4'-Chloro-5-methoxy-3-biphenylacetic Acid (DKA-9) のラットにおける代謝
および抗炎症作用に関する研究¹⁾

杉山 信, 奥山義男, 吉本吉彦
日本新薬総合研究所²⁾

Studies on the Metabolism of 4'-Chloro-5-methoxy-3-biphenylacetic Acid (DKA-9)
in Rat and the Anti-inflammatory Activity of DKA-9 and Its Metabolites¹⁾

MAKOTO SUGIYAMA, YOSHIO OKUYAMA and YOSHIHIKO YOSHIMOTO

Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.²⁾

(Received May 25, 1977)

The metabolic fate of 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetic acid (DKA-9), a newly developed anti-inflammatory drug, was examined in rats after intravenous administration of ¹⁴C-DKA-9. It was found that DKA-9 was metabolised mainly through two major pathways, glucuronide formation and demethylation followed by sulfate formation. The metabolites in urine and bile were fractionated by the combination of solvent extraction and preparative thin-layer chromatography. Five metabolites were detected and the structure of these metabolites was investigated from spectral and elemental analysis data. The major metabolites were identified as potassium 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetic acid O-sulfate (72.4% of the dose in 24 hr) in urine, 1-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetoxyl)glucuronic acid (28.0% of the dose in 6 hr) in bile, and DKA-9 (5.2% of the dose in 48 hr) in feces, and the minor metabolites were also identified as 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetic acid, 2-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl)-2-hydroxyacetic acid and (4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetyl)glycine.

The anti-inflammatory action of DKA-9 and its metabolites were also investigated by the inhibition of carrageenin-induced edema. There was no active metabolite and, therefore, the anti-inflammatory effect of DKA-9 in the rat seemed to be due to the action of DKA-9 itself.

Keywords—anti-inflammatory drug; metabolism; mass spectrometry; identification; edema; carrageenin

DKA-9 は吉本ら³⁾ によって合成された強い鎮痛, 抗炎症作用を有する非ステロイド系の薬物である。⁴⁾ この薬物の吸収, 分布および排泄については ¹⁴C で標識した DKA-9 を用いて検討を行なったところ,⁵⁾ ラットにおいて投与した ¹⁴C-DKA-9 の 80% 以上の放射活性が尿中に排泄されるにもかかわらず DKA-9 のまま排泄された量は微量で本薬物は代謝を受けやすい薬物であることが明らかとなった。

本報では合理的な製剤設計を行なうための検討の一環としてラットを用いた代謝および抗炎症作用発現物質について検討を行なったので報告する。

実 験 の 部

1. 試験化合物 DKA-9 は吉本ら³⁾ による合成品を用い, 標識化合物は市販の K¹⁴CN を用いてカルボン酸部分を標識したもの⁶⁾ (32 μ Ci/mg) を適宜無標識の DKA-9 で希釈して用いた。

2. 代謝物の合成標品 (4'-Chloro-5-methoxy-3-biphenylacetyl)glycine (I) の合成——1) 4'-Chloro-5-

1) 日本薬学会第 96 年会で発表, 名古屋, 1976 年 4 月。

2) Location: Hachijyo-Sagaru, Nishioji-Dori, Minami-ku, Kyoto.

3) Y. Tamura, Y. Yoshimoto, K. Kunimoto, S. Tada, T. Tomita, T. Wada, E. Seto, M. Murayama, Y. Shibata, A. Nomura, K. Ohata, *J. Med. Chem.*, **20**, 709 (1977).

4) Y. Shibata, A. Nomura, K. Ohata, *Jpn. J. Pharmacol.*, **24**, 138 (1974).

5) 日本薬学会第 95 年会で発表, 西宮, 1975 年 4 月。

methoxy-3-biphenylacetyl chloride (II): DKA-9 2.00 g に SOCl_2 10 ml を加え 2 時間還流後、溶媒を減圧下に留去する。油状の残渣を CHCl_3 -*n*-hexane で再結晶し II を無色砂状晶として得た。mp 80—83°, 966 mg.

2) I: NaOH 366 mg を蒸留水 15 ml に溶かした溶液に glycine 343.3 mg を溶解させたのち氷水-食塩浴で冷却下激しく攪拌しながら II 900 mg を徐々に加える。4.5 時間攪拌後 10% HCl で酸性として析出する結晶をろ取、10% HCl、蒸留水で洗浄、乾燥して粗結晶を得た。EtOH-*n*-hexane で再結晶を行ない無色雲状結晶 645 mg を得た。mp 160—162°. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$: C, 61.18; H, 4.83; N, 4.20. Found: C, 61.11; H, 4.64; N, 4.11.

2-(4'-Chloro-5-methoxy-3-biphenyl)-2-hydroxyacetic Acid (III) の合成——1) Methyl 2-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl)-2-oxo-acetate (IV): Methyl 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetate 10 g と SeO_2 5.73 g を混合し 190—200° で 3.5 時間加熱する。冷後 EtOH-dioxane 混液を加え不溶物をろ過して除去した。ろ液を活性炭処理後溶媒を留去して褐色油状物質を得た。これを ether-*n*-hexane で再結晶して IV を無色針状結晶として得た。mp 96—97°, 7.2 g. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClO}_4$: C, 63.06; H, 4.30; Cl, 11.64. Found: C, 63.31; H, 4.35; Cl, 11.57.

2) Methyl 2-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenyl)-2-hydroxyacetate (V): IV 1.01 g を MeOH 20 ml と diglyme 10 ml に溶解し NaBH_4 63.3 mg を加え 0° で 4 時間攪拌する。dil.HCl を加え pH 4—6 に調整し溶媒を減圧下に留去する。残渣を ether で抽出し、ether 層は水洗し MgSO_4 乾燥後 ether を留去する。残留した結晶を ether で再結晶して V を無色粉末として得た。mp 140—141°, 620 mg. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClO}_4$: C, 62.65; H, 4.93; Cl, 11.56. Found: C, 62.84; H, 5.01; Cl, 11.62.

3) III: V 500 mg を 5% NaOH 30 ml と MeOH 30 ml の混液に溶解し、2.5 時間水浴上で還流する。MeOH を減圧下に留去し、水層を ether で抽出する。Ether 層は水洗し、 MgSO_4 で乾燥後 ether を留去する。残留した無色結晶を ether-*n*-hexane で再結晶し III を無色粉末状結晶として得た。mp 135—136°, 370 mg. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClO}_4$: C, 61.55; H, 4.48; Cl, 12.11. Found: C, 61.62; H, 4.67; Cl, 12.02. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 3380, 1710, 1590, 820.

Potassium 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetic Acid O-Sulfate (VI) の合成——乾燥した pyridine 50 ml 中に氷冷しながら ClSO_3H 3.53 g を滴下、50° に加温後 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetic acid (DKA-24)³⁾ 4.75 g を加え 1 時間攪拌する。冷後 5N KOH 60 ml に反応液を加えたのち氷冷しながら HCl で pH 2—3 にして析出する沈殿物質をろ取し、水洗後 EtOH- H_2O で再結晶をくりかえし板状結晶として VI を得た。mp 126—210° (dec.), 1.67 g. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClKO}_6\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 42.16; H, 3.03; S, 8.04. Found: C, 42.28; H, 2.81; S, 8.16. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 3400, 3000—2500, 1700, 1600, 1280—1200, 1060, 825.

Methyl 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-(4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetyl)- β -D-glucuronate (VII) の合成——DKA-9 の K 塩 0.79 g と methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-1-bromo-1-deoxy- α -D-glucuronate⁶⁾ 0.99 g を acetone 25 ml に加え 7 時間還流後室温で一夜放置する。acetone を減圧下に留去し、得られた残渣に CHCl_3 を加える。蒸留水を加え分層後 CHCl_3 層を飽和 NaHCO_3 液、蒸留水で洗浄し MgSO_4 で乾燥後溶媒を留去する。得られた黄色残渣を CHCl_3 -ether で再結晶し無色針状結晶として VII を得た。mp 163—165°, 0.25 g. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{ClO}_{12}$: C, 56.71; H, 4.93; Cl, 5.98. Found: C, 56.63; H, 4.76; Cl, 6.18.

(4'-Chloro-5-carboxymethyl-3-biphenyl)- β -D-glucopyranosiduronic Acid (VIII) の合成——1) Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-1-O-(4'-chloro-5-methoxycarbonylmethyl-3-biphenyl)- β -D-glucopyranosiduronate (IX): Methyl-4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetate³⁾ 16.6 g と methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-1-bromo-1-deoxy- α -D-glucuronate 28 g にイソキノリン 28 ml とキノリン 40 ml を加え -5° で 20 分間攪拌した後 Ag_2O 16.34 g を徐々に加える。3 時間攪拌後 CHCl_3 1 l を加え不溶物を除去し、3N HCl、蒸留水で洗浄し MgSO_4 で乾燥する。減圧下溶媒を留去し、得られた油状物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (6.5 cm×40 cm, benzene: AcOEt=4:1) により精製する。これを $(\text{AcO})_2\text{O}$ 50 ml, pyridine 20 ml に溶解し室温で一夜放置したのち氷水中に注ぎ、 CHCl_3 抽出を行なう。 CHCl_3 層を 3N HCl、蒸留水で洗浄後、溶媒を留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製したのち EtOH で再結晶を行ない IX を無色針状結晶として得た。mp 92.5—95.5°, 4.5 g. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{ClO}_{12}$: C, 56.71; H, 4.93; Cl, 5.98. Found: C, 56.53; H, 4.83; Cl, 6.00.

2) VIII: IX 3.6 g に MeOH 10 ml と NaOH 1.82 g H_2O 5 ml を加え 1 時間還流する。減圧下 MeOH を留去し、残渣を氷冷却下に 10% HCl で pH 1—2 とする。塩析後、AcOEt で抽出し、飽和 NaCl 液で洗浄、 MgSO_4 で乾燥し溶媒を留去し結晶を得た。これを AcOEt で再結晶し VIII を無色粉末結晶として得た。mp 191—193° (dec.), 1.6 g. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClO}_9$: C, 54.74; H, 4.36; Cl, 8.08. Found: C, 54.54; H, 4.22; Cl, 8.06. $[\alpha]_D^{25} = -72.3^\circ$ ($c=0.703$ in H_2O).

3. 実験動物 代謝実験には体重 150—200 g、抗炎症作用の測定には体重 120—150 g のいずれも Wistar 系雄性ラットを用いた。

4. 放射活性 (^{14}C) の測定 尿、胆汁は蒸留水で一定容積に希釈した後、糞の EtOH 抽出物はそのまま 0.5 または 1 ml をバイアルに採取し、ジオキサン系シンチレーター (ppo 15 g, popop 0.28 g, naphthalene 112 g/

6) G.N. Bollenbach, J.M. Long, D.G. Benjamin, J.A. Lindquist, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3310 (1955).

11 dioxane) 12 ml を混和して堀場 LS-500 型液体シンチレーションカウンター (LSC) で ^{14}C を測定した。また薄層クロマトグラフィー (TLC) 上の ^{14}C はプレートより削りとり蒸留水 1 ml で抽出しジオキサンシンチレーター 12 ml を加えて一夜放置後測定した。計数効率は外部標準チャンネル比法および内部標準法によって求め計数値を補正した。

5. 薄層クロマトグラフィー (TLC) シリカゲルプレート (Kieselgel GF₂₅₄, Merck: Kieselgel G, Merck=1:1, 厚さ 0.25 mm, 120°, 2 時間活性化) を用い, 展開溶媒は solv. 1: CHCl_3 ·acetone·AcOH (16:3:1, v/v), solv. 2: benzene·EtOH·40% dimethylamine (4:5:1, v/v), solv. 3: ether. isopropyl ether·MeOH·40% dimethylamine (12:8:5:4, v/v), solv. 4: 水飽和 *n*-butanol, solv. 5: CHCl_3 ·acetone·AcOH (3:16:1, v/v), solv. 6: CHCl_3 ·acetone·AcOH (5:14:1, v/v), solv. 7: acetone·benzene (10:1, v/v) の 7 種類を用いた。呈色試薬は Pauly 試薬, naphthoresorcine 試薬を用い, UV ランプを併用した。なお TLC の radiochromatogram は Radiochromatogram Scanner System (ALOKA JTC 201) を用いて作成した。

6. 投与量, 投与方法 DKA-9 あるいは ^{14}C -DKA-9 を Na 塩として少量の水に溶解させたのち, 生理食塩液を加えて投与液を調製した。代謝物の検索と定量には一夜絶食したラットを用いて 12.5 mg (100 μCi)/kg の ^{14}C -DKA-9 を静脈内または経口投与し, 代謝物を単離精製する場合には 50 mg/kg の DKA-9 を腹腔内に投与した。

7. 代謝物の検索 ^{14}C -DKA-9 を投与したのち得られた尿 (24 時間), 胆汁 (6 時間) および糞 (48 時間) について凍結乾燥, 酵素分解 (arylsulfatase, β -glucuronidase, pH 5.5, 37°, 24 時間), 溶媒抽出を行ない, 試料を得, TLC を用いて代謝物を検索した。

8. 代謝物の単離, 同定 1) M_0 , M_1 , M_3 —延 50 匹のラットに DKA-9 (全量 0.50 g) を投与して 24 時間までの尿を採取した。尿を凍結乾燥後, 少量の蒸留水を加え不溶物を除去したのち HCl を加えて pH 1 に調整した。調整後 3 倍量の benzene, AcOEt でそれぞれ 3 回抽出を行ない, 抽出液を減圧下濃縮した。Benzene 抽出物については preparative TLC (solv. 2 を用い, 展開後 MeOH で溶出) を行ない M_0 (未変化 DKA-9), M_3 (α -OHDKA-9) を分離した。さらに分離精製するために preparative TLC を M_0 (solv. 4→solv. 1), M_3 (solv. 4→solv. 4) について行ない, 得られた代謝物はそれぞれ acetone 50 μl に溶解後, N,O -bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide 10 μl で trimethylsilyl 化し, GC-MS 測定試料とした。AcOEt 抽出物も benzene 抽出物同様 preparative TLC (solv. 2→solv. 2→solv. 3→solv. 4→solv. 2, MeOH 溶出) を行ない IV (DKA-24S) の aglycone である M_1 を得た。⁷⁾ これを CHCl_3 , benzene で再結晶し, mp 142—143° の無色粉末状結晶 (M_1) を得た。

2) M_2 —延 135 匹のラットに DKA-9 (全量 1.35 g) を投与した。得られた 24 時間尿を Amberlite XAD-2 樹脂 500 ml に吸着させ, MeOH 500 ml で溶出した。溶出液を減圧下濃縮し, preparative TLC (solv. 4→solv. 6, MeOH 溶出) を行ない M_2 を分離精製した。得られた M_2 を 1N KOH に溶解後, 6N HCl を加え析出した結晶をろ取り EtOH-H₂O で再結晶して mp 125—210° (dec.) の無色板状結晶 (M_2) を得た。

3) M_4 —胆管カニューレションを施したラット 10 匹に DKA-9 (全量 100 mg) を投与して 6 時間までの胆汁を氷水中に採取した。得られた胆汁に HCl を加えて pH 1 に調整後, 3 倍量の AcOEt で 3 回抽出し, 抽出液を減圧下濃縮した。得られた AcOEt 抽出物について preparative TLC (solv. 5)⁸⁾ を行ない M_4 (DKA-9 acyl glucuronide) を分離した。AcOEt 抽出物を減圧下濃縮し, 氷冷下少量の MeOH に溶解させ, 直ちに CH_2N_2 の ether 溶液⁹⁾ を加えて 10 分間放置し methyl 化を行なった。これを $(\text{AcO})_2\text{O}$ -pyridine で acetyl 化したのち preparative TLC (solv. 7 CH_2Cl_2 で溶出) を用いて精製した。得られた M_4 の methyl-acetyl 誘導体を EtOH で再結晶し, mp 164.5—166° の無色針状結晶を得た。

9. スペクトルの測定 マススペクトル 日立 RMU-6MG 質量分析計を使用し, 試料導入は直接導入系およびガスクロマトグラフィー導入系を用いて次の条件で測定した。直接導入: イオン化電圧; 70 eV, イオン加速電圧; 3.2 kV, イオン化室温度; 140°, 試料加熱温度; 90—100°。ガスクロマトグラフィー導入: イオン化電圧 20 eV, イオン加速電圧; 3.2 kV, イオン化室温度; 200°, 注入口温度; 250°, カラム温度; 140—180°, カラム; 1 m $\times$ 3 mm (ガラスカラム), 充填剤; Diasolid ZS (80—100 mesh), He; 1.2 kg/cm²。

赤外吸収 (IR) スペクトル 日立赤外分光々度計 215 型を使用し, KBr 法によって測定した。

10. 代謝物の定量 1) 尿中代謝物— ^{14}C -DKA-9 投与尿 (24 時間尿) を採取して一定容積に希釈後, 一定量をシリカゲルプレートにスポットして solv. 1 で展開した。次に各代謝物部位のシリカゲルを削りとり, 蒸留水 1 ml に分散させたのち LSC により ^{14}C を測定した。各代謝物の排泄率は各代謝物部位の ^{14}C とスポットした ^{14}C の比を求め, 尿中排泄率を乗じて算出した。

2) 胆汁中代謝物— ^{14}C -DKA-9 投与胆汁 (6 時間胆汁) を氷水中に採取し, 一定容積に希釈後, 一定量をシリ

7) DKA-24S は酸性水溶液から AcOEt で抽出すると定量的に加水分解されて DKA-24 として AcOEt 層に抽出される。

8) Ester 交換を防ぐため 0.01N HCl で溶出し, AcOEt 抽出を行なった。

9) 上尾庄次郎, 佐々木喜男, “実験化学講座・18 巻, 有機化合物の反応 II (下),” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1958, p. 528。

カゲルプレートにスポットして尿と同様の操作を行なった。別に胆汁中の抱合体を分解するため,¹⁰⁾ 一定量を取り同量の 0.2N NaOH を加え 50°, 2 時間加熱した。冷却後 1N HCl を加えて酸性にしたのち AcOEt で 3 回抽出を行ない,¹¹⁾ 濃縮後その一部をシリカゲルプレートにスポットし, solv. 1 で展開した。以下尿と同様の操作を行ない DKA-9, DKA-24 量を求め, deconjugation を行なわない場合の量を差し引くことによって抱合体量を求めた。

3) 糞中代謝物——¹⁴C-DKA-9 投与糞 (48 時間糞) を乾燥後, 粉碎し EtOH 中に懸濁振盪して抽出を行ない (X4), 抽出液を減圧下濃縮し, 尿, 胆汁と同様の操作を行ない定量した。

11. 抗炎症試験 カラゲニン足蹠浮腫法によってラットに被検物質を 12.5 mg/kg の割合に静脈内投与後, 1% carrageenin 液を足蹠皮下に注入し, 経時的な浮腫率を測定した。なおブランクとして被検物質を含まない生理食塩液を投与したものについて同時測定を行なった。

実 験 結 果

代謝物の検索

1) Authentic Sample の TLC DKA-9 とやや構造が類似している酸性抗炎症剤の代謝については現在までに種々報告されているが,¹²⁾ 主として環の酸化およびそれに伴う抱合, 側鎖 (たとえば酢酸部分) の酸化, carboxyl 基の抱合等によって代謝の進行していることが判明している。著者らはこれらの報告をもとに DKA-9 について考えられる 6 種類の代謝物を合成し, 標品とした。そこで DKA-9 を含めてこれら化合物について数種の展開溶媒を用いて TLC を行ない, 得られた結果を Table I に示した。

2) 尿中代謝物の検索 12.5 mg/kg の ¹⁴C-DKA-9 を静脈内投与して得た 24 時間尿について各条件で radiochromatogram を作成しその一部を Fig. 1 に示した。(1) は投与尿を solv. 1 で展開して得られたもので 4 つの ¹⁴C ピーク (M₀, M₁, M₂, M₃) が認められた。そこでこれらのピークと合成標品の R_f-値を比較したところ Table I, Fig. 1 に示すように M₀ と DKA-9, M₁ と DKA-24, M₂ と DKA-24S および M₃ と α-OHDKA-9 がそれぞれ一致した。(2) は投与尿を HCl で pH 1 とし 3 倍量の benzene で抽出を行ない, solv. 1 で展開したもので尿中 ¹⁴C の約 6% に相当するものであり,¹³⁾ M₀, M₁, M₂ および M₃ の ¹⁴C ピークが認められるが

TABLE I. R_f Values of Metabolites of DKA-9 and Authentic Compounds in Various Solvent Systems

	Solv. 1	Solv. 2	Solv. 3	Solv. 4
M ₀	0.74	0.80	0.62	0.45
DKA-9	0.74	0.79	0.61	0.44
M ₁	0.63	0.64	0.50	0.46
DKA-24	0.63	0.64	0.50	0.47
M ₂	0.00	0.30	0.31	0.28
DKA-24S	0.00	0.30	0.32	0.28
M ₃	0.30	0.71	0.56	0.25
α-OHDKA-9	0.28	0.71	0.56	0.26
m,a-M ₄ ^{a)}	1.00	0.95	0.98	0.84
m,a-DKA-9G ^{a)}	0.98	0.99	1.00	0.87
M ₅	0.35	0.75	0.55	0.30
DKA-9gly.	0.35	0.75	0.57	0.30
DKA-240G	0.00	0.04	0.01	0.10

a) Methylated-acetylated M₄ and DKA-9G (DKA-9 acyl glucuronide).

10) DKA-9G.

11) 胆汁中の ¹⁴C は 100% 抽出される。

12) たとえば R.E. Harmer, M.A.P. Meisinger, G.E. Davis, F.A. Kuehl, Jr, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **143**, 215 (1964).

13) 12.5 mg/kg の ¹⁴C-DKA-9 を静脈内あるいは経口投与した場合, 投与した ¹⁴C の約 80% が尿中に 24 時間で排泄される。⁵⁾

Fig. 1. Thin-Layer Radiochromatograms of the Rat Urine after Intravenous Administration of ^{14}C -DKA-9 (Solv. 1)

(1) urine, (2) benzen extract of the rat urine.

M_2 は (1) に比較して著しく小さく benzene に抽出されがたい極性代謝物と考えられる。また投与尿を aryl-sulfatase (Sigma Type H-2) 処理した場合, solv. 1 で展開した radiochromatogram では (1) で認められた M_2 の ^{14}C ピークが完全に消失しほぼ定量的に M_1 の ^{14}C ピークが出現した。この現象は AcOEt で抽出を行なった場合にも認められ、さらに投与尿を solv. 2 で展開した場合、(1) で原点付近に存在した M_2 ピークが DKA-24S と同じ R_f 値 0.3 に移行し単一代謝物と考えられ、これらのことから M_2 は M_1 の硫酸抱合体であると推定した。次に (2) の M_3 部分を MeOH で抽出し、再び solv. 1 で展開して radiochromatogram を作成したところ、 M_3 のピークよりもわずかに R_f 値の大きい微量代謝物 (M_5) ピークが新たに認められた。このピークは合成標品と R_f 値を比較したところ Table I に示すように DKA-9 gly. (I) と一致した。

以上の結果、 ^{14}C -DKA-9 を静脈内投与した場合、投与後 24 時間までに尿中に排泄される代謝物は 4 種類で未変化体 M_0 はわずかしき排泄されなかった。また M_2 が量的に非常に多く主代謝物であることが判明した。なお経口投与の場合についても同様の検索を行なったが、静脈内投与の場合と全く同じ結果が得られ投与経路による差は認められなかった。

3) 胆汁中代謝物の検索 12.5 mg/kg の ^{14}C -DKA-9 を静脈内投与して得た胆汁について各条件で radiochromatogram を作成し Fig. 2 に示した。(1) は胆汁を solv. 1 で展開したものであるが、原点に大きな ^{14}C ピークが認められるほかは DKA-9, DKA-24 の R_f 値に相当する部分にわずかな ^{14}C の存在が認められるにすぎなかった。しかし胆汁を室温に放置すると経時的に DKA-9 に相当する部分の ^{14}C が増加する現象が認められ、抱合体の存在を示唆した。(2) は胆汁を HCl で pH 1 とし 3 倍量の AcOEt で抽出を行ない solv. 1 で展開したもので (1) で原点に集中していた ^{14}C が M_1 部と原点に分布し、(1) の原点部の ^{14}C 中には一部 M_2 に由来するものの存在することが判明した。(3) は胆汁を arylsulfatase, β -glucuronidase (東京臓器化学製) 混合物で処理して solv. 1 で展開したもので (2) で認められた原点の ^{14}C がほぼ定量的に M_0 部に移行していることが判明した。また (2) と (3) の M_1 部の ^{14}C がほぼ等しく、 M_1 glucuronide は存在しないものと考えられる。した

Fig. 2. Thin-Layer Radiochromatograms of the Rat Bile after Intravenous Administration of ^{14}C -DKA-9 (solv. 1)

(1) bile, (2) AcOEt extract of the rat bile, (3) bile treated with arylsulfatase and β -glucuronidase.

Fig. 3. Gas Chromatograms and Mass Spectra of DKA-9 and M_0
(as trimethylsilylated form)

Fig. 4. Mass Spectra and Infrared Spectra (KBr) of DKA-24 and M_1

がって胆汁中には4種の化合物が排泄されるが、その大部分が M_0 の acyl glucuronide (M_4) であることが明らかとなった。

3) 糞中代謝物の検索 12.5 mg/kg の ^{14}C -DKA-9 を静脈内投与して得た糞を乾燥し、EtOH 抽出を行なったところ糞中 ^{14}C の約 80% が EtOH 層に抽出された。EtOH 層を solv. 1 で展開した radiochromatogram では M_0 の大きな ^{14}C ピークが認められるのに反し、原点付近には小さなピークしか認められず抱合体量の少ないことが判明した。原点部の ^{14}C についてはアルカリ分解後 TLC を行なったところ M_0 部に移行したことより M_4 と考えられる。

代謝物の同定

M_0 DKA-9 投与尿の benzene 抽出物から分離精製を行ない約 1 mg の無色アメ状物質 (M_0) を得た。この物質を trimethylsilyl 化したのち GC-MS で測定したところ Fig. 3 に示すように合成標品の trimethylsilyl 化体と retention time (t_R) およびマススペクトルが一致し、 M_0 を DKA-9 と同定した。

M_1 DKA-9 投与尿の benzene 抽出物および AcOEt 抽出物から分離精製を行ない約 3 mg の無色結晶を得た。この化合物のマススペクトル、IR スペクトルを Fig. 4 に示すが、いずれも合成標品 DKA-24 と完全に一致した。また M_1 と DKA-24 について混融試験を行なったが融点降下は認められなかった。これらの結果より M_1 を DKA-24 と同定した。

M_2 DKA-9 投与尿について Amberlite XAD-2 樹脂を用い分離を行ない、精製後 117 mg の無色結晶を

得た。この化合物の IR スペクトルを測定したところ Fig. 5 に示すように合成標品 DKA-24S と完全に一致した。また C, H および S について元素分析を行なったところいずれも理論値の 0.5% 以内の測定値を得た。Anal. Calcd. $C_{14}H_{10}ClKO_6S \cdot H_2O$: C, 42.16; H, 3.03; S, 8.04. Found: C, 42.49; H, 2.81; S, 8.35. これらの結果より M_2 は DKA-24S と同定した。

M_3 M_0 の精製と併行して約 0.1 mg の無色アメ状物質 (M_3) を得た。この物質を trimethylsilyl 化したのち GC-MS で測定したところ Fig. 6 に示すように合成標品 α -OHDKA-9 の trimethylsilyl 化体と t_R およびマススペクトルが完全に一致し、 M_3 を α -OHDKA-9 と同定した。

M_4 DKA-9 を投与して得た胆汁について精製を行ない無色アメ状物質 (M_4) 約 3 mg を得た。代謝物の検索の項で述べたように M_4 は酵素処理あるいはアルカリ加水分解で DKA-9 を aglycone として生ずることより DKA-9 acylglucuronide (DKA-9G) と考えられるが、得られた M_4 について solv. 4 で TLC を行ない naphthoresorcin 試薬で呈色を行なったところ M_4 部が陽性となり、グルクロナイドの存在を確認した。さらに M_4 を methyl-acetyl 化して結晶を得、マススペクトル, IR スペクトル, を測定したところ Fig. 7, Fig. 8 に示すように DKA-9G の methyl-acetyl 誘導体 (VII) と完全に一致し、混融試験を行なっても融点降下を認めなかった。これらの結果より M_4 を DKA-9G と同定した。

代謝物の定量

尿中代謝物 ^{14}C -DKA-9 を 12.5 mg/kg 静脈内投与して得た 24 時間尿について定量法にしたがって定量を行なったところ、DKA-24S が投与量の 72.4% を占め主代謝物であり、DKA-9, DKA-24 および α -OHDKA-9 はそれぞれ 1.2%, 1.8%, 0.5% と少量であることが判明した。DKA-9gly. は 0.05% 以下で DKA-9 の代謝の場合 glycine conjugation は minor process であることが判明した。

胆汁中代謝物 ^{14}C -DKA-9 を投与後 6 時間までに投与した ^{14}C の 35.4% が胆汁中に排泄され、⁵⁾ DKA-9G が 28%, DKA-24S が 4.2% を占め、胆汁中には 90% 以上が抱合体として排泄された。しかし DKA-9, DKA-24 および α -OHDKA-9 はそれぞれ 0.9%, 0.2%, 0.2% と微量で、DKA-9gly. は認められなかった。

糞中代謝物 投与後 48 時間までに投与した ^{14}C の 8.5% が糞中に排泄され、そのうちの 77.6% が EtOH

Fig. 5. Infrared Spectra of DKA-24S and M_2 (KBr)

Fig. 6. Gas Chromatograms and Mass Spectra of α -OHDKA-9 and M_3 (as trimethylsilylated form)

Fig. 7. Mass Spectra of Methylated-acetylated DKA-9G and M_4

a: methylated-acetylated DKA-9G.

b: methylated-acetylated M_4 .

Fig. 8. Infrared Spectra of Methylated-acetylated DKA-9G and M_4 (KBr)

に抽出された。EtOH 抽出物について定量を行なったところ DKA-9 が 5.2% と多く、DKA-24, DKA-24S, DKA-9G および α -OHDKA-9 はそれぞれ 0.7%, 0.1%, 0.5%, 0.1% と微量であった。胆汁中に排泄される ^{14}C 量および代謝物より考えると、胆汁中に排泄される ^{14}C の相当部分が消化管より再吸収されることおよび胆汁中の主代謝物である DKA-9G が消化管内でほぼ完全に加水分解されることが示唆された。

DKA-9 および代謝物の抗炎症作用

DKA-9 をラットに投与した場合の代謝物については DKA-24, DKA-24S, α -OHDKA-9 および DKA-9G を同定し得たが、DKA-9G は血液中には存在し得ないと考えられ、また未同定の DKA-9gly. も微量でともに薬効寄与は無視できる。そこで薬効を示す物質を知る目的で DKA-9 および上述 3 種の代謝物について carrageenin 浮腫抑制作用を測定したところ Fig. 9 に示すように DKA-9 を除いて生理食塩液を投与した場合とほとんど等しい経時的な浮腫率を示し、抗炎症作用は認められなかった。したがって各代謝物の体内量を考えると代謝物の薬効寄与はほとんど期待できず、DKA-9 が薬効発揮の本体であることが判明した。

Fig. 9. Time Course of Edema Formation induced by Carrageenin after Intravenous Administration of 12.5 mg/kg DKA-9 and Metabolites (●) and Saline as a Standard (○)

Each point represents the mean $\pm$ S.E.

考 察

本検討に用いた ^{14}C -DKA-9 は実験の部で述べたようにカルボン酸部分を ^{14}C 標識したもので Myalex¹⁴) の場合

14) D.M. Foulkes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **172**, 115 (1970).

Chart 1. Possible Metabolic Pathways of DKA-9 in Rat

のように decarboxylation が生じた場合代謝検討には不適当と考えられる。そこでもし生体内で decarboxylation が生起すれば $^{14}\text{CO}_2$ が呼気中に排泄されるものと考え、ラットを用いて ^{14}C -DKA-9 を投与したのちの呼気を $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液中に捕集して ^{14}C を測定したが、投与後 24 時間までにおいてもほとんど ^{14}C を認めず decarboxylation を否定する結果が得られた。したがって本検討に用いた ^{14}C -DKA-9 は十分に目的に適した化合物であることが判明した。

代謝物の検索は主として TLC を用いて行なったが、GC-MS を併用した検討から dechlorination あるいは phenyl 基脱離などの代謝経路は認められず、抱合、酸化的脱メチル化を中心に投与された DKA-9 は体内でほとんど代謝されることが判明した。代謝物としては DKA-24, DKA-24S, α -OHDKA-9 および DKA-9G (methyl acetyl 体として) の 4 種を同定し得たが、DKA-9gly. は微量で同定に要する量を単離し得なかった。したがってラットにおける DKA-9 の推定代謝経路は Chart 1 に示すように主として DKA-9 の glucuronide formation と 5 位の methoxy 基の desmethylation とそれに続く sulfation の 2 つの経路で代謝が進行し、最終主代謝物である DKA-9G は胆汁を介して消化管に、DKA-24S は尿中に排泄されることが判明した。

一般に acyl glucuronide はアルカリ性で不安定、酸性で安定と言われている。¹⁵⁾ インドメサチンの acyl glucuronide はアンモニアを含む展開溶媒で TLC を行なうと展開中酸アミドを生成し、また MeOH 溶液にして放置するとエステル交換によって methyl ester 体を生成することが報告されている。¹²⁾ DKA-9G についても同様の現象が認められた。すなわち DKA-9G をアルカリ性の solv. 3 で TLC を行なうと、Fig. 10 に示すように DKA-9 と未知物質に分解され、未知物質を単離してマスペクトルを測定したところ合成標品 methyl 4'-chloro-5-methoxy-3-biphenylacetate³⁾ と一致した。この事実は遊離酸 (DKA-9, DKA-24) がこの条件で TLC を行なっても methyl ester 体を生成しないことより acyl glucuronide の検出法に應用できるものと考えられる。

DKA-24 の glucuronide の存在はラットにおいては生成しないか微量と考えられるが、構造上エーテル型 (DKA-24OG; VIII) とエステル型 (DKA-24G) の 2 種が考えられる。DKA-24 OG はアルカリ性で安定で 0.1N NaOH 中 50°, 2 時間放置してもまったく分解が認められず、酵素分解によって定量的に aglycone DKA-24 を生成することが認められた。また AcOEt 抽出の際にもまったく分解が認められなかった。したがって尿を solv.

Fig. 10. Thin-Layer Radiochromatogram of the Rat Bile after Intravenous Administration of ^{14}C -DKA-9(solv. 3)

15) ラデュ・マンデル・ウェイ (麻生芳郎, 大森義仁監訳), “新しい薬物代謝学,” 広川書店, 東京, 1974, p. 147.

2 で TLC を行ない標品と比較して DKA-24OG が認められないこと、また胆汁では Fig. 2 (2), (3) を比較することにより、DKA-24OG は存在しないものと考えられる。また胆汁について solv. 3 で TLC を行なっても DKA-24 の methyl ester 体である methyl 4'-chloro-5-hydroxy-3-biphenylacetate (DKA-24M) が生成せず、DKA-24G の存在も否定された。なお種差検討においてヒト、猿尿中より DKA-24M を TLC より確認、同定し DKA-24G の存在を推定している。¹⁾

以上ラットにおける DKA-9 の代謝の全貌をほぼ明らかにし得た。そこで DKA-9 を投与した場合体内に存在する代謝物について抗炎症作用への寄与を carrageenin 浮腫抑制率を測定することによって検討したが、いずれの代謝物もほとんど薬効を示さなかった。DKA-9 が主として肝臓で代謝される¹⁶⁾ 事実より作用部位への移行に関しては DKA-9 を投与した場合と各代謝物を投与した場合と差がないものと考えられ、したがって DKA-9 を投与した場合各代謝物の薬効への寄与は考えられず、薬効は DKA-9 のみによるものであることが判明した。

16) 肝臓還流法で DKA-9 の代謝を検討したところ、ほぼ *in vivo* の結果と一致した。(薬誌投稿予定)