

NY-198の胆汁排泄と腸肝循環

齋藤 玲

北海道大学医療技術短期大学部

桶崎 英一・山田 健久・山口 俊明・長谷川 洋通・永田 治

北陸製薬株式会社 中央研究所

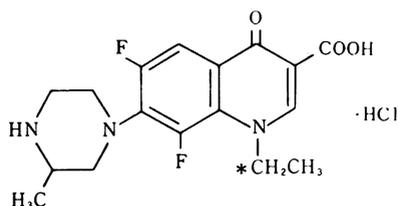
NY-198のラットにおける腸肝循環の機構およびヒトにおける胆汁排泄について検討した。

ラットにおける NY-198の腸肝循環を検討した結果、その59.8%が再吸収された。NY-198経口投与後胆汁中へ排泄された NY-198グルクロン酸抱合体は消化管内容物によって加水分解されて NY-198となり、胆汁中へ排泄された NY-198未変化体とともに消化管より再吸収されるものと考えられた。また、総胆管結石症患者に NY-198を経口投与後、得られた胆汁中には NY-198グルクロン酸抱合体および NY-198未変化体が高濃度で存在し、ヒトにおいてもラットと同様、腸肝循環の可能性が示唆された。

NY-198は、北陸製薬株式会社において新規に合成された、ピリドンカルボン酸系抗菌剤である。

本剤は *in vitro* および *in vivo* において、強い抗菌力を示し¹⁾、さらに動物における体内動態試験の結果、経口投与で速やかに吸収され、血中および組織内へ良好に移行し、その排泄経路は主として尿中であるが胆汁を経由するものも多く、また腸肝循環の多いことが報告されている²⁾。

本研究では、NY-198のラットにおける腸肝循環とその機構およびヒトにおける NY-198の胆汁排泄について検討したので報告する。



* : ¹⁴C-labeled position

Fig. 1. Chemical structure of ¹⁴C-NY-198

試験方法

I. ラットにおける NY-198の腸肝循環の機構

1. 投与検体

¹⁴C 標識 NY-198 (以下¹⁴C-NY-198と略す)を北陸製薬株式会社で合成し、用いた。標識部位は1位エチル基の1位炭素であった (Fig. 1)。その放射化学的純度は、n-プロパノール-濃アンモニア水混液 (7:3, v/v) を展開溶媒として用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) において99%以上であり、比放射能は8.4μCi/mgであった。

2. 実験動物

体重約200g (8週令) のSD系雄性ラット (日本クレア) を一夜絶食後、使用した。

3. 投与液の調整、投与量および投与方法

¹⁴C-NY-198の20mg/5mlの水溶液を調製し、20mg/kgの用量で、予め胆管カニューレを施したラットの胃内へゾンデにて強制投与した。腸肝循環の試験では、予め胆管カニューレを施したラットの十二指腸へ、¹⁴C-NY-198経口投与後得られた0~8 h 胆汁1mlもしくは採取した胆汁から HPLC にて分取した NY-198グルクロン酸抱合体水溶液 (NY-198換算量で約3mg含有) 1mlを注射筒にて投与した。

4. 試料の採取

投与後ラットをボールマンケージに入れ、胆汁はカニューレより、尿は自然排泄されたものを経時的に採取した。

5. NY-198グルクロン酸抱合体の分取

¹⁴C-NY-198をラットに経口投与後得られた胆汁をフィルター (LS 5 μm, Millipore) でろ過し、HPLCに

より分取した。すなわち装置として BIP-I 型液体クロマトグラフ (日本分光), 検出器に UVIDEC-100V 型紫外分光検出器 (280nm, 日本分光), カラムに Nucleosil 10C₁₈ (内径 10mm × 25cm, Nagel), 移動相としてアセトニトリル-1%酢酸混液 (2:8, v/v) を用い, 25 ± 1°C, 流量 9.0ml/min で NY-198 グルクロン酸抱合体を分取した (保持時間 2 ~ 2.5 min)。分取した NY-198 グルクロン酸抱合体溶液を凍結乾燥し, 残渣を少量の水に溶解した。

6. NY-198 グルクロン酸抱合体の確認

分取した NY-198 グルクロン酸抱合体の確認は, 装置として JMS-DX 303 型質量分析計 (日本電子) を用い, Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FAB-MS) により行なった。FAB-MS の条件は以下の通りである。加速電圧: 3.0KV, ガン電圧: 6.0 KV, マトリックス: グリセロール。

7. NY-198 グルクロン酸抱合体の *in vitro* 加水分解

消化管内容物により NY-198 グルクロン酸抱合体が加水分解され NY-198 を生成するか否かを検討した。

ラットを頸動脈切断により屠殺後, 小腸, 盲腸および結・直腸を摘出し, 内容物を採取した。小腸については, 腸内を 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄後反転させスライドグラスにより粘膜を採取した。採取した内容物および小腸粘膜を 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.0) でホモジネートし, 10% ホモジネート液を調製し, 酵素溶液とした。分取した NY-198 グルクロン酸抱合体水溶液 0.1ml (NY-198 換算量で 16.2 μg 含有) に 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.0) 1.9ml および酵素溶液もしくは β-glucuronidase 溶液 (500 sigma units/ml, *Escherichia coli*, Type IX, Sigma) 1.0ml を加え 37°C でインキュベートした。反応液を 0.2ml ずつ経時的にサンプリングし, NY-198 未変化体の定量に供した。なお, 反応液 0.2ml に 3N NaOH 0.2ml を加え, 沸騰水浴中 0.5 h インキュベートした後中和し, 以下同様に操作して求めた NY-198 濃度を 100% として加水分解率を算出した。

8. 定量法

(1) Total radioactivity

投与後採取した胆汁および尿の一定量をバイアルビンにとり, シンチレーター (Aquasol-2, NEN) を加え, LSC-653 型液体シンチレーションカウンター (Aloka) にて放射能 (¹⁴C) を測定した。なお, 放射能のクエンチングの補正は外部線源 (¹³⁷Cs) チャンネル比法により行なった。

(2) NY-198 未変化体およびその代謝物

投与後採取した胆汁および尿 0.1ml を用い, NY-198 の代謝物の定量法³⁾に従って NY-198 未変化体および代謝物の定量を行なった。なお, 検出器として RLC-551 型

radioanalyzer (Aloka) を用い, 胆汁および尿中代謝物の存在比を求め, total radioactivity より求めた濃度に存在比を乗じて濃度を求めた。

(3) NY-198

NY-198 グルクロン酸抱合体の *in vitro* 加水分解における反応液中の NY-198 の定量は反応液 0.2ml を用い, NY-198 未変化体の定量法⁴⁾に従って行なった。

II. ヒトにおける胆汁排泄

1. 基礎的検討

総胆管結石症にて, T チューブドレナージ施行中の 3 例を対象に NY-198 の胆汁中への移行を経時的に測定した。投与薬剤は NY-198 の 100mg カプセル剤 (NY-198 塩基として 100mg 含有) を 1 回 2 カプセル, 1 日 3 回連続経口投与した。得られた胆汁中の NY-198 未変化体, NY-198 グルクロン酸抱合体および代謝物 M-III ~ M-VI を HPLC により測定した。

2. 定量法

(1) NY-198 未変化体および NY-198 グルクロン酸抱合体

血清 0.5ml, 胆汁 0.1ml を用い, NY-198 未変化体の定量ではそのまま, 総 NY-198 (NY-198 未変化体 + NY-198 グルクロン酸抱合体) の定量ではサンプルに β-glucuronidase (300 sigma units, *E. coli*, Type IX, Sigma) を加えて 37°C, 2 h インキュベートした後, NY-198 未変化体の定量法⁴⁾に従って行なった。また, 総 NY-198 濃度から NY-198 未変化体濃度を差し引いて NY-198 グルクロン酸抱合体濃度を求めた。

(2) 代謝物 M-III ~ M-VI

胆汁中代謝物 M-III ~ M-VI の定量は, NY-198 の代謝物の定量法³⁾に従って行なった。なお, 濃度は NY-198 に換算して求めた。

試験結果

I. ラットにおける NY-198 の腸肝循環の機構

1. NY-198 の腸肝循環

胆管カニューレを施したラットの十二指腸内に, 予め ¹⁴C-NY-198 を経口投与後採取した胆汁を投与し, 胆汁中の放射能が再吸収されて胆汁および尿中へ排泄されるか否かを検討した。結果を Table 1 に示す。NY-198 の腸肝循環は投与後 24h で 59.8% であり, 永田らの報告した値²⁾とほぼ同様であった。再吸収後 24h までに排泄された胆汁および尿中の各代謝物の排泄率は Table 2 に示すように, 胆汁では NY-198 グルクロン酸抱合体が多く排泄され投与量の 14.6%, 尿では未変化体が多く排泄され投与量の 31.8% であった。また, 代謝物の排泄率は NY-198 経口投与時の値²⁾とほぼ同様であった。

Table 1. Enterohepatic circulation of radioactivity in rats 24h after intraduodenal administration of bile containing ^{14}C -NY-198 and its metabolites

Assay	% of dose		
	Bile	Urine	Total
Radioisotope	20.4±2.4	39.3±5.9	59.8±7.4
HPLC-assay	4.6±0.5	31.8±4.8	36.4±5.0

Each value represents the mean ± S.D. of five rats.

Table 2. Cumulative urinary and biliary excretion of NY-198 and its metabolites in rats 24h after intraduodenal administration of bile containing ^{14}C -NY-198 and its metabolites

Metabolite	Cumulative excretion(% of dose)		
	Urine	Bile	Total
NY-198	31.8±4.8	4.6±0.5	36.4±5.0
Glucuronide	2.7±1.3	14.6±2.2	17.3±2.7
M-III	1.2±0.3	0.2±0.2	1.4±0.3
M-IV	1.3±0.4	0.4±0.2	1.7±0.4
M-V	1.4±0.7	0.6±0.2	2.0±0.9
M-VI	N. D.	0.1±0.2	0.1±0.2

Each value represents the mean ± S.D. of five rats.

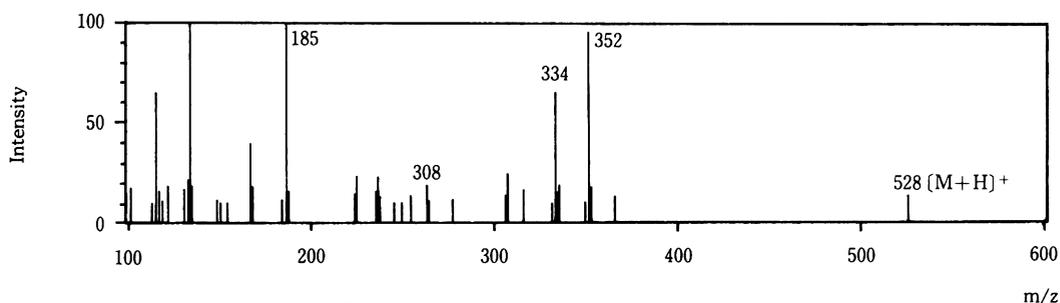


Fig. 2. Mass spectrum of NY-198 glucuronide

2. NY-198グルクロン酸抱合体の確認

HPLCにより分取したNY-198グルクロン酸抱合体をFAB-MSにより測定したスペクトルをFig. 2に示す。NY-198グルクロン酸抱合体の擬分子イオンピーク $[\text{M} + \text{H}]^+$ が m/z 528に認められ、グルクロン酸抱合体であることが証明された。

3. NY-198グルクロン酸抱合体の再吸収

胆管カニューレを施したラットの十二指腸内に分取したNY-198グルクロン酸抱合体を投与し、NY-198グルクロン酸抱合体が再吸収されて胆汁および尿中へ排泄されるか否かを検討した。結果をTable 3に示す。再吸収率は投与後24hで52.2%であり、腸肝循環の結果とほぼ同様であった。この時の胆汁および尿中の各代謝物の投与量に対する排泄率は、Table 4に示すように、胆汁ではNY-198グルクロン酸抱合体が11.5%、尿では未変化体が32.0%と多く排泄された。また、各代謝物の排泄率は腸肝循環の試験結果とほぼ同様であった。

4. NY-198グルクロン酸抱合体の *in vitro* 加水分解

NY-198グルクロン酸抱合体がラットの消化管内容物もしくは小腸粘膜により加水分解されるか否かを検討し

た。結果をFig. 3に示す。NY-198グルクロン酸抱合体は盲腸および結・直腸の内容物により速やかに加水分解され、その加水分解率は60分間インキュベートで概ね100%であった。一方、小腸内容物および小腸粘膜での加水分解率はそれぞれ6.3%、8.0%と低かった。

II. ヒトにおけるNY-198の胆汁排泄

NY-198を200mg、1日3回連続経口投与時の総胆管結石症患者におけるNY-198および代謝物の胆汁中濃度をTable 5に、その存在比をTable 6に示す。ヒト胆汁中には、NY-198未変化体およびラットで認められた代謝物(NY-198グルクロン酸抱合体、M-III、M-IV、M-V、M-VI)が確認された。

胆汁中NY-198未変化体濃度は18.21~26.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、NY-198グルクロン酸抱合体濃度は17.91~35.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ヒトにおいても胆汁中にはNY-198グルクロン酸抱合体がNY-198未変化体と同程度の高い濃度で存在していた。その他の代謝物は0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度であった。NY-198未変化体の存在比は40.3~63.6%、NY-198グルクロン酸抱合体では35.1~59.0%であり、その他の代謝物は0.8%以下であった。

Table 3. Reabsorption of radioactivity in rats 24h after intraduodenal administration of ^{14}C -NY-198 glucuronide

Assay	% of dose		
	Bile	Urine	Total
Radioisotope	16.0±3.1	36.3±7.1	52.2±9.6
HPLC-assay	3.8±1.0	32.0±6.5	35.8±6.6

Each value represents the mean ± S.D. of five rats.

Table 4. Cumulative urinary and biliary excretion of NY-198 and its metabolites 24h after intraduodenal administration of NY-198 glucuronide

Metabolite	Cumulative excretion(% of dose)		
	Urine	Bile	Total
NY-198	32.0±6.5	3.8±1.0	35.8±6.6
Glucuronide	1.9±1.0	11.5±2.8	13.4±2.6
M-III	0.3±0.3	N. D.	0.3±0.3
M-IV	1.5±1.0	0.2±0.1	1.7±1.0
M-V	0.4±0.1	0.5±0.2	0.9±0.2
M-VI	0.2±0.2	N. D.	0.2±0.2

Each value represents the mean ± S.D. of five rats.

Table 5. Biliary and serum concentrations of NY-198 and its metabolites during oral administration of NY-198 to patients with cholelithiasis at multiple doses of 200mg t. i. d.

Time (h)	N	Concentration (μg equivalent to NY-198/ml)							
		Bile						Serum	
		NY-198	Glucuronide	M-III	M-IV	M-V	M-VI	NY-198	Glucuronide
1.0	2	24.53 (8.51)	17.91 (18.63)	0.21 (0.23)	0.03 (0.01)	0.05 (0.01)	0.07 (0.02)	3.19	0.23
1.5	3	21.32 (15.80)	25.35 (17.41)	0.22 (0.16)	0.05 (0.04)	0.10 (0.09)	0.05 (0.02)	—	—
2.5	1	24.49	31.40	0.26	0.05	0.10	0.05	4.16	0.24
3.0	2	18.21 (20.11)	25.64 (27.54)	0.06 (0.01)	0.02 (0.00)	0.04 (0.03)	0.04 (0.01)	—	—
4.0	2	26.15 (3.94)	35.86 (30.38)	0.13 (0.10)	0.05 (0.06)	0.09 (0.08)	0.06 (0.01)	—	—

Each value represents the mean, S. D. in parentheses.

Table 6. Metabolic patterns in the bile during oral administration of NY-198 to patients with cholelithiasis at multiple doses of 200mg t. i. d.

Time (h)	N	Metabolic pattern (% of biliary excretes)					
		NY-198	Glucuronide	M-III	M-IV	M-V	M-VI
1.0	2	63.6±20.1	35.1±21.5	0.8±1.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.2
1.5	3	43.4± 4.8	55.6± 4.6	0.5±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1
2.5	1	43.5	55.7	0.5	0.1	0.2	0.1
3.0	2	40.3± 2.1	59.0± 1.3	0.4±0.4	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.2
4.0	2	47.7±26.7	51.9±26.6	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1

Each value represents the mean ± S. D.

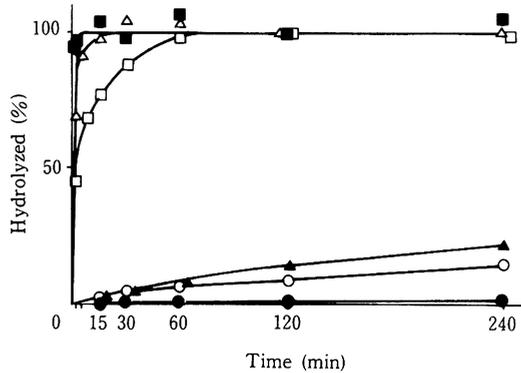


Fig. 3. In vitro hydrolysis of NY-198 glucuronide by colon-rectal(□), cecal(△) and small intestinal(○) contents, β -glucuronidase(■), small intestinal mucosa(▲) and control(●)

考 察

ラットにおける NY-198 の腸肝循環について検討した。ラットの十二指腸内へ投与した胆汁中放射活性の 59.8% が再吸収され、永田ら²⁾の報告と同様に NY-198 の腸肝循環が多いことが再確認された。この値は NY-198 経口投与後の胆汁中未変化体の割合 (21.9%)⁵⁾と比較して大きく、NY-198 の腸肝循環には未変化体以外の代謝物すなわち胆汁中に 63.1% の割合を占める NY-198 グルクロン酸抱合体の関与が示唆された。さらに、再排泄された胆汁および尿中未変化体の排泄率の合計は投与量の 36.4% であり、投与した胆汁中の未変化体の割合 (21.9%) より大きいことから、NY-198 グルクロン酸抱合体が消化管内もしくは体内で加水分解されて NY-198 を生じていることが示唆された。

NY-198 グルクロン酸抱合体の腸肝循環への関与をより直接的に調べるために NY-198 グルクロン酸抱合体を分取し、再吸収実験を行なった結果、腸肝循環の試験結果とほぼ同程度再吸収された。また、胆汁中未変化体および代謝物の排泄率も NY-198 経口投与時とほぼ同様であることから、NY-198 グルクロン酸抱合体が消化管内で加水分解されて NY-198 となり、再吸収されるものと考えられた。

多くの薬物においてグルクロン酸抱合体が消化管内の細菌叢で加水分解されて aglycone となり、再吸収されるという報告がなされており⁶⁻⁸⁾、NY-198 でも同様であると推察されたため、*in vitro* 加水分解試験を行なった。盲腸および結・直腸内容物により NY-198 グルクロン酸抱合体が速やかに加水分解されて NY-198 を生成した。

また、NY-198 の結・直腸部における吸収は比較的良好であること²⁾から加水分解された NY-198 が消化管下部

から再吸収されるものと推察された。

以上のことから、NY-198 経口投与後、胆汁中へ排泄された NY-198 グルクロン酸抱合体は消化管内容物によって速やかに加水分解されて NY-198 を生じ、生成した NY-198 が胆汁中へ排泄された NY-198 未変化体とともに消化管より再吸収されるものと考えられた。

ヒトにおける NY-198 の胆汁排泄を、総胆管結石症患者について検討した。ヒトの胆汁中には NY-198 グルクロン酸抱合体、NY-198 未変化体が多く存在し、他の代謝物は少なく、ラット⁵⁾と同様の傾向であった。胆汁中に NY-198 グルクロン酸抱合体および NY-198 未変化体が高濃度で存在することから、ヒトにおいてもラットと同様腸肝循環の可能性が示唆された。また、NY-198 未変化体が高濃度で胆汁中に排泄されたことより NY-198 の胆道感染症における有用性が支持された。

稿を終わるにあたり、ヒトの NY-198 経口投与後の胆汁を御提供いただいた中村 孝博士 (天使病院) に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一: NY-198 の細菌学的評価 - *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用 -. Chemotherapy 36 (S-2): 99~111, 1988
- 2) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198 の体内動態 IV - ¹⁴C-NY-198 によるラット, イヌにおける吸収, 分布, 排泄 -. Chemotherapy 36 (S-2): 151~173, 1988
- 3) 永田 治, 山田健久, 高橋和余, 桶崎英一, 柳田知司, 中西秀樹: NY-198 の体内動態 III - HPLC 法によるサルにおける吸収, 代謝, 排泄 -. Chemotherapy 36 (S-2): 144~150, 1988

- 4) 桶崎英一, 牧野栄一, 大道光一, 永田 治, 山田健久, 高橋和余, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態II—HPLC法とBioassay法によるイヌにおける吸収, 排泄—。Chemotherapy 36 (S-2): 138~143, 1988
- 5) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 長谷川洋通, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態V—¹⁴C-NY-198によるラット, イヌにおける代謝—。Chemotherapy 36 (S-2): 174~187, 1988
- 6) PLAA, G. L.: The enterohepatic circulation. Handbook of experimental pharmacology 28 (3) (EICHLER, O., A. FARAH, H. HERKEN & A. D. WELCH) pp.130-149, 1975
- 7) GLAZKO, A. J.; W. A. DILL & L. M. WOLF: Observations on the metabolic disposition of chloramphenicol (chloromycetin) in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 104: 452-458, 1952
- 8) CLARK, A. G.; L. J. FISCHER, P. MILLBURN, R. L. SMITH & R. T. WILLIAMS: The role of gut flora in the enterohepatic circulation of stilboestrol in the rat. Biochem. J. 112: 17-18, 1969

BILIARY EXCRETION AND ENTEROHEPATIC CIRCULATION OF NY-198

AKIRA SAITO

College of Medical Technology, Hokkaido University, Sapporo

EIICHI OKEZAKI, TAKEHISA YAMADA, TOSHIAKI YAMAGUCHI,

HIROMICHI HASEGAWA and OSAMU NAGATA

Central Research Laboratory, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

We studied the mechanism of enterohepatic circulation of NY-198 in rats and biliary excretion of NY-198 in humans.

The percentage of enterohepatic circulation of NY-198 was 59.8% of the dose, and the mechanism was as follows. NY-198 glucuronide, which was excreted into bile after oral administration of NY-198, was hydrolyzed to NY-198 by the intestinal contents, then reabsorbed from the intestine together with the parent NY-198 in bile.

Concentrations of NY-198 glucuronide and parent NY-198 were high in bile after oral administration of NY-198 to patients with cholelithiasis at multiple doses of 200 mg t.i.d.. We therefore think it possible that enterohepatic circulation of NY-198 in humans is similar to that in rats.