新規抗潰瘍薬 TEI-5103 の生体内動態 (第 3 報)

ラットおよびイヌにおける代謝

田辺 裕史, 佐藤 順一, 太田 知裕, 望月 勉

岡部宏一郎, 大場 丈夫, 成智 達之

帝人株式会社 生物医学研究所 〒191 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2

Key words : 3-[p-trans-4-aminomethylcyclohexylcarbonyl]phenyl]propionic acid hydrochloride (TEI-5103)/Anti-ulcer agent/Rat/Dog/metabolism

**Metabolic Fate of Anti-Ulcer Drug TEI-5103 (III) :
Metabolism in Rats and Dogs**

Hirofumi TANABE, Jun-ichi SATO, Tomohiro OTA, Tsutomu MOCHIZUKI,
Kouichiro OKABE, Takeo OHBA, and Tatsuyuki NARUCHI

Teijin Institute for Bio-Medical Research, 4-3-2 Asahigaoka,
Hino, Tokyo, 191, Japan

Summary

Biotransformation of 3-[p-trans-4-aminomethyl-cyclohexylcarbonyl]phenyl]propionic acid hydrochloride (TEI-5103) was studied in rats and dogs.

1) Three metabolites which were related chemically to TEI-5103 were detected in urine; they were identified on a UV spectrum, Chromatograph and Mass spectrum by direct comparison with authentic compounds as follows: 3-[p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid (M-1), p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)benzoic acid (M-2), p-(4-carboxycyclohexylhydroxymethyl)benzoic acid (M-3). Metabolite M-3 was detected only in dogs.

2) In rat plasma, the major metabolites were M-2, unchanged drug and M-1; while in dogs, unchanged drug, M-3 and M-1.

3) After oral and intravenous administration, M-2, unchanged drug and M-1 were mainly excreted to the urine in rats while in dogs, M-3, M-2 and unchanged drug were the main metabolites excreted to the urine.

4) M-2 was mainly excreted with bile in rats. In dogs, M-2 and M-1 were a major metabolites excreted to feces after intravenous administration.

緒言

3-[p-(trans-4-aminomethylcyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid hydrochloride (TEI-5103) は、各種実験潰瘍モデル動物において抗潰瘍作用を示すことが報告されている¹⁾。その作用機序は、胃腔内から胃粘膜に直接作用し、胃粘膜血流増加、胃粘膜バリアー増強、胃粘膜 PG 含量増加など防御因子増強作用によると考えられ^{2,3,4)}、本薬は臨床面において胃潰瘍などの胃腸障害への適用が期待されている。

著者らは、すでに TEI-5103 の生体内動態を明らかにする目的で、¹⁴C で標識した TEI-5103 を用いてラットおよびイヌにおける吸収、排泄およびラットにおける組織内分布などについて検討し報告した^{5,6)}。今回、本薬物の代謝を明らかにする目的で、ラットおよびイヌに ¹⁴C 標識または非標識の TEI-5103 を投与して、尿中から代謝物を分離、同定し、またラットおよびイヌにおける血漿、尿中などの代謝物を分離、定量を行い、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 標識化合物

実験に使用した ¹⁴C で標識した TEI-5103 (¹⁴C-TEI-5103) の化学構造式および標識位置を Fig. 1 に示した。¹⁴C-TEI-5103 は前報⁵⁾に準じ、野村生物科学研究所または Amersham International plc (England) で合成したものを実験に使用した。¹⁴C-TEI-5103 の比放射能は 4.5 μ Ci/mg, 165 μ Ci/mg, 46 μ Ci/mg, 放射化学的純度はいずれも 97% 以上であった。¹⁴C-TEI-5103 は非標識 TEI-5103 で適宜希釈して使用した。

2. 合成標品

代謝物の標品化合物 3-[p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid (M-1), p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)benzoic acid (M-2), p-(4-carboxycyclohexylhydroxymethyl)

benzoic acid (M-3) は当研究所で合成したものをを用いた。

3-[p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid (M-1) は、4-Ethoxycarbonylcyclohexane carboxylic acid 2.0 g をチオニルクロライドにより酸クロリドとした後、塩化アルミニウム存在下 Methyl 3-phenylpropionate と反応させた。生成したアシル化合物を塩酸加水分解した後、アセトン-水により再結晶して 1.88 g の白色結晶 (mp 249~250°C) を得た (収率 62%)。

p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)benzoic acid (M-2) は、上記の酸クロリド 2.2 g をトルエンと Friedel-Crafts 反応を行い、生成したアシル化合物を無水クロム酸で酸化した。反応混合物を一旦エーテル中でジエステル体に誘導し、次いでカラムクロマトグラフィーにより精製し、塩酸加水分解した後、再結晶を行い、630 mg の白色結晶 (mp 287~293°C 分解) を得た (収率 23%)。

p-(4-carboxycyclohexylhydroxymethyl)benzoic acid (M-3) は、M-2 280 mg をメタノール中で NaBH₄ により還元し、塩酸で酸性にすると結晶が生成した。これを濾取し、再結晶を行い、246 mg の白色結晶 (mp 236~237°C) を得た (収率 88%)。

3. 実験動物および投与方法

Wistar 系雄性ラット (7~8 週齢, 静岡県実験動物農業協同組合) または雄性ビーグル犬 (体重 9~11 kg, 9 カ月齢, WHITE EAGLE LABORATORIES, INC., USA) を使用した。標識または非標識薬物は経口投与では蒸留水に、腹腔内投与および静脈内投与では生理食塩水に溶解して投与した。

4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置は島津 LC-3 A (島津製作所) または日立 Model 655-15 (検出器: 日立 Model 200-20) (日立製作所) を使用した。

5. ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS)

装置は M-80 B 型日立二重収束 GC 質量分析計 (日立製作所) を使用した。

6. 血漿、尿、胆汁、糞中代謝物の分離、定量

ラットおよびイヌに ¹⁴C-TEI-5103 を投与して得られた血漿、尿、胆汁および糞ホモジネート試料は 2 N-塩酸で pH 3 以下に調整した後、SEP-

Fig. 1. Chemical structure of ¹⁴C-TEI-5103
*: ¹⁴C-labeled position.

PAK C-18 Cartridge (Waters Associates, Inc.) に通し、蒸留水次いで 5% メタノール水で洗浄した。洗浄後メタノールで溶出させた。溶出液を濃縮乾固後、HPLC を用いて 15 および 30 秒間隔で分取し溶離液中の放射能を測定することにより未変化体および代謝物を分離、定量した。このときの HPLC 条件は、カラム; μ -Bondapak C-18 (4.6 ϕ $\times$ 250 mm, Waters Associates, Inc.), 溶媒; 37% CH_3OH を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) (PIC B-7 (Waters Associates, Inc.) 1 vial/l を含む), 波長; 256 nm, 流速; 1 ml/mim で行った。

7. 放射能の測定

分取した HPLC の溶離液中の放射能は、前報⁵⁾ に準じ親水性シンチレーターを加え直接放射能を測定した。放射能の測定には液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 4530 または TRI-CARB 3255, Packard) を用いて行い、また計数効率の補正は外部標準線源法を用いた。

8. 代謝物の分離、同定

1) M-1 および M-2

ラットに非標識 TEI-5103 200 mg/kg を腹腔内投与し、投与後の尿を代謝ケージで分離採取した。尿は 1 N-塩酸で pH 3 に調整した。次いで Amberlite XAD-2 カラムで前処理し、さらにシリカゲルカラム (8 ϕ $\times$ 200 mm, WAKO C-200, 和光純薬) を用い、 CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH = 100: 20: 10 (v/v) で代謝物を含む画分を分取した。M-1 および M-2 を含む粗代謝物画分を HPLC により M-1 および M-2 を別々に分離精製した。HPLC の条件はカラム; μ -Poracil (4 ϕ $\times$ 250 mm, Waters Associates, Inc.), 溶媒; 0.4% CH_3COOH を含む CH_2Cl_2 , 流速; 1 ml/mim で行った。分離精製した M-1 および M-2 は、用時調整した Diazomethane ether 溶液でメチルエステル化を行った後、GC/MS に供した。

2) M-3

イヌに非標識 TEI-5103 を静脈内投与し、投与後の尿を分離採取した。尿は SEP-PAK C-18 を用いて前処理し、同様に処理した ^{14}C -TEI-5103 を投与した尿を混合し、HPLC によって M-3 を分離した。HPLC の条件は、カラム; μ -Bondapak C-18 (3.9 ϕ $\times$ 300 mm, Waters Associates,

Inc.), 溶媒; 37% CH_3OH を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5), 流速; 1 ml/mim で行った。分離した M-3 は SEP-PAK C-18 を用いて脱塩した後、用時調製した Diazomethane ether 溶液でメチルエステル化を行った。メチルエステル化した M-3 は、さらに HPLC によって精製した。HPLC の条件は、カラム; Lichrosorb SI-60 (4.0 ϕ $\times$ 300 mm, Merck), 溶媒; 3% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ を含む n-hexane, 流速; 1 ml/mim で行った。分離精製した M-3 は GC/MS に供した。

実験結果

1. 代謝物の同定

ラットおよびイヌにおける尿中代謝物を UV スペクトル, HPLC の保持時間およびマススペクトルから推定し、合成標品と UV スペクトル, HPLC の保持時間およびマススペクトルを比較することによりそれぞれの代謝物を同定した。

1) M-1

Fig. 2 に M-1 メチルエステル体のマススペクトルを示す。別途合成した標品とマススペクトル, HPLC の保持時間が一致したことから、M-1 の構造は 3-[p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid と同定した。

2) M-2

Fig. 3 に M-2 メチルエステル体のマススペクトルを示す。別途合成した標品とマススペクトル, HPLC の保持時間が一致したことから、M-2 の構造は p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)benzoic acid と同定した。

3) M-3

Fig. 4 に M-3 メチルエステル体のマススペクトルを示す。M-3 メチルエステル体のマススペクトルから M-2 のカルボニル基の還元体が推定され、また M-3 の UV スペクトルの極大波長が M-2 (250 nm) に比較して低波長側 (238 nm) にシフトしたことから、M-2 のカルボニル基の還元体が支持された。別途合成した標品とマススペクトル, UV スペクトルおよび HPLC の保持時間が一致したことから、M-3 の構造は p-(4-carboxy-cyclohexylhydroxymethyl)benzoic acid と同定した。

Fig. 2. Mass spectrum of M-1-methyl ester derivative

Fig. 3. Mass spectrum of M-2-methyl ester derivative

2. 血漿中代謝物

ラットに ^{14}C -TEI-5103 を 200 mg/kg 経口投与30分後, 10 mg/kg 静脈内投与1時間後およびイヌに ^{14}C -TEI-5103 を 10 mg/kg 静脈内投与30分後の血漿中代謝物パターンを Table I に示した. なお, 未同定の代謝物は minor であり合計し, Table I に Others として示した.

ラットの血漿中では, 主に未変化体 M-2 および M-1 が認められた. イヌの血漿中では, 主に未変化体, M-3 および M-1 が認められ, また M-2 もわずかに認められた.

3. 尿中代謝物

1) ラット

ラットに ^{14}C -TEI-5103 を 200 mg/kg 経口投

与後 0~6, 6~12, 12~24 時間および 10 mg/kg 静脈内投与 0~6 および 6~12 時間の尿中代謝物を投与量に対する割合で Table II に示した. なお, 未同定の代謝物は minor であり合計し, Table II に Others として示した.

経口投与後24時間まで投与した放射能の1.46%が尿中に排泄された. 経口投与後24時間までに, 尿中に排泄された放射能のほとんどが投与後 0~6 時間に主に M-2 (0.38% dose), 未変化体 (0.21% dose), M-1 (0.11% dose) として排泄された. 以後の時間帯では M-1 の割合が減少し, M-2 の割合が増加した.

静脈内投与後12時間までに, 投与した放射能の 55.45%が尿中に排泄された. 経口投与時と同様

Fig. 4. Mass spectrum of M-3-methyl ester derivative

Table I. Percentage of TEI-5103 and its metabolites in plasma after oral (200 mg/kg) or intravenous (10 mg/kg) administration of ^{14}C -TEI-5103 to rats and dogs.

Animal	Route	Time	Metabolites (% of ^{14}C in plasma)				
			Unchanged	M-1	M-2	M-3	Others
Rat	oral	0.5 h	27.1	16.8	31.3	N.D.	24.8
	intravenous	1 h	29.8	17.6	28.0	N.D.	24.6
Dog	intravenous	0.5 h	20.2	30.6	6.7	10.0	32.4

Values are for pooled samples from the three animals.

N.D. : Not detected

Table II. Composition of radioactivity in urine after oral and intravenous administration of ^{14}C -TEI-5103 to rats.

Route	Time	Metabolite (% of dose)				
		Unchanged	M-1	M-2	Others	Total
oral	0— 6	0.21	0.11	0.38	0.41	1.11
	6—12	0.04	0.01	0.09	0.06	0.20
	12—24	0.04	0.01	0.06	0.04	0.15
(200 mg/kg)	0—24	0.29	0.13	0.53	0.51	1.46
Intravenous	0— 6	17.07	7.19	17.12	10.34	51.72
	6—12	0.65	0.30	2.23	0.55	3.73
(10 mg/kg)	0—12	17.72	7.49	19.35	10.89	55.45

Values are for pooled samples from the three rats.

Table III. Composition of radioactivity in urine after oral and intravenous administration of ^{14}C -TEI-5103 to dogs. (Dose : oral ; 200 mg/kg, intravenous ; 10 mg/kg)

Route	Time (hr)	Metabolite (% of dose)					Total
		Unchanged	M-1	M-2	M-3	Others	
Oral	0—12	0.26 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.02	0.58 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.20	1.80 $\pm$ 0.30
Intravenous	0— 6	10.66 $\pm$ 3.85	0.76 $\pm$ 0.18	4.56 $\pm$ 1.89	6.91 $\pm$ 3.43	3.97 $\pm$ 2.42	26.89 $\pm$ 10.79

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of three dogs.

Table IV. Composition of radioactivity in rat bile and dog feces after intravenous administration of ^{14}C -TEI-5103 (10 mg/kg) to rats or dogs

Sample	Time	Metabolite (% of dose)					Total
		Unchanged	M-1	M-2	M-3	Others	
Rat bile*	0— 2 hr	1.47	1.80	17.34	N.D.	20.18	40.79
Dog feces**	0—24 hr	1.20 $\pm$ 0.37	6.60 $\pm$ 1.44	7.02 $\pm$ 0.44	0.37 $\pm$ 0.05	3.42 $\pm$ 0.58	18.61 $\pm$ 2.40

* : Values are for pooled samples from the three rats.

** : Each value represents the mean $\pm$ S.E. of the three dogs.

N.D. : Not detected.

にそのほとんどが投与後 0～6 時間に主に M-2 (17.12% dose), 未変化体 (17.07% dose), M-1 (7.19% dose) として排泄された。投与後 6～12 時間では, 経口投与時と同様に M-1 の割合が減少し, M-2 の割合が増加した。

2) イヌ

イヌに ^{14}C -TEI-5103 を 200 mg/kg 経口投与後 0～12 時間および 10 mg/kg 静脈内投与後 0～6 時間の尿中代謝物を投与量に対する割合で Table III に示した。なお, 未同定の代謝物は minor であり合計し, Table III に Others として示した。

経口投与後 12 時間までに, 投与した放射能の 1.80% が尿中に排泄された。投与後 0～12 時間に主に M-3 (0.58% dose), M-2 (0.29% dose), 未変化体 (0.26% dose) として排泄された。

静脈内投与後 12 時間までに, 投与した放射能の 53.26% が尿中に排泄された。投与後 0～12 時間に主に 未変化体 (10.66% dose), M-3 (6.91% dose), M-2 (4.56% dose) として排泄された。

4. 胆汁および糞中代謝物

ラットに ^{14}C -TEI-5103 を 10 mg/kg 静脈内投与し, 投与後 0～2 時間の胆汁中代謝物パターンを Table IV に, またイヌに ^{14}C -TEI-5103 を 10 mg/kg 静脈内投与し, 投与後 0～24 時間の

糞中代謝物パターンを Table IV に示した。なお未同定の代謝物は合計し, Table IV に Others として示した。

ラットに静脈内投与し, 投与後 0～2 時間の胆汁中では主に M-2 として排泄された。その他極性の高い代謝物および少量の M-1, 未変化体も排泄された。

イヌに静脈内投与し, 投与後 0～24 時間の糞中へは M-2 および M-1 として排泄された。

考 察

著者らは, すでにラットおよびイヌにおける TEI-5103 の経口吸収率はいずれの種においても投与量の約 5 % 前後と低いこと⁵⁾ およびラットに経口投与したときの各臓器, 組織への放射能の分布は低いこと⁶⁾ を明らかにした。TEI-5103 は経口吸収率が低いこと, 静脈内投与時の本薬の代謝も合せて検討した。

ラットおよびイヌの尿中からの 3 種の代謝物が同定され, TEI-5103 の代謝経路は Fig. 5 のごとく推定された。両種共に TEI-5103 は酸化的脱アミノ体である M-1 に代謝され, さらに側鎖 propionic acid が β 酸化された M-2 に代謝された。イヌでは M-2 のカルボニル基が還元された M-3 にさらに代謝された。M-3 はラットでは検

Fig. 5. Possible metabolic pathways of TEI-5103 in rats and dogs

出されず種差が認められた。このケト基の還元に関しては、一般的に肝上清の数種のケト基還元酵素により還元されるため基質特異性が異なり、二環性の alkanolic 化合物に見られるように種差が存在することが知られている⁷⁾。M-3 の生成がラットよりもイヌで顕著に認められたことは Lan らが報告した二環性の alkanolic 化合物である SQ 20650 の結果⁸⁾と同様であった。

ラットに ^{14}C -TEI-5103 を静脈内投与し、投与後の膀胱尿および胆汁を用いて、抱合体の有無を塩酸加水分解処理および β -グルクロニダーゼ処理によって検討した結果、未変化体および代謝物の抱合型は認められなかった(未公表)。

ラットおよびイヌに ^{14}C -TEI-5103 を静脈内投与し、投与後6時間までに尿中にラットで主に未変化体および M-2 として投与量の約55%が排泄

された。しかしイヌでは、主に未変化体および M-3 として投与量の約27%が尿中に排泄された。投与後24時間までの尿中への排泄はラットでは投与量の約57%、イヌでは投与量の約60%とほぼ同量排泄され⁵⁾、ラットに比較してイヌでは尿中への排泄が緩やかであった。このことは尿中へ排泄される主代謝物の差によるものと考えられた。本薬をラットおよびイヌに経口投与したとき、大部分未吸収のまま糞中へ排泄され、少量が消化管から吸収され全身循環に入り、以後はほぼ静脈内投与時と同様な代謝物として尿および胆汁中に排泄されるものと考えられた。

要約

ラットおよびイヌは ^{14}C 標識または非標識の TEI-5103 を投与して、TEI-5103 の代謝を検討した。

1. ラットおよびイヌの尿中から 3-[p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid (M-1), p-(4-carboxycyclohexylcarbonyl)benzoic acid (M-2), p-(4-carboxycyclohexylhydroxymethyl)benzoic acid (M-3) の三種の代謝物を分離同定した。代謝物 M-3 は特にイヌの尿中に多く認められ、ラットでは検出されなかった。

2. ラットの血漿中では、主に未変化体および M-2 が、イヌでは、主に未変化体、M-3 および M-1 が認められた。

3. ラットの尿中では、主に M-2、未変化体および M-1 として、イヌでは主に M-3、M-2 および未変化体として排泄された。

4. ラットの胆汁中では主に M-2 として、イヌでは主に胆汁を介して糞中に M-2 および M-1 として排泄された。

文 献

- 1) Hoshina, K., Yamazaki, N., Takeshita, T. and Naruchi, T.: Anti-Ulcer effect of 3-[p-(trans-4-aminomethylcyclohexylcarbonyl)phenyl]propionic acid hydrochloride (TEI-5103). *Arzneim. Forsch.*, **35** (I): 439-497 (1985).
- 2) Yamazaki, N., Tanabe, H., Yamamoto, M., Hoshina, K., Oba, T., Takeshita, T. and Naruchi, T.: A novel anti-ulcer agent (TEI-5103) directly acting on gastric mucosa from lumen. *Jpn. J. Pharmacol.*, **43**: Suppl. 232 p. (1987).
- 3) Tanabe, H., Yamamoto, M., Oba, T., Hoshina, K., Takeshita, T. and Naruchi, T.: A novel anti-ulcer agent (TEI-5103, TG-51), directly acting on gastric mucosa from lumen. *Dig. Dis. Sci.*, **31** (10): 200 S (1986).
- 4) Hoshina, K., Yamazaki, N., Kamimoto, F., Takeshita, T. and Naruchi, T.:

A novel anti-ulcer agent (TEI-5103, TG-51, promoting a gastric mucosal barrier (I) *Dig. Dis. Sci.*, **31** (10) : 348 S (1986).

- 5) 田辺裕史, 佐藤順一, 太田知裕, 山本 勝, 岡部宏一郎, 望月 勉, 大場丈夫, 成智達之: TEI-5103 の生体内動態 (第1報) ラットおよびイヌにおける吸収および排泄. 薬物動態, **3** (1) : 3-11 (1988).
- 6) 田辺裕史, 佐藤順一, 山本 勝, 太田知裕, 岡部宏一郎, 大場丈夫, 成智達之: TEI-5103 の生体内動態 (第2報) ラットにおける組織内分布, 胎仔移行性および乳仔移行性. 薬物動態, **3** (1) : 13-24 (1988).
- 7) Pottie, J., Busigny, M. and Raynaud, J.P. : Species differences in the biotransformation of 4-(2-methyl-3-(4-chlorobenzoyl) phenyl) butanoic acid (RU 16029). *Xenobiotica.*, **8** : 429-437 (1978).
- 8) Lan, S.J., Chando, T.J., Weliky, I. and Schreiber, E.C. : Metabolism of p-(cyclopropylcarbonyl)phenylacetic acid (SQ 20, 650). Species differences. *Drug Metab. Dispos.*, **3** (3) : 171-179 (1975).