

Tripamideの代謝研究

1982年11月

堀 江 透

目 次

緒 言	1
第 1 編 代謝物の構造決定と水酸化の立体選択性	3
第 1 章 標識化合物の合成	3
1-1 ^{14}C -Carbonyl-Tripamide の合成	3
1-2 8, 9- T_2 -Isoindoline-Tripamide の合成	5
1-3 3, 5- D_4 -Isoindoline-Tripamide の合成	5
1-4 8, 9- <i>exo-cis</i> - D_2 -Isoindoline-Tripamide の合成	7
第 2 章 代謝物の単離・同定および構造決定	9
2-1 代謝物の単離・精製	9
2-2 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid の同定	10
2-3 4-chloro-3-sulfamoylbenzamide の同定	10
2-4 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid-(<i>N'</i> -acetyl)-hydrazide の同定	11
2-5 水酸化代謝物 3-hydroxy-tripamide および 8-hydroxy-tripamide の構造決定	11
第 3 章 主水酸化代謝物 8-hydroxy-tripamide の水酸基の配置の決定と水酸化の立体選択性	14
3-1 <i>endo</i> および <i>exo</i> 8-hydroxy-tripamide の合成と同定	14
3-2 水酸化反応の同位体効果と立体選択性	19
第 4 章 Tripamide の代謝経路	21
4-1 肝アリアルアミダーゼによる加水分解	21
4-2 一酸化炭素およびチトクローム P-450 抗体による阻害	23
4-3 フェノバルビタールおよびメチルコランスレン投与による影響	24
4-4 加水分解反応と水酸化反応の代謝種差	26
第 5 章 考 察	29
第 2 編 ^{14}C -Tripamide の体内動態	31
第 1 章 ラットおよび家兎における ^{14}C -Carbonyl-Tripamide の吸収, 分布, 代謝および排泄	31
1-1 血中濃度	33
1-2 組織内分布	35
1-3 胆汁および尿, 糞中排泄	38
1-4 臓器中および胆汁, 尿中, 糞中代謝物	39
1-5 主代謝物 ^{14}C -CSBA 静脈内投与時の血中濃度と尿および糞中排泄	42
第 2 章 ラットにおける ^{14}C -Carbonyl-Tripamide および ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の吸収, 分布および排泄	43
第 3 章 考 察	47

第3編	Tripamide 連続投与後の肝薬物代謝酵素活性の上昇	49
第1章	^{14}C -Tripamide 連続投与時の尿および糞中代謝物の変動.....	49
第2章	Tripamide 連続投与後の肝薬物代謝酵素活性に及ぼす影響.....	52
2-1	アミノピリン N-脱メチル化活性およびアニリン水酸化活性に及ぼす影響.....	54
2-2	肝ミクロゾーム電子伝達系への影響.....	55
第3章	Tripamide 代謝物連続投与後の薬物代謝酵素活性に及ぼす影響.....	56
3-1	アミノピリン N-脱メチル化活性およびアニリン水酸化活性に及ぼす影響.....	56
3-2	Tripamide の代謝活性に及ぼす影響.....	56
3-3	肝ミクロゾーム電子伝達系への影響.....	57
第4章	^{14}C -Tripamide 投与時の放射能の肝細胞内分布と covalent binding.....	60
第5章	肝ミクロゾームにおける ^3H および ^{14}C -Tripamide の covalent binding.....	65
5-1	NADPH の生成系下の covalent binding.....	65
5-2	フェノバルビタールおよび塩化コバルト投与による影響.....	67
5-3	covalent binding の種差と代謝物生成との関係.....	68
5-4	ミクロゾーム電子伝達系成分への covalent binding.....	70
第6章	考 察.....	72
第4編	ヒドラジン類似代謝物およびアセチルヒドラジンの肝臓に及ぼす影響	75
第1章	アセチルヒドラジン投与による血漿 GOT および GPT への影響.....	75
第2章	ヒドラジン類似代謝物およびアセチルヒドラジン投与の肝臓に及ぼす影響.....	76
2-1	血漿 GOT, GPT および脂質への影響.....	76
2-2	肝コレステロールおよび脂質への影響.....	77
2-3	肝の組織学的変化.....	77
2-4	薬物代謝酵素活性への影響.....	78
第3章	考 察.....	79
第5編	Tripamide の血中動態と薬効との関連	81
第1章	赤血球への移行.....	81
1-1	^{14}C -Tripamide 投与後の血中分布.....	81
1-2	Tripamide の赤血球への移行.....	81
第2章	高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中の Tripamide および代謝物の定量法の確立.....	86
2-1	血漿, 赤血球および尿中 Tripamide の定量.....	88
2-2	尿中水酸化代謝物の定量.....	89
2-3	血漿および赤血球中 CSBA の測定法.....	91
第3章	自然発症高血圧ラットにおける Tripamide の血中濃度と降圧効果.....	92
第4章	ヒトにおける Tripamide の血中動態と電解質排泄.....	95
4-1	Tripamide の吸収に及ぼす食事効果.....	95

4-2	単回投与時の Tripamide の血中動態と電解質排泄	99
4-3	連続投与時の Tripamide の血中動態	108
第5章	考 察	114
	総括	120
	謝辞	122
	引用文献	125

緒 言

本態性高血圧症が医療上問題にされる理由は、血圧の上昇持続によって、心脈管系への負担が増大し、脳、心臓、腎臓などの主要臓器の血管障害を起し、脳卒中、心不全、腎不全などを招来することにある。^{1), 2)}したがって高血圧症患者に対し、降圧剤を投与し、適切なレベルに血圧を維持することは、血管障害の進展を遅らせ、合併症の発生を予防できる。^{3), 4), 5)}

一般に軽症本態性高血圧症の治療には、第一選択薬としてサイアザイド系降圧利尿剤が用いられている。これらは降圧効果が確実で比較的緩徐に作用が発現し、また併用薬剤の作用を増強することから高血圧症治療のベース薬となっている。しかし副作用として、低カリウム血症、高尿酸血症、耐糖能の低下等が指摘されており、長期間の使用にあたっては注意を要する。Thiazide系降圧利尿剤やFurosemideの利尿薬の使用時には時にはカリウムの補給が必要な場合があり、患者の自宅での治療上において、大きな欠点となっている。

そこで、降圧作用が確実で、利尿作用があまり強くなく、尿酸上昇、耐糖能低下、カリウムの過剰排泄を起さない化合物の開発望まれている。

降圧利尿剤の系図は Fig. 1 に示すごとく、Chlorobenzoylsulfonamide 基本構造化合物として、代表的な Thiazide 系化合物 Hydrochlorothiazide, Chlorothiazide が開発されている。また Sulfonyl を Carbonyl に置換した, Quinethazone, Metolazone も合成されて医薬品となっている。その他 Thiazide 骨核を有しない Chlortharidone, Furosemide も開発されている。本研究所では、降圧作用が確実で、利尿作用があまり強力でなく、しかも尿酸上昇、耐糖能低下、カリウム過剰排泄を起さない化合物の探索研究を開始した。300 余化合物のスクリーニングテストの結果、確実な降圧作用を示すが、尿量増加作用は比較的弱く、特にカリウム排泄は、Furosemide に比べて著明に少ない化合物 Tripamide を見出した。⁶⁾ (Fig. 1) 本化合物は従来の Thiazide 系降圧利尿薬とは構造的に全く新規な化合物である。DOCA 高血圧ラット、SHR あるいは Goldbatt 犬において確実で緩徐な降圧作用を示すことが報告されている。⁷⁾ また血管平滑筋の活動電位を抑制することにより血管平滑筋の緊張を緩和し、血圧を下降させるユニークな作用を

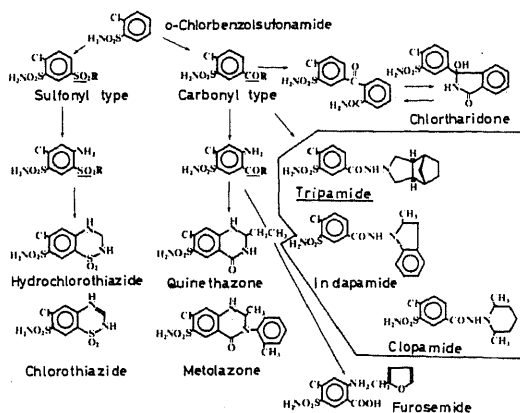


Fig. 1. A genealogical chart of anti-hypertensive diuretics

有する。⁸⁾

Thiazide系降圧利尿薬の代謝研究に関しては報告も多く⁹⁻¹⁸⁾、生体内ではThiazide骨核は安定である。Thiazide系降圧利尿薬の代謝は主として、骨核外の側鎖が代謝されるわけで、¹¹⁾側鎖のないThiazide系化合物はほとんど未変化体として尿中に排泄される。^{9, 10, 15)}一方非サイアザイド系降圧利尿薬の代謝に関しては、Mefruside,^{19, 20)}Indopamide^{21, 22)}の報告があるのみで割合少ない。まして全く新規な構造を有するTripamideの代謝に関しては全く報告がない。

そこで、著者はTripamideの薬物代謝を薬効と毒性の面から以下のごとく詳細に研究した。

- 1) Tripamideの代謝物の構造決定と体内動態を検討するために4種の標識化合物を合成し、さらにもう一種の標識化合物を入手し、合せて5種の標識化合物を用いて検討した。
- 2) ラットの尿中から6種の代謝物を分離同定した。そのうち2種の水酸化代謝物について水酸基の位置を決定し、主水酸化代謝物については水酸基の配置も決定した。
- 3) Tripamideの代謝経路を解明し、主代謝経路に関して、その反応に関与する酵素系について種々検討した。さらに水酸化反応の同位体効果と立体選択性に関して検討を加えた。
- 4) ラットおよび家兎において¹⁴C-Tripamideの吸収、分布、代謝および排泄について検討した。
- 5) ラットにおいてTripamide連続投与後の肝薬物代謝酵素活性を検討した。さらに薬物代謝酵素活性の上昇作用は、Tripamideの代謝物が関与していることを明らかにし、活性上昇機序について若干検討した。
- 6) Tripamideの代謝物の中に、ヒドラジン類似代謝物が確認された。そこで、それらの代謝物の毒性をアセチルヒドラジンを対照として肝臓におよぼす影響について検討した。
- 7) Tripamideのラットおよびヒト赤血球への移行を検討した。
- 8) 高速液体クロマトグラフィーを用いて生体試料中のTripamideおよびその代謝物の定量法について検討した。
- 9) 自然発症高血圧ラットを用いて、Tripamideの血中濃度と血圧降下作用との関連について検討した。
- 10) ヒトにおけるTripamideの代謝動態について、単回および連続投与時の血中濃度、尿中排泄を検討した。
- 11) ヒトにおいて、Tripamideの吸収におよぼす食事効果について検討した。

第1編 代謝物の構造決定と水酸化の立体選択性

Tripamideの代謝物の構造と生体内運命を研究する目的で4種の標識化合物の合成を行った。すなわち、薬理活性を有する構造部位であるChlorosulfamoylbenzoyl moietyを ^{14}C で標識し、体内動態と薬理効果との関連を検討した。非Thiazide系降圧利尿薬の代謝研究から、Tricyclodecan ringへの代謝が予測されたので、あらかじめ、最も水酸化を受けやすい位置を三重水素あるいは重水素で標識した。代謝物の構造決定にはこれら標識化合物を用い、代謝物の $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ の値を追跡すること、また代謝物の生成速度の同位効果を利用して決定した。さらに水酸化の立体選択性を検討するために、Tricyclodecane ringの8および9位を立体選択的に重水素標識を行った。

ラットの尿中から効率良く代謝物を単離、精製し、未変化体を含めて、6種の代謝物の構造を決定した。そのうち主水酸化代謝物については水酸基の配置を決定するため、exoおよびendo配置の8-hydroxy-tripamideを立体選択的に合成する方法を見出した。

最後に、Tripamideの主代謝経路である加水分解反応と水酸化反応について、それに関与する酵素系について検討し、Tripamideの代謝経路を明らかにした。

第1章 標識化合物の合成

1-1 ^{14}C -Carbonyl-Tripamideの合成

^{14}C -Tripamideの合成は Sturm²³⁾ および Hoefle²⁴⁾ らの方法に準じて行なった。 ^{14}C -Tripamideの合成法の概要を Fig.1-1 に示す。

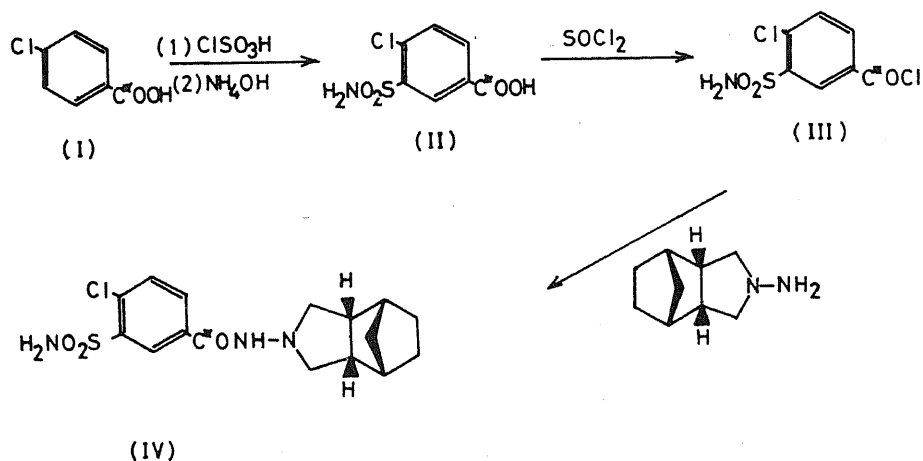


Fig.1-1. Outline of synthesis of (IV).

(I) をクロルスルホン酸でクロルスルホン化し、アンモニア水で処理して (II) を得る。(II) を塩化チオニルと反応させて酸クロライド (III) とし、(III) をトリエチルアミンの存

在下, 4-Amino-4-aza-endo-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decane(ATD) と反応させ, ¹⁴C-Tripamide (IV) を得る。

実験結果

(1) 放射能の検出

放射能は Aloka LCS-652 型液体シンチレーションカウンターで測定し, ラジオクロマトグラムは, Aloka Thin Layer Chromatogram Scanner(Model TLC-2B) で測定した。UV スペクトルの測定は日立 124 型自記分光光度計で行なった。

(2) ¹⁴C-4-Chloro-3-sulfamoylbenzoic acid(II) の合成

¹⁴C-p-Chlorobenzoic acid(I) 611 mg(46.8mCi, 3.904mmoles) にクロルスルホン酸 3 ml を加え油浴中145~150°C で5時間反応させる。一夜放置後, 反応溶液に氷水 5 ml を注意深く加え, 未反応のクロルスルホン酸を分解する。析出した結晶を濾取し, 水 2 ml で2回洗浄後, この結晶に28%アンモニア水 4 ml を加える。窒素ガス気流中, 過剰のアンモニアを除き, 濃塩酸 2 ml を加え, 析出した結晶を濾取, 5%塩酸 2 ml で2回洗浄し, ¹⁴C-p-Chlorobenzoic acid(II) を得た。収量 489 mg (収率53.3%)。

(3) ¹⁴C-4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl chloride(III) の合成

デシケーターで一夜減圧乾燥した(II) 489 mg に塩化チオニル 5 ml を加え, 油浴中還流下2時間反応させる。過剰の塩化チオニルを減圧で溜去し ¹⁴C-4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl chloride(III) を得た。収量は定量的であった。

(4) ¹⁴C-N-(4-Aza-endo-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decan-4-yl)-4-chloro-3-sulfamoylbenzamide (¹⁴C-Tripamide) の合成

(3)で得た(III) にジオキサン 2 ml を加え, これに ATD 300 mg(1.98mmoles) およびトリエチルアミン 0.2ml をジオキサン 2 ml にとかした溶液を加える。50°C に加温し, 約10分間振とうする。室温で2日間放置後, 析出した結晶を濾取し50%含水メタノール 2 ml で2回洗浄し, ¹⁴C-Tripamide(IV) を得た。

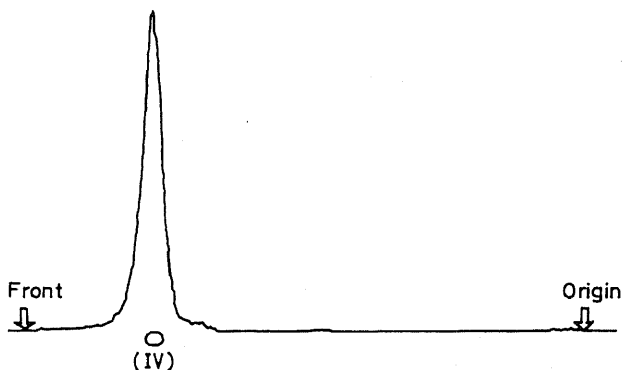


Fig.1-2. Radioscans of (IV) on TLC developed with benzene/acetone (1 : 1).

収量 206mg (収率13.9%), 比放射能 31.7 μ Ci/mg, 放射化学的純度95%。

14 C-Tripamide の TLC ラジオクロマトグラムを Fig.1-2 に示した。

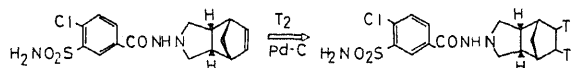
14 C-Tripamide の UV スペクトルは, 合成標品のそれと同一の吸収スペクトルを示した。

本報告の方法で目的通りの 14 C-Tripamide を合成することができた。TLC の Rf 値及び UV スペクトルは, 合成標品と同一であった。

動物における Tripamide の吸収, 分布, 排泄および代謝を研究するためには十分な比放射能 (31.7 μ Ci/mg), 放射化学的純度 (95%) を有していた。

1-2 8, 9-T₂-Isoindoline-Tripamide (3 H-Tripamide) の合成

D₄-Tripamide は下記の反応によって, 次のように合成した。



N-(4-Aza-endo-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}]-decan-8-ene-4-yl)-4-chloro-3-sulfamoylbenzamide 200mg をメタノール15ml に溶かし, 5%Pd-C50mg を加えて, 5Ci のトリチウムガスにて接触還元を行う (室温にて1.5時間, かくはんする)。メタノールを加えて減圧乾固をくり返して不安定トリチウムを除いた。少量のメタノールに溶かし, Tripamide 標品50mg を加えて, 50%含水メタノールで5回再結晶を行った。 3 H-Tripamide の比放射能は 6.0 μ Ci/mg, 放射化学的純度は, 95%であった。

再結晶回数	比放射能
1	7.39 μ Ci/mg
2	6.83
3	6.15
4	5.99
5	6.01

1-3 3, 5-D₄-Isoindoline-Tripamide (D₄-Tripamide) の合成

D₄-Tripamide の合成は Fig.1-3 に示す。

化合物 1 (18g) を THF (200ml) 中で重水素化リチウムアルミニウム (LiAlD₄) 8.4g と3時間反応し, 2を得た。2 (1.52g) を Triethylamine 存在下 3 (2.54g) と反応させ 4 (0.7g) を得た。

D₄-Tripamide(4)の薄層クロマトグラフィー (TLC, Kieselgel 60F₂₅₄ 0.25mm, ベンゼン/アセトン (1/1)) の Rf 値および融点 (251-2 $^{\circ}$ C) は Tripamide 標品のそれと一致した。IR スペ

クトルは 2200 cm^{-1} にC-D伸縮振動による吸収が、Massスペクトルから Fig.1-4 に示すフラグメントピークが検出された。

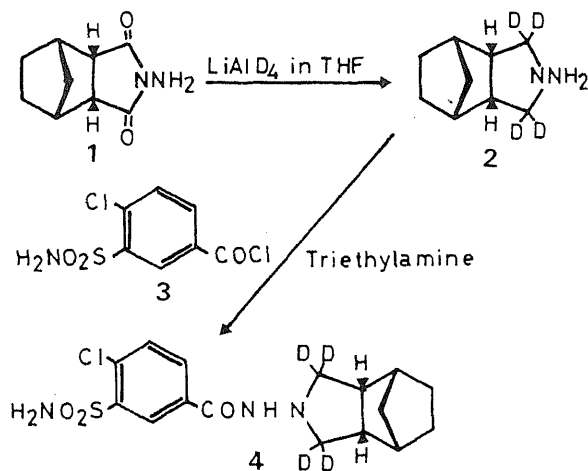


Fig. 1-3. Outline of synthesis of 3,5-D₄-Isoindoline-Tripamide

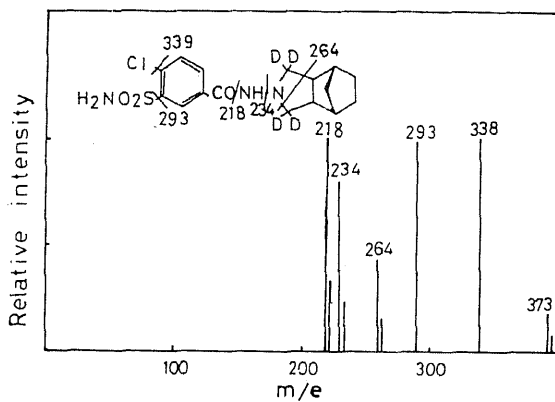


Fig. 1-4 Mass spectrum of [D₄]tripamide.

NMRの測定から (C₃, C₅) 2.7~3.1 (m) ppmのピークが消失し、TripamideのD化率は90%以上であった。

1-4 8,9-exo-cis-D₂-Isoindoline-Tripamide(8,9-exo-cis-D₂-Tripamide)の合成

8,9-exo-cis-D₂-Isoindoline-Tripamideの合成は Fig. 1-5 に示すルートで行った。

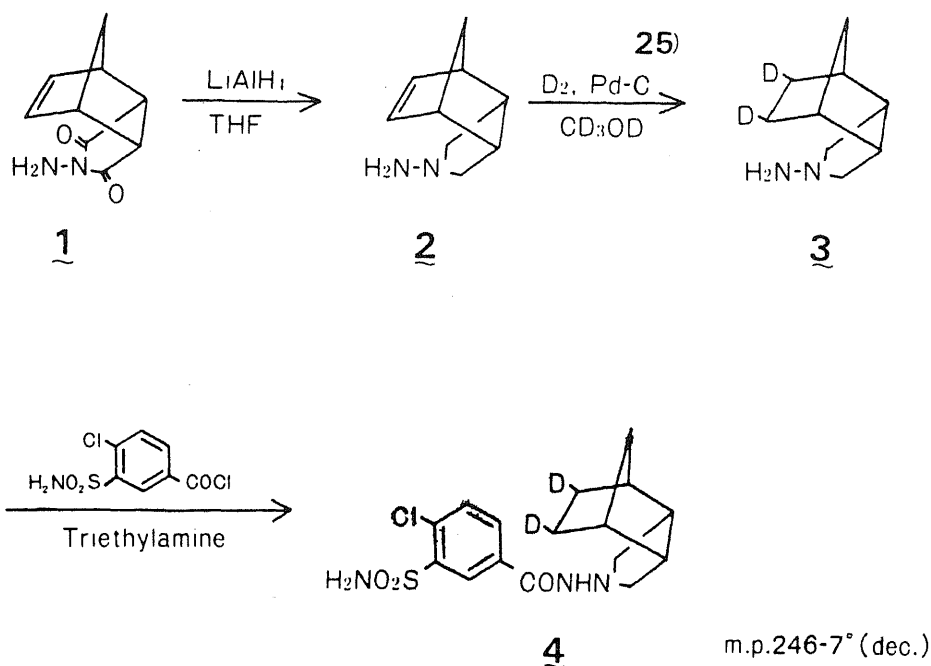


Fig. 1-5. Outline of synthesis of 8,9-exo-cis-D₂-Isoindoline-Tripamide

(1) 1 → 2

THF (モレキュラーシーブ dried) 400ml に LiAlH₄ 25g を加え、攪拌下(1)50g を徐々に加える。還流下 5 時間反応後、氷冷し、水 50ml で分解する。内容物を吸引濾過し、THF で洗浄濾液を硫酸マグネシウム顆粒で乾燥後、濃縮し蒸留する。

b. p. 115-120°/15-16mm Hg. 23.5g (収率 55.8%)

(2) 2 → 3

重水素ガスで充満した風船つきマイヤーに 10% Pd-C 少量入れ、CD₃OD 2ml を加えて攪拌し、Pd-C を活性化させる。その後、ゴム栓を通して、注射筒で(2)152mg を CD₃OD 2ml に溶かした溶液を加え、攪拌する。

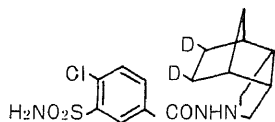
(3) 3 → 4

Crude(3) 142mg, K₂CO₃ 85mg, 50% Dioxan-Water 10ml を室温で攪拌下、酸クロライド 254mg を加える。40~50℃ に加温し、20 分間反応する。反応溶液を減圧で濃縮し得られる、アメ状の残渣をカラムで精製する。(シリカゲル 100 メッシュ 10g, Benzene, 5% Ethyl-acetate-Benzene で溶出する。)

収量 172mg, m. p. 246-7°

合成した(4)の I R スペクトルおよび Mass スペクトルを Fig.1-6 に示す。

① IR



3,600~3,050cm⁻¹ (m) ν NH
2,190~2,150cm⁻¹ (w) ν CD
1,655cm⁻¹ (s) ν C=O
1,550cm⁻¹ (m) δ NH
1,335cm⁻¹ }
1,160cm⁻¹ } (s) ν SO₂

② MASS

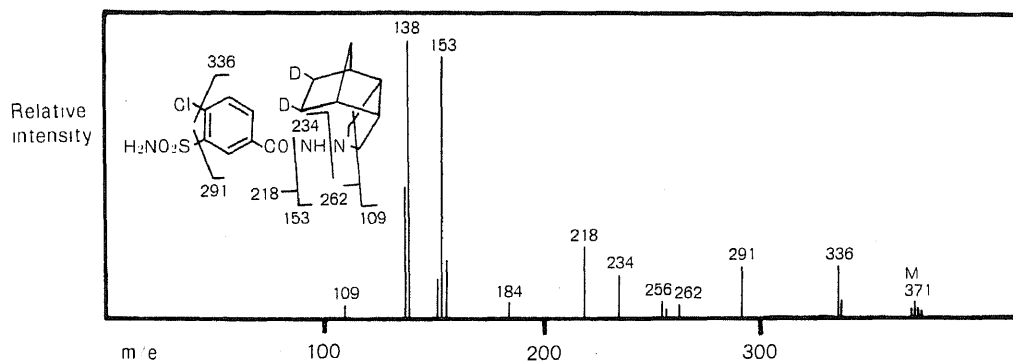


Fig. 1-6. Spectral data of 8,9-exo-cis-D₂-Isoindoline-Tripamide

第2章 代謝物の単離・同定および構造決定

2-1 代謝物の単離・精製

^{14}C -Tripamide (5mg/kg) をラット (Wistar 系雄性, 体重 200~250g) 3匹に経口投与した後の24時間尿を採取し, Amberlite XAD-4 (1.5×15cm, Rohm & Haas, U.S.A.) カラムクロマトグラフィーを行い, 水, 40%メタノール-水, ついでメタノールの順に溶出させ, 各フラクションを濃縮乾固した。各分画中の代謝物について TLC (Kieselgel 60F₂₅₄, 厚さ, 0.25mm, Merck, FR Germany) 分析を行った。

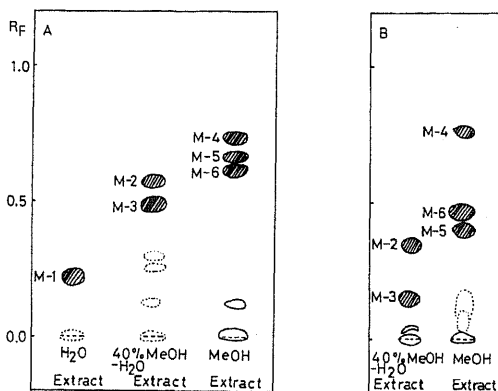


Fig.1-7 Autoradiogram of t.l.c. of urinary metabolites in rats after oral administration of [^{14}C]tripamide.

Solvents were (A) 28% w/v aq. ammonia (sp. gr. 0.90)-water-butanol (1:9:50, v/v) or (B) benzene-acetone (1:1, v/v). The dose of [^{14}C]tripamide was 5 mg/kg.

代謝物は水分画に M-1, 40%メタノール-水分画に M-2, M-3, メタノール分画に M-4, M-5, および M-6 が認められた。

各分画中に量的に多い代謝物 M₁~M₆ を同定することにした。

次に各代謝物を量的に多く得るため, ラット (Wistar 系雄性, 体重 200~250g) 24匹に Tripamide (100mg/kg) を経口投与した際の24時間尿および糞を採取し, 代謝物を単離, 精製した。尿はそのまま, 糞は水抽出を行い, pH 7 に調整し, Amberlite XAD-4 (4.5×40cm) カラムクロマトグラフィーを行い, 水, 40%メタノール, ついでメタノールの順に溶出させた。各フラクションをシリカゲルクロマトグラフィー (Silicic acid, Mallinkrodt, FR Germany, 3.0×40cm) を行い, ベンゼン, ベンゼン-アセトン (7:3, v/v), ベンゼン-アセトン (3:7, v/v) の順に溶出させた。各フラクションは濃縮乾固し, Preparative TLC (Kieselgel 60F₂₅₄, 厚さ, 0.25mm, 20×20cm Merck, FR Germany) を行い, 展開溶媒 A, B (Fig.1-7) で展開させた。代謝物に相当する部分をかきとり, クロロホルム-メタノール (8:2, v/v) の混合溶媒でシリカゲルより抽出した。

単離・精製した各代謝物のマススペクトルを測定した。(Fig.1-8)

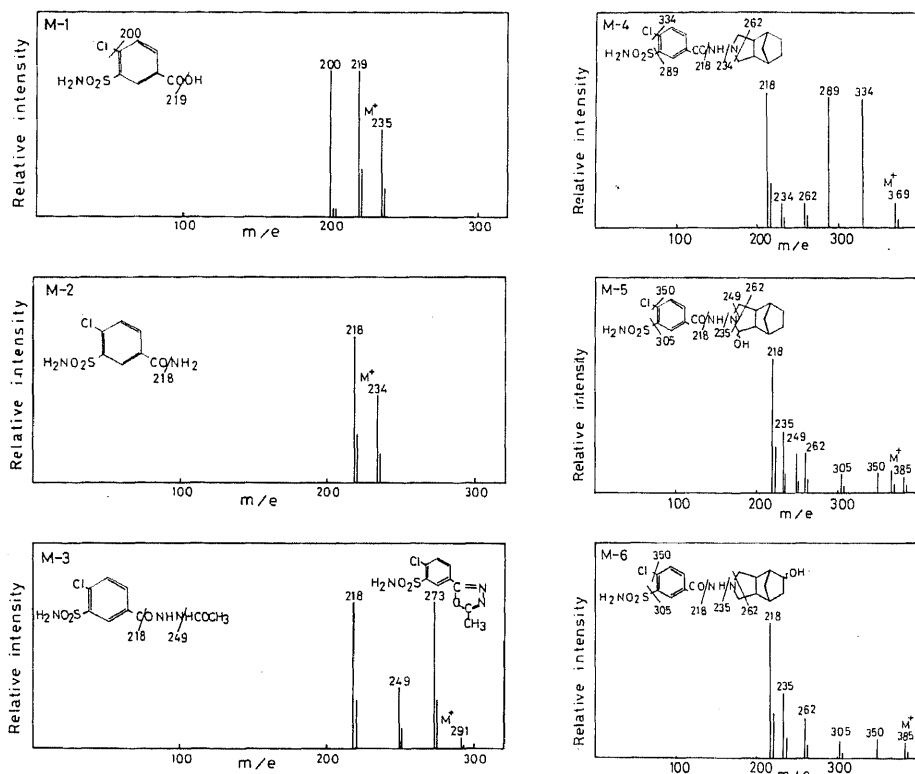


Fig.1-8 Mass spectra of metabolites M-1, M-2, M-3, M-4, M-5 and M-6.

Electron impact mass spectra were recorded on a JEOL model JMS-OIST mass spectrometer under the following conditions; ionizing voltage 50 or 75 eV, ionizing current 200 μ A and temperature 140–200°C.

2-2 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid の同定

Fig.1-8 から M-1 は 4-Chloro-3-sulfamoylbenzoic acid (CSBA) と推定された。CSBA の合成標品と M-1 の TLC の Rf 値 (展開溶媒: 28% アンモニア水/水/n-ブタノール (1/9/50) およびベンゼン/メタノール/酢酸 (80/20/5)) が一致し、ジアゾメタンでメチル化すると標品 4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl methylester の Rf 値と一致した。

また合成標品との同位体希釈分析 (標品約 50mg を正確に秤量し、メタノールに溶解した後、 14 C-Tripamide を投与したラット尿中から精製した各代謝物を加えて、水-メタノールから再結晶をくり返す。その後比放射能を測定する。) を行った結果、4 回の再結晶で比放射能の低下は認められなかったことから、M-1 を CSBA と同定した。

2-3 4-chloro-3-sulfamoylbenzamide の同定

Fig.1-8 から M-2 は 4-Chloro-3-sulfamoylbenzamide (CSBM) と推定された。CSBM の合成標品と M-2 と TLC の Rf 値 (展開溶媒; 28%アンモニア水/水/n-ブタノール (1/9/50))

および、ベンゼン/アセトン (1/1) が一致した。また合成標品との同位体希釈分析を行った結果、4回の再結晶で比放射能の低下は認められなかったことから、M-2をCSBMと同定した。

2-4 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid-(N'-acetyl)-hydrazide の同定

Fig.1-8 から M-3 は 4-Chloro-3-sulfamoylbenzoic acid-(N'-acetyl)-hydrazide (CSBH) と推定された。CSBH の合成標品と M-3 の TLC の Rf 値 (展開溶媒; 28%アンモニア水/水/n-ブタノール (1/9/50)) が一致した。合成標品との同位体希釈分析を行った結果、3回の再結晶で比放射能の低下は認められなかったことから M-3 を CSBH と同定した。

2-5 水酸化代謝物 3-hydroxy-tripamide および 8-hydroxy-tripamide の構造決定

Fig.1-8 から、M-4 は Tripamide と推定され、M-4 の Rf 値 (展開溶媒; ベンゼン/アセトン (1/1)) は標品と一致した。Tripamide との同位体希釈分析の結果、M-4 を Tripamide と同定した。

代謝物 M-5 および M-6 は Fig.1-8 より、いずれも Tripamide に酸素が導入された代謝物と推定された。代謝物を Pd-C/H₂ で処理しても Tripamide が生成されないとから N-oxide 体ではなかった。フラグメントピークから代謝物は Tricyclodecane ring が水酸化された代謝物と推定され、水酸基の位置は以下の方法で決定した。

(1) 3-hydroxy-tripamide の同定

3, 5-D₄-Isoindoline-Tripamide に少量の ¹⁴C-Carbonyl-Tripamide を加え、0.5 μCi/μmol の D₄-Tripamide を調整した。肝ミクロゾームを用いて、非標識 Tripamide あるいは D₄-Tripamide を基質として、NADPH 生成系下で 37°C、60 分間インキュベートした。水酸化代謝物の生成に及ぼす同位体効果について検討した。肝ミクロゾーム NADPH 生成系下の Tripamide の代謝物の生成速度は以下の方法で測定した。

反応溶液として、NADP (0.8 μmoles) 0.1 ml, G-6-P (20 μmoles) 0.1 ml, G-6-PDH (5 units) 0.1 ml, MgCl₂ (25 μmoles) 0.1 ml, D₄-および非標識 Tripamide (0.32, 0.38 μmoles) 0.2 ml, ミクロゾーム懸濁液 1 ml を合せ全量 1.6 ml とした。37°C、インキュベート後、メタノール 2 ml で除蛋白し、遠沈して上澄を減圧下濃縮乾固する。残渣をメタノール 0.5 ml にとかし、その 0.02 ml を TLC (Kieselgel 60F₂₅₄, 0.25 mm) にスポットし、展開溶媒にベンゼン/アセトン (1/1) あるいは 28%アンモニア水/水/n-ブタノール (1/9/50) を用いて展開した。オートラジオグラフィーをとり、代謝物に相当する Rf 値部分をかきとり放射能を測定した。

代謝物 M-1, M-2, M-5 および M-6 の生成速度に及ぼす同位体効果について Fig.1-9 に示した。

Fig.1-9 から明らかのように、代謝物 M-6 のみが非標識 Tripamide を基質とした場合に比べて、D₄-Tripamide の方が遅かった。各代謝物の生成速度 (インキュベート 30 分間の間に生成した量) における K_H/K_D は M-1 (1.03), M-2 (1.02), M-5 (1.60), M-6 (0.93) とな

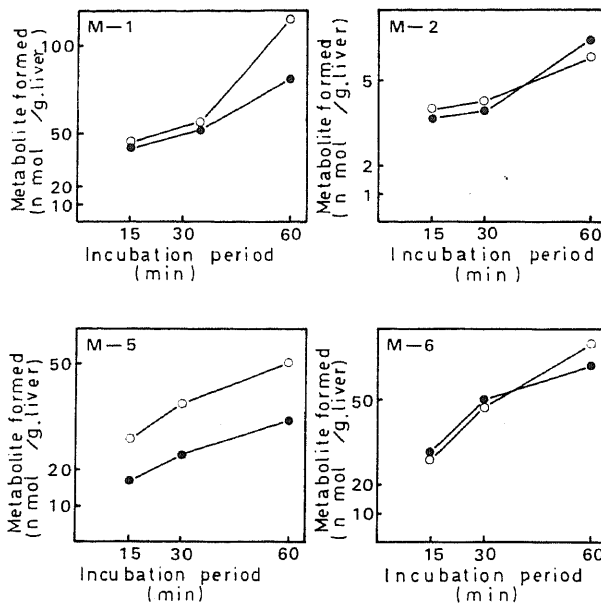


Fig.1-9 Time-course of metabolite formation by liver microsomes.

Each metabolite formed was determined individually at 15, 30 and 60 min. ○—○; Unlabelled tripamide, ●—●; [D₄]tripamide.

り、M-5の生成速度のみに1.6倍の同位体効果が認められた。

チトクロームP-450によるAliphatic carbonへの水酸化反応には同位体効果が認められることが報告されている。^{26), 27)}

D₄-Tripamideの重水素はTricyclodecane ringの3および5位に標識されているので、代謝物M-5は3-hydroxy-tripamideと同定された。

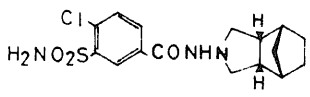
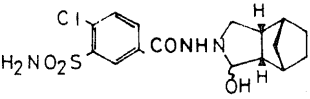
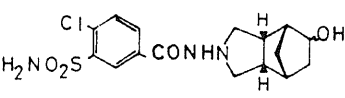
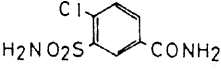
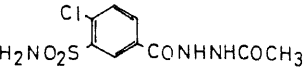
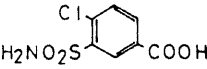
Fig.1-8のM-5のフラグメントピーク(249, 262)は、M-5が3-hydroxy-tripamideであることを支持している。

(2) 8-hydroxy-tripamideの同定

8,9-T₂-Isoindoline-Tripamide (19.6 μCi) および¹⁴C-Carbonyl-Tripamide (24.6 μCi) をラットに3 mg/kg経口投与した後の24時間尿を採取し、前述した方法にしたがって、水酸化代謝物を単離・精製した。水酸化代謝物³H/¹⁴Cの値は、投与した二重標識Tripamideの値(0.80)に比べて、代謝物M-5は変らなかったが、M-6は0.60と25%低下した。代謝物M-6はTricyclodecane ringの8位あるいは9位の方の³Hが脱離していることから8位あるいは9位に水酸化された代謝物と決定された。したがってM-6は8-hydroxy-tripamideと同定された。

以上同定した6種のTripamideの代謝物の構造、名称、Rf値およびM⁺(m/e)をTable 1-1に示す。

Table 1. The chemical structures of the metabolites of tripamide.

Metabolite structure	Chemical name	R_F in solvent		Molecular ion (M^+)
		1	2	
	<i>N</i> -(4- <i>aza-endo</i> -tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]-decan-4-yl)-4-chloro-3-sulphamoylbenzamide (tripamide)	0.75	0.77	369
	<i>N</i> -(3(or 5)-Hydroxy-4- <i>aza-endo</i> -tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]-decan-4-yl)-4-chloro-3-sulphamoylbenzamide (3-hydroxy-tripamide)	0.68	0.40	385
	<i>N</i> -(8(or 9)-Hydroxy-4- <i>aza-endo</i> -tricyclo-[5.2.1.0 ^{2,6}]-decan-4-yl)-4-chloro-3-sulphamoylbenzamide (8-hydroxy-tripamide)	0.61	0.44	385
	4-Chloro-3-sulphamoylbenzamide (CSBM)	0.56	0.35	234
	4-Chloro-3-sulphamoylbenzoic acid-(<i>N'</i> -acetyl)hydrazide (CSBH)	0.48	0.15	291
	4-Chloro-3-sulphamoylbenzoic acid (CSBA)	0.32	0	235

R_F values are from t.l.c. on Kieselgel 60 F₂₅₄ (0.25 mm in thickness) in solvent 1; 28% w/v aq. ammonia (sp. gr. 0.90)-water-butanol (1:9:50 v/v); or solvent 2; benzene-acetone (1:1, v/v).

第3章 主水酸化代謝物 8-hydroxy-tripamide の水酸基の配置の決定と水酸化の立体選択性

3-1 *endo* および *exo* 8-hydroxy-tripamide の合成と同定

1. N-(4-Aza-8-*endo*-hydroxy-*endo*-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decan-4-yl)4-chloro-3-sulfamoylbenzamide 5 の合成

endo 8-hydroxy-tripamide の合成は Fig.1-10 に示すルートで行った。

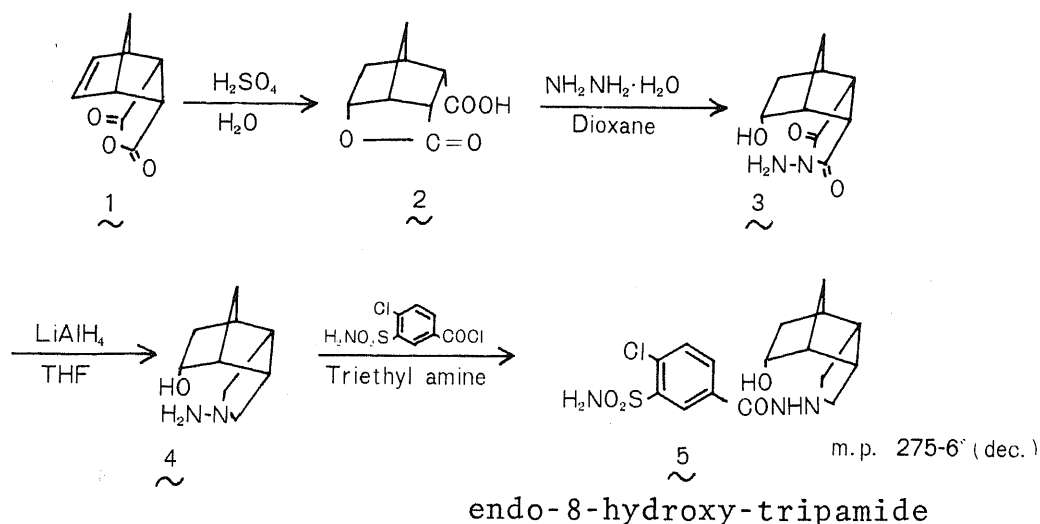


Fig. 1-10. Outline of synthesis of *endo*-8-hydroxy-tripamide

(1) 1 \rightarrow 2

1 (164 g) を水に懸濁し、室温で攪拌下、濃硫酸を滴下する。終了後90℃で10~15分間攪拌すると透明溶液となる。この溶液に熱湯 2 l を加え、約 1 時間攪拌、氷冷し、析出結晶を濾過、水洗する。

収量 149.8 g m. p. 196-7°

(2) 2 \rightarrow 3

Bicyclo[2.2.1]heptane-*endo*-2,3-dicarboxylic acid-5-*endo*-hydroxy- γ -lactone 2 36.4 g (0.2M) にジオキサン 200 ml を加える。室温で攪拌下80% Hydrazine hydrate 15 g (0.24M) を滴下する。その後加熱し、還流下 5 時間反応する。ジオキサンを減圧で留去しアメ状残留物にエタノール 100 ml を加え氷冷すると結晶化する。

結晶を減圧で濾過し、エタノールから再結晶する。

収量 34.3 g m. p. 162-3°

(3) 3 → 4

金属ナトリウムで乾燥した Tetrahydrofurane 500ml 中に LiAlH_4 74 g (0.2M) を徐々に加え、室温で攪拌する。

次に 3 19.6 g (0.1M) を発熱・発泡に注意しながら、5～6回に分けて加える。その後加熱し、還流下6時間反応する。

反応混合物を氷冷し、10%水酸化ナトリウム水溶液20mlを滴下し、分解する。内容物を減圧濾過し濾液を MgSO_4 で乾燥後濾過する。Tetrahydrofurane を減圧留去し、残留物を蒸留する。

b. p. 171-6°/19 mm Hg 収量 13.7 g

(4) 4 → 5

4 8.4 g (0.05M) と Triethylamine 6ml をジオキサン80mlに溶解する。この溶液に酸クロライド (Fig.1-10) 12.7 g (0.05M) を2回に分けて加える。室温で2時間攪拌後、ジオキサンを減圧で留去し、残渣をカラムクロマト (シリカゲル 60～80 メッシュ, 400 g) にかけて、クロロホルム, 5%エタノール-クロロホルム, 10%エタノール-クロロホルムで順に溶出させる。

5 9.7 g の白色結晶が得られ、エタノールから再結晶する。

収量 8.2 g m. p. 275-6° (分解)

元素分析 $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S} = 385.8$

	C	H	N
理論値	49.81	5.23	10.89
実験値	49.64	5.26	10.89

2. N-(4-Aza-8-exo-hydroxy-endo-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}]-decan-4-yl)-4-chloro-3-sulfamoylbenzamide 14 の合成

8-exo-hydroxy-tripamide の合成は Fig.1-11 に示すルートで行った。

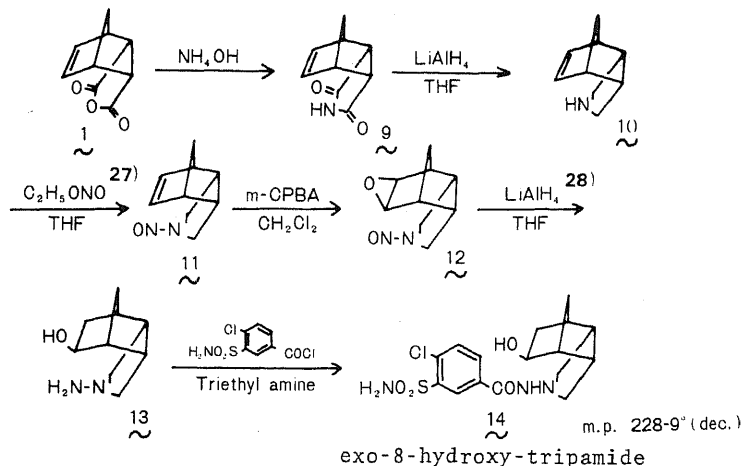


Fig. 1-11. Outline of synthesis of endo-8-hydroxy-tripamide

(1) 1→9

1 無水ハイミック酸 (endo) 164 g (1 M) に28%アンモニア水 200ml, 水 100mlを加えて, 還流下6時間反応する。一夜放置後水 200mlを加え結晶を滷過, 水洗する。

収量 146 g m. p. 184-5°

(2) 9→10

金属ナトリウムで乾燥した Tetrahydrofurane 500ml中に LiAlH₄ 38 g (1.0M) を加え, 室温で攪拌する。

次に 9 82 g (0.5M) を5~6回に分けて加える。その後加熱, 還流下5時間反応する。反応混合物を氷冷し, 10%水酸化ナトリウム水溶液 50mlを滴下し分解する。内容物を減圧滷過し, 滷液を MgSO₄ で乾燥後滷過する。Tetrahydrofurane を減圧留去すると無色ゼリー状の物質 10 が得られる。

収量 52 g

(3) 10→11

10 27.4 g (0.2M) を Tetrahydrofurane 200mlに溶解する。攪拌下10~15°Cに温度を保ちつつ, 15%エチルニトライト-エタノール溶液100g(0.22M) を加える。室温で24時間攪拌する。溶媒を減圧で留去し得られた赤褐色アメ状物質をカラムクロマト(シリカゲル 60~80 メッシュ, 500 g) にかけて, ベンゼン, 1%酢酸エチル-ベンゼンと順に溶出させる。黄色 oil が得られた。

収量 28.3 g

(4) 11→12

11 28 g (0.17M) を塩化メチレン 200mlに溶解する。氷冷, 攪拌下25°C以内で85% m-Chloroperbenzoic acid 38.6 g (0.19M) を加える。室温で3時間反応後, 水 200mlを加え, 次に10% Na₂S₂O₄ 70mlを加え, 過剰の m-Chloroperbenzoic acidを分解する。有機層を分取し, 10% Na₂CO₃溶液50mlで2回洗滌する。MgSO₄で乾燥し滷過後, 塩化メチレンを減圧留去する。得られた粗結晶をカラムクロマト(シリカゲル 60~80 メッシュ 500 g) にかけて5%酢酸エチル-ベンゼン, 10%酢酸エチル-ベンゼンと順に溶出させる。

収量 16.7 g m. p. 137-8°

(5) 12→13

金属ナトリウムで乾燥した Tetrahydrofurane 100ml中に LiAlH₄ 3.8 g (0.1M) を加え室温で攪拌する。これに 12 を9 g (0.05M) を5~6回に分けて加える。加熱還流下7時間反応する。反応混合物を氷冷し, 10%水酸化ナトリウム 10mlを滴下し, 分解する。内容物を減圧滷過し, 滷液を MgSO₄ で乾燥する。滷過し, Tetrahydrofurane を減圧留去すると黄橙色の oil として 13 が得られた。

crude 8.8 g

(3) 13→14

13 3.4g に Triethylamine 3 ml, ジオキサン 30ml を加え, 室温攪拌し, これに酸クロライド 5.1g を加える。室温で 3 時間反応後, ジオキサンを減圧で留去し, 残渣をカラムクロマト (シリカゲル 60~80 メッシュ, 150g, 2%メタノール-ベンゼンで溶出) で精製すると 2.1g の白色結晶を得る。

この結晶をエタノールから再結晶する。

収量 1.6g m. p. 228-9°

元素分析 $C_{16}H_{20}ClN_3O_4S = 385.8$

	C	H	N
理論値	49.81	5.23	10.89
実験値	49.74	5.36	10.42

3. 代謝物 8-hydroxy-tripamide の水酸基の配置の決定

(1) *exo* および *endo* 8-hydroxy-tripamide のマススペクトル

合成した *exo* および *endo* 8-hydroxy-tripamide のマススペクトルを Fig.1-12 に示した。*exo* 体に M^+357 が認められた他はほとんど同様のフラグメントピークを示した。

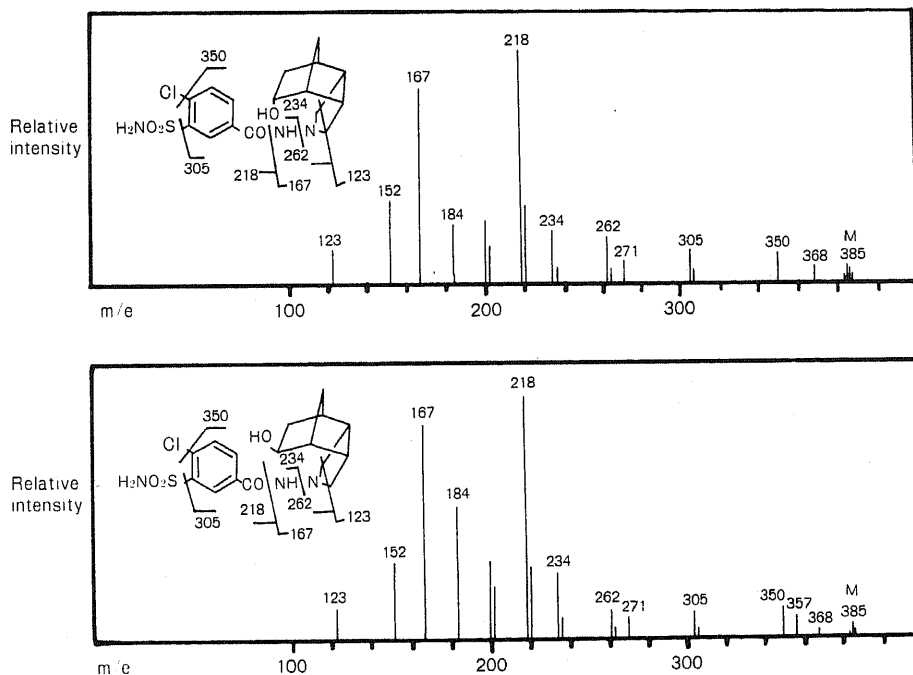


Fig. 1-12. Mass spectra of *endo* or *exo*-8-hydroxy-tripamide

(2) *exo* および *endo* 8-hydroxy-tripamide, および代謝物の HPLC クロマトグラム

合成した *exo* および *endo* 8-hydroxy-tripamide, および代謝物の HPLC クロマトグラ

ムを Fig.1-13 に示した。

各化合物の HPLC 保持時間は、exo 体が5.65分、endo 体7.74分であり、代謝物(5.64分)は exo 体のそれと一致した。

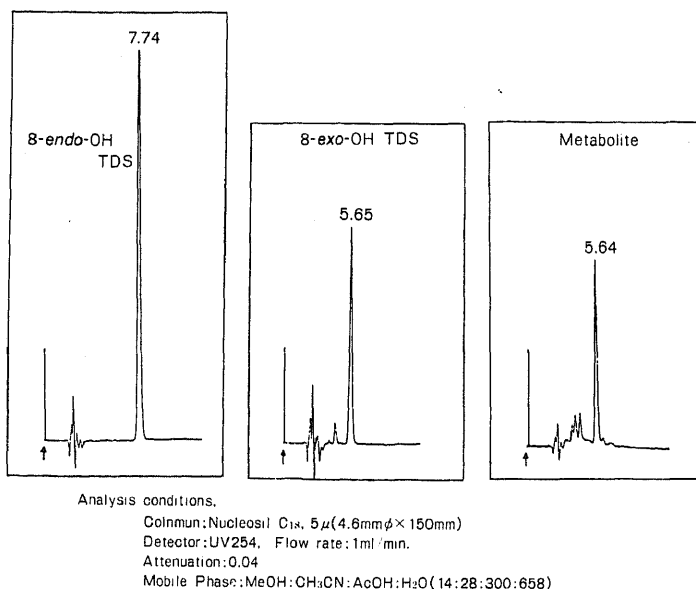
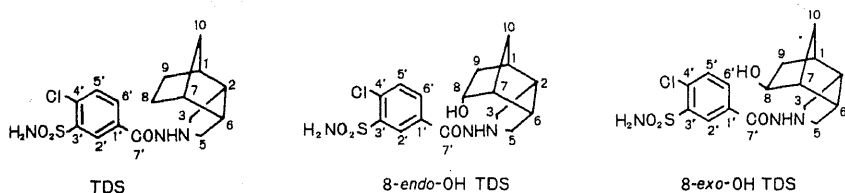


Fig.1-13 HPLC chromatograms of 8-endo- or exo-hydroxy-tripamide, and metabolite

- (3) exo および endo 8-hydroxy-tripamide, および代謝物の ¹³C-NMR のケミカルシフト合成した 8-hydroxy-tripamide, および代謝物の ¹³C-NMR の chemical shifts を Table 1-2 に示した。



	C _{1'}	C _{2'}	C _{3'}	C _{4'}	C _{5'}	C _{6'}	C _{7'}	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
TDS	134.1	129.1	142.0	132.5	132.4	132.4	163.5	41.5	42.5	55.4	55.4	42.5	41.5	24.5	24.5	42.5
8-endo-OH TDS	134.6	129.2	142.3	133.0	132.7	132.7	164.5	42.4	41.5	56.3	55.6	41.1	45.8	74.3	33.1	40.3
8-exo-OH TDS	134.0	129.2	142.1	132.8	132.6	132.6	163.5	43.0	42.2	55.6	54.8	41.3	49.5	69.2	37.4	38.5
Metabolite	134.0	129.2	142.1	132.8	132.6	132.6	163.5	— ^a	— ^a	55.6	54.8	— ^a	43.5	69.2	37.4	38.5

a: Not assignable

Table 1-2 ¹³C Chemical shifts of 8-endo- or exo-hydroxy-tripamide, and metabolite

Table1-2から明らかなように、Tripamide に比べて、aromatic ring の炭素の chemical shift は両化合物とも変わらないが、Tricyclodecane ring の炭素に変化が認められた。

水酸基の置換した炭素である α 位 C_8 は44.7~49.8ppm, β 位 C_9 は8.6~12.9 ppm, C_7 は4.3~8 ppm 低磁場シフトしているのに対して、 C_{10} は endo 配置が2.2 ppm, exo 配置が4 ppm 高磁場シフトした。

立体的に込み合っている2個の原子がそれぞれの Van der Waals 半径またはそれ以下の距離にある場合は C-H 結合の電子は分極を受けて高磁場シフトする立体圧縮シフト効果が報告されている。³⁰⁻³⁴⁾

したがって C_{10} がより高磁場シフトした exo 8-hydroxy-tripamide の水酸基が exo 配置であることが確認された。

代謝物は量的に少ないため assign できなかったシグナルが認められたが、他はすべて exo 8-hydroxy-tripamide と一致した。したがって代謝物は exo 8-hydroxy-tripamide と同定した。

3-2 水酸化反応の同位体効果と立体選択性

8, 9-exo-cis- D_2 -Tripamide (0.236 μ mol) および非標識 Tripamide を基質に用いて、NADPH 生成系肝ミクロゾーム (ミクロゾーム蛋白量1.24mg) における3および8-hydroxy-tripamide の生成速度を比較検討した。(Fig.1-14)

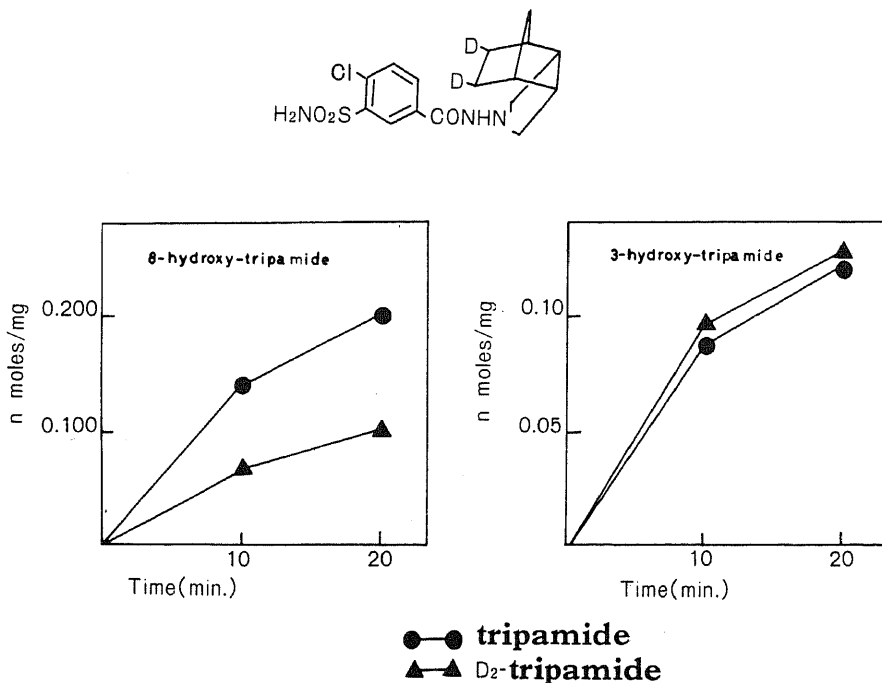


Fig. 1-14

The effect of isotope on tripamide hydroxylation by microsomal preparation

8-hydroxy-tripamide の生成速度に 2 倍の同位体効果が認められた。したがって 8-水酸化反応は *exo* 配置から立体選択的に起り、しかも水素の引き抜きが反応の律速にないことを示している。一方 3-hydroxy-tripamide の生成は非標識 Tripamide を基質に用いた時と比べて変らなかった。

同様なことが、3,5-D₄-Isoindoline-Tripamide を基質に用いた時の 3-hydroxy-tripamide の生成にも認められた。(Fig.1-9)

したがって Aliphatic carbon への水酸化反応には同位体効果が報告されている^{26, 27)} ごとく Tricyclodecane ring の水酸化反応においても同様なことが認められた。

第4章 Tripamideの代謝経路

4-1 肝アリールアミダーゼによる加水分解

実験方法

1. アリールアミダーゼ活性の測定

アリールアミダーゼ活性は、反応溶液として ^{14}C -Tripamide (0.32 μmoles) 0.2ml, 0.2M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1ml 加え, 37°C でインキュベート後, 反応溶液 0.01ml を TLC にスポットした。展開溶媒ベンゼン/メタノール/酢酸 (80/20/5) で展開後, オートラジオグラフィーをとり, Tripamide および CSBA の Rf 値に相当する部分をかきとり放射能を測定した。

2. O-Ethyl O-p-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN) による阻害実験

EPN (E. I. du pont de Nemours Co, 純度95%以上) をエタノール/プロピレングリコール (2/8) の溶媒にとかし, 0.2ml を反応溶液に加えた。

3. ウサギ肝マイクロゾームからの肝アリールアミダーゼの精製³⁵⁾

0.25M Sucrose で10%肝ホモジネートを調製し, マイクロゾーム分画を得てそれを凍結乾燥した。マイクロゾーム蛋白あたり 0.1mg のコール酸を加え, 37°C, 30分間インキュベート後, 100,000 μ , 60分間超遠心分離し, 可溶化上澄を得た。この40-70%飽和硫酸分画を採取し, 沈澱を 0.05 M Tris-HCl buffer (pH8.0) に溶解し, Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーで脱塩した。ついで DEAE Sephadex A50 カラムに吸着させ, Tris-HCl buffer で洗滌後, 0.1M NaCl を含む buffer で溶出し, ついで 0.2M に塩濃度を上げるにより目的とする酵素活性を有する蛋白を溶出した。メンブランフィルターで脱塩濃縮したものを用いた。以上の操作より得られた酵素標品は千葉大学薬学部薬物学教室佐藤哲男助教授より供与された。比活性はマイクロゾームの23倍で, これを10倍に buffer で希釈して用いた。(0.47 U/mg)

実験結果

1. O-Ethyl O-p-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN) による Tripamide 水解反応の阻害

佐藤ら³⁶⁾の報告によれば, EPN は Peptidase を全く阻害せず, Acetanilidase に対しては, $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 以下では阻害せず, Isocobaximid amidase (アリールアミダーゼ) に対しては $1 \times 10^{-4}\text{M}$, $1 \times 10^{-5}\text{M}$ でそれぞれ66.8, 25%阻害する。

そこで in vitro 肝マイクロゾームにおける Tripamide の代謝活性に及ぼす EPN の影響を検討した。

Fig.1-15 から明らかなように, 8-hydroxy-tripamide の生成はほとんど阻害されないのに対して, CSBA の生成は EPN 濃度 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , $1 \times 10^{-4}\text{M}$ でそれぞれ

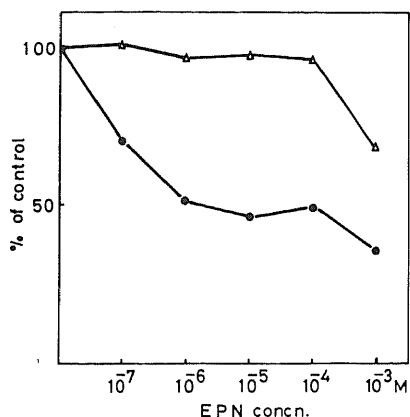


Fig. 1-15. The values are expressed as percentage of control activity from three experiments using rat liver microsomes. 8-hydroxy-tripamide formation ($\triangle-\triangle$); 4-chloro-3-sulphamoylbenzoic acid (CSBA) formation ($\bullet-\bullet$).

29, 47, 53, 50%阻害された。

2. 精製アリールアミダーゼによる Tripamide の水解

精製アリールアミダーゼ (0.47 U/mg) の pH 8.0 Tris-HCl buffer 懸濁液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ml を使い, ¹⁴C-Tripamide (0.32 μ moles) を基質にして, 37°C, 1, 2, 24時間インキュベートした。(Fig.1-16)

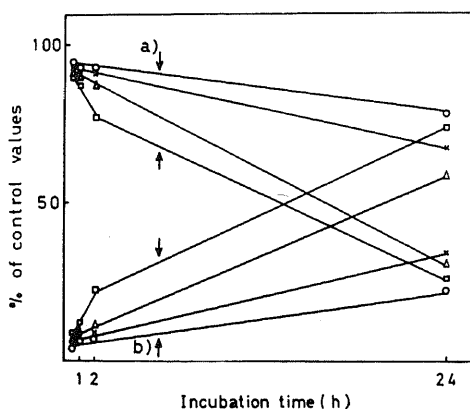


Fig. 1-16. The values (a) disappearance of tripamide and (b) appearance of CSBA, are expressed as percentage relative to control values after incubation without enzyme. The partially purified arylamidase (4.7 units/ml; Satoh and Moroi 1972) obtained from a rabbit microsomal preparations was suspended in tris-HCl buffer (pH 8.0). 0.1 ml (O—O), 0.2 ml (x—x), 0.4 ml ($\Delta-\Delta$) and 0.6 ml ($\square-\square$) enzyme preparations were used respectively.

Fig.1-16 から明らかなように, アリールアミダーゼにより Tripamide は水解され, CSBA が生成した。Tripamide の減少に相当する CSBA が生成していることから, Tripamide の水解反応以外の反応は起きていないことが示された。

Fig.1-16 に示すがごとく、酵素量の増加に応じて、CSBAの生成が増加した。TripamideはpH8.0,0.2M Tris-HCl bufferのみでインキュベートした時は、全く変化しなかった。

以上の事から、Tripamideの水解反応には肝アリアルアミダーゼが関与しているものと考えられる。

血漿中には種々のエステル化合物をはじめ、Procainamideのようなアミド結合の水解酵素が存在することが知られている。

そこでTripamideの水解が血漿中で起こるか否かを検討した。ウサギおよびモルモットから得た血漿1mlに¹⁴C-Tripamide (0.32 μmoles)を加え、37°Cで1時間インキュベートしたが、いずれの血漿を用いてもTripamideは水解されなかった。

Isocarboxamidも血漿ではほとんど水解されないことが報告されている。³⁷⁾

Tripamideが肝ミクロゾーム中のアリアルアミダーゼで水解されることを明らかにしたが、代謝物8-hydroxy-tripamideおよびCSBHもTripamide同様に肝ミクロゾームで水解されるか否を検討した。Tripamideのみが水解され、8-hydroxy-tripamideおよびCSBHは水解されなかった。

4-2 一酸化炭素およびチトクローム P-450 抗体による阻害

実験方法

1. 一酸化炭素阻害実験

反応溶液を密栓バイアルビンに入れ、バイアル内を一酸化炭素/酸素(80/20)の混合ガスで置換し、実験を行った。

2. チトクローム P-450 抗体による阻害

Wistar 系雄性ラット(体重200g)から常法に従ってミクロゾーム分画を調整した。

Incubation mixtureはG-6-p 20 μmol (0.1ml), NADP 0.8 μmol (0.1ml) G-6-P dehydrogenase 5 units (0.1ml) 0.05 phosphate buffer (pH7.4) 0.2ml ¹⁴C-Tripamide 0.236 μmol (0.2ml) microsomes preparation 0.05ml (0.35mg protein, P-450 contents; 0.51 nmol/ml)である。あらかじめ調整した³⁸⁻⁴⁰⁾チトクローム P-450 および P-448 抗体(千葉大・薬・北田光一助手より供与)を所定の濃度添加後10分間 pre-incubateする。その後、NADPH生成系を加えて、37°, 30分間 incubateした。エーテル20mlを加えて反応を停止し、エーテル層を減圧下濃縮乾固し、HPLCにより分析した。

実験結果

(1) 一酸化炭素による Tripamide の水酸化反応の阻害

肝ミクロゾームにおける Tripamide の水酸化反応に及ぼす一酸化炭素の影響を Table 1-3に示した。

Table 1-3 から明らかなように、Aniline水酸化活性が55%阻害される条件下で、3-hydroxy-tripamideの生成が45%、8-hydroxy-tripamideの生成が90%阻害されるのに対して、CSB

Aの生成はほとんど阻害されなかった。

Tripamideの水酸化反応が一酸化炭素で阻害されることから、この反応は肝ミクロゾームに局在するチトクローム P-450 が関与していることが推察された。

Table 1-3 Effect of carbon monoxide on the hydroxylation of tripamide or aniline by rat liver microsomal preparation.

Metabolite	Metabolite formed (nmol/g liver per 30 min)		
	N ₂ /O ₂ (80:20)	CO/O ₂ (80:20)	Inhibition (%)
p-Aminophenol	1399	636	55
3-Hydroxy-tripamide	45.9	25.4	45
8-Hydroxy-tripamide	39.3	4.0	90
4-Chloro-3-sulphamoylbenzoic acid (CSBA)	54.6	47.7	13

The mean values of three experiments are expressed as nmol per g liver per 30 min.

(2) チトクローム P-450 抗体による Tripamide の水酸化反応の阻害

肝ミクロゾームにおける Tripamide の水酸化反応に及ぼすチトクローム P-450 および P-448 抗体の影響を Fig.1-17 に示した。

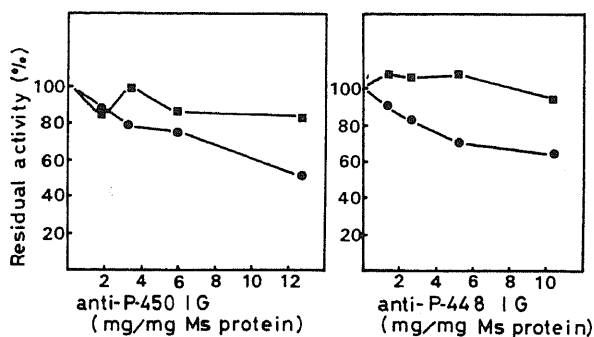


Fig. 1-17 Effect of anti-P-450 or anti-P-448 on tripamide hydroxylation.

Liver microsomes from normal rat were preincubated with various concn. of anti-P-450 IG (58.5 mg protein/ml in 10 mM phosphate (pH 7.4) containing 20% aq. glycerol) or anti-P-448 IG (30.0 mg protein/ml in same buffer) for 10 min. Microsomal protein concn. was 0.35 mg for the assay. ■—■, 3-hydroxylation; ●—●, 8-hydroxylation.

Fig.1-17 から明らかなように、8-hydroxylation はチトクローム P-450 および P-448 いずれの抗体によっても阻害されるのに対して、3-hydroxylation はほとんど阻害されなかった。このことから Tripamide の 8-hydroxylation はチトクローム P-450 が関与していることが明らかであり、3-hydroxylation は CO で阻害されることからチトクローム P-450 が関与していることが示唆されたが、用いたチトクローム P-450 抗体により阻害されないことから、Tripamide の 3-hydroxylation は 8-hydroxylation とは別個の P-450 種が関与していることが推察された。

4-3 フェノバルビタールおよびメチルコランズレン投与による影響

PB および MC を前処理した場合には、基質特異性の異なる P-450 が誘導されることが知られている。前者は P-450、後者は P-448 と呼ばれている。

そこで Tripamide 水酸化反応には P-450 種のうち、どちらの P-450 が関与しているかを明らかにするために、PB および MC をラットに前処理した肝ミクロゾームを用いて、Tripamide の代謝活性を検討した。

実験方法

1. Phenobarbital (PB) および 3-Methylcholanthrene (MC) 処理

Wistar 系雄性ラット (体重136-149g) に PB-Na 塩 (80 mg/kg) の生理食塩水溶液あるいは MC (40mg/kg) の Corn oil 溶液を毎日 1 回、3 日間、腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に瀉血して殺した。

実験結果

P-450 量は PB 投与で 2.3 倍、MC 投与で 1.7 倍に増加した。b₅ 量は PB 投与では変化なかったが MC 投与で約 20% 増加した。Aminopyrine N-脱メチル化活性は PB 投与で 2.8 倍に上昇したが MC 投与では変わらなかった。

Tripamide は、P-450 と結合すると Type 1 の基質差スペクトルを示す。

Tripamide の P-450 結合量は、PB 投与で 1.5 倍に増加したが MC 投与では変わらなかった。

以上のごとく、本実験において PB および MC 投与による典型的な誘導現象が観察された。

そこでこの条件下で Tripamide の代謝について検討した。(Fig.1-18)

3-hydroxy-tripamide の生成は PB 投与で約 30% 減少し、MC 投与で約 50% 増加した。8-hydroxy-tripamide の生成は、PB 投与で変わらず、MC 投与で約 40% 増加した。CSBM の生成は、PB および MC 投与でいずれも対照群と変わらなかった。CSBA の生成は PB 投与で約 50% 増加傾向を示したが、MC 投与では変わらなかった。

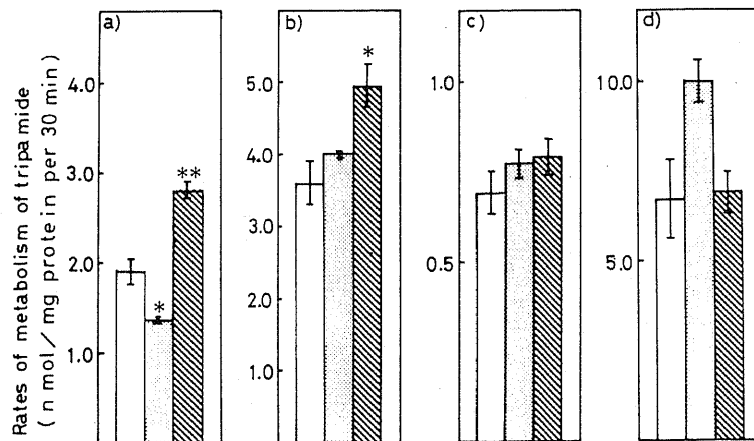


Fig. 1-18 Effect of the treatment of rats with phenobarbitone or 3-methylcholanthrene on the metabolism of tripamide.

Significantly different from control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Each value represents the mean \pm S.E.M. ($n=3$) for (a) 3-hydroxy-tripamide, (b) 8-hydroxy-tripamide (c) 4-chloro-3-sulphamoylbenzamide (CSBM) and (d) 4-chloro-3-sulphamoylbenzoic acid (CSBA); phenobarbitone 3-methylcholanthrene control.

以上のごとく Tripamide の水酸化活性は MC 投与で誘導されることから、水酸化反応には P-450 種として P-448 が関与しているものと推察される。肝アリールアミダーゼは P B 投与で誘導されることから、³¹⁾ Tripamide の水解も P B 投与で誘導されたものと考えられる。

4-4 加水分解と水酸化反応の代謝種差

Tripamide は肝ミクロゾームに局在するアリールアミダーゼによって加水分解される一方、チトクローム P-450 によって水酸化される。両酵素については種差が認められる。^{41, 42)}

そこで、in vitro において、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌおよびヒトの肝ミクロゾームを用い、Tripamide の加水分解活性と水酸化活性について検討した。

実験方法

1. 使用動物

マウスは ddY 系 8 週令 (体重 31~33 g), ラットは Wistar 系 10 週令 (体重 250~270 g) モルモット Hartley 系 12 週令 (体重 430~450 g) ウサギ白色在来種 (体重 2.7 kg) および雑犬 (体重 10 kg) で各種とも雄性動物を用いた。ヒト肝は慶応大・医・薬理学教室鎌滝哲也助教授より供与された。

2. 肝ミクロゾーム分画の調製

肝を 1.15% KCl で灌流後、0.05M りん酸緩衝液-1.15% KCl (0.1mM EDTA 含有) pH7.4 にて 25% ホモジネートをつくり 9000 g, 20 分間、遠心分離した。その上清をさらに 105000 g, 60 分間超遠心分離し、そのペレットをミクロゾーム分画とした。なおヒトにおいては原発性肝癌および涙腺癌の肝転移の手術時に摘出した肝の正常組織部位、および脳動脈瘤死後 1 時間 30 分後に摘出した肝を直ちに -80° に保存したものをを用いた。使用時に 1.15% KCl で 20% ホモジネートをつくり、同様にしてミクロゾーム分画を調製した。

3. Tripamide の代謝活性の測定

基質として、¹⁴C-Tripamide (比放射能 18.67 μ Ci/mg) を用いた。ミクロゾーム分画を pH 7.4 0.05M りん酸緩衝液-1.15% KCl (0.1mM EDTA 含量) に懸濁し、酵素標品とした。反応溶液の組成は MgCl₂ 50 μ moles (0.1ml), NADP 0.8 μ moles (0.1ml) G-6-P 20 μ moles (0.1ml), G-6-P dehydrogenase 5 units (0.1ml), ¹⁴C-Tripamide (0.376 μ moles) 0.2ml, ミクロゾーム懸濁液 (3~7 mg protein/ml) 1 ml で、全量を 1.6ml とした。37°, 30 分間インキュベートした反応液にエーテル 20ml を加え、20 分間振盪した後、2500 r. p. m. で 5 分間遠心分離する。未変化体および水酸化代謝物の抽出を充分に行うため 2 回抽出操作を繰り返した。さらに加水分解産物 CSBA を抽出するため 2M 酢酸一塩酸緩衝液 1ml を加えて、pH 2.0 に調整し、エーテル 20ml で 2 回抽出した。エーテルを濃縮乾固して得た残渣にメタール 0.5ml を加えて溶解後ジアゾメタンを加え、2 時間放置し、CSBA をそのメチルエステルとして定量に供した。

4. 代謝物の定量

未変化体、水酸化代謝物 (3-hydroxy-tripamide および 8-hydroxy-tripamide) および CSBA メチルエステルは TLC で展開後オートラジオグラムを作成し、authentic 化合物に相当する代謝物の Rf 値部分をかきとり、放射能を測定した。

Aniline の水酸化活性、Aminopyrine および Benzphetamine の N-脱メチル化活性、チトクローム P-450 量の測定は常法通りである。

5. Incubation mixture の組成

ヒト肝ミクロゾーム	0.5mg	MgCl ₂	10mM
buffer	50mM	NADP	0.5mM
EDTA	0.1mM	G-6-P	5mM
		G-6-P dehydrogenase	0.5 unit
Substrate	50 μl	Total	0.5ml
Aniline	5mM		
Benzphetamine	1mM		
Aminopyrine	5mM		

著者の用いたヒト肝ミクロゾームは Aniline 水酸化活性、Benzphetamine N-脱メチル化活性、Aminopyrine N-脱メチル化活性を示した。すなわち Aniline 水酸化活性値 (0.56 n moles/mg/min) は Sultatos and Vesell⁴³⁾ の報告している値 (0.31~0.36 nmoles/mg/min) に良く近似しており、Aminopyrine N-脱メチル化活性値 (2.88 nmoles/mg/min) は Bohr ら⁴⁴⁾ の結果 (2.59±0.28 nmoles/mg/min) と良く一致していた。またチトクローム P-450 量についても Sultatos らの結果 (0.25~0.55 nmoles/mg) および Bohr らのそれ (0.39±0.14 nmoles/mg) と良く一致していた。

実験結果

各種動物の肝ミクロゾームにおける Tripamide の加水分解活性と水酸化活性を Table 1-4 に示した。

Table 1-4. Species difference on the hydroxylation or hydrolysis of tripamide

Animals	Tripamide metabolized	8-Hydroxy-tripamide	3-Hydroxy-tripamide	CSBA
		(n mol/mg/30 min)		
Mouse	20.2	7.49	1.44	1.57
Rabbit	23.7	10.57	3.93	2.26
Dog	9.0	2.02	0.24	0.34
Guinea pig	33.9	16.00	2.43	2.21
Rat	48.6	18.23	6.22	9.96
Human	7.0	2.60	0.35	0.47

肝ミクロゾームにおける Tripamide の加水分解活性は動物種により異なり，ラットが最も高く以下，ウサギ，モルモット，マウスの順で，ヒトおよびイヌが最も低かった。

ヒト肝ミクロゾームにおける Tripamide の加水分解活性をラットのそれと比較すると，ヒトはラットに比べて約1/20と低値を示した。肝ホモジネートにおける Isocarboxazide の加水分解活性はヒトはラットに比べて約1/2であり，Tripamide 分解活性の場合にはヒトおよびラット間の差異が著しいことが認められた。

一方水酸化活性は，ラット>モルモット>ウサギの順で，ついでマウスで，ヒトおよびイヌは最も低かった。

ヒトとラットについて，水酸化活性と加水分解活性を比較すると，ヒトの水酸化活性は加水分解活性に比べて6.3倍高い。一方ラットの場合は水酸化活性/加水分解活性の値は2.5であることから，ヒトはラットに比べて，加水分解反応よりも水酸化反応の方が優先的に起ることが推察された。

第5章 考 察

ラットの尿中から Amberlite XAD-4 カラムクロマトおよびシリカゲルカラムクロマトを組合せ、効率良く代謝物の単離・精製を行うことができた。

4種の標識化合物を合成し、互いに組合せることによって、代謝物の構造決定に大きく寄与した。すなわち 4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl moiety を有する代謝物はマスマスペクト測定から構造を推定し、別途合成した標品との同位体希釈分析により同定した。水酸化代謝物についてはマスマスペクトル測定より、Tricyclodecane ring に酸素が導入されたことを確かめ、水酸基の位置については最も水酸化を受けやすい位置を重水素および三重水素で標識し、それらの化合物を用いて、水酸化代謝物の $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ の値、肝マイクロゾームにおける代謝物の生成速度に及ぼす同位体効果から決定した。この方法は Aliphatic 炭素を持つ立体的な化合物の代謝物の構造決定に有用な方法と考えられる。

水酸化代謝物のうち main である 8-hydroxy-tripamide の水酸基の配置を決定するため、endo および exo 配置の 8-hydroxy-tripamide を立体選択的に合成する方法を確立した。これによって、代謝物が exo 配置であることを決定した。また 8,9-exo-cis-D₂-Isoindoline-Tripamide を合成し、それを用いて肝マイクロゾームにおける 8-hydroxy-Tripamide の生成速度に同位体効果が認められることから、立体障害の少ない exo 配置から立体特異的に水酸化が起ることを証明した。Bicyclic なノルボルネンの水酸化は exo/endo (3.4/1) と報告されている²⁷⁾ ので、Tricyclic な Tripamide の水酸化はより選択性が高められ、立体特異的水酸化が起るものと推察される。さらに Tripamide の水酸化は水素の引きぬきが律速となっていることが示され、良く知られている Aliphatic 炭素への水酸化⁴⁵⁾ と同様なメカニズムにより水酸化されるものと推察される。

同定した代謝物のうち 4-chloro-3-sulfamoylbenzoyl moiety を有する代謝物 CSBA, CSBM および CSBH は Tripamide と同等の利尿活性を有することが報告されている。^{45, 46, 47)}

Tripamide の水酸化には肝マイクロゾーム中のチトクローム P-450 が関与していることを明らかにしたが、3-hydroxylation と 8-hydroxylation とは異った P-450 種の関与が示唆された。このように水酸化の位置により P-450 種が異なるという報告は、Hexane の 1, 2, および 3 位水酸化⁴⁸⁾、Biphenyl の 2, 3, および 4 位水酸化⁴⁹⁾ Warfarin の 4, 6, 7, および 8 位水酸化⁵⁰⁾ 等にも認められる。

Tripamide の 3-hydroxylation は窒素に隣接した炭素への水酸化なので、8-hydroxylation のような C-C の水酸化とは水酸化メカニズムが異なるのかも知れない。このことは 3-hydroxylation と 8-hydroxylation の同位体効果が、前者が 1.6 倍に対して、後者が 2 倍とわずかではあるが、3-hydroxylation に同位体効果が小さいことから支持される。すなわち、3-hydroxylation が水素の引きぬきが律速となる割合が少ない、つまり、N-oxide から酸素の転移も水酸化のメカニズムに寄与しているのかも知れない。

一方、アミド結合の加水分解反応は肝マイクロゾームで行われ、PB 投与で誘導され、また EPN で阻害された。さらにウサギ肝マイクロゾームから精製した肝アリアルアミダーゼによって Tripamide は加水分解されることから、加水分解反応には肝アリアルアミダーゼが関与していることを示した。in vitro 肝マイクロゾームにおいては 8-hydroxy-tripamide および CSBH からは

CSBAがほとんど生成されなかったことからCSBAの生成は、Tripamideから直接の水解反応によって生成するものと考えられる。

以上をまとめ、Tripamideの代謝物の代謝経路についてFig.1-19に示した。

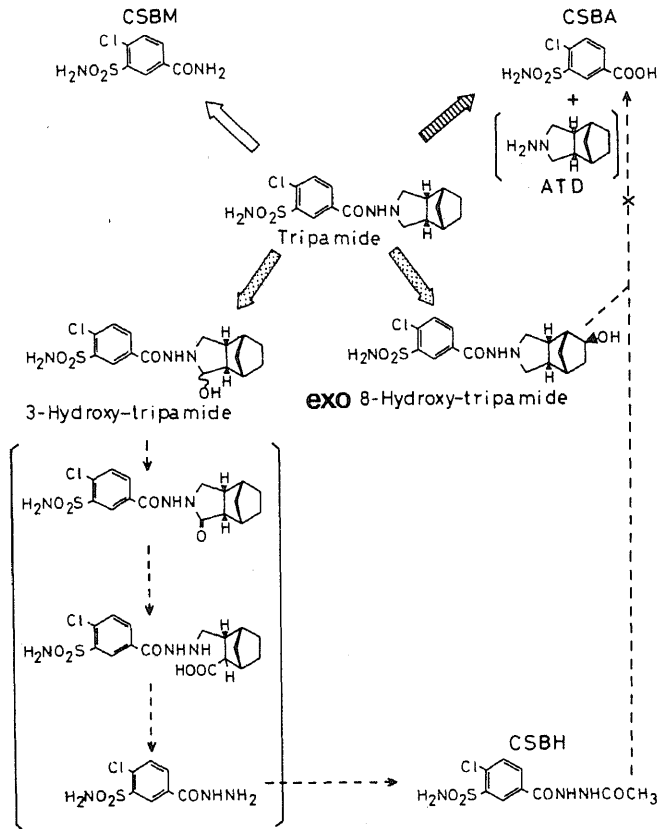


Fig.1-19 Postulated metabolic pathways of tripamide.

The enzymes participating in the metabolism of tripamide are indicated as follows; ; arylamidase, ; mono-oxygenase. Compounds in parentheses indicate presumed metabolites.

代謝物CSBHは、3-hydroxy-tripamideから図のカッコ内に示す推定代謝物を経由して生成するものと考えられる。また、TripamideからCSBAが生成する際、同時に4-Amino-4-aza-endo-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decane(ATD)が生成すると思われる。

ヒトはイヌと同様に他の動物に比べて代謝が遅いことが示唆された。またラットに比べてヒトは加水分解反応よりむしろ水酸化反応が優先することが示唆され、Tripamideの代謝経路に種差があることが示された。

第2編 ^{14}C -Tripamide の体内動態

クロルスルフォンアミド基を官能基にもつ降圧利尿剤は数多く開発されており、これらの体内動態においても多くの報告がなされている。しかしそのほとんどはサイアザイド骨核を有し、本骨核の生体内での安定性は極めて高く、多くは未変化体として尿中に排泄される。^{9, 10, 15)} 一方サイアザイド骨核を持たない化合物の代謝研究はほとんどない。²²⁾ そこで Tripamide の生体内動態を明らかにする目的でラットおよび家兔に ^{14}C -Tripamide を投与し、吸収、分布、代謝および排泄について検討した。

また Tripamide は動物においてすみやかに CSBA と ATD に加水分解されるので、Chlorosulfamoylbenzoyl の Carbonyl に標識した ^{14}C -Carbonyl-Tripamide と Tricyclodecan ring の 3 および 5 位の炭素を標識した ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の 2 種の標識化合物を用いて、ラットにおける吸収、分布および排泄について比較検討した。

第1章 ラットおよび家兔における ^{14}C -carbonyl-Tripamide の吸収、分布、代謝および排泄

実験方法

1. 動物

Wistar 系雄性ラット (体重200~250g) を用いた。

家兔 (雄, ニューゼalandホワイト, 体重 2.6~3.1kg)

3. 投与検体の調製および投与量

^{14}C -Tripamide はごく少量の濃塩酸にとかし、最終塩酸濃度が1.25%になるよう蒸留水で希釈し、 ^{14}C -Tripamide の経口投与の検体とした (^{14}C -Tripamide 1mg/ml)。静脈内投与のための検体は、さらに水酸化ナトリウムの結晶を加え、約 pH10 に調整した検体を用いた。投与量は 5mg/kg として、ラットは17時間絶食後経ロゾンデにおいて経口投与を行なった。家兔の場合はカテーテルにて胃内へ投与した。

静脈内投与は、ラットは大腿静脈に、家兔は耳静脈に行った。

4. 血液、尿および糞の採取

^{14}C -Tripamide を投与後、所定時間ごとにラット尾静脈より0.05mlの血液を採取した。家兔は耳静脈より0.1ml採血した。

ラットおよび家兔は個別に代謝ケージ内で飼育し、投与後所定時間ごとに尿および糞を別々に採取した。静脈内投与家兔については所定時間ごとに膀胱にカテーテルを挿入して採尿した。

4. 臓器の採取

^{14}C -Tripamide 投与後、所定時間ごとにラットおよび家兎を瀉血して殺し、主要臓器を摘出し、生理食塩水で良く洗浄した。

5. 胆汁の採取

ラットをエーテル麻酔下で背面固定後、開腹し、ポリエチレンチューブ (Cray Adams, PE50) を総胆管に挿入後、腹部を縫合した。

覚醒後 ^{14}C -Tripamide を投与し、ボールマンケージに移し、所定時間ごとに48時間まで採取した。

6. 全身オートラジオグラフィー

ラットに ^{14}C -Tripamide を経口投与し、投与2時間、8時間、72時間後にエーテル麻酔により殺し、ドライアイス-アセトン中で急速凍結した後、マイクロトームで厚さ20ミクロンの全身切片をサロテープ (久光製薬) 上に切り出した。正中線および左腎断面の切片をX線フィルム (サクラ, 工業用, タイプN) に密着させ、カセット内で9日間露出しオートラジオグラムを作成した。

オートラジオグラム上の各臓器の同定は、対応する組織切片との比較により行なった。

8. 代謝物の定量

(1) ラット血中代謝物の抽出

ラット1匹あたり0.2mlを所定時間ごとに採血し、3匹から得られた血液に蒸留水40mlを加えて溶血し、10,000 r. p. m. で10分遠沈後、上澄をアンバーライト XAD-4 のカラムクロマトグラフィーにかけた。水、次いで40%メタノール、最後にメタノールで溶出させ、各分画中の代謝物の定量を行なった。

(2) 肝臓、腎臓からの抽出

肝臓、腎臓を水でホモジナイズして、凍結乾燥後、メタノールで80℃、4時間、還流抽出した。メタノール抽出液をさらに Sephadex LH 20 カラムクロマトグラフィーにかけ、脂質成分を除いた後、代謝物の定量を行なった。

(3) 胆汁、尿中からの抽出

24時間胆汁および尿はそのまま Amberlite XAD-4 カラムクロマトグラフィーを行ない、水、40%メタノール、メタノールで溶出させ、分画中の代謝物を定量した。

(4) 糞中からの抽出

糞の乾燥粉末約0.1gをメタノールで80℃、4時間還流抽出した。

(5) 薄層クロマトグラフィ (TLC)

市販の薄層板 (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) を用い、以下に示す展開溶媒を用いた。

ベンゼン / アセトン (1 / 1)

28%アンモニア水 / 水 / n-ブタノール (1 / 9 / 50)

展開後の検出はUV吸収, 放射能の検出はX線フィルムを用いたオートラジオグラムにより行なった。

代謝物の定量はTLCで分離した代謝物の各スポットをかきとりジオキサン系シンチレーター 5 mlまたは10mlを加えて放射能を測定することにより行なった。

9. 放射能の測定

組織中の放射能の測定のための試料の調製は⁽¹⁾燃焼法または⁽²⁾可溶化法により行なった。

(1) 燃焼法

血液は一定量を濾紙に塗布後, 風乾し, 糞は減圧乾燥後, 乾燥粉末として約5~40mgを正確に秤量後, セロテープで濾紙に封入した。臓器は湿重量約50~200mgを正確に秤量後, 減圧下乾燥した。これらの乾燥試料を自動燃焼装置 (Model ASC-111, Aloka) で燃焼し, 液体シンチレーションカウンター (Model LSC-652, Aloka) で放射能を測定した。

(2) 可溶化法

血液は0.05mlあるいは0.02mlをSoluen-350 (Packard) / イソプロピルアルコール (1 / 4) 0.75mlで可溶化し, 過酸化水素水0.25mlを加えて20分間放置後, 濃塩酸を0.1ml加えて, ジオキサン系シンチレーター 5 mlを添加した。

臓器は湿重量約50~100mgを正確に採取して, Soluen-350 0.5mlに添加し, 50°Cで約2時間インキュベートし, 可溶化後, 過酸化水素水を数滴加えて脱色し, 濃塩酸0.7mlを加え, ジオキサン系シンチレーター 5 mlを添加した。

尿および胆汁は一定量をジオキサン系シンチレーターを加え, 液体シンチレーションカウンターで測定した。

実 験 結 果

1-1 血中濃度

¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) ラットおよび家兔に経口および静脈内投与した際の血中放射能濃度を Fig. 2-1および2-2に示した。

¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) をラットに経口投与した際の血中放射能濃度のピークは投与後1時間で, Tripamide換算4.96 μg/mlであり, 血中からの消失は二相性 (半減期は2.6時間, 12.8時間) を示した。家兔に¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) を経口投与した場合には, 投与後1時間でピークに達し, その濃度はTripamide換算で2.88 μg/mlであり, 血中消失半減期は44分, 5.31時間とラットに比べて血中からの消失が速かった。

¹⁴C-Tripamideを静脈内投与した場合の血中消失半減期は, ラット (0.6mg/kg) では0.03, 2.63時間であるのに対して, 家兔 (0.3mg/kg) では0.06, 1.51時間, ラットに比べて家兔の方が速かった。(Fig2-2) 両動物における血中主代謝物はCSBAであるので¹⁴C-CSBAを静脈内投与した際の血中消失半減期を検討すると, ラット (0.52mg/kg) では65分, 家兔 (0.24mg/kg) では二相性を示しそれぞれ1.7分と49分であり, 家兔の方が短かった, また8時間までに尿

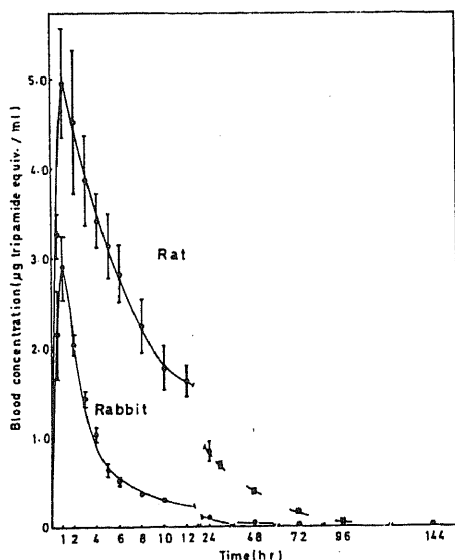


Fig. 2-1 Blood concentration of radioactivity after oral administration of [^{14}C]tripamide (5 mg/kg) to rats and rabbits. Values represent the means \pm S.E. of three animals. \circ : rat, \bullet : rabbit.

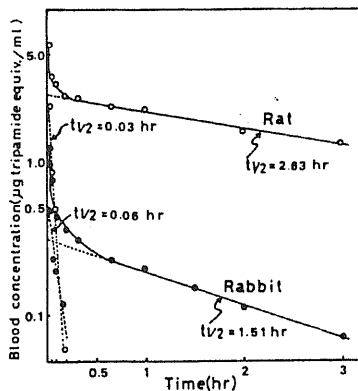


Fig. 2-2 Blood concentration of radioactivity after intravenous administration of [^{14}C]tripamide to rats (0.6 mg/kg) and rabbits (0.3 mg/kg). Values represent the means of three animals. \circ : rat, \bullet : rabbit.

中へ回収される放射能はラット約20%，家兎約100%であり，家兎はラットの約5倍尿中に排泄された。

以上のことから ^{14}C -Tripamide 投与後の血中放射能濃度の消失における両動物種間での差異は，主代謝物CSBAの生成速度，CSBAの排泄速度および排泄経路の差異によるものと推察される。

^{14}C -Tripamide (4.5 mg/kg) をラットに7日間連続経口投与した際の血中放射能濃度の推移を Fig. 2-3 に示した。

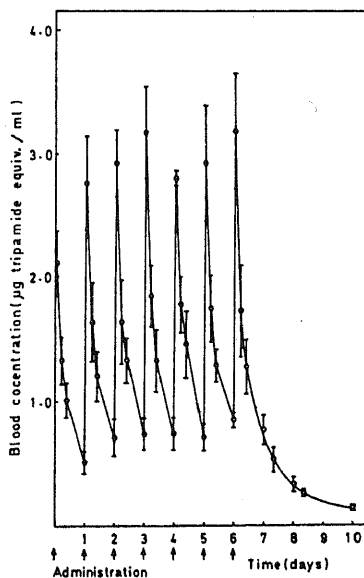


Fig. 2-3 Blood concentration of radioactivity after repeated oral administration of [^{14}C]tripamide (4.5 mg/kg) to rats. Values represent the means \pm S.E. of three animals.

^{14}C -Tripamide をラットに連続経口投与した際の最高血中放射能濃度は連続投与 2 日後でほぼプラトーに達し、Tripamide 換算約 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。血中放射能濃度の消失は投与回数に関係なく一定で、最終投与後の血中消失半減期は一回投与の場合とほとんど一致していた。

1-2 組織内分布

1. 組織内分布

ラットに ^{14}C -Tripamide ($5 \text{ mg}/\text{kg}$) を経口投与した際の放射能の臓器内分布を Table 2-1 に示した。

^{14}C -Tripamide ($5 \text{ mg}/\text{kg}$) を経口投与した後の放射能の臓器内分布は、肝臓が最も高く、

Table 2-1 Tissue distribution of radioactivity in rats after oral administration of ^{14}C tripamide ($5 \text{ mg}/\text{kg}$)

Tissues	Time (hr) after administration			
	2	8	96	7 days
	(μg tripamide equiv./g or ml)			
Brain	0.10±0.02	0.07±0.02	0	0
Testis	0.34±0.04	0.14±0.01		0
Nerve	0.18±0.02	0.07±0.01	0.01±0.00	0
Fat	0.27±0.04	0.07±0.00	0.02±0.00	0
Muscle	0.51±0.06	0.17±0.01	0.01±0.00	0
Pancreas	0.73±0.08	0.71±0.06	0.01±0.00	0
Heart	1.07±0.10	0.41±0.02	0.02±0.00	0
Spleen	1.34±0.04	0.63±0.04	0.06±0.01	0.02±0.00
Adrenal	1.43±0.20	0.31±0.06	0.01±0.00	0
Blood	4.11±0.19	2.94±0.40	0.14±0.01	0
Lung	1.25±0.09	1.09±0.13	0.03±0.00	0.01±0.01
Kidney	8.30±0.19	2.80±0.07	0.18±0.06	0.04±0.02
Liver	11.41±0.85	3.59±0.33	0.10±0.02	0.05±0.01
Intestine	3.45±0.94	4.23±1.96	0.10±0.00	0
Stomach	2.82±0.26	0.85±0.02	0.03±0.01	0

Values represent the means±S.E. of three animals.

Table 2-2 Tissue distribution of radioactivity in rabbits after oral administration of [¹⁴C] tripamide (5 mg/kg)

Tissues	Time (hr) after administration		
	1	3	7 days
	(μg tripamide equiv./g or ml)		
Brain	0.13±0.02	0.10±0.01	0.03±0.01
Testis	0.32±0.10	0.32±0.05	0.02±0.00
Nerve	0.13±0.06	0.43±0.02	0
Fat	0.25±0.07	0.25±0.01	0.10±0.02
Muscle	0.22±0.05	0.27±0.04	0
Thymus	0.45±0.15	0.36±0.07	0.01±0.00
Pancreas	0.85±0.32	0.50±0.04	0.03±0.01
Heart	0.95±0.28	0.81±0.06	0.04±0.01
Spleen	0.70±0.25	0.48±0.06	0.01±0.01
Adrenal	1.07±0.42	0.64±0.16	0.01±0.00
Blood	2.88±0.36	1.31±0.21	0
Lung	1.48±0.57	1.12±0.17	0.01±0.01
Kidney	20.87±8.01	10.13±2.46	0.11±0.01
Liver	4.84±1.54	5.19±0.17	0.03±0.01
Bile-cyst	7.36±0.64	7.65±1.32	0.03±0.02
Bile	0.06±0.01*	1.31±0.21*	0
Intestine	3.56±0.79	5.33±0.75	0.12±0.02
Stomach	23.50±3.67	5.17±2.18	0.02±0.01

*Represents % of dose. Values represent the means±S.E. of three animals.

次いで腎臓で、他の臓器は血中濃度より低く、脳、精巣、神経、脂肪、筋肉へはほとんど移行しなかった。肝臓、腎臓においても、血中からの経時的な消失とともに臓器中からも消失した。投与7日後の体内への放射能の残留は投与量の0.05%でほとんど認められなかった。

ウサギに ¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) を経口投与した際の放射能の臓器内分布 (Table 2-2) は、腎臓が最も高く、次いで肝臓で他はいずれの臓器も血中濃度に比べて低く、脳、神経、脂肪、筋肉への移行は少なかった。肝臓、腎臓への移行の差異を除いては、ラットと同様な分布傾向を示していた。肝臓、腎臓への分布の差異は、両動物間の排泄経路の違いによるものと推察される。投与7日後の体内放射能の残留は投与量の0.3%であり、ほとんどの臓器中から消失していた。

2. ラット全身オートラジオグラフィ

¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) 経口投与2時間後のオートラジオグラム (Fig. 2-4) から、放射能の分布は、肝臓、腎臓、に最も高く、肺、心臓、副腎、脾臓、顎下線、ハーダー氏腺にも認められたが、脳、精巣、脂肪にはほとんど認められなかった。

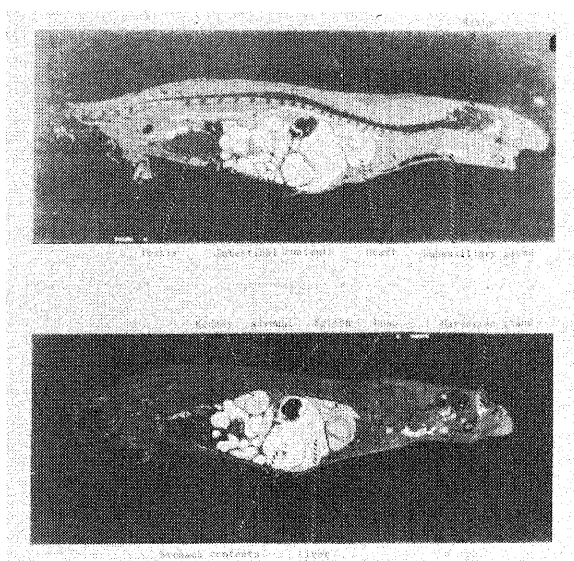


Fig. 2-4. Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in rat 2 hours after oral administration of ^{14}C -Tripamide(5 mg/kg)

3. 連続投与時の臓器内分布

^{14}C -Tripamide (4.5 mg/kg) を7日間連続経口投与した後の臓器中の放射能の蓄積 (Table 2-3) は、最終投与10時間後において、腎臓への移行が肝臓に比べて高くなっていることその他は、一回投与時と差異はなかった。最終投与7日後の放射能の残留は、投与量の0.16%で臓器への蓄積は認められなかった。

TABLE 2-3 Tissue distribution of radioactivity in rats after 7-day repeated administration of [^{14}C]tripamide(4.5 mg/kg)

Tissues	Time(hr) after administration			
	10	24	96	7 days
	(μg tripamide equiv. / g or ml)			
Brain	0.03±0.01	0.05±0.01	0	0
Testis	0.05±0.01	0.06±0.01	0	0
Nerve	0.12±0.01	0.07±0.04	0.01	0.02
Fat	0.12±0.07	0.06±0.01	0.05	0.05
Muscle	0.06±0.01	0.29±0.07	0.01	0.01
Pancreas	0.12±0.02	0.09±0.01	0.02	0.02
Heart	0.18±0.04	0.13±0.02	0.03	0.02
Spleen	0.42±0.09	0.29±0.07	0.16±0.03	0.18±0.05
Adrenal	0.19±0.05	0.18±0.03	0.03	0.02
Blood	1.15±0.17	0.77±0.12	0.14±0.02	0.10
Lung	0.29±0.06	0.24±0.06	0.05±0.01	0.03
Kidney	1.85±0.45	0.91±0.16	0.17±0.04	0.11±0.01
Liver	1.15±0.06	0.68±0.21	0.19±0.02	0.14±0.02
Intestine	3.69±1.53	0.45±0.23	0.03	0
Stomach	0.69±0.33	0.25±0.09	0.03	0

1-3 尿および糞中泄, 胆汁排泄

^{14}C -Tripamide (5 mg/kg) をラットおよび家兔に経口投与した際の尿および糞中排泄を Table 2-4 に示した。

Table 2-4 Urinary and fecal excretion of radioactivity after oral administration of [^{14}C] tripamide (5 mg/kg) to rats and rabbits

Days after administration	Rat		Rabbit	
	Urine	Feces	Urine	Feces
	(% of dose)		(% of dose)	
1	38.5	44.3	76.4	8.6
2	2.0	2.1	2.1	7.6
3	0.5	0.3	0.8	4.0
4	0.3	0.1	0.4	1.5
5	0.2	0.1	0.2	1.2
6	0.1	0.1	0.1	0.4
7	0.0	0.0	0.1	0.9
Total	41.6	47.0	80.1	24.2

The values represent the means of three animals.

^{14}C -Tripamide ラット経口投与後の尿および糞中への放射能の排泄は、投与7日間で、尿中に41.6%、糞中に47.0%であった。排泄された放射能の約90%が24時間以内に尿および糞に回収された。

静脈内投与 (5 mg/kg) した場合に、投与後3時間以内に投与量の30.1%が尿中に排泄され、7日間の累積排泄率は尿および糞とも経口投与時と同等であった。

^{14}C -Tripamide 投与後7日間の家兔の尿中排泄率は、投与量の80.0%で、そのうちの95.5%が24時間以内に排泄された。一方糞中排泄率は24.2%で、その35.5%が24時間以内に、42%が48時間以内に、83.6%が72時間以内に排泄された。投与後7日間で合せてほぼ100%が回収された。

家兔に ^{14}C -Tripamide (0.3 mg/kg) を静注した際の尿中排泄率は7日間で66.8%であり、糞中排泄は24時間で7.4%、48時間で15.1%であった。静脈内投与後の糞中排泄が胆汁を介しての排泄であると仮定すると、家兔における ^{14}C -Tripamide の胆汁排泄率は約15%程度あるものと考えられる。

^{14}C -Tripamide (5 mg/kg) を胆管瘻ラットに経口および静脈内投与した際の放射能の累積排泄率を Table 2-5 に示した。

経口および静脈内投与いずれも投与1時間後に排泄のピークを示し、経口投与24時間の累積排泄率は41.7%、静脈内投与12時間の累積排泄率は46.2%であり、静脈内投与12時間以後の胆汁中への放射能排泄はほとんど認められず、経口投与時と静脈内投与時の胆汁排泄はほぼ等しかった。

^{14}C -Tripamide (4.5 mg/kg) を1日1回7日間連続経口投与した際の尿および糞中排泄率を Fig.2-5 に示した。

各投与24時間毎の尿中への放射能の排泄は約37%であり、糞中への排泄は約50%で尿および糞合わせて約90%が回収された。

Table 2-5 Biliary excretion of radioactivity after oral and intravenous administration of [¹⁴C] tripamide (5 mg/kg) to rats

Time (hr) after administration	Oral	Intravenous
	(% of dose)	
0.33		0.5
0.5	0.1	
0.67		3.1
1	1.0	3.8
2	2.8	7.9
3	3.0	6.2
4	2.3	3.7
5	2.7	
6	3.8	7.8
7	3.8	
8	2.4	4.0
10	3.5	
12		9.2
24	16.3	
48	2.3	
72	0.5	
Total	44.5	46.2

The values represent the means of three animals.

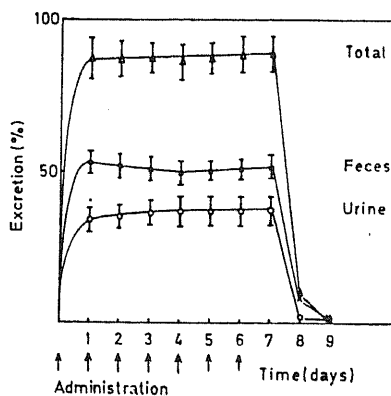


Fig. 2-5 Urinary and fecal excretion of radioactivity after repeated oral administration of [¹⁴C] tripamide (4.5 mg/kg) to rats. Values represent the means ± S.E. of three animals.

1-4 臓器中および胆汁，尿中，糞中代謝物

1. 肝臓および腎臓中代謝物

¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) をラットおよび家兎に経口投与した際の肝臓および腎臓中の代謝物を Table 2-6 に示した。

いずれの動物種とも各臓器中主代謝物はCSBAであった。他の代謝物はラットがCSB

Table 2-6 Concentration of tripamide and its metabolites in blood, liver and kidney after oral administration of [¹⁴C]tripamide (5 mg/kg) to rats and rabbits

Metabolites	Rat			Rabbit	
	Liver	Kidney	Blood	Liver	Kidney
Tripamide	n.d.	9.6	n.d.	n.d.	3.4
8-Hydroxy-tripamide	3.5	8.7	n.d.	n.d.	6.5
CSBM	12.8	6.2	19.1	6.2	22.8
CSBH	14.9	11.9	2.4	n.d.	n.d.
CSBA	25.9	22.4	53.1	46.1	44.9
Unknown metabolites	42.9	41.2	27.9	47.4	22.4

The values represent % of metabolites in tissues 2 hr and 1 hr after oral administration of [¹⁴C]tripamide to rats and rabbits, respectively. n.d.: Not detectable. The abbreviations CSBM, CSBH and CSBA designate 4-chloro-3-sulfamoylbenzamide, 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid-(N'-acetyl)hydrazide and 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid, respectively.

H, ついでCSBMであるのに対して、家兎ではCSBHは検出されず、CSBMが多かった。また両動物種とも Tripamide の標的臓器の一つである腎臓に未変化体が認められることは薬理作用との関連からも興味深い。

2. ラット血中代謝物の推移

ラットに ¹⁴C-Tripamide (5 mg/kg) を経口投与した際の血中代謝物の推移を Fig.2-6 に示す。

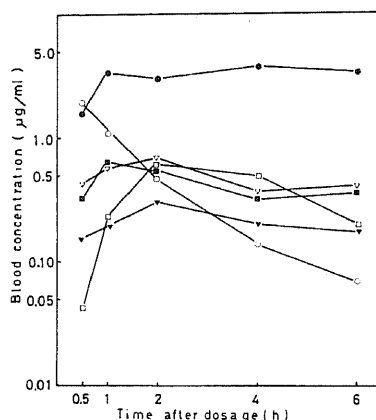


Fig. 2-6 Blood concentrations of metabolites after oral administration of [¹⁴C]tripamide to rats.

The values represent the means of five rats. Oral dosage of tripamide was 5 mg/kg. Metabolites are shown: ●; metabolite M-1 (CSBA), ○; tripamide (M-4), ■; metabolite M-2 (CSBM), □; metabolite M-3 (CSBH), ▼; metabolite M-5(3-hydroxy-tripamide), ▽; metabolite M-6 (8-hydroxy-tripamide).

主代謝物であるCSBAは、投与30分後にすでに血中に全代謝物の28.2%と未変化体と同程度存在していた。CSBAの最高血中濃度は3.91 µg/mlで投与6時間にわたり一定の値を示したのに対して、血中未変化体は投与30分後が最高で、1.91 µg/mlを示し、半減期1.15時間で血中から消失した。代謝物CSBM, 8-hydroxy-tripamide, CSBAは投与1時間後が最も高く、徐々に血中から消失した。CSBAは血中に約40% (投与1~2時間後) 存在し、

血中の主代謝物であった。

3. 胆汁中、尿および糞中代謝物

^{14}C -Tripamide (5 mg/kg) をラットおよび家兎に経口投与した際の胆汁中、尿および糞中代謝物を Table 2-7 に示した。

Table 2-7 Excretion of tripamide and its metabolites in bile, urine and feces during the 24 hr after oral administration of ^{14}C tripamide (5 mg/kg) to rats and rabbits

Metabolites	Rat			Rabbit	
	Bile	Urine	Feces	Urine	Feces
		(% of dose)		(% of dose)	
Tripamide	n.d.	0.2	n.d.	0.2	0.4
8-Hydroxy-tripamide	0.1	2.5	5.0	1.3	1.1
3-Hydroxy-tripamide	0.7	0.4	5.2	1.3	0.9
CSBM	0.4	2.8	4.9	11.7	1.2
CSBH	0.5	4.8	2.4	0.9	n.d.
CSBA	6.6	10.1	5.6	40.2	0.5
Unknown metabolites	33.4	11.8	30.4	20.8	4.5

The values represent the means of three animals. n.d.: Not detectable. The abbreviations CSBM, CSBH and CSBA designate 4-chloro-3-sulfamoylbenzamide, 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid-(N'-acetyl)hydrazide and 4-chloro-3-sulfamoylbenzoic acid, respectively. The urinary and fecal excretion was tested in animals which were not cannulated to bile ducts.

ラット胆汁中主代謝物はCSBAであった。

両動物における主代謝物であるCSBAの尿および糞中への排泄を経口投与時で比較すると、ラット尿中へは10.1%、糞中へは5.6%排泄されるのに対し、ウサギ尿中へは40.2%、糞中へは0.5%排泄された。

次に水酸化代謝物の尿および糞中排泄率をラット、ウサギで比較すると、ラットでは尿中に2.9%、糞中に10.2%、ウサギでは尿中に2.6%とラットと同程度の排泄率であるが、糞中へは2.0%であり、ラットに比べて5分の1程度であった。

未変化体の尿中排泄率は、ラット、ウサギ、いずれも0.2%であり、糞中排泄率は、ラットでほとんど認められず、ウサギは0.4%であった。

4. ^{14}C -Tripamide 静注時の尿中および胆汁中への代謝物の排泄速度

ラットに ^{14}C -Tripamide (5 mg/kg) を静脈内投与した際の各代謝物の胆汁中および尿中への排泄速度を Table 2-8 に示した。

各代謝物の胆汁中および尿中への排泄速度を比較すると3および8-hydroxy-tripamideは、胆汁中への排泄速度の方が約2~3倍速かった。

このことはラットおよび家兎いずれも尿中に比べて糞中に水酸化代謝物の排泄量が他の代謝物に比べて多いことを裏づけている。またラット糞中への水酸化代謝物の排泄が家兎に比べて多いことは、ラットの胆汁排泄率が家兎に比べて高いためと推察される。

Table 2-8 Rates of biliary and urinary excretion of metabolites after intravenous injection of [^{14}C]tripamide to rats.

Metabolite	Excretion rate			
	Bile		Urine	
	$k(\text{h}^{-1})$	$t_{1/2}$	$k(\text{h}^{-1})$	$t_{1/2}$
Tripamide	1.37	0.5	1.39 < †	< 0.5 †
M-6(8-Hydroxy-tripamide)	0.24	2.9	0.13	5.3
M-5(3-Hydroxy-tripamide)	0.29	2.4	0.10	7.1
M-2 (CSBM)	0.23	3.1	0.20	3.4
M-3 (CSBH)	0.17	4.1	0.17	†.1
M-1 (CSBA)	0.25	2.8	0.19	3.7

Dose, 5 mg/kg.

† The unchanged drug was found in urine only within 30 min after intravenous injection.

1-5 主代謝物 ^{14}C -CSBA 静脈内投与時血中濃度と尿および糞中排泄

ラットに ^{14}C -CSBA(0.24mg/kg)を静注した際の血中消失半減期は約1時間であり、その時の尿中排泄率は20.2% (8時間)であった。

一方家兔に ^{14}C -CSBA (0.52mg/kg)を静注した際の血中放射能濃度は二相性を示し、第一相の半減期は1.68分、第二相は49.27分であり、これは ^{14}C -Tripamide 経口投与後の第一相の半減期に近似していた。

尿中への排泄率は投与7時間で107.8%であり、糞中への排泄率は投与24時間で2.6%であった。尿中排泄半減期は58.8分であり、血中消失半減期に近似していた。

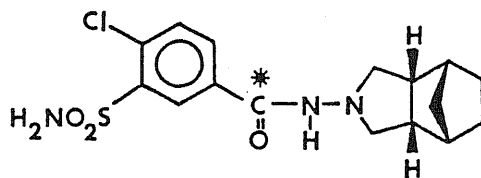
第2章 ラットにおける ^{14}C -Carbonyl および ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の吸収, 分布および排泄

^{14}C -Tripamide はラットおよび家兎においてすみやかに体内で加水分解を受ける。したがって投与された放射能は生体内では Chlorosulfamoylbenzoyl moiety を有する代謝物の動態を示すことが明らかとなった。それ故加水分解後のもう一方の片われである非標識部分 Tricyclodecane ring moiety の生体内運命については全く明らかにされていない。

そこで Tricyclodecane ring に標識した ^{14}C -Isoindoline-Tripamide をラットに投与し、その吸収, 分布および排泄を比較検討した。

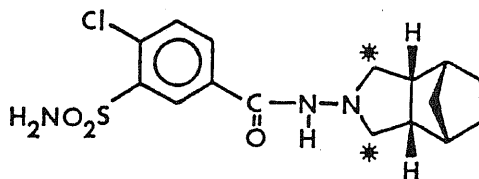
実験方法

標識化合物 ^{14}C -Isoindoline-Tripamide は Adria 社より供与された。標識位置および比放射能は以下に示す通りである。



^{14}C -Carbonyl-Tripamide

s.a. : 18.67 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



^{14}C -Isoindoline-Tripamide

s.a. : 16.07 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

1. 血中濃度

ラットに ^{14}C -Carbonyl および Isoindoline-Tripamide に経口投与した際の血中放射能濃度を Fig.2-7 に示した。

^{14}C -Carbonyl-Tripamide 投与後の血中放射濃度は投与後 2 時間後にピークに達し、その値

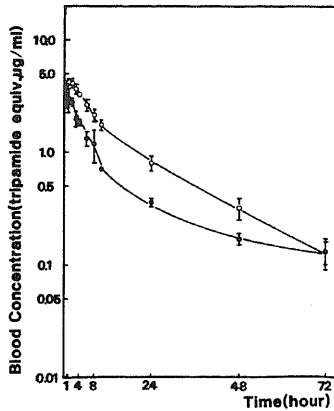


Fig. 2-7. Blood concentration of radioactivity after oral administration of ^{14}C -Carbonyl- or Isoindoline-Tripamide (5 mg/kg) to rats
 ○; ^{14}C -Carbonyl-Tripamide
 ●; ^{14}C -Isoindoline-Tripamide

は 4.17 ± 0.41 trip. equiv. $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。一方 ^{14}C -Isoindoline-Tripamide投与の場合は、投与1時間後にピークに達し、その濃度は 2.99 ± 0.73 trip. equiv. $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。 ^{14}C -Carbonyl-Tripamide投与時の方が血中濃度が高かった。血中消失半減期は ^{14}C -Carbonyl-Tripamideが2.33, 16.0時間に対して、 ^{14}C -Isoindoline-Tripamideは2.81, 22.0時間でいずれも、 ^{14}C -Isoindoline-Tripamide投与時の方が遅かった。

次に投与後1, 8, 24, 48および72時間後の血中放射能の血漿および赤血球への分布を検討した。(Fig.2-8)

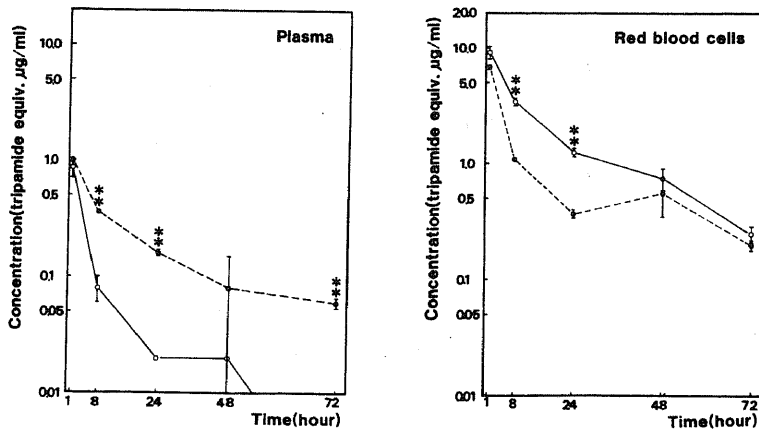


Fig. 2-8. Concentration of radioactivity in plasma and red blood cells following ^{14}C -Carbonyl- or Isoindoline-Tripamide to rats
 ○; ^{14}C -Carbonyl-Tripamide
 ●; ^{14}C -Isoindoline-Tripamide

血漿中濃度は ^{14}C -Isoindoline-Tripamide 投与時の方が高く、赤血球濃度は ^{14}C -Carbonyl-Tripamide 投与時に高かった。いずれも ^{14}C -Isoindoline-Tripamide 投与時の方が放射能の消失が遅かった。

Chlorosulfamoylbenzoyl moiety は赤血球に、Tricyclodecane ring moiety は血漿中にそれぞれ親和性が高いことが示された。

2. 組織内分布

ラットに ^{14}C -Carbonyl および Isoindoline-Tripamide (5 mg/kg) を経口投与した際の臓器分を Table 2-9 および 2-10 に示した。

Table 2-9. Tissue distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C -Carbonyl-Tripamide to rats

Tissues	Time after administration (hr)				
	1	8	24	48	72
	(tripamide equiv. $\mu\text{g/g}$ or ml)				
Blood	5.22 \pm 0.70	1.92 \pm 0.21	0.72 \pm 0.08	0.43 \pm 0.08	0.13 \pm 0.04
Plasma	0.87 \pm 0.16	0.08 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
R.B.C.	9.13 \pm 1.14	3.44 \pm 0.27	1.25 \pm 0.10	0.75 \pm 0.16	0.25 \pm 0.04
Brain	0.23 \pm 0.04	0.05 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Heart	2.30 \pm 0.32	0.28 \pm 0.01	0.10 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
Lung	2.29 \pm 0.28	0.41 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
Liver	17.27 \pm 0.89	1.90 \pm 0.34	0.50 \pm 0.04	0.39 \pm 0.16	0.23 \pm 0.01
Pancreas	2.61 \pm 0.79	0.16 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02
Spleen	2.24 \pm 0.29	0.74 \pm 0.05	0.20 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
Adrenals	3.31 \pm 0.59	0.19 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
Kidneys	11.20 \pm 1.78	1.70 \pm 0.17	0.57 \pm 0.08	0.37 \pm 0.13	0.16 \pm 0.02
Sub.	2.78 \pm 0.72	0.41 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
Thyroid	2.17 \pm 0.33	0.27 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
Thymus	1.09 \pm 0.17	0.11 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Testis	0.27 \pm 0.04	0.12 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Muscle	0.98 \pm 0.11	0.09 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Fat	1.81 \pm 1.14	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.05 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00
Aorta	1.39 \pm 0.45	0.18 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.90 \pm 0.01
Skin	1.07 \pm 0.20	0.16 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00

R.B.C.: Red blood cells

Sub.: Submaxillary gland

Values represent the means \pm S.E. of three animals

Table 2-10. Tissue distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C -Isoindoline-Tripamide to rats

Tissues	Time after administration (hr)				
	1	8	24	48	72
	(tripamide equiv. $\mu\text{g/g}$ or ml)				
Blood	4.13 \pm 0.28	0.70 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02	0.34(0.08)	0.13 \pm 0.03
Plasma	1.02 \pm 0.06	0.36 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.08(0.07)	0.06 \pm 0.01
R.B.C.	6.81 \pm 0.34	1.08 \pm 0.04	0.37 \pm 0.03	0.56(0.21)	0.20 \pm 0.02
Brain	0.29 \pm 0.03	0.19 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.02(0.01)	0.02 \pm 0.00
Heart	2.12 \pm 0.10	0.35 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.06(0.03)	0.06 \pm 0.01
Lung	3.30 \pm 1.04	0.81 \pm 0.08	0.33 \pm 0.03	0.16(0.12)	0.17 \pm 0.01
Liver	20.12 \pm 0.41	3.10 \pm 0.18	1.05 \pm 0.01	1.38(0.14)	0.74 \pm 0.14
Pancreas	2.00 \pm 0.17	0.26 \pm 0.02	0.08 \pm 0.00	0.07(0.00)	0.04 \pm 0.00
Spleen	1.95 \pm 0.19	0.30 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.10(0.01)	0.07 \pm 0.00
Adrenals	3.63 \pm 0.38	0.31 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.11(0.00)	0.07 \pm 0.01
Kidneys	7.94 \pm 0.38	2.29 \pm 0.20	0.93 \pm 0.06	1.02(0.07)	0.40 \pm 0.05
Sub.	2.20 \pm 0.11	0.33 \pm 0.05	0.10 \pm 0.01	0.08(0.00)	0.04 \pm 0.01
Thyroid	3.85 \pm 1.48	0.78 \pm 0.06	0.57 \pm 0.07	0.39(0.06)	0.19 \pm 0.01
Thymus	1.06 \pm 0.07	0.17 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.04(0.01)	0.02 \pm 0.00
Testis	0.34 \pm 0.04	0.19 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.03(0.00)	0.02 \pm 0.00
Muscle	1.10 \pm 0.19	0.15 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.04(0.01)	0.01 \pm 0.00
Fat	0.80 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	0.04(0.01)	0.02 \pm 0.00
Aorta	2.34 \pm 0.22	0.31 \pm 0.01	0.20 \pm 0.03	0.20(0.03)	0.08 \pm 0.04
Skin	0.91 \pm 0.07	0.19 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.16(0.05)	0.15 \pm 0.06

R.B.C.: Red blood cells

Sub.: Submaxillary gland

Values represent the means \pm S.E. of three animals

投与1時間後の分布は両標識化合物間で分布の差異は認められなかったが、投与8時間以後では、¹⁴C-Carbonyl-Tripamide 投与後に、¹⁴C-Isoindoline-Tripamide のそれに比べて、血液、赤血球、脾臓の濃度が高く、逆に、肺、肝臓、膵臓、副腎、腎臓および甲状腺では、¹⁴C-Isoindoline-Tripamide 投与後の方が高かった。全体的に、¹⁴C-Isoindoline-Tripamide 投与時の方が臓器からの消失は遅かった。

3. 尿および糞中排泄

ラットに ¹⁴C-Carbonyl および ¹⁴C-Isoindoline-Tripamide (5 mg/kg) を経口投与した際の尿および糞中排泄率を Table 2-11 に示した。

Table 2-11. Urinary and fecal excretion of radioactivity after oral administration of ¹⁴C-Carbonyl- or Isoindoline-Tripamide to rats

Hours after administration	¹⁴ C-Carbonyl-tripamide		¹⁴ C-Isoindoline-tripamide	
	Urine	Feces	Urine	Feces
0—3	13.43 ± 2.25 *	} 57.76 ± 0.97	9.15 ± 3.28	} 54.74 ± 9.51
3—6	9.33 ± 2.22		7.53 ± 1.02	
6—10	7.29 ± 2.76		6.15 ± 8.80	
10—24	4.70 ± 0.16		6.78 ± 0.74	
24—48	2.63 ± 0.70	3.50 ± 1.21	2.95 ± 0.36	11.01 ± 3.96
48—72	0.66 ± 0.08	0.37 ± 0.11	1.01 ± 0.29	1.37 ± 0.76
Total	38.04 ± 5.26	61.63 ± 0.62	33.57 ± 3.65	67.13 ± 4.89

The values represent the means ± S.E. of three animals
*: % of dose

¹⁴C-Carbonyl-Tripamide 投与時には尿に38.0%，糞に61.6%排泄され、¹⁴C-Isoindoline-Tripamide の場合は、尿に33.6%，糞に67.1%排泄された。いずれも尿、糞合せて100%回収された。尿、糞の排泄経路は両標識化合物間で有意な差異は認められなかった。

しかし、尿中への排泄速度は ¹⁴C-Carbonyl-Tripamide の方が有意に速く、¹⁴C-Isoindoline-Tripamide 投与の方は単位時間あたり2～3%の排泄が持続した。

第3章 考 察

^{14}C -Tripamide 経口投与後の血中放射能濃度の上昇から、ラットおよび家兎における ^{14}C -Tripamide の吸収はすみやかであり、また血中放射能濃度の消失も極めて速いことから代謝および排泄も速いものと考えられる。 ^{14}C -CSBA の静脈内投与後の血中放射能濃度の推移が、 ^{14}C -Tripamide 経口投与後の血中放射能濃度の消失に近似することから、 ^{14}C -Tripamide を経口投与した後の血中放射能の消失は、代謝物CSBAの推移を反映しているものと考えられる。

家兎における ^{14}C -Tripamide の静脈内投与後の血中放射能濃度の消失が速やかであり、また尿中への代謝物の出現が速やかであることから、Tripamide の組織移行性および代謝がすみやかであることが推察される。

家兎における組織内分布は腎臓が最も高く、ついで肝臓で他の臓器は血中濃度より低く、ラットに比べて、肝臓よりも腎臓への移行が高い他は、分布傾向は類似していた。両動物間における肝臓および腎臓への分布の差異は、臓器中主代謝物CSBAの尿および胆汁への排泄経路における差異によるものと考えられる。

^{14}C -Tripamide の分布傾向は、Mefruside,⁵¹⁾ Hydrochlorothiazide⁵²⁾ および Chlorothiazide,⁵³⁾ DU-5747⁵⁴⁾ 等クロルスルフォンアミド系降圧利尿剤のそれと類似しており、このような事実はクロルスルフォンアミド基を有する薬物に共通したことと推論される。

経口投与1～2時間後の肝臓では未変化体は検出されなかったが、標的臓器の一つである腎臓に未変化が存在していることは薬理効果を裏付ける知見と思われる。

血中主代謝物は経口および静脈内投与いずれもCSBAであった。 ^{14}C -Tripamide 静脈内投与時の血中放射能濃度の消失半減期は、 ^{14}C -CSBA を静脈内投与した際の血中放射能濃度の消失半減期に近似していた。

このことは血中代謝物がChlorosulfamoylbenzoyl基を有する代謝物によつて占められていることから支持される。

^{14}C -Tripamide 静注時のウサギにおける糞中排泄は約15%であることから、家兎の胆汁排泄はラットに比べて少ないものと推察される。

ラットにおける経口および静脈内投与時の糞中排泄率はそれぞれ、47.0%、45.2%と胆汁排泄に近似しており、さらに糞中代謝物に未変化体が認められないことから、糞中への排泄は胆汁を介しての排泄であると考えられる。以上のことから、投与されたTripamideは、ほとんど吸収されるものと考えられる。

糞中全代謝物に占める水酸代謝物の比率が尿中に比べて高いことは、水酸代謝物は尿中よりむしろ胆汁中へ排泄されるというラットの結果から裏づけられる。しかし家兎においては、胆汁排泄が少ないことから、投与量に対する水酸代謝物の糞中排泄率が尿中と比べて変らなかったものと考えられる。

以上述べた如く、 ^{14}C -Tripamideは家兎においてもラットと同様にほとんど吸収され、すみやかに代謝されるものと考えられるが、代謝経路及び代謝物の排泄経路には両動物種間で種差が認められた。

^{14}C -Tripamide を連続投与した時の各投与時の分布容量および $t_{1/2}$ に1回投与時と殆んど

差が認められなかったことは、 ^{14}C -Tripamide の連続投与により、放射能の排泄は影響されないことを示している。最終投与10時間後の臓器内放射能の分布傾向は一回投与時と同様であったことから、連続投与により分布傾向には影響を及ぼさなかったものと考えられる。また、各投与24時間毎の尿および糞中に投与放射能の90%が回収され、最終投与96時間後の体内には投与量の0.16%しか存在していない事實は、 ^{14}C -Tripamide の体内残留性の少ないことを示している。

ラットにおける ^{14}C -Carbonyl および ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の体内動態の比較から、Chlorosulfamoylbenzoyl 基と Tricyclodecane ring を有する代謝物の排泄経路には差異はなく、腎臓への移行に基づく、尿中排泄速度に差異が認められたことは、腎臓へのクロルスルフォンアミド基の移行性の良さを物語っている。また両標識化合物での臓器分布の差異はクロルスルフォンアミド基は赤血球、脾臓への親和性が高いこと、Tricyclodecane ring は赤血球よりもむしろ、血漿に親和性が高いことが示唆された。しかも ^{14}C -Isoindoline-Tripamide 投与時の方が組織からの消失が遅いことは、Tricyclodecane ring の膜系への親和性が高いことを示唆している。このことは、Tripamide の構造上、クロルスルフォンアミド基が薬理活性を示し Tricyclodecane ring が細胞膜透過性と親和性を高め、活性部位での Tripamide の濃度を高める役割を果しているものと推論される。

以上の結果は、加水分解が主でしかも速度が速く、かつ加水分解後の両代謝物の極性に差異があるので、両方の官能基に標識しなければ、Tripamide 総体の生体内動態を知ることはできないことを示している。

Tripamide に構造類似の Indapamide の尿中排泄率は71%、胆汁排泄率は54%と報告されており⁵⁵⁾ Tripamide に比べて尿中排泄率が高い。

第3編 Tripamide 連続投与後の肝薬物代謝酵素活性の上昇

肝薬物代謝酵素活性は種々の非生理的条件下で影響を受けるほか、多くの外来物質によって影響を受けることが知られている。

特に薬物が連続投与された場合、一般に良く知られているように「酵素誘導」という現象が起こることがある。^{56), 57)}

Tripamide は高血圧症患者に長期にわたって使用されるものであり、他剤と併用する場合も多い。したがって連続投与による薬物代謝酵素活性の変動を検討することは、体内動態および薬効の変化を推測する上に極めて重要なことである。

そこで Tripamide を連続投与した際の肝薬物代謝酵素活性を *in vitro* 肝ミクロゾームを用いて実験を行なった。

さらに Tripamide はラットにおいてすみやかに代謝されることから、Tripamide それ自体が薬物代謝酵素活性を上昇させるよりもむしろ代謝物による可能性が推定されるので、Tripamide のラットにおける主代謝物 4-Chloro-3-sulfamoylbenzoic acid (CSBA) と、その際同時に生成すると推定される代謝物 4-Amino-4-aza-*endo*-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decane (ATD) をそれぞれ Tripamide と等モル連続投与し、Tripamide 投与時と比較検討した。

また薬物代謝酵素活性の上昇機序について、肝細胞内分布、および covalent binding との関連で検討した。

第1章 ¹⁴C-Tripamide 連続投与時の尿および糞中代謝物の変動

実験方法

1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット (体重250~320g) を用いた。

2. 投与液および投与量

¹⁴C-Tripamide (比放射能16.0 μ Ci/mg) を濃塩酸に溶解し最終塩酸濃度を1.24%に調製した。¹⁴C-Tripamide の投与量は4.5 mg/kg/day とし、1日1回、7日間連続経口投与した。毎投与2時間後に一定量の固型飼料を与えた。

実験結果

1. 尿中代謝物

¹⁴C-Tripamide (4.5 mg/kg) を連続経口投与した際の毎投与24時間後の糞中代謝物の排泄率を Fig.3-1 に示した。

未変化体の尿中排泄は、投与回数に関係なく、0.8~0.9%で、CSBA および CSBH の排泄は、共に増加傾向を示していた。また代謝物 3-hydroxy-tripamide, 8-hydroxy-tri-

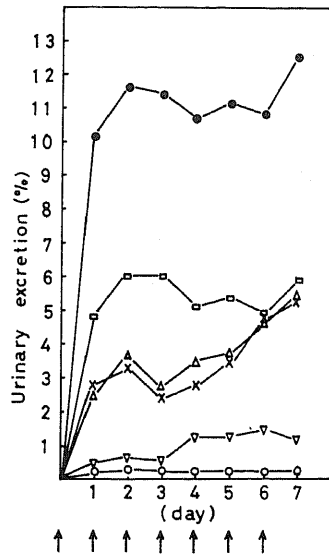


Fig. 3-1. Urinary metabolites after repeated administration of ^{14}C -Tripamide (4.5 mg/kg) to rats

○; tripamide, ▽; 3-hydroxy-tripamide
 Δ; 8-hydroxy-tripamide, x; CSBM,
 □; CSBH, ●; CSBA

pamide およびCSBMの尿中への排泄も投与回数に応じて増加していた。

水酸化代謝物の生成が肝ミクロゾームに局在するモノオキシゲナーゼによるものであることから Tripamide の連続投与により尿中へのこれらの代謝物の排泄が増加することは、薬物代謝酵素活性の上昇が示唆される。

2. 糞中代謝物

^{14}C -Tripamide (4.5 mg/kg) を連続経口投与した際の毎投与24時間後の糞中代謝物の排泄率を Fig.3-2 に示した。

未変化体は、糞中にはほとんど認められず、8-hydroxy-tripamide の排泄が投与回数に応じて、増加していた。3-hydroxy-tripamide, CSBM, CSBHいずれも投与に対応した増加は観察されなかった。CSBAについては、投与4日まで増加するが、その後減少することが尿中CSBAの排泄パターンと異っていた。

^{14}C -Tripamide を7日間連続経口投与すると、尿および糞中への代謝物の排泄が増加することから薬物代謝酵素活性が上昇することが示唆された。水酸化代謝物が増加したことから、肝ミクロゾームに局在するモノオキシゲナーゼ活性の上昇が、またCSBAの排泄が増加することから肝アリアルアミダーゼ活性も上昇することが推察された。

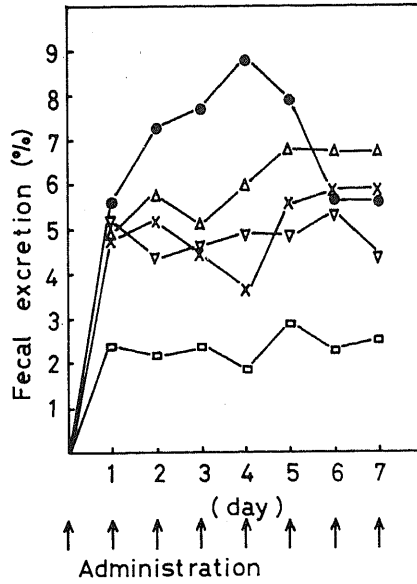


Fig. 3-2. Fecal metabolites after repeated administration of ^{14}C -Tripamide(4.5 mg/kg) to rats

○; tripamide, ▽; 3-hydroxy-tripamide
 Δ; 8-hydroxy-tripamide, ×; CSBM
 □; CSBH, ●; CSBA

第2章 Tripamide連続投与後の肝薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

実験方法

1. 動物

体重110~130gのWistar系雄性ラットを一群3匹用いた。

2. 投与量

Tripamide 200mg (0.542 mmoles) / kg / day

C S B A 167mg (0.711 mmoles) / kg / day

A T D 163mg (0.542 mmoles) / kg / day

(A T Dはそれ自身酸化されやすく不安定などで酒石酸塩を用いた。)

以上の試料を5%アラビアゴム懸濁液にてラット1匹あたり1mlを経口投与した。Control群は同様に5%アラビアゴム懸濁液を投与した。7日間、毎日1回投与し、最終投与後24時間後に瀉血して殺した。

3. 薬物代謝酵素活性の測定

(1) 肝マイクロゾーム分画の調製

最終投与24時間後に瀉血して殺し、0.05M Phosphate buffer (1.15% KCl含有)で灌流し、直ちに肝臓を取り出し、肝1g当たり2mlの0.05M Phosphate buffer (0.1mM EDTA含有)を加え、永冷下Potter-Elvehjem型テフロンホモジナイザーでよくすりつぶし、冷却遠心機で、9,000g、20分間、遠心分離を行なう(9,000g上清分画)。その上清をさらに105,000g、60分間超遠心分離し、その沈澱物をマイクロゾーム分画とする。マイクロゾーム分画は肝1gあたり2mlの0.05M Phosphate buffer (pH 7.4)で懸濁し、酵素標品とした(マイクロゾーム懸濁液)。

(2) 反応溶液の組成

MgCl₂ (25 μmoles) 0.1ml, G-6-P (20 μmoles) 0.1ml, NADP (0.8 μmoles) 0.1ml, G-6-P DH (5 units) 0.1ml, Substrate (Aminopyrine (AM) および Aniline (AN) 4 μmoles, ¹⁴C-Tripamide 0.4 μmoles (pH 10)) 0.2ml, マイクロゾーム懸濁液 1ml, 全容量 1.6mlとする。反応は37℃, 30分間インキュベートする。

(3) Aminopyrine(AM)N脱メチル化活性の測定 (ホルムアルデヒドの定量)⁵⁸⁾

AMを基質にして、インキュベート後、10%トリクロル酢酸 2.5mlを加え、3,000r.p.m., 5分間遠心分離し、この上清 2.5mlにNash試薬⁵⁸⁾ 1mlを加えて、37℃, 30分間温めて得られた黄色水溶液を415nmの波長で吸光度を測定した。

(4) Aniline(AN)水酸化活性⁵⁹⁾

ANを基質にして、37℃, 30分間、インキュベート後、10%トリクロル酢酸 1mlを加え

て、2,500 r. p. m. 7分間遠心分離する。上清1.5mlに10%炭酸ナトリウムを1mlを加え、さらに2%フェノール/0.2N水酸化ナトリウム溶液1mlを加える。37°C, 30分間温置し、620nmの吸光度を測定した。

(5) Tripamide 代謝活性の測定

¹⁴C-Tripamide (0.34 μ moles) を基質にして、37°C, 30分間、インキュベート後、メタノール5mlを加えて、2,500 r. p. m., 7分間遠心分離する。上清を濃縮乾固し、残渣をメタノール0.5mlで溶かし、その0.02mlを薄層クロマトグラフィー(Kieselgel 60F₂₅₄, 0.25mm, Merck) にスポットする。展開溶媒としてベンゼン/アセトン(1/1)および28%アンモニア水/水/n-ブタノール(1/9/50)で展開後、Tripamide, 8-hydroxy-tripamide およびCSBAに相当するRf値部分をかきとり、放射能を測定した。

(6) NADPH-チトクロームc還元酵素活性の測定⁶⁰⁾

マイクロゾーム懸濁液0.2ml, チトクロームc(酸化型horse heart, Sigma Type VI) 35 nmoles 1ml, KCN 3.3 μ moles 0.3ml, NADPH 100 nmoles 1mlを加え、550-535 nmの吸光度差を25°Cで5分間、日立156型二波長分光光度計で測定した。

(7) チトクロームP-450量⁶¹⁾ およびb₅量⁶²⁾ の測定

マイクロゾーム懸濁液2.8mlをそれぞれリファレンスおよびサンプルのキュベットに入れ、サンプルキュベットにNADH(オリエンタル酵母) 200 nmolesを加えてチトクロームb₅を還元する。還元型および酸化型差スペクトルを自記分光光度計(島津マルチパーパスMPS-5,000)で測定し、424-409 nmの吸光度差からb₅量を算出した。P-450量はb₅測定用のサンプルキュベットをリファレンスとし、新たにサンプル側のキュベットにマイクロゾーム懸濁液2.8mlを加え、2-3mgのハイドロサルファイトを加えて一酸化炭素を30秒間通気し、直ちに自記分光光度計で測定した。450-490 nmの吸光度差から算出した。b₅量およびP-450量算出のための分子吸光係数はそれぞれ165および91mM⁻¹cm⁻¹を用いた。

(8) 基質差スペクトルの測定⁶³⁾

マイクロゾーム懸濁液2.8mlに2mMの基質を加え、マイクロゾーム懸濁液をリファレンスにして差スペクトルを測定する。Tripamideは417-390 nmの吸光度差をmg蛋白あたりで表示した。

(9) 蛋白定量

マイクロゾーム懸濁液0.5mlに0.5N水酸化ナトリウム溶液9.5mlを加えて、1時間煮沸する。以下Lowry法⁶⁴⁾に従った。

実験結果

2-1 アミノピリンN-脱メチル化活性およびアニリン水酸化活性に及ぼす影響

Tripamide (200mg/kg), 7日間, 経口投与した最終投与後1日, 2日, 4日および7日後のAMN-脱メチル化活性およびAN水酸化活性をFig.3-3に示した。

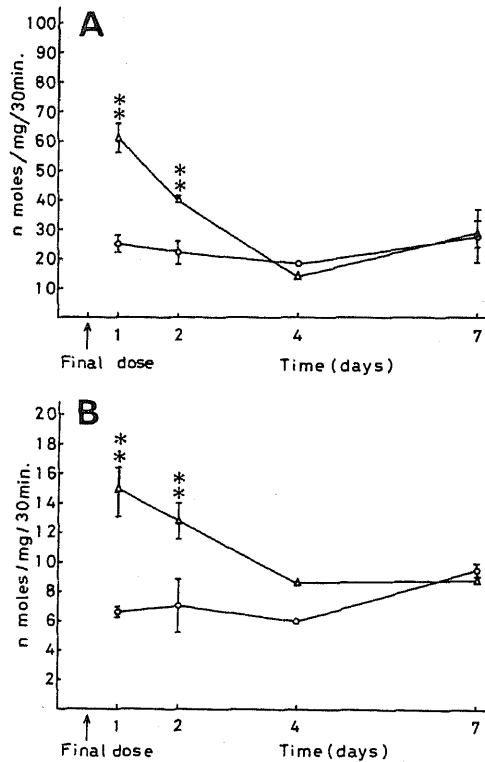


Fig. 3-3. The enhancement of the activities of (A) aminopyrine N-demethylase and (B) aniline hydroxylase after repeated administration of tripamide(200 mg/kg) to rats

**;<p 0.01

AM N-脱メチル化活性およびAN水酸化活性はいずれも最終投与24時間後に、約2倍に上昇した。2日後でやや低下し、4日後でほぼ正常レベルに回復した。Tripamide連続投与すると肝薬物代謝酵素活性が上昇することが示された。上昇した活性は投与中止後すみやかに回復した。

2-2 肝ミクロゾーム電子伝達系への影響

この活性上昇の要因を明らかにするために、ミクロゾーム電子伝達系成分について検討した。(Fig.3-4)

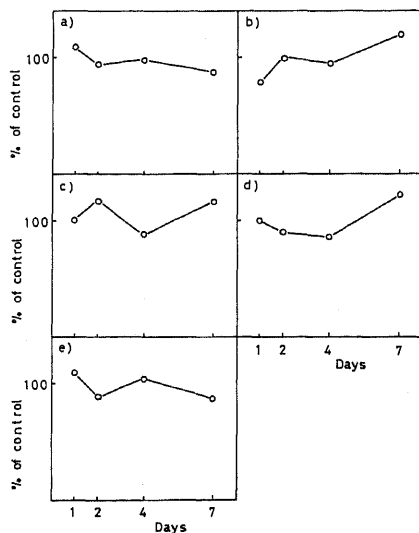


Fig. 3-4. Liver weight(a), microsomal protein(b), cytochrome P-450(c) and b₅(d), and binding of tripamide(d) after repeated administration of tripamide(200 mg/kg) to rats

肝重量、ミクロゾーム蛋白量、チトクローム P-450 および b₅ 量、Tripamide 結合量はいずれも活性上昇に対応した変動は認められなかった。

以上のことから、Tripamide 連続投与によって薬物代謝酵素活性が上昇するが、それに対応したミクロゾーム電子伝達系成分の変動は認められなかった。

第3章 Tripamide 代謝物連続投与後の薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

Tripamide はラットにおいてすみやかに代謝され、主として CSBA を生成する。したがって Tripamide の薬物代謝酵素活性の上昇は代謝物による可能性も考えられるので、主代謝物である CSBA、その際同時に生成すると推定される代謝物 ATD 及び Tripamide を各等モル (Tripamide 200mg/kg に相当) ラットに連続投与した後の薬物代謝酵素活性を検討した。

3-1 アミノピリン N-脱メチル化活性およびアニリン水酸化活性に及ぼす影響

AM N-脱メチル化活性および AN 水酸化活性を Fig. 3-5 に示した。

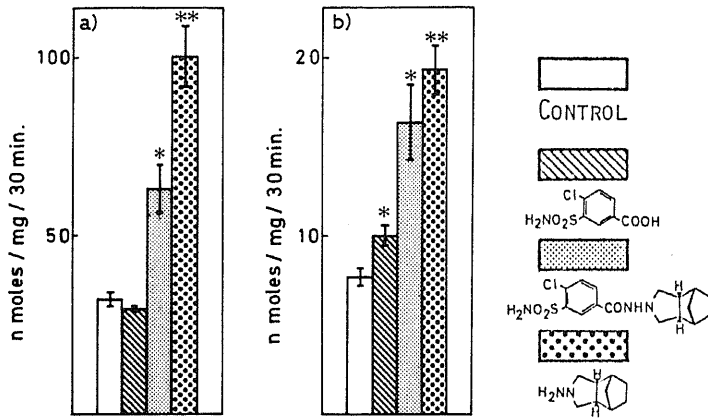


Fig. 3-5. The activities of aminopyrine N-demethylase(a) and aniline hydroxylase(b) after repeated administration of tripamide or its metabolites to rats
*;<p 0.05, **; <p<0.01

AM N-脱メチル化活性はCSBA 投与群では活性の上昇が認められないのに対して、 Tripamide 投与群では約2倍、ATD 投与群では約3倍に上昇した。AN 水酸化活性は CSBA 投与群で1.3倍、Tripamide 投与群で2.1倍、ATD 投与群で2.5倍に上昇した。

いずれの代謝活性も CSBA 投与群では変化が少なく、また Tripamide 投与時に比べて ATD 投与時の方がより活性が上昇した。

3-2 Tripamide の代謝活性に及ぼす影響

次に Tripamide の代謝活性に及ぼす影響を Fig. 3-6 に示した。

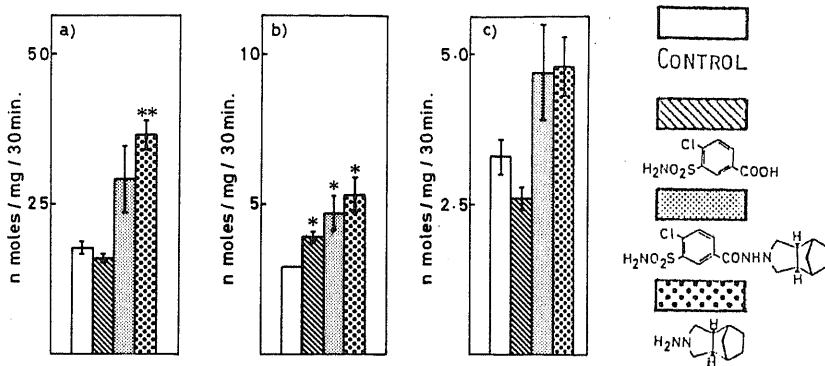


Fig. 3-6. The activities of the metabolism of tripamide after repeated administration of tripamide or its metabolites
 a) metabolic rate of tripamide
 b) 8-hydroxylation
 c) hydrolysis
 *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

Tripamide の代謝活性は CSBA 投与群で変わらないのに対して、Tripamide 投与群で約1.7倍に上昇傾向を示し、ATD 投与群で約2倍に上昇した。

8-hydroxylase 活性は CSBA 投与群で約1.3倍、Tripamide 投与群で約1.6倍、ATD 投与群で約1.8倍に上昇した。

CSBA の生成活性は、CSBA 投与群で変わらないのに対して、Tripamide 投与群で約1.4倍、ATD 投与群で約1.5倍に上昇傾向を示した。

以上のことから、CSBA 投与は 8-hydroxylase 活性をわずかに上昇させるが Tripamide の代謝に殆んど影響をあたえなかった。しかし Tripamide および ATD 投与では、Tripamide の代謝活性がいずれも上昇することが明らかになった。

3-3 肝ミクロゾーム電子伝達系への影響

次に Tripamide 連続投与時における薬物代謝酵素活性の上昇機序を明らかにするために Tripamide および代謝物の連続投与後の肝ミクロゾーム電子伝達系の成分を検討した。

肝重量、肝ミクロゾーム蛋白量および NADPH-チトクローム c 還元酵素活性を検討した。(Fig. 3-7)

肝重量は ATD 投与群で有意に増加したが、CSBA および Tripamide 投与群では変化が認められなかった。

肝ミクロゾーム蛋白量は Tripamide 投与群で有意に減少し、ATD 投与群で減少傾向を示したが、CSBA 投与群では変化が認められなかった。

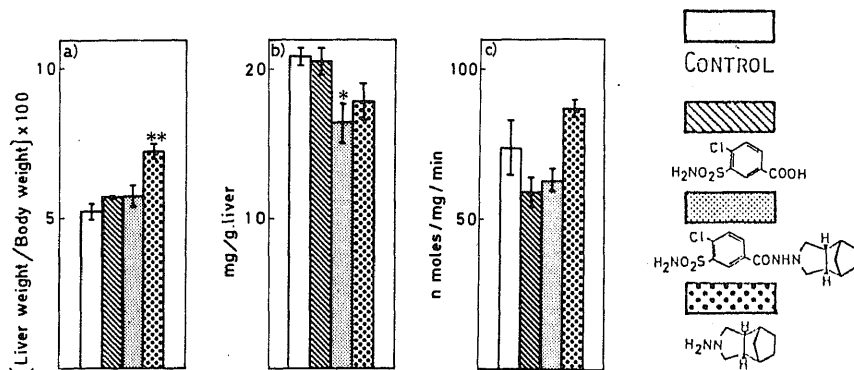


Fig. 3-7. Liver weight(a), microsomal protein(b) and NADPH cytochrome c reductase(c) after repeated administration of tripamide or its metabolites
 *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

NADPH-チトクローム c 還元酵素活性は ATD 投与群で上昇傾向を示したが, CSBA および Tripamide 投与群では有意な変化が認められなかった。

さらにチトクローム P-450 および b 量を検討した。(Fig. 3-8)

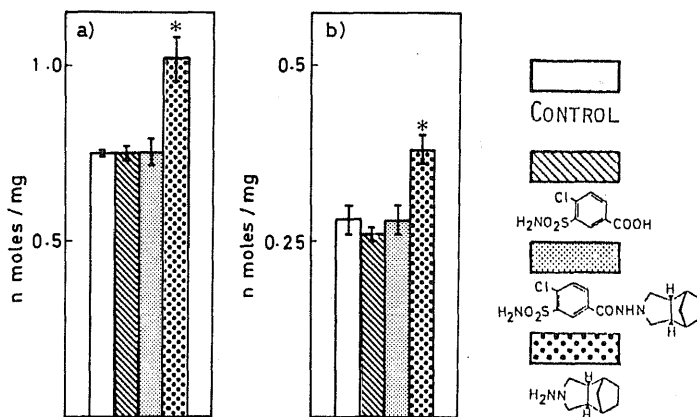


Fig. 3-8. The contents of cytochrome p-450(a) and b_5 (b) after repeated administration of tripamide or its metabolites
 *; $p < 0.05$

P-450量および b_5 量いずれも CSBA および Tripamide 投与群では変わらず，ATD 投与群では有意に約36%増加した。

ラットにおける Tripamide 連続投与時の肝薬物代謝酵素活性の上昇は代謝物 ATD によることが示唆された。しかし活性上昇を説明し得るほどの電子伝達系成分の大きな変動は認められなかった。

したがって通常の「酵素誘導」に認められるようなチトクローム P450の量的変化に対応した薬物代謝活性の変動は Tripamide 投与時には観察されなかった。

第4章 ^{14}C -Tripamide 投与時の放射能の肝細胞内分布と covalent binding

肝薬物代謝酵素活性の上昇機序を ^{14}C -Tripamide 投与後の放射能の肝細胞内分布とその covalent binding との関連で検討した。

第2編第2章で述べたように、ラットに ^{14}C -Carbonyl および ^{14}C -Isoindoline-Tripamide を投与した際の肝臓および腎臓内の放射能濃度を Fig. 3-9 に示した。

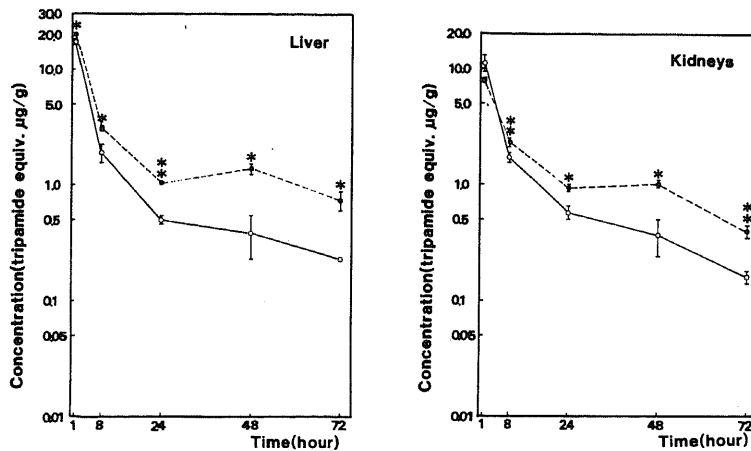


Fig. 3-9. Concentration of radioactivity in liver and kidney following ^{14}C -Carbonyl or Isoindoline-Tripamide to rats

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

^{14}C -Isoindoline-Tripamide 投与の方が肝臓および腎臓からの放射能の消失は遅かった。このことは Tricyclodecane ring moiety を有する代謝物が Chlorosulfamoylbenzoyl moiety を有する代謝物に比べて、肝臓および腎臓への親和性が高いことを示唆している。

薬物代謝酵素を誘導する薬物の性質は ① 作用時間が長いこと、② 脂溶性が高いこと ③ 肝臓に貯留することが知られている。⁵⁷⁾ Tripamide 投与後の肝薬物代謝酵素活性の上昇が、代謝物 ATD によることが示唆されたが、以上の結果は代謝物 ATD の肝臓への貯留性と関連しているものと思われる。

そこでこの肝臓を用いて、肝細胞内の放射能の分布と各分画中の放射能の covalent binding を検討した。

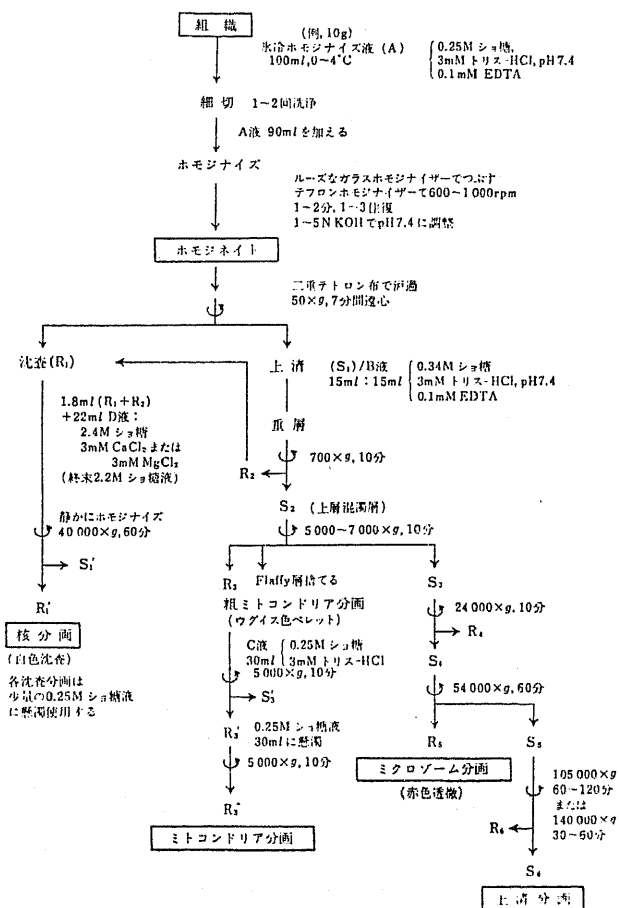
実験方法

1. 肝臓内 ATD 量の測定

^{14}C -Isoindoline-Tripamide (5 mg/kg) 投与後, 1 および 8 時間後の肝臓を摘出し, 肝臓 1 g あたり 10 ml の 1/15 M phosphat buffer (pH7.0) でホモジナイズする。その後, 酢酸エチル 20 ml で 2 回抽出する。抽出物を TLC (Kieselgel GF₂₅₄ (20×20 cm, 厚さ 0.25 mm)) にスポットし, ベンゼン/アセトン (1:1) で展開する。オートラジオグラフィーをとり, 代謝物に相当する Rf 値部分をかきとり, その放射能を測定する。

2. 肝細胞内分画法

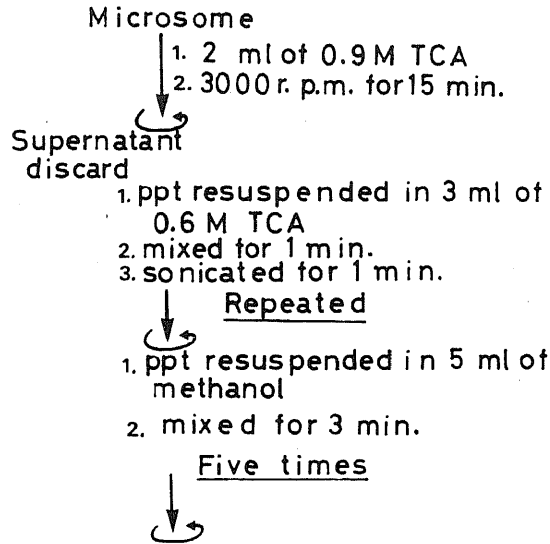
肝細胞分画法は以下に示す通りである。



3. covalent binding の測定

分画中の covalent binding は以下に示す通りであった。各分画はそれぞれ 1 ml を試料に用いた。

Determination of binding to protein



実験結果

1. 肝臓内 ATD 量

^{14}C -Isoindoline-Tripamide (5 mg/kg) 投与後1および8時間後の肝臓中 ATD量を測定した。(Table. 3-1)

いずれの時間においても ATD は肝臓中代謝物の約 4% を占ていた。

Table 3-1. Ethyl acetate-extractable metabolites in rats liver following administration of ^{14}C -Isoindoline-Tripamide

Metabolites	Time (h) after administration	
	1	8
	(%)	
Ethyl acetate extracts	62.7 \pm 3.3	58.7 \pm 4.4
Tripamide	13.1 \pm 1.9	5.3 \pm 0.5
ATD	3.9 \pm 0.4	4.3 \pm 0.2
8-hydroxy-tripamide	4.3 \pm 0.3	2.5 \pm 1.0
3-hydroxy-tripamide	5.5 \pm 0.3	3.7 \pm 0.4

2. 肝細胞内分布

ラット¹⁴C-Carbonyl および¹⁴C-Isoindoline-Tripamide (5 mg/kg) を投与した後の肝細胞分画中の放射能の分布を検討した。(Fig. 3-10)

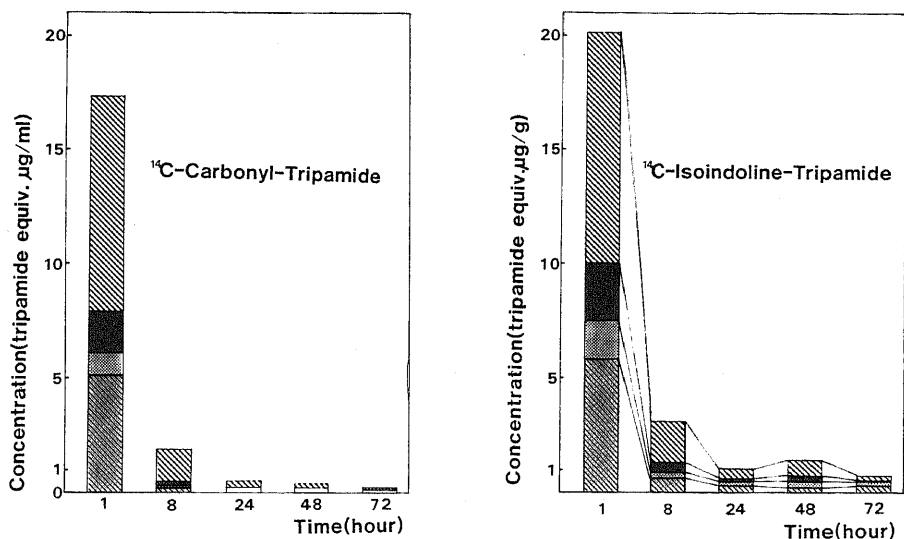






Fig.3-10 Distribution of radioactivity in subcellular fraction of liver following administration of ¹⁴C-Carbonyl- or ¹⁴C-Isoindoline-tripamide

 ; Cytosol
 ; Microsomes
 ; Mitochondria
 ; Nucleus

投与1時間後については、Cytosol ≫ Nucleus > Microsomes > Mitochondria の順で、両化合物とも差異は全く認められなかった。しかし8時間後では Cytosol は ¹⁴C-Carbonyl > ¹⁴C-Isoindoline であるのに対して、Nucleus, Microsomes および Mitochondria の膜分画においては ¹⁴C-Isoindoline > ¹⁴C-Carbonyl であった。この変化は時間が経るにしたがって著明であった。

Tricyclodecane ring moiety は膜成分に対して高い親和性を示した。

3. 肝細胞分画中の covalent binding

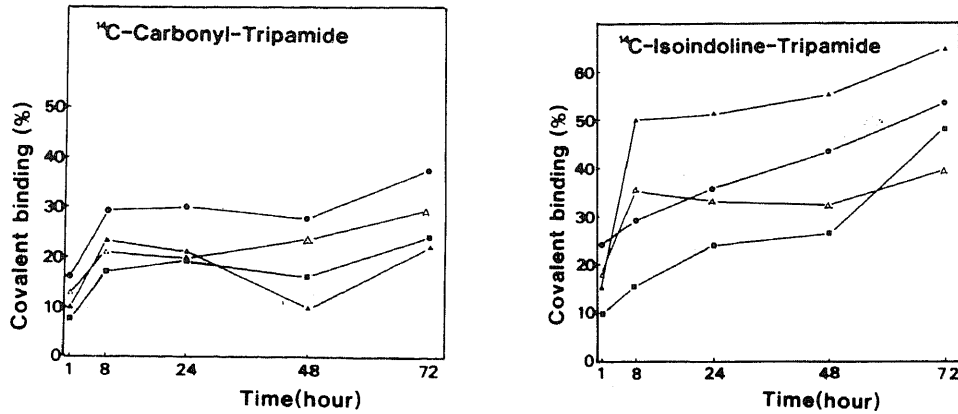


Fig.3-11 Covalent binding in subcellular fraction of liver following administration of ^{14}C -Carbonyl- or ^{14}C -Isoindoline-tripamide to rats

- ; Microsomes
- ▲; Nucleus
- △; Mitochondria
- ; Cytosol

^{14}C -Carbonylおよび ^{14}C -Isoindoline-Tripamide をラットに投与した後の肝細胞分画中の蛋白への covalent binding を検討した。(Fig. 3-11)

^{14}C -Carbonyl-Tripamide を投与した場合の covalent binding は Microsomes > Mitochondria > Cytosol > Nucleus の順であるのに対して ^{14}C -Isoindoline-Tripamide のそれは Nucleus 分画への binding が著明に高かった。ATD がチトクローム P-450 を誘導し、薬物代謝酵素活性を上昇させることと、Tricyclodecane ring moiety が核へ移行し、covalent binding することとは関連があるものと思われる。また Microsomes 分画への covalent binding が投与直後、いずれの標識化合物を用いても高いことは、この covalent binding process が肝ミクロゾーム中の薬物代謝酵素系と共役していることを示唆している。

第5章 肝ミクロゾームにおける ^3H および ^{14}C -Tripamide の covalent binding

^{14}C -Tripamide をラットに投与した後の肝蛋白に放射能が covalent binding していることが明らかにされた。この binding には Tricyclodecane ring moiety が関与していることが示唆された。そこで in vitro 肝ミクロゾームにおいて、NADPH 生成系下で covalent binding を検討した。またこの covalent binding process がチトクローム P-450 を含む薬物代謝酵素系と共役しているか否か調べた。さらに binding に関与する活性代謝物の検索も合わせて行った。

5-1 NADPH 生成系下の covalent binding

1. 肝ミクロゾームにおける NADPH 生成系下の covalent binding (Table 3-2)

Table 3-2. Covalent binding of [^3H][^{14}C]Tripamide by microsomal preparations

Condition	Protein binding	
	^3H n moles/mg	^{14}C
Control	142.9 (100)	16.70 (100)
Non-incubate	35.2 (25)	4.84 (29)
-NADPH	24.2 (21)	3.30 (20)
Boiling Ms	29.7 (17)	3.52 (21)

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$; 1.37, substrate; ^3H -Isoindoline- and ^{14}C -Carbonyl-Tripamide (conc.; 0.20 μmol)

表から明らかなように Tricyclodecane ring moiety の方が Chlorosulfamoylbenzoyl moiety より高い covalent binding を示した。

また covalent binding は 37° でインキュベートしなければ低いことから nonspecific な binding ではなく、ミクロゾームを 95° 、5 分間、加熱処理することによって低下することから酵素反応であることが示された。さらに系から NADPH を除くと低下することから反応には NADPH が要求された。

2. Tripamide 代謝物の covalent binding

代謝物として CSBA, CSBH, 3-hydroxy-tripamide を基質に用い、 ^{14}C -Carbonyl および ^{14}C -Isoindoline-Tripamide を対照として NADPH 生成系下 in vitro 肝ミクロゾームにおける

代謝物の covalent binding を検討した。(Table. 3-3)

Table 3-3. Covalent binding of metabolites of tripamide

Metabolites	Substrate Concentration (dpm)	Covalent binding	
		(dpm)	%
CSBA	80632	0.0	0.00
CSBH	72430	48.9	0.07
¹⁴ C-Iso-3-hydroxy-Tripamide	80560	2196	2.73
¹⁴ C-Carb-Tripamide	82894	1364	1.65
¹⁴ C-Iso-Tripamide	71352	3519	4.93

Tricyclodecane ring moiety を持たない代謝物 CSBA および CSBH は全くミクロゾーム蛋白と covalent binding しなかった。

¹⁴C-Carbonyl-Tripamide は ¹⁴C-Isoindoline-3-hydroxy tripamide よりは低かった。

以上のことから Tricyclodecane ring moiety が covalent binding に何んらかの関与をしていることが示された。

3. 基質濃度と covalent binding との関係

ミクロゾーム蛋白量 (6 mg/ml) を一定にして ¹⁴C-Isoindoline-Tripamide を 27~270 n mol 添加して、基質濃度と covalent binding との関係を検討した。

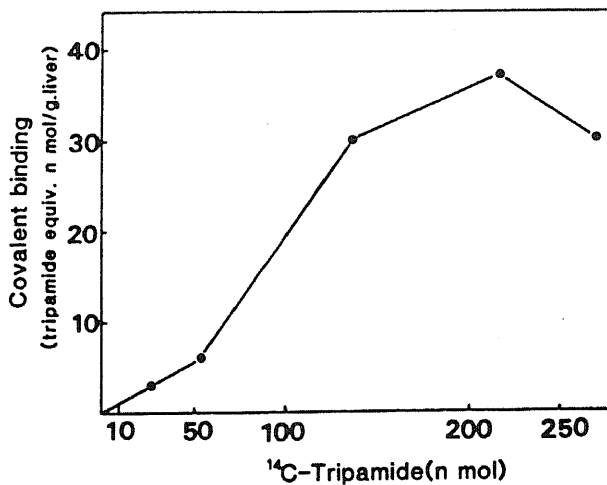


Fig. 3-12. Covalent binding of various concentration of ¹⁴C-Isoindoline-Tripamide

その結果を Fig. 3-12 に示した。

5-2 フェノバルビタールおよび塩化コバルト投与による影響

実験方法

Wistar 系雄ラット (体重142-191g) にフェノバルビタール Na(PB) 80mg/kg を3日間腹腔内投与し, 塩化コバルト (CoCl₂) は40mg/kg を3日間皮下投与し, それぞれ最終投与24時間後に殺し, 肝ミクロゾーム分画を調製した。

実験結果

1. 薬物代謝酵素活性に及ぼす PB および CoCl₂ の投与効果 (Table 3-4)

Table 3-4. Effects of pretreatment of phenobarbital(PB) or CoCl₂ on drug-metabolizing enzymes

	Microsomal protein mg/g.liver	Cytochrome		Drug-metabolizing enzymes			
		P-450 n moles/mg	b ₅ n moles/mg	Aminopyrine n moles/mg	Aniline μ moles/g		
Control	21.7±0.9	1.06±0.04	0.52±0.02	43.4±1.0	0.94±0.03	8.41±0.46	0.18±0.01
PB	28.2±0.5**	2.03±0.11**	0.36±0.02**	45.6±2.0	1.29±0.06**	7.54±0.31	0.21±0.01*
CoCl ₂	22.7±0.7	0.30±0.07**	0.37±0.04*	11.6±2.6**	0.26±0.05**	3.61±0.67**	0.08±0.01**

*; p<0.05, **; p<0.01

アミノピリン N-脱メチル化活性, アニリン水酸化活性およびチトクローム P-450量はPB投与で増加し, CoCl₂投与により低下した。

2. Covalent binding に及ぼす PB および CoCl₂ の投与効果 (Table 3-5)

Table 3-5. Effects of pretreatment of phenobarbital(PB) or CoCl₂ on covalent binding

	³ H		¹⁴ C		³ H minus ¹⁴ C
	n moles/mg	μ moles/g.liver	n moles/mg	μ moles/g.liver	
Control	173.9±9.0	3.78±0.26	19.6±0.8	0.43±0.03	154.3±8.8
PB	154.1±6.0	4.37±0.24	18.9±1.1	0.54±0.04	135.3±5.1
CoCl ₂	37.6±7.6**	0.84±0.14**	8.6±1.4**	0.19±0.03**	29.0±6.3**

**; p<0.01

substrate; ³H-Isoindoline-¹⁴C-Carbonyl-Tripamide

covalent binding は PB 投与で増加せず, CoCl₂投与で約2分の1に低下した。

5-3 Covalent bindingの種差と代謝物生成との関係

第1編第4章の4-4で述べた各種動物の肝ミクロゾームを用いて covalent binding と各代謝物の生成との関係を検討した。(Fig. 3-13)

1. 各種動物肝ミクロゾームにおける covalent bindingと代謝物との関係

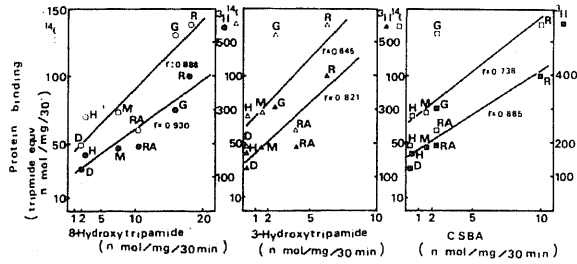


Fig. 3-13 Correlation of covalent binding between the formation of metabolites by microsomal preparation
R; Rat, G; Guinea pig, RA; Rabbit, M; Mouse
D; Dog, H; Human

各種動物肝ミクロゾームにおける 8-hydroxy-tripamide, 3-hydroxy-tripamide および CSBA の生成と binding の生成との関連性の検討は 8-hydroxy-tripamide の生成が最も良く相関性を示した。

2. ^{14}C -Isoindoline-8-hydroxy-tripamide を基質に用いた場合の covalent binding

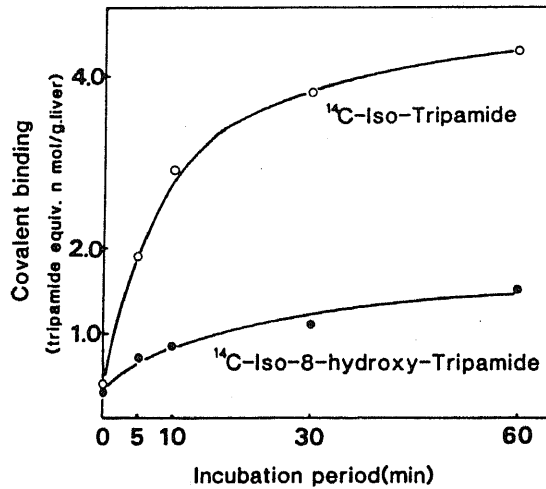


Fig. 3-14. Covalent binding of ^{14}C -Isoindoline-8-hydroxy-tripamide
 ^{14}C -Isoindoline-Tripamide to microsomal protein

covalent binding の生成と 8-hydroxy-tripamide の生成とが相関性を示したことから 8-hydroxy-tripamide からの活性代謝物が covalent binding に関与することが推測された。そこで、8-hydroxy-tripamide を基質に用い、 ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の binding と比較検討した。(Fig. 3-14) 8-hydroxy-tripamide の covalent binding は明らかに ^{14}C -Isoindoline-Tripamide に比べて高値を示した。このことは ^{14}C -Isoindoline-Tripamide が直接の 8-水酸化反応による binding と加水分解後の ATD の 8-水酸化反応を経ての binding との両方合せもつが、8-hydroxy-tripamide は肝ミクロゾームにおいてほとんど加水分解されないので binding は 8-hydroxy-tripamide からの binding のみのため、 ^{14}C -Tripamide に比べて低値を示したものと推察される。

3. ^3H および ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の covalent binding の Isotope ratio

Tricyclodecane ring の 8 および 9 位に ^3H 標識した ^3H -Isoindoline-Tripamide と 3 および 5 位に ^{14}C 標識した ^{14}C -Isoindoline-Tripamide を 1 : 1 に混合した二重標識 Tripamide を基質に用い、covalent binding した際のミクロゾーム蛋白の Isotope ratio を検討した。(Fig. 3-15)

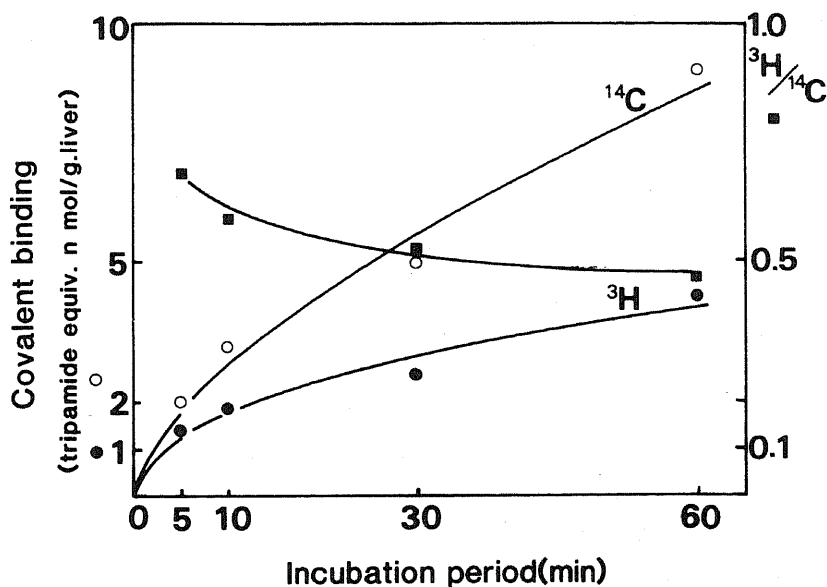


Fig. 3-15. Ratio of ^3H to ^{14}C in radioactivity bound to protein by microsomal preparation substrate; ^{14}C -Isoindoline-Tripamide/ ^3H -8,9-Isoindoline-Tripamide (1:1)

肝マイクロゾーム蛋白に covalent binding した放射能の $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ の値がインキュベート時間の経過とともに低下したことから, binding の過程で Tricyclodecane ring の 8 位あるいは 9 位の ^3H が脱離したことを示している。

それ故 covalent binding には Tricyclodecane ring の 8-水酸化反応を経ての活性代謝物が関与していることが示された。

5-4 肝マイクロゾーム電子伝達系成分への covalent binding

肝マイクロゾーム蛋白に Tripamide の 8-水酸化反応を経ての活性代謝物が covalent binding することを明らかにした。そこで次にこの covalent binding する蛋白の中にマイクロゾーム電子伝達系成分が含まれているかどうかを検討した。

実験方法

1. 可溶化および溶出溶媒

solvent A : 100mM kpi buffer(pH7.25), 0.6% コール酸, 1 mM EDTA Na₂,
1 mM dithiothreitol

solvent B : 10mM kpi buffer(pH7.25), 0.6% コール酸, 1 mM EDTA Na₂,
1 mM dithiothreitol

solvent C : 10mM kpi buffer(pH7.25), 0.5% コール酸, 1 mM EDTA Na₂,
1 mM dithiothreitol

elute I : 10mM kpi buffer(pH7.25), 0.4% コール酸, 0.08% Emulgen 913 ,
1 mM dithiothreitol

elute II : 100mM kpi buffer(pH7.25), 0.4% コール酸, 0.2% Emulgen 913 ,
1 mM dithiothreitol

2. 肝マイクロゾーム蛋白の可溶化と分離

^{14}C -Isoindoline-Tripamide(0.54 μmol) をマイクロゾーム懸濁液 (蛋白量 : 6 mg) と NADPH 生成下 30 分間インキュベートした。その後 105,000g, 60 分間超遠心分離し, 得られたマイクロゾームペレット (24mg protein) を solvent A 10ml で懸濁して, 0°, 一夜放置する。可溶化後, 165,000g, 60 分間超遠心分離して, 上清 5 ml をあらかじめ solvent B で平衡にした 8-aminoocetyl-Sepharose 4B カラム (1.2 \times 6 cm) にかける。solvent C 30ml で洗滌後, elute I 20ml, ついで elute II 30ml で溶出させる。

実験結果

^{14}C -Tripamide (0.54 μmol) を NADPH 生成下肝マイクロゾーム懸濁液とインキュベートすると, 24.5% の放射能がマイクロゾーム蛋白と binding した。それを 0.6% コール酸で処理すると, 92.5% の放射能が可溶化された。可溶化されたマイクロゾーム懸濁液を 8-aminoocetyl-Sepharose 4B のアフィニティーカラムクロマトを行い, 各 solvent で溶出させた。その溶出パターンを Fig. 3-16 に示した。

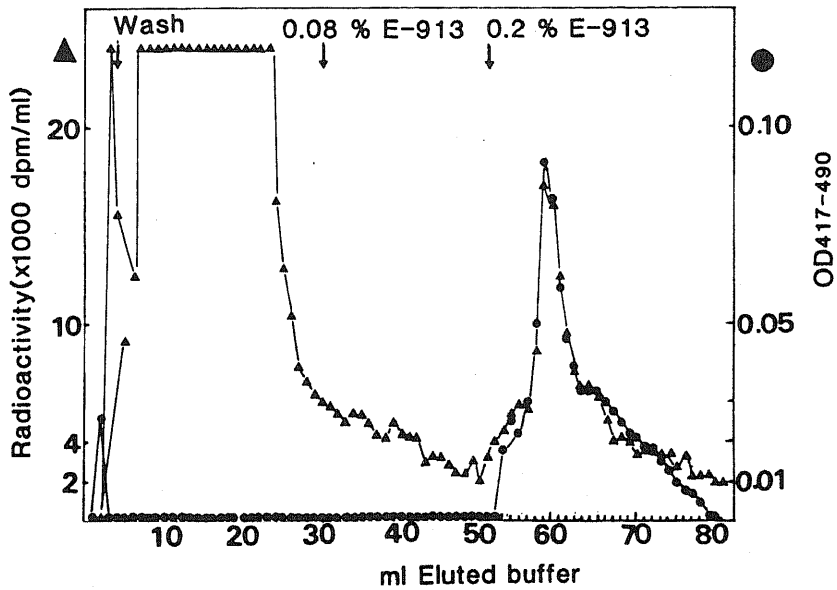


Fig. 3-16. Elution patterns of radioactivity and cytochrome P-450 on 8-aminooctyl-Sepharose 4B column chromatography

Fig. 3-16から明らかなように、ミクロゾーム蛋白に binding した放射能のほとんどは、0.6% コール酸処理により、解離する可逆的な結合であった。しかし、0.2% E-913により溶出されるチトクローム P-450 fraction に放射能が検出されたことから、Tripamide の活性代謝物はチトクローム P-450 に covalent binding することが示された。

しかし、0.2% E-913 で溶出される fraction はチトクローム P-450 の他 NADPH cyt c reductase および NADH cyt. c reductase が溶出されていることが報告されている⁶⁵⁾ので、必ずしも Tripamide の活性代謝物は P-450 のみに結合しているとは限らない。

第6章 考 察

Phenobarbital⁶⁶⁾ や Antipyrine⁶⁷⁾ のような薬物代謝酵素の誘導を引き起こす薬物を連続投与した時に、Warfarin や Diphenylhydantoin 等の薬物を投与した場合、その薬物の代謝物の尿中排泄量が増加することが知られている。¹⁴C-Tripamide をラットに7日間連続投与した際に水酸化代謝物や加水分解代謝物 CSBA の尿中排泄率が増加したことから、肝ミクロゾーム中のモノオキシゲナーゼやアリールアミダーゼ活性の上昇が示唆された。実際、Tripamide 200mg/kg をラットに7日間連続投与すると、肝ミクロゾームにおける Tripamide 8-hydroxylase 活性や加水分解活性が上昇した。さらに、アミノピリン N-脱メチル化活性、アニリン水酸化活性も約2倍に上昇した。

上昇した活性は投与中止後、約4日後でほぼ正常レベルに回復することから、活性上昇は可逆的なもので投与中止後すみやかに回復することを示している。

本実験結果から、¹⁴C-Tripamide (4.5mg/kg) 連続投与後における尿および糞中への代謝物の排泄率の上昇は、肝薬物代謝酵素活性の上昇に基づくものであることが示された。

CSBA および ATD を連続経口投与した際の薬物代謝酵素活性の結果から CSBA は薬物代謝酵素活性上昇能はなく、ATD は薬物代謝酵素活性の上昇能を有しており、Tripamide 投与時の活性の上昇に比し、Tripamide と等モルの ATD を投与した場合の方が、いずれの基質に対しても代謝活性の上昇が高かった。

以上のことからラットにおける Tripamide 投与時における薬物代謝酵素活性の上昇は代謝物 ATD によるものと推察される。

¹⁴C-Isoindoline-Tripamide と ¹⁴C-Tripamide の体内動態の比較から、Chlorosulfamoyl 基のみを有する代謝物は肝臓からすみやかに消失するのに対して、Tricyclodecane ringのみを有する代謝物は肝臓からの消失が遅い、この原因は Tricyclodecane ring が蛋白と covalent binding することに起因している。何故なら Chlorosulfamoyl 基のみを有する代謝物 CSBA および CSBH は in vitro 肝ミクロゾームにおいて、covalent binding しなかった。以上のように Tricyclodecane ring が肝臓に長時間残存することが、ATD に薬物代謝酵素活性の上昇作用がある理由の1つであろう。

Tripamide 連続投与時における薬物代謝酵素活性の上昇は肝ミクロゾーム蛋白量、NADPH cyt.c reductase 活性、Tripamide の結合量、チトクローム P-450 および b₅ 量等からは説明できなかった。さらに ATD 投与による活性上昇にしても、活性上昇に見合うチトクローム P-450 の増加は観察されなかった。したがってこの場合一般に良く知られている「酵素誘導」^{66, 67)} とは性質を異にするものと考えられる。Griseofulvin,⁶⁸⁾ Caffeine⁶⁹⁾ 等はチトクローム P-450 量が増加しないにもかかわらず、薬物代謝酵素活性が上昇する。また CoCl₂ 投与はチトクローム P-450 量が低下⁷⁰⁾ するにもかかわらず、Biphenyl 4-hydroxylation 活性は上昇した。⁷¹⁾ Isosafrole 投与⁷²⁾ はチトクローム P-450 量は20%しか増加しないが、薬物代謝酵素活性は2.5~10倍増加する。

このように薬物代謝酵素活性の上昇とチトクローム P-450 量の増加とは必ずしも平行しない。Caffeine 投与により P-450 還元速度が増加する⁷³⁾ 場合があり Tripamide もこのような理由により活性上昇を引き起こすのかも知れない。

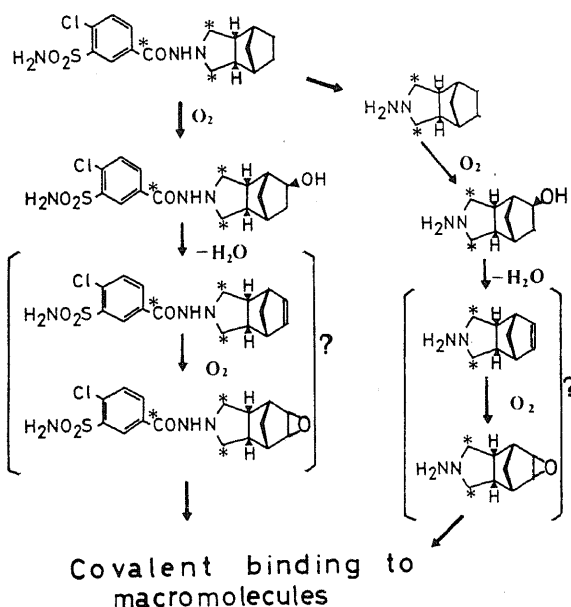
Troleandomycin を投与するとチトクローム P-450は誘導されるが、見かけ上 P-450は増加していない。しかし、50 μ M Potassium ferricyanide で処理すると P-450は増加した⁷⁴⁾すなわち代謝物が P-450に binding して P-450量の測定を妨害しているものと考えられる。Triamide の場合も、代謝物が P-450に binding することが示されているので、見かけ上 P-450が増加していないように見えるのかも知れない。Isosafrole の代謝物もチトクローム P-450に binding することが報告⁷⁵⁾されており、透析により離れないが、1 mM の Cyclohexane の添加で解離する可逆的な結合の他に、不可逆的な結合も存在⁷⁶⁾することが報告されている。

このように P-450に covalent binding することが活性上昇に関与している可能性も考えられる。

Troleandomycin,^{77,78)} Piperonyl butoxide,⁷⁹⁾ Isosafrole⁸⁰⁻⁸³⁾ 等は Phenobarbital および 3-methylcholanthrene 投与によって誘導される P-450とは全く異なる新しい P-450が誘導されることが報告されている。ATD 投与によりわずかではあるが有意にチトクローム P-450が誘導されることは量的増加はともかく、質的变化を伴う新しい P-450が誘導されている可能性もある。

Tricyclocane ring moiety を有する代謝物が核へ移行し、covalent binding していることは、inducer が核へ移行し、蛋白の de novo 合成を引き起こすという現象と関連しているものと推論される。

肝ミクロゾーム蛋白との covalent binding には Tricyclocane ring の 8-水酸化反応を経由しての活性代謝物が関与している。そこでその活性代謝物を以下に推定した。



Possible mechanisms for reactive metabolites formation
from triamide using rat liver microsomes

covalent binding に 8-水酸化反応が関与していることから当然 binding には肝ミクロゾーム電子伝達系のモノオキシゲナーゼが関与していることが示唆されるわけである。binding には NADPH を必要とし、CoCl₂ 投与による P-450 の低下に平行して、binding も低下すること等からチトクローム P-450 が関与していることが推察された。

このような例は Lopronic acid,⁸⁴⁾ PCB,⁸⁵⁾ Acetylhydrazine,⁸⁶⁾ Acetoaminophen,⁸⁷⁾ Bromobenzene,⁸⁸⁾ Furosemide,⁸⁹⁾ Isoniazid⁹⁰⁾ 等多くの薬物に認められる。

Indopamide 10mg~100mg/kg, 7日間連続投与しても薬物代謝酵素活性は変らなかった⁹¹⁾ したがって、Indapamide の場合は代謝物 N-amino-2-methylindoline には薬物代謝酵素活性の上昇作用はないものと推察される。

第4編 ヒドラジン類似代謝物およびアセチルヒドラジンの肝臓に及ぼす影響

抗結核薬 Isoniazid は、しばしば肝障害を引き起こすことが知られている。⁹²⁾ この肝障害は Isoniazid が加水分解されて生成するアセチルヒドラジンが原因物質と考えられている。⁹³⁾ Tripamide の代謝物中にアセチルヒドラジンを生成する可能性のある代謝物、4-Chloro-3-sulfamoylbenzoic acid-(N²-acetyl)-hydrazide(CSBH) が同定された。また Tripamide の加水分解の際 CSBA と同時に生成するヒドラジン化合物 4-Amino-4-aza-endo-tricyclo[5, 2, 1, 0^{2,6}]-decane(ATD) も推定されている。そこで、両化合物をアセチルヒドラジンを対照化合物として肝毒性について検討した。

第1章 アセチルヒドラジン投与による血漿 GOT および GPT への影響

アセチルヒドラジン50, 100, 200および400mg/kg をラットに3日間連続投与した後24時間後の血漿 GOT および GPT の活性を測定した。また同時にフェノバルビタール (80mg/kg i, p) 3日間前処理した群についても同様に検討した。(Table 4-1)

Table 4-1. The change of GPT and GOT in acetylhydrazine-treated rats

Dose (mg/kg)	Untreated		PB-treated	
	GPT (K-U/ml)	GOT	GPT	GOT
Control	70±8.3	95±3.5	188±115.9	170±78.7
50	112±44.0	124±9.1*	607±64.5*	247±9.6
100	81±19.7	115±3.8*	700±218.3	214±29.0
200	149±36.4	153±18.7*	1307±573.4	481±202.4
400	110±16.8	151±7.0**	847±196.2*	394±106.9

*; p<0.05, **; p<0.01

アセチルヒドラジン投与により血漿 GOT は有意に上昇し、フェノバルビタールの処置により、GPT が著しく上昇した。フェノバルビタールの前処理によりアセチルヒドラジンの代謝が亢進することによって肝毒性が増強されたことを示している。

第2章 ヒドラジン類似代謝物およびアセチルヒドラジン投与の肝臓に及ぼす影響

実験方法

1. 動物は SPF の Wistar 系雄ラット (生後 7~8 週令, 体重: 177~216g) を使用した。投与は 5 日間, 1 日 1 回経口投与し, 検体は 5% アラビアゴム液に懸濁して用いた。
2. 最終投与後動物を一昼夜絶食させた後, ペントバルビタール (40~50mg/kg) を腹腔内投与し, ヘパリン処理した注射筒にて腹部下行大動脈より採血した。
3. GPT, GOT は UV 法, 総コレステロールは Libermann-Buchard 法, 以上はテクニコン社製オートアナライザー II 型を用いて測定した。
中性脂肪は TG-E set (ヤトロン), リン脂質は Phospholipids-Test Wako (和光純薬) を使用した。
4. 全採血後ただちに肝臓を摘出して重量測定し, その一部を 10% 中性ホルマリン液で固定した。固定組織は型の如くパラフィン切片となし, Hematoxyline-Eosin 染色, PAS 染色および Sudan III 染色を行ない光学顕微鏡にて観察した。
5. 重量測定した肝の約 1g を切り取って精秤し, 9 倍量の蒸留水を加えてホモジナイズした。このホモジネートを用いて, 蛋白量 (Lowry 法), TBA 値,⁹⁴⁾ 脂肪は Bleigh & Dyer⁹⁵⁾ の変法にて脂質を抽出し, 以下の項目について測定した。

中性脂肪: TG-set (ヤトロン), 総コレステロール: 総コレステロール測定試薬 (和光純薬), 遊離コレステロール: 遊離コレステロール測定試薬 (和光純薬), リン脂質: Phospholipids-Test Wako (和光純薬)

2-1 血漿 GOT, GPT および脂質への影響 (Table 4-2)

Table 4-2. The activities of GPT and GOT, plasma triglyceride cholesterol, and phospholipid in acetylhydrazine- or hydrazine derivative metabolites-treated rats

Compound	Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Liver weight Absolute (g)	Relative (g./100 g bw)	GPT (K-U/ml)	GOT (K-U/ml)	Cholesterol (mg/dl)	Tri-glyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
Control		186±4	6.12±0.16	3.29±0.05	72±5	110±3	53±1	89±6	79±4
CSBH	399	181±3	5.74±0.12	3.17±0.04	79±9	110±7	55±2	97±7	77±4
	1200	178±3	5.73±0.19	3.22±0.05	79±18	106±5	60±2**	107±6	92±2**
	4000	173±2*	5.69±0.14	3.29±0.06	53±6	104±3	66±2**	110±8	102±4**
ATD	551	183±3	9.49±0.36**	5.19±0.11**	17±5**	54±5**	78±3**	85±4	104±4**
	800	178±4	10.30±0.28**	5.78±0.10**	6±3**	38±2**	83±5**	97±3	116±8**
Acetylhydrazine	50	160±4**	6.46±0.22	4.04±0.08**	48±12	160±33	66±2**	72±2*	100±4**
	100	140±4**	7.15±0.16*	5.12±0.09	54±5*	222±22*	n.t.	87±4	n.t.

*; <p 0.05, **; <p<0.01

CSBH 399mg/kg では各項目いずれも差は認められなかったが、1,200, 4,000mg/kg では総コレステロール、リン脂質が用量依存的に増加した。

ATD 投与群は GPT, GOT は減少し、総コレステロール、リン脂質は増加した。アセチルヒドラジン投与は GPT が減少し、GOT は増加した。総コレステロール、リン脂質は増加したが、中性脂肪は減少した。

2-2 肝コレステロール、脂質への影響 (Table 4-3)

Table 4-3. Liver triglyceride, cholesterol, phospholipid and lipid peroxide in acetylhydrazine- or hydrazine derivative metabolites-treated rats

Compound	Dose (mg/kg)	Protein mg/g. liver	Triglyceride mg/g. liver	Total-cholesterol mg/g. liver	Free-cholesterol mg/g. liver	Phospholipid mg/g. liver	TBA-value OD ₅₃₂ /g. liver
Control		206.5±4.8	2.60±0.53	3.13±0.12	2.32±0.05	25.55±0.38	6.22±0.69
CSBH	399	204.0±3.6	2.32±0.31	3.30±0.08	2.45±0.09	25.57±0.22	9.38±0.73*
	1200	198.5±2.3	2.83±0.12	3.18±0.07	2.33±0.04	24.30±0.80	7.83±0.66
	4000	192.0±3.1	2.93±0.15	3.47±0.11	2.48±0.07	26.20±0.37	9.37±1.39
ATD	551	197.3±3.6	6.38±1.07**	3.68±0.16*	2.22±0.08	30.27±0.91**	16.78±1.18**
	800	187.3±6.4*	13.68±1.62**	4.38±0.32**	2.10±0.03**	34.55±0.73**	25.53±2.61**
Acetyl-hydrazine	50	186.7±3.7**	7.03±2.02	3.02±0.08	2.12±0.07*	26.70±0.77	39.45±5.32**
	100	166.8±3.4**	37.68±3.96**	4.12±0.23**	2.25±0.07	32.00±0.58**	86.38±8.49**

*; p<0.05, **; p<0.01

ATD 投与群では中性脂肪、総コレステロール、リン脂質および TBA 値が増加した。800 mg/kg ではさらに蛋白量および遊離コレステロールが減少した。アセチルヒドラジン 50mg/kg では蛋白量、遊離コレステロールは減少し、TBA 値は増加した。また中性脂肪も増加傾向を示した。100mg/kg では蛋白量は減少し、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質および TBA 値は増加した。

2-3 肝の組織学的変化

光顕による観察結果を Table 4-4 に示した。

対照群および CSBH の各投与群では肝小葉の形態はほぼ明瞭であり、肝細胞の配列および形態もほぼ正常であった。

ATD 投与群では全般にわたり混濁、腫大がみられ、小葉中心帯の肝細胞は浮腫状を呈していた。また一部の肝細胞において核濃縮や核崩壊の認められた例が 551mg/kg で 3 例、800mg/kg で 2 例あった。

Sudan III 染色では、小葉中間帯から週辺帯にかけて、種々の大きさの顆粒状を呈する脂肪滴の沈着がみられた。

アセチルヒドラジン 50, 100mg/kg では肝小葉中間帯から週辺帯にかけての肝細胞内に微細な、また例によっては核と同大程度の空胞が認められた。Sudan III 染色では小葉中間帯から週辺帯にかけて脂肪滴の沈着がみられた。アセチルヒドラジンおよび ATD でみられる脂肪滴の沈着の程度はアセチルヒドラジン 100mg/kg > アセチルヒドラジン 50mg/kg > ATD 800mg/kg > ATD 551mg/kg の順であった。

Table 4-4. The extent of hepatic necrosis after repeated administration of acetylhydrazine or hydrazine metabolites

Compound		Dose (mg/kg)	Grade	Round cell infiltration	Focal necrosis	Regeneration	PIS	Sudan III	Atrophy	Cloudy swelling	
Control	-	1	4	0	0	0	0	0	0	0	
	±	5	2	0	4	6	0	0	0	0	
	+	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
CSBH	399	-	0	4	6	1	0	6	6	6	
		±	6	2	0	3	6	0	0	0	
		+	0	0	0	2	0	0	0	0	
	1200	-	0	5	6	0	0	6	6	6	
		±	6	1	0	4	6	0	0	0	
		+	0	0	0	2	0	0	0	0	
	4000	-	5	5	6	1	0	6	6	6	
		±	3	1	0	4	6	0	0	0	
		+	0	0	0	1	0	0	0	0	
ATD	551	-	6	6	3	0	0	6	0	0	
		±	0	0	3	0	3	0	1	1	
		+	0	0	0	2	2	0	5	0	
	800	++	0	0	0	4	1	0	0	0	
		-	6	6	4	0	0	6	0	0	
		±	0	0	1	6	2	0	1	1	
		+	0	0	1	0	4	0	5	0	
		Acetylhydrazine 50	-	1	4	6	3	0	6	6	6
			±	5	1	0	2	0	0	0	0
+	0		1	0	0	5	0	0	0		
100	++	0	0	0	1	1	0	0	0		
	-	0	2	6	3	0	6	6	6		
	±	5	1	0	1	0	0	0	0		
	+	1	3	0	2	0	0	0	0		
	++	0	0	0	0	6	0	0	0		

2-4 薬物代謝酵素活性への影響 (Table 4-5)

Table 4-5. Drug-metabolizing enzymes in acetylhydrazine- or hydrazine derivative metabolites-treated rats

Compound	Dose (mg/kg)	Cytochrome contents		Aniline hydroxylation	Aminopyrine N-demethylation
		P-450	b ₅		
		nmol/g. liver		μmol/g. liver/30 min	
Control		22.77±0.95	13.07±0.55	1.02±0.05	1.22±0.08
CSBH	399	17.57±0.17*	10.77±0.65	2.21±0.03**	1.08±0.00
	1200	19.50±2.16	11.10±1.80	2.58±0.29**	1.02±0.09
	4000	18.90±0.40*	9.03±1.07	2.04±0.15**	0.86±0.07*
ATD	551	46.63±6.50*	19.47±1.03**	0.93±0.04	1.53±0.09
	800	34.17±2.23**	15.63±1.84	1.07±0.03	1.32±0.06
Acetylhydrazine	50	11.95±2.44*	7.50±0.63**	2.25±0.09**	0.81±0.07*
	100	10.13±1.96**	5.35±0.72**	1.21±0.03*	0.31±0.04**

*; p<0.05, **; p<0.01

CSBH 投与群ではチトクローム P-450 および b₅ 量は減少ないし減少傾向を示した。アニリン水酸化活性は各投与群とも著しく上昇したが、アミノピリン N-脱メチル化活性は変わらないが、4,000mg/kg の投与群で減少した。

ATD 投与群は著しい P-450 量の増加が観察されたが、薬物代謝酵素活性は変らなかった。

アセチルヒドラジン投与群ではチトクローム P-450 および b₅ 量いずれも減少した。それに平行して、アミノピリン N-脱メチル化活性は低下した。一方アニリン水酸化活性は逆に上昇した。

第3章 考 察

アセチルヒドラジン投与群では肝重量は増加し、血漿中の総コレステロール、リン脂質ならびに肝臓中の中性脂肪、総コレステロール、リン脂質などの脂質も増加した。さらに肝臓TBA値も上昇したことから脂質過酸化反応が亢進していることが推察された。組織所見では肝細胞に脂肪滴の沈着がみられ、肝臓の脂質の増加と一致した変化であった。またGTPは減少、GOTは増加を示した。

チトクロームP-450および b_5 量はいずれも減少し、それと平行してアミノピリンN-脱メチル化活性が低下したがアニリン水酸化活性は逆に著しく上昇した。

以上のようにアセチルヒドラジン投与によって観察された肝障害は、ヒドラジン⁹⁶⁾やヒドラジン誘導体⁹⁷⁾によって生じる肝毒性の変化とよく酷似していた。

CSBH投与群ではアニリン水酸化活性の著しい上昇が観察された他は、対照群と何ら差は認められなかった。したがってCSBHから肝毒性を発現するほどの量のアセチルヒドラジンは生成しないものと推論される。事実、*in vitro*肝ミクロームにおいて、CSBHからCSBAはほとんど生成しなかった。

ATDは構造中にアセチルヒドラジンと同様ヒドラジン結合を有している。

ATD投与群では肝重量の増加、GTP、GOTの減少、血漿中の総コレステロール、リン脂質、肝の中性脂肪、総コレステロール、リン脂質などの脂質および肝TBA値の増加がみられた。また組織所見では肝細胞中に脂肪滴の沈着がみられた。チトクロームP-450および b_5 量は増加したが、アニリン水酸化、アミノピリンN-脱メチル化活性は変化が認められなかった。ATDはアセチルヒドラジンに認められる肝毒性は示さず、脂肪肝への移行と肝の適応的機能亢進作用を合せもつ肝に複雑に影響を及ぼすことが示された。

第3編において、ATD投与は肝薬物代謝酵素活性を上昇させることを示したが、本編においては、チトクロームP-450の増加にもかかわらず、薬物代謝酵素活性の上昇は観察されなかった。したがって、ATD高投与量投与では、肝障害への移行により誘導効果が消失したものと推論される。

アセチルヒドラジンおよびCSBH等のアセチルヒドラジン誘導体の著しいアニリン水酸化活性の上昇は、チトクロームP-450の量的変化に平行せず、P-450の monooxygenase 活性の関与はないものと推察される。

同様なことをAkinらがヒドラジンを投与した時にアニリン水酸化活性が上昇することを報告している⁹⁸⁾しかし、チトクロームP-450は変らなかった。またアニリン水酸化活性は、p-Nitroanisole, 7-Ethoxycoumarin, Biphenyl等を添加することにより活性上昇が観察される⁹⁹⁾さらに、ヘモグロビンやミオグロビンによりアニリン水酸化が起り、ミクロゾームに両ヘム蛋白を添加することにより著しい活性上昇が認められる¹⁰⁰⁾このことから、アニリン水酸化活性は他の薬物の代謝活性とは異なり、別個の水酸化メカニズムが存在する可能性が示唆される。アセチルヒドラジン投与によりP-450量が約2分の1に低下したにもかかわらず、アニリン水酸化活性は逆に約2倍に上昇した。以上のことはP-450の peroxidase 活性によるアニリン水酸化のメカニズムを推測させる。Phenylhydrazineはヘム蛋白の存在下酸素と反応し、 O_2 を発生し、そのことがヘム蛋白による drug-metabolizing peroxidase 活性の発現に寄

与しているものと推論されている。¹⁰¹⁾さらに、Phenylhydrazine とヘム蛋白により radical が発生し、その結果赤血球中の TBA 値が上昇することが報告されている。¹⁰²⁾以上のことはヒドラジンは P-450 と反応し、O₂ を発生し、その O₂ を使ってアニリンが水酸化されるか、あるいはヒドラジン投与により発生した radical がアニリンからプロトンを引きぬき、アニリンが酸化されることが推論される。

アニリン水酸化活性の上昇が CSBH やアセチルヒドラジンに認められ、ATD には観察されなかったことから、鎖状のヒドラジン結合が活性上昇には関与しているものと考えられる。

一般に肝障害が惹起されると薬物代謝酵素活性が低下することが知られているが、アセチルヒドラジン肝障害においてはアミノピリン N-脱メチル化活性は低下するが、アニリン水酸化活性は著しく上昇しており、一様に肝障害が惹起されたからといって、薬物代謝酵素活性が低下するとは限らないことを示している。

薬物の肝障害とその活性代謝物の蛋白への covalent binding との関連が数多く報告されている。¹⁰³⁻¹¹²⁾

ATD は第 3 編 5、6 章で述べたように、肝蛋白に covalent binding することが示されている。したがって ATD の脂肪肝への移行ならびに GOT 活性の低下等は、ATD 代謝物の高分子蛋白への covalent binding により惹起されるものと推論される。いずれにしても ATD には薬物代謝酵素活性の上昇をもたらす肝の適応的機能亢進作用と脂肪肝への障害作用の両作用を有しており、低投与量で前者の作用が高投与量で後者の作用が発現するものと推察される。

脂質過酸化反応と肝障害作用との関連が報告されており¹¹³⁾ ATD およびアセチルヒドラジン投与により著しい TBA 値の上昇が観察されたが、このことは肝障害作用の惹起を支持しているものと考えられる。

第5編 Tripamideの血中動態と薬効との関連

降圧利尿剤の体内動態と薬効との関連は、降圧利尿薬の微量定量法があまり開発されていないこと、さらに利尿活性は体内動態との相関が認められず、むしろ腎機能およびホルモンなどの体液制御機構との関連が深いことなどから、あまり関心が寄せられなかった。¹¹⁴⁾

しかし降圧利尿剤の体内動態が食事効果や病態によってかなり影響を受けること、さらに微量定量法が開発されてきたことから数年前からこの方面の研究が活発になった。^{115,116,117)}

Beermann等はHydrochlorothiazideに関して、血漿中AUCと電解質排泄との関連を検討しているが、相関性はないと報告している。¹¹⁸⁾またFurosemideに関して、血漿中濃度と利尿活性は関連がなく、Furosemideの尿中排泄率と電解質排泄とに相関性があると報告している。^{119,120)}

そこでまず手はじめに、Tripamideの生体試料中での定量法を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いて確立した。Tripamideの降圧効果と血中濃度との関連は、Tripamideが正常血圧に影響を与えないので、⁷⁾老令自然発症高血圧ラットを用いて行なった。さらに健康人において、電解質排泄と血中動態との関連を検討した。

第1章 Tripamideの赤血球への移行

1-1 ¹⁴C-Tripamide投与後の血中分布

実験方法

¹⁴C-Tripamide投与ラットの頸動脈カニューレーションによりヘパリン加速沈管に血液を採取し、4,000r.p.m, 20分間遠心分離して、赤血球成分と血漿成分とを分離する。血漿中放射能の蛋白結合率は、血漿1mlをそれぞれVisking tube 8/32に入れ、外液0.05 M Phosphate buffer (pH7.4) 1,200mlに浸し、3日間4℃で攪拌した。

実験結果

¹⁴C-Tripamide経口投与2時間および8時間後の血中放射能のそれぞれ92, 94%が赤血球成分に存在しており、血漿成分は6~8%であった。血漿中に存在する放射能のそれぞれ25, 50%が血漿蛋白と結合していた。

Tripamideおよび代謝物は血中ではほとんど赤血球中に存在していることを示している。

1-2 Tripamideの赤血球への移行

Tripamideおよび代謝物は血中ではそのほとんどが赤血球中に存在していることからTripamideの赤血球移行性は極めて高いものと考えられる。

そこでin vitroにおいてTripamideの赤血球への移行と結合について検討した。

実験方法

1. ^{14}C -Tripamide の調製

^{14}C -Tripamide を濃塩酸 1 ml に溶解し、水 10 ml を加えて、固型水酸化ナトリウムで約 pH 10 に調整する。pH 7.4 0.05M Phosphate buffer で所定の濃度に調整した。

2. ^{14}C -Tripamide の赤血球中への移行¹²⁾

1. ラット赤血球中への移行

頸動脈カニューレーションによりヘパリン加遠沈管に採血し、4,000 r.p.m. 20 分間遠沈、赤血球を採取する。生理食塩水で赤血球を数回洗った後、pH 7.4 0.05M Phosphate buffer (0.9% NaCl) に懸濁する (赤血球浮遊液)。

赤血球浮遊液 (血液 1 ml に相当) に pH 7.4 等張 Phosphate buffer 1 ml, ^{14}C -Tripamide 20 $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ 等張 buffer を加えて、スピッツ管で 37°C、温置する。所定時間後、遠沈 (3,500 r.p.m. 30 秒) して、上清の放射能を測定した。

2. ヒト赤血球中への移行

ラットと同様にして、ヒト赤血球浮遊液 (ヘマトクリット 27%) 1.8 ml に ^{14}C -Tripamide 34.8 $\mu\text{g}/0.2\text{ml}$ 等張 Phosphate buffer を加えて、スピッツ管で 37°C 所定時間温置する。以下 1. と同様に行なった。

3. ^{14}C -Tripamide のラット赤血球内漿蛋白との結合

1. 赤血球膜と赤血球内漿の分離¹²⁾

血液に 10 倍量の冷水を加えて一夜放置後、0.02M クエン酸を加えて pH 5.5 に調整する。4°C、10,000g、20 分間遠心分離し、上清 (赤血球内漿) と沈澱 (赤血球膜) とに分ける。赤血球膜は水で 4 回洗浄した後、はじめの血液量の 2 倍相当量の 0.05M pH 7.4 Phosphate buffer に懸濁した (赤血球膜懸濁液)

2. 結合実験

赤血球膜懸濁液および赤血球内漿 (0.5~2.0 ml) に ^{14}C -Tripamide 8 $\mu\text{g}/0.2\text{ml}$ を Seamless Cellulose Tubing (Visking, Co., Size 8 / 32) に入れ、袋の両側をしぼり 0.05 M Phosphate buffer に浸して、5°C、4 日間、外液を攪拌した。

4. Tripamide および代謝物の赤血球中からの放出

^{14}C -Tripamide (5 mg/kg) をラットに経口投与した 1 時間後の赤血球を集め、血漿と等量の pH 7.4 等張 Phosphate buffer を加え懸濁し、一定時間後に遠心分離する。上清に移行した放射能を測定し、すべて上清を回収した後、buffer を新たに加えて同様に繰り返す。

実験結果

1. Tripamide の赤血球への移行

ラットおよびヒト赤血球への ^{14}C -Tripamide の移行性を検討した。(Fig. 5-1)

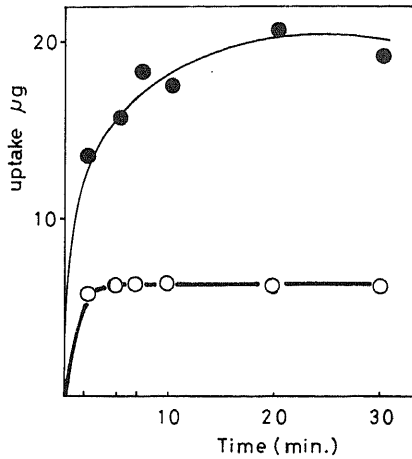


Fig. 5-1. The time-course of uptake of tripamide into red blood cells from human(●) and rat(○)

Tripamideのラット赤血球中への移行は急速であり、直ちにプラトーに達するのに対して、ヒト赤血球中への移行はラットの場合より遅く20分後にプラトーに達した。

2. Tripamideの濃度と赤血球への移行

Tripamide各濃度(9.3—128.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)をヒト赤血球浮遊液に添加した際の赤血球中への移行量をTable. 5-1に示した。

Table 5-1. Uptake of various amounts of tripamide to red blood cells

Added tripamide (μg)	Red blood cells (μg)	Medium (μg)	Red blood cells	
			Medium	Medium
9.0	8.41	0.93	9.0	
17.5	15.57	1.93	8.1	
33.0	28.01	4.96	5.6	
60.0	42.06	17.95	2.3	
128.0	80.16	48.24	1.7	

Tripamide $9.3\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、赤血球 / Medium の値は約 9 で飽和現象が認められた。

3. Tripamide および代謝物のラット赤血球中からの放出

^{14}C -Tripamide 経口投与時のラット赤血球中からの放射能の放出を Fig. 5-2 に示した。

Tripamide および代謝物の赤血球中からの放出はすみやかであり、上清への移行は、赤血球中濃度に依存し、上清と赤血球中との濃度比は常に約 2 対 8 になっていた。

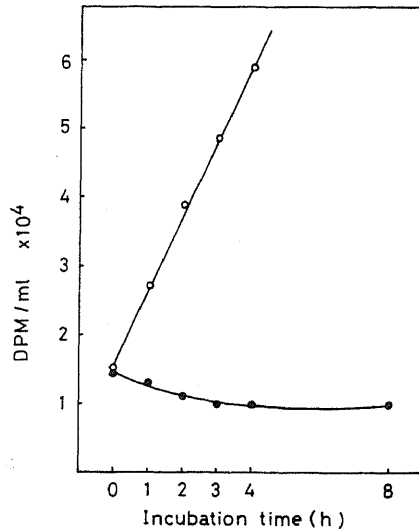


Fig. 5-2. Release of radioactivity from red blood cells to medium
○; cumulative, ●; per hour

4. Tripamide のラット赤血球内漿蛋白との結合

Tripamide の赤血球内漿および赤血球膜との結合率を Fig. 5-3 に示した。

Tripamide の赤血球膜結合性は低く、膜懸濁液を増やしても結合率は変らなかった。赤血球内漿との結合は、内漿成分を増加すると、それに比例して結合率も増加した。Tripamide は赤血球内漿成分と結合し、その結合量は血液 1ml 相当の赤血球内漿成分に対して Tripamide $3.12\mu\text{g}$ であった。

以上のことは赤血球中に移行した Tripamide は赤血球膜とは結合せず、赤血球内漿成分と結合して存在していることを示唆している。

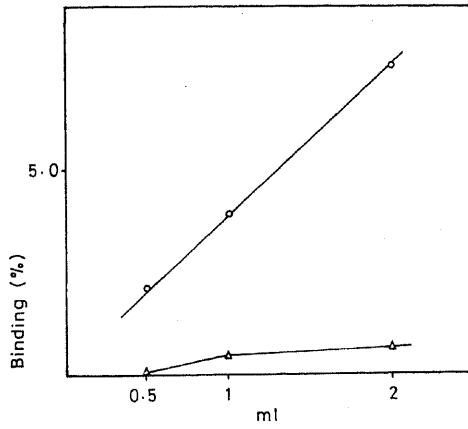


Fig. 5-3. Binding of tripamide to the membrane (Δ) or contents of red blood cells (O)

第2章 高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中の Tripamide および代謝物の定量法の確立

Tripamide は容易に赤血球へ移行することから、血中 Tripamide の測定としては血漿と赤血球を分別、定量することが望ましい。またラットの主代謝物である CSBA の定量はヒトにおける加水分解速度を推測する上で重要である。

ヒト肝ミクロゾームを用いた Tripamide の代謝から、ヒトでは水酸化反応が優先して起こることが示唆されたので尿中の水酸化代謝物の測定法も合わせて確立する必要がある。

スルホンアミド系薬物、例えば Hydrochlorothiazide,¹²²⁾ Chlorothiazide,¹²³⁾ Polythiazide,¹²⁴⁾ Mefruside,¹²⁵⁾ Furosemide,¹²⁶⁾ の HPLC を用いての定量についてはすでに報告されている。著者らも同様に、HPLC を用いて Tripamide のヒトにおける薬物動態を検討するために Tripamide のヒト血漿中、赤血球中および尿中の定量法について検討した。

実験方法

Table. 5-2に示す装置および分離条件で実験を行った。

TABLE 5-2

CONDITIONS OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Apparatus	Compound		
	TDS	CSBA	3-OH. 8-OHTDS
Pump	ALTEX Model 100	LC-1	ALTEX Model 100
Detector	UVIDEC 100II	UVD-1	UVIDEC 100II
Wave length	254 mm	254 mm	254 mm
Injector	Rheodyne Model 7120*		
Column	Hitachi gel 3011** (particle size 10 μ m) (4.6 x 500 mm)		Nucleosil C18 (particle size 10 μ m) (4.6 x 250 mm)
Pre column	Permaphase ODS (4.6 x 50 mm)*		
Mobile phase	AcOH:H ₂ O:MeOH (1:10:90)	AcOH:H ₂ O:MeOH (1:20:80)	H ₂ O:MeOH (3:2)
Flow rate	0.7ml/min	0.6ml/min	0.7ml/min
Temperature	32°	25°	40°

* すべての測定に用いた。

** CSBAとTDSの場合に用いた。

ALTEX Model 100 ; ALTEX社(米国)

LC-1 ; 島津製作所(株)

UVIDEC 100II ; 日本分光(株)

Hitachi gel ; 日立(株)

Nucleosil C18 ; Nagel(西独)

Permaphase ODS ; Du pont(米国)

2. 内部標準物質

内部標準物質 (I.S.) の名称と構造式を Table 5-3 に示す。I.S. はすべて合成標品を用いた。

Table 5-3. Chemical structures of internal standard

構造式	化学名	濃度
	4-(4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl)-4-aza-endo-tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]-decane [I.S.(1)]	2.5 mg / 100 ml
	N-(4-Aza-exo-tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]-decan-4-yl)-4-chloro-3-sulfamoylbenzamide [I.S.(2)]	16.5 mg / 100 ml
	3-Sulfamoylbenzoic acid [I.S.(3)]	2.5 mg / 50 ml

3. 代謝物 3-hydroxy-tripamide および 8-hydroxy-tripamide の調製

Tripamide の代謝物である 3-hydroxy-tripamide および 8-hydroxy-tripamide は、¹⁴C-Tripamide を基質としてラット肝ミクロソームを用いた in vitro 実験で生成させ Amberlite XAD-4 カラムクロマトグラフィーを行い、水、40%メタノール水、メタノールで溶出させる。メタノール溶出液を減圧下濃縮乾固し、TCL で分離、精製した。

4. 試薬

分析溶媒の蒸留水とメタノールは HPLC 用 (和光純薬製)、緩衝液は 0.05M Borate buffer (pH 9.0)、0.05M Phosphate buffer (pH 7.0) を用いた。ジアゾメタンは Schlenk¹²⁷⁾ の方法に準じて用時調製し、エーテル/メタノール (9 / 1) 飽和溶液とした。

5. 抽出方法

ヒト血液 7 ml を 3,000 r.p.m. 10 分間遠心分離し得られた上清を血漿に、沈澱物を赤血球として測定に用いた。

1. 血漿中からの Tripamide

血漿 3 ml に I.S. (1) 溶液を 25 μl、蒸留水 3 ml を加えて、50 ml 用スクリーキャップつき遠沈管に入れ、エーテル 20 ml で 15 分間振とう抽出する。遠心分離後 2 回抽出を行なったエーテル層を 5 ml まで N₂ ガスで濃縮し、pH 9 Borate buffer 2 ml を加えて 15 分間振とうする。遠心分離後エーテルを 45°C、N₂ ガスで乾固し、残渣にメタノール 0.25 ml を加え 80°C で超音波処理後、遠心分離を行ない上清 50 μl を HPLC に注入する。

2. 赤血球中からの Tripamide の抽出

赤血球に I.S. (1) 溶液を 0.2 ml あるいは 0.8 ml 加えた後、蒸留水 50 ml で溶血したものを分液ロート (300 ml) に入れ、エーテル 100 ml を加えてはげしく振り、その後 10 分間振とう抽出する。30 分放置後エーテルを 50 ml のナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで減圧乾固する。残渣をメタノール 0.4 ml に溶解し、その 40 μl を HPLC に注入する。

3. 尿中からの Tripamide, 3-hydroxy-tripamide および 8-hydroxy-tripamide の抽出

尿10ml を 1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH7 に調整し, 50ml 用スクリーキャップ付遠沈管に入れ I.S. (2) 溶液を 20 μ l を加え, エーテル 20ml で 15 分間振とうし, 2 回抽出する。遠心分離後エーテルを 45 $^{\circ}$ C, N₂ ガスで 10ml まで濃縮する。そこに 1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml 加え, 5 分間振とうし水層に転溶する。遠心分離後エーテルを除去し, 水層にさらに 6 N 塩酸溶液 0.2ml を加え, 酸性にしエーテルで 5 分間振とうする。水層を 1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH7 に調整し, さらに pH7.0 Phosphate buffer 1 ml を加えて, エーテル 10ml で 15 分間振とうし 2 回抽出する。遠心分離後エーテルを共栓試験管に移し 45 $^{\circ}$ C, N₂ ガスで乾固し, 残渣をメタノール 0.4ml に溶解し, その 40 μ l を HPLC に注入する。

4. 血漿および赤血球中からの CSBA の抽出

血漿および赤血球を中性下でエーテル抽出した後の水層を pH2 に調整する。

血漿の場合には, I.S. (3) 溶液を 0.2ml 加えて, 15ml 用スクリーキャップ付試験管に入れ, エーテル 6 ml で 15 分間振とうし 2 回抽出する。遠心分離後エーテルを 45 $^{\circ}$ C, N₂ ガスで濃縮乾固する。赤血球の場合には, I.S. (3) 溶液を 0.2ml 加えて, 分液ロート (300ml) に移しエーテル 100ml を加えて, 手で激しく振とう後, さらに 10 分間振とう抽出する。30 分間放置後エーテルをナス型フラスコに移し, 50 $^{\circ}$ C でロータリーエバポレーターで減圧乾固する。つぎに, 各々の残渣を少量のメタノールで溶解しジアゾメタンを過剰に加えメチル化を行なう。約 1 時間静置後 45 $^{\circ}$ C, N₂ ガスで乾固し, 残渣をメタノール 0.5ml で溶解し, 蒸留水 3 ml, エーテル 6 ml 加え 10 分間振とう抽出する。遠心分離後エーテルを共栓試験管に移し 45 $^{\circ}$ C, N₂ ガスで乾固する。残渣をメタノール 0.4ml で溶解しその 20 μ l を HPLC に注入する。

6. 検量線の作成

血漿, 赤血球および尿中の Tripamide は, それぞれ 10~100ng, 10~1,000ng, 20~400ng の範囲で検討し, 得られたクロマトグラムの Tripamide と I.S. の Peak height ratio から Tripamide 濃度を算出した。

尿中の 3-hydroxy-tripamide は, 0.25~1.28 μ g, 0.17~1.09 μ g の範囲で検討し, 得られたクロマトグラムの面積から 3-hydroxy および 8-hydroxy-tripamide 濃度を算出した。

実 験 結 果

2-1 血漿, 赤血球および尿中の Tripamide の定量

血漿, 赤血球および尿中のエーテル抽出物の HPLC クロマトグラムを Fig. 5-4, Fig. 5-5 および Fig. 5-6 に示した。Tripamide と I.S. は, いずれのクロマトグラムにおいてもブランクの妨害を受けず分離した。

検量線は, 原点を通る良好な直線を示し, 血漿および赤血球中 Tripamide は, 注入量として 10ng 以上, 尿中では 20ng 以上が定量できる。

血漿および赤血球には Tripamide 200ng を, 尿には Tripamide 25ng を加え, 回収率を検討したところ, 血漿では 90%, 赤血球では 97%, 尿では 80% であった。

2-2 尿中水酸化代謝物の定量

3-hydroxy および 8-hydroxy-tripamide と同様の HPLC 分離条件では分離されない。そこでカラム, 移動相, 温度等を検討した結果, Table. 5-2に示した条件で, Fig. 5-7に示すように尿ブランクの妨害を受けずに分離した。検量線は3-hydroxy および 8-hydroxy-tripamide 共に原点を通る直線を示した。

回収率は 8-hydroxy-tripamide は $37.3 \pm 2.3\%$ で 3-hydroxy-tripamide は $37.2 \pm 0.6\%$ であった。

本法の HPLC 条件は尿中濃度と同じ範囲においては, 血漿および赤血球中の定量にも応用できることが判った。

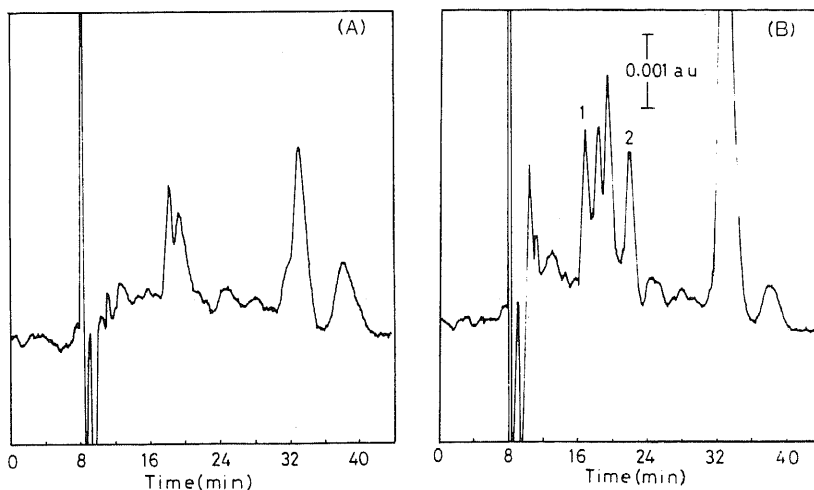


Fig.5-4 Chromatograms of (A) plasma extract and (B) plasma extract containing 100 ng of tripamide (1) and 125 ng of internal standard I (2). Three peaks eluting at 18.1, 19.3 and 33.0 min were endogenous plasma constituents. HPLC conditions as in Table 5-2 The detector range for both chromatograms was 0.001 a.u.

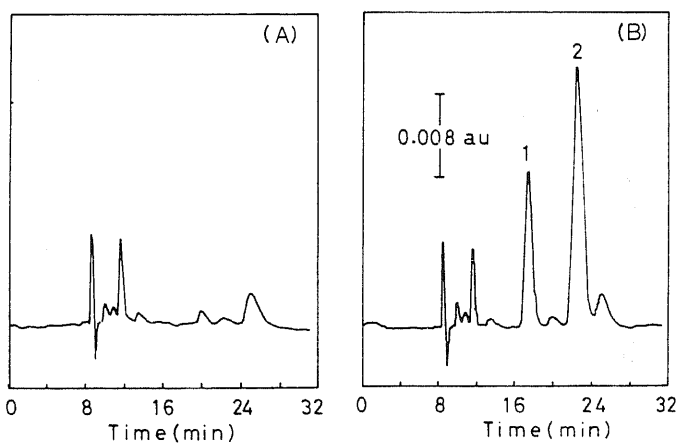


Fig.5-5 Chromatograms of (A) red blood cell extract and (B) red blood cell extract containing 1 µg of internal standard and 400 ng of tripamide. HPLC conditions as in Table 5-2 The detector range for both chromatograms was 0.008 a.u.

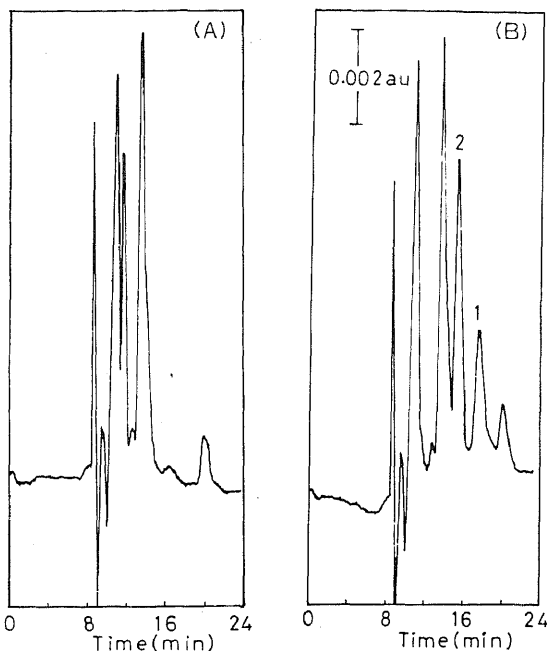


Fig.5-6Chromatograms of (A) blank urine and (B) urine extract containing 200 ng of tripamide (1) and 330 ng of internal standard II (2). Solvent: 1% aqueous acetic acid-methanol (10:90, v/v). Solvent flow-rate: 0.7 ml/min. Column: Hitachi gel 3011, 10- μ m particle size, 500 \times 4.6 mm. Column temperature: 32°C.

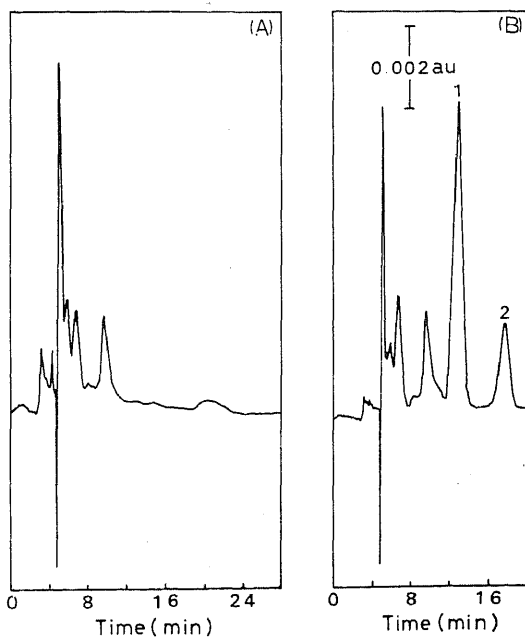


Fig.5-7Chromatograms of (A) blank urine and (B) the hydroxylated metabolites as a single medication in a human urine sample. 1 and 2 on the chromatogram show 8-hydroxy- and 3-hydroxytripamide, respectively. Solvent: water-methanol (60:40, v/v). Solvent flow-rate: 0.7 ml/min. Column: Nucleosil C₁₈, 10- μ m particle size, 250 \times 4.6 mm. Column temperature: 40°C.

2-3 血漿および赤血球中 CSBA の定量

CSBAは、極性の高い代謝物であるため Tripamide を分離する条件では、HPLC からの溶出が早く生体成分との分離は不可能である。そこでジアゾメタンによるメチル化を行ない CSBA および I.S. (3) のメチルエステル体として定量した。

Fig. 5-8は、血漿および赤血球 blank を実験方法に従って処理した際のクロマトグラムであるが、図から明らかな如く、CSBA および I.S. の retention time に一致する妨害ピークは認められなかった。

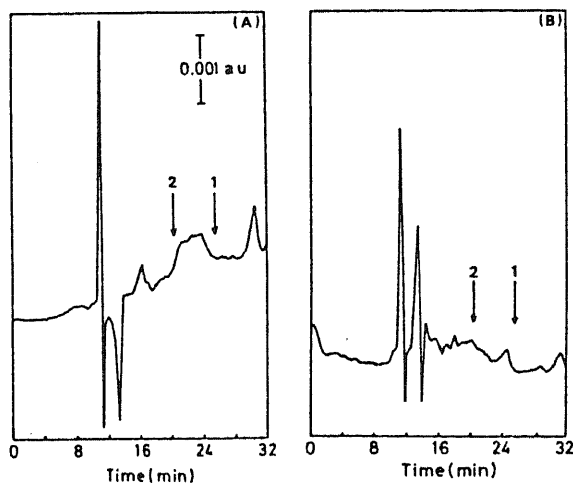


Fig. 5-8. Chromatograms of blank of (A) plasma and (B) red blood cells

また、CSBA および I.S. の標準液にジアゾメタンを加えメチル化反応を検討した際の反応検量線は原点を通る直線となり、反応が CSBA および I.S. 共に定量的に進行していることが示された。つぎに血漿および赤血球に一定量の CSBA と I.S. を添加し同様に処理した場合の peak height は標準液とほぼ等しく、回収率はいずれも90%以上であった。

第3章 Tripamide の血中濃度と降圧効果

老令自然発症高血圧ラット (SHR) における Tripamide および CSBA を含む代謝物 5 種類について降圧作用を検討したところ、いずれの代謝物においても単独投与では降圧作用は認められず、Tripamide のみに作用が認められた。¹⁷⁾

そこで、老令 SHR に Tripamide 100mg/kg を経口投与した際の降圧作用と血中 Tripamide 濃度の関連性を検討した。

実験方法

1. 動物

体重 450 g 前後の雄性の老令 SHR (77週令) を実験に使用した。投与前血圧は 225mmHg であった。

2. 投与

Tripamide として 100mg/kg を体重 100g 当り 0.5ml となるように 5% アラビアゴムに懸濁して調製し、金属ゾンデを用いて強制的に胃内に投与した。

3. 血圧測定

島津式収縮期血圧測定装置 (SCS-301) を使用した。ラットを無麻酔で固定し、尾の動脈より非観血的に、投与前と投与後 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間の血圧を測定した。

4. 採血

投与後、予めヘパリンを含ませた 1ml の注射筒を用いて、尾静脈より血液 0.2ml を血圧測定と同じ時間において採血した。

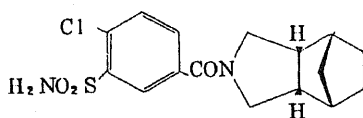
5. 血中 Tripamide の定量

血中 Tripamide の定量は、HPLC を用いて行なった。以下に抽出方法を示す。

ラット尾静脈より採血した血液 0.2ml を共栓試験管にとり、蒸留水 2ml で溶血後、内部標準物質 (以下 I.S. と略) 溶液 0.1ml とエーテル 5ml を加え 15 分間振とうし抽出する。遠心分離後エーテルを共栓試験管に移し、再度エーテル抽出を繰り返す。エーテル層を合せ 45° 下、N₂ ガスで濃縮乾固する。残渣をメタノール 0.4ml で溶解しその 20μl を HPLC に注入した。

I.S. の構造式を Fig. 5-9 に示した。

Fig. 5-9. Chemical structure of internal standard



4-(4-Chloro-3-sulfamoyl
benzoyl)-4-aza-endo-tricyclo
[5.2.1.0.2',6']-decane
(I.S.) 125 mg/50 ml

6. HPLC 装置

Table. 5-4に HPLC の測定条件を示す。

TABLE 5-4

CONDITIONS OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Pump	ALTEX Model 100
Detector	UVIDEC 100 II (254 nm)
Injector	Rheodyne Model 7120
Column	Nucleosil C18 (particle size 10 μ m) (4.6 \times 250 mm)
Mobile phase	AcOH:H ₂ O:MeOH (1 : 40 : 60)
Flow rate	0.7 ml/min
Temperature	25 $^{\circ}$

ALTEX Model : ALTEX社 (米国)

UVIDEC 100 II : 日本分光 (株)

Nucleosil C18 : Nagel (西独)

7. 検量線の作成

Tripamide 10~200ng の範囲で Tripamide と I.S. の高さの比から検量線を求めた。

実 験 結 果

1. 血中 Tripamide の定量

Fig. 5-10に HPLC クロマトグラムを示す。血液中には Tripamide および I.S. の測定を妨害するピークはなかった。検量線は原点を通る直線がえられた。検出限界は、注入量で10ng であり、抽出回収率は、91~98%であった。

2. 降圧効果と血中 Tripamide 濃度

Tripamide 100mg/kg を経口投与した時の血圧と血中 Tripamide 濃度推移を Fig. 5-11に示した。血圧は、投与後1時間から下降し、4時間で最低値を示した。以後回復傾向を示し8時間後では投与前のレベルまで回復した。

血中 Tripamide 濃度は、投与後2時間で最高値3.2 μ g/mlを示し、以後すみやかに血中から消失し、24時間後では血中に Tripamide は認められなかった。

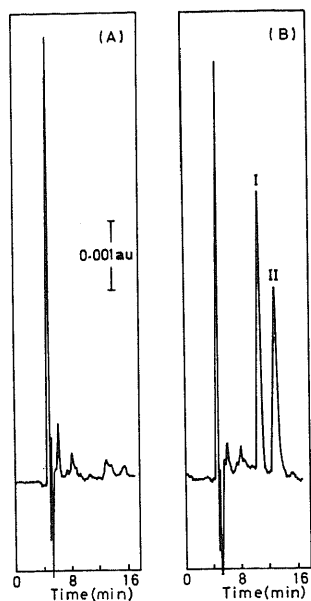


Fig. 5-10. Chromatograms of (A) blood extract and (B) blood extract containing tripamide(I) and I.S.(II)

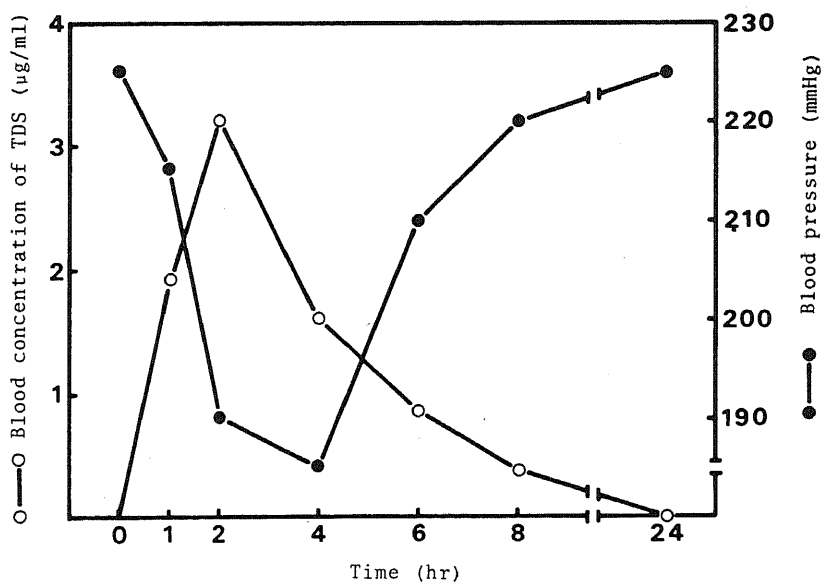


Fig. 5-11. Relationship between antihypertensive effect and blood level of tripamide in SHR

第4章 ヒトにおける Tripamide の血中動態と電解質排泄

臨床第一相および第二相試験では、薬剤の人における投与量、薬理作用の強さとその時間的推移の検討が行われるが、薬剤の安全性および有効性の点から適切な投与量や投与間隔を科学的に検討するためには、同時に薬物動態も明らかにして、投与量—薬物動態—薬理作用の強さの関係から、その薬剤の安全性と有効性の条件である投与量幅と投与間隔、さらに投与期間を検討することが望ましいといわれている。

4-1 Tripamide の吸収に及ぼす食事効果

実験方法

1. 投与

下記に示すように、健康男子10名を2群に分け、3週間間隔のクロスオーバー法により実施した。前日の夕食後から15時間絶食した被験者は、食後投与の場合は同一献立の朝食をとった後、1時間後に Tripamide 15mg 含有のノルモナール[®]1錠を約100mlの水とともに服用し、空腹時投与の場合は朝食をとらずに、そのまま15mgのノルモナール1錠を約100mlの水とともに服用した。

食後服用者および空腹時服用者はいずれも試験開始前日の朝食から試験期間中（投与後2日間）は同一献立の食事を行った。なお試験開始前日から4日間はアルコール類、コーヒー、茶、コーラおよびチョコレート等カフェイン類を含む飲食物の摂取を禁じた。

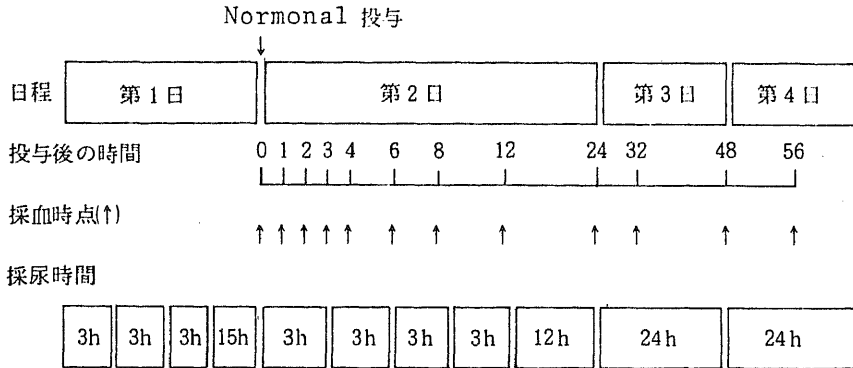
被験者の年齢、身長および体重

被 験 者	年 令	身長 (cm)	体重 (kg)	投 与 方 法	
				試験 I	試験 II
H . S	37	165	67	食後	空腹
H . T	45	164	68	食後	空腹
T . T	40	163	60	食後	空腹
N . M	30	172	66	食後	空腹
Y . S	28	174	67.5	食後	空腹
H . H	44	171	65	空腹	食後
T . H	35	165	64	空腹	食後
M . T	25	173	68	空腹	食後
M . M	29	165	62	空腹	食後
T . K	49	163	64	空腹	食後

2. 採血および採尿

下記に示す実施スケジュールに従って、採血および採尿を行なった。

実施スケジュール



3. 測定

Tripamide の赤血球中濃度および水酸化代謝物の測定は第5編第2章に準じた。

赤血球中 Tripamide 濃度-時間曲線下面積 (AUC) は台形法から算出し、分散分析により検定した。

実験結果

(1) 食後および空腹時投与における赤血球中 Tripamide 濃度の推移

クロスオーバー法により10名の健康男子に1日用量の15mgノルモナル1錠を空腹時または食後1時間後に投与した際の赤血球中 Tripamide 濃度曲線を Fig.5-12 に示した。赤血球中 Tripamide 濃度は、空腹時投与4時間後に $0.45 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、食後投与では投与6時間後に $0.74 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最高値を示し、以後緩徐に低下した。とくに、投与後4、6および8時間の赤血球中 Tripamide 濃度は食後投与の方が空腹時投与に比べて、有意に高かった。

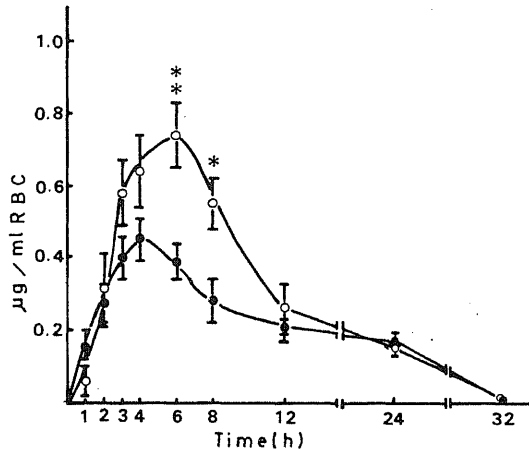


Fig. 5-12. Mean(+S.E.) concentration of tripamide in red blood cells following single oral 15 mg dose of Normonal in tablet to fasted(●) and non-fasted(o) subjects

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

また12時間以後の赤血球中 Tripamide 濃度の見かけ上の消失にはほとんど差は認められなかった。24時間以後の赤血球中 Tripamide 濃度は、高い濃度を示す被験者 T. H と吸収が遅い被験者 T K を除いて、他はすべて検出限界 ($0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$) 以下であった。

各被験者におけるピーク時間、ピークレベルおよび赤血球中 Tripamide 濃度の AUC を Table 5-5 に示した。各被験者における赤血球中 Tripamide 濃度は大部分の例において空腹時投与に比べて、食後投与の方が赤血球中 Tripamide 濃度は高かった。Table 5-5 から明らかなように、ピークレベルも空腹時投与に比べて食後投与の方が有意に高かった。

AUC₀₋₂₄ は空腹時投与 ($5.681 \pm 0.689 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$) て、食後投与 ($7.999 \pm 0.950 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$) の方が有意に大きかった。

Table 5-5. Peak level and calculated area-under-curve(AUC) of tripamide in red blood cells from 10 healthy volunteers following single 15 mg dose of Normonal to fasted and non-fasted

Subjects	Peak RBC level of TDS		AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	Time (h)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
H. S	4	0.51	6.205
	4	0.81	6.105
H. T	4	0.56	7.240
	6	0.91	8.100
T. T	4	0.72	7.620
	3	0.85	7.170
N. M	4	0.68	7.840
	2	0.83	8.240
Y. S	6	0.63	6.825
	3	0.93	7.845
H. H	4	0.12	1.280
	4	0.67	3.215
T. H	3	0.68	7.505
	6	1.35	14.790
M. T	3	0.40	4.250
	6	0.89	7.030
M. M	6	0.28	3.815
	6	0.67	7.055
T. K	3	0.44	4.230
	8	0.79	10.590
Mean±S. E.		0.50±0.06 0.87±0.06**	5.681±0.689 7.999±0.950*

upper; fasted *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$
lower; non-fasted

(2) 食後および空腹時投与における水酸化代謝物の尿中排泄

食後および空腹時にノルモナルを投与した際の水酸化代謝物の尿中排泄率を Table 5-6 に示した。空腹時投与の排泄率 7.3% に比べて、食後投与の排泄率 9.8% の方が有意に高かった。食後および空腹時投与における各時間あたりの尿中排泄量を Table 5-7 に示した。投与後 3～9 時間の尿中排泄量において、空腹時投与に比べて食後投与の方が有意に多かった。

Table 5-6. Individual urinary excretion of hydroxylated metabolites following single oral 15 mg dose of Normonal to fasted and non-fasted

Subjects	After food (%)			Fasting (%)		
	3-OH TDS	8-OH TDS	Total	3-OH TDS	8-OH TDS	Total
H. S	2.8	4.9	7.7	2.3	4.1	6.4
H. T	2.5	5.8	8.3	3.3	4.7	8.0
T. T	0	4.1	4.1	0	3.9	3.9
N. M	4.5	4.4	8.9	5.0	3.3	8.3
Y. S	8.0	5.5	13.5	6.5	3.3	9.8
H. H	6.0	5.1	11.1	3.7	3.8	7.5
T. H	6.3	3.3	9.6	3.1	3.1	6.2
M. T	12.6	3.5	16.1	5.6	3.4	9.0
M. M	3.8	5.6	9.4	2.3	2.6	4.9
T. K	5.9	3.8	9.7	6.4	2.9	9.3
Mean±S.E.	5.2±1.1	4.6±0.3**	9.8±1.0**	3.8±0.7	3.5±0.2	7.3±0.6

**; p<0.01

Table 5-7. Individual urinary excretion of hydroxylated metabolites versus time following single oral 15 mg dose of Normonal to fasted and non-fasted

Subjects	0 - 3	3 - 6	6 - 9	9 - 12	12 - 24	24 - 48	48 - 72 h
H. S	13.90 11.04	33.37 77.71	19.36 71.39	53.72 42.65	146.86 111.91	97.45 122.77	0 0
H. T	39.91 0	35.82 74.22	97.27 99.31	31.49 116.98	149.07 185.07	110.89 0	0 0
T. T	22.37 43.42	49.67 69.54	42.30 73.34	24.49 47.94	82.62 0	0 0	0 0
N. M	44.38 40.42	53.65 90.94	43.08 80.01	48.78 71.01	119.37 115.85	164.60 108.13	0 0
Y. S	29.45 13.87	71.12 60.48	79.86 178.41	71.34 83.24	161.90 229.62	143.53 164.57	0 35.91
H. H	0 9.44	38.49 131.20	34.54 113.89	38.83 96.32	89.27 140.18	226.92 143.82	0 0
T. H	0 8.18	27.96 54.05	38.43 63.77	39.32 36.12	133.08 76.33	112.37 85.37	0 222.68
M. T	22.12 6.09	63.18 83.04	83.92 85.53	133.54 128.74	107.59 182.94	99.69 137.92	0 292.98
M. M	0 14.87	36.63 68.04	0 78.52	8.07 110.53	149.68 124.24	83.32 139.56	0 0
T. K	0 0	37.65 0	51.91 60.02	38.54 48.32	166.27 294.54	232.51 409.60	0 0
Mean±S.E.	17.21 ±5.43	44.75 ±4.45	49.07 ±9.54	48.81 ±10.83	130.57 ±9.37	127.13 ±21.84	
	14.75 ±4.80	70.92 ±10.37*	90.42 ±11.82**	78.19 ±10.72*	146.07 ±25.97	131.19 ±35.91	

upper; fasted *; p<0.05, **; p<0.01
lower; non-fasted

4-2 単回投与時の Tripamide の血中動態と電解質排泄

健康男子3名を対象に、ノルモナル 15mg, 45mg, 90mgを投与し、その薬動学的性質を明らかにし、同時に血圧、脈拍、尿量および電解質排泄の変化を測定し健康人におけるノルモナルの薬理作用と薬物動態との関係を検討した。

実験方法

健康男子3名(年齢:36, 42, 47才, 体重:62.0, 62.5, 65.7kg)を対象とした。被験者は、所定の標準的朝食(和食)をとった後、1時間後にノルモナルを約100mlの水とともに服用した。ノルモナルは、15mg(1錠)、45mg(15mg錠3錠)、90mg(15mg錠6錠)を投与量順に2週間毎に投与した。本試験に先立ち、予試験として空腹時投与後の血中濃度を検討したが、食後投与の方が高い最高血中濃度が得られたので、本試験では食後1時間投与とした。

いずれの場合も、被験者は試験日前日の夕食後から試験期間中はアルコール類およびコーヒー、茶、コーラ、チョコレート等カフェイン類を含む飲食物は摂取しなかった。

1. 検査項目、検査方法および検査スケジュール

臨床検査は、坐位および仰臥位の血圧および脈拍を Sphygmomanometer (Kenz 45s, 松下産業機器)により測定した。

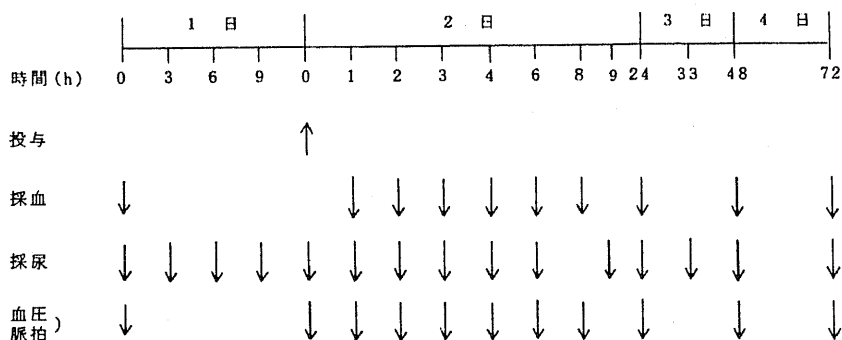
臨床化学検査では、電解質 (Na, K, Cl, Ca) [Na および K; 炎光光度計 (日立205型, 日立製), Cl; 電極法-クロライドメーター (常光産業製), Ca; O. C. P. C法 (色素法)] 尿素窒素 [酵素法-クリナライザー (日本電子製)] および尿酸 (Uricase 分解による比色法)を測定した。

試験スケジュールを下記に示した。

血圧および脈拍の測定、採血、分別蓄尿は下記のスケジュールにしたがって実施した。

血液は、10mlを採血後、3mlを、あらかじめ硝酸処理した試験管にとり、室温に約1時間放置した後、3,000r. p. m で20分間遠心分離後、得られた血清を臨床化学検査項目の測定に

試験スケジュール



用いた。残りの 7 ml はヘパリン処理試験管に取り、3,000 r. p. m で10分間遠心分離を行ない、血漿および赤血球部分に分離し、Tripamide の濃度を測定した。

2. Tripamide および代謝物 (CSBA, 3-hydroxy および 8-hydroxy-tripamide) の定量

生体試料中の定量は、第5編第2章に準じて行なった。

3. 薬動学的解析

薬動学的パラメーター中の、Ka, Kel, $t_{1/2}$ は、実測値を薬物動態解析プログラムNONLIN 2^{128,129)}を用いて、最適コンパートメント・モデルの選択を含めて電算処理によって求めた。電算機は、IBM System 370 Model 158を使用した。

AUC は、薬物動態解析プログラムNONLIN 2によって求められたワン・コンパートメント・モデルの理論式から trapezoidal rule を用いたプログラムによって Olivetti P6060 で算出した。

実験結果

1. ノルモナル投与後の血漿中 Tripamide 濃度

各投与量における血漿中 Tripamide 濃度を Table 5-8 に示した。

Table 5-8. Serum concentration after oral administration of Normonal to three healthy volunteers

Time (hr)	Dose	15mg			45mg			90mg		
		T.I.*	A.K	T.K*	T.I	A.K	T.K	T.I	A.K	T.K
1			n.d.		n.d.	n.d.		22.2	26.0	18.5
2			21.2		n.d.	n.d.		124.5	111.5	67.7
3			30.5		30.5	16.2	42.8	107.0	111.0	91.3
4			24.5		n.d.	n.d.	20.2	130.2	139.2	83.5
6			n.d.		n.d.	18.5	22.5	73.0	56.7	17.3
8			n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	92.7	33.7	29.2
24			n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

表から明らかなように、15mg, 45mg 投与時の血漿中濃度は、ほとんどが16ng/ml の検出限界以下であるのに対し、90mg 投与時は、投与3～4時間後に最高血漿中濃度を示し、その時の濃度は117.6±17.3 ng/ml と15mg, 45mg 投与時に比べ高い濃度を示した。

2. ノルモナル投与後の赤血球中 Tripamide 濃度

各投与量における赤血球中 Tripamide 濃度推移を Fig.5-13 に示した。

いずれの投与量においても投与後3～4時間にピークに達し、その時の濃度は15mg で0.96 μg/ml, 90mg では4.98 μg/ml であり、72時間後では、赤血球中に Tripamide は検出されな

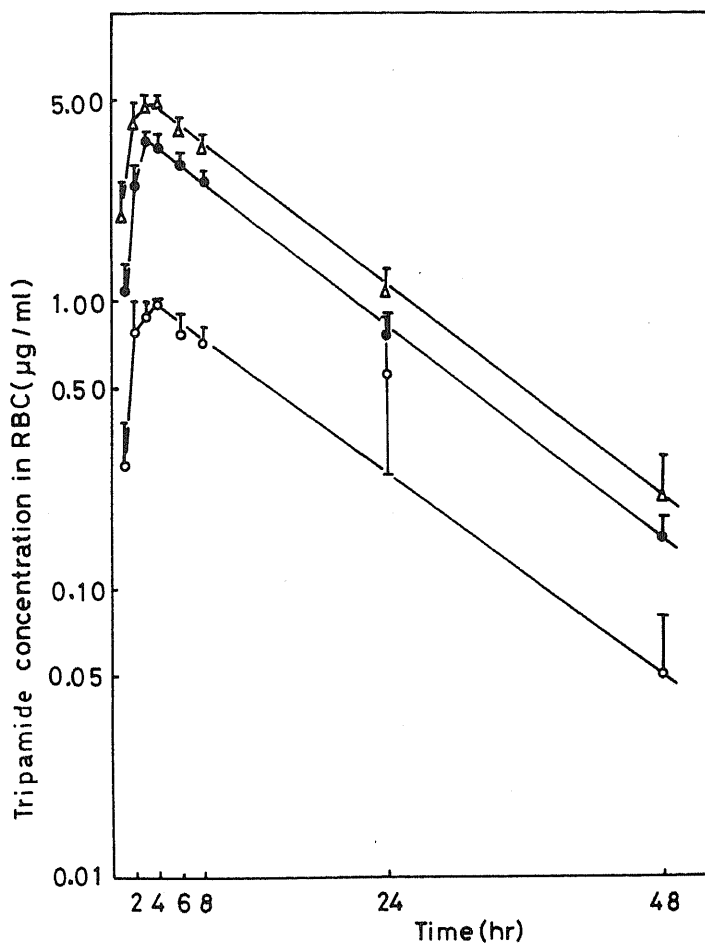


Fig. 5-13. Mean(+S.E.) tripamide concentration in red blood cells after oral administration of Normonal (15(O), 45(●) and 90(Δ) mg)

った。

Tripamide 赤血球中濃度は血漿中濃度に比べて著しく高く、血中 Tripamide の 95~98% が赤血球中に存在していた。

また、ノルモナル 90 mg 投与時の Tripamide 血漿中濃度と赤血球中濃度のピーク時は一致していた。

3. 薬動学的パラメーター

赤血球中 Tripamide 濃度の実測値は one compartment model によって解析を行ない、得ら

れた薬動学的パラメーターを Table 5-9 に示した。

Table 5-9. Pharmacokinetic constant obtained after oral administration of various doses of Normonal to three subjects

Subject	Body weight	Dose (mg)	Cmax $\mu\text{g/ml}$	Tmax hr	Ka hr^{-1}	Ke1 hr^{-1}	$t_{1/2}$ hr	AUC (0-24h) $\mu\text{g/ml/hr}$	AUC (0-48h) $\mu\text{g/ml/hr}$	AUC (0- ∞) $\mu\text{g/ml/hr}$
T. I.	65.7	15	0.85	3.50	0.850	0.0521	13.30	13.58	17.85	19.57
		45	3.88	2.76	1.000	0.0782	8.86	51.35	60.05	61.64
		90	5.61	1.40	2.713	0.0658	10.53	73.64	89.35	93.48
A. K.	62.0	15	0.87	1.96	1.457	0.102	6.80	9.43	10.32	10.40
		45	2.92	2.54	0.946	0.114	6.08	31.67	34.04	34.22
		90	4.37	1.99	1.411	0.105	6.60	46.84	50.96	51.34
T. K.	62.5	15	0.98	6.73	0.265	0.0726	9.55	16.68	21.05	22.01
		45	3.04	3.39	0.876	0.0539	12.86	47.93	62.34	67.82
		90	4.55	3.19	0.891	0.0639	10.85	66.85	82.78	87.21

消失半減期は15mg投与で 9.88 ± 1.88 時間（平均値 \pm S. E.）、45mg投与で 9.27 ± 1.97 時間、90mg投与では 9.33 ± 1.37 時間であった。一方、被験別では、T. I. で 10.90 ± 1.29 時間、A. K. で 6.49 ± 0.22 時間、T. K. で 11.09 ± 0.96 時間であり、投与量の違いによる排泄速度定数に差異が認められなかったが個体別には差異が認められた。

最高赤血球中濃度（Cmax）は15mgで $0.85 \sim 0.98 \mu\text{g/ml}$ 、45mgで $2.92 \sim 3.88 \mu\text{g/ml}$ 、90mgでは $4.37 \sim 5.61 \mu\text{g/ml}$ を示し、15mgと45mg投与間では dose dependent に増加しているが、45mgと90mg投与間においては dose dependent な増加は認められなかった。同様なことがAUCにも認められた。

4. ノルモナル90mg 投与時における血漿および赤血球中の Tripamide およびCSBAの濃度

ノルモナル90mgを健康男子1名に空腹時投与した際の血漿および赤血球中の Tripamide およびCSBAの濃度推移を Fig.5-14 に示した。

Tripamideの最高赤血球中濃度は、投与2時間後に $4.81 \mu\text{g/ml}$ を示し、CSBAのそれは、投与4時間後に $0.057 \mu\text{g/ml}$ を示した。

一方、Tripamideの最高血漿中濃度は、投与8時間後に $0.086 \mu\text{g/ml}$ を示し、CSBAのそれは、投与4時間後に $0.028 \mu\text{g/ml}$ を示した。

以上のことから、ノルモナル90mgを空腹時に投与した際のヒト血中CSBA濃度は、血中 Tripamide 濃度の1.8~2.5%と極めて低かった。

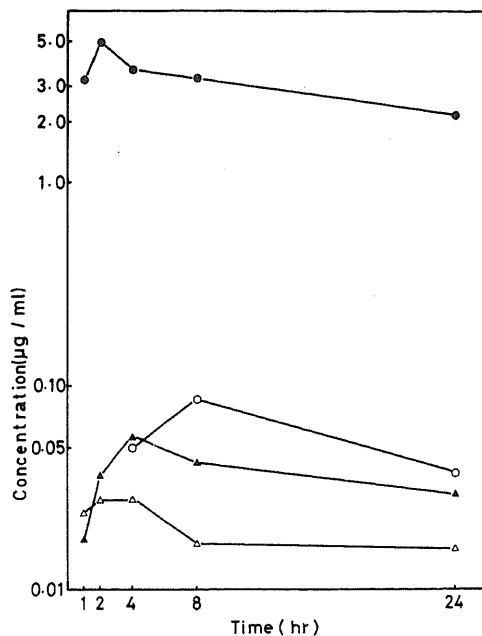


Fig. 5-14. Tripamide and 3-chloro-4-sulfamoylbenzoic acid (CSBA) concentration in plasma and red blood cells after oral administration of Normonal (90 mg)

- ; tripamide level in red blood cells
- ; tripamide level in plasma
- ▲; CSBA level in red blood cells
- △; CSBA level in plasma

5. ノルモナル投与後の Tripamide の尿中排泄

各人の各投与量に対する累積排泄率と排泄速度を Table 5-10 に示した。

Tripamide の尿中排泄率は、15mg 投与で 2.5~3.5%，45mg 投与で 0.8~1.6%，90mg 投与では 0.6~0.9% であり、投与量の増加に従って排泄率は低下した。また、いずれの投与量でも 4~6 時間後に最大の排泄があった。

投与量毎の排泄速度定数は変化が認められず、その排泄半減期は、平均 9 時間であった。

6. ノルモナル投与後の Tripamide 代謝物の尿中排泄

ノルモナル 90mg 投与時における 3-hydroxy および 8-hydroxy-tripamide の尿中排泄率を Table 5-11 に示した。

各人の 3-hydroxy と 8-hydroxy-tripamide の排泄比率が 0.37, 1.11, 1.68 の値を示し、Tripamide の水酸化を受ける位置に個体差が認められたが、水酸化代謝物の排泄率は 8.1~11.8% であり、個体差は認められなかった。また未変化体に比べて、約 10 倍多く排泄され、水酸化代謝物はヒト尿中主代謝物の 1 つと考えられる。

Table 5-10. Urinary excretion and renal clearance of tripamide after various dose of Normonal

Subject	Dose (mg)	Excretion (μg)	(%)	K (hr ⁻¹)	t _{1/2} (hr)
T.I	15	404	2.7	0.069	10.0
	45	728	1.6	0.050	13.9
	90	749	0.8	0.063	11.0
A.K	15	525	3.5	0.099	7.0
	45	368	0.8	0.102	6.8
	90	557	0.6	0.092	7.5
T.K	15	377	2.5	0.081	8.6
	45	537	1.2	0.068	10.2
	90	813	0.9	0.086	8.1

TABLE 5-11

RENAL EXCRETION OF THE HYDROXYLATED METABOLITES IN HUMANS

Subject	Metabolite	Excretion			
		mg in 72 h	%	Total (%)	<u>3-Hydroxy</u> 8-Hydroxy
T. I.	3-Hydroxytripamide	1.95	2.2	8.1	0.37
	8-Hydroxytripamide	5.29	5.9		
A. K.	3-Hydroxytripamide	6.21	6.9	11.0	1.68
	8-Hydroxytripamide	3.70	4.1		
T. K.	3-Hydroxytripamide	5.62	6.2	11.8	1.11
	8-Hydroxytripamide	5.05	5.6		

7. 血圧および脈拍の推移

ノルモナルを15mg, 45mg, 90mgを投与した際の血圧および脈拍数をFig.5-15に示した。図から明らかなように、いずれの投与量において、座位、仰臥位ともに著明な降圧効果および脈拍数の変動は認められなかった。

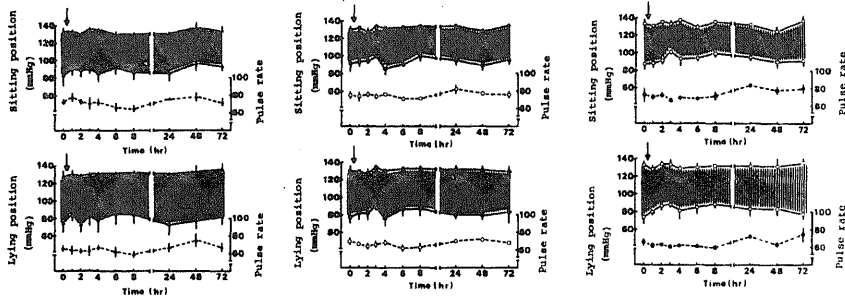


Fig. 5-15. Blood pressure lying and sitting after oral administration of Normonal(15(Δ), 45(\circ) and 90(\bullet) mg)

8. ノルモナル投与後の尿量

ノルモナルを15mg, 45mg, 90mg投与時における尿量の変動を Fig. 5-16 に示した。単位時間あたりの尿量は、いずれの投与量において投与後2時間から増加し、4時間まで投与量に応じて増加した。24~33時間後に投与前値に回復した。

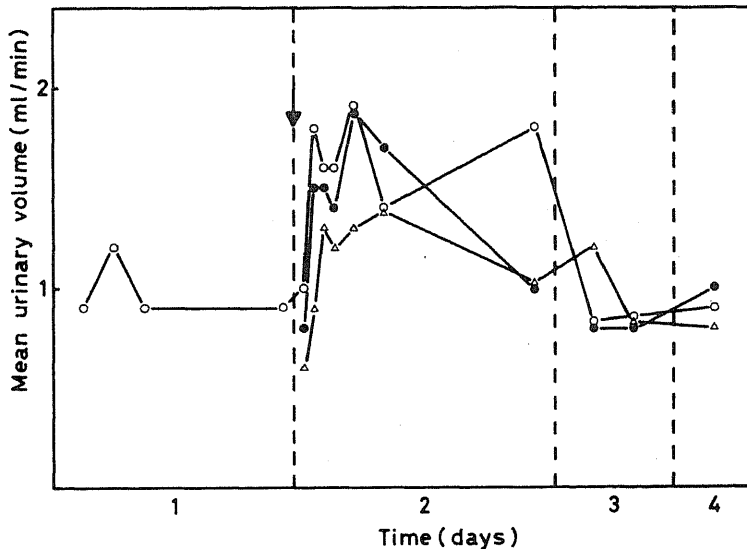


Fig. 5-16. Mean urinary flow after oral administration of Normonal(15(Δ), 45(\bullet) and 90(\circ) mg)

9. ノルモナル投与後の単位時間あたりの電解質排泄

ノルモナル 15mg 投与時における血清および尿中の Na, Cl, K, Ca の量を Fig.5-17 に示した。

各電解質の尿中排泄量はいずれも有意な増加は認められなかった。

血清 Na および Cl 値は有意に増加したが、血清 K 値には変動が認められなかった。

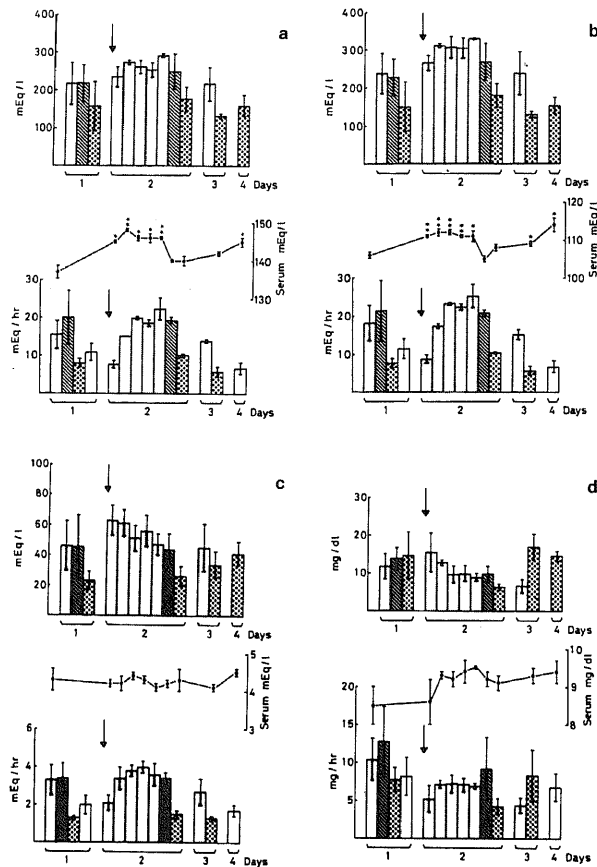


Fig. 5-17. Mean(+S.E.) urinary(□) and plasma(○) level of Na^+ (a) Cl^- (b), K^+ and Ca^{++} (d) after oral administration of Normonal(15 mg) *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

つぎにノルモナルを45mg投与時における血清中および尿中の各電解質を Table 5-18に示した。尿中のNaとClの排泄量は投与後2時間から増加し、4～6時間の排泄が最も高かった。このことは、Tripamideの尿中排泄が4～6時間に多いことと一致していた。しかし、K排泄の増加に一定の傾向は認められなかった。

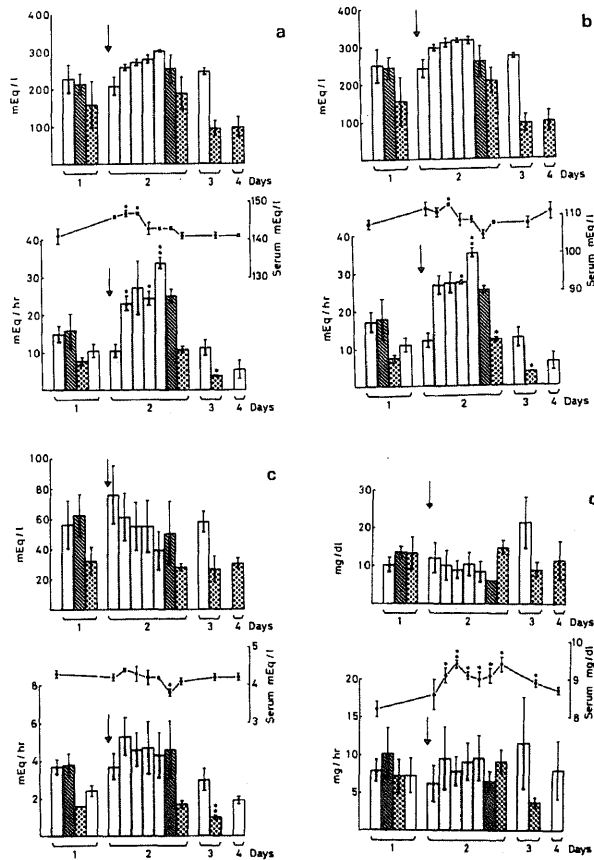


Fig. 5-18. Mean(+S.E.) urinary(□) and plasma(○) level of Na⁺(a) Cl⁻(b), K⁺ and Ca⁺⁺(d) after oral administration of Normonal(45 mg) *; p<0.05, **; p<0.01

また血清 Na 値は投与 2~3 時間後に、Cl 値は 3 時間後に上昇した。K 値は 8 時間後だけに低下していたが、その他はほとんど変動しなかった。また、血清 Ca 値は有意に上昇した。尿中 Ca 排泄量には変化がなかった。

つぎにノルモナルの 90mg 投与時における血清中および尿中各電解排泄を Fig. 5-19 に示した。尿中の Na と Cl の排泄量は、45mg 投与時と同様に増加した。K の排泄量は、15mg、45mg 投与に比べ増加傾向を示していたが有意ではなかった。

血清 Na および Cl 値は、いずれも上昇した。血清 K 値は、2 時間後に上昇が認められたが他は変動がなかった。血清 Ca 値の上昇が認められるが、尿中 Ca 排泄量は変動がなかった。

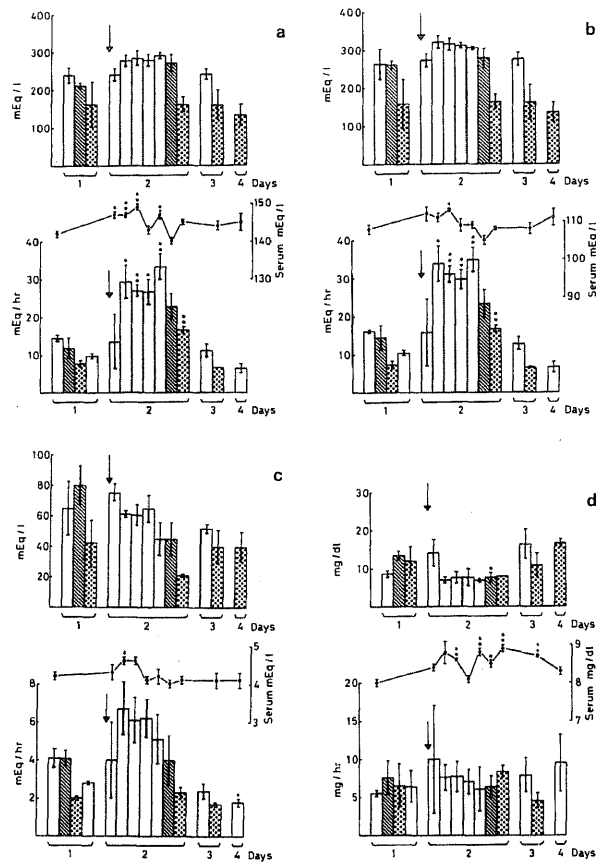


Fig. 5-19. Mean(+S.E.) urinary(\square) and plasma(\circ) level of Na^+ (a) Cl^- (b), K^+ and Ca^{++} (d) after oral administration of Normonal (90 mg)

4-3 連続投与時の Tripamide の血中動態

慢性疾患の治療に当って薬物は、くり返し投与されるのが一般的であるが、単独投与後の薬物動態理論が直ちにそのまま応用できるとは限らない。特に連続投与によって薬物動態パラメーターに影響を与える因子として肝への取り込みや肝薬物代謝酵素活性の変動等による初回通過効果の変化が考えられる。ラットに Tripamide $200\text{mg}/\text{kg}$ を5日間連続投与した際に、肝薬物代謝酵素活性が上昇することが明らかにされており、さらに ^{14}C -Tripamide 5mg をラットに7日間連続投与した場合、尿中および糞中水酸化代謝物の排泄率が増加した。

そこで健康人3名にノルモナル 30mg をくり返し投与し、血中薬物動態および尿中未変化体、水酸化代謝物の排泄率を検討した。

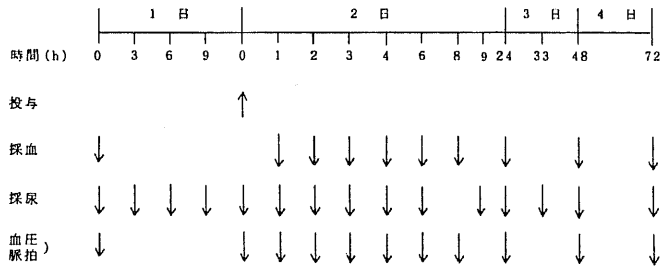
試験方法

健康男子3名（年齢34才，43才，48才；体重64，76，66kg）は毎日午前8時に所定の標準的朝食（ただし，投与後5，6日目は自宅で朝食）をとった後，1時間後にノルモナル30mgを約100mlの水と一緒に服用した。ノルモナルの臨床試験においては毎食後午前9時15mg，さらに4時間後15mg，1日量30mgとされているが，ノルモナルの電解質排泄に対する効果は，15～90mg投与の範囲内ではAUCによく相関していること，シュミレーションの結果から1日2回を1日1回に投与した際にも，AUCの違いはみとめられなかったので本試験では，1日1回30mg投与した。被験者は前日の夕食後から試験期間中はアルコール類およびコーヒー，茶，コーラ，チョコレート等カフェイン類を含む飲食物は摂取しなかった。

試験スケジュールは下記に示す通りである。

血液は，10mlを採血後，3mlをあらかじめ硝酸処理した試験管にとり，室温に約1時間放置後，3000 r. p. m. で20分間遠心分離後得られた血清を臨床検査項目の測定に用いた。残り7mlはヘパリン処理試験管に取り，3000 r. p. m. で10分間遠心分離し，血漿および赤血球部分に分け，Tripamideの測定用とした。

試験スケジュール



1. Tripamide および水酸化代謝物（3-hydroxy および8-hydroxy-tripamide）の定量

血漿，赤血球および尿中 Tripamide の定量，尿中 3-hydroxy および 8-hydroxy-tripamide の定量は第5編第2章に準じて行なった。

2. 薬動力学的解析

4-2 で得られた薬物動態パラメーターを用いて，連続投与時の採血点を決定した。連続投与時の初回投与の実測値から各自の排泄速度定数を求め，連続投与時の血中濃度推移のシュミレーションを行ない，実測値を併せてプロットした。

結 果

1. ノルモナル連続投与時の血中薬物動態

(1) 赤血球中 Tripamide 濃度推移

健康男子3名にノルモナル30mgを1日1回投与した際の赤血球中 Tripamide 濃度推移を Fig.5-20 に示した。

いずれも3日目までは徐々に赤血球中濃度は上昇し，3回後の服用で最高赤血球濃度

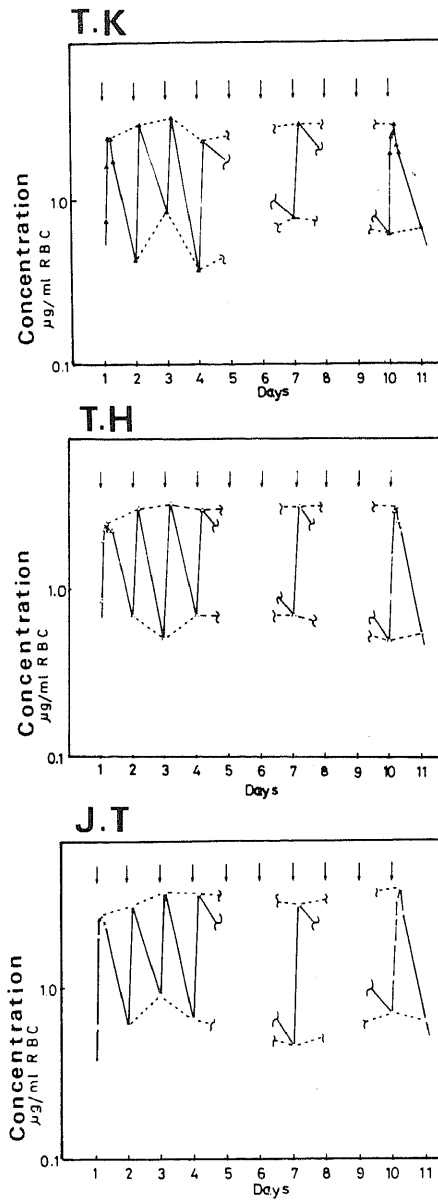


Fig. 5-20. Tripamide concentration in red blood cells following repeated administration

3.30 ± 0.15 µg/ml に達し、以後一定値を示した。

さらに各人の初回投与時から推測した赤血球中濃度推移と実測値を Fig. 5-21 に示した。図から明らかなように各人の実測値は推測赤血球中濃度推移によく一致していた。

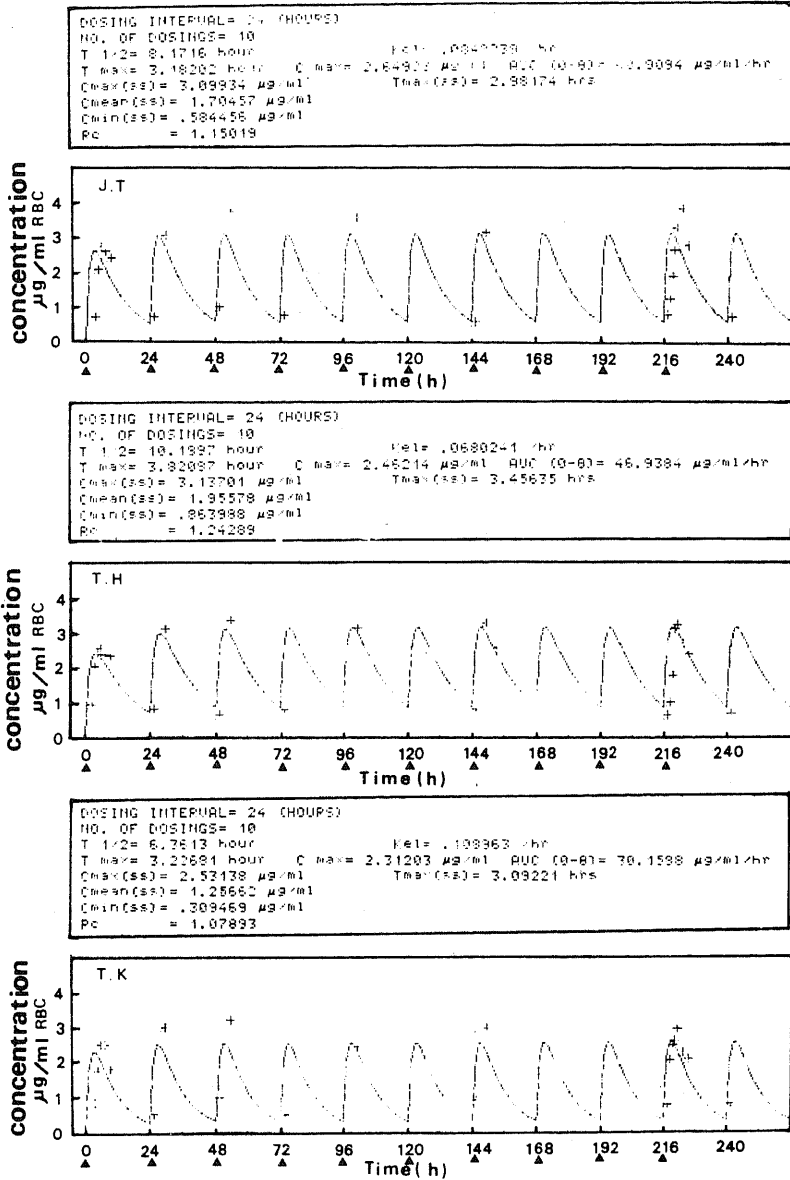


Fig. 5-21. Simulated red blood cells level versus time curves from single dose and repeated administration

(2) Tripamide 血漿中濃度推移

健康男子 3 名 (T. K, T. H, J. T) にノルモナル30mg を 1 日 1 回投与した際に血漿中濃度が測定され得た 2 名 (T. K, T. H) の血漿中濃度推移を Fig.5-22 に示した。

投与 4 時間後の血漿中濃度推移は投与 3 回後に最高血漿中濃度 (約21ng/ml) を示し、以後一定値を示した。

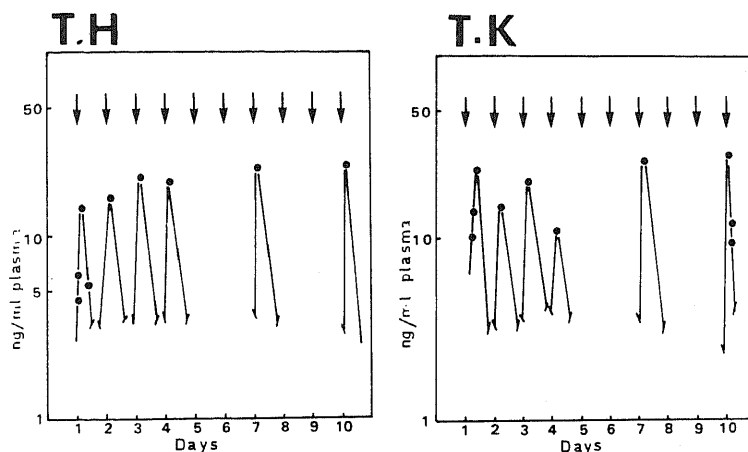


Fig. 5-22. Plasma concentration of tripamide following repeated administration

2. ノルモナル連続投与時の Tripamide および水酸化代謝物の尿中排泄

ノルモナル (30mg) 連続投与時の各人の各投与24時間後の Tripamide および水酸化代謝物の尿中排泄率を Table 5-12 に示した。

Table 5-12 Excretion of tripamide and hydroxylated metabolites following repeated administration

Subjects	Metabolites	Repetitions(days)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T.K	Tripamide	1.6	1.8	1.9	1.4	2.1	1.8	1.8	2.0	2.1	2.0
	3-Hydroxy-tripamide	17	22	23	24	24	22	22	22	23	23
	8-Hydroxy-tripamide	10	14	16	17	17	16	16	17	19	18
	Total	28.6	37.8	40.9	42.4	43.1	39.8	39.8	41.0	44.1	43.0
J.T	Tripamide	1.4	1.4	1.4	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
	3-Hydroxy-tripamide	17	20	22	20	21	21	22	22	22	22
	8-Hydroxy-tripamide	12	13	14	13	14	14	14	15	15	15
	Total	30.4	34.4	37.4	34.1	36.1	36.1	37.1	38.1	38.1	38.1
T.H	Tripamide	1.0	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.7	1.7	1.7
	3-Hydroxy-tripamide	11	13	15	15	15	16	16	16	16	16
	8-Hydroxy-tripamide	11	12	13	14	14	15	15	16	16	16
	Total	23.0	26.4	29.4	30.5	30.5	32.5	32.5	33.7	33.7	33.7

10日間の各人の未変化体の尿中排泄率は、T. K 1.6～2.0%、J. T 1.4～1.0%、T. H 1.0～1.7%の範囲内で変動した。T. K、T. H の2名でくり返し投与により排泄率の増加を示し、J. T 1名は逆に減少した。各人とも各投与後の排泄量は連続投与4～6日後に一過性に減少する傾向があった。

10日間の各人の水酸化代謝物 3-hydroxy-tripamide の尿中排泄率は T. K 17～25%、J. T 17～23%、T. H 11～17%、8-hydroxy-tripamide は T. K 10～20%、J. T 12～16%、T. H 11～16%で、いずれもくり返し投与により排泄率は増加した。

10日間の各人の排泄率は T. K 27～45%、J. T 29～39%、T. H 22～33%であり、最終投与後は約33～45%の水酸化代謝物が尿中に排泄された。未変化体の尿中排泄率2%と合せると、投与量の約35～47%が尿中に回収された。

第5章 考 察

^{14}C -Tripamide をラットに投与した際の血中放射能は約90%以上が赤血球中に存在していた。さらに *in vitro* における Tripamide の赤血球中移行実験でも、Tripamide はすみやかに赤血球に移行し、その約90%が赤血球中に存在していた。ヒト赤血球移行速度は、ラットに比べて遅かった。

赤血球に移行した Tripamide および代謝物は、赤血球を等張 buffer に懸濁することにより、直ちに放出されるが、Medium / 赤血球の比は常に約 2 / 8 であることから、Tripamide および代謝物は赤血球中では高分子成分と結合しているものと推定される。実際に、Tripamide と赤血球内漿および赤血球膜との結合を検討したところ、Tripamide は赤血球内漿と結合することが明らかとなった。

Serotonin や p-Nitroaniline はすみやかに赤血球に移行し、赤血球膜とは結合せず、赤血球内漿と結合すると報告されている。¹³⁰⁾

Tripamide もこれらの物質と同様に赤血球膜透過性が高く、赤血球内漿との親和性が高いものと考えられる。またこの結合は容易に離れることから共有結合のような強い結合ではなく、比較的弱い結合と考えられる。血中のほとんどの Tripamide が赤血球中に存在していることは、Tripamide の赤血球膜透過性が高く、赤血球内漿と結合することにより赤血球内保持性が高いことによるものと推察される。

ヒトにノルモナルを投与した際の血漿中 Tripamide レベルは極めて低く、特に 15mg の投与量ではほとんど検出限界以下であった。ヒトにおいてもラットと同様に Tripamide は血中では 94~96% が赤血球に存在していた。Tripamide の血漿中濃度と赤血球濃度の関係を検討すると (Fig.5-23), Tripamide の赤血球中濃度が約 3~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の時には、血漿中濃度は検出限界以上あるいは付近である。一方、赤血球中濃度が約 3~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、Tripamide の赤血球中濃度に比例して血漿中濃度が上昇することを示している。さらに、個人別に血漿中濃度と赤血球中濃度の関係を検討すると (Fig.5-24), 4名で赤血球中濃度が約 3~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上に上昇すると、血漿中濃度もそれに比例して上昇することが認められたが、1名 (J. T) においては赤血球中濃度が 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上高くなっても血漿中濃度が上昇することはなかった。

以上のごとく、Tripamide 赤血球中濃度が約 3~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上になると血漿中に Tripamide が上昇するという見かけ上の飽和現象は、赤血球内漿蛋白と Tripamide との結合に飽和が起り、遊離 Tripamide は速やかに血漿中に移行するためと考えられる。同様な結果が Chlorthalidone についても報告されている。¹³¹⁾ Chlorthalidone の場合は血中濃度が 15~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で赤血球中濃度の飽和現象が観察されている。^{132, 133)}

サイアザイド系降圧利尿薬の活性中心はスルホンアミド基と考えられている。スルホンアミド基のイオウ原子の 3d π 電子の働きによって金属とキレート能を有し、電子受容能もあると考えられている^{134, 135)}。一方サイアザイド降圧利尿薬の金属イオン (Cu^{++}) とのキレート能は Zn^{++} を Cofactor にもつ carbonic anhydrase の阻害効果と平行していることが報告されている。¹³⁶⁾ 実際 Acetazolamide は carbonic anhydrase を強く阻害するし、Chlorthalidone は carbonic anhydrase に強い親和性を示し、¹³³⁾ Acetazolamide と競合することが報告さ

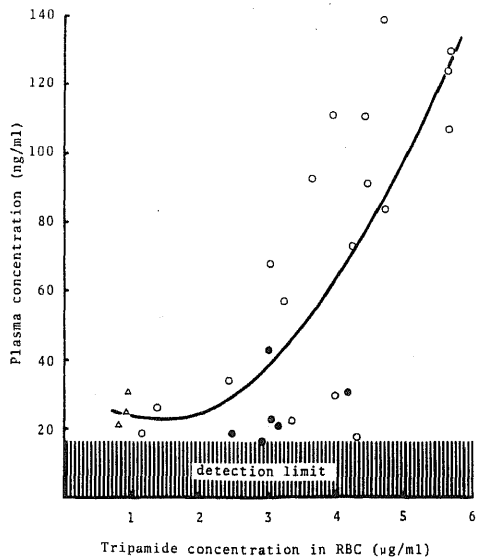


Fig. 5-23 Relationship between plasma concentration and red blood cells concentration of tripamide in three subjects who were receiving a dose of 15(Δ), 45(\bullet) and 90(O) mg

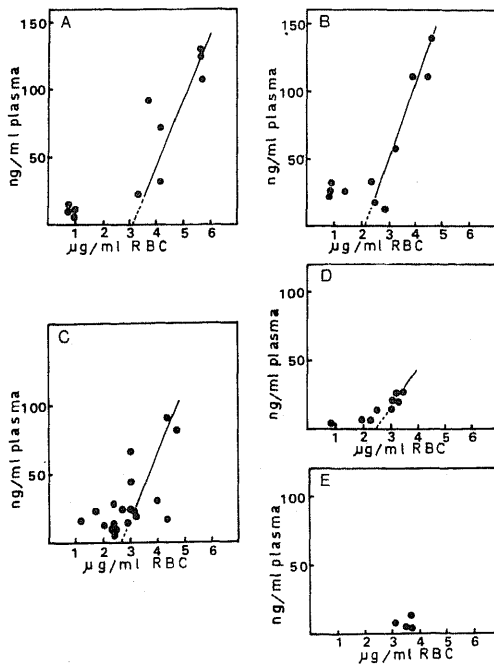


Fig. 5-24. Relationship between plasma concentration and red blood cells concentration of tripamide in individual subject

れている¹³⁷⁾ carbonic anhydrase は赤血球中に存在していることが知られているので、これらスルホンアシド基を有する降圧利尿薬の赤血球内漿蛋白への結合には carbonic anhydrase への結合が示唆される。Tripamide の carbonic anhydrase 阻害作用は Acetazolamide の約1/2、Hydrochlorothiazide の約23倍と報告されている。¹³⁸⁾

また carbonic anhydrase の阻害効果と Na⁺ の cerebrospinal fluid への取り込みとの間に関連があることが報告されている。¹³⁹⁾

スルホンアミド系降圧利尿薬で赤血球中濃度が血漿中濃度に比べて著しく高い薬物として Metlazon¹⁴⁰⁾、Mefruside¹⁴¹⁾ が知られており、Bumetamide は赤血球と結合しないと報告されている。¹⁴²⁾

生体試料中の Tripamide も他のスルホンアミド系薬物と同様に HPLC を用いて、簡単にしかも精度良く定量できることが判った。Tripamide と類似の構造を有する Indapamide¹⁴³⁾ は蛍光定量法が報告されているが、本法による Tripamide の定量法と同程度の検出限界と推定される。

さらに本法は Tripamide の代謝物も同様に定量できることが判った。

そこで薬物動態と薬効との関連を検討した。

正常血圧の範囲にある健康男子10名に1日用量15mgのノルモナル錠を空腹時(前日の夕食後から15時間絶食)および食後1時間後に投与した際の赤血球中 Tripamide 濃度および尿中水酸化代謝物の排泄について比較した。

投与後6および8時間後における赤血球中 Tripamide の AUC も同様に食後投与の方が有意に大きかった。しかし、12時間以後の見かけ上の消失には空腹時および食後投与にはほとんど差は認められなかった。

一方水酸化代謝物の尿中排泄率についてみると、尿中排泄率は空腹時投与に比べて食後投与の方が有意に増加し、赤血球中 Tripamide 濃度の AUC に良く対応していた。また尿中排泄量も赤血球中 Tripamide 濃度が有意に高い投与後4~8時間に対応して、空腹時投与に比べて食後投与の方が有意に増加することが明らかとなった。赤血球中 AUC は食後投与の方が有意に大きく、明らかにノルモナルは食事によって吸収が向上したことを示している。このことは食後投与における水酸化代謝物の尿中排泄率が空腹時投与に比べて増加したことから示された。

薬物の Bioavailability に及ぼす食事の効果については多くの報告があり、一般的には、吸収に対して遅延、低下または向上などの例が知られている。食事により Bioavailability が増加する例として、Propranolol および Metoprolol (肝での代謝および初回通過効果の減少)、Canrenone および Spironolactone (代謝および gastric emptying の遅延、胆汁酸の分泌の増加)、Hydrochlorothiazide¹⁴⁴⁾ (gastric emptying の遅延)、Hydralazine (腸管内での分解の抑制) 等が知られているが、ノルモナルが食後投与により吸収率が増加することの詳細については明らかではない。

スルホンアミド系降圧利尿薬の中で、Furosemide は¹⁴⁵⁾ 食事により吸収が遅延し、Bendroflumethiazide¹⁴⁶⁾ は影響を受けず、Hydrochlorothiazide¹⁴⁴⁾ は増加する。

正常血圧の範囲にある健康人3例に、ノルモナル15mg, 45mg, 90mg を1回投与した際には、ノルモナル投与による血圧および脈拍数に対する影響は認められなかった。このことは、前臨床試験において、正常血圧ラットに対しては降圧作用を示さなかった⁷⁾と報告され

ている。

尿中の Na, Cl, K の排泄量と赤血球中 Tripamide 濃度から求めた AUC (O-24 hr) (Table 5-9) との関係について検討したものを Fig.5-25 に示す。

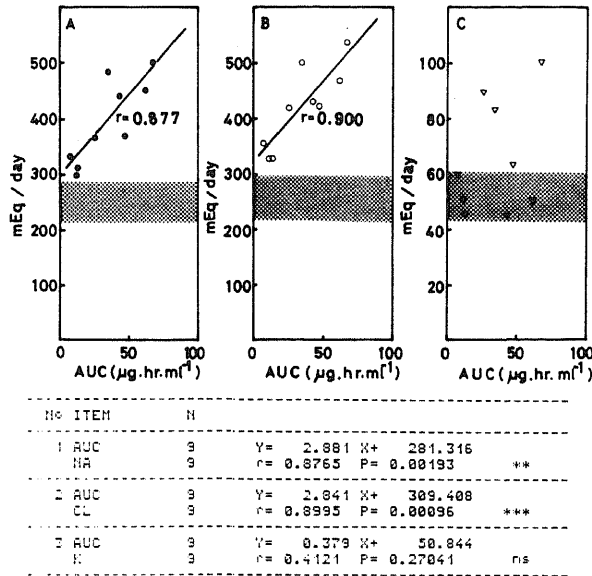


Fig. 5-25 Relationship between urinary of Na^+ , Cl^- and K^+ , and area-under-curve ($\text{AUC}_{0-24\text{h}}$)

Fig.5-25に示すように、尿中 Na, Cl の排泄量は投与量の増加に伴う赤血球中 AUC の増大と良く相関したが、尿中 K 排泄量は一定の傾向が認められなかった。

Na および Cl の尿中排泄量は Tripamide の赤血球中 AUC (O-24h) と高い相関性を示し、Na, Cl の排泄パターンも Tripamide 赤血球中濃度の時間的推移と良く一致した。このことから Tripamide 赤血球中濃度推移は作用部位での薬物濃度推移を反映しているものと推測される。一方尿中 K 排泄は AUC との間に相関性は認められなかった。

Hydrochlorothiazide に関して血漿中 AUC と電解質排泄とは相関しないと報告されており、¹⁴⁷⁾ Bendroflumethiazide も同様に、血漿レベルと利尿活性は相関しないし、¹⁴⁸⁾ 降圧効果とも ¹⁴⁹⁾ 相関性は認められなかった。Furosemide の場合は血漿レベルとは相関しないが、尿中 Furosemide の排泄と利尿活性は相関していた。¹²⁰⁾ Tripamide の場合は赤血球中 AUC と尿中 Tripamide の排泄および水酸化代謝物の排泄ともいずれも尿中電解質排泄とに相関性が認められた。このことは赤血球膜透過性が良く、かつ赤血球内漿蛋白(おそらく carbonic anhydrase) への親和性が高いことと、標的臓器である腎への移行と作用とに関連があるものと推察される。Ethacrynic acid や Furosemide は腎の尿細管(主としてヘンレの上行脚)で Na^+

の再吸収を抑制することによって利尿作用を発揮するものとされており、その Na^+ 再吸収抑制は $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 阻害作用に基づくものと説明されている。^{150, 151)} Tripamideの本酵素に対する阻害作用は $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 濃度ではEthacrynic acidより強力であった。¹³⁸⁾ また老令SHRを用いてのTripamideの血中濃度と降圧作用との相関性を検討した結果、降圧作用の時間的推移と血中Tripamide濃度の推移は良く一致していた。代謝物CSBA, CSBMおよびATDについては降圧作用はまったく認められない⁴⁷⁾ ことから、Tripamideの降圧効果はTripamideそのものと推察される。

未変化体Tripamideの尿中排泄は、動物(ラットおよびウサギ)では、投与量の0.2%であったのに対して、ヒトでは0.6~3.5%であった。このことは、ヒトにおいても、投与されたTripamideは大部分が代謝される。しかし未変化体Tripamideのヒト赤血球中消失半減期は、約8時間であり、ラット血中消失半減期1.15時間に比べて著しく遅いことから、ヒトでの代謝は動物に比べて著しく遅いものと考えられる。

動物(ラットおよびウサギ)にTripamideを投与すると尿中には、主としてCSBAが排泄され、水酸化代謝物の排泄は、投与量のラットで2.9%、ウサギで2.6%であった。一方ヒト尿中には、水酸化代謝物が投与量の8.1~11.8%が排泄され、動物に比べより多かった。このことはヒト肝ミクロゾームにおいて加水分解反応と水酸化反応と比較した場合、ヒトでは水酸化反応が進行し易いことが示唆された結果からも支持される。

CSBAは動物(ラットおよびウサギ)では血中主代謝産物であるが、ヒトでは、CSBAの血中のレベルは、Tripamideの1.8~2.5%でありTripamideに比べてはるかに低い。このことは、ヒトのTripamide加水分解活性が、ラットに比べてかなり低いことに起因しているものと推察される。

ノルモナルを投与した後のヒト血中CSBAはその40~70%が赤血球中に存在しており、血漿中濃度と差は認められなかったため、Tripamideに比べ赤血球中への移行は少ないものと推察される。

健康男子3名に、ノルモナル1日30mgを毎日食後1時間後に投与した際の血中濃度は投与4時間後のレベルは3回目の投与でほぼ最高濃度に達し、以後一定値を示した。この結果は初回投与から推測した連続投与時の濃度推移とよく一致した。これはノルモナルのくり返し投与によりTripamideの血中動態には何んら影響を与えないことを示している。血漿中濃度推移も投与4時間後に最高血漿中濃度を示し、赤血球濃度推移に近似していた。また初回投与後の赤血球半減期と10日後のそれとは差異が認められなかった。(Fig.5-26)

一般に薬物代謝酵素の誘導が観察される場合は、血中半減期が短縮することが知られている。^{152, 153)} このことから、ヒトにおいてはTripamideは薬物代謝酵素活性の上昇を引き起こさないものと推察される。

ノルモナル連続投与した3名の赤血球中濃度は差異が認められなかったにもかかわらず、1名(J.T)において、血漿中濃度はピーク時においても検出限界以上であった。このことは、赤血球の飽和現象濃度に個体差があることを示している。

1日1回9時に30mgを服用する場合と、1日2回9時と午後1時にそれぞれ15mg服用した場合とでは、赤血球濃度推移にほとんど差異のないことが、血中シュミレーションから推測された。したがってTripamideの血中動態からは1日1回服用でも十分な効果が得られるものと考えられる。

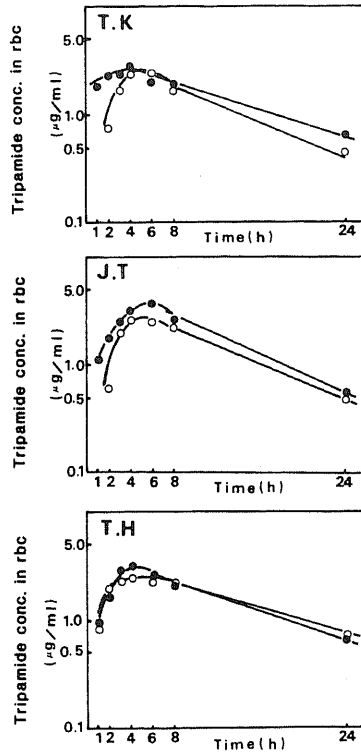


Fig. 5-26. Tripamide concentration in red blood cells following single(O) and multiple(●) dosing

ノルモナル連続投与時の尿中排泄は未変化体が1~2%, 水酸化代謝物は22~45%であった。未変化体に対する水酸化代謝物の比はノルモナルのくり返し投与により2名で上昇し, 1名は変らなかった。

ノルモナル連続投与時の未変化体および水酸化代謝物の尿中排泄は投与量の約35~47%であり, 他の代謝物の尿中排泄, さらには胆汁を介しての糞中排泄等を考慮すれば, ヒトにおけるノルモナルの吸収も動物と同様にかなり良好なものと考えられる。

ノルモナルの投与量別および被験者別の赤血球中からの消失半減期を比較すると, 投与量別では差異はなく, 被験者別の消失半減期に差異が認められた。このことは, ノルモナルの15~90mgの投与範囲では, 赤血球中消失半減期には個有の生理学的条件(代謝および排泄速度)に影響されており, 一定の臨床効果を期待するためには, 1日の投与量設定および投与間隔に幅をもたせる必要があると思われる。

総 括

非サイアザイド系降圧利尿薬 Tripamide の安全性、薬効との関連で、Tripamide の代謝研究を行ない、その結果を5編にわたり、記述したが、これらを要約して以下にまとめた。

- (1) ラットの尿中から代謝物を効率良く、単離、精製し、合成した4種の標識化合物を用いて、6種の代謝物の構造決定を行った。主水酸化代謝物の水酸基の配置については、exoあるいはendo 8-hydroxy-tripamide を立体選択的に合成する方法を見出し、代謝物がexo配置であることを ^{13}C -NMR, HPLCより決定した。さらに8,9-exo-cis- D_2 -Isoindoline-Tripamide を合成して、Tricyclodecane ring への水酸化には立体選択性と同位体効果が認められることを示した。

Tripamide の主代謝経路はアミドの加水分解と Tricyclodecane ring への水酸化反応であるが、水酸化には肝ミクロゾーム中のチトクロームP-450が関与していることを示し、Tricyclodecane ring の3位あるいは8位の水酸化には異ったP-450種の関与が示唆された。一方加水分解反応は肝ミクロゾーム中のアリアルアミダーゼが関与していることを示した。

- (2) ^{14}C -Tripamide のラットおよび家兎における生体内動態から、肝および腎への移行程度、排泄経路に種差が認められた。 ^{14}C -Carbonyl および Isoindoline-Tripamide の標識位置の異なる標識化合物を用いてラットの組織内分布を検討した結果、組織からの放射能の消失は ^{14}C -Isoindoline-Tripamide の方が遅かった。この理由は Tricyclodecane ring moiety を有する代謝物が、肝蛋白に covalent binding することに起因していることを明らかにした。
- (3) ラットに Tripamide を連続投与すると肝薬物代謝酵素活性がすることが示され、活性上昇には、代謝物 A T D が関与していることが示唆された。活性上昇機序は Tricyclodecane ring moiety を有する代謝物が核へ移行し、チトクロームP-450を誘導する他、肝ミクロゾーム中の電子伝達系成分と covalent binding することにより、活性上昇に寄与しているものと推論された。covalent binding の反応は肝ミクロゾーム電子伝達系が関与し、Tricyclodecane ring の8-水酸化反応を経ての活性代謝物が binding に関与していることを示した。

- (4) Tripamide の代謝物中二種のヒドラジン化合物 A T D, C S B H が認められたので、Tripamide の安全性との関連でアセチルヒドラジンを対照にして、肝への影響を検討した。

A T D およびアセチルヒドラジン投与は肝臓中の T G, Chol, P L, L P をいずれも上昇し、肝臓に脂肪の沈着が観察された。しかしアセチルヒドラジンは G O T を上昇させ、チトクロームP-450 および b_5 量、アミノピリンN-脱メチル化活性をいずれも低下させる、典型的なヒドラジン肝障害作用を示したが、A T D はチトクロームP-450 および b_5 量を上昇させたが、薬物代謝酵素活性に変動が認められなかった。また G O T は逆に正常より低下した。

A T D には肝臓の障害作用の他に適応的機能亢進作用(第3編)を合せ持つことが示唆され

た。A T Dの肝障害作用は第3編の項で述べた、covalent bindingに起因しているものと推察された。

- (5) Tripamideは血中ではほとんどが赤血球中に存在している。赤血球膜には結合せず、内漿成分と可逆的に結合することが示された。生体試料中のTripamideおよび代謝物の定量法を確立したことにより、血中濃度と降圧効果に関連すること、赤血球中AUCと電解質排泄とが良く相関することを見出した。

Tripamideの吸収には食事効果が観察され、食後投与の方が有意に赤血球中濃度が高かった。このことは一般的に薬剤が胃障害を避けるための食後投与であるのに比べて、薬動学的側面からより積極的なノンモナルの用法の裏づけとなった。

謝 辞

終りに臨み、本論文作成に際して、終始懇切丁寧な御指導を賜りました千葉大薬学部・北川晴雄教授、ならびに有益なる御助言をいただきました千葉大学薬学部・坂井進一郎教授、鈴木徳二教授、原田正敏教授、および山崎幹夫教授に対して深甚なる謝意を表します。

また肝アリアルアミダーゼの提供のみならず懇切なる御指導を賜りました千葉大学薬学部・佐藤哲男助教授、ならびに本研究に御協力いただきました慶応大学医学部薬理学教室・鎌滝哲也助教授、および千葉大学薬学部・北田光一助手に厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究の機会と本論文発表の許可を賜りましたエーザイ株式会社・内藤祐次社長、山岸敦常務、ならびに研開本部長・友枝宗光博士に謹んで感謝致します。また本研究に懇篤なる御指導と御助言をいただきましたエーザイ株式会社東京研究所長・大竹信三郎博士、筑波研究所担当部長・藤田孟博士、および薬物動態系木下健策博士、東京研究所臨床薬理室・森下亘通修士、筑波研究所探索企画室・加藤昭彦氏に深く感謝致します。

最後に本研究に協力して下さった元エーザイ株式会社診療所長・川崎直久博士、および東京研究所臨床解析・大野俊郎氏、豊田真弓学士、筑波研究所・中村隆晴氏、酒井操学士、安全性研究所・高村忠伸修士、中野度純一修士に深く感謝致します。

掲 載 雑 誌 目 録

1. 第1編, 第1章の内容の一部は J. Labelled Compounds & Radiopharm., 14, 191(1978) の雑誌に SYNTHESIS OF ^{14}C -TRIPAMIDE と題して掲載された。
2. 第1編, 第2章の内容は Xenobiotica, 11, 197(1981) の雑誌に STUDIES ON THE METABOLISM OF TRIPAMIDE, A NEW ANTIHYPERTENSIVE AGENT I, CHARACTERIZATION OF METABOLITES IN RATS と題して掲載された。
3. 第1編, 第3章の内容は J. Pharmacobio. Dynamics, 4, s-3(1981) の雑誌に STEREOSELECTIVITY ON HYDROXYLATION OF TRIPAMIDE と題して掲載された。
4. 第1編, 第4章の内容は Xenobiotica, 11, 693(1981) の雑誌に STUDIES ON THE METABOLISM OF TRIPAMIDE, A NEW ANTIHYPERTENSIVE AGENT II, METABOLISM BY THE HEPATIC MICROSOMAL ENZYMES と題して掲載された。
5. 第2編, 第2章の内容は Japan J. Pharmacol., 32, 1041(1982) の雑誌に STUDIES ON THE METABOLISM OF TRIPAMIDE III, METABOLIC FATE OF ^{14}C -TRIPAMIDE IN RATS AND RABBITS と題して掲載された。
6. 第3編の内容は第14回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム講演要旨15ページ福岡(1982)に ENHANCEMENT OF THE ACTIVITY OF HEPATIC DRUG-METABOLIZING ENZYMES FOLLOWING REPEATED ADMINISTRATION OF TRIPAMIDE IN RATS と題して掲載された。
7. 第4編, 第2章の内容は J. Chromatography, 231, 111(1982) の雑誌に DETERMINATION OF TRIPAMIDE AND ITS METABOLITES IN PLASMA, RED BLOOD CELLS AND URINE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY と題して掲載された。

引用文献

- 1) 上田英雄編：高血圧のすべて（南江堂）P 339（1973）
- 2) 尾前照雄，老年者高血圧について，日本老年医学会雑誌，11，133（1974）
- 3) 武田忠直ら，高血圧の長期降圧剤治療，最新医学，31，516（1976）
- 4) Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agent: JAMA, 202, 1028(1967)
- 5) Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents: JAMA, 213, 1143(1970)
- 6) 小林正敏ら，診療と新薬，16，1001（1979）
- 7) 五十嵐俊二ら，診療と新薬，16，1253（1979）
- 8) H. Asada, T. Itoh, H. Suzuki, Y. Ito, and H. Kuriyama, General Pharmacol.(Oxford), in press(1982)
- 9) R.E. Cutler, A.W. Forrey, T.G. Christopher, and B.M. Kimpel Clin. Pharmacol. Ther., 15, 588(1974)
- 10) B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, and A. Rosen, Clin. Pharmacol. Ther., 19, 531(1976)
- 11) S.J. Kolis, T.H. Williams, and M.A. Schwartz, Drug Metab. Dispos., 4, 169(1976)
- 12) C.R. Michael, E.H. Vergona, J. Ryan, S.J. Kolis, and M.A. Schwartz, J. Pharmacol. Exp. Ther., 197, 697(1976)
- 13) W.R. Dixo, R.L. Yong, A. Holazo, M.L. Jack, R.E. Weinfeld, A. Liebman, and S.A. Kaplan, J. Pharm. Sci., 65, 701(1976)
- 14) G.J. Yakatan, R.B. Smith, E.L. Frome, and J.T. Dohnso, J. Clin. Pharmacol., 17, 37(1977)
- 15) A.I. Cohen, and O.N. Hinsvark, Proc. Can. Fed. Biol. Soc., 13, 155(1970)
- 16) B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, and B. Lindström Clin. Pharmacol. Ther., 22, 385(1978)
- 17) B. Beermann, K. Hellstrom, B. Lindström, and A. Rosen, Clin. Pharmacol. Ther., 17, 424(1975)
- 18) D.C. Hobbs, and T.M. Twomey, Clin. Pharmacol. Ther., 23, 241(1978)
- 19) B. Duhm, W. Maul, H. Mendenwald, K. Patzsche, and L.A. Wegner, Arzneim.-Forsch., 17, 672(1967)
- 20) H.L.J. Fleuren, C.P.W. Verwey-van Wissen, and J.M.van Rossum, Eur. J. Clin. Pharmacol., 17, 59(1980)
- 21) D.B. Campbell, A.R. Taylor, and R.Moore, Brit. J. Clin. Pharmacol., 3, 971P(1976)
- 22) D.B. Campbell, A.R. Taylor, Y.W. Hopkins, and J.R.B. Williams, Curr. Med. Res. Opin., 5, 13(1977)

- 23) K. Sturm, W. Siedel, R. Weyer, and H. Rushing
Chem. Ber., 99, 328(1966)
- 24) M. Hoefle, T. Blouin, H. DeWald, A. Holmes, and D. Williams,
J. Med. Chem., 11, 970(1968)
- 25) D.R. Arnold, D.J. Trecker, and E.B. Whipple,
J. Am. Chem. Soc., 87, 2596(1965)
- 26) L.M. Hjelmeland, L. Aronow, and J.R. Trudell,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 541(1977)
- 27) J.T. Groves, and G.A. McClusky,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 154(1978)
- 28) D. Enders, P. Pieter, B. Renger, and D. Seebach,
Org. Syn., 58, 113(1978)
- 29) J.B. Wright, and R.E. Willete, J. Med. Pharm. Chem., 5, 815(1962)
- 30) B.V. Cheney, and D.M. Grant, J. Am. Chem. Soc., 89, 5319(1967)
- 31) D.M. Grant, and B.V. Cheney, J. Am. Chem. Soc., 89, 5315(1967)
- 32) J.D. Roberts, F. J. Weigert, J.I. Kroschwitz, and H.J. Peich,
J. Am. Chem. Soc., 92, 1338(1970)
- 33) J.B. Grutzner, M. Jautelat, J.B. Dence, R.A. Smith, and J.D. Roberts,
J. Am. Chem. Soc., 92, 7107(1970)
- 34) S.F. Nelson, and G.R. Weisman, J. Am. Chem. Soc., 98, 1842(1976)
- 35) T. Satoh, and K. Moroi, Biochem. Pharmacol., 21, 3111(1972)
- 36) T. Satoh, and K. Moroi, Biochem. Pharmacol., 24, 1436(1975)
- 37) T. Satoh, and K. Moroi, Biochem. Pharmacol., 20, 504(1971)
- 38) Y. Imai, and R. Sato, Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 8(1974)
- 39) C. Hashimoto, and Y. Imai, Biochem. Biophys. Res. Commun.,
68, 821(1976)
- 40) M. Noshiro, and T. Omura, J. Biochem., 83, 61(1978)
- 41) C.L. Litlerst, E.G. Mimnaugh, R.L. Reagan, and T.E. Gram,
Drug Metab. Dispos., 3, 259(1975)
- 42) T. Satoh, and K. Moroi, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 192, 128(1971)
- 43) L.G. Sultatos, and S.E. Vesell, Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 600(1980)
- 44) C. Bahr, C-G. Groth, H. Jansson, G. Lundgren, M. Lind, and
H. Glaumann, Clin. Pharmacol. Ther., 27, 711(1980)
- 45) P.J-R. Bioissier, C.Dumont, and J. Lesbron, Therapie, 21, 331(1966)
- 46) M.L. Hoefle, L.T. Blouin, H.A. DeWald, A. Holmes, and D. Williams,
J. Med. Chem., 11, 970(1968)
- 47) 中島祥景ら, 新薬と臨床, 28, 159 (1979)
- 48) U. Frommer, V. Ullrich, and S. Orrenius, FEBS LETTERS, 4, 14(1974)

- 49) R.E. Billings, and R.E. McMahon, *Mol. Pharmacol.*, 14, 145(1978)
- 50) L.S. Kaminsky, M.J. Fasco, and F.P. Guengerich,
J. Biol. Chem., 255, 85(1980)
- 51) V.B. Duhm, W. Maul, H.Medenwald, K.Pafzschke, and L.A. Wegner,
Arzneimittel-Forschung, 17, 672(1967)
- 52) J.E. Baer, H.L. Leidy, A.V. Brooks, and K.H. Beyer,
J. Pharm. Exp. Ther., 125, 259(1959)
- 53) H. Sheppard, T.F. Mowles, N.Bowen, A.A. Renzi, and A.J. Plummer,
Toxicol. Appl. Pharmacol., 2, 188(1960)
- 54) 村田敏郎ら, *応用薬理*, 7, 257 (1973)
- 55) L.J. Klunk, and S. Mangat, *Pharmacologist*, 22, 278(1980)
- 56) A.H. Conney, R.M. Welch, R. Kuntzman, and J.J. Burns,
Clin. Pharmacol. Ther., 8, 2(1967)
- 57) H. Remmer, The 29th International Congress of Pharmaceutical
Science, in London, 3(1969)
- 58) T. Nash, *Biochem. J.*, 55, 416(1953)
- 59) Y. Imai, A. Ito, and R. Sato, *J. Biochemistry*, 60, 417(1966)
- 60) C.H. Williams, and H. Kamin, *J. Biol. Chem.*, 237, 587(1962)
- 61) T. Omura, and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370(1964)
- 62) D. Garfinkel, *Arch. Biochem. Biohys.*, 77, 493(1958)
- 63) J.B. Shenkman, H. Remmer, and R.W. Estabrook,
Mol. Pharmacol., 3, 113(1967)
- 64) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R. J. Randall,
J. Biol. Chem., 193, 265(1951)
- 65) Y. Imai, *J. Biochem.*, 80, 267(1976)
- 66) P. Morselli, M. Rizzo, and S. Garratini, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*,
179, 88(1971)
- 67) A. Breckenridge, M.L.E. Orme, S.Thorgeirsson, D.S. Davies,
and R.V. Brooks, *Clin. Sci.*, 40, 351(1971)
- 68) C. Lin, R. Chang, C. Casmer, and S. Symchowicz, *Drug Metab. Dispos.*,
1, 611(1973)
- 69) C. Mitoma, L. Lombrozo, S.E. LeValley, and F. Dehm,
Archs. Biochem. Biophys., 134, 434(1969)
- 70) W. Legrum, G. Stuehmeier, and K.J. Netter,
Toxicol. Appl. Pharmacol., 48, 195(1979)
- 71) G. Stuehmeier, W. Legrum, and K.J. Netter,
Xenobiotica, 12, 273(1982)
- 72) H: Vainio, and M.G. Parkki, *Toxicology*, 5, 279(1976)

- 73) L. Lombrozo, and C. Mitoma, *Biochem. Pharmacol.*, 19, 2317(1970)
- 74) D. Pessayre, D. Larrey, J. Vitaux, P. Breil, J. Belghiti, and J-P. Benhamou, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1699(1982)
- 75) C.R. Elcombe, J.W. Bridges, and R.H. Nimmo-Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 915(1976)
- 76) C.R. Elcombe, J.W. Bridges, R.H. Nimmo-Smith, M. Dickins, B.C. Sweatman, and K.J. Netter, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.*, 293, Supplement, R50
- 77) C. Bonfils, I. Dalet-Beluche, and P. Naufel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104, 1011(1982)
- 78) D.M. Delaforge, E. LeProvost, J.P. Flinois, S. Columelli, and Beaune, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103, 1201(1981)
- 79) F.X. Kamienski, and S.D. Murphy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 883(1971)
- 80) D.E. Ryan, P.E. Thomas, and W. Levin, *J. Biol. Chem.*, 255, 7941(1980)
- 81) G.J. Fisher, H. Fukushima, and J.L. Gaylor, *J. Biol. Chem.*, 256, 4388(1981)
- 82) L.H. Botelho, D.E. Ryan, P-M. Yuan, R. Kutny, J.E. Shively, and W. Levin, *Biochemistry*, 21, 1152(1982)
- 83) C.R. Elcombe, and K.J. Netter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 89(1978)
- 84) E. Raffaelli, R.M. Facino, M. Salmona, and D. Pitr'e, *Pharmacol. Res. Commun.*, 9, 833(1977)
- 85) T. Shimada, and R. Sato, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 585(1978)
- 86) S.D. Nelson, J.R. Mitchell, W.R. Snodgrass, J.A. Timbrell, and G.B. Corcoran, *Science*, 193, 901(1976)
- 87) D.J. Jollow, J.R. Mitchell, W.Z. Potter, D.C. Davis, J.R. Gillette, and B.B. Brodie, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 187, 175(1973)
- 88) T. Wolff, and S. Hesse, *Fifth International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation, Tokyo, Japan 77*(1981)
- 89) J.R. Mitchell, W.Z. Potter, J.A. Hinson, and D.J. Jollow, *Nature*, 251, 508(1974)
- 90) S.D. Nelson, W.R. Snodgrass, and J.R. Mitchell, *Fed. Proc.*, 34, 784(1975)
- 91) L.J. Klunk, S. Mangat, T.S. Shoupe, and E. Magnien, *Pharmacologist*, 23, 164(1981)
- 92) J.R. Mitchell, and D.J. Jollons, *Progress in Hepatology Gastroenterology*, 68, 392(1975)

- 93) J.R. Mitchell, H.J. Zimmerman, K.G. Ishak, U.P. Thorgiersson, J.A. Timbrell, W.R. Snodgrass, and S.D. Nelson, *Ann. Intern. Med.*, 84, 181(1976)
- 94) 真杉文紀ら, ビタミン, 51, 21 (1977)
- 95) E.G. Bligh, W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911(1959)
- 96) N.R. DiLuzio, and T.E. Stege, *Life Science*, 21, 1457(1977)
- 97) S.K. Jain, S. Majumdar, and D. Subrahmanyam, *Arch. Pharmacol.*, 298, 75(1977)
- 98) F.J. Akin, and W.P. Norred, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 287(1978)
- 99) G.L. Lowery, and W.R. Bidlack, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 747(1978)
- 100) H.G. Jonen, R. Kahl, and G.F. Kahl, *Xenobiotica*, 6, 307(1976)
- 101) B. Goldgerg, A. Stern, and J. Peisach, *J. Biol. Chem.*, 251, 3045(1976)
- 102) B. Goldberg, and A. Stern, *Mol. Pharmacol.*, 13, 832(1977)
- 103) R.J. Mcmurtry, W.R. Snodgrass, and J.R. Mitchell, *Clin. Res.*, 24, 407A(1976)
- 104) S.S. Thorgeirsson, H.A. Sasame, J.R. Mitchell, D.J. Jollow, and W.Z. Potter, *Pharmacologist*, 14, 205(1976)
- 105) P.J. Wirth, C.J. Bettis, and W.L. Nelson, *Mol. Pharmacol.*, 12, 759(1976)
- 106) J.R. Mitchell, W.L. Nelson, W.Z. Potter, H.A. Sasame, and D.J. Jollow, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 199, 45(1976)
- 107) J. Mitchell, G. Corcoran, and C. Smith, *Clin. Res.*, 28, 882A(1980)
- 108) R.K. Verbeeck, J.F. Gerkens, G.R. Wilkinson, and R.A. Branch, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216, 479(1981)
- 109) J.R. Mitchell, M.R. Boyd, and S.D. Nelson, *Abstr. Papers, Am. Chem. Soc.*, 172, Meet. Medi. 32(1976)
- 110) J.R. Gillette, *Isr. J. Chem.*, 14, 193(1975)
- 111) J. Mitchell, G. Corcoran, and C. Smith, *Clin. Res.*, 29, 501A(1981)
- 112) R.J. Mcmurtry, and J.R. Mitchell, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42, 285(1977)
- 113) J.R. Mitchell, C.V. Smith, R.H. Lauterburg, and E.C. Horning, *Gastroenterology*, 77, A28(1979)
- 114) 阿部 裕, 日本臨床, 36, 341 (1978)
- 115) 奥村勝彦, 薬局, 31, 681 (1980)
- 116) C.R. Blagg, *Lancet*, 1959 ii
- 117) L. Dettli, D. Spring, *Z. ges exp. Med. exp. Chir.*, 134, 310(1960)

- 118) B. Beermann, and M. Groschinsky-Grind, *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 12, 279(1977)
- 119) S. Fukuchi, K. Katayama, M. Kakemi, M. Ueda, and T. Koizumi, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2217(1977)
- 120) B. Odland, and B. Beermann, *Hygiea*, 87, 212(1978)
- 121) 内海 勇ら, *ビタミン*, 37, 243 (1968)
- 122) M.J. Cooper, A.R. Sinaiko, M.W. Anders, and B.L. Mirkin, *Anal. Chem.*, 48, 1110(1976)
- 123) I.L. Hornigberg, J.T. Stewart, A.P. Smith, R.D. Plunkett, and D.W. Hester, *J. Pharm. Sci.*, 63, 1762(1976)
- 124) R.E. Moskalyk, R.A. Locock, L.G. Chatten, A.M. Veltman, and M.F. Bieilech, *J. Pharm. Sci.*, 64, 1406(1975)
- 125) C.J. Little, A.D. Dale, D.A. Ord, and T.R. Marten, *Anal. Chem.*, 49, 1311(1977)
- 126) B. Lindström, *J. Chromatography*, 100, 189(1974)
- 127) H. Schlenk, and J.L. Gellerman, *Anal. Chem.*, 32, 1412(1960)
- 128) J.G. Wagner, *Drug Intelligence ill.*, 57(1975)
- 129) C.M. Metzler, The Upjohn Company Technical Report 7292/69/7292/005, Kalamezoo, Michigan(1969)
- 130) L.S. Schanker, P.A. Nafpliotis, and J.M. Johnson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 133, 325(1961)
- 131) H.L.J. Fleuren, and J.M. Rossum, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 5, 359(1977)
- 132) P. Collste, M. Garle, M.D. Rawlins, and F. Sjoqvist, *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 9, 319(1976)
- 133) W. Dieterle, J. Wagner, and J.W. Faigle, *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 10, 37(1976)
- 134) Y. Orita, A. Ando, Y. Takamitsu, *et al.*, *Jap. Circul. J.*, 31, 441 (1967)
- 135) Y. Orita, A. Ando, Y. Takamitsu, *et al.*, *Jap. Circul. J.*, 36, 187(1972)
- 136) 折田義正ら, *日本臨床*, 27, 1208 (1969)
- 137) B. Beermann, K. Hellstrom, B. Lindstrom, and A. Rosen, *Clin. Pharm. Therap.*, 17, 424(1975)
- 138) 富宇賀孝ら, *診療と新薬*, 16, 1263 (1979)
- 139) B.P. Vogh, and A.S. Doyle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217, 51(1981)
- 140) A.I. Chohen, A.D. Hartman, O.N. Hinsuark, P.F. Karus, and W. Zazulak, *J. Pharm. Sci.*, 62, 931(1973)
- 141) Schlobmann, *Arzneimittel-Forschung*, 17, 688(1976)

- 142) P.J. Pentikainen, A. Pentilla, P.J. Nenvone, and G.Gothoni,
Brit. J. Clin. Pharmacol., 4, 39(1977)
- 143) P.E. Grebow, J.A. Treitman, and A.K. Yeung,
J. Pharm. Sci., 67, 1117(1978)
- 144) B. Beermann, and M. Groschinsky-Grind, Europ. J. Clin. Pharmacol.,
13, 125(1978)
- 145) M.R. Kelly, R.E. Cutler, A.W. Forrey, and B.M. Kimpel,
Clin. Pharmacokin. Therap., 15, 178(1974)
- 146) B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, and B. Lindstrom,
Acta Med. Scand., 204, 291(1978)
- 147) B. Beermann, and Groschinsky-Grind, Europ. J. Clin. Pharmacol.,
13, 195(1978)
- 148) B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, and B. Lindstrom,
Clin. Pharmacol. Therap., 22, 385(1977)
- 149) B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, B. Lindstrom, and B. Wikland,
Europ. J. Clin. Pharmacol., 13, 119(1978)
- 150) S.P. Banerjee, Biochem. Pharmacol., 20, 1649(1970)
- 151) B.R. Nechay, J. Clin. Pharmacol., 17, 626(1977)
- 152) S. Riegelman, M. Rowland, and W.L. Epstein, JAMA, 213, 426(1971)
- 153) A.H. Conney, C. Davison, R. Gastel, and J.J. Burns,
J. Pharm. Exp. Ther., 130, 1(1961)