

Pipemidic acid の吸収, 分布および排泄

清水当尚・中村信一・黒部暢之・高瀬善行

大日本製薬株式会社総合研究所

Pipemidic acid (PPA) は新しい pyridopyrimidine 系合成抗菌剤である¹⁾。本剤は化学構造上 Piromidic acid (PA)²⁾ および Nalidixic acid (NA)³⁾ と類似しているが、緑膿菌および NA 耐性菌に抗菌作用を示すこと、組織内への移行が良好なこと、ほとんど代謝を受けないことなど、後 2 剤には見られない特徴を有する。本報では PPA の吸収, 分布および排泄につき動物および人で調べた結果を報告する。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

PPA は当研究所で合成された PPA 三水和物の結晶を用いた。本結晶 1 mg は無水 PPA 849 μ g に相当する。PPA の力価は常に無水物の重量で表現した。マウス, ラットおよびサルに投与する際は本剤を 0.2% carboxymethyl cellulose に懸濁し, また, イヌ (尿中排泄測定の場合だけ 0.5% tragacanth に懸濁) およびヒトに投与する際は本剤の 250 mg 錠を用いた。

2. 体内濃度の測定

体重 30~46 g の雄 ddy-s マウス, 体重 191~262 g の雄 Wistar ラット, 体重 9.4~13.2 kg の雌雄 Beagle 犬, 体重 3.8~9.3 kg の雌雄赤毛サル (*Macaca mulatta*) および体重 47~70 kg, 年齢 34~49 才の男子健康成人に PPA を経口投与し, 体内各部における濃度を測定した。血液は所定の時間にマウスおよびラットでは心臓穿刺, イヌ, サルおよびヒトでは静脈穿刺により採取し, 遠心分離で血漿を分離した。マウスの場合には各時間ごとに採血する個体が異なるが, その他の動物およびヒトでは同一個体から経時的に採血を行なった。尿は採尿容器にマウスでは 4 匹ずつ, その他の動物およびヒトでは個々にプールし, 所定の時間に採取した。イヌおよびサルの臓器, 組織および体液は最終投薬 2 時間後に動物を屠殺して採取した。臓器および組織はその一部を秤量し, 2 倍重量の水を加えて, Polytron (Kinematica G. m. b. H) でホモジナイズし, 80°C で 15 分間加熱攪拌後に冷却し, 遠心分離で上清だけを分取した。ヒトの糞便は投薬 24 および 48 時間後に採取し, その一部を秤量して 9 倍重量の水に懸濁し, 沸騰水浴中で 10 分間加熱抽出後に冷却し, 上清を遠心分離した。血漿および髄液は希釈することなくそのまま定量用試料となし, また, 胆

汁, 尿, および臓器, 組織, 糞便の熱湯抽出液は pH7.5 の 0.067M 磷酸緩衝液で適宜希釈した後に定量に供した。PPA の定量は大腸菌 Kp 株を指示菌とする薄層カップ法⁴⁾により行なった。検量線は血漿および髄液の場合それぞれの動物の血漿を用い, 胆汁, 尿, 臓器, 組織および糞便の場合 pH7.5 の 0.067M 磷酸緩衝液を用いて作成した。

3. 蛋白結合率の測定

PPA の血漿蛋白質との結合は迅速限外濾過法により調べた。PPA の piperazine 環の 2, 4 位を標識した ¹⁴C-PPA (11.6 μ Ci/mg) を新鮮イヌ血漿 pH 7.0 または人血清 pH 7.2 (Flow Laboratories Inc.) に種々の濃度に溶解した後, それぞれの限外濾過液を適宜加えて希釈し, PM-30 濾過膜を装着した濾過セル (Amicon, model 12) 内に注入した。濾過セル内の血漿 (清) を magnetic stirrer で攪拌しながら, 窒素ガスで約 2 kg/cm² に加圧して毎分約 0.2 ml の速度で濾過を行ない, 限外濾過液を採取した。血漿 (清) はその 50 μ l を 0.5 ml の Soluene 100 (Packard) および 10 ml の toluene scintillator⁵⁾ に溶解後水酢酸 2 滴を加えて酸性とし, また, 無蛋白の限外濾過液はその 50 μ l を 10 ml の dioxane scintillator⁶⁾ に溶解して, いずれも Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (Packard, model 3380) により放射能を測定した。限外濾過液中の放射能を遊離型 PPA とみなした。蛋白結合率は蛋白質濃度に影響されるので, 限外濾過液の総量が当初希釈に用いた限外濾過液と等しくなったとき, 蛋白結合率の算出を行なった。

4. 体内活性物質の検索

マウス, ラット, イヌ, サルおよびヒトの血漿中および尿中の活性物質の検索を薄層クロマトグラフィーにより行なった。血漿は薄層クロマトグラフィー実施に先立ち Amberlite XAD-2 (Rohm and Haas Co.) カラムを通過させて活性物質を吸着させた後, 水洗により蛋白質を除去し, 続いて吸着された活性物質を 50% メタノールで溶離 (回収率: 約 75%) し減圧濃縮した。このように調製した除蛋白濃縮血漿および未処理の尿の適当量 (約数 μ l) を Eastman Chromagram 6060 または DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 にスポットし, n-

butanol : acetic acid : water = 3 : 1 : 1 または chloroform : acetic acid : dimethylformamide = 5 : 2 : 5 の混合溶媒系で約 15 cm の長さで展開した。乾燥して溶媒除去後に大腸菌 Kp 株を接種した薄層カップ法用 MÜLLER-HINTON 培地 (栄研) を約 2 mm の厚さにクロマトグラムシート上に重層し、37°C で 1 夜培養後 triphenyltetrazolium chloride 溶液 (飽和 Na₂HPO₄ 溶液に 1 mg/ml の濃度に溶解) で菌を染色して抗菌活性スポットの有無を観察した。

結 果

1. 血中濃度

動物に PPA を 42.7~50 mg/kg 1 回経口投与した際の血中濃度を Fig. 1 に示す。平均血漿中濃度のピークは、マウスでは 1 時間後に 8.0 µg/ml, ラットでは 30 分後に 4.7 µg/ml, イヌおよびサルでは 2 時間後にそれぞれ 11.9 および 6.3 µg/ml であった。マウスおよびラットでは平均血漿中濃度は 4 時間後に定量限界以下になったが、イヌおよびサルでは、6 時間後においても、それぞれ 5.8 および 2.7 µg/ml と比較的高値を示した。健康成人に PPA を 0.5, 1 および 2 g (平均 8.3, 16.9 および 33.6 mg/kg) 1 回経口投与した際の血中濃度を Fig. 2 に示す。平均血漿中濃度は 0.5 g 投与では 1 時間後に 4.4 µg/ml, 1 g 投与では 2 時間後に 5.4 µg/ml, 2 g 投与では 2 時間後に 10.3 µg/ml のピークを示し、6~8 時間後にはそれぞれ 0.9, 2.3 および 4.0 µg/ml に低下した。ヒトの血中濃度の推移はイヌと比較的類似しており、他の動物より相対的に濃度は高く、かつ持続的であった。イヌに PPA を 8 時間ごとに 4 回経口投与した際の血中濃度の推移を Fig. 3 に示す。平均血漿中濃度のピークは各投薬 2 または 4 時間後に見られ、250 mg (平均 25.0 mg/kg/dose) 投与ではそれぞれ 6.0, 8.9, 8.2 および 12.2 µg/ml であり、500 mg (平均 42.0 mg/kg/dose) 投与では 10.5, 11.4, 17.4 および 17.9 µg/ml であった。連投により平均血漿中濃度は上昇し 1 回投与の約 2 倍の高さになったが、3 ないし 4 回目ごろから上昇は鈍くなる傾向が見られた。

2. 蛋白結合

PPA の蛋白結合率を Table 1 に示す。遊離型 PPA はイヌ血漿では 78.0~82.1%, 人血清では 65.4~72.7% であり、血中 PPA の濃度により大きな変動は見られなかった。PPA の血漿 (清) 蛋白質との結合は可逆的で希釈により容易に遊離型 PPA になった。

Fig. 1 Plasma levels of PPA in mice, rats, dogs and monkeys

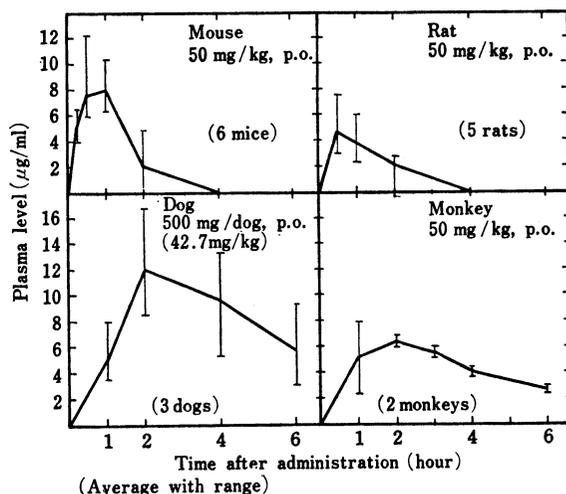


Fig. 2 Plasma levels of PPA in healthy human adults

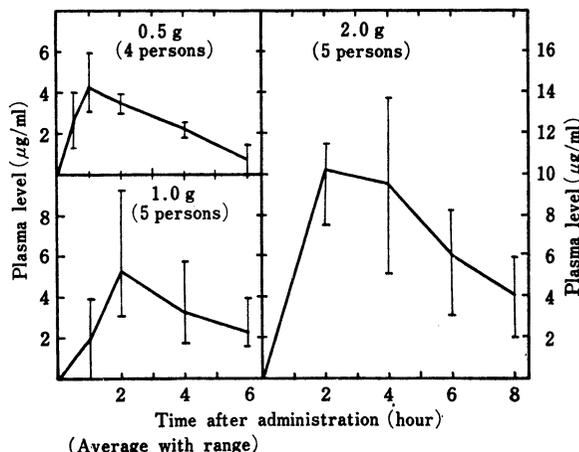


Fig. 3 Plasma levels of PPA in dogs receiving 4 oral doses

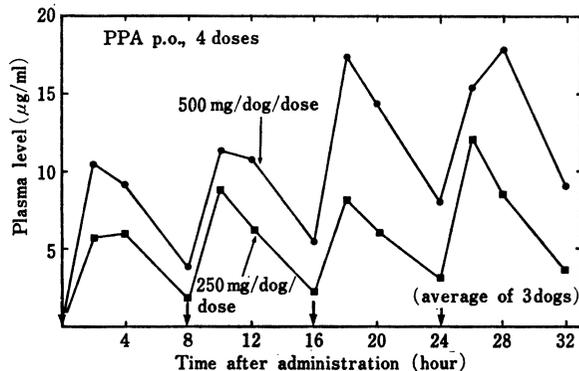


Table 1 Protein binding of PPA

Dog plasma, pH 7.0		Human serum, pH 7.2	
Concn. of PPA ($\mu\text{g/ml}$)	Unbound PPA (%)	Concn. of PPA ($\mu\text{g/ml}$)	Unbound PPA (%)
2.6	82.1	2.9	71.9
5.6	78.0	6.8	72.7
10.6	79.6	13.2	68.3
21.5	78.8	26.9	65.4

3. 臓器および組織中濃度

PPA を経口投与したイヌおよびサルにおける臓器および組織中濃度を Fig. 4 に示す。500 mg (平均 42.7 mg/kg) を 1 回投与したイヌ, 500 mg (平均 42.0 mg/kg/dose) を 8 時間ごとに 4 回投与したイヌおよび 50 mg/kg/dose を 1 日 2 回, 1 カ月間連投したサルのいずれにおいても, 脳および髄液以外の臓器および組織から活性物質が検出され, その濃度は一般に血漿中濃度とほぼ等しいか, それより高かった。また, 胆嚢胆汁および膀胱尿中の濃度は血漿中濃度よりはるかに高かった。投与方法や動物の種類にかかわらず PPA の体内分布パターンはほぼ類似していた。

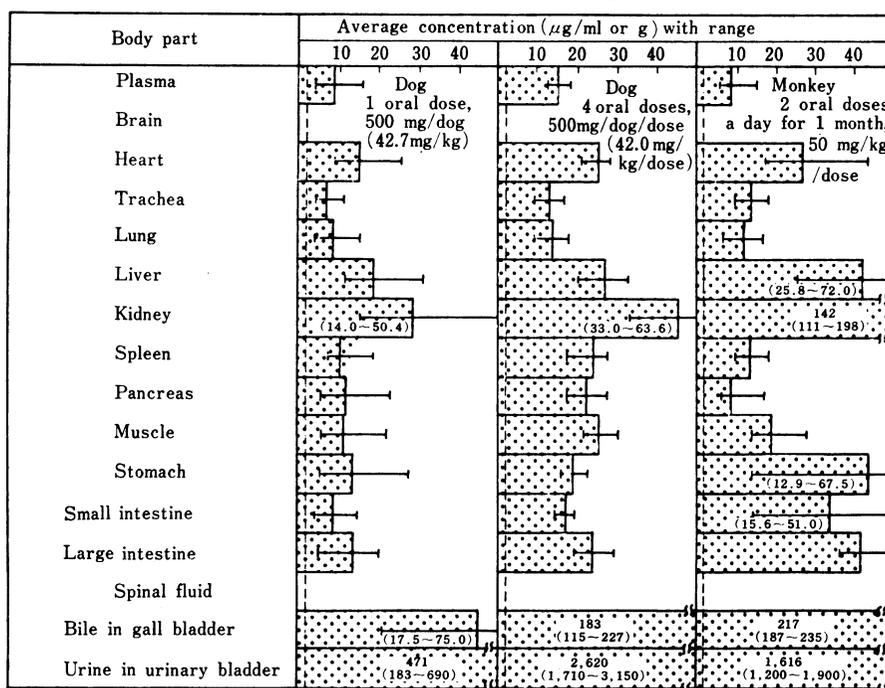
4. 尿中排泄

動物における PPA の尿中排泄を Fig. 5 に示す。50 mg/kg を 1 回経口投与したマウスおよびラットの平均尿中濃度のピークはそれぞれ 310 $\mu\text{g/ml}$ (0~3 時間尿) および 1,313 $\mu\text{g/ml}$ (3~6 時間尿) であり, 24 時間までの平均累積回収率はそれぞれ 40 および 39% であった。50 mg/kg/dose を 8 時間間隔で 2 回経口投与したイヌおよびサルの 24 時間蓄尿の平均尿中濃度はそれぞれ 1,067 および 1,030 $\mu\text{g/ml}$ であり, 平均回収率はそれぞれ 24 および 45% であった。健康成人 (血中濃度の場合と同一個体) に PPA を 0.5, 1 および 2 g 1 回経口投与した際の尿中排泄を Fig. 6 に示す。平均尿中濃度のピークは 0.5 g 投与では 1,116 $\mu\text{g/ml}$ (2~4 時間尿), 1 g 投与では 2,441 $\mu\text{g/ml}$ (2~4 時間尿), 2 g 投与では 1,949 $\mu\text{g/ml}$ (4~6 時間尿) であり, 24 時間までの平均累積回収率はそれぞれ 88, 68 および 71% であった。

5. 糞便中排泄

PPA 1 g を健康成人に 1 回経口投与した際の糞便中排泄を Fig. 7 に示す。投与 0~24 時間に採取した糞便中の平均濃度は 1,174 $\mu\text{g/g}$ であり, また, 24~48 時間に採取した糞便中の平均濃度は 247 $\mu\text{g/g}$ であった。48 時間までの平均累積回収率は 25.1% であった。同時に測定した 24 時間までの平均尿中回収率は 72.2% であったので, 合計の回収率は 97.3% であった。

Fig. 4 Organ and tissue levels of PPA in dogs and monkeys



Animals were sacrificed 2 hours after the last dose. Average of 3 animals.

..... assay limit.

Fig. 5 Urinary excretion of PPA in mice, rats, dogs and monkeys

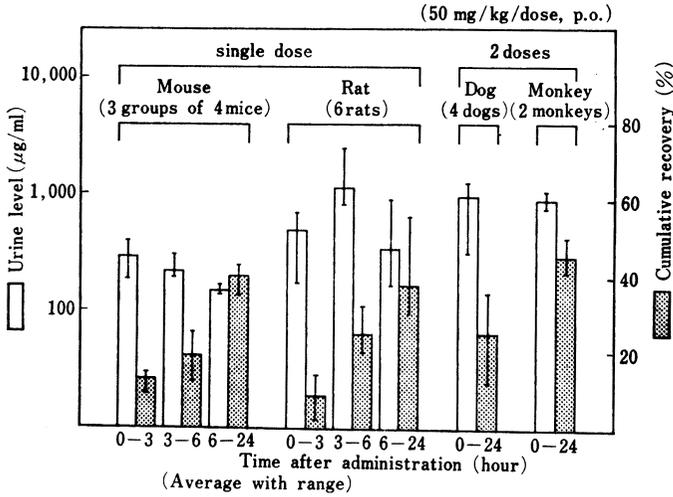


Fig. 6 Urinary excretion of PPA in healthy human adults

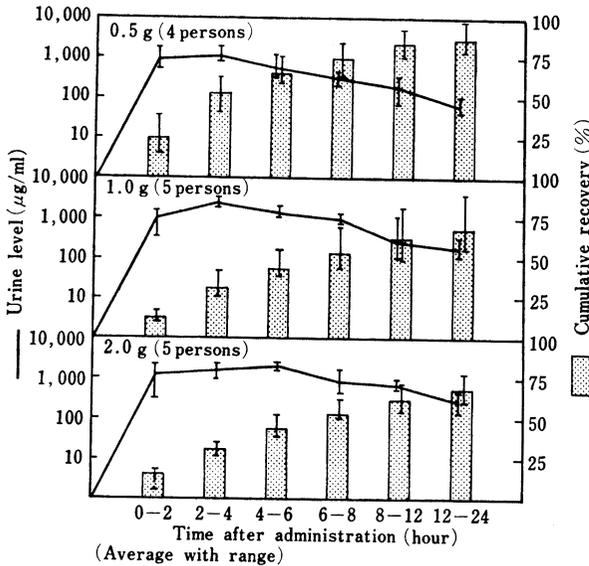
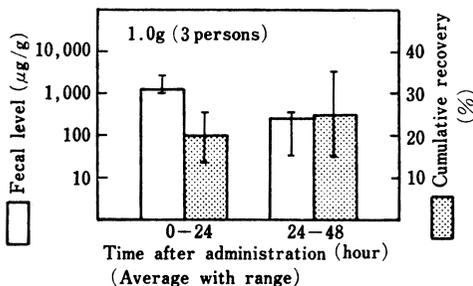


Fig. 7 Fecal levels of PPA in healthy human adults



6. 体内抗菌活性物質

PPA を投与した動物およびヒトの体内における抗菌活性物質の本体を明らかにするため、ラット、イス、サルおよびヒトの血漿ならびにマウス、ラット、サルおよびヒトの尿を薄層クロマトグラフィーで展開し、抗菌活性スポットをバイオオートグラフィーで調べた。展開溶媒として2種の混合溶媒を用いたが、いずれの場合も調べたすべての血漿および尿においてPPAのRf値とほぼ等しい位置にだけただ1つの抗菌活性スポットが検出された(Fig. 8, 9: いずれも1種の溶媒系だけを代表例として示し他は省略した)。この活性物質はラット尿およびヒト尿から抽出精製され、紫外線および赤外線吸収スペクトルならびに質量スペクトルから未変化のPPAと同定された。

考 察

PPA 約 50 mg/kg を1回経口投与した場合、血中濃度のピークは調べたすべての動物およびヒトで 4.7 μg/ml 以上の値を示した。PPA が多くのグラム陰性菌に 3.13 μg/ml 以下の MIC 値を示すこと⁷⁾、体内では代謝によりほとんど不活化されないこと、血中では70~80%前後が血漿(清)蛋白質とは結合せず遊離型で存在することなどを考慮するとき、この濃度は多くのグラム陰性菌の増殖を阻害しうる濃度であるように思われる。事実、マウスにおける感染防禦実験では PPA は種々のグラム陰性菌感染症に 50 mg/kg 以下の経口投与で有効で、その効果は一般に PA, NA, Cephalexin および Ampicillin より優れていた⁷⁾。そればかりでなく、PPA は比較的 MIC 値の高いNA耐性菌および緑膿菌感染症にも経口投与で有効で、その緑膿菌に対する効果は皮下投与による Carbenicillin の効果より優れていた⁷⁾。このような優れた *in vivo* 効果は臓器および組織中濃度が血中濃度より一般に高いこととなんらかの関係があるように思われる。PPA の組織への移行の良好なことはマウスおよびラットの全身オートラジオグラフィーならびに radioassay による組織中濃度測定によっても確認された⁸⁾。PPA の胆嚢胆汁中濃度はイスおよびサルでは血中濃度よりかなり高かったが、膀胱尿中濃度はさらに高い値を示した。蓄尿中濃度は調べたすべての動物およびヒトにおいて、きわめて高い値を示し、かつ回収率もかなり高かったので、吸収された PPA は主に尿路から排泄されるのであろうと考えられる。

Fig. 8 Bioautograms of plasma of a rat, dog, monkey and man developed by thin-layer chromatography

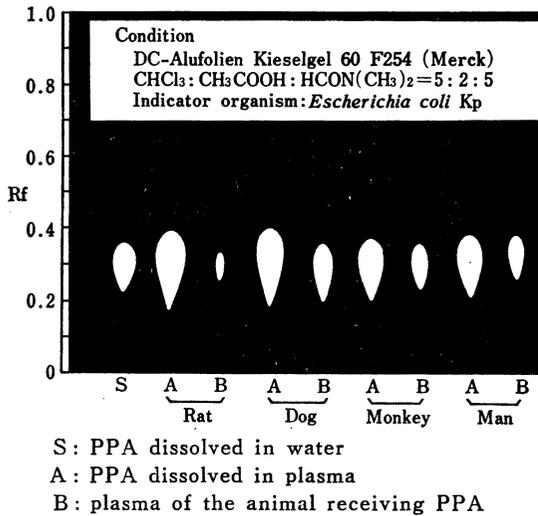
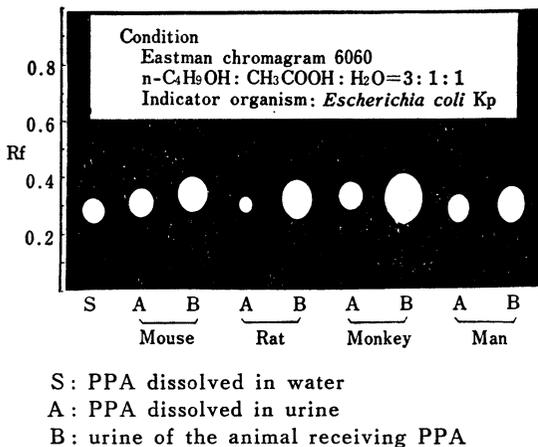


Fig. 9 Bioautograms of urine of a mouse, rat, monkey and man developed by thin-layer chromatography



PPA を 1g 1 回経口投与したヒトで、糞便および尿からの回収率を同時に測定すると、糞便からは平均 25.1%，尿からは平均 72.2%，合計 97.3% が回収された。この結果は本剤が消化管からよく吸収されること、体内にほとんど蓄積しないこと、代謝によりほとんど失活しないことなどを示唆するものである。代謝的安定性に関しては、動物およびヒトの血液および尿において、活性物質の主体は未変化の PPA であることが明らかにされた。PA, NA および Oxolinic acid は体内で代謝を受け、一部が抗菌活性のない物質になることが知られている^{9,10,11)} ので、本剤の代謝的安定性は類似物質には見ら

れない特徴と考えられる。PPA のこのような吸収、分布、排泄および代謝的特性から、本剤は経口投与で身体各部のグラム陰性菌感染症に臨床効果の期待される薬剤であると思われる。

結 論

PPA は経口投与により体内によく吸収された。マウス、ラット、イヌ、サルおよびヒトに約 50 mg/kg 1 回経口投与した場合、その平均血漿中濃度は 4.7~11.9 μg/ml の範囲であり、また、その蛋白結合率はイヌ血漿では約 20%，人血清では約 30% であった。PPA の組織への移行は良好で、多くの臓器および組織では血中濃度より高い濃度で活性物質が検出された。尿中濃度は調べたすべての動物およびヒトで高く、また、回収率は投与量の 24~88% に達した。糞便中排泄はヒトに 1g 投与した場合、投与量の約 25% であった。PPA は生体内ではほとんど代謝されず、血中および尿中活性物質の主体は未変化の PPA であった。

(本研究期間は昭和47年7月から49年2月である。)

文 献

- 1) MATSUMOTO, J. & S. MINAMI: Pyrido [2, 3-d] pyrimidine antibacterial agents. 3. 8-Alkyl- and 8-vinyl-5,8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido [2, 3-d] pyrimidine-6-carboxylic acids and their derivatives. *J. Med. Chem.* 18: 74~79, 1975
- 2) SHIMIZU, M.; S. NAKAMURA & Y. TAKASE: Piromidic acid, a new antibacterial agent: Antibacterial properties. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* -1970: 117~122, 1971
- 3) LESHER, G. Y.; E. J. FROELICH, M. D. GRUETT, J. H. BAILEY & R. P. BRUNDAGE: 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1063~1065, 1962
- 4) SHIMIZU MASANAO; SHIN-ICHI NAKAMURA, YOSHIYUKI TAKASE & NOBUYUKI KUROBE: Pipemidic acid: Absorption, distribution, and excretion. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7(4): 441~446, 1975
- 5) HALL, T. C. & E. C. COCKING: High-efficiency liquid-scintillation counting of ¹⁴C-labelled material in aqueous solution and determination of specific activity of labelled protein. *Biochem. J.* 96: 626~633, 1965
- 6) BRAY, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a

- liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1 : 279~285, 1960
- 7) 清水当尚, 高瀬善行, 中村信一, 片江宏巳, 南明, 中田勝久, 井上 了, 石山正光, 久保雄嗣: Pipemidic acid の抗菌作用. *Chemotherapy* 23(9) : 2659~2667, 1975
- 8) 橋本昌久, 森野直宜, 宮崎 亀, 景本 昭: ^{14}C 標識 Pipemidic acid のラット, マウスにおける吸収, 分布, 排泄および代謝. *Chemotherapy* 23(9) : 2693~2706, 1975
- 9) SHIMIZU, M.; Y. SEKINE, H. HIGUCHI, H. SUZUKI, S. NAKAMURA & K. NAKAMURA: Piromidic acid, a new antibacterial agent: Absorption, distribution, excretion and metabolism. *Antimicrob. Agents & Chemother.* -1970 : 123~128, 1971
- 10) 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
- 11) DICARLO, F. J.; M. C. CREW, M. D' MELGAR, S. ROEMER, S. M. RINGEL, L. J. HAYNES & M. WILSON: Oxolinic acid metabolism by man. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 174 : 413~427, 1968

ABSORPTION, DISTRIBUTION AND EXCRETION OF PIPEMIDIC ACID

MASANAO SHIMIZU, SHINICHI NAKAMURA, NOBUYUKI KUROBE
and YOSHIYUKI TAKASE

Research and Development Division, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Pipemidic acid (PPA) was well absorbed by the oral route. When administered to mice, rats, dogs, monkeys and men at a single oral dose of about 50 mg/kg, average plasma levels reached peaks ranging between 4.7 and 11.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$. About 20% of PPA was bound to proteins in dog plasma and about 30% in human serum. PPA was widely distributed to various organs and tissues at concentrations comparable to or higher than the plasma level. Peak urine levels of PPA were around 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in animals and men, and 24 to 88% of administered doses was recovered from urine for 24 hours. An average recovery from feces was about 25% in men receiving a single oral dose of 1 g. A main active principle in plasma and urine was unchanged PPA itself.