

## 実験動物種における Cilastatin sodium (MK-0791) の生体内動態

MK-0791 および代謝物の血漿中濃度および尿中排泄率

石井康行・亀井啓介・柴田雅彦・堀越純子

秋山博子・濱島健二・早瀬 清

日本メルク萬有株式会社研究所

Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791), 各 10 mg/kg をラットに急速静脈内投与, またウサギ, 成熟犬および幼若犬には点滴静脈内投与し, MK-0791 およびその主代謝物 N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度推移および尿中排泄率について検討し, 以下の結果を得た。

1. 未変化 MK-0791 の血漿中半減期は, ラットおよびウサギでは 15.6 および 12.7 分であったが, 成熟および幼若犬では 83.1 および 55.6 分であり, 種差が認められた。
2. N-アセチル MK-0791 はラットにおいて半減期 7.5 分で血漿中より消失した。また他の動物種では N-アセチル MK-0791 は全時点を通じて血漿中に微量が検出されたにすぎず, 幼若犬では全く認められなかった。
3. 未変化 MK-0791 の尿中排泄率はラット, ウサギ, 成熟犬および幼若犬でそれぞれ 0.6, 16.8, 42.7 および 31.2% であり, 種差が認められた。
4. N-アセチル MK-0791 の尿中排泄率はラット, ウサギおよび成熟犬でそれぞれ 14.0, 40.1 および 12.4% であった。また幼若犬では検出限界以下であった。

Cilastatin sodium (MK-0791) は腎の dehydropeptidase-I の特異的阻害剤であり, この酵素による imipenem (MK-0787) の水解不活化を抑制する<sup>1)</sup>。その結果, 未変化 MK-0787 の尿中回収率が飛躍的に増加する<sup>1)</sup>。また, MK-0791 は MK-0787 の腎毒性をも抑制することが報告されている<sup>2)</sup>。これらのことから MK-0791 の臨床上の有用性が認められるが, MK-0791 は生体内で代謝され *in vitro* での dehydropeptidase-I 阻害活性が約 2 倍高い N-アセチル MK-0791 に変換される<sup>1)</sup>。この N-アセチル MK-0791 は実験動物およびヒトの尿中に主代謝物として排泄されることが報告されているが<sup>1)</sup>, 血漿中での動態についての報告はまだない。

そこで, 今回著者らは MK-0791 を MK-0787 と併用してラット, ウサギ, 成熟犬および幼若犬に投与し, 未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度推移および尿中排泄率について検討を行ったので報告する。

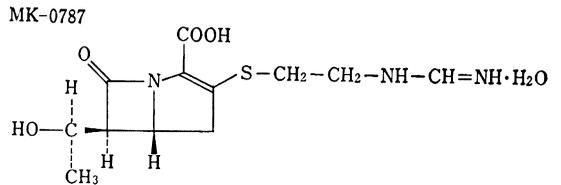
### I. 実験材料および方法

#### 1. 被験薬物および試薬

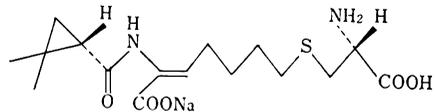
MK-0787, MK-0791, N-アセチル MK-0791 および S-(p-methylbenzyl)-L-cysteine は MSDRL より供与されたものを使用した。N-propionyl MK-0791 は日本メルク萬有株式会社で合成したものをを使用した。また

S-benzyl-L-cysteine は東京化成工業株式会社製を使用した。薬物の構造式は Fig.1 に示した。なお, N-アセ

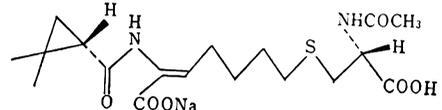
Fig.1 Chemical structure of MK-0787, MK-0791 and N-acetyl MK-0791



MK-0791



N-acetyl MK-0791



チル MK-0791 の値は全て MK-0791 へ換算した。

## 2. 実験動物

動物は、Sprague-Dawley 系雌性ラット (体重 208~233 g), 日本白色在来種 雄性 家 兎 (体重 2.94~3.12 kg), 成熟雄性ビーグル犬 (体重 10.3~10.7 kg) および 幼若雌雄ビーグル犬 (体重 1.08~1.18 kg) を使用した。

## 3. 投与薬物の調製および投与方法

MK-0787 および MK-0791 はいずれも用時生理食塩液または 0.03% 炭酸水素ナトリウムを含有した生理食塩液に溶解し, いずれの動物種においても 10/10 mg/kg の投与量にて使用した。

ラットの場合は, 尾静脈より急速投与し, ウサギおよびイヌの場合はそれぞれ耳介静脈および前腕皮静脈より点滴にて 1.38 ml/min の速度で投与した。

## 4. 試料の採取

血液はラットでは大腿動・静脈より, ウサギでは耳介静脈より, またイヌでは頸静脈よりそれぞれ所定の時刻にヘパリン処理した試験管に採取し, 遠心分離後得られた血漿に等容量の MES 緩衝液 [1M 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (pH 6.0)/Ethylene glycol (1:1, v/v)] を混合し測定試料とした。

尿はラットではシリコンチューブ付ペニスキャップを装着し所定の時刻にエーテル吸入により強制的に排尿させた。ウサギおよびイヌではいずれも導尿カテーテルを用い, 経時的に採尿した。採尿はラットの投与後 6-24 時間尿以外はいずれも氷冷下で行い, 得られた尿に等容量の MOPS 緩衝液 [1M 3-(*N*-Morpholino) propane-sulfonic acid (pH 6.8)/Ethylene glycol (1:1, v/v)] を混合し, 測定試料とした。

## 5. 血漿中濃度の測定

未変化 MK-0791 は前報<sup>3)</sup>で報告した方法に従って試料をメタノール処理後, 蛍光検出器を装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定した。N-アセチル MK-0791 は Bond Elut<sup>®</sup> SAX カラム (Analytichem International 社) により抽出後, さらに塩酸性下で酢酸エチル抽出を行い, 紫外線検出器を装着した HPLC にて測定した。

## 6. 尿中排泄の測定

未変化 MK-0791 は前報<sup>3)</sup>で報告した方法に従って測定した。試料を SEP PAK<sup>®</sup> C<sub>18</sub> カートリッジ (Waters 社) で処理し, 蛍光検出器装着の HPLC にて測定した。N-アセチル MK-0791 は Bond Elut<sup>®</sup> SAX カラムにて抽出し抽出液を紫外線検出器装着の HPLC にて測定した。

## 7. 高速液体クロマトグラフィー

### a) 未変化 MK-0791

前報<sup>3)</sup>に示した。

### b) N-アセチル MK-0791

ガードカラム: MPLC RP-18 SPHERI-10, 18-GU (Brownlee Labs.)

分析カラム: ERC-ODS-1162(4.6×100 mm, Erma Optical Works)

移動相: 1% リン酸緩衝液 (トリエチルアミンにて pH 4.0 に調製)/メタノール (3:2, v/v), 0.2~0.5% アセトニトリル含有

流速: 1.0 ml/min

検出器: 紫外線検出器

測定波長: 210 nm

内部標準物質: N-propionyl MK-0791

## II. 結 果

### 1. ラット

MK-0787/MK-0791, 各 10 mg/kg を急速静脈内投与した後の MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度推移を Fig. 2 に示した。投与後 5 分の未変化 MK-0791 の血漿中濃度は 39.6  $\mu$ g/ml であり, それ以降指数関数的に減少し 1 時間以降では検出されなかった。これを 2-コンパートメントモデルで解析した結果, 未変化 MK-0791 の血漿中半減期 ( $\beta$  相) および AUC は 15.6 分および 7.5  $\mu$ g·hr/ml であった (Table 1)。また, Fig. 2 に示したように, 血漿中 N-アセチル MK-0791 は投与後 45 分まで 7.5 分の半減期で消失し, 2 時間以降は検出されなかった。[AUC]<sub>0-0.8</sub> は 2.6  $\mu$ g·hr/ml であった。

未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の尿中排泄率を Table 2 に示した。MK-0791 はその大部分が代謝され, 24 時間までの尿中には未変化 MK-0791

Fig. 2 Plasma levels of MK-0791 and N-acetyl MK-0791 following intravenous administration of MK-0787/MK-0791(10/10mg/kg) to rats ( $n=3$ )

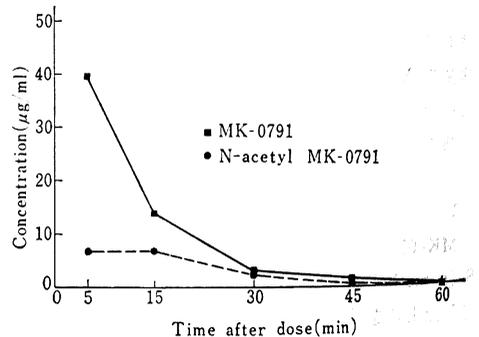


Table 1 Pharmacokinetic parameters of MK-0791 obtained from plasma level

Animal	Rat	Rabbit
Route	i.v. bolus	i.v. infusion
Dosed drug	MK-0787/MK-0791	MK-0787/MK-0791
Dose (mg/kg)	10/10	10/10
Kel (min <sup>-1</sup> )	0.101	0.057
Vdss (ml/kg)	184	184
Cl (ml/min/kg)	22	10
AUC (μg·hr/ml)	7.5	16.5
t1/2 (min)	15.6	12.7
Max conc. (μg/ml)	70.5	—
Css (μg/ml)	—	450

Parameters of MK-0791 were derived from two-compartment and one-compartment models for rats and rabbits, respectively.

Table 2 Urinary excretion of MK-0791 and N-acetyl MK-0791 following intravenous administration of MK-0787/MK-0791 (10/10mg/kg) to rats

Time (hr)	Urinary excretion (% of dose)	
	MK-0787/MK-0791	
	MK-0791	N-acetyl MK-0791
0-1	0.5±0.2	10.6±3.0
1-2	0.1±0.1	2.7±1.0
2-4	N.D.	0.6±0.2
4-6	N.D.	0.1±0.1
6-24	N.D.	N.D.
Total	0.6±0.3	14.0±2.8

Values are expressed as mean ± S.E. of 4-5 rats.  
N.D.=Not detected

としては僅かに0.6%が排泄されるにすぎず、しかも2時間以降の尿には検出されなかった。一方、N-アセチル MK-0791 は24時間までに14.0%が尿中に排泄され、そのうち約76%は1時間までに排泄された。

## 2. ウサギ

MK-0787/MK-0791, 各10 mg/kgを点滴静脈内投与した後の未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度推移を Fig. 3 に示した。未変化 MK-0791 の血漿中濃度は、投与終了後5分で39.5 μg/mlであり、以降指数関数的に減少し、4時間では検出されなかった。未変化 MK-0791 の血漿中濃度推移は、1-コンパートメントモデルに適合した。血漿中からの消失は速くその半減期は12.7分であり、AUCは16.5 μg·hr/mlであった (Table 1)。N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度は投与終了後5から30分までは1.0~1.6 μg/mlとほぼ一定であり、2時間では検出されなかった。

尿中排泄率は Table 3 に示した。12時間までの尿中に未変化 MK-0791 は16.8%、N-アセチル MK-0791

は40.1%が排泄された。未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 は、いずれも尿中排泄速度が速く、総排泄量の70%以上が2時間以内に排泄された。

## 3. 成熟犬

MK-0787/MK-0791, 各10 mg/kgを点滴静脈内投与した後の未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度推移を Fig. 4 に示した。投与終了後5分での未変化 MK-0791 の血漿中濃度は43.9 μg/mlであり、以降指数関数的に減少した。半減期および [AUC]<sub>0-8</sub> はそれぞれ83.1分および35.4 μg·hr/mlであった。N-アセチル MK-0791 は30分で最高値を示したが、その濃度は1.2 μg/mlであり4時間では検出されなかった。

未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の12時間までの尿中排泄率は Table 4 に示したように、それぞれ42.7 および12.4%であり、いずれもその約80%が2時間以内に排泄された。N-アセチル MK-0791 は

Fig. 3 Plasma levels of MK-0791 and N-acetyl MK-0791 following intravenous infusion of MK-0787/MK-0791 (10/10mg/kg) to rabbits (n=6)

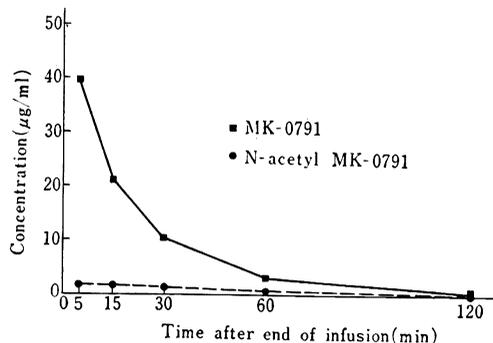


Table 3 Urinary excretion of MK-0791 and N-acetyl MK-0791 following intravenous infusion of MK-0787/MK-0791 (10/10mg/kg) to rabbits

Time (hr)	Urinary excretion (% of dose)	
	MK-0787/MK-0791	
	MK-0791	N-acetyl MK-0791
0-2	12.2±2.5	29.1±8.3
2-4	4.1±2.3	8.8±4.1
4-6	0.4±0.1	1.9±0.7
6-8	0.1±0.0	0.4±0.4
8-12	N.D.	N.D.
Total	16.8±1.7	40.1±7.6

Values are expressed as mean ± S.E. of 6 rabbits. N.D.=Not detected

6時間以降の尿中には検出されなかった。

4. 幼若犬

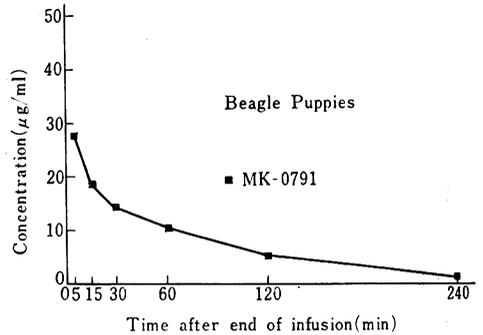
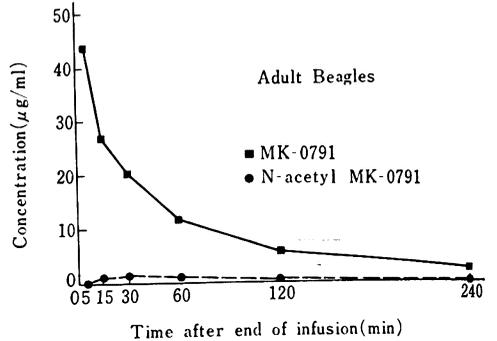
MK-0787/MK-0791, 各 10 mg/kg を点滴静脈内投与した後の未変化 MK-0791 の血漿中濃度推移を Fig. 4 に示した。投与終了後5分の未変化 MK-0791 の血漿中濃度は 27.2 µg/ml であり, 55.6 分の半減期で指数関数的に減少した。また [AUC]<sub>0-∞</sub> は, 26.7 µg·hr/ml であった。N-アセチル MK-0791 は全ての時点で検出されなかった。

投与終了後から 12 時間までの尿中に回収された未変化 MK-0791 は 31.2% で, 4 時間までにその約 85% が排泄された (Table 4)。N-アセチル MK-0791 はクロマトグラム上は僅かながら認められたが, その量は全て検出限界以下であった。

III. 考 察

MK-0787/MK-0791, 各 10 mg/kg を各動物種に投与

Fig. 4 Plasma levels of MK-0791 and N-acetyl MK-0791 following intravenous infusion of MK-0787/MK-0791 (10/10mg/kg) to adult beagles (n=2) and beagle puppies (n=2)



した後の未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿および尿中の動態について検討した。

ラットおよびウサギにおける未変化 MK-0791 の血漿中からの消失は極めて速いが, イヌでは成熟, 幼若とも上記二種の動物の半減期より長く種差が認められた。

Table 4 Urinary excretion of MK-0791 and N-acetyl MK-0791 following intravenous infusion of MK-0787/MK-0791 (10/10mg/kg) to adult beagles and beagle puppies

Time (hr)	Urinary excretion (% of dose)											
	Adult beagle						Beagle puppy					
	MK-0791			N-acetyl MK-0791			MK-0791			N-acetyl MK-0791		
	# 1	# 2	ave.	# 1	# 2	ave.	# 1	# 2	ave.	# 1	# 2	ave.
0-2	26.2	46.1	36.2	8.7	10.6	9.7	16.3	12.7	14.5	N.D.	N.D.	N.D.
2-4	1.4	7.8	4.6	0.7	4.2	2.5	13.8	10.8	12.3	N.D.	N.D.	N.D.
4-6	1.6	0.6	1.1	0.4	N.D.	0.2	3.5	1.9	2.7	N.D.	N.D.	N.D.
6-8	0.6	0.2	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	1.6	0.4	1.0	N.D.	N.D.	N.D.
8-12	0.5	0.2	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	0.9	0.5	0.7	N.D.	N.D.	N.D.
Total	30.3	54.9	42.7	9.8	14.8	12.4	36.1	26.3	31.2	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.=Not detected ave.=Average

別に報告<sup>4)</sup>した通り MK-0791 の血漿タンパク結合率はラット、ウサギおよび成熟犬でそれぞれ 16, 34 および 32% であるから、血漿タンパク結合率のみにより、イヌにおける血漿中濃度推移は説明できなかった。

いずれの動物種においても未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の尿中への排泄は速いが、それらの排泄量はいずれも互いに異なっており、MK-0791 の排泄および代謝における種差が認められた。一方、<sup>14</sup>C-MK-0791/MK-0787 を用いた実験では、放射能の尿中排泄率はラットでは約 50%、ウサギでは約 96% また成熟犬では約 83% であることが報告されている<sup>5),6)</sup>。今回の実験では、未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の合計の尿中排泄率はラットでは約 15%、ウサギでは約 57% また成熟犬では約 55% であることより、N-アセチル MK-0791 以外の代謝物の存在も示唆された。これら未知代謝物については、MSDRL との共同実験によってウサギおよびアカゲザルの尿中に主代謝物である N-アセチル MK-0791 を含めて、スルホキソド体ヤシステイン部分の切断したものなど少なくとも 10 個は存在していることを明らかにした<sup>5)</sup>。このことからラットおよびイヌにおいても同様な代謝物の存在の可能性が示唆され、MK-0791 の活発な代謝がうかがわれた。

ウサギおよび成熟犬では N-アセチル MK-0791 の血漿中濃度がかかなり低いにもかかわらず、尿中排泄率はそれぞれ 40.1 および 12.4% であることより、これらの動物種における MK-0791 のアセチル化は主に腎において行われているものと考えられる。これに対して、ラットの場合は血漿中に N-アセチル MK-0791 が存在することより、腎以外の臓器においてもアセチル化が起っていると考えられる。なお、これらの動物種における N-アセチル MK-0791 の尿中排泄量はウサギで最も高い値を示したが、これは一般にウサギでは N-アセチル化能が高い事の現れであると考えられる<sup>7)</sup>。

また、成熟および幼若犬における未変化 MK-0791 の生体内動態は別の報告<sup>4)</sup>にて、両者に差異がないことを示したが、今回の実験においては、未変化 MK-0791 は幼若犬で排泄がやや遅れる傾向にあった。また N-アセチル MK-0791 の尿中排泄率には明らかな差異が認められた。これは一般に幼若動物では薬物代謝酵素が未発達であることから、幼若犬においても N-アセチル化に関与する酵素が未発達であり、そのため排泄率に差異が生じたと考えられる。

以上、各動物種における未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿および尿中での動態より MK-0791 の活発な代謝が示唆された。

なお、今回の実験では MK-0787/MK-0791 投与であっ

たが、MSDRL との共同実験<sup>5)</sup> および前報<sup>9)</sup> によって、MK-0791 投与と MK-0787/MK-0791 投与との間に MK-0791 の生体内動態に関する差異が認められないことを報告した。

また、MK-0791 の生体内での作用機構については、KAHAN ら<sup>1)</sup>によって MK-0791 は腎の刷子縁上に局在する dehydropeptidase-I による MK-0787 の加水分解を阻害し、未変化 MK-0787 の尿中回収率を著しく増大させることが示されている。さらに彼らは MK-0791 および MK-0787 が尿細管分泌も行っていることから、尿細管分泌によって MK-0791 が刷子縁上に局在する dehydropeptidase-I に接近し、MK-0787 と競合的に作用することによって、この酵素を不活性化し、未変化 MK-0787 の尿中回収率を増大させていると推論している。さらに、ヒト腎より単離した dehydropeptidase-I を用いた CAMPBELL ら<sup>9)</sup>によって、MK-0791 の阻害作用が可逆的な拮抗阻害であることが示されている。これらのことと今回得た結果である MK-0791 の活発な代謝がどのように結び付くのか、現段階では不明である。

以上、実験動物種での未変化 MK-0791 および N-アセチル MK-0791 の血漿および尿中での動態について述べてきたが、ヒトについては MSDRL との共同実験<sup>5)</sup>において、MK-0791 は尿中に未変化体として約 80% また N-アセチル体として約 10% が排泄されていることを明らかにしている。また、別の実験において著者らはヒト血漿中には N-アセチル MK-0791 が存在しないことも確認している。このように、MK-0791 の代謝は実験動物種とヒトではかなり異なっているが、MK-0791 のアセチル化が主として腎で起っている事については共通していると考えられる。

## 文 献

- 1) KAHAN, F. M.; H. KROPP, J. G. SUNDELÖF & J. BIRNBAUM: Thienamycin; development of imipenem-cilastatin. *J. Antimicrob. Chemother.* 12(Suppl. D): 1~35, 1983
- 2) 白井敏仁, 久野博司, 来原兄忠, 小林速雄: Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791) の安全性に関する研究 (第 5 報)—MK-0787 の腎毒性に及ぼす MK-0791 の防禦効果—。 *Chemotherapy* 33(S-4): 217~226, 1985
- 3) 亀井啓介, 岡崎明彦, 岡田則子, 濱島健二: Cilastatin sodium (MK-0791) の体液および組織内濃度測定法。 *Chemotherapy* 33(S-4): 282~289, 1985
- 4) 濱島健二, 小林速雄, 亀井啓介, 柴田雅彦, 堀越純子, 早瀬 清, 澁谷正興, 岩本里美: イヌおよびウサギにおける Imipenem (MK-0787), Cilastatin sodium (MK-0791) の血漿中濃度および尿中排泄。 *Chemotherapy* 33(S-4): 315~322,

- 1985
- 5) ZACCHEI, A. G.; J. G. MACDONALD, L. L. WEINDER, J. D. ROGERS & K. HAYASE: Pre-clinical disposition, metabolism and safety assessment of imipenem and cilastatin. (To be submitted)
- 6) KROPP, H. et al.: Physiological disposition of MK-0791 in various mammalian species following intravenous dosing of radiolabeled MK-0791 alone or combination with MK-0787 (MSDRL data)
- 7) 戸部満壽夫, 堀内茂友編: 実験医学のめざす外挿—実験動物からヒトへ, 薬物の代謝からみた動物実験からヒトへの外挿 (加藤隆一), 39~75 頁, 清至書院, 1984
- 8) 原 健一, 柴田雅彦, 小林速雄, 濱島健二, 早瀬清, 澁谷正興, 佐々木洋明: ラットにおける Imipenem (MK-0787) および Cilastatin sodium (MK-0791) の生体内動態 (I)。Chemotherapy 33 (S-4): 290~304, 1985
- 9) CAMPBELL, B. J.; L. J. FORRESTER, W. L. ZAHLER, & M. BURKS:  $\beta$ -Lactamase activity of purified and partially characterized human renal dipeptidase. J. Biol. Chem. 259: 14586-14590, 1984

## PHARMACOKINETICS OF CILASTATIN SODIUM

### PLASMA LEVELS AND URINARY EXCRETION OF CILASTATIN SODIUM AND METABOLITE

YASUYUKI ISHII, KEISUKE KAMEI, MASAHICO SHIBATA, JUNKO HORIKOSHI  
HIROKO AKIYAMA, KENJI HAMAJIMA and KIYOSHI HAYASE  
Research Laboratories, Nippon Merck-Banyu Co., Ltd.

Plasma levels and urinary excretion of cilastatin sodium (MK-0791) and N-acetyl MK-0791 were studied in rats following intravenous bolus injection and in rabbits, adult beagles and beagle puppies following intravenous infusion of MK-0787/MK-0791 at a dose of 10/10 mg/kg and following results were obtained.

1) The half-life of intact MK-0791 was 15.6 and 12.7 min in rats and rabbits, respectively, and adult beagles and beagle puppies showed a half-life of 83.1 and 55.6 min, respectively.

2) In rats, N-acetyl MK-0791 disappeared from the plasma with a half-life of 7.5 min. A small amount of N-acetyl MK-0791 was found in the other species, but in beagle puppy plasma, no N-acetyl MK-0791 was detected.

3) Urinary excretion of intact MK-0791 was 0.6, 16.8, 42.7 and 31.2% of the dose in rats, rabbits, adult beagles and beagle puppies, respectively.

4) Urinary excretion of N-acetyl MK-0791 was 14.0, 40.1 and 12.4% of the dose in rats, rabbits and adult beagles, respectively, and in beagle puppies, no N-acetyl MK-0791 was detected.