

(3) 胎盤通過性 添付資料へ-7

1) 組織内濃度

妊娠13及び18日目のSprague-Dawley (SD) 系ラット (n=3) に、¹⁴C-アゼルニジピン (1.88MBq/mg、PEG400溶液) の1mg/kgを単回経口投与し、投与後1、6及び24時間に組織を採取して組織内放射能を測定した。その結果を表へ-7に示した。母体では放射能分布は、妊娠13及び18日目ラットとともに、投与後1及び6時間に肝臓及び副腎で血漿中濃度を上回る高濃度の放射能が認められ、胎盤、卵巣及び子宮には妊娠13日目ラットは血漿中濃度と同程度か3倍程度の放射能が、妊娠18日目ラットは血漿中濃度と同程度あるいはそれ以下の放射能が認められた。妊娠13及び18日目ラットとともに胎児の放射能はわずかに認められた程度で、羊水にはほとんど放射能は認められなかった。投与後24時間には、妊娠13及び18日目ラットとともに母体の全ての組織の放射能濃度が減少した。妊娠18日目ラットの胎児では、各時点で母体の血漿中濃度を上回る濃度分布を示した組織はほとんどなかった。

表へ-7 ¹⁴C-アゼルニジピン (1mg/kg) を妊娠13及び18日目のラットに
単回経口投与後の組織内濃度

組 織	放射能濃度 (アゼルニジピン換算 ng/ml又はng/g tissue)					
	妊娠13日目ラット			妊娠18日目ラット		
	1時間	6時間	24時間	1時間	6時間	24時間
血 漿	35±11	42±7	6±0	59±6	83±11	12±0
血 液	26±8	33±5	6±1	41±3	60±5	9±0
大 脳	3±1	5±1	N.D.	2±0	5±0	N.D.
心 臓	98±31	227±22	19±1	86±11	252±26	27±3
動 脈	35±7	104±43	14±4	15±3	80±23	39±13
静 脈	N.D.	135±65	22±7	24±3	165±33	43±9
肺	164±39	258±27	28±1	123±16	276±14	40±3
肝 臓	544±178	1042±97	126±5	513±60	1062±117	160±10
腎 臓	123±40	318±44	44±2	113±10	379±27	59±5
副 腎	335±125	570±69	60±2	309±31	654±74	94±9
子 宮	19±6	78±5	14±0	19±1	69±5	17±1
卵 巢	43±13	87±9	31±2	41±4	90±3	29±3
胎 盤	32±10	114±15	29±6	50±3	109±12	34±2
羊 水	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4±1	N.D.
胎 児	3±1	11±1	4±0	N.D.	10±0	7±0
胎 膜	—	—	—	7±2	60±2	27±3
胎 児 組 織	血 液	—	—	—	N.D.	9±0
	脳	—	—	—	2±0	6±0
	心 臓	—	—	—	N.D.	13±0
	肺	—	—	—	3±0	14±1
	肝 臓	—	—	—	6±0	31±6
	腎 臓	—	—	—	N.D.	15±0
消化管		—	—	—	3±0	14±1

平均値土標準誤差 (n=3)

N.D. : 検出限界以下

— : 未測定

2) 全身オートラジオグラフィー

妊娠13及び18日目のSD系ラット (各時点n=1) に、¹⁴C-アゼルニジピン (1.88MBq/mg、PEG400溶液) の1mg/kgを単回経口投与し、投与後1、6及び24時間に全身オートラジオグラムを常法に従い作製した。妊娠13日目ラットは、投与後1時間では生殖組織に放射能はほとんど認められず、投与後6時間では陰核腺、乳腺、胎膜、胎盤、卵巣及び子宮に母体血液よりも高い放射能が認められた。投与後24時間には全体の放射能は減少したが、胎膜に高い放射能が認められた。

妊娠18日目ラットは、投与後1及び6時間では陰核腺、乳腺、胎膜、胎盤、卵巣及び子宮に放射能が認められ、投与後6時間では胎児にも低い放射能が認められたが、投与後24時間には全体の放射能は減少した。

(4) 血漿蛋白結合添付資料へ-20~22

1) 血漿蛋白結合率 (*in vitro*)添付資料へ-20

ラット（ウイスター今道）、イヌ（ビーグル）、サル（カニクイザル）及びヒトの血漿に、それぞれ¹⁴C-アゼルニジピン（1.43MBq/mgおよび1.88MBq/mg）を0.01、0.1、1及び10 μg/mlの濃度になるよう添加し、37°Cで1時間インキュベート後、4°C、140,000gで17~24時間遠心し、得られた上清の放射能濃度から血漿蛋白結合率を算出した。結果は表へ-8に示す通りで、¹⁴C-アゼルニジピンの0.01~10 μg/mlの濃度範囲における血漿蛋白結合率は、ラットが95~97%、イヌが92~94%、サルが95~97%及びヒトが90~91%で、いずれの動物種においても90%以上の高い結合率であった。

表へ-8 ラット、イヌ、サル及びヒトの血漿蛋白に対する¹⁴C-アゼルニジピンの結合率 (*in vitro* : 超遠心法)

濃度 (μg/ml)	ラット	イヌ	サル	ヒト
0.01	95.0	93.3	95.5	91.1
0.1	96.7	92.1	96.6	89.8
1	95.4	93.9 ¹⁾	95.4	91.1±0.6 ²⁾
10	96.1	92.9 ¹⁾	96.2	89.6

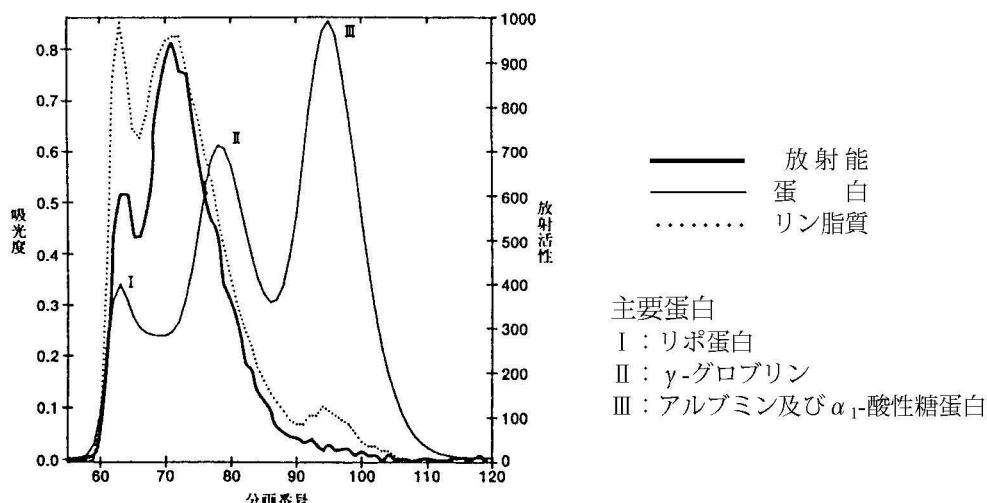
単位: % n=2 1)n=1 2)平均値±標準誤差 (n=10)

2) 結合蛋白及び結合の可逆性 (*in vitro*)添付資料へ-20、21

¹⁴C-アゼルニジピンを1 μg/mlの濃度で添加したヒト血清をゲル濾過した際の蛋白及び¹⁴C-アゼルニジピンの溶出パターンより、アゼルニジピンと結合する血清蛋白を検討した。結果は図へ-16に示す通りで、¹⁴C-アゼルニジピンの溶出はリン脂質の溶出とほぼ一致しており、血清中ではリポ蛋白に結合しているものと考えられた。

一方、¹⁴C-アゼルニジピンの血清リポ蛋白への結合率は、濃度 (0.02~324 μg/ml) に依存せず70~80%のほぼ一定の値を示し、結合に飽和は認められなかった。また、100倍濃度のニカルジピン共存下でも約80%の結合率を示し、ニカルジピンの影響を受けなかったことより、血清リポ蛋白への結合は特異的結合ではなく、非特異的結合と考えられた。

また、¹⁴C-アゼルニジピンを1 μg添加したヒト血清1mlにトリクロル酢酸及び80%メタノールを加えて抽出操作を行った結果、添加した放射能のほぼ100%が抽出液中に回収され、血清蛋白への結合は可逆的と考えられた。



図へ-16 ¹⁴C-アゼルニジピンを添加したヒト血清のゲル濾過による蛋白及び¹⁴C-アゼルニジピンの溶出パターン

3) ラット *in vivo* 血漿蛋白結合 添付資料へ-22

ウイスター今道系雄性ラット（体重239～256g、n=3）に、¹⁴C-アゼルニジピン（1.39MBq/mg、DMA-PEG400溶液）の1mg/kgを単回経口投与後2及び24時間に採血して血漿を分離し、超遠心法にて蛋白結合率及びリポ蛋白結合率を求めた。その結果を表へ-9に示した。投与後2及び24時間の蛋白結合率は58.6%及び64.1%で、リポ蛋白結合率は23.9%及び14.3%であった。

表へ-9 ラットに¹⁴C-アゼルニジピン（1mg/kg）を単回経口投与後の血漿蛋白結合率

時 間	蛋白結合率 (%)	リポ蛋白結合率 (%)
投与後2時間	58.55±2.82	23.86±2.54
投与後24時間	64.09±1.80	14.34±1.80

平均値±標準誤差 n=3

(5) 血球への分布 添付資料へ-5、6、20

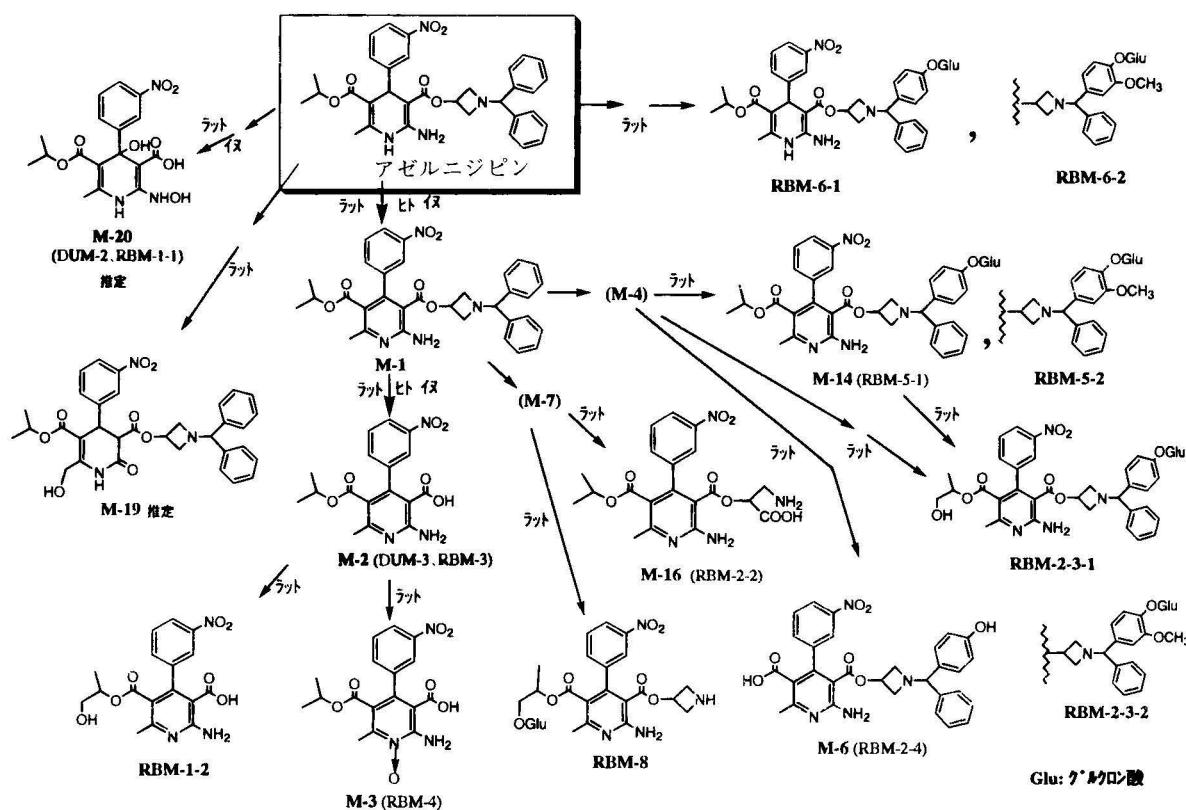
ラットの血液に¹⁴C-アゼルニジピン（1.88MBq/mg）を0.01、0.1及び1μg/mlの濃度になるようそれぞれ添加し、全血中放射能濃度及びヘマトクリット値を測定した後、37℃で15分間インキュベートし、遠心分離して得られた血漿の放射能濃度を測定した。これらの測定値をもとに算出した赤血球放射能移行率は、¹⁴C-アゼルニジピン濃度が0.01μg/mlでは27.2%、0.1μg/mlでは33.2%、1.0μg/mlでは33.3%といずれの濃度においてもほぼ同様の移行率を示した。

また、¹⁴C-アゼルニジピンを用いたラット及びイヌ単回経口投与時の血漿中総放射能濃度測定（概要281頁及び282頁）の際、血漿と同様に全血中総放射能濃度も測定し、ヘマトクリット値をもとに血球移行率を算出した結果、ラットでは投与後1時間で10.9%、24時間で26.7%であり、イヌでは投与後2時間で29.5%であった。

3. 代謝添付資料へ-6、11、23~27、29~31、参考資料

(1) 代謝物の検索及び代謝経路添付資料へ-23、26、27、参考資料

ラット胆汁中、イヌ及びヒト尿中からそれぞれ単離した代謝物について、質量スペクトルによる構造解析を行った。その結果、図へ-17に示す代謝経路が推定された。

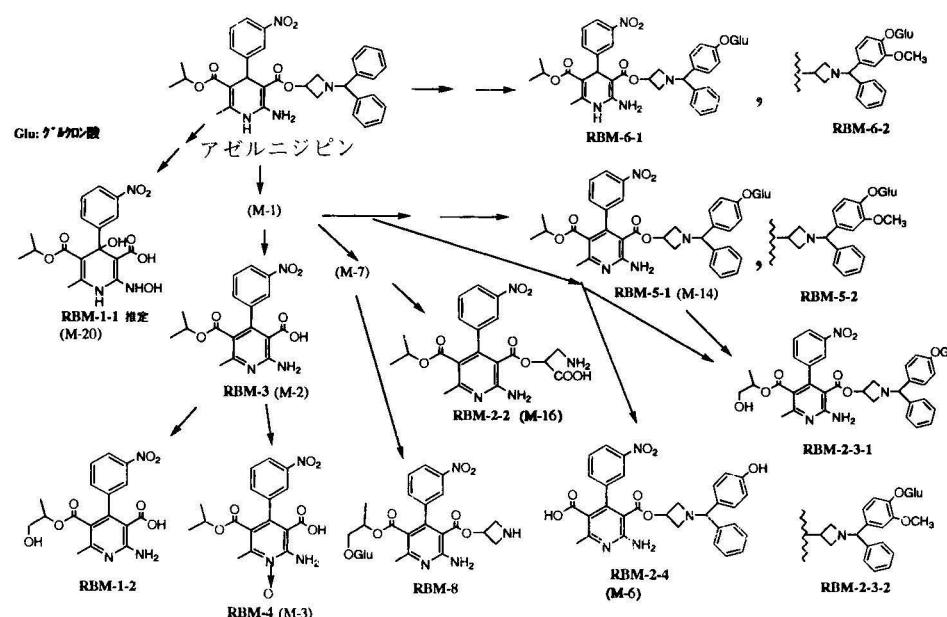


図へ-17 アゼルニジピンの推定代謝経路

1) ラット胆汁中代謝物の構造解析 添付資料へ-23

ウイスター今道系雄性ラット（体重238.5～271.6g、n=7）に、¹⁴C-アゼルニジピン（1.39MBq/mg、PEG400溶液）を5mg/kg単回静注投与し、投与後6時間まで採取した胆汁を用いて、代謝物の構造を検討した。得られた胆汁をHPLCにて分取した結果、図へ-18に示すRBMs-1～8の代謝物を含む画分が得られ、さらに精製を行ったところRBMs-1に2種、RBMs-2に7種、RBMs-5に2種、RBMs-6に2種の代謝物が確認された。このうち再度HPLCで分取精製した画分について質量スペクトルの解析を行った結果、未変化体を含む14種の代謝物の構造が決定あるいは推定され、図へ-19に示すラットの代謝経路が推定された。

図へ-18 ¹⁴C-アゼルニジピン（5mg/kg）をラットに単回静注投与後の胆汁中代謝物画分（HPLC、RI検出）

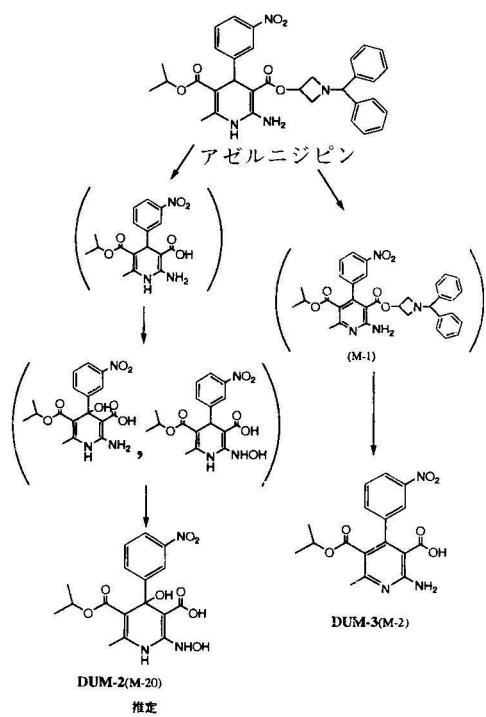


図へ-19 ラットにおけるアゼルニジピンの推定代謝経路

2) イヌ尿中代謝物の構造解析添付資料へ-26

雄性ビーグル犬（体重12.4～13.7kg、n=3）に、¹⁴C-アゼルニジピン（1.39MBq/mg、PEG400溶液）を10mg/kg単回経口投与し、投与後24時間まで採取した尿を用いて、質量スペクトルによる代謝物の構造解析を行った。得られた尿をHPLCにて単離精製した結果、図へ-20に示す3種の画分が得られ、そのうち単離精製できた2種の画分について質量スペクトルを解析した結果、決定あるいは推定された構造から、図へ-21に示すイヌの代謝経路が推定された。

図へ-20 ¹⁴C-アゼルニジピン（10mg/kg）をイヌに単回経口投与後の尿中代謝物画分（HPLC、RI検出）



図へ-21 イヌにおけるアゼルニジピンの推定代謝経路

3) ヒト尿中代謝物の構造解析添付資料へ-27

¹⁴C-アゼルニジピンを4mg/body単回経口投与したヒト尿[†]を二次元TLCにて検索した結果、数種の代謝物が検出され、そのうち主代謝物をHPLCで単離精製し、質量スペクトルによる構造解析を行った。その結果、主代謝物はM2であることが明らかになった。

(2) ラット代謝物プロファイル添付資料へ-24、25、参考資料

1) 血漿及び臓器中代謝物添付資料へ-24

ウィスター今道系雄性ラット（体重219～238g、n=4）に、¹⁴C-アゼルニジピン（1.39MBq/mg、PEG400溶液）を1mg/kg単回経口投与後1、4及び6時間に採取した血漿、心臓、肝臓及び腎臓を用いて、TLC法により未変化体、代謝物M1、M2及びM3の分離定量を行った。結果は表へ-10に示す通りで、血漿ではM2が、肝臓ではM2及びM3がそれぞれ主代謝物として存在した。腎臓及び心臓では未変化体が多く存在し、その他腎臓ではM1、M2及びM3が、心臓ではM1がそれぞれ認められた。

表へ-10 ¹⁴C-アゼルニジピン（1mg/kg）をラットに単回経口投与後の血漿及び臓器中代謝物プロファイル

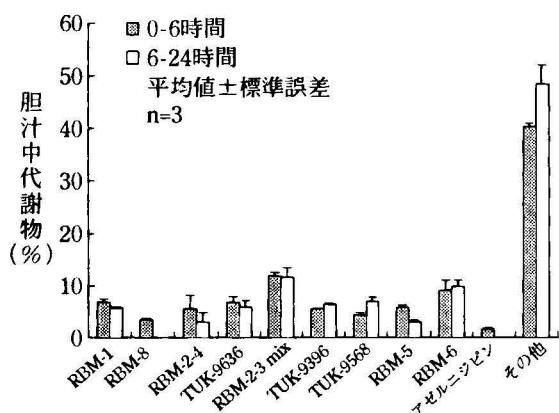
臓器	投与後時間 (時間)	血漿又は各臓器中総放射能に対する割合 (%)			
		未変化体	M1	M2	M3
血漿	1	13.2±1.7	5.2±0.4	16.5±1.6	N.D.
	4	13.2±1.5	3.4±0.4	32.8±2.5	N.D.
	6	21.1±1.3	6.0±0.7	19.6±5.8	N.D.
肝臓	1	30.3±3.6	8.3±0.6	7.6±0.7	15.3±0.5
	4	10.2±1.5	2.5±0.4	16.2±0.6	13.4±0.9
	6	12.5±1.7	3.1±0.4	20.5±0.5	14.5±0.7
腎臓	1	35.5±1.3*	8.7±2.8*	14.5±1.8*	10.4±0.3*
	4	39.4±4.6	7.5±1.2	14.3±2.3	9.9±0.7
	6	28.4±3.3	5.3±0.2	13.7±0.3	9.9±0.9
心臓	1	38.6±4.3	18.2±2.5	N.D.	N.D.
	4	61.3±2.6	13.3±0.7	N.D.	N.D.
	6	63.9±8.8	12.9±1.6	N.D.	N.D.

平均値±標準誤差 n=4 (* n=3)

N.D. : not detected

2) 胆汁中代謝物 添付資料へ-25

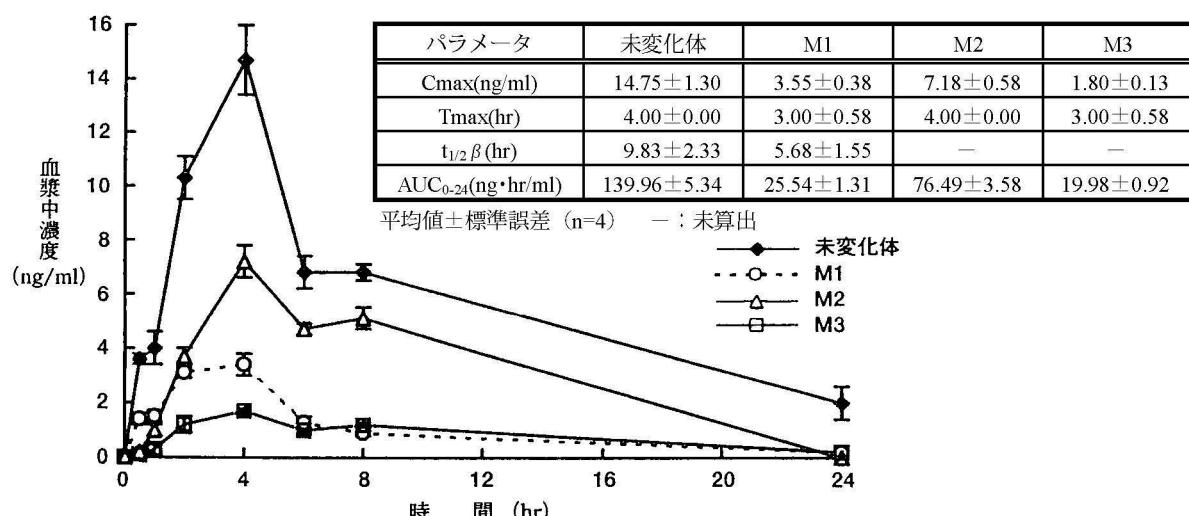
ウイスター今道系雄性ラット（体重238.5～271.6g、n=3）に、¹⁴C-アゼルニジピン（1.39MBq/mg、PEG400溶液）を1mg/kg単回静注投与後0～6及び6～24時間に採取した胆汁を用いて、放射能検出HPLC法により未変化体及び代謝物の分離定量を行った。結果は図へ-22に示す通りで、投与後0～6及び6～24時間の胆汁中には代謝物RBM-6が最も多く存在し、未変化体は0～6時間には認められたが6～24時間には検出されなかった。



図へ-22 ¹⁴C-アゼルニジピン（1mg/kg）をラットに単回静注投与後の胆汁中代謝物プロファイル

参考) ラット血漿中代謝物濃度推移 参考資料

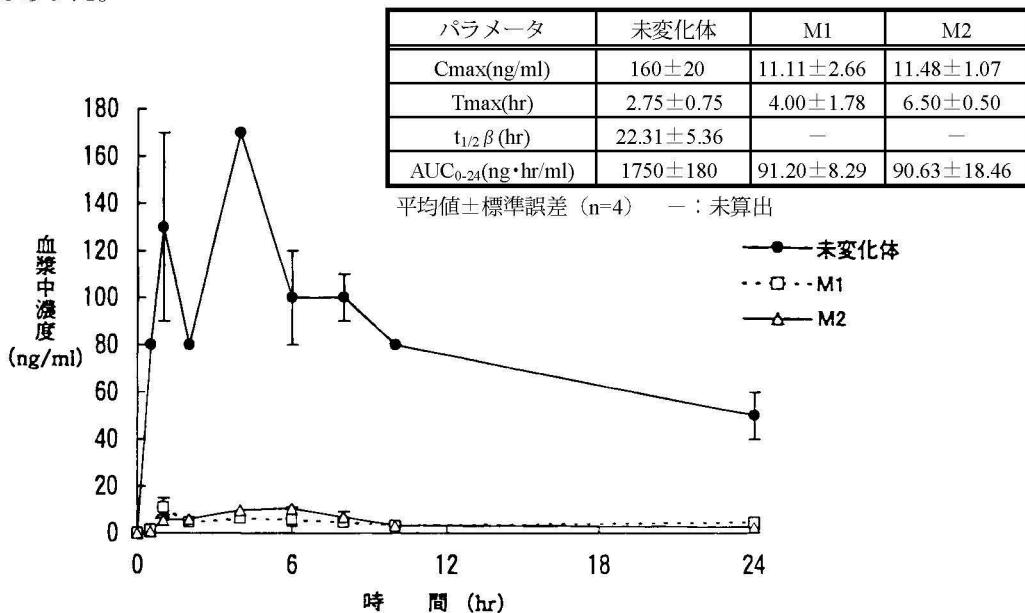
ウイスター今道系雄性ラット（平均体重230g、n=4）に、¹⁴C-アゼルニジピン（1.88MBq/mg、PEG400溶液）を1mg/kg単回経口投与後経時的に採血し、二次元TLCにより血漿中未変化体、代謝物M1、M2及びM3の定量を行った。結果は図へ-23に示す通りで、血漿中濃度は未変化体が最も高く、次いでM2、M1の濃度が高かった。



図へ-23 ¹⁴C-アゼルニジピン（1mg/kg）をラットに単回経口投与時の未変化体及び代謝物の血漿中濃度推移

(3) イヌ血漿中代謝物濃度推移添付資料へ-6

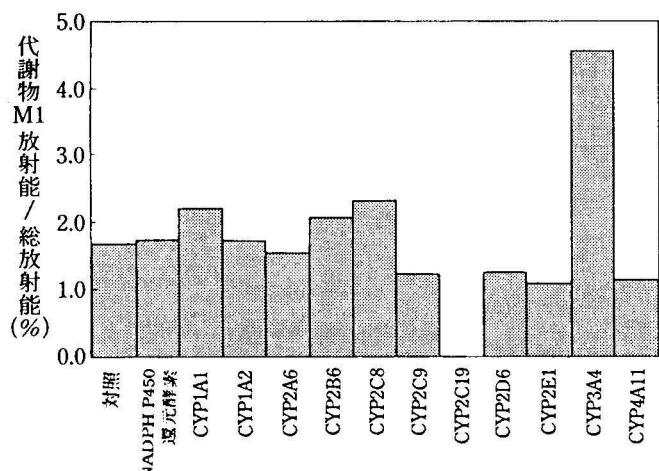
¹⁴C-アゼルニジピンを用いたイヌ単回経口投与時の血漿中総放射能濃度測定（概要282頁）で採取した血漿試料を用いて、一次元TLCにより未変化体及び代謝物の定量を行った。結果は図へ-24に示す通りで、血漿中主代謝物であるM1及びM2のAUC₀₋₂₄はともに未変化体の5.2%であった。なお、静脈内投与（概要282頁）の血漿試料についても同様の測定を実施し、経口投与及び静脈内投与の未変化体のAUC₀₋₂₄から絶対的バイオアベイラビリティーを算出した結果24.82%であった。



(4) 代謝に関するチトクロームP450分子種添付資料へ-29、30

1) ヒト添付資料へ-29

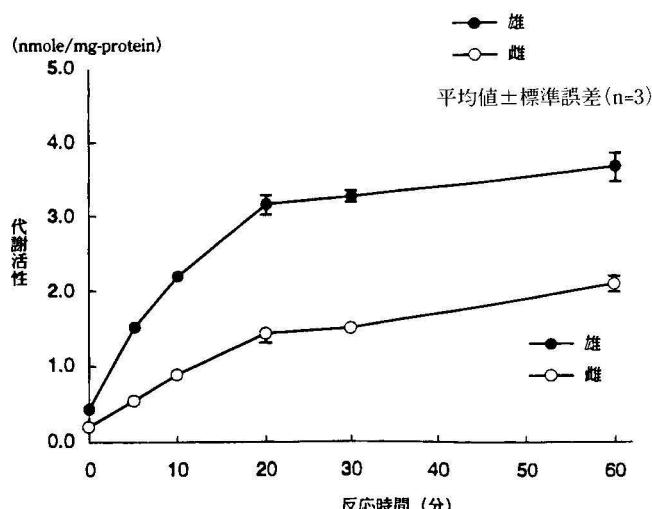
アゼルニジピンは胆汁を介して糞中に排泄され、その多くが代謝物であることより、主な代謝部位は肝臓と考えられる。そこで、11種のヒトP450分子種をそれぞれ発現させたヒトリンパ芽球様細胞由来のミクロソームと¹⁴C-アゼルニジピン（終濃度10 μM）を37°Cで2時間インキュベートし、生成した代謝物M1の量からアゼルニジピンの代謝に関するP450分子種を検討した。代謝物の定量は、インキュベート後の反応液をTLCで展開した後イメージングプレートにコンタクトし、放射性スポットの発光強度をイメージングアナライザーにより測定して行った。結果は図へ-25に示す通りで、P450を発現させていない対照のミクロソームよりも代謝物M1の生成が多く認められたのは、CYP3A4を発現させたミクロソームであった。従って、ヒトにおけるアゼルニジピンの代謝にはCYP3A4が関与し、代謝の第一段階はジヒドロピリジン環の酸化と考えられた。



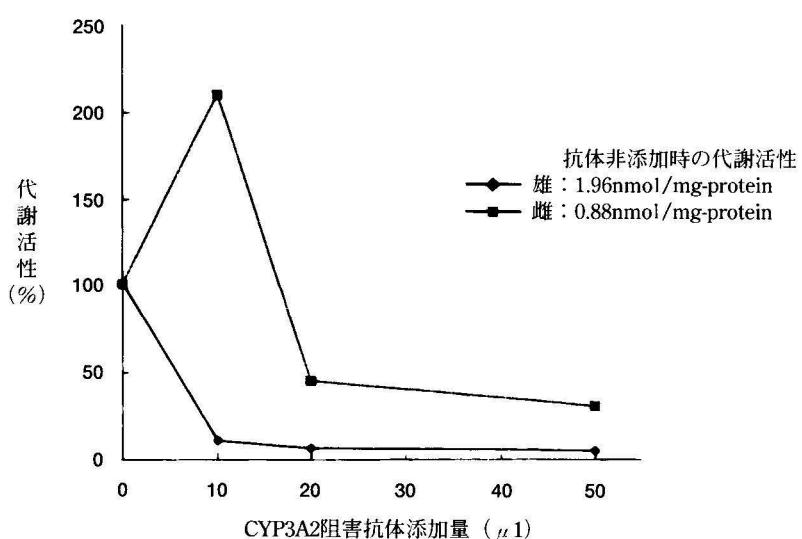
図へ-25 ヒトP450発現系ミクロソーム（ヒトリンパ芽球様細胞）による¹⁴C-アゼルニジピンの代謝（反応時間 2 時間）

2) ラット 添付資料へ-30

ウィスター今道系雌雄ラットからそれぞれ調製した肝ミクロソームに、アゼルニジピンを $50 \mu M$ の濃度で添加して $37^\circ C$ で60分間インキュベートし、経時的に採取した反応液中の代謝物M1の生成量をHPLCにて測定した結果、図へ-26に示すように雄ラットの方が高い代謝活性を示した。さらに、ヒトCYP3A4に相当するラットCYP3A2の抗体を添加したミクロソームにアゼルニジピンを $1mM$ の濃度で添加して $37^\circ C$ で20分間インキュベートした結果、図へ-27に示すように雌雄ともに代謝活性が阻害され、ラットではCYP3A2が本薬の代謝に関与するものと考えられた。さらに、雌雄ラット肝ミクロソーム中のCYP3A2含量をウエスタンブロッティングにより比較したところ、雄ラットの方が多い、ラットで認められた血漿中濃度の雌雄差（概要284頁）は肝臓のCYP3A2含量の差によるものと考えられた。



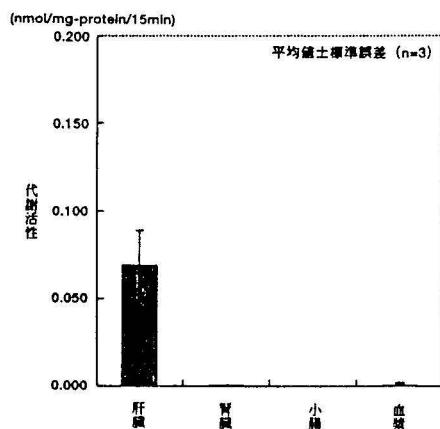
図へ-26 雌雄ラット肝ミクロソームにおけるアゼルニジピンの代謝



図へ-27 雌雄ラット肝ミクロソーム代謝に及ぼすCYP3A2阻害抗体の影響

(5)代謝部位に関する検討添付資料へ-11

ウィスター今道系雄性ラットから調製した肝臓、腎臓及び小腸の9000g上清並びに血漿に、それぞれ ^{14}C -アゼルニジピンを $50 \mu\text{M}$ の濃度で添加して 37°C で15分間インキュベートし、生成する代謝物総量をTLCにより測定した。結果は図へ-28に示す通りで、肝臓でのみ代謝物の生成が認められ、アゼルニジピンの代謝部位は肝臓であることが示された。



図へ-28 ^{14}C -アゼルニジピンのラット臓器ホモジネート及び血漿による代謝

(6) 肝薬物代謝酵素に与える影響 添付資料へ-31

ウィスター今道系雄性ラット（体重185～228g）に、アゼルニジピン（CMC懸濁液）の1、10及び100mg/kgを1日1回7日間反復経口投与した後、肝臓を摘出してミクロソーム懸濁液を調製し、チトクロームP450含量及び各種薬物代謝酵素活性の測定、並びにウエスタンブロッティングによるチトクロームP450分子種の検討を行った。なお、陽性対照群としてフェノバルビタール投与群（80mg/kg×3日間腹腔内投与）を設け、また各群それぞれに6日間の休薬群を設けた。結果は表へ-11に示す通りで、100mg/kg投与群ではチトクロームP450含量及び各種薬物代謝酵素活性がいずれも有意に増加し酵素誘導が認められた。ウエスタンブロッティングではフェノバルビタールと同様CYP2B1/2及び3Aの増加が認められ、酵素誘導はフェノバルビタール型と考えられた。10mg/kgでは、アルコキシクマリン脱アルキル化活性が有意に増加したが、チトクロームP450含量の増加は認められなかった。なお、上昇したP450含量及び代謝酵素活性は、休薬により回復に向かった。

表へ-11 アゼルニジピンをラットに7日間反復投与後の肝薬物代謝酵素活性

測定項目	対 照	アゼルニジピン (mg/kg p.o.)			フェノバルビタール (80mg/kg i.p.)
		1	10	100 ^{a)}	
肝 重 量 (g)	13.18±0.28 (12.91±0.23)	13.73±0.57 (12.49±0.36)	13.46±0.49 (12.67±0.40)	7.75±0.04** (11.95±0.38)	15.23±0.68* (13.65±0.24*)
チトクロームP450含量 (nmole/mg-protein)	0.69±0.03 (0.60±0.01)	0.66±0.03 (0.70±0.03*)	0.67±0.02 (0.70±0.03*)	0.84±0.07* (0.66±0.10)	1.46±0.08** (0.76±0.03**)
7-メトキシクマリン脱メチル化活性 (nmole/min/mg-protein)	0.16±0.01 (0.16±0.00)	0.16±0.01 (0.15±0.00)	0.19±0.00* (0.16±0.00)	0.46±0.03** (0.20±0.00**)	0.65±0.05** (0.20±0.00**)
7-エトキシクマリン脱エチル化活性 (nmole/min/mg-protein)	0.18±0.01 (0.19±0.01)	0.19±0.01 (0.19±0.01)	0.23±0.01** (0.19±0.01)	0.71±0.05** (0.26±0.00**)	0.92±0.07** (0.26±0.01**)
7-プロポキシクマリン脱プロピル化活性 (nmole/min/mg-protein)	0.15±0.01 (0.14±0.00)	0.16±0.01 (0.14±0.00)	0.17±0.00** (0.14±0.01)	0.43±0.03** (0.17±0.00**)	0.51±0.04** (0.17±0.00**)
アニリン水酸化酵素活性 (nmole/min/mg-protein)	0.54±0.05 (0.47±0.02)	0.52±0.03 (0.44±0.01)	0.59±0.03 (0.42±0.03)	1.03±0.09** (0.63±0.04**)	0.86±0.05** (0.49±0.02)
アミノピリン脱メチル化酵素活性 (nmole/min/mg-protein)	3.61±0.26 (2.66±0.04)	3.12±0.20 (2.73±0.05)	3.95±0.58 (3.01±0.13*)	4.47±0.18* (2.83±0.26)	5.08±0.25** (3.29±0.11**)
p-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性 (nmole/min/mg-protein)	24.78±2.45 (16.89±0.58)	26.14±2.77** (12.13±1.29)	24.88±1.61 (14.21±2.12)	39.97±4.07** (41.53±4.35**)	61.99±4.27** (35.52±2.43**)

平均値±標準誤差 (n=6、^{a)}: n=5)

() : 休薬群

対照群とのStudent's t-test * : p<0.05、** : p<0.01