向精神薬に関する研究 (第 7 報¹⁾) APY-606 の生体内運命 その 2³H-APY-606 の吸収, 生体内分布, 排泄および代謝

今村 博, 岡田忠夫, 松井英一, 加藤安之

吉富製薬株式会社研究所²⁾Studies on Psychotropic Drugs. VII.¹⁾ Metabolic Fate of APY-606 (2) Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism of Tritiated APY-606

HIROSHI IMAMURA, TADAO OKADA, EIICHI MATSUI and YASUYUKI KATO

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received October 3, 1969)

Tritium labeled compound (³H-APY-606) of a new phenothiazine derivative, 8-[3-(2-chloro-10-phenothiazynyl) propyl]-3-oxo-1-thia-4,8-diazaspyro [4,5] decane hydrochloride was synthesized, and its absorption, distribution, excretion and metabolism were investigated in rats. When this compound was orally administered at a dose of 10 mg/kg, about 40% of the dose was absorbed from the gastrointestinal tract within 6 hr, but the speed of absorption was relatively slow. 3% and 55% of the administered radioactivity (³H) were excreted in the urine and feces, respectively, during the 3 days following the oral administration of ³H-APY-606, and 32% of the dose was also excreted in the bile during 24 hr. The highest concentration of ³H in most organs was found 4 hr after its oral administration, and ³H was concentrated in the liver, adrenals, kidney and lung. ³H level in the brain was 2—4 fold of that in the blood, and blood level was relatively low. Protein binding of ³H in the serum was 90% at 1 hr, 34% at 24 hr, after oral administration. Seventy % of ³H in the urine and 94% of it in the bile were extracted with organic solvent, and a small amount of glucuronide was formed in the urine.

Four radioactive metabolites in the urine and 3 metabolites in the bile were detected by thin-layer chromatography, but the native compound could not be detected.

前報¹⁾ で新規な phenothiazine 系化合物, 8-[3-(2-chloro-10-phenothiazynyl) propyl]-3-oxo-1-thia-4,8-diazaspyro(4,5)decane hydrochloride (以下 APY-606 と略) のラットにおける排泄および代謝産物について検討し, ラット尿および胆汁中に未変化体は検出されずほとんどすべて代謝産物として排泄されることを報告した。

本報では APY-606 の ³H 標識化合物 (以下 ³H-APY-606 と略) を用いラットにおける吸収, 生体内分布, 排泄および代謝を検討し興味ある知見を得たので報告する。

実 験 の 部

³H-APY-606 の合成 ³H 化は, 1) ³H₂O による方法, 2) LiAl³H₄ による還元法で行ない 1) の結晶で生体内分布, 2) の結晶でその他の実験を行なった。

1) ³H₂O による方法——(イ) 2-Chloro-10-(3-chloropropyl)phenothiazine [I] の ³H 化: 硬質試験管 7 本に [I] を 500 mg ずつ入れ (計 3.5 g), ³H₂O の AcOH 溶液 0.5 ml (約 3 mCi) を加えて熔閉, 油浴中で約 120°, 24 hr 加熱した。冷後開管し, MeOH で易動性の ³H を除去, 活性炭処理後減圧濃縮乾固, 残留物をそのままの反応に用いた。

(ロ) ³H-APY-606 の合成: (イ) の実験で得た残留物を dimethylformamide (DMF) 56 ml に溶かし, 3-oxo-1-thia-4,8-diazaspyro(4,5)decane hydrobromide 2.9 g, Na₂ CO₃ 3.5 g 加え, 時々振盪しながら約 90°, 21 hr 油浴中で加熱した。冷後不溶物を汙別除去, 汙液を減圧濃縮し残留した油状物をトルエン 80 ml に溶解した。トルエン層を H₂O 30 ml で洗浄後冷却下に 5 % HCl を加えると目的物の塩酸塩が油状物として析出した。油状物を H₂O およびトルエンで洗い少量の EtOH に溶解し, isopro-OH を加えて冷却すると褐色の結晶が析出した。結

1) 第 6 報: 中西美智夫, 岡田忠夫, 加藤安之, 薬誌, 90, 808 (1970)。

2) Location: 26-1, Nishigahara-1, Kita-ku, Tokyo.

晶を濾取し活性炭処理後 90% MeOH から再結した。結晶の純度は薄層クロマトグラフィー (TLC), 逆同位体希釈法³⁾ および IR から 100% であることを確認した。収量 900 mg, mp 267° (decomp.), 比放射能 1.14 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 。

2) LiAl^3H_4 による方法——つぎの経路で合成した。

II の合成: LiAl^3H_4 1.9 mg (5 mCi, 100 mCi/mmol, NENC) に非放射性 LiAlH_4 18.6 mg を加えて無水エーテル 3 ml にけんたくし、攪拌下に冷却しつつ、I 100 mg を無水エーテル 1 ml に溶解して徐々に滴下した後、3 hr 還流した。冷後 H_2O 0.5 ml, 15% NaOH 0.5 ml および MeOH 5 ml を加え過剰の LiAl^3H_4 を完全に分解し濾別する。残渣を MeOH, エーテルで十分洗い濾液を合せて減圧濃縮乾固すると白色結晶が析出した。結晶は少量の CHCl_3 に溶解し、シリカゲルカラムを通して精製した。収量 93 mg, mp 79—80°。

III の合成: II 93 mg を無水ベンゼン 1 ml に溶解し冷却下に PBr_3 0.5 ml を加え、40° で約 4 hr 加温した。反応終了後反応液を氷水中に入れ目的物をベンゼン抽出した。ベンゼン層は H_2O , 2N NaOH, H_2O で洗浄、無水 Na_2SO_4 で脱水乾燥後溶媒を留去すると油状物 (約 31.6 mg) が残留した。油状物はそのまがつぎの反応に用いた。

$^3\text{H-APY-606}$ の合成: III 約 31.6 mg, IV 27.2 mg, 無水 Na_2CO_3 32.7 mg を DMF 0.5 ml 中に入れ油浴中で 90—100°, 約 15 hr 加熱した。以後の操作は 1) の $^3\text{H}_2\text{O}$ による方法に準じた。放射化学的純度 100%, 収量 16.9 mg, 比放射能 67.7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 。

使用動物および投与法 体重約 100 g の雄 Donryu ラット (日本ラット K.K. 供給) を用いた。 $^3\text{H-APY-606}$ は実験目的に応じ担体で一定の比放射能に希釈後生理食塩液にけんたくして経口投与した。

放射活性 (^3H) の測定 試料をトルエン・シンチレーター³⁾ (シンチレーター I) またはジオキサン・シンチレーター³⁾ (シンチレーター II) に溶解またはけんたくさせ液体シンチレーション計数装置 (Packard Model 3315) により測定した。試料のクエンチングは外部標準線源法により補正した。

消化管ホモジネート中 ^3H の測定 ラットを 1 夜絶食後エーテル麻酔下に開腹して総胆管を結さつする。

Fig. 1. ^3H in the Gastrointestinal Tract after Oral Administration of $^3\text{H-APY-606}$

Each point represents the mean of 3 rats.

30 min 後に検体 10 mg/kg (677 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) を投与、一定時間ごとにラットを殺し、食道上部および直腸下部を結さつし内容物とともに全消化管を摘出した。消化管は付着した血液、腸間膜などを完全に取り除き細片とし、DMF で全量 50 ml としてホモジナイズした。ホモジネート 0.1 ml をシンチレーター I 15 ml に溶解して ^3H を測定した。対照として検体投与直後に処理したホモジネート中 ^3H を測定し、これを 100 として各時間における残存率を求めた。また実験中に排泄された糞中に ^3H は検出されなかった。

組織中 ^3H の測定 1 夜絶食したラットに検体 200 mg/kg (228 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) を投与、一定時間ごとに既述の方法⁴⁾ で各組織を摘出した。血液は 0.02 ml をシンチレーター I 15 ml にけんたく、他の組織は 3 倍量の精製水を加えて作成したホモジネート 0.1 ml を hyamine 1 ml に加熱溶解後シンチレーター I 14 ml を加えて ^3H を測定した。

尿、糞および胆汁中 ^3H の測定 検体 10 mg/kg (677 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) 投与後の尿、糞および胆汁を前報¹⁾ に準じて経時的

3) 今村 博, 松井英一, 加藤安之, 薬誌, 90, 302 (1970).

4) 今村 博, 松井英一, 加藤安之, 薬誌, 90, 317 (1970).

に採取し、尿および胆汁は 0.05 ml をシンチレーター II 15 ml に溶解して ^3H を測定した。糞中 ^3H は糞を 50 ml の DMF で抽出し、抽出液 0.1 ml をシンチレーター I 15 ml に溶解して測定した。

血清たん白との結合 検体 10 mg/kg (185 $\mu\text{Ci/kg}$) 投与後の血清 0.5 ml を用い、Barlow ら⁵⁾ のゲル濾過法で血清中 ^3H のたん白結合率を測定した。

尿および胆汁中 ^3H の抽出 検体 10 mg/kg (185 $\mu\text{Ci/kg}$) 投与後 24 hr 以内の尿および胆汁を前報¹⁾ と同様 pH 12 (F-1 分画) および pH 8—9 (F-2 分画) で 2 倍量の CHCl_3 で 3 回抽出、水層をさらに 2 倍量の BuOH で抽出 (F-3 分画) した。各分画中に移行した ^3H を測定して抽出率を求めた。

β -Glucuronidase 処理 前項で抽出後の尿の 1 ml を pH 7 に調整、 β -glucuronidase (55000 u/g, Sigma) 10 mg を加えて 37°, 24 hr 加温した。

TLC 尿および胆汁の F-1 分画を 40° で減圧濃縮して TLC に付した。TLC はシリカゲルプレート (Wakogel B-5, 和光純薬, 厚さ 0.25 mm, 105°, 30 min 活性化) を用い、展開溶媒として (S-1) ペンゼン-ジオキサン-10% NH_4OH (10:15:1, v/v) の上層, (S-2) EtOH-AcOH- H_2O (5:3:2, v/v) の溶媒系で展開した。クロマトグラム上のスポットはシリカゲルを原点から 1 cm の幅でけずり取り、シンチレーター I 10 ml にけんだくさせて ^3H を測定することにより検出した。

TABLE I. Distribution of ^3H in Rat Tissues after Oral Administration of ^3H -APY-606

Tissues	Time in hours					
	0.5	1	2	4	6	24
Blood	13.8 $\pm$ 0.9 ^{a)}	13.3 $\pm$ 3.4	30.2 $\pm$ 2.4	20.7 $\pm$ 2.6	20.6 $\pm$ 6.8	6.7 $\pm$ 3.6
Serum	21.6 $\pm$ 4.1	30.1 $\pm$ 0.3	45.6 $\pm$ 36.8	37.0 $\pm$ 16.3	33.6 $\pm$ 2.5	38.1 $\pm$ 3.3
Brain	42.9 $\pm$ 14.3	31.7 $\pm$ 7.2	53.1 $\pm$ 21.6	72.3 $\pm$ 12.0	47.0 $\pm$ 18.5	22.7 $\pm$ 0.2
Heart	65.1 $\pm$ 16.3	76.9 $\pm$ 20.4	120.2 $\pm$ 20.4	113.1 $\pm$ 32.9	50.4 $\pm$ 12.1	22.7 $\pm$ 0.1
Lung	109.6 $\pm$ 20.6	156.2 $\pm$ 48.3	180.1 $\pm$ 27.0	245.6 $\pm$ 37.9	217.2 $\pm$ 28.8	39.8 $\pm$ 3.1
Liver	317.7 $\pm$ 18.7	324.1 $\pm$ 80.9	280.9 $\pm$ 83.9	797.6 $\pm$ 2.8	304.4 $\pm$ 61.4	82.8 $\pm$ 2.0
Kidney	98.5 $\pm$ 22.0	136.2 $\pm$ 29.3	180.0 $\pm$ 55.0	240.7 $\pm$ 35.4	141.2 $\pm$ 11.1	40.0 $\pm$ 0.2
Spleen	65.4 $\pm$ 0.2	73.6 $\pm$ 11.9	124.2 $\pm$ 58.2	201.0 $\pm$ 48.5	103.0 $\pm$ 30.3	24.8 $\pm$ 1.7
Adrenal	195.7 $\pm$ 20.0	235.7 $\pm$ 30.5	418.8 $\pm$ 61.1	377.0 $\pm$ 60.8	179.8 $\pm$ 41.8	23.1 $\pm$ 1.1

a) dpm/mg of tissue, mean $\pm$ S.D. (n=3)

TABLE II. Serum Levels and Protein Binding of ^3H in the Serum

Time (hr)	^3H levels ($\times 10^4$ dpm/ml)		^3H in the serum	
	Blood	Serum	Bound	Free
0.5		2.30	80.4%	19.6%
1	1.45	2.36	90.0	10.0
2	2.94	4.00	82.3	17.7
4	2.71	3.24	63.1	36.9
24	1.09	1.11	34.1	65.9

TABLE III. Excretion of ^3H in the Urine and Feces after Oral Administration of ^3H -APY-606

	Excretion (% of dose)			
	1 day	2 day	3 day	Total
Urine	2.1	0.4	0.2	2.7
Feces	51.1	3.7	0.3	55.1
Total	53.2	4.1	0.5	57.8

Each value was obtained from 3—5 rats.

5) C.F. Barlow, H. Firemark, L.J. Roth, *J. Pharm. Pharmacol.*, **14**, 550 (1962).

Fig. 2. Cumulative Excretion of ³H in the Bile after Oral Administration of ³H-APY-606

Each point represents the mean of 3 rats.

Fig. 3. Thin-Layer Chromatograms of Radioactive Metabolites in F-1 Fraction obtained from Rat Urine and Bile

developing solvents
S-1: benzene-dioxane-10% NH₄OH
(10:15:1, v/v)
S-2: EtOH-AcOH-H₂O (5:3:2, v/v)
A: authentic APY-606

実験結果

消化管吸収 検体投与後各時間における消化管ホモジネート中に残存する ³H の、対照 (100) に対する割合を Fig. 1 に示した。投与 2 hr までは投与量の約 90 % が検出されたが 6 hr 後の残存率は約 60 % であった。消化管壁中に存在す

る ³H を未吸収と見なすと、6 hr 以内の吸収率は約 40 % となる。

生体内分布 組織中 ³H は検体投与後徐々に増加し、多くの組織では投与後 4 hr で最高となり、6 hr 後には低下した。肝臓、副腎、腎臓、肺などに高濃度の ³H が検出されたが、血中濃度は比較的であった (Table I)。

血清たん白との結合 血清中 ³H は全血中濃度より高く、投与 1 hr 後では 90 %、24 hr 後では 34 % が血清たん白と結合していた (Table II)。

尿、糞および胆汁中排泄 投与後 3 日間で投与した ³H の約 3 % が尿中、55 % が糞中にそれぞれ排泄された (Table III)。胆汁中には投与後 6 hr 以内に 15 %、24 hr 以内に 32 % が排泄された (Fig. 2)。

尿および胆汁中 ³H の抽出率 尿中 ³H は主として F-1 および F-3 分画に抽出された。水層には 27 % が抽出されずに残存したが、β-glucuronidase 処理により 13 % が新たに抽出可能となった。胆汁中 ³H の 61 % は F-1 分画に抽出され、水層には 6 % が残存するにすぎなかった。無投与尿および胆汁中に加えた ³H-APY-606 は F-1 分画に抽出された (Table IV)。

尿および胆汁中代謝産物の検討 尿および胆汁から得た F-1 分画を TLC で分析した結果、尿で 4 個、胆汁で 3 個のスポットが検出され、その 1 つは (S-1) のクロマトグラムでは APY-606 と近い Rf 値を示したが、(S-2) のクロマトグラムでは APY-606 と Rf 値の等しいスポットは検出されなかった (Fig. 3)。

TABLE IV. Extraction of ³H in the Urine and Bile

Fraction	Rate of extraction (%)				
	Urine		Bile	³ H-APY-606 ^{c)}	
	Before ^{a)}	After ^{b)}		Urine	Bile
F-1	38.0	3.2	60.8	99.9	98.3
F-2	9.4	3.8	12.7		
F-3	26.0	5.5	20.1		
Total	73.4	12.5	93.6	99.9	98.3
Residue	26.6	14.1	6.4		

a) before treatment with β-glucuronidase

b) after treatment with β-glucuronidase

c) authentic sample

考 察

薬物の消化管吸収率の測定法として, Schanker ら⁶⁾の小腸還流法が一般に用いられているが, 本化合物は水に難溶なため実施が困難であった. 一方, Phillips ら⁷⁾は難溶性薬物の消化管吸収率を経口投与後の消化管中残存量から求めているが, この場合には吸収された薬物が消化管内に排泄される可能性を考慮する必要がある. Phenothiazine 系化合物のチオリダゼン⁸⁾では投与量の 60% が胆汁中に排泄されることが知られており, ³H-APY-606 でも投与した放射活性の 15% が 6 hr 以内に排泄されることが明らかとなった (Fig. 2). 以上の理由から本実験では胆管結さつラットを用い, 検体投与後の全消化管中 ³H の残存量を測定した. この場合内容物の一部が消化管壁に付着し, 両者を完全に分離することができなかつたので両者を合せて処理したため, 消化管壁に存在する ³H は未吸収分に含まれる. Fig. 1 に示したように投与後 2 hr までの残存率は約 90% で消化管からの吸収は明らかでない. しかし 4 および 6 hr 後の残存率は明らかに低下し, 6 hr では約 60% となり, ほぼ 40% が吸収されたことになる. 以上の結果は本化合物の消化管吸収が比較的遅いことを示唆しており, 1つの理由として本化合物が水に難溶なため消化管内での溶解速度が吸収速度を律速していることが考えられる.⁹⁾ ³H-APY-606 を経口投与すると多くの組織中 ³H は 4 hr 後にほぼ最高となり, 6 hr 後には低下するが, かなりの ³H が組織中に検出され (Table I), 本化合物の消化管吸収が遅い事実とも一致する. 組織中 ³H の分布量は臓器により著しく異なり, 肝臓, 腎臓, 肺および副腎に多く血中には少ない. 脳内濃度は血中濃度の 2—4 倍で, APY-606 またはその代謝産物は他の phenothiazine 系化合物と同様, 脳血液関門を比較的容易に通過するものと推定される.¹⁰⁾ 副腎へ高濃度に分布する現象はクロールプロマジン,¹¹⁾ イミプラミン,¹²⁾ カルピプラミン⁹⁾ などでも認められているが, 生理的意義は明らかでない. Table II に示した全血と血清中 ³H の割合から血液中 ³H の大部分は血清に存在し, しかも投与初期にはほとんど血清タンパクと結合していることがわかる. 経口投与された ³H-APY-606 に由来する ³H の尿中排泄率は 3% にすぎず, 55% は糞中に排泄された (Table III). 本化合物の消化管吸収が比較的遅いため一部は未吸収のまま糞中へ排泄されることも考えられるが, Fig. 2 で明らかなように投与 ³H の 32% が胆汁中に排泄されることから糞中 ³H の大部分は胆汁中に排泄された ³H に由来するものと推定される.

尿中 ³H の 73% は有機溶媒で抽出され, F-1 分画には 38% が抽出された. 水層に残存する ³H の一部は β -glucuronidase 処理により, 新たに抽出可能となるので, glucuronide の存在が考えられるが, 量的にはわずかである (Table IV). 胆汁中 ³H は尿と異なり, 94% が有機溶媒で抽出され, F-1 分画には 61% が抽出された (Table IV).

尿および胆汁の F-1 分画を TLC で分析すると Fig. 3 に示すクロマトグラムが得られ, 尿では 4 個, 胆汁では 3 個の代謝産物が検出された (S-1). しかし未変化体と R_f 値の等しいスポットは検出されない (S-2) ので, 尿および胆汁中にはほとんどすべて代謝産物として排泄されることが明らかである. 以上の結果は化学的方法で検討した前報¹⁾の結果ともほぼ一致する.

6) L.S. Schanker, D.J. Tocco, B.B. Brodie, C.H.A. Hogben, *J. pharmacol. Exptl. Therap.*, **123**, 81 (1958).

7) B.M. Phillips, C.E. Pilkvist, P.J. Kraus, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **156**, 358 (1965).

8) S. Eidusson, E. Geller, *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 1249 (1963).

9) 中西美智夫, 加藤安之, 瀬戸口通英, 津田 厚, 安田 寛, 薬誌, **90**, 197 (1970).

10) 中島 啓, “新精神薬理学,” 小林 司編, 医学書院, 1968, p. 154.

11) S.E. Sjöstrand, G.B. Cassano, E. Hansson, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **156**, 34 (1965).

12) G.B. Cassano, E. Hansson, *Intern. J. Neuropsychiat.*, **2**, 269 (1966).