新規抗アレルギー薬 KW-4679 の体内動態 (第 4 報): KW-4679 のラットおよびイヌにおける代謝

大石 孝義・真柄 弘・安澤 亨・小林 弘幸
山口 和夫・小林 智

Disposition of KW-4679 (4): Metabolism of KW-4679 in Rats and Dogs

Takayoshi OHISHI, Hiroshi MAGARA, Tohru YASUZAWA, Hiroyuki KOBAYASHI,
Kazuo YAMAGUCHI, Satoshi KOBAYASHI

Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Shizuoka

Summary

The metabolism of KW-4679 was investigated in rats and dogs after oral administration of ^{14}C -KW-4679 or KW-4679.

1) After oral administration to rats, N-mono-demethyl-KW-4679 (M1), N-di-demethyl-KW-4679 (M2), KW-4679 N-oxide (M3), C8-hydroxyl-KW-4679 (M5), M5 sulfate (M4) and oxidated M5 (M6) were identified as the metabolites of KW-4679 in bile in addition to unchanged KW-4679.

2) When ^{14}C -KW-4679 was orally administered to fasting male rats, 66.4% of radioactivity detected in plasma at 0.5 hr after administration, accounted for the unchanged KW-4679. The main metabolite in plasma was M1 (7.7%). In urine, also, radioactivity was present mainly as the unchanged KW-4679, which represented 27.3% of dose. The main metabolite excreted in urine was M1 (6.0%) followed by M6, M5, M2, M3 and then by M4. The main metabolite in bile was M6 followed by M4 and then by the unchanged KW-4679. In feces, 19.4% of administered radioactivity was excreted as the unchanged KW-4679. The main metabolite in feces was M5 (5.1%) followed by M6, M1, M4, M2 and then by M3.

3) After oral administration to fasting female rats, the unchanged KW-4679 was a main component of radioactivity excreted in urine, same as in male rats.

4) When ^{14}C -KW-4679 was orally administered to fasting male dogs, 71.1% of radioactivity detected in plasma at 0.5 hr after administration was the unchanged KW-4679. The main metabolite in plasma was M3 (11.0%). The major component in urine was the unchanged KW-4679 (51.6%) followed by M1 (4.5%), M3, M5, M2, M6 and then by M4. KW-4679 was the major component excreted also in feces, representing 6.0% of dose followed by M5, M1, M6, M4 and then by M2.

5) The metabolic pathway of KW-4679 in rats and dogs consisted of oxidative N-demethylation of the side chain and hydroxylation of dibenzoxepine ring and its sulfation and further oxidation of N-atom in the side chain.

Key words : Antiallergic, KW-4679, Rat, Dog, Metabolism

緒 言

(Z)-11-[3-(Dimethylamino)propylidene]-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin-2-acetic acid hydrochloride (KW-4679) は当社で合成され、種々の動物実験モデルにおいて強い抗アレルギー作用および抗喘息作用¹⁻³⁾を示す新規抗アレルギー剤である。我々はすでに、¹⁴C-KW-4679 をラットおよびイスに経口投与後の吸収および排泄ならびにラットにおける分布について報告した^{4,5)}。ラットに経口投与すると ¹⁴C-KW-4679 は速やかにかつほぼ完全に吸収された。ラット、イスに経口投与すると尿中に投与放射能の42.6および73.4%がそれぞれ排泄され、イスでは主排泄経路

は尿中であつた。またラットに経口投与すると放射能は肝臓、腎臓に主に分布し、組織内放射能は血漿中放射能濃度とはほぼ平行に消失し特に残留する組織は認められなかった。

今回、¹⁴C-KW-4679 あるいは KW-4679 をラットおよびイスに経口投与後の代謝について検討した。

実験材料および方法

1. 使用薬物および化合物

非標識 KW-4679 は当社研究所で合成された Lot No. P-008 および P-009 を使用した。また、¹⁴C-KW-4679 は11位の炭素が ¹⁴C 標識されたものであり、Amersham 社で合成されたもの

¹⁴C-KW-4679

* : Position labeled with ¹⁴C

KW-4679

KF 13452 (M1)

KF 13453 (M2)

KF 16750 (M3)

Fig. 1 Chemical structures of ¹⁴C-KW-4679, KW-4679 and authentic compounds of metabolites

を用いた⁴⁾。¹⁴C-KW-4679 の比放射能は、1.93 GBq/mmol (5.16 MBq/mg) および 2.18 GBq/mmol (5.81 MBq/mg) であった。放射化学的純度は、薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により 97% 以上であった。¹⁴C-KW-4679 の化学構造および ¹⁴C の標識位置を Fig. 1 に示した。代謝物標品の (Z)-11-[3-(Me-thylamino) propylidene]-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin-2-acetic acid (M1), (Z)-11-(3-Amino-propylidene)-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin-2-acetic acid (M2) および (Z)-11-[3-(Dimethylamino) propylidene]-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin-2-acetic acid N-oxide (M3) は当社医薬研究所薬化学研究部より入手した。アセトニトリルは HPLC 用および一級品 (関東化学㈱) を用いた。トリメチルシリルジアゾメタンは東京化成㈱より購入した。その他の試薬は特に記さない限り市販の特級品をそのまま用いた。

2. 実験動物

購入後 1 週間以上予備飼育した 7 週齢の Wistar 系ラット (雄性ラット: 体重 200-300 g, 雌性ラット: 体重 150-160 g, 日本チャールス・リバー㈱) を使用した。また購入後 10 ヶ月間予備飼育した 15 ヶ月齢の雄性ビーグル犬 (体重 10-11 kg, 日本農産工業㈱) を使用した。ラットおよびイスともに投与前 16 時間以上絶食し実験に用いた。薬物投与後 6 時間より固形飼料 (ラット: F-2, 船橋農場㈱, イス: ED-1, ㈱三和化学研究所) を摂取させ、水は実験期間中自由に摂取させた。実験例数はラットでは 1 群 4-5 匹とした。イスは 1 群 4 頭とした。

3. 投与液の調製および投与方法

¹⁴C-KW-4679 に非標識 KW-4679 を添加して注射用蒸留水 (大塚製薬㈱) に溶解し、ラットでは 0.2 および 10 mg/ml, イスでは 1 mg/ml の溶液を調製した。代謝物同定時では非標識 KW-4679 を注射用蒸留水に溶解し、10 mg/ml の投与液を調製した。ラットには ¹⁴C-KW-4679 あるいは KW-4679 溶液を 5.0 ml/kg の容量で経口投

与針により胃内へ強制投与した (投与量: 1 mg/kg および 50 mg/kg)。イスには 1.0 ml/kg の容量で経口ゾンデにより胃内に強制投与した (投与量: 1 mg/kg)。

4. 試料の採取

ラットに ¹⁴C-KW-4679 1 mg/kg を経口投与後 0.5 および 4 時間に軽度エチルエーテル麻酔下、右大腿部動静脈を切断し採血し、放血死させた。イスに ¹⁴C-KW-4679 1 mg/kg を経口投与後 0.5, 1 および 2 時間に左前腕橈側皮静脈より血液を採取した。血液は直ちに遠心分離 (2000 x g, 10 分, 室温下) して血漿を得た。その一部を放射能の測定に供した。ラットおよびイスに ¹⁴C-KW-4679 1 mg/kg を経口投与後の動物を個別に代謝ケージ内で飼育し、ラットでは投与後 24 時間までの尿および糞、イスでは投与後 24 時間までの尿と投与後 48 時間までの糞を室温下で分別採取した。尿の一部を放射能の測定に供した。糞は水を加えて超高速ホモジナイザーでホモジナイズした。攪拌均質化後、その一部をコンバストバッド (Packard 社) に吸収させ、放射能の測定に供した。軽度のエチルエーテル麻酔下で、ラットの総胆管にシリコンチューブあるいはポリエチレンチューブを挿入した。覚醒後、経口投与針により ¹⁴C-KW-4679 1 mg/kg あるいは 50 mg/kg を強制投与し、ラットを直ちにラットホルダー (KM-325 (A), 夏目製作所㈱) に収め、投与後 24 時間までの胆汁を採取した。その一部を放射能の測定に供した。胆汁中代謝物の分取時では総胆管カニューレ留置ラット 30 匹に KW-4679 50 mg/kg を強制投与して、投与後 24 時間までの胆汁を室温下で採取した。各試料は分析まで -20°C で凍結保存した。

5. 代謝物の精製

1) 前処理: 胆汁中からの主要代謝物の精製は Fig. 2 に示す方法で行った。すなわち、24 時間までに排泄された胆汁 (約 400 ml) を水で 10 倍希釈し、HP-10 (三菱化成㈱) 4000 ml を充填したカラムにアプライした後、水 8000 ml で洗浄した。アセトニトリル 9000 ml で代謝物を溶出

Fig. 2 Purification procedure for the metabolites in bile after oral administration of KW-4679 (50 mg/kg) to bile-duct cannulated male rats

させた。溶出液を減圧濃縮し、セミ分取 HPLC (HPLC 条件 A) で KW-4679 に由来すると思われる 6 画分を分取した。分取液は凍結乾燥し、質量分析 (MS), 核磁気共鳴分析 (NMR) および LC/MS に供した。M4 画分の一部には 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加え、アリスルファターゼ (*Helix pomatia* 由来, ベーリンガー・マンハイム山之内株) を添加し, 37°C, 一晩インキュベートした。遠心分離後上清を LC/MS に供した。また M4 分画の一部をジメチルスルホキシド- d_6 (DMSO- d_6) 中で加水分解して得た分解物 (ca.3 mg) をメタノール溶液に溶解し, トリメチルシリルジアゾメタン/ヘキササン溶液およびジイソプロピルエチルアミンを添加し, 室温で 1 時間反応させた。反応液を減圧留去し, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒系; クロロホルム: メタノール: アンモニア水, 10: 1: 0.1, v/v/v) で精製し, M4 の加水分解物のメチル化物を得た。

2) HPLC (HPLC 条件 A): セミ分取 HPLC 条件 A では, ポンプに島津 LC 8A を, カラムに YMC-Pack SH-342-5 (ODS, 20 mm I.D. x 150 mm, ワイエムシィ株) を用い, 移動相には A 液および B 液にそれぞれ 0.1% TFA 水溶液およ

び 80% アセトニトリル/0.1% TFA 水溶液を用いて B 液 20% から 40 分かけて B 液 46% までの直線グラジエントで溶出した。流速は 10 ml/min, 検出は 250 nm での紫外外部吸収で行った。

3) 薄層クロマトグラフィー (TLC): ^{14}C -KW-4679 50 mg/kg をラットに経口投与後 24 時間までに排泄された胆汁から, 代謝物を上記同様に HP-10 カラムにより粗精製した。アセトニトリル溶出画分の一部に予想代謝物を混合し, HPLC 条件 B で各代謝物を精製した。M4 画分は上記同様, 酵素処理を行った。精製した代謝物と予想代謝物をシリカゲルプレート (Polygram Sil G UV254, 株ケムコ) に同時に展開した。展開溶媒には, 溶媒 A; n-ブタノール/水/酢酸 (5: 2: 1) および溶媒 B; テトラヒドロフラン/0.1 M 塩化ナトリウム (3: 1) の 2 種類を用いた。展開位置を紫外線ランプにより確認した。TLC プレートはさらに X 線フィルム (Ultrofilm ^3H , Leica 社) と密着させて, オートラジオグラムを作製するかラジオクロマナイザー (JTC-601, アロカ) で直接放射能の展開位置を確認した。

HPLC 条件 B ではポンプに日立 655 を, カラムに YMC-Pack AM-312 (ODS, 6 mm I.D. x 150 mm, ワイエムシィ株) を用い, セミ分取 HPLC 条件 A と同様の移動相を用いて B 液 25% から 35 分かけて B 液 50% までの直線グラジエント, 流速は 1 ml/min で溶出した。検出は 250 nm での紫外外部吸収で行った。

6. 代謝物の定量

1) 前処理: ラットおよびイヌに ^{14}C -KW-4679 投与後の血漿あるいは糞ホモジネイトに, 0.1% TFA 含有アセトニトリルを等量加えて攪拌後, 遠心分離して上清を得た。抽出は 2 回行った。上清を併せて窒素気流下で濃縮し, その濃縮液を 0.1% TFA で希釈して, その一部を HPLC 条件 C で分析した。尿および胆汁は遠心分離し上清を得, その一部を HPLC 条件 C で分析した。

2) 分析条件 (HPLC 条件 C): ポンプに日立 655 を, カラムに YMC-Pack AM-312 (ODS, 6

mm I.D.×150 mm, ワイエムシィ(株))を用い、移動相にはA液およびB液にそれぞれ0.1% TFA水溶液および80%アセトニトリル/0.1% TFA水溶液を用いてB液20%から50分かけてB液50%までの直線グラジエントで溶出した。流速は1 ml/min, 検出は250 nmでの紫外吸収で行った。代謝物の定量は、試料に予想代謝物を添加後、HPLCに注入した後、各一定時間およびピーク毎の溶出液を放射能測定用バイアルに採取し、その放射能を測定して行った。なお、代謝物の検索にはオンラインラジオ検出器(トレースII, Packard社)をHPLCカラムの出口に接続し、シンチレーター Scintisol EX-H(和光純薬(株))を1 ml/minの流速で流し、シンチレーターセル(130 μ l)を用いたhomogeneous計数法で行った。

7. 機器分析

1) 高速液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS): HPLCは、ポンプに日立655A-11を、カラムにYMC-Pack AM-312(ODS, 6 mm I.D.×150 mm, ワイエムシィ(株))を用いて、上記のHPLC条件Cと同様な条件で操作した。カラム溶出液に5%グリセロール水溶液を0.2 ml/minの流速で混合した。スプリッターで1/600にスプリットし、JMS-SX 102型質量分析計(日本電子)に導入し、フリット-FABマスマスペクトラムをイオンソース温度35°C, 加速電圧10 kV, ガン電圧1 kV, エミッション電流10 mAで測定した。

2) 質量分析: 装置としてJMS-SX 102型質量分析計を用い、試料を直接導入し、EI, FABマスマスペクトルを測定した。EI測定時のイオン化電圧は70 eV, 加速電圧は10 kVであった。FAB測定時のマトリックスはグリセロールおよび3-ニトロベンジルアルコールを用いた。

3) 水素核磁気共鳴(^1H NMR): 装置としてAMX-400フーリエ変換核磁気共鳴装置(ブルカー)を用いた。測定溶媒にはDMSO- d_6 あるいはクロロホルム- d_1 (CDCl_3)を用い、内部基準物質にはテトラメチルシランを用いた。

8. 放射能の測定

血漿, 尿, 胆汁, HPLC溶出液, 代謝物精製画分および投与液の希釈液はシンチレーター Scintisol EX-H(和光純薬(株))に溶解して放射能を測定した。コンバストパッドに吸収させた糞ホモジネートは自然乾燥後、全自動サンプルオキシダイザー(Tri-Carb 306, Packard社)により燃焼処理した。生じた二酸化炭素をカーボソルブ(Packard社)に吸収させ、パーマフローV(Packard社)と混和後、放射能を測定した。

放射能の測定は液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb 4530C, Tri-Carb 2200CA, Packard社)で行った。計数効率は外部標準線源法により自動補正した。計測時間は2-5分間とした。

9. データの処理法

液体シンチレーションカウンターで測定した値は自然計数率の2倍を検出限界とした。検出限界未満(N.D.)を示したものについては、数値0を代入して計算した。HPLCクロマトグラムで検出された未変化体および予想代謝物(M1, M2, M3, M4, M5, M6)以外の溶出液中の放射能は、未知代謝物(Others)とした。平均値の差の検定はStudentのt検定で行った。有意水準は両側5%とした。

結 果

1. 代謝物の検索

^{14}C -KW-4679 1 mg/kgをイスに経口投与後の尿およびラットに経口投与後の胆汁, 尿および糞抽出物をHPLCで分析した時のラジオクロマトグラムをFig. 3に示した。主代謝物にはM1-M6のナンバーを付した。なお、それぞれの試料間で同じ保持時間を示す代謝物については同一ナンバーとした。

2. 代謝物の単離, 同定

非標識KW-4679 50 mg/kgをラットに経口投与後24時間までに排泄された胆汁をFig. 2に示す方法でHP-10のカラムで精製し、アセトニトリル溶出画分を濃縮したものをセミ分取HPLC条件Aで分離し、M4, M5, M6, M2, M1, UDお

Fig. 3 Typical radiochromatograms of biological samples, collected during 0–24 hr after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting male rats and dogs
(A) Rat bile, (B) Rat urine, (C) Rat feces, (D) Dog urine

よび M3 画分を分取した。

(1) **KW-4679 (UD)** : ^{14}C -KW-4679 1 mg/kg あるいは 50 mg/kg 投与後のラット胆汁を HP-10 処理後, HPLC により未変化体と同一の溶出時間を示した画分は, 標品 KW-4679 と溶媒系 A, B を用いた TLC で展開位置が一致した。KW-4679 50 mg/kg 投与後のラット胆汁より HP-10 カラムさらに HPLC により精製した未変化体と同一の溶出時間を示した画分 (UD 画分) は LC/MS 分析において, KW-4679 標品と溶出時間が同一であり, KW-4679 塩基の擬分子イオン (MH^+ , m/z 338) が検出された。また UD 画分の質量分析において, EI マススペクトルで m/z 337 の分子イオン (M^+) が認められ, フラグ

メントイオンも KW-4679 標品の EI マススペクトルと良く一致した (**Fig. 4**)。FAB マススペクトルにおいても m/z 338 の擬分子イオン (MH^+) が検出された (**Fig. 5**)。UD 画分の ^1H NMR スペクトルは KW-4679 のスペクトルとほぼ一致した (**Table I**)。これらのことから本物質は未変化体と同定された。

(2) **代謝物 M1 (N-モノ脱メチル体)** : ^{14}C -KW-4679 50 mg/kg をラットに経口投与して得た胆汁から精製した, M1 合成標品と同一 HPLC 溶出時間を示す M1 画分は, 溶媒系 A, B を用いた TLC で M1 標品と展開位置が一致した。さらに KW-4679 50 mg/kg をラットに経口投与して得た胆汁を直接注入した LC/MS のマス

Fig. 4 EI mass spectra of (A) UD fraction and (B) KW-4679

クロマトグラムにおいて、M1 標品の溶出時間に M1 の擬分子イオン (m/z 324) が検出された。これらのことから、代謝物 M1 は KW-4679 の N-モノ脱メチル体と推定された。

(3) 代謝物 M2 (N-ジ脱メチル体) : ^{14}C -KW-

4679 50 mg/kg をラットに経口投与して得た胆汁から精製した、M2 合成標品と同一 HPLC 溶出時間を示す M2 画分は、溶媒系 A, B を用いた TLC で M2 標品と展開位置が一致した。さらに KW-4679 50 mg/kg をラットに経口投与して得

Fig. 5 FAB mass spectrum of UD fraction

Fig. 6 FAB mass spectrum of M3 fraction

た胆汁を直接注入した LC/MS のマスクロマトグラムにおいて、M2 合成標品の溶出時間に M2 の擬分子イオン ($m/z310$) が検出された。このことから、本代謝物は KW-4679 の N-ジ脱メチル体と推定された。

(4) 代謝物 M3 (N-オキシド体) : ^{14}C -KW-4679 50 mg/kg をラットに経口投与して得た胆汁から精製した、M3 合成標品と同一 HPLC 溶出時間を示す M3 画分は、溶媒系 A, B を用いた TLC で M3 標品と展開位置が一致した。KW-4679 50 mg/kg 投与後の胆汁より精製した、HPLC において合成標品 M3 と同一溶出挙動を示す M3 画分は LC/MS 分析において、M3 合成

標品の溶出時間に M3 の擬分子イオン ($m/z354$) が検出された。本画分の FAB マススペクトルにおいても、M3 の擬分子イオンが検出された (Fig. 6)。さらに本画分の ^1H NMR スペクトルは、KW-4679 のスペクトルと比較して、N-メチル基のシグナルおよび 16 位のメチレンプロトンのシグナルが KW-4679 よりも低磁場にシフトしていることが観測され、17 位の窒素の酸化体 (N-オキシド体) であることが示唆された (Table I)。これらのことから、本代謝物は KW-4679 の N-オキシド体と同定された。

(5) 代謝物 M4 (水酸化後の硫酸抱合体), M5 (水酸化体) : 代謝物 M4 はアリルスルファター

Table I ^1H NMR data for KW-4679, UD, its metabolites (M3, M4) and derivatives (M5 and its methylate)

proton	KW-4679*	UD	M3
1	7.07(br s)	7.06(d, J=2.2 Hz)	7.09(br s)
3	7.09(dd, J=8.3, 2.2 Hz)	7.01(dd, J=8.4, 2.2 Hz)	ca. 7.1(dd)
4	6.79(d, J=8.3 Hz)	6.80(d, J=8.3 Hz)	6.80(d, J=8.2 Hz)
6	5.18(br)	5.18(br)	5.20(br)
7			
8	7.3–7.4 (4H)	7.25–7.45 (4H)	7.25–7.45 (4H)
9			
10			
12	3.55(s)	3.53(s)	3.53(s)
14	5.65(t, J=7.3 Hz)	5.63(t, J=7.2 Hz)	5.63(t, J=7.3 Hz)
15	2.78(dt, J=7.3, 7.8 Hz)	ca. 2.7(m)	2.91(m)
16	3.25(t, J=7.8 Hz)	ca. 3.3(m)	3.82(m)
NMe ₂	2.72(s)	2.76(s)	3.41(s)
+NH	9.37(br s)	9.37(br s)	—
COOH	12.5(br)	12.5(br)	12.3(br)
COOMe	—	—	—

proton	M4	M5	M5 methylate
1	**	7.03(d, J=2.2 Hz)	ca. 7.0
3	**	ca. 7.1 (dd)	ca. 7.0
4	6.80(d, J=8.3 Hz)	6.80(d, J=8.3 Hz)	6.84(d, J=8.2 Hz)
6	5.12(br)	5.07(br)	ca. 5.1(br)
7	**	6.75(br s)	6.68(d, J=2.5 Hz)
8	**	—	—
9	ca. 7.0(br dd)	6.74(dd, J=8.0, 2.5 Hz)	6.73(dd, J=8.2, 2.5 Hz)
10	**	7.09(d, J=8.0 Hz)	7.06(d, J=8.2 Hz)
12	3.52(s)	3.52(s)	3.53(s)
14	5.60(t, J=7.2 Hz)	5.55(t, J=7.2 Hz)	5.58(t, J=7.3 Hz)
15	ca. 2.7(m)	2.70(m)	2.78(m)
16	ca. 3.3(m)	3.25(m)	2.98(m)
NMe ₂	2.75, 2.74(both s)	2.75, 2.76(both s)	2.67(s)
+NH	9.24(br s)	9.26(br s)	—
COOH	—	—	—
COOMe	—	—	3.68(s)

* KW-4679 standard sample was measured in DMSO-d₆ at 270 MHz** Those signals were overlapped between δ 7.0 and δ 7.3UD, M3, M4 and M5 were measured in DMSO-d₆ and M5 methylate was measured in CDCl₃ at 400 MHz

ゼにより加水分解され M5 を生じた。M4 画分の FAB マススペクトルでは正イオン検出時は KW-4679 塩基より 96 マスユニット大きい擬分子イオン (m/z 434) が検出され (Fig. 7(A)), 陰イオン検出時は 2 マス少ない擬分子イオン (m/z 432) が検出された。M5 は LC/MS 分析におい

て, KW-4679 塩基より 16 マスユニット大きい擬分子イオン (m/z 354) を示した (Fig. 7(B), Fig. 8(A))。さらに, M4 画分の ^1H NMR スペクトルと M4 の加水分解体 (M5) のメチル化体の ^1H NMR スペクトルのデータ (Table I) において, C-8 位に水酸基が結合することが示唆され

Fig. 7 FAB mass spectrum of (A) M4 fraction and (B) Frit FAB/LC mass spectrum of M4 fraction treated by arylsulfatase

た。以上のことから、M4はKW-4679のC-8位水酸化(M5)後の硫酸抱合体と同定された。

(6) 代謝物 M6 (二酸化体) : M5 と M6 混合画分中の M6 は、LC/MS 分析において KW-4679 塩基より 32 マスユニット大きい擬分子イオン (m/z 370) が検出された (Fig. 8(B))。このことから、M6 は KW-4679 の水酸化体 (M5) がさらに酸化されたものと推定された。

3. 代謝物の定量

^{14}C -KW-4679 1 mg/kg をラットおよびマウスに経口投与後の血漿中、尿中、胆汁中(ラットのみ)

および糞中の代謝物を HPLC で分離し未変化体および M1-M6 の定量を行った。HPLC での定量時の注入放射能に対する溶出液中の放射能の回収率は 89.5-114.5% と良好であり (Table II-IV), 各代謝物の定量時では HPLC の回収率で補正を行わなかった。

1) ラット

(1) 血漿中代謝物 : ^{14}C -KW-4679 1 mg/4.02 MBq/kg 経口投与後 0.5 および 4 時間に採取した血漿のラジオクロマトグラムを Fig. 9 に、血漿中未変化体および各代謝物の血漿中放射能に対す

Fig. 8 Frit FAB/LC mass spectra of (A) M5 fraction and (B) M6 fraction

る割合を **Table II** に示した。

0.1% TFA 含有アセトニトリルによる血漿中放射能の抽出率は、投与後0.5および4時間でそれぞれ90.0および81.4%と良好であった。未抽出の放射能は未知代謝物とした。投与後0.5時間では血漿中放射能の66.4%が未変化体であった。代謝物ではM1(7.7%)が最も多く、ついでM6(3.1%), M5(1.8%), M2(0.9%), M4(0.8%)およびM3(0.5%)の順であった。投与後4時間では血漿中放射能の35.5%は未変化体であった。代謝物ではM1(7.2%)が最も多く、ついでM6(2.4%), M5(1.3%), M4(1.0%), M2(0.8%)

およびM3(0.7%)と投与後0.5時間に比べ、未変化体の割合が低下したが、M1-M6の代謝物の割合はおおむね同様であった。

(2) 尿中代謝物： ^{14}C -KW-4679を1 mg/2.45–4.98 MBq/kg 経口投与後24時間までに排泄された尿中未変化体および各代謝物の排泄率を **Table III** に示した。

絶食、非絶食条件下の雄性ラットおよび絶食条件下の雌性ラットに経口投与後の尿中への放射能の排泄率はそれぞれ、投与放射能の41.7%, 44.2%および46.0%であった。

絶食条件下で経口投与した雄性ラットでは投与

Table II Composition of KW-4679 and its metabolites in plasma after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting male rats and dogs

Animal	Time		% of radioactivity in plasma								Extraction recovery ^{a)} (%)	HPLC recovery ^{b)} (%)
			KW-4679	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Others		
Rat	0.5 hr	Mean	66.4	7.7	0.9	0.5	0.8	1.8	3.1	19.0	90.0	97.9
		S.D.	5.8	1.0	0.5	0.1	0.2	0.4	1.9	3.1	3.6	1.1
	4 hr	Mean	35.5	7.2	0.8	0.7	1.0	1.3	2.4	51.1	81.4	89.5
		S.D.	11.6	0.8	0.5	0.8	0.7	0.2	1.3	11.0	3.8	7.1
Dog	0.5 hr	Mean	71.1	2.1	1.1	11.0	N.D.	0.3	N.D.	14.6	91.7	97.2
		S.D.	9.9	1.4	1.1	2.2		0.5		6.7	2.5	12.0
	1 hr ^{c)}	Mean	53.7	3.1	0.6	8.8	N.D.	0.4	N.D.	33.6	81.0	107.1
		S.D.										
	2 hr ^{d)}	Mean	56.3	4.7	0.5	10.1	0.5	1.9	1.0	24.9	90.9	114.5
		S.D.	7.7	1.1	0.9	1.3	0.8	1.7	0.9	5.2	4.6	6.9

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 4 rats and dogs

N.D. : Not detected

^{a)} Percent of radioactivity extracted with 0.1% TFA in acetonitrile from total radioactivity in plasma

^{b)} Percent of radioactivity recovered in the eluate of HPLC after injection of sample

^{c)} n=2, ^{d)} n=3

Table III Composition of KW-4679 and its metabolites in urine (0–24 hr) after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting and non-fasting male rats, fasting female rats and fasting male dogs

Animal	Sex	Condition		% of dose								Excretion in urine	HPLC recovery ^{a)} (%)
				KW-4679	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Others		
Rat	Male	Fasting	Mean	27.3	6.0	0.7	0.5	0.1	1.1	1.3	4.7	41.7	100.0
			S.D.	3.4	0.7	0.2	0.1	0.0	0.2	0.3	0.8	4.1	2.9
		Non-fasting	Mean	26.7	5.2	0.8	0.5	0.1	1.0	0.9	9.0	44.2	97.9
			S.D.	4.6	0.8	0.2	0.1	0.0	0.5	0.1	2.0	3.7	4.6
	Female	Fasting	Mean	31.3	3.4**	0.5	0.8**	0.1	0.4**	0.6**	8.9	46.0	99.8
			S.D.	3.9	0.7	0.3	0.1	0.0	0.2	0.2	1.3	4.5	1.7
	Dog	Male	Mean	51.6	4.5	1.2	1.9	0.1	1.3	0.6	10.8	71.9	96.7
			S.D.	5.3	1.0	0.3	1.0	0.1	0.6	0.3	3.5	6.5	3.4

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats and 4 dogs

^{a)} Percent of radioactivity recovered in the eluate of HPLC after injection of sample

** : Significantly different from the value of fasting male rats ($p < 0.01$)

放射能の27.3%が未変化体であり、尿中放射能の65.5%を占めた。代謝物ではM1(6.0%)が最も多く、ついでM6(1.3%), M5(1.1%), M2(0.7%), M3(0.5%) およびM4(0.1%)の順であった。

非絶食条件下で経口投与した雄性ラットでは投与放射能の26.7%が未変化体であり、尿中放射能の60.4%を占めた。代謝物ではM1(5.2%)が最

も多く、ついでM5(1.0%), M6(0.9%), M2(0.8%), M3(0.5%) およびM4(0.1%)の順であった。

絶食条件下で経口投与した雌性ラットでは投与放射能の31.3%が未変化体であり、尿中放射能の68.0%を占めた。代謝物ではM1(3.4%)が最も多く、ついでM3(0.8%), M6(0.6%), M2(0.5%),

Table IV Composition of KW-4679 and its metabolites in feces after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting male rats and dogs

Animal	Time		% of dose								Excretion in feces	Extraction recovery ^{a)} (%)	HPLC recovery ^{b)} (%)
			KW-4679	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Others			
Rat	0-24 hr	Mean	19.4	2.6	0.4	0.2	0.6	5.1	4.1	13.7	46.1	89.7	93.3
		S.D.	4.6	0.7	0.2	0.1	0.3	0.9	0.7	1.8	5.7	3.3	6.2
Dog	0-48 hr	Mean	6.0	1.8	0.2	N.D.	0.4	2.2	0.8	11.0	22.3	82.8	94.2
		S.D.	1.7	0.5	0.2		0.2	0.9	0.3	0.3	3.7	8.4	5.2

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats and 4 dogs

N.D. : Not detected

a) Percent of radioactivity extracted with 0.1% TFA in acetonitrile from total radioactivity in feces homogenate

b) Percent of radioactivity recovered in the eluate of HPLC after injection of sample

Table V Composition of KW-4679 and its metabolites in bile (0-24 hr) after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting bile-duct cannulated male rats

	% of dose									HPLC recovery ^{a)} (%)
	KW-4679	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Others	Excretion in bile	
Mean	5.3	2.6	0.3	0.4	6.3	2.3	7.3	23.2	47.7	104.5
S.D.	1.1	0.2	0.1	0.1	1.5	0.7	0.9	3.2	3.8	2.7

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats

a) Percent of radioactivity recovered in the eluate of HPLC after injection of sample

M5(0.4%) および M4(0.1%) の順であった。
M1, M5 および M6 の排泄率は絶食下の雄性ラットでの排泄率に比べ有意に低かった ($p < 0.01$)。
M3 の排泄率は有意に高かった ($p < 0.01$)。

(3) 糞中代謝物：絶食条件下の雄性ラットに ^{14}C -KW-4679 1 mg/3.70 MBq/kg を経口投与後 24 時間までの糞中未変化体および各代謝物の排泄率を **Table IV** に示した。

放射能の糞中排泄率は投与放射能の 46.1% であった。0.1% TFA 含有アセトニトリルによる糞中放射能の抽出率は 89.7% であった。未抽出の放射能は未知代謝物とした。投与放射能の 19.4% が未変化体であり、糞中放射能の 42.1% を占めた。代謝物では M5(5.1%) が最も多く、ついで M6(4.1%), M1(2.6%), M4(0.6%), M2(0.4%) および M3(0.2%) の順であった。

(4) 胆汁中代謝物：絶食条件下で総胆管カニューレ留置ラットに ^{14}C -KW-4679 1 mg/3.66

MBq/kg を経口投与後 24 時間までの胆汁中未変化体および各代謝物の排泄率を **Table V** に示した。

放射能の胆汁中排泄率は投与放射能の 47.7% であった。投与放射能の 5.3% が未変化体であり、胆汁中放射能の 11.1% を占めた。代謝物では M6(7.3%) が最も多く、ついで M4(6.3%), M1(2.6%), M5(2.3%), M3(0.4%), M2(0.3%) の順であった。

2) イヌ

(1) 血漿中代謝物： ^{14}C -KW-4679 1 mg/0.38 MBq/kg を絶食条件下のイヌに経口投与後 0.5, 1 および 2 時間の血漿中未変化体および各代謝物の血漿中放射能に対する割合を **Table II** に示した。ラジオクロマトグラムを **Fig. 10** に示した。

0.1% TFA 含有アセトニトリルによる血漿中放射能の抽出率は投与後 0.5, 1 および 2 時間でそれぞれ、91.7, 81.0, 90.9% であった。未抽出の放

Fig. 9 Typical HPLC radiochromatograms of plasma sample after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting male rats

射能は未知代謝物とした。投与後0.5時間では未変化体が血漿中放射能の71.1%を占めた。代謝物ではM3(11.0%)が最も多く、ついでM1(2.1%), M2(1.1%)およびM5(0.3%)の順であった。M4およびM6は検出限界未満であった。投与後1時間では血漿中放射能の53.7%が未変化体であ

った。代謝物ではM3(8.8%)が最も多く、ついでM1(3.1%), M2(0.6%)およびM5(0.4%)の順であった。M4およびM6は検出限界未満であった。投与後2時間では血漿中放射能の56.3%が未変化体であった。代謝物ではM3(10.1%)が最も多く、ついでM1(4.7%), M5(1.9%),

Fig. 10 Typical HPLC radiochromatograms of plasma sample after oral administration of ^{14}C -KW-4679 (1 mg/kg) to fasting male dogs

M6(1.0%), M2(0.5%) および M4(0.5%) の順であった。いずれの時間においても未変化体が最も多く存在し、代謝物では M3 が多く、その他の代謝物の存在比は 5% 以下であった。

(2) 尿中代謝物：経口投与後 24 時間までの尿

中未変化体および各代謝物の排泄率を **Table III** に示した。

尿中排泄率は投与放射能の 71.9% であった。投与放射能の 51.6% が未変化体であり、尿中放射能の 71.8% を占めた。代謝物では M1(4.5%) が最

Fig. 11 Proposed metabolic pathway of KW-4679 in rats and dogs

も多く、ついで M3(1.9%), M5(1.3%), M2(1.2%), M6(0.6%) および M4(0.1%) の順であった。

(3) 糞中代謝物：経口投与後48時間までの糞中未変化体および各代謝物の排泄率を Table IV に示した。

糞中排泄率は投与放射能の22.3%であった。0.1% TFA 含有アセトニトリルによる抽出率は82.8%であった。未抽出の放射能は未知代謝物とした。投与放射能の6.0%が未変化体であり、糞中放射能の26.9%を占めた。代謝物では M5(2.2%) が最も多く、ついで M1(1.8%), M6(0.8%), M4(0.4%) および M2(0.2%) の順であった。

考 察

KW-4679 を経口投与後のラット胆汁中より主要代謝物を精製し、構造推定を行った。KW-

4679 の代謝物として、N-モノ脱メチル体(M1), N-ジ脱メチル体(M2), N-オキシド体(M3), 水酸化体(M5), 水酸化体の硫酸抱合体(M4) および水酸化体の酸化体(M6) が同定ないし推定された。これらの代謝物の構造より KW-4679 のラット、イヌにおける推定代謝経路を Fig. 11 に示した。

^{14}C -KW-4679 1 mg/kg をラットおよびイヌに投与後の血漿、尿中、糞中および胆汁中代謝物について定量し、KW-4679 の代謝および排泄について検討した。

ラットおよびイヌに ^{14}C -KW-4679 を経口投与後0.5時間の血漿中放射能のそれぞれ66.4, 71.1% は未変化体であり、他の代謝物に比べ最も多く存在した。ラットでの主代謝物は N-モノ脱メチル体(M1) であるのに対し、イヌでの主代謝物は N-オキシド体(M3) と差が認められた。

雄性ラットに経口投与後24時間までの尿中への未変化体の排泄率は投与放射能の27.3%であり、血漿同様未変化体が主であった。代謝物では総N-脱メチル体 (M1+M2: 6.7%) が、総水酸化体 (M4+M5+M6: 2.5%) およびN-オキシド体 (M3: 0.5%) に比べ多く排泄された。糞中への未変化体の排泄率は投与放射能の19.4%と血漿および尿同様、未変化体が主に存在した。代謝物では総N-脱メチル体が3.0%、総水酸化体が9.8%、N-オキシド体が0.2%と血漿および尿中代謝物と比べ、総N-脱メチル体は少なく、総水酸化体の占める割合が高かった。未変化体、N-脱メチル化代謝物およびN-オキシド体は尿中への排泄率が高く、逆に水酸化代謝物は糞中への排泄率が高かった。

胆汁中への未変化体の排泄率は投与放射能の5.3%と尿中および糞中への未変化体の排泄より少なかった。代謝物では総水酸化体の排泄が総N-脱メチル体の排泄より多く、胆汁中に水酸化代謝物がN-脱メチル化代謝物に比べて多く排泄されることが、糞中に水酸化代謝物が多く見い出される原因と考えられた。

血漿中には胆汁中主代謝物である水酸化代謝物が少なかったが、これはKW-4679が肝臓で代謝され、生じた水酸化体および水酸化後の硫酸抱合体の多くはそのまま胆汁中に排泄され、循環血流への移行が少ないことに起因すると考えられた。また糞中には、胆汁中に比べ硫酸抱合体 (M4) は少なく、水酸化体 (M5) が多かった。胆汁中に排泄された硫酸抱合体が腸内で加水分解され水酸化体を生じたと推定された。未変化体は胆汁中 (5.3%) より糞中 (19.4%) に多く排泄された。KW-4679はほぼ完全に吸収されると考えられる⁴⁾ことから、胆汁中未知代謝物にはKW-4679の抱合体が存在し、腸内で加水分解されKW-4679を生じた可能性も考えられた。

非絶食下の雄性ラットに経口投与後の未変化体および代謝物の尿中排泄率は絶食下の雄性ラットに経口投与時とおおむね同様であり、ラットにおけるKW-4679の代謝に及ぼす摂食の影響は少

ないことが示唆された。

絶食下の雌性ラットの尿中代謝物は、絶食下の雄性ラットの尿中代謝物と比較して、未変化体の排泄率はやや高く、M3 (N-オキシド体) の排泄率は高く、M1, M5 および M6 の排泄率は雌性ラットでは低かった。各代謝物の尿、胆汁中への排泄比率に性差がないと仮定すると雌性ラットのN-脱メチル化および水酸化代謝酵素活性は雄性ラットより低いことが示唆された。このことは雌性ラットにおけるKW-4679の生物学的利用率 (76.3%, 未発表) が雄性ラット (60.8%)⁶⁾ に比べて高いことと矛盾しない。ラット尿、糞中の代謝物をあわせて考えると、M1が最も多く (8.6%) ついでM5 (6.2%) が多いことから、KW-4679のラットにおける主代謝経路は側鎖N-モノ脱メチル化およびジベンゾオキセピン骨格の水酸化であった。

イスに経口投与後の尿中放射能の主存在形態はラットと同様、未変化体であり、代謝物としてはラット同様総N-脱メチル化体 (M1+M2: 5.7%) が主であったが、N-オキシド体 (M3) の排泄が、ラットより多く認められ、血漿中にラットとは異なりM3が検出されたことと一致した。イス糞中および尿中未変化体および代謝物の排泄を比較するとラット同様、未変化体、M1, M2 および M3 は主に尿中に、M4 および M5 は主に糞中に排泄された。イス尿および糞中の代謝物をあわせて考えると、M1が最も多く (6.3%) ついでM5 (3.6%) であり、ラット同様、イスでも主代謝経路は側鎖N-モノ脱メチル化およびジベンゾオキセピン骨格の水酸化であった。血漿中主代謝物であったN-オキシド体 (M3) の尿、糞中への排泄は少なく、M3は分布容積が小さいかさらなる代謝を受けていることが考えられた。

要 約

¹⁴C-KW-4679あるいはKW-4679を用いて、ラットおよびイスにおける代謝について検討した。

1. ラットに経口投与後の胆汁中より未変化体以

外に代謝物として、N-モノ脱メチル体 (M1), N-ジ脱メチル体 (M2), N-オキシド体 (M3), ジベンゾオキセピン骨格の水酸化体 (M5), M5の硫酸抱合体 (M4), および M5の酸化体 (M6) が推定ないし同定された。

2. 絶食下の雄性ラットに経口投与後0.5時間の血漿中放射能の66.4%は未変化体であった。代謝物では M1(7.7%) が最も多く存在した。尿中放射能の主存在形態は血漿同様未変化体であり、投与放射能の27.3%を占めた。代謝物では M1(6.0%) が最も多くついで M6, M5, M2, M3 および M4 の順であった。胆汁中主代謝物は M6 であり、ついで M4 および未変化体が多く排泄された。糞中には未変化体が投与放射能の19.4%排泄された。代謝物では M5(5.1%) が最も多くついで M6, M1, M4, M2 および M3 の順であった。尿中および糞中をあわせると未変化体の排泄は46.8%と主な存在形態であった。代謝物では M1(8.6%) が多くついで M5 であった。

3. 絶食下の雌性ラットに経口投与後の尿中には雄性ラットに比べ未変化体が多く排泄され、M1は少なかった。

4. 絶食下の雄性イスに経口投与後0.5時間の血漿中放射能の71.1%は未変化体であった。代謝物では M3(11.0%) が最も多く存在した。尿中放射能の主存在形態はラット同様未変化体(51.6%)であった。代謝物では M1(4.5%) が最も多く、ついで M3, M5, M2, M6 および M4 の順であった。糞中でも未変化体为主存在形態であり、投与放射能の6.0%排泄された。代謝物では M5(2.2%) が最も多くついで M1, M6, M4 および M2 の順であった。尿中および糞中をあわせると未変化体の排泄は57.6%と主な存在形態であ

った。代謝物ではラット同様 M1(6.3%) が多く、ついで M5 であった。

5. ラットおよびイスにおける KW-4679 の代謝経路は KW-4679 の側鎖の酸化的 N-脱メチル化およびジベンゾオキセピン骨格の水酸化とその硫酸抱合化さらに側鎖の N の酸化であった。

謝 辞：本研究遂行にあたり、御協力頂いた協和発酵工業株式会社医薬研究所 中村昭正、服部いつ乃、長谷川陽子、萩倉敏夫、西家弘佳、渡辺恵美の各氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Ishii, H., Manabe, H., Sasaki, Y., Satoh, H., Tamura, T. and Ohmori, K.: Pharmacological properties of a new antiallergic agent KW-4679. *Jpn J. Pharmacol.*, **46**(Suppl.): 284 (1988)
- 2) Ohshima, E., Otaki, S., Sato, H., Kumazawa, T., Obase, H., Ishii, A., Ishii, H., Ohmori, K. and Hirayama, N.: Synthesis and antiallergic activity of 11-(aminoalkylidene)-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin derivatives. *J. Med. Chem.*, **35**: 2074-2084 (1992)
- 3) Ohmori, K., Ishii, H., Ikemura, T., Shirakura, R. and Kitamura, S.: Inhibitory effect of KW-4679 on antigen-induced late asthmatic responses and airway inflammation in guinea pigs. *Eur. Resp. J.*, **6**(Suppl): 17, 318S (1993)
- 4) 大石孝義, 西家弘佳, 小林弘幸, 小林 智: 新規抗アレルギー薬 KW-4679 の体内動態 (第1報) ^{14}C -KW-4679 のラットにおける単回投与時の吸収, 分布および排泄. 薬物動態, **10**(5): 651-668 (1995)
- 5) 大石孝義, 西家弘佳, 小林弘幸, 小林 智: 新規抗アレルギー薬 KW-4679 の体内動態 (第3報) ^{14}C -KW-4679 のイスにおける経口投与後の吸収および排泄. 薬物動態, **10**(5): 683-688 (1995)
- 6) 桑原 隆, 大石孝義, 池永哲二, 西家弘佳, 佐藤隆, 小林弘幸, 小林 智: 新規抗アレルギー薬 KW-4679 の体内動態 (第6報) 各種実験動物における血漿中動態. 薬物動態, **10**(5): 722-735 (1995)