Posatirelin の体内動態 (第3報): ラットにおける代謝物

松永 義正, 森本 慶子, 戸田 洋志
寺内 嘉章, 藤井 敏彦, 宮崎 亀

Disposition of Posatirelin (3): Metabolites in Rats

Yoshimasa MATSUNAGA, Keiko MORIMOTO, Hiroshi TODA
Yoshiaki TERAUCHI, Toshihiko FUJII, Hisashi MIYAZAKI

Developmental Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka

Summary: After a single or repeated intravenous administration of [^{14}C]posatirelin in rats, the structure of urinary metabolites and the metabolite profile of plasma, urine, bile and milk were studied.

1. In 24 hr urine of rats, three major radioactive components were detected on thin layer chromatogram. One component was identified by mass spectrometry as the unchanged posatirelin. Other components were (2S)-6-oxopipicolinic acid (M2) and (2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipicolinamide (M3) as revealed by mass spectrometry.

2. In plasma at 1 hr after single administration, the unchanged posatirelin, M2 and M3 were accounted for about 40%, 36% and 21%, respectively.

3. The unchanged posatirelin, M2 and M3 accounted for about 61%, 18% and 18%, respectively, of radioactivity in 24 hr-pooled urine.

4. After repeated administration, the composition of plasma and urinary radioactive metabolites were not statistically different from those after single dosing.

5. M3, unchanged posatirelin and M2 accounted for about 88%, 8% and 5%, respectively, of radioactivity in 24 hr-pooled bile.

6. In milk at 1 hr after administration, the unchanged posatirelin, M2 and M3 were accounted for about 84%, 8% and 9%, respectively.

Key words: Posatirelin, Metabolism, Plasma, Urine, Bile, Milk, Intravenous administration, Rat

緒 言

Posatirelin, (–)-(2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-2-carbamoyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipicolinamide (RGH-2202) は Gedeon Richter 社 (Hungary) により合成された thyrotropin releasing hormone (以下 TRH と略) 類縁体である。

我々は前報^{1,2)}において, ^{14}C 標識 posatirelin のラットにおける単回および反復静脈内投与後の体内動態を検討し, Posatirelin は 2 相性の血漿中消失パターンを示し, 腎臓にもっとも高く分布し, 主として尿中に, 一部胆汁や呼気中にも排泄されること, 反復投与による体内蓄積性は小さいこと等を明らかにした。本報では [^{14}C] posatirelin をラットに静脈内投与後の尿中代謝物の化学構造および血漿, 尿, 胆汁, 乳汁中の代謝物組成について検討した結果について報告する。

実験材料および方法

1. 標識化合物および化合物

1) 標識化合物

[^{14}C]Posatirelin は Gedeon Richter 社から入手した。入手時の [^{14}C]posatirelin の放射化学的純度は約 92% であったので, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて前報¹⁾と同様に精製した。精製後の [^{14}C] posatirelin の比放射能は 722 kBq (19.5 μCi)/mg ~ 261 kBq (7.05 μCi)/mg であり, 放射化学的純度は薄層ラジオクロマトグラフィー (TLC) で検定の結果, 95% 以上であった。

2) 化合物

非標識 posatirelin および予想代謝物標品の (2S)-6-oxopipicolinic acid, (2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopi-

Fig. 1 Possible metabolic pathway of posatirelin in rats

M2; (2S)-6-oxopiperidic acid, M3; (2S)-N-[(1S)-1-[[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopiperidamide

pecolamide (Fig. 1) は Gedeon Richter 社から入手した。その他の化学試薬、溶媒は市販の特級品または HPLC 用を使用した。

2. 実験動物

動物は Wistar 系ラットを日本エスエルシー(株) (浜松) より購入した。ラットは室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照明12時間サイクルの条件下の部屋で1週間以上予備飼育した後、試験に供した。ラットは試験期間中個別に代謝ケージ内で上記予備飼育と同様な条件下で飼育し、飼料 (MF, オリエンタル酵母工業(株), 東京) および水を自由に摂取させた。

3. 投与方法

$[^{14}\text{C}]$ Posatirelin を非標識 posatirelin で適宜希釈後、生理食塩水に溶解し、20 mg/kg の用量でラットの静脈内に単回投与もしくは1日1回21日間反復投与した。

ラットの例数は1群3匹とした。ただし、単回静脈内投与後の血漿中代謝物試験については1群6匹とした。

4. 試料の採取

1) 血漿

雄性ラットを単回および反復静脈内投与後1時間に

それぞれエーテル麻酔し、腹部大動脈より全採血した。採血した血液は 4°C 、 $1800 \times \text{g}$ 、15分間遠心し、血漿を分離した。

2) 尿

雄性ラットに単回静脈内投与後4, 8, 24時間に排泄尿をドライアイスで冷却し、凍結採取した。それぞれの尿を溶解後、水を加えて希釈し、放射能を測定後、混和し、24時間のプール尿とした。

反復静脈内投与後24時間に排泄尿を上記単回投与時と同様に採取し、24時間のプール尿とした。

3) 胆汁

雄性ラットに単回静脈内投与後1, 2, 4, 6, 8, 24時間まで胆汁を採取した。それぞれの胆汁は水を加えて希釈し、放射能を測定後、混和し、24時間のプール胆汁とした。

4) 乳汁

授乳期雌性ラットを単回静脈内投与後1時間にエーテル麻酔し、腹部大動脈からの全採血により致死させ、直ちに胸部乳腺を摘出した。乳腺を切開し、流出する乳汁を採取した。なお、乳汁採取を容易にするため採取時刻の1時間前に母獣から乳児を隔離するとともにオキシトシン生理食塩水溶液を母獣に 0.5 U/kg 腹腔内投与した。また、血液は上記1)項と同様に処理し、得られた血漿についても代謝物組成を検討した。

5. 質量分析試料の調製

雄性ラット24時間プール尿の一定量に少量のトリフルオロ酢酸を加えて pH 2 に調整後、同容量のブタノールで4回抽出した。得られたブタノール層を混和し、25%アンモニア水を加えて pH 7 に調整し、減圧乾固後、残渣を20%アセトニトリルに懸濁した。この懸濁液を20%アセトニトリルで平衡化した Mega Bond Elut C18 (1 g/6 cc, Varian, Harbor City, CA, USA) に注入し、未吸着の溶出画分を採取した。この画分を減圧乾固後、残渣を少量の蒸留水に溶解し HPLC 装置に注入した。HPLC 装置は Waters 600E システム (Waters Associates Inc., Milford, MA, USA) を使用し、カラムは Cosmosil 5C18-AR (10 mm(i.d.)×25 cm) (ナカライテスク(株), 京都) を40°Cで用い、移動相は0.05%トリフルオロ酢酸:アセトニトリル (0.05%トリフルオロ酢酸を初濃度100%とし、アセトニトリルを1%/minで終濃度30%とする直線グラジェント法) を流速 3 ml/min で用いた。放射性成分の溶出を吸光度 (220 nm) および放射能 (ラジオアナライザー, Flo-One β series A-200, Packard Ins. Co., Meriden, CT, USA) で検出し、溶出画分 Fr. P2 (保持時間13.0~14.5分), Fr. P3 (保持時間32.0~32.5分), Fr. P4 (保持時間27.0~27.5分) を分取した。得られた溶出画分はさらに上記 HPLC (移動相を0.05%トリフルオロ酢酸:アセトニトリル=95:5もしくは0.05%トリフルオロ酢酸:アセトニトリル=80:20のアイソクラティック溶出に変更) により精製し、質量分析用試料とした。

6. 代謝物組成分析試料の調製

1) 血漿および乳汁

血漿および乳汁は共に氷冷下、その一定量に3倍量のエタノールを加えて4°C, 1700×g, 10分間遠心し、除蛋白上清と沈殿を分離した。沈殿はエタノールで洗浄し、遠心を繰り返す、得られた上清を除蛋白上清に混和した。この上清を減圧乾固後、残渣を少量のエタノールに溶解し TLC に供した。

2) 尿および胆汁

尿は無処理のまま TLC に供し、胆汁は凍結乾燥後、残渣に少量の蒸留水を加えて溶解し TLC に供した。

7. 質量分析

精製した各放射性成分について、大気圧化学イオン化法 (APCI) による液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて分析した。

LC-MS 装置は M-1000 四重極型質量分析計 (イオン源: APCI, 日立製作所(株), 東京) を用いた。カラムは μ Bondasphere 5 μ C18-100 A (3.9 mm×15 cm) (Waters Associates Inc., Milford, MA, USA) を用い、移動

相は0.05%トリフルオロ酢酸:アセトニトリル=80:20もしくは0.05%トリフルオロ酢酸:アセトニトリル=50:50を流速 1 ml/min で用いた。質量分析 (APCI/MS) はドリフト電圧 40 V, 霧化器温度280°C, 脱溶媒室温度399°C, イオンマルチプライヤー 2000 V で行い、マススペクトルを得た。

8. 代謝物組成の分析

各試料の放射性代謝物組成を TLC により分析した。

TLC はシリカゲル 60 F₂₅₄ プレート (厚さ 0.25 mm, 5×20 cm, E. Merck, Darmstadt, Germany) を用い、クロロホルム/メタノール/25%アンモニア水=5/3/1 を溶媒として室温で展開した。展開後の TLC プレートはリニアアナライザー (Laboratorium Berthold, Wildbad, Germany) を用いて放射能ピークを検出した。プレート上の未変化体および代謝物の放射能ピークの確認は同一プレート上で展開した非標識 posatirolin および代謝物の標品との展開位置の比較により行った。各放射性成分の組成比 (%) は該当放射能ピークの計数値を全放射能ピークの計数値の合計で除して求め、百分率で表示した。

9. 放射能の測定

各測定試料はシンチレータカクテル Aquasol-2 (Du Pont NEN Research Products, Boston, MA, USA) および Atomlight (Du Pont NEN Research Products, Boston, MA, USA) と直接混和、もしくは Soluene 350 (Packard Ins., Co., Meriden, CT, USA) を加えて溶解し、シンチレータカクテル Econofluor (Du Pont NEN Research Products, Boston, MA, USA) と混和した。各シンチレータカクテル混和試料の放射能の測定は液体シンチレーションカウンタ (Model LSC-903, アロカ(株), 東京、もしくは Model 2200 CA, Packard Ins., Co., Meriden, CT, USA) を用いて行った。計数効率の補正は外部標準線源法により行った。

10. データ処理

データは3もしくは6例の平均値±標準誤差で表示した。

群間比較は Student の t 検定を行い、P<0.05 を有意差ありとした。

結 果

1. 尿中代謝物の同定

雄性ラット24時間プール尿中には、TLC (Fig. 2b) で分析の結果、4種の放射性成分 (P1~P4) が認められ、P2, P3 はそれぞれ予想代謝物標品 (2S)-6-oxo- β -alanine, (2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-carboxyl-1-

pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipecolamide に、P4 は posatirelin 合成標品の Rf 値と一致し、それぞれ尿中放射能の約18, 18, 61%を占めた。なお、これらの P2~P4 はそれぞれ前記 (5.質量分析の調製の項) の HPLC の Fr. P2~P4 に相当した。そこでこれら主成分 (Fr. P2~P4) の化学構造について LC-MS により検討した。得られたマスペクトルを Fig. 3 に示す。

Fr. P4 から単離した化合物のマスペクトル (Fig. 3, a-2) 上には m/z 353 の $[M+H]^+$ プロトン化分子が得られた。このマスペクトルは標品の posatirelin (分子量352) のマスペクトル (Fig. 3, a-1) と一致したことから、本化合物は未変化体 posatirelin と同定した。

Fr. P2 から単離した化合物のマスペクトル (Fig. 3, b-2) 上には m/z 144 の $[M+H]^+$ イオンが得られ、Fr. P3 から単離した化合物のマスペクトル (Fig. 3, c-2) 上には m/z 354 の $[M+H]^+$ イオンが得られた。

これらのマスペクトルのうち、前者は代謝物標品の (2S)-6-oxopipecolic acid (分子量143) のマスペクトル (Fig. 3, b-1) と一致し、後者は代謝物標品の (2S)-N-[(1S)-1-[[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipecolamide (分子量353) のマスペクトル (Fig. 3, c-1) と一致したことから、これらの化合物はそれぞれ上記の代謝物と同定し、以下代謝物 M2, M3 と表示した。

なお、放射性成分 (P1) の化学構造は微量のため同定できず、以下代謝物 M1 と表示した。

2. 代謝物組成

$[^{14}\text{C}]$ Posatirelin を 20 mg/kg の用量で静脈内投与後の血漿、尿、胆汁、乳汁それぞれの TLC ラジオクロマトグラムを Fig. 2 に、TLC から求めた放射性成分の組成比を Table I に示す。

1) 血漿中代謝物

単回投与後 1 時間の雄性ラット血漿中には未変化体

Fig. 2 TLC radiochromatograms of (a) plasma at 1 hr, (b) 24 hr-pooled urine, (c) 24 hr-pooled bile and (d) milk at 1 hr after intravenous administration of $[^{14}\text{C}]$ posatirelin in rats (dose: 20 mg/kg)
O; Origin, F; Front, M2; (2S)-6-oxopipecolic acid, M3; (2S)-N-[(1S)-1-[[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipecolamide, UD; Unchanged posatirelin

Fig. 3 LC-APCI-MS spectra of urinary metabolites in rats
a-1): Authentic posatiirelin, a-2): Isolated posatiirelin,
b-1): Authentic M2, b-2): Isolated M2,
c-1): Authentic M3, c-2): Isolated M3

Table I Composition of radioactive materials in plasma, urine, bile and milk after single or 21 consecutive daily intravenous administration of [^{14}C]posatirelin in rats (dose: 20 mg/kg/day)

Administration	Sex	Specimen	M1	M2	M3	UD
(% of radioactivity in the specimen)						
Single	Male	Plasma (1 hr)*	3.1 $\pm$ 0.6	35.8 $\pm$ 6.6	21.4 $\pm$ 2.1	39.7 $\pm$ 4.6
		Urine (0-24 hr)	3.3 $\pm$ 0.4	17.7 $\pm$ 2.2	18.3 $\pm$ 1.6	60.8 $\pm$ 4.1
		Bile (0-24)	N.D.	4.6 $\pm$ 0.5	87.5 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.7
Consecutive	Female (lactating rat)	Plasma (1 hr)	N.D.	36.6 $\pm$ 4.4	22.7 $\pm$ 2.0	40.7 $\pm$ 3.7
		Milk (1 hr)	N.D.	7.5 $\pm$ 1.3	8.8 $\pm$ 1.0	83.7 $\pm$ 2.3
	Male	Plasma (1 hr)	4.3 $\pm$ 0.2	30.8 $\pm$ 1.2	16.5 $\pm$ 1.1	48.4 $\pm$ 2.3
		Urine (0-24 hr)	4.5 $\pm$ 0.7	19.1 $\pm$ 5.8	19.0 $\pm$ 1.1	57.5 $\pm$ 6.8

Each value represents mean $\pm$ S.E. of 3 animals or 6 animals*.

N.D.: not detected.

M1: Unknown, M2: (2S)-6-oxopipecolic acid,

M3: (2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipecolamide.

UD: Unchanged posatirelin.

が約40%, 代謝物 M2 が約36%, 代謝物 M3 が約21%認められ, そのほかに原点付近に未同定の代謝物 M1 が約3%認められた.

反復投与後1時間の血漿中には未変化体(約48%), M2(約31%), M3(約17%), M1(約4%)が認められた. 反復投与と単回投与時の代謝物組成比には統計学的に有意な差は認められなかった.

2) 尿中代謝物

雄性ラットに単回投与後24時間のプール尿中には未変化体が主成分で約61%, M2, M3 がともに約18%認められたほか原点付近に M1 が約3%認められた.

反復投与後24時間のプール尿中にも未変化体, M2, M3, M1 がそれぞれ約58, 19, 19, 5%認められ, 単回投与時の尿中組成比と比較して統計学的に有意な差は認められなかった.

3) 胆汁中代謝物

雄性ラットに単回投与後24時間のプール胆汁中には M3 が主成分で約88%認められた. 未変化体および M2 の割合は少なくそれぞれ約8, 5%であった.

4) 乳汁中代謝物

単回投与後1時間の授乳期雌性ラットの乳汁中には未変化体, M2, M3 が認められ, それらの組成比はそれぞれ約84, 8, 9%であり, 同時に採血した血漿中代謝物組成(未変化体, M2, M3 がそれぞれ約41, 37, 23%)に比較して未変化体の割合が大きかった. なお, 授乳期雌性ラットと雄性ラットの血漿中代謝物組成比はほぼ等しかった.

考 察

ラットに [^{14}C]posatirelin を静脈内投与後24時間プール尿中から未変化体のほかに代謝物 (2S)-6-oxopipecolic acid (M2), (2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-2-carboxyl-1-

pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipecolamide (M3) の化学構造を LC-MS で同定した. また, [^{14}C]posatirelin を静脈内投与後, 呼気中に約15%の放射能が排泄された¹⁾ことから, M2 はさらに $^{14}\text{CO}_2$ にまで代謝されるものと考えられる. M2 は加水分解的に開環すると, その化学構造上, リシンの代謝物である α -アミノアジピン酸を生成する³⁾と推測されることから, M2 はリシンの代謝経路を経て脱炭酸され, $^{14}\text{CO}_2$ 生成するものと考えられる.

単回投与後1時間の血漿中には未変化体, M2, M3 がそれぞれ約40, 36, 21%認められ, そのほかの代謝物は極微量であった. 投与後24時間のプール尿中には主成分の未変化体が約61%, M2, M3 がともに約18%認められた. これらの血漿および尿中代謝物組成比は単回投与と反復投与間に統計学的に有意な差はなく, posatirelin の代謝は反復投与により影響されないことが示唆された. 投与後24時間プール胆汁中には主成分の M3 のほか未変化体, M2 が認められた.

これらのことからラットにおける posatirelin の主要代謝物は M2, M3 であることが明らかとなった.

TRH は代謝酵素 pyroglutamyl peptidase により pyroglutamic acid と histidylprolineamide に代謝されるほか, 他の代謝酵素 TRH amidase により pyroglutamyl-histidylproline に代謝されることが報告⁴⁾されており, posatirelin においても TRH と同様な代謝を受け, (2S)-6-oxopipecolic acid および (2S)-N-[(1S)-1-[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopipecolamide (6-oxopipecolylleucylproline) が生成したものと推察される.

以上のことからラットにおける posatirelin の代謝経路を推定し, Fig. 1 に示す.

要 約

[¹⁴C]Posatirelin をラットに単回および反復静脈内投与し、尿中代謝物の同定および血漿、尿、胆汁、乳汁中代謝物組成を検討した。

1. 24時間プール尿中には TLC から3種の主放射性成分が認められた。これらは質量分析により未変化体 posatirelin, (2S)-6-oxopipicolinic acid (M2) および (2S)-N-[(1S)-1-[[(2S)-2-carboxyl-1-pyrrolidinyl] carbonyl]-3-methylbutyl]-6-oxopiperidylamide (M3) と同定された。

2. 単回投与後1時間の血漿中には未変化体, M2, M3 がそれぞれ約40, 36, 21%認められた。

3. 単回投与後24時間のプール尿中には未変化体, M2, M3 がそれぞれ約61, 18, 18%認められた。

4. 血漿および尿中代謝物組成比は単回投与と反復投与間に統計学的に有意な差は認められなかった。

5. 投与後24時間のプール胆汁中には主成分の M3 が約88%, 未変化体および M2 がそれぞれ約8, 5%認められた。

6. 投与後1時間の乳汁中には未変化体, M2 および

M3 がそれぞれ約84, 8, 9%認められた。

[試験期間: 1991年4月~1994年8月]

謝 辞: おわりに、本研究の支持をいただきました大日本製薬株式会社研究開発部門担当・関根 豊博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 松永義正, 森本慶子, 南部啓子, 景本 昭, 藤井敏彦, 宮崎 亀, 塙 真也, 西山真一郎, 江角凱夫: Posatirelin の体内動態 (第1報) ラットにおける単回静脈内投与後の血漿中濃度, 組織中濃度, 脳内分布および排泄. 薬物動態 **11**(3): 235-249 (1996).
- 2) 松永義正, 森本慶子, 藤井敏彦, 宮崎 亀, 塙 真也, 西山真一郎, 江角凱夫: Posatirelin の体内動態 (第2報) ラットにおける単回静脈内投与後の胎児, 乳汁中移行性および反復静脈内投与後の血漿中濃度, 分布, 排泄. 薬物動態 **11**(3): 250-272 (1996).
- 3) 藤岡基二, 藤本大三郎, 柿本康男: アミノ酸代謝と生体アミン. 生化学実験講座 (日本生化学会編), **11**(2): 511-529 (1976).
- 4) Prasad, C., Matsui, T., Peterkofsky, A.: Antagonism of ethanol narcosis by histidyl-proline diketopiperazine. *Nature* **268**(14): 142-144 (1977).