新規トロンボキサンA₂受容体拮抗薬 (S-1452) の ラットにおける代謝物の同定

溝尻 顕爾, 乗鞍 良, 吉森 丈夫, 中西真智子, 岩谷 宏治

塩野義製薬研究所神崎川分室 〒561 豊中市二葉町3-1-1

照井 彬弘, 菊池 純子, 中川 有造

塩野義製薬研究所 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4

Key words : S-1452, (+)-S-145, Rat, Metabolism, Urine, Bile, Plasma, ¹H-NMR, GC/MS, LSIMS

Identification of Metabolites of a New Thromboxane A₂ Receptor Antagonist, S-1452, in Rats

Kenji MIZOJIRI, Ryo NORIKURA, Takeo YOSHIMORI,

Machiko NAKANISHI, and Kouji IWATANI

Kanzakigawa Laboratory, Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.,
3-1-1, Futaba-cho, Toyonaka-shi, Osaka 561, Japan

Yoshihiro TERUI, Junko KIKUCHI, and Yuzo NAKAGAWA
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.,
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

Summary

The metabolism of S-1452, calcium (5*Z*)-7-[(1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*S*)-3-phenylsulfonylaminobicyclo [2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoate hydrate, a new TXA₂ receptor antagonist, in rats was studied. Twelve unconjugated metabolites including the unchanged free acid of S-1452, (+)-S-145, and three α -chain-shortened metabolites, bisnor-, dihydrobisnor- and tetranor-(+)-S-145, and four pairs of their regioisomeric metabolites, hydroxylated at the 5- or 6-position of the bicyclo ring, were isolated from plasma after oral administration of ¹⁴C-S-1452 or unlabelled S-1452. Two of the hydroxylated metabolites, 5-OH-tetranor- and 6-OH-tetranor-(+)-S-145, were also isolated from urine. Furthermore, four taurine-conjugated metabolites, (+)-S-145, bisnor-(+)-S-145, dihydrobisnor-(+)-S-145 and tetranor-(+)-S-145 taurine, were isolated from bile. The structures of these metabolites were identified by means of GC/MS, LSIMS and ¹H-NMR analyses in comparison with their synthesized reference compounds. The stereochemistry of 6-OH-(+)-S-145, the *exo* configuration of its hydroxy group, was confirmed by comparison of its retention time on HPLC with those of *endo* and *exo* reference standards. Other hydroxylated metabolites also were considered to be of the *exo* configuration. Tentative metabolic pathways in rats are presented and discussed.

緒言

Calcium (5Z)-7-[(1R, 2S, 3S, 4S)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoate hydrate(S-1452)は、強力なTXA₂受容体拮抗作用を有する (+)-S-145¹⁻³⁾ の安定な Ca 塩として当研究所で合成され⁴⁾、経口剤として有効な気管支喘息および血栓塞栓性疾患の治療薬⁵⁻⁷⁾ として開発中の薬物である。

本報では、S-1452のラットにおける代謝物を血漿、尿および胆汁より単離同定した結果について報告する。

実験材料および方法

1. 投与化合物および試薬

非標識S-1452⁴⁾, ¹⁴C標識S-1452⁸⁾ (¹⁴C-S-1452), 非標識S-145²⁾ (S-1452遊離酸のラセミ体) および¹⁴C標識S-145 (¹⁴C-S-145) は当研究所で合成された。¹⁴C-S-1452の比放射能は757kBq/mg, 放射化学的純度は94.3%, ¹⁴C-S-145の比放射能は1.17MBq/mg, 放射化学的純度は97%以上であった。¹⁴C-S-1452の構造式を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 Chemical structure of ¹⁴C-S-1452

誘導体試薬 trimethylsilyldiazomethane (TMSD) はナカライテスクより、N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) はジーエルサイエンスより購入した。β-Glucuronidase は Type-1(東京臓器)を用いた。その他の試薬、溶媒は市販の特級品もしくは HPLC 用を用いた。

2. 合成標品

当研究所で合成された以下の標品⁹⁾を用いた。

それらの化学名を以下に示し、構造式を Fig. 2 に示す。

- (1) (+)-S-145; (5Z)-7-[(1R, 2S, 3S, 4S)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid.
- (2) **Bisnor**-(+)-S-145; (3Z)-5-[(1R, 2S, 3S, 4S)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-3-pentenoic acid.
- (3) **Dihydrobisnor**-(+)-S-145; 5-[(1R, 2S, 3S, 4S)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl] pentanoic acid.
- (4) **Tetranor**-(+)-S-145; 3-[(1R, 2S, 3S, 4S)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl] propionic acid.
- (5) 5-OH-(+)-S-145; (5Z)-7-[(1S, 2S, 3R, 4S, 5R)-5-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-pentenoic acid.
- (6) 5-OH-Bisnor-(+)-S-145; (3Z)-5-[(1S, 2S, 3R, 4S, 5R)-5-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-3-pentenoic acid.
- (7) 5-OH-Dihydrobisnor-(+)-S-145; 5-[(1S, 2S, 3R, 4S, 5R)-5-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]pentanoic acid.
- (8) 5-OH-Tetranor-(+)-S-145; 3-[(1S, 2S, 3R, 4S, 5R)-5-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]propionic acid.
- (9) 6-OH-(+)-S-145; (5Z)-7-[(1R, 2S, 3S, 4R, 6S)-6-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid.
- (10) 6-OH-(+)-S-145 (*endo*); (5Z)-7-[(1R, 2S, 3S, 4R, 6R)-6-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid.
- (11) 6-OH-Bisnor-(+)-S-145; (3Z)-5-[(1R, 2S, 3S, 4R, 6S)-6-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-3-pentenoic acid.
- (12) 6-OH-Dihydrobisnor-(+)-S-145; 5-[(1R, 2S, 3S, 4R, 6S)-6-hydroxy-3-phenylsul-

- (1) (+)-S-145 : R = CH₂-CH=CH-CH₂-COOH
- (2) Bisnor-(+)-S-145 : R = CH₂-CH=CH-COOH
- (3) Dihydrobisnor-(+)-S-145 : R = CH₂-CH₂-COOH
- (4) Tetranor-(+)-S-145 : R = CH₂-COOH
- (14) (+)-S-145 taurine : R = CH₂-CH=CH-CH₂-CONH-CH₂-SO₃H
- (15) Bisnor-(+)-S-145 taurine : R = CH₂-CH=CH-CONH-CH₂-SO₃H
- (16) Dihydrobisnor-(+)-S-145 taurine : R = CH₂-CH₂-CONH-CH₂-SO₃H
- (17) Tetranor-(+)-S-145 taurine : R = CH₂-CONH-CH₂-SO₃H

- (5) 5-OH-(+)-S-145 : $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = CH_2$ COOH
- (6) 5-OH-Bisnor-(+)-S-145 : $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = CH_2$ COOH
- (7) 5-OH-Dihydrobisnor-(+)-S-145 : $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = CH_2$ COOH
- (8) 5-OH-Tetranor-(+)-S-145 : $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = CH_2$ COOH
- (9) 5-OH-(+)-S-145 : $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = CH_2$ COOH
- (11) 6-OH-Bisnor-(+)-S-145 : $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = CH_2$ COOH
- (12) 6-OH-Dihydrobisnor-(+)-S-145 : $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = CH_2$ COOH
- (13) 6-OH-Tetranor-(+)-S-145 : $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = CH_2$ COOH

(10) 6-OH-(+)-S-145 (*endo*)

Fig. 2 Chemical structures of authentic compounds

fonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]pentanoic acid.

- (13) **6-OH-Tetranor-(+)-S-145**; 3-[(1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*R*, 6*S*)-6-hydroxy-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]propionic acid
- (14) **(+)-S-145 taurine**; *N*-[(5*Z*)-7-[(1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*S*)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoyl] taurine.
- (15) **Bisnor-(+)-S-145 taurine**; *N*-[(3*Z*)-7-[(1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*S*)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-3-pentenoyl]taurine.
- (16) **Dihydrobisnor-(+)-S-145 taurine**; *N*-[5-[(1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*S*)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl] pentanoyl]taurine.
- (17) **Tetranor-(+)-S-145 taurine**; *N*-[3-[(1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*S*)-3-phenylsulfonylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl] propionyl] taurine.

3. 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット（日本クレア）を2週間以上予備飼育し、9～10週齢（体重：280～300 g）で使用した。購入後のラットは水および固形飼料（CA-1, 日本クレア）を自由に摂取させ、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照明時間12時間の条件下で飼育した。血漿あるいは尿

中代謝物に関する投与では24時間絶食して、胆汁
中代謝物に関する投与では絶食せずに用いた。

4. 投与液の調製、投与方法および試料採取

血漿あるいは尿中代謝物検索のために ^{14}C -S-1452を5 mg/2ml/kg で、代謝物分離のために非標識S-1452を100mg/2ml/kg で、いずれも0.5%メチルセルロース懸濁液で経口投与した。血漿採取用ラットは投与後45分にエーテル麻酔し、腹部下行大動脈から採血して、遠心分離により血漿を得た。尿採取用ラットは投与後ボールマンケージ(KN-326型, 夏目製作所)に固定し、24時間まで尿を採取した。胆汁中代謝物検索のために ^{14}C -S-145を10mg/2ml/kg で、代謝物分離のために非標識S-145を100mg/2ml/kg で、いずれも0.5%メチルセルロース懸濁液で経口投与し、投与後8時間まで、酢酸緩衝液(pH 5)を加えた容器中に胆汁を採取した。このときのラットには、あらかじめエーテル麻酔下で胆管カニューレーションを施したのちボールマンケージに固定し、麻酔覚醒後2~3時間に投与した。

5. 代謝物の検索

1) 血漿中代謝物

¹⁴C-S-1452を投与後採取した血漿に0.1N塩酸

を添加して pH 3 に調整し、4 倍量の *n*-ブチルクロライドあるいは酢酸エチルで 4 回抽出した。これらの抽出溶媒を減圧留去し、それぞれの乾固物を少量のメタノールに溶解して TLC を行った。プレートはシリカゲル 60F₂₅₄ (No. 5715, Merck) を用い、*n*-ブチルクロライドで抽出した低極性代謝物は、*n*-ペンタン/クロロホルム/酢酸 (6:3:1, V/V/V) で、酢酸エチルで抽出した高極性代謝物はクロロホルム/メタノール/酢酸 (7:1:1, V/V/V) で展開した。展開後のプレートを X 線フィルム (医療用 RX, 富士写真フィルム) に暴露させてオートラジオグラム (TLC-ARG) を作成し、標品の *R_f* 値と比較することにより代謝物を検索した。

2) 尿中代謝物

¹⁴C-S-1452 を投与後の尿について、血漿の場合と同様の方法で酢酸エチル抽出を行い、TLC 分離および TLC-ARG により代謝物を検索した。

3) 胆汁中代謝物

¹⁴C-S-145 を投与後 8 時間までの胆汁について、次のように代謝物を分離した。胆汁 1.5 ml を 0.5 M 酢酸緩衝液で pH 5.0 に調整し、 β -glucuronidase 200 μ l を加えて 37°C で 18 時間インキュベートした。インキュベート終了後 1 N 塩酸で pH 3 に調整し、酢酸エチル 6 ml で 2 回抽出を行い、酢酸エチル可溶性代謝物を除去した。水相を酸性処理した SEP-PAK (C₁₈, Waters) に添加し、0.02 N 塩酸 10 ml で洗浄後、メタノール 5 ml で溶出し、溶出画分を乾固後 TLC を行った。プレートはシリカゲル 60F₂₅₄ を用い、クロロホルム/メタノール/水/酢酸 (13:10:3:1, V/V/V/V) で展開した。展開後のプレートを X 線フィルムに暴露させて TLC-ARG を作成した。TLC-ARG を指標にして代謝物の展開部分を 4 分画し、各分画をかきとり、メタノールで抽出後 HPLC で分離した。HPLC では、ポンプは Waters 6000A を、検出器は UVIDEC-100-II (220 nm, 日本分光) を使用した。カラムは Nucleosil 5C₁₈ 4.6 ϕ mm $\times$ 150 mm (ケムコ) を用い、アセトニトリル/メタノール/リン酸緩衝液 (50 mM, pH 3.0) (200:50:700, V/V/V) の移動相を 1.5 ml/min の流速で溶出した。

6. 代謝物の単離

1) 血漿および尿中代謝物

非標識 S-1452 を投与後の血漿について、上記と同様の方法で *n*-ブチルクロライドあるいは酢酸エチルで抽出後 TLC 分離を行った。展開後の代謝物部分のシリカゲルをかきとり、メタノールで抽出した。メタノール抽出液を濃縮し、HPLC により *n*-ブチルクロライド抽出物から M-1, M-2, M-3, M-4 を、酢酸エチル抽出物から M-5, M-6, M-7, M-8, M-9, M-10, M-11, M-12 を分取した。また、非標識 S-1452 投与後の尿について酢酸エチル抽出を行い、同様の方法により M-8 および M-12 を分取した。HPLC は 5.3) に記載した装置およびカラムで行った。ただし、移動相はアセトニトリル/メタノール/水/酢酸を用い、低極性代謝物の分離では (30:200:300:1, V/V/V/V) で、高極性代謝物の分離では (220:130:650:1, V/V/V/V) で使用した。流速はいずれも 1.5 ml/min とした。

2) 胆汁中代謝物

非標識 S-145 を投与後 8 時間までの胆汁について、上記と同様の方法で処理して水溶性代謝物を単離した。HPLC による精製は、セミ分取カラムによる粗分取と、分析カラムによる精製の 2 段階で行った。いずれの HPLC においても前記と同じ装置を用いたが、粗分取ではカラムは Nucleosil 10C₁₈ 7.5 ϕ mm $\times$ 300 mm (ケムコ) を用いて、アセトニトリル/メタノール/リン酸緩衝液 (50 mM, pH 3.0) (300:200:700, V/V/V) を流速 1.5 ml/min で溶出し、精製ではカラム Nucleosil 5C₁₈ 4.6 ϕ mm $\times$ 150 mm (ケムコ) を用いて、上記移動相を M-A の分離では (200:50:450, V/V/V) の組成で、M-B では (200:50:500, V/V/V) で、M-C では (200:50:600, V/V/V) で、M-D では (200:50:700, V/V/V) で、いずれも 1.5 ml/min で溶出した。

7. MS 分析

血漿より単離した低極性代謝物 M-1, M-2, M-3, M-4, およびその標品は TMSD によりメチルエステル誘導体とした。血漿と尿より分取した高極性代謝物 M-5, M-6, M-7, M-8, M-9,

M-10, M-11, M-12, およびその標品はTMSDでメチルエステル誘導化後さらに BSTFA でTMS 化を行った。これらの誘導化後の代謝物について、GC/MS(EI) 分析を行った。装置はGC 5890A (Hewlett Packard) を接続した Mass Selective Detector 5970 (Hewlett Packard) を使用した。カラムは Ultra-1 (12m × 0.2φ mm, i.d., Hewlett Packard) を用い、キャリアガス (He) 流量を1.5kg/cm²とし、イオン化電圧70eV で測定した。

胆汁中代謝物M-A, M-B, M-C, M-D, およびその標品については LSIMS 分析を行った。装置は日立M-8022型 SIMS イオン源を装備した日立M-68型質量分析計 (M-80型と同等品) を使用し、正イオン測定、負イオン測定ともに一次イオンに Xe⁺, 一次加速電圧9kV, 二次加速電圧3kV に設定した。測定はメタノールに溶解した約5μg 相当量の試料を LSIMS 用ターゲット板 (Ag) 上に塗布したマトリックス剤 (約2μl

のグリセロール) と混合し, 1μl の0.1N塩酸を添加して行った。

8. NMR 分析

¹H-NMR スペクトルは XL-400核磁気共鳴装置 (Varian) を用いて、水素核を400MHz で観測した。試料を CD₃OD に約0.1mg/0.5ml に溶解し、内部標準として TMS を添加して室温で測定した。

結 果

1. 血漿, 尿および胆汁中代謝物の HPLC-プロファイル

S-1452を経口投与後45分の血漿, および24時間の尿より抽出した代謝物についての HPLC プロファイルを Fig. 3 および Fig. 4 に, ラセミ体のS-145を経口投与後8時間の胆汁をβ-glucuronidase で処理後抽出した代謝物の HPLC プロファイルを Fig. 5 に示す。各クロマトグラム

Fig. 3 High performance liquid chromatograms of n-butylchloride and ethyl acetate extracts of rat plasma after oral administration of S-1452

Fig. 4 High performance liquid chromatogram of ethyl acetate extracts of rat urine after oral administration of S-1452

Fig. 5 High performance liquid chromatogram of bile extracts after oral administration of S-145 to rats

で黒色で表示したピークは、別途に ^{14}C -S-1452あるいは ^{14}C -S-145を投与した試料を HPLC 分取し、放射能を確認した代謝物である。

血漿では、*n*-ブチルクロライドにより4種の低極性代謝物M-1, M-2, M-3, M-4が抽出され、これらは HPLC で良好に分離された (Fig. 3 A)。酢酸エチルでは4種の低極性代謝物以外に8種の高極性代謝物が抽出され、それらは展開時間が近接した4組のペアーピークとして分離された (Fig. 3 B)。

尿中の代謝物は、 ^{14}C -S-1452投与試料を用いた検討によると、*n*-ブチルクロライドでは抽出されず、大部分が酢酸エチルで抽出され、その中の主な代謝物はM-8, M-12の2種類であった (Fig. 4)。

胆汁中には β -glucuronidase で加水分解されず、さらに酢酸エチルでも抽出されない代謝物としてM-A, M-B, M-CおよびM-Dの4種が検出され、これらは HPLC で良好に分離された (Fig. 5)。

2. 血漿中代謝物の構造

1) 低極性代謝物

血漿中より単離した低極性代謝物M-1, M-2, M-3およびM-4のメチルエステル誘導体の GC/MS スペクトルを Fig. 6に示す。

M-1のメチルエステル誘導体は m/z 391に $[\text{M}]^{+*}$ が認められ、開裂イオンとして $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (m/z 360), $[\text{M}-\text{SO}_2\text{Ph}]^+$ (m/z 250), $[\text{M}-(\text{SO}_2\text{Ph}+\text{OCH}_3+\text{H})]^+$ (m/z 218) および $[\text{SO}_2\text{Ph}]^+$ (m/z 141) がみられた。これらのスペクトルは、(+)-S-145標品のメチルエステル誘導体のスペクトルと一致し、両者は HPLC の保持時間も一致することより、M-1は未変化体の(+)-S-145であると決定された。

M-2, M-3, M-4のメチルエステル誘導体では、いずれも分子イオンピークはみられなかったが、 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$, $[\text{M}-\text{SO}_2\text{Ph}]^+$, $[\text{M}-(\text{SO}_2\text{Ph}+\text{OCH}_3+\text{H})]^+$ に相当するフラグメントイオンピークがM-2では m/z 332, 222, 190に、M-3では m/z 334, 224, 192に、M-4では m/z 306, 196, 164にそれぞれ認められた。さらに、 m/z 141はいずれの代謝物にもみられ、 SO_2Ph の存

Fig. 6 EI mass spectra of the methyl ester derivatives of non-polar metabolites (M-1~M-4) isolated from rat plasma after oral administration of S-1452

在が示された。これらのスペクトルより、M-2は (+)-S-145の α -側鎖が β -酸化を受けた bisnor-(+)-S-145, M-3は bisnor-(+)-S-145の α -側鎖が飽和した dihydrobisnor-(+)-S-145, M-4は (+)-S-145の α -側鎖が2回の β -酸化を受けた tetranor-(+)-S-145であることが予測された。これらはそれぞれの標品と GC/MS スペクトルおよび HPLC の保持時間が一致することよりその構造を決定した。

2) 高極性代謝物

血漿中より単離した高極性代謝物M-5, M-6, M-7, M-8, M-9, M-10, M-11およびM-12のメチルエステル-TMS誘導体の GC/MS スペクトルを Fig. 7 に示す。

8種類の高極性代謝物のうちM-5については分子イオンピーク (m/z 479) が認められたが、その他の代謝物では観察されなかった。M-6を除く7種代謝物とも TMS 基よりメチル基1個が脱離した $[M-CH_3]^+$ がそれぞれ m/z 465 (M-5), 438 (M-7), 410 (M-8), 464 (M-9), 436 (M-10), 438 (M-11), 410 (M-12) に観察された。そのほか8種の代謝物に共通して $[M-SO_2Ph]^+$

(順に m/z 338, 310, 312, 284, 338, 310, 312, 284) と, $[SO_2Ph]^+$ (m/z 141) がみられた。M-5, M-7, M-8では, $[M-TMSOH]^{+*}$ (順に m/z 389, 363, 335) と $[M-(SO_2Ph+TMSOH)]^+$ (順に m/z 248, 222, 194) がみられた。一方, M-9, M-10, M-11, M-12では, m/z 155がいずれも基準ピークとして認められたが, $[M-(SO_2Ph+TMSOH)]^+$ はみられなかった。これら代謝物は (+)-S-145, bisnor-(+)-S-145, dihydrobisnor-(+)-S-145および tetranor-(+)-S-145の, それぞれビシクロ環5位 (M-9~M-12) あるいは6位 (M-5~M-8) 水酸化体標品と GC/MS スペクトル, および HPLC 保持時間が一致することよりその構造を決定した。ただし, M-6は夾雑ピークが多く鮮明なマススペクトルを得ることができなかったが, 予想標品のスペクトルと $[SO_2Ph]^+$ (m/z 141), $[M-(SO_2Ph+TMSOH)]^+$ (m/z 220), $[M-SO_2Ph]^+$ (m/z 310)などが一致すること, および HPLC の保持時間が一致することから, 6-OH-bisnor-(+)-S-145であると決定した。

3) 高極性代謝物の水酸基の配位

Fig. 7 EI mass spectra of the methyl ester and trimethylsilyl ether derivatives of polar metabolites (M-5~M-12) isolated from rat plasma after oral administration of S-1452

血漿中より単離した高極性代謝物M-5~M-12の水酸基には *exo* と *endo* の2種の配位が考えられる。そこで、6-OH-(+)-S-145 (*exo*) と異性体の6-OH-(+)-S-145 (*endo*) の2種類の合成標品の GC/MS のスペクトルおよび HPLC 保持時間を比較した。GC/MS スペクトルを Fig. 8 に、HPLC クロマトグラムを Fig. 9 に示す。

GC/MS のフラグメンテーションパターンは、*exo* 体と *endo* 体ではほぼ一致するものの、フラグメントイオンのピーク強度、とくに m/z 206, 232, 248の強度に大きな違いが認められた。HPLC では、保持時間が *exo* 体の10.55分に対して *endo* 体は17.31分と著しい違いがみられた。代謝物M-5の GC/MS によるフラグメンテー

Fig. 8 EI mass spectra of the methyl ester and trimethylsilyl ether derivatives of authentic 6-OH-(+)-S-145 (*exo*) and 6-OH-(+)-S-145 (*endo*)

ジョンパターンは6-OH-(+)-S-145 (*exo*) のパターンと等しく、HPLC 保持時間もこの条件下では10.61分であることから、M-5の水酸基の配位は *exo* 位であることが確認された。他の高極性代謝物の水酸基の配位も、同定に用いた標品はすべて *exo* 体であり、代謝物と標品のマススペクトルおよび HPLC 保持時間がいずれの場合も一致することから、すべて *exo* 位であることが推定された。

3. 尿中代謝物の構造

尿中より単離したM-8, M-12の GC/MS スペクトルは、それぞれ6-OH-tetranor-(+)-S-145および5-OH-tetranor-(+)-S-145標品の GC/MS スペクトルと完全に一致することから、

血漿中より単離したM-8, M-12と同一代謝物であることが確認された。尿中代謝物M-8, M-12については、水酸基の配位を調べる目的で、さらに¹H-NMR 分析を行った。スペクトルデータを Table I に示す。

M-8ではビシクロ環6位 *endo* 配位のプロトンシグナルが3.64ppm に、5位の *exo* および *endo* 配位のシグナルが1.03および2.00にみられたが、1.3ppm 近傍の6位 *exo* 配位のプロトンシグナルはみられなかった。また、M-12では、5位 *endo* 配位と6位の *exo* および *endo* 配位のシグナルが4.18, 1.35および1.73ppm にみられたが、1.0ppm 近傍の5位 *exo* 配位のプロトンシグナルはみられなかった。この結果、M-8 およびM-12とも水酸基の配位は *exo* 位である

Fig.9 High performance liquid chromatograms of authentic 6-OH-(+)-S-145 (*exo*) and 6-OH-(+)-S-145 (*endo*) and metabolite (M-5) isolated from rat plasma

ことが確認され、それらの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、それぞれ6-OH-tetranor-(+)-S-145および5-OH-tetranor-(+)-S-145の *exo* 体標品の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルと一致した。

4. 胆汁中代謝物の構造

S-145を経口投与後8時間の胆汁より単離した代謝物M-Dの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、3.56 ppm(=NCH₂-) および2.95ppm(-CH₂-SO₃-) にタウリン抱合体の特徴的なシグナルが観察され、さらに、プロトン数および DQCOSY 測定よりカップリング相関を確認した結果、M-Dは tetranor-(+)-S-145のタウリン抱合体と推定され、標品のスペクトルとも一致した。次にM-A, M-B, M-CおよびM-Dのマススペクトルを測定した。M-D, M-Cについては通常の LSIMS 測定を行ったが、M-AおよびM-Bには夾雑物の混入がみられたため、scanning TLC-LSIMS を行った。それらの特徴的なフラグメントイオンの帰属を Table II に示す。

Table II に示す分子量領域の各イオンの帰属結果より、M-A, M-B, M-CおよびM-Dの分

子量は、それぞれ484, 458, 456および430と決定された。さらに、開裂イオンである $[\text{M-SO}_2\text{Ph} + 2\text{H}]^+$ や $[\text{M-SO}_2\text{Ph}]^+$ あるいは $[\text{M-SO}_2\text{Ph}]^-$ に帰属されるイオンが各代謝物で観察され、タウリンの存在を示す $[\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}]^-$, $[\text{SO}_3]^-$, および $[\text{CH}_2\text{CONHCH}_3]^-$ が共通してみられた。さらに、これらのスペクトルや HPLC の保持時間がそれぞれの予想標品と一致することから、各代謝物は (+)-S-145 taurine (M-A), bisnor-(+)-S-145 taurine (M-B), dihydrobisnor-(+)-S-145 taurine (M-C) および tetranor-(+)-S-145 taurine (M-D) であることが決定された。

考 察

ラットの血漿中より未変化体を含めて12種類、尿中より2種類の第1相代謝物(非抱合型)を、また、胆汁中より4種類のタウリン抱合型代謝物を単離同定した。尿中より単離した代謝物は、血漿中代謝物の2種と一致したが、これら非抱合型代謝物12種のうち4種は、未変化体とその α -鎖の短縮型であり、他の8種はビシクロ環の5位あ

Table I ^1H -NMR spectral data of metabolites (M-8, M-12) isolated from rat urine and its authentic compounds

Proton	δ , ppm (CD ₃ OD)			
	Metabolite M-8	Authentic (+)-6-OH-tetranor (<i>exo</i>)	Metabolite M-12	Authentic (+)-5-OH-tetranor (<i>exo</i>)
H-1	1.80 (s)	1.80 (s)	1.92 (d, 4.0)	1.92 (m)
H-2	0.86 (m)	0.86 (m)	0.96 (m)	0.96 (m)
H-3	2.88 (m)	2.88 (m)	2.85 (t, 4.5)	2.86 (t, 4.5)
H-4	2.04 (m)	2.04 (m)	2.20 (d, 3.8)	2.19 (d, 4.0)
H-5 <i>exo</i>	1.03 (m)	1.03 (m)	—	—
H-5 <i>endo</i>	2.00 (m, 2.0, 7.0, 14.0)	2.00 (m, 2.0, 7.0, 14.0)	4.18 (dd, 7.0, 2.0)	4.17 (dd, 7.0, 2.0)
H-6 <i>exo</i>	—	—	1.35 (m)	1.35 (m)
H-6 <i>endo</i>	3.64 (d, 7.0)	3.64 (d, 7.0)	1.73 (m, 2.0, 7.0, 13.0)	1.73 (m, 2.0, 7.0, 13.0)
H-7	1.52 (m), 1.27 (d)	1.52 (m), 1.27 (m)	1.52 (m), 1.29 (d)	1.52 (m), 1.29 (m)
H-1'	1.37-1.46 (m, overlapped)	1.37-1.46 (m, overlapped)	1.22-1.38 (m, overlapped)	1.21-1.38 (m, overlapped)
H-2'	2.07-2.14 (m, overlapped)	2.07-2.14 (m, overlapped)	1.94-2.04 (m, overlapped)	1.93-2.04 (m, overlapped)
Aromatic-H	7.55 (m), 7.61 (m), 7.87 (m)	7.56 (m), 7.60 (m), 7.87 (m)	7.57 (m), 7.61 (m), 7.88 (m)	7.57 (m), 7.61 (m), 7.88 (m)

Coupling pattern and constant (J , Hz) are shown in parentheses ; s, singlet ; d, doublet ; dd, double doublets ; t, triplet ; m, multiplet.

(+) -5-OH-tetranor (*exo*) (+) -6-OH-tetranor (*exo*)

Table II LSI mass spectral data of conjugated metabolites (M-A~M-D) isolated from rat bile after oral administration of S-145

Fragment ion	(m/z)			
	M-A	M-B	M-C	M-D
(Positive ion)				
$[M + 2Na - H]^+$	529	501	503	475
$[M + Na]^+$	507	479	481	453
$[M + H]^+$	485	457	459	431
$[M - NHCH_2CH_2SO_3H]^+$	n.o.	n.o.	334	306
$[M - SO_2Ph + 2H]^+$	345	317	319	291
$[M - SO_2Ph]^+$	343	315	317	289
(Negative ion)				
$[M + 2Na - 3H]^-$	n.o.	499	n.o.	n.o.
$[M + Na - 2H]^-$	n.o.	477	479	451
$[M - H]^-$	483	455	457	429
$[M - SO_2Ph]^-$	343	315	317	289
$[SO_2Ph]^-$	141	141	141	141
$[NHCH_2CH_2SO_3H]^-$	124	124	124	124
$[SO_3]^{2-}$	80	80	80	80

n.o. : Not observed.

Fig. 10 Postulated metabolic pathways of (+)-S-145 in rats

るいは6位の水酸化体であった。非抱合型代謝物の推定代謝経路を Fig. 10に示す。

プロスタノイド類の α -鎖末端が β -酸化をうけて propionic acid 型の tetranor 体にまで短

縮化される代謝経路は、ラット¹⁰⁾、ヒト^{11~13)}における PGE₂類などの代謝、また、医薬品では trimoprostil¹⁴⁾、sulprostone¹⁵⁾などの代謝で見られている。S-145では heptenoic acid 基の Δ^3

二重結合が飽和された dihydrobisnor-(+)-S-145が単離同定された。この種の飽和型 bisnor 体の生成は、*in vitro* においては PGE 類をモルモット¹⁶⁾ の肝ミトコンドリアとインキュベートした際に認められている。一方、*in vivo* においては、PGF 類をラット¹⁷⁾、サルおよびヒトに¹⁸⁾、あるいは TXB₂をウサギ¹⁹⁾ に投与した際に検出されているが、比較的報告例は少ない。また、pentenoic acid 基を持つ他の医薬品でも、trimoprostil¹⁴⁾ をラットに投与した際に、タウリン抱合体として単離されている例がみられる程度である。S-1452の開発前駆体であるS-145 (ラセミ体) のラット遊離肝細胞による *in vitro* 代謝でも dihydrobisnor 体の生成が認められており、この代謝物はS-145の dihydro 体を経由して生成されると報告されている²⁰⁾。しかし、本研究ではラットにS-1452経口投与後の血漿あるいは尿、胆汁中に (+)-S-145の α -鎖飽和型代謝物が検出されなかったことから、*in vivo* における dihydrobisnor 体の生成は、Fig. 10に示すように bisnor-(+)-S-145を経由したものと考えられる。

(+)-S-145と α -鎖短縮型の代謝物すべてについて、ビシクロ環の5位あるいは6位が水酸化を受けた代謝物が検出された。これら高極性代謝物の水酸基の配位には *endo*, *exo* 位の2種が考えられるため、それらの1種であるM-5について両配位の標品を合成し、GC/MS および HPLC の比較によりその配位が *exo* 位であることを決定した。また、他の高極性代謝物の水酸基の配位もすべて *exo* 位であることが推定された。今回、ラットより単離同定した高極性代謝物のうちのいくつかは、サルあるいはイヌの血漿中にも検出さ

れ、さらにラットおよびサル、イヌの胆汁中には比較的多量の高極性代謝物が排泄されることから^{21, 22)}、このような水酸化代謝は、いずれの動物においても進行しており、ヒトでも生成されることが推測された。脂肪環の水酸化代謝で立体選択性の高い例としては、nufenoxole の isoquinuclidine 環5位水酸化²³⁾、sparteine の4位水酸化²⁴⁾ の例がみられるが、S-1452の水酸化代謝においても、いずれの動物でも *exo* 体のみが生成されることから、きわめて立体選択性の高い代謝反応と考えられる。

S-145の α -鎖短縮型代謝物のタウリン抱合体を単離した。PGE₂類薬の trimoprostil¹⁴⁾ では、3種の α -鎖変化体とそれぞれのタウリン抱合体が単離同定されているが、これまで、タウリン抱合体のラットでの生成例は、2-naphthyl acetic acid²⁵⁾, *all-trans* retinoic acid²⁶⁾, pirofen²⁷⁾, 3,4-dichlorobenzoyloxyacetic acid²⁸⁾, lovastatin²⁹⁾ などで見られているが多くはない。今回同定したタウリン抱合体はラットの胆汁から単離したものであるが、これらの抱合体は、イヌ血漿中およびイヌ、サルの尿、胆汁中でも検出されている²²⁾。さらに、S-1452およびその代謝物のタウリン以外の抱合体としてグルクロナイドの生成もラット、イヌおよびサルにおいて認められている^{21, 22)}。

謝 辞

標識化合物を合成していただきました当研究所の牧角徳夫博士、濱田芳徳博士、長崎 亨、勝山 禎彦両氏ならびに代謝物標品を合成していただきました成定昌幸博士、大谷光昭博士、渡辺文彦氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Hanasaki, K. and Arita, H. : Characterization of a new compound, S-145, as a specific TXA₂ receptor antagonist in platelets. *Thromb. Res.*, **50** : 365-376 (1988).
- 2) Narisada, M., Ohtani, M., Watanabe, F., Uchida, K., Arita, H. and Do-teuchi, M. : Synthesis and *in vitro* activity of various derivatives of a novel thromboxane receptor antagonist, ($\pm$)-(5*Z*)-7-[3-*endo*[(phenylsulfonyl) amino]bicyclo[2.2.1]hept-2-*exo*-yl]heptenoic acid. *J. Med. Chem.*, **31** : 1847-1854 (1988).
- 3) Kishino, J., Hanasaki, K., Nagasaki, T. and Arita, H. : Kinetic studies on stereospecific recognition by the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor of the antagonist, S-145. *Br. J. Pharmacol.*, **103** : 1883-1888 (1991).

- 4) Ohtani, M., Matsuura, T., Watanabe, F. and Narisada, M. : Enantioselective synthesis of S-1452, an orally active potent thromboxane A₂ receptor antagonist. *J. Org. Chem.*, **56** : 2122-2127 (1991).
- 5) Hanasaki, K., Nagasaki, T. and Arita, H. : Characterization of platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor by a novel thromboxane receptor antagonist, [³H]S-145. *Biochem. Pharmacol.*, **38** : 2007-2017 (1989).
- 6) Arimura, A., Asanuma, F., Kurosawa, A., Harada, M., Nagai, H. and Koda, A. : Pharmacologic profiles of S-1452, a novel thromboxane A₂ antagonist, as an anti-asthmatic drug. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **87** : 254 (1991).
- 7) 嘉久志寿人, 四家 勉, 早崎洋子, 有田 斉, 内田清久 : 経口トロロボキサナA₂/プロスタグランジンエンドペルオキシンドレセプター拮抗薬, (+)-S-145カルシウム塩二水和物の血小板凝集に対する作用. *日薬理誌*, **98** : 113-120 (1991).
- 8) Nagasaki, T., Watanabe, F., Katsuyama, Y., Hamada, M., Ohtani, M. and Narisada, M. : Synthesis of [¹⁴C]- and [³H]-labelled (+)-[1R-[1 α , 2 α (Z), 3 β , 4 α]]-7-[3-[(phenylsulfonyl) amino] bicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid, ((+)-S-145) and its calcium salt (S-1452). *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **31** : 23-38 (1992).
- 9) Watanabe, F., Matsuura, T., Shirahase, K. and Ohtani, M. : Synthesis of metabolites of S-1452, an orally active thromboxane A₂ receptor antagonist. *Chem. Pharm. Bull.*, **39** : 2842-2848 (1991).
- 10) Gren, K. : Metabolism of prostaglandin E₂ in the rat. *Biochemistry*, **10** : 1072-1086 (1971).
- 11) Hamberg, M. and Samuelsson, B. : On the metabolism of prostaglandins E₁ and E₂ in Man. *J. Biol. Chem.*, **246** : 6713-6721 (1971).
- 12) Steffenrud, S. : Metabolism of 16,16-dimethyl-prostarlandin E₂ in the human female. *Biochem. Med.*, **24** : 274-292 (1980).
- 13) Steffenrud, S. : Metabolism of 9-deoxo-16,16-dimethyl-9-methylene prostaglandin E₂ in humans. *Drug Metab. Dispos.*, **11** : 255-265 (1983).
- 14) Kolis, S.J., Postma, E.J., Williams, T.H. and Sasso, G.J. : Identification of trimoprostil metabolites excreted in rat bile formed by oxidation and taurine conjugation. *Drug Metab. Dispos.*, **14** : 465-470 (1986).
- 15) Kuhn, W., Hoyer, G.A., Backhus, S. and Jakobs, U. : Identification of the major metabolites of the prostaglandin E₂-analogue sulprostone in human plasma, and isolation from urine (*in vivo*) and liver perfusate (*in vitro*) of female guinea-pigs. *Drug Metab. Dispos.*, **19** : 920-925 (1991).
- 16) Steffenrud, S. : Metabolism of prostaglandin E analogs in the guinea pig liver mitochondrial fraction. *Biochem. Med.*, **32** : 161-180 (1984).
- 17) Gren, K. : The metabolism of prostaglandin F_{2 α} in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **231** : 419-444 (1971).
- 18) Hansson, G. : Metabolism of two PGF_{2 α} analogues in primates : 15(S)-15-methyl- Δ^4 -*cis*-PGF_{2 α} and 16,16-dimethyl- Δ^4 -*cis*-PGF_{2 α} . *Prostaglandins*, **18** : 745-771 (1979).
- 19) Westlund, P., Kumlin, M., Nordenstrom, A. and Granstrom, E. : Circulating and urinary thromboxane B₂ metabolites in the rabbit. *Prostaglandins*, **31** : 413-443 (1986).
- 20) Higaki, J., Tonda, K., Takahashi, S. and Hirata, M. : Metabolism of a thromboxane A₂ antagonist in isolated rat hepatocytes. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18** : 1057-1062 (1989).
- 21) 乗鞍 良, 吉森丈夫, 村上 剛, 中西真智子, 溝尻顕爾 : 新規トロロボキサナA₂受容体拮抗薬 (S-1452) の体内動態 (第1報) ラットにおける¹⁴C-S-1452単回投与後の吸収, 分布, 代謝および排泄. *薬物動態*, **8** : 83-96 (1993).
- 22) 乗鞍 良, 吉森丈夫, 村上 剛, 中西真智子, 溝尻顕爾 : 新規トロロボキサナA₂受容体拮抗薬 (S-1452) の体内動態 (第4報) イヌおよびサルにおける¹⁴C-S-1452投与後の吸収, 分布, 代謝および排泄. *薬物動態*, **8** : 113-125 (1993).
- 23) Cook, C.S., Campion, J.G., Hribar, J.D. and Karim, A. : Metabolism and pharmacokinetics of nufenoxole in animals and humans : an example of

- stereospecific hydroxylation of an isoquinuclidine ring. *Xenobiotica*, **20** : 1065-1080 (1990).
- 24) Ebner, T., Eichelbaum, M., Fischer, P. and Meese, C.O. : Über die stereospezifische Hydroxylierung von (+)-Sparteïn (Pachycarpin) bei der Ratte. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **322** : 399-403 (1989).
- 25) Emudianughe, T.S., Caldwell, J. and Smith, R.L. : Amino acid conjugation responses to 2-naphthylacetic acid in rodents. *Biochem. Soc. Trans.*, **7** : 522-524 (1979).
- 26) Skare, K.L., Schnoes, H.K. and DeLuca, H.F. : Biliary metabolites of *all-trans* retinoic acid in the rat : isolation and identification of a novel polar metabolites. *Biochemistry*, **21** : 3308-3317 (1982).
- 27) Egger, H., Bartlett, F., Yuan, H.P. and Karliner, J. : Metabolism of pirofen in man, monkey, rat and mouse. *Drug Metab. Dispos.*, **10** : 529-536 (1982).
- 28) Peffer, R.C., Abraham, D.J., Zemaitis, M.A., Wong, L.K. and Alvin, J. D. : 3,4-Dichlorobenzyloxyacetic acid is extensively metabolized to a taurine conjugate in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **10** : 305-311 (1987).
- 29) Vyas, K.P., Kari, P.H., Pitzenberger, S.M., Halpin, R.A., Ramjit, H. G., Arison, B., Murphy, J.S., Hoffman, W.F., Schwartz, M.S., Ulm, E. H. and Duggan, D.E. : Biotransformation of lovastatin 1. Structure elucidation of *in vitro* and *in vivo* metabolites in the rat and mouse. *Drug Metab. Dispos.*, **18** : 203-211 (1990).