ロイコトリエン拮抗剤 ONO-1078の体内動態 (第4報):

代謝および蛋白結合

石堂 雅恒, 柴川 公雄, 高本まゆみ, 梶原 郁郎, 澤田 正文, 愛下 秀毅

小野薬品工業株式会社水無瀬研究所 〒618 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1

Key words : ONO-1078, Leukotriene antagonist, Metabolism, Protein binding**Studies on the Metabolic Fate of Leukotriene Antagonist ONO-1078 (4) :****Metabolism and Protein Binding**

Masatsune ISHIDO, Kimio SHIBAKAWA, Mayumi TAKAMOTO,

Ikuo KAJIWARA, Masafumi SWADA, Hideki AISHITA

Minase Research Institute, ONO Pharmaceutical Co., Ltd.

3-1-1 Sakurai Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka

Summary

The metabolism of ONO-1078(4-oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy)benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4 H-1-benzopyran hemihydrate) was examined in rats, guinea-pigs and dogs. The binding to plasma (or serum) protein and interaction with reference drugs in binding to human serum protein were also investigated.

1. Metabolites in rats were almost all those with a hydrolyzed amido-bond in ONO-1078 molecule, except unchanged drug which was not absorbed and excreted into feces. Besides, metabolites in rat were quite different from those of dog. In this manner, species-difference was observed.

2. MC-0 and MH-0, hydrolyzed metabolites of ONO-1078, and besides MH-1 and MH-2, taurine conjugates of MH-0 and hydroxylated MH-0, respectively, were identified as main metabolites in rats. Moreover a part of MH-0 was incorporated into the adipose tissue as triglycerides.

3. Similarly to rats, the metabolite which had hydrolyzed amido-bond in ONO-1078 molecule was observed in guinea-pigs.

4. The amido-bond of ONO-1078 was not hydrolyzed in dogs. Main metabolites were M-1, as mono-hydroxylated form, M-2, as di-hydroxylated form of ONO-1078, and M-3, as sulfo-conjugates of M-1 and M-2.

5. ONO-1078 was rapidly hydrolyzed in liver microsomal fraction obtained from rat and guinea-pig. The enzyme hydrolyzing compound in rat liver was identified as carboxylesterase. But, in dog liver microsomal fraction, ONO-1078 was not hydrolyzed.

6. In the presence of carboxylesterase inhibitor, the formation of M-1 and M-2 in rat liver microsomal fraction was observed.

7. *In vivo* binding to plasma (or serum) protein after oral administration varied 97.1~98.9% in rats, 76.1~84.1% in dogs. All the binding to rat, dog and human serum proteins *in vitro* were more than 99.7%.

8. The examination of interaction with reference drugs in the binding to human serum protein revealed that ONO-1078 and every reference drugs tested did not affect to the binding ratio of each other.

緒言

ONO-1078(4-oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy)benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4*H*-1-benzopyran hemihydrate) の体内動態については、ラット^{1,2)} およびイヌ³⁾ においてすでに検討し報告した。その結果、ラットでは¹⁴C標識体は速やかに消失するのに対し、³H標識体では消失は緩やかであり、脂肪組織中に蓄積する傾向を示した。また、イヌでは¹⁴C標識体はラットと同様の血漿中濃度推移を示し、一部の組織を除いて速やかに体内から消失した。今回はこれらラットおよびイヌの他、有効性薬理試験を行っているモルモットにおける代謝について検討を行った。また、本薬物の血漿（あるいは血清）蛋白との結合性および併用の予想される薬剤のヒト血清蛋白に対する結合の相互作用についても検討を行ったので併せて報告する。

実験材料および方法

1. 標識化合物および合成標品

使用した¹⁴C-ONO-1078および³H-ONO-1078は Amersham 社において合成した (Fig. 1)。比放射能は¹⁴C-ONO-1078が4.3MBq/mg, ³H-ONO-1078が2.0GBq/mg であった。また、シリカゲルプレート (Kieselgel 60 F₂₅₄ ガラスプレート, 厚さ0.25mm, E. Merck) を用いてクロロホルム/エタノール (1/1) あるいはベンゼン/酢酸エチル/エタノール/酢酸 (3/7/7/1) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーで測定

した放射化学的純度は¹⁴C-ONO-1078が97%以上、³H-ONO-1078が95%以上であった。非標識ONO-1078 (lot K8001-1) および代謝物同定用合成標品 ONO-ME-020(4-oxo-8-[4-(4-(4-hydroxyphenyl) butoxy)benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4*H*-1-benzopyran), ONO-ME-021(4-oxo-8-[4-(4-(3,4-dihydroxyphenyl) butoxy)benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4*H*-1-benzopyran), ONO-RS-499(4-(4-phenylbutoxy) benzoic acid), ONO-RS-499のタウリン抱合体(2-[4-(4-phenylbutoxy) benzoylamino] ethanesulfonic acid) および ONO-RS-498(8-amino-4-oxo-2-(tetrazol-5-yl)-4*H*-1-benzopyran) は小野薬品工業株式会社水無瀬研究所で合成したものをを用いた。これら合成標品の MS および¹H-NMR 分析データを Table 1 に示した。

2. 実験動物

1) ラット

購入後温度23±1℃, 湿度60±5%の条件下, 1週間予備飼育した8~9週齢のSD系雌雄ラット (日本クレア) を用いた。動物は1群3~5匹で使用し, 投与に先だって絶食は行わなかった。

2) モルモット

購入後温度23±1℃, 湿度60±5%の条件下, 1週間予備飼育した体重300g前後のHartley系モルモット (日本ラビット) を使用した。動物は1群4匹で使用し, 投与前18時間絶食した。

3) イヌ

実験動物として生後9~10カ月齢, 体重8.0~

Specific radioactivity : 4.3 MBq/mg
Radiochemical purity : >97%

Specific radioactivity : 2.0 GBq/mg
Radiochemical purity : >95%

Fig. 1 Chemical structures of ¹⁴C-ONO-1078 and ³H-ONO-1078.

Table I MS and ¹H NMR analysis of authentic standards

<p>ONO-1078</p>	<p>FAB-MS (m/z) : 482 [M+H]⁺ ¹H-NMR δ : 1.8-1.9 (4H, m, CH₂(i)), 2.73 (2H, t, CH₂(h)), 4.07 (2H, t, CH₂(g)), 7.03 (2H, d, Hb), 7.20 (1H, t-like, Hc₁), 7.23 (2H, d-like, Hc₃), 7.24 (1H, s, Hk), 7.30 (2H, t, Hc₂), 7.51 (1H, t, Hf), 7.97 (1H, dd, He), 8.02 (2H, d, Ha), 8.67 (1H, dd, Hd)</p>
<p>ONO-ME-020 (M-1)</p>	<p>FAB-MS (m/z) : 498 [M+H]⁺ ¹H-NMR δ : 1.76-1.88 (4H, m, CH₂(i)), 2.64 (2H, t, CH₂(h)), 4.08 (2H, t, CH₂(g)), 6.77 (2H, d, Hc₁), 7.03 (2H, d, Hb), 7.05 (2H, d, Hc₂), 7.27 (1H, s, Hk), 7.53 (1H, t, Hf), 7.98 (1H, dd, He), 8.02 (2H, d, Ha), 8.68 (1H, dd, Hd)</p>
<p>ONO-ME-021 (M-2)</p>	<p>FAB-MS (m/z) : 514 [M+H]⁺ ¹H-NMR δ : 1.76-1.86 (4H, m, CH₂(i)), 2.58 (2H, t, CH₂(h)), 4.09 (2H, t, CH₂(g)), 6.56 (1H, dd, Hc₂), 6.69 (1H, d, Hc₃), 6.72 (1H, d, Hc₁), 7.05 (2H, d, Hb), 7.27 (1H, s, Hk), 7.55 (1H, t, Hf), 8.00 (1H, dd, He), 8.02 (2H, d, Ha), 8.54 (1H, dd, Hd)</p>
<p>ONO-RS-499 (MH-O)</p>	<p>EI-MS(m/z(%)) : 284(100)[M]⁺, 253(40)[M-OCH₃]⁺, 132(100)[M-O•C₆H₄•COOCH₃]⁺, 91(100)[C₆H₅•CH₂]⁺ ¹H-NMR δ : 1.78-1.88 (4H, m, CH₂(i)), 2.72 (2H, t, CH₂(h)), 4.05 (2H, t, CH₂(g)), 6.92 (2H, d, Hb), 7.18-7.32 (5H, m, Hc), 7.98 (2H, d, Ha)</p>
<p>Taurine conjugated ONO-RS-499 (MH-1)</p>	<p>FAB-MS (m/z) : 378 [M+H]⁺ ¹H-NMR δ : 1.75-1.85 (4H, m, CH₂(i)), 2.67 (2H, t, CH₂(h)), 3.10 (2H, t, CH₂(l)), 3.80 (2H, t, CH₂(m)), 4.02 (2H, t, CH₂(g)), 6.95 (2H, d, Hb), 7.15-7.25 (5H, m, Hc), 7.75 (2H, d, Ha)</p>
<p>ONO-RS-498 (MC-O)</p>	<p>EI-MS(m/z(%)) : 229(100)[M]⁺, 201(98)[M-N₂]⁺, 186(64)[M-N₃H]⁺, 172(26)[M-N₄H]⁺</p>

11.8kg の雄性イヌ（ビーグル, HAZLETON-LRE）を用いた。また、代謝物の同定の目的で体重8.5kg の雑犬を用いた。

ビーグル犬には1日1回（午後1時頃）、約250g の固形試料（DS-5, オリエンタル酵母工業）を与え、水は自由に摂取させ、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下で1カ月以上動物舎で予備飼育した。試験に先立ち、イヌは投与1週間前より代謝ケージ（第一化学薬品型, トキワ科学器械）に移し、水および固型飼料（午前9時頃）を与え、飼料を1時間以内に摂取するように習慣付け、さらに環境に馴化させたのち、各試験に供した。動物は1群3匹で使用し、食後30分に投与した。

3. 投与方法

1) ラットへの経口投与

^{14}C -ONO-1078あるいは ^3H -ONO-1078に非標識の ONO-1078を加え、クロロホルム/エタノール（1/1）に溶解したのち溶媒を除去した。これに0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液を加えて懸濁し、 $2\text{mg}/4\text{ml}/\text{kg}$ をゾンデを用いて経口投与した。投与放射能は ^{14}C -ONO-1078では $2\text{MBq}/\text{kg}$ 、 ^3H -ONO-1078では $3.7\text{MBq}/\text{kg}$ とした。

2) モルモットへの経口投与

^{14}C -ONO-1078に非標識の ONO-1078を加え、クロロホルム/エタノール（1/1）に溶解したのち溶媒を除去した。これに0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液を加えて懸濁し、 $2\text{MBq}/2\text{mg}/10\text{ml}/\text{kg}$ をカテーテルを用いて経口投与した。

3) イヌへの経口投与

^{14}C -ONO-1078に非標識の ONO-1078を加え、クロロホルム/エタノール（1/1）に溶解したのち溶媒を除去した。これに0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液を加えて懸濁し、 $4\text{mg}/4\text{ml}/\text{kg}$ をカテーテルを用いて経口投与した。投与放射能は胆汁中排泄率の測定試験においては約 $1.85\text{MBq}/\text{kg}$ 、その他の試験においては約 $5.55\text{MBq}/\text{kg}$ とした。なお、投与は食後30分に行った。

4. 放射能の測定

各試料中の放射能の測定は、液体シンチレー

ションカウンター（LSC-903, ALOKA）で1～5分間計数することにより行った。なお、計数効率の補正は外部標準線源法によった。

5. 血漿、尿、糞および胆汁試料の採取

1) ラット

雌雄ラットに ^{14}C -ONO-1078あるいは ^3H -ONO-1078を経口投与後3時間および6時間に頸静脈よりヘパリンを入れたシリンジで採血し遠心分離して得た血漿を用いた。尿および糞は経口投与したのちラットを代謝ケージに収め、自然排泄されたものを使用した。胆汁は軽度のエーテル麻酔下に総胆管にカニューレを挿入したラットに経口投与し、ボールマンケージに固定し、排泄された胆汁を用いた。

2) モルモット

雄モルモットに ^{14}C -ONO-1078を経口投与後1時間にヘパリンを入れたシリンジで心臓採血し得た血漿を用いた。尿および糞は経口投与後モルモットを代謝ケージに収め、自然排泄されたものを使用した。胆汁は軽度のエーテル麻酔下に胆嚢を結紮し、胆管にカニューレを挿入したモルモットに経口投与し、ボールマンケージに固定し、排泄された胆汁を用いた。

3) イヌ

雄性ビーグル犬に ^{14}C -ONO-1078を経口投与後代謝ケージに収め、経時的に採血し、血漿を得た。また、自然排泄される尿および糞を採取した。代謝物の分析には経時的に採取した血漿のうち3時間および6時間のものを用いた。胆汁は胆管にシリコンチューブを挿入し、胆汁を体外へ導出したビーグル犬に ^{14}C -ONO-1078を経口投与後に採取した。

代謝物の同定の目的には、雑犬をバルビタール麻酔下、胆管にポリエチレンチューブを挿入し、非標識の ONO-1078を静脈内投与したのち、排泄される胆汁を採取した。

6. 代謝物の単離・精製

1) MC-0, MH-0

ONO-1078をラット肝ミクロゾーム分画に添加し、 37°C でインキュベートしたのちエタノールを加えて除タンパクし、エタノールを濃縮乾固後

TLC を行い単離・精製した。

2) MH-1

ONO-1078を投与後のラットプール胆汁をBond Elut C₁₈ (Analytichem International) に負荷し、1% NH₃を含むメタノールで溶出した。さらに、Bond Elut Si (Analytichem International) に負荷し、メタノール/酢酸エチル混液 (1/1) で溶出した。次いで TLC を行ったのち、HPLC で分取精製した。

3) MH-2

ONO-1078を投与後のラットプール尿を酸性下 ODS-120-50ゲル (東京化成) に負荷し、1% NH₃を含むメタノールで溶出した。さらに、ケイ酸カラム (CC-7) に負荷し、メタノール/酢酸エチル混液 (1/1) で溶出した。次いで TLC を行ったのち、HPLC で分取精製した。

4) M-1, M-2, M-3

麻酔下の雑犬の胆管にポリエチレンチューブを挿入し ONO-1078を静脈内投与後、排泄される胆汁を採取した。得られた胆汁を Bond Elut C₁₈ に負荷し、水で洗浄したのち1% NH₃を含むメタノールにて溶出した。次いでケイ酸カラム(CC-7)に負荷し、クロロホルム/メタノール混液 (4/1) でM-1を、同混液(3/1)でM-3をそれぞれ分離した。M-3はスルファターゼ (H. pomatia 由来 type H-1, Sigma) によって水解され、M-1およびM-2を生成した。これらの代謝物はさらに TLC および HPLC で分取精製した。

7. 代謝物の定量

¹⁴Cあるいは³H-ONO-1078を投与後のラット、モルモットおよびイヌの血漿、尿、胆汁および糞中代謝物の定量は、以下に示す方法で前処理したのち、方法の11に示した条件で HPLC 分析を行った。

1) 血漿

血漿に5~10倍量のエタノールを添加して攪拌後遠心分離し、上清を得た。沈殿にさらにエタノールを加えて得た上清も合して濃縮乾固した。少量のメタノールに溶解して HPLC に注入した。

2) 尿、胆汁

尿あるいは胆汁を酸性下、Sep-pak C₁₈ (Wa-

ters) に負荷し、水で洗浄したのち1% NH₃を含むメタノールにて溶出した。溶出液を濃縮乾固し、少量のメタノールに溶解して HPLC に注入した。

3) 糞

糞に水を加えてホモジネートし、その一部にメタノールを加えて攪拌抽出した。遠心後上清を濃縮乾固し、少量のメタノールに溶解して HPLC に注入した。

8. *In vitro* 代謝試験

各臓器ホモジネートは4倍量の1.15% KCl を加え、テフロンホモジナイザーにて調製した。また、ミクロゾーム分画は常法に従って調製した。

1) アミド結合加水分解活性

反応液 (30mM リン酸緩衝液 pH7.4, 4~20 μg/ml ¹⁴Cあるいは³H-ONO-1078, 5mg/ml microsomal protein) 100μl を37℃, 30分間インキュベート後エタノールにて抽出し、方法の10に示した条件で TLC にて分析した。エステラーゼ阻害剤の影響をみる場合は、DFP (diisopropyl fluorophosphate) およびエゼリンは終濃度10⁻⁵Mに、PHMB (p-hydroxymercuribenzoic acid) は10⁻³Mに、NaF は0.7Mにそれぞれ添加した。ラットにおける加水分解活性存在部位の検討では、臓器ホモジネート、血漿、胆汁および胃・腸液0.2ml に¹⁴C-ONO-1078を4 μg/ml に添加し、同様にインキュベートした。

2) 水酸化活性

反応液 (50mM リン酸緩衝液 pH7.4, 10mM MgCl₂, 10mM NADPH, 10μg/ml ¹⁴C-ONO-1078, 5mg/ml microsomal protein) 100μl を37℃, 30分間インキュベート後エタノールにて抽出し、方法の11に示した条件で HPLC にて分析した。DFP を添加する場合は終濃度10⁻⁵M に添加した。

9. 蛋白結合率の測定

1) 試料の調製

In vivo での代謝物も含めた蛋白結合率の測定には、¹⁴Cあるいは³H-ONO-1078を2 mg/kg 経口投与後3, 6および24時間のラット血漿および¹⁴C-ONO-1078を4 mg/kg 経口投与後3および

6時間のイヌ血漿を試料とした。

ONO-1078の各種血清蛋白との結合率の測定はラット、イヌ、ヒトの新鮮血清あるいはHSA (Fraction V, Sigma), α_1 -acid glycoprotein (Sigma) 溶液に ^3H -ONO-1078を6, 60あるいは600ng/mlに添加し、37℃15分間インキュベートしたものを試料とした。

ONO-1078と各種併用薬との相互作用をみる目的では、ヒト新鮮血清に ^3H -ONO-1078あるいは併用薬をそれぞれ単独あるいは同時に添加し、37℃、15分間インキュベートしたものを試料とした。添加量は ONO-1078 600ng/ml, テオフィリン (和光純薬) 20.0 μg /ml, サルブタモール (Sigma) 50.0 μg /ml, インドメタシン (Sigma) 100.0 μg /ml, アゼラスチン 30.0 μg /ml とした。

2) 蛋白結合率の測定

各試料0.5mlを遠心限外ろ過器 MPS-3 (アミコン) に移し、遠心 (1000 $\times g$, 40分間) した。ろ過前の液(a)およびろ液(b)それぞれ100 μl について ONO-1078はシンチレーター ACS-IIを10ml加えて放射能を、他の薬剤は HPLC にてそれぞれ濃度を測定し、以下の式に従って蛋白結合率を測定した。

$$\text{蛋白結合率 (\%)} = (1 - (b) \text{の濃度} / (a) \text{の濃度}) \times 100$$

3) 結合蛋白の推定

ヒト血清に ^3H -ONO-1078を600ng/mlに添加し、インキュベート後ポリアクリルアミドゲルプレート (PAG プレート4/15, 第一化学薬品) に負荷した。泳動にはトリスグリシン緩衝液 (pH 8.4) を用いた。泳動終了後同時に泳動した蛋白標品に対応する部分を切り取り放射能を測定した。

4) 結合部位の推定

HSA 10 μM に ONO-1078を0, 2.5および10 μM の濃度に添加し、励起波長300nm で320~440 nm の蛍光スペクトルを測定し、蛍光強度の変化を測定した。

10. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

Kieselgel F₂₅₄ ガラスプレート (厚さ0.25mm あるいは0.5mm) を使用した。展開溶媒はベンゼン/酢酸エチル/エタノール/酢酸 (3/7/7/1) を使用し、約15cm 展開した。TLC 上の放射能

は BID システム (BIO SCAN) を用いて測定した。

11. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

1) 代謝物の分取用 HPLC 条件

代謝物分取の目的にはポンプに LC-3A (Shimadzu) あるいはL-6200 (Hitachi), 検出器に SPD-1 (Shimadzu) あるいはL-4000 (Hitachi) を検出波長260nm で、カラムに ERC-ODS-1161 (エルマ, 6 $\times$ 100mm) を使用し、流速1 ml/min にて行った。移動相には0.02M KH_2PO_4 / $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$ の混合溶媒を適宜混合比率を変えて使用した。

2) 代謝物の定量用 HPLC 条件

代謝物の定量の目的にはポンプにL-6200 (Hitachi), 検出器にL-4000 (Hitachi) を検出波長260nm にて、カラムに ERC-ODS-1161 (エルマ, 6 $\times$ 100mm) を使用し、流速1 ml/min の低圧グラディエントにて分析した。移動相には0.02M KH_2PO_4 / $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$ の混合溶媒を3種 (A液: 混合比率8/0/1, B液: 同8/6/1, C液: 同8/9/1) 使用し、次の条件下直線グラディエントした: 0~10min; A/B/C (85/15/0) からA/B/C (57/43/0), 10~15min; A/B/C (57/43/0) からA/B/C (25/75/0), 15~30min; A/B/C (25/75/0) からA/B/C (0/100/0), 30~35min; A/B/C (0/100/0)。これに加えて ^3H -ONO-1078を投与した試料では35~45min; A/B/C (0/100/0) からA/B/C (0/0/100)。溶出液はフラクションコレクター Frac-100 (Pharmacia) を用いて1分間ごとに分画し、放射能を測定した。

3) 蛋白結合の相互作用検討時の併用薬の測定

ポンプにL-6200 (Hitachi), 検出器にL-4000 (Hitachi), カラムに ERC-ODS-1161 (エルマ, 6 $\times$ 100mm) を使用し、室温で1.0ml/min の流速で分析した。

テオフィリンは移動相に0.01M酢酸緩衝液 (pH 6) / $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$ の混合溶媒 (91/6/3) を使用し、カフェインを内部標準物質 (IS) とし検出波長273nm で分析した。

サルブタモールは移動相に5.8mM KH_2PO_4 - 5mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム (pH 6) /

CH₃OH の混合溶媒 (7/3) を使用し, p-ヒドロキシ安息香酸メチルを IS とし, 検出波長291nm で分析した.

インドメタシンは移動相に0.02M KH₂PO₄/CH₃CN の混合溶媒 (55/45) を使用し, p-ヒドロキシ安息香酸アミルを IS とし, 検出波長260 nm で分析した.

アゼラスチンは移動相に0.02M KH₂PO₄/CH₃CN の混合溶媒 (45/55) を使用し, p-ヒドロキシ安息香酸ヘキシルを IS とし, 検出波長260nm で分析した.

12. 核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR)

XL-500型(500MHz, Varian)を用い, CDCl₃ および CD₃OD に溶解して測定した. 内部標準物質には TMS を用いた.

13. 質量スペクトル (MS)

DX-300 (JEOL) を用いて測定した. FAB-MS 分析ではマトリックスにグリセロールを用い, アルゴンガスをビームガスとして用いた.

結 果

1. 代謝物の検索

¹⁴C-ONO-1078を経口投与したビーグル犬 (4 mg/kg), モルモット (2mg/kg), ラット (2mg/kg) および³H-ONO-1078を経口投与したラット (2mg/kg) の各胆汁中放射能を HPLC で分析したときの代表的なラジオクロマトグラムを Fig. 2 に示した. ビーグル犬では保持時間 (RT) 34 分の未変化体の他, 代謝物としてM-1 (RT 26 分), M-2 (RT 23分) およびM-3 (RT 20分) が認められた. ¹⁴C-ONO-1078を投与したラットではビーグル犬のクロマトグラムと異なり, RT 9分に代謝物 MC-0を認めた. モルモットのクロマトグラムはラットと同様に MC-0が認められた. また, ³H-ONO-1078を投与したラットのクロマトグラムでは, MH-0(RT 48分), MH-1 (RT 25分) および MH-2 (RT 16分) が認められた.

胆汁中代謝物の profile から ONO-1078のビーグル犬の主たる代謝物はラットの代謝物と一致しないこと, ラットでは³H標識体と¹⁴C標識体

Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of radioactivity in dog, guinea-pig and rat bile obtained after oral administration of ¹⁴C or ³H-ONO-1078.

とではクロマトグラムが異なること, モルモットの代謝物はラットと同じであることが認められた.

2. ラットにおける代謝物の同定

ラットにおいては, ONO-1078はアミド結合の水解が予想されるため, それぞれの水解物の動態を調べる目的で¹⁴Cおよび³H-ONO-1078を用いて検討を行った (Table II).

1) MC-0

Tabel II MS and ^1H -NMR analysis of metabolites in rats

MC-O		EI-MS (m/z (%)) :	229(100)[M] $^+$, 201(95)[$\text{M}-\text{N}_2$] $^+$, 186(15)[$\text{M}-\text{N}_3\text{H}$] $^+$, 172(5)[$\text{M}-\text{N}_4\text{H}$] $^+$
MH-O		EI-MS (m/z (%)) : (Me ester) ^1H -NMR δ : (CDCl_3)	284(30)[M] $^+$, 132(40)[$\text{M}-\text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOCH}_3$] $^+$, 91(100)[$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2$] $^+$ 1.8-1.9 (4H, m, $\text{CH}_2(\text{i})$), 2.70 (2H, t, $\text{CH}_2(\text{h})$), 4.04(2H, t, $\text{CH}_2(\text{g})$), 6.90(2H, d, Hb), 7.2-7.3 (5H, m, Hc), 8.02 (2H, d, Ha)
MH-1		FAB-MS (m/z) : (Negative) ^1H -NMR δ : (CD_3OD)	376 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ 1.75-1.85 (4H, m, $\text{CH}_2(\text{i})$), 2.65(2H, t, $\text{CH}_2(\text{h})$), 3.10(2H, t, $\text{CH}_2(\text{l})$), 3.85 (2H, t, $\text{CH}_2(\text{m})$), 4.05 (2H, t, $\text{CH}_2(\text{g})$), 6.90 (2H, d, Hb), 7.1-7.3(5H, m, Hc), 7.75(2H, d, Ha)
MH-2 Hydroxylated MH-1		FAB-MS (m/z) : (Negative)	392 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$

MC-0は EI-MS スペクトルおよび HPLC での保持時間が合成標品 ONO-RS-498と一致したことから、ONO-1078のアミド結合が水解されたクロモン環側の代謝物と同定した。

2) MH-0

MH-0はメチルエステルの EI-MS スペクトルと HPLC での保持時間が合成標品のp-phenylbutoxy benzoic acid と一致したことから、ONO-1078のアミド結合が水解された phenylbutoxy benzoic acid 側の代謝物と同定した。

3) MH-1

^1H -NMR において、この代謝物はONO-1078に特徴的な7.24ppm 付近の singlet プロトンや7.51, 7.97, 8.67ppm のプロトンシグナルが認められず、クロモン環を有しなかった。負イオン FAB-MS で分析したところ、擬分子イオン [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ m/z 376を認め、MH-0よりも106質量数多かった。また、別途に合成した MH-0のタウリン抱合体と HPLC および TLC での挙動が一致した。

以上のことから、MH-1は MH-0のタウリン抱合体と同定した。

4) MH-2

MH-2は負イオン FAB-MS で分析したところ、MH-1より16質量数多い擬分子イオン [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ m/z 392が認められ、さらに MH-2は MH-1よりも高極性であったことから、MH-0の水酸化体のタウリン抱合体であると推定した。

3. イヌにおける代謝物の同定

イヌにおける代謝物は単離・精製したのち ^1H -NMR や FAB-MS で分析した (Table III)。

1) M-1

M-1は HPLC で分取・精製したとき、主ピークとその直後に溶出するサブピークとの2つの混合物であることが認められた。これらの代謝物を ^1H -NMR で分析したところ、ONO-1078の phenylbutoxy 基の benzene 環のプロトンは主ピークの代謝物では6.77ppm と7.01ppm にそれぞれ2プロトンの doublet として認められ、

Tabel III FAB-MS and ^1H -NMR analysis of dog biliary metabolites

<p>M-1 (Mixture of two metabolites)</p>	<p>FAB-MS (m/z) : ^1H-NMR δ : ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$)</p>	<p>498 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1.8-1.9 (4H, m, CH_2 (i)), 2.63 (2H, t, CH_2 (h)), 4.05 (2H, t, CH_2 (g)), 6.77 (2H, d, Hc_1), 7.01 (2H, d, Hb), 7.05 (2H, d, Hc_2), 7.24 (1H, s, Hk), 7.52 (1H, t, Hf), 7.97 (1H, dd, He), 8.01 (2H, d, Ha), 8.68 (1H, dd, Hd)</p> <p>FAB-MS (m/z) : ^1H-NMR δ : ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$)</p> <p>498 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1.8-1.9 (4H, m, CH_2 (i)), 2.65 (2H, t, CH_2 (h)), 4.10 (2H, t, CH_2 (g)), 6.61 (1H, dd-like, Hc_1 or Hc_2), 6.68 (1H, t-like, Hc_4), 6.70 (1H, dd-like, Hc_1 or Hc_3), 7.06 (2H, d, Hb), 7.09 (1H, t, Hc_2), 7.18 (1H, s, Hk), 7.51 (1H, t, Hf), 7.96 (1H, dd, He), 8.05 (2H, d, Ha), 8.56 (1H, dd, Hd)</p>
<p>M-2</p>	<p>FAB-MS (m/z) : ^1H-NMR δ : ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$)</p>	<p>514 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1.75-1.85 (4H, m, CH_2 (i)), 2.56 (2H, t, CH_2 (h)), 4.09 (2H, t, CH_2 (g)), 6.53 (1H, dd, Hc_2), 6.66 (1H, d, Hc_3), 6.69 (1H, d, Hc_1), 7.05 (2H, d, Hb), 7.17 (1H, s, Hk), 7.52 (1H, t, Hf), 7.96 (1H, dd, He), 8.01 (2H, d, Ha), 8.55 (1H, dd, Hd)</p>
<p>M-3 (Mixture of three metabolites)</p>	<p>^1H-NMR δ : (CD_3OD)</p> <p>^1H-NMR δ : ($\text{DMSO}-d_6$)</p>	<p>1.7-1.8 (4H, m, CH_2 (i)), 2.72 (2H, t, CH_2 (h)), 4.12 (2H, t, CH_2 (g)), 7.07 (2H, d, Hb), 7.16 (1H, s, Hk), 7.19 (2H, d, Hc_2), 7.23 (2H, d, Hc_1), 7.52 (1H, t, Hf), 7.96 (1H, dd, He), 8.20 (2H, d, Ha), 8.53 (1H, dd, Hd)</p> <p>Analysed after hydrolysis</p> <p>1.7-1.8 (4H, m, CH_2 (i)), 2.55 (2H, t, CH_2 (h)), 4.10 (2H, t, CH_2 (g)), 6.75 (1H, d, Hc_1), 6.82 (1H, dd, Hc_2), 6.91 (1H, s, Hk), 6.99 (1H, d, Hc_3), 7.11 (2H, d, Hb), 7.49 (1H, t, Hf), 7.88 (1H, dd, He), 8.07 (2H, d, Ha), 8.12 (1H, dd, Hd)</p>

Table IV Composition of ONO-1078 and its metabolites in plasma, urine, feces and bile after oral administration of ^{14}C -ONO-1078 (2mg/kg) to rats

	%			% of dose					
	Plasma			Urine		Feces		Bile	
	Male		Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
	3hr	6hr							
ONO-1078	37.7	48.4	37.0	0.1	0.0	96.5	92.1	0.0	0.0
MC-0	45.5	33.9	38.6	2.2	4.2	0.3	0.9	0.3	0.1
Others	16.8	17.7	24.4	1.0	0.2	3.9	3.6	0.3	0.2
Total	100.0	100.0	100.0	3.3	4.4	100.7	96.6	0.6	0.3

Each value represents the mean of three animals.

Table V Composition of ONO-1078 and its metabolites in plasma, urine, feces and bile after oral administration of ^3H -ONO-1078 (2mg/kg) to rats

	%		% of dose					
	Plasma		Urine		Feces		Bile	
	Male		Male	Female	Male	Female	Male	Female
	3hr	6hr						
MH-0	8.0	5.6	0.0	0.0	3.3	3.4	1.1	2.3
ONO-1078	44.3	27.6	0.0	0.0	76.0	73.2	0.0	0.1
MH-1	8.5	6.2	0.0	0.1	2.4	3.2	4.0	2.8
MH-2	14.5	30.6	0.5	0.1	0.2	1.0	3.4	0.9
Others	24.7	30.0	0.6	0.8	14.5	9.4	2.8	4.2
Total	100.0	100.0	1.1	1.0	96.4	90.2	11.3	10.3

Each value represents the mean of three animals.

Table VI Composition of ONO-1078 and its metabolites in plasma, urine, feces and bile after oral administration of ^{14}C -ONO-1078 (2mg/kg) to male guinea-pigs

	%		% of dose	
	Plasma	Urine	Feces	Bile
	1hr	0-24hr	0-48hr	0-24hr
ONO-1078	36.1	0.0	82.5	0.1
MC-0	20.4	2.0	1.9	1.2
Others	43.5	0.7	7.3	0.7
Total	100.0	2.7	91.7	2.0

Each value represents the mean of three animals.

Table VII Composition of ONO-1078 and its metabolites in plasma, urine, feces and bile after oral administration of ^{14}C -ONO-1078 (4mg/kg) to male beagle dogs

	%		% of dose					
	Plasma		Urine		Feces		Bile	
	3hr	6hr	0-24hr	24-48hr	0-24hr	24-48hr	0-24hr	24-48hr
ONO-1078	53.5	55.4	0.03	0.03	70.0	17.0	0.59	0.12
M-1	2.4	0.1	0.00	0.00	2.9	2.1	0.26	0.04
M-2	0.7	0.1	0.00	0.00	0.9	0.7	0.10	0.02
M-3	19.3	18.0	0.00	0.00	0.6	0.5	2.88	0.46
MC-0	1.3	0.8	0.01	0.00	0.0	0.0	0.00	0.00
Others	22.8	25.6	0.26	0.07	3.2	1.3	0.37	0.06
Total	100.0	100.0	0.30	0.10	77.6	21.6	4.20	0.70

Each value represents the mean of three animals.

Table VIII Localization of ONO-1078 hydrolysis activity in rat guinea-pig and dog

	Extent of Hydrolysis		
	Rat	Guinea-pig	Dog
Liver	+++	+++	-
Kidney	+++	+++	-
Lung	+	NT	NT
Intestine	+	NT	NT
Plasma	-	NT	NT
Bile	-	NT	NT
Gastric juice	-	NT	NT
Intestinal juice	-	NT	NT

+++ : hydrolyzed >90%, + : hydrolyzed <10%

++ : hydrolyzed 10-90%, - : not hydrolyzed

NT : not tested

サブピークの代謝物では6.61, 6.68, 6.70, 7.09 ppm にプロトンが認められ, それぞれp-位およびm-位が置換されていた. さらに置換基を推定するためにM-1を FAB-MS で分析したところ, ONO-1078より16質量数多い擬分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z498を認め, 水酸基に置換されていた.

以上の結果から, M-1は ONO-1078のp-位水酸化体およびm-位水酸化体の混合物と同定した.

2) M-2

M-2はこのものの自体では存在量が少ないために, M-3をスルファターゼで水解して生じたものを精製し分析した. M-2を ^1H -NMR で分析したところ, phenylbutoxy 基の benzene 環のプロトンが6.53, 6.66および6.69ppm に認められ, p-

位およびm-位の両方が置換されていた. また, FAB-MS で分析したところ, ONO-1078より32および54質量数多い $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z514, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z536を認め, 水酸基に置換されていた.

以上の結果から, M-2は ONO-1078のp-およびm-位二水酸化体と同定した.

3) M-3

M-3はスルファターゼによりM-1とM-2を生成したことから, これらの硫酸抱合体の混合物であった. 抱合位置を決定するために, M-3のそれぞれの代謝物を酵素処理することなく精製し, ^1H -NMR で分析した. その結果, M-1のp-位水酸化体では硫酸抱合することにより6.77ppm のプロトンが7.23ppm にシフトしており, 水酸基

が抱合されていた。また、M-2では硫酸抱合により6.66ppmのプロトンが6.99ppmにシフトしたことから、m-位の水酸基が抱合されていた。

4. ラットに ^{14}C -ONO-1078を経口投与したときの代謝

雌雄ラットに ^{14}C -ONO-1078を2 mg/kg 経口投与したときの血漿、尿、糞および胆汁を用いて代謝物を定量した (Table V)。

1) 血漿中代謝物

経口投与後3時間および6時間の血漿中放射能の約40%は未変化体であり、また、MC-0も約40%存在した。

2) 尿中代謝物

経口投与後24時間までの尿中には、雄で投与量の3.3%、雌で4.4%の放射能が排泄された。未変化体の排泄率は、雄で投与量の0.1%であったが雌では認められず、MC-0の排泄率は、雄で投与量の2.2%、雌で4.2%であった。

3) 糞中代謝物

経口投与後48時間までの糞中には、雄で投与量の100.7%、雌で96.6%の放射能が排泄された。未変化体の排泄率は、雄で投与量の96.5%、雌で92.1%であった。MC-0の排泄率は、雄で投与量の0.3%、雌で0.9%であった。

4) 胆汁中代謝物

経口投与後24時間までの胆汁中には、雄で投与量の0.6%、雌で0.3%の放射能が排泄された。雌雄とも胆汁中には未変化体は認められなかった。MC-0の排泄率は、雄で投与量の0.3%、雌で0.1%であった。

5. ラットに ^3H -ONO-1078を経口投与したときの代謝

雌雄ラットに ^3H -ONO-1078を2 mg/kg 経口投与したときの血漿、尿、糞および胆汁を用いて代謝物を定量した (Table V)。

1) 血漿中代謝物

雄ラットに経口投与後3時間および6時間の血漿中放射能のうち未変化体は3時間に44.3%、6時間に27.6%存在した。また、MH-0、MH-1およびMH-2が3時間にそれぞれ8.0、8.5および14.5%、6時間でそれぞれ5.6、6.2および30.6%

存在した。

2) 尿中代謝物

経口投与後24時間までの尿中には、雄で投与量の1.1%、雌で1.0%の放射能が排泄された。尿中には未変化体は認められなかった。MH-1は雄ではほとんど認められず、雌の排泄率は投与量の0.1%、MH-2の排泄率は雄で投与量の0.5%、雌で0.1%であった。

3) 糞中代謝物

経口投与後48時間までの糞中には、雄で投与量の96.4%、雌で90.2%の放射能が排泄された。未変化体の排泄率は、雄で投与量の76.0%、雌で73.2%であった。MH-1およびMH-2の排泄率は、それぞれ雄で投与量の2.4および0.2%、雌で3.2および1.0%であった。

4) 胆汁中代謝物

経口投与後48時間までの胆汁中には、雄で投与量の11.3%、雌で10.3%が排泄された。雄では胆汁中に未変化体は認められなかったが、雌では投与量の0.1%が認められた。MH-1およびMH-2の排泄率は、それぞれ雄で投与量の4.0および3.4%、雌で2.8および0.9%であった。

6. モルモットに ^{14}C -ONO-1078を経口投与したときの代謝

雄モルモットに ^{14}C -ONO-1078を2 mg/kg 経口投与したときの血漿、尿、糞および胆汁を用いて代謝物を定量した (Table VI)。

1) 血漿中代謝物

経口投与後1時間の血漿中放射能の36.1%は未変化体であり、MC-0は20.4%存在した。

2) 尿中代謝物

経口投与後24時間までの尿中には投与量の2.7%の放射能が排泄された。尿中には未変化体は認められなかった。MC-0の排泄率は投与量の2.0%であった。

3) 糞中代謝物

経口投与後48時間までの糞中には投与量の91.7%の放射能が排泄された。未変化体およびMC-0の排泄率はそれぞれ投与量の82.5および1.9%であった。

4) 胆汁中代謝物

経口投与後24時間までの胆汁中には投与量の

2.0%の放射能が排泄された。未変化体およびMC-0の排泄率はそれぞれ投与量の0.1および1.2%であった。

7. ビーグル犬に ^{14}C -ONO-1078を経口投与したときの代謝

雄性ビーグル犬に ^{14}C -ONO-1078を4 mg/kg経口投与し、得られた血漿、尿、糞および胆汁を用いて代謝物を定量した (Table VII)。

1) 血漿中代謝物

経口投与後3時間および6時間の血漿中放射能の半分以上は未変化体であり、M-3が約20%弱認められた。また、投与後3時間にはM-1が2%程度認められた。

2) 尿中代謝物

経口投与後48時間までの尿中には投与量の0.4%の放射能が排泄された。0~24時間および24~48時間の尿の未変化体の排泄率はいずれも投与量の0.03%であった。尿中にはM-1、M-2およびM-3のいずれも認められなかった。

3) 糞中代謝物

経口投与後48時間までの糞中には投与量の99.2%の放射能が排泄された。未変化体の排泄率は0~24時間に投与量の70.0%, 24~48時間に17.0%であった。M-1、M-2およびM-3の排泄率は0~24時間にそれぞれ2.9, 0.9および0.6%, 24~48時間にそれぞれ2.1, 0.7および0.5%であった。

4) 胆汁中代謝物

経口投与後48時間までの胆汁中には投与量の4.9%の放射能が排泄された。未変化体の排泄率は0~24時間に投与量の0.59%, 24~48時間に0.12%であった。M-1、M-2およびM-3の排泄率は0~24時間にそれぞれ0.26, 0.10および2.88%, 24~48時間にそれぞれ0.04, 0.02および0.46%であった。

8. *In vitro* での代謝

1) アミド結合加水分解活性

ラット、モルモットおよびイヌの臓器ホモジネートあるいはマイクロゾーム分画にONO-1078を添加し、アミド結合が加水分解されるかどうかを調べた。

ONO-1078はラットおよびモルモットの肝臓お

Table K Effects of esterase inhibitors on ONO-1078 hydrolysis activity

Compound	Inhibition (%)
+Eserine (10^{-5}M)	0
+DFP (10^{-5}M)	100
+PHMB (10^{-3}M)	91
+NaF (0.7M)	98

DFP : diisopropylfluorophosphonate

PHMB : p-hydroxymercuribenzoic acid

よび腎臓で添加量のほとんどが加水分解された。また、ラット肺および小腸でも添加量の10%程度が加水分解された。しかし、イヌの肝臓および腎臓では加水分解されなかった (Table VII)。

ラット肝臓に存在する加水分解活性について、各種エステラーゼ阻害剤に対する感受性を検討した。その結果、有機リン剤の diisopropylfluorophosphate (DFP) および p-hydroxymercuribenzoic acid (PHMB) により強く阻害された (Table K)。

2) ラット肝マイクロゾームによる水酸化反応

ラット肝臓より常法に従ってマイクロゾーム分画を調製し、 Mg^{+} イオンおよび NADPH の存在下 ^{14}C -ONO-1078を添加し、生成する代謝物をHPLCで分析した。その結果、ラットのマイクロゾームでは加水分解活性が強く、添加した ^{14}C -ONO-1078はすべて水解された。しかし、エステラーゼ活性阻害剤のDFPを 10^{-5}M の濃度に添加して同様の反応を行うと、ラット由来マイクロゾームでもイヌの代謝物であるM-1およびM-2の生成を認めた (Fig. 3)。

9. ラットに ^3H -ONO-1078を反復経口投与時の脂肪中存在形態

雄ラットに ^3H -ONO-1078を2 mg/kg/day 1日1回15日間反復経口投与後24時間の白色脂肪中放射能をクロロホルムにて抽出後、ケイ酸カラムにて精製し、石油エーテル/エーテル/酢酸(70/30/1)を展開溶媒とするTLCで分析した。放射能はトリグリセリドに一致するRf値とトリグリセリドおよびジグリセリドの間に認められた。さらに、このものをアルカリ加水分解して再びTLCで分析したところ、上記の2つの放射能ス

Fig. 3 HPLC chromatograms of radioactivity after incubation of ^{14}C -ONO-1078 with rat liver microsomal fraction at 37°C for 30min in the presence (lower) or absence (upper) of DFP.

ポットは消失し、ONO-1078の加水分解代謝物のMH-0に一致する位置に放射能スポットが認められた (Fig. 4).

10. 蛋白結合

1) 蛋白結合率

ラット、イス、ヒト血清、HSA あるいは α_1 -acid glycoprotein (AAG) に ^3H -ONO-1078を添加し、遠心限外ろ過法で蛋白結合率を測定した。各種血清およびHSA に対し、ONO-1078は99.7~99.8%の高い結合率を示した (Table X).

^{14}C -ONO-1078を経口投与後および6時間にお

Fig. 4 Schematic representation of thin layer chromatograms of the metabolites in fat.

ける血漿中放射能の蛋白結合率は、イスでは76.1~84.1%，ラットでは96.7~97.5%であり、 ^3H -ONO-1078を経口投与後3, 6, 24時間のラットにおける蛋白結合率は97.1~98.9%であった (Table XI). なお、これら放射能はエタノールにより抽出されることから蛋白との結合様式は可逆的であった。

2) 結合蛋白の推定

ヒト血清に ^3H -ONO-1078を添加し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、アルブミン、AAG およびグロブリン群に分画し、各分画に存在する放射能を測定したところ、その多くはアルブミン分画に認められた (Table XII). この結果から、ONO-1078の主たる結合蛋白はアルブミンであると判断した。

3) アルブミン結合部位の検討

ONO-1078の HSA 分子上の結合部位を蛍光スペクトル法⁴⁾で検討した。その結果、ONO-1078は HSA 分子上の U site 付近に存在する

Table X Binding of ONO-1078 to HSA, AAG and serum proteins after addition of ^3H -ONO-1078 to protein solution

	Binding (%)				
	Rat serum	Dog serum	Human serum	HSA (43.2mg/ml)	AAG (1mg/ml)
6ng/ml	99.7 $\pm$ 0.1	99.8 $\pm$ 0.1	99.7 $\pm$ 0.2	99.7 $\pm$ 0.1	98.0 $\pm$ 0.1
60ng/ml	99.7 $\pm$ 0.0	99.8 $\pm$ 0.1	99.7 $\pm$ 0.1	99.7 $\pm$ 0.0	97.9 $\pm$ 0.3
600ng/ml	99.8 $\pm$ 0.1	99.8 $\pm$ 0.1	99.8 $\pm$ 0.2	99.7 $\pm$ 0.1	97.5 $\pm$ 0.3

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments.

HSA : human serum albumin

AAG : α_1 -acid glycoprotein

Table XI Binding of radioactivity to serum protein after oral administration of ^{14}C or ^3H -ONO-1078 to male rats (2mg/kg) or male dogs (4mg/kg)

	Rat ^{14}C -ONO-1078 p.o.		Rat ^3H -ONO-1078 p.o.		Dog ^{14}C -ONO-1078 p.o.	
	Concentration	Binding	Concentration	Binding	Concentration	Binding
	(ng eq./ml)	(%)	(ng eq./ml)	(%)	(ng eq./ml)	(%)
3hr	139.6 $\pm$ 118.4	97.5 $\pm$ 0.2	61.4 $\pm$ 6.6	97.9 $\pm$ 0.2	18.0 $\pm$ 7.5	84.1 $\pm$ 5.0
6hr	81.4 $\pm$ 28.1	96.7 $\pm$ 0.5	55.4 $\pm$ 4.9	98.9 $\pm$ 0.7	13.4 $\pm$ 7.9	76.1 $\pm$ 10.4
24hr	NT	NT	31.2 $\pm$ 10.8	97.1 $\pm$ 0.8	NT	NT

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals.

NT : Not tested

Table XII Fractionation of radioactivity in human serum by electrophoresis

Fraction	Proportion (%)
Globulin	13.9 $\pm$ 3.6
Albumin	55.5 $\pm$ 3.2
α_1 -acid glycoprotein	13.2 $\pm$ 7.0
Others	18.6 $\pm$ 2.7

Mean $\pm$ S.D. of 4 experiments.

^3H -ONO-1078 was added in human serum. After incubation at 37°C for 15min, serum proteins were fractionated by electrophoresis and measured radioactivity.

Trp 残基の蛍光強度を用量依存的に抑制した。この結果から、ONO-1078の結合部位は U site であると判断した。

4) 併用薬との相互作用

ONO-1078と併用が予想されるテオフィリン、サルブタモール、インドメタシンおよびアゼラスタチンの各薬剤との共存時におけるそれぞれの薬剤のヒト血清タンパクとの結合率を測定した。ONO-1078の蛋白結合率は、これら併用薬によって影響を受けず、また、これらの薬剤の蛋白結合率にも影響を与えなかった (Table XIII)。

考 察

ONO-1078のラット、モルモットおよびイヌでの代謝について検討した。その結果から推定される代謝経路を Fig. 5 に示した。

ラットの代謝物として構造が同定あるいは推定された MH-0, MH-1, MH-2および MC-0の

Table XIII Protein binding of ONO-1078 to human serum protein in the presence or absence of other drug

	Protein binding (%) of	
	ONO-1078	Other drug
ONO-1078 (600ng/ml)	99.8 $\pm$ 0.0	—
Theophyllin (20 μg /ml)	—	60.5 $\pm$ 3.9
ONO-1078+Theophyllin	99.7 $\pm$ 0.0	58.3 $\pm$ 4.2
ONO-1078 (600ng/ml)	99.7 $\pm$ 0.1	—
Salbutamol (50 μg /ml)	—	12.9 $\pm$ 0.7
ONO-1078+Salbutamol	99.7 $\pm$ 0.1	14.8 $\pm$ 1.0
ONO-1078 (600ng/ml)	99.8 $\pm$ 0.1	—
Indomethacin (100 μg /ml)	—	99.7 $\pm$ 0.4
ONO-1078+Indomethacin	99.7 $\pm$ 0.1	99.7 $\pm$ 0.3
ONO-1078 (600ng/ml)	99.7 $\pm$ 0.1	—
Azelastine (30 μg /ml)	—	89.4 $\pm$ 1.0
ONO-1078+Azelaatine	99.7 $\pm$ 0.0	89.4 $\pm$ 4.7

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments.

Fig. 5 Proposed metabolic pathway of ONO-1078.

→ : Rat ---- : Dog

各代謝物は、いずれもアミド結合が水解されたものであった。しかし、 ^3H -標識体と ^{14}C -標識体を投与後の試料を同条件で分析したクロマトグラムを比較しても、保持時間の一致した放射能ピークが少なかったことから (Fig. 2), 構造が推定に至らなかったその他の代謝物もアミド結合が水解されているものと推定された。さらに、ラット肝臓におけるアミド結合の水解酵素は、エステラーゼ阻害剤に対する感受性から carboxylesterase であると推定した (Table K)。Carboxylesterase は多くの組織に分布しており、なかでも肝臓の活性が最も強く、その他腎臓や腸管にも存在することが知られている⁵⁾。In vitro での代謝試験でも、肝臓および腎臓のホモジネートにおいて加水分解されたことから (Table XII), 吸収された ONO-1078 はこれらの組織で水解され、代謝されるものと考えられた。また、ラットミクロゾーム中で carboxylesterase 阻害剤の DFP の存在下、ONO-1078 から M-1 が生成したことから、M-1 への代謝経路もあるものと考えられた (Fig. 5)。

ラットに ^3H -ONO-1078 を投与したときに脂肪

中に放射能が蓄積する傾向を認め、トリグリセリドへの取り込みが示唆されたため、脂肪中の放射能をアルカリ加水分解したところ MH-0 を生じた。MH-0 に構造の類似した ethyl benzyloxy benzoate はトリグリセリドとして脂肪組織へ取り込まれることが報告されている⁶⁾。また、放射能の脂肪組織からの $T_{1/2}$ は 8~12 日であり¹⁾、トリグリセリドの $T_{1/2}$ (8 日) とほぼ一致しており、MH-0 もトリグリセリドとして脂肪組織に取り込まれているものと考えられた。

モルモットにおいては ^{14}C -ONO-1078 を投与した結果、ラットと同じ代謝物が認められ (Fig. 2), また、肝臓あるいは腎臓ホモジネートにおいてラットと同様に強い加水分解活性が認められたことから (Table XII), モルモットはラットと同じ代謝をするものと考えられる。

イヌの代謝物として構造が同定あるいは推定された M-1, M-2 および M-3 は、いずれも ONO-1078 の水酸化体およびその硫酸抱合体であり、ラットで認められたアミド結合が水解された代謝物はほとんど認められなかった。ホモジネートを用いた in vitro 代謝試験でもアミド結合は水解

されず、また、ラットの水解酵素として推定した *carboxylesterase* は基質特異性に種差があることが知られており⁷⁾、イヌにおいて水解されないのはこの基質特異性の差によるものと考えられた。

ラットとモルモットではアミド結合の水解をとまなう代謝経路をとったが、イヌにおいてはアミド結合は水解されずに水酸化を1回あるいは2回受ける経路をとり、代謝に種差があることが明らかとなった。しかし、ラットにおいてもイヌにおいても毒性試験で異常所見は認められておらず^{8, 9)}、代謝物が毒性に関係するものではないと考える。

本薬物はラット、イヌおよびヒトの各血清蛋白と99.7~99.8%と高い結合率を示したが、HSAに対する結合率も同じであったことから、主たる結合蛋白はアルブミンであると推定した (Table X)。経口投与後の代謝物も含めた蛋白結合率は、ラットでは96.7~98.9%と未変化体の蛋白結合率と同程度であったが、イヌでは76.1~84.1%とやや低い結合率を示した (Table XI)。したがって、イヌでは未変化体に比べて代謝物の蛋白結合率が低いことが考えられた。一方、結合様式はイヌおよびラットにおける血漿中放射能がいずれもエタノールにより抽出されたことから可逆的なものであった。

本薬物と併用される可能性の高い薬剤について、ヒト血清蛋白との結合における相互作用について検討を行った。本薬物は他剤が共存しても蛋白結合率に影響を受けず、また、他剤の蛋白結合率にも影響を及ぼさなかったことから (Table XII)、本薬物は薬物相互作用を示さないものと考えられた。

以上のように、本薬物はラットおよびモルモットではアミド結合の加水分解および抱合反応により代謝されたが、イヌではアミド結合が水解されることなく水酸化と抱合反応によって代謝に種差が認められた。また、高い蛋白結合性を示したが可逆的であり、薬物相互作用も認めなかったことから、他剤との併用による体内動態の変化などは考えにくいものと思われた。

要 約

ONO-1078(4-oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy)

benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4*H*-1-benzopyran hemihydrate) のラット、モルモットおよびイヌにおける代謝について検討した。また、血漿 (あるいは血清) 蛋白との結合性について検討を行うとともに、併用を予想される相手薬剤との蛋白結合の相互作用についても検討した。

1. ラットでの代謝物は未吸収で糞中へ排泄された未変化体を除いて、ほとんどすべてアミド結合が水解された代謝物であった。また、ラットの代謝物とイヌの代謝物は異なっており、種差が認められた。

2. ラットの主たる代謝物としてアミド結合が水解された MC-0および MH-0の他、MH-0がタウリン抱合された MH-1、そして MH-0が水酸化後にタウリン抱合された MH-2が同定された。また、MH-0の一部はトリグリセリドとして脂肪組織中へ取り込まれた。

3. モルモットではラットと同様にアミド結合が水解された代謝物を認めた。

4. イヌではアミド結合は水解されず、主たる代謝物はフェニル基の水酸化されたM-1およびM-2、そしてこれらの硫酸抱合体のM-3であった。

5. ONO-1078のアミド結合は、ラットおよびモルモットの肝ミクロゾーム分画で速やかに加水分解を受けた。また、ラット肝臓中に存在する水解酵素は *carboxylesterase* であると推定した。しかし、イヌでは肝ミクロゾーム分画において水解されなかった。

6. ラット肝ミクロゾーム分画に *carboxylesterase* 阻害剤の存在下、イヌの代謝物であるM-1およびM-2の生成を認めた。

7. 経口投与後の血漿 (あるいは血清) 中放射能の蛋白結合率は、ラットでは97.1~98.9%、イヌでは76.1~84.1%であった。ONO-1078の蛋白結合率はラット、イヌ、ヒトのいずれの血清蛋白とも99.7%以上であった。

8. ヒト血清蛋白を用いた薬物相互作用の検討で、ONO-1078は併用を予想される他剤により蛋白結合率の変化を受けず、他剤の結合率にも影響を与えなかった。

文 献

- 1) 石堂雅恒, 柴川公雄, 中尾康裕, 澤田正文, 愛下秀毅: ロイコトリエン拮抗剤 ONO-1078 の体内動態 (第1報): ラットに単回投与後の吸収, 分布および排泄. 薬物動態, **8**: 3-26 (1993).
- 2) 石堂雅恒, 柴川公雄, 澤田正文, 愛下秀毅: ロイコトリエン拮抗剤 ONO-1078 の体内動態 (第2報): ラットに反復経口投与後の吸収, 分布および排泄および薬物代謝酵素への影響. 薬物動態, **8**: 27-38 (1993).
- 3) 石堂雅恒, 阪口喜美子, 高木まゆみ, 澤田正文, 愛下秀毅, 神 義容, 片見好春, 三容隆行, 野上貴祐: ロイコトリエン拮抗剤 ONO-1078 の体内動態 (第3報): ビーグル犬に単回投与後の吸収, 分布および排泄. 薬物動態, **8**: 39-47 (1993).
- 4) 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二, 編: 医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法 (ソフトサイエンス社) p 358-361, 1985.
- 5) 加藤隆一, 鎌滝哲也, 編著: 薬物代謝の比較生化学 (清至書院) p 410, 1983.
- 6) Fears, R., Baggaley, K.H., Alexander, R., Morgan, B., Hindley, R.M.: The participation of ethyl 4-benzyloxybenzoate (BRL 10894) and other arylsubstituted acids in glycerolipid metabolism. *J. Lipid Res.*, **19**: 3-11 (1978).
- 7) 加藤隆一, 鎌滝哲也, 編著: 薬物代謝の比較生化学 (清至書院) p 413, 1983.
- 8) 米沢秀利, 山口康二郎, 四宮啓祐, 小出達司, 鈴木靖郎, 上田博明, 村形信哉, 谷本隆志, 田中雅治, 柳浩由紀, 七野 裕, 酒井正樹, 白川隆源, 板垣伊織, 千原 昇, 金沢英一, 松岡康夫: 4-Oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy) benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4H-1-benzopyran hemihydrate (ONO-1078) の毒性試験 (第3報) ラットにおける経口投与による12カ月毒性試験. 応用薬理, **44**: 219-242 (1992).
- 9) 米沢秀利, 山口康二郎, 小出達司, 四宮啓祐, 鈴木靖郎, 村形信哉, 七野 裕, 千原 昇, 柳浩由紀, 下内孝司, 松岡康夫: 4-Oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy) benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4H-1-benzopyran hemihydrate (ONO-1078) の毒性試験 (第5報) イヌにおける経口投与による12カ月毒性試験. 応用薬理, **44**: 263-286 (1992).