

## Clavulanic acid および BRL 28500 のラットおよびイヌにおける体内動態

熊倉博之・石井隆太郎・西岡佳隆・幸嶋祥亘

ビーチャム薬品株式会社

江角凱夫・三次孝一・埴真也

仙田哲・渡辺勇夫・横島徹熹

第一化学薬品株式会社東海研究所

GRAHAM MELLOWS

Beecham Pharmaceuticals Research Division

$^{14}\text{C}$ -CVA-K,  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 あるいは TIPC をラットおよびイヌに静脈内投与し, 吸収・分布・代謝および排泄について検討を行い, 以下の結果を得た。

- $^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットおよびイヌに静脈内投与した際, 血液中放射能濃度は 3 相性で消失した。投与後 24 時間以降の半減期はラットで 68.35 hr, イヌで 118.34 hr であった。
- $^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに静脈内投与した際, 放射能はほぼ全身に分布し, 膀胱, 膀胱内貯尿, 腎臓, 肝臓に高く, 中枢神経系, 脂肪, 精囊, 睪丸, 前立腺に低かった。また, CVA の濃度は腎臓, 血漿, 肝臓, 肺, 心臓, 睪丸, 脾臓, 筋肉の順に高かった。
- $^{14}\text{C}$ -CVA-K の主排泄経路はラット, イヌとも尿中であり, 一部は  $^{14}\text{CO}_2$  として呼気中へ排泄された。一方, 胆汁を経由して糞中へ排泄された放射能は極めて少なかった。
- CVA はラット, イヌとも生体内で代謝を受けるが, 尿中に排泄された放射能のうち, CVA の割合が最も多かった。
- $^{14}\text{C}$ -CVA-K を授乳中ラットに静脈内投与した際, 放射能は乳汁中へ移行したものの, 乳汁からの消失は血液より速く, 放射能が長期にわたり乳汁中に認められる傾向はなかった。
- $^{14}\text{C}$ -CVA-K を妊娠ラットに静脈内投与した際, 放射能は胎仔へ移行したものの, その濃度は母体血漿より低くかつ残留する傾向はなかった。
- $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をラットに静脈内投与した際, CVA の生体内動態は  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与時とほぼ同様であった。さらに, TIPC の生体内動態も TIPC 投与時と大きな相違は認められなかった。また, イヌにおける  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与時の CVA の生体内動態も  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与時と同様であった。

BRL 28500 は Clavulanic acid (CVA) のカリウム塩<sup>1-3)</sup> (CVA-K; Fig. 1) と Ticarcillin (TIPC; Fig. 1) を 1:15 に配合した抗生物質である。BRL 28500 は CVA が種々の  $\beta$ -lactamase を阻害するため,  $\beta$ -lactamase 産生により TIPC に対して耐性であった細菌に対しても抗菌活性を示す<sup>4,5)</sup>。

今回,  $^{14}\text{C}$ -CVA-K,  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 ( $^{14}\text{C}$ -CVA-K+TIPC) あるいは TIPC を用いて吸収・分布・代謝・排泄について検討したので, その結果を報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

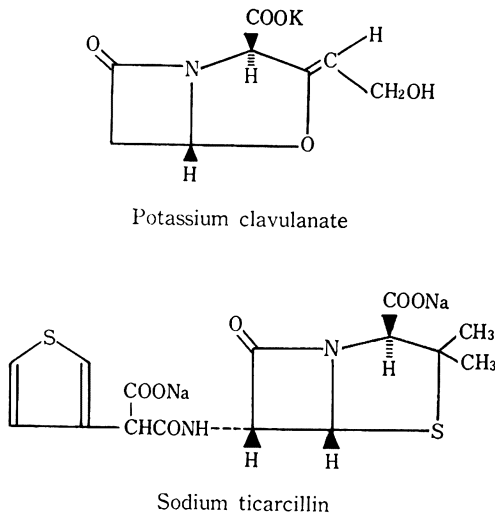
$^{14}\text{C}$ -CVA-K は hydroxymethyl 基の炭素がやや低いのを除き, すべての炭素がほぼ均一に標識されたものを使

用した<sup>6)</sup>。 $^{14}\text{C}$ -CVA-K の比放射能は 5.84~12.94  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ , 放射化学的純度は 96% 以上であった。なお, 放射化学的純度の検定は薄層クロマトグラフィーを用いて行った。また, 所定の比放射能にするため, 非標識 CVA-K を使用した。このほか, TIPC を使用した。さらに,  $^{14}\text{C}$ -CVA-K に TIPC を力価として 1:15 の割合に混合したものを  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 として使用した。

## 2. 実験動物

日本チャールス・リバーより購入した 7~8 週齢の Crj: CD(SD) 雄性 (体重; 250~299 g), 同系妊娠 18 日目 (体重; 317~414 g), 同系分娩後 14 日授乳中ラット (体重; 332~340 g) および L. R. E. より購入した体重 10 kg 前後のビーグル犬を使用した。購入後ラットは

Fig. 1 Chemical structure of CVA-K and TIPC



1 週以上、イヌは1 カ月以上それぞれ予備飼育し、実験に供した。

### 3. 投与方法

$^{14}\text{C}$ -CVA-K,  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 あるいは TIPC は注射用蒸留水に溶解し、それぞれ静脈内に投与した。なお、 $^{14}\text{C}$ -CVA-K,  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 および TIPC の投与量はそれぞれ 12.5 mg/kg, 200 mg/kg, 187.5 mg/kg とし、投与液量はラット、イヌでそれぞれ 1.2 ml/kg, 0.5 ml/kg とした。

### 4. 生体試料の採取

#### 1) 血液、尿、糞、呼吸および組織試料

ラットの血液は尾静脈より 100  $\mu\text{l}$ 、イヌの血液は後肢外側伏在静脈より約 5 ml をそれぞれ経時的に採取した。イヌの血液はヘパリンナトリウム入り真空採血管に採取し、その一部を遠心分離し、血漿を得た。

尿、糞および呼吸の採取に際しては、これらが同時に採取できる代謝ケージにラットあるいはイヌを収め、ラットとイヌの尿およびラットの糞については、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) の入った容器に遮光水冷下で、イヌの糞はそのまま金網上に採取した。呼吸中  $^{14}\text{CO}_2$  は代謝ケージに空気を通じながら 20% モノエタノールアミン水溶液に捕集した。

臓器、組織はラットを所定時間にエーテル軽度麻酔下、頸動脈切断により放血死させ、所定ものを摘出し、その重量を測定した。なお、同時に得られた血液から血漿を分離し、血漿中放射能、CVA および TIPC 測定用試料とした。

#### 2) 胆汁試料

エーテル麻酔下でラットの総胆管にポリエチレンチューブを挿入した後、ポールマンケージに収め、麻酔覚醒

後  $^{14}\text{C}$ -CVA-K あるいは  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 を投与し、所定時間に尿および胆汁を遮光水冷下で 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) の入った容器にそれぞれ採取した。

#### 3) 乳汁試料

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに投与した後、所定時間にエーテル軽度麻酔下で胸部および鼠径部乳頭から乳汁を 50  $\mu\text{l}$  採取した。同時に尾静脈から血液を 100  $\mu\text{l}$  採取した。

#### 5. 放射能測定用試料の調製

尿および胆汁は氷冷した 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 6.5) を加えてそれぞれ一定量とし、糞は同緩衝液で一定量としたのち攪拌均質化し、それぞれその 0.5 ml にシンチレーター Aquasol-2 (NEN) を 10 ml 加えた。呼吸中  $^{14}\text{CO}_2$  を捕集した 20% モノエタノールアミン水溶液はその 0.5 ml にシンチレーター ATOMLIGHT (NEN) を 10 ml 加えた。血液、血漿、各組織および乳汁については、その一定量を乾燥し、自動燃焼装置 (PAC KARD, Tri-Card 306) で燃焼し、 $\text{CO}_2$  吸収剤 Oxisorb- $\text{CO}_2$  (NEN) 6 ml に吸収させたのち、シンチレーター Oxiprep-2 (NEN) を 12 ml 加えた。その他の試料についてはエマルジョン系シンチレーター (トルエン 1 L, PPO 4 g, POPOP 0.1 g, ノニオン NS-200 500 ml) 10 ml を加え、放射能測定用試料とした。

#### 6. 放射能の測定

放射能測定用試料は液体シンチレーションカウンター (ALOCA LSC-903) で放射能を計数した。計数効率の補正は外部標準線源によるチャンネル比法によった。

#### 7. 全身オートラジオグラフィ

$^{14}\text{C}$ -CVA-K あるいは  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 を投与後、所定時間にラットをエーテル麻酔死させ、 $-70^\circ\text{C}$  のドライアイス・アセトンで凍結し、クライオミクロトーム (PALMSTIERNAS MAKAIKA VERKSTAD, CRYO MICROTOME 450 MP) により約 30  $\mu\text{m}$  厚の全身切片を作製した。得られた切片を X 線フィルム (小西写真 (株), SCRE) と密着させ、全身オートラジオグラムを作製した。

#### 8. 微生物学的定量法

CVA および TIPC の定量は大型平板寒天穿孔法による標準曲線法で実施した。尿、胆汁試料については放射能測定用試料と同時に調製し、組織は 2~4 倍の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 6.5) を加え、磨砕後遠心分離して得られた上澄を用いた。

なお、希釈を要する際には、無投与ラットの各組織を同様に処理して得られた上澄を用いた。

#### 1) CVA

検定菌として *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 株を用いた。Nutrient agar (Oxoid pH 7.0) 培地に所定量

の Bacto-agar (Difco) を加え、高圧蒸気滅菌したのち、菌液 ( $10^8$  cells/ml) およびベンジルペニシリンをそれぞれ一定量加え、大型平板に流し固化させた。固化後、寒天に穿孔を作り標準液および試料液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ注入し、 $37^\circ\text{C}$  で一晚培養後、その阻止円径を測定し CVA 濃度を算出した。

## 2) TIPC

検定菌として *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10701 株を用いた。寒天平板の作製に際しては、Antibiotic medium No. 2 (Difco pH 7.0) に所定量の Bacto-agar (Difco) を加え、高圧蒸気滅菌したのち、菌液 ( $10^8$  cells/ml) を所定量加え、大型平板に流し固化させた。固化後、寒天に穿孔を作り標準液および試料液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ注入し、 $37^\circ\text{C}$  で一晚培養後、その阻止円径を測定し TIPC 濃度を算出した。

## 9. 尿中代謝物の分析

投与後 6 時間の尿を分析試料とした。尿はその一定量を凍結乾燥し、メチルアルコールで溶出した。溶出液を減圧濃縮したのち標準物質として CVA-K および CVA-K をラットまたはイヌに経口投与した際の尿中主要代謝物である 1-amino-4-hydroxybutan-2-one (AHB)<sup>7)</sup> とともに TLC の分析に供した。TLC にはシリカゲル F<sub>254</sub> プレート (E. Merck) を用い n-ブチルアルコール：エチルアルコール：水：ギ酸 (20 : 10 : 10 : 1) で 15 cm 展開した。展開後、TLC 上の CVA の位置を紫外線ランプ (254 nm) で、AHB の位置をニンヒドリン溶液噴霧により確認した。ついで TLC プレートに X 線フィルム (富士写真フィルム(株), RX) を密着露出させ、得たオートラジオグラムの黒化相当部のシリカゲルを削りとり放射能を測定し、尿中代謝物の存在比を求めた。

## II. 実験結果

### 1. 血液・血漿中濃度推移

#### 1) ラット

##### i) 血液

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに静脈内投与した際の血液中放射能濃度推移を Fig 2-A に示した。放射能濃度は投与後 5 分に  $15.66 \mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示し、以後 3 相性で消失した。投与後 96 時間には 5 分の濃度の 1% に減少した。投与後 24 時間以降の半減期は  $68.35 \text{ hr}$ 、投与後 96 時間までの AUC は  $64.77 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。

$^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をラットに静脈内投与した際の血液中放射能濃度推移を Fig 2-B に示した。放射能濃度は、投与後 5 分に  $19.10 \mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示し、以後 3 相性で消失した。投与後 96 時間には 5 分の濃度の 1% に減少した。投与後 24 時間以降の半減期は  $54.25 \text{ hr}$ 、投与後 96 時間までの AUC は  $67.69 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。 $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と比較すると、血液中放射能濃度の半減期、AUC に顕著な相違は認められなかった。

##### ii) 血漿

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに静脈内投与した際の血漿中放射能濃度および CVA 濃度の推移を Fig. 3-A に示した。放射能濃度は投与後 5 分に  $33.14 \mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示し、投与後 6 時間には 5 分の濃度の 3% に減少した。CVA 濃度は投与後 5 分に  $31.57 \mu\text{g/ml}$  を示し、以後半減期  $0.27 \text{ hr}$  で消失した。投与後 2 時間までの CVA 濃度の AUC は  $8.89 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。放射能濃度に対する CVA 濃度 (CVA/RA) の値は、投与後 5 分、30 分、2 時間でそれぞれ 0.95, 0.85, 0.11 であった。

TIPC をラットに静脈内投与した際の血漿中 TIPC 濃度推移を Fig. 3-B に示した。TIPC 濃度は投与後 5 分に  $646.37 \mu\text{g/ml}$  を示し、以後半減期  $0.21 \text{ hr}$  で消失した。投与後 2 時間までの AUC は  $205.84 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。

$^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をラットに静脈内投与した際の血漿中

Fig. 2 Blood concentrations of radioactivity after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 (200 mg/kg) to male rats. Each point represents mean of three animals.

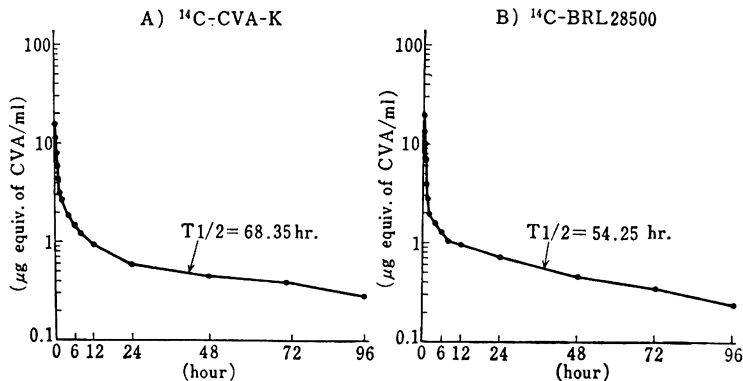


Fig. 3 Plasma concentrations of radioactivity, CVA and TIPC after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg), TIPC (187.5 mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 (200 mg/kg) to male rats. Each point represents the mean of three animals.

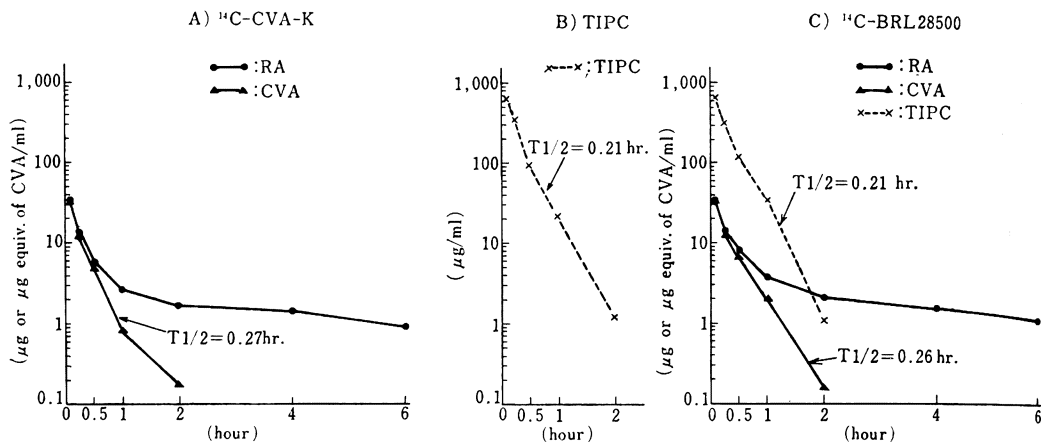
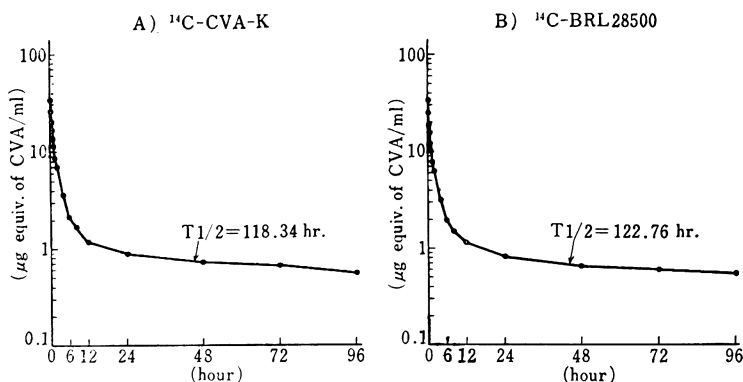


Fig. 4 Blood concentrations of radioactivity after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 (200 mg/kg) to male dogs. Each point represents the mean of three animals.



放射能濃度, CVA および TIPC 濃度推移を Fig. 3-C に示した。放射能濃度は5分に  $34.89 \mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示し, 投与後6時間には5分の濃度の3%に減少した。CVA 濃度は投与後5分に  $33.01 \mu\text{g/ml}$  を示し, 以後半減期  $0.26 \text{ hr}$  で消失した。投与後2時間までの CVA 濃度の AUC は  $10.73 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。投与後5分, 30分, 2時間における CVA/RA 値はそれぞれ  $0.95$ ,  $0.86$ ,  $0.08$  であった。TIPC 濃度は投与後5分に  $649.18 \mu\text{g/ml}$  を示し, 以後半減期  $0.21 \text{ hr}$  で消失した。投与後2時間までの TIPC 濃度の AUC は  $215.66 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。

$^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と比較すると, CVA 濃度の半減期, AUC, CVA/RA 値に顕著な相違は認められなかった。さらに, TIPC 投与群と比較すると, TIPC 濃度の

半減期および AUC に相違は認められなかった。

## 2) イヌ

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をイヌに静脈内投与した際の血液中放射能濃度推移を Fig. 4-A に, 血漿中放射能濃度および CVA 濃度推移を Fig. 5-A に示した。血液中放射能濃度は投与後5分に  $33.26 \mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示し, 以後3相性で消失した。投与後96時間には5分の濃度の1%に減少した。投与後24時間以降の半減期は  $118.34 \text{ hr}$ , 投与後96時間までの血液中放射能濃度の AUC は  $114.59 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。血漿中放射能濃度は投与後5分に  $58.57 \mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示し, 投与後6時間には5分の濃度の4%に減少した。血漿中 CVA 濃度は, 投与後5分に  $58.62 \mu\text{g/ml}$  を示し, 以後半減期  $0.28$ ,  $0.62 \text{ hr}$  の2相性で消失した。投与後6時間まで

Fig. 5 Plasma concentrations of radioactivity, CVA and TIPC after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 (200 mg/kg) to male dogs.

Each point represents the mean of three animals.

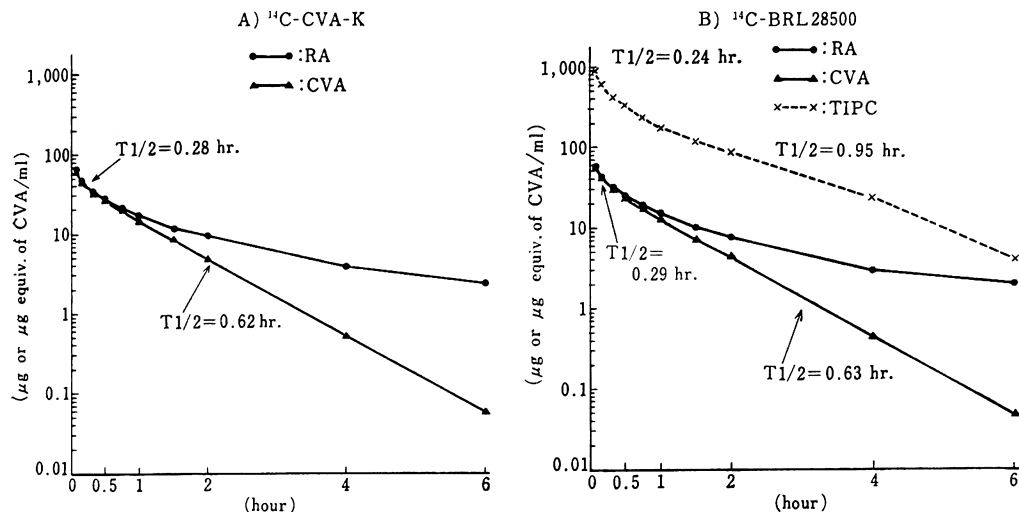


Table 1 Cumulative excretions of radioactivity, CVA and TIPC in urine, feces and expired air after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5mg/kg), TIPC (187.5mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL28500 (200mg/kg) to male rats

Compound	Time (hr.)	Radioactivity (% of dose)				CVA (% of dose)		TIPC (% of dose)
		Urine	Feces	Expired air	Total	Urine	Urine	
$^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5mg/kg)	0-6	80.0 $\pm$ 0.1	—	5.9 $\pm$ 0.1	—	59.2 $\pm$ 1.5		
	24	83.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.0	7.1 $\pm$ 0.2	91.7 $\pm$ 0.3	60.0 $\pm$ 1.5		
	48	84.0 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0.3	92.6 $\pm$ 0.4	—		
	96	84.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.4	93.2 $\pm$ 0.4	—		
TIPC (187.5mg/kg)	0-6						59.8 $\pm$ 0.6	
	24						60.7 $\pm$ 0.5	
$^{14}\text{C}$ -BRL28500 (200mg/kg)	0-6	75.3 $\pm$ 0.5	—	7.3 $\pm$ 0.3	—	56.0 $\pm$ 1.7	59.6 $\pm$ 6.4	
	24	82.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.3	91.2 $\pm$ 0.2	56.4 $\pm$ 1.7	60.4 $\pm$ 6.5	
	48	82.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.3	92.4 $\pm$ 0.3	—	—	
	96	82.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.1	9.0 $\pm$ 0.3	93.5 $\pm$ 0.3	—	—	

The data represent the mean  $\pm$  S.E. of three animals.

— : Not determined.

の血漿中 CVA 濃度の AUC は  $42.78 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。投与後 5 分, 30 分, 2 時間における CVA/RA 値はそれぞれ 1.00, 1.01, 0.51 であった。

$^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をイヌに静脈内投与した際の血液中放射能濃度推移を Fig. 4-B に, 血漿中放射能濃度, CVA および TIPC 濃度推移を Fig. 5-B に示した。血液中放射能濃度は投与後 5 分に  $33.49 \mu\text{g}/\text{ml}$  (CVA 換算) を示し, 以後 3 相性で消失した。投与後 96 時間には 5 分の濃度の 1% に減少した。投与後 24 時間以降の半減期は 122.76 hr, 投与後 96 時間までの血液中放射能濃度の AUC は  $105.59 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。血漿中放射能濃

度は投与後 5 分に  $56.77 \mu\text{g}/\text{ml}$  (CVA 換算) を示し, 投与後 6 時間には 5 分の濃度の 4% に減少した。血漿中 CVA 濃度は, 投与後 5 分に  $56.02 \mu\text{g}/\text{ml}$  を示し, 以後半減期 0.29, 0.63 hr の 2 相性で消失した。投与後 6 時間までの血漿中 CVA 濃度の AUC は  $38.99 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。投与後 5 分, 30 分, 2 時間における CVA/RA 値はそれぞれ 0.99, 0.95, 0.58 であった。 $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と比較すると, 血液中放射能濃度の半減期, AUC および血漿中 CVA 濃度の半減期, AUC, CVA/RA 値に相違は認められなかった。なお, 血漿中 TIPC 濃度は投与後 5 分に  $908.41 \mu\text{g}/\text{ml}$  を示し, 以後

半減期 0.24, 0.95 hr の 2 相性で消失した。投与後 8 時間までの血漿中 TIPC 濃度の AUC は  $651.82 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$  であった。

## 2. 尿, 糞および呼気中への排泄

### 1) ラット

$^{14}\text{C-CVA-K}$ , TIPC あるいは  $^{14}\text{C-BRL 28500}$  をラットに静脈内投与した際の尿, 糞および呼気中排泄率を Table 1 に示した。

$^{14}\text{C-CVA-K}$  投与群では投与後 96 時間までの尿中に投与量の 84.2%, 糞中に 1.2%, 呼気中に 7.9% の放射能が排泄された。投与後 24 時間までの尿中に排泄された CVA は投与量の 60.0% であった。

TIPC 投与群では投与後 24 時間までの尿中に投与量の 60.7% の TIPC が排泄された。

$^{14}\text{C-BRL 28500}$  投与群では投与後 96 時間までの尿中に投与量の 82.8%, 糞中に 1.7%, 呼気中に 9.0% の放射能が排泄された。投与後 24 時間までの尿中に排泄された CVA および TIPC はそれぞれ投与量の 56.4%, 60.4% であった。

放射能の尿, 糞, 呼気中排泄率および CVA の尿中排泄率は  $^{14}\text{C-CVA-K}$  投与群と同様であった。さらに,

TIPC の尿中排泄率は TIPC 投与群とはほぼ一致した。

### 2) イヌ

$^{14}\text{C-CVA-K}$  あるいは  $^{14}\text{C-BRL 28500}$  をイヌに静脈内投与した際の尿, 糞および呼気中排泄率を Table 2 に示した。

$^{14}\text{C-CVA-K}$  投与群では投与後 96 時間までの尿中に投与量の 86.0%, 糞中に 2.1%, 呼気中に 6.8% の放射能が排泄された。投与後 24 時間までの尿中に排泄された CVA は投与量の 31.6% であった。

$^{14}\text{C-BRL 28500}$  投与群では投与後 96 時間までの尿中に投与量の 84.2%, 糞中に 2.6%, 呼気中に 7.3% の放射能が排泄された。投与後 24 時間までの尿中に排泄された CVA および TIPC はそれぞれ投与量の 31.6%, 68.9% であった。 $^{14}\text{C-CVA-K}$  投与群と比較すると放射能の尿, 糞, 呼気中排泄率および CVA の尿中排泄率に相違は認められなかった。

### 3. 胆汁中への排泄

$^{14}\text{C-CVA-K}$  あるいは  $^{14}\text{C-BRL 28500}$  を胆管カニューレラットに静脈内投与した際の胆汁および尿中排泄率を Table 3 に示した。

$^{14}\text{C-CVA-K}$  投与群では, 投与後 24 時間までの胆汁

Table 2 Cumulative excretions of radioactivity, CVA and TIPC in urine, feces and expired air after intravenous administration of  $^{14}\text{C-CVA-K}$  (12.5mg/kg) or  $^{14}\text{C-BRL28500}$  (200mg/kg)

Compound	Time (hr.)	Radioactivity (%of dose)				CVA(%of dose)	TIPC(%of dose)
		Urine	Feces	Expired air	Total	Urine	Urine
$^{14}\text{C-CVA-K}$ (12.5mg/kg)	0-6	76.9±0.9	—	4.9±0.0	—	31.0±3.6	—
	24	84.1±1.3	1.6±0.2	6.2±0.0	91.8±1.2	31.6±3.8	—
	48	85.3±1.2	1.9±0.2	6.5±0.1	93.7±1.0	—	—
	96	86.0±1.2	2.1±0.3	6.8±0.0	94.8±1.0	—	—
$^{14}\text{C-BRL28500}$ (200mg/kg)	0-6	76.9±1.6	—	5.2±0.3	—	31.6±5.0	68.6±1.6
	24	82.6±1.4	2.2±0.2	6.6±0.2	91.4±1.1	31.6±5.0	68.9±1.7
	48	83.7±1.4	2.5±0.2	6.9±0.3	93.1±1.2	—	—
	96	84.2±1.4	2.6±0.2	7.3±0.3	94.1±1.2	—	—

The data represent the mean ±S.E. of three animals.

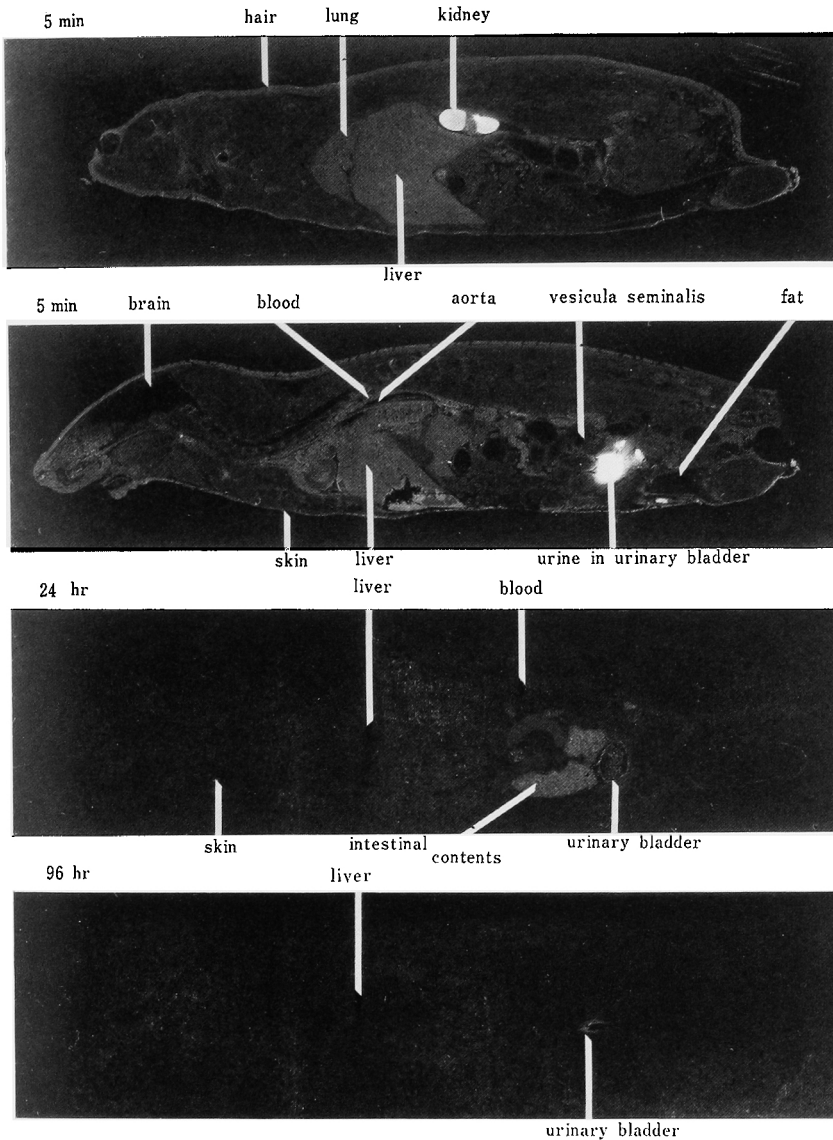
- : Not determined.

Table 3 Cumulative excretions of radioactivity, CVA and TIPC in bile and urine after intravenous administration of  $^{14}\text{C-CVA-K}$  (12.5mg/kg) or  $^{14}\text{C-BRL28500}$  (200mg/kg) to male rats fitted with bile duct cannulae

Compound	Time (hr.)	Radioactivity (%of dose)		CVA (%of dose)		TIPC (%of dose)	
		Bile	Urine	Bile	Urine	Bile	Urine
$^{14}\text{C-CVA-K}$ (12.5mg/kg)	0-6	1.6±0.3	66.8±3.8	0.2±0.0	57.6±2.0	—	—
	12	1.8±0.3	71.9±4.3	0.2±0.0	58.2±1.7	—	—
	24	1.8±0.3	72.9±4.4	0.2±0.0	58.3±1.7	—	—
$^{14}\text{C-BRL28500}$ (200mg/kg)	0-6	3.2±0.2	76.7±1.3	0.7±0.1	54.7±1.4	28.8±4.2	62.3±2.0
	12	3.4±0.2	84.4±1.7	0.7±0.1	55.4±1.8	28.8±4.2	63.7±2.6
	24	3.4±0.2	86.1±1.5	0.7±0.1	55.5±1.8	28.9±4.2	63.9±2.6

The data represent the mean ±S.E. of three animals.

Fig. 6 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity at various times after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) to male rats



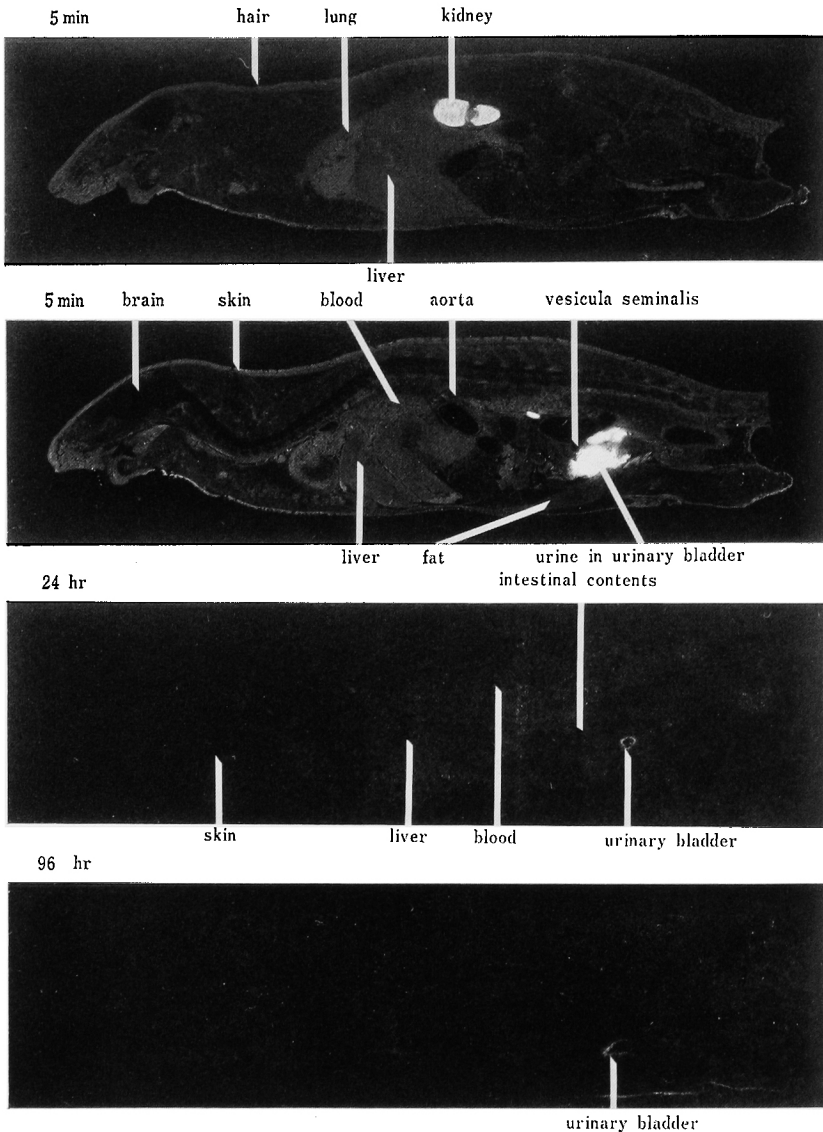
中に投与量の 1.8% の放射能が排泄され、CVA の排泄率は投与量の 0.2% であった。また、同時に採取した尿中への放射能および CVA の排泄率はそれぞれ投与量の 72.9%、58.3% であった。

$^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群では胆汁中に排泄された放射能および CVA は投与後 24 時間までにそれぞれ投与量の 3.4% および 0.7% であった。TIPC の排泄率は投与量の 28.9% であった。また、同時に採取した尿中への放射能、CVA および TIPC の排泄率はそれぞれ投与量の 86.1%、55.5%、63.9% であった。

#### 4. 全身オートラジオグラム

$^{14}\text{C}$ -CVA-K あるいは  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をラットに静脈内投与した際の全身オートラジオグラムを Fig. 6, 7 に示した。 $^{14}\text{C}$ -CVA-K および  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群における放射能の分布パターンは同様であり、投与後 5 分では腎臓および膀胱内貯尿が最も高く、肝臓、肺、大動脈、皮膚および被毛への分布は血液と同程度であった。中枢神経系、脂肪および精囊への分布は低かった。24 時間では全体の放射活性は低下したが、膀胱、腸内容物、肝臓、腎臓、ハーダー氏腺および皮膚への分布が血液よ

Fig. 7 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity at various times after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 (200 mg/kg) to male rats



り高かった。96 時間では膀胱への分布が 24 時間とほぼ同程度であったほかは、肝臓および腎臓に低い放射活性を示したのみであった。

##### 5. 組織内濃度

###### 1) $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに静脈内投与した際の組織内放射能濃度を Table 4 に、CVA 濃度を Table 6 に示した。投与後短時間では、膀胱、腎臓および肝臓における放射能濃度が高く、中枢神経系、脂肪、精嚢、睪丸および前立腺に低かった。膀胱、ハーダー氏腺、褐色脂肪、

脂肪、大動脈および皮膚からの放射能の消失は血漿と比較して緩慢であったが、他の組織からの消失は血漿とほぼ同様であった。投与後 96 時間ではいずれの組織とも 5 分値の 7% 以下に減少した。また、CVA は投与後短時間において、測定したいずれの組織にも分布し、腎臓、血漿、肝臓、肺、心臓、睪丸、脾臓、筋肉の順に高かった。特に高濃度を示した組織は腎臓であった。投与後 4 時間にはいずれの組織にも CVA は認められなかった。

###### 2) TIPC 投与群

TIPC をラットに静脈内投与した際の組織内 TIPC 濃



Table 4 Tissue concentrations of radioactivity after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5mg/kg) to male rats

Tissue	Radioactivity ( $\mu\text{g}$ equiv. of CVA/g or ml)					
	5min.	30min.	1hr.	4hr.	24hr.	96hr.
Plasma	33.14 $\pm$ 0.46	5.63 $\pm$ 0.40	2.60 $\pm$ 0.41	1.36 $\pm$ 0.22	0.35 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01
Blood	24.03 $\pm$ 0.40	4.85 $\pm$ 0.20	2.81 $\pm$ 0.31	1.53 $\pm$ 0.19	0.54 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.00
Cerebrum	0.57 $\pm$ 0.15	0.30 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.00
Hypophysis	5.87 $\pm$ 1.57	2.25 $\pm$ 0.29	2.35 $\pm$ 0.47	1.27 $\pm$ 0.25	0.25 $\pm$ 0.13	0.06 $\pm$ 0.03
Eye ball	3.83 $\pm$ 0.90	1.43 $\pm$ 0.23	1.24 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.14	0.13 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.00
Harderian gland	3.63 $\pm$ 0.48	1.86 $\pm$ 0.17	2.37 $\pm$ 0.38	2.45 $\pm$ 0.10	2.15 $\pm$ 0.35	0.27 $\pm$ 0.05
Thyroid	5.24 $\pm$ 0.91	1.57 $\pm$ 0.28	1.29 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.02
Submaxillary gland	5.68 $\pm$ 1.07	2.55 $\pm$ 0.32	2.94 $\pm$ 0.30	1.70 $\pm$ 0.12	0.31 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.00
Heart	5.16 $\pm$ 0.14	1.67 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.30	1.06 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.00
Lung	10.34 $\pm$ 0.57	3.20 $\pm$ 0.11	2.66 $\pm$ 0.29	1.30 $\pm$ 0.15	0.39 $\pm$ 0.07	0.18 $\pm$ 0.02
Liver	14.49 $\pm$ 1.26	10.56 $\pm$ 1.60	7.29 $\pm$ 0.91	3.53 $\pm$ 0.20	1.09 $\pm$ 0.27	0.75 $\pm$ 0.04
Kidney	157.53 $\pm$ 9.58	22.01 $\pm$ 0.64	10.60 $\pm$ 0.82	4.86 $\pm$ 0.58	1.09 $\pm$ 0.08	0.30 $\pm$ 0.09
Adrenal	6.37 $\pm$ 0.83	1.87 $\pm$ 0.15	1.96 $\pm$ 0.41	1.29 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.04
Spleen	4.76 $\pm$ 0.18	2.58 $\pm$ 0.18	2.24 $\pm$ 0.29	1.17 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.04
Pancreas	6.63 $\pm$ 0.55	3.01 $\pm$ 0.39	2.78 $\pm$ 0.59	1.98 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.03
Urinary bladder	166.48 $\pm$ 57.78	31.59 $\pm$ 11.52	31.21 $\pm$ 8.98	9.36 $\pm$ 5.44	2.49 $\pm$ 1.73	2.66 $\pm$ 0.22
Muscle	8.61 $\pm$ 1.01	4.59 $\pm$ 0.04	3.95 $\pm$ 0.49	1.27 $\pm$ 0.23	0.17 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02
Fat	5.70 $\pm$ 2.08	1.02 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.20	0.33 $\pm$ 0.14	0.19 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.04
Brown fat	8.97 $\pm$ 2.97	2.45 $\pm$ 0.20	1.62 $\pm$ 0.38	1.02 $\pm$ 0.09	0.61 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.05
Bone marrow	7.42 $\pm$ 1.39	3.54 $\pm$ 0.28	2.96 $\pm$ 0.91	1.93 $\pm$ 0.49	0.56 $\pm$ 0.09	0.17 $\pm$ 0.03
Medulla spinalis	1.86 $\pm$ 0.23	0.60 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
Skin	12.35 $\pm$ 0.60	3.32 $\pm$ 0.17	2.01 $\pm$ 0.39	1.14 $\pm$ 0.14	0.41 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.15
Aorta	19.36 $\pm$ 4.22	5.31 $\pm$ 1.07	3.28 $\pm$ 0.88	1.21 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.02
Testis	3.83 $\pm$ 0.70	0.99 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.19	0.61 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
Prostate	4.72 $\pm$ 0.80	1.47 $\pm$ 0.24	1.93 $\pm$ 0.32	0.88 $\pm$ 0.17	0.34 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.02

The data represent the mean  $\pm$  S.E. of three animals

度を Table 6 に示した。TIPC は投与後短時間において、測定したいずれの組織にも分布し、腎臓、肝臓、血漿、肺、心臓、睪丸、脾臓、筋肉の順に高かった。特に高濃度を示した組織は腎臓および肝臓であった。投与後4時間にはいずれの組織にも TIPC は認められなかった。

### 3) $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群

$^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をラットに静脈内投与した際の組織内放射能濃度を Table 5 に、CVA および TIPC 濃度を Table 6 に示した。組織内放射能および CVA 濃度はいずれの時点においても大部分の組織で  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と同濃度を示した。また、TIPC 濃度は投与後1時間の肝臓、腎臓が高いのを除き、TIPC 投与群とほぼ同濃度を示した。

### 6. 尿中代謝物の定量

$^{14}\text{C}$ -CVA-K あるいは  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 をラットおよびイスに静脈内投与した際の投与後6時間までの尿のクロマトグラムを Fig. 8 に、その定量値を Table 7 に示した。ラット、イスとも TLC 上に5個のスポットが認め

られたので、これらを Rf 値の高い順に F<sub>1</sub>~F<sub>5</sub> の符号を付した。このうち F<sub>3</sub> が CVA の Rf 値に、F<sub>5</sub> が AHB の Rf 値にそれぞれ一致した。

#### 1) ラット

$^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群では、投与後6時間までの尿中には CVA が最も多く尿中放射能排泄量の 63.6% であった。AHB は 4.3%、その他のフラクションは 5.6~11.4% であった。また、 $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群の CVA および代謝物の存在パターンは  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と比較して大きな相違は認められなかった。

#### 2) イス

$^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群では、投与後6時間までの尿中には CVA が最も多く尿中放射能排泄量の 41.6%、次いで AHB が多く 18.9% であった。その他のフラクションは 6.4~10.2% であった。また、 $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群の CVA および代謝物の存在パターンは、 $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と比較して大きな相違は認められなかった。

### 7. 胎仔移行性

#### 1) 全身オートラジオグラム

Table 5 Tissue concentrations of radioactivity after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -BRL28500 (200mg/kg) to male rats

Tissue	Radioactivity ( $\mu\text{g}$ equiv. of CVA/g or ml)					
	5min.	30min.	1hr.	4hr.	24hr.	96hr.
Plasma	34.89 $\pm$ 2.47	7.75 $\pm$ 0.34	3.63 $\pm$ 0.18	1.50 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01
Blood	24.73 $\pm$ 2.02	6.80 $\pm$ 0.43	3.92 $\pm$ 0.17	1.53 $\pm$ 0.14	0.60 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.07
Cerebrum	1.00 $\pm$ 0.27	0.43 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.00
Hypophysis	7.74 $\pm$ 1.15	3.30 $\pm$ 0.54	1.81 $\pm$ 0.31	1.01 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.00
Eye ball	4.85 $\pm$ 0.50	2.14 $\pm$ 0.29	1.46 $\pm$ 0.13	0.67 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00
Harderian gland	4.57 $\pm$ 0.02	2.33 $\pm$ 0.27	2.52 $\pm$ 0.06	1.95 $\pm$ 0.16	1.90 $\pm$ 0.33	0.30 $\pm$ 0.04
Thyroid	8.60 $\pm$ 0.69	2.50 $\pm$ 0.38	1.27 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02
Submaxillary gland	8.32 $\pm$ 1.44	3.43 $\pm$ 0.17	3.19 $\pm$ 0.08	1.70 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.01
Heart	7.23 $\pm$ 0.53	2.35 $\pm$ 0.33	2.01 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01
Lung	14.73 $\pm$ 0.69	4.77 $\pm$ 0.06	3.12 $\pm$ 0.18	1.27 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.01
Liver	12.57 $\pm$ 0.31	10.69 $\pm$ 0.72	8.37 $\pm$ 0.66	3.19 $\pm$ 0.25	1.69 $\pm$ 0.22	0.80 $\pm$ 0.03
Kidney	176.07 $\pm$ 22.84	29.36 $\pm$ 2.08	15.70 $\pm$ 1.19	4.46 $\pm$ 0.26	1.14 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.01
Adrenal	9.46 $\pm$ 1.59	2.90 $\pm$ 0.21	2.28 $\pm$ 0.28	1.02 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.01
Spleen	6.33 $\pm$ 0.35	2.86 $\pm$ 0.07	2.45 $\pm$ 0.10	1.08 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.01
Pancreas	8.76 $\pm$ 0.65	4.40 $\pm$ 0.05	3.31 $\pm$ 0.25	1.61 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01
Urinary bladder	70.49 $\pm$ 26.09	60.35 $\pm$ 7.55	59.28 $\pm$ 26.81	9.22 $\pm$ 5.15	4.42 $\pm$ 1.26	3.25 $\pm$ 1.24
Muscle	6.96 $\pm$ 0.83	5.57 $\pm$ 0.45	5.12 $\pm$ 0.21	1.14 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.00
Fat	4.20 $\pm$ 0.74	0.97 $\pm$ 0.14	0.75 $\pm$ 0.15	0.50 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.01
Brown fat	8.12 $\pm$ 2.23	3.08 $\pm$ 0.14	2.31 $\pm$ 0.41	0.91 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.01
Bone marrow	8.92 $\pm$ 1.38	3.85 $\pm$ 0.26	3.76 $\pm$ 0.27	1.71 $\pm$ 0.41	0.73 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.01
Medulla spinalis	1.60 $\pm$ 0.14	0.75 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
Skin	14.45 $\pm$ 1.58	4.73 $\pm$ 0.22	2.18 $\pm$ 0.50	1.11 $\pm$ 0.10	0.42 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.02
Aorta	17.15 $\pm$ 0.40	6.69 $\pm$ 0.32	2.89 $\pm$ 0.43	1.76 $\pm$ 0.27	0.36 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.03
Testis	4.22 $\pm$ 0.25	1.40 $\pm$ 0.07	1.23 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02
Prostate	4.69 $\pm$ 0.27	2.71 $\pm$ 0.28	9.23 $\pm$ 7.00	0.87 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.02

The data represent the mean  $\pm$  S.E. of three animals.

$^{14}\text{C}$ -CVA-K を妊娠 18 日目ラットに静脈内投与した際の全身オートラジオグラムを Fig. 9 に示した。胎子への放射能の移行は認められたものの、その濃度は母体血液より低かった。胎子組織への放射能の分布パターンは脳が他の組織より低かったほかはほぼ均一であった。

## 2) 組織内濃度

$^{14}\text{C}$ -CVA-K を妊娠 18 日目ラットに静脈内投与した際の組織内濃度を Table 8 に示した。胎子中放射能濃度は投与後 1 時間に最高濃度を示したがその濃度は 1.57  $\mu\text{g/g}$  (CVA 換算) と母体血漿中濃度の 41% であった。投与後 24 時間には最高濃度の 26% に減少した。胎子中 CVA 濃度は投与後 30 分において最も高かったが、母体血漿中濃度の 11% にすぎず、24 時間には検出限界以下となった。

## 8. 乳汁中濃度

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに静脈内投与した際の乳汁中濃度推移を Fig. 10 に示した。乳汁中放射能濃度は投与後 8 時間に最高濃度 2.89  $\mu\text{g/ml}$  (CVA 換算) を示した。以後、放射能の消失は血液より速やかで、投与後 48 時

間には最高濃度の 5% に減少した。血液中濃度と比較すると、最高乳汁中濃度を示した 8 時間では血液中濃度の約 2 倍を示したものの、48 時間では、血液中濃度の 25% と低かった。

## III. 考 察

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに静脈内投与した際、放射能は投与後短時間にほぼ全身に分布し、膀胱、膀胱内貯尿、腎臓および肝臓に高く、中枢神経系、脂肪、精囊、睪丸および前立腺に低いパターンを示した。膀胱、ハーダー氏腺、褐色脂肪、脂肪、大動脈および皮膚からの放射能の消失は血漿と比較して緩慢であったが、他の組織からの消失は血漿と同様であり、特に組織との強い親和性を示すものとは考えられなかった。

また、放射能の排泄は速やかであり、投与後 6 時間までに投与量の 85.9%、96 時間までに 93.2% が体外へ排泄された。投与後 96 時間までの尿、糞、呼気中排泄率はそれぞれ投与量の 84.2%、1.2%、7.9% であったことから  $^{14}\text{C}$ -CVA-K の主排泄経路は尿中であり、一部は  $^{14}\text{CO}_2$  として呼気中へ排泄されることが確認された。

Table 6 Tissue concentrations of CVA and TIPC after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -BRL28500 (200mg/kg) to male rats

Tissue	Compound	$^{14}\text{C}$ -CVA-K(12.5mg/kg) dosed group					TIPC(187.5mg/kg) dosed group					$^{14}\text{C}$ -BRL28500(200mg/kg) dosed group				
		5min.	30min.	1hr.	4hr.		5min.	30min.	1hr.	4hr.		5min.	30min.	1hr.	4hr.	
Plasma	CVA	31.57 ±0.45	4.79 ±0.44	0.84 ±0.03	N.D.							33.01 ± 2.28	6.65 ± 0.27	1.98 ± 0.27	N.D.	
	TIPC						646.37 ±35.30	93.95 ± 8.83	20.78 ± 3.54	N.D.		649.18 ±22.45	117.32 ±10.31	34.11 ± 3.74	N.D.	
Brain	CVA	0.26 ±0.07	N.D.	N.D.	N.D.						0.25 ± 0.05	N.D.	N.D.	N.D.		
	TIPC						7.73 ± 0.54	1.15 ± 0.05	N.D.	N.D.	7.74 ± 0.45	N.D.	N.D.	N.D.		
Liver	CVA	6.46 ±0.90	3.14 ±0.11	0.36 ±0.01	N.D.						5.92 ± 0.88	2.59 ± 0.07	2.27 ± 0.65	N.D.		
	TIPC						489.02 ±15.72	450.76 ±25.82	95.01 ±10.55	N.D.	484.33 ± 1.44	388.51 ±41.99	191.62 ±15.54	N.D.		
Kidney	CVA	83.36 ±5.19	13.97 ±0.36	1.90 ±0.41	N.D.						89.38 ± 6.58	12.08 ± 1.33	3.27 ± 0.55	N.D.		
	TIPC						1789.19 ±94.71	447.48 ±63.06	89.86 ±21.34	N.D.	1822.65 ± 2.26	407.33 ±57.23	226.36 ±41.28	N.D.		
Lung	CVA	5.25 ±0.11	1.12 ±0.14	0.23 ±0.02	N.D.						7.06 ± 0.39	1.45 ± 0.07	0.36 ± 0.08	N.D.		
	TIPC						156.88 ± 5.89	24.71 ± 2.39	7.28 ± 1.08	N.D.	151.44 ± 7.19	24.62 ± 0.93	6.56 ± 0.99	N.D.		
Heart*	CVA	3.15	0.68	0.21	N.D.						4.56	0.84	0.21	N.D.		
	TIPC						98.37	12.91	2.88	N.D.	97.41	16.94	N.D.	N.D.		
Spleen*	CVA	2.49	0.87	0.22	N.D.						3.29	0.83	0.14	N.D.		
	TIPC						54.95	9.12	1.91	N.D.	56.63	10.46	1.87	N.D.		
Muscle	CVA	1.17 ±0.14	N.D.	N.D.	N.D.						0.90 ± 0.13	N.D.	N.D.	N.D.		
	TIPC						40.91 ± 1.92	3.95 ± 0.75	1.28 ± 0.09	N.D.	39.22 ± 3.65	4.88 ± 0.26	1.49 ± 0.14	N.D.		
Testis	CVA	2.66 ±0.04	0.48 ±0.02	N.D.	N.D.						3.87 ± 0.10	0.74 ± 0.09	0.30 ± 0.07	N.D.		
	TIPC						60.86 ± 3.49	20.42 ± 2.15	4.56 ± 0.48	N.D.	67.04 ± 1.87	16.58 ± 1.77	6.71 ± 2.51	N.D.		

The data represent the mean ±S.E. of three animals.

N.D.: Not detected.

\*: Obtained from pooled sample of three animals.

Fig. 8 Thin-layer chromatograms of 0~6 hr. urine sample after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 (200mg/kg) to male rats and dogs.  
Solvent system ; n-butyl alcohol : ethyl alcohol : water : formic acid (20 : 10 : 10 : 1)

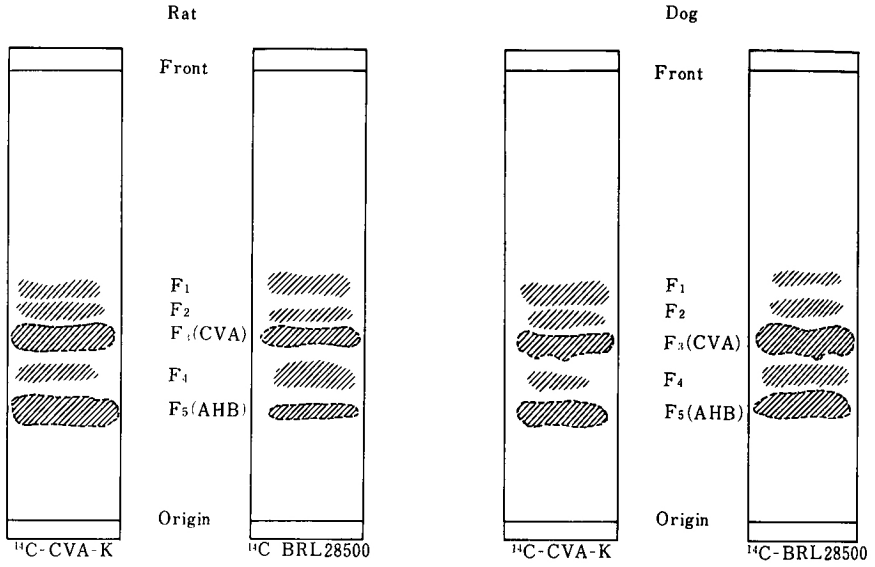


Fig. 9 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity at 5 min. and 24 hr. after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) to rats at the 18 th day of pregnancy.

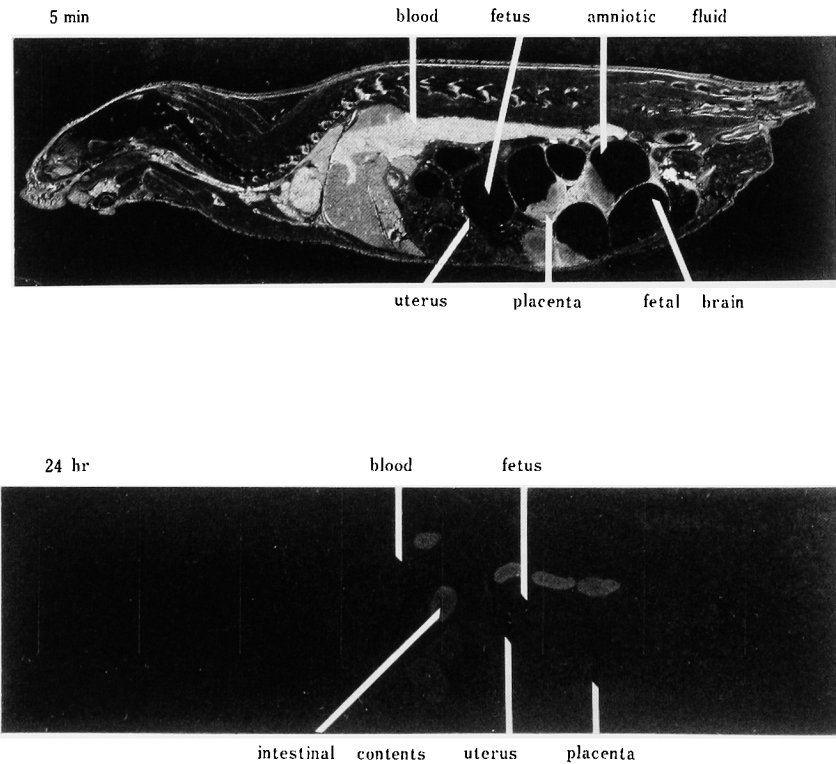


Table 7 Metabolic pattern in 0-6 hr urine sample after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5mg/kg) or  $^{14}\text{C}$ -BRL28500 (200mg/kg) to male rats and dogs

Animal	Compound	Recovery* (%)	Composition of radioactivity (% of radioactivity in urine)					
			F <sub>3</sub> (CVA)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub> (AHB)	Others
Rat	$^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5mg/kg)	95.5±0.6	63.6±0.3	5.6±0.7	11.4±1.0	9.5±0.2	4.3±0.7	1.1±0.2
	$^{14}\text{C}$ -BRL28500(200mg/kg)	95.1±0.7	54.8±1.3	12.5±0.4	8.9±0.4	4.2±0.1	4.4±0.1	10.4±0.9
Dog	$^{14}\text{C}$ -CVA-K(12.5mg/kg)	93.4±0.4	41.6±5.8	6.4±1.7	6.8±1.0	10.2±1.1	18.9±4.6	9.5±1.3
	$^{14}\text{C}$ -BRL28500(200mg/kg)	95.3±1.7	43.1±5.5	5.2±1.2	8.2±0.6	7.5±0.8	23.8±1.1	7.5±1.6

The data represent the mean ±S.E. of three animals.

\* : The recoveries tabulated are the amounts of radioactivity in the methanol extracts expressed as percentages of that excreted in the urine.

Table 8 Tissue concentrations of radioactivity and CVA after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5mg/kg) to rats at the 18th day pregnancy

Tissue	Radioactivity ( $\mu\text{g}/\text{equiv. of CVA}/\text{g or ml}$ )				CVA ( $\mu\text{g}/\text{g or ml}$ )			
	5min.	30min.	1hr.	24hr.	5min.	30min.	1hr.	24hr.
Plasma	36.10±2.17	9.31±0.40	3.84±0.19	0.31±0.05	33.87±1.16	8.76±0.40	2.13±0.18	N.D.
Blood	24.03±2.44	8.71±0.62	3.08±1.35	0.56±0.08	—	—	—	—
Liver	9.80±1.94	8.59±0.51	5.83±0.25	0.98±0.12	5.84±0.71	1.66±0.41	0.39±0.04	N.D.
Kidney	166.30±5.88	38.80±5.84	18.30±2.65	1.75±0.12	96.71±20.54	14.96±0.75	3.20±0.55	N.D.
Uterus	14.80±2.01	7.27±0.76	4.55±0.40	0.49±0.02	11.91±2.10	4.52±0.08	1.35±0.14	N.D.
Ovary	8.85±1.61	3.95±0.23	2.54±0.12	0.35±0.03	5.99*	1.28*	0.34*	N.D.*
Placenta	6.44±0.81	4.51±0.24	3.49±0.43	0.43±0.00	6.29±0.60	2.77±0.09	1.30±0.10	N.D.
Fetus	0.85±0.06	1.28±0.08	1.57±0.23	0.41±0.02	0.87±0.10	0.97±0.02	0.56±0.02	N.D.
Amniotic fluid	0.39±0.10	0.88±0.09	1.00±0.06	0.22±0.02	0.46±0.06	0.72±0.07	0.53±0.06	N.D.

The data represent the mean ±S.E. of three animals.

N.D. : Not detected.

— : Not determined.

\* : Obtained from the pooled sample of three animals.

一方、胆汁中放射能排泄率は投与後 48 時間までに投与量の 1.8% であり、無処置ラットにおける糞中放射能排泄率とはほぼ一致した。したがって、糞中に認められた放射能は胆汁を経由し、排泄されたものと示唆された。

$^{14}\text{C}$ -CVA-K をラットに投与した際、投与後 30 分までの血漿中放射能濃度に対する CVA の濃度の比(CVA/RA) は 0.85 以上であり、血漿中に認められた放射能の大部分は CVA として存在するものと推察された。しかしながら、CVA/RA は時間とともに低下し、4 時間においては血漿中に CVA は認められなくなった。また、投与後 6 時間までの尿を TLC で分析すると、CVA の Rf 値に相当する放射能が尿中放射能排泄量の 64% と最も多かったものの、このほかにも TLC 上にスポットが認められ、CVA は生体内で代謝を受けるものと考えられた。さらに Bolton 等<sup>7)</sup> はラットおよびイスの経口投与時における CVA の尿中主要代謝物として 1-amino-4-

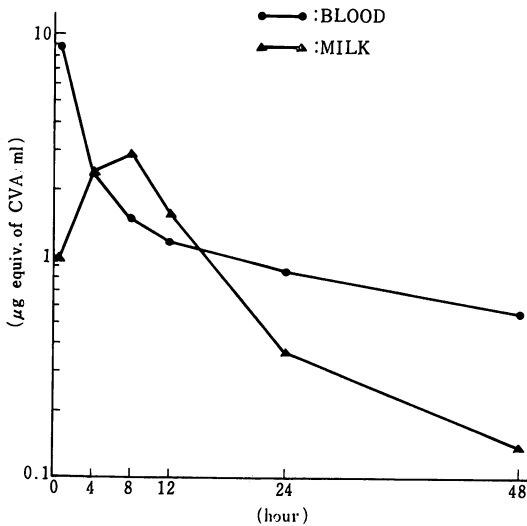
hydroxybutan-2-one (AHB) を同定しており、今回の実験でも F<sub>5</sub> が AHB の Rf 値に一致したことから、静脈内投与した際にも代謝物として AHB の存在が明らかとなった。

$^{14}\text{C}$ -CVA-K を妊娠ラットに静脈内投与した際、胎仔中に放射能は移行したものの、最高濃度 (1.57  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) に達した 1 時間においても母体血漿中濃度 (3.84  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) より低く、投与後 24 時間には最高濃度の 26% に減少しており、放射能は胎仔体内に残留する傾向はないものと考えられた。

$^{14}\text{C}$ -CVA-K を授乳中ラットに投与した際、放射能の乳汁への移行は認められたものの乳汁からの消失は血液より速やかであり、投与後 48 時間には 0.14  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と最高濃度の 5% に減少し、かつその濃度も血液の 25% と低く、放射能が長期にわたり乳汁中に認められる傾向はないものと推察された。

Fig. 10 Milk and blood concentrations of radioactivity after intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K (12.5 mg/kg) to lactating rats.

Each point represents the mean of three animals.



イヌにおける  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 静脈内投与時の体内動態をラットと比較したところ、イヌにおける血液、血漿中放射能濃度、血漿中 CVA 濃度およびそれらの AUC はラットより高く、さらにイヌにおける血液からの放射能および CVA の消失はラットより緩慢であった。また、投与後短時間における血漿の CVA/RA 値は両動物種とも 0.9 前後であったが、イヌでは投与後 2 時間に 0.51、4 時間に 0.13 を示したのに対し、ラットでは 2 時間に 0.11、4 時間には CVA は認められておらず、イヌにおける血漿中代謝物の存在比はラットより小さかった。

一方、イヌにおける放射能の尿、糞、呼気中の排泄率はラットと顕著な相違は認められず、放射能の排泄パターンは両動物間で同様であると考えられた。また、イヌおよびラットの尿中代謝物を TLC で検討したところ、その分離パターンが両動物間で同様であったことから、代謝物の種類には差がないことが示唆された。しかし、イヌにおける CVA の存在比がラットより低く AHB の存在比がラットより高かったことは、イヌとラットにおける CVA の排泄速度および代謝速度に差があったためと推察された。

ラットおよびイヌにおける  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群の吸収・分布・代謝・排泄の結果をそれぞれ  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群と比較すると血液中放射能濃度の半減期、AUC および血漿中 CVA 濃度の半減期、AUC には顕著な相違は認められなかった。 $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群のラット

における組織内放射能濃度および CVA 濃度はいずれの時点においても  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群とほぼ同程度の濃度を示した。また、放射能の分布パターンも  $^{14}\text{C}$ -CVA-K 投与群とほぼ同様であった。さらに、ラットおよびイヌにおける放射能の尿、糞、呼気中排泄率、CVA の尿中排泄率、尿中代謝物の存在パターンも両投与群でほぼ同様であった。したがって、ラットおよびイヌに BRL 28500 として静脈内投与しても CVA の生体内動態は CVA-K 投与時とほぼ同様であると考えられた。

ラットにおける  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群の血漿中 TIPC 濃度の半減期および AUC は TIPC 投与群と比較して相違は認められず、組織内 TIPC 濃度も投与後 1 時間における肝臓、腎臓の濃度が低かった以外、TIPC 投与群と大きな相違は認められなかった。また、この分布パターンは石山ら<sup>9)</sup>がラットに TIPC を 200 mg/kg 筋注した際の報告と類似するものであった。さらに、 $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 投与群および TIPC 投与群における TIPC の尿中排泄率は投与後 24 時間までにそれぞれ投与量の 60.4%、60.7% であり、両投与群間で相違は認められなかった。したがって、BRL 28500 として投与しても TIPC の生体内動態は TIPC 投与時とほぼ同様であると考えられた。以上の結果より、ラットあるいはイヌに BRL 28500 として投与しても、CVA、TIPC の生体内動態はそれぞれの単独投与時とほぼ同様であると考えられた。

#### 文 献

- 1) ROLINSON, G. N.: Naturally-occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiotics* 24: 668~669, 1976
- 2) READING, C. & M. COLE: Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11(5): 852~857, 1977
- 3) HOWARTH, T. T.; A. G. BROWN & T. J. KING: Clavulanic acid, a novel  $\beta$ -lactam isolated from *Streptomyces Clavuligerus*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 7: 266~267, 1976
- 4) PAISLEY, J. W. & J. A. WASHINGTON II: Combined activity of clavulanic acid and ticarcillin against ticarcillin resistant, Gram-Negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14(2): 224~227, 1978
- 5) HUNTER, P. A.; K. COLEMAN, J. FISHER & D. TAYLOR: *In vitro* synergistic properties of clavulanic acid, with ampicillin, amoxycillin and ticarcillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 445~470, 1980
- 6) ELSON, S. W. & R. S. OLIVER: Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. I Incorporation of  $^{13}\text{C}$ -labelled precursors. *J. Antibiot.*

- 31 : 702~715, 1978
- 7) BOLTON, G. C; G. D. ALLEN, C. W. FILER & D. J. JEFFERY: Absorption, metabolism and excretion, studies on clavulanic acid in the rat and dog, *Xenobiotica* 14 (6) : 483~490, 1984
- 8) 石山俊次, 他: 外科における Ticarcillin の抗菌力, 吸収・排泄と臨床応用について。Chemotherapy 25 : 2690~2697, 1977

## METABOLIC FATE OF CLAVULANIC ACID AND BRL 28500 IN THE RAT AND DOG

HIROYUKI KUMAKURA, RYUTARO ISHII, YOSHITAKA NISHIOKA and YOSHINOBU KOSHIMA  
Beecham Yakuhin K. K.

YOSHIO ESUMI, KOICHI MITSUGI, SHINYA HANAWA, SATOSHI SENDA,  
ISAO WATANABE and TETSUYOSHI YOKOSHIMA  
Tokai Laboratory, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.

GRAHAM MELLOWS  
Beecham Pharmaceuticals Research Division

$^{14}\text{C}$ -CVA-K,  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 and TIPC were administered intravenously to rats and dogs to study their absorption, distribution, metabolism and excretion. The following results were obtained:

1. Following intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K to rats and dogs at 12.5 mg (potency)/kg, blood concentrations of radioactivity declined in 3 phases. The elimination half-lives beyond 24 hours were 68.35 hours in rats and 118.34 hours in dogs.

2. Following intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K to rats, radioactivity distributed into most tissues in the body. The tissue concentrations of radioactivity were highest in the bladder, urine contained in the bladder, kidney and liver. Tissues in which the lowest concentrations of radioactivity were observed included the central nervous system, fat, vesicula seminalis, testis and prostate. The tissue concentrations of CVA were highest in the kidney, with lower concentrations in plasma, liver, lung, heart, testis, spleen and muscle.

3. The major route of excretion of radioactivity was in the urine in both rats and dogs, partly being excreted into the expired air as  $^{14}\text{CO}_2$ . The amount of radioactivity excreted in the feces via biliary excretion was extremely small.

4. Although some metabolism of CVA occurred in the body of both rats and dogs, CVA was the major radioactive component excreted in urine.

5. When  $^{14}\text{C}$ -CVA-K was administered intravenously to lactating rats, radioactivity was transferred to the milk: this was subsequently eliminated from the milk faster than from the blood and showed no tendency to be present in milk for a prolonged period.

6. When  $^{14}\text{C}$ -CVA-K was administered intravenously to pregnant rats, radioactivity was transferred to the fetuses. Fetal concentrations of radioactivity were lower than those in the maternal plasma and there was no tendency for retention in the fetuses.

7. When  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 was administered intravenously to rats, the metabolic fate of CVA was similar to that following intravenous administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K. The metabolic fate of TIPC was very similar to that following intravenous administration of TIPC alone. The metabolic fate of CVA after administration of  $^{14}\text{C}$ -BRL 28500 to dogs was also similar to that following administration of  $^{14}\text{C}$ -CVA-K.