄は投与期間中ほぼ一定で、投与終了後速やかに減少したこと、臓器中放射能濃度が単回投与時の残存から予測される値とほぼ一致し、時間経過と共に減少することより、bufalin は蓄積性がないことが示唆された。

以上まとめると、bufalin は吸収が速やかで且つ吸収率が高い。ラットにおける主排泄経路は胆汁中排泄を介した糞中排泄である。肝臓、肺臓、腎臓、脾臓に比較的分布し易く、心臓に特に血液より高い濃度で集まることはない。蓄積性はなく、投与後速やかに代謝されることが明らかとなった。

謝辞 本研究に際し、終始ご指導を頂きました、東京薬科大学 馬場茂雄教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) 森下信一, 齋藤 隆, 三島泰宏, 水谷 陸, 平井康晴, 川上萬里, 日薬理, **87**, 361 (1986).
- 2) S. Tōma, S. Morishita, K. Kuroshima, Y. Mishima, Y. Hirai, M. Kawakami, *Xenobiotica*, **17**, 1195 (1987).
- 3) K. Aoki, M. Aoki, Y. Hirai, Y. Kuroiwa, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1184 (1986).
- 4) 須賀俊郎, 代謝, **10**, 762 (1973).
- 5) 小松曼耆, 岡野定輔, 分析化学, **15**, 1115 (1966).
- 6) 小松曼耆, 岡野定輔, 薬誌, **87**, 712 (1967).
- 7) G. R. Pettit, Y. Kamano, *J. Org. Chem.*, **37**, 4040 (1972).
- 8) J. K. Wheeler, A. A. Moghissi, B. F. Rehnberg, M. C. Colvin, *Health Phys.*, **22**, 35 (1972).
- 9) 佐々木弘三, 樋口三郎, 塩原有一, 佐渡卓郎, 大藪新太郎, 竹本 稔, 南保俊雄, 横島徹喜, 基礎と臨床, **10**, 393 (1976).
- 10) J. Q. Russell, C. D. Klaassen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**, 455 (1973).
- 11) C. S. Fischer, A. Sjoerdsma, R. Johnson, *Circulation*, **5**, 496 (1952).
- 12) 今井昭一, “心臓血管系の薬理,” 朝倉書店, 東京, 1969, pp. 103—109.
- 13) 東間章二, 平井康晴, 杉本智潮, 庄司政満, 小國泰弘, 森下信一, 伊藤千尋, 堀江正信, 薬誌, **111**, 687 (1991).
- 14) K. Kitani, Y. Sato, S. Kanai, M. Nokubo, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **37**, 355 (1982).