薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
97 (10) 1071-1081 (1977)

UDC 615.281.011.5.034:547.466.1.04

β -ラクタム系抗生物質の薬学的研究 (第 6 報¹⁾) 6-[D(-)- α -(4-Ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)phenylacetamido]penicillanic Acid (T-1220) の代謝について

才川 勇, 高井 明, 中島良文, 吉田長作, 保田 隆, 清水悦郎
酒井広志, 滝 秀雄, 田井 賢, 高下 寛,
富山化学工業株式会社 総合研究所²⁾

Studies on β -Lactam Antibiotics for Medicinal Purpose. VI.¹⁾ Studies on the Metabolism of 6-[D(-)- α -(4-Ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)-phenylacetamido]penicillanic Acid (T-1220)

ISAMU SAIKAWA, AKIRA TAKAI, YOSHIFUMI NAKASHIMA, CHOSAKU YOSHIDA,
TAKASHI YASUDA, ETSURO SHIMIZU, HIROSHI SAKAI, HIDEO TAKI,
MASARU TAI, and YUTAKA TAKASHITA
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.²⁾

(Received February 15, 1977)

Metabolism of 6-[D(-)- α -(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)phenylacetamido]penicillanic acid (T-1220), a new β -lactam antibiotic, was studied *in vivo* and *in vitro*. Only unchanged T-1220 was detected by bioautography in urine of human, monkeys, dogs, rats, and mice receiving T-1220 intramuscularly. When ¹⁴C-labeled T-1220 was administered to rats, most of the radioactive product was excreted unchanged in the urine, but two metabolites were detected in a minute amount by autoradiography. These metabolites were identified as ¹⁴C-labeled α -{3-[2-(N-ethyl-N-oxaloamino)ethyl]ureido}-benzylpenicillin (¹⁴C-T-1220A) and ¹⁴C-labeled α -(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)benzylpenicilloic acid (¹⁴C-T-1220B) by thin-layer chromatography, electrophoresis, and high-pressure liquid chromatography. Metabolism of ¹⁴C-T-1220 and its mechanism were studied by using high-pressure liquid chromatography for the separation and radioactive measurement for the determination. In the case of the intramuscular administration of ¹⁴C-T-1220 to rats, about 92% of the radioactivity was excreted unchanged in urine and bile, but about 94% of the radioactivity in the feces was ¹⁴C-T-1220B. The same results were found in rats pretreated with SKF-525A and phenobarbital. *In situ* studies showed that ¹⁴C-T-1220 changed to ¹⁴C-T-1220B in the intestinal tracts, and *in vitro* studies showed that ¹⁴C-T-1220 changed to ¹⁴C-T-1220B in fecal homogenate. From these results, it seemed that ¹⁴C-T-1220 was changed to ¹⁴C-T-1220B by β -lactamase produced from intestinal flora.

Keywords—synthesis of ¹⁴C-T-1220; metabolism of T-1220; TLC; HPLC; electrophoresis; bioautography; autoradiography

才川ら³⁾によって合成された 6-[D(-)- α -(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)phenylacetamido]penicillanic acid (T-1220) は aminobenzylpenicillin (AB-PC) のアミノ基に 4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarbonyl 基を導入した新規半合成ペニシリンである。

T-1220 の *in vitro* および *in vivo* での有効性については三橋ら⁴⁾により研究され、グラム陽性菌およびグラ

1) 第 5 報: 高野俊太郎, 吉田長作, 酒井広志, 山本芳子, 田井 賢, 保田 隆, 才川 勇, 薬誌, 97, 1064 (1977).

2) Location: 2-4-1, Shimookui, Toyama.

3) 才川 勇, 高野俊太郎, 吉田長作, 高島億太, 桃井海秀, 保田 隆, 加須屋興子, 小松美和子, 薬誌, 97, 980 (1977).

4) S. Mitsuhashi, I. Saikawa, T. Yasuda, *Prog. Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* 16 th. Chicago, Abstr., 1976, 349.

Chart 1

ム陰性菌に対して広範囲な抗菌スペクトルを有し、特にグラム陰性桿菌に対し強い抗菌力を示すことが報告されている。また著者らは T-1220 の吸収、排泄ならびに体内分布を bioassay 法⁵⁾ および radioassay 法⁶⁾ により検討した。その結果、T-1220 は経口投与ではほとんど吸収されないが、非経口的に投与した場合すみやかに吸収され、排泄も比較的速い薬物であることが判明した。

さらに著者ら^{7,8)} は T-1220 の水溶液中ならびに各種体液中の安定性について検討した結果、T-1220 は pH 5—6 で比較的安定であるが、より酸性側またはアルカリ性側では不安定であり、その分解パターンは Chart 1 のとおりである。

すなわち酸性溶液中では従来のペニシリンと同様 β-ラクタム環の開環体 α-(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazine-carboxamido) benzylpenicilloic acid (T-1220 B) ならびにその脱炭酸体 α-(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazine-carboxamido)benzylpenilloic acid (T-1220 D) が生成し、一方アルカリ性溶液中では T-1220 B のほか N-ethyl-2,3-dioxo-piperazine 環の導入による新しい分解物 α-{3-[2-(N-ethyl-N-oxaloamino)ethyl]ureido}benzylpenicillin (T-1220 A) および α-{3-[2-(N-ethyl-N-oxaloamino)ethyl]ureido}benzylpenicilloic acid (T-1220 C) が生成する

5) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀雄, 渡辺泰雄, 松原信之, 中川三千子, 金川心子, *Chemotherapy*, **25**, 801 (1977).

6) 才川 勇, 高井 明, 中島良文, 保田 隆, 清水悦郎, 酒井広志, 池上輝久, 高木多美子, *Jap. J. Antibiotics*, **30**, 571 (1977).

7) 才川 勇, 高野俊太郎, 吉田長作, 斉藤英二, 保田 隆, 酒井広志, 高下 寛, 山本芳子, 杉本由美子, 薬誌, **97**, 995 (1977).

8) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀雄, 渡辺泰雄, 加須屋興子, 安川久美子, 金川心子, *Chemotherapy*, **25**, 789 (1977).

ことを報告した。

今回著者らは以上の知見をもとにして T-1220 の代謝について検討を行ったので報告する。

実 験 の 部

使用化合物 T-1220, T-1220 A, T-1220 B および T-1220 C は前報¹⁾ で得たものをいずれもナトリウム塩(凍結乾燥)として用いた。

¹⁴C-T-1220 の合成 Chart 2 に示す経路で合成した。

¹⁴C-Diethyl Oxalate (II) の合成 ¹⁴C-Oxalic acid (1) 150 mg (1 mCi) を EtOH 1 ml に溶解し、氷冷下 SOCl₂ 0.33 ml を加え、室温で一晩放置した。さらに 2 hr 還流した後溶媒を留去した。残留物は *n*-hexane 1 ml で 3 回抽出し、抽出液を集め減圧下溶媒を留去し、II 220 mg (90.5%) を得た。赤外吸収スペクトル (IR) は標品に一致した。

¹⁴C-1-Ethyl-2,3-dioxopiperazine (III) の合成 N-Ethylethylenediamine 132 mg を EtOH 1 ml に溶かし、CO₂ (大過剰) を 1 hr 導入した。ついで II 220 mg の EtOH 1 ml 溶液を室温で添加し、同温度で 1 hr、約 50° で 1.5 hr 反応した。反応後減圧下で溶媒を留去し、残渣をアセトン 2 ml に溶解し、Silicagel カラム (Wako Gel C-200, 10 min i.d. × 100 mm) に付し、アセトン 50 ml で溶出した。溶出液を減圧乾固して mp 110° の白色結晶 140 mg (66%) を得た。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹, 3230, 3125 (NH), 1680—1660 (C=O)。

¹⁴C-6-[D(-)- α -(4-Ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamidó)phenylacetamido]penicillanic Acid Monohydrate (V) (¹⁴C-T-1220) の合成 III 140 mg を CH₂Cl₂ 1 ml に溶かし、室温で Me₃SiCl 0.15 ml を加えた後、-25—-30° に冷却し、Et₃N 0.17 ml を加え、-20—-25° で 30 min かきまぜた。次いで -30—-35° に冷却し、trimethyl chloroformate 0.07 ml の CH₂Cl₂ 1 ml 液を 5 min で滴下し、同温度で 1 hr かきまぜた。0° で減圧下溶媒を留去し、Et₃N·HCl を含む白色粉末 ¹⁴C-4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarbonyl chloride (IV) を得た。anhyd. AB-PC 0.34 g を CH₂Cl₂ 5.8 ml にけんだくし、これに氷冷下 Et₃N 0.29 ml を加えて溶解した。-5—-10° に冷却したのち IV の入った反応器内に移し、室温で 70 min かきまぜた。反応液は減圧下に溶媒を留去し、残渣に H₂O 4 ml を加え不溶物をろ別後、AcOEt 5 ml を加え、かきまぜながら 2 N HCl を添加し、pH 1.5—2.0 に調整した。AcOEt 層を分取し、H₂O 3 ml で 2 回洗浄した後、H₂O 3 ml を加え、室温で 3 hr かきまぜ、析出した結晶をろ取した。H₂O, iso-PrOH およびエーテルそれぞれ約 2 ml で順次洗浄し、白色プリズム状晶 240 mg (45%) を得た。

mp 154—155° (dec.) 比放射能 1.1 μ Ci/mg, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1765, 1710—1630 (C=O)。本物質の放射化学的純度は薄層クロマトグラフィー (TLC) で検討した結果 95% 以上であった。

なお実験には ¹⁴C-T-1220 に非標識 T-1220 を適宜加えることにより希釈し、NaHCO₃ で中和しナトリウム塩として使用した。

ヒトおよび実験動物 被験者は年令 25—35 才の健康男子、体重 50—75 kg であった。⁹⁾

マウスは ddY 系雄性、体重約 25 g, ラットは Wistar 系雄性、体重約 200 g, イヌはビーグル犬雄性、体重約 10 kg, サルはカニクイザル雄性、体重約 5 kg を用いた。

フェノバルビタール処理ラットはフェノバルビタールナトリウム 50 mg/kg を 1 日 1 回、4 日間連続腹腔内投与し、最終投与 24 hr 後実験に供した。

SKF 525 A 処理ラットは SKF 525 A 50 mg/kg を実験 1 hr 前に腹腔内投与し実験に供した。

なお、フェノバルビタール、SKF 525 A 処理の効果はペントバルビタールナトリウム 35 mg/kg を腹腔内投

9) 本実験の内容を十分に把握し承諾したボランティアのうち医師が健康であると認めた人に医師の監督下で本実験を行なった。

与し、その睡眠時間の短縮あるいは延長により確認した。

薬物投与 ヒトの場合は T-1220 1 g を注射用蒸留水 4 ml に用時溶解し、臀部に筋肉内投与した。

動物に投与する場合は T-1220 1 g を生理食塩水 4 ml に用時溶解し、20 mg/kg を大腿部に筋肉内投与あるいは静脈内投与した。

^{14}C -T-1220 の場合は NaHCO_3 を加えた生理食塩水に用時溶解し、20 mg/kg をマウスでは背部皮下投与、ラットの場合は筋肉内投与、静脈内投与および胃ゾンデを用いて経口投与した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 1) セルロース——吸着剤としてアビセル SF (フナコシ薬品) を用い厚さ 0.25 mm の薄層を作成し、一夜風乾後使用した。展開溶媒として $n\text{-BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:1:5) の上層を用いた。

2) シリカゲル——市販 (メルク社) のシリカゲルプレートを用い展開溶媒として a) $\text{AcOBu}:\text{AcOH}:\text{iso-PrOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:5:2:3), b) $\text{AcOBu}:\text{AcOH}:\text{acetone}:\text{H}_2\text{O}$ (10:6:3:4), c) $\text{AcOEt}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:3:3) を用いた。検出はヨウ素蒸気および *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする bioautography により行った。なお bioautography に際してはセルロースの場合は溶媒風乾後直ちに、またシリカゲルの場合は溶媒風乾後 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を噴霧したのち常法により行った。

また ^{14}C -T-1220 の場合はオートラジオグラフィーにより放射活性物質の検出を行った。

フィルムはサクラ X 線用 Type N を用い、2 週間露出後常法に従って現像した。

フィルムの黒化度からの半定量はデントメーター (富士理研 FD-AIV 型) を使用して行った。

高圧ろ紙電気泳動 富士理研、高圧ろ紙電気泳動装置 P-N 型を用い、泳動溶媒として 1) pyridine: $\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (100:4:900) pH 6.5, 2) 0.1 M リン酸緩衝液 pH 6.5 を用い、80 v/cm, 40 min 泳動し、検出は TLC と同様に行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 島津デュポン高速液体クロマトグラフ 830 型を用い、カラムは Zipax SAX 2.1 mm.i.d. $\times$ 1 m, カラム温度: 室温, 内部標準物質として *o*-クレゾール 1 mg/ml 溶液を用い、溶出方法は $2.5 \times 10^{-5}\text{M}$ NaClO_4 (pH 6.5) から $2.5 \times 10^{-2}\text{M}$ NaClO_4 (pH 6.5) への Concave gradient を用い、流量約 1.0 ml/min とし、紫外吸収スペクトル (UV) 検出波長は 220 nm を使用した。なお ^{14}C -T-1220 の場合は試料に等容量のキャリア溶液 (T-1220, T-1220 A, T-1220 B および T-1220 C それぞれ 2 mg/ml を含有) を加え、UV で検出すると同時に 1 min ごとに溶出液を放射能測定用バイアルに採取し、各分画の放射能を測定した。

放射能の測定 液体シンチレーションカウンタは Aloka LSC 601 型、シンチレーターはジオキサン系を使用した。また計数効率は外部標準線源法により求めた。

尿中代謝物の検索 T-1220 をヒトおよび各種動物に、また ^{14}C -T-1220 をラットおよびマウスに投与したのち、それぞれ 6 hr までの尿を採取し、TLC および HPLC により代謝物の検索を行なった。

尿中、胆汁中および糞中代謝物の同定 ラットに ^{14}C -T-1220 を筋肉内投与したのち、6 hr までの尿および胆汁、24 hr までの糞を採取し、代謝物の同定を試みた。

a) 尿の場合——採取した尿を減圧下に濃縮したのち、TLC の項に記した 1) の条件下で展開後、薄層クロマトスキャンナー (Aloka MB-1 型) で代謝物の位置を確認したのち各分画をけずり取り、水で抽出した。抽出液は減圧下に濃縮し、再度 TLC および HPLC、電気泳動に付し標品と比較することにより代謝物の同定を試みた。

b) 胆汁の場合——採取した胆汁を直接 TLC および HPLC に付し、標品と比較検討を行った。

c) 糞の場合——採取した糞に 4 倍量 (v/w) の水を加え、氷冷下ホモジナイズした。つぎに最終濃度が 80% になるように EtOH を加え再びホモジナイズしたのち、3000 rpm, 10 min 遠心分離し、上澄液を減圧下で濃縮後 TLC および HPLC に付し胆汁の場合と同様検討を行った。

尿中、胆汁中および糞中代謝物の定量 ^{14}C -T-1220 をラットに経口、筋肉内あるいは静脈内投与した場合およびマウスに背部皮下投与した場合の尿中、胆汁中および糞中に排泄された各代謝物を HPLC と液体シンチレーションカウンターの併用により測定した。

尿の採取はマウス、ラットともに投与後 6 hr まで、胆汁の採取はラットの場合は 6 hr までの胆汁を総胆管カニューレションにより採取し、マウスの場合は投与後 2 hr で屠殺し胆のうより直接採取した。なお採取した尿、胆汁は直接 HPLC に付した。糞の採取はマウス、ラットともに投与後 24 hr 行ない、代謝物の同定の項に記した処理を施したのち HPLC に付した。

組織ホモジネートによる代謝の検討 ラットを頸動脈切断により放血死させ、肝臓、腎臓および小腸を摘出し、それぞれ 4 倍量 (v/w) の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えホモジナイズした。このホモジネートを 2 部に分け、1 部は 100° , 5 min の熱処理を行ない、1 部は何ら処理は施さなかった。それぞれのホモジネート 1 ml に ^{14}C -T-1220 1 mg/ml 溶液 1 ml を加え、 37° , 60 min incubation した。Incubation 終了後、EtOH 8 ml を加え反応を止めた後、3000 rpm, 10 min 遠心分離した。上澄液は減圧下濃縮乾固し、残留物に水 0.5 ml を加え溶解したのち、糞中代謝物の場合と同様に代謝物の同定および定量を行なった。

消化管内における代謝の検討 ラットを 16 hr 絶食したのちエーテル麻酔下開腹し、胃および盲腸は全体、空腸部、回腸部および大腸部は両端を結紮し約 10 cm のループを作成した。これらのループ内に ^{14}C -T-1220 1 mg/ml 溶液 0.5 ml を注入したのち開腹部を縫合し 4 hr 放置した。放置後各ループを取り出し内容物を 0.1 M

リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後 EtOH 10 ml を加え 3000 rpm, 10 min 遠心分離したのち、糞中代謝物の場合と同様に代謝物の同定および定量を行った。

糞ホモジネートによる代謝の検討 イヌの新鮮糞に 9 倍量 (v/w) の 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてホモジネートを作製した。このホモジネートを 3 部に分け 1 部は 100°, 5 min の熱処理を行い、1 部は 4 倍量 (v/w) の EtOH を加えた後減圧下に濃縮し、EtOH を留去後水を加えて最初の容量にした。

また残りの 1 部は何ら処理はしなかった。それぞれのホモジネート溶液 1 ml に ^{14}C -T-1220 1 mg/ml 溶液の 1 ml を加え、37°, 60 min incubation したのち糞中代謝物の場合と同様に代謝物の同定および定量を行った。

糞中細菌の β -Lactamase 活性の検討 イヌの新鮮糞に 5 倍量 (v/w) の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてホモジネートを作製した。このホモジネートを超音波発生装置 (トミー精工製 Model UR-200 p) を用い 15 min 超音波処理を行ったのち、10000 rpm, 20 min 冷凍遠心 (Kubota KR-200 A) を行った。このようにして得た上澄液を 3 等分し糞ホモジネートと同様、熱処理、EtOH 処理および無処理のものについて T-1220, benzylpenicillin (PC-G) および AB-PC に対する β -lactamase 活性を Perret ら¹⁰⁾ のヨウ素滴定法により測定した。

結 果

Bioautography による尿中抗菌活性代謝物および分解物の検討

Fig. 1 に T-1220 をヒトおよび各種動物に投与した場合の bioautogram の 1 例を示す。

T-1220 以外に抗菌活性物質は認められなかった。

しかし Fig. 2 に示すようにアルカリ性の尿 (採尿時 pH 7.2) を室温に一夜放置した場合には T-1220 の他に抗菌力のある分解物 [I] を認めた。

この分解物 [I] は各種条件下で TLC を行ったところ T-1220 A に一致した。

HPLC およびオートラジオグラフィーによる尿中代謝物の検討

Fig. 3 に T-1220 を投与したイヌおよびヒト尿の HPLC の結果を示す。

ヒトの場合は未変化の T-1220 以外のピークは認められなかったが、イヌの場合わずかに代謝物 [I] および [II] (M-1, M-2) が検出され、その retention time から T-1220 A および T-1220 B と推定した。

一方、 ^{14}C -T-1220 を投与したラット尿の TLC を行ったのち、オートラジオグラフィーにより代謝物の検索を行い、その黒化度をデンストメータで測定した結果を Fig. 4 に示す。

ほとんど T-1220 であるが、わずかに M-1 および M-2 が検出された。

^{14}C -T-1220 投与したラット尿中、胆汁中および糞中代謝物の同定

^{14}C -T-1220 を投与したラット尿中、胆汁中および糞中代謝物を各種条件下で TLC を行った結果を Table I に示す。

Fig. 1. Bioautogram of Urine of Human and Various Animals after Intramuscular Administration of T-1220

Sample: 1, T-1220; 2, dog; 3, mouse; 4, rat; 5, human; 6, monkey. TLC condition: plate, cellulose; solvent system, n -BuOH-AcOH- H_2O (10: 1: 5). Test organism: *Bacillus subtilis* ATCC6633.

Fig. 2. Bioautogram of Degradation Products in Urine of Human after Intramuscular Administration of T-1220

Sample: 1, T-1220A; 2, T-1220; 3, human urine (standing for 24 hrs at room temperature). TLC condition is the same as in Fig. 1.

10) C.J. Perret, *Nature* (London), **174**, 1012 (1954).

Fig. 3. High Pressure Liquid Chromatograms of Urine after Intramuscular Administration of T-1220 in Human (a) and Dog (b)

HPLC condition: column, Zipax SAX 1 m $\times$ 2.1 mm, i.d.; column temperature, room temperature; mobile phase, concave gradient 2.5×10^{-5} M NaClO_4 (pH 6.5) to 2.5×10^{-2} M NaClO_4 (pH 6.5); flow rate, about 1 ml/min; detector, UV photometer at 220 nm.

尿中, 胆汁中および糞中に排泄された代謝物はそれぞれ同様な R_f 値を示した. そこで尿について TLC の項 1) の条件で TLC を行ったのち, M-1 および M-2 をかきとり, 抽出し, 再度 TLC に付し標品と比較検討した結果を Table II に示す.

M-1 および M-II の R_f 値はそれぞれ標品の T-1220 A および T-1220 B に一致した.

さらに Fig. 5, 6 に示したように HPLC および電気泳動の結果も標品の T-1220 A, T-1220 B に一致した. なお, HPLC および電気泳動の結果から濃縮操作中に分解して生成したと考えられるわずかな ^{14}C -

Fig. 4. Densitometric Scannogram of Autoradiogram of Urine after Intramuscular Administration of ^{14}C -T-1220 in Rat

TLC condition is the same as in Fig. 1.

TABLE I. R_f Values of Standard Sample and Excreted Radioactive Metabolites of ^{14}C -T-1220

TLC Sample	1	2	3
Urine (Rat)	0.84	0.49	0.56
	0.57	0.21	0.36
	0.46		
Bile (Rat)	0.85	0.50	0.54
	0.59	0.20	0.37
	0.47		
Feces (Rat)	0.86	0.51	0.55
	0.59	0.22	0.36
	0.46		
T-1220	0.85	0.50	0.55
T-1220A	0.47	0.20	0.35
T-1220B	0.53	0.21	0.37
T-1220C	0.32	0.09	0.19

TLC condition: 1) plate, cellulose; solvent system, $\text{BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (10: 1: 5). 2) plate, silicagel; solvent system, $\text{AcOBu-AcOH-iso-PrOH-H}_2\text{O}$ (10: 5: 2: 3). 3) plate, silicagel; solvent system, $\text{AcOBu-AcOH-acetone-H}_2\text{O}$ (10: 6: 3: 4). Detection: I_2 vapor, radiochromatogram scanning.

TABLE II. *R_f* Values of Standard Sample and Urinary Metabolites (M-1, M-2) of ¹⁴C-T-1220

Solvent system Sample	1	2	3
M-1	0.22	0.19	0.35
M-2	0.25	0.19	0.37
Standard			
T-1220	0.35	0.50	0.55
T-1220A	0.23	0.19	0.35
T-1220B	0.25	0.20	0.37
T-1220C	0.12	0.09	0.19

TLC condition: plate, silicagel; solvent system, 1) AcOEt-EtOH-H₂O (9: 3: 3). 2) AcOBu-AcOH-iso-PrOH-H₂O (10: 5: 2: 3). 3) AcOBu-AcOH-acetone-H₂O (10: 6: 3: 4). Sample: M-1, extract from *R_f* value 0.46 separated by TLC (condition 1 of Table I); M-2, extract from *R_f* value 0.57 separated by TLC (condition 1 of Table I). Detection is the same as in Table I.

Fig. 5. High Pressure Liquid Chromatograms of Standard Sample (1) and Urinary Metabolites (2, 3) of ¹⁴C-T-1220

HPLC condition is the same as in Fig. 3.
Sample: shown in Table I.

Fig. 6. Electrophoresis of Standard Sample (1) and Urinary Metabolites (2, 3) of ¹⁴C-T-1220

Electrophoresis condition: paper, Toyo roshi No. 51; solvent system, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5); voltage, 80 V/Cm; detection, ⊙: I₂ vapor peak; radiochromatogramscanning.

T-1220 C が検出された。

また採取した尿、胆汁および糞にキャリア溶液を加えたのち HPLC に付し、T-1220, T-1220 A および T-1220 B の分画を採取し、電気泳動に付したところ、各分画は放射化学的に単一物質であることを確認した。

¹⁴C-T-1220 を投与した場合の尿中、胆汁中および糞中代謝物の HPLC による定量

¹⁴C-T-1220 をラットおよびマウスに投与した尿中、胆汁中および糞中代謝物を定量した結果を Table III に、またそのときの HPLC の 1 例を Fig. 7 に示す。

ラットに筋肉内投与あるいは静脈内投与した場合およびマウスに背部皮下投与した場合、尿中および胆汁中に排泄された放射能の大部分は未変化の ¹⁴C-T-1220 であり、¹⁴C-T-1220 A および ¹⁴C-T-1220 B はわずかに検出されたにすぎなかった。一方、経口投与した場合、尿中および胆汁中に排泄された放射能は非常に少なく、投与

TABLE III. Excretion of ^{14}C -T-1220 and Its Metabolite in Urine, Bile and Feces

Animal		Rat									Mouse	
Administration route		<i>i.v.</i>			<i>i.m.</i>			<i>p.o.</i>			<i>s.c.</i>	
Excretion route		Urine (0— 6 hr)	Bile (0— 6 hr)	Feces (0— 24 hr)	Urine (0— 6 hr)	Bile (0— 6 hr)	Feces (0— 24 hr)	Urine (0— 6 hr)	Bile (0— 6 hr)	Feces (0— 24 hr)	Urine (0— 6 hr)	Bile (0— 2 hr)
Recovery ^{a)}		20.4 ^{b)}	75.3	78.3	26.2	71.7	72.7	1.7	3.0	97.1	30.6	—
Products ratio	^{14}C -T-1220	94.0 ^{c)}	93.1	4.2	92.9	92.2	5.1	83.9	69.4	17.4	92.8	92.0
	^{14}C -T-1220A	2.0	2.1	3.5	2.4	3.2	1.1	3.1	3.6	1.8	2.8	3.2
	^{14}C -T-1220B	2.9	3.2	91.3	3.3	2.2	93.5	11.3	24.5	77.7	3.7	3.8
	^{14}C -T-1220C	0.1	0.4	0.3	0.1	0.9	0.1	0.1	0.8	1.2	0.1	0.1

a) Recovery of radioactive product. b) % of dose. c) % of recovery.

Fig. 7. High Pressure Liquid Chromatogram of Urine after Intramuscular Administration of ^{14}C -T-1220 in Rat

HPLC condition is the same as in Fig. 3.

無処理の場合とほぼ同様でフェノバルビタールおよび SKF 525 A 処理による影響はほとんどみられなかった。

^{14}C -T-1220 の消化管内での代謝

Table V にラットの消化管各部位での ^{14}C -T-1220 の代謝について検討した結果を示す。

胃内および回腸内ではほとんど代謝されなかったが、空腸内、盲腸内および大腸内では ^{14}C -T-1220 は代謝され ^{14}C -T-1220 B になることが認められた。

量の 1.7% および 3% でその大部分は ^{14}C -T-1220 であったが、10—20% の ^{14}C -T-1220 B も検出された。しかし糞中に排泄された放射能には未変化体がほとんど存在せず、大部分 ^{14}C -T-1220 B であり、わずかに ^{14}C -T-1220 A および ^{14}C -T-1220 C が検出された。

フェノバルビタールおよび SKF 525 A 処理ラットにおける尿中代謝物の HPLC による定量

Table IV にフェノバルビタールおよび SKF 525 A 処理ラットに ^{14}C -T-1220 を投与した場合の HPLC による尿中代謝物の測定結果を示す。

各処理群のフェノバルビタールの睡眠時間にはフェノバルビタールおよび SKF 525 A 処理の効果は明らかに認められたが、 ^{14}C -T-1220 を投与した場合の尿中、胆汁中および糞中代謝物のパターンは

TABLE IV. Effect of Pretreatment of SKF525A and Phenobarbital on Excretion of ^{14}C -T-1220 and Its Metabolites in Rat

Products	Control	SKF525A	P.B
^{14}C -T-1220	94.07 ± 1.52 ^{a)}	94.87 ± 0.80	94.43 ± 1.02
^{14}C -T-1220A	1.60 ± 0.18	0.67 ± 0.18	0.73 ± 0.41
^{14}C -T-1220B	3.80 ± 0.85	3.13 ± 0.15	4.13 ± 0.62
^{14}C -T-1220C	1.07 ± 0.72	0.33 ± 0.18	0.43 ± 0.43
Hours of sleep (min)	55.00 ± 3.52 ^{b)}	415.00 ± 50.00 ^{c)}	7.33 ± 2.33 ^{c)}

a) % of recovery, mean ± S. E. b) Mean ± S. E. (n=3). c) $p < 0.01$.

TABLE V. Metabolism of ^{14}C -T-1220 in Gastro-Intestinal Tracts in Rat

Products	Stomach	Jejunum	Ileum	Caecum	Crassum
^{14}C -T-1220	97.25 ^{a)}	67.03	95.90	52.91	97.81
^{14}C -T-1220A	0.92	0.73	0.69	2.23	0.70
^{14}C -T-1220B	1.83	30.53	3.41	43.37	1.49
^{14}C -T-1220C	— ^{b)}	1.71	—	1.49	—

a) Results are expressed as percent of recovery. b) Not detected.

TABLE VI. Metabolism of ^{14}C -T-1220 with Rat Tissue Homogenate

Products	Liver		Kidney		Intestine	
	A	B	A	B	A	B
^{14}C -T-1220	93.3	97.3	93.2	96.5	97.1	97.3
^{14}C -T-1220A	2.1	0.8	1.1	1.4	0.7	1.4
^{14}C -T-1220B	3.5	2.0	4.7	1.9	1.8	1.3
^{14}C -T-1220C	0.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Results are expressed as percent of recovery. A, not treated; B, heat treated (100°, 5 min).

TABLE VII. Metabolism of ^{14}C -T-1220 with Dog Feces Homogenate

Products	A	B	C
^{14}C -T-1220	0.1	94.5	93.2
^{14}C -T-1220A	0.2	1.2	2.2
^{14}C -T-1220B	98.1	3.2	3.4
^{14}C -T-1220C	1.1	0.1	0.1

Results are expressed as percent of recovery. A, not treated; B, heat treated (100°, 5 min), C, EtOH treated.

^{14}C -T-1220 の組織ホモジネートによる代謝の検討

ラットの肝臓、腎臓および小腸ホモジネートによる ^{14}C -T-1220 の代謝について検討した結果を Table VI に、またその時 HPLC の 1 例を Fig. 8 に示す。

いずれの組織ホモジネートにおいても無処理の場合も、熱処理の場合もほぼ同様な結果が得られ、 ^{14}C -T-1220 の代謝はほとんど認められなかった。

^{14}C -T-1220 の糞ホモジネートによる代謝の検討

熱処理、EtOH 処理および無処理のイヌの糞ホモジネートによる ^{14}C -T-1220 の代謝について検討した結果を Table VII に示す。

熱処理および EtOH 処理した場合、 ^{14}C -T-1220 はほとんど代謝されないが無処理の場合 ^{14}C -T-1220 は代謝され、ほとんどが ^{14}C -T-1220 B になることが認められた。

Fig. 8. High Pressure Liquid Chromatogram of ^{14}C -T-1220 incubated with Rat Liver Homogenate

HPLC condition is the same as in Fig. 3.

TABLE VIII. β -Lactamase Activity of Dog Feces Homogenate

	T-1220	AB-PC	PC-G
β -Lactamase activity ^{a)}	4.3	4.6	1.4
unit/ml ^{b)}	(307)	(329)	(100)

a) Unit/ml. b) Relative activity (Pc-G=100).

糞中細菌の β -Lactamase 活性の検討

糞中細菌の T-1220, PC-G, および AB-PC に対する β -lactamase 活性の測定結果を Table VIII に示す。

T-1220, PC-G および AB-PC は糞中細菌の産生する β -lactamase により失活することが認められた。また、この酵素溶液の β -lactamase 活性は熱処理あるいは EtOH 処理することにより消失した。

考 察

ヒトおよび種々の動物に T-1220 を投与した場合、尿中に排泄される抗菌活性物質は種々の条件下で TLC を行った結果、未変化体の T-1220 のみであった。しかしアルカリ性を示す尿を室温に放置した場合、T-1220 の他に T-1220 A が認められた。これは先に著者らが報告した水溶液中の T-1220 の変化と同様、尿中に排泄された T-1220 が二次的に分解して T-1220 A が生成したものと推定される。

一方、ラットに ^{14}C -T-1220 を投与した場合の尿を TLC で分離後オートラジオグラフィーを行ったところ、 ^{14}C -T-1220 以外に M-1 および M-2 が認められた。また胆汁および糞中にも同様な代謝物が認められ、各代謝物を標品と TLC, HPLC および電気泳動により比較検討したところ、それぞれ T-1220 A および T-1220 B に一致した。なお各代謝物の同定の際、わずかな T-1220 C も検出されたが、これは抽出操作あるいは濃縮操作中に、T-1220 A および T-1220 B が分解したものと推定される。

つぎにこれらの代謝物の定量的取り扱いを試みた。従来ペニシリン系抗生剤の代謝物の定量的取り扱いはヨウ素滴定法によるラクタム開環体の定量¹¹⁾あるいは ^{14}C 等の標識化合物を用い、溶媒抽出法または TLC による定量法¹²⁾がとられてきた。T-1220 の場合も同様、これらの方法を試みたがヨウ素滴定では定量値にバラツキが大きく、また TLC による定量法では時間がかかり、またその精度には難点がみられた。そこで著者らは T-1220 の水溶液中の分解の検討に用いた HPLC の迅速かつ高い分離能および放射能測定の定量性とを併用することを試みた。すなわち尿、胆汁については直接分析することが可能であり、糞および組織ホモジネートについては実験の部に記したような簡単な前処理を行うことにより分析可能であり、従来の測定法に比較し未変化体およびその代謝物を精度よく定量することができた。この測定方法によりラットおよびマウスに ^{14}C -T-1220 を投与した場合の尿中、胆汁中および糞中の代謝物を定量した結果、いずれの場合も尿中および胆汁中に排泄される放射能は大部分が未変化の ^{14}C -T-1220 であり、わずかに ^{14}C -T-1220 A および ^{14}C -T-1220 B が認められるにすぎなかった。しかし糞中に排泄された放射能には未変化の ^{14}C -T-1220 はほとんどなく大部分が ^{14}C -T-1220 B であった。フェノバルビタールおよび SKF 525 A 処理ラットにおいても代謝物のパターンは同様であった。さらに組織ホモジネートと incubation した場合にも代謝物が認められなかったことから、 ^{14}C -T-1220 は薬物代謝酵素により代謝されないものと推定した。つぎに消化管各部位での代謝を検討したところ、盲腸内および大腸内ではかなり変化することを認めた。またイヌの糞ホモジネートと 1 hr incubation した場合にも ^{14}C -T-1220 はほとんど ^{14}C -T-1220 B になることが認められ、この変化は糞ホモジネートを EtOH 処理あるいは熱処理した場合、全く認められなかったことから糞中細菌の β -lactamase によるものと推定した。そこでこの糞中細菌の β -lactamase 活性を Perret らの方法により測定したところ、T-1220 に対しては 4.3 unit/ml, PC-G に対しては 1.4 unit/ml, AB-PC に対しては 4.6 unit/ml であり、いずれも糞中細菌の β -lactamase により加水分解されることが認められた。

11) M. Cole, M.D. Kening, V.A. Hewitt, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **3**, 463 (1973).

12) Y. Nakai, Y. Shirakawa, T. Fujita, Z. Suzuoki, T. Fugono, *Xenobiotica*, **2**, 147 (1972).

つぎに T-1220 A, T-1220 B および T-1220 C 以外の代謝物について検討した. Cole ら¹¹⁾ は PC-V あるいは AB-PC をヒトに投与した場合, 尿中にわずかながら 6-APA として排泄されることを報告している. T-1220 についても同様, 検討したが 6-APA の産生は認められなかった. また HPLC に付した試料の回収率は ¹⁴C-T-1220, ¹⁴C-T-1220 A, ¹⁴C-T-1220 B および ¹⁴C-T-1220 C の分画を合わせるとほぼ 100% になり他の代謝物はほとんどないものと思われる.