

経口用セフェム剤 CS-807の実験動物における体内動態について

駒井 亨・河合賢司・榎 秀美・徳井太郎・木下 武・田中 実

三共株式会社分析代謝研究所

プロドラッグ型経口セフェム剤 CS-807を、ラット、イヌ、およびサルに経口投与し、抗菌活性体 R-3763への変換を中心に吸収、分布、代謝、排泄を検討した。

CS-807-¹⁴C をラットに13mg/kg 経口投与後の消化管内残存率、静注時と経口時の尿中排泄率の比較などから、消化管吸収率は約70%であり、主として小腸上部から吸収されることが示された。CS-807は吸収過程で上皮細胞内において非特異的エステラーゼにより、抗菌活性体 R-3763に加水分解され、活性体として循環血に移行した。血中濃度は、イヌ>ラット>サルの順に種差がみられ、その最高濃度は、それぞれ23.4μg/ml (Tmax=2時間)、8.4μg/ml (Tmax=1時間) および3.9μg/ml (Tmax=4時間) であった。吸収後の臓器分布は腎が最も高濃度で、肝、肺、皮膚などが血漿と同程度の濃度であり、さらに全身の組織間隙の体液部分に R-3763が広く分布した。

尿中への総排泄率はラットで58%、イヌで56%、サルで38%となり主として腎経由で排泄されたが、ラットでは投与量の約3%が R-3763として胆汁にも排泄された。

尿、胆汁には、R-3763の他に微量の代謝物として R-1073、R-5002が同定されたが、尿・血漿および糞中バイオオートグラムにより、抗菌活性をもつ代謝物は、R-3763のみであった。

R-3763の血清蛋白との結合率はイヌで最も高く、ラット、マウスがこれにつぎ、ヒトでの結合率は約40%と最も低く、ヒト血清中では、非結合型が結合型を上回った。

CS-807はプロドラッグ型経口用セフェム剤であり Fig. 1 に化学構造を示した様に抗菌活性を持つ R-3763 の4位カルボン酸に isopropoxycarbonyloxyethyl をエステル結合させた薬剤である。今回我々は CS-807の体内動態を知る目的で¹⁴C 標識 CS-807を合成し各種実験動物における吸収、分布、代謝および排泄を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. 化合物

¹⁴C-標識 CS-807および¹⁴C-標識 R-3763は三共株式会社化学研究所および第一化学薬品株式会社で合成された。その標識位置は Fig. 1 の中に * で示した。合成時の比活性は 15~20μCi/mg であり放射化学的純度は 98%以上であった。非標識 CS-807、CS-807の Δ²異性体 R-4060、R-3763、R-3763の Δ²異性体 R-1073および糞中から精製同定された代謝物 R-5002¹⁾は三共株式会社化学研究所で合成された。これらの化学構造を

Fig. 1 に示した。対照薬剤としては Cephalexin (CEX, 塩野義製薬), Cefaclor (CCL, 塩野義製薬), Amoxicillin (AMPC, 協和発酵工業), Cefixime, (FK-027) および T-2525を使用した。なお、Cefixime と T-2525は当社化学研究所で合成した。

2. 実験動物

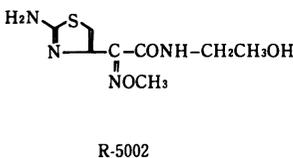
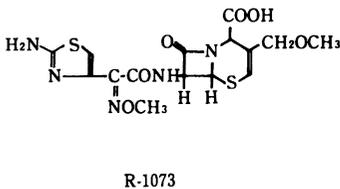
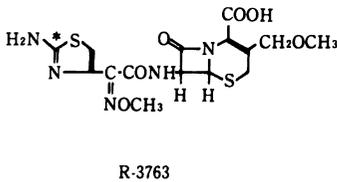
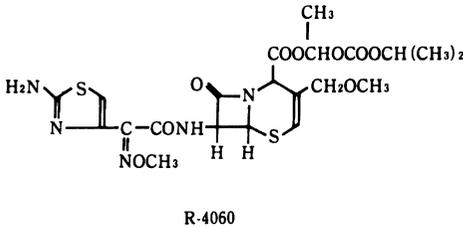
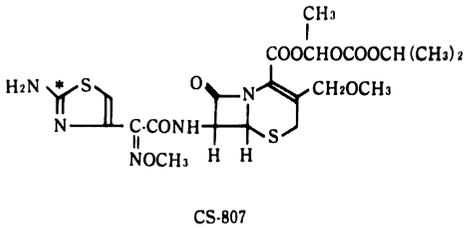
実験動物として以下の動物を絶食下で使用した。

ラット: Wistar-Imamichi 系雄, 体重約200~300g。イヌ: Beagle 系雄, 体重約10kg。サル: *Cynomolgus* 体重約3kg。絶食はいずれの動物においても実験前日の午後4時に代謝ケージ内から食餌のみを取り去り水は自由に与える方法で行った。

3. 薬液の調製とその投与方法

In vivo の実験では CS-807-¹⁴C または R-3763-¹⁴C は polyethylene glycol 400 (PEG-400, 岩井化学) 溶液として適宜非標識化合物で希釈して使用した。投与量は CS-807として 13mg/kg (R-3763換算10

Fig. 1 Chemical structure of CS-807 and its analogues

* ^{14}C -labelled position

mg/kg) とした。ラットおよびイヌの投与は経口ゾンデによる経口投与としサルではゴムチューブにより経鼻投与とした。投与6時間後に餌を与えた。

In situ 腸管吸収実験ではCS-807は0.5%トラガント懸濁溶液として、また *in vitro* 実験(蛋白結合・加水分解)ではエタノール溶液として実験に供した。

4. 尿、糞の採取と処理

ラット、イヌ、サルをそれぞれのステンレス代謝ケージに移し尿・糞を24時間間隔で分離採取した。尿は0.1 M リン酸カリ緩衝液(pH 6.0)で希釈後その一部を液体シンチレーションカウンター用バイアルに採り放射能を測定した。糞は3倍量の蒸留水で一夜膨潤後ポリトン・ホモジナイザーまたはミキサーで均一化したあと放射能を測定した。

5. 血液の採取と処理

ラットでは頸動脈放血でヘパリン含有試験管に、イヌでは前肢静脈より、またサルでは大腿静脈からヘパリン処理した注射器にて、各3 ml ずつ採取した。採取血液は3000rpm×5分で遠心し血漿を採取した。

6. 組織内濃度の放射能測定

ラットを放血致死後、ただちに開腹し各種臓器を摘出した。各種生体組織は50~1000mgをPDP 11/44コンピュータにon-line接続したメトラ-天秤で正確に秤量後、液体シンチレーションカウンター用バイアルに移し1~2 ml NCS[®]組織溶解剤(Amersham)を用いて溶解した。褐色を呈する組織は過酸化ベンゾイルにより脱色し放射能を測定した。

7. 胆汁中排泄

エーテル麻酔下に、ラットの総胆管にポリエチレンチューブ(PE50)を挿入し、麻酔覚醒後、CS-807- ^{14}C を13mg/kg経口投与した。ラットは背位固定とし、24時間まで胆汁を氷冷下に採取した。胆汁の一部(約50 μl)をバイアルにとり放射能を測定した。

8. 消化管内吸収部位

エーテル麻酔下にラットの腹部を小さく切開し、胃、十二指腸、小腸上部(空腸)、小腸中部(回腸)、小腸下部(回腸)の、それぞれ長さ約8 cmの両端を結紮し、ループ内に0.5%トラガント懸濁液CS-807- ^{14}C を、1 mg/0.5ml/loopあて注入した。投与30分後に腸ループを摘出し、腸腔内残留物を氷冷生理食塩水で洗い出したあと、腸壁はエタノールでホモジナイズ後その一部をとりNCSで処理した。腸腔内洗液および腸壁内放射能を測定することにより、腸腔内残存率と、腸壁中残存率を測定した。

In vivo 消化管内薬物の残存量は、ラットにCS

-807-¹⁴Cを経口投与後、1, 2, 6, 24時間に、ラットを頸動脈放血致死せしめ、消化管を胃から直腸にわたり全摘出した。消化管を、胃、小腸上部(十二指腸、空腸)、小腸下部(回腸)、盲腸および大腸下部(結腸+直腸)に分割し、内容を生理食塩水で洗い出したあと、各部位の内容液中放射能は、アセトンで処理後、また各消化管壁放射能は、ポリトロンでホモジナイズ後燃焼法により測定した。

9. 腸管ホモジネートでの加水分解

小腸(空腸部)を摘出し、水冷生理食塩水で洗浄後、適量の1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を加えてポリトロンでホモジナイズし、9000G×15分の遠心上清を腸ホモジネートとして用いた。最終25%小腸相当ホモジネート液に、CS-807を130 μ g/mlになるよう添加し、37Cでインキュベートした。所定時間後に2倍量のエタノールを加えて反応を停止させ、抽出上清中のCS-807, R-3763, R-1073をHPLCで定量した。HPLC測定には、 μ Bondapak C18カラム(ウォーターズ)を用い、UV254nmで検出、溶媒は、CS-807測定では0.05%CH₃COONH₄:CH₃OH=45:55、R-3763およびR-1073測定では0.1M(NH₄)₂SO₄ soln.:CH₃CN=90:10を用い流速は1 ml/minとした。

10. 門脈血中の形態

結紮ループをつくり、この腸ループ部分に分布する腸管静脈が集合する部分の血管にポリエチレンチューブを挿入して、門脈血を水冷試験管に採取した。一方、頸静脈にカニューレを挿入して、別のラットから得た血液を輸血した状態で、腸ループ内にCS-807-¹⁴C(1 mg/0.5ml)を注入、以後10分ごとに門脈血を採取した。血液は、水冷下に遠心後、血漿を分取し、エタノール抽出後、シリカゲル TLC プレートに付加して、代謝物の検索を行った。

11. 薄層クロマト(TLC)による代謝物の分離・定量

生体試料中のR-3763およびその他代謝物の分離・定量はシリカゲル TLCにより行った。プレートは、メルク社製シリカゲル TLC プレート F254を用い溶媒は、n-ブタノール:酢酸:H₂O=4:1:1を用いた。あらかじめ非放射能標品溶液をスポットし、これに重ねて試料溶液をスポットして展開した。

放射性代謝物の検出はX線フィルムにより実施し、代謝物の定量は、プレート上の吸着剤を直接バイアルびん内にかきとり、液体シンチレーションカウンターによる放射能計数で行った。

バイオオートグラム作製では、試料溶液のみをシリカゲル TLC プレートにスポットし、展開後、*Sta-*

phylococcus aureus (209-P) 培地に15分間コンタクト後、一夜培養して、菌生育阻止円を検出した。

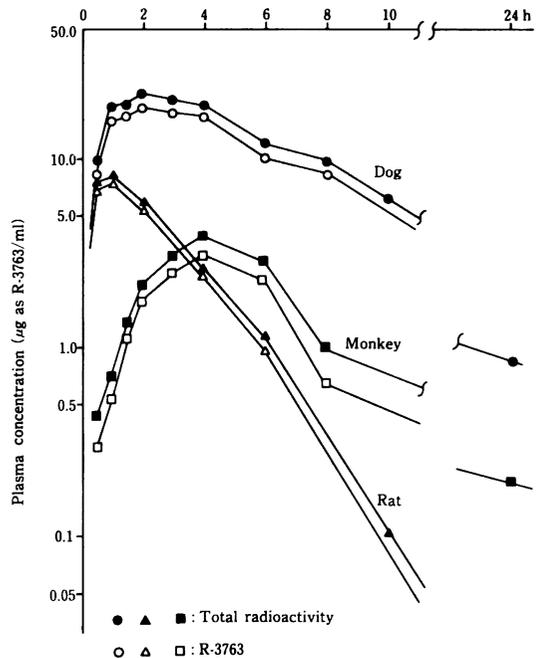
12. 全身オートラジオグラフィー

ラットまたはリスザル(体重約700g)にCS-807-¹⁴Cを13mg/kgあて経口投与し、一定時間後にエーテル麻醉し、ただちにヘキサンドライアイス中で全身を凍結した。凍結後、常法に従い50 μ m厚の全身切片を作製し、³H型X線フィルム(小西六)に露光してオートラジオグラムを得た。

13. 血清蛋白結合

各種動物の血清0.9mlに、各種抗生物質の1/15Mリン酸緩衝液(pH7.4) 0.1mlを加え、薬物濃度を25 μ g/mlとして、30分間37Cインキュベートした。その後血清を、MPS-1限外濾過キット(アミコン社)に移し、1000Gで3分間遠心して濾過液濃度をHPLCで測定した。HPLC測定には、YMC A 312(山村化学)カラムを用い、AMPCの場合は、CH₃OH:5%CH₃COONH₄:H₂O=30:10:60、その他の場合はCH₃OH:5%CH₃COONH₄:H₂O=15:10:75を溶媒として行った。検出は、UV法とし、AMPCは240nm、その他は270nmで実施した。

Fig. 2 Plasma concentration of radioactivity and R-3763 after oral administration of CS-807-¹⁴C to rats, dogs and monkeys



14. 放射能測定

ラット、イヌ、サル、の糞中放射能およびイヌ、サルの血中放射能は焼燃法で測定した。これらの試料の一部を焼焼カップにとり、燃焼装置 Packard Sample Oxidizer 306を用い、完全燃焼させ、生成 ^{14}C の吸収には Oxisorb- CO_2 (NEN)、液体シンチレーターは Oxiprep-2 (NEN) を用いた。ラットの組織内放射能測定に用いた溶解法では NCS^{D} 溶液に10ml トルエンシンチレーター (トルエン 1 l あたりオムニフロー (NEN) 4 g) を、それ以外にはトルエン:エタノールシンチレーター (50:50, PPO 8 g/l: Dimethyl-POPOP 200mg/l) を用いた。測定には Packard Tri-Carb 460C を用い、測定効率の補正は外部線源法によった。

II. 結果

1. 血漿中濃度

ラット、イヌおよびサルに $\text{CS-807-}^{14}\text{C}$ を 13mg/kg で経口投与後の血漿中総放射能およびシリカゲル TLC で測定した抗菌活性体 R-3763 の濃度を Fig. 2 に示した。イヌ血漿中濃度が他の動物よりも高い値となりピーク時点 ($T_{\text{max}} = 2$ 時間) では最大放射能濃度 C_{max} は $23.4 \mu\text{g/ml}$ であり、消失半減期も 4.5 時間と緩徐であった。ラットの血中濃度がこれにつき、その C_{max} は $8.4 \mu\text{g/ml}$ であり、ピーク時点は最も早く投与後 1 時間、消失半減期は約 2 時間であった。サルの血漿中濃度は徐々に上昇して、そのピーク時点は 4 時間と最も遅く、その最大濃度も $3.9 \mu\text{g/ml}$ と三種の動物の中では低い値であった。血漿中濃度には種差が認められ

Table 1-A Urinary and fecal excretion of radioactivity after oral and I.V. administration of $\text{CS-807-}^{14}\text{C}$ or $\text{R-3763-}^{14}\text{C}$ to rats (13mg/kg, n=3-4)

Dosed form	(h)	$\text{CS-807-}^{14}\text{C}$		$\text{R-3763-}^{14}\text{C}$	
		P.O.	I.V.	P.O.	P.O.
Urine		% of dose			
	0-24	57.30±0.61	81.84±0.99	7.44±1.01	
	24-48	0.70±0.12	0.74±0.16	1.67±0.56	
	48-72	0.10±0.00	0.20±0.03	0.27±0.08	
	Total	58.10±0.70	82.77±1.11	9.37±0.77	
Feces	0-24	29.87±3.49	10.04±1.14	68.40±6.98	
	24-48	7.57±2.18	1.76±0.18	12.68±5.55	
	48-72	0.60±0.06	0.63±0.12	1.17±0.43	
	Total	38.03±1.27	12.43±1.09	82.25±2.10	
	Grand total	96.13±0.57	95.20±0.92	91.62±1.58	

Values represent mean±S.E.

Table 1-B Urinary and fecal excretion of radioactivity after oral administration of $\text{CS-807-}^{14}\text{C}$ to Beagle dogs (13mg/kg, n=4)

Period (h)	Urine	% of dose Feces	Total
0-24	51.76±4.67	25.02±9.11	76.77±5.11
24-48	3.47±1.25	9.49±4.95	12.96±5.91
48-72	0.67±0.19	2.33±1.22	3.00±1.31
72-120	0.50±0.11	0.18±0.03	0.67±0.12
Total	56.39±5.60	37.01±3.19	93.40±2.91

Table 1-C Urinary and fecal excretion of radioactivity after oral administration of $\text{CS-807-}^{14}\text{C}$ to *Cynomolgus* monkeys (13mg/kg, n=3)

Period (h)	Urine	% of dose Feces	Total
0-24	30.64±2.69	24.85±6.39	55.49±7.77
24-48	3.41±0.58	14.00±4.78	17.42±5.36
48-72	2.38±0.23	15.81±3.23	18.18±3.28
72-96	0.77±0.04	2.31±0.48	3.09±0.49
96-144	0.54±0.07	0.29±0.02	0.82±0.08
144-168	0.40±0.04	0.06±0.03	0.45±0.06
Total	38.14±2.68	57.32±1.90	95.46±0.87

たが、いずれの動物においても血漿中放射能の大部分は抗菌活性体 R-3763 であり、他に微量の R-1073 が検出されたが、CS-807 は全く検出されなかった。この結果、CS-807 が吸収後速やかに加水分解され、抗菌活性を持つ R-3763 として血中を循環することが明らかとなった。

2. 尿糞中排泄

ラットに $\text{CS-807-}^{14}\text{C}$ を経口で、また抗菌活性体である R-3763- ^{14}C を経口および静注投与後の放射能の尿糞中排泄率を Table 1 A に示した。R-3763- ^{14}C を静注投与後 72 時間の尿中排泄率は 82.8% であったのに対して経口投与後の尿中排泄率は 9.4% であり R-3763 の消化管吸収率は約 10% と推定された。これに対して $\text{CS-807-}^{14}\text{C}$ 経口投与では投与放射能の 58% が尿中に排泄され、尿中放射能の約 90% が R-3763 として検出された。これらの結果はエステル型プロドラッグ化により R-3763 の消化管吸収性が約 6 倍上昇したことを示すとともに吸収後速やかに CS-807 が R-3763 に活性化される事を示している。CS-807- ^{14}C をイヌおよびサルに経口投与後の尿排泄率はそれぞれ Table 1 B および Table 1 C に示すように、イヌで 56.3% (120 時間)、サルで 38.1% (168 時間) でありいずれもその大

Table 2 Distribution of radioactivity in gastrointestinal lumen and gastrointestinal walls after oral administration of CS-807-¹⁴C to rats (13mg/kg, n=2)

Part of gastrointestinal	% of dose							
	1hr		2hr		6hr		24hr	
	Lumen	Walls	Lumen	Walls	Lumen	Walls	Lumen	Walls
Stomach	29.2	7.0	1.6	0.8	0.1>	0.1	0.3	0.1>
Upper small intestine	2.7	10.1	0.8	3.0	0.1>	0.1	0.1>	0.1>
Lower small intestine	6.8	5.2	16.0	8.1	1.7	1.4	0.2	0.1>
Cecum	0.3	0.1	5.6	0.8	22.9	2.4	3.7	0.2
Lower large intestine	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1>	0.1	1.5	0.1
Feces	-	-	-	-	-	-	34.5	-
Total	38.9	22.6	24.1	12.8	24.8	4.1	5.7	0.4
% Absorbed	38.5		63.1		71.1		59.4	

部分が投与24時間後に排泄された。また血漿中と同様いずれの動物においても尿中に未変化のCS-807は排泄されなかった。糞中への排泄率はラット、イヌおよびサルでそれぞれ38.0% (72時間), 37.0% (120時間) および57.3% (168時間) であり尿糞中への排泄合計はいずれも95%前後となり吸収後残留することなく体外に排泄されることが示された。

3. 腸腔内残存率による吸収の推定

CS-807経口投与後の吸収率を直接に評価するために、ラットにCS-807-¹⁴Cを経口投与後に消化管各部位の腔内、および壁内に残存している放射能を測定し、Table 2に示した。消化管腔からの吸収は2時間では

ぼ完了し、この時点で血中に60%以上が、また6時間後は、70%以上が吸収された。消化管内に残存した放射能は2時間では小腸下部に、6時間では盲腸に達し少なくとも10時間までは盲腸内に滞留したあと糞中に排泄された。未吸収放射能をTLCで検討した結果、投与1時間後の胃内未吸収物(投与量の29%)の85%は、未変化CS-807であったが、2時間後の小腸下部腔内では(投与量の16%)、その60%以上がR-3763であり、以後盲腸内に移行し、(投与量の約20%)さらに代謝分解を受け主としてR-5002となって排泄されることが明らかになった。

4. 腸吸収部位

CS-807の消化管からの吸収部位を知る目的で、CS-807-¹⁴Cを0.5%トラガント懸濁液として腸ループ内に投与し、その吸収率を測定した。Table 3に示したようにその吸収率は、十二指腸>小腸上部>小腸下部>

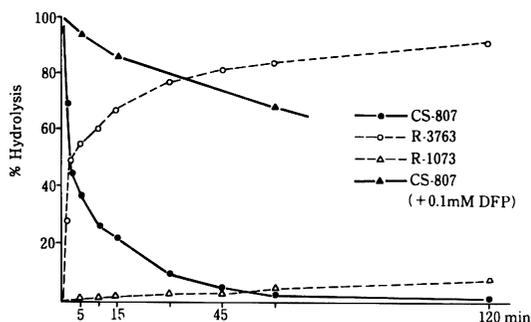
Table 3 Absorption of CS-807-¹⁴C from different part of rat digestive tract (Dose:1mg/8cm loop, n=4, 30min)

Digestive tract	Disappearance from lumen	Retained in tissue	Absorbed into blood
Stomach	27.49±1.71	11.28±2.21	16.22±3.59
Duodenum	63.46±1.14	42.79±0.53	20.67±1.17
Upper small intestine	59.78±7.65	48.57±5.70	11.21±2.15
Middle small intestine	43.75±2.72	33.75±1.85	10.00±1.39
Lower small intestine	54.86±5.57	36.85±3.54	18.01±3.75

Values represent mean±S.E.

Fig. 3 Hydrolysis of CS-807 in 9000 g supernatants from rat small intestine

Concentration of CS-807=130 μg/ml



小腸中部>胃の順であり胃からも吸収が認められるものの十二指腸、小腸上部からの吸収が最も大きいことが示された。

5. 腸管での加水分解

1) ホモジネート中での加水分解

消化管上部から吸収された CS-807は、循環血では R-3763の形になっていたことから、吸収過程において、CS-807が R-3763に加水分解されることが推察された。そこで、ラット小腸上部の9000G遠心血清における CS-807 (130 μ g/ml) の加水分解性を測定した。Fig. 3 に示したように 25% ホモジネート中で、CS-807は急速に加水分解され、ほぼ定量的に活性体である R-3763が生成した。この結果は CS-807が吸収過程において腸管壁で十分加水分解されうること示している。この加水分解で R-3763と異なる生成物が検出されたが、これは標品との比較から R-3763の異性体である R-1073と同定された。CS-807を 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 60分 37°C でインキュベートすると徐々に加水分解され 2 時間後には 15% の R-1073を生じたことから、R-1073の生成は、CS-807の化学的な分解により副生したものと結論された。また、Fig. 3 では、腸ホモジネートに非特異的エステラーゼ阻害剤である DFP (Diiso-

propylfluorophosphate) を添加すると、加水分解が著明に抑制された。

2) 門脈血中の吸収形態

CS-807-¹⁴C (1 mg/loop) をラット小腸上部の結紮腸ループ内に投与し、門脈血中に到達した放射能の形態を Fig. 4 に TLC オートラジオグラムとして示した。有意な放射性スポットとして検出されたのは、R-3763のみであり投与形である CS-807は有意には検出されなかった。本試験の投与量は約 5 mg/kg に相当するが、この投与量では CS-807が速やかに腸壁内に移行し、加水分解され R-3763として門脈血に吸収されることが示された。

6. 組織内濃度

Table 4 に示したように消化管を除く組織内濃度は、投与後急速に上昇し、投与 1 時間にピーク値に達した。消化管壁以外で最大濃度を示したのは腎であり、血漿、肝、肺がこれにつぐ濃度を示した。以後、血漿では、半減期 1.9 時間 (ピーク ~ 4 時間まで) で減少し、24 時間にはピーク時の 1% 程度にまで低下し、他の組織でもほぼ血漿同様の減少を示した。Fig. 5 には、投与 30 分、2 時間、6 時間後のラット全身オートラジオグラムを示したが腎で最も高く、肝、肺、皮膚、ならびに全身の

Fig. 4 *In situ* absorption from in portal blood

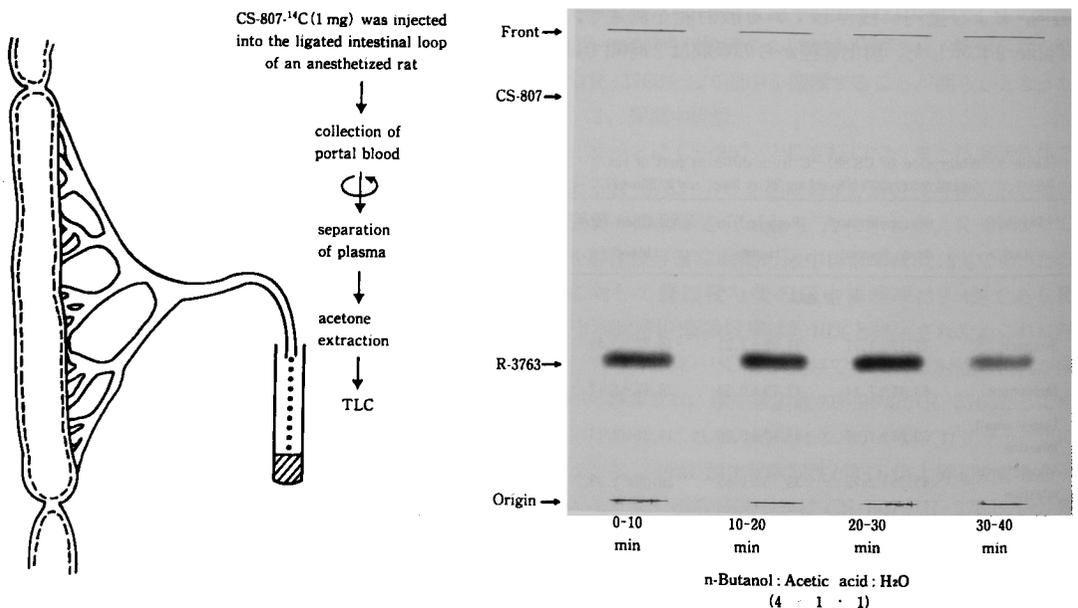


Table 4 Tissue distribution of radioactivity after oral administration CS-807-¹⁴C to rat

(13mg/kg, n=4)

Tissue	Concentration ($\mu\text{g/ml}$ or g) ^{a)}							
	0.5hr	1hr ^{b)}	2hr	4hr	6hr	10hr	24hr	48hr
Blood	3.90 ± 0.68	4.08 ± 0.87	3.29 ± 0.47	1.47 ± 0.24	0.62 ± 0.25	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.01 ± 0.00
Plasma	7.40 ± 1.36	8.07 ± 2.49	5.93 ± 0.92	2.78 ± 0.45	1.14 ± 0.41	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Brain	0.18 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	<0.01	<0.01
Eyeball	1.05 ± 0.24	0.80 ± 0.11	0.66 ± 0.11	0.46 ± 0.14	0.32 ± 0.17	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Salivary gland	1.75 ± 0.36	1.80 ± 0.40	1.57 ± 0.49	0.71 ± 0.14	0.54 ± 0.22	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	<0.01
Thyroid gland	2.21 ± 0.43	1.82 ± 0.33	1.50 ± 0.22	0.66 ± 0.07	0.64 ± 0.16	0.28 ± 0.06	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.05
Heart	1.01 ± 0.18	1.21 ± 0.30	0.88 ± 0.16	0.43 ± 0.05	0.18 ± 0.07	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Thymus	0.48 ± 0.09	0.56 ± 0.15	0.48 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Lungs	1.92 ± 0.36	2.39 ± 0.77	2.02 ± 0.38	0.92 ± 0.08	0.38 ± 0.12	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Liver	4.30 ± 0.86	4.31 ± 1.42	2.46 ± 0.39	1.54 ± 0.22	0.71 ± 0.15	0.23 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.06 ± 0.00
Pancreas	0.91 ± 0.17	1.25 ± 0.34	0.98 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.17	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	<0.01
Spleen	0.62 ± 0.11	0.50 ± 0.11	0.39 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Stomach	60.57 ± 5.47	26.28 ± 3.77	16.12 ± 5.20	4.83 ± 1.07	1.38 ± 0.47	0.29 ± 0.04	0.13 ± 0.06	0.03 ± 0.01
Small intestine	116.98 ± 21.40	59.63 ± 6.63	40.43 ± 4.67	15.41 ± 6.84	2.56 ± 1.79	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.06	<0.01
Duodenum	150.56 ± 17.76	75.65 ± 8.72	59.85 ± 31.39	23.45 ± 11.47	2.90 ± 1.91	0.18 ± 0.06	0.09 ± 0.05	0.01 ± 0.00
Large intestine	4.12 ± 2.90	1.51 ± 0.51	0.88 ± 0.15	1.34 ± 0.81	2.92 ± 1.51	2.00 ± 0.31	0.19 ± 0.03	0.06 ± 0.02
Caecum	1.69 ± 0.47	2.13 ± 0.05	2.04 ± 0.76	5.43 ± 1.96	5.95 ± 1.01	10.81 ± 6.60	0.85 ± 0.26	0.24 ± 0.10
Kidney (right)	9.09 ± 1.39	9.86 ± 2.05	8.08 ± 1.29	4.25 ± 0.86	1.83 ± 0.88	0.33 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.08 ± 0.01
Kidney (left)	9.50 ± 1.53	10.21 ± 2.31	8.02 ± 1.04	4.63 ± 1.04	1.77 ± 0.83	0.32 ± 0.04	0.19 ± 0.04	0.08 ± 0.00
Adrenal	1.77 ± 0.35	1.45 ± 0.30	0.95 ± 0.12	0.71 ± 0.11	0.58 ± 0.16	0.43 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.08 ± 0.03
White fat	0.62 ± 0.10	0.73 ± 0.22	0.57 ± 0.11	0.27 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.08 ± 0.05	<0.01	<0.01
Testis (right)	0.44 ± 0.08	0.79 ± 0.16	0.64 ± 0.10	0.37 ± 0.11	0.15 ± 0.06	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.00	<0.01
Testis (left)	0.47 ± 0.10	0.69 ± 0.19	0.63 ± 0.10	0.28 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.03 ± 0.000	0.01 ± 0.00	<0.01
Skeletal muscle	0.84 ± 0.15	0.76 ± 0.24	0.75 ± 0.19	0.36 ± 0.07	0.18 ± 0.10	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01	<0.01
Lymphnode	1.72 ± 0.16	0.96 ± 0.14	1.01 ± 0.09	0.45 ± 0.10	0.34 ± 0.14	0.18 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.04 ± 0.02

a) Values represent the mean \pm S.E. as μg equivalent to R-3763; b) n=3

Fig. 5 Whole-body autoradiograms of CS-807-¹⁴C in Wistar-Imamichi rats (13 mg/kg, p.o.)

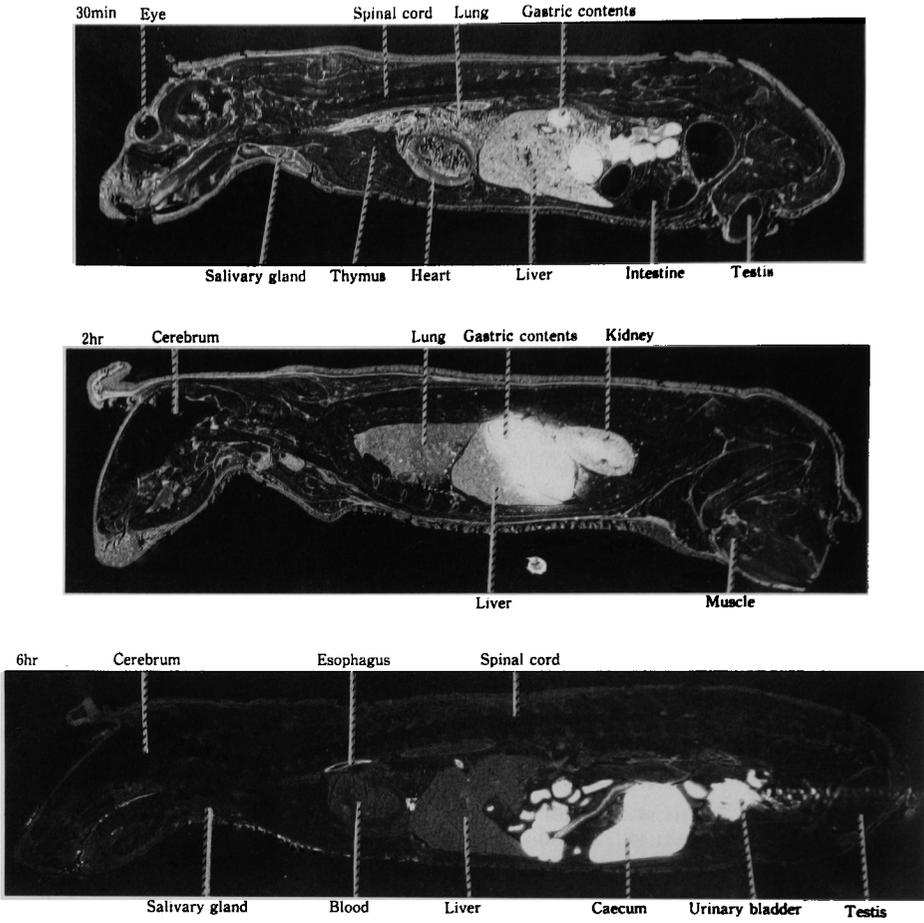
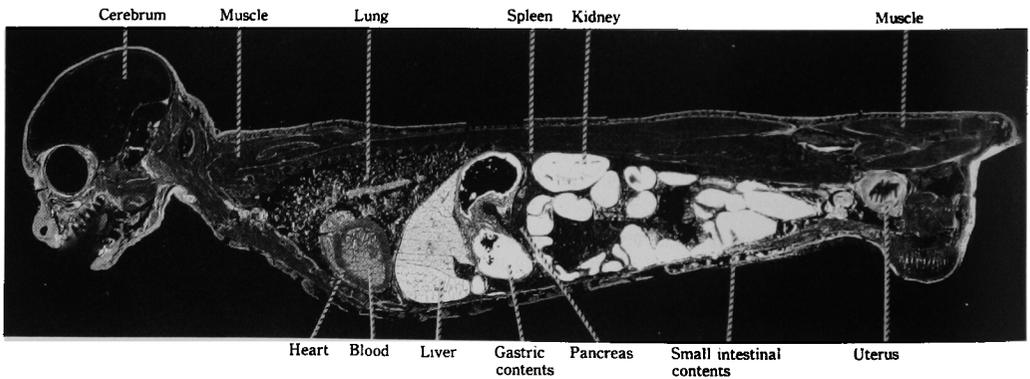


Fig. 6 Whole-body autoradiogram of CS-807-¹⁴C in squirrel monkey 2hr after oral administration (13 mg/kg)



液に血漿と同程度の濃度に分布することが明確に示された。Fig. 6はCS-807- ^{14}C 投与2時間後のリスザルにおける全身オートラジオグラムを示している。ラットと同様、消化管以外では腎が最大濃度を示し、肝への移行性も血漿より高いことが示された。さらに血漿、肺について、皮膚、子宮へも高い移行が認められた。一方、ラット、リスザルとも大脳はじめ中枢組織への移行は低いことが確認された。

7. 胆汁中排泄

投与6時間までに投与放射能の $4.3 \pm 1.3\%$ 、投与24時間までには $8.5 \pm 0.8\%$ が胆汁中に排泄された。投与6時間の胆汁放射能のうち約60% (投与量の $2.2 \pm 0.7\%$) が抗菌活性をもつR-3763で排泄されており、R-3763以外には、R-1073 ($0.6 \pm 0.1\%$) や、R-5002 ($0.5 \pm 0.1\%$) が検出された。

Table 5 Urinary and fecal metabolites 24hr after oral administration of CS-807- ^{14}C to rats, dogs and monkeys (13mg/kg)

Metabolites (n)	Rats		Dogs	Monkeys
	exp I (2)	(3)	exp II (4)	(3)
Urine	% of dose			
CS-807	—★	—	—	—
R-3763	48.36	50.41 ± 0.65	39.80 ± 3.46	18.44 ± 1.45
R-1073	2.49	2.37 ± 0.13	3.62 ± 0.74	1.75 ± 0.14
R-5002	2.81	3.17 ± 0.82	2.79 ± 0.36	2.63 ± 0.24
Feces				
CS-807	—	—	—	—
R-3763	2.88	nd★★	11.96 ± 4.51	1.36 ± 0.24
R-1073	2.55	nd	2.83 ± 0.22	1.88 ± 0.47
R-5002	16.05	nd	2.98 ± 0.70	15.12 ± 4.18

★: not significantly detected

★★: nd=not determined

8. 尿、糞中代謝物

CS-807- ^{14}C をラット、イヌおよびサルに経口投与(13mg/kg)後の尿および糞中に排泄された代謝物を、シリカゲル TLCにより分離・定量した。24時間までの結果をTable 5に示した。尿中の主代謝物は、抗菌活性体であるR-3763であることが示された。R-3763以外に二重結合の転移した異性体であるR-1073およびR-5002が有意に検出された。未変化CS-807は全く検出されなかった。

9. バイオオートグラム

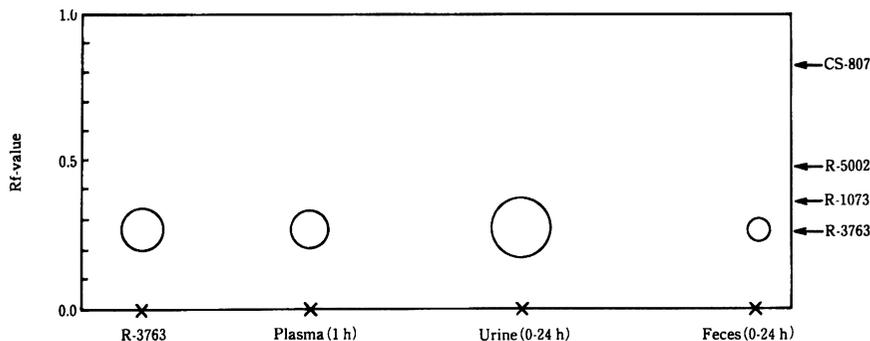
CS-807- ^{14}C をラットに経口投与後の血漿、尿、および糞の抽出液のバイオオートグラムを作製した。その結果、Fig. 7に示したようにいずれの生体試料においても抗菌活性を持つスポットは1個のみ検出され、その位置は標品のR-3763と完全に一致した。この結果からCS-807はR-3763として抗菌活性を示すことが確認された。

10. 血清蛋白結合性

CS-807は経口投与後は血漿中で抗菌活性体R-3763として存在することからR-3763の血清蛋白結合率をヒトおよび他の動物種について検討するとともに他の経口用抗生物質と比較した。Table 6に示したようにR-3763のヒト血清蛋白結合率は40.9%と他の動物種に比較して低く、イヌでの結合率が最も高い値を示した。一方、Cefixime (FK-027) およびT-2525 (T-2588の活性体)のヒト血清蛋白結合率はそれぞれ70%²⁾および75%³⁾であることが報告されているが、我々の測定においてもほぼ同じ68%および83%の結合率を示し、R

Fig. 7 TLC-Bioautogram of urine, plasma and feces in rats administered with CS-807 (13 mg/kg, p.o.)

Plate: Silica gel G (Merck Co.)
Solvent: n-Butanol: Acetic acid: H₂O=4:1:1
Test organism: *S. aureus* 209P



-3763の結合率がこれらに比較して低いことが明らかとなった。しかし、CCL, CEX および AMPC のヒト血清蛋白結合率を Table 6 あるいは既報の値^{2),3)}と比較すると R-3763 とほぼ同程度かこれより低い結合率であった。なお種差に関しては R-3763 同様、Cefixime もイヌ血漿蛋白との結合率が最も高かったのに対して T-2525 は逆にイヌでの結合率が他の動物に比較して著しく低く、化合物間で差の大きいことが認められた。

III. 考 察

¹⁴C で標識した CS-807 をラット (Wistar-Imamichi), イヌ (Beagle) およびサル (*Cynomolgus*) に 13mg/kg 経口投与した結果ラット, イヌでは投与放射能の50%以上が, またサルでも約40%以上が尿中に排泄された。活性原体である R-3763 の¹⁴C 標識体をラットに経口投与後の尿排泄率が10%以下であったことから, CS-807 の吸収率は活性体の6倍に増加しており経口性プロドラッグとして高い吸収性を持つことが明らかとなった (Table 1A, B, C)。

CS-807-¹⁴C を投与後の血漿中放射能濃度はイヌが全時点を通じて最も高い値を示し, ラットがこれに次いだ。サルでは血中濃度が徐々に上昇しピーク時点が4時間と遅く最高血中濃度もイヌ, ラットに比較して低い値であった (Fig. 2)。血中濃度では種差がみられたものの血中放射能の大部分はいずれの動物でも R-3763 であり CS-807 自身は検出されなかった。Phase I 試験に

Table 6 Serum protein binding of R-3763 and other oral antibiotics
In vitro, 90% of serum
Incubated for 30min at 37°C
Ultrafiltration method
(25 µg/ml)

	% binding			
	Man	Dog	Rat	Mouse
R-3763	40.9	87.7	57.8	47.4
FK-027	68.4	96.5	81.1	66.3
T-2525	83.1	21.6	91.1	80.9
CCL	34.6	19.9	22.2	16.7
CEX	4.5	9.1	17.4	18.7
AMPC	36.1	22.9	22.0	22.9

においてヒトに CS-807 を経口投与後の R-3763 の24時間尿中排泄率は40~50%と報告されている⁴⁾。動物における24時間尿中への R-3763 の回収率は, ラットで約50%, イヌで40%, サルでは20%弱 (Table 5) であり, ヒトは, ラットとイヌの中間に位置している。また血中濃度もイヌとラットの中間の値を示しており, ヒトにおける

CS-807 は試験した動物種の中ではラットとイヌの中間的な体内動態を示しカニクイザルでの動態はヒトとは若干異なるものと推定される。

CS-807 のラット消化管からの吸収率を消化管内残存率から求めたところ, 吸収は投与2時間ではほぼ完了し, 吸収率は70%以上と推測された (Table 2)。R-3763-¹⁴C を静注投与した時の尿中排泄率に対する経口 CS-807 の尿中排泄率 (Table 1A) から推測した吸収率も70.2%であり, ラットにおける吸収率は, 約70%相当と結論される。

吸収部位については, 投与2時間時点で, 十二指腸から小腸上部(空腸)にかけてはほとんど放射能が無く, この時点で小腸下部(回腸)に検出された放射能が, ほぼ未吸収分として, 糞中に排泄されたことから吸収は小腸上部で生じることが推定された。この推定は, 麻酔ラットの消化管各部位の結紮ループからの CS-807-¹⁴C の吸収速度の測定により実証され, 十二指腸から空腸にかけて CS-807 が高率に吸収されることが示された (Table 2)。

投与された CS-807 が血漿中にも, 尿中にも検出されなかったことは, CS-807 が吸収過程で速やかに加水分解されることを強く示唆している。事実, CS-807 はラット腸ホモジネート中で, DFP により阻害される非特異的エステラーゼにより極めて容易に活性型 R-3763 に加水分解されることが示され (Fig. 3), また *in situ* の門脈血採取により, 門脈中に R-3763 として移行していることが確認された (Fig. 4)。これらの実験結果は, 以前我々が ampicillin の経口性プロドラッグ, pivampicillin の吸収について報告した機構⁵⁾と同様に, CS-807 が消化管上皮細胞に移行後, 細胞内エステラーゼにより, R-3763 に活性化されて血流へ吸収されてゆくことを示している。

CS-807-¹⁴C 経口投与後の体内分布は, ラットとリスザルでの全身オートラジオグラフィーおよびラットでの放射能濃度の測定により検討された (Fig. 5, 6)。両方法で得られた結果は良く一致し, 消化管を除いては, 腎が最高濃度を示し, 肝, 肺, 皮膚, 子宮などが血漿とほぼ同程度の濃度を示した。しかし, 通常の脂溶性薬物に比較すると組織への移行は低く, 全身にわたって組織間隙に相当する体液に血漿と同濃度で分布することが全身オートラジオグラフィーで明確に示された。体液への分布パターンは注射用セファロsporin の一つである cefmetazole と類似した分布⁶⁾であり, CS-807 が吸収後は R-3763 として血中を循環しているという観察結果と良く一致する。

吸収後の CS-807 の排泄は一部が肝を經由して胆汁中に排泄される他は、腎經由で尿中に排泄される。これに伴い血漿中 R-3763 はラットでは半減期約 2 時間で消失し、各組織内からもほぼ同様の半減期で消失し、体内への残留性は認められなかった。ラット胆汁に 3% 以上の R-3763 が排泄されたことは、ヒトにおいても胆管内に R-3763 が排泄され、胆道系感染症に薬効を発現する可能性を示唆している。

CS-807 投与後の尿、糞および血漿中のバイオオートグラムはいずれも R-3763 に一致する位置にのみ抗菌活性スポットを示し、抗菌活性をもつ他の代謝物は無いことが示された (Fig. 7)。しかし、 ^{14}C -標識体を用いた今回の実験から尿および胆汁中に、R-3763 の二重結合が転移した異性体 R-1073 および 7 位側鎖由来の R-5002 が同定された。R-5002 は、盲腸内で生成し、糞に排泄されたことから、CS-807 由来の消化管内 R-3763 が盲腸内の腸内細菌により代謝分解されて生じたと考えられる。尿および胆汁により排泄された R-5002 は消化管下部で生成したものの一部が吸収された結果と推定される。一方、CS-807 を 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に溶解すると、緩徐ながら R-3763 の二重結合の転移した異性体を生じたことから、R-1073 は非酵素的な分解過程により生成したと考えられる。これらの結果から推定された CS-807 の体内動態を Fig. 8 に示した。

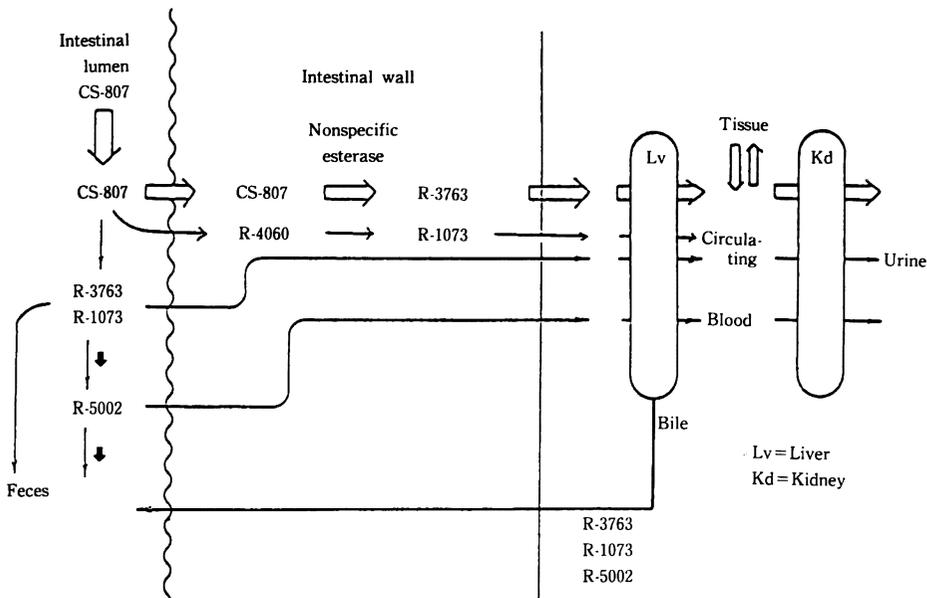
血中の活性体 R-3763 の蛋白結合率は動物に比してヒトでは低く、40% 程度であった。この値は CEX, CCL などよりは高いものの、Cefixime や T-2588 の活性体 T-2525 と比較すると低い (Table 6)。抗菌活性の効力の強さは、血漿中の非蛋白結合部分の濃度に依存していると考えられ、R-3763 の蛋白結合率が低いことは本剤の薬効の面で有用と推察される。なお、R-3763, Cefixime が各動物種の中でイヌで最も高い結合率を示したのに対して、T-2525 は逆にイヌでの結合率が著しく低く抗生剤の蛋白結合性を考察する上で興味ある知見と思われる。

以上、CS-807- ^{14}C 体を用いて明らかになった実験動物における吸収、分布、代謝、排泄像から CS-807 が活性体 R-3763 の易吸収性プロドラッグとして、有用な体内動態の性質を有していることが示された。

謝 辞

本研究において、代謝物の同定にあたり、当研究所、池田敏彦博士、桑野晴光主任研究員の協力を、またバイオオートグラム作製においては、科学技術研究所 (株) 五十嵐勇、小山睦子両氏の協力を得たことを感謝する。また、代謝研究の全般につき、佐藤栄輝、広田孝司、唯木わかこ、下村優子、黒岩千登世、川崎陽子、亀山恵美、半田ちなみ、各研究員の協力に対し感謝する。

Fig. 8 Metabolic pathways of CS-807 in rats.



文 献

- 1) 徳井太郎, 榎 秀美, 池田敏彦, 木下 武, 広田孝司, 下村優子, 駒井 亨: 経口用セフェム剤 CS-807の代謝(II)代謝物の同定とその体内動態。薬物動態 2: 432-433, 1987
- 2) 坂本 博, 広瀬俊治, 峯 靖弘, 五島達智子, 西田実, 桑原章吾: 新しい経口セファロスポリン, Cefixime (CFIX) の実験動物における体内動態について。Chemotherapy 33 (S-6): 157-168, 1985
- 3) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 高橋礼子, 貞木 浩: 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588の実験動物における体内動態について。Chemotherapy 34 (S-2): 122-133, 1986
- 4) 熊沢浄一: CS-807の概要。第3回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム抄録, 123 pp, 1987
- 5) SHINDO, H.; K. FUKUDA, K. KAWAI & K. TANAKA: Studies on intestinal absorption of pivampicillin and species difference in the intestinal esterase activity. J. Pharm. Dyn. 1: 310-323, 1978
- 6) SHINDO, H.; K. KAWAI, T. IKEDA, I. IGARASHI & S. SUGAWARA: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism of Cefmetazole in *Cynomolgus* Monkeys. J. Antibiotics 35: 742-754, 1982

ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISM AND EXCRETION OF CS-807, A NEW ORAL CEPHEM ANTIBIOTIC, IN EXPERIMENTAL ANIMALS

TORU KOMAI, KENJI KAWAI, HIDEMI TSUBAKI, TARO TOKUI, TAKESHI KINOSHITA and MINORU TANAKA
Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo

Absorption, distribution, excretion and biotransformation of ^{14}C -labeled CS-807 was studied after oral administration to Wistar-Imamichi rats, beagle dogs and *Cynomolgus* monkeys, at the dose of 13mg/kg.

CS-807- ^{14}C was mainly absorbed from the upper part of the small intestine and the absorption rate was approximately 70% in rats. During absorption, CS-807 was rapidly hydrolyzed to its active form, R-3763, by non-specific esterase in the intestinal epithelium, and transferred to the circulatory blood. The plasma concentration of radioactivity was the highest in dogs (23.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), followed by rats (8.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and monkeys (3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

R-3763 was mainly excreted to the urine after being distributed to the kidney, liver, lung, skin or extracellular space in the whole body. Approximately 3% of the dose was excreted in the bile as the active acid.

Bioautography showed that R-3763 was the only active substance in the plasma and urine. Serum protein binding ratio in the human was approximately 40% and was lower than those in the experimental animals.