^{14}C-PC-904のラットにおける体内動態について

宮脇裕幸・長田明彦・大部良隆
住友化学工業株式会社医薬事業部研究開発センター

PC-904 (sodium (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-(4-hydroxy-1, 5-naphthyridine-3-carboxamido) -2-phenylacetamido]-3, 3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3. 2. 0] heptane-2-carboxylate) の体内動態を知るためにラットに ^{14}C で標識した PC-904 を静脈内投与し検討した結果について報告する。

I. 実験材料および方法

1. 標識化合物および標準物質

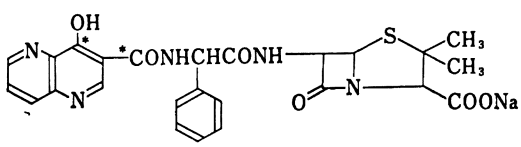
^{14}C で標識した PC-904 (以下 ^{14}C-PC-904 と略す) の構造および標識位置は Fig. 1 に示したとおりであり，当社生物科学研究所検定部で合成し，その放射化学的純度は薄層クロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィーによれば 95% 以上であった。また代謝体同定のための標準物質として当社医薬事業部研究開発センターで合成した PC-904 (lot No. 230176) および PC-904 のラクタム環開裂体 (lot No. 08491) を用いた。標識化合物の使用に際しては比放射能 9.5mCi/g のものをそのままあるいは実験により PC-904 で適宜希釈して用いた。

2. 実験動物

7週齢の Sprague-Dawley 系雄性および雌性ラットを静岡県実験動物農業協同組合から購入し (体重，雄性 230～250g，雌性 160～180g)，固型飼料 (日本クレア，CE-2) と水道水を与えアルミ製ケージに高圧蒸気滅菌したプレナ屑を敷き1～3週間飼育 (室温 24±2°C，湿度 55±5%) した後に使用した。妊娠ラットは 10 週齢にて交配させ膣栓を確認した日を妊娠第0日とし 13 日目 (体重約300g) および20日目 (体重360～400g) のものを用いた。その他の実験では8週齢 (体重，雄性 270～290g，雌性 180～200g) で使用した。なお妊娠ラットには繁殖用固型飼料 (日本クレア，CA-1) を与えた。

3. 投与方法

Fig. 1 Chemical structure of ^{14}C-PC-904



(*Labeled position)

^{14}C-PC-904 を 0.9% NaCl 溶液に溶解し股静脈から 1.2ml/min. の速度で投与した。投与液量は 2.5ml/kg (800mg/kg の場合だけ 5 ml/kg) とし用時調製した。

4. 採血法

ヘパリン処理したガラス細管を用い眼窩静脈叢穿刺により約 0.3 ml ずつ採血し血漿を得た。

5. 全身オートラジオグラフィー

^{14}C-PC-904 投与後のラットをエーテル麻酔下ドライアイス・アセトン中で凍結致死させ 2.5% カルボキシメチルセルロースナトリウムに包埋・凍結後クライオミクロトーム (PMV, 450MP) にて厚さ 30μ の全身切片を作製した。切片は工業用X線フィルム (フジ写真フィルム，150) とコンタクト法により2週間 (投与後5分) または4週間 (投与後2および 24 時間) 露出し常法により現像した。

6. 臓器摘出法

エーテル麻酔下に開腹し後大静脈から採血致死させ脳，唾液腺，甲状腺，肺，胸腺，心臓，肝臓，腎臓，副腎，脾臓，膵臓，胃，睾丸，筋肉 (後肢) および皮膚 (背部) を摘出した。

7. 尿，糞中排泄

ラットを1匹ずつ代謝ケージに収容し，尿および糞を採取した。糞は乾燥後コーヒーミルで粉末とし，50mg を秤量してサンプルオキシダイザー (Packard, Tricarb 306) で処理し放射能測定用サンプルとした。

8. 胆汁中排泄

エーテル麻酔下の雄性ラットに胆管カニュレーション手術を施しボールマンケージに固定した。手術後約1時間放置し胆汁流出量が 0.5ml/hr 以上のラットに ^{14}C-PC-904 を 50, 200 または 800 mg/kg 投与し胆汁および尿を採取した。

9. 胆管結紮ラット

エーテル麻酔した雄性ラットの総胆管を結紮し，ただちに ^{14}C-PC-904 を 50mg/kg 投与した後1匹ずつ代謝ケージに収容し，尿を採取した。この際対照として開腹縫合手術だけ施したラットを用いた。

10. 放射能測定法

試料中の放射能は液体シンチレーションスペクトロメーター (Packard, Tricarb3385) を用いて測定した。用途により2種のシンチレーターすなわちシンチレータ

ーⅠ（トルエン1Lに6gのPPOと75mgのPOPOPを含む）およびシンチレーターⅡ（シンチレーターⅠとエタノール，7：3の混液）を用いた。摘出した組織は60～100mgを精秤しNCS®（Amersham/Searle）1mlを加えて加温（55℃）溶解し，シンチレーターⅠを加えた。尿，胆汁および液体クロマトグラフからの溶出液にはシンチレーターⅡを加えた。計数値は外部標準チャネル比法により計数効率を求め補正した。血中および組織中放射能量は，用いた標識化合物の比放射能（0.95mCi/g，10倍希釈）からPC-904としてのμg相当量（μgEq.と略す）に換算して示した。この場合組織中放射能濃度の検出限界は約0.5μgEq./gまたはmlであった。

11. 代謝体の分析

尿および胆汁中の代謝体の検討に高速液体クロマトグラフ（島津，LC-1）を用いた。尿（投与後0～6時間）あるいは胆汁（投与後0～3時間）を1～5μl直接に高速液体クロマトグラフに注入し溶出液を30秒ごとに分取しその放射能を測定した。なお，カラムはイオン交換型（du Pont，WAX，1m）を用いpH 3.4の硝酸ナトリウム・クエン酸バッファー（0.01M）をキャリアーとした。

Fig. 2 Serum levels of ^{14}C after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (50mg/kg) in rats (Values are means of 4 animals ±S.E.)

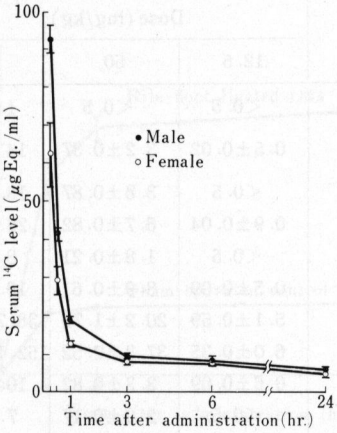


Fig. 3 Autoradiograms showing the distribution of ^{14}C after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (50 mg/kg) in male rats. a), b) 5 min, c) 2hr and, d) 24 hr after administration

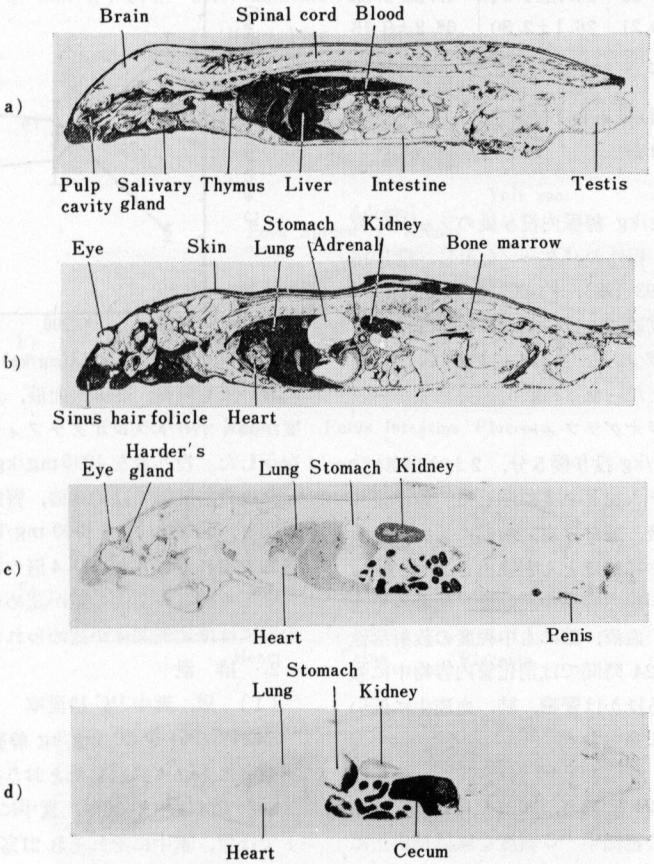


Table 1 Tissue levels of ^{14}C 1 hour after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (μg Eq./g or ml) in rats

Tissue	Dose (mg/kg)		
	12.5	50	200
Brain	<0.5	<0.5	1.3±0.01
Salivary gland	0.5±0.02	3.2±0.37	14.2±3.22
Thyroid	<0.5	3.8±0.87	13.2±0.86
Lungs	0.9±0.04	6.7±0.82	26.2±2.69
Thymus	<0.5	1.8±0.21	8.1±2.04
Heart	0.5±0.09	3.9±0.61	19.0±6.07
Liver	5.1±0.59	20.2±1.79	138.7±12.65
Kidneys	6.0±0.35	37.3±2.52	152.1± 9.00
Adrenals	0.6±0.09	3.3±0.82	10.9±0.52
Spleen	<0.5	2.0±0.17	7.7±0.50
Pancreas	<0.5	3.0±0.54	11.3±1.34
Stomach	0.7±0.19	2.5±0.18	13.7±1.48
Testes	0.6±0.08	4.9±0.73	16.1±3.23
Muscle	<0.5	2.1±0.26	7.5±1.51
Skin	0.8±0.09	7.5±0.83	39.1±1.61
Blood	2.0±0.22	14.7±1.84	47.6±3.63
Serum	3.4±0.21	26.1±2.30	68.2±9.15

Values are means of 4 animals ± S. E.

II. 実験結果および考察

1. 血中濃度および分布

(1) 血中濃度

^{14}C-PC-904 を 50mg/kg 静脈内投与後のラットにおける血漿中 ^{14}C 濃度は2相性のパターンを示し，投与15分後でそのレベルは約 93（雄），約 62（雌）μgEq./ml であり，生物学的半減期約 20 分で急速に減少したが3時間以降はゆるやかな減少となり，24 時間後では雄雌ともに約 5 μgEq./ml となった (Fig. 2)。

(2) 全身オートラジオグラフィー

^{14}C-PC-904 を 50mg/kg 投与後5分，2および24時間目のオートラジオグラムを Fig. 3 に示した。投与後5分には肝臓，腎臓，血液，肺，皮膚，歯髄に強い放射活性が認められ脳，脊髄中にはほとんど検出されなかった。投与後2時間では小腸内容物中放射能が最も高く次いで腎臓で高く，肝臓，血液，肺にも中程度の放射活性が認められた。投与後 24 時間では消化管内容物中に強い放射活性が認められるほかは腎臓，肺，血液中に低い放射活性を認めただけであった。

(3) 組織中濃度

雄ラットに ^{14}C-PC-904 を 12.5，50 または 200mg/kg 静脈内投与し1時間後の組織中 ^{14}C 濃度を臓器摘出法により測定した結果を Table 1 に示した。いずれの投与量

Fig. 4 Excretion of ^{14}C into urine and feces after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (50 mg/kg) in rats (Values are means of 4 animals).

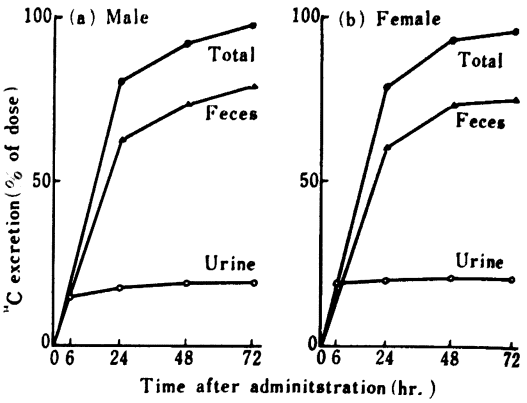
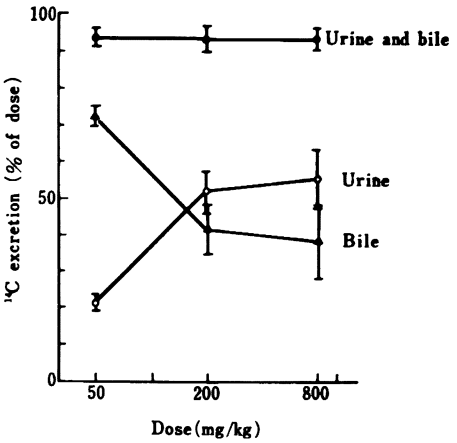


Fig. 5 Excretion of ^{14}C into urine and bile after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 in bile-duct cannulated rats (Values are means of 4 animals ±S. E.)



においても腎臓，肝臓，血液，皮膚および肺中の ^{14}C 濃度が高くオートラジオグラフィーによる知見と同じ傾向を示した。投与量を 12.5 mg/kg から 50 mg/kg に増加した場合，肝臓では約4倍，腎臓では約6倍の ^{14}C 濃度となり，50 mg/kg と 200 mg/kg とを比較すると肝臓，腎臓でそれぞれ6および4倍の濃度であり，他の組織においても約3～7倍の差が認められ組織中濃度と投与量の間にほぼ比例関係が認められた。

2. 排 泄

(1) 尿，糞中 ^{14}C 排泄率

^{14}C-PC-904 を 50 mg/kg 静脈内投与後の尿，糞中 ^{14}C 排泄率は Fig. 4 に示したとおり投与後 72 時間までに雄ラットでは尿中に 19%，糞中に 78% が排泄され雌ラットでは尿，糞中にそれぞれ 21% および 75% が排泄された。

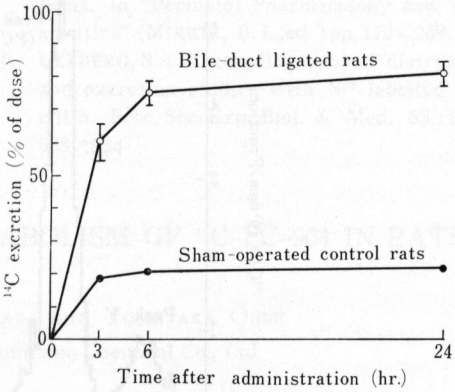
（2） 尿，胆汁中 ^{14}C 排泄率

胆管ろうラットに ^{14}C-PC-904 を 50，200 または 800 mg/kg 静脈内投与後 24 時間までの尿，胆汁中 ^{14}C 排泄率を Fig. 5 に示した。尿中排泄率は投与量が増加すると 22%(50 mg/kg), 52%(200 mg/kg), 55%(800 mg/kg) と増加し，胆汁中排泄率は逆に 72%(50 mg/kg), 41% (200 mg/kg), 38%(800 mg/kg) と減少したが合計排泄率に変化はなかった。

（3） 胆管結紮時の尿中 ^{14}C 排泄率

総胆管を結紮したラットに ^{14}C-PC-904 を 50 mg/kg 静脈内投与後の尿中 ^{14}C 排泄率を Fig. 6 に示した。投与後 24 時間までに胆管結紮ラットで 83%，対照ラットでは 23% の ^{14}C が排泄されその大部分はいずれの群でも 0～3 時間に排泄された。この結果は前項に述べた大量投与時の尿，胆汁中排泄率の変化と対応づけて考えられ PC-904 の主排泄経路は胆汁中から糞中であるが，胆汁中排泄の容量を越えた場合および胆汁中排泄が妨げられた場合尿中排泄がその代償経路となることを示している。

Fig. 6 Urinary excretion of ^{14}C after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (50mg/kg) in bile-duct ligated rats (Values are means of 4 animals ±S. E.)



ペニシリン系薬物の胆汁中排泄に関し RYRFELDT は薬物の分配率との相関について論じているが[1]，PC-904 の

Fig. 7 Autoradiograms showing the distribution of ^{14}C after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (50 mg/kg) in pregnant rats. a) 2 hr after administration at 13 days of gestation, b) 5 min, c) 2 hr and d) 24 hr after administration at 20 days of gestation

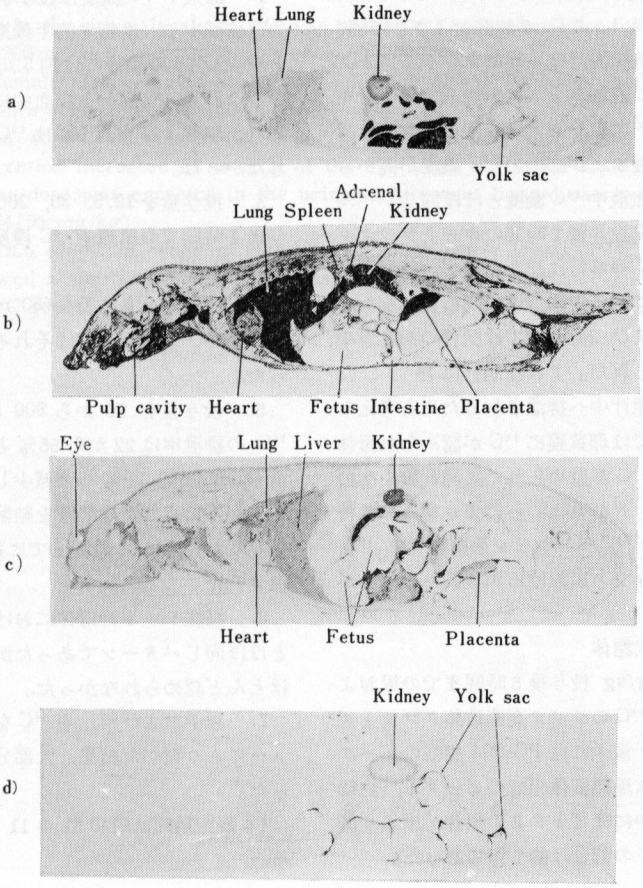
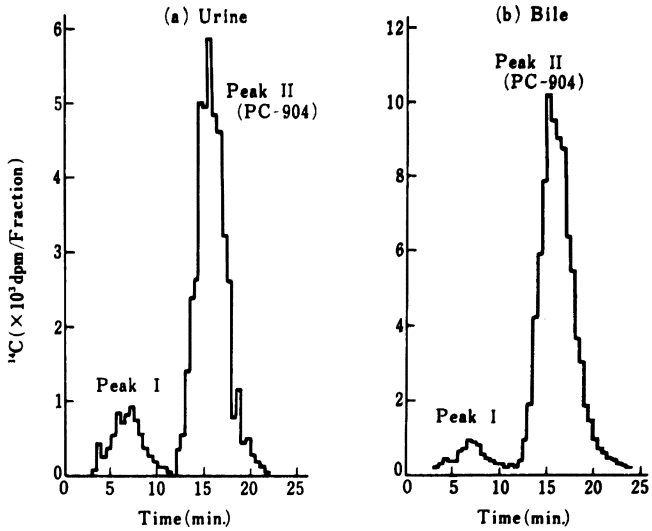


Fig. 8 High performance liquid radiochromatograms of rat urine (0～6 hr) and bile (0～3 hr) after intravenous injection of ^{14}C-PC-904 (50 mg/kg)



胆汁中排泄率は Ampicillin, Methicillin とともに最も高い部類に属することが知られた。

3. 胎仔への移行性

妊娠第13日目および第20日目のラットに^{14}C-PC-904を 50 mg/kg 静脈内投与し，5分，2時間および24時間（妊娠第 13 日目は2時間後だけ）後のオートラジオグラムをFig. 7に示した。妊娠ラットにおける^{14}Cの分布はすでに示した雄ラットでの分布とほぼ同じパターンであり，肝臓，腎臓，血液および肺での^{14}C濃度が高かった。胎盤中^{14}C濃度は血液中^{14}C濃度とほぼ同じレベルであった。妊娠 13 日目投与後2時間のオートラジオグラム上では胎仔への^{14}Cの移行は認められず，妊娠第20日目でも投与後5分では胎仔中に^{14}Cは認められなかったが，投与後2時間および 24 時間では胎仔の消化管中にわずかながら認められた。これは胎仔に移行した^{14}Cが胎仔においても胆汁中へ排泄されるためと考えられた。投与後 24 時間では卵黄膜に^{14}Cが認められ母体の腎臓中にも低濃度の^{14}Cが認められた。卵黄膜中への薬物の移行については WADDELL らにより種々の薬物について知られているが[2]，ペニシリン系薬物では ^{35}S-ベンジルペニシリンのマウスにおける卵黄膜への分布が報告されている[3]。

4. 尿および胆汁中代謝体

^{14}C-PC-904 を 50 mg/kg 投与後6時間までの尿および3時間までの胆汁中^{14}Cのラジオ高速液体クロマトグラムをFig. 8に示した。尿中には PC-904 相当のピークII（約83%）とラクタム環開裂体相当のピークI（約12%）が認められ，胆汁中にはピークIIの割合が尿より高く（約 91%），ピークIの割合は約7%であった。

III. 総　　括

^{14}C-PC-904 をラットに静脈内投与し，^{14}Cの体内動態に関し次の結果を得た。

1. 血漿中^{14}C濃度は投与(50 mg/kg) 後3時間まで急速に減少し（生物学的半減期約 20 分），以後ゆっくりと減少し 24 時間後には約5 μgEq./ml となっていた。

2. 肝臓，腎臓および血中に最も高い^{14}C濃度が認められ，脳および脊髄中には^{14}Cの分布はほとんど認められなかった。

3. 投与量を 12.5, 50, 200 mg/kg と上げた場合，投与後1時間での組織中^{14}C濃度はほぼ投与量に比例して上昇した。

4. 雄，雌ともに投与(50 mg/kg) 後 72 時間までの尿，糞中^{14}Cの排泄率はそれぞれ約20および80%であった。

5. 投与量を 50 から 800 mg/kg に上げた場合尿中^{14}Cの排泄率は 22 から 55% と増加し，胆汁中^{14}Cの排泄率は 72 から 38% へと減少したが合計の排泄率は変化しなかった。また総胆管を結紮したラットに 50 mg/kg 投与したとき，24 時間までに約 83% の^{14}Cが尿中に排泄された。

6. 妊娠ラットの母体における^{14}C分布は雄性ラットとほぼ同じパターンであったが，胎仔への^{14}Cの移行はほとんど認められなかった。

7. 尿中および胆汁中^{14}Cを高速液体クロマトグラフィーにより調べた結果，大部分は未変化の PC-904 であった。

（本研究期間は昭和 51 年 11 月から昭和 52 年 5 月である。）

謝　　辞

本研究の実施にあたりご指導を賜わりました帝京大学小児科（助教授）紺野昌俊先生に深くお礼申し上げます。

また種々ご助言を頂いた当社研究開発センター　仲谷坦博士およびご協力を頂いた射場一彦，鎮守道彦，西垣里美の諸氏に深謝いたします。

文　　献

1) RYRELFDT, A: Biliary excretion of some penicillins, quaternary ammonium compounds and tertiary amines, including aspects on mechanisms for their excretion. Acta Pharmacol. Toxicol. 32 : I-XXIV, 1973

2) WADDEL, W. J.: Disposition of drugs in the fetus. in "Perinatal Pharmacology and Therapeutics" (MIRKIN, B. L.,ed.) pp. 119～269, 1976

3) ULLBERG, S. : Autoradiographical distribution and excretion studies with S^{35}-labelled penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 85 : 550～553, 1954

DISTRIBUTION, EXCRETION AND METABOLISM OF ^{14}C-PC-904 IN RATS

HIROYUKI MIYAWAKI, AKIHIKO NAGATA and YOSHITAKA OHBE

Research and Development Center, Sumitomo Chemical Co., Ltd.

The biological disposition and metabolic fate of PC-904, sodium (2 S, 5 R, 6 R)-6-[(R)-2-(4-hydroxy-1, 5-naphthyridine-3-carboxamido)-2-phenylacetamido]-3, 3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3. 2. 0] heptane-2-carboxylate, were studied in rats after intravenous injection of ^{14}C-PC-904.

1) Plasma levels of ^{14}C rapidly decreased with a biological half life of about 20 minutes until 3 hours after injection (50 mg/kg), then gradually decreased.

2) The liver, kidneys and blood showed the highest ^{14}C levels, while the brain and the spinal cord showed the lowest levels.

3) A dose response in the tissue levels of ^{14}C was observed 1 hour after injection when the dose was raised (12. 5, 50 and 200 mg/kg).

4) Both male and female rats excreted about 80% and 20% of the ^{14}C dose in the feces and urine, respectively, in 72 hours after injection (50 mg/kg).

5) Biliary excretion of ^{14}C decreased (72 to 38%) when the dose was raised (50 to 800 mg/kg), while the urinary excretion increased 22 to 55% of the ^{14}C dose, the total ^{14}C excretion being unchanged. About 83% of the dose was excreted in the urine in bile-duct ligated rats within 24 hours after injection of ^{14}C-PC-904 (50 mg/kg).

6) Tissue distribution of ^{14}C in pregnant rats showed much lower levels of ^{14}C in fetuses than that in the dams that showed a similar pattern of ^{14}C distribution to male rats.

7) Analyses by HLC revealed that most of the ^{14}C in the urine and bile was unchanged PC-904.