[薬学雑誌 YAKUGAKU ZASSHI
94 (5) 553-558 (1974)]

UDC 547.466.64'546.621.09 : 615.31.015.4

N-アセチルグルタミン-アルミニウム錯体化合物 (KW-110) の生化学的研究

(第 1 報) ^{14}C -KW-110 のラットでの生体内運命について

白木 洋, 高木 永子, 峯浦 和幸, 高平 汎志

協和醸酵工業株式会社富士研究室¹⁾

Biochemical Studies on the N-Acetylglutamine-Aluminum Complex (KW-110). I.

Studies on the Metabolic Fate of ^{14}C -KW-110 in Rats

HIROSHI SUIRAKI, EIKO TAKAGI, KAZUYUKI MINEURA and HIROSHI TAKAHIRA

Fuji Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.¹⁾

(Received August 27, 1973)

The metabolic fate of ^{14}C -KW-110 in rats has been studied. After oral administration of 500 mg/kg of ^{14}C -KW-110 to rats, the radioactivity excreted was 73.3% in expiratory CO_2 , 16.4% in feces, and 8.2% in urine, whereas aluminum in KW-110 was excreted in feces only. After the oral administration of KW-110 to rats, the radioactivity was distributed in all tissues in rats and especially high in stomach, intestinal tracts, liver, and kidney, but aluminum in KW-110 administered was distributed only in digestive tracts, and retained in stomach for about 5—7 hr after its oral administration and gradually moved into intestinal tracts. N-Acetylglutamine, glutamine, and urea were identified as urinary radioactive metabolites after the oral administration of KW-110 and they accounted for 46.5%, 24.7%, and 27.4%, respectively, of total radioactivity excreted in 48-hr urine. The radioactive substances detected in serum were also N-acetylglutamine, glutamine, and glutamic acid.

N-アセチルグルタミン-アルミニウム錯体化合物 (以下 KW110 と省略) は塩崎ら²⁾により N-アセチルグルタミンとアルミニウムイソプロポキシドより合成されたもので, Fig. 1 に示すような分子量 1156 の化合物である。この化合物が田中ら³⁾ および一木ら⁴⁾ により種々の実験潰瘍に対して顕著な予防および治癒効果をもつことが明らかにされ, またその抗潰瘍スペクトラムが既存のアルミニウム製剤に比べて幅広いということから興味を持たれた化合物である。

Fig. 1. Chemical Structure of KW-110

る。一般に生体における消化性潰瘍の成因は複雑であるために, それに伴いその治療には作用機作の異なる種々の薬剤が使用されている。そこで著者らは KW-110 の示す広範な抗潰瘍スペクトラムに興味をもち, その作用機作に関する研究を始めた。まずその研究の一環として KW-110 の N-アセチルグルタミンの炭素骨格を ^{14}C で標識した化合物を用いて, ラットでの生体内運命について検討したので報告する。

実 験 の 部

実験材料 ラットは Wistar 系雄性, 体重 200 ± 10 g のものを, 特に記載がないかぎりには 1 群 3 匹として使用した。グルタミン- ^{14}C (U) (比放射能 0.22 Ci/mmole) は第一化学薬品工業より入手した。N-アセチルグルタミン- ^{14}C (U) (比放射能 1.30 mCi/mmole), KW-110- ^{14}C (U) (比放射能 7.62 mCi/mmole) はそれぞれグルタミン- ^{14}C (U) より合成し, ペーパークロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーで放射化学的に純粋であることを確認したのち実験に使用した。非標識グルタミンおよび N-アセチルグルタミンは協和醸酵工業製を, KW-110 は塩崎らにより合成されたものを使用した。セルロース粉末は Whatman 社製 Cellulose Powder CF-11, DEAE-セルロースはファルマシア社製, Amberlite XAD-2 はロームアンドハース社製をそれぞれ使用した。

- 1) Location: 1188, Shimotogari, Nagaizumi-machi, Sunto-gun, Shizuoka.
- 2) 塩崎和雄, 橋本光也, 薬剤学, 32, 56 (1972).
- 3) 田中 洪, 周藤勝一, 石井澄洋, 織間博光, 高平汎志, 日薬理誌, 68, 602 (1972).
- 4) 一木彦三, 中津 賞, 田坂邦安, 磯田政恵, 基礎と臨床, 6, 1486 (1972).

試料の調製 尿, 糞はラットに ^{14}C -KW-110 500 mg/kg (放射能として 1 μCi /ラット) を経口投与し, その 4, 8, 15, 24, 36, 48, 60, 72 時間目のものを採取した. 呼吸中 CO_2 は, その 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 24, 36, 48, 60, 72 時間目までのものをエタノールアミン: エチルセロソルブ (1:3) 混液に吸収させ捕集した. 体内分布は ^{14}C -KW-110 500 mg/kg (放射能として 2 μCi /ラット) を経口投与し, その 1, 3, 5, 7, 10, 12, 24, 48, 72 時間目に各ラットを殺し, 血液を採取した後, 脳, 心, 肺, 胃, 胃内容物, 腸, 肝, 脾, 腎, 膵, 精のう, 膀胱, 睪丸を摘出し, 生理食塩水で洗ったのち測定試料とした.

放射能の測定 尿はその 0.2 ml をジオキサン系シンチレーター (ナフタレン 60 g, DPO 4 g, POPOP 0.2 g をジオキサン 900 ml, メタノール 100 ml の混液に溶かしたもの) 15 ml に加えて測定した. 糞は減圧下 P_2O_5 で乾燥したのち, その 100 mg を, 血液は 0.2 ml を, 胃, 胃内容物, 腸, 肝は生理食塩水でホモジナイズしたのち, 容量を 20 ml に調整し, その 0.2 ml を, その他の組織はハサミで細切したのちその 100 mg をそれぞれバイアルに取り, これに 70% 過塩素酸 0.2 ml, 30% 過酸化水素 0.4 ml を加え, 60° で 60 分間加熱溶解した. これにトルエン系シンチレーター (DPO 5 g をトルエン 1 l およびエチルセロソルブ 500 ml の混液に溶かしたもの) 15 ml を加えて測定した. CO_2 捕集液はその 1 ml をトルエン系シンチレーター 15 ml に加えて測定した. ペーパークロマトグラムは幅 2 cm, 長さ 1 cm に切り取り, ジオキサン系シンチレーター 10 ml に浸して測定した. 放射能の測定には Packard 社 Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Model 3320 を用い, クエンチングの補正には外部標準線源法を用いた.

アルミニウムの蛍光測定法 尿, 血液は 0.5 ml, 糞は 200 mg, 胃, 胃内容物, 肝, 腸はそのホモジネート 0.5 ml, その他の組織は 200 mg をそれぞれ 30 ml のケルダールフラスコに取り, 70% 過塩素酸: 硝酸 (1:4) 混液 5 ml を加えセミマイクロケルダール用電気炉 (三田村理研製) 上で 30 分間加熱した. 過塩素酸を白煙として除いたのち, 室温にまで冷却し, これに 0.1 M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて残渣を溶解し, その容量を 10 ml に調整した. その 1—2 ml を 50 ml 遠沈管に取り, 上記緩衝液 5 ml, 1% オキシシン溶液 (オキシシン 2 g を氷酢酸 5 ml に加温溶解後, 水で 200 ml に調整したもの) 2 ml, クロロホルム 10 ml を加えて 1 分間振とうした. 次にこれを遠心分離し, 上層の水を除いたのち, クロロホルム層を励起波長 397 m μ , 蛍光波長 510 m μ で蛍光強度を測定した. アルミニウムの検量線の作成は硫酸アルミニウムカリウムを用いた.

クロマトグラフィー ペーパークロマトグラフィー (PPC) には東洋汙紙 No. 51A, 薄層クロマトグラフィー (TLC) にはアビセル SF (フナコシ薬品製) を用いて, 厚さ 0.25 mm に調製し, 1 夜室温で乾燥したものを使用した. 展開溶媒には 1) ピリジン: メタノール: 水 (1:20:5), 2) *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (4:1:5), 3) *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (12:3:5), 4) *n*-アミルアルコール: 酢酸: 水 (5:5:2) の 4 種を用いた. 検出試薬には 0.1% ニンヒドリン試薬 (ニンヒドリン 100 mg をアセトン 100 ml に溶かしたもの), ユールリッヒ試薬 (*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1 g をエタノール 100 ml に溶かし, これに塩酸 10 ml を加えたもの) および 0.1% アリザリン S 試薬 (アリザリン S 100 mg を水 100 ml に溶かしたもの) の 3 種を用いた. 0.1% アリザリン S によるアルミニウムの検出には 0.1% アリザリン S を噴霧したのち, アンモニア蒸気にさらして行なった.

反転腸管による吸収実験 24 時間絶食したラットを殺し, その腸管を取り出し, 空腸部を長さ 15 cm に切り取った. それをガラス棒で腸管を傷つけないように反転させ, その両端は径 0.5 cm のガラス管に固定した. これを ^{14}C -KW-110 を含む Tyrode 溶液 (pH 7.8) 中に浸し, 37° で 60 分間インキュベートした. インキュベーション後腸管を取り出し, 外側を生理食塩水で洗った後, ガラス管より生理食塩水を注入して腸管内を洗い, 洗液を 10 ml に調整した. この溶液を用いて放射能, アルミニウム量および放射性物質の検討を行なった.

血清中代謝物 ^{14}C -KW 110 500 mg/kg (放射能として 3.2 μCi /ラット), ^{14}C -グルタミン 360 mg/kg (放射能として 3.2 μCi /ラット) をラットに経口投与し, 0.5, 1, 3, 5, 7 時間目に各ラットを殺し, 血液を採取した. その血液を直に遠心分離し血清を調製した. 各血清は生理食塩水で 2 倍に希釈し, 等量の 0.44M トリクロロ酢酸 (以下 TCA と省略) を加えて, 3000 rpm で遠心分離し上清を採取した. 沈殿は再び等量の TCA で洗い, その洗液は上清に合わせた. この上清分画をエーテル 15 ml で 3 回振とう抽出して TCA を除いたのち, 減圧濃縮した. この濃縮液を用いて N-アセチルグルタミン, グルタミン, グルタミン酸の定量を同位体逆希釈法により行なった. すなわち, 非標識の各標品約 80 mg を加えて水で再結晶化を 3 回行ないその比放射能より定量した.

機器分析 アルミニウムの蛍光測定には Hitachi Fluorescence Spectrophotometer MPF-2A, 融点測定には三田村理研製微量融点測定装置を用いた.

結 果

排泄および体内分布

^{14}C -KW-110 500 mg/kg をラットに経口投与し, その放射能およびアルミニウムの排泄を経時的に測定した. 結果は Fig. 2 および Fig. 3 に示すように, 放射能は投与後 72 時間目までに尿中に 8.4%, 糞中に 16.2%, 呼吸中に 73.2% が排泄されたが, アルミニウムは全て糞中のみ排泄され, 投与後 72 時間目までに 100% が回収された.

放射能の体内分布の経時変化は Table I に示すように, 検索した全ての臓器にその分布が認められ, 特に胃,

Fig. 2. Cumulative Excretion Radioactivity in Rats after Oral Administration of ^{14}C -KW-110 (500 mg/kg) -----: Urine: Feces —: Expiratory CO_2

Fig. 3. Cumulative Fecal Excretion of Aluminum in Rats after Oral Administration of KW-110 (500 mg/kg)

TABLE I. Distribution of Radioactivity in Rat Tissues after Oral Administration of ^{14}C -KW-110 (500 mg/kg)

Tissues	Hours (dpm per g wet tissue)							
	1	3	5	7	10	12	24	48
Brain	234	267	270	358	285	277	216	199
Heart	218	440	450	497	344	289	280	284
Lung	363	399	421	502	634	823	570	394
Spleen	394	732	834	1135	1140	1065	948	654
Pancreas	508	1729	1749	1661	1199	1198	831	520
Kidney	635	1267	1345	1558	1649	1308	1110	757
Stomach wall	14397	8577	4234	3408	1945	1292	764	526
Stomach contents	27028	12945	8540	3557	2440	2076	75	68
Intestine	8320	10660	11394	13448	8405	2631	996	485
Liver	765	1649	2495	2139	2449	2534	942	870
Testis	250	231	270	370	305	290	250	220
Seminal vesicle	577	612	645	533	444	412	410	744
Blood (per ml)	1615	2800	2875	3300	3520	3066	2560	1050

Fig. 4. Stomach and Intestine Levels of Aluminum in Rats after Oral Administration of KW-110 (500 mg/kg)

—: stomach,: intestine

腸, 肝, 腎に多くの分布を示した. また血中では投与後徐々に上昇し, 7—12 時間目に最大分布を示した. 一方, アルミニウムは放射能の分布と異なり, 胃, 腸管以外の組織および血液中には全く検出されなかった. 胃 (組織+内容物), 腸管 (組織+内容物) 内のアルミニウムの分布は Fig. 4 に示すように, 投与後 5—7 時間においても投与アルミニウムの約 40% が胃内に留まった.

KW-110 の腸管吸収

実験の部に記載した方法で調製した反転腸管を用いて KW-110 の腸管吸収について検討した. 結果は Table II に示すように, KW-110 の放射能部分は腸管吸収を受けるがアルミニウムの吸収は全くないことが示された. この結果は前述のアルミニウムの排泄および体内分布の結果とよく一致する. また反

TABLE II. Absorption of ^{14}C -KW-110 through the Everted Small Intestine

Concentration of KW-110 in outer solution	% of absorption			
	Radioactivity		Aluminium	
	Expt. 1	Expt. 2	Expt. 1	Expt. 2
5 mM	21	20	0	0
10 mM	27	18	0	0
20 mM	14	19	0	0

Fig. 5. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Urine Sample Treated with Amberlite XAD-2 Column Chromatography

転腸管内液を溶媒系 1, 2 を用いて PPC により検討した結果, その放射能スポットは単一で, R_f 値は標品 N-アセチルグルタミンのそれと全く一致した. この結果は KW-110 が体内に吸収される時には N-アセチルグルタミンとアルミニウムとに解離し, N-アセチルグルタミンのみ吸収されていることを示唆している.

尿中代謝物の分離

^{14}C -KW-110 500 mg/kg を経口投与した 48 時間目までの尿を用い尿中代謝物の分離を行なった. なおこの尿中には投与放射能の 7.6% が排泄されていた. まず尿をろ過し, ろ液 250 ml を Amberlite XAD-2 カラム (4×40 cm) に注入し, 水で溶出した. この水溶出分画 400 ml 中に尿中放射能の 98% が回収された. 次にこれを減圧濃縮後, DEAE-セルロースカラム (酢酸型, 2.4×24 cm) に注入し, 水, 0.5N 酢酸および 0.5M 酢酸ナトリ

ウムで順次溶出し, 5 ml ずつ分取した. 結果は Fig. 5 に示すように, 尿中放射能は 3 つに分離され, A 分画中に尿中放射能の 74%, B 分画中に 24.7%, C 分画中に 0.6% が溶出された.

尿素およびグルタミンの同定

まず A 分画中の代謝物について検討した. この分画を減圧濃縮し, 溶媒系 1 で PPC を行なうと, 放射能は 2 つに分離し, R_f 値 0.44 と 0.66 に検出された. この濃縮液をセルロースカラム (2.4×32 cm) に注入し, 溶媒系 1 で溶出を行ない 3 ml ずつ分取した. その結果, 放射能はフラクション No. 19—No. 25 (A-1 分画), No. 26—No. 36 (A-2 分画) および No. 47—No. 52 (A-3 分画) に分かれ, それぞれ尿中放射能の 46.5%, 27.4%, 0.7% であった. A-1 分画については減圧濃縮後, 水-エタノールより結晶化すると白色針状晶が得られ, この物質の溶媒系 2, 3, 4 での PPC の R_f 値は標品尿素のそれと全く一致し, 尿素との混融点も 138° で尿素のそれと一致した. また非標識尿素を添加し, 水-エタノールにより 3 回再結晶化を行なった同位体逆希釈法によってもその放射能の変化は認められなかった. 以上の結果より A-1 分画中の代謝物を尿素と同定した. 次に A-2 分画中代謝物について検討した. この分画を減圧濃縮後, 溶媒系 1, 2, 3 を用いて PPC を行なうと, その放射能は単一で, R_f 値は標品グルタミンのそれと全く一致した. そこで溶媒系 2 を用いて preparative TLC を行なって精製したのち, 非標識グルタミンを用いて同位体逆希釈法による同定を試みた. 水で 3 回結晶化を行ない, その比放射能に変化がないことから, A-2 分画中の代謝物をグルタミンと同定した. A-3 分画中の代謝物については微量であったために, その構造を明らかにすることができなかった.

N-アセチルグルタミンの同定

次に B 分画中代謝物について検討した. この分画を減圧濃縮したのちにそれを溶媒系 1, 2, 3 で PPC を行なうと, その放射能は 1 つで, R_f 値は N-アセチルグルタミンのそれと全く一致した. そこでこの分画を非標識 N-アセチルグルタミンを用い同位体逆希釈法により同定を試みた. その結果, 水による再結晶化を 3 回行ない, 比放射能に変化がないことを確認し, B 分画中の代謝物を N-アセチルグルタミンと同定した. C 分画中の代謝物については, 微量であったために, その構造については明らかにすることが出来なかった. 以上のように, KW-

TABLE III. Determination of Urinary Metabolites after Oral Administration of KW-110 (500 mg/kg) in Rats

Metabolites	% of urinary radioactivity
N-Acetylglutamine	24.7
Glutamine	27.4
Urea	46.5
Unknown A-3	0.7
Unknown C	0.6

Fig. 6. Radioactivities in the Rat Serum and Serum TCA-supernatant Fraction after Oral Administration of ^{14}C -KW-110 or ^{14}C -Glutamine

KW110: ○—○ serum; ×—× serum TCA-soluble fraction
glutamine: ○··○ serum; ×··× serum TCA-soluble fraction

Fig. 7. N-Acetylglutamine, Glutamine and Glutamic Acid Contents in Rat TCA-supernatant Fractions after Oral Administration of ^{14}C -KW-110

—: N-acetylglutamine ···: glutamine
---: glutamic acid

110 投与後の尿中代謝物として尿素，グルタミンおよび N-アセチルグルタミンを同定したが，各代謝物の 48 時間目までの尿中への排泄量は Table III に示した。

血清中代謝物について

^{14}C -KW-110 投与での血清中の存在形態について経時的に測定した。まず血清中の放射能分布について測定した。結果は Fig. 6 に示すように，KW-110 投与群では血清中の放射能は投与後徐々に上昇し，Table I に示した結果ともよく一致していた。しかしグルタミン投与では投与後 1 時間目前後に最大分布が見られ，KW-110 に比べて速かに体内に吸収されていることが示された。しかし両物質とも TCA 可溶性分画中の放射能は時間経過とともに減少し，その傾向はグルタミン投与時に顕著に現われ，投与後 3 時間目では血清中放射能の約 10% のみ存在していた。TCA 可溶性分画中の代謝物を PPC で検討した結果，KW-110 投与群では N-アセチルグルタミン，グルタミンおよびグルタミン酸，グルタミン投与時ではグルタミンおよびグルタミン酸の存在を認め，これら血清中代謝物の定量を同位体逆希釈法で行なった。結果は Fig. 7 に示すように，KW-110 投与群では投与後 3 時間まで N-アセチルグルタミンが比較的高濃度に存在し，グルタミンおよびグルタミン酸の血清中濃度は一定濃度で長時間持続していることが認められた。

考 察

N-アセチルグルタミン-アルミニウム錯体化合物 (KW-110) のラットでの生体内運命について検討した。 ^{14}C -KW-110 500 mg/kg をラットに経口投与すると，放射能は呼気中に 73.2%，糞中に 16.2% および尿中に 8.4% が排泄されたが，アルミニウムはすべて糞中に排泄された。また放射能はすべての組織に分布していたが，アルミニウムは胃および腸管内にのみ検出され，他の組織および血液中には全く認められなかった。反転腸管を用い

た KW-110 の吸収実験でもアルミニウムの吸収が全く認められないことより、KW-110 の経口投与時ではアルミニウムの体内への吸収は起こっていないことを示唆している。一般にアルミニウムの胃腸管からの吸収はないものと考えられ、^{5,6)} また連続投与時での慢性毒性や組織への蓄積性はないものと考えられていた。しかし最近 Berlyne ら^{7,8)} は腎臓摘出ラットを用いてアルミニウムの毒性について検討し、アルミニウムは連続投与により少量ではあるが吸収され、組織内に蓄積する可能性があることを報告した。しかしこれに対する反論の報告もなされている。^{9,10)} このように、アルミニウムの吸収および毒性についてはまだ不明の点が多いが、Berlyne らも述べているように、現在用いられているアルミニウムの測定法、すなわち放射化分析、比色分析および原子吸光分析による分析方法ではその各測定値の間で大きな差が認められ、まず第一にアルミニウムの測定法の確立が望まれる。本報で著者らが用いた 8-hydroxyquinoline (オキシシン) による蛍光分析法は酸化分解したのちアルミニウムを測定する方法で、アルミニウムに特異的で、血液での感度は 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり J. W. Poole¹¹⁾ らの結果とほぼ同様であった。

KW-110 経口投与後 5—7 時間、アルミニウムが胃内に約 40% 留まっていることが認められた。一方、この間胃内の放射能は減少していることから、胃内では KW-110 はアルミニウムと放射能部分とに分離し、大部分はアルミニウムとして胃内に留まっていることが示唆された。この結果は従来よりアルミニウム製剤について考えられているアルミニウムの吸着作用、被覆作用、および胃酸中和作用による制酸剤としての作用機序と関連して興味もたれる。

KW-110 の経口投与後の尿および血中代謝物の確認結果および反転腸管での実験結果から KW-110 を経口投与した時、N-アセチルグルタミンとして吸収され、グルタミン、グルタミン酸へと順次代謝され、以後 Krebs 回路の基質となり、最終的には CO_2 として体外に排泄されるが、一部は尿素となって尿中に排泄される代謝様式が示唆された。KW-110 経口投与による血中放射能は投与後徐々に上昇し、投与後 7—12 時間目に最大分布を示し、グルタミンに比べて緩やかに吸収されることが示唆された。このような KW-110 の体内への緩徐な吸収は、KW-110 が体内に吸収されるためにはまず N-アセチルグルタミンとアルミニウムに分離する必要があることおよび田中ら⁸⁾ が報告しているように KW-110 には若干の胃運動抑制作用が認められていることなどに関連しているものと考えられる。この吸収形態は血清中代謝物の推移にも反映されている。すなわち、KW-110 投与後 N-アセチルグルタミンの最大分布は 3—5 時間目にあり、しかもグルタミン、グルタミン酸の血清中での濃度は投与後 1—7 時間において一定濃度に持続されていた。このような結果は現在検討中であるが、胃粘膜組織でのヘキソサミン合成の観点から潰瘍損傷部位の修復機作とも関連して興味もたれる。

謝辞 ¹⁴C-KW-110 および ¹⁴C-N-アセチルグルタミンの合成をしていただきました当社堺工場研究課 藤井恭一氏、また本研究に対し終始御助言いただきました田中研究室長始め生化学研究室内の各氏に厚く御礼申し上げます。

5) 原 三郎, 関 隆, 碓井 浩, 森 玄俊, 東京医科大学雑誌, 17, 1337 (1959).

6) 原 三郎, 関 隆, 碓井 浩, 中川路浩二, 森 玄俊, 東京医科大学雑誌, 17, 1345 (1959).

7) G.M. Berlyne, J. Ben-Ari, D. Pest, J. Weinberger, M. Stein, G.M. Gilmore, R. Levine, *Lancet.*, 2, 494 (1970).

8) G.M. Berlyne, *Lancet.*, 2, 1253 (1970).

9) O.M. Wrong, J.D. Swales, *Lancet.*, 2, 1130 (1970).

10) R. Verberckmoes, *Lancet.*, 1, 750 (1972).

11) J.W. Poole, L.A. Zeigler, M.A. Dugan, *J. Pharm. Science.*, 54, 651 (1965).