

新抗菌剤 Piromidic acid の研究

II. 吸収, 分布, 排泄および代謝

清水当尚・中村信一・高瀬善行
関根 豊・鈴木啓郷・中村 清
大日本製薬株式会社総合研究所

Piromidic acid (5, 8-Dihydro-8-ethyl-5-oxo-2-pyrrolidinopyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acid)¹⁾は主としてグラム陰性菌に有効な新しい合成化学療法剤である。その化学療法的性質は Nalidixic acid²⁾と類似しているが、ブドウ球菌に対してもある程度の抗菌力を有する点³⁾, および動物実験では毒性の弱い点^{4,5)}が異なっている。本報では Piromidic acid の吸収, 分布, 排泄および代謝につき報告する。

実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

Piromidic acid (PA), Substance A (β -Hydroxy-piromidic acid) および Substance N は大日本製薬総合研究所で合成したものを使用し, Nalidixic acid (NA) は市販錠剤 (ウイントマイロン: 第一製薬) より抽出, 精製したものをを用いた。

2. 活性物質の定量

大腸菌 Kp 株を指示菌とする薄層カップ法を用いた。大腸菌 Kp 株を中性ブイヨン中で一夜培養し, 530 m μ で吸光度 0.46 に調製後その 1 ml を 200 ml の変法 Mueller-Hinton 培地 (ミューラヒントン培地 '栄研' を 1.5 倍に希釈し, pH を 6.0 に修正した培地) に 45°C で混ぜ, 混液を 5 ml ずつ直径 9 cm のシャーレに播き平板を作製した。平板あたり 4 個のカップ (直径 8 mm) を立て, その中に pH 6.0 の 1/15 M 磷酸緩衝液で適宜希釈した定量用試料を満し, 37°C で一夜培養後阻止円直径を測定した。検量線は血漿, 胆汁, 尿などに PA を既知量添加し, 試料と同様に処理して作製した。活性物質の濃度は PA の濃度に換算して表わした。

3. ラットにおける体内分布

PA を 0.2% carboxymethylcellulose に 5 mg/ml の濃度に懸濁させ, 体重 250~350 g の Splague-Dawley 系雄ラットに 100 mg/kg 経口投与した。血中濃度: 投薬後 1, 2, 3, 4 および 6 時間目に心臓穿刺で 4 匹のラットから個々に採血し, 遠心分離で血漿を取り, 磷酸緩衝液で 4 倍希釈して定量用試料とした。胆汁中排泄: 5 匹のラットを pentobarbital 麻酔下に手術して胆汁が polyethylene tube を通つて小試験管内にたくええられ

るようにした後投薬し, 1, 2, 3, 4 および 6 時間後に胆汁を取り, 磷酸緩衝液で 10~100 倍希釈して定量用試料とした。尿中排泄: 投薬 0~3, 3~6 および 6~24 時間後に 6 匹のラットから個々に尿を集め, 磷酸緩衝液で 10~100 倍希釈して定量に供した。組織内濃度: 投薬 2, 6 および 24 時間後にラットを 2 匹ずつ心臓採血により屠殺し, 組織を直ちに採取し, ドライアイスで凍結して保存した。保存各組織 0.5 g を 0.25 ml の 0.2 N NaOH および 1.75 ml の生理食塩水とホモゲナイズし, 沸騰水中で 3 分加熱後冷却して遠心し, 上清を磷酸緩衝液で 4 倍希釈して定量用試料を作製した。血液は前記のように処理して定量に供した。Bioautography: 投薬後 2 および 6 時間目に肝臓, 腎臓および消化管を取り, ドライアイスで凍結後厚さ 300~400 μ の凍結切片を作製し, 薄層カップ法用平板上に貼布し, 37°C で一夜培養した。

4. マウスの全身 autoradiography

用いた標識 PA は当研究所で合成されたもので, 8-ethyl 側鎖の C-1 部位が ¹⁴C で標識されており, その比活性は 4 μ Ci/mg であつた。標識 PA を 0.2% の carboxymethylcellulose に懸濁し, 体重約 24 g の ICR 系雄マウスに 100 mg/kg 経口投与後 0.5, 1, 6 および 24 時間目にマウスの全身をドライアイス-アセトンで急速冷凍し, 松岡の方法⁶⁾に従い厚さ 40 μ の全身切片を作製した。切片は -20°C で乾燥し, 工業用 X 線フィルム (富士 No. 200) と密着し, 9 日間放置して露光させた。

5. ヒトにおける血中濃度および尿中排泄

体重 63~75 kg, 年齢 39~49 才の男性健康志願者 4 名に PA または NA 1 g を crossover して投与し, 1, 2, 3, 4 および 6 時間目に血漿を, 8 時間目まで 2 時間間隔で尿を採取し, 大腸菌 Kp 株を指示菌とする薄層カップ法で定量した。定量値は PA または NA 換算値で表わした。

6. 代謝

代謝物の検討はラットおよびヒトで行なわれた。代謝物の分離には薄層およびカラムクロマトグラフィー, 溶

媒抽出法などを用い、代謝物の同定には元素分析、紫外および赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴、合成標品との同定などが用いられた。詳細は他に報告する予定である。

7. 代謝物の抗菌作用

代謝物の抗菌作用の測定は液体希釈法で行なつた。使用菌株および実験方法の詳細は前報で述べた。

結 果

1. ラットにおける吸収、排泄および体内分布

ラットにPAを100 mg/kg、1回経口投与し、吸収、排泄および体内分布を bioassay で調べた。Fig. 1 に示すとおり PAの平均血中濃度は投薬2～3時間後に12 $\mu\text{g/ml}$ の最高濃度に達し、6時間後では6 $\mu\text{g/ml}$ に低下した。

Fig. 2 に胆汁中濃度および胆汁からの回収率を示す。

Fig. 1 Average plasma level in rats receiving a single oral dose of 100 mg/kg of piromidic acid

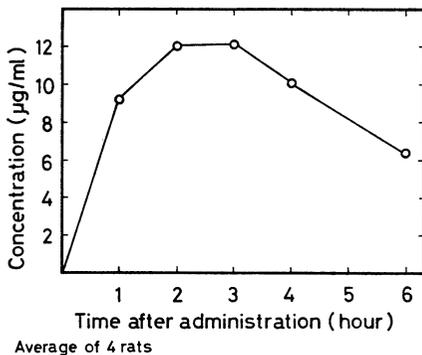
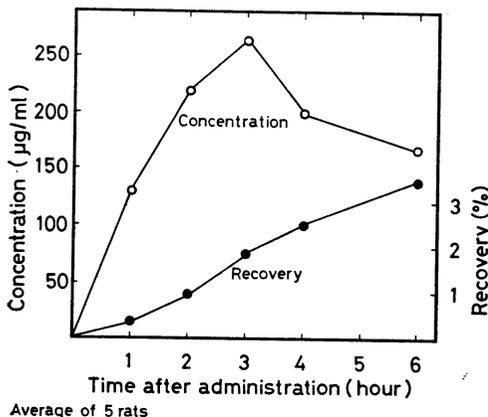


Fig. 2 Average bile level and recovery from bile in rats receiving a single oral dose of 100 mg/kg of piromidic acid

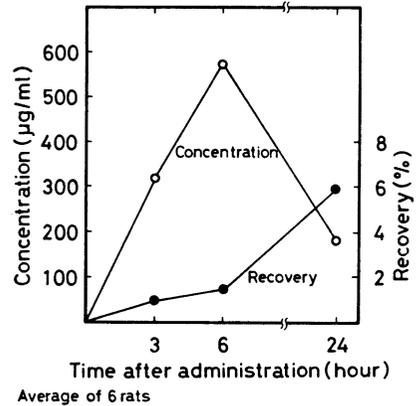


PAの平均胆汁中濃度は投薬2～3時間後に270 $\mu\text{g/ml}$ の最高濃度に達し、6時間後においてもなお150 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を維持した。6時間目までの胆汁からの平均回収率は3.5%であつた。

Fig. 3 には尿中濃度および尿中排泄率を示す。

PAの平均尿中濃度は投薬3～6時間後で570 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になり、6～24時間後では170 $\mu\text{g/ml}$ に低下した。24時間目までの尿中からの平均回収率は6.0%であつた。

Fig. 3 Average urine level and recovery from urine in rats receiving a single oral dose of 100 mg/kg of piromidic acid



臓器および組織内濃度は Fig. 4 に示すとおりである。PAの濃度は投薬2時間後では胃で174 $\mu\text{g/g}$ 、小腸で125 $\mu\text{g/g}$ 、血漿で6.4 $\mu\text{g/ml}$ 、腎臓で4.9 $\mu\text{g/g}$ 、肝臓で4.5 $\mu\text{g/g}$ であり、6時間後では小腸で60 $\mu\text{g/g}$ 、大腸で68 $\mu\text{g/g}$ 、血漿で4.9 $\mu\text{g/ml}$ 、腎臓で4.9 $\mu\text{g/g}$ 、肝臓では定量限界(4 $\mu\text{g/g}$) 以下であり、その他の部位では各時間とも定量限界以下であつた。

Fig. 5 には投薬後2時間目の肝臓、腎臓、小腸および大腸の bioautogram を示す。各切片のまわりに明瞭な指示菌の発育阻止帯がみられ、活性物質の存在が示された。6時間目の切片でも同様の結果が得られた。

2. マウスの全身 autoradiography

マウスに ^{14}C -PAを100 mg/kg 経口投与し、経時的に作製した全身 autoradiogram を Fig. 6 に示す。

Radioactivity は投薬後30分および1時間では脳、脊髄以外の全身各部に広く分布し、6時間後では消化管、肝臓、腎臓などを除きかなり減少し、24時間後では消化管の一部を除きほぼ完全に消失した。Fig. 7 には1時間後の autoradiogram の拡大図を示す。

Fig. 4 Average organ, tissue and plasma levels in rats receiving a single oral dose of 100 mg/kg of piromidic acid

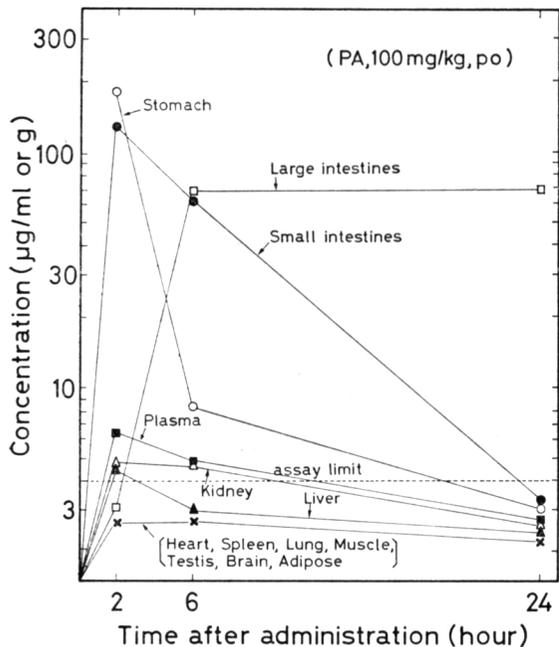


Fig. 6 Whole body autoradiograms of mice prepared at various times after oral administration of ¹⁴C-piromidic acid

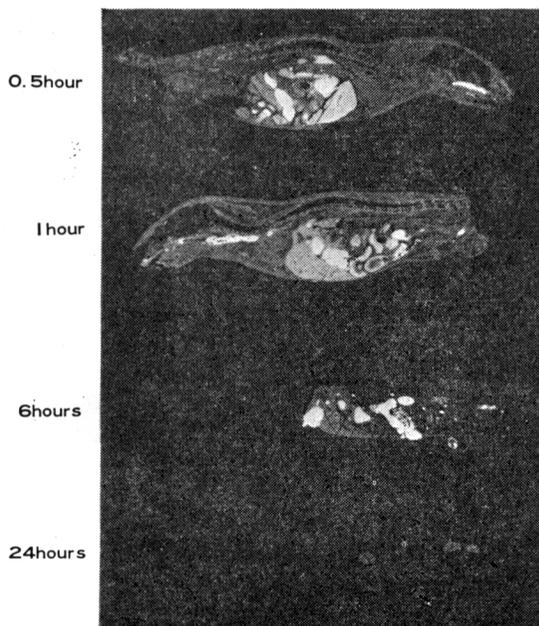


Fig. 5 Bioautography of liver, kidney and intestines of rats receiving a single oral dose of 100 mg/kg of piromidic acid

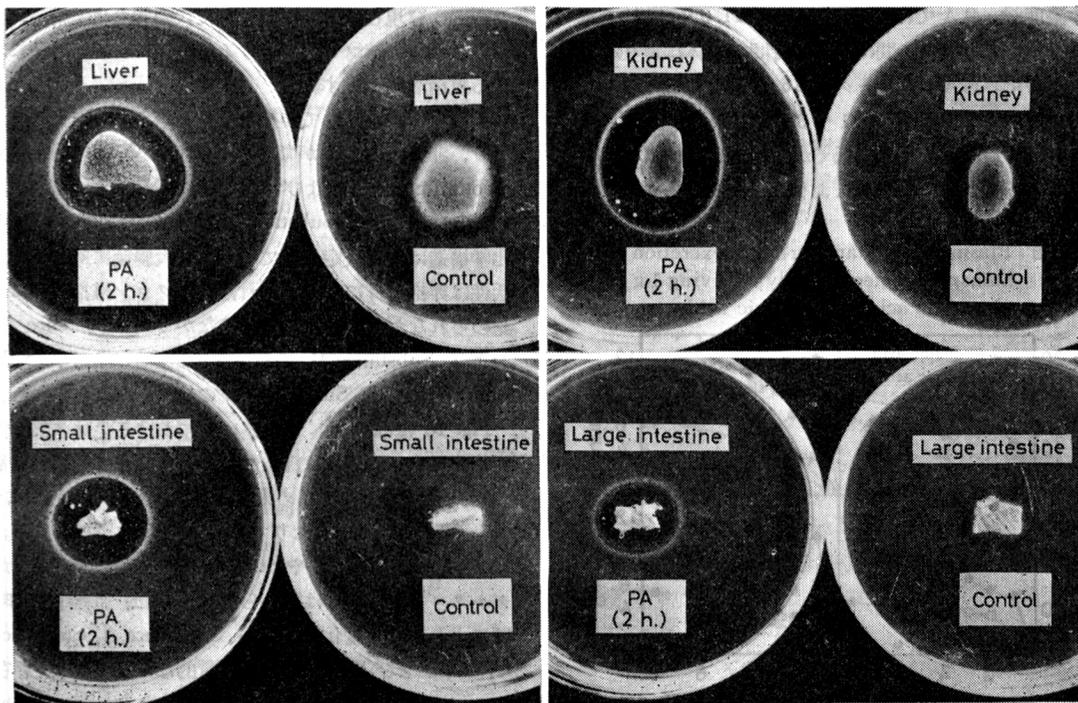
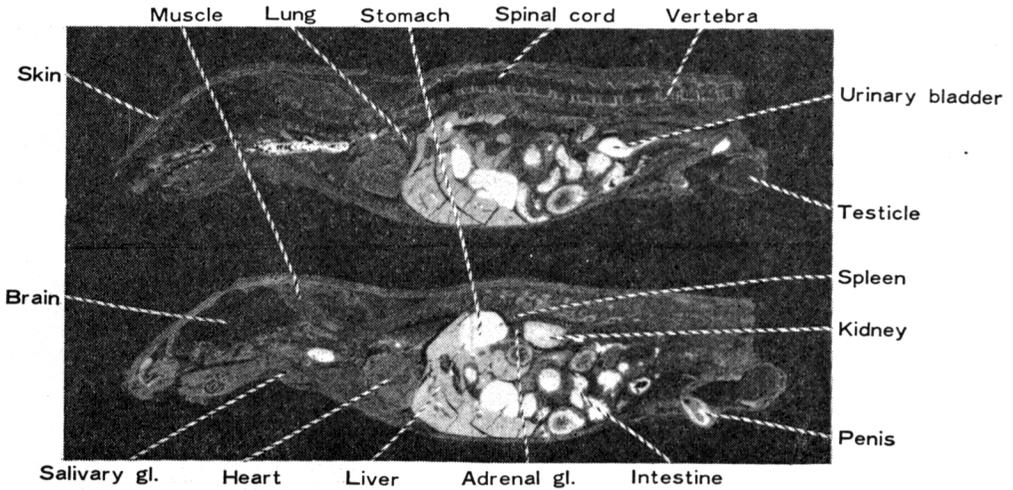


Fig. 7 Distribution of radioactivity in whole body autoradiograms of mice orally receiving ¹⁴C-piromidic acid

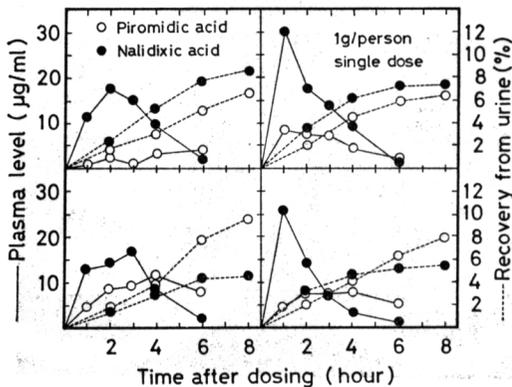


Radioactivity は、胃、腸、膀胱には高濃度に、肝臓および腎臓にはかなりの濃度に分布しているが、脳および脊髄ではきわめて低濃度で back ground とほぼ同程度であつた。

3. ヒトにおける血中濃度および尿中排泄

健康成人における PA の血中濃度および尿中排泄を NA と crossover 実験で比較した。Fig. 8 に示すとおり血中濃度は、PA ではピークで 3.8~11.6 μg/ml であり、ピークに達する時間は 1~8 時間で個体によりかなり異なつた。NA ではピークで 16.4~30.0 μg/ml であり、ピークに達する時間は 1~3 時間であつた。PA は NA に比し最高血中濃度が低くかつピークに達する時間が遅く、6 時間では逆に NA より血中濃度が高くなる傾

Fig. 8 Plasma levels and urinary excretion in human volunteers orally receiving 1g of piromidic acid or nalidixic acid



向を示した。PA の尿中からの回収率は投薬後 8 時間までで 6.4~9.5% で NA の 4.5~8.5% とはほぼ同じであつた。NA は投薬後 6 時間までに大部分が尿中に排泄されてしまうのに対し、PA は 6~8 時間後でもかなりの排泄のみられる個体があつた。

4. 代謝

PA は体内で数種の代謝物に変換される。Fig. 9 には PA および現在までに確認された代謝物の化学構造、薄層クロマトグラフィーにおける Rf 値および大腸菌に対する抗菌活性を示す。

代謝物には大別して非抱合体とグルクロン酸抱合体があり、非抱合体のなかでは Substance A (β-Hydroxy-piromidic acid) および Substance N の化学構造は決定されているが、Substance B および Substance C の化学構造は未だ決定されていない。大腸菌に対する抗菌活性は非抱合体にのみみられ、グルクロン酸抱合体には認められなかつた。非抱合体のなかでは Substance A および Substance B の抗菌作用が強かつたが、Substance C および Substance N の抗菌作用は弱かつた。

Fig. 10 にはラットおよびヒトにおける生体各部の代謝物を示す。血中では経時的に PA ならびに代謝物の量的関係が変化し、はじめ未変化の PA が多いが後には Substance A が主となり Substance B も認められた。しかし Substance N や Substance C は存在せず、またグルクロン酸抱合体は認められなかつた。胆汁中では時間により多少の変化はあるが Substance A, Substance N, PA および Substance B が量的にはほぼこの順で存在し、グルクロン酸抱合体も微量検出された。尿中からは

Fig. 9 Piromidic acid and its metabolites

Substance	Chemical structure	Rf*	Antibacterial activity**
Piromidic acid		0.54	+++
Substance A		0.25	++++
Substance N		0.35	+
Substance B	Unidentified	0.48	++++
Substance C	Unidentified	0.10	++
Glucuronide of Piromidic acid		0.00	-
Glucuronide of Substance A		0.00	-
Glucuronide of Substance N		0.00	-

* Rf value in thin layer chromatography (EASTMAN CHROMAGRAM 6060, CHCl₃-HCO₂H-HCO₂C₂H₅, 10:1:4)
 ** Antibacterial activity against *E. coli* Kp

Fig. 10 Distribution of piromidic acid and its metabolites in rats and humans

Rat	Blood	Unconjugated	A ^a , PA ^b , B ^c
		Conjugated ^d	undetected
	Bile	Unconjugated	A, N ^e , PA, B
		Conjugated	trace
	Urine	Unconjugated	A, N, PA, B, C ^f
		Conjugated	A, N, PA
	Liver	Unconjugated	A, PA
		Conjugated	undetected
	Kidney	Unconjugated	A, PA, B
		Conjugated	undetected
Human	Blood	Unconjugated	A, PA, B
		Conjugated	undetected
	Bile	Unconjugated	A, N, PA, B
		Conjugated	trace
	Urine	Unconjugated	A, N, PA, B, C
		Conjugated	A, N, PA,

^a Substance A
^b Piromidic acid
^c Substance B
^d Glucuronide
^e Substance N
^f Substance C

多量の Substance A, かなりの量の Substance N, および少量の Substance B, Substance C, PA ならびに Substance A, Substance N および PA のグルクロン酸抱合体が検出された。ラットの臓器ではグルクロン酸抱合体は検出されず, 非抱合体のうち Substance A と PA が肝臓で, それらに加えて更に Substance B が腎臓で認められた。ラットとヒトでは代謝物の種類および分布パターンに特に差はみられなかった。

主代謝物 Substance A および尿中, 胆汁中では Substance A に次いで多い Substance N の *in vitro* 抗菌作用を PA と比較して Table 1 に示す。Substance A は PA と類似の抗菌スペクトルを有しており, その抗菌力は PA よりグラム陽性菌では弱いがグラム陰性菌では強かつた。Substance N は一部のグラム陰性菌に対してのみ弱い抗菌作用を示した。

考察および総括

ラットに PA を 100 mg/kg, 1 回経口投与すると, 活性物質は血中では 2~3 時間後に 12 μg/ml, 胆汁中では 2~3 時間後に 270 μg/ml, 尿中では 3~6 時間後に 570 μg/ml の最高濃度に達し, 消化管, 肝臓, 腎臓からも活性物質が検出された。しかし, その他の部位からは活性物質は検出されなかった。マウスの全身 autoradiography では radioactivity は投薬後 30 分ないし 1 時間で脳, 脊髄以外の全身に広く分布したが, とりわけ消化管, 膀胱, 肝臓, 腎臓では高濃度であった。しかし, 24 時間後には radioactivity は全身よりほとんど完全に消失した。これらの結果は PA が経口投与により消化管から吸収されること, 吸収されたのち PA またはその代謝物が体内の特定部位に高濃度に存在することおよび貯留性のないことを示している。このような分布特性が PA の腎感染症のような特殊感染症に対する有効性³⁾ および低毒性⁴⁾ の一つの理由で

Table 1 *In vitro* antibacterial activity of substance A and substance N in comparison with piromidic acid

Organism	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Substance A	Substance N	Piromidic acid
<i>Staph. aureus</i> Terajima	30	>100	10
<i>Diplo. pneumoniae</i> I	100	>100	100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	3	>100	1
<i>E. coli</i> K-12	1	100	1
<i>Pseud. aeruginosa</i> Tsuchijima	100	>100	100
<i>Prot. vulgaris</i> OX ₁₉	1	>100	1
<i>Sal. enteritidis</i> No. 1891	1	100	3
<i>Sal. typhimurium</i> S-9	1	100	3
<i>Shig. flexneri</i> 2a EW10	3	>100	10
<i>Shig. sonnei</i> EW33	1	30	3
<i>Brucella abortus</i> Kusayanagi	100	>100	>100

あろうと考えられる。

PAとNAの血中濃度および尿中排泄を健康成人にて crossover 実験で比較すると、PAはNAより血中濃度は低いにもかかわらず尿中回収率はほぼ等しかった。したがって、PAはNAと同様尿路感染症の治療に使用しうる可能性が考えられる。PAは生体内で代謝され数種の代謝物に変換される。それらのうち抗菌活性を有するのは Substance A, Substance B, Substance C, Substance N などの非抱合体であり、なかでも Substance A, Substance B の抗菌力はグラム陰性菌ではPAより強かった。NAも体内では代謝されるが、代謝物のうち 7-hydroxy 体のみが抗菌作用を有し、その抗菌力の強さはNAとほぼ同じとされている⁹⁾。PAの代謝物中量的に最も多いのは非抱合型の Substance A で、血液、尿、胆汁、肝臓、腎臓中より主代謝物として検出された。これに対しNAでは量的に多いのはグルクロン酸抱合体であり、抗菌活性を有する非抱合体は相対的に少ないとされている⁹⁾。この点PAとは代謝のパターンが異なるようである。このような代謝物の量的関係および分布のパターンから、PAの体内での抗菌活性の主体は Substance A と未変化の PA であると考えられ、これに Substance B などの抗菌活性が加わってほぼ全体の *in vivo* 抗菌活性を形成しているものと思われる。

結 論

Piromidic acid は消化管よりよく吸収され、活性物質は主として肝臓、腎臓および消化管に分布しかつ尿中、胆汁中へ高濃度に排泄される。ラットに 100 mg/kg, 1 回経口投与すると、活性物質は血中では 2~3 時間後に 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 胆汁中では 2~3 時間後に 270 $\mu\text{g}/$

ml, 尿中では 3~6 時間後に 570 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最高濃度に達した。6 時間までの胆汁からの回収率は 3.5%, 24 時間までの尿からの回収率は 6.0% であった。消化管では時間により異なるが、100 $\mu\text{g}/\text{g}$ 前後の濃度に活性物質が検出され、臓器では肝臓および腎臓からそれぞれ 4.5 および 4.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に活性物質が検出されたが、その他の臓器および組織では検出されなかつた。肝臓、腎臓および消化管中の活性物質の存在はこれらの部位の bioautography によつても確認された。マウスの全身 autoradiography では radioactivity は投薬後 30 分~1 時間で脳、脊髄以外の全身各部に広く分布し、とりわけ消化管、膀胱では高濃度であったが、肝臓および腎臓においてもかなりの濃度であった。しかし、radioactivity は投薬後 6 時間でかなり減少し、24 時間ではほぼ完全に全身から消失した。Piromidic acid と Nalidixic acid の血中濃度および尿中排泄を健康成人にて crossover 実験で比較すると、Piromidic acid は Nalidixic acid に比し血中濃度は低い尿中回収率はほぼ等しかった。Piromidic acid は生体内で代謝され数種の代謝物に変換されるが、主代謝物は Substance A (β -Hydroxypiromidic acid) であった。その抗菌力は Piromidic acid よりグラム陽性菌では弱いグラム陰性菌では強かった。生体内での抗菌活性の主体は Substance A と未変化の Piromidic acid であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) British Patent 1,129,358, 1968
- 2) DEITZ, W. H., J. H. BAILEY & E. J. FROELICH: *In vitro* antibacterial properties of nalidixic acid, a new drug active against gram-

- negative organisms. *Antimicrob. Agent & Chemother.*, -1963, p. 583~587, 1964
- 3) 清水当尚, 中村信一, 高瀬善行: 新抗菌剤 Piromidic acid の研究 I. 抗菌作用. *Chemotherapy* 19 (5): 379~386, 1971
- 4) 仙田博美, 大西久美雄, 岡武哲, 辰巳熙: Piromidic acid の毒性学的検討. *Chemotherapy* 19 (5): 404~421, 1971
- 5) 磯崎 孟, 松野幸男: Piromidic acid の一般薬理作用. *Chemotherapy* 19 (5): 394~403, 1971
- 6) MATSUOKA, O.: Autoradiography in biology. *Radioisotopes* 18: 75~84, 116~126, 1969
- 7) FELDMAN, H. A. & C. MELNYK: *In vitro* susceptibility of sulfonamide-resistant *Meningococci* to nalidixic and hydroxynalidixic acids. *Antimicrob. Agent & Chemother.*, -1964, p. 440~443, 1965
- 8) MCCHESENEY, E. W., E. J. FROELICH, G. Y. LESHNER, A. V. R. CRAIN & D. ROSI: Absorption, excretion and metabolism of a new antibacterial agent, nalidixic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6: 292~309, 1964

ABSORPTION, DISTRIBUTION, EXCRETION AND METABOLISM OF PIROMIDIC ACID

MASANAO SHIMIZU, SHINICHI NAKAMURA,
YOSHIYUKI TAKASE, YUTAKA SEKINE,
HIROSATO SUZUKI and KIYOSHI NAKAMURA

Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Piromidic acid, a new synthetic antibacterial agent, was absorbed well from intestinal tracts and bacteriologically active substances mainly distributed to liver, kidney and intestinal tracts and excreted into urine and bile in high concentrations. At a dose of 100 mg/kg to rats, mean peak levels were 12 $\mu\text{g/ml}$ in plasma 2~3 hours postadministration, 270 $\mu\text{g/ml}$ in bile from 2 to 3 hours and 570 $\mu\text{g/ml}$ in urine from 3 to 6 hours. The average recovery from bile for 6 hours was 3.5% and that from urine for 24 hours was 6.0%. The active substances were found in stomach, small intestine, large intestine, liver and kidney at the peak concentrations of 174, 125, 68, 4.5 and 4.9 $\mu\text{g/g}$ respectively but were undetectable in other organs and tissues tested. The presence of the active substances in liver, kidney and intestinal tracts was also shown by bioautography. In whole body autoradiograms of mice receiving ^{14}C -piromidic acid, radioactive substances were distributed to almost whole body at 0.5 or 1 hour after administration, decreased significantly at 6 hours and disappeared almost completely at 24 hours. The concentrations of radioactivity were high in urinary bladder and gastro-intestinal tracts, moderate in liver and kidney, and quite low in brain and spinal cord. In a crossover experiment on the plasma levels and urinary excretion of piromidic acid and nalidixic acid in human volunteers, it was found that piromidic acid showed low plasma level and equal urinary excretion as compared with nalidixic acid. Piromidic acid is changed by metabolism in living body into several metabolites. The main metabolite was substance A (β -hydroxypiromidic acid), *in vitro* antibacterial activity of which was lower against gram-positive bacteria than piromidic acid but higher against gram-negative ones. The active principles of piromidic acid *in vivo* seems to be substance A and unchanged piromidic acid.