

デヒドロペプチダーゼ- I (DHP- I) の組織内分布の種差と panipenemの代謝に及ぼす影響

高萩英邦・広田孝司・松下洋子・村松重基・田中 実
三共株式会社・分析代謝研究所*

松尾英一
杏林大学医学部病理学教室

Panipenem(PAPM)を静脈内投与したときの代謝におけるデヒドロペプチダーゼ- I (DHP- I)の関与を調べるために、各種動物の主要臓器におけるDHP- I およびPAPM分解活性を測定した。

Glycyldehydrophenylalanine(GDPA)を基質としたDHP- I 活性を較べると、マウス、ウサギ、イヌ、サルおよびヒトにおいては腎の活性が最も高かったが、ラットにおいては肺で最も高い活性を示した。DHP- I 活性の高い臓器では概ねPAPMの分解活性も高く、DHP- I がPAPMの分解に深く関わっていることが示されたが、高いDHP- I 活性を有するヒト腎でのPAPMの分解活性は比較的弱く、基質特異性に種差があることもわかった。

ラットにPAPMを静脈内投与した後の血中濃度は、他の動物に比し著しく速く消失した。この時加水分解代謝物の生成率は高く、肺においてDHP- I がPAPMをよく分解することによるものと考えられた。

Key words : Panipenem/betamipron, カルバペネム, DHP- I

カルバペネム系抗生物質は、ジペプチダーゼの一種であるデヒドロペプチダーゼ- I (DHP- I)により加水分解を受けることが知られている^{1,2)}。そこで実験動物における各種臓器のDHP- I 活性並びにpanipenem (PAPM)の加水分解活性を測定するとともに、これらの動物にPAPMを投与後の血中濃度を測定しDHP- I 活性のPAPM加水分解活性に及ぼす影響を考察した。

I. 実験材料および方法

1. 化合物

PAPMおよびbetamipron(BP)は三共株式会社、第一生産技術研究所で製造されたものを用いた(ロット番号、PAPM : ZCP-102, BP : 121)。

DHP- I の活性測定に用いた基質glycyldehydrophenylalanine(GDPA)は、三共株式会社、化学研究所で、またPAPM加水分解物R976-2は分析代謝研究所で合成²⁾したもの用いた。

2. 実験動物

マウス : ddY系、雄性、体重約20g

ラット : Wistar Imamichi系、雄性、体重約300g

ウサギ : Japanese White系、雄性、体重約2.5kg

イヌ : Beagle系、雄性、体重約10kg

サル : Cynomolgus系、雄性、体重約4kg

(各n=3)

3. 組織の採取

組織としては肝、腎および肺を用いた。マウス、ラット、ウサギの組織は摘出直後に、イヌおよびサルの組織は摘出後-80°Cで保存したものを用いた。ヒトの組織は、杏林大学医学部病理学教室において剖検時に、顕微鏡標本作製用に採取した小組織片の整形の際に、残余した約1gの小組織片を用いた(n=3)。

4. 酶素液の調製

組織片を細切した後、組織湿重量の4倍量の50mM

MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonate, pH 7.0)緩衝液を加え、グラステフロンホモジナイザー(B. braun Melsungen AG)を用いて20%ホモジネートとし、酵素液とした。

5. DHP-I の活性測定

Campbellの方法³⁾を一部変更して用いた。即ち、反応液は50μM GDPA, 25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4, いずれも終濃度)および酵素液から成り、全量2.5mlとした。

反応はUV測定用キュベット中で行い、酵素液を加える前に予め37°Cで加温し、酵素液を添加することにより反応を開始した。反応はGDPAがDHP-IによりglycineとphenylpyruvateおよびNH₃に分解されるときのGDPAの減少速度を波長275nmでモニターし、対照液にはGDPAを抜いた反応液を用いた。

活性はCampbellの方法に従いミリユニック(mU)で表し、1mUは1分間に1nmoleのGDPAを加水分解する量を示している。なお、GDPAの分子吸光係数(ε)には 1.53×10^4 を用いて計算した³⁾。

6. DHP-I によるPAPM加水分解活性の測定

1mM PAPMの50mM MES緩衝液(pH7.4)中に、各組織ホモジネートを終濃度として5%ないし10%になるように添加し、反応を開始した。反応の停止は3倍量のメタノールを加え、攪拌することにより行った。反応停止後、遠心分離を行って除蛋白をし、上清中のPAPMを以下の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定した。

カラム：YMC-ODS-A312(6×150mm, 山村化学)

移動相：50mM 酢酸緩衝液／メタノール(9:1)

流速：1ml/min

検出：UV(297nm)

7. 動物におけるPAPMの投与と血中濃度の測定

イヌ、ウサギおよびラットにPAPM 50mg/kgを静脈内投与し、常法に従って採血、血漿を分離したのち、カラムスイッチング法を利用したHPLC⁴⁾により血漿中PAPMおよび加水分解代謝物R976-2²⁾の測定を行った。

1) PAPMの定量

PAPMの定量法は以下の通りである。

カラム I : G2000SW(7.5×300mm, 東ソー)

カラムII : YMC-ODS-A312(6×150mm, 山村化学)

移動相 I : 20mM MES緩衝液(pH7.0)/メタノール(95:5)

移動相 II : 10mM SDS(sodium dodecylsulfate), 20mM MES緩衝液(pH7.0)/メタノール(75:25)

流速：1ml/min

検出：UV(297nm)

2) R976-2²⁾の定量

R976-2の定量法は以下の通りである。

カラム I : G2000SW(7.5×300mm, 東ソー)

カラムII : センシューパックNH₂-2201N(6×200nm, センシュー化学)

移動相 I : 5mM 硫酸ナトリウム, 5mM リン酸緩衝液(pH6.0)

移動相II : 移動相I/テトラヒドロフラン(8:2)

流速：1ml/min

検出：UV(210nm)

II. 結 果

1. DHP-I 活性の臓器分布と種差並びにPAPMの分解活性との相関

各種動物における肝、腎および肺におけるGDPAを用いたDHP-I活性をTable 1およびFig. 1に示した。

Table 1. DHP-I activity^{**} in several tissues of humans, monkeys, dogs, rabbits, rats and mice (n=3)

		m unit/g tissue	
	Liver	Kidney	Lung
Human	—**	1638 ± 445	42 ± 11
Monkey	53.1 ± 20.4	1647 ± 274	143 ± 50
Dog	29.4 ± 2.5	2914 ± 268	92 ± 27
Rabbit	24.0 ± 5.8	597 ± 70	137 ± 24
Rat	48.9 ± 4.4	312 ± 29	702 ± 52
Mouse	76.3 ± 7.2	942 ± 64	133 ± 35

*) DHP-I activity was assayed using glycyldehydro-phenylalanine as a substrate.

**) Not determined

DHP-I活性はラットを除き、いずれも腎で最も高く、中でもイヌが極めて高いことが示された。ヒト、サルがイヌの約1/2の活性、次いでマウス、ウサギ、ラットの順であった。肺におけるDHP-I活性はラットを除き、腎の1/4~1/30と低く、肝ではさらに低いことがわかった。ラットにおけるDHP-Iは肺、腎、肝の順に高く、他の動物と比べ特異な分布であった。

一方、PAPMの分解活性(nmole/min/g組織)は、Table 2およびFig. 1に示したとおりである。腎におけるPAPMの加水分解活性はウサギ、イヌで高く、次いでラット、サル、マウスと続き、ヒトにおいては低いことが示された。一方、肺における分解活性はラットで著しく高く、これらは次に高い活性を示したウサギの約18倍高い活性であった。ウサギとイヌは同程度で、ヒト肺の活性はさらに低く、ラットの約1/70であった。サル、マウスについては有意な加水分解活性は観察さ

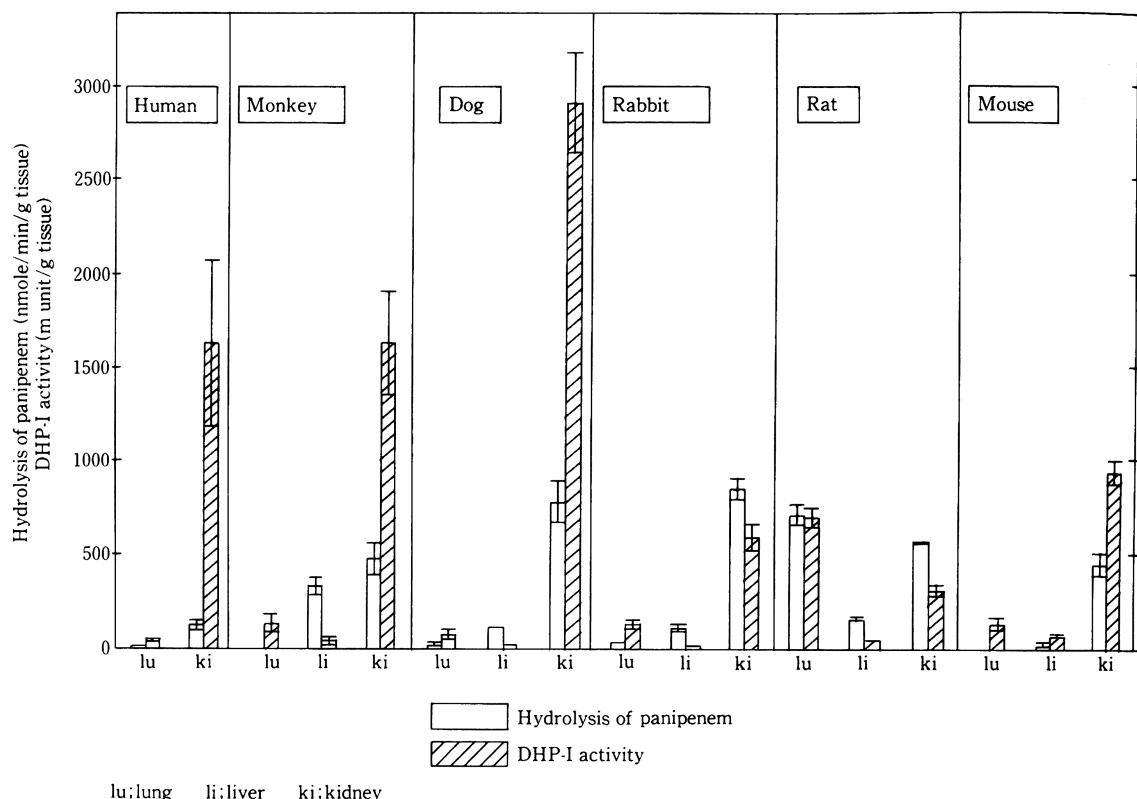


Fig. 1. DHP-I distribution and its hydrolysis activity of panipenem in several tissues of humans, monkeys, dogs, rabbits, rats, mice ($n=3$)

Table 2. Hydrolysis of panipenem by several tissues of humans, monkeys, dogs, rabbits, rats and mice ($n=3$)

		n mole/min/g tissue	
	Liver	Kidney	Lung
Human	—*)	130 ± 28	10.9 ± 4.8
Monkey	348 ± 45	496 ± 83	ND
Dog	128 ± 3	791 ± 110	35.7 ± 17.8
Rabbit	116 ± 19	854 ± 55	38.9 ± 5.6
Rat	166 ± 11	569 ± 7	715.0 ± 53.0
Mouse	20 ± 20	448 ± 60	ND

*) Not determined ND: not detected

れなかった。肝における活性についてはラット、ヒト以外の動物においては腎と肺の間の活性を示したが、サルを除きいずれも腎より著しく低い活性であった。

2. DHP-I活性のPAPMの血中濃度におよぼす影響

ラット、ウサギおよびイヌにPAPMを単回静注後の

血漿中PAPMおよび加水分解代謝物R976-2²⁾の濃度をFig. 2~4に、ヒトに60分間持続静注後の血漿中のそれらを、臨床第I相試験の結果⁷⁾を引用してFig. 5に示した。図中に示したように、R976-2の血漿中濃度下面積(Area Under the Curve : AUC)と、R976-2とPAPMのAUCの和に対する比((AUC) R976-2/(AUC) PAPM + (AUC) R976-2)はラット、ウサギ、イヌおよびヒトでそれぞれ、0.59, 0.17, 0.32および0.20であり、ラットにおけるR976-2の生成率が著しく大きい。このことは、肺におけるPAPMを基質としたDHP-Iの活性がPAPMの血中濃度に大きく関わっていることを示唆するものである。

III. 考 察

PAPM等のカルバペネム系抗生物質は哺乳動物のDHP-Iにより加水分解され¹⁾、PAPMはDHP-Iとの反応により加水分解代謝物R976-2を生成することは報告した²⁾。DHP-Iは腎の近位尿細管上皮に高濃度に分布し^{5,6)}、その活性は一般に合成のデヒドロペプチドであるGDPAの加水分解速度をもって表現される³⁾。

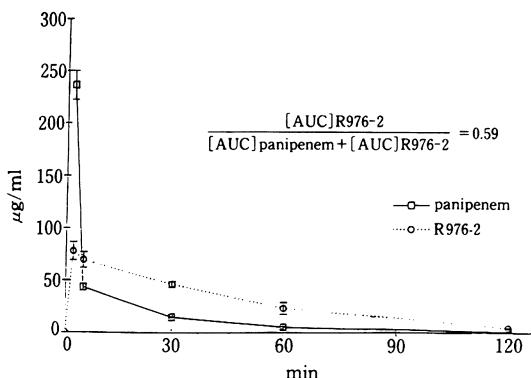


Fig. 2. Plasma concentration of panipenem and R976-2 after I.V. administration of [^{14}C] panipenem to rats (50mg/kg, n=3)

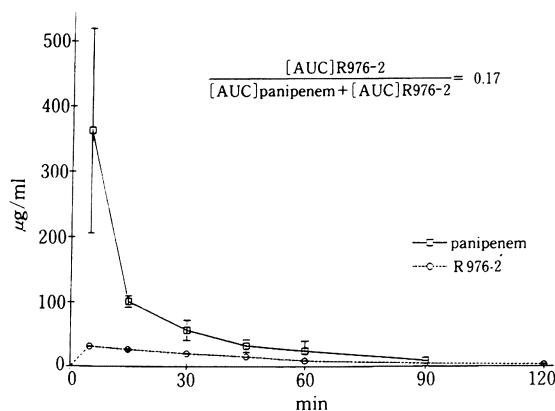


Fig. 3. Plasma concentration of panipenem and R976-2 after I.V. administration to rabbits (50mg/kg, n=3)

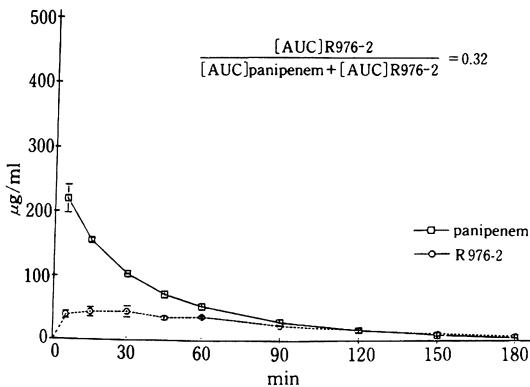


Fig. 4. Plasma concentration of panipenem and R976-2 after I.V. administration to dogs (50mg/kg, n=3)

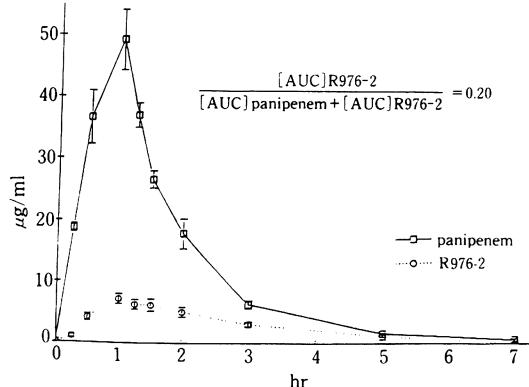


Fig. 5. Plasma concentration of panipenem and R976-2 after D.I. administration of panipenem/betamipron to human volunteers (1000mg/1000mg/body, n=5)

PAPMは、このGDPAと類似した構造を有し(Fig. 6)，矢印で示したペプチド結合部分が攻撃され、加水分解されると考えられる。

我々は、PAPMの主要排泄臓器である腎、血中濃度に関与すると考えられる肺および肝について、そのDHP-I活性、PAPM分解活性を測定した。さらにPAPM(ヒトの場合はPAPM/BP)を投与した後の血漿中PAPMとR976-2の濃度を測定し、これらの臓器におけるDHP-I活性、PAPM分解活性とin vivoにおけるPAPMの代謝分解との相関を検討した。

DHP-Iの活性はCampbellの方法³に従ってミリユニット(mU)単位で表したが、PAPMの分解速度(nmole/min/g組織)と同一の単位である。

腎におけるPAPM加水分解活性は、ウサギ、イヌ、ラット、サル、マウス、ヒトの順であった(Table 2)。しかしながら、in vivoにおける静脈内投与後のPAPM

の尿中回収率は、このin vitroにおけるPAPM分解活性とは必ずしも相関せず、例えばウサギのPAPM分解活性はラットのそれの1.5倍高いが、尿中回収率はいずれも約40%と有意な差は見られていない⁴。また、腎におけるDHP-I活性の種差も、これら動物の尿中回収率を説明できるものではなかった。以上、DHP-I活性がPAPMの加水分解に大きく関わっていることが示されたが、高いGDPA分解活性を有するヒト腎でも、PAPMの加水分解活性は他の動物種よりも低く、DHP-Iの基質特異性には種差があることも明らかになった。

一方、肺におけるGDPAとPAPM分解活性はラットにおいて著しく高く、他の動物の20倍、あるいはそれ以上の活性を有していることが明らかになった。Fig. 2~5に示したように、PAPMを静脈内投与した後の血中濃度はラットでは他の動物に比し速く消失し、加水分解代謝物R976-2の生成率も著しく高いことは、この

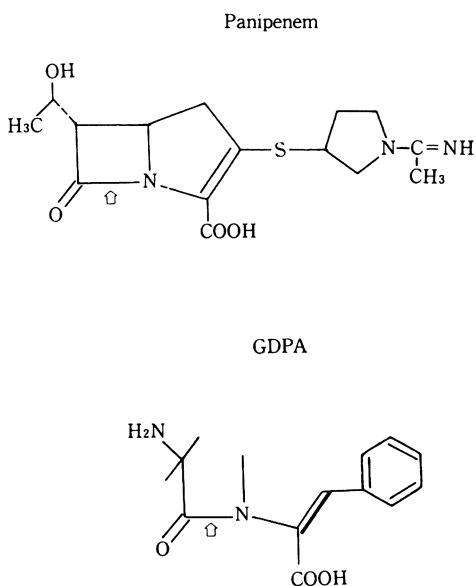


Fig. 6. Enzymatic hydrolysis of GDPA and panipenem by DHP-I

肺におけるPAPM分解活性によるものと考えられる。また、肝におけるPAPM分解活性の種差から、ラットにみられる血中濃度の速い消失を説明することは困難であった。

ヒトにおけるDHP-IのPAPM分解活性は、腎ではやや高いが、肺で極めて低い。ヒトにPAPM/BP投与後のPAPMの血中濃度と尿中回収率を、DHP-I阻害剤配合のイミペネム／シラスタチン(チエナム[®])投与後のイミペネムのそれと比較するとき、血中濃度はPAPM

でやや高く、尿中回収率ではイミペネムで高いと報告されている⁷⁾。このことはヒトにおけるPAPMの代謝もDHP-Iの臟器分布、特に腎と肺の活性に強く依存していることを示唆するものである。

文 献

- 1) Kropp H, Sundelof J G, Hajdu R, Kahan F M : Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by renal dipeptidase, dehydropeptidase-I . Antimicrob Agents Chemother 22 : 62~70, 1982
- 2) 高萩英邦, 松下洋子, 広田孝司, 重田明美, 村松重基, 中島栄一, 川原幸則 : Panipenem/betamipronの実験動物における体内動態—ラットおよびイヌにおけるpanipenem/betamipronの分布、代謝および排泄—。 Chemotherapy 39(S-3) : 206~226, 1991
- 3) Campbell B J. : Renal dipeptidase. Methods Enzymol 19 : 722~729, 1970
- 4) Takahagi H, Inoue K, Horiguchi M : Drug monitoring by a fully automated high-performance liquid chromatographic technique, involving direct injection of plasma. J Chromatogr 352 : 369~379, 1986
- 5) McIntyre T, Curthoys N P : Renal Catabolism of Glutathione. J Biol Chem 257 : 11915~11921, 1982
- 6) Hirota T, Nishikawa Y, Tanaka M, Fukuda K, Igarashi T, Kitagawa H : Localization of dehydropeptidase-I, an enzyme processing glutathione, in the rat kidney. J Biochem 102 : 547~550, 1987
- 7) 上野一恵, 島田 騰 : 第38回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム(1)。CS-976, 岐阜, 1990

IN VITRO DEHYDROPEPTIDASE-I ACTIVITY AND ITS
HYDROLYTIC ACTIVITY OF PANIPENEM IN SEVERAL TISSUES
IN ANIMAL SPECIES AND THEIR INFLUENCE
ON THE DISPOSITION OF PANIPENEM IN VIVO

Hidekuni Takahagi¹⁾, Takashi Hirota¹⁾, Yoko Matsushita¹⁾,
Shigeki Muramatsu¹⁾, Minoru Tanaka¹⁾, and Eiichi Matsuo²⁾

¹⁾Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

2-58 Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan

²⁾Department of Pathology, Kyorin University, School of Medicine

The influence of dehydropeptidase-I (DHP-I) activity on the elimination of panipenem (PAPM) *in vivo* was studied by examining glycyldehydrophenylalanine (GDPA) and PAPM hydrolytic activities in several tissues in animal species.

Renal GDPA hydrolytic activity was the highest in mice followed with rabbits, dogs, monkeys and humans, while in rats, it was the highest in the lung.

Tissues with high DHP-I activities have mostly high PAPM hydrolytic activity, which suggests DHP-I is strongly associated with the hydrolytic metabolism of PAPM. On the other hand, since the high DHP-I activity of human kidney has rather low PAPM hydrolytic activity, there exist species differences in substrate specificity of the DHP-I.

In rats, the plasma elimination of PAPM was the fastest accompanying with high plasma concentration of the hydrolytic product among animal species tested.

These results indicate the metabolic disposition of PAPM is deeply dependent on DHP-I activity especially in the lung and the kidney.