¹⁴C 標識 Oxolinic acid の生体内運命に関する研究 (第2報)^{1,2)}

各種動物における ¹⁴C-Oxolinic acid の全身オートラジオグラフィ的分布

大塚峯三, 内藤一秋, 佐藤善重
田辺製薬株式会社 薬物代謝研究所
埼玉県戸田市川岸 2-2-50
1975年12月9日 受理

新合成抗菌剤 ¹⁴C-oxolinic acid のマウス, ラット, ウズラおよびウナギにおける生体内分布とその推移を全身オートラジオグラフィによって検討した。

マウスに ¹⁴C-oxolinic acid を 20mg/kg の割合で経口投与したとき, 消化管からかなり良く吸収され, ほとんど全身に移行した。投与後30~60分において, 最も高い放射能濃度を示したのは, 肝臓, 腎臓, 心筋, 骨および褐色脂肪であり, 一方中程度の濃度は血液, 骨格筋, 副腎および脳下垂体に見られ, 中枢神経系および睪丸は最も低い濃度を示した。投与後60分における胎児内各組織中濃度は母体の胎盤の濃度とほぼ同程度であり, 時間の経過とともに減少した。胎児内組織のうち, 骨に高い放射能が認められた。また, 投与48時間後には, マウス体内の放射能はほとんど完全に消失した。

ラットにおける分布様式もまたマウスのそれに類似した。しかし, 褐色脂肪への取り込みは, マウスのそれに比しかなり少なかった。ウズラでは, その分布はマウスおよびラットのそれに類似した。本化合物はまたウズラのメラニン含有組織である眼, 皮膚, 毛包に取り込まれた, しかし成熟卵胞への取り込みはきわめて少なかった。ウナギでは吸収, 排泄の緩慢であることを示す ARGМが見られた。

Oxolinic acid は^{3),4)}, *in vivo* でグラム陰性菌に対し nalidixic acid よりも抗菌性が強く, グラム陽性菌の一部に対しても有効な^{5),6)} 合成抗菌剤である。また, 感染動物における治療効果^{7),8)} も認められており動物薬として開発中である。前報¹⁾では, ¹⁴C-oxolinic acid のラット, マウスにおける吸収, 分布, 排泄ならびに各種動物の血漿タンパク質との親和性などについて検討したが, 本報では oxolinic acid が動物用の抗菌剤として使用されることから, ウズラ, ウナギなどを含めた動物における ¹⁴C-oxolinic acid の分布とその推移について, オートラジオグラフィ的に検討し, 二, 三の知見が得られたので報告する。なお, 本化合物の代謝については別報²⁾で報告する。

1. 実験材料および方法

1.1 標識化合物

Oxolinic acid (OA と略す) の化学構造は Chart 1 に示す。その化学名は 5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid である。標識化合物として, *N*-エチル基の1位の炭素を ¹⁴Cで標識したもの^{1),2)}を用いた。その比放射能は5.68 μ Ci/mg であり, ペーパークロマトグラフィおよび薄層

Chart 1 Chemical structure and labeled position of ¹⁴C-oxolinic acid.

クロマトグラフィによる放射化学純度は98%以上であった。

1.2 実験動物

実験動物として, 体重20g (約5週令) のddY系雄マウス, 体重約45g (妊娠17~19日目) の同系妊娠マウス, 体重約200g の Wistar 系雄ラット, 同妊娠ラット (妊娠末期), 体重約130g の雌ウズラおよび体重約140g のウナギを使用した。なお, 投与前にマウスおよびラットはそれぞれ16, 20hr 絶食し水は自由に与えた。ウナギは投与後水温20°Cの流水中で飼育し, 飼育期間中は餌を与えなかった。

1.3 投与量および投与方法

^{14}C -OA は 0.5% CMC 水溶液に懸濁してマウスには 20mg/kg, ラット, ウズラ, ウナギには 10mg/kg, 妊娠ラットには 100mg/kg の割合で経口投与した。

1・4 全身オートラジオグラフィ (全身 ARG)⁹⁾

^{14}C -OA を投与した動物は各所定時間に、エーテル麻酔(ウナギはウレタン麻酔*) したのち、ドライアイス-アセトン中で凍結殺処分した。ついで -20°C のクリオスタット内で、ユングあるいはライツ1300型ミクロトームを用いて厚さ 40μ の全身薄切切片を作製した。切片はクリオスタット内で凍結乾燥後、工業用 X 線フィルム (サクラ, N タイプ) と一定期間密着露出した。ついで現像, 定着を行なって全身オートラジオグラム (ARGM) を得た。

2. 実験結果

2・1 マウスにおける ^{14}C -OA の分布

Fig. 1 に, ^{14}C -OA を経口投与したマウスの全身 ARGM を示した。経口投与した ^{14}C -OA は中枢神経系を含めたほとんどすべての組織に移行し, かつこれらの組織の放射能濃度のピークは投与後 30 分～1 時間に見られた。各組織の放射能は, その後時間の経過にともなって次第に減少し, 投与後 24 時間においては, 消化管内容, 胆のう内容などを除いてほとんど消失するという推移を示した。

一方, 各組織における分布の詳細を述べると, つぎのとおりであった。

中枢神経系および眼: 脳および脊髄は他の臓器組織と比較して放射能濃度は低かったが, 投与初期 (10～30 分) には, 大脳, 小脳, 嗅球および脊髄に放射能の移行が見られた (Fig. 1, 2A)。脳内では小脳が大脳に比し若干高い濃度を示したが, 各部位での濃淡は顕著でなく均一性を示した。投与後 4 時間では, それらの部位から放射能はほとんど消失した。また眼のブドウ膜および水晶体周辺にも放射能の取り込みが見られたが, 24 時間後には消失した。

呼吸器および消化器系: 投与 30 分には, 肺臓は肝臓, 腎臓について放射能濃度が高く, ほぼ血中濃度と同程度であった。肝臓は投与後 10 分からすでに臓器中最も高く, 投与後 30 分～2 時間がピークで, その後徐々に減衰した。胆のう内容にも強い放射能が全期間を通じて観察された。唾液腺および脾臓は軽度の放射能濃度を示した。胃内には投与後 6 時間まで, また腸管内には 24 時間後まで顕著な放射能が認められたが, 48 時間

* 10% ウレタン水溶液に浸漬

後には若干の放射能が検出されたにすぎなかった。

脈管系: 心臓血より観察される血中濃度は, 投与後 10 分ではまだ低かったが, 30 分後になるとかなり高くなり肝臓, 腎臓につぐものであった。心筋における放射能濃度はピーク時点では血中濃度に匹敵あるいはそれ以上であった。脾臓への取り込みはそれほど顕著ではなく, 骨格筋と比べほぼ同程度であった。

骨, 骨格筋および皮膚: 骨にはかなり高い放射能の取り込みが見られ, 投与後 4 時間では肝臓より高い放射能濃度を示し, 24 時間後でも若干放射能が見られた。また骨髄にも中程度の移行があり, 24 時間では非常にわずかに認められる程度であった。骨格筋は中程度であり, 投与後 24 時間ではほとんど消失した。皮膚では投与初期に毛根部に高い放射能が認められ, その後次第に減少したが, 観察期間を通して終始骨格筋を上回る放射能濃度を示した。

内分泌系: 脳下垂体, 松果体は投与後早期から非常に高い放射能濃度を示した (Fig. 2 A)。この高い放射能は 2 時間後まで持続したのち, 次第に減少した。副腎にも放射能の移行がみられ, 皮質ではとくに顕著であった。

卵巣, 胎盤および胎児: 胎児では, 脳を含めて全身に放射能が分布し, なかでも骨に高い濃度がみられた。しかし, 胎児内に移行した放射能は 24 時間後にはほとんど消失した。母体の卵巣, 胎盤における放射能濃度は, 血中濃度以上にはならなかった (Fig. 3)。

2・2 ラットにおける ^{14}C -OA の分布

2・2・1 雄ラットを用いた場合

ラットに ^{14}C -OA を経口投与して得られた ARGM は, マウスにおける所見とほぼ同様であり, 分布様式に本質的な差異は認められなかった。しかし, マウスに比し全身の放射能濃度のピークは 2～3 時間と若干遅く, また, 相対的に濃淡の少ない分布像であった。Fig. 4 にピーク時点の ARGM を示した。

ラット各組織における分布の特徴の内, マウスのそれと若干異なるところを挙げると, 褐色脂肪, 脳下垂体および骨はマウスの場合に比し, 相対的に低い放射能濃度を示し, とくに褐色脂肪においてはその濃度は骨格筋より低かった。また, マウスにおいては小脳が大脳に比し若干高い放射能濃度を示したが, ラットではその差がほとんどみられず, ほぼ同程度であった (Fig. 2 B)。

2・2・2 妊娠ラットを用いた場合

^{14}C -OA を経口投与した場合, 放射能は胎盤を通過

Fig. 1 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in male mice at various times after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (20 mg/kg) A, 10 min; B, 30 min; C, 2 hr; D, 4 hr; E, 24 hr.

して胎児に移行した。胎児内の分布は母体同様ほぼ全身的であった。なかでも骨組織、眼のブドウ膜などの放射能濃度は母体の骨格筋のそれより若干高かった。胎児の脳にも移行が見られ、その割合は母体のそれに比し同程度かやや高めであった。

胎盤の放射能濃度は、終始母体の血液のそれとほぼ同程度であったが、胎児の臓器組織よりは骨を除いて高かった。卵巣にも黒化が見られたが部位による黒化度の差異は認められなかった。また、乳腺では卵巣より若干低い放射能が観察された。Fig. 5に投与後2時間の時点のARGMを示した。

2.3 ウズラにおける ^{14}C -OA の分布

産卵中のウズラに ^{14}C -OA を経口投与し、得られた全身ARGMをFig. 6に示した。

全身的な放射能のピークは投与後約1時間に存在し、マウスやラットと同様、全身に取り込まれた。投

Fig. 2 Magnified whole body autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the brain of mouse and rat. A, 30 min after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (20 mg/kg) to a mouse. B, 3 hr after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (10 mg/kg) to a rat.

与後6時間では放射能濃度がやや減少したが、そのパターンはあまり変わらず、また24時間では肝臓および骨髄に軽度の放射能濃度が認められただけで、全身的にはほとんど消失し、消化管内腔や総排泄腔にまだ放射能が観察されるという推移を示した。

一方、臓器別では肝臓、腎臓が最も高く、血液、肺臓、心筋、脾臓、骨格筋、輸卵管および骨髄は中程度であった。中枢神経系にはそれらについで放射能の移行が見られた。また、脳下垂体、眼のブドウ膜および毛包にも比較的高い放射能が見られた。なお、卵胞膜には軽度の放射能濃度が観察されたが、成熟卵胞にはきわめて少量の放射能が移行したに過ぎなかった (Fig. 6 B)。

2.4 ウナギにおける ^{14}C -OA の分布

投与後3時間においては、肝臓、腎臓および骨格筋に軽度の放射能が認められるにすぎないが、投与後6時間では全身的に中程度の放射能の移行が見られた。また、全身的な放射能濃度のピークは、投与後24~48時間であった。

Fig. 3 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in pregnant mice at 30 min (A) and 24 hr (B) after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (20 mg/kg).

マウス、ラット、ウズラに比し、ウナギでは体内からの放射能の消失は緩慢であり、投与後 120 時間でも非常に軽度であるが、放射能濃度が認められた。なお、経時的な ARGM を Fig. 7 に示した。

また、臓器別に見た放射能分布の特徴はつぎの通りであった。

中枢神経系および眼：脳および脊髄には中程度の放射能の移行が見られたが、投与後 120 時間たつとほとんど消失した。眼の色素顆粒層にはウズラなどと同様比較的高い放射能の移行が観察された。

鰓および消化器系：鰓は血中濃度とほぼ同程度の放射能濃度を保持しながら、経時的に減衰していった。

Fig. 4 Autoradiogram showing the distribution of radioactivity in male rat at 3 hr after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (10 mg/kg).

肝臓はマウスなどと同様観察期間中最も高い濃度を有する臓器であり、投与後 120 時間の時点でもかすかに認められた。胆のう内容の放射能濃度は、投与後 3 時間ではわずかであったが、24 時間後にはかなり高かった。

脈管系：血中濃度は肝臓、腎臓について高く、比較的長時間その濃度を維持した。心筋および脾臓も高く血液とほぼ同様の放射能濃度を示した。

骨、骨格筋および皮膚：骨格筋の放射能濃度が最も高い時点では、血中濃度とほぼ同程度であったが、投与後 120 時間の時点ではほとんど黒化度は認められなかった。マウスおよびウズラで骨組織にかなり高い放射能濃度が見られたが、ウナギではそれほど顕著ではなく、椎骨におけるそれは非常に低かった。皮膚のうちメラニンを含む色素顆粒に富む背側は高い放射能濃度を示し、眼の色素層とともに全身中最も高かった (Fig. 7 C)。

3. 考 察

マウスに経口投与した場合、投与後 30 分～1 時間にかけて各臓器・組織中の放射能濃度はピークに達し、かつそれらの濃度は高かった。この所見は、本薬物が比較的速やかに吸収され、かつ組織移行の良いことを示すものである。Ringel ら⁹⁾ はマウスに 20, 40 および 80 mg/kg の割合で OA を経口投与したときの血中濃度を微生物学的定量法によって検討し、いずれの投与量でもそのピークは投与後約 30 分に有在したと報告しているが、これはわれわれの全身 ARGM の所見とほぼ一致するものである。一方、ウズラやラットの場合、全身の放射能濃度のピークは若干遅れ、前者では投与後約 1 時間、後者では 2～3 時間であり、ウナギの場合、さらに遅く投与後 24～48 時間に見られた。このようなピーク時点の差は、消化管からの吸収速度の差、血漿タンパクとの結合ならびに薬物代謝酵素活性の相違などがかなり影響するものと考えられる。

Fig. 5 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in pregnant rat at 2 hr (A and B) after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (100 mg/kg).

マウス, ラットおよびウズラにおいて, ほとんどすべての臓器組織に移行した放射能は, 投与後2時間以降6時間位まで緩徐な減少を示し, 24および48時間では排泄系の一部にしか存在しなかった。したがって, ^{14}C -OA およびその放射性代謝物の体内からの消失は比較的速やかであり, 貯留性はさきわめて少ないものと判断される。しかしながら, 骨のみは他の組織臓器に比較し排泄が若干緩慢であった。この骨との親和性は, OA の carboxyl 基あるいはそのカテコール性代謝物²⁾の hydroxy 基と骨の Ca との相互作用によるも

Fig. 6 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in the whole body (A) of a hen quail and around its ovary (B) at 1 hr after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (10mg/kg).

のと推察されるが, 類似構造を有しかつカテコール性代謝物を生じない Piromidic acid¹⁰⁾においても骨との親和性がみられることから, Carboxyl 基と Ca との相互作用のほうが大きいと思われる。一方, 経時的な分

Fig. 7 Autoradiograms showing the distribution of radioactivity in eels at various times after oral administration of ^{14}C -oxolinic acid (10 mg/kg). A, 6 hr; B, 24 hr; C, 96 hr.

布を見ると骨からの消失が明らかに観察されることから、両者間の結合はテトラサイクリン¹¹⁾などでみられる様な強固なものではないと判断された。

sulfadiazine や sulfamerazine は全体液にかなり分布し、肋膜腔、腹腔、脳脊髄液中などに、血液濃度の50~80%の濃度の薬物が出現したと Fischerら¹²⁾は報告している。今回の ¹⁴C-OA の場合には、放射能濃度としては高くなかったが、脳脊髄液、胸腔に放射能が観察されるので、本薬物についてもまた体液へ移行があるものと推察される。

また、脳内に移行した放射能の局在性は鮮明ではなかったが、向精神薬のそれ¹³⁾に似て、灰白質および辺縁系に取り込みの多い分布を示した。これは本化合物の中樞作用¹⁴⁾を示す原因でないかと思われる。

本薬物が動物用の抗菌剤として使用されることから、魚肉、鶏肉への薬物の移行に興味をもたれた。産卵中のウズラを用いて全身 ARG を行なったところ、成熟卵胞には、放射能がわずかしき移行しなかったことから、卵黄への取り込みは非常に少ないものと推察される。大島ら¹⁵⁾は OA 投与後のニワトリの卵黄と卵白中の濃度を bioassay で検討し、卵黄中の薬物濃度は非常に低く卵白の約1/20であると報告している。これは全身 ARG の結果を支持するものであろう。

ウナギの全身 ARG を見ると、前述した如くマウス、ラットに比し、経口投与後の全身的なピークは明らかに遅かった。すなわち、消化管からの吸収およびその排泄は比較的緩慢であると推察される。このことは魚類における薬物代謝酵素活性がきわめて低い（あるいはほとんど有していない¹⁶⁾）ということと関連しているかも知れない。また、投与後24時間の ARG で、胆汁中に強い放射能が観察されたことから、ウナギにおいても本薬物は胆汁を介して排泄することが認められた。

終りにのぞみウズラ、ウナギの実験手法などに御助言、御教示を賜りました当社薬理研究所大島慧主任研究員、遠藤俊夫氏に深謝いたします。また、実験に協力された関操、木村真喜子の両氏に心から謝意を表します。

文 献

- 1) 大塚峯三, 内藤一秋, 佐藤善重: 応用薬理, **9**, (6), 849 (1975)
- 2) 藤原充雄, 大塚峯三, 佐藤善重: *Radioisotopes*, **24**, 12 (1975)
- 3) D. Kaminsky and R. I. Meltzer: *J. Med. Chem.*, **11**, 160 (1968)
- 4) K. Okumura, T. Adachi, M. Tomie, K. Kondo and I. Inoue: *J.C.S., Perkin, I*, 173 (1972)
- 5) F.J. Turner, S.M. Ringel, J.F. Martin, P.J. Sterino, J. M. Daly and B. S. Schwartz: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 475 (1967)
- 6) S.M. Ringel, F.T. Turner, D. Kaminsky and B.S. Schwartz: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 480 (1967)
- 7) 遠藤俊夫, 佐久間真理, 田中久, 萩島健次, 原武史, 大島 慧, 佐藤善重: *Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries*, **39**, (2), 173 (1973)
- 8) 早坂治男, 吉田弘嗣, 金子修司, 遠藤俊夫, 赤池幸雄: 農林省申請資料 (1973)
- 9) 佐藤善重, 阿部久二: 応用薬理, **3**, (1) 1 (1969); *ibid.*, **3**, (2) 77 (1969)
- 10) M. Shimizu, Y. Sekine, H. Higuchi, H. Suzuki, S. Nakamura and K. Nakamura: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 123 (1970)
- 11) 佐久間真理, 大塚峯三, 佐藤善重: *Radioisotopes*, **20**, 83 (1971)
- 12) S.H. Fischer, L. Troast, A. Waterhouse, J. A. Shannon: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **79**, 373 (1943)
- 13) 佐藤善重: 薬の分布・作用, 基礎と臨床, p. 1~131, 大森義仁, 麻生芳郎編, 広川書店(1974)
- 14) 高市雄之, 他: 農林省申請資料 (1973)
- 15) 大島慧, 他: 農林省申請資料 (1973)
- 16) B.B. Brodie and R.P. Maickel: *1st International, Pharmacol. Meeting*, **6**, (1) 299 (1961)

Abstract

Studies on the Fate of ^{14}C -Labeled Oxolinic Acid (II)
Whole Body Autoradiographic Distribution of
 ^{14}C -Oxolinic Acid in Animals

Minezo OTSUKA, Kazuaki NAITO and Yoshishige SATO

Drug Metabolism Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.
2-2-50, Kawagishi, Toda, Saitama

Distribution patterns of ^{14}C -labeled oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent, were studied in mice, rats, hen quails and eels by means of whole body autoradiography.

In mice ^{14}C -oxolinic acid administered orally in a dose of 20 mg/kg was absorbed to a considerable extent from the intestinal tract and distributed in almost all tissue. At 30 to 60 minutes after the administration, highest concentrations of radioactivity were observed in the liver, kidney, myocardium, bone and brown fat, while radioactivities were moderate in the blood, skeletal muscle, adrenal gland and pituitary gland, and lowest in the central nervous system and testis. The concentration in the fetus at 60 minutes after the administration was about equal to that of the placenta, and then it gradually decreased with a lapse of time. In the tissues of the fetus high concentrations of radioactivity were found especially in the bone. The radioactivity was almost completely eliminated from mice body within 48 hours after the administration.

In rats the distribution pattern was also very similar to that in mice. But the uptake of radioactivity into brown fat was considerably less than that in mice. In hen quails, the distribution pattern resembled those in mice and rats. It was of note that the compound was localized in the melanin containing tissues in the eye, skin and hair follicles, but it was only slightly incorporated into the maturing follicles of the ovary. In eels, the absorption and elimination of the compound seem to be very slow.

(Received December 9, 1975)